

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FASULYE'DE (*Phaseolus vulgaris* L.) *B-BOX* GEN AİLESİ ÜYELERİNİN
GENOM ÇAPINDA TANIMLANMASI, GELİŞİM VE STRES TEPKİLERİ
SIRASINDA İFADELERİ

Onur Altay AKDAŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FASULYE'DE (*Phaseolus vulgaris* L.) B-BOX GEN AİLESİ ÜYELERİNİN GENOM ÇAPINDA TANIMLANMASI, GELİŞİM VE STRES TEPKİLERİ SIRASINDA İFADELERİ

Onur Altay AKDAŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Çinko parmak transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonu düzenleyen diziye özgü DNA bağlayıcı proteinlerdir. DNA bağlama alanı, sistein ve histidin kalıntılarının kombinasyonları yoluyla çinko iyonlarını koordine eden çinko parmaklar tarafından oluşturulur. Çinko parmak transkripsiyon faktörlerinin (ZFTF'ler), bir sınıfı olan B-BOX proteinleri (BBX'ler), çoklu işlevleri nedeniyle son yıllarda oldukça ilgi görmektedir. B-BOX proteinleri, bir veya iki B-BOX alanına ve bazı durumlarda bitkinin gelişiminde önemli roller oynayan ek bir CCT (CO, CO-benzeri ve TOC1) motifine sahip çinko parmak transkripsiyon faktörleri sınıfını kodlar. B-BOX'lar, aynı zamanda bitki büyümesi ve gelişiminin kontrolünde yer alan karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturmak için çeşitli faktörlerle etkileşime giren proteinlerdir. B-BOX proteinleri ışık sinyalleri, bitkilerde çiçeklenme, fotomorfogenez ve pigment birikimi gibi bir dizi fizyolojik ve gelişimsel sürece aracılık eder. Ortaya çıkan kanıtlar, bir grup B-BOX proteininin (BBX'ler) bu ışık aracılı gelişim süreçlerinde merkezi oyuncular olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. Dünyada yaygın olarak tüketilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), geleneksel insan beslenmesinde kilit rol oynamaktadır. Son zamanlarda, özellikle yüksek protein, nişasta, diyet lifi, mikro besinler ve düşük yağ seviyelerine sahip biyoaktif içeriği nedeniyle insan beslenmesinde kullanımına yönelik teşvik edici gelişmeler yaşanmıştır. Tüm bu doğrultular kapsamında tamamlanan bu tezde, *Phaseolus vulgaris* genomunda bulunan B-BOX proteinlerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve biyoinformatik analizleri gerçekleştirilerek, çeşitli abiyotik stresler altında qRT-PCR aracılığıyla gen ifadelerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Temmuz 2024, 93 sayfa

Anahtar Kelimeler fasulye (*P. vulgaris* L.); B-BOX gen ailesi; genom çapında karakterizasyon; transkriptom analizi; gen ifadesi analizi

ABSTRACT

Master Thesis

GENOME-WIDE IDENTIFICATION OF B-BOX GENE FAMILY MEMBERS IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND THEIR EXPRESSION DURING DEVELOPMENT AND STRESS RESPONSES

Onur Altay AKDAŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Zinc finger transcription factors are sequence-specific DNA binding proteins that regulate transcription. The DNA binding domain is formed by zinc fingers that coordinate zinc ions through combinations of cysteine and histidine residues. B-BOX proteins (BBXs), a class of zinc finger transcription factors (ZFTFs), have attracted much attention in recent years due to their multiple functions. B-BOX proteins encode a class of zinc finger transcription factors with one or two B-BOX domains and, in some cases, an additional CCT (CO, CO-like and TOC1) motif that plays important roles in plant development. B-BOXs are proteins that interact with various factors to form a complex regulatory network that is also involved in the control of plant growth and development. B-BOX proteins mediate a number of physiological and developmental processes such as light signals, flowering, photomorphogenesis and pigment accumulation in plants. Emerging evidence suggests that a group of B-BOX proteins (BBXs) function as central players in these light-mediated developmental processes. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), widely consumed around the world, play a key role in traditional human nutrition. Recently, there have been encouraging developments for its use in human nutrition, especially due to its bioactive content with high protein, starch, dietary fiber, micronutrients and low fat levels. In this thesis project, which is aimed within the scope of all these directions, it is planned to identify, characterize and bioinformatics analyzes of B-BOX proteins in the *Phaseolus vulgaris* genome and reveal gene expressions through qRT-PCR under various abiotic stresses.

July 2024, 93 pages

Key Words common bean (*P. vulgaris* L.); *B-BOX* gene family; genome-wide characterization; transcriptomic analysis; expression profiling

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin başından itibaren, sağladığı olanaklar ve tüm destekleri için danışman hocam sayın Prof. Dr. Emine Sümer ARAS'a, tez çalışmam dahil olmak üzere üzerimde birçok emeği olan sayın hocam Prof. Dr. İlker BÜYÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve benden desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Aybüke OKAY ve Merve Nur ŐANLI'ya,

Eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen ve beni her zaman başarabileceğime inandıran sevgili babam Kemal AKDAŞ'a ve burada olmasa bile desteğini ve sevgisini sonsuza kadar hissedeceğim, hayatımdaki en özel insan olan sevgili annem Nurgül AKDAŞ'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, FYL-2022-2760 numaralı proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir. Destekleri için Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Onur Altay AKDAŞ
Ankara, Temmuz 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Fasulye (Phaseolus vulgaris) Hakkında Genel Bilgiler	1
1.1.1 Fasulyenin tarihçesi ve coğrafi dağılımı	2
1.1.2 Fasulye bitkisinin sınıflandırılması	6
1.1.3 Fasulye bitkisinin besin değerleri	7
1.1.4 Fasulye bitkisinin yetiştirilme koşulları	8
1.1.5 Fasulyede görülen hastalıklar	8
1.1.5.1 Bakteriyel hastalıklar	9
1.1.5.2 Mantar hastalıkları	10
1.1.5.3 Paraziter hastalıklar	11
1.1.5.4 Viral hastalıklar	12
1.1.6 Bitkilerde abiyotik stres	13
1.1.6.1 Bitkilerde kuraklık stresi	13
1.1.6.2 Bitkilerde tuz stresi	14
1.1.7 Bitkilerde sirkadiyen ritim	20
1.2 B-BOX Gen Ailesi	21
1.2.1 Bitkilerde transkripsiyon faktörleri	21
1.2.2 B-BOX proteinleri	21
1.2.2.1 B-BOX proteinlerinin bitki çimlenmesi üzerindeki etkileri	24
1.2.2.2 B-BOX proteinlerinin çiçek oluşumu üzerindeki etkileri	25
1.2.2.3 B-BOX proteinlerinin sirkadiyen ritim ile ilişkisi	26
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1 Phaseolus vulgaris'te B-BOX Genlerinin Tanımlanması	31

3.2 B-BOX Geninin Yapısı, Fiziksel Konumları, Korunmuş Motifleri ve Domainleri.....	32
3.3 B-BOX Gen Ailesinin Filogenetik Analizi ve Dizi Hizalaması.....	35
3.4 B-BOX Promotörlerinin Analizi.....	36
3.5 PvBBX Proteinlerinin 3 Boyutlu Yapısının Görselleştirilmesi	37
3.6 PvBBX Genlerinde miRNA Hedef Tahmini	38
3.7 Genlerin Duplikasyonları ve Ortolog İlişkilerinin Analizi.....	39
3.8 PvBBX Genlerinde Dokuya Özgü mRNA Seviyelerinin İncelenmesi	41
3.9 B-BOX Proteinlerinin Hücre İçi Konumları	42
3.10 Transkriptom Verileri Aracılığıyla PvBBX Genlerinin Tanımlanmış Ekspresyon Seviyesi	43
3.11 Bitki Materyalleri ve Büyüme Koşulları.....	43
3.12 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qPCR Analizleri	43
3.13 Primer Dizaynı	45
3.14 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1 B-BOX Üyelerinin Filogenetik Analizi, Motif ve Domain Analizi, Gen yapısı, 3 Boyutlu Protein Yapısı, Fonksiyonel Özelliklerine Göre Karakterizasyonları ve Sınıflandırılması.....	50
4.2 P. vulgaris'te PvBBX Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve P. vulgaris ve Diğer Türler Arasındaki Sinteni Analizi.....	54
4.3 B-BOX Genlerinin Promotor Analizi.....	62
4.4 PvBBX Üyelerinin Dokuya Özgü mRNA Düzeylerinin Analizi	67
4.5 Kuraklık ve Tuz Stresi Altındaki PvBBX Genlerinin RNAseq Analizi.....	68
4.6 PvBBX Üyelerinin miRNA Analizi.....	69
4.7 RNA İzolasyonu.....	72
4.8 cDNA İzolasyonu	73
4.9 qRT-PCR Analizi Yoluyla PvBBX Genlerinin Tuz Stresine Yanıt Olarak Rollerini	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	77
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ.....	93

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
aa	Aminoasit
ACT	Aktin
cDNA	Komplementer DNA
Ca	Kalsiyum
Cl	Klor
cm	Santimetre
Cu	Bakır
da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Demir
gr	Gram
H	Hidrojen
ha	Hektar
K	Potasyum
ka	Homolog Olmayan Değişim Oranı
kcal	Kilokalori
ks	Homolog Değişim Oranı
L	Litre
M	Molar
Mg	Magnezyum
miRNA	MikroRNA
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn	Manganez
mol	Mol
Na	Sodyum
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik asit
Tm	Erime Sıcaklığı
Zn	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 2009-2019 Yılları Arası Dünya Fasulye Üretim Miktarı ve Ekim Alanı	4
Şekil 1.2 2019 yılında kıtalara göre fasulye tohumu üretim payı	4
Şekil 1.3 Fasulye ekim alanında önde gelen ülkeler	5
Şekil 1.4 Fasulye üretiminde önde gelen ülkeler	5
Şekil 1.5 Abiyotik strese karşı tepkinin genel modeli	16
Şekil 1.6 Temsili Bir Türün Yaprak Hareketleri.....	20
Şekil 3.1 Phytozome veri tabanı.....	31
Şekil 3.2 NCBI Blast veri tabanı.....	32
Şekil 3.3 Expasy Protparam veri tabanı	32
Şekil 3.4 TBtools programı kromozom haritası görüntüleme aracı.....	33
Şekil 3.5 Gene Structure Display Server veri tabanı.....	33
Şekil 3.6 MEME motif görselleştirme aracı	34
Şekil 3.7 NCBI Conserved Domain Search aracı	34
Şekil 3.8 TBtools programı gen yapısı, motif ve domain görüntüleme aracı	35
Şekil 3.9 MEGA11 programı	35
Şekil 3.10 iTOL veri tabanı.....	36
Şekil 3.11 Phytozome veri tabanı genomik dizi aracı.....	36
Şekil 3.12 PlantCARE veri tabanı.....	37
Şekil 3.13 Phyre2 veri tabanı	37
Şekil 3.14 MiRBase v21.0 veri tabanı	38
Şekil 3.15 Cytoscape programı	38
Şekil 3.16 JGI Data Portal veri tabanı.....	39
Şekil 3.17 TBtools programı sinteni analizi aracı.....	39
Şekil 3.18 TBtools programı Ka/Ks hesaplama aracı	40
Şekil 3.19 TBtools programı Circos aracı.....	40
Şekil 3.20 Phytozome veri tabanı bitki doku ısı haritası grafiği	41
Şekil 3.21 TBtools programı ısı haritası grafiği oluşturma aracı.....	42
Şekil 3.22 WoLF PSORT veri tabanı.....	42
Şekil 4.1 B-BOX genlerinin tahmini hücre içi lokalizasyonları.....	51

Şekil 4.2 İki bitki türünden, <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ve <i>Arabidopsis thaliana</i> , B-BOX proteinlerinin filogenetik analizi.....	51
Şekil 4.3 PvBBX'lerin NJ yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaca göre hizalanarak görselleştirilmiş motif, domain ve gen yapısı analizleri.....	54
Şekil 4.4 PvBBX genlerinin kromozom haritası.....	55
Şekil 4.5 PvBBX genlerinin circos analizi.....	56
Şekil 4.6 PvBBX genlerinin <i>A. thaliana</i> ve <i>G. max</i> ile ortolog ilişkisi	57
Şekil 4.7 PvBBX'lerin 3 boyutlu yapı modellemeleri	61
Şekil 4.8 PvBBX genlerinde cis-elementlerinin dağılımı	63
Şekil 4.9 Cis-etkili elementlerin yüzdesel dağılımı	65
Şekil 4.10 <i>P. vulgaris</i> 'in farklı dokularındaki PvBBX üyelerinin mRNA seviyeleri.....	68
Şekil 4.11 İki farklı stres grubu ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılmalı RNAseq verilerinin ısı haritası. (Kontrol - Kuraklık stresi, Kontrol – Tuz stresi)	69
Şekil 4.12 PvBBX üyelerini hedefleyen miRNA'lar	71
Şekil 4.13 qPCR analizi yapılarak tuz stresi altında Elkoca çeşidinin kök, gövde ve yapraklarında belirlenmiş 8 PvBBX geninin ekspresyon grafikleri	75
Şekil 4.14 qPCR analizi kullanılarak tuz stresi altında Serra çeşidinin kök, gövde ve yapraklarında belirlenmiş 8 PvBBX geninin ekspresyon grafikleri	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye’de fasulye üretiminin illere göre dağılımı.....	6
Çizelge 1.2 Fasulyenin (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sistematik sınıflandırılması.....	6
Çizelge 1.3 Fasulyenin besin değerleri	7
Çizelge 3.1 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri.....	45
Çizelge 3.2 cDNA sentezi reaksiyon koşulları	45
Çizelge 3.3 PvBBX genleri için dizayn edilen primerler.....	46
Çizelge 3.4 RT-qPCR için reaksiyon bileşenleri	46
Çizelge 3.5 RT-qPCR için reaksiyon koşulları	46
Çizelge 4.1 B-BOX proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri.....	48
Çizelge 4.2 PvBBX gen duplikasyonları	57
Çizelge 4.3 <i>P. vulgaris</i> ve <i>G. max</i> ’de bulunan PvBBX gen duplikasyonları.....	58
Çizelge 4.4 <i>P. vulgaris</i> ve <i>A.thaliana</i> ’da bulunan PvBBX gen duplikasyonları	60
Çizelge 4.5 Cis-etkili elementlerin kategorilere göre dağılımı	64
Çizelge 4.6 Gelişim ile ilgili cis-düzenleyici elementler	65
Çizelge 4.7 Çevresel etmenlerle ilgili cis-düzenleyici elementler	66
Çizelge 4.8 Işığa duyarlı cis-düzenleyici elementler	66
Çizelge 4.9 Hormon ile ilgili cis-düzenleyici elementler.....	66
Çizelge 4.10 Biyotik stres ile ilgili cis-düzenleyici elementler.....	67
Çizelge 4.11 Bağlanma bölgeleri ile ilgili cis-düzenleyici elementler	67
Çizelge 4.12 İzole edilen RNA örneklerinin saflık dereceleri ve miktarları.....	72
Çizelge 4.13 İzole edilen cDNA örneklerinin saflık dereceleri ve miktarları.....	73

1. GİRİŞ

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) Hakkında Genel Bilgiler

Phaseolus vulgaris, *Fabaceae* (baklagiller) familyasına ait olup, dünyanın en önemli gıda baklagillerinden bir tanesi olarak, fasulye türlerinin birçoğunu içeren geniş bir cinsin adıdır. Mevcut tüm arkeolojik, morfolojik ve moleküler (fazeolin tohum proteini ve allozimler) kanıtlar, yetiştirilen fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*) en yakın akrabası olan yabani fasulyeden evrimleştiğini göstermektedir. Farklı boyutlarda ve renklerde çeşitli fasulye tipleri mevcuttur, bunlar arasında kahverengi, beyaz, siyah, yeşil ve kırmızı fasulyeler yer alır. Her biri benzersiz besin bileşimi ve tat profilleriyle öne çıkar. Aynı zamanda fasulyeler, lif, protein, vitaminler (ör. Cu, Ca, Fe, Mg, Mn, Zn) içererek, gündelik besin ihtiyaçları bazında mükemmel bir gıda olarak görülmektedir (Singh vd. 1991, Rosales vd. 2012).

Fasulye genetik yapısı açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve genomu dizilenmiştir. *Phaseolus vulgaris* genomu, toplam kromozom sayısı $2n = 22$ olan iki kromozom setinden oluşan bir diploiddir. Fasulyenin genom boyutunun yaklaşık 587,7 megabaz çifti (Mbp) olduğu tahmin edilmektedir. Bu genom boyutu, tekrarlayan DNA dizilerinin varlığına atfedilen diğer baklagil türleri ile karşılaştırıldığında nispeten büyüktür.

Phaseolus vulgaris yani fasulye bitkisi, genellikle 20 ila 60 cm yüksekliğe ulaşabilen otsu bir bitkidir. Gövdesi dik, çomak şeklinde ve dallanmış bir yapıya sahiptir. Gövdenin rengi genellikle yeşil veya kahverengi olabilir. *Phaseolus vulgaris*'te çimlenme epigealdir ve ortalama 3-6 gün gerektirir. Çiçeklenme zamanı çeşit, sıcaklık ve fotoperiyoda göre değişmektedir. Çiçeklenme genellikle dikimden 28-42 gün sonra başlar, ancak yüksek rakımda yetiştirilen tırmanıcı türlerde bu süre daha uzun olabilmektedir (Pathania vd. 2014). Fasulye bitkisinin yaprakları yeşil renkte ve trifoliat düzeninde bulunur, yani üç yaprakçıktan oluşur. Bu yapraklar, bitkinin büyümesi ve fotosentez yapması için önemli bir rol oynarlar. Aynı zamanda yaprakların şekli ve boyutu çeşitlilik gösterebilir, fakat genellikle kenarları düz veya hafif dalgalıdır. Fasulye bitkisinin çiçekleri genellikle

beyaz, mor, pembe veya leylak renkte olup, küçük ve tüylü bir yapıya sahiptir. Bitkinin çiçekleri, tozlaşma süreciyle fasulye meyvesinin oluşmasını sağlar. Fasulye meyveleri, çeşitlerine bağlı olarak farklı şekil ve boyutlarda olabilir. Genellikle yeşil, sarı veya mor renkte olan fasulye meyveleri, tüylü veya tüysüz bir dış yüzeye sahiptir. Bu meyveler, fasulye tohumlarını içinde barındırır ve bitkinin üreme döngüsünü tamamlamasına yardımcı olur (Singh vd. 1991, Rosales vd. 2012, Bellucci vd. 2014).

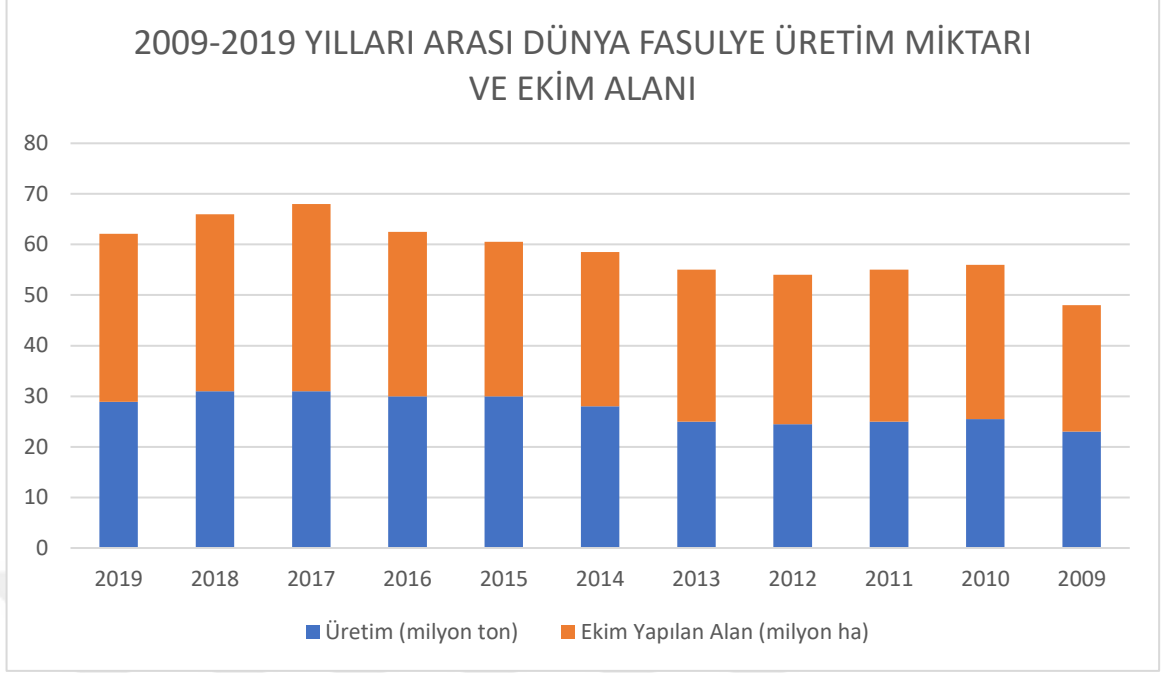
Fasulye bitkisinin tohumları, bitkinin üreme sürecinde önemli bir rol oynayan yapıları temsil eder. Fasulye bitkisi, fasulye meyvelerinin içinde yer alan tohumlarla ürer. Bu tohumlar, çeşitlere bağlı olarak farklı şekil ve boyutlarda olabilir. Genellikle yuvarlak veya oval şekle sahip olan fasulye tohumları, çeşitlerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Fasulye tohumları, fasulye meyvelerinin iç kısmında yer alır ve dış etkilere karşı korunmak üzere bir kabukla kaplıdır. Kabuğun rengi ve dokusu fasulye çeşidine bağlı olarak değişebilir. Tohum kabukları genellikle pürüzsüz veya hafif tüylü olabilir. Fasulye tohumlarının içinde, bitkinin gelişimi için gerekli olan besinler depolanır. Bu besinler, tohumun embriyosu tarafından kullanılarak ilk büyüme aşamalarında enerji sağlar. Embriyo, tohumun büyümesi ve çimlenmesi sırasında yeni bir bitki oluşturmak için gereken hücreleri içerir (Bewley vd. 2013, Los vd. 2018).

1.1.1 Fasulyenin tarihçesi ve coğrafi dağılımı

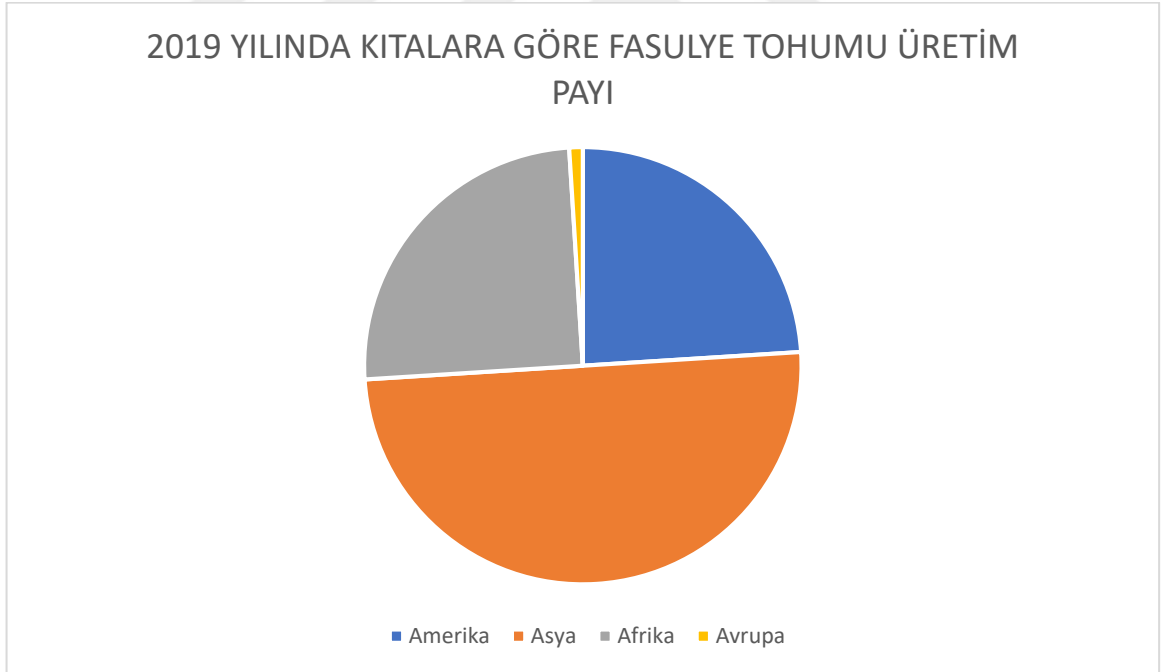
Yaklaşık 8000 yıl önce, orta Meksika ve Güney Amerika'da fasulye ekilip tüketilmeye başlamıştır. Bu birbirlerinden bağımsız iki olayın bir sonucu olarak iki önemli genetik havuz ortaya çıkmıştır. Yaklaşık 500 yıl önce, her iki genetik havuzdan kuru fasulye Amerika'dan İber Yarımadası'na getirilmiştir ve kısa süre sonra Avrupa, Afrika ve Asya'nın geri kalanına yayılmıştır. Tohumlardaki proteinin %90'ını oluşturan Phaseolin ve diğer moleküler ve mikro uydu belirteçleri, kültürler arasındaki genetik ilişkileri, orijinal gen havuzlarının boyutunu ve bölgesel olarak spesifik moleküler çeşitlilikteki düşüşü belirlemede çok önemli olduğunu kanıtlamıştır (Pathania vd. 2014). Örneğin, Avrupa çeşitlerinin genetik analizi, kıta genelinde daha yüksek bir Andean/Mezoamerikan çeşitliliği oranı gösterirken, Çin'de en çok temsil edilen Mezoamerikan çeşitleridir. Afrika'da, bölgeye bağlı olarak her iki havuzun karışık bir

bolluğu vardır. Dünyanın dört bir yanındaki bu geniş coğrafi dağılım ve yüzyıllar boyunca seçilen özelliklerin zenginliği, farklı ortamlarda çiftçiliğin ve farklı toplulukların özel ihtiyaç ve tercihlerinin sonucudur (Gepts 1998, Broughton vd. 2003, Angioi vd. 2010, Rodriguez vd. 2016). Fasulye dünya çapında üçüncü en önemli baklagil mahsulü olarak soya fasulyesi (*Glycine max* L.) ve fıstığın (*Arachis hypogea* L.) gerisindedir (De Ron vd. 2015). Temel gıda ürünleri arasında, fasulye, büyüme alışkanlığı, tohum özellikleri (boyut, şekil ve renk) ve olgunlaşma süresi bakımından en büyük değişimi gösterir. Bu değişkenlik, Amerika, Afrika, Orta Doğu, Çin ve Avrupa gibi çok çeşitli yetiştirme sistemlerinde ve ortamlarda üretimini mümkün kılmaktadır (Blair vd. 2012, Nadeem vd. 2021).

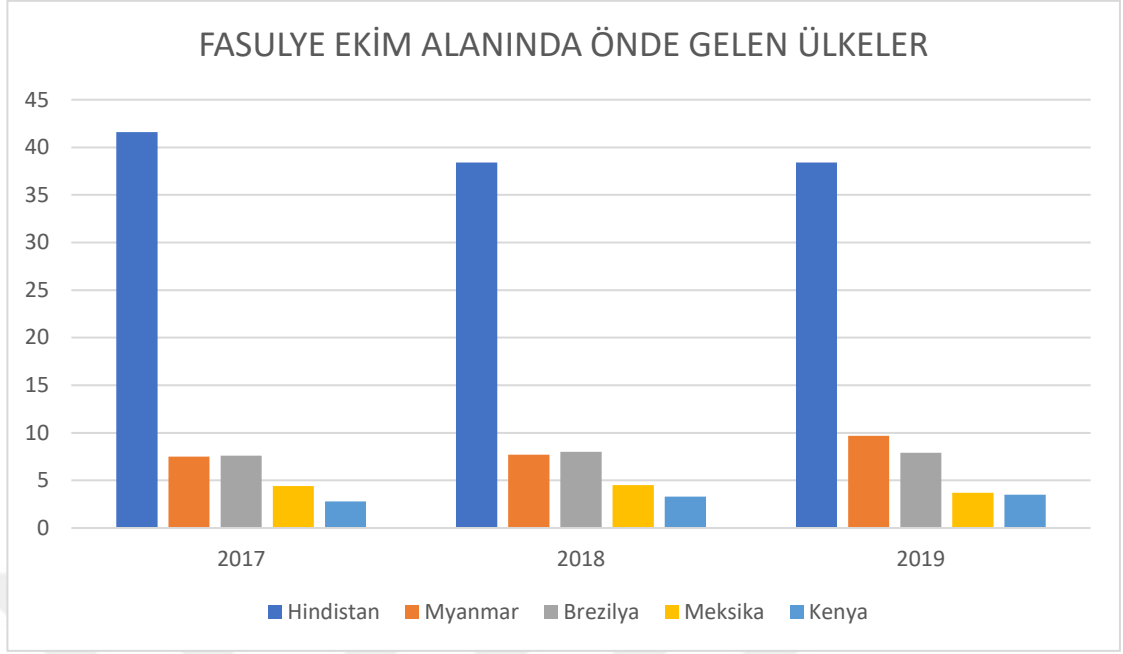
Nüfusun hızla artması nedeniyle 2050 yılında gezegende yaşaması beklenen 9,6 milyar insanı beslemek için yüzde 70 daha fazla gıdaya ihtiyaç duyulacağı tahmin edilmektedir. Bu talebin çoğunluğunu gelişmekte olan ülkeler ve Afrika'nın oluşturması öngörülmektedir (Alexandratos ve Bruinsma 2012). Fasulye, dünya çapında çoğunlukla yenilebilir tohumları ve kabukları için kullanılan önemli bir taneli baklagil bitkisidir. Dünya nüfusunun protein ihtiyacının %15'ini, kalori ihtiyacının ise %30'unu karşılayan önemli bir protein kaynağıdır (McConnell vd. 2010). FAO, 2019 yılında dünyada fasulye hasadının 33,1 milyon hektar, üretiminin ise 28,9 milyon ton olduğunu bildirmiştir (Şekil 1.1). Asya, dünyadaki fasulyenin %50'sini üretmektedir (Şekil 1.2) ve 2000-2019'da dünya çapında kuru fasulye üreten ilk beş ülke Amerika, Çin, Brezilya, Hindistan ve Myanmar'dır (Şekil 1.4 ve 1.5) (Nadeem vd. 2021).



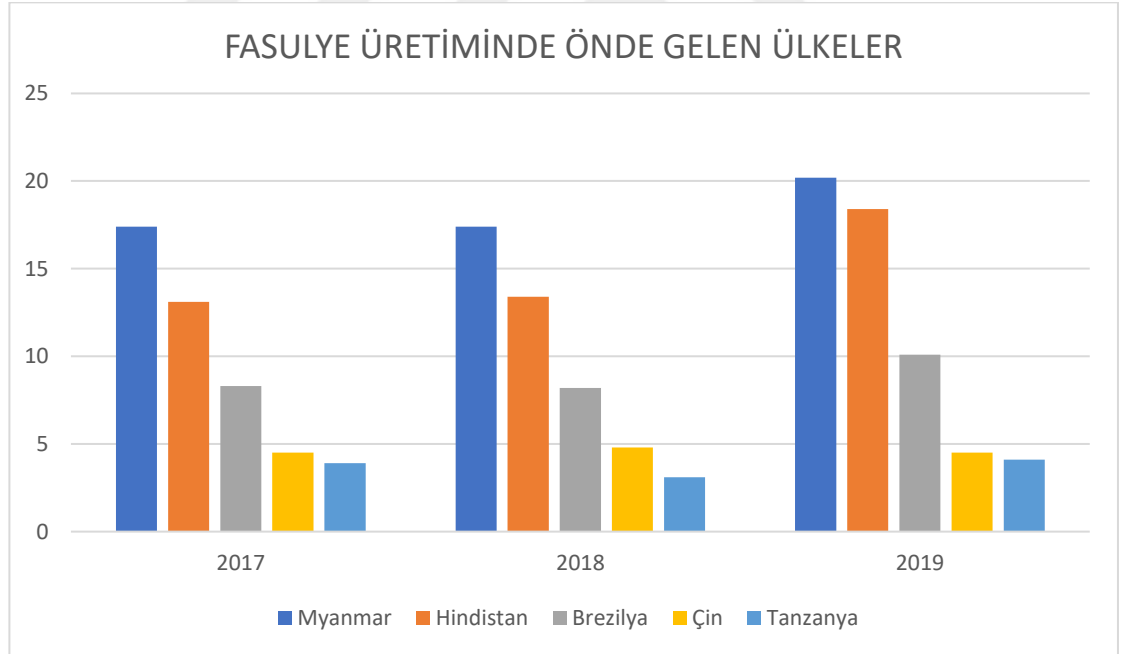
Şekil 1.1 2009-2019 Yılları arası dünya fasulye üretim miktarı ve ekim alanı



Şekil 1.2 2019 yılında kıtalara göre fasulye tohumu üretim payı



Şekil 1.3 Fasulye ekim alanında önde gelen ülkeler



Şekil 1.4 Fasulye üretiminde önde gelen ülkeler

Çizelge 1.1 Türkiye’de fasulye üretiminin illere göre dağılımı

İller	2017	2018	2019	2020	2021
Niğde	28.126	36.398	42.503	58.835	70.905
Konya	70.242	53.439	49.664	62.408	57.285
Bitlis	20.765	19.685	24.071	32.143	41.703
Nevşehir	24.001	18.232	21.637	28.303	34.589
Karaman	31.125	30.193	25.826	27.518	27.724
Kayseri	3.157	3.965	4.455	6.551	9.343
Kahramanmaraş	4.927	4.695	4.736	4.482	4.206
Gümüşhane	4.245	3.348	3.601	3.635	4.023
Kütahya	3.727	3.477	3.460	2.984	2.751
Diğer	46.017	43.598	41.598	46.848	47.134
TOPLAM	239.000	220.000	225.000	279.518	305.000

1.1.2 Fasulye bitkisinin sınıflandırılması

Phaseolus cinsi, yaklaşık yetiştirilen ve yabani toplam seksen tür içermek üzere, oldukça büyüktür, ancak *P. vulgaris* en yaygın şekilde yetiştirilen türdür. *P. vulgaris* ile en yakın akraba türler *P. albescens*, *P. coccineus*, *P. costaricensis*, *P. dumosus*, *P. parvifolius* ve *P. persistus*'tur. *P. vulgaris*'e ek olarak, dört *Phaseolus* türü daha yetiştirilmektedir: *P. dumosus* (yıl fasulyesi), *P. coccineus* (çalı fasulyesi), *P. acutifolius* (teparı fasulyesi) ve *P. lunatus* (lima fasulyesi). Fasulyenin taksonomik sınıflandırılması Çizelge 1.2’de verilmiştir (Oecd 2017).

Çizelge 1.2 Fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) sistematik sınıflandırılması

Üst Alem	Eukaryota
Alem	Plantae
Klad	Tracheophytes
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae
Cins	Phaseolus L.

Çizelge 1.2 Fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) sistematik sınıflandırılması (devam)

Tür	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Binomial Adı	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

1.1.3 Fasulye bitkisinin besin değerleri

Fasulye tohumlarında yüksek oranda protein, lif, polifenoller, flavonoidler, karotenoidler, saponinler, oligosakkaritler, yoğunlaştırılmış tanenler, lektinler, tripsin inhibitörleri ve fitik asit içeriğiyle insan sağlığına birçok olumlu etkisi olan çok çeşitli ve önemli besin bileşikleri bulunur. Diğer fitokimyasal bileşiklerin yanı sıra polifenoller, antosiyaninler ve flavonoidler özellikle antioksidan biyolojik aktivitelerle ve diyabet, kanser ve obezite gibi kronik dejeneratif hastalıkların yanı sıra metabolik sendrom, trigliseritler ve kolesterol ile bağlantılı diğer koşullara karşı koruyucu etkilerle ilişkilidir (Beebe vd. 2000, Dzomba 2013, Chávez-Servia vd. 2016).

Fasulyenin tiamin, riboflavin, niasin, B6 vitamini ve folik asit gibi suda çözünebilen çeşitli vitaminlerin yanı sıra potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), çinko (Zn), bakır (Cu) ve demir (Fe) gibi mineralleri içerdiği bulunmuştur. Temel amino asitler (izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin ve valin), bazı antibeslenme faktörleri (rafinoz oligosakkarit, tripsin inhibitörü, hemaglutinin, tanen ve fitik asit) belirlenmiştir (Çizelge 1.3) (AuguStin vd. 1981, Barampama ve Simard 1993, Sangronis ve Machado 2007, Celmeli vd. 2018).

Çizelge 1.3 Fasulyenin besin değerleri

Parametre	Değer	Birim
Protein	24.9	%
Lif	5.2	%
Yağ	1.4	%
Nişasta	40.7	%
Toplam şeker	4.9	%
Enerji	4350	kcal/mg

Çizelge 1.3 Fasulyenin besin değerleri (devam)

Kalsiyum	2.1	g/kg
Fosfor	4.5	g/kg
Magnezyum	2	g/kg
Sodyum	0.03	g/kg
Potasyum	16.9	g/kg
Klor	1.6	g/kg
Manganez	15	mg/kg
Çinko	11	mg/kg
Bakır	11	mg/kg
Demir	85	mg/kg

1.1.4 Fasulye bitkisinin yetiştirilme koşulları

Fasulyeler 29,5°C'ye kadar yüksek sıcaklıkları tolere edebilir ve 15°C ila 27°C arasındaki sıcaklıklarda iyi büyüebilirler. Yüksek sıcaklık (35°C civarı veya üzeri) ve nem stresi nedeniyle çiçek ve bakla oluşumu sırasında önemli sayıda çiçeklenme ve gelişen bakla kaybı meydana gelir. Büyüme mevsimi boyunca düşük bağıl nem ve 350-500 mm yağış, bakteri ve mantar hastalıkları tehlikesini azalttığı için optimum yetiştirme koşullarıdır. Sıcak mevsim mahsulü olan fasulye, ani sıcaklık değişimlerine karşı hassastır. Yüksek sıcaklıklar bitkinin büyümesini hızlandırır, soğuk sıcaklıklar ise yavaşlatır. Genel olarak bitkiler kısa günlere daha kolay uyum sağlar; düzgün çimlenmeleri için minimum ortalama 18°C toprak sıcaklığına ihtiyaç duyarlar ve dona karşı çok hassastırlar. Son donma tarihinden sonra ekim yapılmalıdır. Ekim için en iyi zamanı seçerken, en iyi yetiştirme koşullarını garanti etmek için günün uzunluğunu ve sıcaklığı göz önünde bulundurulmalıdır (Salcedo J.M. 2008).

1.1.5 Fasulyede görülen hastalıklar

Fasulye bitkisinde, bakteriyel hastalıklar, mantar hastalıkları, paraziter hastalıklar ve viral hastalıklar görülebilmektedir.

1.1.5.1 Bakteriyel hastalıklar

Bakteriyel hastalıklar fasulye üretimini sınırlandıran önemli sorunlardan biridir. Lokal olarak meydana gelen bakteriyel hastalıklar, yaygın bakteriyel yanıklıklar [*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) ve *fuscans* varyantı *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* var. *fuscans* (Xapf)], hale yanıklığı [*Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* (Psp)] ve bakteriyel kahverengi nokta [*P. syringae* pv. *syringae* (Pss)] olarak sınıflandırılabilir. Bu hastalıkların görülme sıklığı ve şiddeti, biyolojik ve iklimsel faktörlerin yanı sıra yönetim uygulamalarından da etkilenerek yıllık olarak değişmektedir (Fourie 2002).

Xanthomonas campestris pv.'nin neden olduğu yaygın yanıklık, dünya çapında yaygın fasulyelerde görülen önemli bir hastalıktır. Patojen tohumlarla bulaşır. Yüksek sıcaklık (25°C ila 30°C), yüksek bağıl nem, sık yağışlar ve duyarlılık, bu hastalığın salgınlarını kolaylaştıran ana faktörlerdir (Arnaud-Santana vd. 1994).

Pseudomonas syringae pv.'nin neden olduğu hale yanıklığı, fasulyede görülen, tohum kaynaklı, önemli bir hastalıktır. Hastalık, Güney Afrika'da, özellikle de ülkenin ılıman ve serin bölgelerinde, kuru fasulye üretiminin önemli bir kısıtlamasını oluşturmaktadır. Verim kayıplarının boyutu henüz tahmin edilmemiştir ancak hastalık tüm ticari çeşitlerde ve fasulye üretim alanının tamamında görülmektedir (Fourie 1998).

Pseudomonas syringae pv.'nin yol açtığı bir diğer hastalık ise bakteriyel kahverengi nokta hastalığıdır (BBS). Güney Afrika da dahil olmak üzere dünya çapında fasulyede görülen önemli bir bakteriyel hastalıktır. Hastalık tohum kaynaklıdır ve esas olarak yaprakları ve daha az ölçüde baklaları enfekte eder. Fasulye yapraklarında, BBS semptomları ilk önce suyla ıslanmış lekeler olarak ortaya çıkabilir; bunlar yavaş yavaş genişler, sonrasında ise kurur ve genellikle dar sarı veya açık yeşil bir bölgeyle çevrelenir. Lezyonlar birleşebilir ve ara sıra absisyon yapabilir, daha sonra yapraklara parçalanmış bir görünüm verebilir (Fourie 2002).

1.1.5.2 Mantar hastalıkları

Fasulye, fide aşamasından tohum olgunlaşma aşamasına kadar doğal koşullar altında tek başına veya diğer mikrobiyal bitki patojenleri ile kombinasyon halinde çok sayıda mantar patojeni tarafından enfekte olabilir. Farklı ekosistemlerde yetiştirilen mahsuller, çeşitli mantar bitki patojenlerine ek olarak, büyümelerini olumsuz yönde etkileyebilecek ve hastalığa neden olan etmenlerin erişim süresine bağlı olarak değişen büyüklüklerde verim potansiyeline sahip olabilecek farklı türdeki diğer biyotik ve abiyotik etmenlere maruz kalır. Duyarlı bitki türleri için normal fonksiyonlardan ve gelişimden herhangi bir sapma, etkilenen bitki türlerinde hastalığa yol açmaktadır (Narayanasamy 2011).

Bölgede fasulye üretimini etkileyen başlıca mantar hastalıkları beyaz küf [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary], köşeli yaprak lekesi [*Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous ve U. Braun], ağ yanıklığı ve *Rhizoctonia* kök çürüklüğüdür (*Rhizoctonia solani* Kühn) (Taboada vd. 2022).

Beyaz küf hastalığının belirtileri tipik olarak yapraklarda ve gövdelerde suya batırılmış lezyonlarla başlar. Hastalık ilerledikçe bitkinin iç ve dış dokularında kalın beyaz bir misel gelişimi ve ardından sert siyah sklerotlar gözlenir, bu da bitkinin distal kısımlarının solmasına ve daha sonra nekrotik hale gelmesine neden olmaktadır. Sonunda bitkinin rengi ağarmış görünecek ve bitki kısımları doku bozulması nedeniyle parçalanmış özellikler gösterecektir (Taboada vd. 2022, Shang vd. 2024).

Phaeoisariopsis griseola mantarının neden olduğu köşeli yaprak lekesi (ALS), fasulye bitkisine menşee merkezi ve yetiştirilme alanı boyunca zarar verir. Hastalık, aralıklı serin ve sıcak, yağışlı ve kuru havalarla daha kolay gelişmektedir. Enfekte olmuş tohumların ekilmesi durumunda hastalık belirtileri ana yapraklarda ortaya çıkabilir. Gelişmekte olan ve yetişkin bitkilerde, genellikle bitki örtüsünün daha yaşlı yaprakları, bakla ve tohumlar da dahil olmak üzere diğer kısımlara yayılan daha şiddetli semptomlar göstermektedir (Pastor-Corrales vd 1998).

Thanatephorus cucumeris Donk mantarının neden olduğu ağ yanıklığı (WB), fasulye mahsullerinin yetiştirilmesinden ekonomik fayda elde edilmesi açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bunun esas sebebi ise hastalığın fasulye gelişiminin herhangi bir evresinde gelişebilmesi ve esas olarak patojenin gelişimi için uygun koşulların olduğu bölgelerde 1 ila 3 hafta gibi kısa bir sürede ürünün tamamen kaybına yol açabilecek yaprak dökülmesine neden olmasıdır. Nemli tropik bölgelerde doğal olan yüksek nem ve 23°C'nin üzerindeki sıcaklık koşulları altında, uzun süreli ve ani yüksek yağış dönemleri, ağ yanıklığı hastalığının görülme sıklığı ve şiddetini kolaylaştırmaktadır. Semptomları genellikle bitkinin yapraklarında görülmektedir (Suárez vd. 2022).

R. solani, fasulyede *Rhizoctonia* sönümlenmesine ve kök çürüklüğü hastalığına neden olabilen toprak kaynaklı mantarlardan biridir. Bu mantar hastalığının belirgin semptomları genellikle yaz başında, tarlanın içerisinde dağılmış solmuş veya ölü fidelerin bulunduğu yaz mevsiminin başlarında görülmektedir. Bu mantar tohum çürüklüğüne, kök çürüklüğüne ve hipokotillerde lezyonlara neden olabilir. Sönümlenme hastalığı, çimlenen fidelerin ortaya çıkmadan önce enfekte olması durumunda meydana gelir. Ayrıca genç fidelerin hipokotillerinde kırmızımsı kahverengi çökük lezyonlar oluşur. Ortaya çıkan sert, kuru pamukçuk fideyi bağlayabilir ve ölmesine neden olabilir. Bununla birlikte, hayatta kalabilen daha yaşlı bitkiler veya fideler, toprak yüzeyine yakın alt gövdede karakteristik batık, kırmızımsı kahverengi kanserler ve düzensiz veya bodur büyüme gibi benzer semptomları da sergileyebilir. Yaşlı hastalıklı bitkiler sonuç olarak klorotik hale gelirler ve nitrojen eksikliği olan bitkilere benzerlik gösterirler (Rahman vd. 2020).

1.1.5.3 Paraziter hastalıklar

Bitkilerdeki paraziter nematodlar, konakçılarıyla çeşitli etkileşimler gösterebilmektedir. Bazı nematodlar, konakçıya asla girmeyen, ancak toprakta göç eden, onlarla karşılaştıklarında kökleri geçici bir besin kaynağı olarak kullanan göçmen ektoparazitlerdir. Göçmen endoparazitler konakçıya girer ve konakçı dokuları boyunca göç ederek büyük hasara neden olurlar. Yarı endoparazitik nematodların göç aşamaları olabilir, ancak aynı zamanda yaşam döngüsünün bir aşamasında beslenmek için konak bitkiye kısmen nüfuz edebilirler. *Rotylenchulus reniformis* dahil olmak üzere bu tür

nematodlar, hareketsiz aşamada konak içindeki beslenme yapısını tetikler. Bununla birlikte, ekonomik açıdan en önemli nematodlar olan kök düğümü ve kist nematodları biyotroftir ve konukçularının köklerinde, nematoda zengin ve uzun ömürlü bir besin kaynağı sağlayan karmaşık beslenme yapılarını tetikler (Jones vd. 2013).

1.1.5.4 Viral hastalıklar

Bitkisel üretim sistemlerini kısıtlayan ana faktörlerden biri viral enfeksiyonlardır. Bitki virüsleri, değişen iklim koşullarına uyum sağlama yetenekleri ve tipik olarak vektör bulaşmasıyla bağlantılı olan kolay yayılmaları nedeniyle yeni keşfedilen bitki hastalıklarının çoğunluğundan sorumludur. Antiviral ilaçların eksikliği virüsleri yönetmeyi zorlaştırmaktadır; bunun yerine kontrol yöntemleri, virüslerin mahsule girmesini, orada yerleşmesini ve yayılmasını engellemek için bir dizi sıhhi önlemlerle sınırlıdır veya hastalık hasarını azaltmak için genetik direnç dayanır. Bitkisel materyallerde dünya çapında artan ticaret, yoğun üretim yöntemleri, sık kültürel uygulamalar ve hızlı çeşit değişiminin bir sonucu olarak viral enfeksiyonlar daha sık ortaya çıkabilir. Bu faktörler aynı zamanda yeni virüslerin ve vektörlerinin bulaşma olasılığını da artırır (Moriones vd Verdin 2020).

Fasulye üretkenliği, yakından ilişkili potivirüsler Fasulye Mozaik Virüsü (BCMV) ve Fasulye Mozaik Nekroz Virüsü (BCMNV) tarafından ciddi oranda engellenebilmektedir. BCMV ve BCMNV'nin neden olduğu mahsul kayıpları, fasulyenin hayati bir diyet proteini ve mineral besin kaynağı olduğu az gelişmiş ülkelerdeki küçük çiftçilerin üretkenliği ve bu yüksek değerli mahsulün ticari ölçekte yetiştirilmesi üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahiptir. Fasulye Mozaik Virüsü ve Mozaik Nekroz Virüsü, fasulye üzerinde ve diğer kültür veya yabani baklagiller üzerindeki en büyük viral hastalık tehditleridir (Worrall vd. 2015). Fasulye bitkilerinde BCMV ve BCMNV'nin her ikisi de mozaik, bodurlaşma, yaprakların kıvrılması ve sararma gibi çarpıcı biçimde benzer semptomlara neden olur. "Kara kök", "üst nekroz" veya "sistemik nekroz" olarak bilinen başka bir hastalık, sistemik nekroz ile karakterize edilir ve genellikle bitki ölümüyle sonuçlanır. Daha yüksek sıcaklıklarda BCMV suşları tarafından veya tüm sıcaklıklarda BCMNV tarafından indüklenebilir. Bu hastalığa, belirli bir fasulye çeşidinde mevcut olan

baskın gene bağı olarak "aşırı duyarlı bir tepkinin" veya daha doğrusu "yayılan vasküler nekrozun" üretilmesi neden olur. Bu gen, BCMV suşlarına karşı monogenik direnç kazandırır. Bununla birlikte, bitki 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda (sıcaklığa bağlı) BCMV suşları veya herhangi bir sıcaklıkta (sıcaklıktan bağımsız) BCMNV ile tehdit edildiğinde sistemik üst nekroz ve bitki ölümü tetiklenir. Bu nedenle, her iki virüsün bazı suşlarının ürettiği semptomların benzerliğinin, bunları sahada ayırt etmeyi çok zorlaştırması şaşırtıcı değildir (Flores-Estévez vd 2003).

1.1.6 Bitkilerde abiyotik stres

İklim değişikliğinin artan ekolojik etkileri arasında abiyotik stresin bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde yarattığı zorluklar da yer almaktadır. Mahsul verimliliği üzerindeki sınırlamalar, artan insan nüfusunun sınırlı çevresel kaynaklar için rekabet etmesiyle daha da şiddetlenmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin yoğunlaştığı alçak enlemlerin, artan sıcaklıklar ve artan karbondioksit seviyeleri nedeniyle iklim değişikliğinin tarımsal verimlilik üzerindeki en büyük etkilerini göreceği öngörülmektedir. Bu durum, uyum planlarını tasarlamaya çalışan uzmanlar için zorlu bir süreç oluşturacaktır. Çeşitli bitki türlerinde strese neden olabilecek çevresel stres faktörleri veya abiyotik elementler üzerine yapılan tüm araştırmalar, bitki abiyotik stres araştırması şemsiyesi altında toplanmaktadır. Yüksek ve düşük ışık seviyeleri, UV-B ve UV-A radyasyonu, aşırı yüksek ve aşırı düşük sıcaklıklar, kuraklık, sel ve su altında kalma, kimyasal faktörler (ağır metaller ve pH), aşırı Na⁺ kaynaklı tuzluluk, yetersiz veya aşırı miktarda hayati besin maddeleri, gaz halindeki kirleticiler (ozon, kükürt dioksit), mekanik faktörler ve nadiren meydana gelen diğer stres etkenleri, bu stres etkenlerinin bazı örnekleridir (Pereira 2016).

1.1.6.1 Bitkilerde kuraklık stresi

Küresel ölçekte mahsul verimliliğini kısıtlayan temel etmenlerden bir tanesi kuraklıktır. Mahsul büyüme modelleri, bu sorunun gelecekte daha da ciddileşeceğini göstermektedir. Kuraklık sırasında normal büyüme engellenir, su etkileşimleri bozulur ve bitkinin su kullanım verimliliği azalır. Ancak bitkilerde bu daha karmaşık bir olgudur çünkü bitkiler

hücresel ve tüm organizma düzeyinde daha geniş yelpazede fizyolojik ve biyokimyasal tepkilere sahiptirler. Fotosentez hızındaki azalmanın başlıca nedenleri arasında membran hasarı, stomaların kapanması ve enzim aktivitesinin, özellikle de ATP üretiminin bozulması yer alır. Bitkiler, su emilimini artıran yayılma direnci, su alımını artıran derin, çoğalan kök sistemleri ve terleme kaybını azaltan daha küçük, daha sulu yapraklar dahil olmak üzere çeşitli kuraklığa dayanıklı stratejiler sergiler. Glisinbetain, prolin ve diğer amino asitler, organik asitler ve polioller dahil düşük moleküler ağırlıklı osmolitler, kuraklık stresi altında bitkinin hücresel fonksiyonların sürdürülmesinde hayati roller oynamaktadırlar (Farooq vd. 2012).

Kuraklık stresi, tohum ağırlığını ve toprak üstü biyokütleyi yaklaşık %80 oranında önemli ölçüde azaltabilmektedir. Hem abiyotik stresin verim üzerindeki etkisine hem de hasat indeksi gibi onunla yakından ilişkili özelliklere ilişkin önemli kanıtlar göz önüne alındığında, bu şaşırtıcı değildir. Verim kaybı muhtemelen yer üstü biyokütledeki azalmalardan kaynaklanmıştır (yani, daha az yaprak alanı daha az fotoasimilata eşittir), bu da kuraklık stresi tedavilerinde üretilen bakla ve tohum sayısında ~%75'lik bir azalmaya yol açarak verimin azalmasına (tohum ağırlığı) yol açmıştır. Su eksikliği tedavisine yanıt olarak yaprak dokusundaki karbon izotop fraksiyonu tüm gelişim aşamalarında azalabilmektedir. Çözünebilir yaprak fraksiyonunda, birleşik su eksikliği ve düşük fosfor, temel besinlerin ve amino asitlerin konsantrasyonunda önemli değişikliklere yol açmaktadır (Smith vd. 2022).

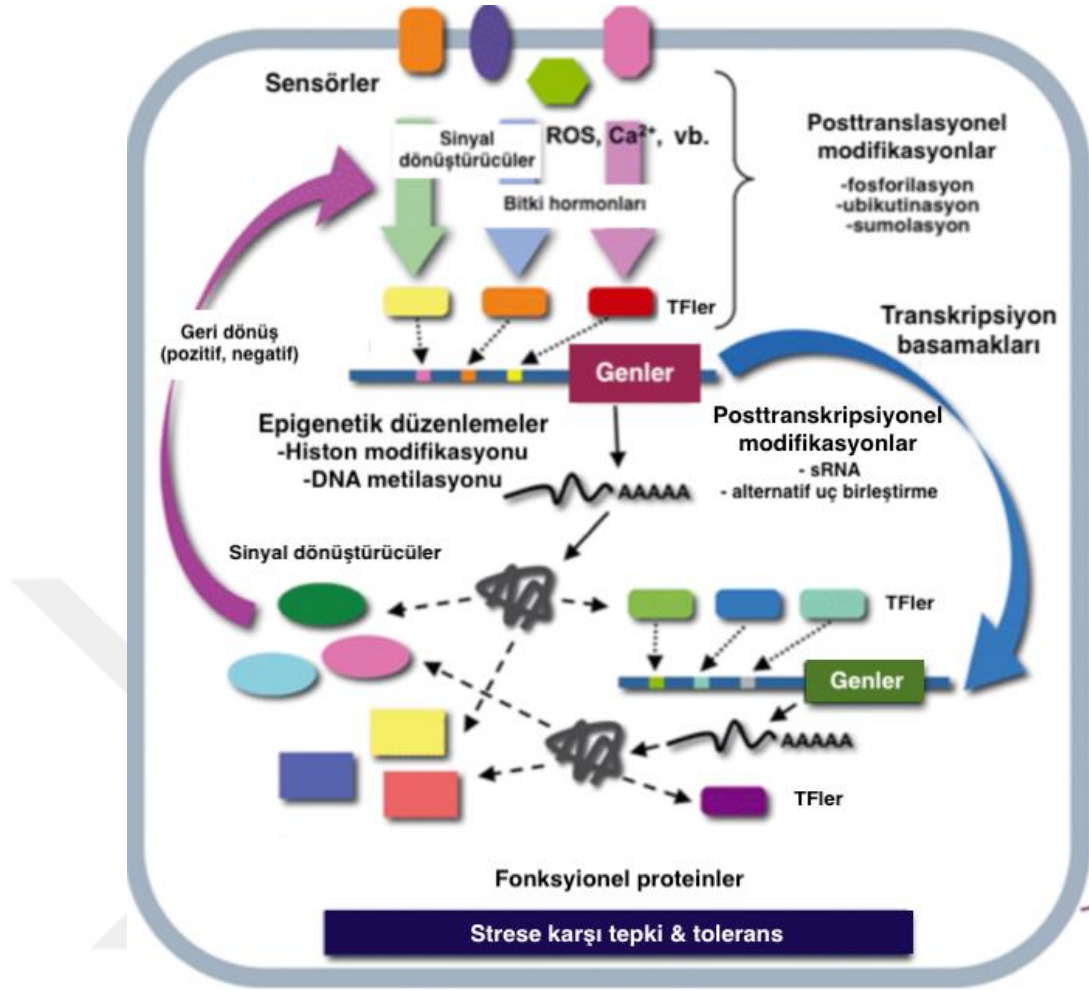
1.1.6.2 Bitkilerde tuz stresi

Tuzluluk, özellikle kurak ve yarı kurak iklimlerde bitki verimliliğini sınırlayan en önemli çevresel sorunlardan biridir. Sulama suyundaki ve topraktaki tuzluluk, dünya çapında tarımdaki en önemli abiyotik kısıtlamalarının başında gelir ve Akdeniz bölgesi gibi kurak ve yarı kurak bölgelerde sulama gereksinimlerinin artması nedeniyle durum son 20 yılda daha da kötüleşmiştir. Toprak tuzluluğu dünya çapında yaklaşık 800 milyon hektar ekilebilir alanı etkilemektedir (Acosta-Motos vd. 2017).

Tuz stresi altındaki bitkiler büyüme ve gelişme, çiçeklenme ve meyve oluşumu, tohum çimlenmesi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Tuzlu toprağın yüksek sodyum içeriği, bitkinin besinleri ve suyu emme yeteneğini kısıtlar. Ozmotik stres ve iyonik stres, beslenme dengesizliği ve su kıtlığının neden olduğu iki temel strestir. Bu başlangıç stresleri, ikincil streslerin zincirleme reaksiyonuna yol açabilir ve oksidatif stres üretebilir. Sonuç olarak, tuz stresi çeşitli fizyolojik ve moleküler değişikliklere neden olur ve fotosentezi önleyerek bitki büyümesini engeller, bu da mevcut kaynak miktarını azaltır ve hücre bölünmesini ve büyümesini baskılar (Zhao vd. 2021).

Doğadaki bitkiler, halofitler adı verilen tuz stresine dayanıklı olanlar ve tuz stresine duyarlı olan glikofitlerdir, ki insanların yararlanabileceği hemen hemen tüm mahsul türleri, topraktaki yüksek tuz konsantrasyonlarına duyarlı olan glikofitlerdir. Araştırmacılar, tuz stresine karşı toleranslı bitkilerde tuza tolerans mekanizmalarını inceleyip, ellerindeki bulguları tuza toleranslı olmayan bitkilere uygulamaya çalışmaktadırlar. Geçmişteki çalışmalar tüm savunma ağının büyük bir bölümünü ortaya çıkarmıştır (Hao vd. 2021).

Tuz stresi iki farklı bileşene ayrılabilir. Kısa vadede tuz stresi ozmotik strese neden olurken, uzun vadede fitotoksik iyonların, özellikle de Na^+ ve Cl^- birikmesi nedeniyle iyon toksisitesi meydana gelir. Ozmotik ve toksik etkilerin yanı sıra tuz stresi de oksidatif stresi tetiklemektedir, bütün bu faktörler tuzluluğun bitkilerdeki zararlı etkilerine katkıda bulunmaktadır. Na^+ , henüz tanımlanmamış özel bir Na^+ algılama modülü tarafından algılanmaktadır. Erken algılamanın ardından yukarı yöndeki sinyal yanıtları tetiklenir. K^+ , Ca^{2+} , H^+ , fosfolipid, reaktif oksijen türleri (ROS), çeşitli protein kinazlar ve bitki hormonları karmaşık sinyal iletim ağında yer alır. Daha sonra strese duyarlı genleri düzenleyen transkripsiyon faktörleri uyarılır. Bunun sonucunda ise iyon taşıyıcı genler ve antioksidan genler gibi fonksiyonel genler verimli bir şekilde ifade edilir (Şekil 1.5). Son olarak, tuz stresi altında hayatta kalabilen ve tolerans kazanabilen bitkiler, ROS temizleme gibi fizyolojik adaptif tepkilerden sorumludur. Bitkilerin direnç geliştirmesi için bu yolağın her bir adımı büyük önem arz etmektedir (Hao vd. 2021).



Şekil 1.5 Abiyotik strese karşı tepkinin genel modeli (Hirayama ve Shinozaki 2010)

Tuz stresine karşı *P. vulgaris*'in adaptasyon stratejilerinden biri, osmoregülasyon süreçlerindeki değişikliklerdir. Yüksek tuz konsantrasyonlarına maruz kalan bitki, hücre içi osmotik basıncı artırmak için osmoprotektanlar gibi bileşenlerin sentezini artırır. Bu, hücrel su potansiyelini korur ve osmotik dengenin sağlanmasına yardımcı olur. Ayrıca, tuz stresi altında *P. vulgaris*'in antioksidan savunma sistemleri aktive olur. Bu sistemler, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine karşı koruma sağlar. Katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış gözlenir ve bu enzimler serbest radikallerin temizlenmesi ve oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynar. Ayrıca, tuz stresine karşı *P. vulgaris* bitkilerinde fotosentez sürecinde de değişiklikler meydana gelir. Stoma kapanması ve stomatal direncin artması, su kaybını minimize ederken fotosentez hızında azalma görülebilir. Böylece, bitki suyunu korur ve su stresine karşı direnç kazanır. Bu biyokimyasal mekanizmalar, *P. vulgaris*'in

tuz stresine karşı adaptasyonunu sağlar ve bitkinin stres altında hayatta kalmasını destekler. Ancak, bu mekanizmaların tam olarak anlaşılması ve optimize edilmesi, tuz stresine dayanıklı fasulye çeşitlerinin geliştirilmesi için önemlidir. Bu mekanizmaların detaylı incelenmesi, bitki yetiştirme programlarına ve tarım uygulamalarına yol gösterici olabilir (Läuchli ve Grattan 2007, Fahad vd. 2015, Negrão vd. 2016).

Tuzluluğa yol açan sorunlar olarak tarım arazilerinin uygunsuz kullanımı, kuraklık, aşırı buharlaşma ve yetersiz drenajın tuzluluğa yol açması gösterilebilir. Tuzlu toprak, bitki büyümesini engelleyen tuz konsantrasyonlarına sahip toprakları ve toprağın yapısını değiştiren tuz konsantrasyonları olmayan toprakları ifade eder. Tuz stresi, bu tuzların fazla oranda olması durumunda bitki büyümesi, gelişimi, verimi ve tohum kalitesi gibi özellikleri etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Şu anda dünyadaki kurak ve yarı kurak toprakların %17'si sulanmaktadır; ancak sulanan bu alanların %20'si yanlış tedaviler nedeniyle verimsiz kalmaktadır ve bitki varlığı da bununla birlikte olumsuz bir döngü içerisinde (Mustafa vd. 2020).

Fizyolojik Etkiler: Artan solunum hızı, iyon toksisitesi, değişen bitki gelişimi, değişen mineral dağılımı, membrandaki kalsiyumun yerini sodyumun alması nedeniyle membran kararsızlığı, azalan fotosentetik oran ve membran geçirgenliği, tuz stresinin bitkiler üzerindeki fizyolojik etkilerinden sadece birkaçıdır. Tuz stresinin neden olduğu ozmotik ve iyonik stres hem bitkinin tamamında hem de hücresel düzeyde bitki fizyolojisi üzerinde etkiye sahiptir (Nawaz vd. 2010).

Azalan stoma açıklığı, bitkinin tuza karşı en belirgin ve kolayca ölçülebilir tepkisidir. Tuzun köklerin dışındaki ozmotik etkisi stoma reaksiyonlarını tetikler. Tuzluluk, su ilişkilerini bozduğu için önce stoma iletkenliği üzerinde geçici bir etki yapar, ardından kısa bir süre sonra absisik asitin lokal sentezi nedeniyle anında etki gösterir. Orta veya yüksek tuzluluğun gaz alışverişini bozduğuna, bunun da fotosentez oranını düşürdüğüne ve kuraklık stresini çok anımsatan sonuçlara neden olduğuna dair kanıtlar vardır. Stoma iletkenliğindeki azalmayı, çeşitli türler ve tuzluluk seviyeleri için rapor edildiği gibi, CO₂ asimilasyonu ve solunum oranındaki azalma takip etmektedir. Tuz stresine maruz bırakılan bitkilerde stoma iletkenliği azalsa bile birim yaprak alanı başına fotosentez

oranları büyük derecede etkilenmemektedir. Hücre yapısındaki, birim yaprak alanı başına daha yüksek kloroplast yoğunluğuna sahip, daha kalın, daha küçük yapraklar üreten değişiklikler bu ilişkiyi açıklamaktadır. Tuzluluğun getirdiği azalma, fotosentezin yaprak alanı bazında değil, birim klorofil bazında raporlanması durumunda çoğunlukla ölçülebilir. Her durumda, tuzluluk yaprak alanını azalttığında bitki başına fotosentez oranı her zaman azalmaktadır. Araştırmalar, *B. parviflora*'nın fotosentez oranının düşük tuzluluk koşullarında arttığını ve tuzluluk arttıkça azaldığını göstermiştir. Buna karşılık, stoma iletkenliği yüksek tuzluluk koşullarında düşüş gösterirken, düşük tuzluluk koşullarında değişmeden kalmıştır (Parida vd. 2004, Torabi ve Halim 2013).

Biyokimyasal Etkiler: Bitki türlerinin tuz stresini tanıma ve buna göre tepki verme yeteneği, iyonlar, ozmotik diferansiyel, hormonlar veya ROS tarafından üretilen sinyaller tarafından düzenlenir. Bu sinyaller, bitkinin stresli ortamlara uyum sağlamasına olanak tanıyan fizyolojik süreçleri başlatmak için uygun reseptörlere bağlanır. Abiyotik stresle ilgili olarak, iyonik sinyalleme, osmolit düzenlemesi ve gen düzenlemesi olmak üzere üç farklı sinyal iletim yolu tanımlanmıştır. Tuzluluk stresi altında sinyal iletimi için iyonik stres sinyal yolu açıklığa kavuşturulmuştur. Bu bağlamda kalsiyum (Ca) önemli bir rol oynamaktadır. Bitkilerin stresli durumlara uyum sağlaması için sinyal iletimini tetikler. İyon kanalı fonksiyonu, gen ekspresyonu ve enzim aktivitesinin düzenlenmesi dahil olmak üzere çok sayıda aktivite, yüksek sitozolik Ca konsantrasyonları tarafından tetiklenir. Eksojen olarak uygulanan kalsiyum, sinyal iletimini artırarak K⁺/Na⁺ seçiciliğini artırır ve dolayısıyla tuz adaptasyonunu sağlar. Tuz stresli koşullar altında, glisinbetain'in sinyal iletimini ve iyon homeostazisini koruduğu söylenmektedir (Shahid vd. 2020).

Morfolojik Etkiler: Bitkilerin tuz stresine karşı tepkileri, farklı büyüme aşamalarında ilerledikçe sıklıkla değişebilmektedir. Birkaç günlük gecikmeyle bitkilerin çoğunluğu çimlenme sırasında tuzluluğa karşı tolerans gösterebilir. Fideler kılcal yükselme, toprak yüzeyine yakın buharlaşma ve su stresi nedeniyle değişen tuzluluk oranlarına maruz kaldığından, çoğunun ortaya çıkma ve vejetatif gelişim sırasında savunmasız olması pek olası değildir. Bitkiler olgunlaşır ve özellikle sonraki gelişim aşamalarında tuza karşı

giderek daha dirençli hale gelir. Bununla birlikte, türlerin büyüme açısından tuzluluğa nasıl tepki verdikleri farklılık gösterebilmektedir (Jafari ve Hashemi Garmdareh 2019).

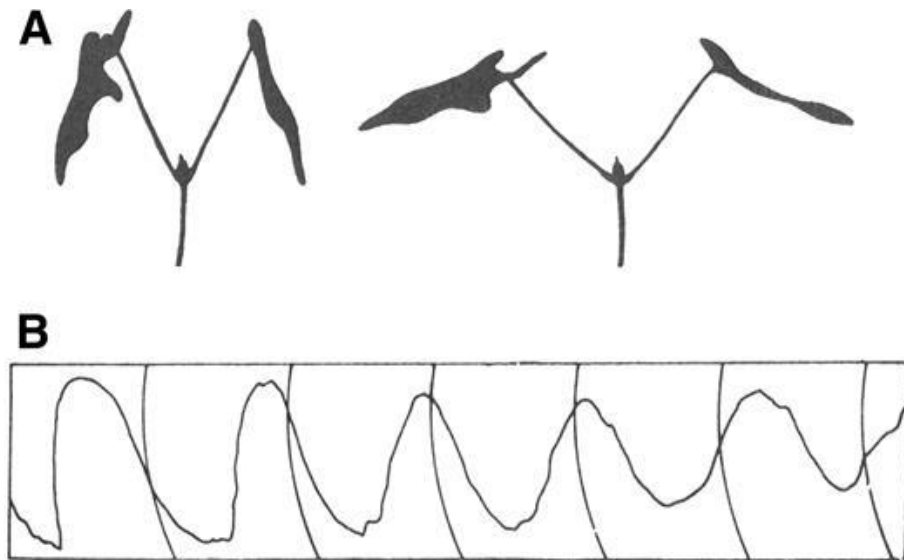
Echium amoenum üzerinde yapılan bir çalışmanın sonucunda, tuz stresi altındaki bitkinin farklı dokularındaki morfolojik değişimler incelenmiştir, ve bulgular analiz edilmiştir. Sulama suyunda tuzluluk arttıkça kök uzunluğu azalmış, aynı zamanda yaprak alanı azalma eğilimi göstermiştir. Suyun tuzluluğunun artmasıyla birlikte kuru ve yaş kök ağırlığı ile toprak üstü kısımlarının ağırlığı da diğer özellikler gibi azalmıştır (Ghajar Sepanlou 2011).

Moleküler Etkiler: Sensörler olarak bilinen moleküller, ilk stres sinyalini tanıyan moleküllerdir. Hücre içine bir sinyal göndermek için sensörler bir kademeyi başlatacak veya durduracaktır. Çoğu durumda bu, belirli gen setlerinin üretilmesine neden olacak nükleer transkripsiyon faktörlerini aktive edecektir. Stres durumunun belirli bir bileşeni tarafından tetiklenen sinyalleme kademesinin yalnızca bazı dalları, tek bir sensör tarafından düzenlenebilir. Kuraklık, tuz ve soğuk koşulları altında hücrelerin sitoplazmasına geçici Ca^{2+} akışının, apoplastik alan akışı veya dahili depo salınımlarından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Stres sinyallerine yönelik sensörlerden biri Ca^{2+} akışına neden olan kanaldır. Ligandlara duyarlı Ca^{2+} kanalları, Ca^{2+} salınımını dahili olarak düzenler. Bu ligandlar ikinci habercilerdir. Tekrarlayan Ca^{2+} geçici olayları, Ca^{2+} 'nın sinyalleme fonksiyonunun çok önemli bir bileşenidir. Bu geçici olaylara, erken Ca^{2+} sinyal basamakları tarafından oluşturulabilen absisik asit (ABA) gibi sinyal moleküllerinin yanı sıra ilk turdaki ikinci haberciler neden olabilir. Biyolojik reaksiyonları başlatmak için sensörler belirli hedefleri doğrudan fosforile edebilir veya aşağı yönde mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) kademesine bağlanabilir. Hücreler, membran reseptörlerinden alınan sinyalleri iletmek ve yükseltmek için sıklıkla birçok fosfoprotein kaskadı kullanır. Proteinlerin fosforilasyonu ve defosforilasyonu şüphesiz en yaygın hücre içi sinyal yollarıdır. Protein lokalizasyonu ve bozulması, makromoleküllerin toplanması, enzim aktivasyonu ve daha fazlasını içeren çok sayıda biyolojik aktivite onlar tarafından düzenlenir. Gen regülasyonunu ve enzim aktivitesini değiştiren reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), birçok abiyotik

stres etkeninin ilk göstergeleri arasındadır. ROS ve RNS, birçok bitkinin çevreye verdiği tepkiyi düzenleyen koordineli bir ağ oluştururlar (Rodriguez vd. 2005, Cramer vd. 2011).

1.1.7 Bitkilerde sirkadiyen ritim

Dünyanın dönüşünün dinamik kuvvetleri nedeniyle, ortam ışık ve sıcaklıkta döngüler yaşar. Sirkadiyen ritimler, bir organizmadan kaynaklanan ve çevreye tepki veren herhangi bir süreci ifade edebilir. Sirkadiyen ritim, organizmaların gece ve gündüz çok farklı metabolizmalarını, fizyolojilerini ve davranışlarını kontrol eder (Şekil 1.6). “Sirkadiyen” terimi, ilk olarak 1950’lerin sonlarında Franz Halberg tarafından kullanılmıştır. Latince "etrafında" anlamına gelen circa ve "gün" anlamına gelen diem sözcüklerinden oluşmaktadır. Sirkadiyen ritim, birbirine bağlı geri bildirim döngülerinden oluşan karmaşık bir ağ aracılığıyla bir dizi fizyolojik süreci kontrol eder. Büyüme düzenlemesi, çiçeklenmenin fotoperiyodik kontrolü ve biyotik ve abiyotik strese tepkiler gibi çeşitli bitki çevresel adaptasyonları, saat genlerindeki varyasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Saat, ortama karşı tamponlanmış olmasına ve çeşitli durumlarda yaklaşık 24 saatlik döngüleri sürdürmesine rağmen, sıcaklık veya ışıktaki ani değişiklikler gibi çevresel ipuçlarıyla sıfırlanabilir. Sirkadiyen saat ağı ile çevresel tepki yolları arasındaki bağlantıların karmaşıklığı, bu çelişkili ihtiyaçlarla açıklanabilir (McClung 2006a, Srivastava vd. 2019).



Şekil 1.6 Temsili Bir Türün Yaprak Hareketleri (McClung 2006b)

1.2 B-BOX Gen Ailesi

1.2.1 Bitkilerde transkripsiyon faktörleri

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler) (veya diziye özgü DNA bağlama faktörü), spesifik bir DNA dizisine bağlanıp, DNA tarafından haberci RNA'ya genetik bilginin transkripsiyon hızını kontrol eden proteinler olarak tanımlanmaktadır (Latchman 1997). Transkripsiyon faktörleri, promotörler ve arttırıcılar olarak bilinen DNA'daki düzenleyici elementlere bağlanır. DNA ile doğrudan etkileşimler yoluyla gen transkripsiyonunu ve dolayısıyla haberci RNA oluşumunu uyarırlar (veya bazen inhibe ederler) (Papavassiliou 1995). Bitkilerde transkripsiyon faktörleri çoğunlukla birbirlerine benzer DNA bağlama özelliklerine sahip olup, yapısal olarak da ilişkili protein ailelerini oluşturur ve ek olarak bazen ilgili fenomenlere dahil olurlar. Bazı transkripsiyon faktörü grupları, hedef dizilerin uzunluğunu ve değişkenliğini arttırmak için homo- ve/veya heterodimerize olabilirler. Transkripsiyonel aktivatörler, genel olarak, modüler bir aktivasyon alanı içerir. Transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri, fosforilasyon ve glikosilasyon gibi transkripsiyon sonrası modifikasyonun yanı sıra nükleer taşıma, oligomerizasyon vb. seviyelerinde kontrol edilmektedir (Meshi ve Iwabuchi 1995).

Transkripsiyon faktör genleri, bütün ökaryotik genomların büyük bir bölümünü oluşturur ve çoğunlukla kodladıkları DNA bağlama alanının türüne göre çeşitli ve genellikle büyük gen aileleri şeklinde gruplandırılabilirler. İşlevsel fazlalık, bu gen ailelerinde sıra dışı bir durum değildir; bu sebepten dolayı belirli transkripsiyon faktörü genlerinin uygun karakterizasyonu, çoğu zaman bunların bütün bir aile bağlamında incelenmesini gerektirir. Transkripsiyon faktörleri, hem protein-protein etkileşimleri yoluyla (kendi aralarında ve diğer protein aileleri ile) hem de transkripsiyon seviyesinde karmaşık ağlar oluştururlar (Riechmann ve Ratcliffe 2000).

1.2.2 B-BOX proteinleri

B-BOX (BBX) proteinleri, bir veya iki B-BOX motifli bir B-BOX domaini içeren bir çinko-parmak transkripsiyon faktörleri sınıfıdır ve bazen bir CCT (CONSTANS, CO-

benzeri ve TOC1) domaini de içermektedirler. Çinko bağlayıcı motiflerin bir alt tipi olan B-BOX domaini, çinko iyonlarının bağlanmasıyla yapısal olarak stabilize edilir. Hayvanlarda, RING-parmak ve sarmal-sarmal alanları sıklıkla konjuge edilerek üçlü motif (TRIM) proteinleri veya RING, B-BOX, sarmal-sarmal (RBCC) proteinleri oluşturmaktadır.

BBX proteinleri, fide fotomorfogenezi, çiçeklenmenin fotoperiyodik düzenlenmesi, biyotik ve abiyotik streslere tepkileri içeren büyüme ve gelişme süreçlerini kontrol eden düzenleyici ağlarda anahtar faktörlerdir. Daha önceki çalışmalarda, CCT domaini barındırmayan bitki BBX'leri keşfedilmiştir ve sonuç olarak, hem CCT domainine sahip olan hem de olmayan B-BOX içeren proteinler artık BBX proteinleri olarak adlandırılmaktadır (Liu vd. 2018). Bitki BBX'leri, DNA veya RNA yerine diğer proteinlerle etkileşime girerek transkripsiyonu düzenleyen çinko parmak proteinlerinin bir alt sınıfına ait transkripsiyon faktörleridir (Gangappa ve Botto 2014).

Bitkilerde BBX transkripsiyon faktörlerinin N-terminal bölgesindeki korunmuş Sistein (C) ve Histidin (H) kalıntıları, genellikle protein-protein etkileşimlerinde yer alması beklenen bir veya iki B-box alanı (CX2CX8CX7CX2CX4HX8H) taşır (Khanna vd. 2009, Ma vd. 2021).

Bazı BBX proteinleri, karboksil ucuna yakın ek bir CCT domaini içermektedir. CCT domaini yüksek oranda korunmuştur ve bu domain, transkripsiyonel düzenleme ve nükleer taşımada önemli roller oynar. BBX transkripsiyon faktörü ailesinin ışık ve sirkadiyen döngüde fonksiyonel olduğu bilinmektedir. Arabidopsis'in ilk BBX geni CONSTANS (CO) keşfedilmiştir. CO, iki B-BOX ve bir CCT domaini içermekle birlikte uzun gün koşullarında çiçeklenmenin fotoperiyod düzenlemesinde önemli bir rol oynar, ancak kısa gün (SD) koşullarında çiçeklenme süresi üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Huang vd. 2012, Chu vd. 2016).

Çinko parmak transkripsiyon faktörlerinin bir sınıfı olan B-BOX proteinleri, bitkilerde önemli metabolitlerin biyosentezine yol açan birçok ışık sinyali yolağına aracılık eder. B-

BOX proteinleri, bitki büyümesini, gelişimini düzenleyebilir ve stres tepkisine bağlı olabilir (Wei vd. 2020, Obel vd. 2022).

Son genom çapında ekspresyon çalışmaları, B-BOX proteinlerinin bitki hormonu sinyalleme tepkilerinde yer aldığını ileri sürmüştür. Bitkilerin büyüme ve gelişme süreçlerinde olumsuz etki oluşturan dış faktörler stres olarak tanımlanmaktadır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik stres faktörleri olarak iki grupta incelenmektedir. Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, insanlar ve hayvanlar biyotik stres faktörlerini oluşturmaktadır. Abiyotik stres faktörleri ise toprak, ışık, su, radyasyon, kimyasal maddeler, yer çekim kuvveti, manyetik kuvvetler gibi çevresel faktörlerdir (Büyük vd. 2012). Abiyotik stresler bitkinin büyüme ve gelişmesi için tehlike arz eder ve küresel mahsul kaybına yol açmaktadır. Çevresel değişimlerin uyguladığı baskıyı düşürmek ve artan nüfusla beraber artış gösteren talebi karşılamak adına, bu üretilen mahsullerin strese toleranslı olarak donatılması gerekliliktir (Carmenza Muñoz ve Leterme 2002).

Domateste (*Solanum lycopersicum*) B-BOX genleri tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Gen dağılımı, sentez analizleri, ekzon-intron mimarisi ve motif farklılıkları araştırılmıştır, promotör ve gen ekspresyonu analizi, BBX'lerin bitkinin ışığa ve düşük sıcaklık sinyalleşmesine tepkisinde önemli roller oynadığını göstermiştir (Bu vd. 2021). Elma (*Malus domestica* Borkh.) üzerinde yapılan bir çalışmada B-BOX gen ailesi üyelerinin organa özgü ifadenin özelliklerine göre, cis etkili öğelerin bir analizi, çoğunlukla promotör dizilerinde stres yanıtıyla ilgili öğelerin yaygın olduğunu göstermiştir. (Liu vd. 2017). Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) B-BOX genleri farklı koşullar altında, özellikle farklı hormonlar ve aydınlık-karanlık koşulları altında değişken ekspresyonlar sergilemişlerdir ve genlerin aydınlık-karanlık muamele altında düzenlendiğini ve bazı bitki hormonları absisik asit, indol-3-asetik asit ve salisilik asit tarafından güçlü bir şekilde indüklendiği tespit edilmiştir (Chen vd. 2021). *Rosaceae* familyasına ait 7 türdeki B-BOX genleri üzerine yapılan bir çalışmada genlerin çiçeklenme indüksiyonunda potansiyel katılımları belirlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak, B-BOX genleri, özellikle fonksiyonel analiz alanında bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için potansiyel genetik

belirteçler olarak kullanılabilceği ve meyve bitkilerinde çiçek indüksiyonunda yer aldıkları belirtilmiştir (Shalmani vd. 2018b).

1.2.2.1 B-BOX proteinlerinin bitki çimlenmesi üzerindeki etkileri

Fitokrom etkileşim faktörleri (PIF'ler), HY5, HYH ve COP1 gibi başlıca ışık düzenleyici proteinler, fotoreseptörlerden ışık sinyalleri alır. Bunlar arasında COP1 ve PIF'ler negatif düzenleyicilerken, HY5 ve HYH pozitif düzenleyicilerdir, yani fotomorfogenezi olumlu yönde etkilemektedirler. HY5 ve HYH, ışık varlığında işlevseldir, ancak düşük ışık koşullarında, COP1/SUPPRESSOR OF phyA-105 (SPA) kompleksi tarafından özellikle bozunmak üzere hedeflenirler. Bu, karanlıkta COP1'in nükleer translokasyonu ve ışıkta sitosolik bölünmesi ile senkronize edilir. PIF'ler çoğunlukla karanlıkta oluşur ve fitokrom bağımlı bir şekilde ışık tarafından bozunur. Bu proteinler, hormon ve ışık yollarının karmaşık sinyal ağlarını birbirine bağlayan çok önemli bir düzenleyici düğüm oluşturur (Vaishak vd. 2019). Bir bitkinin yaşam döngüsünde çimlenme ilk ve en önemli biyolojik aşamadır. Tohum embriyosunun bir sonraki neslin çoğalması için gerekli koordineli metabolik aktiviteleri sürdürmesine izin veren çeşitli iç ve dış uyarıcılar tarafından kontrol edilir (Koller ve Hadas 1982).

B-BOX transkripsiyon faktörleri, tohum çimlenmesinde pozitif veya negatif rol oynayabilmektedirler. Arabidopsis thaliana türündeki B-BOX proteinleri üzerine yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, organizmadaki B-BOX proteinlerinin bir kısmı tohum fotomorfogenezi desteklerken, diğer bir kısmı ise baskılamaktadır (Vaishak vd. 2019).

B-BOX transkripsiyon faktörleri bitkinin çimlenme sürecinde de kritik bir rol oynamaktadır. Çimlenme, tohumun dinlenme durumundan aktif büyüme ve gelişme sürecine geçişini temsil eder. B-BOX proteinleri bu süreçte çeşitli mekanizmalar aracılığıyla çimlenmeyi düzenler. Geçmişteki birçok çalışma, B-BOX transkripsiyon faktörlerinin tohum çimlenmesinde hormonal sinyalizasyon üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle, absisik asit (ABA) ve giberellin (GA) gibi hormonal sinyallerin B-BOX faktörlerinin ekspresyonunu ve aktivitesini etkilediği bilinmektedir.

ABA, tohumun dinlenme durumunu sürdürerek çimlenmeyi inhibe ederken, GA tohumun çimlenme potansiyelini artırır. B-BOX faktörleri, bu hormonal sinyallerin algılanması ve sinyal yollarının düzenlenmesi yoluyla tohumun çimlenmesi üzerinde etkili olabilir. Ayrıca, B-BOX proteinleri çimlenme sürecinde çeşitli genlerin düzenlenmesinde rol oynar (Shalmani vd. 2019, Song vd. 2020).

Örneğin, bazı B-BOX transkripsiyon faktörleri, çimlenme sürecinin başlamasını teşvik eden genlerin ekspresyonunu aktive eder veya çimlenmeyi inhibe eden genlerin ekspresyonunu baskılayabilir. Bu şekilde, B-BOX transkripsiyon faktörleri tohumun embriyonik büyümesi, kök oluşumu ve kallus oluşumu gibi çimlenme süreçlerini düzenleyebilir. Ancak, B-BOX transkripsiyon faktörlerinin çimlenme sürecindeki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır ve bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. B-BOX proteinlerinin spesifik hedef genler ve etkileşim ağları üzerindeki etkilerinin aydınlatılması, bitki çimlenmesinin moleküler düzeydeki düzenlemesini daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır (Shalmani vd. 2019, Song vd. 2020).

1.2.2.2 B-BOX proteinlerinin çiçek oluşumu üzerindeki etkileri

Vegetatif evreden üreme evresine geçiş, bitkilerin fizyolojik durumunun yanında, fotoperiyod, ışık kalitesi ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelere cevap olarak karmaşık bir dizi genetik yolak tarafından düzenlenmektedir. CO, endüktif fotoperiyotlara yanıt olarak çiçeklenmenin temel düzenleyicilerinden biridir ve “florigen” geni Flowering Lotus T (FT) VE CO1’in Aşırı İfadesinin Baskılayıcısı (SOC1) gibi çiçek indükleyicileri destekleyip, fotoperiyodik çiçeklenme kontrolünün temel bileşenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bitkilerde, endüktif uzun günlerde, çiçeklenme için çok önemli bir aktivatör olan CO, transkripsiyonu aktive etmek ve çiçeklenmeyi başlatmak adına FT promotörünün bölgeleriyle CCT domaini aracılığıyla doğrudan birleşmektedir. CO-FT modülü, fotoperiyodik çiçeklenmenin kontrolünde önemli bir düzenleyici merkez görevi alır ve çeşitli bitki türlerinde yüksek oranda korunmaktadır (Tiwari vd. 2010, Song vd. 2020).

Arabidopsis thaliana bitkisindeki *BBX* gen ailesi üyeleri, çiçeklenme zamanlamasının düzenlenmesinde önemli rol oynar. *BBX19*, *BBX20* ve *BBX24* gibi *B-BOX* genlerinin, çiçeklenme üzerinde pozitif bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu genler, çiçeklenme inhibitörü olan FLOWERING LOCUS C (FLC) geninin ekspresyonunu baskılayarak çiçeklenme sürecini teşvik eder. Ayrıca, *BBX32* ve *BBX33* gibi diğer *B-BOX* genlerinin ise çiçeklenmeyi inhibe edici etkisi olduğu bulunmuştur. Bu genler, çiçeklenmeyi tetikleyen FT promotörünün ekspresyonunu inhibe ederek çiçeklenmeyi geciktirir. Günler kritik gün uzunluğundan daha uzunsa, CO proteini ışıkla stabilize edilir ve böylece FT ifadesini teşvik edebilir. Işık yokluğunda, CO karanlıkta hızla bozulur ve FT ifadesini destekleyemez. Fotoperiyod dışında, diğer dış ve iç işaretler FT düzenlemesine katılır. Örneğin, ortam sıcaklığındaki bir artış, kromatin erişilebilirliğini etkileyerek FT'nin fotoperiyoda ve CO bağımlılığını geçersiz kılar. Bienal *Arabidopsis* bitkilerinde, vernalizasyondan önceki FLOWERING LOCUS C (FLC) transkripsiyon faktörünün yüksek seviyeleri, uzun gün fotoperiyodunda FT'nin aktivasyonunu önler. FLC, FT'nin ilk intronundaki varsayılan düzenleyici bölgelere doğrudan bağlanır. FLC'nin etkisi kısmen, bir kompleks oluşturabileceği Kısa Bitkisel Faz'ın (SVP) varlığına bağlıdır. SVP tercihen birkaç varsayılan CArG kutusu içeren FT promotördeki bölgelere bağlanır. SVP baskısının FT üzerindeki etkisi, özellikle genç bitkilerde ve ayrıca soğuk ortam sıcaklığında görülür. Bitki yaşı, microRNA 156 (miR156) yolu aracılığıyla FT düzenlemesine katılır (Lee vd. 2007, Tiwari vd. 2010).

1.2.2.3 B-BOX proteinlerinin sirkadiyen ritim ile ilişkisi

Bir bitkinin yaşam döngüsü boyunca büyüme ve gelişmesini etkileyen en önemli çevresel unsurlardan biri güneş ışığıdır. Bitkiler, sürekli değişen ışık seviyelerine uyum sağlamak için doğru süreçlerin geliştirilmesini sağlayan hassas ve karmaşık bir düzenleyici sistem geliştirmiştir (Xu vd. 2017).

Arabidopsis thaliana'da, sekiz varsayılan transkripsiyon faktörünü kodlayan çift *B-BOX* çinko parmak (DBB, DOUBLE B-BOX) genlerinin küçük bir alt ailesi, sirkadiyen ritim ve ışık sinyallerine yanıt olarak hipokotil uzamasının erken fotomorfojenik düzenlemesine referansla karakterize edilmiştir. Bunlar arasında beş DBB geninin

transkripsiyonunun sirkadiyen ritmin kontrolü altında olduğu tespit edilmiştir. Bu varsayılan transkripsiyon faktörlerinin fizyolojik rolleri hakkında fikir sahibi olmak için ileri ve geri genetik çalışmalar yapılmıştır. Sonuçlar, erken fotomorfojenez sırasında ışık sinyali iletiminde yaygın olarak rol oynadıkları öne sürülmüştür (Kumagai vd. 2008).

Benzer şekilde, *Solanum sogarandinum*'da bir *BBX* geni tanımlanmıştır ve *BBX24* ifadesinin *S. sogarandinum* ve *Solanum tuberosum*'da sirkadiyen döngü sergilediği gösterilmiştir. *StBBX24* promotöründe bulunan sirkadiyen DNA motifini bağlayan ve ZPR1 adı verilen çinko parmak koordinatörlerinin C4 alt sınıfına ait bir protein tespit edilmiştir. ZPR1'ler, 'ZPR1 domaini' olarak adlandırılan ve iki C4 tipi çinko parmağı ve tanımlanmamış alanlardan oluşan kopyalanmış bir modül ile karakterize edilen, evrimsel olarak korunan proteinlerdir (Kielbowicz-Matuk vd. 2017).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu vd. (2021) tarafından, domateste (*Solanum lycopersicum*) 31 *B-BOX* geni tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Gen dağılımı, sentez analizleri, ekzon-intron mimarisi ve motif farklılıkları araştırılmıştır, promotör ve gen ekspresyonu analizi, *BBX*'lerin bitkinin ışığa ve düşük sıcaklık sinyalleşmesine tepkisinde önemli roller oynadığını göstermiştir (Bu vd. 2021).

Liu vd. (2018) tarafından, elma (*Malus domestica Borkh.*) üzerinde yapılan bir çalışmada toplam 64 *B-BOX* üyesi (*MdBBX*) tespit edilmiştir. Tüm *MdBBX*'ler, filogenetik ilişkiye, içerdiği *B-BOX* sayısına ve ek bir CCT alanı olup olmadığına göre beş gruba ayrılmıştır. Organa özgü ifadenin özelliklerine göre, *MdBBX*'ler mikroarray bilgilerine göre üç gruba ayrılmıştır. Cis etkili öğelerin bir analizi, çoğu *MdBBX*'in promotör dizilerinde stres yanıtıyla ilgili öğelerin yaygın olduğunu göstermiştir. Farklı gruplardan on iki *MdBBX* üyesi rastgele seçilmiş ve abiyotik streslere maruz bırakılmıştır. 12 *MdBBX*'ten altısı ozmotik basınca, tuza, soğuk stresine ve eksojen absisik asit muamelesine duyarlı olduğu gözlemlenmiştir ve ifadeleri 20 kattan fazla artmıştır. Sonuçlar, *MdBBX*'lerin abiyotik strese yanıt olarak yer alabileceğini göstermiştir (Liu vd. 2018).

Chen vd. (2021) tarafından, kapsamlı biyoinformatik analiz yoluyla, buğdayda (*Triticum aestivum L.*) 96 *B-BOX* genini tanımlanıp ve karakterize edilmiştir. Farklı koşullar altında, özellikle farklı hormonlar ve aydınlık-karanlık koşulları altında ekspresyon kalıpları detaylı olarak incelenmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR ile farklı dokulardaki altı *TabBX* geninin ekspresyon profillerini saptanarak, altı genin aydınlık-karanlık muamele altında düzenlendiğini ve bazı *TabBX* genlerinin (*TabBX2.11*, *TabBX2.13*, *TabBX2.15* ve *TabBX2.15* ve *TabBX3.10*), bitki hormonları absisik asit, indol-3-asetik asit ve salisilik asit tarafından güçlü bir şekilde indüklendiği tespit edilmiştir (Chen vd. 2021).

Zhao vd. (2021) tarafından, 28 Tartar karabuğday (*Fagopyrum tataricum*) *B-BOX* (*FtBBX*) geni tanımlanmış ve bir karşılaştırma programı kullanılarak taranmıştır. Tartar

karabuğdayının *B-BOX* genleri, *FtBBX*'lerin Tartar karabuğdayının büyüme ve gelişmesinde önemli roller oynayabileceğini gösteren farklı koşullar altında değişen ekspresyon göstermiştir (Zhao, vd. 2021).

Shalmani vd. (2018) tarafından, yedi *Rosaceae* türünden 212 *B-BOX* geni araştırılmıştır. (*Malus x domestica*'dan 67, *Pyruscommunis*'ten 40, *Rosa Chinesis*'ten 22, *Prunuspersica*'dan 20, *Fragariavesca*'dan 21, *Prunusavium*'dan 22 ve *Rubusoccidentalis*'ten 20). Çalışmada *B-BOX* genlerinin çiçeklenme indüksiyonunda potansiyel katılımları belirlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak, *B-BOX* genleri, özellikle fonksiyonel analiz alanında bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için potansiyel genetik belirteçler olarak kullanılabilirliği ve meyve bitkilerinde çiçek indüksiyonunda yer aldıkları belirtilmiştir (Shalmani vd. 2018a).

Ma vd. (2021) tarafından, biberde (*Capsicum annuum L.*) 24 *B-BOX* (*CaBBX*) geni tespit edilmiştir. Bu genlerin bitki büyümesi, gelişmesi ve abiyotik ve biyotik stres tepkisinde rol aldığı belirtilmiştir (Ma vd. 2021).

Obel vd. (2022) tarafından, salatalık (*Cucumis sativus L.*) genomunda 26 *B-BOX* geni tanımlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, *B-BOX* gen ailesinin karotenoid birikimi ve fotoperiyodik tepkilerdeki biyolojik rollerini anlamak için bir çerçeve sağlamıştır (Obel vd. 2022).

Feng vd. (2021) tarafından, *Gossypium arboreum*, *G. raimondii*, *G. hirsutum* ve *G. barbadense*'de genom çapında tanımlama yoluyla sırasıyla 17, 18, 37 ve 33 *B-BOX* geni tespit edilmiştir. Çalışmada, Bu proteinlerin, bitki büyüme ve gelişimini düzenlemenin yanı sıra abiyotik strese toleransında önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Feng vd. 2021).

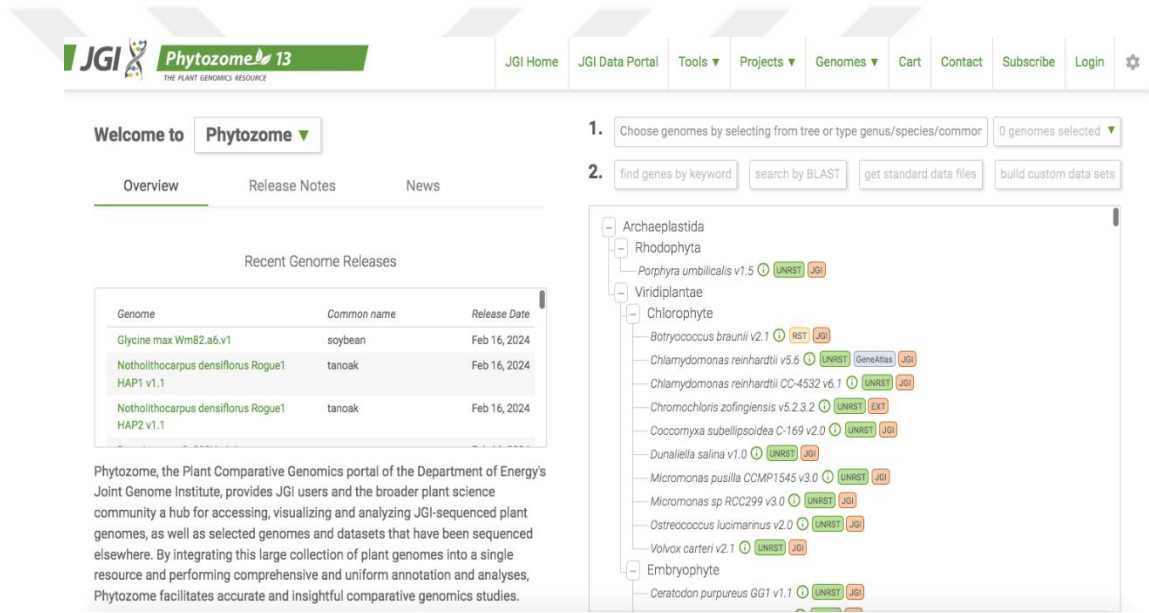
Shalmani vd. (2019) tarafından, beş *Poaceae* türünden toplam 131 *B-BOX* gen ailesi üyesi incelenmiş, *B-BOX* proteinlerinin, fotomorfojeniz, çiçeklenmenin fotoperiyodik düzenlenmesi ve biyotik ve abiyotik streslere tepkiler dahil olmak üzere bitki büyüme düzenlenmesi ve gelişiminde önemli rol aldıklarının altı çizilmiştir (Shalmani vd. 2019).

Li vd. (2014) tarafından, *B-BOX* STO gen ailesinin fonksiyonunu karakterize edilerek fotoperiyot/sirkadiyen ritim geni ile FRIGIDA/FLC arasındaki ilişki araştırılmıştır. STO'nun iki *B-BOX* domaini bulunmakta birlikte, CTT domaini bulundurmamaktadır. İfadesi sirkadiyen ritim tarafından kontrol edilir ve çevresel faktörlerden ve fitohormonlardan etkilenmektedir. Kısa gün büyüme koşulları altında STO-1 mutant çiçekler wild-type daha geç çiçek açarken, STO'nun aşırı ekspresyonu hem uzun hem de kısa günlerde erken çiçeklenmeye neden olur. STO aşırı ifadesi yalnızca FLC ifade seviyesini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda FT ve SOC1 ifadesini de etkinleştirir. Sonuçlar, fotoperiyot ve sirkadiyen saat yolu geni STO'nun, anahtar çiçeklenme zamanı genleri FLC ve FT/SOC1'i ayrı ayrı etkileyebileceğini ve çiçeklenme düzenleme mekanizmasına yeni bir bakış açısı ortaya koymuştur Bu çalışmanın, bitki büyümesi, gelişmesi ve stres tepkisinde etkili olan B-BOX genlerinin dünyada ve ülkemizde en çok tüketilen ve zengin protein içeriği olan *P. vulgaris* bitkisi üzerinde incelenmesi ve çeşitli stres faktörlerine karşı geliştirdiği mekanizmaların gözlemlenmesi, gen ailesinin moleküler fonksiyonlarının aydınlatılması ile strese dirençli bitkilerin geliştirilmesi amacındaki çalışmalara yol gösterici olması amaçlanmaktadır (Li vd. 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 *Phaseolus vulgaris*'te B-BOX Genlerinin Tanımlanması

P. vulgaris B-BOX dizileri, Pfam ID (PF00643) ve *P. vulgaris* genom veritabanı v2.0 kullanılarak Phytozome v13'ten (www.phytozomes.net) indirildi (Goodstein vd. 2012). Daha sonra *P. vulgaris*'teki potansiyel B-BOX proteinleri, Blastp araması kullanılarak bir protein veri tabanı ile karşılaştırıldı. B-BOX proteinlerinin fizikokimyasal durumunu gözlemek için ProtParam Aracı (<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanıldı.



Welcome to **Phytozome**

Overview Release Notes News

Recent Genome Releases

Genome	Common name	Release Date
Glycine max Wm82.a6.v1	soybean	Feb 16, 2024
Notholithocarpus densiflorus Rogue1 HAP1 v1.1	tanoak	Feb 16, 2024
Notholithocarpus densiflorus Rogue1 HAP2 v1.1	tanoak	Feb 16, 2024

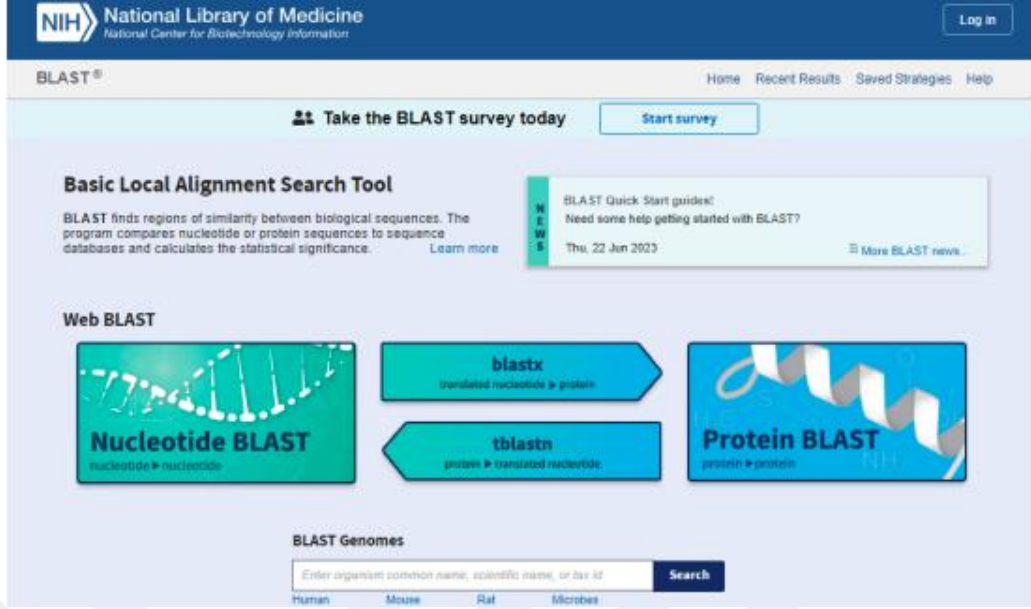
Phytozome, the Plant Comparative Genomics portal of the Department of Energy's Joint Genome Institute, provides JGI users and the broader plant science community a hub for accessing, visualizing and analyzing JGI-sequenced plant genomes, as well as selected genomes and datasets that have been sequenced elsewhere. By integrating this large collection of plant genomes into a single resource and performing comprehensive and uniform annotation and analyses, Phytozome facilitates accurate and insightful comparative genomics studies.

1. Choose genomes by selecting from tree or type genus/species/commor 0 genomes selected

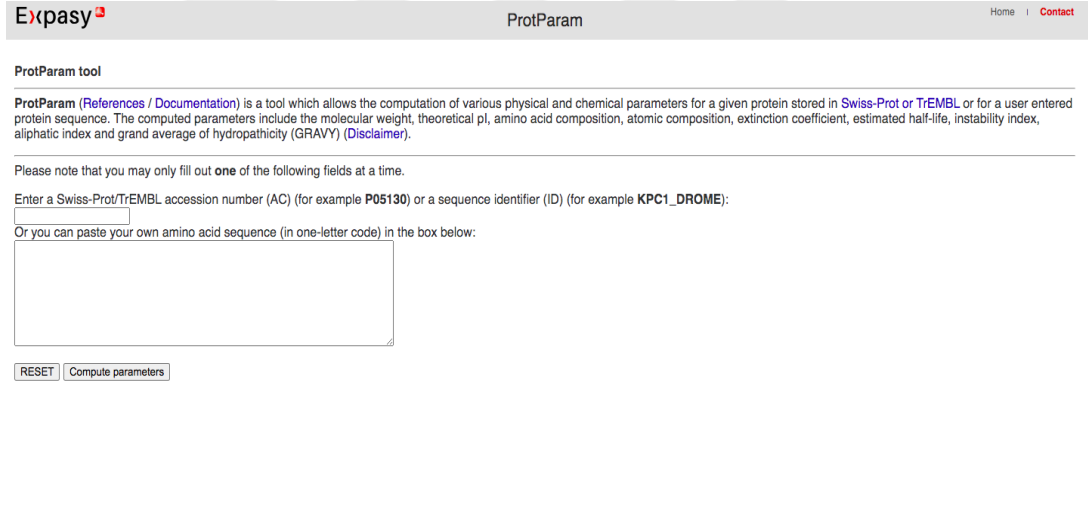
2. find genes by keyword search by BLAST get standard data files build custom data sets

Archaplastida
Rhodophyta
Porphyra umbilicalis v1.5 UNRST JGI
Viridiplantae
Chlorophyte
Botryococcus braunii v2.1 RST JGI
Chlamydomonas reinhardtii v5.6 UNRST GeneA99a JGI
Chlamydomonas reinhardtii CC-4532 v6.1 UNRST JGI
Chromocloris zofingensis v5.2.3.2 UNRST EXT
Coccomyxa subellipsoidea C-169 v2.0 UNRST JGI
Dunaliella salina v1.0 UNRST JGI
Micromonas pusilla CCMP1545 v3.0 UNRST JGI
Micromonas sp RCC299 v3.0 UNRST JGI
Ostreococcus lucimarinus v2.0 UNRST JGI
Volvox carteri v2.1 UNRST JGI
Embryophyte
Ceratodon purpureus GG1 v1.1 UNRST JGI

Şekil 3.1 Phytozome veri tabanı



Şekil 3.2 NCBI Blast veri tabanı

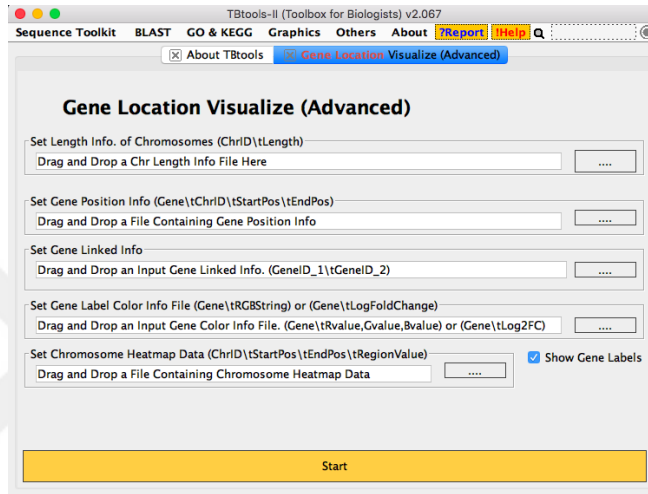


Şekil 3.3 Expasy Protparam veri tabanı

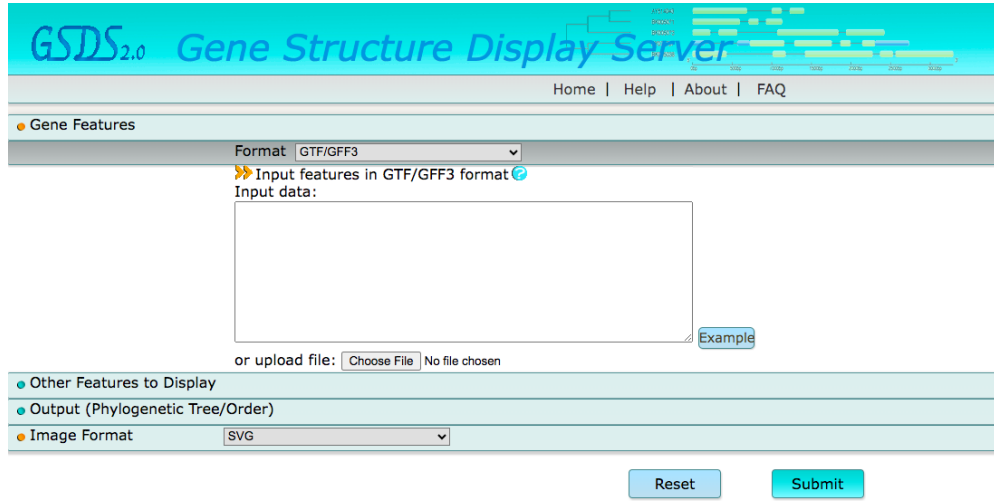
3.2 B-BOX Geninin Yapısı, Fiziksel Konumları, Korunmuş Motifleri ve Domainleri

PvBBX genleri, TBtools Araç Takımı (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) kullanılarak tüm *P. Vulgaris* kromozomları üzerinde çizildi (Chen vd. 2020). *P.vulgaris*'teki *B-BOX* genlerinin fiziksel özelliklerini göstermek için Gene Structure Display Server v2.0

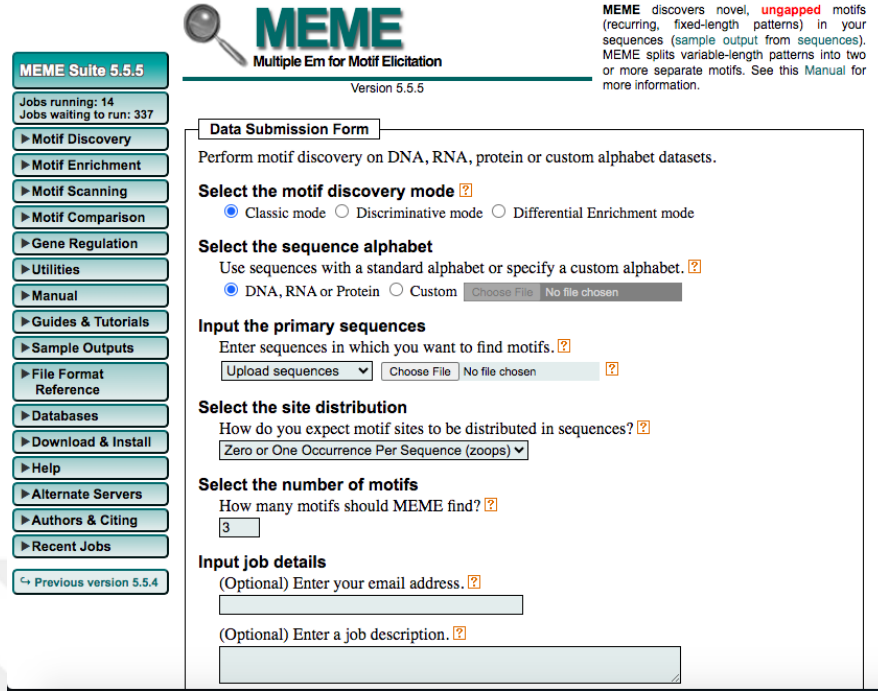
(www.gsds.gaolab.org) kullanıldı (Hu vd. 2014). PvBBX proteinlerinin korunmuş motiflerini belirlemek için MEME Aracı (https://meme-suite.org/meme/) kullanıldı (Bailey vd. 2006). NCBI Conserved Domain Search kullanılarak PvBBX'lerin domain bölgeleri elde edildi (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) ve TBtools yardımıyla, üyelerin filogenetik ilişkileri motif ve domain benzerlikleriyle birlikte görselleştirilip ispatlandı (Chen vd. 2020).



Şekil 3.4 TBtools programı kromozom haritası görüntüleme aracı



Şekil 3.5 Gene Structure Display Server veri tabanı



MEME Suite 5.5.5
Version 5.5.5

MEME
Multiple Em for Motif Elicitation

MEME discovers novel, **ungapped** motifs (recurring, fixed-length patterns) in your sequences (sample output from sequences). MEME splits variable-length patterns into two or more separate motifs. See this Manual for more information.

Data Submission Form

Perform motif discovery on DNA, RNA, protein or custom alphabet datasets.

Select the motif discovery mode ?

Classic mode Discriminative mode Differential Enrichment mode

Select the sequence alphabet
Use sequences with a standard alphabet or specify a custom alphabet. ?

DNA, RNA or Protein Custom

Input the primary sequences
Enter sequences in which you want to find motifs. ?

?

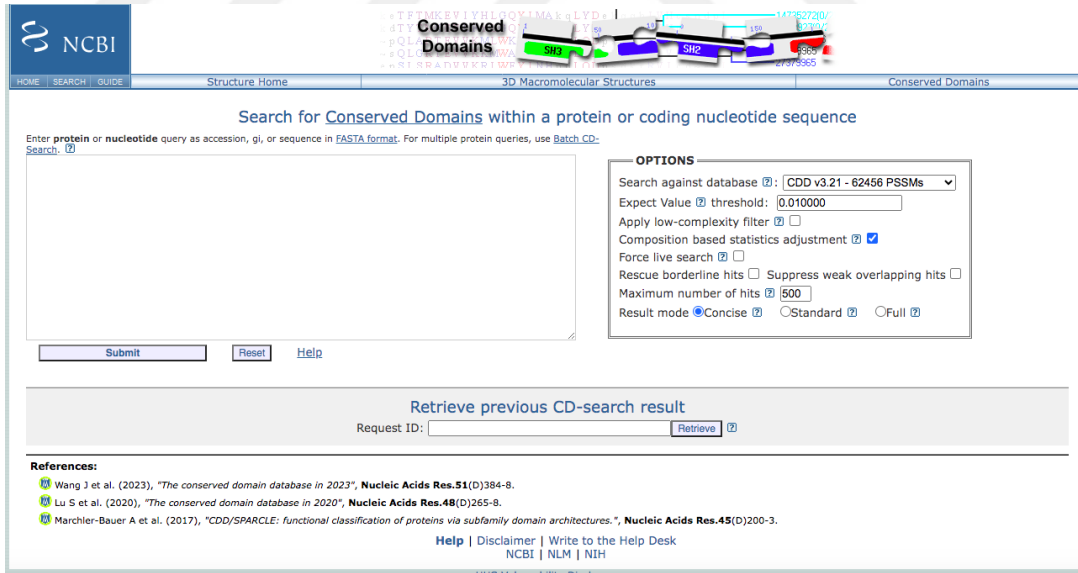
Select the site distribution
How do you expect motif sites to be distributed in sequences? ?

Select the number of motifs
How many motifs should MEME find? ?

Input job details
(Optional) Enter your email address. ?

(Optional) Enter a job description. ?

Şekil 3.6 MEME motif görselleştirme aracı



NCBI

Conserved Domains

Search for Conserved Domains within a protein or coding nucleotide sequence

Enter **protein** or **nucleotide** query as accession, gi, or sequence in **FASTA format**. For multiple protein queries, use **Batch CD**.
Search: ?

[Help](#)

OPTIONS

Search against database ? :

Expect Value ? threshold :

Apply low-complexity filter ?

Composition based statistics adjustment ?

Force live search ?

Rescue borderline hits Suppress weak overlapping hits

Maximum number of hits ?

Result mode Concise ? Standard ? Full ?

Retrieve previous CD-search result

Request ID: ?

References:

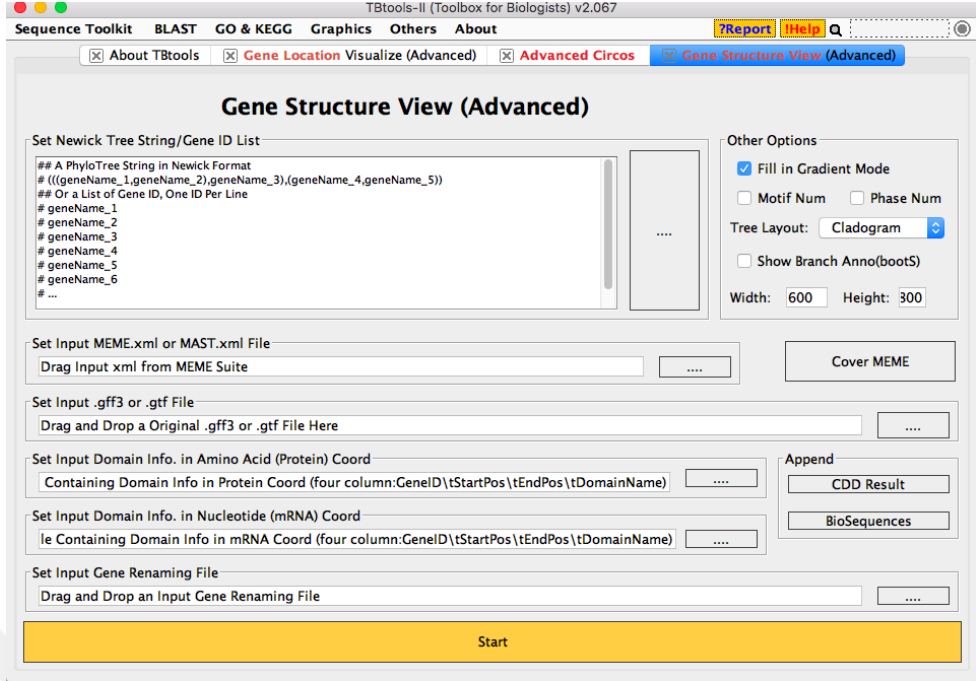
[Wang J et al. \(2023\), "The conserved domain database in 2023", *Nucleic Acids Res.*51\(D\)384-8.](#)

[Lu S et al. \(2020\), "The conserved domain database in 2020", *Nucleic Acids Res.*48\(D\)265-8.](#)

[Marchler-Bauer A et al. \(2017\), "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", *Nucleic Acids Res.*45\(D\)200-3.](#)

[Help](#) | [Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
NCBI | NLM | NIH

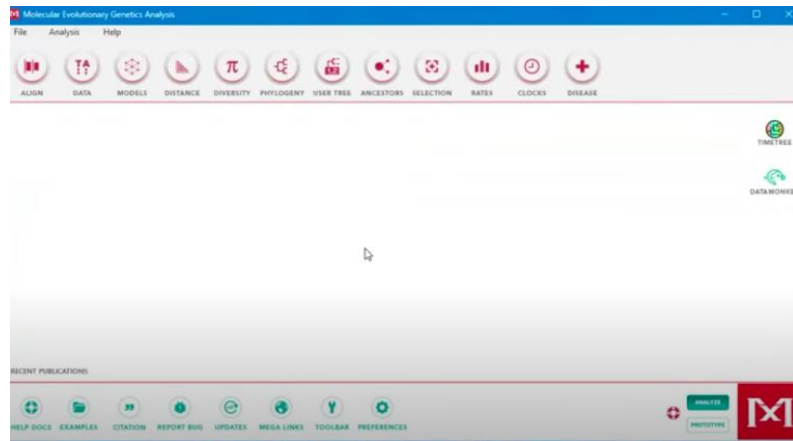
Şekil 3.7 NCBI Conserved Domain Search aracı



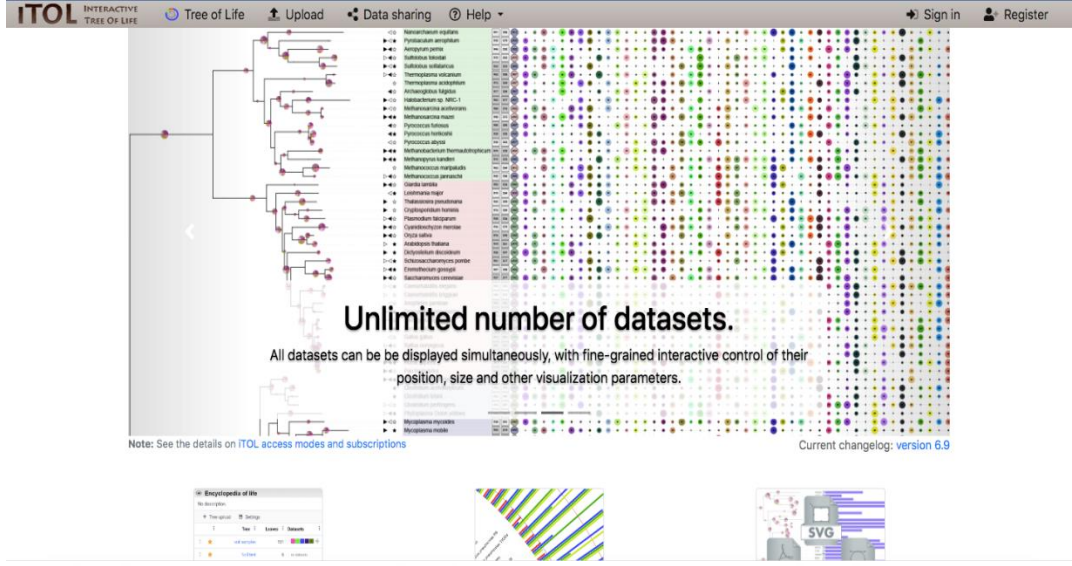
Şekil 3.8 TBtools programını gen yapısı, motif ve domain görüntüleme aracı

3.3 B-BOX Gen Ailesinin Filogenetik Analizi ve Dizi Hizalaması

Farklı PvBBX protein dizilerini hizalamak için ClustalW seçildi (Tamura vd. 2011). Maximum Likelihood (ML) yöntemi, filogenetik ağaçlar oluşturmak için (önyükleme değeri = 1000) MEGA11 yazılımı kullanılarak uygulandı (Tamura vd. 2011) ve iTOL veritabanı (www.itol.embl.de/index.shtml) kullanılarak görselleştirildi (Letunic ve Bork 2011).



Şekil 3.9 MEGA11 programını



Şekil 3.10 iTOL veri tabanı

3.4 B-BOX Promotörlerinin Analizi

Her *PvBBX* geninin 1.500 kb promotör DNA dizisi, Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) veritabanı v13 kullanılarak ekstre edildi ve PlantCARE veritabanı kullanılarak bir cis element taraması gerçekleştirildi (Rombauts vd. 1999).



Şekil 3.11 Phytozome veri tabanı genomik dizi aracı

Şekil 3.12 PlantCARE veri tabanı

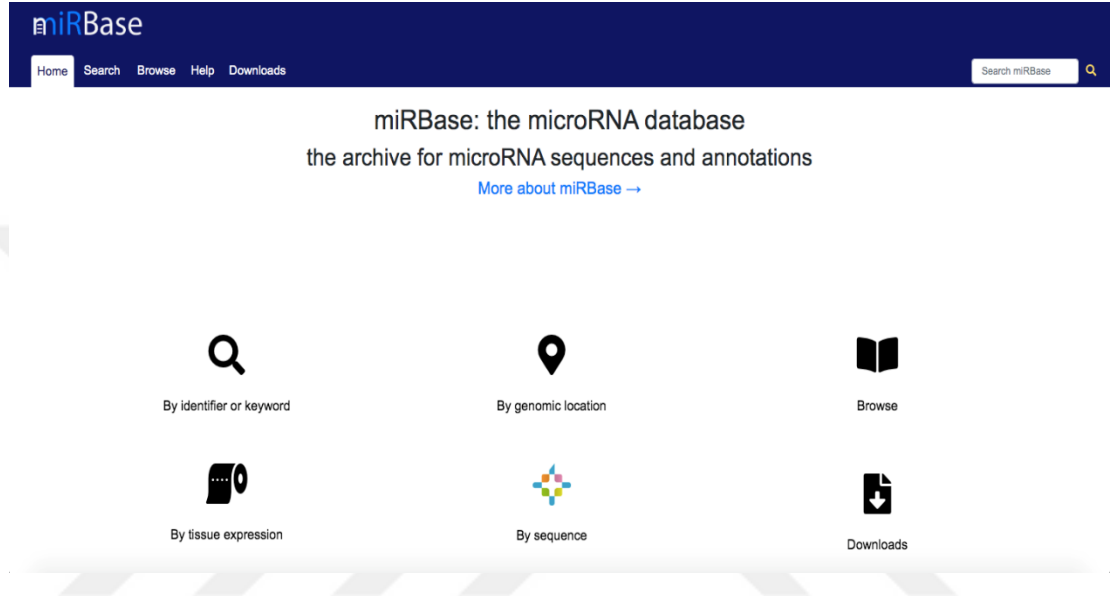
3.5 PvBBX Proteinlerinin 3 Boyutlu Yapısının Görselleştirilmesi

PvBBX üyelerinin protein yapıları Phyre2 kullanılarak tespit edildi (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) ve üç boyutlu yapılarının güvenilirlik oranı yüzde doksanın üzerinde olan *PvBBX* üyeleri görselleştirildi (Kelley vd. 2015).

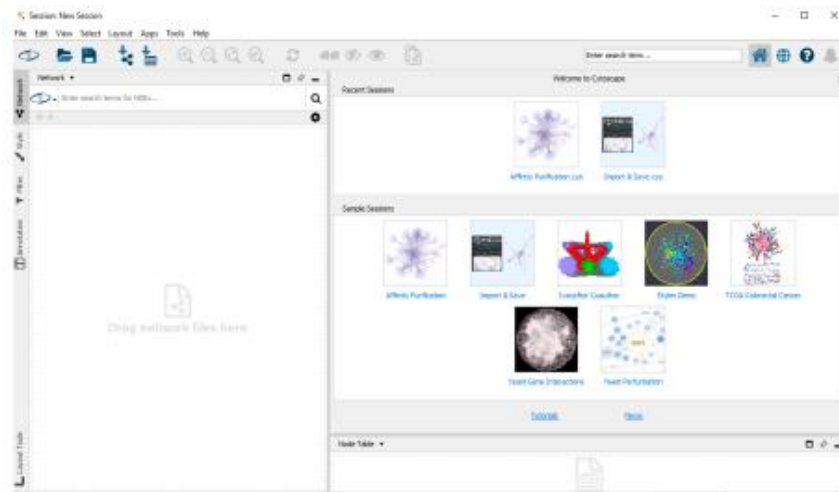
Şekil 3.13 Phyre2 veri tabanı

3.6 *PvBBX* Genlerinde miRNA Hedef Tahmini

Bilinen tüm miRNA bitki dizilerinin edinimi MiRBase v21.0 kullanılarak yapıldı (Kozomara vd 2018). MiRNA elemanlarının fonksiyonel görüntüleri Cytoscape (https://cytoscape.org/) kullanılarak elde edildi (Shannon vd. 2003).



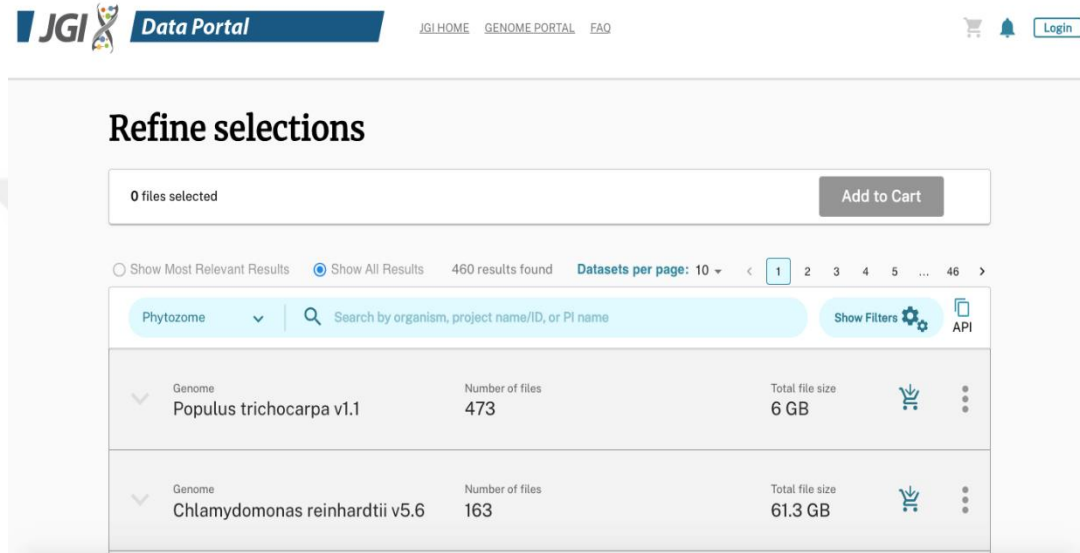
Şekil 3.14 MiRBase v21.0 veri tabanı



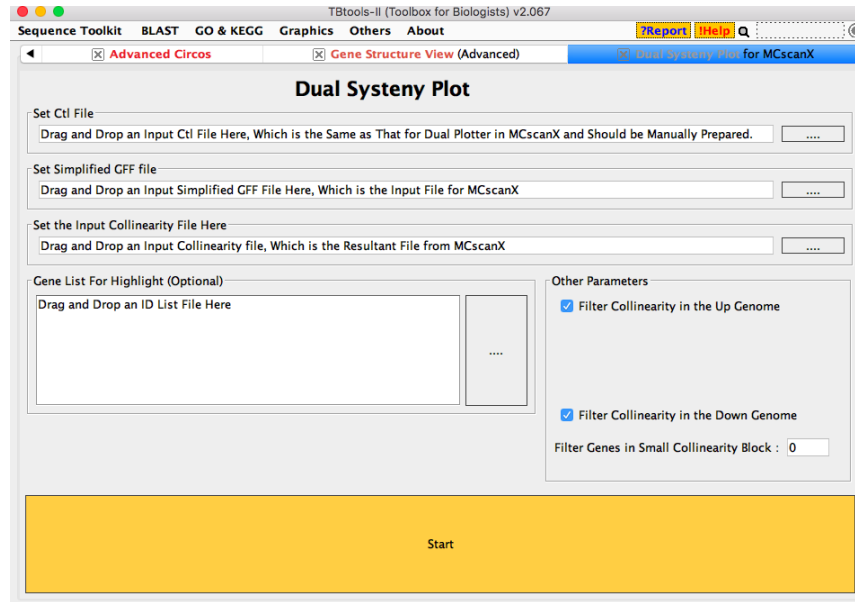
Şekil 3.15 Cytoscape programı

3.7 Genlerin Duplikasyonları ve Ortolog İlişkilerinin Analizi

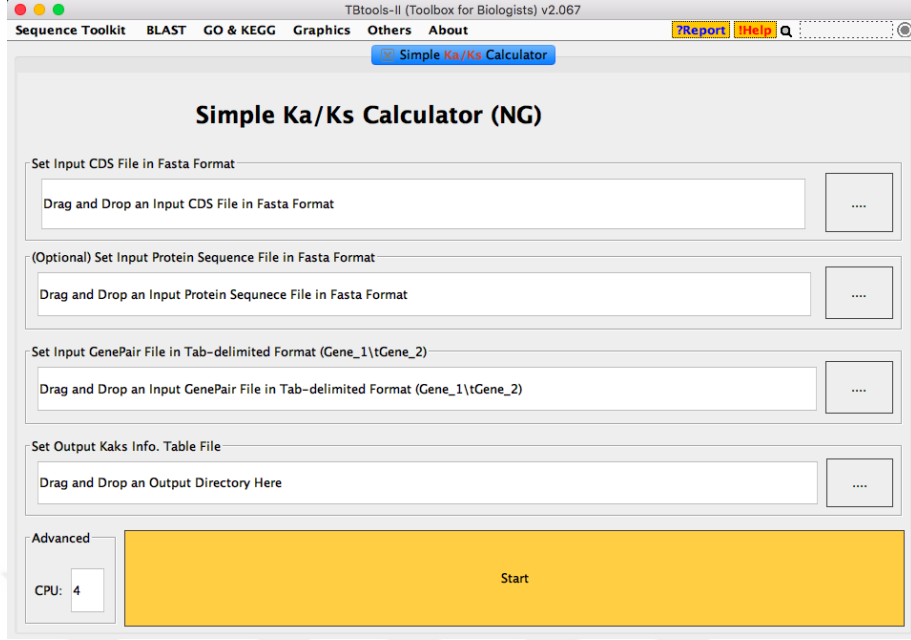
PvBBX genlerinin kendi aralarında ve ayrıca *Glycine max* ve *Arabidopsis thaliana*'daki *BBX* üyeleriyle ortolog ilişkileri, TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) Toolkit'in Sinteni Analizi ve Ka/Ks hesaplayıcı araçları kullanılarak Phytozome JGI Veri Portalı'ndan indirilen veriler kullanılarak elde edildi (Chen vd. 2020).



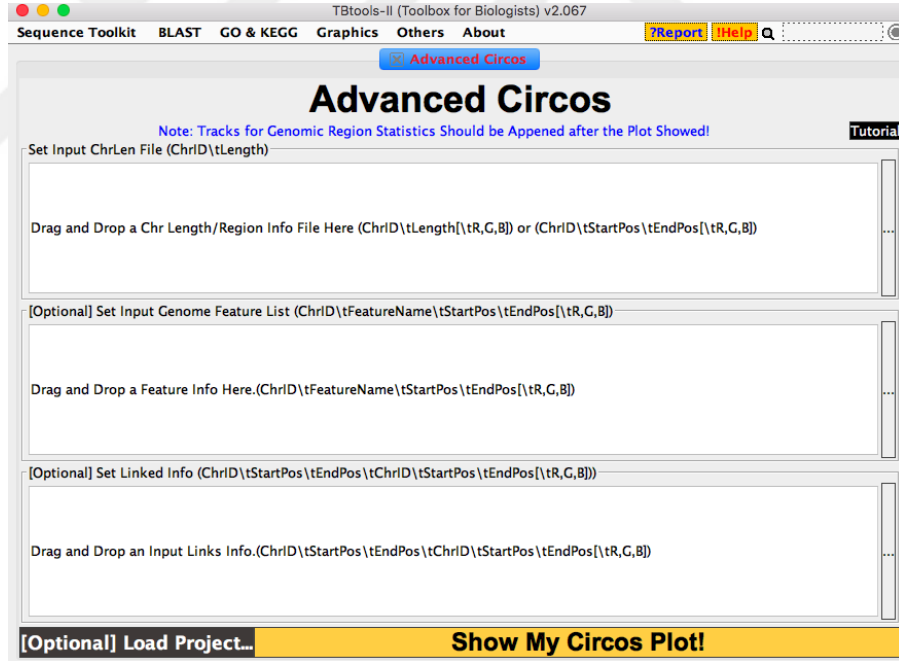
Şekil 3.16 JGI Data Portal veri tabanı



Şekil 3.17 TBtools programı sinteni analizi aracı



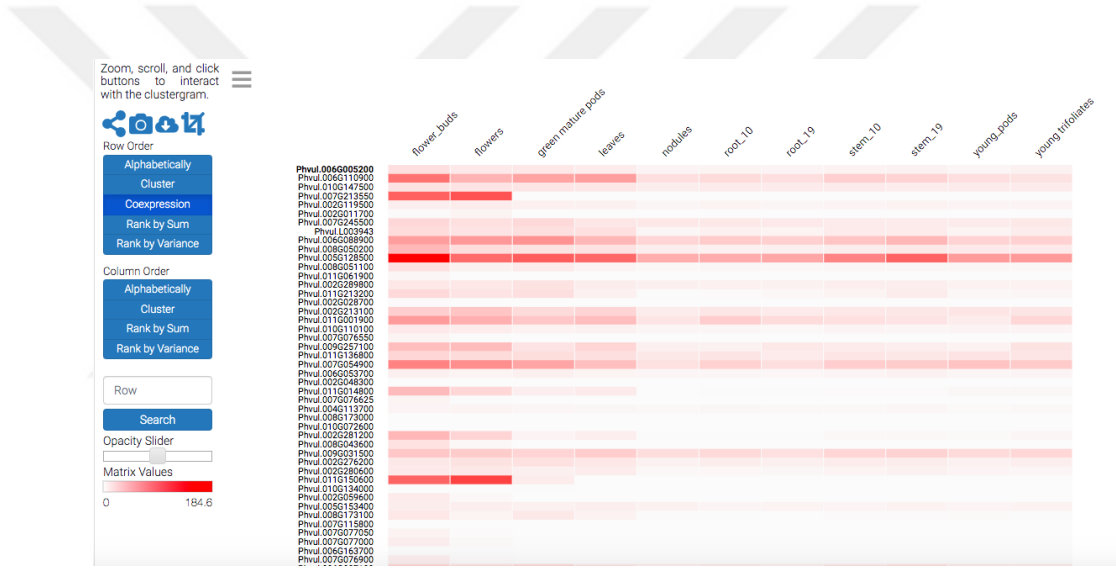
Şekil 3.18 TBtools programı Ka/Ks hesaplama aracı



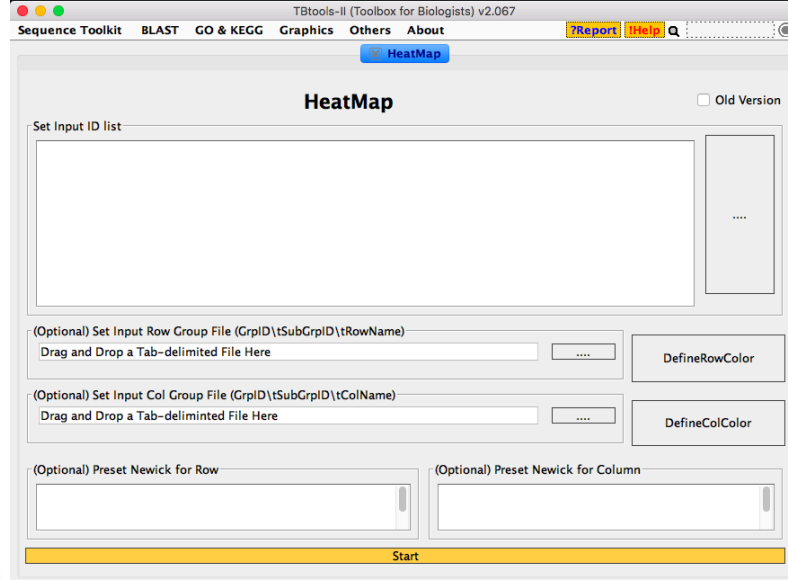
Şekil 3.19 TBtools programı Circos aracı

3.8 *PvBBX* Genlerinde Dokuya Özgü mRNA Seviyelerinin İncelenmesi

Phytozome Veritabanı v13, genç tomurcuklar, kökler, olgun tomurcuklar, gövdeler, yeşil yapraklar, nodüller, çiçekler, çiçek tomurcukları ve genç üç yapraklılar dahil olmak üzere büyümenin çeşitli aşamalarında farklı bitki dokularındaki *PvBBX* genlerinin ekspresyon derecesini değerlendirmek için kullanıldı. FPKM (dizilenen milyon baz çifti başına transkript dizisinin kilobaz başına beklenen parça sayısı), silico ekspresyon seviyelerini ifade etmek için kullanıldı. TBtools Araç Takımı (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) kullanılarak log₂'ye dönüştürülmüş FPKM değerleri kullanılarak bir ısı haritası grafiği oluşturuldu (Chen vd. 2020).



Şekil 3.20 Phytozome veri tabanı bitki doku ısı haritası grafiği



Şekil 3.21 TBtools programını ısı haritası grafiği oluşturma aracı

3.9 B-BOX Proteinlerinin Hücre İçi Konumları

P.vulgaris'teki B-BOX proteinlerinin çekirdek, mitokondri, kloroplast vb. hücre lokalizasyonunu belirlemek için WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) ve Tbttools Araç Takımı (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) kullanılmıştır (Horton vd. 2007, Chen vd. 2020)

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:

No file chosen



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

(↑Select organism type to activate the submit button)

Şekil 3.22 WoLF PSORT veri tabanı

3.10 Transkriptom Verileri Aracılığıyla *PvBBX* Genlerinin Tanımlanmış Ekspresyon Seviyesi

PvBBX genlerinin mRNA seviyelerini analiz etmek amacıyla Dizi Okuma Arşivi (SRA) kullanıldı. Daha sonra Büyük ve ark. (2016) erişim numaralı SRR957667 (kontrol yaprağı) ve SRR957668 (tuzla işlenmiş yaprak) kullanılmıştır. Ardından hiyerarşik kümelemeye yönelik ısı haritaları üretmek amacıyla TBtools Araç Takımı (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) kullanıldı (Chen vd. 2020).

3.11 Bitki Materyalleri ve Büyüme Koşulları

'Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' tescilli iki Türk fasulyesi çeşidi, 'Elkoca' ve 'Serra' tohumları kullanılmıştır. 5 dakika boyunca yüzde 5 (h/h) hipoklorit içeren bir solüsyonda yüzey sterilizasyonunun ardından, her iki çeşidin tohumları çimlenmiştir ve 0.2L modifiye 1/10 Hoagland solüsyonu içeren saksılarda hidroponik olarak büyütülmüştür (Büyük vd. 2016, İnal vd. 2017). *P. vulgaris* fideleri, 25°C'de ve %70 bağıl nemde 250 mmol m⁻² s⁻¹ fotosentetik foton akışına sahip kontrollü bir çevresel büyüme odasında büyütülmüştür. Fasulye fidelerine, büyüme odasındaki ilk üç yapraklı aşamaya geldikten sonra, 150 mM NaCl içeren Hoaglands çözeltisi (orta tuzluluk stresi için) kullanılarak 9 gün boyunca tuz stresi uygulanmıştır. 150 mM NaCl tuz stres seviyesi, birkaç ürün için eşik tuz konsantrasyonunu açıklayan ve büyüme üzerinde önemli bir etki gösteren önceki araştırmalara dayalı olarak seçilmiştir (Büyük vd. 2016, İnal vd. 2017). İki farklı fasulye çeşidinden yaprak, gövde ve kök dokuları toplanmıştır ve doğrudan toplam protein analizi için işlenmiştir. Ardından, RT-qPCR analizi için stres uygulamasının dokuzuncu gününden sonra -80 °C'de saklanmıştır.

3.12 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qPCR Analizleri

RNA ekstraksiyonu için NucleoSpin ® RNA Kiti (Macherey – Nagel, Almanya) kullanılmıştır. RNA'ların kalite kontrolü NanoDrop Lite (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, ABD) ve agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Komplementer DNA sentezi için iScript™ cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Primerleri oluşturmak için IDT,

Primer Quest kullanılmıştır ve primer dizileri de izelge 3.3'te gösterilmiştir. qRT-PCR reaksiyonları için iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, ABD) kullanılmıştır. Light Cycler® Nano qPCR cihazı, qRT-PCR reaksiyonlarını (Roche) gerçekleştirmek için kullanılmıştır. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak qRT-PCR verilerini normalleştirmek için Actin (ACT) geni kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılmış ve iki yönlü ANOVA yöntemi ile Fisher'in 0.05 anlamlılık düzeyinde en az anlamlı fark testi uygulanmıştır.

NucleoSpin ® RNA Kiti protokolü

1. Sıvı azotla toz haline getirilen bitki örneklere 100 mg kadar alınmak üzere ependorf tüplere aktarılır.
2. Tüplere 500 μ L FARB Tamponu eklenerek vortekslenir ve ardından 25°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılır.
3. Yeni toplama tüplerinin ilerine filtre kolonu yerleştirilir ve örneklere karşımı filtre kolonuna eklenir. Ardından örneklere (~ 18.000 xg) 1 dakika olmak üzere santrifüje koyulur.
4. Toplama tüpünden, supernatant (st faz) alınır ve yeni bir tüpe aktarılır ve hacim ayarlaması yapılır.
5. %70 RNaz içermeyen etanol, 1:1 oranında eklenir ve vorteks yardımıyla karışması sağlanır.
6. Kitin içindeki FARB Mini Kolonlardan bir adeti toplama tüpüne yerleştirilir, ardından etanol ve nek karışımı FARB Mini Kolona aktarılır. Tam hızda, 1 dakika boyunca santrifüjlenir, toplama tüpündeki sıvı atılır ve FARB Mini Kolon toplama tüpüne geri konulur.
7. Geri kalan nek karışımı için 6. adım tekrarlanır.
8. 500 μ l yıkama tamponu FARB Mini Kolona eklenir ve ardından 1 dakika boyunca tam hızda santrifüje konulur. Alt kısımdaki sıvı atılır ve FARB Mini Kolonu toplama tüpüne geri konulur.
9. 750 μ l Yıkama Tamponu 2, FARB Mini Kolona eklenir ve ardından 1 dakika boyunca tam hızda santrifüje konulur. Sıvı kısmı atılır ve FARB Mini Kolonu toplama tüplerine geri konulur.

10. 3 dakika boyunca tam hızda santrifüje konulur ve Mini Kolon kurutulur.
11. FARB Mini Kolonu bir elüsyon tüpüne yerleştirilir.
12. 30 ~ 50 µl RNaz içermeyen ddH₂O, FARB Mini Kolonun membran merkezine eklenir ve 1 dakika boyunca bekletilir.
13. FARB Mini Kolonu, 1 dakika boyunca tam hızda santrifüje konulur ve RNA ayrıştırılır.
14. RNA -80°C'de saklanır.

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 sentezi 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 verileri baz alınarak, *PvBBX-06*, *PvBBX-07*, *PvBBX-09*, *PvBBX-12*, *PvBBX-14*, *PvBBX-17*, *PvBBX-21*, *PvBBX-25* genleri seçilmiştir. Seçilen genlere en uygun ileri ve geri primerler, Integrated DNA Technologies (IDT), Primer Quest veri tabanı kullanılarak dizayn edilmiştir. Primerler dizayn edilirken, primerlerin GC oranları, erime sıcaklıkları, uzunlukları, ampikon uzunlukları ve ikincil yapı oluşturma ihtimalleri göz önünde bulundurulmuştur.

Çizelge 3.3 *PvBBX* genleri için dizayn edilen primerler

Gen Adı	İleri	Geri
PvBBX-06	GCGATGAGAGGAGAGTTGATT	TTCCATTCCCACACACTCAC
PvBBX-07	GGTTCTGCGATACAGAGAGAAG	CCACATCCGAGTCAGTTTCA
PvBBX-09	GCTCAGGAACAGGATAAGAAGG	CCAAGAAACCTGGCAAGAAATC
PvBBX-12	TGCGAGCTGTGTGGATTAC	GCTCCATGAACCCTTGTATCA
PvBBX-14	CTCTTCTGTCAGGACTGTGATG	GAACTTGAAGCCACTCGGATA
PvBBX-17	GCGAGAGTGTCAAGGTACAG	CCTTCATTCTGGGTCTCTTCTC
PvBBX-21	GACACACAAGAGGCAGACAA	CACACGCTTCACCCATAGAA
PvBBX-25	CGACATCCACTCTGCCAATC	CGGAGTGTACGGACTCATAGAA

3.14 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Primerler dizayn edildikten sonra, iTaq Universal SYBR Green Supermix kullanılarak RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun doğruluğu, T_m eğrileri kontrol edilerek sağlanmıştır. Reaksiyon bileşenleri ve koşulları 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 µl)	0.5 µl
Geri Primer (10 µl)	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

B-BOX gen ailesinin *P. vulgaris*'teki sınıflandırması, fonksiyonel işlevleri ve filogenetik ilişkileri dikkate alınarak isimlendirilmiştir (Çizelge 4.1). *P. vulgaris* (n=11) genomunda toplam 32 B-BOX proteini belirlenmiştir. Üyelerin protein uzunlukları 124 ila 448 aminoasit arasında olup, moleküler ağırlıkları ise 14135.27 ila 48713.48 Da arasındadır. Kararsızlık indeksi, 40'ın üzerindeyse proteinin kararsız, 40'ın altında ise kararlı olduğu bilgisini vermektedir, karakterizasyon sonuçları doğrultusunda ise yalnızca 2 B-BOX proteinin, BBX-12 ve BBX-20, kararlı olup, 30 B-BOX proteinin ise kararsız olduğu tespit edilmiştir. B-BOX proteinlerinin izoelektrik noktaları incelendiğinde, en düşük izoelektrik noktaya sahip üyenin *PvBBX-11* (4.34), en yüksek izoelektrik noktaya sahip üyenin ise *PvBBX-29* (9.41) olduğu görülmüştür. 32 B-BOX proteini arasından 26 tanesi asidik özellik göstermektedir.

Çizelge 4.1 B-BOX proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri

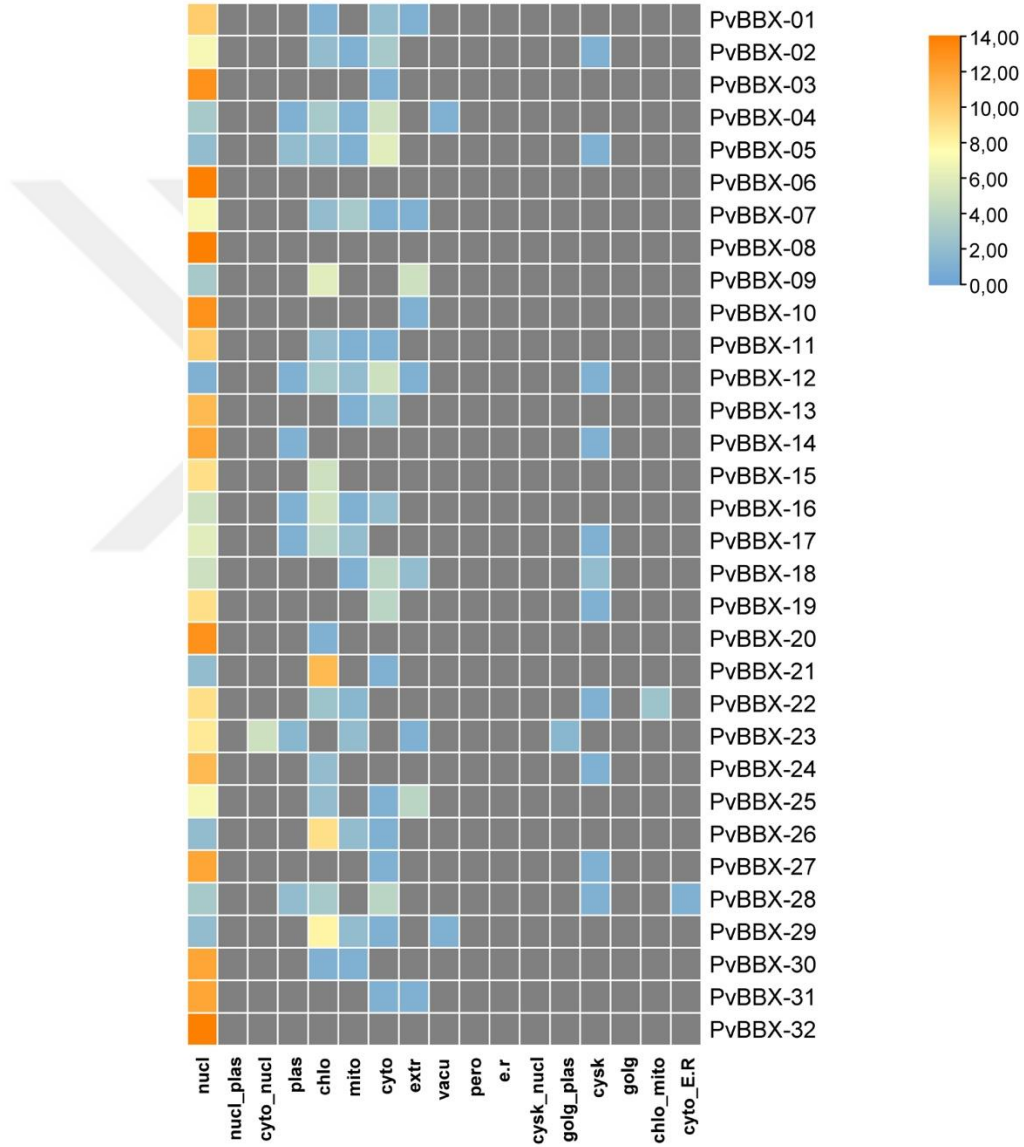
ID	Gen Adı	Kr	Başlangıç	Bitiş	Protein Uzunluğu	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Alifatik İndeks	Kararsızlık İndeksi	GRAVY	Hücre İçi Konum
Phvul.001G009700.2	PvBBX-01	1	724598	726049	265	6.20	29342.87	69.96	55.12	-0.483	Çekirdek
Phvul.001G087300.1	PvBBX-02	1	13547690	13551468	369	6.78	41555.44	67.97	50.03	-0.704	Çekirdek
Phvul.001G203000.1	PvBBX-03	1	46165418	46169710	352	5.98	39264.20	72.05	56.85	-0.548	Çekirdek
Phvul.002G111400.1	PvBBX-04	2	23843554	23846186	184	6.69	20200.03	61.58	49.78	-0.591	Hücre Dışı Bölge
Phvul.002G316100.1	PvBBX-05	2	48277889	48279987	369	5.52	41213.88	66.86	50.64	-0.603	Çekirdek
Phvul.003G036000.1	PvBBX-06	3	3755258	3757312	384	8.75	43360.11	66.02	48.21	-0.717	Çekirdek
Phvul.003G149000.1	PvBBX-07	3	36033164	36035185	369	6.45	40086.79	64.04	51.51	-0.382	Çekirdek
Phvul.003G260100.2	PvBBX-08	3	49948927	49958090	196	7.52	21776.92	61.84	47.48	-0.565	Çekirdek, Hücre Dışı Bölge
Phvul.004G157300.1	PvBBX-09	4	46185293	46188957	406	4.90	46015.38	69.93	47.05	-0.664	Çekirdek
Phvul.005G076700.1	PvBBX-10	5	18235875	18239674	307	5.12	33884.85	67.36	57.88	-0.458	Çekirdek
Phvul.005G110600.1	PvBBX-11	5	33740900	33742341	222	4.34	24276.92	48.83	57.49	-0.950	Çekirdek
Phvul.005G113200.2	PvBBX-12	5	34319918	34320517	124	8.64	14135.27	73.95	38.93	-0.372	Hücre Dışı Bölge
Phvul.005G113300.1	PvBBX-13	5	34321526	34325545	426	5.58	47033.73	60.92	57.46	-0.483	Çekirdek
Phvul.005G153500.1	PvBBX-14	5	38325488	38327921	240	4.86	26625.88	74.00	46.74	-0.423	Hücre Dışı Bölge
Phvul.006G005200.2	PvBBX-15	6	3877292	3882710	448	5.40	48713.48	69.06	55.82	-0.398	Çekirdek
Phvul.006G193800.1	PvBBX-16	6	29307021	29307717	147	4.67	15892.33	57.01	45.52	-0.647	Çekirdek
Phvul.007G027200.1	PvBBX-17	7	2094925	2096667	409	5.36	45980.34	56.55	56.40	-0.790	Çekirdek
Phvul.007G033100.1	PvBBX-18	7	2662274	2668226	437	4.97	48939.99	84.12	49.77	-0.354	Çekirdek
Phvul.007G166100.1	PvBBX-19	7	28129676	28132660	341	6.54	38789.39	60.38	48.23	-0.768	Çekirdek
Phvul.008G022800.1	PvBBX-20	8	1883851	1886538	359	5.78	39608.91	64.15	36.20	-0.489	Çekirdek

Çizelge 4.1 B-BOX proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri (devam)

Phvul.008G190200.1	PvBBX-21	8	52879011	52889512	411	5.21	45074.45	61.97	58.40	-0.474	Çekirdek
Phvul.008G254400.1	PvBBX-22	8	60239097	60240207	251	8.54	27178.81	76.69	60.49	-0.222	Çekirdek, Hücre Dışı Bölge
Phvul.009G004200.1	PvBBX-23	9	798584	800209	236	6.30	26254.52	66.99	44.32	-0.477	Hücre Dışı Bölge
Phvul.009G014100.1	PvBBX-24	9	2339089	2340672	272	6.82	29846.40	59.19	63.76	-0.538	Çekirdek
Phvul.009G085300.1	PvBBX-25	9	13956610	13957992	310	7.01	33783.84	66.81	54.23	-0.392	Çekirdek
Phvul.011G038900.2	PvBBX-26	11	3550738	3553505	211	6.17	23788.08	75.88	57.21	-0.592	Hücre Dışı Bölge
Phvul.011G040800.1	PvBBX-27	11	3705755	3707746	257	6.30	28679.20	68.33	57.70	-0.512	Çekirdek
Phvul.011G053700.1	PvBBX-28	11	4717681	4720921	241	4.90	26409.91	79.75	43.74	-0.283	Hücre Dışı Bölge
Phvul.011G106300.1	PvBBX-29	11	12857731	12858240	128	9.41	14490.89	81.56	47.98	-0.126	Hücre Dışı Bölge
Phvul.011G108800.1	PvBBX-30	11	13594183	13595272	184	4.60	19761.33	47.28	51.52	-0.866	Çekirdek
Phvul.011G149800.1	PvBBX-31	11	42493079	42494810	193	4.66	21885.90	64.09	59.65	-0.824	Çekirdek
Phvul.011G168500.1	PvBBX-32	11	47360722	47364552	296	5.57	32385.17	66.86	61.81	-0.421	Çekirdek

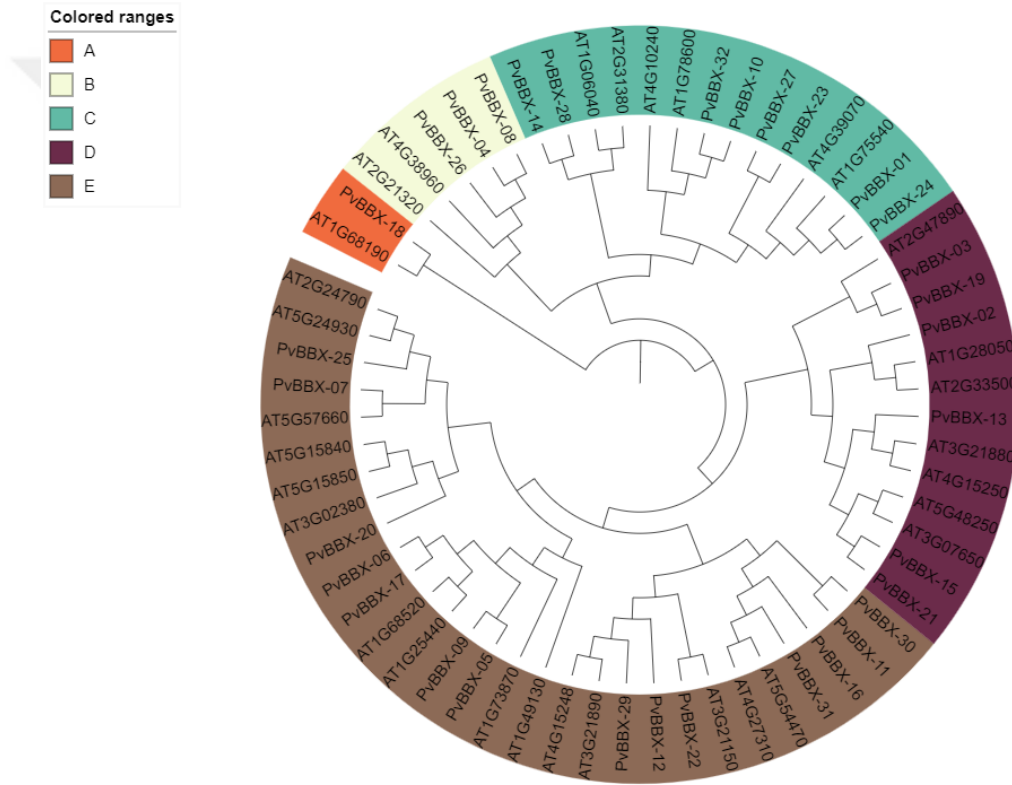
4.1 B-BOX Üyelerinin Filogenetik Analizi, Motif ve Domain Analizi, Gen yapısı, 3 Boyutlu Protein Yapısı, Fonksiyonel Özelliklerine Göre Karakterizasyonları ve Sınıflandırılması

Çevrimiçi bir araç olan WoLF PSORT kullanılarak, *B-BOX* genlerinin hücre içi lokalizasyonları konumlandırılmıştır (Şekil 1.4) (Horton vd. 2007). 32 *B-BOX* proteininin hücre içerisinde en çok yoğunluk gösterdiği bölge çekirdek olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 *B-BOX* genlerinin tahmini hücre içi lokalizasyonları

Bu çalışmada toplam 32 *B-BOX* geni tanımlanmış olup, aralarındaki evrimsel ve filogenetik ilişkiyi gözlemlemek amacıyla, *P. vulgaris* L.'deki *B-BOX* genleri ve *A. thaliana*'daki *B-BOX* genleri filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir. B-BOX proteinleri, A, B, C, D ve E olmak üzere 5 ana gruba ayrılmıştır. En fazla *B-BOX* üyesi filogenetik ağacın E grubunda bulunup (29), D grubunda 13, C grubunda 14, B grubunda 5 ve A grubunda 2 *B-BOX* üyesi bulunmaktadır. Filogenetik ağaç, ML yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. *Phaseolus vulgaris* ve *Arabidopsis thaliana*'nın B-BOX proteinlerinin tanımlayıcı adları sırasıyla "Pvul" ve "AT" ile başlar (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 İki bitki türünden, *Phaseolus vulgaris* L. ve *Arabidopsis thaliana*, B-BOX proteinlerinin filogenetik analizi

B-BOX proteinlerinin filogenetik ilişkilerini desteklemek amacıyla, motif, domain ve gen yapıları analiz edilmiştir. Motif 1'in bütün PvBBX üyelerinde mevcut olduğu görülmüştür. PvBBX-23, PvBBX-27, PvBBX-24, PvBBX-01, PvBBX-10, PvBBX-32, PvBBX-14, PvBBX-28, PvBBX-26, PvBBX-08 ve PvBBX-04 proteinleri ortak olarak Motif 3'ü taşır ve protein ailesinde Motif 3 sadece bu dalda bulunmaktadır. Motif 8

yalnızca PvBBX-23, PvBBX-27, PvBBX-24, PvBBX-01 proteinlerinde bulunmaktadır ve bu dört protein filogenetik ağacın C grubunda bulunup, komşu protein olarak konumlanmıştır. Motif 7 ise yalnızca PvBBX-26, PvBBX-08 ve PvBBX-04 proteinlerinde bulunmaktadır ve bu proteinler de filogenetik ağaçta aynı grupta (B grubunda) konumlanmıştır.

PvBBX-31, PvBBX-16, PvBBX-11, PvBBX-30 proteinleri ortak olarak Motif 10'a sahiptirler ve filogenetik ağaç incelendiğinde bu dört proteinin E grubunda ve aynı alt dalda konumlandıkları görülmüştür. PvBBX-21, PvBBX-15, PvBBX-13, PvBBX-19, PvBBX-03, PvBBX-02, PvBBX-07, PvBBX-25, PvBBX-20, PvBBX-06, PvBBX-17, PvBBX-09, PvBBX-05 proteinleri ortak olarak Motif 2'yi bulundurur, aynı zamanda PvBBX-21, PvBBX-15, PvBBX-13, PvBBX-19, PvBBX-03 ve PvBBX-02 proteinleri Motif 5 ve Motif 6'yı da ortak olarak bulundurmaktadır ve bu proteinler filogenetik ağaçta da aynı grupta (D grubunda) bulunur.

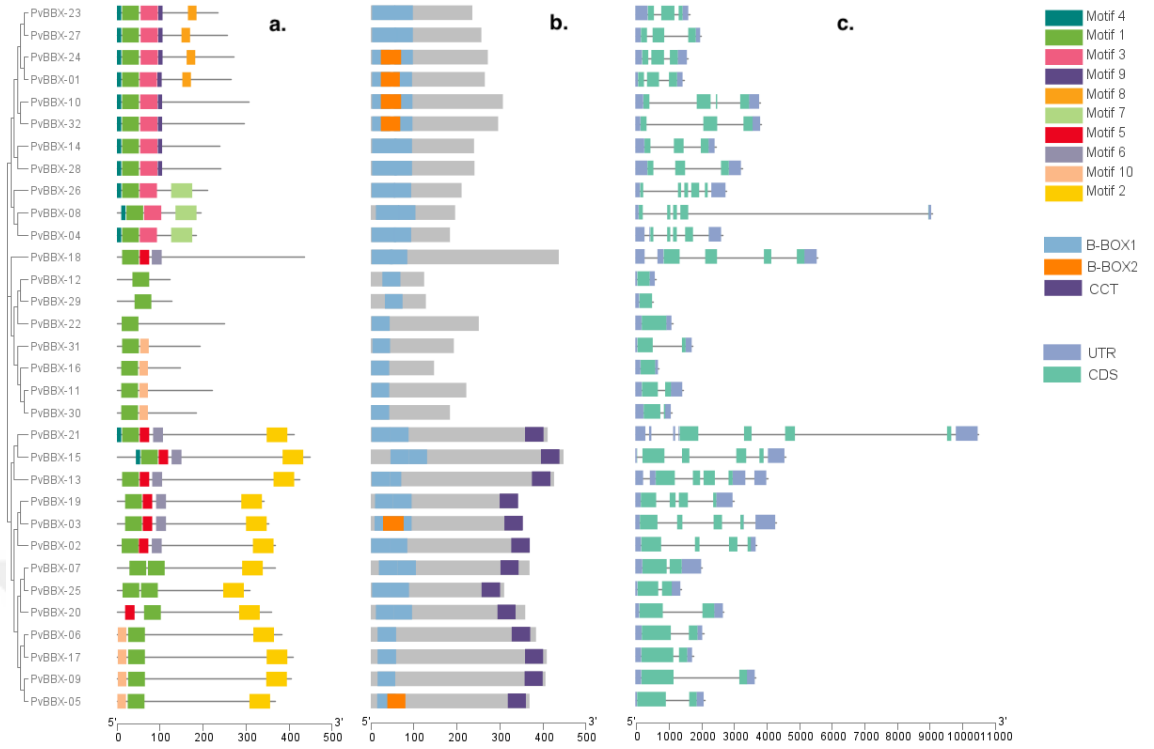
Phaseolus vulgaris'te B-BOX1, B-BOX2 ve CCT olmak üzere 3 adet domain tespit edilmiştir ve B-BOX proteinleri, bir veya iki B-BOX domainine ve bazı durumlarda bitkinin gelişiminde önemli roller oynayan ek bir CCT (CO, CO-benzeri ve TOC1) domainine sahip çinko parmak transkripsiyon faktörleri sınıfını kodlamaktadırlar. Dolayısıyla CCT domaini barındıran genlerin filogenetik olarak ve taşıdıkları motifler bazında ortak noktalara sahip olmaları beklenmiştir ve analizler sonucunda da bu kanıtlanmıştır. CTT domaini bulunduran B-BOX proteinleri, filogenetik ağacın yalnızca D ve E gruplarında konumlanmış olup, birbirleriyle yakın filogenetik ilişki gösterirler. B-BOX1 domaini, belirlenen protein ailesinde en yaygın görülen domain olup, 32 protein üyesinin tamamında bulunmaktadır. B-BOX2 domaininin ise, PvBBX-24, PvBBX-01, PvBBX-10, PvBBX-32, PvBBX-3 ve PvBBX-5 olmak üzere 6 adet PvBBX protein üyesinde bulunduğu görülmüştür.

Ortak olarak Motif 2'yi bulunduran PvBBX-21, PvBBX-15, PvBBX-13, PvBBX-19, PvBBX-03, PvBBX-02, PvBBX-07, PvBBX-25, PvBBX-20, PvBBX-06, PvBBX-17, PvBBX-09, PvBBX-05 proteinleri aynı zamanda CCT domainine sahiplerdir ve bu

domain yalnızca bu PvBBX üyelerinde bulunmaktadır. Görsel incelendiğinde Motif 2 ve CCT domaini simetrik bir şekilde konumlanmıştır ve bu da Motif 2 ve CCT domainin birbirleriyle ilişkilendirilebileceğini bize göstermektedir.

PvBBX üyelerinin gen yapılarını görselleştirmek için yapılan analizde filogenetik ağaçta aynı dalı paylaşan genlerin simetrik ekzonlar sergilediği görülmüştür. Her iki uçta eşleşen uçbirleştirme bölgelerine sahip olduğu bilinen simetrik yapıya sahip ekzonlar tespit edilmiştir. Üyelerin ekzon ve intron yapıları ile motif ve filogenetik yapıları arasında doğrudan bir ilişki vardır. Örneğin, ortak motiflere sahip olup filogenetik ağaçta da aynı dalda konumlanan *PvBBX-23*, *PvBBX-27*, *PvBBX-24*, *PvBBX-01* üyelerinin gen yapıları da birbirleriyle aynıdır. Benzer olarak *PvBBX-06*, *PvBBX-17*, *PvBBX-09*, *PvBBX-05* proteinleri de ortak motifler barındırırlar ve gen yapılarının da simetrik olduğu görülmektedir. Bir başka örnek olarak, *PvBBX-12*, *PvBBX-29* ve *PvBBX-22* genleri verilebilir, bu üç üye yalnızca Motif 1 barındırır ve sahip oldukları tek domain de B-BOX1 domainidir, ekzon ve intron yapılarına bakıldığında ise üçünün de simetrik gen yapılarına sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu bulgu, gen yapılarının, genlerin korunmuş bölgeleriyle ilişkisini desteklemekle birlikte, Motif 1 ve B-BOX1 domaininin birbirleriyle doğrudan ilişkili olabileceğini de ortaya koymaktadır, çünkü her ikisi de toplam 32 *PvBBX* üyesinde mevcut olan tek motif ve domainlerdir.

P. vulgaris 'te korunmuş olan 10 motif filogenileriyle ilişkilendirilmiştir. Her bir renkli kutu bir motifi temsil etmektedir ve kutuların uzunlukları, motiflerin sekans uzunluklarına göre ölçeklendirilmiştir. *P. vulgaris* L.'de bulunan B-BOX1, B-BOX2 ve CCT domainlerinin konumlandırılması şekil 4.3'de gösterilmiştir. Her bir renkli kutu bir domaini temsil etmektedir. *PvBBX* üyelerinin gen yapısı analizi, genlerin ekzon, intron ve UTR bölgelerini belirtmek amacıyla görselleştirilmiştir (Şekil 4.3).

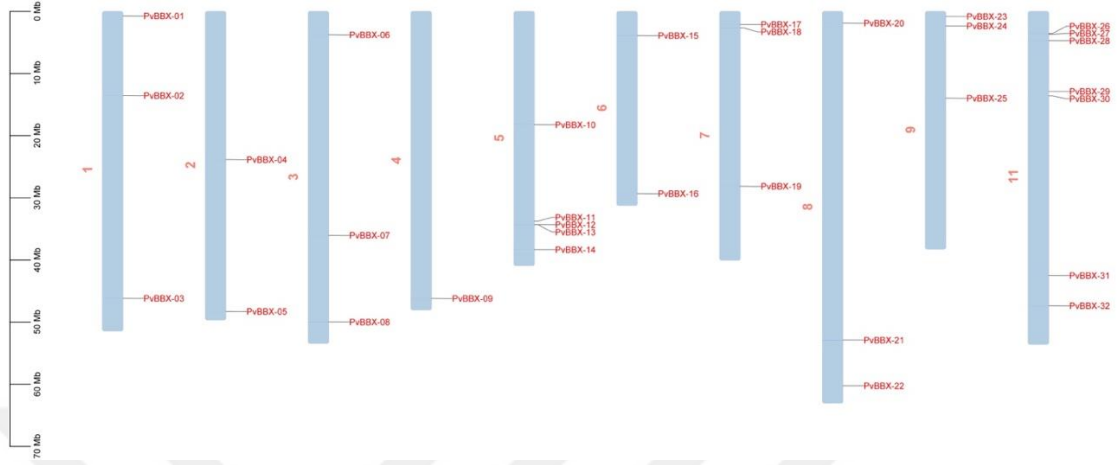


Şekil 4.3 *PvBBX*'lerin ML yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaca göre hizalanarak görselleştirilmiş motif, domain ve gen yapısı analizleri

4.2 *P. vulgaris*'te *PvBBX* Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve *P. vulgaris* ve Diğer Türler Arasındaki Sinteni Analizi

PvBBX üyeleri *Phaseolus vulgaris* genomundaki 10 kromozom üzerinde konumlanmıştır. *PvBBX-01*, *PvBBX-02*, *PvBBX-03* genleri kromozom 1 üzerinde, *PvBBX-04* ve *PvBBX-05* genleri kromozom 2 üzerinde, *PvBBX-06*, *PvBBX-07*, *PvBBX-08* genleri kromozom 3 üzerinde, *PvBBX-09* geni kromozom 4 üzerinde, *PvBBX-10*, *PvBBX-11*, *PvBBX-12*, *PvBBX-13*, *PvBBX-14* genleri kromozom 5 üzerinde, *PvBBX-15*, *PvBBX-16* genleri kromozom 6 üzerinde, *PvBBX-17*, *PvBBX-18*, *PvBBX-19* genleri kromozom 7 üzerinde, *PvBBX-20*, *PvBBX-21*, *PvBBX-22* genleri kromozom 8 üzerinde, *PvBBX-23*, *PvBBX-24*, *PvBBX-25* genleri kromozom 9 üzerinde ve son olarak da *PvBBX-26*, *PvBBX-27*, *PvBBX-28*, *PvBBX-29*, *PvBBX-30*, *PvBBX-31* ve *PvBBX-32* genleri kromozom 11 üzerinde bulunmaktadır. En çok gen barındıran kromozom, 11. kromozom olup, 7 gen

bulundurmaktadır, bununla birlikte 10. kromozomda *PvBBX* üyesi bulunmamaktadır (Şekil 4.4).



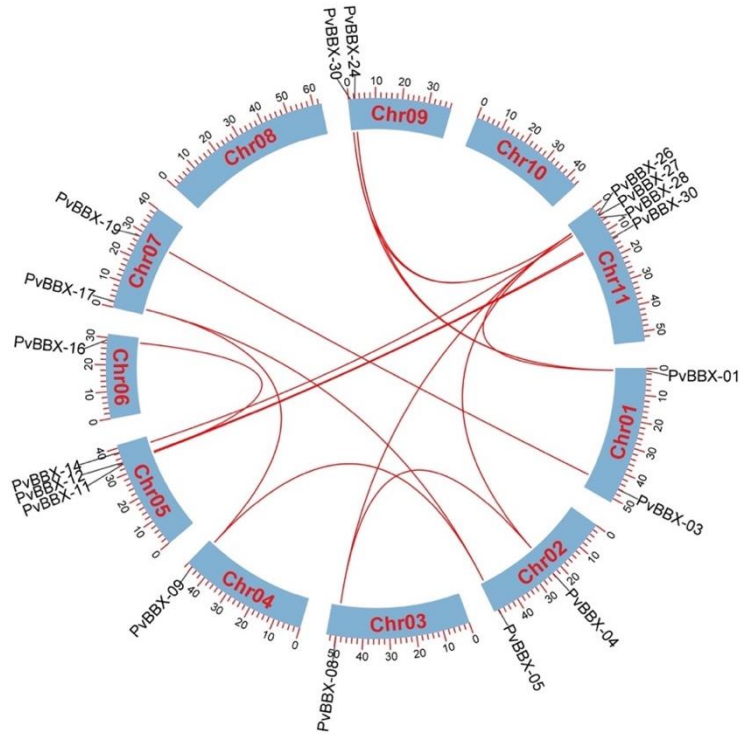
Şekil 4.4 *PvBBX* genlerinin kromozom haritası

Organizmaların evrimsel sürecini kavramak için önemli basamaklardan biri de duplikasyonlardır. Genler arasındaki duplikasyonları, tandem duplikasyon ve segmental duplikasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Duplikasyona uğrayan gen dizisinin bir kromozomdan diğerine kopyalanması, segmental duplikasyon olarak adlandırılır. Duplike olan gen dizisinin orijinal duplikasyonla aynı kromozom üzerinde bulunduğu duplikasyon türü ise tandem duplikasyon olarak adlandırılmaktadır (Leister 2004). *B-BOX* genlerinde yapılan duplikasyon analizleri doğrultusunda toplam 15 duplikasyon tespit edilmiştir ve bunların tamamı segmental duplikasyondur.

Gen duplikasyonları, *PvBBX* genleri arasındaki paralog ilişkileri görüntülemek amacıyla incelenmiştir (Şekil 4.5). Kromozom 1 üzerindeki *PvBBX-01* ile kromozom 9 üzerindeki *PvBBX-23*, *PvBBX-24* ve kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-27* arasında, kromozom 1 üzerindeki *PvBBX-03* ile kromozom 7 üzerindeki *PvBBX-19* arasında, kromozom 2 üzerindeki *PvBBX-04* ile kromozom 3 üzerindeki *PvBBX-08* arasında ve kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-26* arasında, kromozom 2 üzerindeki *PvBBX-05* ile kromozom 4 üzerinde *PvBBX-09* arasında ve kromozom 7 üzerindeki *PvBBX-17* arasında, kromozom 3 üzerindeki *PvBBX-08* ile kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-26* arasında, kromozom 4

üzerindeki *PvBBX-09* ile kromozom 7 üzerindeki *PvBBX-17* arasında, kromozom 5 üzerindeki *PvBBX-11* ile kromozom 6 üzerindeki *PvBBX-16* arasında ve kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-30* arasında, kromozom 5 üzerindeki *PvBBX-14* ile kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-28* arasında, kromozom 9 üzerindeki *PvBBX-23* ile kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-27* arasında ve kromozom 9 üzerindeki *PvBBX-24* ile kromozom 11 üzerindeki *PvBBX-27* arasında olmak üzere toplam 15 duplikasyon görülmüştür (Şekil 4.5).

Genlerin homolojik özelliklerini belirlemek amacıyla K_a ve K_s hesaplamaları yapılmıştır. *PvBBX* genlerinin K_a/K_s değerleri yaklaşık 0,087 ile 0,314 arasındadır ve ortalama K_a/K_s değerleri 0,205 bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda, *PvBBX*'lerin ortalama 11,96 milyon yıl önce ayrıldığı görülmektedir (Çizelge 4.2).



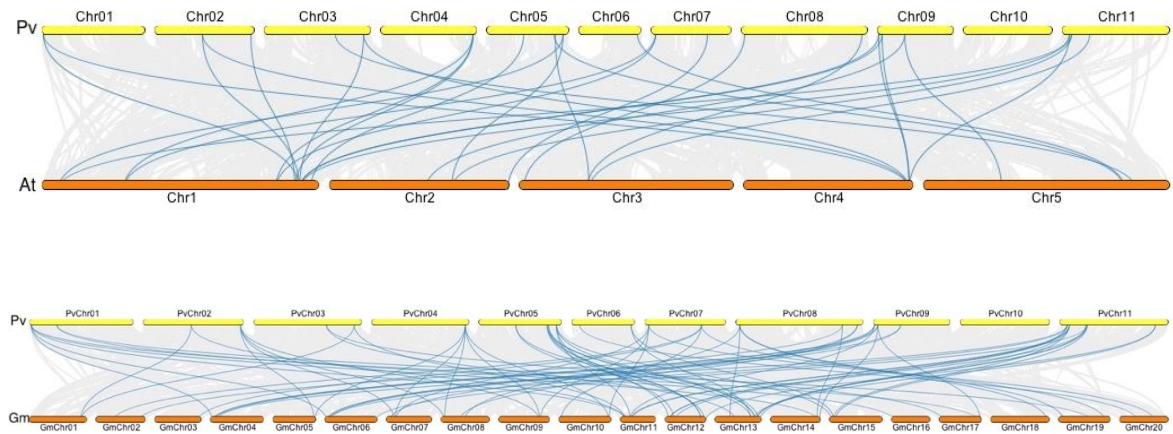
Şekil 4.5 *PvBBX* genlerinin circos analizi

Çizelge 4.2 *PvBBX* gen duplikasyonları

P. vulgaris Gen Adı	P. vulgaris Gen Adı	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ
PvBBX-01	PvBBX-23	0,368	NaN	NaN	NaN
PvBBX-01	PvBBX-24	0,299	1,049	0,285	8,072
PvBBX-01	PvBBX-27	0,486	NaN	NaN	NaN
PvBBX-04	PvBBX-08	0,073	0,583	0,124	4,481
PvBBX-04	PvBBX-26	0,214	1,793	0,120	13,792
PvBBX-05	PvBBX-09	0,199	0,848	0,235	6,524
PvBBX-05	PvBBX-17	0,324	2,604	0,124	20,028
PvBBX-03	PvBBX-19	0,286	0,910	0,314	7,004
PvBBX-26	PvBBX-08	0,229	1,816	0,126	13,969
PvBBX-09	PvBBX-17	0,419	4,793	0,087	36,868
PvBBX-11	PvBBX-16	0,391	NaN	NaN	NaN
PvBBX-11	PvBBX-30	0,281	0,784	0,358	6,033
PvBBX-14	PvBBX-28	0,101	0,529	0,191	4,066
PvBBX-23	PvBBX-27	0,290	1,099	0,264	8,452
PvBBX-27	PvBBX-24	0,452	1,862	0,243	14,324

NaN=Sonuç yok

PvBBX üyelerinin diğer türlerle arasındaki ortolog ilişkileri gözlemlemek amacıyla, *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* bitkilerinin BBX proteinleri arasında ortolog analizi yapılarak karşılaştırmalı bir kromozom haritası çıkarılmıştır. Üyeler arasındaki ortolog ilişkiler mavi çizgilerle belirtilmiştir (Şekil 4.6). Yapılan ortolog ilişki analizi sonuçlarında ise, *P. vulgaris* ve *A. thaliana* arasında 33, *P. vulgaris* ve *G. max* arasında ise 68 ortolog ilişki tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 *PvBBX* genlerinin *A. thaliana* ve *G. max* ile ortolog ilişkisi

Çizelge 4.3 *P. vulgaris* ve *G. max*'de bulunan *PvBBX* gen duplikasyonları

P. vulgaris Gen Adı	P. vulgaris Gen ID	G. max Gen ID	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	Glyma.04G027000.1	0,273	0,851	0,321	6,550
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	Glyma.06G027000.1	0,300	0,731	0,410	5,624
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	Glyma.11G112800.1	0,457	NaN	NaN	NaN
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	Glyma.14G216500.1	0,089	0,397	0,225	3,053
PvBBX-02	Phvul.001G087300.1	Glyma.16G050900.1	0,122	0,413	0,296	3,174
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	Glyma.17G255100.1	0,089	0,397	0,224	3,055
PvBBX-02	Phvul.001G087300.1	Glyma.19G099700.1	0,113	0,380	0,297	2,923
PvBBX-04	Phvul.002G111400.1	Glyma.01G168500.1	0,025	0,173	0,143	1,330
PvBBX-05	Phvul.002G316100.1	Glyma.05G233700.1	0,037	0,261	0,140	2,006
PvBBX-05	Phvul.002G316100.1	Glyma.08G041100.1	0,057	0,309	0,185	2,376
PvBBX-04	Phvul.002G111400.1	Glyma.11G074900.1	0,027	0,172	0,157	1,327
PvBBX-08	Phvul.003G260100.2	Glyma.01G168500.1	0,069	0,496	0,138	3,815
PvBBX-08	Phvul.003G260100.2	Glyma.11G074900.1	0,077	0,560	0,138	4,307
PvBBX-07	Phvul.003G149000.1	Glyma.13G093800.1	0,057	0,409	0,139	3,145
PvBBX-07	Phvul.003G149000.1	Glyma.17G066600.1	0,051	0,464	0,110	3,567
PvBBX-09	Phvul.004G157300.1	Glyma.05G233700.1	0,202	0,645	0,313	4,958
PvBBX-09	Phvul.004G157300.1	Glyma.08G041100.1	0,202	0,735	0,275	5,650
PvBBX-09	Phvul.004G157300.1	Glyma.10G274300.1	0,392	2,375	0,165	18,268
PvBBX-14	Phvul.005G153500.1	Glyma.11G127100.1	0,105	0,449	0,234	3,455
PvBBX-11	Phvul.005G110600.1	Glyma.12G198400.1	0,089	0,366	0,242	2,813
PvBBX-12	Phvul.005G113200.2	Glyma.12G196200.1	0,090	0,233	0,386	1,789
PvBBX-11	Phvul.005G110600.1	Glyma.12G103800.1	0,233	0,975	0,239	7,502
PvBBX-14	Phvul.005G153500.1	Glyma.12G051700.1	0,100	0,430	0,232	3,309
PvBBX-10	Phvul.005G076700.1	Glyma.12G233900.1	0,061	0,230	0,264	1,769
PvBBX-11	Phvul.005G110600.1	Glyma.13G303700.1	0,082	0,357	0,229	2,749
PvBBX-12	Phvul.005G113200.2	Glyma.13G306300.1	0,094	0,184	0,508	1,418
PvBBX-14	Phvul.005G153500.1	Glyma.13G344700.1	0,034	0,220	0,154	1,692
PvBBX-10	Phvul.005G076700.1	Glyma.13G265000.1	0,060	0,220	0,273	1,694
PvBBX-14	Phvul.005G153500.1	Glyma.15G029500.1	0,041	0,246	0,168	1,892
PvBBX-16	Phvul.006G193800.1	Glyma.13G248000.1	0,111	0,281	0,395	2,163
PvBBX-16	Phvul.006G193800.1	Glyma.15G065900.1	0,098	0,277	0,354	2,134
PvBBX-19	Phvul.007G166100.1	Glyma.02G152900.1	0,126	0,398	0,317	3,060
PvBBX-19	Phvul.007G166100.1	Glyma.03G209800.1	0,269	0,975	0,276	7,503
PvBBX-19	Phvul.007G166100.1	Glyma.10G021400.1	0,132	0,346	0,382	2,665
PvBBX-17	Phvul.007G027200.1	Glyma.10G274300.1	0,076	0,404	0,188	3,110
PvBBX-19	Phvul.007G166100.1	Glyma.19G207100.1	0,283	0,925	0,306	7,119
PvBBX-17	Phvul.007G027200.1	Glyma.20G115600.1	0,093	0,349	0,267	2,683

Çizelge 4.3 P. vulgaris ve G. max'de bulunan PvBBX gen duplikasyonları (devam)

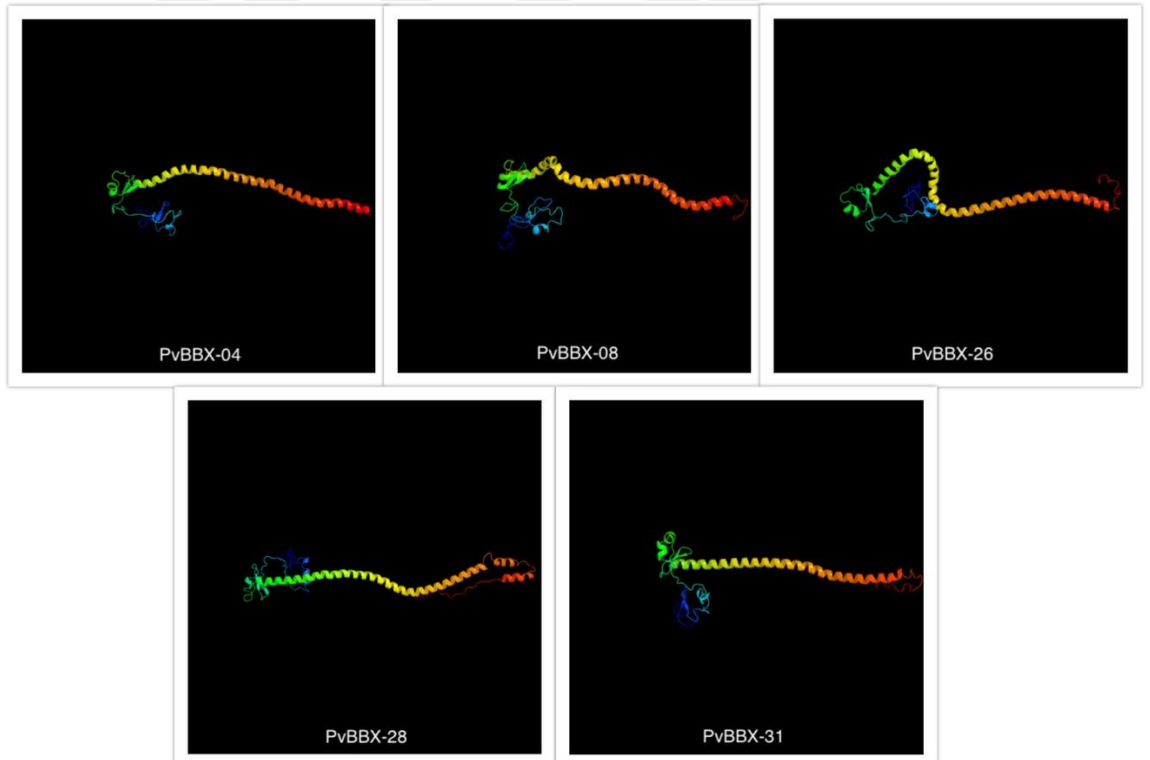
PvBBX-22	Phvul.008G254400.1	Glyma.07G020400.1	0,157	0,420	0,374	3,230
PvBBX-22	Phvul.008G254400.1	Glyma.08G221600.1	0,150	0,428	0,350	3,290
PvBBX-20	Phvul.008G022800.1	Glyma.08G255200.1	0,076	0,286	0,266	2,199
PvBBX-20	Phvul.008G022800.1	Glyma.13G050300.1	0,217	1,008	0,216	7,751
PvBBX-21	Phvul.008G190200.1	Glyma.14G190400.1	0,052	0,158	0,330	1,217
PvBBX-20	Phvul.008G022800.1	Glyma.18G278100.1	0,072	0,319	0,225	2,457
PvBBX-20	Phvul.008G022800.1	Glyma.19G039000.1	0,231	0,974	0,237	7,496
PvBBX-25	Phvul.009G085300.1	Glyma.04G058900.1	0,034	0,461	0,074	3,542
PvBBX-23	Phvul.009G004200.1	Glyma.04G009200.1	0,124	0,353	0,351	2,716
PvBBX-24	Phvul.009G014100.1	Glyma.04G027000.1	0,077	0,366	0,212	2,812
PvBBX-25	Phvul.009G085300.1	Glyma.06G059600.1	0,031	0,487	0,063	3,745
PvBBX-23	Phvul.009G004200.1	Glyma.06G009100.1	0,117	0,307	0,383	2,359
PvBBX-24	Phvul.009G014100.1	Glyma.06G027000.1	0,079	0,390	0,202	3,002
PvBBX-23	Phvul.009G004200.1	Glyma.11G112800.1	0,223	0,905	0,247	6,962
PvBBX-24	Phvul.009G014100.1	Glyma.14G216500.1	0,282	0,869	0,324	6,684
PvBBX-24	Phvul.009G014100.1	Glyma.17G255100.1	0,312	0,894	0,349	6,873
PvBBX-27	Phvul.011G040800.1	Glyma.04G009200.1	0,399	1,062	0,375	8,170
PvBBX-27	Phvul.011G040800.1	Glyma.06G009100.1	0,344	1,145	0,300	8,806
PvBBX-30	Phvul.011G108800.1	Glyma.06G300900.1	0,127	0,253	0,503	1,948
PvBBX-27	Phvul.011G040800.1	Glyma.11G112800.1	0,141	0,386	0,365	2,968
PvBBX-28	Phvul.011G053700.1	Glyma.11G127100.1	0,050	0,262	0,192	2,012
PvBBX-27	Phvul.011G040800.1	Glyma.12G038700.1	0,132	0,310	0,426	2,384
PvBBX-28	Phvul.011G053700.1	Glyma.12G051700.1	0,046	0,262	0,177	2,012
PvBBX-32	Phvul.011G168500.1	Glyma.12G233900.1	0,163	0,822	0,198	6,324
PvBBX-30	Phvul.011G108800.1	Glyma.12G103800.1	0,122	0,303	0,405	2,327
PvBBX-30	Phvul.011G108800.1	Glyma.13G303700.1	0,294	0,709	0,414	5,454
PvBBX-29	Phvul.011G106300.1	Glyma.13G306300.1	0,320	1,030	0,310	7,925
PvBBX-28	Phvul.011G053700.1	Glyma.13G344700.1	0,087	0,553	0,157	4,251
PvBBX-32	Phvul.011G168500.1	Glyma.13G265000.1	0,174	0,726	0,239	5,585
PvBBX-28	Phvul.011G053700.1	Glyma.15G029500.1	0,089	0,652	0,137	5,019
PvBBX-30	Phvul.011G108800.1	Glyma.15G065900.1	0,427	NaN	NaN	NaN
NaN=Sonuç yok						

Çizelge 4.4 *P. vulgaris* ve *A.thaliana*'da bulunan *PvBBX* gen duplikasyonları

P. vulgaris Gen Adı	P. vulgaris Gen ID	A. thaliana Gen ID	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	AT1G75540.1	0,358	1,782	0,201	13,706
PvBBX-01	Phvul.001G009700.2	AT4G39070.1	0,364	NaN	NaN	NaN
PvBBX-04	Phvul.002G111400.1	AT1G75540.1	0,809	NaN	NaN	NaN
PvBBX-05	Phvul.002G316100.1	AT1G73870.1	0,452	NaN	NaN	NaN
PvBBX-04	Phvul.002G111400.1	AT4G38960.3	0,213	NaN	NaN	NaN
PvBBX-08	Phvul.003G260100.2	AT1G75540.1	0,661	NaN	NaN	NaN
PvBBX-08	Phvul.003G260100.2	AT4G38960.3	0,210	2,787	0,075	21,437
PvBBX-07	Phvul.003G149000.1	AT5G57660.1	0,298	NaN	NaN	NaN
PvBBX-09	Phvul.004G157300.1	AT1G73870.1	0,467	2,378	0,197	18,291
PvBBX-09	Phvul.004G157300.1	AT1G68520.1	0,424	NaN	NaN	NaN
PvBBX-09	Phvul.004G157300.1	AT1G25440.1	0,436	NaN	NaN	NaN
PvBBX-14	Phvul.005G153500.1	AT1G06040.1	0,264	2,733	0,097	21,020
PvBBX-10	Phvul.005G076700.1	AT1G78600.2	0,335	1,633	0,205	12,561
PvBBX-14	Phvul.005G153500.1	AT2G31380.1	0,311	3,593	0,087	27,635
PvBBX-12	Phvul.005G113200.2	AT3G21890.1	0,506	NaN	NaN	NaN
PvBBX-11	Phvul.005G110600.1	AT5G54470.1	0,524	NaN	NaN	NaN
PvBBX-16	Phvul.006G193800.1	AT5G54470.1	0,468	NaN	NaN	NaN
PvBBX-17	Phvul.007G027200.1	AT1G68520.1	0,395	NaN	NaN	NaN
PvBBX-17	Phvul.007G027200.1	AT1G25440.1	0,392	NaN	NaN	NaN
PvBBX-19	Phvul.007G166100.1	AT2G47890.1	0,485	NaN	NaN	NaN
PvBBX-22	Phvul.008G254400.1	AT3G21150.1	0,592	1,960	0,302	15,079
PvBBX-20	Phvul.008G022800.1	AT3G02380.1	0,299	3,179	0,094	24,452
PvBBX-24	Phvul.009G014100.1	AT1G75540.1	0,338	NaN	NaN	NaN
PvBBX-23	Phvul.009G004200.1	AT1G75540.1	0,381	NaN	NaN	NaN
PvBBX-25	Phvul.009G085300.1	AT2G24790.1	0,293	2,104	0,139	16,185
PvBBX-23	Phvul.009G004200.1	AT4G39070.1	0,302	2,291	0,132	17,622
PvBBX-24	Phvul.009G014100.1	AT4G39070.1	0,429	NaN	NaN	NaN
PvBBX-25	Phvul.009G085300.1	AT5G24930.1	0,210	NaN	NaN	NaN
PvBBX-28	Phvul.011G053700.1	AT1G06040.1	0,253	NaN	NaN	NaN
PvBBX-27	Phvul.011G040800.1	AT1G75540.1	0,488	2,367	0,206	18,207
PvBBX-28	Phvul.011G053700.1	AT2G31380.1	0,284	NaN	NaN	NaN
PvBBX-30	Phvul.011G108800.1	AT3G21890.1	0,559	NaN	NaN	NaN
PvBBX-27	Phvul.011G040800.1	AT4G39070.1	0,428	2,599	0,165	19,991
NaN=Sonuç yok						

Analiz sonuçları incelendiğinde ise, *A. thaliana* ile en çok ortolog etkileşime giren *PvBBX* üyesi *PvBBX-09* olup, *A. thaliana*'da bulunan 3 genle ortolog ilişki göstermiştir. *G. max* ile en çok ortolog etkileşime giren *PvBBX* üyeleri ise *PvBBX-01* ve aynı şekilde *PvBBX-09* olup 5 genle ortolog ilişki göstermişlerdir. Ka, Ks değerleri ve Ka/Ks oranları genlerin evrimsel sürecini aydınlatmak adına en önemli basamaklardan bir tanesidir. Ka/Ks oranı 1'den büyük ise pozitif, 1'den küçük ise negatif ve Ka/Ks değeri yaklaşık 1 ise genlerde nötr seleksiyon gözlenmektedir (Hurst 2002).

Phyre2 kullanılarak, *PvBBX* proteinlerinin 3 boyutlu homoloji modelleri görselleştirilmiştir. Toplam 32 üye arasından, 3 boyutlu modelleme sonucunda %90 ve üzerinde doğruluk oranına sahip olan 5 *PvBBX* proteini seçilmiştir. Sonuçta, tüm *PvBBX* proteinlerinde α -heliks yapısı görülmüştür (Şekil 4.7).

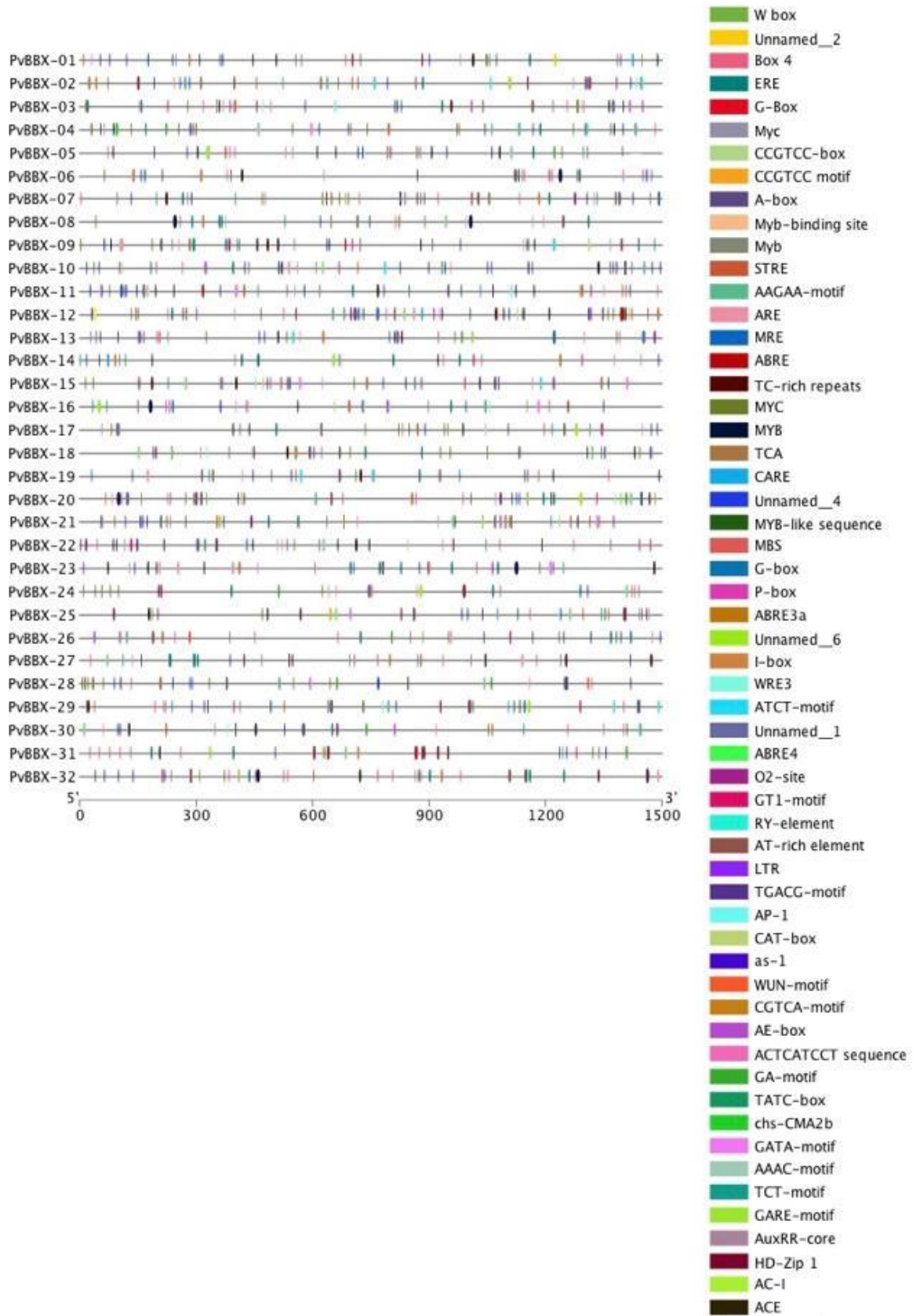


Şekil 4.7 *PvBBX*'lerin 3 boyutlu yapı modellemeleri

4.3 *B-BOX* Genlerinin Promotor Analizi

Gen promotorları, genlerin eksprese edildiği bölgelerin üst kısmında bulunan DNA dizileridir. Transkripsiyonun başlangıcında ve kontrolünde önemli, proteinler için özel bağlanma bölgeleri olan pek çok cis-etkili element içerirler. Transkripsiyon ayrıca, kopyalanan bölgedeki DNA dizilerinin yanı sıra, kopyalanan bölgenin 3'-yan ve aşağı akışındaki DNA dizilerinden de etkilenebilir (Sanyal vd. 2012). Bu sebeple, analiz edilen *B-BOX* genleri üzerinde bir in-siliko promotor taraması gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, otuz iki *B-BOX* geninde rol oynayan 57 farklı cis-etkili element tanımlanmıştır. Her bir renk farklı bir cis-etkili elementi ifade etmektedir (Şekil 4.8).



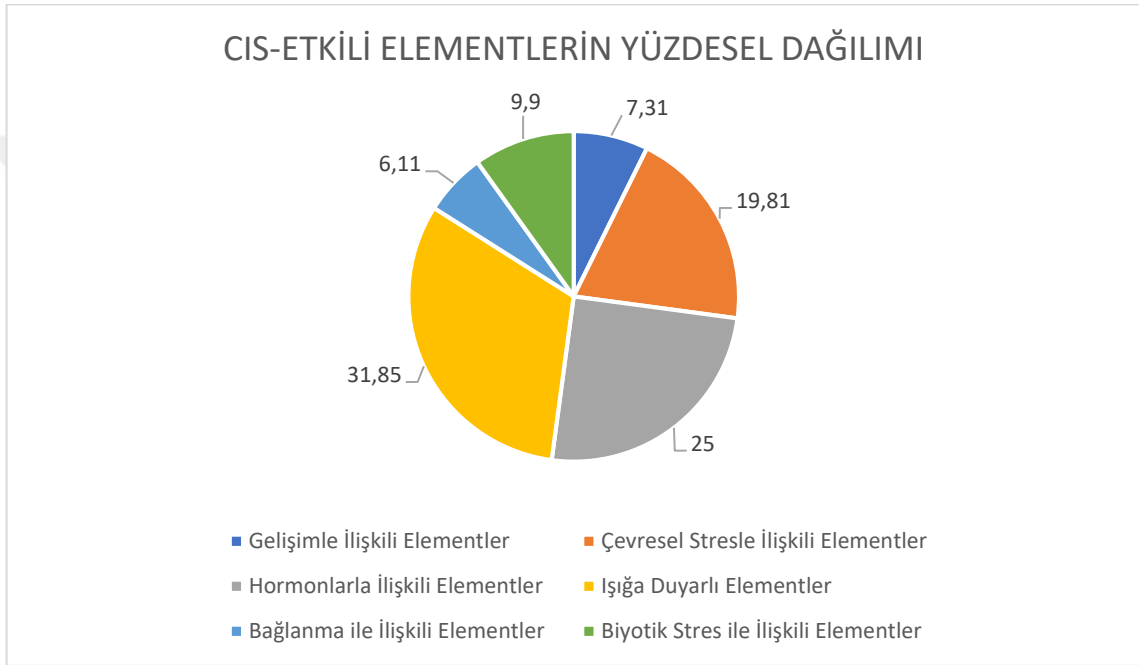


Şekil 4.8 *PvBBX* genlerinde cis-elementlerinin dağılımı

Çizelge 4.5 Cis-etkili elementlerin kategorilere göre dağılımı

	Gelişimle İlişkili Elementler	Çevresel Stresle İlişkili Elementler	Hormonlarla İlişkili Elementler	Işığa Duyarlı Elementler	Bağlanma ile İlişkili Elementler	Biyotik Stres ile İlişkili Elementler
PvBBX-01	2	8	3	4		5
PvBBX-02	6	6	6	5	2	4
PvBBX-03	1	7	14	9	4	2
PvBBX-04	5	12	2	7	1	4
PvBBX-05	1	6	4	7	1	7
PvBBX-06	1	2	2	15	3	1
PvBBX-07	1	6	10	20	4	4
PvBBX-08		8	5	7	1	
PvBBX-09	3	8	9	10	1	8
PvBBX-10	5	8	10	10	5	1
PvBBX-11		7	12	10	2	5
PvBBX-12	8	12	15	13	1	9
PvBBX-13	2	8	1	12	2	5
PvBBX-14	4	3	6	6		2
PvBBX-15	2	14	14	15	2	2
PvBBX-16	3	6	4	9	1	1
PvBBX-17	1	7	4	3	4	5
PvBBX-18	1	8	12	7	2	3
PvBBX-19	1	3	2	6	1	7
PvBBX-20	1	5	14	17	2	4
PvBBX-21	2	10	13	8	1	7
PvBBX-22	4	7	11	11	3	5
PvBBX-23	4	7	5	13	1	
PvBBX-24	2	8	6	9	3	1
PvBBX-25	2	4	8	13	2	3
PvBBX-26	2	6	4	9	1	
PvBBX-27	3	5	11	10		2
PvBBX-28	1	10	10	7	1	1
PvBBX-29	4	2	18	16	3	3
PvBBX-30	3	5	6	9	1	3
PvBBX-31		4	15	25	5	1
PvBBX-32	4	2	14	22	6	2

PvBBX üyeleri arasındaki cis-etkili elementler incelendiğinde, 79 adet gelişim, 214 adet çevresel etmenler, 270 adet hormon, 344 adet ışık, 66 adet bağlanma alanları, 107 adet biyotik stresle ilişkili cis-element olduğu tespit edilmiştir. Cis-etkili elementlerin sayısı ve türleri *PvBBX* promotörleri arasında farklılık göstermektedir; bu da *PvBBX* genlerinin bitki gelişim düzenlemesinde farklı rollere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Tüm *PvBBX* promotörleri arasında en bol bulunan element türü olarak temsil edilen, ışıkla ilişkili cis-etkili elementler olmuştur (Şekil 4.9)



Şekil 4.9 Cis-etkili elementlerin yüzdesel dağılımı

Çizelge 4.6 Gelişim ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Gelişim İle İlgili Cis-Düzenleyici Elementler	
AAGAA-motif	Endosperm ifadesinde rol alır.
GCN4_motif	Endosperm ifadesinde rol alır.
CAT-box	Meristem ifadesinde rol alır.
CCAAT-box	MYBHv1 bağlanma bölgesidir.
O2-site	Zein metabolizmasının regülasyonunda görev alır.
RY-element	Tohuma özgü regülasyonlarda görev alır.
HD-Zip 1	Mezofil hücrelerinin farklılaşmasında görev alır.

Çizelge 4.7 Çevresel etmenlerle ilgili cis-düzenleyici elementler

Çevresel Etmenlerle İlgili Cis-Düzenleyici Elementler	
W-BOX	Savunma ve patojen yanıtında görev alır.
ARE	Anaerobik indüksiyonda görev alır.
TC-rich repeats	Savunma ve stres tepkilerinde görev alır.
MYC	Kuraklık ve düşük sıcaklığa tepki verir.
MBS	Kuraklık destekleyici MYB bağlanma bölgesidir.
LTR	Düşük sıcaklığa tepki verir.
WUN-motif	Bitkide yara oluşumuna tepki verir.

Çizelge 4.8 Işığa duyarlı cis-düzenleyici elementler

Işığa Duyarlı Cis-Düzenleyici Elementler	
Box 4	Işığa tepki vermede korunmuş bir DNA parçasıdır.
G-Box	Işığa tepki vermede yer alan cis-düzenleyici element
MRE	Işık duyarlılığında yer alan MYB bağlanma bölgesi
I-box	Işığa duyarlı bir elementin parçası
ATCT-motif	Işığa tepki vermede korunmuş bir DNA parçasıdır.
GT1-motif	Işığa duyarlı element
AE-box	Işığa duyarlı bir elementin parçası
GA-motif	Işığa duyarlı bir elementin parçası
chs-CMA2b	Işığa duyarlı bir elementin parçası
GATA-motif	Işığa duyarlı bir elementin parçası
AAAC-motif	Işığa duyarlı element
TCT-motif	Işığa duyarlı bir elementin parçası
ACE	Işığa tepki vermede yer alan cis-düzenleyici element

Çizelge 4.9 Hormon ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Hormon ile İlgili Cis-Düzenleyici Elementler	
ERE	Etilen tepkisinde görev alır.
ABRE	ABA tepkisinde görev alır.
P-box	Giberelline duyarlı element
ABRE3a	ABA tepkisinde görev alır.
ABRE4	ABA tepkisinde görev alır.
TGACG-motif	MeJA duyarlılığında yer alan cis-düzenleyici element
CGTCA-motif	MeJA duyarlılığında yer alan cis-düzenleyici element
TATC-box	Gibberellin duyarlılığında yer alan cis-düzenleyici element

Çizelge 4.9 Hormon ile ilgili cis-düzenleyici elementler (devam)

GARE-motif	Giberelline duyarlı element
AuxRR-core	Oksin yanıtında yer alan cis-düzenleyici element

Çizelge 4.10 Biyotik stres ile ilgili cis-düzenleyici elementler

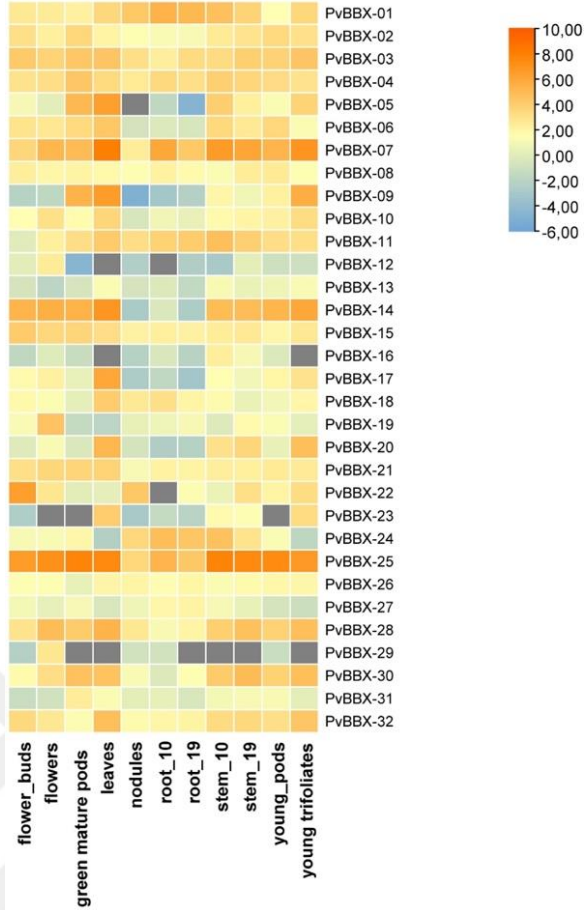
Biyotik Stres ile İlgili Cis-Düzenleyici Elementler	
STRE	Strese duyarlı element
MYB	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklıklara duyarlı element

Çizelge 4.11 Bağlanma bölgeleri ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Bağlanma Bölgeleri ile İlgili Cis-Düzenleyici Elementler	
Unnamed__6	Protein bağlanma bölgeleriyle ilişkili element
Unnamed__1	Protein bağlanma bölgeleriyle ilişkili element
AT-rich element	AT açısından zengin DNA bağlama proteininin (ATBP-1) bağlanma bölgesi
AP-1	Protein bağlanma bölgeleriyle ilişkili element

4.4 PvBBX Üyelerinin Dokuya Özgü mRNA Düzeylerinin Analizi

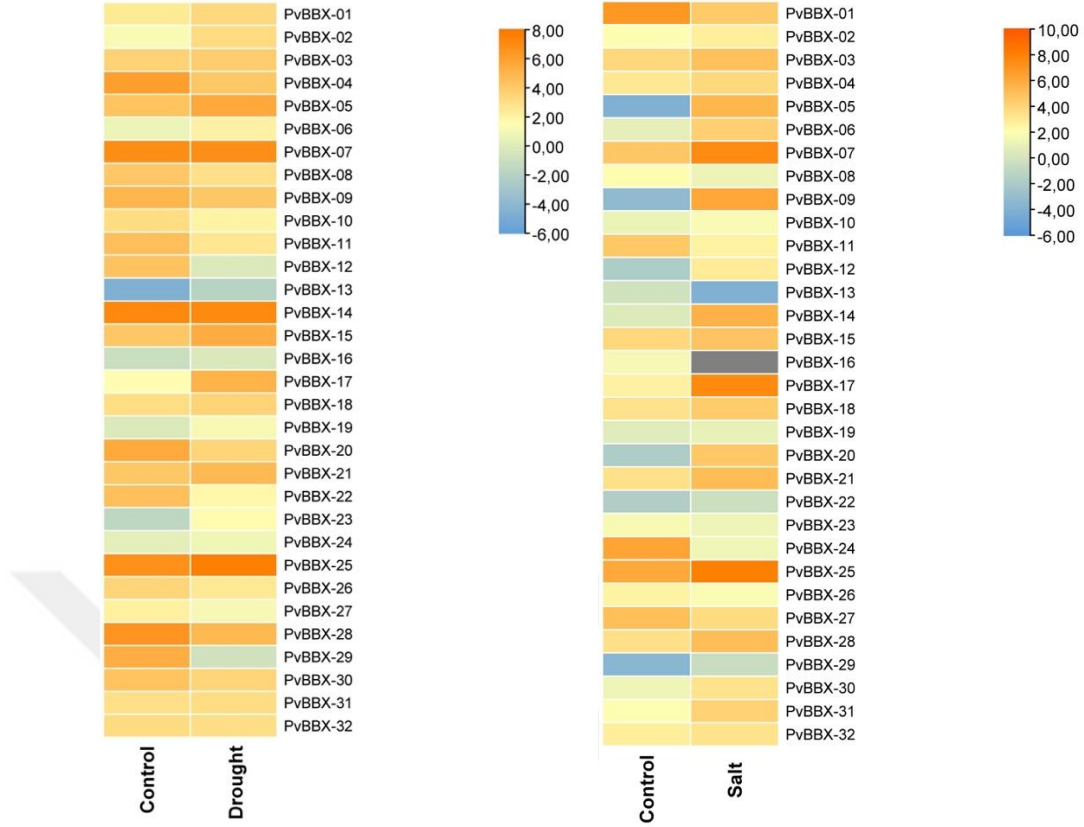
PvBBX genlerinin çiçek tomurcukları, çiçekler, yapraklar, kök 10, genç baklalar, kök 19, genç üç yapraklılar, gövde 10, gövde 19, yeşil olgun baklalar ve nodüller olmak üzere, farklı dokulardaki ekspresyon seviyeleri, ısı haritası üzerinde gösterilmiştir. Ekspresyon yoğunluğu, mavi (en az) ve turuncu (en fazla) arasında seviyelenmiş olup, gri olan bölgelerde ekspresyon bulunmamaktadır. *PvBBX-07* ve *PvBBX-25* genleri, çeşitli dokular üzerinde en fazla ekspresyon gösteren genler olarak, *PvBBX-29* geni ise en az ekspresyon gösteren gen olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 *P. vulgaris*'in farklı dokularındaki *PvBBX* üyelerinin mRNA seviyeleri

4.5 Kuraklık ve Tuz Stresi Altındaki *PvBBX* Genlerinin RNAseq Analizi

Sırasıyla kuraklık ve tuz stresi altındaki yaprak dokularının *PvBBX* genlerindeki değişikliklerini analiz etmek için (Hiz vd. 2014, Gregorio Jorge vd. 2020) tarafından üretilen RNAseq verileri kullanılmıştır. Kuraklık koşulları altında, *PvBBX-02*, *PvBBX-06*, *PvBBX-13*, *PvBBX-17*, *PvBBX-25* genleri kontrol grubuna göre yüksek oranda ekspresyon artışı göstermiştir. Tuzluluk koşulları altında ise, *PvBBX-05*, *PvBBX-06*, *PvBBX-07*, *PvBBX-09*, *PvBBX-12*, *PvBBX-14*, *PvBBX-17*, *PvBBX-21*, *PvBBX-25* ve *PvBBX-31* genleri kontrol grubuna göre yüksek oranda ekspresyon artışı göstermiştir. Ekspresyon yoğunluğu, mavi (en az) ve turuncu (en fazla) arasında seviyelenmiş olup, gri olan bölgelerde ekspresyon bulunmamaktadır.



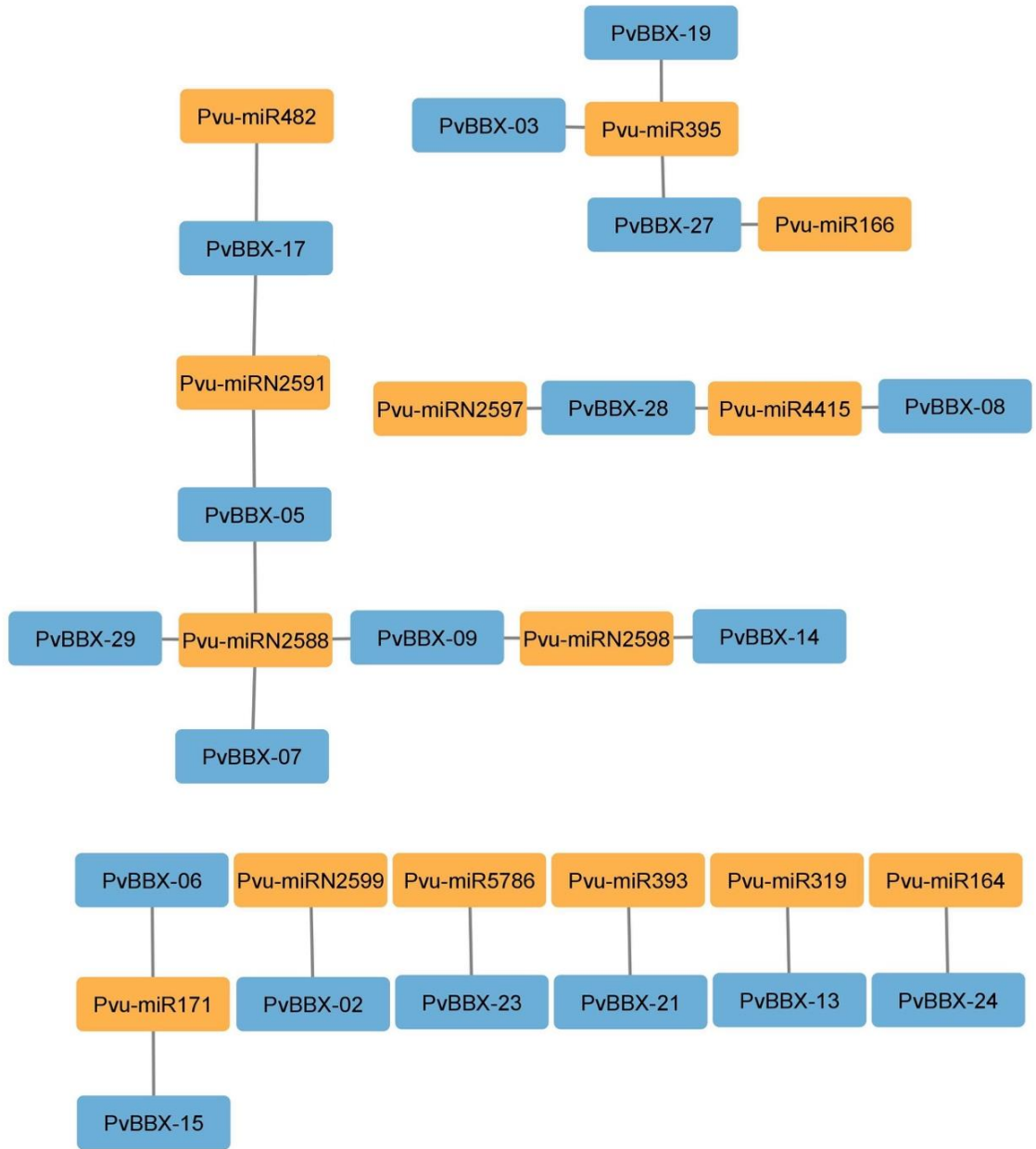
Şekil 4.11 İki farklı stres grubu ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılmalı RNAseq verilerinin ısı haritası (Kontrol - Kuraklık stresi, Kontrol – Tuz stresi)

4.6 PvBBX Üyelerinin miRNA Analizi

MikroRNA'lar (miRNA'lar) bitkilerde, hayvanlarda ve bazı virüslerde bulunan küçük RNA molekülleridir. Bitkilerde miRNA'lar, transkripsiyon sonrası seviyede gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli roller oynar. Çok sayıda gözlem ve araştırma sonucu, miRNA üretimini ve miRNA aracılı gen susturma işlemini kontrol eden son derece karmaşık, çok yönlü ve birbirine bağlı süreçlere işaret etmektedir. Bitki miRNA genleri öncelikle intergenik bölgede ve daha az derecede intragenik alanda tek birimler halinde bulunur. Bununla birlikte bitki genomları aynı zamanda tandem veya segmental duplikasyonların sonucu olan miRNA gen kümelerini de içerir (Conrad vd. 2006, Kuhn vd. 2008). Bitkilerde miRNA'lar, ARGONAUTE (AGO) efektör proteinini, gen susturmanın iki yöntemi olan translasyonel inhibisyon veya hedef RNA kırılması için hedef RNA'ların yerini belirlemesi için yönlendirir. Birincil miRNA transkriptlerinin

veya pri-miRNA'ların çoğunluğu, miRNA'ların üretildiği DNA'ya bağımlı RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. Bitkiler, DICER-LIKE1 adı verilen bir RNase III enzim kompleksinin etkisiyle çekirdekdeki öncü miRNA'ları miRNA'lara dönüştürür. Bitkiler, miRNA'ların uygun fonksiyonunu sürdürmek amacıyla miRNA'ların birikimini düzenlemek için birçok yol kullanır (Budak ve Akpınar 2015, Li ve Yu 2021). Analiz, *PvBBX* gen transkriptlerinin pmiREN veri tabanı ve hizalama için psRNATarget kullanılarak yapılmıştır. Bulgulara göre, en çok hedeflenen *PvBBX* genleri *PvBBX-05*, *PvBBX-17* ve *PvBBX-27* (2) olarak tespit edilmiştir. En fazla *PvBBX* genini hedefleyen MiRNA'nın Pvu-miRN2588 olduğu belirlenmiştir (şekil 4.12).





Şekil 4.12 *PvBBX* üyelerini hedefleyen miRNA'lar

4.7 RNA İzolasyonu

NucleoSpin ® RNA Kiti ile RNA izolasyonu yapılmıştır ve elde edilen RNA örnekleri kalite ve miktar tespiti için Thermo Nano Spectrometer Lite cihazı ile incelenmiştir. İzole RNA örneklerinin optimal A260/280 değerleri ~2.1'dir. Elde edilen RNA örneklerinin saflık oranları ve miktarları çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12 İzole edilen RNA örneklerinin saflık dereceleri ve miktarları (Tuz stresi)

Örnek cDNA	Saflık (A260/280)	Miktar (ng/µl)
ESY-1	2,07	126,4
ESG-1	2,03	106
ESK-1	2,12	70
ESY-2	2,03	32,3
ESG-2	2,09	86,9
ESK-2	2,13	113,2
ESY-3	2,07	101,9
ESG-3	2,13	132,5
ESK-3	2,11	53,3
SSY-1	2,03	86
SSG-1	2,1	56,1
SSK-1	2,15	123,8
SSY-2	2,08	249,7
SSG-2	2,12	197,4
SSK-2	2,09	112,4
SSY-3	2,1	428
SSG-3	2,02	49,7
SSK-3	1,98	116,6
EKY-1	2,14	131,2
EKG-1	2,11	306
EKK-1	2,14	70,4
EKY-2	2,13	161,6
EKG-2	2,16	277,6
EKK-2	2,1	175,7
EKY-3	2,18	224,3
EKG-3	2,17	156,1
EKK-3	2,10	117,7
SKY-1	2,12	220,9

Çizelge 4.12 İzole edilen RNA örneklerinin saflık dereceleri ve miktarları (Tuz stresi)
(devam)

SKG-1	2,15	194
SKK-1	2,16	211,7
SKY-2	2,13	213
SKG-2	2,19	167
SKK-2	2,15	124,9
SKY-3	2,16	209,9
SKG-3	2,14	231,4
SKK-3	2,14	122,9

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

4.8 cDNA İzolasyonu

İzole edilen, saflık ve miktarlarını tespit RNA örneklerinden cDNA eldesi için iScript™ cDNA Sentez kiti (BioRad-Almanya) kullanılmıştır. cDNA sentezi sonucunda örneklerin saflık ve miktar tespiti ise Thermo Nanospectrometer Lite cihazı ile tamamlanmıştır. Saflık miktarı ~1.8, cDNA örnekleri için optimal değerdir. Nanodrop ölçümleri çizelge 4.13'de verilmiştir. Ölçümlerden çıkan sonuçlara doğrultusunda, çalışmanın ileriki safhasında kullanılacak cDNA örnekleri qPCR'da kullanılmak üzere ~250 ng miktarına seyrettilmiştir.

Çizelge 4.13 İzole edilen cDNA örneklerinin saflık dereceleri ve miktarları (Tuz stresi)

Örnek cDNA	Saflık (A260/280)	Miktar (ng/μl)
ESY-1	1.89	1235.7
ESG-1	1.90	1235.7
ESK-1	1.91	1375.6
ESY-2	1.81	970.7
ESG-2	1.92	1478.1
ESK-2	1.92	1655.7
ESY-3	1.91	1323.3
ESG-3	1.91	1187.4

Çizelge 4.13 İzole edilen cDNA örneklerinin saflık dereceleri ve miktarları (Tuz stresi)
(devam)

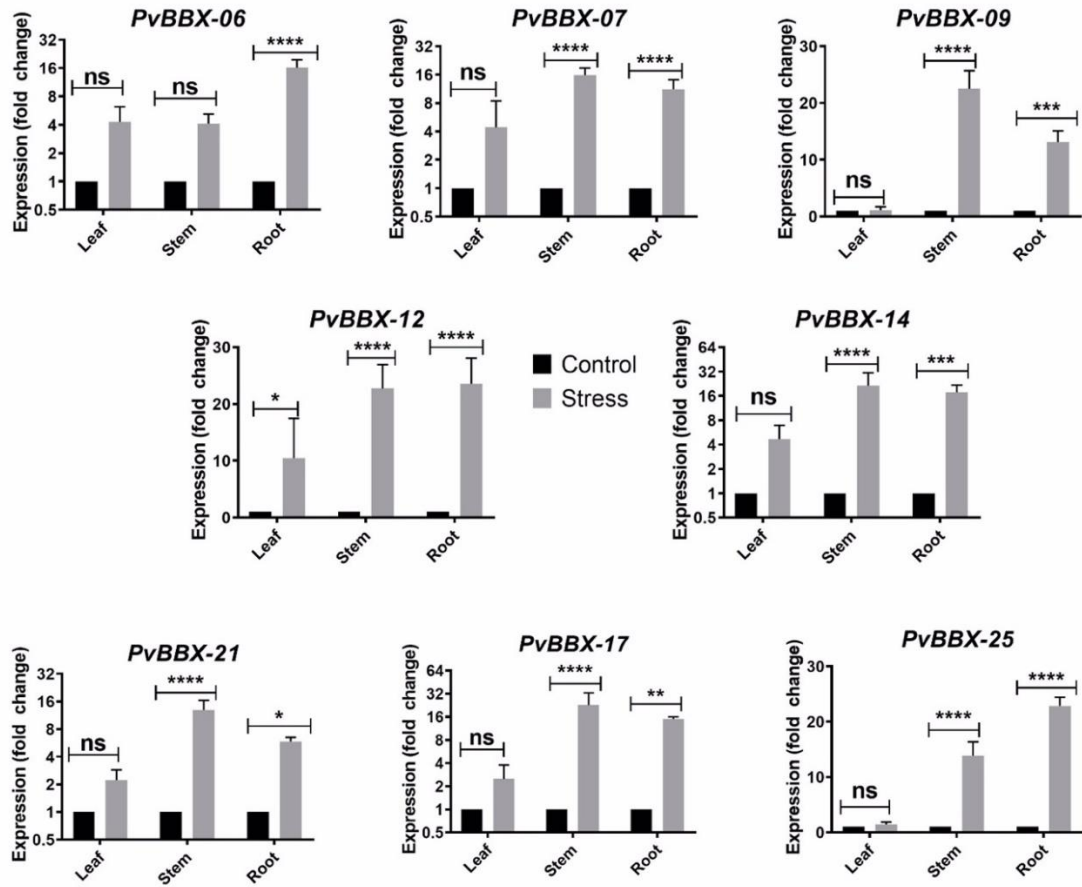
ESK-3	1.91	1303.4
SSY-1	1.91	1514.8
SSG-1	1.91	947
SSK-1	1.91	1292
SSY-2	1.92	1513.3
SSG-2	1.92	1429.6
SSK-2	1.99	1344.9
SSY-3	1.92	1486
SSG-3	1.82	1347
SSK-3	1.90	1250.1
EKY-1	1.89	1055.1
EKG-1	1.92	1540.2
EKK-1	1.92	601.4
EKY-2	1.92	1554.5
EKG-2	1.92	1428.4
EKK-2	1.92	1503.8
EKY-3	1.92	1560
EKG-3	1.90	1076.6
EKK-3	1.91	1366.8
SKY-1	1.90	1435.4
SKG-1	1.92	1588.3
SKK-1	1.92	1569.2
SKY-2	1.92	1542.7
SKG-2	1.92	1601.1
SKK-2	1.91	1236.5
SKY-3	1.91	1274.2
SKG-3	1.93	1462.1
SKK-3	1.91	1306.5

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

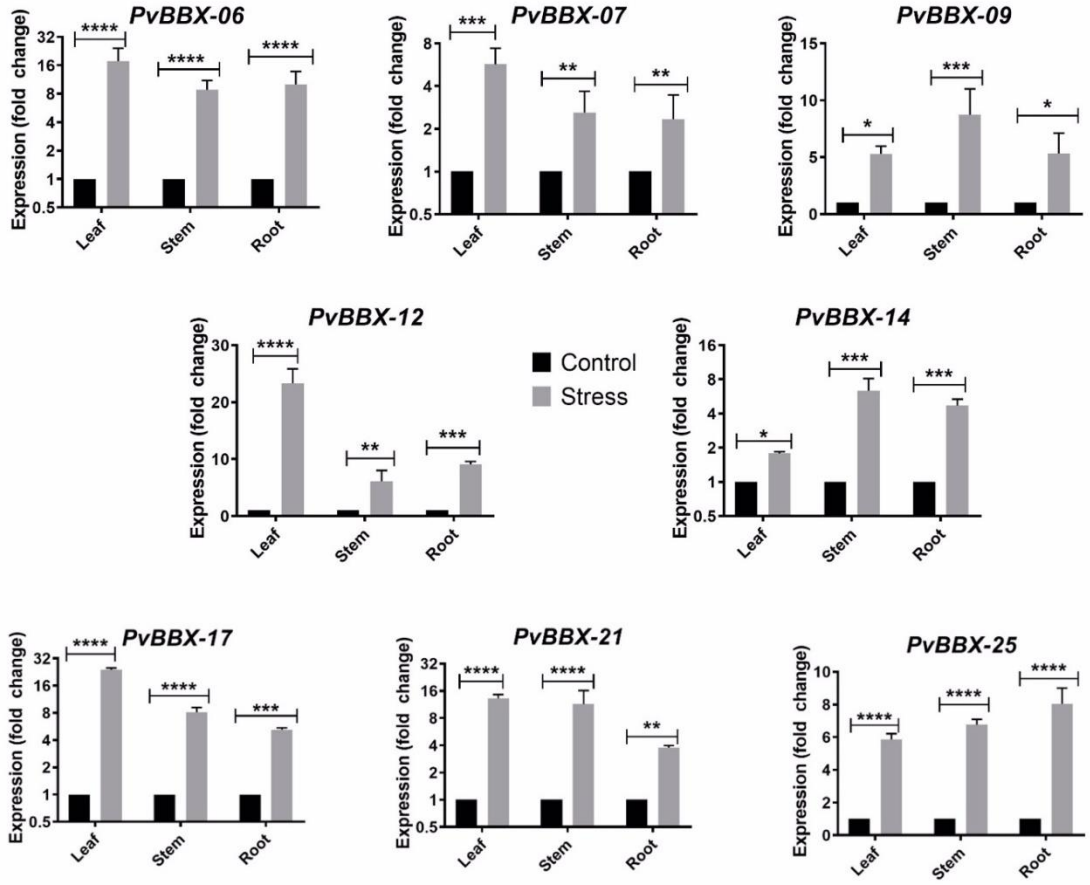
4.9 qRT-PCR Analizi Yoluyla *PvBBX* Genlerinin Tuz Stresine Yanıt Olarak Rollerini

Bu çalışmada, iki fasulye çeşidi olarak Elkoca ve Serra kullanılmıştır. Kök, gövde ve yaprak dokularında tuz stresine potansiyel tepkileri için *PvBBX* genleri analiz edilmiştir.

Elkoca türünde, *PvBBX-09* geni ve *PvBBX-25* geni, yaprakta tuz stresine karşı kayda değer bir ekspresyon artışı sergilememekle birlikte, her iki gen de kök ve gövdede anlamlı bir ekspresyon artışı göstermişlerdir. Bunun dışındaki tüm genler, *PvBBX-06*, *PvBBX-07*, *PvBBX-12*, *PvBBX-14*, *PvBBX-21*, *PvBBX-17* genleri, Serra ve Elkoca türündeki kök, gövde ve yaprak dokularının her birinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında büyük ölçüde ekspresyon artışı sergilemişlerdir (Şekil 4.13, 4.14).



Şekil 4.13 qPCR analizi yapılarak tuz stresi altında Elkoca çeşidinin kök, gövde ve yapraklarında belirlenmiş 8 *PvBBX* geninin ekspresyon grafikleri (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ve **** $P < 0.0001$ ifade etmektedir)



Şekil 4.14 qPCR analizi kullanılarak tuz stresi altında Serra çeşidinin kök, gövde ve yapraklarında belirlenmiş 8 *PvBBX* geninin ekspresyon grafikleri (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 ve **** P < 0.0001 ifade etmektedir)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Toprak çözeltilisindeki yüksek tuz oranı bitki büyümesini engelleyebilir, hatta bitkinin ölümüne neden olabilir. Tuz stresi, küresel ölçekte bitkilerin büyümesini ve gelişmesini sınırlayan başlıca elementtir. Bitkisel tarım tuz stresine karşı giderek daha savunmasız hale gelmektedir ve tuz stresi tarım arazilerinde verim kaybına sebebiyet vermektedir (Zhu 2001).

Dünya çapında mahsul verimine yönelik talepler, son yirmi yılda hızla artan insan nüfusuna ayak uydurmak adına dramatik bir artış göstermiştir. Bu sebeple, mahsul verimini ve kalitesini artırmaya yönelik çalışmalar önemli bir küresel tarım sorunu haline gelmiştir. Dünya çapındaki sulu tarım arazilerinin yaklaşık %20'sinin toprak tuzluluğundan olumsuz etkilenmekte olduğu bildirilmiştir. Toprak tuzluluğu ilgili sorunlar, doğal ortamın bozulması, kötü sulama uygulamaları ve iklim değişiklikleri nedeniyle daha da kötüleşmektedir. Bundan dolayı mahsul verimini etkili bir şekilde artırmak için, giderek ciddileşen toprak tuzlanması tehdidinin ele alınması kritik öneme sahiptir (Zhao vd. 2021).

Yapılmış olan çalışmada toplam 32 *PvBBX* üyesi incelenmiş olup, filogenetik ve fizikokimyasal karakterizasyonları analiz edilmiştir ve bu üyeler *PvBBX*-01 ila *PvBBX*-32 arasında numaralandırılmıştır. Literatürdeki *B-BOX* gen ailesi genom çapı karakterizasyon çalışmalarına göre, *Capsicum annuum* L. 23 (Wang vd. 2022), *Malus domestica* Borkh. 12 (Liu vd. 2018), *Vitis vinifera* L. 24 (Wei vd. 2020), *Pyrus bretschneideri* Rehd. 25 (Cao vd. 2017), *Solanum lycopersicum* 31 (Bu vd. 2021), *Prunus avium* 15 (Wang vd. 2021), *Arachis duranensis* 24 (Jin vd. 2020), *Salvia miltiorrhiza* 27 (Li vd. 2023), *Artemisia annua* L. 27 (He vd. 2023), *Solanum tuberosum* 30 (Talar vd. 2017) *B-BOX* üyesine sahiptir.

B-BOX gen ailesinin *P. vulgaris*'teki sınıflandırması, fonksiyonel işlevleri ve filogenetik ilişkileri dikkate alınarak isimlendirilmiştir. *P. vulgaris* (n=11) genomundaki *B-BOX* üyelerinin protein uzunlukları 124 ila 448 aminoasit arasında olup, moleküler ağırlıkları ise 14135.27 ila 48713.48 Da arasındadır. Aminoasit uzunlukları, farklı organizmalardaki

B-BOX üyeleri arasında farklılık gösterebilmektedir, örneğin *Capsicum annuum*'da aminoasit uzunluklarının 564 ile 1467 arasında olduğu görülmektedir, üyelerin moleküler ağırlıklarının ise 20332.93 Da ile 54983.39 Da arasında oldukları tespit edilmiştir (Wang vd. 2022). *Vitis vinifera*'da ise *B-BOX* proteinlerinin aminoasit uzunlukları, *PvBBX*'lere benzer bir şekilde, 127 ile 474 arasında değişiklik göstermektedir. Moleküler ağırlıkları ise 14258.41 ile 51428.42 arasındadır (Wei vd. 2020).

B-BOX proteinlerinin izoelektrik noktaları incelendiğinde, 26 tanesinin asidik, 5 tanesinin bazik ve 1 tanesinin de nötr olduğu tespit edilmiştir ve değerler 4.34 ile 9.41 arasında değişiklik göstermektedir. Benzer şekilde, *Vitis vinifera*'daki 24 *B-BOX* proteininin 20 tanesinin asidik olduğu görülmüştür (Wei vd. 2020).

Yapılan hücre altı lokalizasyon analizi sonucunda, *PvBBX* üyelerinin çekirdekte yoğunluk gösterdiği görülmüştür. İlgili gen ailesindeki yakın geçmişte *Solanum lycopersicum*, *Pyrus bretschneideri* Rehd ve *Vitis vinifera* L. üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, bu bulguları destekler nitelikte olup, *B-BOX* proteinlerinin benzer şekilde çekirdekte yüksek oranda buldukları görülmüştür (Chu vd. 2016, Cao vd. 2017, Wei vd. 2020).

PvBBX'lerin kromozomal lokasyonları incelenmiştir ve elde edilen bulgular sonucunda, 32 *PvBBX* üyesinin *Phaseolus vulgaris* L.'nin 11 kromozomunun 10'unda eşit olmayan bir şekilde konumlandıkları görülmüştür. *Arachis duranensis* ve *Capsicum Anuum* L. genomundaki *B-BOX* genleri de kromozomlar üzerinde rastgele dağılım göstermiştir (Jin vd. 2020, Wang vd. 2022).

B-BOX proteinlerinin filogenetik ilişkilerini desteklemek amacıyla, motif, domain ve gen yapıları analiz edilmiştir. *Capsicum annuum* üzerinde yapılan çalışmada, tıpkı *PvBBX*'lerde olduğu gibi, *BBX1*, *BBX2* ve *CCT* domainleri görülmüş olup, genlerin bu domainlerle doğru orantılı olarak benzer ekzon-intron yapısına sahip olduğu ve aynı filogenetik gruplarda buldukları görülmüştür. Bu bulgu da *B-BOX* gen ailesinin her iki türde de korunarak evrimleştiğini göstermektedir (Wang vd. 2022). *CCT* domaini orijinal

olarak *Arabidopsis thaliana* proteinleri CONSTANS (CO), CO-LIKE ve TIMING OF CAB1'de (TOC1) bulunan ve *Arabidopsis thaliana*'da çiçeklenme düzenleyicileri olarak karakterize edilen 43 amino asit uzunluğunda bir homoloji bölgesi olarak tanımlanmıştır (Zhang vd. 2015).

Literatürde, üzerinde en çok bilgi sahibi olunan *Arabidopsis* BBX proteini, *AtBBX1*, iki B-BOX ve bir CCT domainine sahip olup, çiçeklenmenin fotoperiyodunun düzenlenmesinde önemli roller oynadığı belirtilmiştir, bu bulgu da CCT domaininin, bitkide çiçeklenme fotoperiyodunu düzenlediğini işaret etmektedir (Liu vd. 2018). Filogenetik ağaçta aynı dalı paylaşan genlerin simetrik ekzonlar sergilediği, *PvBBX* üyelerinin gen yapılarını görselleştirmek için yapılan analiz sonucunda görülmüştür. Her iki uçta eşleşen uçbirleştirme bölgelerine sahip olduğu bilinen simetrik yapıya sahip ekzonlar tespit edilmiştir. Üyelerin ekzon ve intron yapıları ile motif ve filogenetik yapıları arasında doğrudan ilişki tespit edilmiştir. *Beta vulgaris* L. üzerinde yapılan bir çalışmada da sonuçlar bunu destekler niteliktedir. Çalışmada analiz edilen 17 B-BOX proteinin filogenetik ilişkileri incelendiğinde, filogenetik ağacın aynı grubunda konumlanan üyelerin benzer motif ve gen yapısına sahip olduğu görülmüştür. Örnek olarak, *BvBBX08*, *BvBBX09* ve *BvBBX10* genleri filogenetik ağaçta aynı grupta bulunmakta olup, birbirlerine eş gen yapısı sergilemektedirler (Song vd. 2023).

B-BOX genlerinde yapılan duplikasyon analizleri doğrultusunda toplam 15 duplikasyon tespit edilmiştir ve bunların tamamı segmental duplikasyondur. Ka/Ks oranı 1'den büyük ise pozitif, 1'den küçük ise negatif ve Ka/Ks değeri yaklaşık 1 ise genlerde nötr seleksiyon gözlenmektedir. *PvBBX* genlerinin Ka/Ks değerleri 0,087 ile 0,314 arasında değişiklik göstermektedir ve ortalama Ka/Ks değerleri 0,205 olarak tespit edilmiştir, ki bu değer 1'den düşük olup, genlerin negatif seleksiyonuyla ilgili bilgi vermektedir. *Vernicia fordii* türü üzerinde yapılan genom analizi çalışmasında, Ks değerlerinin 1,86 ile 1,94 arasında değiştiği, Tüm duplikasyon gösteren gen çiftleri için Ka/Ks değerleri 1,'den düşük olduğu ve 0,16 ila 0,28 aralığında değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Bu, *VfBBX* kopyalanan gen setlerinin evrimsel süreç boyunca negatif seleksiyona tabii tutulduğunu bize göstermektedir (Shi vd. 2024).

Yapılan ortolog ilişki analizi sonuçlarında, *P. vulgaris* ve *A. thaliana* arasında 33, *P. Vulgaris* ve *G. max* arasında ise 68 ortolog ilişki tespit edilmiştir. *Vitis vinifera* L. organizmasına ait sinteni analizleri doğrultusunda, Asma ve Arabidopsis'teki bazı *BBX* genleri arasında gözlenen sintenik ilişkiler, onların ortak bir atadan evrimleştiğini göstermektedir. (Zhang vd. 2021).

Pvu-miRN2588, gen ifadesini düzenlemede önemli bir rol oynayan miRNA molekülü olarak önemli ve dikkat çekici bir faktördür. Bu miRNA, bitkilerde gen ifadesini düzenlemek için önemli olan küçük, düzenleyici RNA moleküllerinin bir alt sınıfını oluşturur. Özellikle bitki gelişimi, stres yanıtları ve patojen savunması gibi biyolojik süreçlerde gen ifadesinin kontrolünde kritik bir rol oynamaktadır. Pvu-miRN2588'nin belirli hedef genleri düzenleme yeteneği, bitki büyümesi ve adaptasyonu üzerinde etkili olabilir. *Phaseolus vulgaris* türündeki *MYB* gen ailesi üzerinde yapılan bir çalışmada, Pvu-miRN2588 benzer şekilde en çok geni hedefleyen miRNA'nın Pvu-miRN2588 olduğu tespit edilmiştir (Kavas vd. 2022).

Cis-etkili elementlerin sayısı ve türleri *PvBBX* promotörleri arasında farklılık göstermiştir; bu da *PvBBX* genlerinin bitki gelişim düzenlemesinde farklı rollere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Gen ailesindeki toplam 1080 cis-etkili elementin, %7,31'ini gelişimle ilgili elementler, %19,81'ini çevresel stresle ilişkili elementler, %25'ini hormonla ilişkili elementler, %31,85'ini ışığa duyarlı elementler, %6,11'ini bağlanma ile ilişkili elementler ve %9,9'unu da bağlanma ile ilişkili elementler oluşturmaktadır. Tüm *PvBBX* promotörleri arasında en bol bulunan element türü olarak temsil edilen, ışıkla ilişkili cis-etkili elementler olmuştur. Bitkilerde, B-BOX proteinlerinin bitki gelişiminde, özellikle de ışık, sirkadiyen sinyalleme ve çiçeklenmede rol oynadığı bilinmektedir. *Arachis duranensis*'in genom çapında karakterizasyon çalışmasında, 95 tür cis-etkili element tanımlanmıştır ve 53'ünün fonksiyon ataması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre bu 53 adet cis-etkili elementten 24 tanesi ışığa duyarlı element olup, B-BOX proteinlerinin ışık ve sirkadiyen ritimde rol aldığı bulgusunu desteklemektedir (Jin vd. 2020).

Tuz muamelesi sonrasında yapılan analizler, iki farklı fasulye türünün kök, gövde ve yaprak dokularında birikimin meydana geldiğini göstermiştir. Bu durum, bitkinin tuz toleransına tepki verdiğini işaret etmektedir. Yapılan qRT-PCR analizleri ile, *P. vulgaris* bitkisinde *B-BOX* genlerinin işlevi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bulgular, *P. vulgaris*'teki *B-BOX* gen ailesi hakkında kapsamlı bilgi sunmuş ve *B-BOX* genlerinin işlevsel doğrulaması için sağlam bir temel oluşturmuştur.

Elkoca türünde, *PvBBX-09* geni ve *PvBBX-25* geni, yaprakta tuz stresine karşı herhangi bir ekspresyon artışı göstermemekle beraber, her iki gen de kök ve gövdede anlamlı bir ekspresyon artışı göstermişlerdir. Bunun dışındaki tüm genler, *PvBBX-06*, *PvBBX-07*, *PvBBX-12*, *PvBBX-14*, *PvBBX-21*, *PvBBX-17* genleri, Serra ve Elkoca türündeki kök, gövde ve yaprak dokularının her birinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında büyük ölçüde ekspresyon artışı sergilemişlerdir.

Medicago sativa ve *Glycine max* *B-BOX* genleri üzerinde yapılan çalışmaların bulguları incelendiğinde, bitki dokularındaki genlerin tuza maruz bırakıldıktan sonra ekspresyon artışı gösterdiği, ancak bu ekspresyon seviyelerinin, muamelenin süresine bağlı olarak değişiklik gösterebileceği görülmüştür (Sui vd. 2023, Li vd. 2024). Ozmotik stres, tuzluluk ve kuraklığın bir sonucu olarak meydana gelir ve bu, ROS (O_2^- ve H_2O_2) oluşumuyla sonuçlanır. ROS seviyesinin, bitkilerin abiyotik stres faktörlerine dayanabilmesi için belirli bir seviyenin altında olması gerekmektedir, antioksidaz aktivitesini de artıran ROS birikimi gerçekleştiğinde bitki hücreleri daha ciddi oksidatif hasara maruz kalır. Elmada, *B-BOX* proteinini kodlayan genin (*MdBBX10*), tuz stresi altında ekspresyon artışı gösterdiği görülmüştür. *MdBBX10*'un aşırı ekspresyonu, ROS oluşumunu azaltmıştır ve stres koşulları altında hücre hasarını önlemek için fazla ROS birikimini baskılayan SOD, APX, CAT ve GST üretimini artırmıştır (Liu vd. 2018).

Bu çalışmanın sonucunda, *P. vulgaris* genomunda 32 adet *B-BOX* geni belirlenmiştir ve Bu genlerin içerdikleri cis etkili elementler incelenerek biyotik stres, hormonlar, fotoperiyodik tepki, bitki büyümesi, sirkadiyen ritim ve çevresel stres gibi çeşitli promotorlar tanımlanmıştır. Ortolog ilişkiler analiz edilmiştir ve *B-BOX* gen ailesinin genişlemesinde oynadığı rolleri ortaya koymuştur. *B-BOX* genlerinin tuz ve kuraklık

stresine tepkilerini belirlemek için transkriptom verileri kullanılmıştır. Tuz muamelesi ile, iki fasulye türündeki kök, gövde ve yaprak dokularının neredeyse tamamında ekspresyon artışı ortaya çıkmıştır, bu da bitkinin tuz toleransına nasıl tepki verdiğini göstermektedir. qRT-PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar, *B-BOX* genlerinin *P. vulgaris*'te abiyotik strese karşı tepkisel bir işlevi olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır.



KAYNAKLAR

- Acosta-Motos, Jose Ramón, Maria Fernanda Ortuño, Agustina Bernal-Vicente, Pedro Diaz-Vivancos, Maria Jesus Sanchez-Blanco, and Jose Antonio Hernandez. 2017. 'Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms', *Agronomy*, 7: 18.
- Alexandratos, Nikos, and Jelle Bruinsma. 2012. *World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision*.
- Angioi, S. A., D. Rau, G. Attene, L. Nanni, E. Bellucci, G. Logozzo, V. Negri, P. L. Spagnoletti Zeuli, and R. Papa. 2010. 'Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L', *Theor Appl Genet*, 121: 829-43.
- Arnaud-Santana, E, DP Coyne, KM Eskridge, and AK Vidaver. 1994. 'Inheritance; low correlations of leaf, pod, and seed reactions to common blight disease in common beans; and implications for selection', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 116–21.
- AuguStin, Jorg, CB Beck, G Kalbfleish, LC Kagel, and RH Matthews. 1981. 'Variation in the vitamin and mineral content of raw and cooked commercial *Phaseolus vulgaris* classes', *Journal of Food Science*, 46: 1701-06.
- Bailey, T. L., N. Williams, C. Misleh, and W. W. Li. 2006. 'MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs', *Nucleic Acids Res*, 34: W369-73.
- Barampama, Zacharie, and Ronald E Simard. 1993. 'Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi', *Food Chemistry*, 47: 159-67.
- Beebe, Stephen, Alma Gonzalez, and Jorge Rengifo. 2000. 'Research on Trace Minerals in the Common Bean', *Food & Nutrition Bulletin*, 21.
- Bellucci, Elisa, Elena Bitocchi, Domenico Rau, Monica Rodriguez, Eleonora Biagetti, Alessandro Giardini, Giovanna Attene, Laura Nanni, and Roberto Papa. 2014. 'Genomics of Origin, Domestication and Evolution of *Phaseolus vulgaris*.' in.
- Bewley, J. D., Kent Bradford, Henk Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition*.
- Blair, M., Andrea Lorena Herrera Valderrama, Tito Sandoval, Gina Caldas, Fileppi M, and Francesca Sparvoli. 2012. 'Inheritance of seed phytate and phosphorus levels in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and association with newly-mapped candidate genes', *Molecular Breeding*.
- Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, Stephen Beebe, Paul Gepts, and Jos Vanderleyden. 2003. 'Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes', *Plant and Soil*, 252: 55-128.
- Bu, X., X. Wang, J. Yan, Y. Zhang, S. Zhou, X. Sun, Y. Yang, G. J. Ahammed, Y. Liu, M. Qi, F. Wang, and T. Li. 2021. 'Genome-Wide Characterization of B-Box Gene Family and Its Roles in Responses to Light Quality and Cold Stress in Tomato', *Front Plant Sci*, 12: 698525.
- Budak, Hikmet, and B. Ani Akpınar. 2015. 'Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins', *Functional & Integrative Genomics*, 15: 523-31.

- Büyük, İlker, Semra Soydam Aydın, and Sümer Aras. 2012. 'Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar', *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69: 97-110.
- Büyük, İlker, Behcet Inal, Emre İlhan, Mehmet Tanriseven, Sümer Aras, and Mustafa Erayman. 2016. 'Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean', *Molecular Biology Reports*, 43: 1251-66.
- Cao, Yunpeng, Yahui Han, Dandan Meng, Dahui Li, Chunyan Jiao, Qing Jin, Yi Lin, and Yongping Cai. 2017. 'B-BOX genes: genome-wide identification, evolution and their contribution to pollen growth in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)', *BMC Plant Biology*, 17: 156.
- Carmenza Muñoz, L., and Pascal Leterme. 2002. 'Factors influencing pulse consumption in Latin America', *British Journal of Nutrition*, 88: 251-54.
- Celmeli, Tugce, Hatice Sari, Huseyin Canci, Duygu Sari, Alper Adak, Tuba Eker, and Cengiz Toker. 2018. 'The Nutritional Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces in Comparison to Modern Varieties', *Agronomy*, 8: 166.
- Chávez-Servia, José Luis, Elena Heredia-García, Netzahualcoyotl Mayek-Pérez, Elia Aquino-Bolaños, Sanjuana Hernández-Delgado, J. C. Carrillo-Rodríguez, Homar Gill-Langarica, and Araceli Vera. 2016. 'Diversity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces and the Nutritional Value of their Grains.' in.
- Chen, Chengjie, Hao Chen, Yi Zhang, Hannah R. Thomas, Margaret H. Frank, Yehua He, and Rui Xia. 2020. 'TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data', *Molecular Plant*, 13: 1194-202.
- Chen, Shuhui, Wenqiang Jiang, Junliang Yin, Shuping Wang, Zhengwu Fang, Dongfang Ma, and Derong Gao. 2021. 'Genome-wide mining of wheat B-BOX zinc finger (*BBX*) gene family provides new insights into light stress responses', *Crop and Pasture Science*, 72: 17-37, 21.
- Chu, Z., X. Wang, Y. Li, H. Yu, J. Li, Y. Lu, H. Li, and B. Ouyang. 2016. 'Genomic Organization, Phylogenetic and Expression Analysis of the B-BOX Gene Family in Tomato', *Front Plant Sci*, 7: 1552.
- Conrad, Rick, Marianne Barrier, and Lance P. Ford. 2006. 'Role of miRNA and miRNA processing factors in development and disease', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 78: 107-17.
- Cramer, Grant R., Kaoru Urano, Serge Delrot, Mario Pezzotti, and Kazuo Shinozaki. 2011. 'Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective', *BMC Plant Biology*, 11: 163.
- De Ron, Antonio M., Roberto Papa, Elena Bitocchi, Ana M. González, Daniel G. Debouck, Mark A. Brick, Deidré Fourie, Frédéric Marsolais, James Beaver, Valérie Geffroy, Phillip McClean, Marta Santalla, Rafael Lozano, Fernando Juan Yuste-Lisbona, and Pedro A. Casquero. 2015. 'Common Bean.' in Antonio M. De Ron (ed.), *Grain Legumes* (Springer New York: New York, NY).
- Dzomba, Pamhidzai. 2013. 'Anthocyanin content and antioxidant activities of common bean species (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Mashonaland Central, Zimbabwe', *African journal of agricultural research*, 8: 3330-33.

- Fahad, Shah, Saddam Hussain, Amar Matloob, Faheem Ahmed Khan, Abdul Khaliq, Shah Saud, Shah Hassan, Darakh Shan, Fahad Khan, Najeeb Ullah, Muhammad Faiq, Muhammad Rafiullah Khan, Afrasiab Khan Tareen, Aziz Khan, Abid Ullah, Nasr Ullah, and Jianliang Huang. 2015. 'Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review', *Plant Growth Regulation*, 75: 391-404.
- Farooq, M., M. Hussain, Abdul Wahid, and K. H. M. Siddique. 2012. 'Drought Stress in Plants: An Overview.' in Ricardo Aroca (ed.), *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Feng, Zhen, Mengyu Li, Yi Li, Xu Yang, Hengling Wei, Xiaokang Fu, Liang Ma, Jianhua Lu, Hantao Wang, and Shuxun Yu. 2021. 'Comprehensive identification and expression analysis of B-Box genes in cotton', *BMC Genomics*, 22: 439.
- Flores-Estévez, N., J. A. Acosta-Gallegos, and L. Silva-Rosales. 2003. 'Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in Mexico', *Plant Disease*, 87: 21-25.
- Fourie, D. 1998. 'Characterization of Halo Blight Races on Dry Beans in South Africa', *Plant Disease*, 82: 307-10.
- Fourie, D. 2002. 'Distribution and Severity of Bacterial Diseases on Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa', *Journal of Phytopathology*, 150: 220-26.
- Gangappa, S. N., and J. F. Botto. 2014. 'The BBX family of plant transcription factors', *Trends Plant Sci*, 19: 460-70.
- Gepts, Paul. 1998. 'Origin and Evolution of Common Bean: Past Events and Recent Trends', *HortScience*, 33: 1124-30.
- Ghajar Sepanlou, Mehdi. 2011. 'The effect of salinity on the growth, morphology and physiology of *Echium amoenum* Fish. & Mey', *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 10: 8765-73.
- Goodstein, D. M., S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R. D. Hayes, J. Fazo, T. Mitros, W. Dirks, U. Hellsten, N. Putnam, and D. S. Rokhsar. 2012. 'Phytozome: a comparative platform for green plant genomics', *Nucleic Acids Res*, 40: D1178-86.
- Gregorio Jorge, Josefata, Miguel Angel Villalobos-López, Karen Lizeth Chavarría-Alvarado, Selma Ríos-Meléndez, Melina López-Meyer, and Analilia Arroyo-Becerra. 2020. 'Genome-wide transcriptional changes triggered by water deficit on a drought-tolerant common bean cultivar', *BMC Plant Biology*, 20: 525.
- Hao, Shanhu, Yiran Wang, Yunxiu Yan, Yuhang Liu, Jingyao Wang, and Su Chen. 2021. 'A Review on Plant Responses to Salt Stress and Their Mechanisms of Salt Resistance', *Horticulturae*, 7: 132.
- He, Weizhi, Hang Liu, Yongpeng Li, Zhangkuanyu Wu, Yan Xie, Xin Yan, Xiuyun Wang, Qing Miao, Tiantian Chen, Saeed-ur Rahman, Xinghao Yao, Yaojie Zhang, Chen Wang, Xinyi Hu, Xueqing Fu, Li Ren, Kexuan Tang, and Ling Li. 2023. 'Genome-wide characterization of B-box gene family in *Artemisia annua* L. and its potential role in the regulation of artemisinin biosynthesis', *Industrial Crops and Products*, 199: 116736.

- Hirayama, Takashi, and Kazuo Shinozaki. 2010. 'Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future', *The Plant Journal*, 61: 1041-52.
- Hiz, Mahmut Can, Balkan Canher, Harun Niron, and Muge Turet. 2014. 'Transcriptome Analysis of Salt Tolerant Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under Saline Conditions', *PLOS ONE*, 9: e92598.
- Horton, P., K. J. Park, T. Obayashi, N. Fujita, H. Harada, C. J. Adams-Collier, and K. Nakai. 2007. 'WoLF PSORT: protein localization predictor', *Nucleic Acids Res*, 35: W585-7.
- Hu, Bo, Jinpu Jin, An-Yuan Guo, He Zhang, Jingchu Luo, and Ge Gao. 2014. 'GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server', *Bioinformatics*, 31: 1296-97.
- Huang, Jianyan, Xiaobo Zhao, Xiaoyu Weng, Lei Wang, and Weibo Xie. 2012. 'The Rice B-Box Zinc Finger Gene Family: Genomic Identification, Characterization, Expression Profiling and Diurnal Analysis', *PLOS ONE*, 7: e48242.
- Hurst, Laurence D. "The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution." Trends in genetics : TIG vol. 18,9 (2002): 486. doi:10.1016/s0168-9525(02)02722-1
- İnal, Behcet, İlker Büyük, Emre İlhan, and Sümer Aras. 2017. 'Genome-wide analysis of *Phaseolus vulgaris* C2C2-YABBY transcription factors under salt stress conditions', *3 Biotech*, 7: 302.
- Jafari, Sima, and Seyyed Ebrahim Hashemi Garmdareh. 2019. 'Effects of salinity on morpho-physiological, and biochemical characteristics of stock plant (*Matthiola incana* L.)', *Scientia Horticulturae*, 257: 108731.
- Jin, Hanqi, Mengge Xing, Chunmei Cai, and Shuai Li. 2020. 'B-box Proteins in *Arachis duranensis*: Genome-Wide Characterization and Expression Profiles Analysis', *Agronomy*, 10: 23.
- Jones, John T., Annelies Haegeman, Etienne G. J. Danchin, Hari S. Gaur, Johannes Helder, Michael G. K. Jones, Taisei Kikuchi, Rosa Manzanilla-López, Juan E. Palomares-Rius, Wim M. L. Wesemael, and Roland N. Perry. 2013. 'Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology', *Molecular Plant Pathology*, 14: 946-61.
- Kavas, Musa, Mohamed Farah Abdulla, Karam Mostafa, Zafer Seçgin, Bayram Ali Yerlikaya, Çiğdem Otur, Gökhan Gökdemir, Aslıhan Kurt Kızıldoğan, Jameel Mohammed Al-Khayri, and Shri Mohan Jain. 2022. 'Investigation and Expression Analysis of R2R3-MYBs and Anthocyanin Biosynthesis-Related Genes during Seed Color Development of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*)', *Plants*, 11: 3386.
- Kelley, Lawrence A., Stefans Mezulis, Christopher M. Yates, Mark N. Wass, and Michael J. E. Sternberg. 2015. 'The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis', *Nature Protocols*, 10: 845-58.
- Khanna, R., B. Kronmiller, D. R. Maszle, G. Coupland, M. Holm, T. Mizuno, and S. H. Wu. 2009. 'The Arabidopsis B-box zinc finger family', *Plant Cell*, 21: 3416-20.
- Kielbowicz-Matuk, Agnieszka, Jagoda Czarnecka, Ewa Banachowicz, Pascal Rey, and Tadeusz Rorat. 2017. '*Solanum tuberosum* ZPR1 encodes a light-regulated

- nuclear DNA-binding protein adjusting the circadian expression of StBBX24 to light cycle', *Plant, Cell & Environment*, 40: 424-40.
- Koller, D., and A. Hadas. 1982. 'Water Relations in the Germination of Seeds.' in O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond and H. Ziegler (eds.), *Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, and Sam Griffiths-Jones. 2018. 'miRBase: from microRNA sequences to function', *Nucleic Acids Research*, 47: D155-D62.
- Kuhn, Donald E., Mickey M. Martin, David S. Feldman, Alvin V. Terry, Gerard J. Nuovo, and Terry S. Elton. 2008. 'Experimental validation of miRNA targets', *Methods*, 44: 47-54.
- Kumagai, Takeshi, Shogo Ito, Norihito Nakamichi, Yusuke Niwa, Masaya Murakami, Takafumi Yamashino, and Takeshi Mizuno. 2008. 'The Common Function of a Novel Subfamily of B-Box Zinc Finger Proteins with Reference to Circadian-Associated Events in *Arabidopsis thaliana*', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72: 1539-49.
- Latchman, D. S. 1997. 'Transcription factors: an overview', *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1305-12.
- Läuchli, A., and S. R. Grattan. 2007. 'Plant Growth And Development Under Salinity Stress.' in Matthew A. Jenks, Paul M. Hasegawa and S. Mohan Jain (eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Lee, J. H., S. J. Yoo, S. H. Park, I. Hwang, J. S. Lee, and J. H. Ahn. 2007. 'Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*', *Genes Dev*, 21: 397-402.
- Leister, D. 2004. 'Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene', *Trends Genet*, 20: 116-22.
- Letunic, I., and P. Bork. 2011. 'Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy', *Nucleic Acids Res*, 39: W475-8.
- Li, F., J. Sun, D. Wang, S. Bai, A. K. Clarke, and M. Holm. 2014. 'The B-box family gene STO (BBX24) in *Arabidopsis thaliana* regulates flowering time in different pathways', *PLOS ONE*, 9: e87544.
- Li, Mu, and Bin Yu. 2021. 'Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis', *RNA Biology*, 18: 2087-96.
- Li, Shuxia, Shuaiqi Guo, Xueqin Gao, Xiaotong Wang, Yaling Liu, Jing Wang, Xiaohong Li, Jinqing Zhang, and Bingzhe Fu. 2024. 'Genome-wide identification of B-box zinc finger (BBX) gene family in *Medicago sativa* and their roles in abiotic stress responses', *BMC Genomics*, 25: 110.
- Li, Yunyun, Yunli Tong, Jun Ye, Caijuan Zhang, Bin Li, Suying Hu, Xiaoshan Xue, Qian Tian, Yueyue Wang, Lin Li, Junfeng Niu, Xiaoyan Cao, Donghao Wang, and Zhezhi Wang. 2023. 'Genome-Wide Characterization of B-Box Gene Family in *Salvia miltiorrhiza*', *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 2146.

- Liu, Chaoyang, Tao Xie, Chenjie Chen, Aiping Luan, Jianmei Long, Chuhao Li, Yaqi Ding, and Yehua He. 2017. 'Genome-wide organization and expression profiling of the R2R3-MYB transcription factor family in pineapple (*Ananas comosus*)', *BMC Genomics*, 18: 503.
- Liu, X., R. Li, Y. Dai, X. Chen, and X. Wang. 2018. 'Genome-wide identification and expression analysis of the B-box gene family in the Apple (*Malus domestica* Borkh.) genome', *Mol Genet Genomics*, 293: 303-15.
- Los, Francine Gomes Basso, Acácio Antonio Ferreira Zielinski, José Pedro Wojeicchowski, Alessandro Nogueira, and Ivo Mottin Demiate. 2018. 'Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition', *Current Opinion in Food Science*, 19: 63-71.
- Ma, Jing, Jia-xi Dai, Xiao-wei Liu, and Duo Lin. 2021. 'Genome-wide and expression analysis of B-box gene family in pepper', *BMC Genomics*, 22: 883.
- McClung, C. R. 2006a. 'Plant circadian rhythms', *Plant Cell*, 18: 792-803.
- McClung, C. Robertson. 2006b. 'Plant Circadian Rhythms', *The Plant Cell*, 18: 792-803.
- McConnell, M., S. Mamidi, R. Lee, S. Chikara, M. Rossi, R. Papa, and P. McClean. 2010. 'Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)', *Theor Appl Genet*, 121: 1103-16.
- Meshi, Tetsuo, and Masaki Iwabuchi. 1995. 'Plant Transcription Factors', *Plant and Cell Physiology*, 36: 1405-20.
- Moriones, Enrique, and Eric Verdin. 2020. 'Viral Diseases.' in Maria Lodovica Gullino, Ramon Albajes and Philippe C. Nicot (eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* (Springer International Publishing: Cham).
- Mustafa, Yildiz, Poyraz İrem, Çavdar Aslinur, Özgen Yasin, and Beyaz Ramazan. 2020. 'Plant Responses to Salt Stress.' in Y. Abdurakhmonov Ibrokhim (ed.), *Plant Breeding* (IntechOpen: Rijeka).
- Nadeem, Muhammad, Mehmet Yeken, Muhammad Qasim Shahid, Ephrem Habyarimana, Hilal Yilmaz, Ahmad Alsaleh, Rustu Hatipoglu, Yeter Çilesiz, Khalid Mahmood Khawar, Ndiko Ludidi, Muhammad Aasim, Tolga Karaköy, and Faheem Baloch. 2021. 'Common bean as a potential crop for future food security: an overview of past, current and future contributions in genomics, transcriptomics, transgenics and proteomics', *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35: 758-86.
- Narayanasamy, P. 2011. 'Diagnosis of Fungal Diseases of Plants.' in P. Narayanasamy (ed.), *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens, Vol.1* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Nawaz, Khalid, Khalid Hussain, Abdul Majeed, Farah Khan, and Shahid Afghan. 2010. 'Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects', *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 9: 5475-80.
- Negrão, S., S. M. Schmöckel, and M. Tester. 2016. 'Evaluating physiological responses of plants to salinity stress', *Annals of Botany*, 119: 1-11.

- Obel, H. O., C. Cheng, Y. Li, Z. Tian, M. K. Njogu, J. Li, Q. Lou, X. Yu, Z. Yang, J. O. Ogwen, and J. Chen. 2022. 'Genome-Wide Identification of the B-Box Gene Family and Expression Analysis Suggests Their Potential Role in Photoperiod-Mediated β -Carotene Accumulation in the Endocarp of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Fruit', *Genes (Basel)*, 13.
- Oecd. 2017. *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 7*.
- Papavassiliou, Athanasios G. 1995. 'Transcription Factors', *New England Journal of Medicine*, 332: 45-47.
- Parida, Asish, Anath Das, and Bhabatosh Mitra. 2004. 'Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*', *Trees - Structure and Function*, 18: 167-74.
- Pastor-Corrales, Marcial A., Carlos Jara, and Shree P. Singh. 1998. 'Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean', *Euphytica*, 103: 161-71.
- Pathania, Anju, Surinder Sharma, and Prem Sharma. 2014. 'Common Bean.' in.
- Pereira, Andy. 2016. 'Plant Abiotic Stress Challenges from the Changing Environment', *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Rahman, Md, Md Tanbir Rubayet, M. Khurshed, and Alam Bhuiyan. 2020. 'Integrated management of rhizoctonia root rot disease of soybean caused by *Rhizoctonia solani*', *Nippon Journal of Environmental Science*, 1.
- Riechmann, J. L., and O. J. Ratcliffe. 2000. 'A genomic perspective on plant transcription factors', *Curr Opin Plant Biol*, 3: 423-34.
- Rodriguez, M., D. Rau, E. Bitocchi, E. Bellucci, E. Biagetti, A. Carboni, P. Gepts, L. Nanni, R. Papa, and G. Attene. 2016. 'Landscape genetics, adaptive diversity and population structure in *Phaseolus vulgaris*', *New Phytol*, 209: 1781-94.
- Rodriguez, Mayra, Eduardo Canales, and Orlando Borrás-Hidalgo. 2005. 'Molecular aspects of abiotic stress in plants', *Biotechnologia Aplicada*, 22.
- Rombauts, S., P. Déhais, M. Van Montagu, and P. Rouzé. 1999. 'PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database', *Nucleic Acids Res*, 27: 295-6.
- Rosales, M. A., E. Ocampo, R. Rodríguez-Valentín, Y. Olvera-Carrillo, J. Acosta-Gallegos, and A. A. Covarrubias. 2012. 'Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance', *Plant Physiol Biochem*, 56: 24-34.
- Salcedo J.M., Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J. 2008. 'Regeneration guidelines: common bean.', *Crop specific regeneration guidelines*.
- Sangronis, E, and CJ Machado. 2007. 'Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*', *LWT-Food Science and Technology*, 40: 116-20.
- Sanyal, Amartya, Bryan R. Lajoie, Gaurav Jain, and Job Dekker. 2012. 'The long-range interaction landscape of gene promoters', *Nature*, 489: 109-13.

- Shahid, Muhammad Adnan, Ali Sarkhosh, Naeem Khan, Rashad Mukhtar Balal, Shahid Ali, Lorenzo Rossi, Celina Gómez, Neil Mattson, Wajid Nasim, and Francisco Garcia-Sanchez. 2020. 'Insights into the Physiological and Biochemical Impacts of Salt Stress on Plant Growth and Development', *Agronomy*, 10: 938.
- Shalmani, A., X. Q. Jing, Y. Shi, I. Muhammad, M. R. Zhou, X. Y. Wei, Q. Q. Chen, W. Q. Li, W. T. Liu, and K. M. Chen. 2019. 'Characterization of B-BOX gene family and their expression profiles under hormonal, abiotic and metal stresses in Poaceae plants', *BMC Genomics*, 20: 27.
- Shalmani, Abdullah, Sheng Fan, Peng Jia, Guofang Li, Izhar Muhammad, Youmei Li, Rahat Sharif, Feng Dong, Xiya Zuo, Ke Li, Kun-Ming Chen, and Mingyu Han. 2018a. 'Genome Identification of B-BOX Gene Family Members in Seven Rosacea Species and Their Expression Analysis in Response to Flower Induction in *Malus domestica*', *Molecules*, 23.
- Shalmani. 2018b. 'Genome Identification of B-BOX Gene Family Members in Seven Rosaceae Species and Their Expression Analysis in Response to Flower Induction in *Malus domestica*', *Molecules*, 23: 1763.
- Shang, Q., D. Jiang, J. Xie, J. Cheng, and X. Xiao. 2024. 'The schizotrophic lifestyle of *Sclerotinia sclerotiorum*', *Mol Plant Pathol*, 25: e13423.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. 'Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks', *Genome Res*, 13: 2498-504.
- Shi, Kai, Guang Zhao, Ze Li, Junqin Zhou, Lingli Wu, Xiaofeng Tan, and Jun Yuan. 2024. 'Genome-Wide Identification of B-Box Gene Family and Candidate Light-Related Member Analysis of Tung Tree (*Vernicia fordii*)', *International Journal of Molecular Sciences*, 25: 1977.
- Singh, Shree, Paul Gepts, and Daniel Debouck. 1991. 'Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae)', *Economic Botany*, 45: 379-96.
- Smith, Millicent R., Eric Dinglasan, Erik Veneklaas, Jose Polania, Idupulapati M. Rao, Stephen E. Beebe, and Andrew Merchant. 2022. 'Effect of Drought and Low P on Yield and Nutritional Content in Common Bean', *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Song, He, Guangzhou Ding, Chunlei Zhao, and Yanli Li. 2023. 'Genome-Wide Identification of B-Box Gene Family and Expression Analysis Suggest Its Roles in Responses to *Cercospora* Leaf Spot in Sugar Beet (*Beta Vulgaris* L.)', *Genes*, 14: 1248.
- Song, Z., Y. Bian, J. Liu, Y. Sun, and D. Xu. 2020. 'B-box proteins: Pivotal players in light-mediated development in plants', *J Integr Plant Biol*, 62: 1293-309.
- Srivastava, Deepti, Md Shamim, Mahesh Kumar, Anurag Mishra, Rashmi Maurya, Divakar Sharma, Pramila Pandey, and Kapildeo Singh. 2019. 'Role of circadian rhythm in plant system: An update from development to stress response', *Environmental and Experimental Botany*, 162.
- Suárez, Juan Carlos, José Iván Vanegas, José Alexander Anzola, Amara Tatiana Contreras, Milan O. Urban, Stephen E. Beebe, and Idupulapati M. Rao. 2022.

- 'Impact of Web Blight on Photosynthetic Performance of an Elite Common Bean Line in the Western Amazon Region of Colombia', *Plants*, 11: 3238.
- Sui, Chao, Shanshan Cheng, Deying Wang, Lujia Lv, Huiran Meng, Mengxue Du, Jingyu Li, Peisen Su, and Shangjing Guo. 2023. 'Systematic identification and characterization of the soybean (*Glycine max*) B-box transcription factor family', *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37: 104-16.
- Taboada, G., C. L. Abán, G. Mercado Cárdenas, Y. Spedaletti, M. Aparicio González, E. Maita, P. Ortega-Baes, and M. Galván. 2022. 'Characterization of fungal pathogens and germplasm screening for disease resistance in the main production area of the common bean in Argentina', *Front Plant Sci*, 13: 986247.
- Talar, Urszula, Agnieszka Kiełbowicz-Matuk, Jagoda Czarnecka, and Tadeusz Rorat. 2017. 'Genome-wide survey of B-box proteins in potato (*Solanum tuberosum*)—Identification, characterization and expression patterns during diurnal cycle, etiolation and de-etiolation', *PLOS ONE*, 12: e0177471.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. 'MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods', *Mol Biol Evol*, 28: 2731-9.
- Tiwari, Shiv B., Yu Shen, Han-Chang Chang, Yanli Hou, Amanda Harris, Siu Fong Ma, Megan McPartland, Graham J. Hymus, Luc Adam, Colleen Marion, Alemu Belachew, Peter P. Repetti, T. Lynne Reuber, and Oliver J. Ratcliffe. 2010. 'The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element', *New Phytologist*, 187: 57-66.
- Torabi, Masoud, and Mohd Halim. 2013. 'Physiological and biochemical responses of plants in saline environment.' in.
- Vaishak, K. P., P. Yadukrishnan, S. Bakshi, A. K. Kushwaha, H. Ramachandran, N. Job, D. Babu, and S. Datta. 2019. 'The B-box bridge between light and hormones in plants', *J Photochem Photobiol B*, 191: 164-74.
- Wang, Jin, Guangbin Yang, Ying Chen, Yao Dai, Qiaoling Yuan, Qingyun Shan, Luzhao Pan, Li Dai, Xuexiao Zou, Feng Liu, and Cheng Xiong. 2022. 'Genome-Wide Characterization and Anthocyanin-Related Expression Analysis of the B-BOX Gene Family in *Capsicum annuum* L', *Frontiers in Genetics*, 13.
- Wang, Yanyan, Zefeng Zhai, Yueting Sun, Chen Feng, Xiang Peng, Xiang Zhang, Yuqin Xiao, Xin Zhou, Weili Wang, Jiale Jiao, and Tianhong Li. 2021. 'Genome-Wide Identification of the B-BOX Genes that Respond to Multiple Ripening Related Signals in Sweet Cherry Fruit', *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 1622.
- Wei, Hongru, Peipei Wang, Jianqing Chen, Changjun Li, Yongzhang Wang, Yongbing Yuan, Jinggui Fang, and Xiangpeng Leng. 2020. 'Genome-wide identification and analysis of B-BOX gene family in grapevine reveal its potential functions in berry development', *BMC Plant Biology*, 20: 72.
- Worrall, Elizabeth A., Francis O. Wamonje, Gerardine Mukeshimana, Jagger J. W. Harvey, John P. Carr, and Neena Mitter. 2015. 'Chapter One - Bean Common

Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus: Relationships, Biology, and Prospects for Control.' in Margaret Kielian, Karl Maramorosch and Thomas C. Mettenleiter (eds.), *Advances in Virus Research* (Academic Press).

Xu, Dongqing, Yan Jiang, Jian Li, Magnus Holm, and Xing Wang Deng. 2017. 'The B-Box Domain Protein BBX21 Promotes Photomorphogenesis', *Plant Physiology*, 176: 2365-75.

Zhang, Xiuming, Li Zhang, Miaomiao Ji, Yifei Wu, Songlin Zhang, Yanxun Zhu, Jin Yao, Zhi Li, Hua Gao, and Xiping Wang. 2021. 'Genome-wide identification and expression analysis of the B-box transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.)', *BMC Genomics*, 22: 221.

Zhao, J., H. Li, J. Huang, T. Shi, Z. Meng, Q. Chen, and J. Deng. 2021. 'Genome-wide analysis of BBX gene family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)', *PeerJ*, 9: e11939.

Zhao, Shuangshuang, Qikun Zhang, Mingyue Liu, Huapeng Zhou, Changle Ma, and Pingping Wang. 2021. 'Regulation of Plant Responses to Salt Stress', *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 4609.

Zhu, J.-K. (2007). Plant Salt Stress. In eLS, (Ed.).