

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***IQD* GEN AİLESİNİN FASULYE BİTKİSİNDE (*Phaseolus vulgaris* L.)
BİYOİNFORMATİK OLARAK DETAYLI KARAKTERİZASYONU ve
ABİYOTİK STRESLE İLİŞKİSİNİN mRNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Tarık KIRLIOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IQD GEN AİLESİNİN FASULYE BİTKİSİNDE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİYOİNFORMATİK OLARAK DETAYLI KARAKTERİZASYONU ve ABİYOTİK STRESLE İLİŞKİSİNİN mRNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Tarık KIRLIOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker BÜYÜK

Kalmodulin-bağlayıcı proteinlerin bir sınıfı olan IQD proteinleri (1Q-67 alanı), bitki büyüme ve gelişim süreçlerinin yanı sıra bitkinin çevresel uyaranlara tepkisinde yer alır. Günümüze kadar çeşitli bitkilerde yapılan çalışmalar olmasına rağmen fasulyede *IQD* gen ailesinin fonksiyonları hakkında bilgi kısıtlıdır. Yapılan tez çalışmasında, fasulyede *IQD* gen ailesinin genom düzeyinde tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam 36 *PvIQD* geni tanımlanarak *PvIQD1* ile *PvIQD36* olarak isimlendirilmiştir. Filogenetik analiz, *PvIQD* genlerinin dört gruba ayrıldığını ve aynı grupta yer alan genlerin ekzon-intron ve korunmuş motif içeriğinin benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sinteni analizi, *PvIQD* genlerinde segmental duplikasyonun rol oynadığını belirtirken Ka/Ks analizi güçlü arındırıcı seçilimin baskın olduğunu göstermiştir. *PvIQD* genlerinin promotör bölgeleri, yüksek oranda hormon ve stres ilgili cis-elementler içermiştir. Stres ile ilişkili miRNA'ların, *PvIQD* genlerini hedefleyerek gen ekspresyonu düzenlemesinde yer alabileceği tespit edilmiştir. *PvIQD* genleri, farklı dokularda farklı ifade profilleri sergilemiştir. RNA-seq verilerinden elde edilen 10 *PvIQD* geninin tuz stresi altında ekspresyon profilleri qPCR kullanılarak incelenmiştir. *PvIQD* genlerinin tuz stresine karşı güçlü bir tepki oluşturduğu görülmüştür. Sonuç olarak, *PvIQD* genlerinin çeşitli stres tepkilerini düzenleyebileceği düşünülmektedir.

Eylül 2023, 83 Sayfa

Anahtar Kelimeler: ekspresyon profili, Fasulye, IQD proteinleri, RNA-dizileme, Tuz stresi

ABSTRACT

Master Thesis

BIOINFORMATICS CHARACTERIZATION OF *IQD* GENE FAMILY IN COMMON BEAN PLANT (*Phaseolus vulgaris* L.) IN DETAIL AND INVESTIGATION OF ITS RELATIONSHIP WITH ABIOTIC STRESS AT THE mRNA LEVEL

Tarık KIRLIOĞLU

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

Supervisor: Assoc. Prof. İlker BÜYÜK

IQD proteins (domain 1Q-67), a class of calmodulin-binding proteins, are involved in plant growth and development processes, as well as in the plant's response to environmental stimuli. The *IQD* gene family has been studied in various plants to date, but little is known about its functions in common bean. In the thesis study, genome-wide identification and characterization of the *IQD* gene family in common bean was performed. A total of 36 *PvIQD* genes were identified and named as *PvIQD1* to *PvIQD36*. Phylogenetic analysis revealed that *PvIQD* genes were divided into four groups and that the exon-intron and conserved motif contents of the genes in the same group were similar. Sinterni analysis indicated that segmental duplication was involved in *PvIQD* genes, while Ka/Ks analysis showed strong purifying selection predominant. The promoter regions of the *PvIQD* genes contained high levels of hormone and stress-related cis-elements. Stress-associated miRNAs may be involved in gene expression regulation by targeting *PvIQD* genes. *PvIQD* genes exhibited different expression profiles in different tissues. The expression profiles of 10 *PvIQD* genes obtained from RNA-seq data under salt stress were examined using qPCR. *PvIQD* genes appeared to elicit a strong response to salt stress. Consequently, *PvIQD* genes can regulate various stress responses.

September 2023, 83 Pages

Keywords: expression profile, Bean, IQD proteins, RNA-seq, Salt stress

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince, çalışmalarında bilgi, tecrübe ve önerilerini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. İlker BÜYÜK’e, hocamız Prof. Dr. Emine Sümer ARAS’a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) teşekkür ederim.

Tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen Aybüke OKAY’a ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Bitki Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü eğitim sürecine beraber başladığımız, süreç boyunca desteklerini esirgemeyen arkadaşım Burak ÖZCAN’a, Ankara Üniversitesi’nde tanıdığım, fikir alışverişinde bulunabildiğim arkadaşım Ayşe ÖZCAN’a teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde yanımda olan, aldığım kararların arkasında desteklerini hissettiren annem Esmâ KIRLIOĞLU, babam İsmail KIRLIOĞLU, ablalarım Gülsüm KIRLIOĞLU ve Nesibe KIRLIOĞLU ÖZER’e teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklerini sağlayan TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

FYL-2022-2286 kodlu “IQD Gen Ailesinin Fasulye Bitkisinde Biyoinformatik Olarak Detaylı Karakterizasyonu ve Abiyotik Stresle İlişkisinin mRNA Düzeyinde Araştırılması” başlıklı proje için desteklerini sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne teşekkür ederim.

Tarık KIRLIOĞLU
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
2.1.1 Tarihçesi	3
2.1.2 Sınıflandırması	3
2.1.3 Besin, sağlık ve doğa açısından önemi.....	4
2.1.4 Dünya ve Türkiye’de üretimi	4
2.1.5 İklim istekleri.....	6
2.2 Bitkilerde Stres	6
2.3 Tuz Stresi.....	7
2.4 Tuz Stresinin Bitkiler Üzerine Etkileri.....	8
2.4.1 Çimlenme	9
2.4.2 Fide gelişimi/büyümesi.....	9
2.4.3 Fotosentez.....	10
2.4.4 Su ilişkileri	10
2.4.5 İyon toksisitesi	11
2.4.6 Oksidatif stres.....	11
2.5 Tuz Stresi Tolerans Mekanizmaları.....	12
2.5.1 İyon homeostazı.....	12
2.5.2 Ozmotik düzenleme.....	13
2.5.3 Antioksidan savunma sistemi	14
2.5.4 Fitohormonlar	15
2.6 Abiyotik Stres Yanıtında Omiks Yaklaşımlar	16
2.6.1 Genomik.....	16
2.6.2 Transkriptomik.....	17
2.6.3 Proteomik.....	17
2.6.4 Metabolomik.....	18
2.7 Kalsiyum/Kalmodulin Ağı.....	18
2.7.1 Ca ²⁺ sinyali.....	18
2.7.2 Kalmodulin	19
2.7.3 Kalmodulin-bağlayıcı proteinler.....	20
2.7.4 IQD proteinleri (IQ-67 alanı).....	20

3. MATERİYAL VE YÖNTEM	23
3.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> IQD Proteinlerinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu	23
3.2 PvIQD Proteinlerinin Dizi Hizalaması ve Filogenetik Analizi	23
3.3 <i>PvIQD</i> Genlerinin Kromozomal Dağılım, Korunmuş Motif ve Ekzon-İntron Analizi	24
3.4 Gen Duplikasyonu ve Ka/Ks Analizi	24
3.5 <i>PvIQD</i> Genlerinin Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi	25
3.6 Mikro-RNA'ların (miRNA) ve Hedefledikleri <i>PvIQD</i> Genlerin Belirlenmesi ..	25
3.7 Farklı Dokulardaki <i>PvIQD</i> Genlerinin in-silico mRNA seviyeleri	25
3.8 RNA-Seq Datasında <i>PvIQD</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri.....	25
3.9 Bitki Büyüme Koşulları, Materyalleri ve Stres Uygulaması	26
3.10 Total RNA İzolasyonu	27
3.11 Komplementer DNA Sentezi.....	27
3.12 Primer Tasarımı	28
3.13 Geçek Zamanlı PCR (qPCR)	29
3.14 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1 Fasulye'de <i>IQD</i> Gen Ailesinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu	31
4.2 <i>PvIQD</i> Genlerinin Çoklu Dizi Hizalaması	34
4.3 <i>IQD</i> Proteinlerinin Filogenetik Analizi	35
4.4 <i>PvIQD</i> Genlerinin Korunmuş Motif ve Ekzon-İntron Organizasyonu.....	36
4.5 <i>PvIQD</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı.....	38
4.6 <i>PvIQD</i> Genlerinin Sinteni Analizi.....	38
4.7 <i>PvIQD</i> Genlerinin Ortolog İlişkileri	40
4.8 miRNA'ların Hedefledikleri <i>PvIQD</i> Genleri	45
4.9 <i>PvIQD</i> Genlerinin Cis-element Analizi.....	46
4.10 <i>PvIQD</i> Proteinlerinin Hücre Altı Lokalizasyonu	51
4.11 <i>PvIQD</i> Genlerinin Dokuya Özgü mRNA Seviyeleri	52
4.12 <i>PvIQD</i> Genlerinin Tuz Stresi Altında Ekspresyon Profilleri.....	54
4.13 Total RNA İzolasyonu	54
4.14 cDNA Sentezi	56
4.15 <i>PvIQD</i> Genlerinin Tuz Stresi Altında Ekspresyon Seviyeleri.....	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık Olarak
°	Derece
B	Bor
cm	Santimetre
C	Celcius
Cu	Bakır
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır (II) sülfat
Ca	Kalsiyum
Cl	Klorür
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat
CO ₂	Karbondioksit
Fe	Demir
g	Gram
kDa	KiloDalton
ha	Hektar
hg	Hektogram
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₃ BO ₃	Borik asit
L	Litre
K	Potasyum
KCl	Potasyum klorür
K ₂ SO ₄	Potasyum sülfat
KH ₂ PO ₄	Mono Potasyum Fosfat
M	molar
mM	Milimolar
mmol	Milimol
m	Metre
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
Mn	Mangan
MnSO ₄	Mangan (II) sülfat
ng	Nanogram
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NO ₃	Nitrat
NH ₄ Mo	amonyum molibdat

O ₂	Moleküler Oksijen
OH-	Hidroksil
P	Fosfor
Zn	Çinko
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko Sülfat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
v	Hacim

Kısaltmalar

ABA	Absisik Asit
ACT	Aktin
APX	Askorbat Peroksidaz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bç	Baz Çifti
CaM	Kalmodulin
CaMPB	Kalmodulin-Bağlayıcı Protein
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
Chr	Kromozom
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
Ka	Homolog Olmayan Değişim Oranı
Ks	Homolog Değişim Oranı
miRNA	Mikro RNA
Mb	Megabaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pI	İzoelektrik nokta
pH	Hidrojen Kuvveti
RNA	Ribonükleik asit
RNA-seq	RNA-sekanslama
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOS	Stres Sinyal Yolu
Tm	Erime sıcaklığı
qPCR	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Türkiye ve önemli üretici ülkelerin 2017-2021 yılları arasındaki ortalama üretim ve ekim alanları	5
Şekil 2.2 Tuz stresine karşı iki fazlı büyüme tepkisi modeli	8
Şekil 2.3 Tuzluluk seviyelerinin zamana göre çimlenme yüzdesi	9
Şekil 2.4 SOS yolağının tuz stresine yanıt modeli	13
Şekil 2.5 Ca^{+2} -CaM-Hedef protein etkileşimi.....	19
Şekil 4.1 PvIQD proteinlerinin IQ-67 alanının çoklu dizi hizalaması	34
Şekil 4.2 <i>A.thaliana</i> (AtIQD), <i>O.sativa</i> (OsIQD) ve <i>P.vulgaris</i> (PvIQD) IQD proteinlerinin filogenetik analizi.....	35
Şekil 4.3 <i>PvIQD</i> genlerinin filogenetik ilişkileri, korunmuş motif yapısı ve ekzon - intron modeli.....	37
Şekil 4.4 <i>PvIQD</i> genlerinin kromozomal dağılımı.	38
Şekil 4.5 Circos diagramı.....	39
Şekil 4.6 Türler arası sinteni haritaları	41
Şekil 4.7 <i>PvIQD</i> genlerini hedefleyen miRNA'ların ağ gösterimi	46
Şekil 4.8 <i>PvIQD</i> genlerinde bulunan stres ilgili cis elementler ve sayıları.....	49
Şekil 4.9 <i>PvIQD</i> genlerinde bulunan hormon ilgili cis elementler ve sayıları	49
Şekil 4.10 <i>PvIQD</i> genlerinde bulunan gelişim/büyüme ilgili cis elementler ve sayıları	50
Şekil 4.11 <i>PvIQD</i> genlerinde bulunan ışık ilgili cis elementler ve sayıları	50
Şekil 4.12 <i>PvIQD</i> genlerinin farklı dokulardaki ekspresyon profilleri.....	53
Şekil 4.13 <i>PvIQD</i> genlerinin RNA-seq verilerinden elde edilen ekspresyon profilleri	54
Şekil 4.14 <i>PvIQD</i> genlerinin yaprak dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ve ****p<0.0001, ns = istatistiksel olarak anlamsız)	59
Şekil 4.15 <i>PvIQD</i> genlerinin gövde dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ve ****p<0.0001, ns = istatistiksel olarak anlamsız)	61
Şekil 4.16 <i>PvIQD</i> genlerinin kök dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ve ****p<0.0001, ns = istatistiksel olarak anlamsız)..	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Fasulye bitkisinin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 3.1 cDNA sentezi reaksiyon profili.....	27
Çizelge 3.2 Primerler ve özellikleri	28
Çizelge 3.3 Reaksiyon bileşenleri ve miktarları	29
Çizelge 3.4 Reaksiyon profili.....	30
Çizelge 4.1 <i>PvIQD</i> genlerinin kataloğu	32
Çizelge 4.2 Korunmuş motiflerin özellikleri	36
Çizelge 4.3 <i>PvIQD</i> genlerinin Ka/Ks sonucu (NaN = Sonuç yok).....	40
Çizelge 4.4 Fasulye ve Arabidopsis arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks sonucu (NaN = Sonuç yok).....	42
Çizelge 4.5 Fasulye ve soya fasulyesi arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks oranı (NaN = Sonuç yok).....	43
Çizelge 4.6 Fasulye ve pirinç arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks sonucu (NaN = Sonuç yok).....	45
Çizelge 4.7 miRNA-hedef gen tahmin verileri	47
Çizelge 4.8 <i>PvIQD</i> proteinlerinin hücre altı lokalizasyon tahmini	51
Çizelge 4.9 Tuz stresi ve kontrol grubu içeren RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri.....	55
Çizelge 4.10 Tuz stresi ve kontrol grubu içeren cDNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri.....	56

1. GİRİŞ

Bitkiler, sesil yapıları nedeniyle, büyüme ve gelişmeyi sınırlayan çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadır (Atkinson & Urwin, 2012). Hayatta kalmaları, stres koşullarını algılama ve yanıt verme yeteneklerine bağlıdır. Bu nedenle bitkiler, stres algısı ile başlayan ve hücresel tepki ile sonuçlanan sinyal iletim yolları geliştirmiştir. Kalsiyum, sinyal iletiminde stres koşullarına karşı tepkilerin düzenlenmesini aracılık eden önemli bir ikinci habercidir (Reddy vd., 2011). Ca^{2+} konsantrasyonundaki geçici ve ani artışlar, uyarana özgü Ca^{2+} imzaları olarak temsil edilen hücre içi Ca^{2+} sinyalleri tarafından sağlanır. Ca^{2+} konsantrasyonunda meydana gelen hücre içi değişiklikler, Ca^{2+} sensörleri olarak bilinen Ca^{2+} -bağlayıcı proteinler tarafından algılanır. Ca^{2+} sensörlerinin çoğu, Ca^{2+} bağlayan sarmal-döngü-sarmal EF-el motiflerine sahiptir. Ca^{2+} sensörlerine Ca^{2+} bağlandığında aşağı akıştaki hedef moleküller ile etkileşimi sağlayan konformasyonel değişiklikler gerçekleşir (Hashimoto & Kudla, 2011; Reddy vd., 2011; Tuteja & Mahajan, 2007).

Kalmodulin (CaM), tüm ökaryotlarda bulunan, küçük bir asidik Ca^{2+} sensörüdür. Ca^{2+} iyonlarının bağlanması için her biri iki EF-eli içeren ve esnek bir sarmal bölge ile bağlanan iki küresel alandan oluşur. Ca^{2+} bağlanması gerçekleştikten sonra CaM, konformasyonel değişikliğe uğrayarak hedef proteinler ile etkileşime izin verir (T. Yang & Poovaiah, 2003). Metabolik enzimler, kinazlar ve fosfatazlar, transkripsiyon faktörleri, kanallar ve pompalar, hücre iskeleti proteinleri ve bilinmeyen fonksiyonlara sahip proteinler gibi çeşitli rollere sahip CaM-bağlayıcı proteinler (CaMPB'ler), bitkilerde CaM hedefleri olarak bilinir (DeFalco vd., 2010).

IQD proteinleri, bitki gelişim ve büyümesinde, stres yanıtında rol oynayan bitkiye özgü CaM-bağlayıcı proteinlerin geniş bir sınıfıdır (C. Guo vd., 2021). IQD proteinlerinin ayırt edici özelliği, CaM-bağlanma alanlarını içeren 67 amino asitlik (IQ67-alanı) korunmuş merkezi bölgenin varlığıdır. IQ67-alanı, IQ, 1-5-10 ve 1-8-14 motiflerinin benzersiz tekrarlayan bir düzenlenmesini içerir. IQD proteinleri ilk olarak *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* bitkilerinde kapsamlı bir şekilde tanımlandıktan sonra yaygın bir çalışma konusu haline gelmiştir (Abel vd., 2005).

Fasulye, dünya çapında ekonomik ve besinsel değeri olan önemli bir baklagildir. İnsanların doğrudan tüketiminde temel bir protein kaynağı olmasının yanında karbonhidrat, mikro besinler ve fenolik bileşikler de içermektedir. Zengin besin içeriğine ek olarak, insan sağlığına ve tarımsal sürdürülebilirliğe katkı sağlamaktadır (Hayat vd., 2014; Messina, 2014). Sağladığı yararlar ve artan nüfus ile ortaya çıkacak gıda talebi düşünüldüğünde fasulye üretimi ve tüketimi dünya çapında ön plana çıkmaktadır.

Fasulye, üretimini kısıtlayan abiyotik ve biyotik streslere maruz kalmaktadır (Diaz vd., 2018). Tuz stresi, fasulyenin verimini azaltan temel abiyotik streslerden birisidir (Taïbi vd., 2016). Ayrıca, kuraklık, ağır metaller, soğuk ve radyasyon gibi diğer abiyotik stresler de fasulye verimini olumsuz açıdan etkilemektedir. Haşere, yabani otlar ve hastalıklar da fasulye verimini azaltan biyotik streslerdir (Anzano vd., 2021). İklim değişikliği ile beraber stres koşullarının şiddeti ve sıklığı daha fazla görülmektedir (Zandalinas vd., 2022). Bu nedenle, omiks teknolojilerin sağladığı imkanlar aracılığıyla fonksiyonel genlerin tanımlanması ve stres koşullarına verdikleri tepkilerin açığa çıkarılması önemli bir konu haline gelmiştir (Gupta vd., 2013).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, fasulyede *IQD* gen ailesi üyelerinin biyoinformatik araçlar kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu, tuz stresi tedavisi ile bağlantılı genlerin *in siliko* ifade profilleri ve iki farklı fasulye çeşidinin tuz stresi karşısında mRNA ifade düzeylerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, *PvIQD* genlerinin tuz stresine karşı yanıt mekanizmasındaki rolleri, RNA-seq ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Son olarak, bulguların gelecekte *IQD* gen ailesi üzerine yapılacak araştırmalara referans olacağı tahmin edilmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fasulye dünya çapında ekimi yapılabilen, diploid yıllık bir bitki türüdür (De Ron vd., 2015). Baklagiller ailesinde yer alan fasulyenin genom boyutu ~587 Mb'dir. Dizileme teknolojilerinin gelişmesi ile beraber 2014 yılında fasulye genomunun %80'inin sekansını bildirilmiştir. 4,491 alternatif transkript dahil olmak üzere 27,197 protein kodlayan lokus içerdiği bildirilirken yapılacak transkriptom çalışmaları ile artması beklenmektedir. Ek olarak, fasulye genomunun %45,42 oranında transpozon element içerdiği, bunun %39,36'sının retrotranspozonlar (Sınıf I transpozonlar) ve %5,50'sinin DNA transpozonları (Sınıf II transpozonlar) olduğu tespit edilmiştir (Schmutz vd., 2014).

2.1.1 Tarihçesi

Phaseolus cinsine ait türlerin büyük bölümünün Orta Amerika kökenli olduğu ve yaklaşık 4 ila 6 milyon yıl önce ortaya çıktığı düşünülmektedir (Bellucci vd., 2014). Yabani tip fasulye, kuzey Meksika'dan kuzeybatı Arjantin'e kadar geniş bir alana dağılmıştır. Coğrafi olarak izole edilmiş ve genetik olarak farklılaştırılmış başlıca iki gen havuzu ile karakterize edilmektedir: Andean ve Mesoamerican. Fasulye yaklaşık 8000 yıl önce Meksika'da, bu gen havuzlarından bağımsız bir şekilde evcilleştirilmiştir (Bitocchi vd., 2012; Cichy vd., 2015). Avrupalı koloniler tarafından Avrupa ve diğer kıtalara götürüldüğü düşünülmektedir (Gepts & Bliss, 1988). Ayrıca, 1980'li yıllarda Ekvador-Peru bölgesindeki popülasyonlarda görülen ve diğer gen havuzlarında bulunmayan, yeni özgün phaseolin tip I üçüncü gen havuzunu temsil etmektedir (Bellucci vd., 2014; Bitocchi vd., 2012).

2.1.2 Sınıflandırması

Freytag ve Debouck (2002) fasulye türlerinin taksonomisi, dağılımı ve ekolojisini detaylı bir şekilde tanımlamıştır. Fasulye Fabaceae familyasının Papilionoideae alt familyasından

Phaseolus cinsine ait bir bitki türüdür. *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus* ve *P. vulgaris* ekimi yapılan beş önemli fasulye türüdür.

Çizelge 2.1 Fasulye bitkisinin sınıflandırılması

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

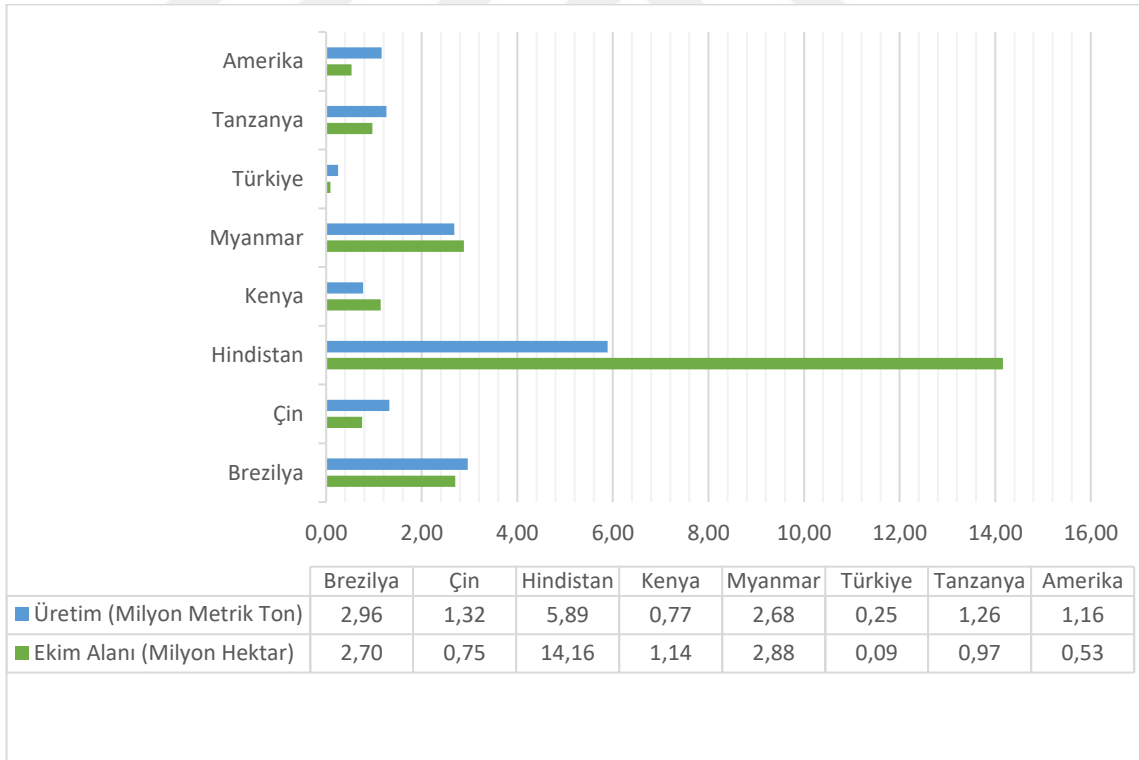
2.1.3 Besin, sağlık ve doğa açısından önemi

Fasulye, zengin besin içeriği ile insanların doğrudan tüketimi için temel bir gıda kaynağıdır. Dünyanın çeşitli bölgelerinde diyet protein kaynağını temsil etmesine ek olarak kompleks karbonhidrat, lif, vitaminler ve mineraller de sağlamaktadır. Ayrıca, fasulyenin içerdiği biyoaktif bileşikler anti-oksidant ve anti-mutajenik aktivite de önemli roller üstlenmektedir. Fasulye tüketimi, besinsel öneminin yanında kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde sağlığa faydalıdır (Hayat vd., 2014; Messina, 2014). Fasulye bitkisinin de içinde bulunduğu baklagiller, rhizobia bakterileriyle simbiyotik ilişki kurarak atmosferik nitrojeni sabitleyebilme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri hem mahsul verimi hem de sürdürülebilir toprak verimliliği açısından önemlidir (Uebersax vd., 2023).

2.1.4 Dünya ve Türkiye’de üretimi

Fasulye, dünyada yerfıstığı ve soya fasulyesinden sonra üretimi yapılan en önemli baklagil mahsulüdür. Kuru ve yeşil fasulye olmak üzere iki ana formu bulunmaktadır

ancak ağırlıklı olarak kuru fasulye formunda üretilmekte ve tüketilmektedir (De Ron vd., 2015). FAO 2021 verilerine göre, kuru fasulyenin ekim alanı dünya çapında 35 milyon 920 bin 593 hektar iken üretimi 27 milyon 715 bin 23 ton, tane verimi ise 7716 hg/ha'dır. Yeşil fasulyede ise 1 milyon 586 bin 86 hektar alanda 23 milyon 411 bin 172 ton üretim ve 147603 hg/ha tane verimi elde edilmiştir. Kıtalar arasında ekim alanı, üretim ve tane verimi açısından karşılaştırıldığında en geniş ekim alanı ve üretim Asya kıtasında iken en yüksek tane verimi Okyanusya kıtasında görülmektedir. En düşük ekim alanı ve üretim Okyanusya kıtasında iken en az tane verimi ise Asya kıtasında görülmektedir. Son 5 yıllık FAO verilerine göre ekim alanı ve üretiminde Hindistan ilk sırada yer alırken Brezilya, Myanmar, Tanzanya, Çin, Meksika, Amerika ve Kenya ilk 10 üretici ülke içerisinde sürekli yer edinmiştir. Türkiye'de ise 2021 yılında 107 bin 723 hektar alanda 305 bin ton üretim ve 28313 hg/ha tane verimi elde edilmiştir. Ülkemiz, son 5 yıllık FAO verileri baz alındığında sadece 2021 ve 2020 yıllarında ilk 20 üretici ülke arasına girebilmiştir (Anonymous, 2023).



Şekil 2.1 Türkiye ve önemli üretici ülkelerin 2017-2021 yılları arasındaki ortalama üretim ve ekim alanları

2.1.5 İklim istekleri

Fasulye, dünyada yaygın olarak yetiştirilen ılıman iklim bitkisidir. Tohumların çimlenmesi epigealdir ve çimlenme için ortalama sıcaklık aralığı 18–22 °C'dir. Sıcaklığın 10 °C'den az ve 35 °C'den fazla olduğu durumlarda çimlenme olumsuz yönde etkilenir. Stres faktörlerinin yer almadığı ideal nem ve sıcaklıkta çimlenmeden tohum olgunluğuna kadar olan büyüme süreci 70 ila 120 günde tamamlanır. Yetiştirildiği bölgenin coğrafik özelliklerine göre bu süreç uzayabilir. Hafif tınlı, pH seviyesi 7 ve organik maddelerce zengin topraklarda yetiştirilmesi daha verimli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (Graham & Ranalli, 1997; Miklas & Singh, 2007).

2.2 Bitkilerde Stres

Canlılar, yaşamları süresince bulundukları çevre ile iletişim halindedir. Sürekli değişim halinde olan çevresel koşullar, organizmaları etkilemektedir. Hareket yetenekleri kısıtlı olan bitkiler ise çevresel koşullara direkt maruz kalmaktadır (Büyük vd., 2012). Çevresel koşulların bitki büyüme ve gelişimlerini olumsuz yönde etkileyerek mahsul verimi, kalite ve canlılık kaybına yol açması stres olarak tanımlanır. Bitkilerde stresin fizyolojik ve metabolik etkileri homeostazı değiştirir (Anzano vd., 2021; Atkinson & Urwin, 2012).

Bitkilerde stres, abiyotik ve biyotik stres olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Patojen enfeksiyonu (bakteri, virüs, böcekler, mantar) ve otçulların saldırıları gibi koşullar biyotik stres altında incelenmektedir. Kuraklık, tuzluluk, sel, sıcaklık, soğuk, ağır metal ve besin eksikliği gibi yaşamsal olmayan koşullar ise abiyotik stres altında incelenmektedir (Anzano vd., 2021; Büyük vd., 2012; J.-K. Zhu, 2016).

İklim değişikliği dünyamızda yıkıcı etkilere sebep olmaktadır. Bitkiler açısından ise ciddi anlamda büyüme ve gelişmeyi sınırlamaktadır. Yağış yoğunluğu, yüksek sıcaklık, kuraklık, CO₂ konsantrasyonu ve patojenlerin artmasına neden olan ısı dalgaları gibi dalgalanmalara neden olarak çevresel koşulları etkilemektedir. Bunun sonucunda bitkiler üzerinde eş zamanlı çoklu stres kombinasyonları ortaya çıkmaktadır (Ahmad vd., 2019;

Zandalinas vd., 2022). Değişen iklim koşulları ile birlikte kuraklık ve tuz stresi bitki gelişimini kısıtlayan iki ana abiyotik stres olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3 Tuz Stresi

Dünya nüfusunun giderek artması gıda talebini de artırmaktadır. Gıda ihtiyacının karşılanması için ekilebilir alanların artırılması ve mahsulden yüksek verim elde edilmesi gerekmektedir. Tuz stresi, bitki gelişimini sınırlayarak mahsul verimini azaltan en yıkıcı etkilere sahip abiyotik streslerden biridir. Su kaynağı sınırlı olan dünyamızda küresel iklim değişikliğinin etkisiyle beraber tuz stresinin şiddeti artmaktadır. Toprak tuzluluğu dünyanın çeşitli bölgelerinde görülmekle beraber kurak ve yarı-kurak bölgelerde yaygın şekilde görülmektedir. Toprak çözeltisinin elektrik iletkenliği (EC) 4 dS/m^{-1} ve üzerinde olduğunda toprak tuzlu kabul edilmektedir (Hao vd., 2021; Osman, 2018).

Tuzluluğun ortaya çıkmasının nedenleri birincil (doğal tuzluluk) ve ikincil (insan-kaynaklı tuzluluk) tuzluluk olarak sınıflandırılmıştır. Birincil tuzluluk, tuzların doğal süreçlerle uzun süreler birikmesinden kaynaklanmaktadır. Kayalar gibi çözünür tuzlar içeren materyallerin ayrışması sonucunda sodyum, kalsiyum, magnezyum klorürleri ve daha az ölçüde sülfatlar ve karbonatlar serbest bırakılır. Rüzgar yardımıyla savrulan okyanus tuzu, engellenmiş drenaj ve sık tuzlu yeraltı sularının kappiler yükselmesi, meydana gelen tuzluluğun diğer nedenleridir. İkincil tuzluluk ise insan etkinliklerinden kaynaklanmaktadır. En sık görülen nedenler doğal bitki örtüsünün değiştirilmesi, yetersiz drenaj sistemi ile sulama, aşırı gübre kullanımı ve tuzlu su kaynaklarının kullanılmasıdır (Parihar vd., 2015; Rasool vd., 2013).

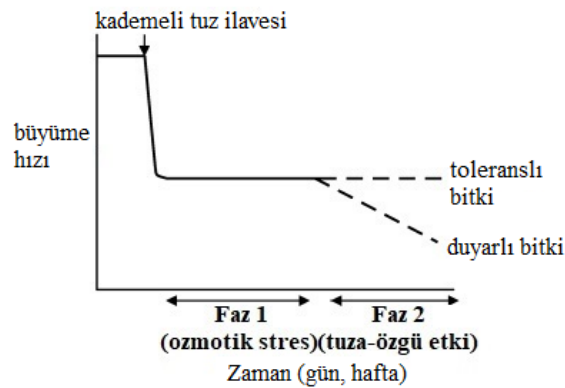
Tuz stresine maruz kalan bitkilerin karşılaştıkları toprak tipleri farklı olabilmektedir. Tuzlu topraklar, tuzlu-sodali topraklar ve sodali topraklar olarak çeşitleri bulunmaktadır (Osman, 2018). Tuzlu topraklarda sodyum, kalsiyum, magnezyum ve potasyumun klorür ve sülfatlarından oluşan nötr tuzlar baskın iken sodali topraklarda sodyum, kalsiyum ve magnezyumun karbonat ve bikarbonatları baskındır. Tuzlu-sodali topraklarda ise hem karbonat ve bikarbonat hem de klorür ve sülfatların iyonları bulunmaktadır. Tuzlu ve

tuzlu-sodali topraklarda $\text{pH} < 8.5$ iken sodali topraklarda $\text{pH} > 8.5$ 'dir (Osman, 2018; Rasool vd., 2013).

Bitkiler tuzlu ortamlarda büyüebilme yeteneklerine göre ayrılmaktadır. Glikofitler, tuz stresine karşı duyarlı olan bitkiler iken halofitler, yüksek tuz konsantrasyonuna sahip topraklarda büyüyerek yaşamlarını sürdürebilir. (Doğru & Canavar, 2020). Halofitler, tuz stresine karşı adaptasyon mekanizmalarının bazılarını glikofitler ile paylaşmaktadır (Van Zelm vd., 2020). Bitkilerde görülen bu stres tolerans mekanizmaları, omiks teknolojiler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Hao vd., 2021).

2.4 Tuz Stresinin Bitkiler Üzerine Etkileri

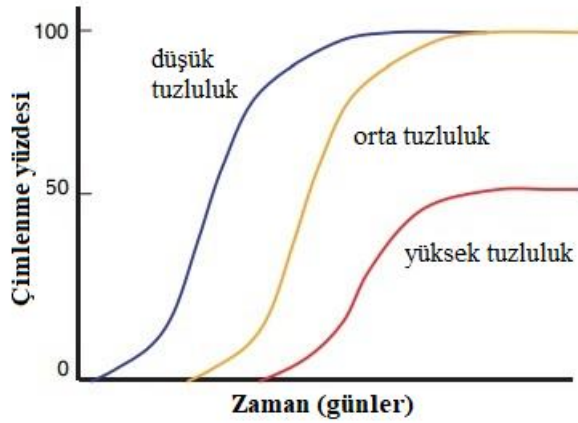
Bitkiler, tuz stresine maruz kaldığında büyüme ve gelişim azalmaktadır. Munns (2005) tarafından bitkilerin tuz stresine karşı büyüme yanıtı 'iki fazlı etki' olarak ifade edilmiştir. İlk olarak tuzluluk, bitkinin su alımını kısıtlayarak daha yavaş büyümeye sebep olur. Bu ozmotik veya su eksikliği etkisidir. İkinci olarak transpirasyon akımına Na^+ iyonlarının girmesi yapraklardaki hücrelere verilen zararı artırarak büyümeyi daha da azaltabilir. Bu, tuzluluğun tuza-özümlü veya fazla iyon etkisidir (Munns, 2005) (Şekil 2.2). Çimlenme, oksidatif stres, fotosentez, su ilişkileri, fide büyümesi, iyon toksisitesi ve verim gibi önemli süreçler tuz stresinden etkilenmektedir (Parihar vd., 2015).



Şekil 2.2 Tuz stresine karşı iki fazlı büyüme tepkisi modeli (Munns, 2005)

2.4.1 Çimlenme

Çimlenme, bitki büyümesi için temel ve hassas aşamalarından biridir. Tuz stresinin şiddeti ve süresine bağlı olarak çimlenme oranı, kök uzaması ve su emilimi gibi fizyolojik süreçleri olumsuz açıdan etkilemektedir (Shahzad vd., 2019). Bybordi (2010), kanola bitkisi ile yaptığı çalışmada 150 ve 200 mM tuz konsantrasyonlarında çimlenme yüzdesinin azaldığını bildirmiştir. Khodarahmpour vd. (2012) tarafından mısır üzerine yapılan başka bir çalışmada farklı tuz konsantrasyonlarında çimlenme yüzdesi ve çimlenme oranının azaldığı tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde Lin vd. (2012) tarafından buğday üzerine yapılan araştırmada çimlenme oranı ve yüzdesinin tuzluluk artıkça azaldığı ifade edilmiştir.



Şekil 2.3 Tuzluluk seviyelerinin zamana göre çimlenme yüzdesi (Läuchli & Grattan, 2007)

2.4.2 Fide gelişimi/büyümesi

Bitkinin canlılığını devam ettirebilmesi için tuz stresi altında fide gelişimi önemlidir. Tuzluluk, biyokütle birikimini azaltarak bodur bir büyümeye yol açabilmektedir ve en önemli etkilerinden birisi yaprak alanı genişlemesini sınırlamasıdır (Shahzad vd., 2019; Yıldız vd., 2020). Jamil vd. (2007) şeker pancarı ve lahana ile yaptığı çalışmada tuz stresinin yaprak genişlemesi, yaprak sayısı, kök ve sürgün kuru ağırlığını azalttığı

bildirilmiştir. Shahbaz vd. (2008) tarafından buğday ile yapılan çalışmada ise tuz stresinin kuru ve taze ağırlığı, yaprak alanı, sürgün uzunluğu ve verimi azalttığı belirlenmiştir.

2.4.3 Fotosentez

Fotosentez, bitkilerin madde ve enerji kaynağı olan en önemli biyokimyasal yollardan birisidir. Fotosentezin azalması veya inhibisyonu tuz stresinin ana etkisidir. Aynı zamanda fotosentetik pigmentler, membran lipitleri ve tilakoid membran proteinleri gibi fotosentetik yapılar da tuz stresinden etkilenmektedir. Tuz stresi, fotosentezi stomaya bağlı ve stomadan bağımsız olarak azaltır. Bitkilerin stomalarını sınırlayarak veya kapatarak CO₂ konsantrasyon seviyesini azaltması stomaya bağlı gerçekleşir. İkinci olarak fotosentetik pigmentlerin bozulması, elektron taşınımının değişmesi ve membran sisteminin zarar görmesi gibi kısıtlamalar stomadan bağımsız gerçekleşmektedir (Hao vd., 2021; Shahzad vd., 2019). Hichem vd. (2009) tarafından mısır ile yapılan çalışmada tuz stresinin stoma iletkenliği, klorofil içeriği ve fotosistem II etkinliği gibi parametreleri azaltarak fotosentezi etkilediği bildirilmiştir. Kwon vd. (2019) tarafından karanfil bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada tuz konsantrasyonunun artması ile net fotosentezin kontrole kıyasla azaldığını belirtmiştir. Aynı zamanda stoma iletkenliği, hücre içi CO₂ konsantrasyonu ve transpirasyonun önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

2.4.4 Su ilişkileri

Tuz stresi, toprak ozmotik potansiyelini artırarak bitkinin su ve mineral alımını engeller. Bu durum bitki hücrelerinin su içeriğini azaltarak bitki büyümesine zarar vermektedir. Su potansiyeli ve ozmotik potansiyel tuz stresine karşı ters orantı gösterir. Tuz stresinin artışı ozmotik ve su potansiyelini azaltırken turgor basıncının artmasına neden olur (Parida & Das, 2005; Yıldız vd., 2020). Bağlı su içeriği, transpirasyon oranı, yaprak su potansiyeli ve stoma direnci bitki-su ilişkilerinde yer edinen temel özelliklerdir. Tuz stresi altında bu özellikler olumsuz etkilenmektedir (Farooq vd., 2010). Romero-Aranda vd. (2001) tarafından domates ile yapılan çalışmada ozmotik ve yaprak su potansiyelinin azaldığı, turgor basıncının ise arttığı bildirilmiştir. Tuz stresinin transpirasyon oranı, stoma iletkenliği, yaprak su potansiyeli, stoma yoğunluğu ve bitki su alımı gibi parametreleri

değiştirerek bitki büyümesi ve fotosentetik aktivite üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Romero-Aranda vd., 2001).

2.4.5 İyon toksisitesi

Sodyum (Na^+) ve/veya klorür (Cl^-) iyonlarının toprakta aşırı derecede birikimi, bitkilerde iyon toksisitesine sebep olur. Bitkiler farklı iyonlara karşı farklı tepkiler oluşturabilirken fazla Na^+ iyonu bitkilerde besin dengesizliğine yol açar (Lin vd., 2012; Parida & Das, 2005). Na^+ iyonunun toksik etkisi Cl^- iyonuna göre daha hızlı ve erken görülmektedir. Yüksek Na^+ konsantrasyonun fotosentez ve büyüme üzerine zararlı etkileri bulunmaktadır. Soya fasulyesi ve asma gibi bitkilerde Na^+ iyonunun yanında Cl^- iyonunun daha toksik etkileri görülebilir. Cl^- iyonları da fotosentez ve diğer metabolik süreçler üzerinde zararlı olabilmektedir (Parihar vd., 2015; Yıldız vd., 2020).

2.4.6 Oksidatif stres

Tuz stresinin bir sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıdır. Normal şartlar altında ROS üretimi, antioksidan savunma sistemi ile denge halindeyken tuz stresinin etkisiyle redoks homeostazında değişiklikler meydana gelir (Ahmad vd., 2019). ROS reaktiftir ve moleküler oksijenden (O_2) türetilir. ROS'un başlıca çeşitleri süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) olmakla birlikte bitkilerde kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi organellerde üretilmektedir (Mushtaq vd., 2020). ROS ve antioksidan sistemi arasındaki denge ROS tarafına kaydığında hücre oksidatif stres altında demektir. ROS lipid peroksidasyonunu indükleyerek membran bütünlüğünü bozmasının yanı sıra biyomoleküllere zarar verecek lipid radikallerini de üretir. Proteinler, ROS'un sebep olduğu dolaylı ya da doğrudan modifikasyonlar geçirir. ROS kaynaklı zincir kırıkları, baz modifikasyonları ve delesyon gibi değişiklikler DNA'da farklı mutasyonlar meydana getirebilir. Sonuç olarak ROS proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere zarar vererek bitki büyüme ve gelişimini sınırlar (Ahmad vd., 2019; Mushtaq vd., 2020).

2.5 Tuz Stresi Tolerans Mekanizmaları

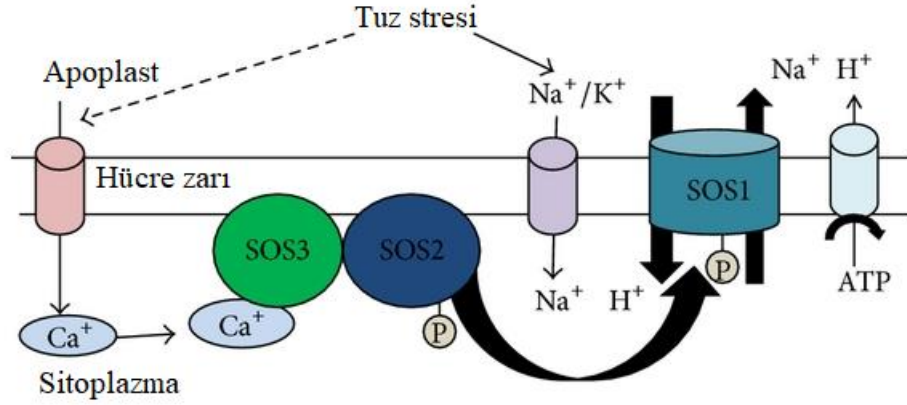
Bitkiler tuz stresi altında yaşamlarını sürdürebilmek için çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar geliştirmiştir. İyon homeostazı, ozmotik düzenleme, antioksidan savunma sistemi ve fitohormonlar tuz stresine karşı temel mekanizmalar arasında yer almaktadır (Gupta & Huang, 2014).

2.5.1 İyon homeostazı

Tuz stresi altında iyon homeostazının sürdürülmesi hayati bir önem taşımaktadır. Na^+ iyonlarının aşırı birikimi iyon toksisitesine sebep olmaktadır (J.-K. Zhu, 2003). Sitozolik K^+ iyonlarının muhafazası tuzluluğun tolere edilmesinde belirleyici bir rol oynamaktadır. K^+/Na^+ oranı tuz stresine toleransın bir ifadesidir. Na^+/H^+ antiporter yüksek K^+/Na^+ oranının sağlanması için gereklidir (Liang vd., 2018).

Na^+/H^+ antiporter bitki tuz toleransı açısından önemli etkileri bulunmaktadır. Na^+ iyonları sitoplazmaya girdiğinde Na^+/H^+ antiporter vasıtasıyla vakuole taşınır. Vakuolar tip H^+ -ATPase (V-ATPase) ve vakuolar pirofosfataz (V-PPase) olmak üzere iki çeşit H^+ pompası bulunur. Bitki hücrelerinde en fazla V-ATPase görülmekle beraber stres koşullarında ki aktivitesi bitki canlılığı açısından kritiktir (Gupta & Huang, 2014).

Tuza aşırı duyarlı stres sinyal yolu (SOS) iyon homeostazını düzenleme de anahtar rol oynar. SOS1, SOS2 ve SOS3 olmak üzere üç ana proteinden oluşur. SOS1, Na^+/H^+ antiporter kodlayarak hücrel Na^+ akışını düzenleme görevini yürütmektedir. SOS1 geninin aşırı ekspresyonu bitkilerde tuzluluğa tolerans sağlamaktadır. SOS2, bir serin/treonin kinazı kodlar ve tuz stresi etkisiyle oluşan Ca^{+2} sinyalleri ile aktive edilir. SOS3 ise Ca^{+2} bağlayıcı bir proteindir. Na^+ konsantrasyonunun artması SOS3'ün Ca^{+2} aracılı etkileşimini sağlar. SOS3'ün SOS2 ile aktivasyonu gerçekleşir. SOS3-SOS2 kompleksi SOS1'i fosforile eder ve SOS1 Na^+ iyonlarını hücre dışına aktarır (Ji vd., 2013; Mahajan vd., 2008; Türkan & Demiral, 2009).



Şekil 2.4 SOS yolağının tuz stresine yanıt modeli (Gupta & Huang, 2014)

K^+ alımını sürdürmek için HKT ve NHX gibi genler K^+ taşıyıcıları ve kanallarını kodlar. HKT ailesi, Na^+ ve K^+ akışını düzenleyerek bitkinin tuz toleransı yeteneğine fayda sağlar (Munns & Tester, 2008). NHX (Na , K^+/H^+) antiporterlerinin pH ve iyon homeostazını sürdürmesinin yanında tuz stresine karşı tolerans gösterir (Assaha vd., 2017).

2.5.2 Ozmotik düzenleme

Ozmotik düzenleme, çözünen madde konsantrasyonunu artırarak hücre turgorunun korunmasına olanak sağlayan tolerans mekanizmasıdır (Liang vd., 2018). Ozmolitler olarak da bilinen uyumlu çözünen organik maddeler şekerler (fruktoz, glikoz, sükroz), şeker alkoller (mannitol, sorbitol), amino asitler (prolin) ve kuaterner amonyum bileşikler (glycine betaine) içermektedir. Stres altında hücrelerdeki ozmolit madde artışı bitkinin metabolik fonksiyonlarının sürdürülmesi açısından kilit bir rol oynamaktadır (Büyük vd., 2012; Sanders & Arndt, 2012).

Bitkiler, tuz stresine cevap olarak prolin biyosentezini aktive ederek prolin birikimini artırmaktadır. Prolin birikimi membran stabilizasyonu, antioksidan ve fotosentetik aktiviteyi geliştirerek tuz stres toleransını artırabilir (Ashraf & Foolad, 2007; Munns & Tester, 2008). Ayrıca, nitrojen ve karbon içeriği bitkilerin stresten kurtulmasını sağlayabilir (Hao vd., 2021).

Glisin betain, amfoterik kuaterner amonyum bileşiği olan bir ozmotik düzenleyicidir. Kloroplastlarda bol miktarda bulunan glisin betain, tilakoid zar bütünlüğün korunmasında ve fotosentetik aktivitenin sürdürülmesinde rol oynamaktadır (Ashraf & Foolad, 2007). Tuz stresi altında bitkiler de sentezlenmektedir ve ozmotik dengeyi sağlayarak tuz stresine karşı tolerans sağlamaktadır (Yilmaz vd., 2011).

Şekerler ve şeker alkolleri de stres karşısında yanıt oluşturmaktadır. Şeker alkolleri antioksidan yetenekleri aracılığıyla tuzluluk ve diğer streslere karşı yanıt verir (Williamson vd., 2002). Stres altında meydana gelen çözünür şekerlerin artışı, bitki toleransını artırabilmektedir. Ozmotik dengeleme, karbon depolama ve oksijen radikallerin temizlenmesi işlevlerini gerçekleştirerek bitki stres hasarını azaltmaktadır (Yilmaz vd., 2011).

2.5.3 Antioksidan savunma sistemi

Stres altında artan reaktif oksijen türleri, bitkilere zarar vermektedir. Bitkiler oksidatif hasarın etkilerinden korunmak ve kurtulmak için çeşitli antioksidanlara sahiptir (Biswas vd., 2020). Antioksidanlar, farklı hücresel lokalizasyonlarda bulunur ve reaktif oksijen türlerinin temizlenmesini sağlar. Enzimatik antioksidanlar ve enzimatik-olmayan antioksidanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimatik antioksidanlar iken askorbik asit, karotenoidler, tokoferoller, glutatyon ve fenolik bileşikler enzimatik-olmayan antioksidanlardır (Hasanuzzaman vd., 2020).

SOD, ROS'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olarak bilinmektedir (Alscher vd., 2002). SOD, süperoksit radikalini moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürerek toksisitesini hafifletir. Kofaktör olarak gereken metal iyonları, SOD aktivitesi için gereklidir. Metal iyonlarına bağlı olarak SOD, manganez SOD (Mn-SOD), demir SOD (Fe-SOD) ve bakır/çinko SOD (Cu/Zn-SOD) olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Alscher vd., 2002; Ighodaro & Akinloye, 2018; Stephenie vd., 2020). SOD aktivitesinde meydana gelen artış bitkilerin maruz kaldığı stresleri tolere etme kabiliyetini artırır (Parida & Das, 2005; Yilmaz vd., 2011).

CAT, H_2O_2 'yi enerji verimli bir şekilde H_2O ve O_2 'ye indirgenmesini katalize eder. Peroksizom ve glioksizom başta olmak üzere kloroplast, mitokondri ve sitozol bölgelerinde H_2O_2 üretimini temizler (Rajput vd., 2021). CAT aktivitesinin seviyesi stresin türü, şiddeti ve süresine bağlı olarak değişmektedir (Ahmad vd., 2019). Bitkilerde yüksek CAT aktivitesinin olması, H_2O_2 'den kaynaklanan oksidatif hasarın etkilerini hafifletmektedir (Hasanuzzaman vd., 2020).

APX, H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır. CAT'dan farklı olarak H_2O_2 'nin katalizlenmesi için indirgeyici madde olarak Askorbat-Glutatyon (AsA-GSH) döngüsünü yenileyen Askorbik asit (AsA) kullanır (Mushtaq vd., 2020). Yüksek bitkilerde amino asit sekans farklılıklarına dayalı olarak, sitosolik (cAPX), mitokondriyal (mitAPX), kloroplastik (chlAPX: stromal-APX ve tilakoidal-APX) ve peroksizomal/ glioksizomal (mAPX) olmak üzere beş farklı APX izoenzimi bulunmaktadır. Stres koşulları altında APX, bitkilere farklı seviyelerde tolerans sağlamaktadır (Pandey vd., 2017).

GPX, H_2O_2 'yi H_2O 'ya ve lipid peroksitleri alkole, glutatyonun oksidasyonu ile birleştirilmiş reaksiyonda indirgemektedir. Bitkilerde GPX, tiyol (-SH) grubu içermekle beraber oksidatif hasarın etkilerini hafifletmek için elektron donörü olarak tioredoksin kullanır (Rajput vd., 2021). Bitkiler çeşitli streslere maruz kaldığında, GPX seviyelerinde meydana gelen artış koruyucu etki sağlamaktadır (Büyük vd., 2012).

2.5.4 Fitohormonlar

Fitohormonlar, bitki büyüme ve gelişim süreçlerinin düzenleyicileri olarak bilinir. Stres koşullarına karşı bitki tepkilerini modüle etme yetenekleri mevcuttur. Absisik asit (ABA), gen ekspresyonu düzenlemesi ve hücrel süreçlerin işlevlerini sağlayarak tuzluluk toleransını yoğunlaştıran stres hormonudur (Fahad vd., 2015). Oksinler, sitokininler, etilen, giberelinler, brassinosteroidler, jasmonatlar ve strigolaktonlar gibi diğer fitohormonlar da tuz stresine karşı bitkiye tolerans sağlayabilmektedir (Iqbal vd., 2014).

ABA, bitkinin hayatı boyunca büyüme ve gelişim aşamalarının düzenlenmesinde yer alır. Stres koşulları altında bitkinin canlılığını sürdürmesi için hareket eder (Fahad vd., 2015).

Bitki tuz stresine maruz kaldığında ABA birikimi indüklenir. Meydana gelen artış sonucunda duyarlı genlerin ekspresyonu tetiklenir ve koruyucu mekanizmalar aktive edilir (Iqbal vd., 2014). Sripinyowanich vd. (2013) tarafından indika pirinci üzerine yapılan çalışmada eksojen ABA'nın tuz toleransını indüklediği bildirilmiştir. *OsP5CS1* geninin ekspresyonu ile prolin birikiminin tetiklendiği ifade edilmiştir.

2.6 Abiyotik Stres Yanıtında Omiks Yaklaşımlar

Abiyotik stres, gelişim ve büyümeyi engellemesi ile bitkiler alemini tehdit etmektedir. Bitkilerde mahsul verimi ve kaliteyi düşüren ana sebeplerden birisidir. Bu nedenlerden dolayı bitkiler, stres koşulları ile mücadele edebilmek amacıyla çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmiştir (Qin vd., 2011). Uyarana özgü yanıt oluşturan bitkiler, çeşitli karmaşık sinyal ağlarını kullanmaktadır. Karmaşık sinyal ağlarını anlamak ve stres mekanizmasını keşfetmek, omiks çalışmalar ile daha hızlı gerçekleştirilebilir. Stres mekanizmasının aydınlatılmasının yanı sıra strese toleranslı bitki yetiştirmek için farklı yaklaşımlar sunar. Omiks yaklaşımlar genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik olmak üzere dört ana sınıfa dayanır (Gupta vd., 2013). Ayrıca, biyoinformatik ve hesaplamalı araçlar, omiks yaklaşımlardan elde edilen verilerin işlenmesi, depolanması, anlamlandırılması ve görselleştirilmesinde güçlü bir altyapı sunmaktadır. Yazılımlar, paketler, platformlar ve programlar bulunmasına ek olarak artan çalışmalar ile orantılı bir şekilde yeni biyoinformatik araçlar geliştirilmektedir (Mochida & Shinozaki, 2011).

2.6.1 Genomik

Gen yapılarını, dizilimlerini, birbirleriyle ve çevreyle olan etkileşimlerini araştıran genomik, bir organizmanın genomunun organizasyonunu ve işleyişini sunmaktadır (Raza vd., 2022). Yeni nesil dizileme teknolojilerin ortaya çıkması ile beraber genom sekansları hızlı bir şekilde serbest bırakılmıştır (Mochida & Shinozaki, 2011; Schmutz vd., 2010, 2014). Sekansların salınması, fonksiyonel genlerin tanımlanması ve karakterizasyonuna imkan sağlamıştır. Bu bağlamda, bitkilerde abiyotik stres yanıtında yer alan genler

tanımlanarak karakterize edilmiştir (Büyük vd., 2022; Filiz vd., 2013). Ayrıca, abiyotik strese karşı toleranslı bitki yetiştirme çalışmalarının önü açılmıştır (El-Esawi vd., 2019).

2.6.2 Transkriptomik

Transkriptomik, belirli bir gelişim dönemi veya fizyolojik koşullara karşılık gelen bir hücre, doku veya tüm organizmanın transkript setlerinin analizidir. Bitkilerde abiyotik stres ve gelişim dönemlerindeki gen ekspresyon değişikliklerini tespit etmek için güçlü bir yaklaşımdır (Y. Yang vd., 2021). Son yıllarda, bitki transkriptomik çalışmalarında yeni nesil dizileme tabanlı RNA-seq ve qPCR kullanılmaktadır. Stres ve kontrol bitkilerinin transkriptomları karşılaştırılarak stres yanıtında yer alan aday genler tespit edilmektedir (Mosa vd., 2017). Veri tabanlarında açık kaynaklı RNA-seq verileri, genom çapında analizlerin yapılmasına olanak sağlayarak abiyotik stres mekanizmasının aydınlatılmasında önemli rol oynamaktadır (Yu vd., 2022).

2.6.3 Proteomik

Proteomik, belirli bir doku, hücre veya organizmanın toplam eksprese edilen protein setinin analizini kapsamaktadır. Bitki çalışmalarında en yaygın ölçülen proteomlar, tüm proteom ve fosfoproteomdur (Mosa vd., 2017). Proteomik ölçümlerinde yaygın olarak çeşitli kütle spektrometresi yaklaşımları kullanılır. Kütle spektrometresi tabanlı teknolojiler, proteinin enzimatik sindiriminden kaynaklanan peptitlerin kütle ve yükünü ölçer. Yapısal proteomik ise hesaplamalı araçlar, nükleer manyetik rezonans, kristalizasyon, elektron mikroskobu ve protein kristallerinin X-ışını yöntemlerini kullanarak proteinlerin fonksiyonları ve etkileşimlerini aydınlatılmaktadır (Y. Yang vd., 2021). Proteomik, bitki stres toleransı ve yanıtında önemli bilgiler sağlamaktadır. Stres koşullarında eksprese edilen protein profillerinin açığa çıkarılması, stres mekanizmasının daha iyi anlaşılması açısından hayati bir rol oynamaktadır (Mosa vd., 2017).

2.6.4 Metabolomik

Metabolomik, küçük moleküller olarak bilinen metabolitlerin hücre, doku ve organizmalarda araştırılmasıdır. Hücrelerin içinde sürekli olarak birkaç reaksiyon meydana geldiğinden, metabolit konsantrasyonlarının oldukça dinamikler. Bu bağlamda, metabolitler hücrenin biyokimyasal aktivitesini ortaya çıkarır (Y. Yang vd., 2021). Metabolomik, bitki aleminde açısından kritik bir öneme sahiptir. Çünkü, bitkilerde yüksek oranda üretilen metabolitler, abiyotik stres yanıtında ve toleransında önemli işlevler sağlayabilir. Metabolik ağların tahmini, metabolitler hakkında anlayışımızı geliştirecektir (Chaudhary vd., 2019).

2.7 Kalsiyum/Kalmodulin Ağı

Bitkiler, hareket yetenekleri kısıtlı olmalarından dolayı sürekli çevresel stres koşullarına maruz kalmaktadır. Hayatta kalabilmeleri, stres koşullarını tolere edebilme yeteneklerine bağlıdır. Bitkiler, uyarınları algılamak ve yanıt oluşturmak için karmaşık sinyal iletim yolları geliştirmiştir. İkincil bir hücre içi haberci olan Ca^{2+} , bitkiler tarafından gelişimsel ve çevresel uyarınların yanıt mekanizmasında kullanılır (Ranty vd., 2016).

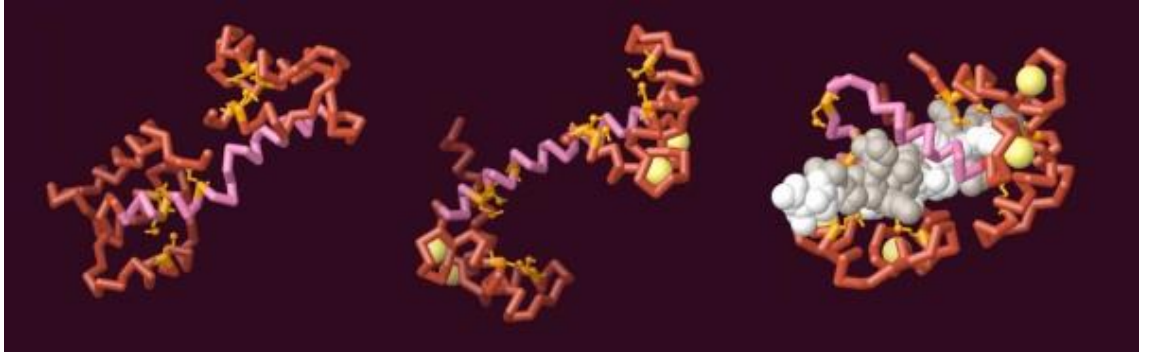
2.7.1 Ca^{2+} sinyali

Kalsiyum, abiyotik ve biyotik streslere karşı tepkilerin düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli gelişimsel süreçlerde rol oynayan önemli bir ikincil habercidir. Bitki tarafından algılanan abiyotik ve biyotik uyarınlar, sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunda ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) geçici ve ani artışlar meydana getirir (Ranty vd., 2006; P. Yuan vd., 2017). Meydana gelen Ca^{2+} konsantrasyonundaki zamansal ve mekansal değişiklikler, belirli bir uyarana özgü olup ' Ca^{2+} imzaları' olarak adlandırılır. Ca^{2+} imzaları, çeşitli zarlarda ve hücre organellerinde kanallar ve taşıyıcılar arasındaki yakından kontrol edilen etkileşimler tarafından üretilir. Ca^{2+} imzalarının algılanması ve çözülmesi, Ca^{2+} sensörleri olarak bilinen Ca^{2+} -bağlayıcı proteinler tarafından gerçekleşir (Batistič & Kudla, 2012; Hashimoto & Kudla, 2011; Perochon vd., 2011; Tuteja & Mahajan, 2007).

Ca^{2+} sensörlerinin büyük bir kısmı EF-el motifi olarak bilinen Ca^{2+} bağlayıcı sarmal-dönüş-sarmal yapısı içerir. Ca^{2+} sensörlerine Ca^{2+} bağlandığında, konformasyonel değişikliğe uğrayarak aşağı akış hedef moleküllerle etkileşim sağlar. Bitkilerde Ca^{2+} sensörleri kalmodulinler (CaM), kalmodulin-benzeri proteinler (CML), Ca^{2+} -bağımlı protein kinazlar (CDPK), ve kalsinörin B-benzeri proteinler (CBL) olmak üzere dört ana sınıf ile temsil edilir (Batistič & Kudla, 2012; DeFalco vd., 2010; Perochon vd., 2011).

2.7.2 Kalmodulin

CaM, ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş, en iyi karakterize edilen Ca^{2+} sensörlerinden birisidir. Esnek bir sarmal bölgeyle birbirine bağlanan, bir çift EF-el içeren iki küresel alana sahiptir. CaM'ın katalitik aktivitesi yoktur fakat Ca^{2+} , CaM'a bağlandığında hidrofobik alanları açığa çıkararak aşağı akışta hedef proteinler ile etkileşime girer. Etkileşim sonucu CaM tarafından aşağı akışta CaM-bağlayıcı proteinlerin (CaMPB'ler) işlevleri düzenlenir (DeFalco vd., 2010; L. Zhang vd., 2014).



Şekil 2.5 Ca^{2+} -CaM-Hedef protein etkileşimi (Goodsell vd., 2015)

Bitkiler, CaM izoformlarını kodlayan CaM genlerine sahiptir. *Arabidopsis thaliana*'da bulunan 7 farklı *CaM* geni 4 CaM izoformunu kodlar. Korunmuş CaM'lara ek olarak bitkiler 1 ila 6 arasında EF-el motifleri içeren fakat başka fonksiyonu olmayan ve CaM ile en az %16 aminoasit özdeşliği paylaşan CaM-benzeri proteinlere (CML) sahiptir. *Arabidopsis thaliana*, CaM'a benzer bir şekilde çoğunluğu 4 EF-el içeren 50 CML'yi kodlamaktadır. CaM/CML familyalarının bitkilerde yaygın olarak bulunması, gelişimsel

ve çevresel koşullara tepki süreçlerinde yer aldıklarını düşündürür (DeFalco vd., 2010; Hashimoto & Kudla, 2011; McCormack & Braam, 2003; L. Zhang vd., 2014).

2.7.3 Kalmodulin-bağlayıcı proteinler

Bitkilerdeki CaMPB'ler, metabolik enzimleri, kinazları ve fosfatazları, transkripsiyon faktörlerini, kanalları ve pompaları, hücre iskeleti proteinleri ve işlevi bilinmeyen proteinleri içerir (Perochon vd., 2011; Ranty vd., 2006). Hedef proteinlerin CaM-bağlayıcı alanları, sekans değişkenliği göstermekle beraber genellikle 16-35 kalıntılık bazik amfililik sarmallardan oluşur. CaM-bağlayıcı alanlar, Ca^{+2} bağımsız IQ motifi, Ca^{+2} bağımlı 1-5-10 ve 1-8-14 motifleri olmak üzere 3 gruba ayrılır (T. Yang & Poovaiah, 2003).

2.7.4 IQD proteinleri (IQ-67 alanı)

IQD proteinleri (IQ-67 alanı), bitkiye özgü CaM-bağlayıcı proteinlerin büyük bir sınıfıdır. IQ67-alanı olarak adlandırılan 67 korunmuş aminoasitten oluşan merkezi bir bölgenin varlığı ile karakterize edilir. IQ67 alanı, 1-5-10 ([FILVW] $\times$ 3[FILV] $\times$ 4[FILVW]) ve 1-8-14 ([FILVW] $\times$ 6[FAILVW] $\times$ 5[FILVW]) motiflerinin birkaç kopyasının yanı sıra 11 ve 15 amino asit kalıntılarından oluşan kısa dizilerle ayrılmış 3 IQ (IQxxxRGxxxR veya I/L/VQxxxRxxxxR/K) motifi içerir. Bir faz-0 intron yoluyla 16 ve 17 kodonlarını kesintiye uğratan yüksek oranda korunmuş bir ekzon-intron sınırı, IQ-67 alanının bir başka özelliğidir.

Bitkiye özgü IQD gen ailesi *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* (Abel vd., 2005), *Glycine max* (Feng vd., 2014), *Solanum lycopersicum* (Huang vd., 2013), *Zea mays* (Cai vd., 2016), *Solanum tuberosum* L. (Mei vd., 2021), *Vitis vinifera* (Liu vd., 2020), *Phyllostachys edulis* (Wu vd., 2016), *Populus trichocarpa* (H. Ma vd., 2014), *Brassica rapa ssp. pekinensis* (J. Yuan vd., 2019), *Brachypodium distachyon* (Filiz vd., 2013), *Gossypium arboreum* (Rehman vd., 2021), *Gossypium raimondii* (Rehman vd., 2021), *Gossypium barbadense* (Rehman vd., 2021), *Gossypium hirsutum* (Rehman vd.,

2021), *Ziziphus jujuba* Mill. (L. Wang vd., 2022), *Triticum aestivum* L. (Ke vd., 2022) ve *Citrullus lanatus* (Dou vd., 2022) türlerinde kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır.

IQD gen ailesinin bitki büyüme ve gelişimi, mikrotübül organizasyon regülasyonu ve abiyotik-biyotik streslere yanıtta önemli roller üstendiğini bulunmuştur (C. Guo vd., 2021). *Arabidopsis thaliana*'da *IQD1*'in glukozinolat birikiminin pozitif bir düzenleyicisi olduğu ve otçullara karşı bitki savunmasını uyardığı bildirilmiştir (Levy vd., 2005). *Glycine max*'te *IQDIII* alt ailesine ait 24 *GmIQD* geninin MeJA stresine karşı ekspresyon profilleri incelendiğinde *GmIQD21* hariç yukarı regüle edildiği bildirilmiş ve *IQD* genlerinin MeJA stresine yanıtta çeşitli roller oynayabileceği ifade edilmiştir (Feng vd., 2014). *Populus trichocarpa*'da tanımlanan 40 *PtIQD* geninden 12 *PtIQD* geni seçilerek MeJA ve PEG streslerine karşı ifade seviyeleri incelenmiştir. Sonuç olarak, *PtIQD* genlerinin kuraklık ve MeJA stres yanıtlarında yer alabileceği belirtilmiştir (H. Ma vd., 2014). *Zea mays*'da 26 *ZmIQD* geni kuraklık stresi yanıtında yer alarak stres düzenlenmesinde roller üstlenebileceği ifade edilmiştir (Cai vd., 2016). *Phyllostachys edulis*'de *PeIQD* genleri MeJA ve kuraklık streslerine karşı yukarı veya aşağı regüle olduğu bildirilmiştir (Wu vd., 2016). *Arabidopsis thaliana*'da *AtIQD5* geni karakterize edilmiş, Ca^{2+} sinyalleri yoluyla yaprak döşeme hücrelerinin morfogenezini düzenlediği bildirilmiştir (Mitra vd., 2019). *Populus deltoides*'de *PdIQD10* geninin ikincil hücre duvarı biyosentezini düzenlediği ve biyokütle oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (Badmi vd., 2018). *Solanum lycopersicum*'da *IQD/SUN24* geninin aşırı ekspresyonunun çimlenmeyi desteklediği ve *SUN24*'un ABA sinyal yolu aracılığıyla tohum çimlenmesini düzenlediği ifade edilmiştir (Bi vd., 2018). *Brassica rapa ssp. pekinensis*'de *BrIQD5* geninin aşırı ekspresyonu kuraklık toleransını artırırken *BrIQD5* geninin susturulması kuraklık toleransını azaltmıştır (J. Yuan vd., 2019). *Gossypium hirsutum*'da, *GhIQD31* ve *GhIQD32*'nin yıkılması kuraklık, tuz ve soğuk streslerini tolere etme yeteneğini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (X. Yang vd., 2019). *Oryza sativa*'da tohum kabuğu hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen *OsIQD14* geninin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. *OsIQD14* geninin mikrotübül hücre iskeleti dinamiklerini modüle ederek tane şeklini etkilediği belirtilmiştir (B. Yang vd., 2020). *Solanum tuberosum* L.'da *StIQD* genlerinin abiyotik streslerdeki rolünü araştırmak için ısı, soğuk, PEG, NaCl ve $CaCl_2$ stresleri uygulanmıştır. Sonuç olarak, *StIQD* genlerinin çeşitli streslere karşı

önemli roller oynadığı ve farklı tepkiler verdiği gösterilmiştir (Mei vd., 2021). *Brassica rapa ssp. pekinensis*'de kuraklık ve tuz stresi yanıtında yukarı regüle olan *BrIQD35* geninin *Nicotiana benthamiana*'da aşırı ekspresyonu kuraklık toleransını artırmıştır (J. Yuan vd., 2022). *Triticum aestivum* L.'da soğuk, tuz, kuraklık/ısı ve metal açlığı altında *TaIQD* genlerinin ifade seviyeleri incelenmiş olup streslere karşı yanıtta yer aldığı ifade edilmiştir. Ayrıca, *TaIQD-2B-5*, *TaIQD-6B-2* ve *TaIQD-6D-2* genlerinin çeşitli streslere karşı dikkate değer bir şekilde indüklendiği belirtilmiştir (Ke vd., 2022). *Ziziphus jujuba* Mill.'da soğuk, tuz, alkalın ve oryzalin tedavileri sonucunda *ZjIQD15* ve *ZjIQD16* genlerinin önemli ölçüde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (L. Wang vd., 2022). *GhCaM7* ile etkileşime giren *GhIQD10*, Ca^{+2} sinyali yoluyla pamuk lifinin uzamasını düzenlediği bildirilmiştir (Xu vd., 2023).

IQD gen ailesi üzerine çeşitli bitkiler ile yapılan çalışmalar sonucunda abiyotik ve biyotik stres tepkileri başta olmak üzere bitki büyüme ve gelişim aşamalarında roller üstlendiği görülmektedir. Farklı türlerde *IQD* gen ailesinin biyoinformatik analizler aracılığıyla karakterizasyon ve tanımlanması yapılmış olup, *Phaseolus vulgaris* bitkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *IQD* gen ailesinin *Phaseolus vulgaris*'de sistematik bir şekilde tanımlanması ve stres mekanizmalarında ki rolünün aydınlatılması, yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 *Phaseolus vulgaris* IQD Proteinlerinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu

P.vulgaris'de IQD proteinlerini tanımlamak için, yayımlanan *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* IQD proteinleri tüm *P.vulgaris* genomuna (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris_v2_1) karşı Pythozome v13 veri tabanında BLASTP (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) aramalarında sorgu dizileri olarak kullanılmıştır (Goodstein vd., 2012). Diziler, e-değeri $\leq 1e^{-5}$ ve özdeşlik ≥ 50 ise aday olarak seçilmiştir. Gereksiz sekanslar manuel bir şekilde kaldırıldıktan sonra tüm IQD aday dizileri SMART veri tabanı (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ve InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) veri tabanı kullanarak IQ domainin varlığı doğrulanmıştır (Letunic vd., 2021; Paysan-Lafosse vd., 2023). Varsayılan *P.vulgaris* IQD proteinleri, varsayımsal proteinlerin karakterizasyonu için NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLASTP'de sorgulama için kullanılmıştır (Johnson vd., 2008). Analizler de kullanılmak üzere *Arabidopsis thaliana* (33 üye) ve *Oryza sativa* IQD (26 üye) protein sekansları Pythozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) veri tabanı kullanılarak indirilmiştir.

Aminoasit sayısı, kodlama dizisi (cds), kromozom koordinatları dahil olmak üzere *P.vulgaris* IQD genleri hakkındaki bilgiler Pythozome v13 veri tabanından elde edilmiştir. *P.vulgaris* IQD proteinlerinin moleküler ağırlık, izoelektrik nokta, gravy değeri ve kararsızlık indeksi gibi fizikokimyasal özellikleri Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) aracı kullanılarak hesaplanmıştır (Gasteiger vd., 2003). *P.vulgaris* IQD proteinlerinin hücre altı lokalizasyon tahmini, WolfPsort (<https://wolfsort.hgc.jp>) aracı kullanılarak elde edilmiştir (Horton vd., 2007).

3.2 PvIQD Proteinlerinin Dizi Hizalaması ve Filogenetik Analizi

PvIQD proteinlerinin IQ-67 alanı GeneDoc kullanılarak keşfedilmiştir. IQ-67 alanı, GeneDoc parametreleri kullanılarak görselleştirilmiştir (KB, 1997). *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, ve *Phaseolus vulgaris* IQD protein sekansları MEGA11

programında ClustalW ile hizalanmıştır. Filogenetik ağaç, çoklu dizi hizalaması baz alınarak 1000 bootstrap, pairwise deletion ve JTT model parametreleri ile MEGA11’de Maximum Likelihood yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Tamura vd., 2021). Elde edilen newick format iTOL (Interactive Tree Of Life) (<https://itol.embl.de/>) web servisine yüklenerek filogenetik ağaç görselleştirilmiştir (Letunic & Bork, 2021).

3.3 *PvIQD* Genlerinin Kromozomal Dağılım, Korunmuş Motif ve Ekzon-İntron Analizi

P.vulgaris genel özellik formatı (GFF3) JGI Data Portal’dan (<https://data.jgi.doe.gov/>) indirilmiştir. *PvIQD* genlerinin kromozomal dağılımı GFF3 dosyası kullanılarak TBtools programında görselleştirilmiştir (Chen vd., 2020). *PvIQD* proteinlerinin korunmuş motiflerini tanımlamak için MEME web servisi (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) kullanılmıştır (Bailey vd., 2006). Parametreler, maksimum motif sayısı: 10, minumum genişlik: 6 ve maksimum genişlik: 50 şeklinde ayarlanmıştır. *PvIQD* genlerinin ekzon-intron bilgileri GFF3 dosyasından elde edilmiştir. Ekzon-intron yapısı ve korunmuş motifler TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) programı kullanarak görselleştirilmiştir (Chen vd., 2020).

3.4 Gen Duplikasyonu ve Ka/Ks Analizi

Arabidopsis thailana, *Oryza sativa*, *Glycine max* ve *Phaseolus vulgaris* türlerinin GFF3 ve genom sekans dosyaları JGI Data Portal (<https://data.jgi.doe.gov/>) kullanılarak indirilmiştir. Gen duplikasyon etkinlikleri Multiple Collinearity Scan toolkit (MScanX) kullanılarak TBtools programında analiz edilmiştir (Y. Wang vd., 2012). *P.vulgaris* ve diğer türler arasında (*A.thaliana*, *O.sativa*, *G.max*) ortolog ilişkileri anlamak için sintenik analiz haritaları Dual Synteny Plotter yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur. *PvIQD* genlerinin homolog ilişkileri Circos diyagramı kullanılarak görselleştirilmiştir. Sinonim (Ka), non-sinonim (Ks) ve Ka/Ks (sinonim/non-sinonim) oranı Simple Ka-Ks Calculator kullanılarak hesaplanmıştır (Chen vd., 2020).

3.5 *PvIQD* Genlerinin Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi

PvIQD genlerinin promotör bölgesindeki cis-düzenleyici elementleri incelemek için, her bir genin başlangıç kodonunun (ATG) yukarısındaki 1500 bp genomik dizi, Phytozome v13 veri tabanından indirilmiştir. Promotor dizisindeki cis-düzenleyici elementler, PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir (Lescot vd., 2002). Cis-düzenleyici elementler ve sayıları, Python Seaborn Kütüphanesi (<https://seaborn.pydata.org/index.html>) kullanılarak görselleştirilmiştir (Waskom, 2021).

3.6 Mikro-RNA'ların (miRNA) ve Hedefledikleri *PvIQD* Genlerin Belirlenmesi

Bilinen tüm *P.vulgaris* miRNA dizileri PmiREN (<https://www.pmiren.com>) veri tabanından indirilmiştir (Z. Guo vd., 2020). Potansiyel miRNA tahmini psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) web servisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Dai vd., 2018). miRNA'ların hedefledikleri *PvIQD* genleri Cytoscape 3.9.1 programı kullanılarak görselleştirilmiştir (Shannon vd., 2003).

3.7 Farklı Dokulardaki *PvIQD* Genlerinin in-silico mRNA seviyeleri

PvIQD genlerinin çeşitli dokulardaki ifade seviyeleri, Phytozome Database v13'den çekilmiştir. FPKM (dizilenen milyon baz çifti başına transkript dizisinin kilobazı başına beklenen parça sayısı) birimleri, in-silico'daki ifade seviyeleri için kullanılmıştır. FPKM değerleri log2'ye dönüştürüldükten sonra ısı haritası Python Seaborn Kütüphanesi (<https://seaborn.pydata.org/index.html>) aracılığıyla oluşturulmuştur (Waskom, 2021).

3.8 RNA-Seq Datasında *PvIQD* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri

PvIQD genlerinin tuz stresi tepkisini anlamak için tuz tedavisi uygulanmış RNA-seq veri setleri analiz edilmiştir. PRJNA656794 proje kodlu ham RNA-seq veri setlerini indirmek için NCBI SRA (Sequence Read Archive) kullanılmıştır (Leinonen vd., 2011; Niron vd.,

2020). İspir çeşidi yaprak dokusuna ait SRR12439141(Kontrol), SRR12439142 (Kontrol-İspir-Yaprak), SRR12439143 (Kontrol), SRR12439144 (Tuz Tedavisi), SRR12439145 (Tuz Tedavisi) ve SRR12439146 (Tuz Tedavisi) erişim numaralı veriler kullanılmıştır. TR43477 çeşidi yaprak dokusuna ait SRR12439153 (Kontrol), SRR12439154 (Kontrol), SRR12439155 (Kontrol), SRR12439156 (Tuz Tedavisi), SRR12439157 (Tuz Tedavisi) ve SRR12439158 (Tuz Tedavisi) erişim numaralı veriler kullanılmıştır (Niron vd., 2020). RNA-seq, biyoinformatik iş akışı Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Blankenberg vd., 2010). NCBI SRA'dan elde edilen veriler FASTQ formatında çıkartılmıştır (<https://github.com/ncbi/sra-tools>). Ham dizi verilerinin okuma kalitesi FASTQC ile analiz edilmiştir (Andrews, 2010). Okumalar, RNA STAR ile *Phaseolus vulgaris* genomuna karşı hizalanmıştır (Dobin vd., 2013). RNA-seq kitaplığının zincirli (sense veya antisens) olup olmadığını anlamak için Infer Experiment kullanılmıştır (L. Wang vd., 2012). Üretilen okumaları saymak için featureCounts kullanılmıştır (Liao vd., 2014). Diferansiyel gen ekspresyonu analizi, Bioconductor DESeq2 paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Love vd., 2014). En az 10 okuma içeren genler filtrelenmiştir. log₂FC değerleri, Seaborn kütüphanesi kümelenmiş ısı haritası ile görselleştirilmiştir (Waskom, 2021).

3.9 Bitki Büyüme Koşulları, Materyalleri ve Stres Uygulaması

Erzurum Üniversitesi'nden temin edilen 'Elkoca' ve 'Serra' fasulye çeşitleri kullanılmıştır. Kültivara özgü tohumlar yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Tohumlar, beş dakika boyunca %5 (v/v) hipoklorit içeren solüsyonlarda bekletilmiştir. Çimlenmeyi takiben tohumlar, 0.2 L 1/10 Hoagland çözeltisi içinde hidroponik bir sistemde yetiştirilmiştir. Hoagland çözeltisi, son konsantrasyonu 10⁻⁶ M Mn, 2 mM Ca, 4 mM NO₃, 2.10⁻⁷ M Cu, 10⁻⁸ M NH₄, 1 mM Mg, 2 mM K, 10⁻⁶ M Zn, 0.2 mM P, 10⁻⁶ M B ve 10⁻⁴ M Fe olan makro ve mikro besinlerden oluşmaktadır. Makro besinler KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, K₂SO₄, Ca(NO₃)₂.4H₂O ve KCl içerirken, mikro besinler H₃BO₃, MnSO₄, NH₄Mo, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O içermektedir (Barac vd., 2004). Fasulye fideleri, ışık, 250 mmol m⁻²s⁻¹ foton akışı, 25 °C sıcaklık ve %70 bağıl nem parametreleri ile dışarıdan izole kontrollü bir iklim kabininde büyütülmüştür. Fasulye fidelerine, trifolat aşamasına ulaştıktan sonra NaCl tedavisi uygulanmıştır. 150mM NaCl (orta seviye tuzluluk stresi)

ve Hoagland çözeltisi 7 gün boyunca uygulandıktan sonra örnekler toplanmıştır. Örnekler iki farklı fasulye çeşidinin yaprak, gövde ve köklerinden 3 biyolojik tekrarlı olacak şekilde toplanmıştır. Toplanan örnekler RNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar -80°C'lik buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.10 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, FavorPrep™ Plant Total Mini Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler, -80 °C'de muhafaza edilen buzdolabından çıkarıldıktan hemen sonra sıvı nitrojen içerisinde bekletilmiştir. Ependorf tüplerine sıvı nitrojen içerisine batırılmış tüplerdeki örneklerden yaklaşık 100 mg aktarılmıştır ve RNA izolasyonu, FavorPrep™ plant total mini kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.11 Komplementer DNA Sentezi

qPCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. iScript™ cDNA synthesis kit, cDNA sentezi için kullanılmıştır. Total hacim 10 µl olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Reaksiyon başına; 5x iScript Reaction mix (2 µl), iScript Reverse Transcriptase (0,5 µl), ddH₂O ve RNA örneği kullanılmıştır. ddH₂O ve RNA miktarı, RNA konsantrasyonuna göre oranlanmıştır ve tüpteki RNA miktarının 500 ng'yi geçmemesine dikkat edilmiştir. PCR cihazı ile çizelge 3.1'de belirtilen reaksiyon profili takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 cDNA sentezi reaksiyon profili

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

3.12 Primer Tasarımı

RNA-seq datasından elde edilen verilere göre *PvIQD2*, *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD12*, *PvIQD14*, *PvIQD15*, *PvIQD18*, *PvIQD32* ve *PvIQD33* qPCR reaksiyonlarında gözlemlenecek hedef genler olarak seçilmiştir. Hedef genlerin primerleri, Integrated DNA Technologies (IDT) Primer Quest programı kullanılarak tasarlanmıştır. Housekeeping olarak *ACT* (Actin) geni kullanılmıştır. Primer tasarımında GC%, Tm değerleri ve hairpin yapısı oluşturma ihtimali kriterleri dikkatli bir şekilde incelenerek en uygun primerler seçilmiştir.

Çizelge 3.2 Primerler ve özellikleri

Hedef Gen	Tip	Sekans	Sekans Uzunluğu	Tm	GC Yüzdesi
PvIQD2	İleri Primer	TTGGGTGAATGGAAGGGTAAG	21	61.988	47.619
PvIQD2	Geri Primer	TTGTCTGGTTGTGAGGACATC	21	62.055	47.619
PvIQD4	İleri Primer	CGGAACGGTGGTGATGATAA	20	61.853	50
PvIQD4	Geri Primer	GCCTTGGAGTAACAGGAGTG	20	61.935	55
PvIQD10	İleri Primer	CCATAGTACCTCACCCACAAAG	22	62.016	50
PvIQD10	Geri Primer	GTGCTTGTTTCCATTGCTACC	21	61.975	47.619
PvIQD12	İleri Primer	GGTGGAACCTGGTTGGAAAGA	20	62.091	50
PvIQD12	Geri Primer	GTCTTGGAGGTGTGAGTTGAA	21	61.985	47.619
PvIQD14	İleri Primer	TTCAGTGGCTATTCTGGTCATC	22	61.981	45.455
PvIQD14	Geri Primer	GAGGAACCGTATCTCTCAAACCTC	23	61.919	47.826
PvIQD15	İleri Primer	GGCACTTGTCAGAGGGTATTT	21	62.2	47.619
PvIQD15	Geri Primer	GATTGGTGGGACCTTAGTGTAG	22	61.767	50
PvIQD18	İleri Primer	GAAGGATGGTGTGATAGTGTAGG	23	61.817	47.826
PvIQD18	Geri Primer	GCCTGCCACTGATGAGATAG	20	61.841	55
PvIQD22	İleri Primer	GACAGGATCAGGAGGAAGAAAC	22	61.983	50
PvIQD22	Geri Primer	CAGAACCACCAGACCATTCA	20	61.841	50
PvIQD32	İleri Primer	GTCTCCAATGTGCCTGATGT	20	62.206	50

Çizelge 3.2 Primerler ve özellikleri (devam)

PvIQD32	Geri Primer	GTGGTCTCTGACAAGGGTTTAG	22	62.138	50
PvIQD33	İleri Primer	CTTATAGCGTGGGAGTGAGTTAC	23	61.958	47.826
PvIQD33	Geri Primer	GCAGCAAGAGGAGTAGTTTGA	21	62.064	47.619
ACT	İleri Primer	TGCATACGTTGGTGATGAGG	20	57	50
ACT	Geri Primer	AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	20	59	55

3.13 Geçek Zamanlı PCR (qPCR)

Geçek zamanlı PCR uygulamaları Mic qPCR cihazı (Magnetic Induction Cyclers) aracılığıyla iTaq Universal SYBR Green Supermix kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qPCR sonunda hedeflenen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığını anlamak için Erime Eğrisi analizi yapılmıştır. qPCR uygulamalarında ki reaksiyon bileşenleri ve profili aşağıda gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Reaksiyon bileşenleri ve miktarları

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

Çizelge 3.4 Reaksiyon profili

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

3.14 Normalizasyon ve İstatiksel Analiz

qPCR verilerinin normalizasyonu $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Livak & Schmittgen, 2001). Üç farklı biyolojik ve teknik tekrar şeklinde yapılan çalışmalarda referans gen olarak ACT (Actin) kullanılmıştır. İstatistiksel analizler, two-way ANOVA yöntemine dayalı GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır ve 0,05 anlamlılık düzeyindeki Fisher testi dikkate alınmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Fasulye’de *IQD* Gen Ailesinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu

Fasulyede *IQD* gen ailesi üyelerini belirlemek için, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* *IQD* protein dizileri, Pythozome BlastP sorgusunda *P.vulgaris* genomuna karşı kullanılmıştır. Gereksiz sekanslar atıldıktan sonra SMART ve InterPro veri tabanlarında *IQ* domainin varlığı doğrulanmıştır. Sonuç olarak, fasulye genomunda toplam 36 *PvIQD* geni tanımlanmıştır. *PvIQD* genleri kromozomlar üzerindeki konumlarına göre *PvIQD1* ila *PvIQD36* olarak isimlendirilmiştir. *PvIQD* proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri analiz edilmiştir. *PvIQD* proteinlerinin uzunlukları 133 (*PvIQD11*) ila 827 (*PvIQD29*) amino asit aralığında ve moleküler ağırlığı (MW) ise 15,27 ila 90,51 kDa arasında değişmiştir. *PvIQD* proteinleri (pI>9,45, ortalama=9,99), *PvIQD29* (pI=5,56) dışında yüksek izoelektrik noktasına sahiptir. *PvIQD* proteinlerinin hidropatinin büyük ortalaması (GRAVY) değerleri negatif çıkmıştır, bu proteinlerin hidrofilik olduğunu göstermektedir. *PvIQD* proteinlerinin kararsızlık indeksleri 40’tan yüksektir. Tüm *PvIQD* genlerinin detaylı özellikleri Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 *PvIQD* genlerinin kataloğu

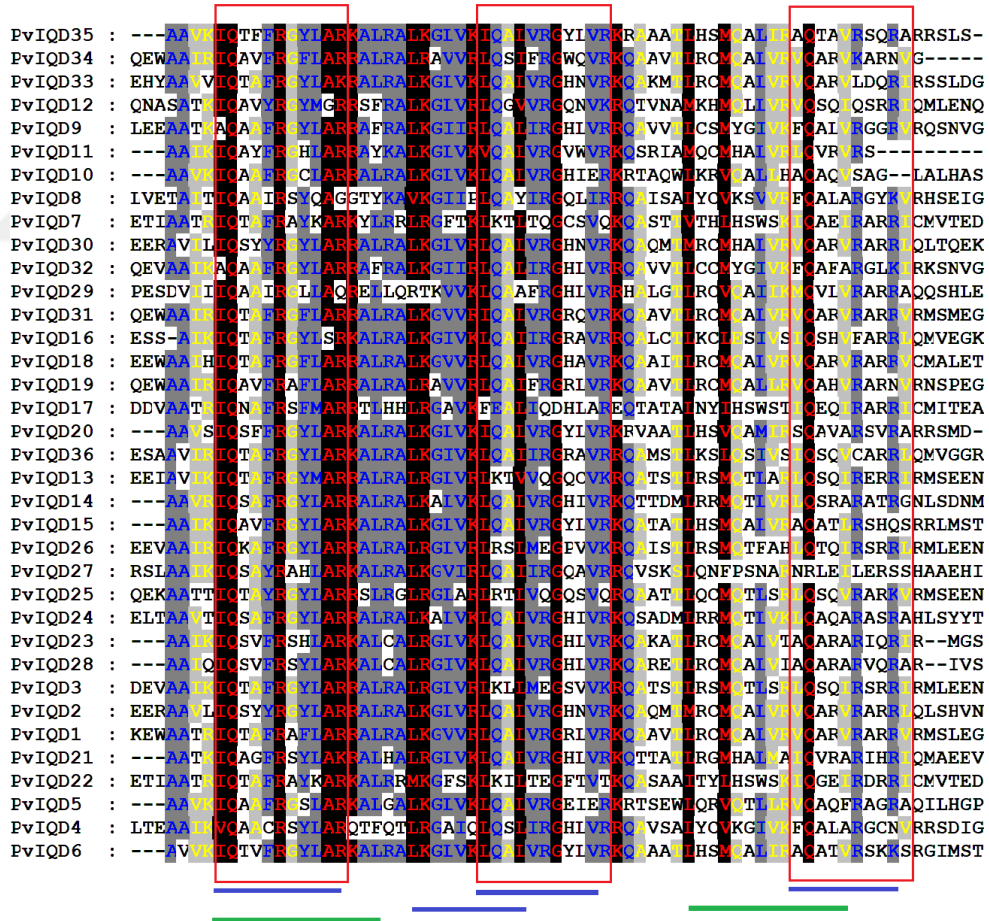
Gen Tanımlayıcısı	Gen İsmi	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Protein Uzunluğu	pI	Moleküler Ağırlık	Kararsızlık İndeksi	Gravy	NCBI Erişim Kodu
Phvul.001G037201.1	PvIQD1	1	3491267	3495084	620	10,08	69,784.33	62.17	-0.883	XP_007161034.1
Phvul.001G075300.1	PvIQD2	1	10674751	10680068	456	10,07	51,158.55	66.63	-0.894	XP_007161510.1
Phvul.001G175100.1	PvIQD3	1	43180744	43185144	475	10,13	53,173.26	65.44	-0.815	XP_007162725.1
Phvul.002G089200.1	PvIQD4	2	15212103	15217438	566	9,48	62,263.71	51.82	-0.815	XP_007157676.1
Phvul.002G154900.1	PvIQD5	2	30928015	30931264	400	10,06	44,656.97	60.18	-0.903	XP_007158468.1
Phvul.002G308100.1	PvIQD6	2	47590546	47593746	437	10,28	48,623.01	55.98	-0.637	XP_007160280.1
Phvul.003G057301.3	PvIQD7	3	7706075	7715435	285	10,64	32,332.31	46.22	-0.835	XP_007153699.1
Phvul.003G068300.1	PvIQD8	3	10283314	10289102	538	9,69	59,657.97	56.55	-0.815	XP_007153827.1
Phvul.003G191700.1	PvIQD9	3	41574555	41582248	588	9,7	65,191.70	46.12	-0.752	XP_007155327.1
Phvul.003G211800.1	PvIQD10	3	43801523	43805043	446	9,98	48,759.67	61.30	-0.752	XP_007155556.1
Phvul.003G267500.1	PvIQD11	3	50562147	50563615	133	11,49	15,274.90	48.01	-0.220	XP_007156210.1
Phvul.003G297100.1	PvIQD12	3	53394367	53400024	532	10,77	59,450.54	51.28	-0.876	XP_007156570.1
Phvul.004G075300.1	PvIQD13	4	12978548	12983115	490	10,17	54,664.10	69.50	-0.707	XP_007151793.1
Phvul.004G120200.1	PvIQD14	4	40992868	40997538	471	9,97	52,067.78	55.45	-0.786	XP_007152324.1
Phvul.004G175300.1	PvIQD15	4	47796318	47798550	456	10,63	50,737.71	61.47	-0.549	XP_007152967.1
Phvul.005G033800.1	PvIQD16	5	3095340	3098160	450	9,92	51,159.24	60.56	-0.789	XP_007149021.1
Phvul.005G067975.1	PvIQD17	5	11703505	11707413	286	9,73	33,219.91	48.33	-0.881	XP_007161597.1
Phvul.005G118200.1	PvIQD18	5	35339861	35346347	430	9,83	47,401.10	47.43	-0.874	XP_007150009.1

Çizelge 4.2 *PvIQD* genlerinin kataloğu (devam)

Phvul.005G157700.3	PvIQD19	5	38650625	38653012	419	9,98	46,552.27	56.49	-0.544	XP_007150498.1
Phvul.005G165500.1	PvIQD20	5	39280276	39282885	366	10,05	41,923.00	55.04	-0.790	XP_007150597.1
Phvul.006G100500.1	PvIQD21	6	21087841	21090029	381	10,54	43,359.90	65.66	-0.785	XP_007147156.1
Phvul.006G178700.1	PvIQD22	6	28097206	28101416	306	10,30	34,309.37	42.09	-0.747	XP_007148077.1
Phvul.007G060900.1	PvIQD23	7	5334802	5337057	462	9,73	51,297.29	52.41	-0.771	XP_007143302.1
Phvul.007G067100.1	PvIQD24	7	6176902	6181546	465	10,43	51,202.39	60.68	-0.700	XP_007143373.1
Phvul.007G092300.2	PvIQD25	7	9590096	9593477	499	10,74	55,248.95	56.35	-0.954	XP_007143677.1
Phvul.007G164300.1	PvIQD26	7	27727291	27730975	474	10,16	52,797.75	62.97	-0.829	XP_007144538.1
Phvul.007G249900.1	PvIQD27	7	37251561	37254785	378	9,96	42,989.11	54.62	-0.739	XP_007145573.1
Phvul.007G277500.1	PvIQD28	7	39746996	39749242	429	9,47	48,275.10	60.68	-0.759	XP_007145905.1
Phvul.009G015200.1	PvIQD29	9	2512578	2518947	827	5,56	90,516.57	61.29	-0.875	XP_007136068.1
Phvul.009G052200.1	PvIQD30	9	10085487	10089616	462	9,66	52,016.25	74.22	-0.839	XP_007136521.1
Phvul.009G078500.1	PvIQD31	9	13163896	13166261	443	10,39	49,688.58	45.05	-0.739	XP_007136839.1
Phvul.009G189500.1	PvIQD32	9	28760534	28768269	584	9,61	64,894.44	44.59	-0.756	XP_007138206.1
Phvul.010G118500.1	PvIQD33	10	39795424	39798608	546	10,18	61,110.97	67.32	-1.006	XP_007135309.1
Phvul.010G137400.1	PvIQD34	10	41988263	41991068	428	10,10	47,274.90	53.25	-0.597	XP_007135534.1
Phvul.010G144700.1	PvIQD35	10	42621150	42624169	395	10,25	44,375.46	58.39	-0.636	XP_007135626.1
Phvul.011G014100.1	PvIQD36	11	1099775	1103695	468	9,95	52,086.22	64.22	-0.678	XP_007131445.1

4.2 PvIQD Proteinlerinin Çoklu Dizi Hizalaması

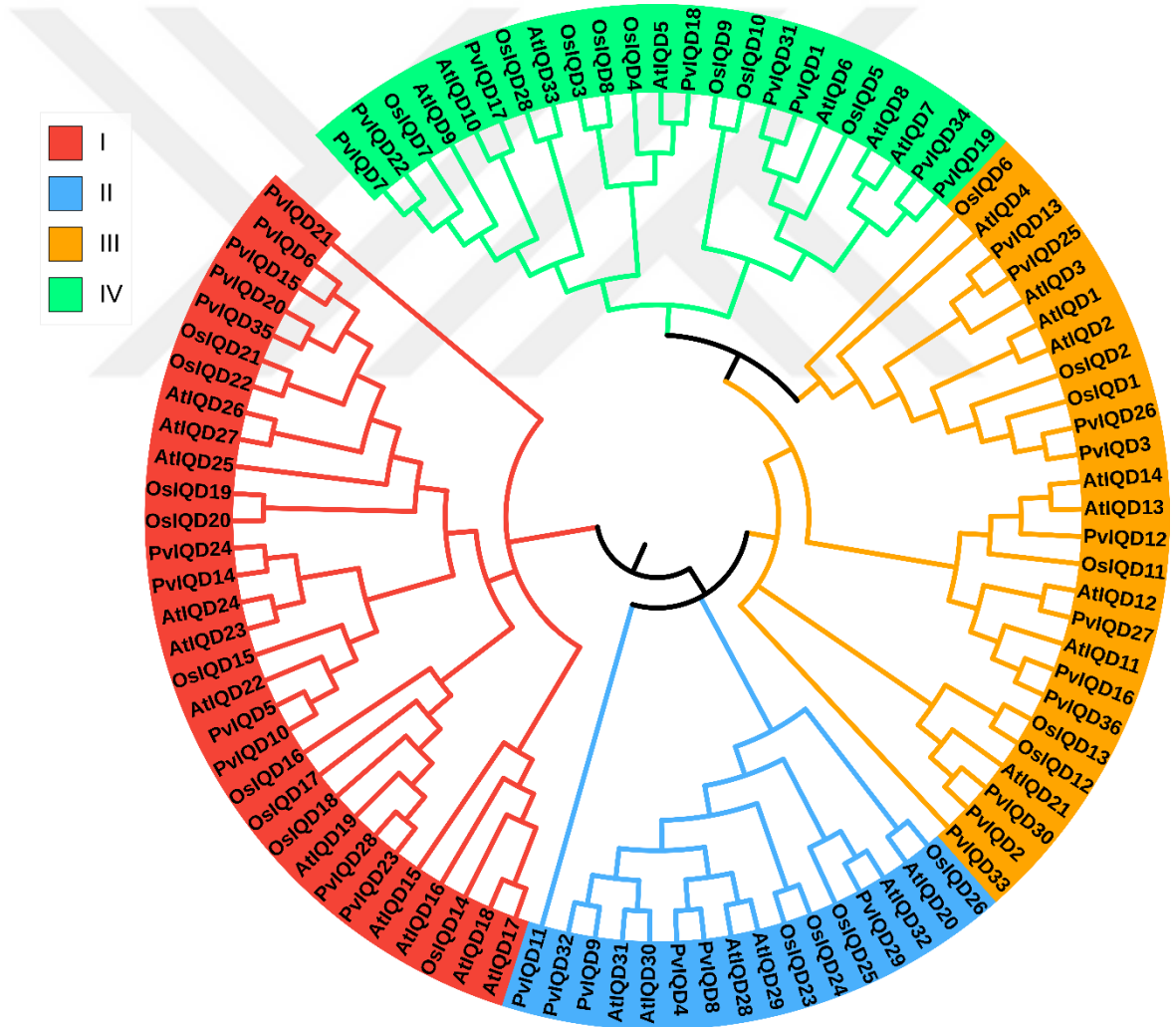
PvIQD proteinlerinin IQ-67 alanları çoklu dizi hizalaması ile analiz edilmiştir. Analiz, IQ-67 alanının benzersiz tekrarlayan motiflerden oluştuğunu ve yüksek oranda korunduğunu göstermiştir (Şekil 4.1). IQ-67 alanının 11 ve 15 amino asitli iki kısa diziyle ayrılan 3 IQ (IQxxxRGxxxR) veya [ILV]QxxxRxxxx[R, K]) içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, kısmen her IQ motifi 1-8-14 motifinin ([FILVW]x6[FAILVW]x5[FILVW]) 3 kopyası ve 1-5-10 motifinin ([FILVW]x3[FILV]x4[FILVW]) 4 kopyası ile örtüştüğü bulunmuştur. Ayrıca, IQ-67 alanı belirtilen motifleri çevreleyen birkaç hidrofobik ve bazik aminoasit tortusu içermektedir. Bu özellikler IQ-67 alanının bazik amfifilik sarmal halinde katlanacağını düşündürmektedir (Abel vd., 2005).



Şekil 4.1 PvIQD proteinlerinin IQ-67 alanının çoklu dizi hizalaması

4.3 IQD Proteinlerinin Filogenetik Analizi

IQD proteinlerinin filogenetik ilişkilerini anlamak için, *Arabidopsis thaliana* (33), *Oryza sativa* (27) ve *Phaseolus vulgaris* (36) IQD proteinlerinin çoklu dizi hizalamaları esas alınarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.2). Filogenetik analiz IQD proteinlerin 4 gruba (I,II,III,IV) sınıflandığını göstermiştir. Grup I en fazla IQD üyesine sahip olurken grup II en az IQD üyesine sahiptir. 36 PvIQD proteini arasından 11'i grup I'e, 6'sı grup II'ye, 11'i grup III'e ve 8'i grup IV'e aittir. AtIQD ve OsIQD proteinleri dört sınıfın hepsinde bulunmuştur.



Şekil 4.2 *A.thaliana* (AtIQD), *O.sativa* (OsIQD) ve *P.vulgaris* (PvIQD) IQD proteinlerinin filogenetik analizi

4.4 *PvIQD* Genlerinin Korunmuş Motif ve Ekzon-İntron Organizasyonu

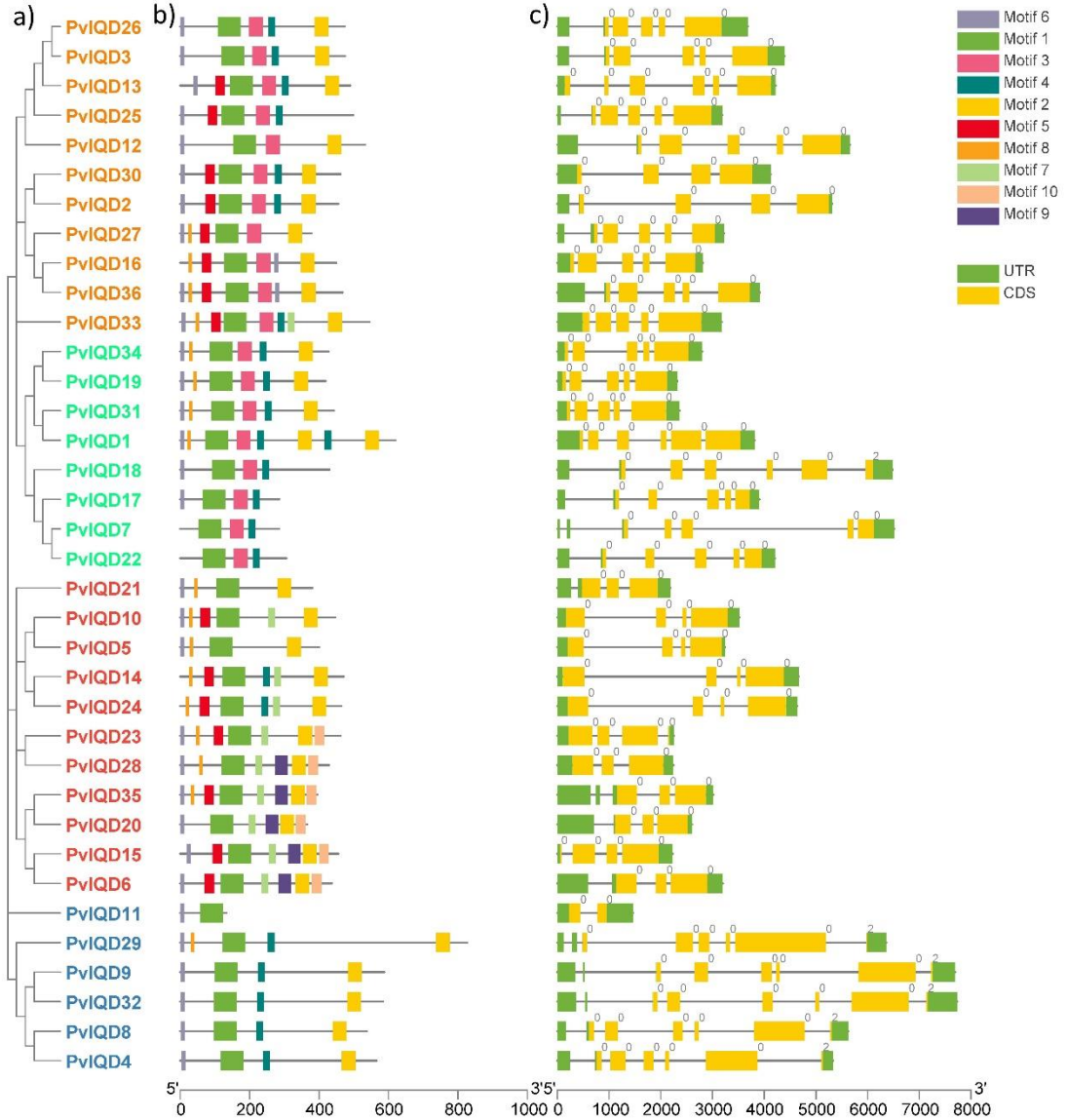
PvIQD proteinlerinin korunmuş motiflerini araştırmak için 10 farklı motif MEME kullanılarak tanımlanmıştır (Şekil 4.3b). Tanımlanan motiflerin her biri SMART ve InterPro'da taranarak açıklanmıştır (Çizelge 4.2). Motif 1, IQ67 alanını temsil ederek tüm *PvIQD* proteinlerinde bulunmaktadır. Motif 2, DUF4005 (Protein of unknown function) motifini temsil eder ve 6 *PvIQD* proteini dışında diğer tüm proteinlerde bulunmaktadır. Bu motifleri takip eden motif 4 ve motif 6 genlerin büyük bir kısmında bulunmaktadır. Motif kompozisyonu ve dağılımı, aynı grupta bulunan *PvIQD* proteinlerinin benzer motifler içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Örneğin Motif 3 yalnızca grup III ve grup IV'ün üyelerinde bulunur. Alt gruplara özgü motifler fasulyedeki *IQD* genlerinin fonksiyonel farklılaşmasına katkıda bulunabilir.

Çizelge 4.3 Korunmuş motiflerin özellikleri

No	Motif	Genişlik	Domain
1	AAIKIQTAFRGYLARRALRALKGLVKLQALVRGHLVRKQAAATLRMCQAL	50	IQ67
2	VRDESSFSSPAFPSYMAPTESAKAKLRSSQAPKQRPDGE	41	DUF4005
3	IEEEWDDSLQSKEEVEAKLLRRQEAAVKRERAMAYAFSHQQ	41	-
4	PGKPNWGWSWLERWMAARPWE	21	-
5	LSEAEKEQNKHAIIVAAATAAAEAAVAAA	30	-
6	VRVQARVRARRIRMS	15	-
7	MGKSGKWFKALLG	13	-
8	QAAAEVVRLTSAGR	14	-
9	DDDESPKIVEVDTWKPKSRSR	21	-
10	IPDQRNFQDSEWGLTGEECRFSTAQSTPRFTNPCSCG	37	-

Tanımlanan tüm *PvIQD* genlerinin ekzon-intron modelleri, *IQD* gen ailesinin evrimi hakkında daha fazla bilgi edinmek için incelenmiştir (Şekil 4.3c). Ekzon-intron yapısı, tüm *PvIQD* genlerinin 2 ila 6 ekzon içerdiğini ve aynı grupta bulunan *PvIQD* genlerinin benzer ekzon-intron sayısı ve intron fazlarını paylaştığını göstermiştir. Örneğin, grup II'deki genler (*PvIQD11* hariç) 6 ekzon ve intron faz 2 içerirken, grup I'deki genler yalnızca 3 veya 4 ekzon ve intron faz 0 içermektedir. Benzer şekilde, grup IV'teki genler (*PvIQD1* ve *PvIQD18* hariç) 5 ekzon ve intron faz 0 (*PvIQD18* hariç) içerirken, grup

III'teki genler 4 ila 6 ekzon ve intron faz 0 içermektedir. *PvIQD* genlerinin intronlarının çoğu intron faz 0 iken yalnızca 6 *PvIQD* geninin intronları, intron faz 2'dir.

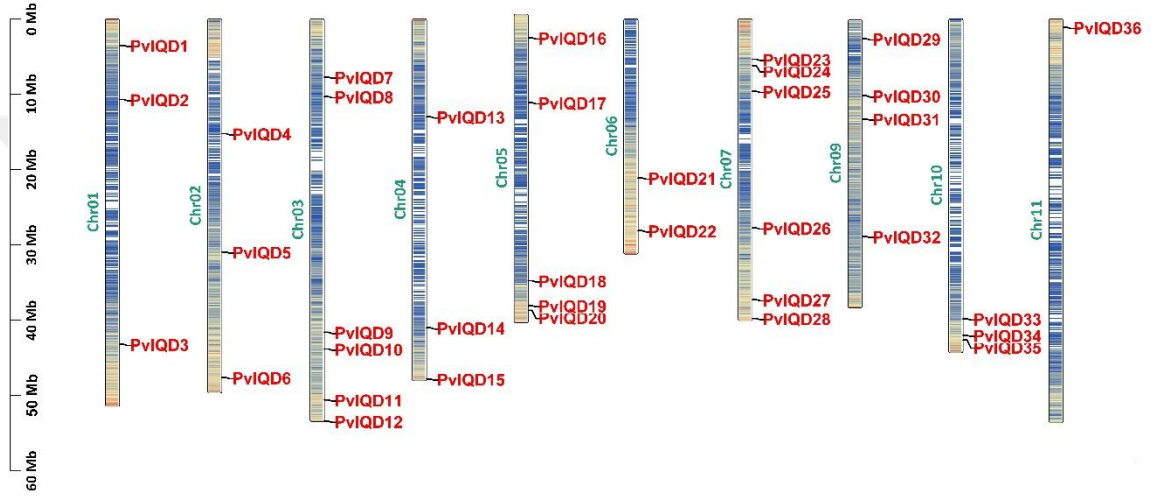


Şekil 4.3 *PvIQD* genlerinin filogenetik ilişkileri, korunmuş motif yapısı ve ekzon-intron modeli

Filogenetik ağaç *PvIQD* proteinlerinin çoklu dizi hizalamasına göre MEGA11 kullanılarak elde edilmiştir. Farklı renkler farklı grupları göstermektedir. (Grup I=Kırmızı, Grup II=Mavi, Grup III=Turuncu, Grup IV=Yeşil) b) Fasulyede IQD ailesinin korunmuş motif içeriği. 10 farklı motif 10 farklı renk kutusu ile gösterilmiştir. c) Fasulyede IQD genlerinin ekzon-intron yapısı. Yeşil kutular 5'3' UTR bölgelerini, sarı kutular ekzon bölgelerini ve gri çizgiler ise intronları temsil etmektedir. Sayılar, intron fazlarını göstermektedir.

4.5 *PvIQD* Genlerinin Kromozomal Dağılımı

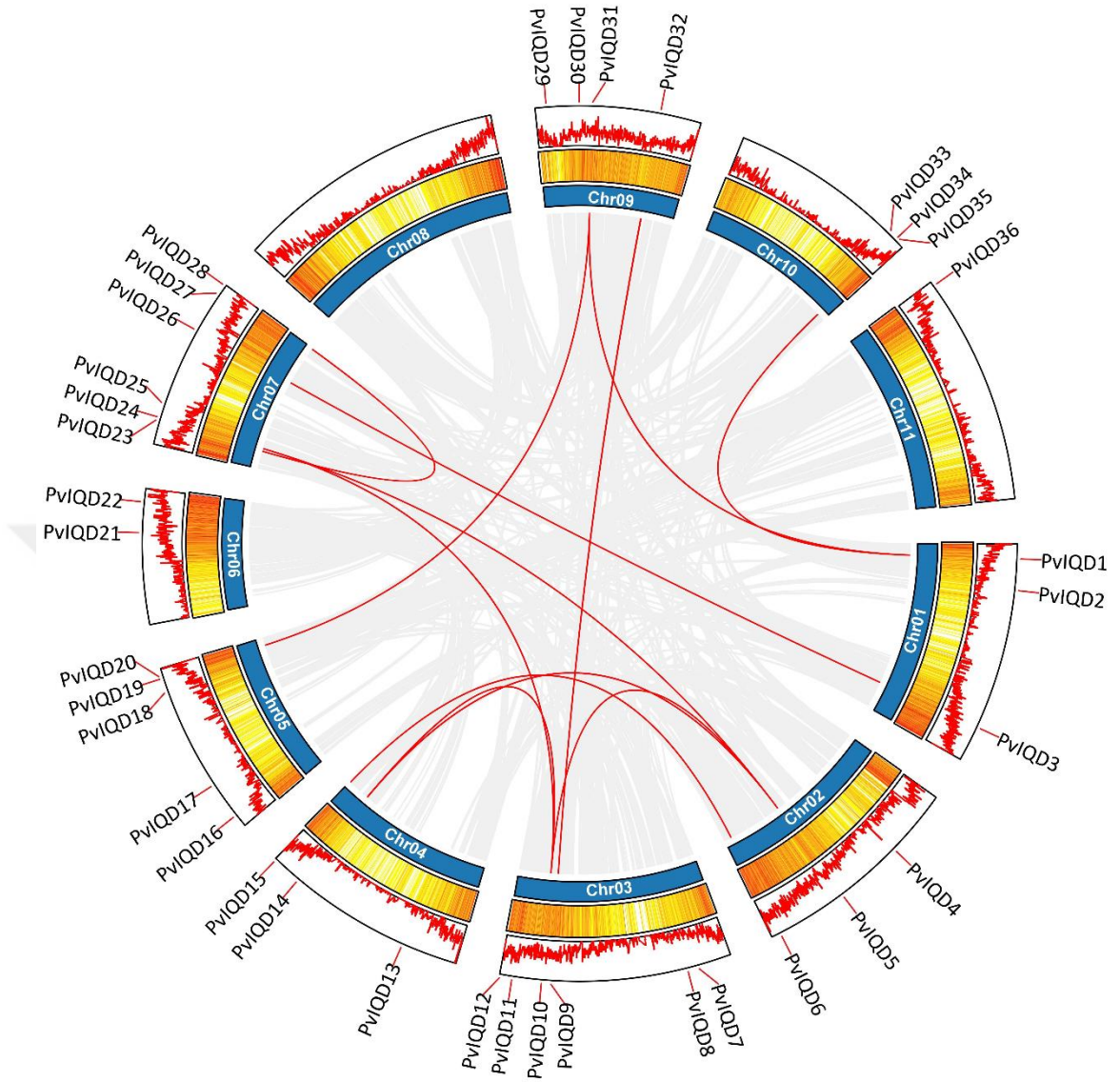
PvIQD genleri Chr08 (Chr=Kromozom) dışında fasulyenin tüm kromozomlarına, lokasyonlarına göre dağılmıştır (Şekil 4.4). Chr03 ve Chr07 en fazla sayıda *PvIQD* (6) geni içerirken Chr11 en az sayıda *PvIQD* (1) geni içermektedir. Ayrıca, Chr01, Chr02, Chr04 ve Chr10 eşit sayıda *PvIQD* (3) geni içermektedir. Analiz sonucuna göre kromozom uzunluğu ve *PvIQD* gen sayısı arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.



Şekil 4.4 *PvIQD* genlerinin kromozomal dağılımı

4.6 *PvIQD* Genlerinin Sinteni Analizi

Gen ailelerinin evrimi, büyük ölçüde gen duplikasyon etkinliklerinden, özellikle tandem ve segmental duplikasyon olaylarından etkilenmiştir (Cannon vd., 2004). Bu nedenle, *PvIQD* genlerinin sinteni analizi yapılmıştır (Şekil 4.5). *PvIQD* genlerinde bir (*PvIQD23/PvIQD28*) tandem duplikasyon etkinliği Chr07'de tespit edilmiştir. Bunun aksine on bir segmental duplikasyon etkinliği *PvIQD* genlerinde belirlenmiştir. *PvIQD5* ve *PvIQD10* en fazla gen çifti etkinliği gösteren genlerdir. Sonuçlar, tandem duplikasyon etkinliklerine kıyasla segmental duplikasyon etkinliklerinin *PvIQD* gen ailesinin evrimi için itici bir rol oynadığını düşündürmektedir.



Şekil 4.5 Circos diagramı

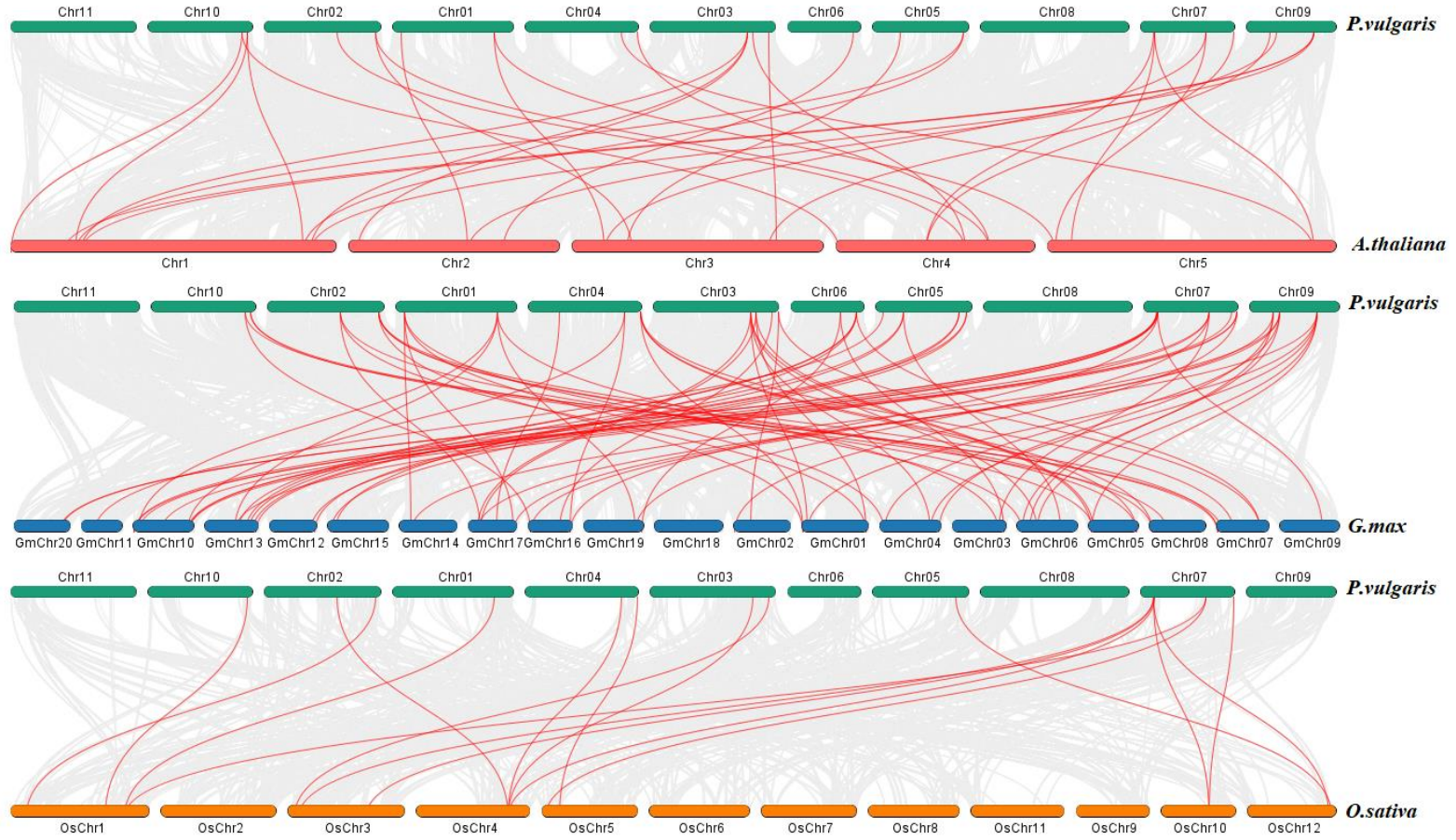
IQD gen ailesinin evrimsel ilişkileri hakkında daha fazla bilgi edinebilmek için K_a/K_s (sinonim olmayan / sinonim) oranı hesaplanmıştır. K_a/K_s oranı gen seleksiyon baskısını yansıtır; $K_a/K_s > 1$ ise pozitif seçilim, $K_a/K_s < 1$ ise saflaştırıcı seçilim ve $K_a/K_s = 1$ ise nötral seçilimi belirtir. Tüm *PviQD* gen çiftleri için $K_a/K_s < 1$ 'dir (Çizelg 4.3).

Çizelge 4.4 *PvIQD* genlerinin Ka/Ks sonucu (NaN = Sonuç yok)

Gen_1	Gen_2	Ka	Ks	Ka/Ks
PvIQD1	PvIQD31	0,163124149	0,733800774	0,222300322
PvIQD1	PvIQD34	0,454906718	1,638738392	0,277595692
PvIQD3	PvIQD26	0,166753925	0,789669732	0,211169199
PvIQD5	PvIQD10	0,300787567	0,977586917	0,307683708
PvIQD5	PvIQD14	0,519221272	1,861278448	0,278959482
PvIQD5	PvIQD24	0,515025036	1,997048197	0,257893143
PvIQD6	PvIQD15	0,168467638	0,77042433	0,218668637
PvIQD9	PvIQD32	0,19868443	0,526728082	0,377204932
PvIQD10	PvIQD14	0,522579846	NaN	NaN
PvIQD10	PvIQD24	0,500036212	1,996186248	0,25049577
PvIQD19	PvIQD31	0,366445034	1,964258151	0,186556454
PvIQD23	PvIQD28	0,175033303	0,670338934	0,261111647

4.7 *PvIQD* Genlerinin Ortolog İlişkileri

IQD gen ailesinin fasulye ve diğer türler ile evrimsel ilişkilerini anlamak için *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* ve *Oryza sativa* ile sentenik haritalar oluşturulmuştur (Şekil 4.6). Toplamda 28 *PvIQD* geni sentenik ilişki göstermiş ve bunlardan 11 *PvIQD* geni üç türde ortak bulunmuştur. En yüksek ilişki 77 ortolog gen çifti ile fasulye ve soya fasulyesi arasında bulunmuştur. En düşük ilişki ise 17 ortolog gen çifti ile fasulye ve pirinç arasında bulunmuştur. Fasulye ve *Arabidopsis* arasında ise 32 ortolog gen çifti ilişkisi bulunmuştur. *PvIQD3*, *PvIQD5*, *PvIQD6*, *PvIQD10*, *PvIQD11*, *PvIQD14*, *PvIQD23*, *PvIQD24*, *PvIQD26*, *PvIQD28* ve *PvIQD34* fasulye ve üç tür arasında sentenik ilişki gösteren ortak genlerdir. Fasulye ve soya fasulyesi arasında *PvIQD9* altı ortolog gen çifti ile en fazla etkinlik gösteren gen iken, fasulye ve *Arabidopsis* arasında *PvIQD9* ve *PvIQD32* üç ortolog gen çifti ile en fazla etkinlik gösteren genlerdir. Fasulye ve pirinç arasında ise *PvIQD23* dört ortolog gen çifti ile en yüksek etkinlik gösteren genidir. Sonuçlar, *PvIQD* genlerinin *IQD* gen ailesinin evrimsel sürecinde rol oynayabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.6 Türler arası sinteni haritaları

IQD gen ailesinin ortolog ilişkileri hakkında daha fazla bilgi edinebilmek için Ka/Ks (sinonim olmayan/sinonim) oranı hesaplanmıştır. Tüm ortolog çiftler $Ka/Ks < 1$ sonucunu vermiştir (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). Sonuçlar, *IQD* gen ailesinin evrimsel süreçte güçlü arındırıcı seçilim altında geçirdiğinin göstermektedir.

Çizelge 4.5 Fasulye ve Arabidopsis arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks sonucu (NaN = Sonuç yok)

Gen_1	Gen_2	Ka	Ks	Ka/Ks
PvIQD33	AT1G01110.2	0,30267126	3,733479603	0,081069483
PvIQD34	AT1G72670.1	0,442004983	3,002767645	0,147199196
PvIQD34	AT1G17480.1	0,421620962	2,008279288	0,209941398
PvIQD33	AT4G00820.1	0,289242688	2,632744724	0,109863552
PvIQD6	AT3G16490.1	0,317753304	NaN	NaN
PvIQD5	AT4G23060.1	0,50168213	NaN	NaN
PvIQD6	AT4G29150.1	0,393471612	NaN	NaN
PvIQD1	AT2G26180.1	0,227788252	NaN	NaN
PvIQD3	AT3G09710.2	0,408332528	2,972008429	0,137392789
PvIQD3	AT5G03040.1	0,342693658	2,469886145	0,138748767
PvIQD2	AT4G29150.1	0,380435852	NaN	NaN
PvIQD14	AT5G62070.1	0,387270246	4,092863207	0,094620862
PvIQD9	AT1G74690.1	0,409230021	1,527364944	0,267932051
PvIQD9	AT1G18840.1	0,478414795	2,163085017	0,221172442
PvIQD9	AT2G02790.1	0,562981004	3,000159412	0,187650364
PvIQD11	AT3G51380.1	0,334894946	1,444432112	0,231852327
PvIQD10	AT4G23060.1	0,399705042	3,251571307	0,122926734
PvIQD22	AT2G33990.1	0,332437689	1,81905843	0,182752617
PvIQD19	AT1G17480.1	0,39769622	2,923747259	0,136022777
PvIQD19	AT1G72670.1	0,382958515	2,417358581	0,158420235
PvIQD17	AT3G15050.1	0,414512874	NaN	NaN
PvIQD26	AT3G09710.2	0,440738112	NaN	NaN
PvIQD23	AT4G14750.1	0,325770409	NaN	NaN
PvIQD28	AT4G14750.1	0,320684324	NaN	NaN
PvIQD26	AT5G03040.1	0,376486328	3,018813848	0,12471333
PvIQD24	AT5G07240.1	0,448658501	NaN	NaN
PvIQD24	AT5G62070.1	0,446963584	NaN	NaN
PvIQD32	AT1G18840.1	0,453923148	2,338687385	0,194093127
PvIQD32	AT1G74690.1	0,429382609	1,230941781	0,348824465
PvIQD32	AT1G14380.1	0,552563535	2,714485795	0,203561034
PvIQD31	AT2G26180.1	0,2542025	2,669440737	0,095226875
PvIQD30	AT3G49260.3	0,331520061	NaN	NaN

Çizelge 4.6 Fasulye ve soya fasulyesi arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks oranı (NaN = Sonuç yok)

Gen_1	Gen_2	Ka	Ks	Ka/Ks
PvIQD34	Glyma.07G008400.1	0,064590155	0,19836707	0,325609263
PvIQD34	Glyma.08G191400.1	0,074835788	0,192201112	0,389361887
PvIQD33	Glyma.16G019700.1	0,033725769	0,223715442	0,150752977
PvIQD5	Glyma.01G217200.1	0,147539399	0,374966964	0,39347306
PvIQD6	Glyma.01G007000.1	0,148071011	0,730505153	0,202696737
PvIQD6	Glyma.05G226100.1	0,050650875	0,357517835	0,1416737
PvIQD5	Glyma.05G049000.1	0,304705353	0,837673344	0,363751999
PvIQD6	Glyma.07G014800.1	0,239454949	1,85594796	0,129020293
PvIQD6	Glyma.08G033100.1	0,041131473	0,421374872	0,097612543
PvIQD5	Glyma.17G130900.1	0,292383459	0,807883892	0,361912723
PvIQD3	Glyma.03G178200.1	0,059980024	0,238669642	0,251309818
PvIQD1	Glyma.04G052200.1	0,160956336	0,785304003	0,204960544
PvIQD1	Glyma.06G052800.1	0,167276604	0,71379452	0,234348401
PvIQD3	Glyma.10G050000.2	0,143323817	0,556770873	0,257419747
PvIQD3	Glyma.13G137500.1	0,147819587	0,570018157	0,259324348
PvIQD1	Glyma.14G097000.1	0,055144344	0,381939509	0,144379785
PvIQD1	Glyma.17G227400.1	0,058086533	0,357869308	0,162312138
PvIQD3	Glyma.19G179000.1	0,055493809	0,255180814	0,21746858
PvIQD15	Glyma.01G007000.1	0,071338695	0,290067626	0,245938148
PvIQD15	Glyma.05G226100.1	0,197061754	0,714911425	0,275644992
PvIQD15	Glyma.07G124900.1	0,124816555	0,38053968	0,327998791
PvIQD15	Glyma.08G033100.1	0,177373266	0,713176074	0,248708941
PvIQD14	Glyma.10G238300.1	0,176965789	0,692047555	0,255713336
PvIQD14	Glyma.16G196900.1	0,070724504	0,345733364	0,204563724
PvIQD13	Glyma.17G185200.1	0,058731497	0,295466234	0,198775665
PvIQD10	Glyma.01G217200.1	0,198495783	0,736516269	0,269506312
PvIQD9	Glyma.01G043800.3	0,537513103	2,192371186	0,245174315
PvIQD9	Glyma.02G138000.1	0,032593123	0,218696762	0,149033405
PvIQD9	Glyma.04G173100.1	0,189602724	0,507035966	0,373943342
PvIQD9	Glyma.05G028600.1	0,065827457	0,218943393	0,300659709
PvIQD10	Glyma.05G049000.1	0,061551138	0,310699754	0,198104881
PvIQD9	Glyma.06G191200.1	0,177192568	0,508906717	0,348182805
PvIQD12	Glyma.07G207300.1	0,03392325	0,178350532	0,190205487
PvIQD11	Glyma.16G121000.1	0,108106985	0,344080246	0,314191197
PvIQD10	Glyma.17G130900.1	0,063795488	0,378817439	0,168406947
PvIQD9	Glyma.17G098200.1	0,07418721	0,244643945	0,303245639
PvIQD21	Glyma.03G246200.1	0,089812956	0,251241709	0,357476297
PvIQD22	Glyma.07G204000.1	0,16252594	0,569429942	0,285418675
PvIQD22	Glyma.13G232700.2	0,054322378	0,224518952	0,24195008
PvIQD22	Glyma.13G172000.4	0,160566965	0,548165631	0,292916877

Çizelge 4.7 Fasulye ve soya fasulyesi arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks oranı (NaN = Sonuç yok) (devam)

PvIQD22	Glyma.15G080000.1	0,053541789	0,1991732	0,268820248
PvIQD21	Glyma.19G243700.1	0,091900752	0,302135479	0,304170674
PvIQD17	Glyma.06G232400.1	0,191938348	0,792877421	0,242078212
PvIQD16	Glyma.11G149200.1	0,071613365	0,163605491	0,437719815
PvIQD18	Glyma.12G189900.1	0,058318136	0,226812549	0,257120412
PvIQD17	Glyma.12G228200.2	0,106564736	0,351017643	0,303587977
PvIQD18	Glyma.13G311700.1	0,06377213	0,216123856	0,295072145
PvIQD19	Glyma.13G348400.6	0,075317535	0,293460355	0,256653184
PvIQD17	Glyma.13G271800.1	0,07671197	0,301660937	0,254298652
PvIQD19	Glyma.15G025400.1	0,07193155	0,234592222	0,306623764
PvIQD28	Glyma.02G004600.1	0,080654399	0,256079924	0,314957913
PvIQD26	Glyma.03G178200.1	0,153104943	0,620627079	0,246693947
PvIQD24	Glyma.09G143900.1	0,173934128	0,76085555	0,228603351
PvIQD26	Glyma.10G050000.2	0,059249113	0,279898518	0,211680694
PvIQD27	Glyma.10G106000.1	0,071136311	0,198166662	0,35897214
PvIQD24	Glyma.10G238300.1	0,069010318	0,293643713	0,235013777
PvIQD23	Glyma.10G245000.1	0,071323741	0,187439642	0,380515776
PvIQD28	Glyma.10G003700.1	0,080773735	0,303989222	0,265712496
PvIQD23	Glyma.10G003700.1	0,195432803	0,71532598	0,273208032
PvIQD28	Glyma.10G245000.1	0,160066467	0,628113037	0,254837041
PvIQD26	Glyma.13G137500.1	0,057794336	0,259979746	0,222303226
PvIQD24	Glyma.16G196900.1	0,170071136	0,641540963	0,26509786
PvIQD26	Glyma.19G179000.1	0,147732719	0,665496449	0,221988741
PvIQD23	Glyma.20G149600.1	0,06917113	0,217497443	0,318031922
PvIQD24	Glyma.20G156200.1	0,059347554	0,260287319	0,228007857
PvIQD32	Glyma.01G043800.3	0,559421125	1,939770346	0,288395544
PvIQD31	Glyma.04G052200.1	0,053195821	0,254332635	0,209158456
PvIQD32	Glyma.04G173100.1	0,097883062	0,199263691	0,491223773
PvIQD30	Glyma.04G235400.1	0,05610091	0,336486755	0,166725462
PvIQD32	Glyma.05G028600.1	0,172258816	0,464620396	0,370751731
PvIQD31	Glyma.06G052800.1	0,067187178	0,27159613	0,247378996
PvIQD32	Glyma.06G191200.1	0,090112178	0,190897399	0,472045082
PvIQD30	Glyma.06G129300.1	0,06949852	0,329928635	0,210647131
PvIQD31	Glyma.14G097000.1	0,171489357	0,855790562	0,200387062
PvIQD30	Glyma.16G019700.1	0,625548284	NaN	NaN
PvIQD31	Glyma.17G227400.1	0,166541369	0,809978054	0,205612199
PvIQD32	Glyma.17G098200.1	0,17713055	0,502589885	0,352435565

Çizelge 4.8 Fasulye ve pirinç arasında meydana gelen ortolog gen çiftleri ve Ka/Ks sonucu (NaN = Sonuç yok)

Gen_1	Gen_2	Ka	Ks	Ka/Ks
PvIQD34	LOC_Os01g51230.1	0,515262635	NaN	NaN
PvIQD6	LOC_Os01g09470.1	0,409582739	NaN	NaN
PvIQD5	LOC_Os04g48160.1	0,528749015	NaN	NaN
PvIQD3	LOC_Os01g61720.8	0,41697227	NaN	NaN
PvIQD14	LOC_Os04g48160.1	0,493827974	NaN	NaN
PvIQD15	LOC_Os05g09520.1	0,443682257	NaN	NaN
PvIQD11	LOC_Os03g04210.1	0,501473118	NaN	NaN
PvIQD10	LOC_Os04g48160.1	0,475982154	NaN	NaN
PvIQD18	LOC_Os12g42430.1	0,454890262	4,17814546	0,10885484
PvIQD26	LOC_Os01g61720.8	0,422108685	NaN	NaN
PvIQD23	LOC_Os10g28420.1	0,412998555	NaN	NaN
PvIQD28	LOC_Os10g28420.1	0,407846732	NaN	NaN
PvIQD23	LOC_Os12g41160.1	0,539960642	NaN	NaN
PvIQD23	LOC_Os03g06570.1	0,427857324	NaN	NaN
PvIQD23	LOC_Os03g43580.1	0,423770747	NaN	NaN
PvIQD24	LOC_Os04g48160.1	0,434593729	NaN	NaN
PvIQD26	LOC_Os05g03190.1	0,341059681	4,070362679	0,083790981

4.8 miRNA'ların Hedefledikleri *PvIQD* Genleri

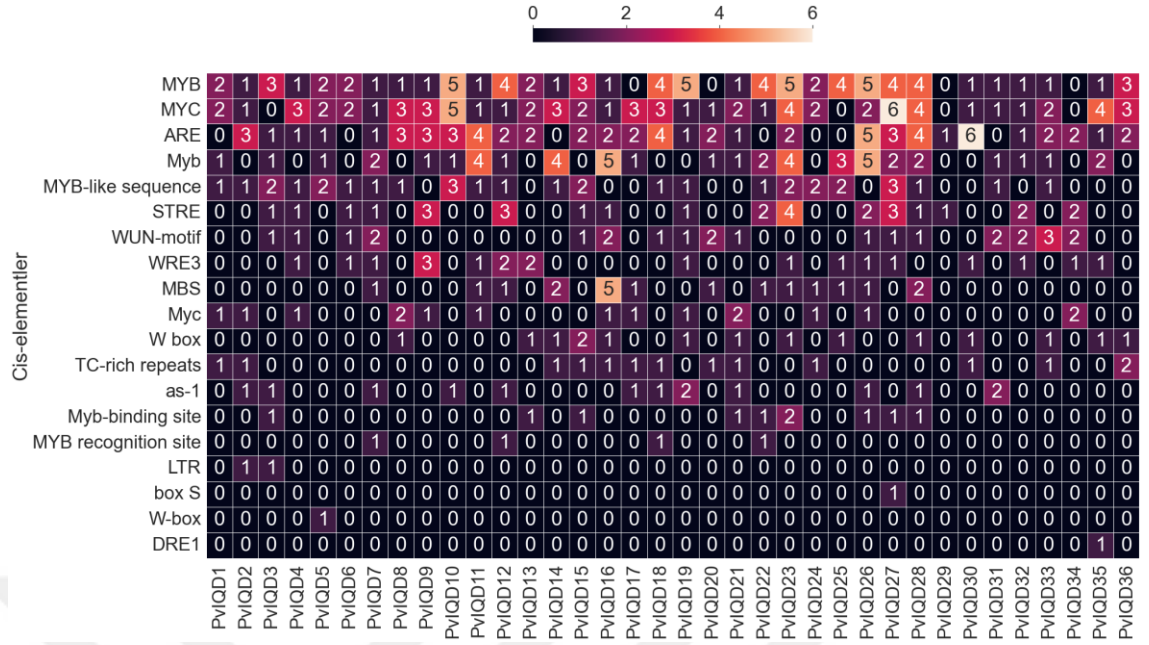
miRNA'lar gen ekspresyon regülasyonunda rol oynayan küçük-kodlayıcı-olmayan RNA'ların bir sınıfıdır. Bitki gelişim ve büyüme süreçlerinde, çevresel streslere karşı yanıtta önemli roller üstlenir (J. Wang vd., 2019). miRNA'ların *IQD* gen ailesi üzerinde etkinliklerinin anlaşılması için miRNA tahmini gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.7). Sonuçlar, 19 *PvIQD* geninin 20 farklı miRNA ailesi tarafından hedeflendiğini göstermiştir (Şekil 4.7). *PvIQD13* (Pvu-miR156a/Pvu-miR157a/Pvu-miRN2588a), *PvIQD25* (Pvu-miR164a/Pvu-miR162/Pvu-miR4415) ve *PvIQD6* (Pvu-miR395a/Pvu-miR395h/Pvu-miR4415) en fazla miRNA tarafından hedeflenen genlerdir. Pvu-miRN2588a ise en fazla *PvIQD* (*PvIQD3/2/36/20/26/13*) geni hedefleyen miRNA'dır.

Çizelge 4.9 miRNA-hedef gen tahmin verileri

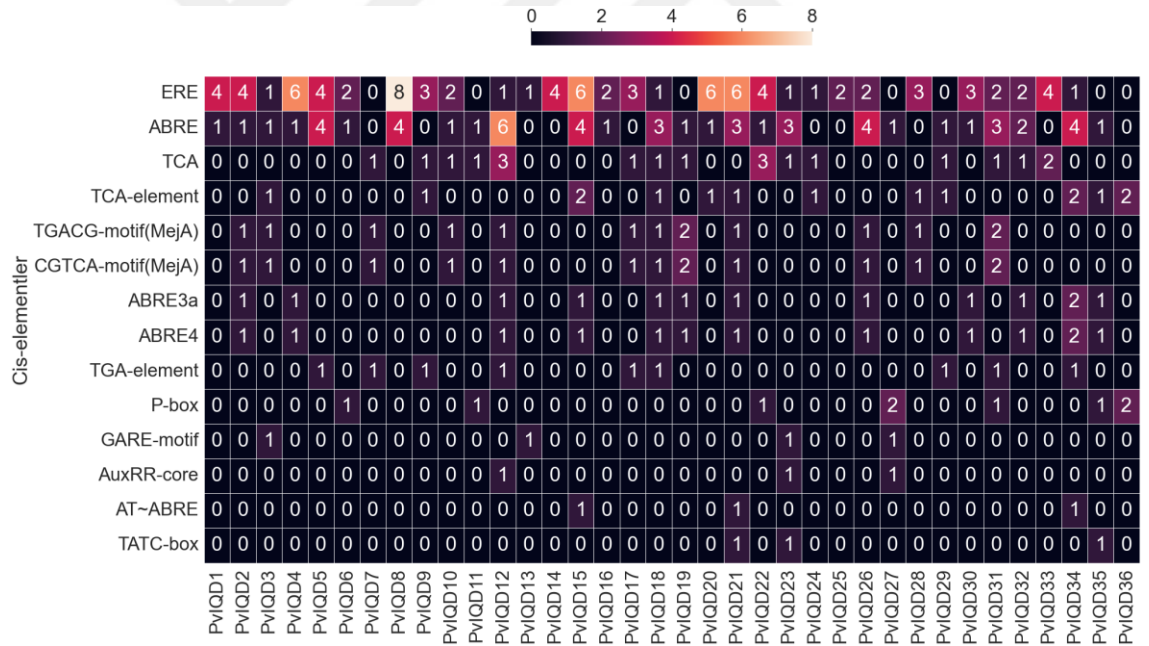
miRNA	Hedef	Beklenti	Başlangıç-Bitiş	miRNA Sekans	Hizalama	Hedef Sekans
Pvu-miR164a	PvIQD25	3.0	1372-1392	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	: : : :::::::::::	CUCUCUUUCCCUGCUUCUCCA
Pvu-miR156a	PvIQD13	4.0	64-82	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	::::: :..: ::::	UUGCUCUUUUUCUUGUCA
Pvu-miR2118	PvIQD33	4.0	1402-1423	UUGCCGAUUCCACCCAUUCCUA	::: ::::::: :::	AGGGACAGGGUGGGAUCAGCAA
Pvu-miRN2588a	PvIQD36	4.0	72-92	CAUUUGUUUCUUCUCUCCUU A	:::::: ::::: :::::	UAAGGAGA-AAAGAAGGAAAUG
				CAUUUGUUUCUUCUCUCCUU A	: ::::: : ::::: :	UGGGGAGAAAAGGAAGCAGCU G
Pvu-miRN2588a	PvIQD2	4.0	2-23	CAUUUGUUUCUUCUCUCCUU A	: ::::: : ::::: :	UGGGGAGAAAAGGAAGCAGCU G
Pvu-miRN2590	PvIQD19	4.0	445-465	UUUUGGACAAUCCAUGCACC	: .. ::::: :::::	AAUGUGAGGAAUUCUCCAGAA
Pvu-miR164a	PvIQD2	4.5	904-924	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	: :.. : ::::::::::	UACAUGACUCAUGCUUCUCCA
Pvu-miR2111a	PvIQD19	4.5	728-747	UAAUCUGCAUCCUGAGGUUU	:: ::::::::::: ::	AGAGCUUAGGAUGUAGCUUG
Pvu-miR395h	PvIQD6	4.5	137-157	UUGAAGUGUUUGGAGGAACUC	:::::: :..:::	CCAUUCCUCCCAAUAUUUCAC
Pvu-miRN2585	PvIQD34	4.5	1263-1283	UUGAUUUCCAUAUAUAUUUA	: ::::: ::::::: ::	GCGAUUAACAAUGGAAGAUAA
Pvu-miR157a	PvIQD13	5.0	64-84	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	::::: : : :: :::::	UUGCUCUUUUUCUUGUCA
Pvu-miR162	PvIQD25	5.0	419-439	UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG	: : : ::::::: ::	GAGGCUUGAGAGGUUUGGCCA
Pvu-miR172c	PvIQD33	5.0	631-651	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	: ::::: ::::::: :	UCGCGGUAUCUUCAGGAUAUU
Pvu-miR393a	PvIQD21	5.0	1093-1113	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC	: . :::::::::::	AGCAAGCGCGAUUCCUUGGC
Pvu-miR394a	PvIQD17	5.0	650-669	UUGGCAUUCUGUCCACCUCC	::: ::::::: :....	GGAGCUGGACAGAGCGUUGG

Çizelge 4.10 miRNA-hedef gen tahmin verileri (devam)

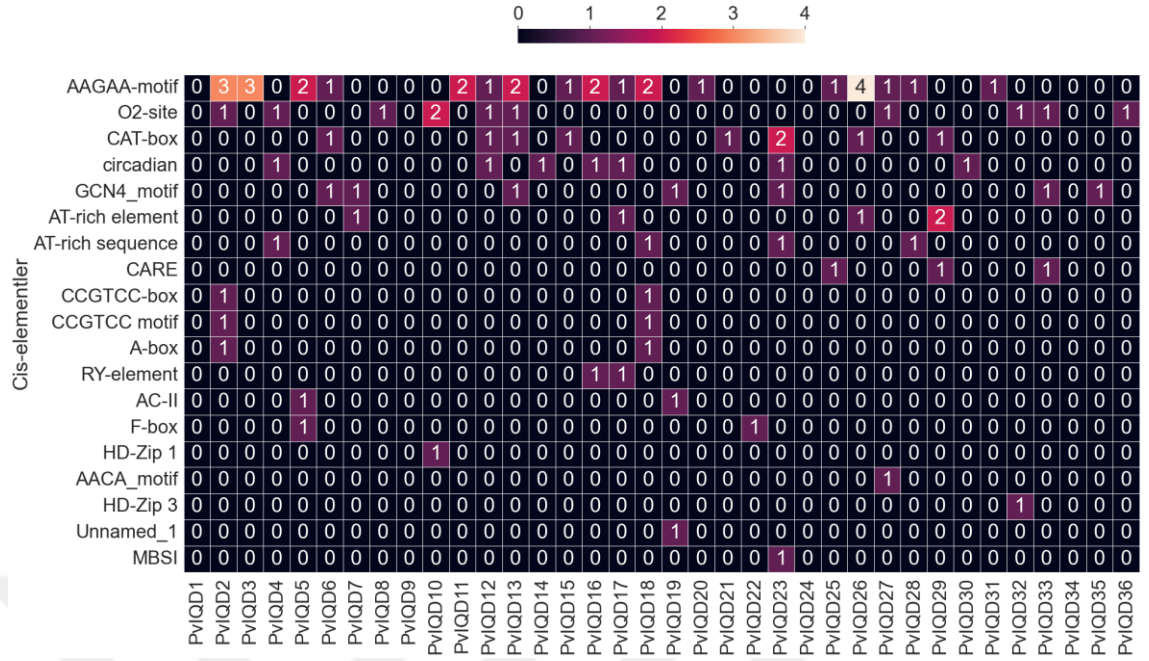
Pvu-miR394a	PvIQD12	5.0	556-575	UUGGCAUUCUGUCCACCUCC	::: ::::: ::	GUAAGAGGACAGAAUGUGAA
Pvu-miR395a	PvIQD6	5.0	136-156	UGAAGUGUUUGGGGAACUCU	::::: :::::	ACCAUCCUCCCAAUAUUUCA
Pvu-miR396a	PvIQD1	5.0	475-495	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG	: ::::: ::	CUCUACAAGGAAGCUGAGGAU
Pvu-miR396a	PvIQD31	5.0	529-549	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG	:: :: ::::: ::	CUUUUGAAGCAAGCUGAGGAA
Pvu-miR398a	PvIQD15	5.0	158-178	UUGUGUUCUCAGGUCACCCCU	:: :: ::::: ::	CAGGUUGUUCUGAGAGUACUA
Pvu-miR4415	PvIQD3	5.0	551-570	UUGAUUCUCAUCACAACAUGU	::::: :: :::::	GAAUGUUG-GAGGAGAAUCAG
Pvu-miR4415	PvIQD25	5.0	551-570	UUGAUUCUCAUCACAACAUGU	::::: :: :::::	GAAUGUC-UGAGGAGAAUCAG
Pvu-miR530	PvIQD11	5.0	243-263	UGCAUUUGCACCUGCGCUUUG	::: :: ::::: ::	GAAAGGGCUGGUGAAGGUGCA
Pvu-miRN2587	PvIQD20	5.0	83-103	UCUUCUCUCUAUUGUCACCUU	::::: ::::: ::	CCCCUGACAAGAGAGAAAAGA
Pvu-miRN2588a	PvIQD26	5.0	835-856	CAUUUGUUUCUUUCUCUCCUU A	::::: ::::: ::	CUGAUGGAGAAAGAGAAGAAU G
Pvu-miRN2588a	PvIQD20	5.0	189-210	CAUUUGUUUCUUUCUCUCCUU A	:: :: ::::: ::	GGGUGUGAAGAAGAAACAAGU U
Pvu-miRN2588a	PvIQD13	5.0	732-753	CAUUUGUUUCUUUCUCUCCUU A	:: :: ::::: ::	UUUGCAGUCAAGGAGCAAAUU
Pvu-miRN2588a	PvIQD3	5.0	865-886	CAUUUGUUUCUUUCUCUCCUU A	:: ::::: :::::	CAGAUGGAUAAAGAGAUGAAU G
Pvu-miRN2590	PvIQD27	5.0	568-588	UUUUGGACAAUCCAUGCACC	:: ::::: :: :::	UCUGAAUGGGAUAGUCAAGA
Pvu-miRN2592	PvIQD21	5.0	384-404	UGUAAUCUGAUUGAGCCGCGU	:: :: ::::: :::::	AAGGGGAUUAGUCAAGUUACA
Pvu-miRN2599	PvIQD6	5.0	1104-1124	UUCUUUCAAACAGGCCCUAG	::: ::::: :: :::::	UCCAGAUCUGGUUCAAGAA



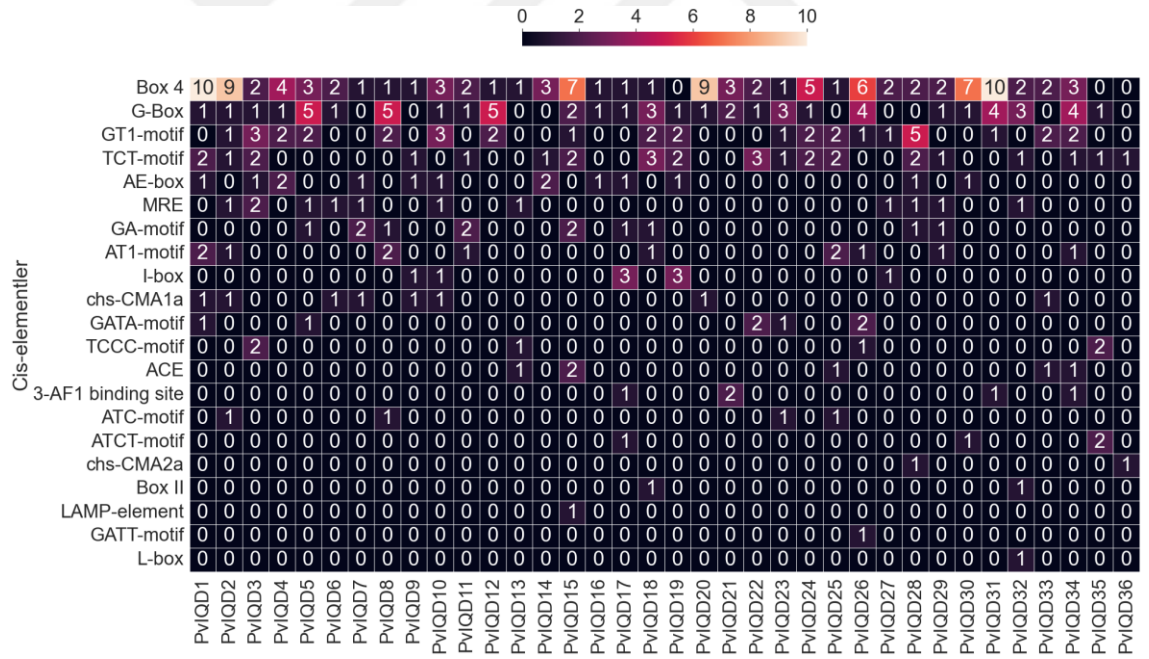
Şekil 4.8 *PvIQD* genlerinde bulunan stres ilgili cis elementler ve sayıları



Şekil 4.9 *PvIQD* genlerinde bulunan hormon ilgili cis elementler ve sayıları



Şekil 4.10 *PvIQD* genlerinde bulunan gelişim/büyüme ilgili cis elementler ve sayıları



Şekil 4.11 *PvIQD* genlerinde bulunan ışık ilgili cis elementler ve sayıları

4.10 PvIQD Proteinlerinin Hücre Altı Lokalizasyonu

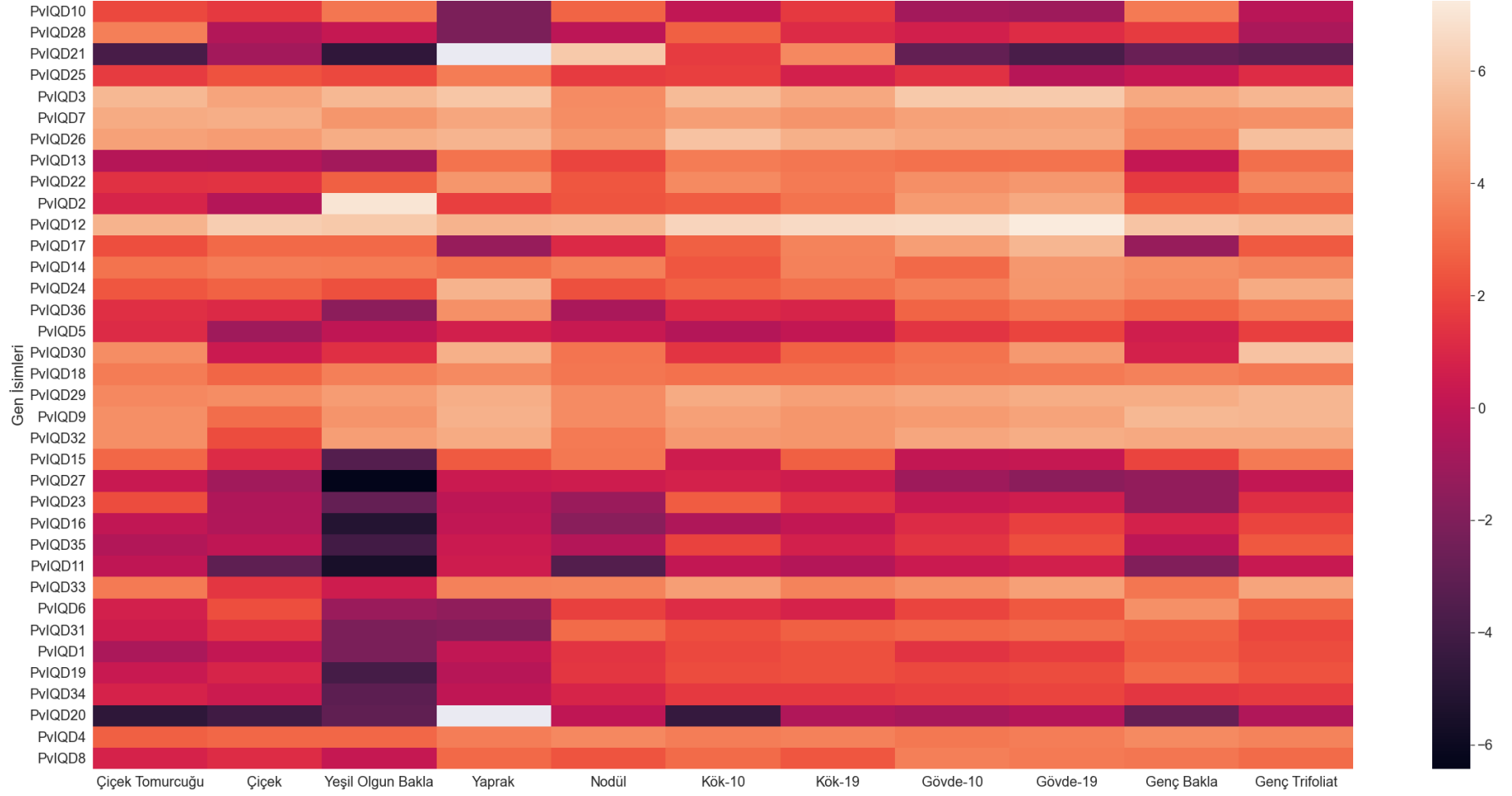
PvIQD proteinlerinin hücre altı lokalizasyon tahmini, WOLFPsort kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.8). Hücre altı lokalizasyon tahmini PvIQD proteinlerinin yüksek oranda çekirdekte bulunduğunu göstermiştir. PvIQD8, PvIQD10 ve PvIQD23 en fazla farklı yerde bulunan proteinlerdir.

Çizelge 4.11 PvIQD proteinlerinin hücre altı lokalizasyon tahmini

Protein İsmi	Hücre Altı Lokalizasyon Tahmini
PvIQD1	nucl: 12, cysk: 2
PvIQD2	nucl: 11, chlo: 1, plas: 1, cysk: 1
PvIQD3	nucl: 12, plas: 2
PvIQD4	nucl: 11, plas: 2.5, golg_plas: 2
PvIQD5	nucl: 12, plas: 1, cysk: 1
PvIQD6	nucl: 11, mito: 2, plas: 1
PvIQD7	nucl: 13, golg_plas: 1
PvIQD8	nucl: 6, chlo: 4, plas: 1.5, golg_plas: 1.5, mito: 1, cysk: 1
PvIQD9	nucl: 12, cyto: 1, golg: 1
PvIQD10	chlo: 5, nucl: 2.5, mito: 2, E.R.: 2, cysk_nucl: 2, plas: 1, extr: 1
PvIQD11	mito: 7.5, chlo_mito: 6, chlo: 3.5, nucl: 2, cyto: 1
PvIQD12	nucl: 11.5, cyto_nucl: 6.5, mito: 1, plas: 1
PvIQD13	vacu: 10, extr: 2, chlo: 1, golg: 1
PvIQD14	chlo: 5, mito: 4, golg: 2, nucl: 1, plas: 1, extr: 1
PvIQD15	vacu: 8, chlo: 3, golg: 2, extr: 1
PvIQD16	chlo: 6, nucl: 6, mito: 1, cysk: 1
PvIQD17	nucl: 13, cyto: 1
PvIQD18	nucl: 11, chlo: 1, cyto: 1, cysk: 1
PvIQD19	chlo: 5, nucl: 3, mito: 3, cyto: 1, plas: 1, cysk: 1
PvIQD20	nucl: 13, plas: 1
PvIQD21	nucl: 11.5, cyto_nucl: 6.5, plas: 1.5, golg_plas: 1.5
PvIQD22	nucl: 9.5, cyto_nucl: 5.5, chlo: 2, mito: 1, plas: 1
PvIQD23	chlo: 4, nucl: 4, mito: 2, cyto: 1.5, cyto_pero: 1.5, vacu: 1, golg: 1
PvIQD24	chlo: 6, mito: 3, nucl: 2, golg: 2, plas: 1
PvIQD25	mito: 6, chlo: 5, nucl: 1, cyto: 1, vacu: 1
PvIQD26	nucl: 13, plas: 1
PvIQD27	nucl: 9.5, cyto_nucl: 5.5, mito: 3, golg_plas: 1
PvIQD28	nucl: 12, mito: 1, cysk: 1
PvIQD29	nucl: 14
PvIQD30	nucl: 13, plas: 1
PvIQD31	nucl: 12, chlo: 1, plas: 1
PvIQD32	nucl: 6, cyto: 4, chlo: 2, mito: 1, golg_plas: 1
PvIQD33	nucl: 11, chlo: 3
PvIQD34	nucl: 9, mito: 2, chlo: 1, cyto: 1, cysk: 1
PvIQD35	nucl: 14
PvIQD36	nucl: 7, mito: 3.5, cyto_mito: 2.5, chlo: 2, cysk: 1

4.11 *PvIQD* Genlerinin Dokuya Özgü mRNA Seviyeleri

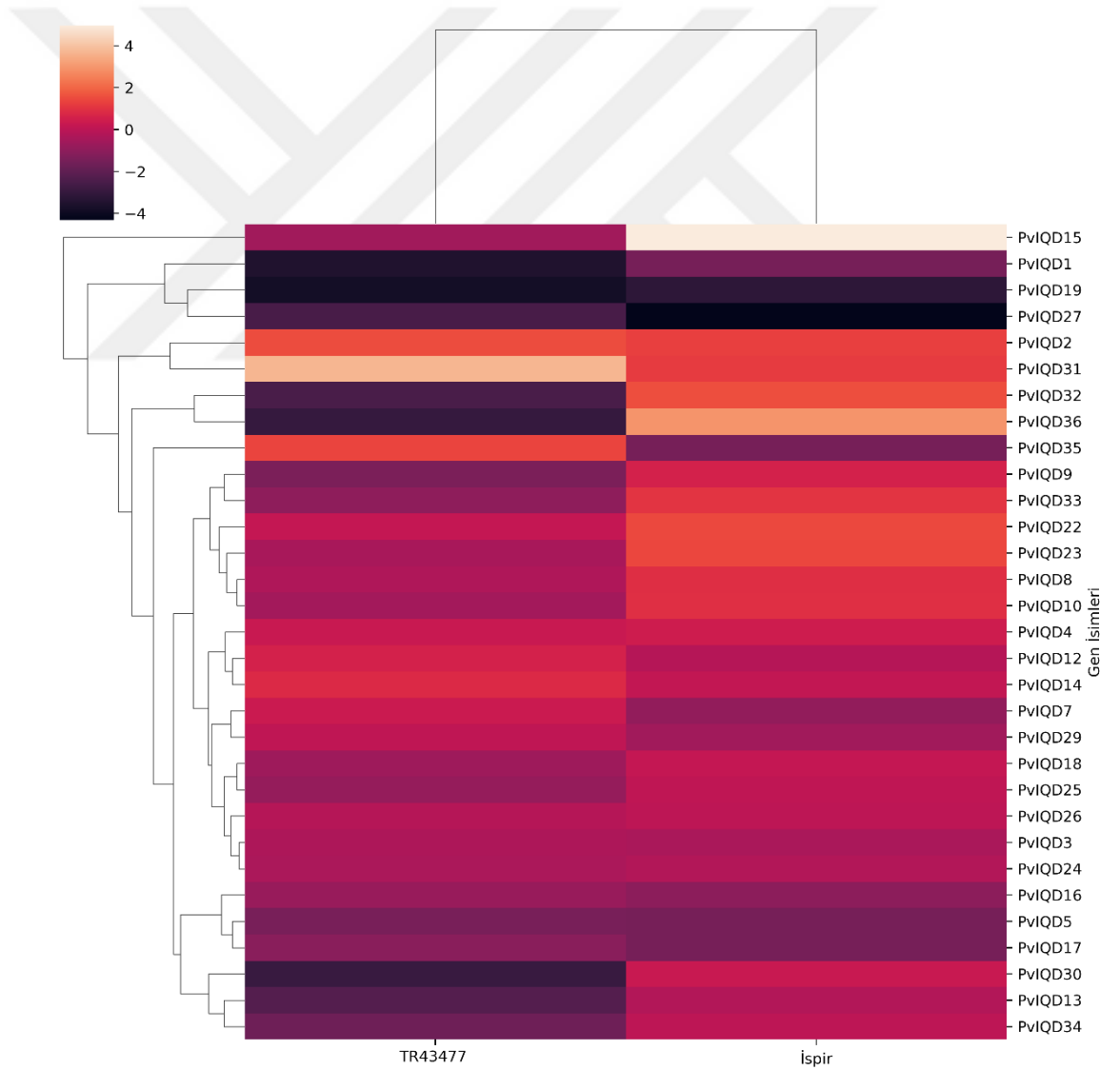
Farklı dokuların ekspresyon seviyelerini araştırmak için *IQD* gen ailesinin dokuya-özü ekspresyon seviyeleri Phytozome v13 veri tabanı kullanılarak indirilmiştir. Ekspresyon seviyeleri $\log_2$ formatına çevrildikten sonra ısı haritası çizilmiştir (Şekil 4.12). Bulgular, farklı dokularda çoğunlukla değişen ifade seviyelerini ortaya çıkarmıştır. 15 *PvIQD* (*PvIQD*3/7/26/22/12/14/24/30/18/29/9/32/33/4/8) geni tüm dokularda eksprese edilmiştir. Sürekli ekspresyon gösteren 12 *PvIQD* (*PvIQD*3/7/26/22/12/14/24/18/29/9/32/4) geni tespit edilmiştir. Tüm dokularda yüksek seviyede (FPKM>3) eksprese edilen 6 *PvIQD* (*PvIQD* 3/7/9/26/12/29) geni bulunmaktadır. Bunun aksine, 9 *PvIQD* (*PvIQD*20/27/21/11/35/5/16/23/28) geni diğer genlere oranla daha düşük seviyelerde eksprese edilmiştir. *PvIQD*30, *PvIQD*2 ve *PvIQD*6 genleri sırasıyla genç trifoliat, yeşil olgun bakla ve nodül dokularında en yüksek ekspresyonu gösterirken *PvIQD*3 çiçek tomurcuğı ve yaprakta en yüksek ekspresyonu göstermiştir. Geriye kalan 6 dokuda (gövde-10, gövde-19, çiçek, genç bakla, kök-10, kök-19) *PvIQD*12 en yüksek ekspresyonu sergileyen gendir. Ayrıca, bazı genler (Örneğin, *PvIQD*17/2/32/30/24/2/33) dokuya özü yüksek ekspresyon seviyeleri göstermiştir. *PvIQD* genlerinin genç trifoliat, kök-10, kök-19 gövde-10, gövde-19 ve çiçek tomurcuğı dokularındaki ekspresyon seviyeleri diğer dokulara oranla daha yüksektir. Sonuçlar *IQD* gen ailesinin farklı dokularda çeşitli ekspresyon seviyeleri göstererek bitki büyüme ve gelişiminde önemli roller oynayabileceğini sunmaktadır.



Şekil 4. 12 *PvIQD* genlerinin farklı dokulardaki ekspresyon profilleri

4.12 *PvIQD* Genlerinin Tuz Stresi Altında Ekspresyon Profilleri

NCBI SRA kullanılarak elde edilen RNA-seq verilerinin biyoinformatik akışı sonucunda İspir ve TR43477 çeşitlerinin tuz stresi altında yaprak dokusu ekspresyon profilleri incelenmiştir (Şekil 4.13). TR43477 çeşidi yaprak dokusu tuz stresi verileri, 6 *PvIQD* (*PvIQD4/7/12/14/22/29*) geninin $\log_2FC > 0$ olduğunu gösterirken 3 *PvIQD* (*PvIQD2/31/35*) geni için $\log_2FC > 1$ olduğunu göstermektedir. İspir çeşidinde ise 10 *PvIQD* (*PvIQD4/8/9/10/14/18/25/26/30/34*) geni $\log_2FC > 0$ iken 8 *PvIQD* (*PvIQD2/15/22/23/31/32/33/36*) geni $\log_2FC > 1$ 'dir.



Şekil 4.13 *PvIQD* genlerinin RNA-seq verilerinden elde edilen ekspresyon profilleri

4.13 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu FavorPrep™ Total RNA Mini Kit kullanılarak yapılmıştır. RNA'ların kalite ve konsantrasyon değerleri için Thermo Nano Spectrometer Lite cihazı ile ölçüm yapılmıştır (Çizelge 4.9). RNA örneklerinin ortalama saflık değerleri ~2.11'dir.

Çizelge 4.12 Tuz stresi ve kontrol grubu içeren RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri¹

RNA	KOD	SAFLIK(A260/280)	MİKTAR (ng/μl)
RNA1	ESY-1	2,07	126,4
RNA2	ESG-1	2,03	106
RNA3	ESK-1	2,12	70
RNA4	ESY-2	2,03	32,3
RNA5	ESG-2	2,09	86,9
RNA6	ESK-2	2,13	113,2
RNA7	ESY-3	2,07	101,9
RNA8	ESG-3	2,13	132,5
RNA9	ESK-3	2,11	53,3
RNA10	SSY-1	2,03	86
RNA11	SSG-1	2,1	56,1
RNA12	SSK-1	2,15	123,8
RNA13	SSY-2	2,08	249,7
RNA14	SSG-2	2,12	197,4
RNA15	SSK-2	2,09	112,2
RNA16	SSY-3	2,1	428
RNA17	SSG-3	2,02	49,7
RNA18	SSK-3	1,98	116,6
RNA19	EKY-1	2,14	131,2
RNA20	EKG-1	2,11	306
RNA21	EKK-1	2,14	70,4
RNA22	EKY-2	2,13	161,6
RNA23	EKG-2	2,16	277,6
RNA24	EKK-2	2,1	175,7
RNA25	EKY-3	2,18	224,3
RNA26	EKG-3	2,17	156,1
RNA27	EKK-3	2,1	117,7
RNA28	SKY-1	2,12	220,9
RNA29	SKG-1	2,15	194

¹ ESY: Elkoca Stres Yaprak, ESG: Elkoca Stres Gövde, ESK: Elkoca Stres Kök, SSY: Serra Stres Yaprak, SSG: Serra Stres Gövde, SSK: Serra Stres Kök, EKY: Elkoca Kontrol Yaprak, EKG: Elkoca Kontrol Gövde, EKK: Elkoca Kontrol Kök, SKY: Serra Kontrol Yaprak, SKG: Serra Kontrol Gövde, SKK: Serra Kontrol Kök

Çizelge 4.13 Tuz stresi ve kontrol grubu içeren RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri (devam)

RNA30	SKK-1	2,16	211,7
RNA31	SKY-2	2,13	213
RNA32	SKG-2	2,19	167
RNA33	SKK-2	2,15	124,9
RNA34	SKY-3	2,16	209,9
RNA35	SKG-3	2,14	231,4
RNA36	SKK-3	2,14	122,9

4.14 cDNA Sentezi

RNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen RNA'lardan cDNA elde etmek için iScript™ cDNA Sentez kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra cDNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri Thermo Nanospectrometer Lite cihazı ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.10). cDNA'ların ortalama saflık değeri ~1.87'dir.

Çizelge 4.14 Tuz stresi ve kontrol grubu içeren cDNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri¹

cDNA	KOD	SAFLIK(A260/280)	MİKTAR(ng/μl)
cDNA1	ESY-1	1,87	1125,5
cDNA2	ESG-1	1,86	1125,7
cDNA3	ESK-1	1,85	1243,6
cDNA4	ESY-2	1,81	915,7
cDNA5	ESG-2	1,86	1437
cDNA6	ESK-2	1,86	1190,7
cDNA7	ESY-3	1,86	882
cDNA8	ESG-3	1,88	1622,5
cDNA9	ESK-3	1,86	1376,4
cDNA10	SSY-1	1,86	1479,5
cDNA11	SSG-1	1,86	964,5
cDNA12	SSK-1	1,87	1513
cDNA13	SSY-2	1,86	1513,3
cDNA14	SSG-2	1,90	1429,6
cDNA15	SSK-2	1,87	1199

¹ ESY: Elkoca Stres Yaprak, ESG: Elkoca Stres Gövde, ESK: Elkoca Stres Kök, SSY: Serra Stres Yaprak, SSG: Serra Stres Gövde, SSK: Serra Stres Kök, EKY: Elkoca Kontrol Yaprak, EKG: Elkoca Kontrol Gövde, EKK: Elkoca Kontrol Kök, SKY: Serra Kontrol Yaprak, SKG: Serra Kontrol Gövde, SKK: Serra Kontrol Kök

Çizelge 4.10 Tuz stresi ve kontrol grubu içeren cDNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri (devam)

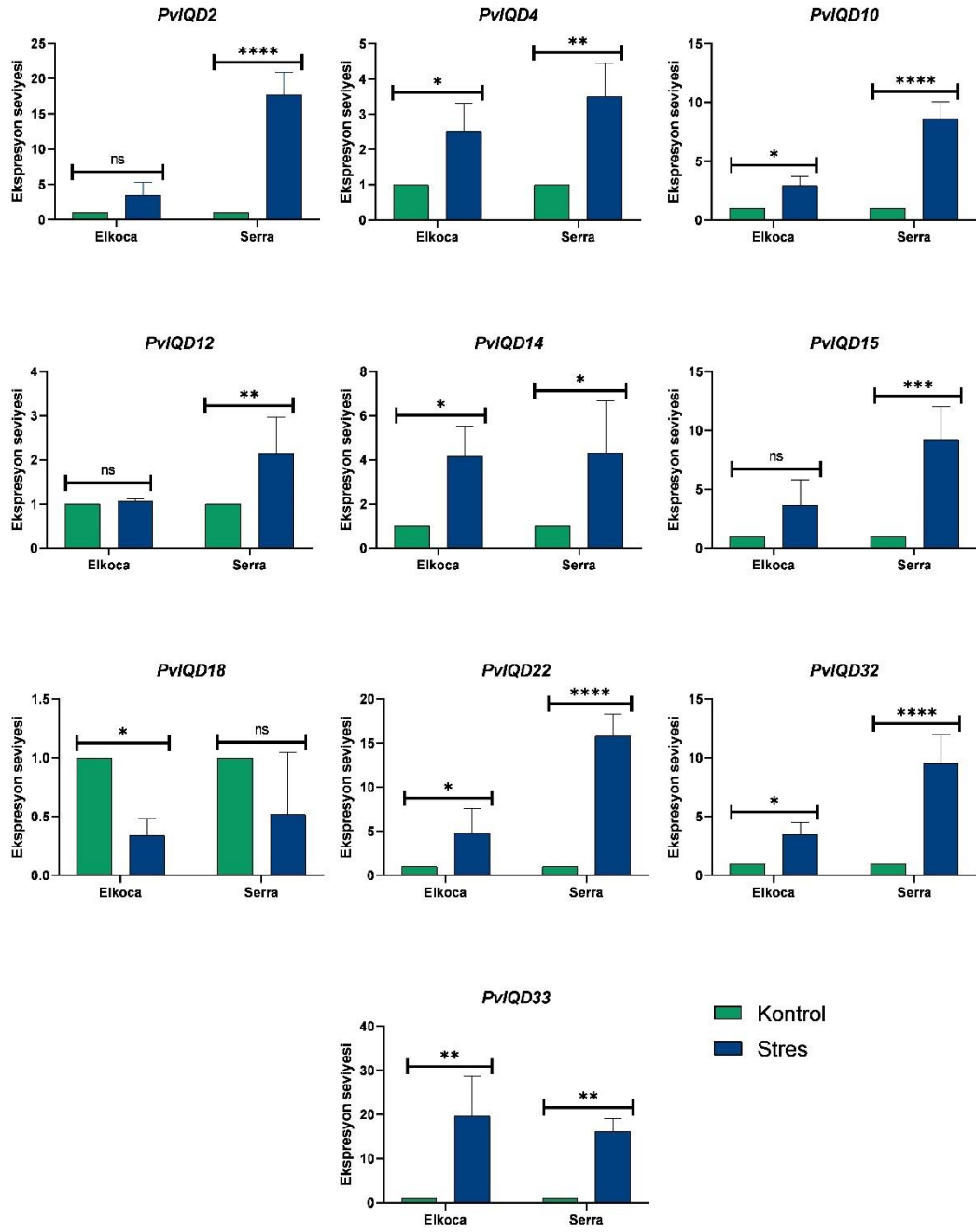
cDNA16	SSY-3	1,87	1486
cDNA17	SSG-3	1,84	1347
cDNA18	SSK-3	1,85	1270,1
cDNA19	EKY-1	1,86	1360
cDNA20	EKG-1	1,86	1540,2
cDNA21	EKK-1	1,86	632,5
cDNA22	EKY-2	1,86	1554,5
cDNA23	EKG-2	1,88	1428,4
cDNA24	EKK-2	1,87	1503,8
cDNA25	EKY-3	1,9	1560
cDNA26	EKG-3	1,87	1536
cDNA27	EKK-3	1,87	1238,5
cDNA28	SKY-1	1,9	1430,4
cDNA29	SKG-1	1,87	1488,5
cDNA30	SKK-1	1,86	1527
cDNA31	SKY-2	1,87	1542,7
cDNA32	SKG-2	1,87	1600
cDNA33	SKK-2	1,86	1174
cDNA34	SKY-3	1,87	1327,5
cDNA35	SKG-3	1,86	1462,1
cDNA36	SKK-3	1,87	1520

4.15 *PvIQD* Genlerinin Tuz Stresi Altında Ekspresyon Seviyeleri

PvIQD genlerinin tuz stresi altında yanıt mekanizmasını aydınlatmak amacıyla qPCR tabanlı ekspresyon seviyeleri ortaya çıkartılmıştır. RNA-seq verileri ve primer uygunluğu göz önünde bulundurularak *PvIQD2*, *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD12*, *PvIQD14*, *PvIQD15*, *PvIQD18*, *PvIQD22*, *PvIQD32* ve *PvIQD33* qPCR uygulamaları için seçilmiştir. Elde edilen verilerin normalizasyonunda referans gen olarak ACT seçilmiştir. Normalizasyon işlemi Livak yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Livak & Schmittgen, 2001). Elkoca ve Serra fasulye çeşitlerinin yaprak, gövde ve kök olmak üzere üç farklı dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Ekspresyon seviyelerinde gözlemlenen artışlar ve azalışlar, two-way ANAVO kullanılarak istatistiksel olarak anlaşılmıştır.

Elkoca ve Serra çeşitlerinin tuz stresine maruz kalmış yaprak dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde çoğu *PvIQD* geninin anlamlı bir şekilde yukarı regüle olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). Serra çeşidi yaprak dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde ise *PvIQD18* dışındaki tüm genler anlamlı bir şekilde yukarı regüle olmuştur. *PvIQD18* ise aşağı regüle olduğu tespit edilmekle beraber istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. *PvIQD2*, ~18 katlık bir artış ile en yüksek tepkiyi gösteren genidir. *PvIQD22* ve *PvIQD33*, ~16 katlık bir artış ile *PvIQD10*, *PvIQD15* ve *PvIQD32* genleri ise ~9 katlık bir artış ile tuz stresine tepki gösteren önemli genler arasında yer almaktadır. *PvIQD4*, *PvIQD12* ve *PvIQD14* genleri de tuz stresine tepki oluşturmuştur.

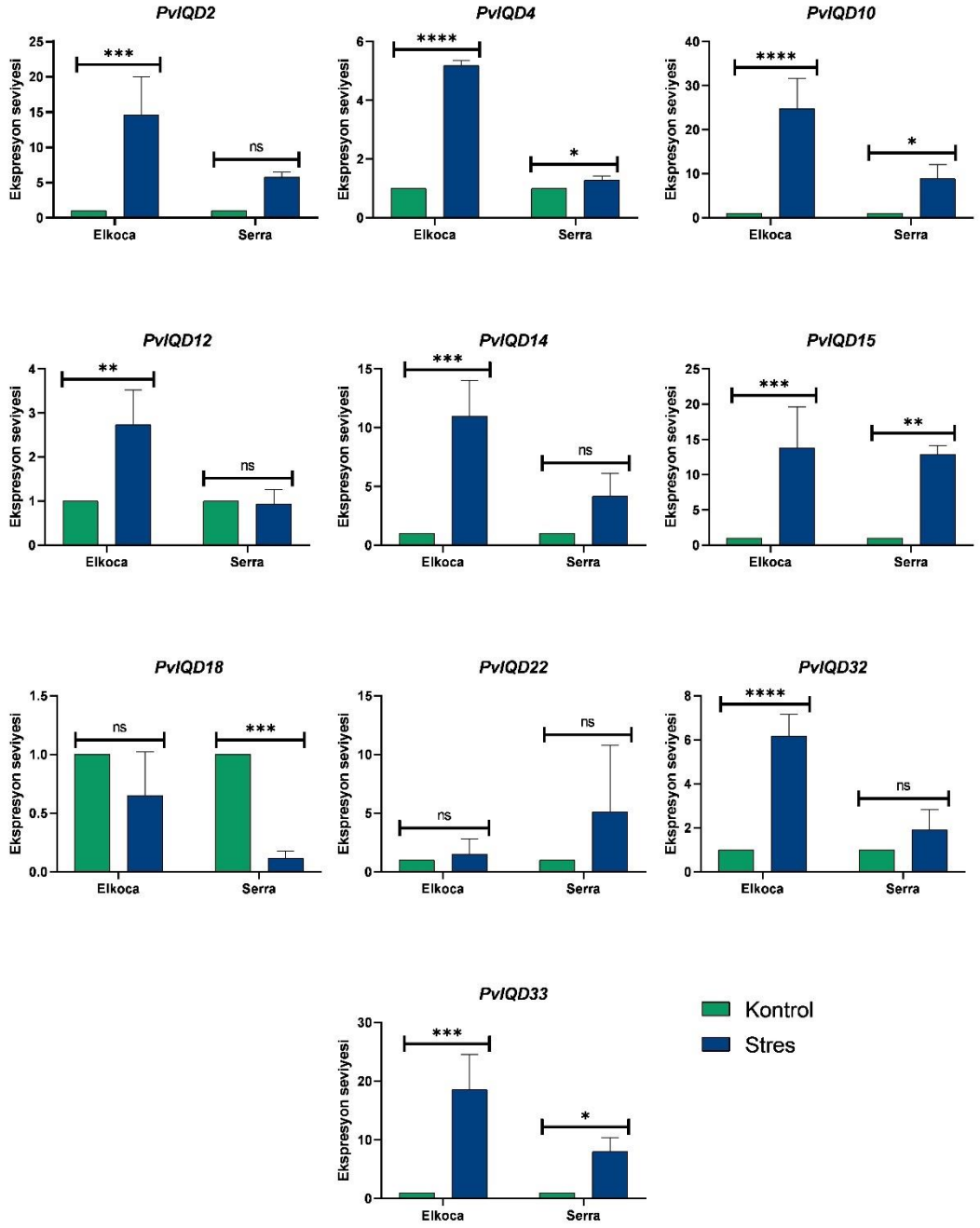
Elkoca çeşidi yaprak dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD14*, *PvIQD22*, *PvIQD32* ve *PvIQD33* genlerinin anlamlı bir şekilde yukarı regüle olduğu görülmüştür. *PvIQD33* geni ~20 katlık bir artış göstererek tuz stresine karşı en yüksek tepki oluşturan gen olarak ortaya çıkmaktadır. *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD14* ve *PvIQD22* genleri ise tuz stresi altında ~2.5 ila ~5 katlık artış sergileyerek yanıt oluşturan önemli genlerdir. *PvIQD2* ve *PvIQD15* genleri yukarı regüle olurken istatistiksel olarak anlamlı değildir. *PvIQD18* geni ise tuz stresine karşı anlamlı bir şekilde aşağı regüle olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, Elkoca ve Serra fasulye çeşitlerinin yaprak dokusunda tuz stresine karşı *PvIQD* genlerinin tepki verdiği gözlemlenmiştir. Yaprak dokusunda tuz stresine karşı verilen yanıt dikkate alındığında *PvIQD* genleri, Serra çeşidinde Elkoca çeşidine göre daha fazla tepki oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4.14 *PviQD* genlerinin yaprak dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, ns = istatistiksel olarak anlamsız)

Elkoca ve Serra fasulye çeşitlerinin tuz stresine maruz kalmış gövde dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, çoğu *PvIQD* geninin anlamlı bir şekilde yukarı regüle olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Elkoca çeşidi gövde dokusunda *PvIQD18* ve *PvIQD22* genleri hariç diğer tüm genler anlamlı bir şekilde yukarı regüle olmuştur. *PvIQD18* geni aşağı regüle olmuş fakat istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. *PvIQD22* geni ise yukarı regüle olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. *PvIQD10*, ~25 katlık bir artışla tuz stresine en yüksek cevap veren gen olmuştur. *PvIQD33*, *PvIQD2*, *PvIQD15* ve *PvIQD14* genleri sırasıyla ~19, ~15, ~14 ve ~11 katlık artış göstererek tuz stresi altında tepki oluşturan önemli genlerdir. *PvIQD4*, *PvIQD12* ve *PvIQD32* genleri de tuz stresi altında gösterdikleri artışlar ile yanıt oluşturan genler arasında yer almaktadır.

Serra çeşidi gövde dokusunda ise *PvIQD10*, *PvIQD15* ve *PvIQD33* genlerinin tuz stresine karşı anlamlı bir şekilde yukarı regüle edildiği görülmektedir. *PvIQD15*, ~13 katlık bir artış ile tuz stresine karşı en yüksek tepkiyi gösteren genidir. *PvIQD10* ve *PvIQD33* ise sırasıyla ~9 ve ~8 katlık artışlar ile yanıt oluşturan genler arasında yer almaktadır. *PvIQD4* geninde ~1.27 katlık bir artış ile değişim söz konusudur fakat kontrole kıyasla ekspresyon seviyesini koruduğu söylenebilir. *PvIQD2*, *PvIQD14* ve *PvIQD32* genleri ise tuz stresi altında yukarı regüle edilmiş fakat istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. *PvIQD12* geni gövde dokusunda tuz stresine karşı değişim göstermezken istatistiksel olarak anlamlı değildir. *PvIQD18* geninin ise gövde dokusunda tuz stresine karşı anlamlı bir şekilde aşağı regüle olduğu görülmektedir. Bulgular, tuz stresi uygulanan Elkoca ve Serra çeşitlerinin gövde dokusunda *PvIQD* genlerinin yanıt oluşturduğunu ortaya koymaktadır. *PvIQD* genleri, Serra çeşidine kıyasla Elkoca çeşidinin gövde dokusunda daha fazla yanıt oluşturmıştır.

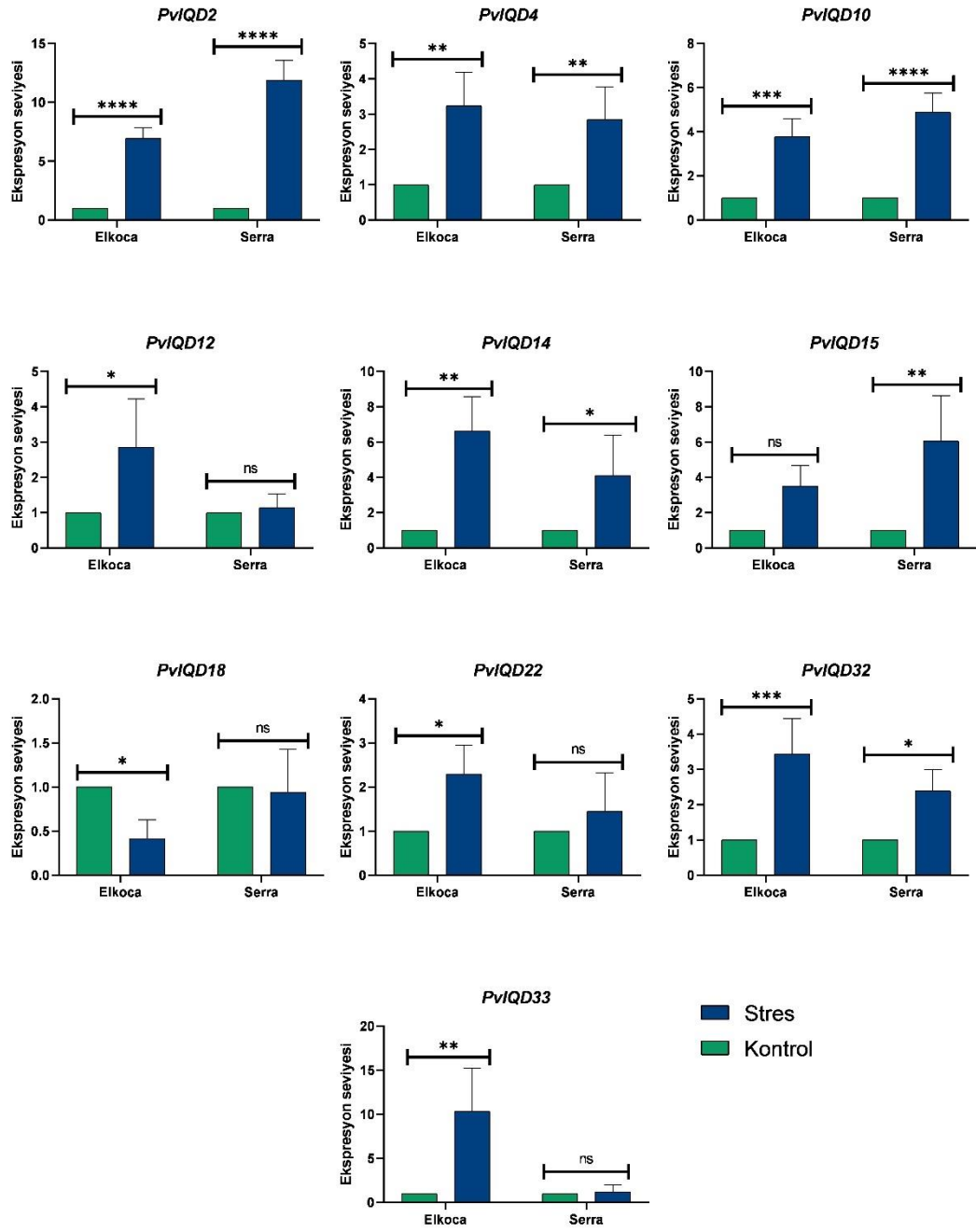


Şekil 4.15 *PviQD* genlerinin gövde dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, ns = istatistiksel olarak anlamsız)

Elkoca ve Serra fasulye çeşitlerinin tuz stresine maruz kalmış kök dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde çoğu *PvIQD* geninin anlamlı bir şekilde yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Elkoca fasulye çeşidinde *PvIQD18* ve *PvIQD15* dışında tüm genler anlamlı bir şekilde yukarı regüle edilmiştir. *PvIQD18* geninin ise tuz stresine karşı anlamlı bir şekilde aşağı regüle olduğu görülmektedir. *PvIQD15* ise yukarı regüle edildiği görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır. *PvIQD33*, ~10 katlık *PvIQD2* ve *PvIQD14* ~7 katlık bir artış ile tuz stresine en fazla tepki gösteren genlerdir. *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD12*, *PvIQD22* ve *PvIQD32* genleri de tuz stresine karşı artış göstererek tepki oluşturduğu tespit edilmiştir.

Serra fasulye çeşidine bakıldığında *PvIQD12*, *PvIQD18*, *PvIQD22* ve *PvIQD33* dışında tüm genlerin anlamlı bir şekilde yukarı regüle edildiği görülmektedir. *PvIQD18*, tuz stresine karşı aşağı regüle edildiği tespit edilmekle beraber istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. *PvIQD12* ise ekspresyon seviyesinde çok az bir değişim göstermiş fakat istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. *PvIQD33*'de *PvIQD12*'ye benzer bir durum sergilemektedir. *PvIQD22* geninin ekspresyon seviyesinde ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. *PvIQD2*, ~12 katlık bir artışla Serra çeşidi kök dokusunda tuz stresine karşı en yüksek tepkiyi göstermiştir. *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD15* ve *PvIQD32* genleri de tuz stresine karşı gösterilen tepki de yer almaktadır. Sonuç olarak, tuz stresi uygulanmış Elkoca ve Serra fasulye çeşitlerinin kök dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyeleri, *PvIQD* genlerinin önemli fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir.

RNA-seq verileri ışığında yapılan qPCR çalışmaları, *PvIQD* genleri hakkında önemli bilgiler sunmuştur. Fasulye bitkisinde tuz stresine karşı rol alan *PvIQD* genleri tespit edilmiştir. qPCR tabanlı yapılan çalışmalar, fasulye bitkisinde IQD gen ailesinin abiyotik stres mekanizmalarında kilit bir rol oynadığını göstermektedir. Fasulye ile yapılacak dirençli bitki yetiştirme çalışmalarında, *IQD* gen ailesinin gösterdiği fonksiyonları ile yer edinebileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.16 *PvIQD* genlerinin kök dokusunda tuz stresine karşı ekspresyon seviyeleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, ns = istatistiksel olarak anlamsız)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan bitkiye özgü *IQD* gen ailesi, çeşitli biyolojik süreçlerde kritik roller üstlenir (C. Guo vd., 2021). *IQD* gen ailesi birçok bitki türünde genom çapında kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Ancak, şu ana kadar besinsel ve ekonomik açıdan değerli olan fasulyede *IQD* gen ailesinin kapsamlı bir şekilde tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir. Yapılan tez çalışmasında fasulye genomunda 36 *PvIQD* geni tanımlanarak karakterize edilmiştir. *PvIQD* genlerinin sayısı Arabidopsis (n=33) (Abel vd., 2005), domates (n=34) (Huang vd., 2013), karpuz (n=35) (Dou vd., 2022) ve Çin lahanası (n=35) (J. Yuan vd., 2019) ile nispeten benzer sayıdadır. Soya fasulyesi (n=67) (Feng vd., 2014), buğday (n=125) (Ke vd., 2022), asma (n=49) (Liu vd., 2020), pamuk (n=102) (Rehman vd., 2021) ve kavak (n=40) (H. Ma vd., 2014) daha fazla sayıda gen içerirken mısır (n=26) (Cai vd., 2016), dev bambu (n=29) (Wu vd., 2016), pirinç (n=29) (Abel vd., 2005), hünnap (n=20) (L. Wang vd., 2022) ve patates (n=23) (Mei vd., 2021) daha az sayıda gen içermektedir. Bitki türlerinin birbirinden farklı sayılarda gen içermeleri genom boyutlarına ve evrimsel etkinliklerinin farklı olmasına dayanmaktadır. Örneğin, fasulye ile akraba olan soya fasulyesi ~1150 Mb genom boyutuna sahipken fasulye ~587 Mb genom boyutuna sahiptir (Schmutz vd., 2010, 2014). Çeşitli moleküler ağırlıklara sahip *PvIQD* proteinlerinin yüksek bir izoelektrik nokta (pI=9.99) ortalamasına sahip olması, Arabidopsis (pI=10.3) (Abel vd., 2005), pirinç (pI=10.4) (Abel vd., 2005), Çin lahanası (pI=10.05) (J. Yuan vd., 2019), mısır (pI=10.3) (Cai vd., 2016) ve kavak (pI=10.3) (H. Ma vd., 2014) türlerinde bildirilen ortalama izoelektrik nokta ile benzerdir. Hücre altı lokalizasyon tahmini *PvIQD* proteinlerinin büyük bir çoğunluğunun çekirdekte lokalize olma ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Ca^{+2} sinyali ve ardından gelişen aşağı akış olayları göz önünde bulundurulduğunda *PvIQD* proteinlerinin çekirdekte fonksiyon göstermesi olasıdır.

Fasulye *IQD* proteinlerinin IQ-67 alanının yapısı hakkında bilgi sağlamak amacıyla yapılan çoklu dizi hizalaması, IQ (IQxxxRGxxxR veya I/L/VQxxxRxxxxR/K) motifinin 3 kopyasını, 1-8-14 ([FILVW]x6[FAILVW]x5[FILVW]) motifinin 3 kopyasını ve 1-5-10 ([FILVW]x3[FILV]x4[FILVW]) motifinin 4 kopyasını içererek IQ-67 alanının karakteristik özelliğini göstermiştir. Evrimsel ilişkiler hakkında daha fazla bilgi edinmek

için Arabidopsis, pirinç ve fasulye IQD proteinlerinin çoklu dizi hizalamasına dayalı bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç, yakın ilişkili IQD proteinlerinin aynı grupta kümелendiği dört gruba ayrılırken yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Dört farklı grubun hepsinde AtIQD ve OsIQD proteinleri bulunarak PvIQD proteinleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. PvIQD proteinleri hakkında verileri desteklemek için MEME serverlarında 10 korunmuş motif aranmıştır. Elde edilen motifler, InterPro ve SMART veri tabanlarında taranarak anlamlandırılmıştır. Motif 1, tüm proteinlerde bulunarak IQ-67 alanının varlığını desteklemiştir. Motif 2, DUF4005 (Protein of unknown function) motifini temsil ederken diğer motifler hakkında bir sonuç alınamamıştır. Ekzon-intron organizasyonu incelendiğinde ekzon-intron sayılarının ve intron fazları Arabidopsis ve pirinçte bildirilen ekzon-intron modeli ile örtüşmektedir (Abel vd., 2005). Son olarak, filogenetik ağaç ile desteklenen *PvIQD* genlerinin korunmuş motif içeriği ve ekzon-intron yapısı, aynı grupta bulunan *PvIQD* genleri açısından benzer bir model içeriği sunmaktadır. Korunmuş ekzon-intron yapısı, *IQD* genlerinin evrimi sırasında önemli roller üstlenebileceğini düşündürmektedir.

Gen duplikasyonları, gen ailelerinin genişlemesine ve evrim sırasında yeni fonksiyonlar kazanmasına katkıda bulunur (Panchy vd., 2016). *PvIQD* genleri arasında ve fasulye ile diğer türler arasında gerçekleşen gen duplikasyon etkinlikleri incelenmiştir. Fasulyede 12 *PvIQD* gen çifti, 1 tandem ve 11 segmental duplikasyon olarak keşfedilmiştir. Seleksiyon baskısı *PvIQD* gen çiftleri için $Ka/Ks < 1$ olarak hesaplanmıştır. Çin lahanası (J. Yuan vd., 2019), mısır (Cai vd., 2016), Arabidopsis (Abel vd., 2005), kavak (H. Ma vd., 2014) ve pamuk (Rehman vd., 2021) ile yapılan araştırmalar, homolog gen çiftlerinde ana rolün segmental duplikasyonlar olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *PvIQD* gen çiftleri için hesaplanan $Ka/Ks < 1$ değeri yapılan çalışmalar tarafından desteklenmektedir. Bu durum, fasulyede *IQD* gen ailesinin genişlemesinde segmental duplikasyon etkinliğinin ve arındırıcı seçilimin ana itici güç olduğunu ortaya koymaktadır. Fasulye ve diğer türler arasında gerçekleşen gen duplikasyonları incelenmiştir. Fasulye ve Arabidopsis arasında 36 ortolog gen çifti tanımlanırken fasulye ve soya fasulyesi arasında 77 ortolog gen çifti tanımlanmıştır. Fasulye ve pirinç arasında ise 17 ortolog gen çifti tanımlanmıştır. Beklenildiği üzere fasulye ile akraba olan soya fasulyesi arasında en iyi sentenik ilişki yakalanmıştır. Tanımlanan tüm ortolog ilişkilerin ($Ka/Ks < 1$) arındırıcı seçim altında

gerçekleştirdiği hesaplanmıştır. Benzer bir şekilde mısır (Cai vd., 2016), soya fasulyesi (Feng vd., 2014), kavak (H. Ma vd., 2014) ve çin lahanası (J. Yuan vd., 2019) ile yapılan çalışmalar, arındırıcı seçilimin ($Ka/Ks < 1$) baskın olduğunu bildirilmiştir. Bulgular, *IQD* gen ailesinin evrimi sırasında arındırıcı seçilimin ana rol oynadığını ve yüksek oranda korunduğunu göstermektedir.

miRNA'lar hedef genlerin gen ifadelerini düzenleyerek bitki gelişim/büyüme süreçlerinde, çevresel streslere yanıtta önemli roller üstlenir (Chand Jha vd., 2021). *PvIQD* genlerinin hangi miRNA'lar tarafından hedeflendikleri, fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen miRNA tahmini sonucunda 20 *PvIQD* geninin 19 miRNA ailesi tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. *PvIQD* genlerini hedefleyen miRNA'ların abiyotik streslere karşı yanıt oluşturdıkları tespit edilmiştir. mir2118'in fasulyede kuraklık ve ABA stres uygulamalarına , soya fasulyesinde tuzluluk tedavisine yanıt olarak yukarı doğru düzenlendiği bildirilmiştir (Arenas-Huertero vd., 2009; Ramesh vd., 2019). mir398, fasulyede su eksikliğine yanıtta, Arabidopsisde tuz ve oksidatif strese yanıt regülasyonuna katıldığı ifade edilmiştir (De la Rosa vd., 2019; Jagadeeswaran vd., 2009; Sunkar vd., 2006). Ayrıca, ABA,UV-B ve biyotik stresler gibi diğer streslerde de rol oynadığı bildirilmiştir (C. Zhu vd., 2011). mir393, çay bitkisinde soğukluk tedavisi, fasulyede kuraklık ve tuzluluk, mısırdaki ise nitrojen eksikliği gibi abiyotik stres yanıtlarında rol oynadığı bildirilmiştir (Raza vd., 2021). mir156, yoncada ve elmada tuz stres toleransını modüle etmektedir (Arshad vd., 2017; Y. Ma vd., 2021). mir164, mısırdaki tuz stresi, Arabidopsisde sıcaklık stresi ve Medicago kuraklık stresi gibi abiyotik stres tepkileriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Shan vd., 2020; Tsai vd., 2023; T. Wang vd., 2011). Ayrıca mir162, mir157, mir172, mir394, mir395 ve mir396 tuzluluk, kuraklık, ağır metal ve su eksikliği gibi çeşitli streslere karşı yanıtta yer aldıkları bildirilmiştir (Chand Jha vd., 2021; B. Zhang, 2015). Ekspresyon seviyeleri araştırılan *PvIQD* genlerinin, birçok stres yanıtında yer alan miRNA ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. *PvIQD2* geni Pvu-miR164 tarafından hedeflenirken *PvIQD15* ise Pvu-miR398 tarafından hedeflenmiştir. *PvIQD12* geni Pvu-miR394 tarafından hedeflenirken *PvIQD33* ise Pvu-miR172 ve Pvu-miR2118 tarafından hedeflenmiştir. Ekspresyon seviyelerinde meydana gelen tepkiler de göz önünde bulundurulduğunda Pvu-

miRNA'ları *PvIQD* genlerinin gen ifadelerini düzenleyerek çeşitli streslere karşı yanıt oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Cis-elementler, gen ekspresyonu düzenlemesine katılarak bitki gelişim süreçleri ve çevresel streslere tepki oluşturmada önemli rol oynar (Hernandez-Garcia & Finer, 2014). Bu nedenle, *PvIQD* genlerinin promotör bölgelerinde bulunan cis-elementler analiz edilmiştir. Sonuçlar, *PvIQD* genlerinin çeşitli cis-elementler içerdiğini ortaya koymuştur. Toplam 73 cis-element tanımlanırken stres ilgili elementler, hormon ilgili elementler, gelişim/büyüme ilgili elementler ve ışık ilgili elementler olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. *PvIQD* genlerinin promotör bölgelerinde tespit edilen stres ilgili elementler incelendiğinde MYB, MYC, ARE, STRE ve WUN-motif en sık bulunan cis elementlerdir. MYC ve MYB kuraklık ve tuz stresleri ile indüklenebilir gen ekspresyonu düzenlemesinde yer alan cis-elementlerdir (Hernandez-Garcia & Finer, 2014; Ibraheem vd., 2010). Anaerobik indüksiyon için gerekli olan ARE ise yaralanma ve patojen saldırısı ile ilişkili cis-elementdir (Ibraheem vd., 2010). STRE, çeşitli stresler tarafından tetiklendiği ve gen ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Ebeed, 2022). WUN-motif ise yaralanma yanıtında yer almaktadır (K. Zhu vd., 2020). *PvIQD* genlerinin promotör bölgelerinde tanımlanan hormon ilgili elementler grubunda ERE, ABRE, TCA ve MeJA en sık rastlanan cis-elementlerdir. ABRE, ABA sinyal yoluna katılarak abiyotik streslerin düzenlenmesinde yer alan ana cis-elementlerden biridir (Hou vd., 2012). MeJA, yara tepkilerinde ve patojen saldırısı gibi durumlara yanıt oluşturmaktadır (Ibraheem vd., 2010). Salisilik asit tepkisinde yer alan TCA, çeşitli stresler tarafından indüklenerek gen ekspresyon düzenlemesinde yer almaktadır (Li vd., 2020). ERE (etilen duyarlı element), yaralanma ve patojen saldırısı ile bağlantılıdır (Ibraheem vd., 2010). Gelişim/büyüme ilgili elementler arasında AAGAA-motif, *PvIQD* genlerinde en sık görülen cis-elementdir. Box-4, G-box ve GT1-motif, *PvIQD* genlerinin promotör bölgelerinde ışık ilgili elementlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu durum, ışığa yanıt elementlerinin gelişim aşamaları ve çevresel streslere cevap oluşturabileceğini düşündürmektedir. Tuz stresi altında ekspresyon profilleri incelenen *PvIQD* genlerinin promotör bölgelerinde, stres ilgili ve hormon ilgili cis-elementlerin varlığı görülmektedir. Patateste, *StIQD* genlerinin promotör bölge analizinde stres ve hormon ilgili cis-elementlerin varlığı bildirilmiştir (Mei vd., 2021). Benzer bir şekilde buğdayda, *TaIQD*

genlerinin promotör bölgelerinde stres ve hormon ilgili cis-elementler tespit edilmiştir (Ke vd., 2022). Biyoinformatik analizlerin ışığında *PvIQD* genlerinin sinyal iletim yollarına katılabileceği ve yanıt mekanizmasında rol alabileceği öngörülmektedir.

PvIQD genlerinin dokulara özgü ifade seviyelerini anlamak için ekspresyon profilleri incelenmiştir. Ekspresyon profilleri *PvIQD* genlerinin farklı dokularda farklı seviyelerde ifade edildiğini ortaya koymuştur. Young trifoliate, root-10, root-19 steem-10, steem-19 ve flower buds dokularında *PvIQD* genlerinin ifade seviyelerinin diğer dokulara oranla daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Mısır'da *ZmIQD* genlerinin farklı gelişim evrelerinde farklı ifade seviyeleri sergilediği bildirilmiştir (Cai vd., 2016). Benzer bir şekilde patatesten, *StIQD* genlerinin farklı dokularda farklı ifade seviyeleri gösterdiği belirtilmiştir (Mei vd., 2021). Kavak'ta yapılan çalışmada ise *PtIQD* genlerinin dokuya spesifik ekspresyon seviyesi gösterdiği ifade edilmiştir (H. Ma vd., 2014). Farklı dokularda eksprese olan *IQD* genleri göz önüne alındığında, *PvIQD* genlerinin gelişim ve büyüme süreçlerinde önemli roller üstlendiği düşünülmektedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, *IQD* gen ailesinin abiyotik ve biyotik streslere karşı önemli işlevleri olduğunu öne sürmektedir. Yapılan tez çalışmasında *PvIQD* genlerinin tuz stresine karşı tepkilerini ortaya çıkarmak için tuz tedavisi içeren RNA-seq verileri biyoinformatik araçlar kullanarak işlenmiştir. Elde edilen verilerden *PvIQD2*, *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD12*, *PvIQD14*, *PvIQD15*, *PvIQD18*, *PvIQD22*, *PvIQD32* ve *PvIQD33* qPCR reaksiyonlarında incelenmek üzere seçilmiş genlerdir. Elkoca çeşidi yaprak dokusunda *PvIQD33* tuz stresine karşı diğer genlere nazaran daha yüksek bir ekspresyon seviyesi sağlarken Serra çeşidi yaprak dokusunda ise *PvIQD2* ve *PvIQD33* tuz stresine en yüksek tepkiyi oluşturan genlerdir. Elkoca çeşidi gövde dokusunda *PvIQD2*, *PvIQD10* ve *PvIQD33* tuz stresine karşı en yüksek ifadeyi gösterirken Serra çeşidi gövde dokusunda ise *PvIQD15* en yüksek ifadeyi gösteren genlerdir. Elkoca çeşidi kök dokusunda *PvIQD33* en yüksek ekspresyon seviyesini sergilerken Serra çeşidi kök dokusunda *PvIQD2* en yüksek ekspresyonu sergileyen gen olmuştur. Genel olarak bakıldığında *PvIQD2*, *PvIQD4*, *PvIQD10*, *PvIQD14*, *PvIQD15*, *PvIQD32* ve *PvIQD33* farklı doku ve çeşitlerde değişebilmek üzere yüksek ifade edilen genler olarak ortaya çıkmaktadır. *PvIQD18* geninin ise anlamlı bir şekilde ifade seviyesini azalttığı görülmüştür. *PvIQD12*

geni ise tuz stresine karşı yukarı regüle olmuş fakat genel seviyeye göre daha düşük seviyelerde eksprese edilmiştir. *PvIQD22*, tuz stresine karşı en iyi ekspresyon seviyesini yaprak dokusunda gösterebilmiştir. Mısır'da *ZmIQD* genlerinin ifade seviyelerini artırarak veya baskılayarak kuraklık stresine yanıt oluşturduğu bildirilmiştir. Çin lahanasında, çoğu *BrIQD* geninin kuraklık stresine yanıt verdiği ve *BrIQD5* geninin en yüksek ekspresyonu sergilediği ifade edilmiştir. *BrIQD5* geninin aşırı ekspresyonunun kuraklığa karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (J. Yuan vd., 2019). Dev bambuda, *PeIQD* genlerinin kuraklık ve MeJA tedavilerine baskılanarak veya artarak cevap oluşturduğu belirtilmiştir (Wu vd., 2016). Benzer bir şekilde kavakta, *PtIQD* genleri kuraklık ve MeJA tedavilerine yanıt oluşturmuştur (H. Ma vd., 2014). Patateste, *StIQD* genlerinin ısı, soğuk, PEG, NaCl ve CaCl₂ streslerine karşı önemli roller oynadığı ifade edilmiştir (Mei vd., 2021). Soya fasulyesinde, *GmIQD* genlerinin MeJA tedavisine çeşitli roller ile yanıt oluşturabileceği öne sürülmektedir (Feng vd., 2014). Hünnapta, *ZjIQD* genlerinin soğuk, tuz ve alkalın streslerine yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (L. Wang vd., 2022). *GhIQD31* ve *GhIQD32* genlerinin yayla pamuğunda yıkılması, tuz ve kuraklık toleransını azalttığı bildirilmiştir (X. Yang vd., 2019). *BrIQD35* geninin benth bitkisinde aşırı ekspresyonu sonucunda kuraklığa karşı tolerans sağladığı belirtilmiştir (J. Yuan vd., 2022). *PvIQD* genlerinin qPCR sonuçları, yapılan çalışmalar ile örtüştüğü görülmektedir. Biyoinformatik ve gen ekspresyon analizi, *PvIQD* genlerinin çevresel streslerin düzenlenmesinde yer aldığını öne sürmektedir.

Sonuç olarak, fasulyede ilk defa *IQD* gen ailesi tanımlanarak karakterize edilmiştir. Toplam 36 *PvIQD* proteinin fizikokimyasal özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Korunmuş motif ve ekzon-intron yapısı, aynı alt aile içerisinde yer alan *PvIQD* genlerinin benzer yapısal çeşitlilik içerdiğini ortaya koymaktadır. Gen ekspresyonu açısından önem teşkil eden miRNA'lar ve cis-elementler kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Farklı dokularda farklı ifade seviyeleri sergileyen *PvIQD* genlerinin tuz stresi altında ekspresyon profilleri incelenerek stres mekanizmasındaki rolü aydınlatılmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında *IQD* gen ailesinin sunulan verileri, fasulyede *IQD* proteinleri ile yapılacak çalışmalar için referans olması muhtemeldir.

KAYNAKLAR

- Abel, S., Savchenko, T., & Levy, M. 2005. Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 72.
- Ahmad, R., Hussain, S., Anjum, M. A., Khalid, M. F., Saqib, M., Zakir, I., Hassan, A., Fahad, S., & Ahmad, S. 2019. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanisms in Plants Under Salt Stress, In: *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches*. M. Hasanuzzaman, K. R. Hakeem, K. Nahar, & H. F. Alharby (eds), (ss. 191-205). Springer International Publishing.
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Andrews, S. 2010. *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Anonymous. 2023. <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Anzano, A., Bonanomi, G., Mazzoleni, S., & Lanzotti, V. 2021. Plant metabolomics in biotic and abiotic stress: A critical overview. *Phytochemistry Reviews*, 1-22.
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. 2009. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology*, 70(4), 385-401.
- Arshad, M., Gruber, M. Y., Wall, K., & Hannoufa, A. 2017. An Insight into microRNA156 Role in Salinity Stress Responses of Alfalfa. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.
- Assaha, D. V. M., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. 2017. The Role of Na⁺ and K⁺ Transporters in Salt Stress Adaptation in Glycophytes. *Frontiers in Physiology*, 8.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523-3543.
- Badmi, R., Payyavula, R. S., Bali, G., Guo, H.-B., Jawdy, S. S., Gunter, L. E., Yang, X., Winkler, K. A., Collins, C., Rottmann, W. H., Yee, K., Rodriguez, M., Sykes, R. W., Decker, S. R., Davis, M. F., Ragauskas, A. J., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. 2018. A New Calmodulin-Binding Protein Expresses in the Context of Secondary

Cell Wall Biosynthesis and Impacts Biomass Properties in Populus. *Frontiers in Plant Science*, 9.

- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., & Li, W. W. 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W369-W373.
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., Vangronsveld, J., & Van Der Lelie, D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology*, 22(5), 583-588.
- Batistič, O., & Kudla, J. 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(8), 1283-1293.
- Bellucci, E., Bitocchi, E., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Giardini, A., Attene, G., Nanni, L., & Papa, R. 2014. Genomics of origin, domestication and evolution of Phaseolus vulgaris. *Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 1. Managing, sequencing and mining genetic resources*, 483-507.
- Bi, L., Weng, L., Jiang, Z., & Xiao, H. 2018. The tomato IQD gene SUN24 regulates seed germination through ABA signaling pathway. *Planta*, 248(4), 919-931.
- Biswas, K., Adhikari, S., Tarafdar, A., Kumar, R., Saha, S., & Ghosh, P. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defence Systems in Plants: Role and Crosstalk Under Biotic Stress, In: *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change*. R. Roychowdhury, S. Choudhury, M. Hasanuzzaman, & S. Srivastava (eds), (ss. 265-292). Springer International Publishing.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., & Attene, G. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), E788-E796.
- Blankenberg, D., Kuster, G. V., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., & Taylor, J. 2010. Galaxy: A Web-Based Genome Analysis Tool for Experimentalists. *Current Protocols in Molecular Biology*, 89(1), 19.10.1-19.10.21.
- Büyük, İ., Okay, A., & Aras, S. 2022. Identification and Characterization of SRS Genes in Phaseolus vulgaris Genome and Their Responses Under Salt Stress. *Biochemical Genetics*, 60(2), 482-503.
- Büyük, İ., SOYDAM-AYDIN, S., & Aras, S. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2).
- Bybordi, A. 2010. The Influence of Salt Stress on Seed Germination, Growth and Yield of Canola Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), Article 1.

- Cai, R., Zhang, C., Zhao, Y., Zhu, K., Wang, Y., Jiang, H., Xiang, Y., & Cheng, B. 2016. Genome-wide analysis of the IQD gene family in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(2), 543-558.
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., & May, G. 2004. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 4(1), 10.
- Chand Jha, U., Nayyar, H., Mantri, N., & Siddique, K. H. M. 2021. Non-Coding RNAs in Legumes: Their Emerging Roles in Regulating Biotic/Abiotic Stress Responses and Plant Growth and Development. *Cells*, 10(7), Article 7.
- Chaudhary, J., Khatri, P., Singla, P., Kumawat, S., Kumari, A., R, V., Vikram, A., Jindal, S. K., Kardile, H., Kumar, R., Sonah, H., & Deshmukh, R. 2019. Advances in Omics Approaches for Abiotic Stress Tolerance in Tomato. *Biology*, 8(4), Article 4.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Cichy, K. A., Porch, T. G., Beaver, J. S., Cregan, P., Fourie, D., Glahn, R. P., Grusak, M. A., Kamfwa, K., Katuuramu, D. N., & McClean, P. 2015. A *Phaseolus vulgaris* diversity panel for Andean bean improvement. *Crop Science*, 55(5), 2149-2160.
- Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. 2018. psRNATarget: A plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*, 46(W1), W49-W54.
- De la Rosa, C., Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. 2019. A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume-specific miR2119 coregulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 133-144.
- De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., Fourie, D., Marsolais, F., Beaver, J., & Geffroy, V. 2015. Common bean. *Grain legumes*, 1-36.
- DeFalco, T. A., Bender, K. W., & Snedden, W. A. 2010. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochemical Journal*, 425(1), 27-40.
- Diaz, L. M., Ricaurte, J., Tovar, E., Cajiao, C., Terán, H., Grajales, M., Polanía, J., Rao, I., Beebe, S., & Raatz, B. 2018. QTL analyses for tolerance to abiotic stresses in a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. *PLOS ONE*, 13(8), e0202342.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
- Doğru, A., & Canavar, S. 2020. Bitkilerde Tuz Toleransının Fizyolojik ve Biyokimyasal Bileşenleri. *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 155-174.

- Dou, J., Duan, S., Umer, M. J., Xie, K., Wang, Y., Kang, Q., Yang, S., Yang, L., Liu, D., & Liu, L. 2022. Genome-wide analysis of IQD proteins and ectopic expression of watermelon ClIQD24 in tomato suggests its important role in regulating fruit shape. *Frontiers in Genetics*, 13, 993218.
- Ebeed, H. T. 2022. Genome-wide analysis of polyamine biosynthesis genes in wheat reveals gene expression specificity and involvement of STRE and MYB-elements in regulating polyamines under drought. *BMC Genomics*, 23(1), 734.
- El-Esawi, M. A., Al-Ghamdi, A. A., Ali, H. M., & Ahmad, M. 2019. Overexpression of AtWRKY30 Transcription Factor Enhances Heat and Drought Stress Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genes*, 10(2), Article 2.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., & Ullah, N. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: A review. *Plant growth regulation*, 75, 391-404.
- Farooq, M., Kobayashi, N., Ito, O., Wahid, A., & Serraj, R. 2010. Broader leaves result in better performance of indica rice under drought stress. *Journal of plant physiology*, 167(13), 1066-1075.
- Feng, L., Chen, Z., Ma, H., Chen, X., Li, Y., Wang, Y., & Xiang, Y. 2014. The IQD gene family in soybean: Structure, phylogeny, evolution and expression. *PloS one*, 9(10), e110896.
- Filiz, E., Tombuloglu, H., & Ozyigit, I. I. 2013. Genome-wide analysis of IQ67 domain (IQD) gene families in *Brachypodium distachyon*. *Plant Omics*, 6(6).
- Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and central America. Botanical Research Institute of Texas.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784-3788.
- Gepts, P., & Bliss, F. A. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Economic Botany*, 42(1), 86-104.
- Goodsell, D. S., Dutta, S., Zardecki, C., Voigt, M., Berman, H. M., & Burley, S. K. 2015. The RCSB PDB “Molecule of the Month”: Inspiring a Molecular View of Biology. *PLOS Biology*, 13(5), e1002140.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., & Putnam, N. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1178-D1186.
- Graham, P. H., & Ranalli, P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1), 131-146.

- Guo, C., Zhou, J., & Li, D. 2021. New Insights Into Functions of IQ67-Domain Proteins. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Guo, Z., Kuang, Z., Wang, Y., Zhao, Y., Tao, Y., Cheng, C., Yang, J., Lu, X., Hao, C., & Wang, T. 2020. PmiREN: A comprehensive encyclopedia of plant miRNAs. *Nucleic acids research*, 48(D1), D1114-D1121.
- Gupta, B., & Huang, B. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014,
- Gupta, B., Sengupta, A., Saha, J., & Gupta, K. 2013. Plant Abiotic Stress: OMICS Approach. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 1.
- Hao, S., Wang, Y., Yan, Y., Liu, Y., Wang, J., & Chen, S. 2021. A Review on Plant Responses to Salt Stress and Their Mechanisms of Salt Resistance. *Horticulturae*, 7(6), Article 6.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M., & Fotopoulos, V. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), Article 8.
- Hashimoto, K., & Kudla, J. 2011. Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie*, 93(12), 2054-2059.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5), 580-592.
- Hernandez-Garcia, C. M., & Finer, J. J. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, 217-218, 109-119.
- Hichem, H., El Naceur, A., & Mounir, D. 2009. Effects of salt stress on photosynthesis, PSII photochemistry and thermal energy dissipation in leaves of two corn (*Zea mays* L.) varieties. *Photosynthetica*, 47, 517-526.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587.
- Hou, L., Chen, L., Wang, J., Xu, D., Dai, L., Zhang, H., & Zhao, Y. 2012. Construction of Stress Responsive Synthetic Promoters and Analysis of Their Activity in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(6), 1496-1506.
- Huang, Z., Van Houten, J., Gonzalez, G., Xiao, H., & van der Knaap, E. 2013. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of SUN, OFP and YABBY gene family in tomato. *Molecular genetics and genomics*, 288(3-4), 111-129.

- Ibraheem, O., Botha, C. E. J., & Bradley, G. 2010. In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa Japonica*) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational Biology and Chemistry*, 34(5), 268-283.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A., & Khan, M. I. R. 2014. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: Regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 34-42.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A., & Sunkar, R. 2009. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*, 229(4), 1009-1014.
- Jamil, M., Rehman, S., & Rha, E. S. 2007. Salinity effect on plant growth, PSII photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Pak. J. Bot*, 39(3), 753-760.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., & Li, X. 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS) Pathway: Established and Emerging Roles. *Molecular Plant*, 6(2), 275-286.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. 2008. NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic acids research*, 36(suppl_2), W5-W9.
- KB, N. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet news*, 4, 1-4.
- Ke, Q., Sun, H., Tang, M., Luo, R., Zeng, Y., Wang, M., Li, Y., Li, Z., & Cui, L. 2022. Genome-wide identification, expression analysis and evolutionary relationships of the IQ67-domain gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its progenitors. *BMC genomics*, 23(1), 264.
- Khodarahmpour, Z., Ifar, M., & Motamedi, M. 2012. Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 298-304.
- Kwon, O. K., Mekapogu, M., & Kim, K. S. 2019. Effect of salinity stress on photosynthesis and related physiological responses in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(6), 831-839.
- Läuchli, A., & Grattan, S. R. 2007. Plant Growth And Development Under Salinity Stress, In: *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. M. A. Jenks, P. M. Hasegawa, & S. M. Jain (eds), (ss. 1-32). Springer Netherlands.

- Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., & on behalf of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration. 2011. The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D19-D21.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Letunic, I., & Bork, P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, 49(W1), W293-W296.
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. 2021. SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic acids research*, 49(D1), D458-D460.
- Levy, M., Wang, Q., Kaspi, R., Parrella, M. P., & Abel, S. 2005. Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *The Plant Journal*, 43(1), 79-96.
- Li, R., Zhu, F., & Duan, D. 2020. Function analysis and stress-mediated cis-element identification in the promoter region of VqMYB15. *Plant Signaling & Behavior*, 15(7), 1773664.
- Liang, W., Ma, X., Wan, P., & Liu, L. 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 286-291.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. 2014. featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Lin, J., Li, X., Zhang, Z., Yu, X., Gao, Z., Wang, Y., Wang, J., Li, Z., & Mu, C. 2012. Salinity-alkalinity tolerance in wheat: Seed germination, early seedling growth, ion relations and solute accumulation. *Afr J Agric Res*, 7, 467-474.
- Liu, Z., Haider, M. S., Khan, N., & Fang, J. 2020. Comprehensive sequence analysis of IQD gene family and their expression profiling in grapevine (*Vitis vinifera*). *Genes*, 11(2), 235.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Ma, H., Feng, L., Chen, Z., Chen, X., Zhao, H., & Xiang, Y. (2014). Genome-wide identification and expression analysis of the IQD gene family in *Populus trichocarpa*. *Plant Science*, 229, 96-110.

- Ma, Y., Xue, H., Zhang, F., Jiang, Q., Yang, S., Yue, P., Wang, F., Zhang, Y., Li, L., He, P., & Zhang, Z. 2021. The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression. *Plant Biotechnology Journal*, 19(2), 311-323.
- Mahajan, S., Pandey, G. K., & Tuteja, N. 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471(2), 146-158.
- McCormack, E., & Braam, J. 2003. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. *New Phytologist*, 159(3), 585-598.
- Mei, C., Liu, Y., Dong, X., Song, Q., Wang, H., Shi, H., & Feng, R. 2021. Genome-wide identification and characterization of the potato IQD family during development and stress. *Frontiers in Genetics*, 12, 693936.
- Messina, V. (2014). Nutritional and health benefits of dried beans. *The American journal of clinical nutrition*, 100(suppl_1), 437S-442S.
- Miklas, P. N., & Singh, S. P. 2007. Common Bean, In: *Pulses, Sugar and Tuber Crops*. C. Kole (eds), (ss. 1-31). Springer.
- Mitra, D., Klemm, S., Kumari, P., Quegwer, J., Möller, B., Poeschl, Y., Pflug, P., Stamm, G., Abel, S., & Bürstenbinder, K. 2019. Microtubule-associated protein IQ67 DOMAIN5 regulates morphogenesis of leaf pavement cells in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 70(2), 529-543.
- Mochida, K., & Shinozaki, K. 2011. Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analyses of Plant Functions. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2017-2038.
- Mosa, K. A., Ismail, A., & Helmy, M. 2017. Omics and System Biology Approaches in Plant Stress Research, In: *Plant Stress Tolerance: An Integrated Omics Approach*. K. A. Mosa, A. Ismail, & M. Helmy (eds), (ss. 21-34). Springer International Publishing.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Tester, M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651-681.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. 2020. Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(3), 81-91.
- Niron, H., Barlas, N., Salih, B., & Türet, M. 2020. Comparative transcriptome, metabolome, and ionome analysis of two contrasting common bean genotypes in saline conditions. *Frontiers in Plant Science*, 11, 599501.

- Osman, K. T. 2018. Saline and Sodic Soils, In: *Management of Soil Problems*. K. T. Osman (ed) (ss. 255-298). Springer International Publishing.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., & Shiu, S.-H. 2016. Evolution of gene duplication in plants. *Plant physiology*, 171(4), 2294-2316.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y. K., Arora, S., & Reddy, M. K. 2017. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Parida, A. K., & Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056-4075.
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., & Colwell, L. 2023. InterPro in 2022. *Nucleic acids research*, 51(D1), D418-D427.
- Perochon, A., Aldon, D., Galaud, J.-P., & Ranty, B. 2011. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*, 93(12), 2048-2053.
- Qin, F., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2011. Achievements and Challenges in Understanding Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. *Plant and Cell Physiology*, 52(9), 1569-1582.
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. 2021. Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology*, 10(4), Article 4.
- Ramesh, S. V., Govindasamy, V., Rajesh, M. K., Sabana, A. A., & Praveen, S. 2019. Stress-responsive miRNAome of Glycine max (L.) Merrill: Molecular insights and way forward. *Planta*, 249(5), 1267-1284.
- Ranty, B., Aldon, D., Cotellet, V., Galaud, J.-P., Thuleau, P., & Mazars, C. 2016. Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Ranty, B., Aldon, D., & Galaud, J.-P. 2006. Plant Calmodulins and Calmodulin-Related Proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 1(3), 96-104.
- Rasool, S., Hameed, A., Azooz, M. M., Muneeb-u-Rehman, Siddiqi, T. O., & Ahmad, P. 2013. Salt Stress: Causes, Types and Responses of Plants, In: *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. P. Ahmad, M. M. Azooz, & M. N. V. Prasad (eds), (ss. 1-24). Springer.

- Raza, A., Su, W., Gao, A., Mehmood, S. S., Hussain, M. A., Nie, W., Lv, Y., Zou, X., & Zhang, X. 2021. Catalase (CAT) Gene Family in Rapeseed (*Brassica napus* L.): Genome-Wide Analysis, Identification, and Expression Pattern in Response to Multiple Hormones and Abiotic Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), Article 8.
- Raza, A., Tabassum, J., Zahid, Z., Charagh, S., Bashir, S., Barmukh, R., Khan, R. S. A., Barbosa, F., Zhang, C., Chen, H., Zhuang, W., & Varshney, R. K. 2022. Advances in “Omics” Approaches for Improving Toxic Metals/Metalloids Tolerance in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Reddy, A. S., Ali, G. S., Celesnik, H., & Day, I. S. 2011. Coping with stresses: Roles of calcium-and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 23(6), 2010-2032.
- Rehman, A., Peng, Z., Li, H., Qin, G., Jia, Y., Pan, Z., He, S., Qayyum, A., & Du, X. 2021. Genome wide analysis of IQD gene family in diploid and tetraploid species of cotton (*Gossypium* spp.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 1035-1061.
- Romero-Aranda, R., Soria, T., & Cuartero, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160(2), 265-272.
- Sanders, G. J., & Arndt, S. K. 2012. Osmotic Adjustment Under Drought Conditions, In: *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*. R. Aroca (eds), (ss. 199-229). Springer.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., ... Jackson, S. A. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), Article 7278.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M., ... Jackson, S. A. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), Article 7.
- Shahbaz, M., Ashraf, M., & Athar, H.-R. 2008. Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)? *Plant Growth Regulation*, 55(1), 51-64.
- Shahzad, B., Fahad, S., Tanveer, M., Saud, S., & Khan, B. 2019. *Plant Responses and Tolerance to Salt Stress: Profiling and CounterAction* (ss. 61-78).
- Shan, T., Fu, R., Xie, Y., Chen, Q., Wang, Y., Li, Zh., Song, X., Li, P., & Wang, B. 2020. Regulatory Mechanism of Maize (*Zea mays* L.) miR164 in Salt Stress Response. *Russian Journal of Genetics*, 56(7), 835-842.

- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. 2003. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. 2020. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68, 103917.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J.-K. 2006. Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Ait Abderrahim, L., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. 2016. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tsai, W.-A., Sung, P.-H., Kuo, Y.-W., Chen, M.-C., Jeng, S.-T., & Lin, J.-S. 2023. Involvement of microRNA164 in responses to heat stress in Arabidopsis. *Plant Science*, 329, 111598.
- Tuteja, N., & Mahajan, S. 2007. Calcium Signaling Network in Plants. *Plant Signaling & Behavior*, 2(2), 79-85.
- Türkan, I., & Demiral, T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 2-9.
- Uebersax, M. A., Cichy, K. A., Gomez, F. E., Porch, T. G., Heitholt, J., Osorno, J. M., Kamfwa, K., Snapp, S. S., & Bales, S. 2023. Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security—A review. *Legume Science*, 5(1), e155.
- Van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. 2020. Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 403-433.
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G. 2019. Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Wang, L., Wang, L., Gao, M., Qi, C., Yang, J., Li, M., Ji, S., Liu, Z., Zhang, M., & Liu, M. 2022. Genome-wide identification of IQ67 domain (IQD) gene families in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and expression profiles in response to cold stress. *Scientia Horticulturae*, 293, 110686.
- Wang, L., Wang, S., & Li, W. 2012. RSeQC: Quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*, 28(16), 2184-2185. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts356>

- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W.-H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 12(1), 367.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., Lee, T., Jin, H., Marler, B., & Guo, H. 2012. MCScanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic acids research*, 40(7), e49-e49.
- Waskom, M. L. 2021. Seaborn: Statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021.
- Williamson, J. D., Jennings, D. B., Guo, W.-W., Pharr, D. M., & Ehrenshaft, M. 2002. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols—multifunctional plant protection? *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 467-473.
- Wu, M., Li, Y., Chen, D., Liu, H., Zhu, D., & Xiang, Y. 2016. Genome-wide identification and expression analysis of the IQD gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Scientific Reports*, 6(1), 24520.
- Xu, F., Wang, L., Xu, J., Chen, Q., Ma, C., Huang, L., Li, G., & Luo, M. 2023. GhIQD10 interacts with GhCaM7 to control cotton fiber elongation via calcium signaling. *The Crop Journal*, 11(2), 447-456.
- Yang, B., Wendrich, J. R., De Rybel, B., Weijers, D., & Xue, H.-W. 2020. Rice microtubule-associated protein IQ67-DOMAIN14 regulates grain shape by modulating microtubule cytoskeleton dynamics. *Plant Biotechnology Journal*, 18(5), 1141-1152. <https://doi.org/10.1111/pbi.13279>
- Yang, T., & Poovaiah, B. W. 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, 8(10), 505-512.
- Yang, X., Kirungu, J. N., Magwanga, R. O., Xu, Y., Pu, L., Zhou, Z., Hou, Y., Cai, X., Wang, K., & Liu, F. 2019. Knockdown of GhIQD31 and GhIQD32 increases drought and salt stress sensitivity in *Gossypium hirsutum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 166-177.
- Yang, Y., Saand, M. A., Huang, L., Abdelaal, W. B., Zhang, J., Wu, Y., Li, J., Sirohi, M. H., & Wang, F. 2021. Applications of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Yildiz, M., Poyraz, İ., Çavdar, A., Özgen, Y., Beyaz, R., Yildiz, M., Poyraz, İ., Çavdar, A., Özgen, Y., & Beyaz, R. 2020. Plant Responses to Salt Stress, In: *Plant Breeding—Current and Future Views*. IntechOpen.
- Yilmaz, E., Tuna, A. L., & Bürün, B. 2011. BİTKİLERİN TUZ STRESİ ETKİLERİNE KARŞI GELİŞTİRDİKLERİ TOLERANS STRATEJİLERİ.

- Yu, Y., Zhang, H., Long, Y., Shu, Y., & Zhai, J. 2022. Plant Public RNA-seq Database: A comprehensive online database for expression analysis of ~45 000 plant public RNA-Seq libraries. *Plant Biotechnology Journal*, 20(5), 806-808.
- Yuan, J., Liu, T., Yu, Z., Li, Y., Ren, H., Hou, X., & Li, Y. 2019. Genome-wide analysis of the Chinese cabbage IQD gene family and the response of BrIQD5 in drought resistance. *Plant molecular biology*, 99, 603-620.
- Yuan, J., Yu, Z., Li, Y., Shah, S. H. A., Xiao, D., Hou, X., & Li, Y. 2022. Ectopic expression of BrIQD35 promotes drought stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biology*, 24(5), 887-896.
- Yuan, P., Jauregui, E., Du, L., Tanaka, K., & Poovaiah, B. 2017. Calcium signatures and signaling events orchestrate plant–microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 173-183.
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Gómez-Cadenas, A., & Mittler, R. 2022. Plant responses to climate change: Metabolic changes under combined abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany*, 73(11), 3339-3354.
- Zhang, B. 2015. MicroRNA: A new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1749-1761.
- Zhang, L., Du, L., & Poovaiah, B. W. 2014. Calcium signaling and biotic defense responses in plants. *Plant signaling & behavior*, 9(11), e973818.
- Zhu, C., Ding, Y., & Liu, H. 2011. MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum*, 143(1), 1-9.
- Zhu, J.-K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 441-445.
- Zhu, J.-K. 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
- Zhu, K., Wu, Q., Huang, Y., Ye, J., Xu, Q., & Deng, X. 2020. Genome-wide Characterization of cis-acting Elements in the Promoters of Key Carotenoid Pathway Genes from the Main Species of Genus *Citrus*. *Horticultural Plant Journal*, 6(6), 385-395.