

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİLİMLER ANABİLİM DALI**

**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) LEA2 ve WOX GENLERİNİN
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

**Ad SOYAD
Mohammad SALEEM**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Emine Dilşat YEĞENOĞLU**

MANİSA-2024

Mohammad
SALEM

ASMADA (*Vitis vinifera* L.) LEA2 VE WOX GENLERİNİN
BİYOFİRMATİK ANALİZLERİ

2024

Tez Sırtı Örneği

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarımsal Bilimler Ana Bilim Dalında akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, tezin yazımında akademik ve etik kurallara aykırı herhangi bir yapay zekâ ve program kullanmadığımı beyan ederim.

İmza

Mohammad SALEEM



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Mohammad SALEEM

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Dilşat YEĞENOĞLU

Üzüm (*Vitis vinifera* L.) tüm dünyada yetiştirilen önemli bir meyve türüdür. Kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres faktörleri hem verimi hem de tane kalitesini olumsuz etkileme potansiyeline sahiptir. LEA gen ailesinin stres toleransı ile ilişkili olduğu ve bu genlerin manipülasyonunun stres toleransını artırabileceğini göstermektedir. WOX genlerinin bazı bitkilerde somatik embriyogenezin anahtar düzenleyicileri olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın amacı üzümde LEA2 ve WOX genlerinin biyoinformatik analizleriyle tanımlanması ve abiyotik stres koşulları altında olası fonksiyonlarının araştırılmasıdır.

Elde edilen bulgular incelendiğinde, LEA2'ye ait 36 gen bulunmuş ve WOX'ye ait 31 gen bulunmuştur. Filogenetik ağaçlar incelendiğinde; LEA2 proteinlerinin 3 ana kola ayrıldığı görülmüştür. WOX'ın ise filogenetik ağaçta 3 ana kola ayrıldığı belirlenmiştir. LEA2 genlerinin çoğunlukla ekzondan oluştuğu görülmüştür. Filogenetik ağaç ile benzerlik gösteren WOX ekzon-intron bölgeleri, motif kalıpları ile de uyusmaktadır. LEA2 proteinleri 6 lokalizasyonda görülmüştür. En çok (21 tanesi) Hücre zarında bulunmuştur. WOX'e bakıldığında ise; 3 lokalizasyonda görülmüştür. En çok (29 tanesi) Çekirdekte yer almıştır. 34 farklı üzüm LEA2 geninin 151 farklı miRNA'lar tarafından hedeflendiği, 31 farklı üzüm WOX geninin 205 farklı miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. LEA2 ve WOX genlerinin de potansiyel cis düzenleyici elementlere sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak, LEA2 ve WOX proteinleri strese dayanıklı bitkiler geliştirmek üzere kullanılabilecek etkili proteinler olabilirler. LEA2 ve WOX genlerini kullanarak strese dayanıklı bitkileri etkili bir şekilde yetiştirmek için *in vivo* çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca bu çalışma, LEA2 ve WOX genlerinin, abiyotik stres toleransı açısından özgül işlevlerinin daha fazla araştırılması için bir temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: (LEA2, WOX, Biyoinformatik, Abiyotik, Stres, Filogenetik)

2024, 56 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Mohammad SALEEM

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Education
Department of Agricultural Sciences**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emine Dilşat YEĞENOĞLU

Grape (*Vitis vinifera* L.) is an important fruit species cultivated worldwide. Abiotic stress factors such as drought and salinity have the potential to adversely affect both yield and berry quality. The LEA gene family is associated with stress tolerance, and the manipulation of these genes could enhance stress tolerance in grapes. WOX genes have been identified as key regulators of somatic embryogenesis in some plants. The aim of this study is to identify LEA2 and WOX genes in grapes through bioinformatic analyses and investigate their potential functions under abiotic stress conditions.

The findings reveal that 36 genes belonging to LEA2 and 31 genes belonging to WOX were identified. Phylogenetic trees indicate that LEA2 proteins are divided into three main clades. Similarly, WOX is also divided into three main clades in the phylogenetic tree. LEA2 genes are predominantly composed of exons. The exon-intron regions of WOX, which show similarity to the phylogenetic tree, also match the motif patterns. LEA2 proteins were observed in six localizations, with the majority (21) found in the cell membrane. In the case of WOX, they were observed in three localizations, with the majority (29) located in the nucleus. It was determined that 34 different grape LEA2 genes are targeted by 151 different miRNAs, and 31 different grape WOX genes are targeted by 205 different miRNAs. It was also revealed that LEA2 and WOX genes possess potential cis-regulatory elements.

As a result, LEA2 and WOX proteins may be effective in developing stress-resistant plants. *In vivo* studies should be conducted to efficiently cultivate stress-resistant plants using LEA2 and WOX genes. Moreover, this study provides a basis for further investigation into the specific functions of LEA2 and WOX genes in terms of abiotic stress tolerance.

Keywords: (LEA2, WOX, Bioinformatics, Abiotic, Stress, Phylogenetics)

2024, 56 pages

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde ve tamamlanmasında bana destek olan ve katkıda bulunan kişi ve kurumlara içtenlikle teşekkür etmek isterim.

Öncelikle, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emine Dilşat YEĞENOĞLU 'na, beni her aşamada yönlendirdiği, değerli görüş ve önerileriyle tez çalışmamın gelişimine katkı sağladığı için teşekkür ederim. Prof. Dr. Meltem SESLİ, Prof. Dr. Yakut GEVREKÇİ ve Öğr. Gör. Tevfik Hasan CAN'a bilgi ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşarak akademik gelişime büyük katkıda bulunduğu için teşekkür ederim.

Tezimin çeşitli aşamalarında bana rehberlik eden ve destek olan Lisansüstü Eğitim Enstitüsü /Tarımsal Bilimler ABD'ne teşekkürlerimi sunarım. TÜRKİYE BURSLARI bana sağladıkları olanaklar ve verdikleri destekle bu çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanmasına yardımcı oldular.

Ayrıca, tez çalışmam süresince bana maddi ve manevi destek veren aileme, arkadaşlarıma teşekkür etmek istiyorum. Sabırları, anlayışları ve sürekli teşvikleri sayesinde bu süreci daha kolay atlattım.

Son olarak, tezimin tamamlanmasına katkıda bulunan ve ismini burada anmadığım herkese teşekkür ederim. Bu çalışma, sizlerin desteği sayesinde başarıya ulaşmıştır.

Saygılarımla,

Mohammad SALEEM

Manisa, 2024

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3D	Three-dimensional
aa	amino acid
ABA	Abscisic Acid
bHLH	A basic helix–loop–helix
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTP	Protein blast
bp	base pairs
CELLO	subCELLular Localization predictor
Da	Dalton
DHN	Dehydrin
DNA	Deoxyribonucleic acid
GA	Gibberelic acid
GO	Gene Ontology
GSDS	Gene Structure Display Server
HB	Homeobox
HD	Homeodomain
HMM	Hidden Markov Model
iTOL	Interactive Tree Of Life
kDa	Kilo Daltons
LEA	Late Embryogenesis Abundant
MEGA	Molecular evolutionary genetics analysis
MeJA	methyl-jasmonate
MEME	Multiple EM for Motif Elicitation
miRNA	microRNA
MW	Molecular Weight
NAC	NAM-ATAF1,2-CUC2
NaCl	Sodium chloride
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDB	Protein Data Bank
Pfam	Protein families database
Phyre2	Protein Homology/analogy Recognition Engine
pI	Isoelectric point
PlantTFDB	Plant transcription factor database
psRNA Target	A Plant Small RNA Target Analysis Server
RNA	Ribonucleic acid
SMP	Seed Maturation Protein
TF	Transcription Factor
VvLEA	<i>Vitis vinifera</i> Late Embryogenesis Abundant
VvWOX	<i>Vitis vinifera</i> Wuschel-related Homeobox

WHY
WOX
WUS

Water Hypersensitive
Wuschel-related Homeobox
WUSCHEL



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: LEA2 genlerinin üzüm kromozomu üzerindeki yerleşimi	19
Şekil 2: WOX genlerinin üzüm kromozomu üzerindeki yerleşimi	20
Şekil 3: LEA2 protinlerine ait Filogenetik ağaç	21
Şekil 4: WOX protinlerine ait Filogenetik ağaç	21
Şekil 5: LEA2 genlerinin motif kompozisyonları.....	23
Şekil 6: WOX genlerinin motif kompozisyonları.....	24
Şekil 7: LEA2 genlerinin ekzon-intron yapısı	25
Şekil 8: WOX genlerinin ekzon-intron yapısı	25
Şekil 9: LEA2 proteinlerinin lokalizasyonunun tahmini	27
Şekil 10: WOX proteinlerinin lokalizasyonunun tahmini	27
Şekil 11: LEA2 genlerine ait proteinlerin tahmini üç boyutlu yapısı.	28
Şekil 12: WOX genlerine ait proteinlerin tahmini üç boyutlu yapısı.	28
Şekil 13: LEA2 Genlerini hedefleyen miRNA'lar	30
Şekil 14: VvLEA2-21, VvLEA2-34 ve VvLEA2-7 Genleri hedefleyen miRNA'lar.....	31
Şekil 15: Ath-miR5021, ath-miR5658, ath-miR854e, ath-miR854d, ath- miR854c, ath-miR854b ve ath-miR854a hedefleyen VvLEA2 genleri	31
Şekil 16: WOX Genlerini hedefleyen miRNA'lar.....	32
Şekil 17: VvWOX-14, VvWOX-31, VvWOX-23, VvWOX-25 ve VvWOX-30 Genleri hedefleyen miRNA'lar	33
Şekil 18: Ath-miR5021, Ath-miR 414, Ath-miR 838 ve Ath-miR 4221 hedefleyen VvWOX genleri.....	33

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1: Üzümde tanımlanan LEA2 genleri	15
Tablo 2: Üzümde tanımlanan WOX genleri.....	17
Tablo 3: LEA2 ve WOX proteinlerinin hücredeki lokalizasyonu.....	26



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT	II
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Üzümün Tarihçesi	3
2.2. Üzümün Önemi.....	3
2.3. The Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteinleri	4
2.4. WUSCHEL-Related Homeobox (WOX)	7
3. MATERYAL-YÖNTEM.....	10
3.1. Yöntem.....	10
3.1.1. Üzüm Genomunda LEA2 ve WOX Genlerinin Belirlenmesi	10
3.1.2. Üzümde LEA2 ve WOX Proteinlerinin Özelliklerini Belirlenmesi ..	10
3.1.3. Üzüm Genomunda LEA2 ve WOX Genlerinin Kromozomal	
Yerleşimlerinin Belirlenmesi	10
3.1.4. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Dizi Hizalanması	10
3.1.5. Filogenetik Analizler	11
3.1.6. Korunmuş Motiflerin ve Ekzon-İntron Yapılarının Belirlenmesi 11	
3.1.7. LEA2 ve WOX Proteinlerinin Hücredeki Lokalizasyonu	11
3.1.8. Üzüm Bitkisi için Belirlenen LEA2 ve WOX Proteinlerinin	
Homoloji Modellemesi	11
3.1.9. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerini Hedef Alan	
miRNA'ların Tanımlanması	12
3.1.10. LEA2 ve WOX Genlerinin Promotör Bölge Analizi.....	12
4. BULGULAR.....	13
4.1. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Dizilerinin Belirlenmesi,	
Adlandırılması ve Karakterizasyonu	13
4.2. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Kromozomal Dağılımı	13
4.3. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Filogenetik Ağacı Analizi	14

4.4.	Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Motiflerinin ve Ekzon-İntron Yapılarının Belirlenmesi	22
4.5.	LEA2 ve WOX Proteinlerinin Lokalizasyonunun Tahmini	26
4.6.	Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Proteinlerinin Homoloji Modellemesi	28
4.7.	Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Analizleri	29
4.8.	Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Promotör Bölge Analizi	34
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	35
KAYNAKLAR:		51



1. GİRİŞ

Dünyanın büyük bir bölümü su kıtlığı, tuzluluk ve aşırı sıcaklık dalgalanmaları tehdidi altındadır. Bitkiler, doğal ortamlarında çeşitli biyotik ve abiyotik stres biçimleriyle karşı karşıyadır. Bu tehditler, mahsullerin hayatta kalmasında ve üretkenliğinde ciddi bir azalmaya neden olmaktadır. Yıllık dünya bitki üretim kayıplarının yarısını oluşturmaktadır [1].

Üzüm (*Vitis vinifera* L.) tüm dünyada yetiştirilen önemli bir meyve türüdür. Kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslerin yanı sıra aşırı sıcaklıklar, üzümlerde hem verimi hem de tane kalitesini olumsuz etkileme potansiyeline sahiptir [2].

LEA proteinleri büyük ölçüde hidrofilik proteinlerdir; şiddetli çevre koşullarının neden olduğu hasarı önleyebilirler. Çok sayıda gelişim sürecine katkıda bulundukları ve tuzluluk, kuraklık, donma ve fitohormon ve absisik asit (ABA) işlemleri ile ilgili olarak biriktikleri bulunmuştur [1].

LEA gen ailesinin stres toleransı ile ilişkili olduğunu ve bu genlerin manipülasyonunun üzümlerde artan stres toleransı sağlayabileceğini göstermektedir [1], [2].

LEA proteinlerinin bitkilerdeki işlevini tanımlamaya, sınıflandırmaya ve değerlendirmeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. LEA proteinlerinin bitkilerde görülen sekans ve fonksiyon çeşitliliği ile mevcut bitki genomlarının sayısının artışı, LEA gen ailelerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesine olanak sağlamıştır [3].

Gen transkripsiyonunun mekansal ve zamansal düzenlemesi, bitki gelişimi ile biyotik ve abiyotik stresler gibi çevresel uyaranlarına karşı yanıtı etkileyen önemli bir sistemdir. Wuschel-related Homeobox (WOX) gen ailesi, bitkilerde embriyogenezin ve organ gelişiminin erken aşamalarında yer alan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. Yapılan çalışmalarda, WOX ailesi üyelerinin iki farklı *Vitis vinifera* çeşidinde embriyojenik doku ile olgun organlarda farklı transkripsiyon seviyeleri gösterdikleri, bitkilerde somatik embriyogenezin anahtar düzenleyicileri olduğu, embriyogenezin erken evrelerinde yer alan gen transkripsiyonunu koordine etmede önemli bir rol oynadıkları ve GmWOX genlerinin çoğunun farklı abiyotik stres faktörlerine (soğuk ve kuraklık) yanıt verdikleri belirlenmiştir [4, 5, 6, 7].

LEA genleri üzümde farklı çeşitlerde çalışılmış olmasına karşın, spesifik olarak LEA2 alt ailesi ve WOX proteinleri ilk defa *Vitis vinifera* L.'da incelenmiş, bu proteinlerin abiyotik stres (kuraklık, sıcaklık vb.) altındaki olası işlevleri analiz edilmiştir, gelecekteki çalışmalarda abiyotik strese karşı daha dayanıklı ve verimi yüksek asmaların geliştirilmesi için yapılacak çalışmalara kaynak oluşturması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üzümün Tarihçesi

Asma (*Vitis vinifera* L.), dünyadaki en eski meyve türlerinden biridir. Arkeolojik araştırmalar, asmanın 150 milyon yıl öncesine ait olduğunu göstermektedir. Anadolu'da da bağcılık oldukça eskidir. Anadolu bağcılığının M.Ö. 3500 yılına dayandığını gösteren arkeolojik kazılar mevcuttur [8].

İnsan yaşamının her alanında üzüm ve üzümle ilgili kavramlar (bağ, yaprak, şarap vb.) önemli bir rol oynamıştır. Tarih boyunca, insanların dini inançlarını ve günlük yaşamlarını yansıtan eşyaları ve mimari eserleri üzümle ilgili kavramları temsil etmiştir. Bu, üzüme verdikleri değeri göstermektedir. Arkeolojik kazılar sonucunda ortaya çıkarılan tarihi eserlerde bu sembollerin bulunması bunun en büyük kanıtıdır. Mitolojiden beri üzüm dünyanın en değerli meyvelerinden biri olmuştur. Mitolojik dönemde üzüm ve üzüm ürünleri tanrılara adanmış, bu nedenle üzüm her zaman sanat eserlerinde yer almıştır [9].

Asmanın veya üzümün milyonlarca yıllık geçmişi vardır. Asmanın anavatanı ile ilgili görüşler tartışmalı olsa da çoğu insan Hazar Denizi'nin güneyi, Kafkasya ve Kuzey Doğu Anadolu bölgelerini asmanın anavatanı olarak görmektedir. Arkeolojik ve jeolojik araştırmalar, asmanın günümüzden milyonlarca yıl önce dünyanın birçok yöresinde yetiştiğini göstermektedir. Pres artığı üzüm çekirdekleri, üzümden şarap yapmanın yaklaşık 10.000 yıl öncesine dayandığını göstermektedir. Bu nedenle bağcılık kültürünün de Anadolu'da aynı dönemde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Anadolu uygarlıklarının tarihi bağcılıkla bağlantılıdır ve çok sayıda asma çeşidi binlerce yıldan beri yetiştirilmektedir [9].

Anadolu bağcılığı, dünya çapında önemli bir rol oynar ve uzun bir geçmişe sahiptir. Asmanın majör gen kaynaklarından biri de Anadolu'dur (Türkiye) [10].

2.2. Üzümün Önemi

Günümüzde üzüm dünya çapında en çok üretilen meyve türlerinden biridir. Taze üzüm yalnızca meyve olarak (sofralık) tüketilmemektedir. Kuru üzüm, özellikle ekmek ve kek sanayiinde, Türkiye dahil olmak üzere birçok ülkede çerez olarak tüketilmektedir [10].

Dünyada daha çok şaraplık üzüm üretimi görülmektedir, ancak üzüm suyu sırası çıkarılarak pekmez, pestil, köfter gibi ürünler işlenip değerlendirilmekte, konyak ve rakı gibi içkiler üzümünden yapılmaktadır. Bilhassa salataların vazgeçilmez bir parçası olan sirke üzümünden üretilmektedir [10].

Ayrıca, çekirdekleri ve çekirdeklerinden çıkarılan yağı da günümüzde önemli bir tüketim maddesidir. Çekirdekleri un haline getirildiğinde içerdiği yüksek antioksidan nedeniyle katkı maddesi olarak bisküvi ve ekmek sanayiinde, çiçeklerinden elde edilen yağ ise kozmetik sanayiinde kullanılmaktadır [10].

2.3. The Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteinleri

Geç Embriyogenez Bolluğu (The Late Embryogenesis Abundant -LEA) protein gen ailesi, birçok bitki türünde tuz ve kuraklık stresine toleransla ilişkilidir [2]. LEA proteinleri bitkilerde bol miktarda bulunur ve bitki gelişimi ile abiyotik stres toleransında önemli rol oynayan hidrofilik koruyucu proteinlerdir [11, 12].

Bu gen ailesinin *Vitis vinifera* 'da dokuz alt aileye (DHN, LEA1, LEA2, LEA3, LEA4, LEA5, LEA6, WHY ve SMP) sınıflandırılan 60 üyesini tanımlanmıştır. LEA2 alt ailesi 35 üyeyle en büyük alt grubu oluşturduğu belirtilmiştir. Genel olarak *LEA* gen ailesinin stres toleransı ile ilişkili olduğunu ve bu genlerin manipülasyonunun üzümlerde stres toleransının artırılmasını sağlayabileceği düşünülmektedir [2].

Nicotiana tabacum'da 123 NtLEA geni tanımlanmış ve LEA1, LEA2, LEA3, LEA4, LEA5, LEA6, DHN (dehidratın) ve SMP (Tohum Olgunlaşma Proteini) olmak üzere 8 gruba ayrılmıştır. LEA2 grubu, NtLEA ailesinin en yaygın görülen üyeleridir [13].

NtLEA genlerinin iki farklı abiyotik stres altında önemli ölçüde uyarıldığı ve farklı ekspresyon modelleri gösterdiği belirlenmiştir. Sırasıyla ABA'ya (Absisik Asit) yanıt veren 35 NtLEA geninin ve NaCl abiyotik stresine yanıt veren 3 NtLEA geninin ekspresyon modelleri karakterize edilmiştir. Birçok NtLEA proteininin (>%78) abiyotik strese karşı tütün direncini artırma potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır [13].

Dişbudak ağacı (*Fraxinus excelsior*) genomunda 118 tane LEA geni (FexLEA) tanımlanmış, miR838 adlı mikro RNA'nın FexLEA transkriptlerini hedef alan en yaygın miRNA olduğu görülmüştür [14].

Hünnap (*Ziziphus jujuba* Mill.) genomunda toplam 93 LEA geni tanımlanmıştır. LEA genleri çeşitli taksonomik gruplara farklı şekilde dağılmıştır.

ZjuLEA genleri ZjuLEA1, ZjuLEA2, ZjuLEA3, ZjuLEA4, ZjuLEA5 (Küçük hidrofilik bitki tohum proteini), ZjuLEA6 (Geç embriyogenezde bol protein 18) olmak üzere 6 ana alt aileye ayrılmıştır. ZjuLEA2 60 üyeli en büyük aile iken ZjuLEA4 ve ZjuLEA6 alt ailelerinin her biri yalnızca bir gen içermektedir [15].

Önceki çalışmalarda salatalıkta 79 LEA geni, patatest 74 StLEA geni, sorgumda 68 SbLEA, üzümde 60 VvLEA, çay bitkisinde 33 ve domatest 27 üye bildirilmiştir[15].

LEA genlerinin sayısı bitkilerde büyük çeşitlilik gösterse de allopoliploidlerin daha yüksek sayılara sahip olma eğiliminde olduğu görülmektedir. Aksine, *Physcomitrella patens* ve *Lotus japonicus* su bitkileri sırasıyla yalnızca 18 ve 19 LEA'ya sahiptir; bu da kuraklık stresine maruz kalan karasal bitkilerin su bitkilerinden daha fazla LEA'ya sahip olduğunu düşündürmektedir [15].

LEA2 proteinlerinin sadece normal büyüme koşulları sırasında değil aynı zamanda kuruma (dessication) stresi sırasında da çeşitli bitki dokularında biriktiği çay, üzüm, sorgum, patates, salatalık ve pamuk üzerine yapılan çalışmalarda da LEA2 genlerinin baskın grup olduğu bildirilmiştir. Segmental ve tandem kopyalamalar ile transpozisyon olaylarının, LEA2 genlerinin yüksek bitkiler arasında yayılmasının ana nedenleri olabileceği varsayılmaktadır [15].

Çay (*Camellia sinensis*)'da toplam 48 LEA geni tanımlanmıştır. En fazla üyenin CsLEA2 grubundaki genler olduğu bulunmuştur. Neredeyse tüm CsLEA genlerinin tohum gelişiminde rol oynadığı ve otuz dokuz tanesinin dehidrasyonla beraber çay tohumunun olgunlaşmasında önemli bir rol oynayabileceği saptanmıştır. Bununla birlikte, tohum kurumasında yalnızca on altı CsLEA geninin görev aldığı ve birçoğunun ifadesinin bastırıldığı görülmüştür. Ayrıca kırk altı adet CsLEA geninin, araştırmadaki stres faktörlerinden en az biri tarafından uyarıldığı ve özellikle yüksek sıcaklık stresine karşı duyarlı oldukları belirtilmiştir. [16].

LEA genleri genellikle yüksek bitkilerde büyük bir gen ailesi olarak bulunmaktadırlar. Bugüne kadar LEA gen ailesinin genom düzeyinde tanımlanması ve analizi, *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*, *S. tuberosum*, *C. sativus*, *S. lycopersicum*, *B. napus*, *M. esculenta*, *P. trichocarpa*, *P. mume* ve *P. tabuliformis* gibi tüm genomları dizilenmiş birçok bitki türünde gerçekleştirilmiştir. Çoğu LEA proteini oldukça hidrofiliktir ve doğal formlarında doğası gereği düzensizdir çünkü yüksek oranda

yüklü amino asit kalıntılarının yanı sıra glisin veya diğer küçük amino asitleri (alanin, serin ve treonin) içerirler. Sistein ile triptofan kalıntılarını ya az miktarda içerirler ya da içermezler. LEA proteinlerinin, bitkilerin normal büyümesi ve gelişmesinde önemli rol oynadığı ve ayrıca hücrelerdeki çeşitli stres koşullarının zararlı etkilerini hafifletmede rol oynadığı düşünülmektedir. Bu proteinlerin, tohum olgunlaşmasının son periyodu sırasında dehidrasyonla eş zamanlı olarak yüksek konsantrasyonlarda biriktiği bulunmuştur. Daha da önemlisi, ifadelerinin soğuk, sıcak ve kuraklık gibi abiyotik stres koşulları altında önemli ölçüde uyarılabileceği gösterilmiştir [16].

LEA proteinlerinin, membran yapılarının stabilizasyonu, serbest radikallerin temizlenmesi ve iyonların ayrıştırılması dahil olmak üzere abiyotik streslere karşı çeşitli önemli işlevlerde yer alabileceği öne sürülmüştür [16].

Hücresele düzeyde, hücrealtı (subcellular) konum analizi, LEA proteinlerinin esas olarak çekirdekte ve sitoplazmada bulunduğunu ortaya çıkarmıştır [16].

Çamda (*Pinus tabulaeformis*) LEA proteinlerinin stres koşulları altındaki hücrelerde koruyucu bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, gen grupları arasında olduğu kadar bir gen grubu içinde de belirli bir düzeyde fonksiyon farklılığı ortaya çıkarılmıştır; bu durum LEA gen ailelerinin potansiyel fonksiyonel çeşitliliğini göstermektedir [17].

Kuraklık, tuzluluk ve aşırı sıcaklık gibi abiyotik stresler normal bitki büyümesi ve gelişimi için sınırlayıcı faktörlerdir. Yüksek tuzluluk hem hücresele hem de tüm bitki seviyesinde su potansiyeli ve iyon dağılımındaki homeostaziyi bozar. Moleküler hasarlara, gelişimin durmasına ve hatta ölüme neden olur. Yüksek sıcaklık; protein denatürasyonu, toplanması ve bozulmasının yanı sıra protein sentezinin engellenmesi ve enzimlerin inaktivasyonu da dahil olmak üzere geri dönüşü olmayan hasarlara yol açabilmektedir. Yüksek sıcaklık aynı zamanda membran lipitlerinin akışkanlığını da artırabilir ve bu da membran bütünlüğünün kaybına neden olabilir. Yüksek bitkiler bu çevresel faktörlere karşı çeşitli genetik tepkiler geliştirmiştir. Abiyotik stres toleransı sırasında hücresele korumada işlev gören LEA proteinleri önemli bir grup olarak yer almaktadır [17].

LEA proteinleri, pamuk ve buğdayda ilk kez bulunmalarından bu yana, omurgasızlar ile prokaryotlar dahil olmak üzere birçok organizmada ve tüm bitki aleminde tanımlanmışlardır. LEA genleri esas olarak tohumlarda ifade edilir ve

adından da anlaşılacağı gibi geç embriyo gelişim aşamasında birikirler, hücrel proteinlerin %4'ü kadarını oluştururlar. Ayrıca tüm gelişim aşaması boyunca fidelerde, köklerde ve diğer organlarda da bulunurlar. Çevresel strese maruz kaldıktan sonra bitkiler buna yanıt olarak yüksek düzeyde LEA proteini biriktirmektedirler. Hücrel yapıların su kaybı ve kuruma etkilerinden korunması, proteinlerin stres kaynaklı hasarlardan korunması, iyonların tutulması ve denatüre proteinlerin katlanması gibi çeşitli işlevlere sahip oldukları öne sürülmektedir. LEA proteinleri aynı zamanda hücrel hasara direnmek için şaperon proteinleri olarak da görev yapabilmektedirler. LEA genleri genellikle yüksek bitkilerde büyük bir gen ailesi olarak bulunurlar. Örneğin *Arabidopsis* ve *Populus* sırasıyla 51 ve 53 üye içerir ve bunlar amino asit dizisi homolojisine ve spesifik motiflere göre sekiz gruba ayrılmaktadırlar [17].

Muz ağacında (*Musa acuminata*) 85 proteini kodlayan toplam 84 LEA geni tanımlanmış ve sekiz alt aileye ayrılmıştır. LEA2 alt ailesi, 57 üyeyi de içeren en büyük ve en çeşitli alt aile olarak belirlenmiştir. MaLEA proteinlerinin çoğu hidrofilik bulunmuş, strese yanıt, bağlanma, yapısal bileşenler olarak görev alma ve embriyo gelişimi dahil olmak üzere çeşitli işlevlerinin bulunduğu öngörülmüştür [18].

Ipomoea pes-caprae L.'de (*Convolvulaceae*) tuz toleransı ile ilişkili atipik bir LEA geni (IpLEA) rapor edilmiştir. Dizi analizi, IpLEA'nın LEA2 (PF03168) grubuna ait olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Bitkilerde IpLEA'nın fonksiyonunu daha fazla değerlendirmek için, IpLEA'yı aşırı eksprese eden transgenik *Arabidopsis* bitkileri üretilmiştir. IpLEA'yı aşırı eksprese eden *Arabidopsis* fideleri ve yetişkin bitkileri, yabani tipe göre tuza ve kuraklık stresine karşı daha yüksek tolerans göstermiştir. Transgenik bitkiler ayrıca yabani tip *Arabidopsis*'ten daha yüksek oksidatif stres toleransı göstermiştir. Ayrıca strese duyarlı bir dizi genin ifadeleri de etkilenmiştir. IpLEA'nın, muhtemelen su homeostazisine aracılık ederek veya reaktif oksijen türleri temizleyicisi olarak hareket ederek, tuz ve kuraklığa karşı bitki stres yanıtında yer aldığı, dolayısıyla mikroorganizmalarda ve bitkilerde çeşitli abiyotik stresler altında fizyolojik süreçleri etkilediği varsayılmaktadır [19].

2.4. WUSCHEL-Related Homeobox (WOX)

Bitkilerde bulunan WOX ailesi, büyüme, gelişme, hücre bölünmesi, farklılaşma ile abiyotik stres yanıtını düzenlemede yer alan bir homeodomain varlığıyla karakterize transkripsiyon faktörleri ailesidir. [7, 20].

Wuschel ile ilişkili homeobox (WOX) gen ailesi, 60-66 amino asit korunmuş DNA bağlanma alanı içeren en büyük transkripsiyon faktörü gruplarından birini kodlayan homeodomain (HD) süper ailesine aittir. Homeobox (HB) transkripsiyon faktörleri bitkilerde 14 sınıfa ayrılmıştır. Evrimsel çalışmalar, WOX gen ailesinin üç kola ayrıldığını göstermektedir. *Arabidopsis thaliana* model bitkisinde toplam 15 WOX proteini, homeodomain aminoasit dizilerine göre modern veya Wuschel (WOX 1-7 ve WUS proteinleri), orta (WOX 8, 9, 11 ve 12 proteinleri) ve eski (WOX 10, 13 ve 14 proteinleri) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır; Son araştırmalar, WOX genlerinin bitkilerde embriyo ve organ gelişimi gibi temel gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir [21].

WOX proteinleri, farklı meristem türlerinin aktivitesini koruyarak ve bitki organlarının oluşumunu düzenleyerek, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol etmektedir. *Arabidopsis thaliana* genomu, WUSCHEL (WUS) geni ve WOX1-14 genleri dahil olmak üzere WOX ailesinin 15 üyesini içermektedir. WOX ailesi üç büyük sınıfa ayrılabilir: *A. thaliana*'nın WOX10, 13 ve 14 genlerini içeren antik veya T1 olarak adlandırılan grup, WOX8, 9, 11 ve 12'yi içeren ara sınıf (T2) ve WUS ve WOX1-7'yi içeren modern sınıf (T3 veya WUS sınıfı). Filogenetik analize göre, WUS sınıfı ilk olarak *Polypodiidae* ve *Spermatophyta*'nın ortak atasında ortaya çıkmıştır. Ara sınıfın üyeleri *Lycopodiophyta*'da görülür, bununla beraber yalnızca tohumlu bitkilerde bulunduğu da düşünülmektedir. Antik sınıfın WOX genleri *Embryophyta* ve *Chlorophyta* genomlarında bulunur [21].

Domateste (*Solanum lycopersicum*) WOX genlerinin (SIWOX) dokuların büyümesi ve gelişmesi sırasında önemli rollerinin olduğu ortaya konulmuştur. Kuraklık, NaCl, soğuk, absisik asit, indol-3-asetik asit, jasmonik asit, gibberellin ve salisilik asit muameleleri altında farklı SIWOX'ların değişen ifadeleri, bu genlerin büyüme düzenleyici fonksiyonlarına ek olarak stres tepkilerindeki potansiyel fonksiyonlarını da göstermektedir [22].

Pirinçte (*Oryza sativa*) bulunan WOX gen ailesi üyelerinin ifadelerinin (OsWOX) pirinç tohumu çimlenmesinde, fide aşamasında, farklı abiyotik stres faktörlerine karşı yanıtta değiştiği belirlenmiş ve OsWOX9 ile OsWOX11 genlerinin tohum çimlenmesini düzenleyen anahtar genler olduğu bildirilmiştir [23].

Aynı zamanda WOX gen ailesinin, embriyogenezin erken evrelerinde hem sürgün hem de kök meristem fonksiyonlarında ve bitkilerde organogenezde yer alan gen transkripsiyonunun koordinasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [6].



3. MATERYAL-YÖNTEM

3.1. Yöntem

3.1.1. Üzüm Genomunda LEA2 ve WOX Genlerinin Belirlenmesi

Öncelikle üzüm genomunda çalışılacak olan LEA2 ve WOX genlerinin belirlenmesinde, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanının yanı sıra PlantTFBD (<http://planttfdb.gao-lab.org/>) veri tabanı kullanılarak bütün bitkilerdeki LEA2 ve WOX genlerine ait genomik, kodlayan bölge ve protein dizileri elde edilmiştir. NCBI genom veri bankasında *Vitis vinifera* L.'ye ait tüm genom bilgisi bulunmaktadır [24]. Pinot Noir çeşiti PN40024 hattından elde edilen tüm diziler CLC Genomic Workbench 21 programı ile Pfam (<https://pfam.xfam.org>) veri tabanında yer alan LEA2 ve WOX proteinleri ile ilişkili korunmuş bölgeler, Hidden Markov Modelleri (HMM) ile karşılaştırılmıştır. Sonra BLASTP sorgusu aracılığı ile $\geq e^{-35}$ beklenti değeri ve $\geq 40\%$ benzerlik koşullarını sağlayan eşleşmeler anlamlı eşleşmeler olarak kabul edilip, üzüme ait olan olası LEA2 ve WOX protein dizileri elde edilmiştir.

3.1.2. Üzümde LEA2 ve WOX Proteinlerinin Özelliklerini Belirlenmesi

Muhtemel LEA2 ve WOX proteinlerinin izoelektrik nokta, molekül ağırlığı, amino asit uzunluğu, stabilite gibi karakteristik özellikleri Expasy PROTPARAM (<https://web.expasy.org/protparam/>) çevrimiçi aracı kullanılarak belirlenmiştir [25].

3.1.3. Üzüm Genomunda LEA2 ve WOX Genlerinin Kromozomal Yerleşimlerinin Belirlenmesi

Üzüm LEA2 ve WOX proteinlerini kodlayan genlerin kromozomal yerleşimlerini belirlemek için ilgili proteinlerin genomik dizileri National Center for Biotechnology Information Database' de (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) taranmıştır. Kromozomal yerleşimlerin görselleştirilmesi ise MapChart yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [26].

3.1.4. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Dizi Hizalanması

Elde edilen üzüm LEA2 ve WOX proteini dizilerinin, MEGA11 programı aracılığıyla ClustalW algoritması kullanılarak çoklu dizi hizalaması yapılmıştır [27].

3.1.5. Filogenetik Analizler

ClustalW programı ile hizalanmış diziler kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir. Filogenetik ağaç çiziminde Maximum Likelihood metodu kullanılmıştır. [28]. Çizilen filogenetik ağaç iTOL veri tabanı kullanılarak görselleştirilmiştir [29].

3.1.6. Korunmuş Motiflerin ve Ekzon-İntron Yapılarının Belirlenmesi

Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) programı kullanılarak genlerin ekzon-intron bölgeleri belirlenmiştir [30].

Evrin ile korunmuş, kısa DNA, RNA ya da protein dizilerine motif denmektedir. Bu motiflerin tanımlanması ve anlaşılması, moleküler ölçekte büyük önem taşımaktadır. Amino asit dizileri arasındaki korunmuş motiflerin tanımlanması için bir motif belirleme aracı olan Multiple Em for Motif Elicitation (MEME, <http://meme-suite.org/>) çevrimiçi aracı kullanılmıştır. Tanımlama yapılırken motif sayısı 20, motif genişliği optimum ≥ 2 ve ≤ 300 olarak seçilmiştir [31].

3.1.7. LEA2 ve WOX Proteinlerinin Hücredeki Lokalizasyonu

Üzüm bitkisine ait LEA2 ve WOX proteinlerinin lokalizasyonunun tahmini CELLO v.2.5 (subCELLular LOcalization predictor, <http://cello.life.nctu.edu.tw/>) programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Veri tabanına yüklenen amino asit dizilerinin hücredeki yerleşimleri belirlenmiştir [32].

3.1.8. Üzüm Bitkisi için Belirlenen LEA2 ve WOX Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Homoloji modellemesi, bir proteinin üç boyutlu (3D) yapısının, yapısı çözümlenmiş olan bir ya da daha fazla protein yapısı ile karşılaştırarak çözümlenmesidir. Öncelikle BLASTP taraması yapılmıştır. Ardından üzüm genlerine benzer dizilerin ve bilinen üç boyutlu yapıya sahip en uygun örneğin belirlenmesi için Protein Data Bank (PDB) taraması yapılmış, sonuç olarak elde edilen veriler, Phyre2 programı kullanılarak homoloji modellemesi ile üzüm bitkisindeki LEA2 VE WOX genlerine ait proteinlerin muhtemel üç boyutlu yapıları bulunmuştur [33].

3.1.9. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerini Hedef Alan miRNA'ların Tanımlanması

Üzüm bitkisindeki LEA2 ve WOX genlerinde miRNA kontrollü gen hedeflerinin tanımlanması için psRNA Target Server kullanılarak da bilinen *Arabidopsis thaliana* miRNA'ları ile üzüm bitkisindeki LEA2 ve WOX gen transkriptleri hizalanarak varsayılan *Arabidopsis thaliana* ve üzüm miRNA'ları belirlenmiştir. [34]

Ardından elde edilen veriler *Cytoscape* programı kullanılarak görselleştirilmiştir. [35]

3.1.10. LEA2 ve WOX Genlerinin Promotör Bölge Analizi

Üzüm LEA2 ve WOX transkripsiyon faktör gen ailesi üyelerinin her birinin 5' başlama noktasından önceki (upstream) bölgesinden yaklaşık 2000 bp DNA parçası alınarak ve PlantCARE veri tabanı (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) kullanılarak cis acting element analizi gerçekleştirilmiştir. [36]

4. BULGULAR

4.1. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Dizilerinin Belirlenmesi, Adlandırılması ve Karakterizasyonu

Bütün bitkilerdeki LEA2 ve WOX dizileri elde edilip aralarından üzüm bitkisine ait olanlar belirlenmiştir. Yapılan bu analizler sonucunda üzüm bitkisindeki her LEA2 ve WOX sınıfına ait diziler elde edilmiş ve asmanın latince adının (*Vitis vinifera*) baş harfleri ile LEA2 ve WOX proteinlerinin kısaltmasıyla, VvLEA2 ve VvWOX şeklinde adlandırılmaları yapılmıştır.

Bu verilere göre; LEA2'ye ait 36 gen bulunmuş ve VvLEA2-1'den VeLEA2-36'ya kadar adlandırılmış, WOX'a ait 31 gen bulunmuş ve VvWOX-1'den VeWOX-31'e kadar adlandırılmıştır.

Bulunan genlerin karakterizasyonu yapılırken, protein uzunluğu, izoelektronik etki değeri (pI), moleküler ağırlıkları gibi özellikleri belirlenmiştir. Buna göre:

LEA2'nin protein uzunluklarının 151 ile 310 aa arasında değiştiği, çoğunun (32 tanesi) bazik özellikte olduğu (izoelektrik etki değeri 4.77 ile 10.58 arasında değiştiği), Moleküler ağırlık 16566.98 ile 34744.89 Da değiştiği, 17 genin kararsız ve 19 tanesinin kararlı olduğu, görülmüştür (Tablo 1).

WOX'nin protein uzunluklarının 168 ile 1772 aa arasında değiştiği, çoğunun (23 tanesi) asidik özellikte olduğu (izoelektrik değerinin 4.68 ile 9.39 arasında değiştiği), Moleküler ağırlık 18552.03 ile 198582.74 Da değiştiği, hepsinin kararsız olduğu görülmüştür (Tablo 2).

4.2. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Kromozomal Dağılımı

LEA2'ye ait belirlenen genler üzüm bitkisinin 13 kromozomu üzerinde dağılmıştır. Mapchart programı ile gösterimi yapılan bu yerleşim incelendiğinde:

LEA2'ye ait genlerden (6 tanesi) 15. kromozom üzerinde yer almaktadır. Ardından 2. Kromozom üzerinde 5 adet gen yer almaktadır. Ardından 6. ve 16. Kromozom üzerinde 4 adet gen yer almaktadır. Ardından 8. ve 9. ve 11. kromozom üzerinde 3 adet gen yer almaktadır. Ardından 4. ve 19. Kromozom üzerinde 2 adet gen yer almaktadır. En az LEA2 geni ise 3. ve 7. ve 10. ve 18. kromozom üzerinde (1 tane) bulunmuştur (Şekil 1).

WOX genlerinin kromozomal dağılımına bakıldığında ise, üzüm bitkisinin 12 kromozomu üzerinde dağıldığı belirlenmiştir.

Genlerin en fazla 4. kromozomda (5 gen) yerleştiği görülmektedir. Ardından 1. ve 6. ve 10. kromozomlarda (4 gen) bulunmaktadır. Ardından 2. ve 8. Kromozomlarda (3 gen) bulunur. Ardından 7. ve 12. Kromozomlarda (2 gen) bulunur. Ardından 3. ve 9. ve 11. ve 13. Kromozomlarda (1 gen) bulunur (Şekil 2).

4.3. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Filogenetik Ağacı Analizi

Maximum Likelihood yöntemi ile çizilen filogenetik ağaçlar incelendiğinde; LEA2 proteinlerinin 3 ana kola ayrıldığı görülmüştür. Bunlar 1'den 3'e kadar sınıflandırılmıştır. Sınıf 1'de 1 protein, Sınıf 2'de 17 protein, Sınıf 3'te 18 protein bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).

WOX'ın ise filogenetik ağaçta 3 ana kola ayrıldığı belirlenmiştir. Bu kollar sınıflandırıldığında; Sınıf 1'de 7 protein, Sınıf 2'de 10 protein, Sınıf 3'te 14 protein bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4).

Tablo 1: Üzümde tanımlanan LEA2 genleri

ID	NCBI Veritabanı	Asma genomunda fiziksel pozisyonu			Protein Uzunluğu(aa)	pI (İzoelektrik Noktası)	Molekül Ağırlığı (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/Kararsız
		Kromozom	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)					
VvLEA2-1	WJZ81913.1	2	457,914	458,459	181	10.17	20068.82	17.64	Kararlı
VvLEA2-2	WJZ81914.1	2	461,560	462,186	208	9.93	22918.97	23.92	Kararlı
VvLEA2-3	WJZ81915.1	2	464,517	465,158	213	9.60	23378.79	40.36	Kararsız
VvLEA2-4	WJZ81916.1	2	470,941	471,576	211	10.09	23469.97	42.58	Kararsız
VvLEA2-5	WJZ82021.1	2	1,358,237	1,358,821	194	9.15	21001.44	31.65	Kararlı
VvLEA2-6	WJZ83567.1	3	2,548,007	2,550,199	310	9.48	34744.89	55.87	Kararsız
VvLEA2-7	WJZ84866.1	4	1,012,998	1,013,795	265	10.00	28808.17	46.63	Kararsız
VvLEA2-8	WJZ85525.1	4	9,468,886	9,469,641	251	9.64	27800.58	37.44	Kararlı
VvLEA2-9	WJZ89485.1	6	16,617,764	16,618,567	267	9.21	29307.84	44.38	Kararsız
VvLEA2-10	WJZ89924.1	6	23,602,705	23,603,259	184	6.21	20156.14	37.87	Kararlı
VvLEA2-11	WJZ89980.1	6	24,375,273	24,375,899	208	9.06	23744.90	42.00	Kararsız
VvLEA2-12	WJZ89981.1	6	24,383,247	24,394,081	240	9.92	26181.85	44.78	Kararsız
VvLEA2-13	WJZ91995.1	7	27,372,319	27,373,449	309	10.22	33985.95	49.45	Kararsız
VvLEA2-14	WJZ92347.1	8	442,396	443,043	215	9.89	24185.44	52.46	Kararsız
VvLEA2-15	WJZ93512.1	8	17,618,557	17,619,180	207	9.70	23074.96	36.67	Kararlı
VvLEA2-16	WJZ93513.1	8	17,625,201	17,625,881	226	8.89	25238.06	28.73	Kararlı
VvLEA2-17	WJZ94378.1	9	2,055,079	2,055,840	253	10.19	27522.98	32.64	Kararlı
VvLEA2-18	WJZ94567.1	9	3,890,660	3,893,081	310	9.89	34378.14	61.40	Kararsız
VvLEA2-19	WJZ94612.1	9	4,170,380	4,173,465	237	9.71	26666.98	42.10	Kararsız
VvLEA2-20	WJZ95790.1	10	275,657	276,645	215	9.65	24708.35	39.36	Kararlı
VvLEA2-21	WJZ97959.1	11	3,104,137	3,107,270	302	9.75	33394.13	65.27	Kararsız
VvLEA2-22	WJZ97983.1	11	3,272,547	3,278,052	212	7.69	23774.28	35.99	Kararlı

Tablo 1. Üzümde tanımlanan LEA genleri (devam)

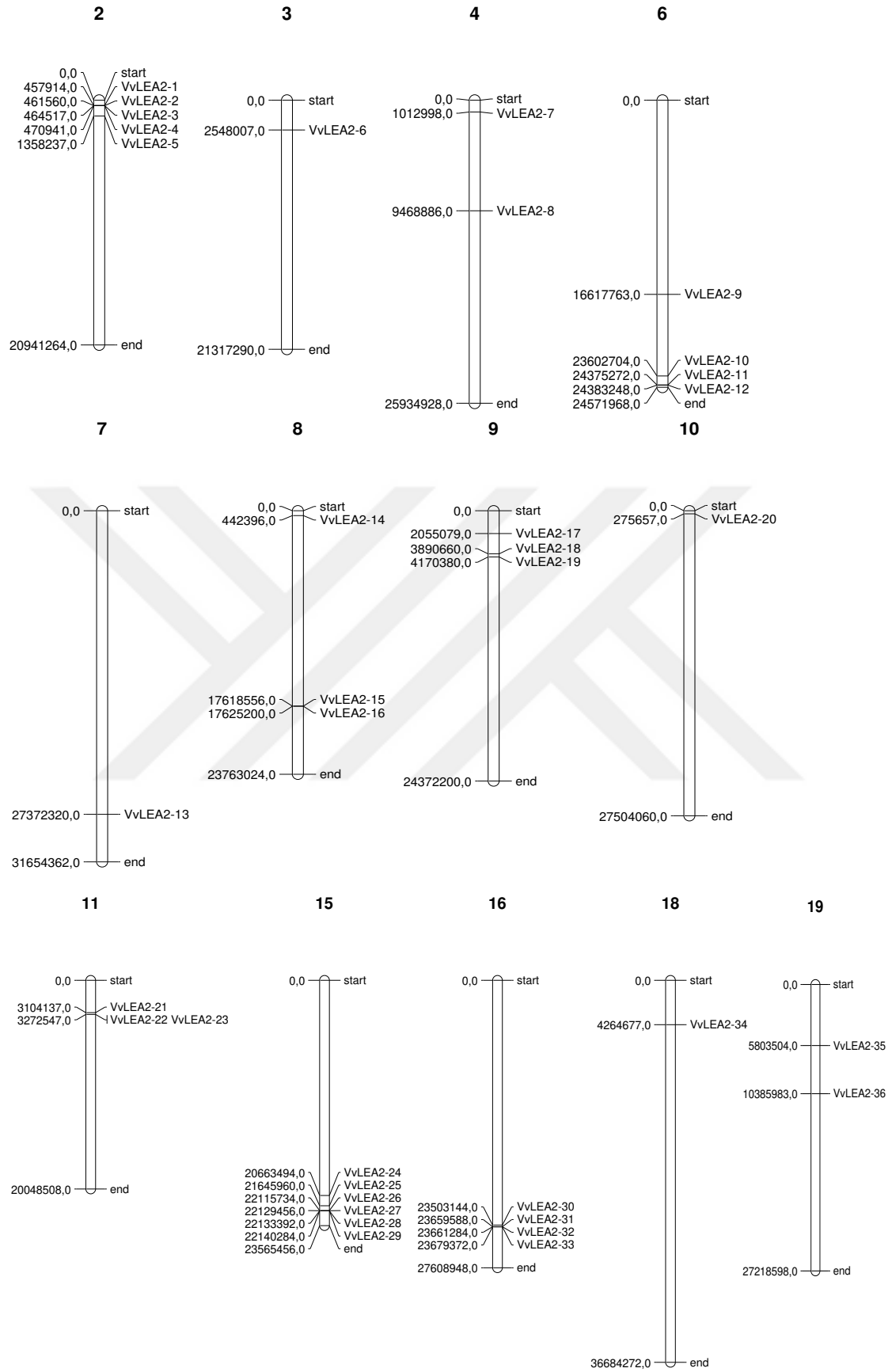
VvLEA2-23	WKA00082.1	11	3,272,547	3,278,052	243	9.28	26287.38	40.99	Kararsız
VvLEA2-24	WKA05790.1	15	20,663,494	20,664,139	194	8.98	21081.54	31.15	Kararlı
VvLEA2-25	WKA05870.1	15	21,645,961	21,648,211	246	10.03	27445.31	46.91	Kararsız
VvLEA2-26	WKA05927.1	15	22,115,734	22,116,682	220	10.23	24440.80	46.83	Kararsız
VvLEA2-27	WKA05929.1	15	22,129,457	22,130,202	152	4.87	16667.40	17.57	Kararlı
VvLEA2-28	WKA05930.1	15	22,133,391	22,134,096	152	6.10	16689.63	29.47	Kararlı
VvLEA2-29	WKA05931.1	15	22,140,285	22,141,506	151	4.77	16566.98	24.14	Kararlı
VvLEA2-30	WKA07357.1	16	23,503,144	23,503,704	186	10.58	20738.17	29.87	Kararlı
VvLEA2-31	WKA07380.1	16	23,659,589	23,660,215	208	9.68	22865.45	36.24	Kararlı
VvLEA2-32	WKA07382.1	16	23,661,285	23,661,902	205	9.22	22485.89	38.52	Kararlı
VvLEA2-33	WKA07384.1	16	23,679,372	23,680,209	211	10.18	23294.40	29.47	Kararlı
VvLEA2-34	WKA09558.1	18	4,264,677	4,267,496	244	9.83	27011.14	50.42	Kararsız
VvLEA2-35	WKA12399.1	19	5,803,504	5,804,474	205	9.93	23196.99	39.52	Kararlı
VvLEA2-36	WKA12765.1	19	10,385,983	10,386,981	249	10.12	28573.42	46.72	Kararsız

Tablo 2: Üzümde tanımlanan WOX genleri

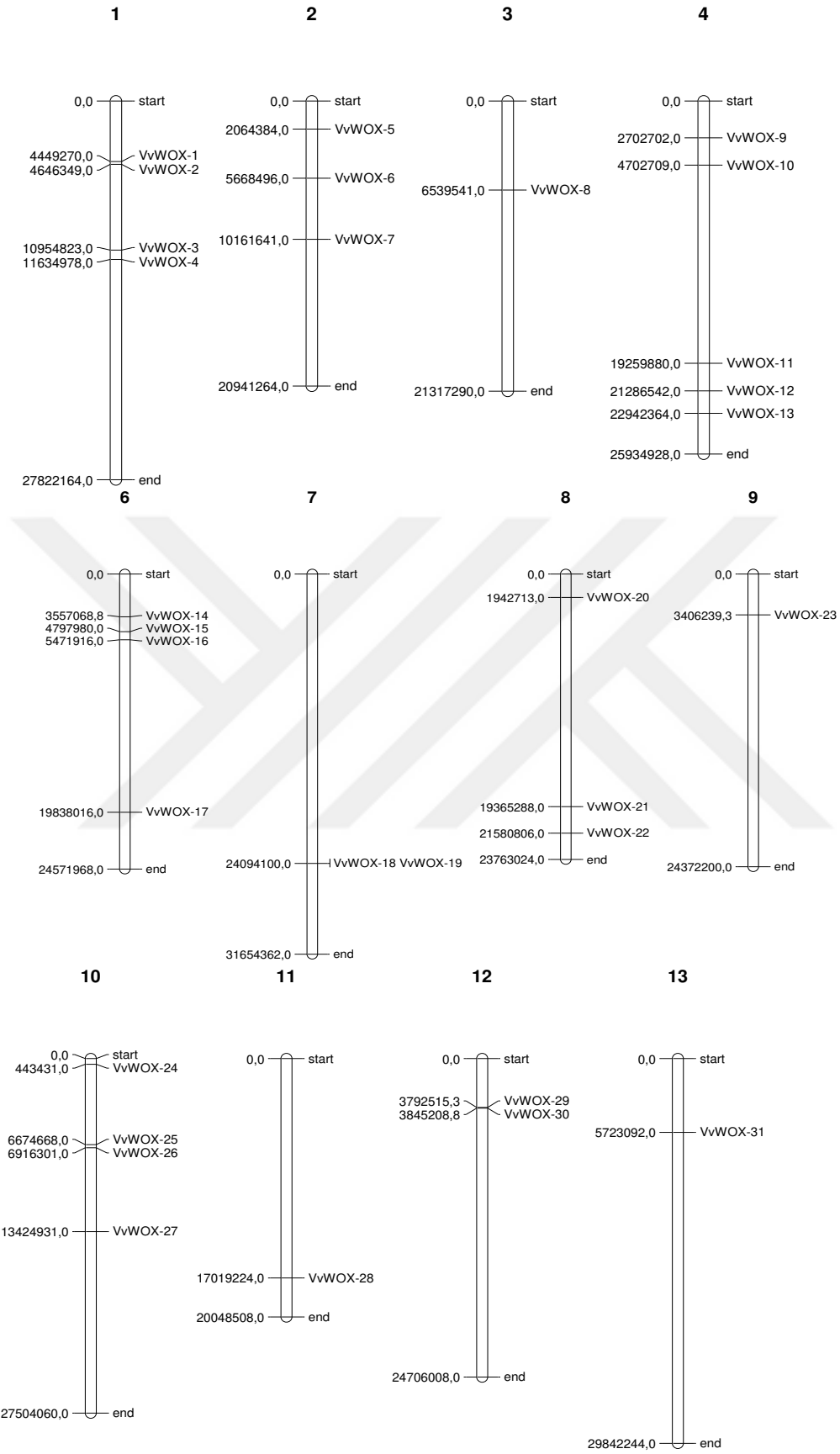
ID	NCBI Veritabanı	Asma genomunda fiziksel pozisyonu			Protein Uzunluğu(aa)	pI (İzoelektrik Noktası)	Molekül Ağırlığı (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/Kararsız
		Kromozom	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)					
VvWOX-1	WJZ80487.1	1	4,449,270	4,452,537	225	8.78	25187.61	66.49	Kararsız
VvWOX-2	WJZ80501.1	1	4,646,349	4,648,861	337	5.96	38432.83	60.11	Kararsız
VvWOX-3	WJZ81010.1	1	10,954,823	10,957,443	321	4.84	36429.55	58.27	Kararsız
VvWOX-4	WJZ81063.1	1	11,634,978	11,637,346	285	5.67	32404.46	63.59	Kararsız
VvWOX-5	WJZ82099.1	2	2,064,384	2,065,408	192	5.46	22419.92	63.90	Kararsız
VvWOX-6	WJZ82482.1	2	5,668,496	5,670,812	297	7.64	33504.74	71.36	Kararsız
VvWOX-7	WJZ82769.1	2	10,161,641	10,168,552	798	5.65	88376.22	54.16	Kararsız
VvWOX-8	WJZ83966.1	3	6,539,541	6,559,848	968	5.91	106887.87	58.87	Kararsız
VvWOX-9	WJZ85056.1	4	2,702,702	2,711,397	840	5.80	92603.86	50.96	Kararsız
VvWOX-10	WJZ85235.1	4	4,702,709	4,711,238	362	4.68	40964.50	75.38	Kararsız
VvWOX-11	WJZ85973.1	4	19,259,881	19,261,432	211	6.03	24353.43	50.64	Kararsız
VvWOX-12	WJZ86175.1	4	21,286,542	21,287,979	280	6.14	31387.53	77.02	Kararsız
VvWOX-13	WJZ86360.1	4	22,942,363	22,945,499	276	6.10	31550.94	57.22	Kararsız
VvWOX-14	WJZ88680.1	6	3,557,069	3,565,395	844	5.87	92249.05	48.36	Kararsız
VvWOX-15	WJZ88781.1	6	4,797,980	4,799,156	208	8.98	24279.64	67.68	Kararsız
VvWOX-16	WJZ88863.1	6	5,471,916	5,473,321	236	6.38	26138.11	67.89	Kararsız
VvWOX-17	WJZ89668.1	6	19,838,015	19,856,553	528	5.80	59902.88	65.19	Kararsız
VvWOX-18	WJZ91657.1	7	24,094,100	24,095,682	335	5.08	37651.58	53.54	Kararsız
VvWOX-19	WJZ91791.1	7	24,094,100	24,095,682	283	8.28	31398.61	54.46	Kararsız
VvWOX-20	WJZ92437.1	8	1,942,713	1,943,888	236	6.30	25875.91	67.57	Kararsız
VvWOX-21	WJZ93702.1	8	19,365,287	19,366,635	263	8.64	30671.69	64.60	Kararsız
VvWOX-22	WJZ93943.1	8	21,580,806	21,582,178	331	7.65	36319.69	57.43	Kararsız

Tablo 2. Üzümde tanımlanan WOX genleri (devam)

VvWOX-23	WJZ94511.1	9	3,406,239	3,415,522	838	6.06	92329.82	48.38	Kararsız
VvWOX-24	WJZ95808.1	10	443,431	446,848	726	5.91	79665.38	43.11	Kararsız
VvWOX-25	WJZ96431.1	10	6,674,668	6,693,961	1747	5.64	196402.02	49.63	Kararsız
VvWOX-26	WJZ96454.1	10	6,916,301	6,918,154	379	6.83	41968.06	55.90	Kararsız
VvWOX-27	WJZ96890.1	10	13,424,932	13,432,434	845	5.93	92835.95	51.31	Kararsız
VvWOX-28	WJZ98722.1	11	17,019,224	17,027,306	727	9.39	82448.56	49.54	Kararsız
VvWOX-29	WJZ99174.1	12	3,792,515	3,793,021	168	8.46	18552.03	57.81	Kararsız
VvWOX-30	WJZ99178.1	12	3,845,209	3,867,157	1772	5.16	198582.74	57.79	Kararsız
VvWOX-31	WKA01151.1	13	5,723,092	5,734,817	841	6.00	91765.64	50.93	Kararsız



Şekil 1: LEA2 genlerinin üzüm kromozomu üzerindeki yerleşimi



Şekil 2: WOX genlerinin üzüm kromozomu üzerindeki yerleşimi

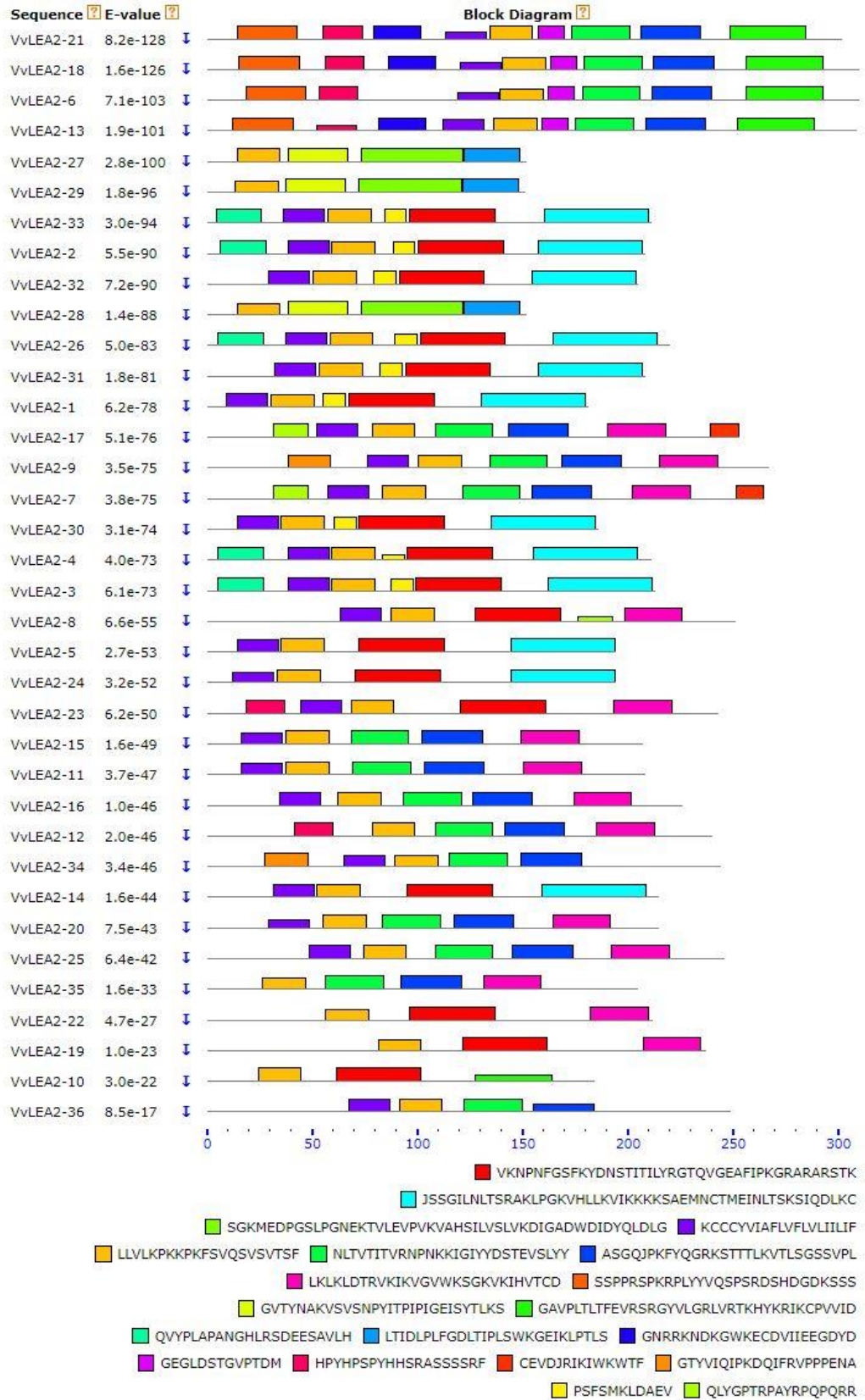
4.4. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Motiflerinin ve Ekzon-İntron Yapılarının Belirlenmesi

Korunmuş motiflerin elde edilmesi için her LEA2 ve WOX sınıfına ait amino asit dizileri, ayrı ayrı MEME suite veri tabanına yüklenerek her LEA2 ve WOX ailesine ait motif kompozisyonu bulunmuştur. Her LEA2 ve WOX ailesi için toplamda 20 tane farklı motif belirlenmiştir. Bunun sonucunda LEA2'ye ait motifler incelendiğinde, 3 baskın motif kalıbı görülmüştür. Yanı sıra aynı motif kalıbına sahip genlerin filogenetik ağaçta da aynı sınıfta yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 5).

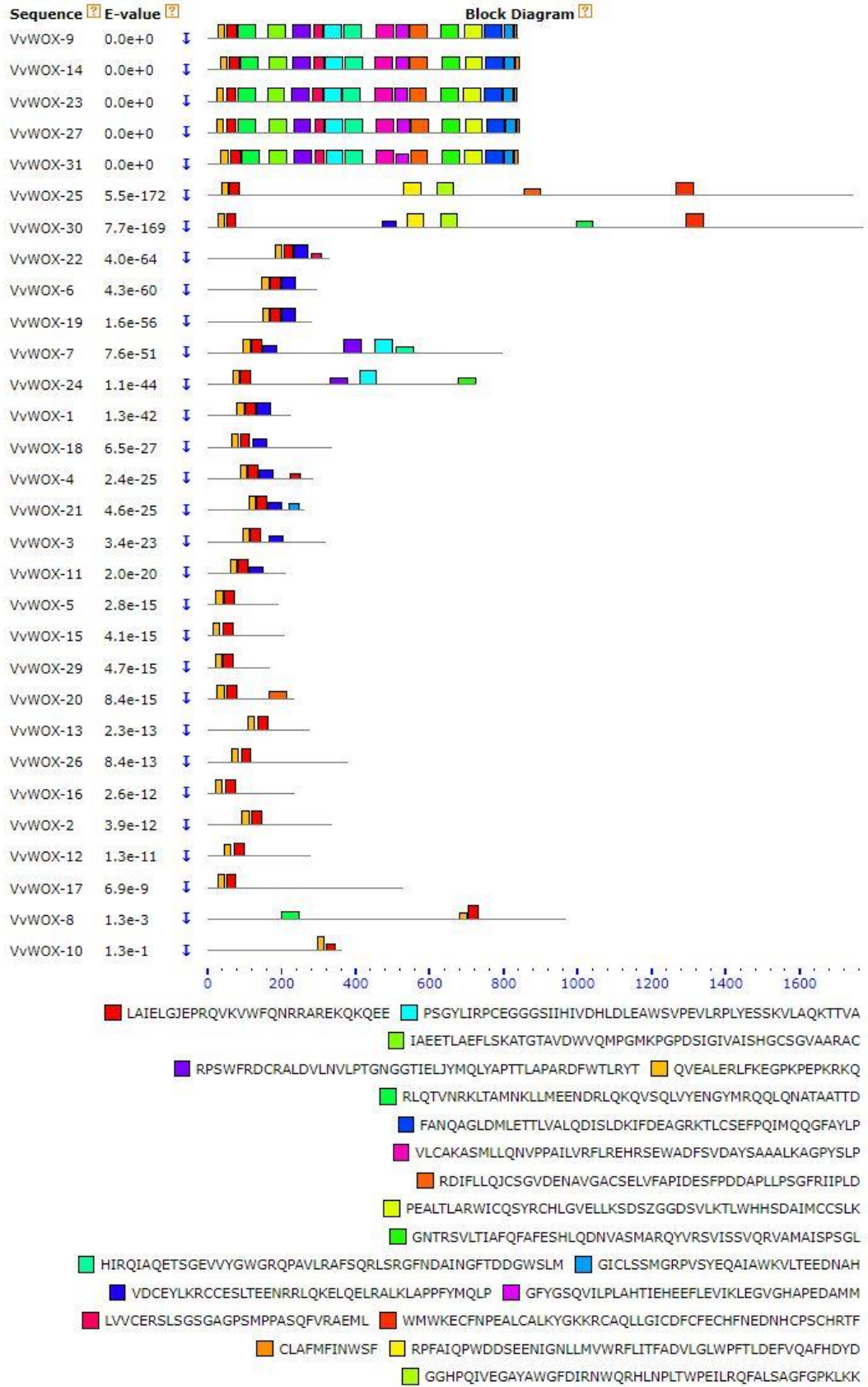
WOX'ın motif yapısı incelendiğinde baskın olarak 2 tane motif kalıbı görülmüştür. Bu da aynı motif kalıbına sahip genlerin filogenetik ağaçta da aynı sınıfta yer aldığını göstermektedir (Şekil 6).

LEA2 ailesinin ekzon-intron bölgelerine bakıldığında ise; LEA2'de ekzon ve intron bölgelerinin büyük kısmı yaklaşık olarak eşittir ve motif yapısı filogenetik ağaçla benzer bir yapı göstermektedir. Örneğin; aynı ekzon-intron yapısına sahip VvLEA2-27 ve VvLEA2-28, filogenetik ağaç üzerinde aynı kolda yer almaktadır ve aynı motif kalıbına sahiptirler. Aynı şekilde VvLEA2-30, VvLEA2-31 ve VvLEA2-32 için de bulunmaktadır. Ek olarak LEA2 genlerinin çoğunlukla ekzondan oluştuğu görülmüştür (Şekil 7).

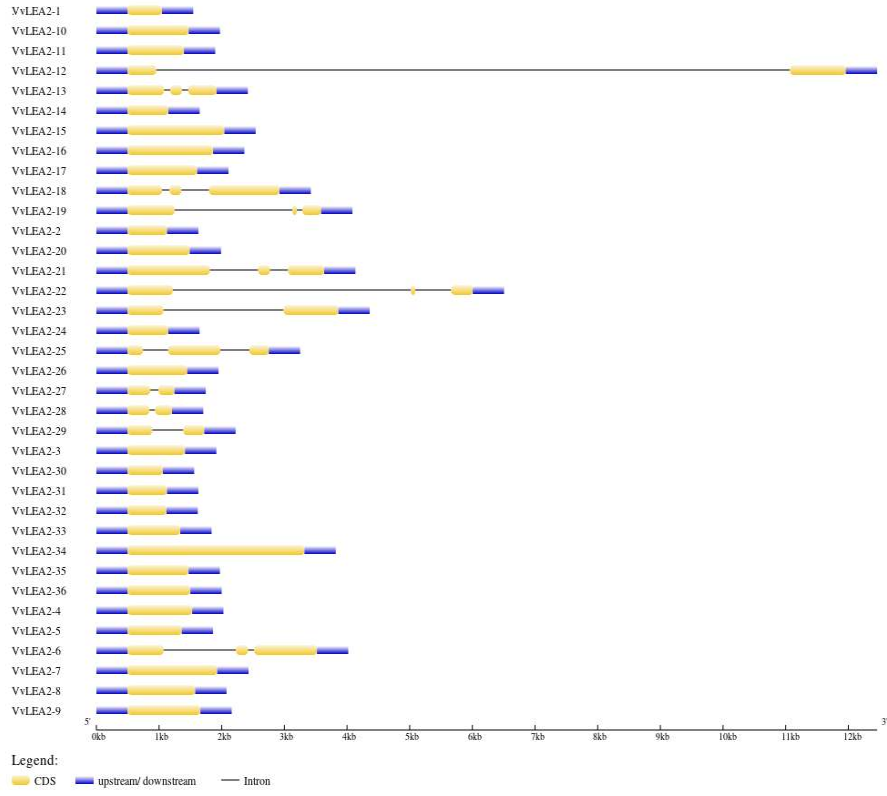
WOX ailesinin ekzon-intron bölgelerine bakıldığında ise; Filogenetik ağaç ile benzerlik gösteren WOX ekzon-intron bölgeleri, motif kalıpları ile de uyumaktadır. Örneğin; aynı ekzon-intron yapısına sahip VvWOX-9, WOX-14, WOX-23, WOX-27 ve WOX-31 filogenetik ağaç üzerinde aynı kolda yer almaktadır ve aynı motif kalıbına sahiptirler (Şekil 8).



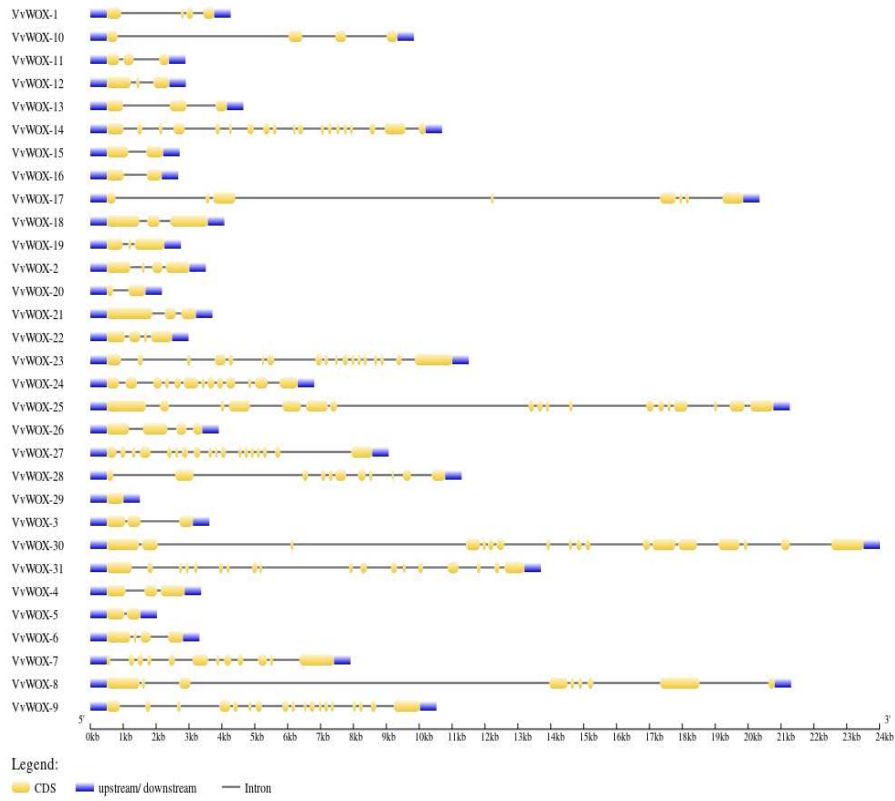
Şekil 5: LEA2 genlerinin motif kompozisyonları



Şekil 6: WOX genlerinin motif kompozisyonları



Şekil 7: LEA2 genlerinin ekzon-intron yapısı



Şekil 8: WOX genlerinin ekzon-intron yapısı

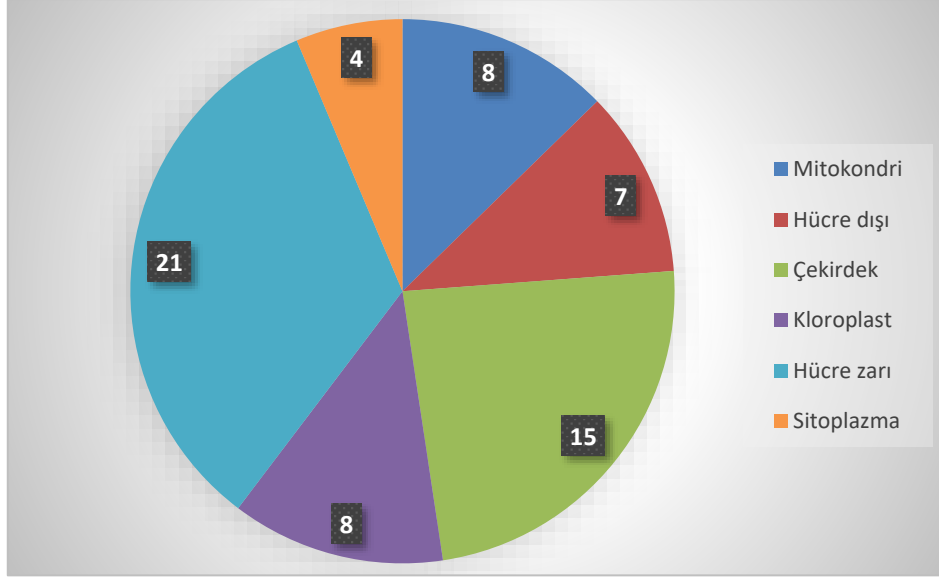
4.5. LEA2 ve WOX Proteinlerinin Lokalizasyonunun Tahmini

CELLO v.2.5 aracılığı ile proteinlerinin hücredeki yerleşimleri incelendiğinde (Tablo 3) LEA2 proteinleri; Mitokondri, Hücre dışı, Çekirdek, Kloroplast, Hücre zarı, Sitoplazma olarak 6 lokalizasyonda görülmüştür. En çok (21 tanesi) Hücre zarında görülmüştür. Ardından 15 tanesi Çekirdekte saptanmıştır ve en az 4 tanesi ise sitoplazmada yer almıştır (Şekil 9).

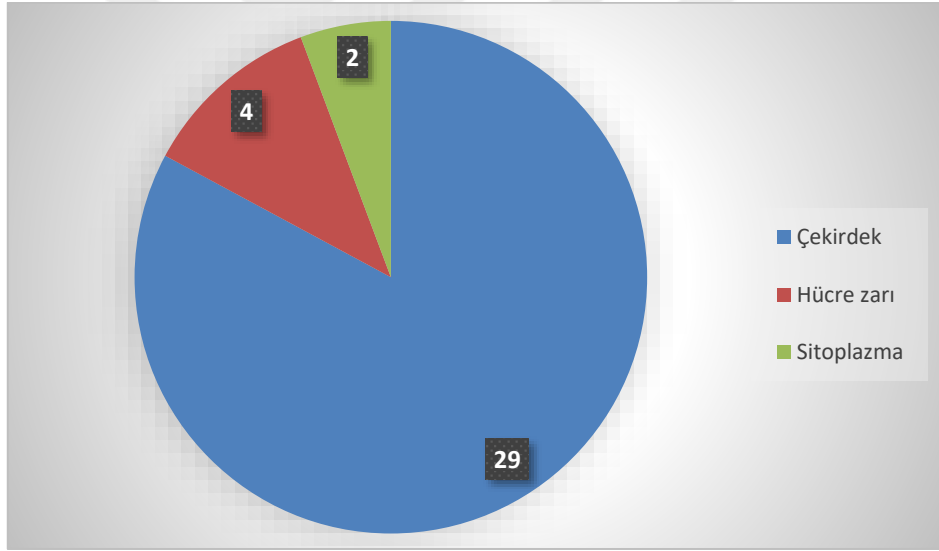
WOX'e bakıldığında; Çekirdek, Hücre zarı, Sitoplazma olarak 3 lokalizasyonda bulunmuştur. En çok (29 tanesi) Çekirdekte, 4 tanesi Hücre zarında ve 2 tanesi Sitoplazmada bulunmuştur (Şekil 10).

Tablo 3: LEA2 ve WOX proteinlerinin hücredeki lokalizasyonu

İD	Hücredeki Yerleşimi	İD	Hücredeki Yerleşimi
VvLEA2-1	Mitokondri, Hücre dışı	VvWOX-1	Çekirdek
VvLEA2-2	Mitokondri, Çekirdek	VvWOX-2	Çekirdek
VvLEA2-3	Çekirdek, Kloroplast	VvWOX-3	Çekirdek
VvLEA2-4	Çekirdek, Kloroplast, Plazma Membranı	VvWOX-4	Çekirdek
VvLEA2-5	Plazma Membranı	VvWOX-5	Çekirdek
VvLEA2-6	Çekirdek, Kloroplast	VvWOX-6	Çekirdek
VvLEA2-7	Çekirdek, Plazma Membranı	VvWOX-7	Çekirdek
VvLEA2-8	Hücre dışı, Çekirdek, Plazma Membranı	VvWOX-8	Çekirdek
VvLEA2-9	Hücre dışı, Plazma Membranı	VvWOX-9	Çekirdek
VvLEA2-10	Mitokondri, Kloroplast, Sitoplazma	VvWOX-10	Çekirdek
VvLEA2-11	Plazma Membranı	VvWOX-11	Çekirdek
VvLEA2-12	Plazma Membranı	VvWOX-12	Çekirdek
VvLEA2-13	Çekirdek, Plazma Membranı	VvWOX-13	Çekirdek
VvLEA2-14	Plazma Membranı	VvWOX-14	Plazma Membranı
VvLEA2-15	Plazma Membranı	VvWOX-15	Çekirdek
VvLEA2-16	Plazma Membranı	VvWOX-16	Çekirdek
VvLEA2-17	Mitokondri, Çekirdek	VvWOX-17	Çekirdek
VvLEA2-18	Çekirdek, Plazma Membranı	VvWOX-18	Çekirdek
VvLEA2-19	Hücre dışı, Çekirdek	VvWOX-19	Çekirdek
VvLEA2-20	Plazma Membranı	VvWOX-20	Çekirdek
VvLEA2-21	Kloroplast, Plazma Membranı	VvWOX-21	Çekirdek
VvLEA2-22	Plazma Membranı	VvWOX-22	Çekirdek
VvLEA2-23	Hücre dışı, Plazma Membranı	VvWOX-23	Plazma Membranı, Sitoplazma
VvLEA2-24	Plazma Membranı	VvWOX-24	Çekirdek
VvLEA2-25	Kloroplast, Plazma Membranı	VvWOX-25	Çekirdek
VvLEA2-26	Mitokondri, Çekirdek	VvWOX-26	Çekirdek
VvLEA2-27	Sitoplazma	VvWOX-27	Çekirdek, Plazma Membranı
VvLEA2-28	Kloroplast, Plazma Membranı, Sitoplazma	VvWOX-28	Çekirdek
VvLEA2-29	Sitoplazma	VvWOX-29	Çekirdek
VvLEA2-30	Mitokondri, Hücre dışı	VvWOX-30	Çekirdek
VvLEA2-31	Mitokondri, Çekirdek, Kloroplast	VvWOX-31	Çekirdek, Plazma Membranı, Sitoplazma
VvLEA2-32	Mitokondri, Çekirdek		
VvLEA2-33	Çekirdek		
VvLEA2-34	Çekirdek		
VvLEA2-35	Hücre dışı, Plazma Membranı		
VvLEA2-36	Plazma Membranı		



Şekil 9: LEA2 proteinlerinin lokalizasyonunun tahmini



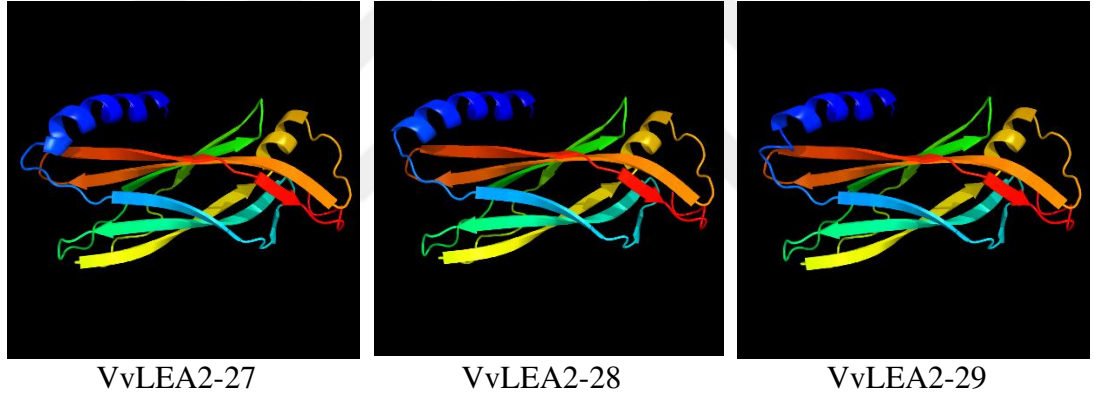
Şekil 10: WOX proteinlerinin lokalizasyonunun tahmini

4.6. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

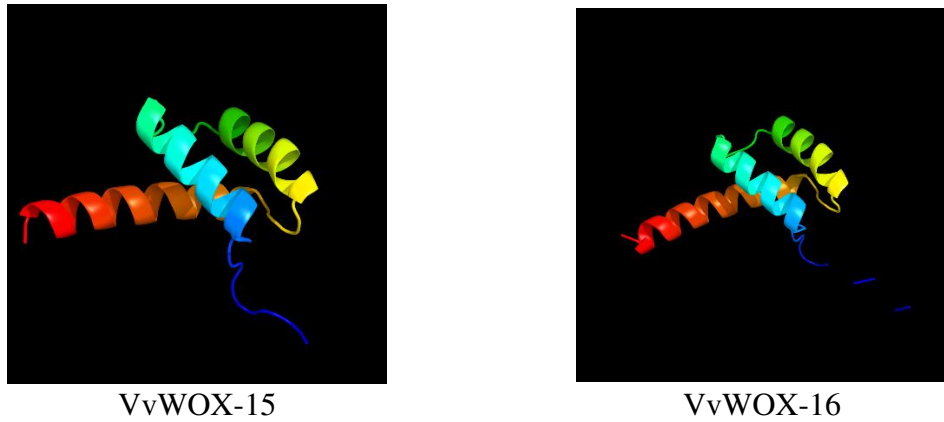
Phyre2 programı kullanılarak homoloji modellemesi sonucunda proteinlerin muhtemel üç boyutlu yapıları tahmin edilmiştir.

LEA2'ye bakıldığında VvLEA2 proteinleri yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Phyre2 veri tabanından güvenilirliği 100% belirlenmiştir. Bunların sonucunda yapılarda daha çok Beta strand yapının hâkim olduğu görülmüştür. VvLEA2 proteinlerinin örnekleri Şekil 11'da verilmiştir.

WOX'ye bakıldığında ise VvWOX proteinleri yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Phyre2 veri tabanından güvenilirliği 99,9% ve üzeri belirlenmiştir. Bunların sonucunda yapılarda daha çok Alfa sarmal yapının hâkim olduğu görülmüştür. VvWOX proteinlerinin örnekleri Şekil 12'da verilmiştir.



Şekil 11: LEA2 genlerine ait proteinlerin tahmini üç boyutlu yapısı.



Şekil 12: WOX genlerine ait proteinlerin tahmini üç boyutlu yapısı.

4.7. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Analizleri

psRNA Target veri tabanı ile yapılan miRNA analizleri sonucunda toplam 34 (VvLEA2-22 ve VvLEA2-28 hariç) farklı üzüm LEA2 geninin 151 farklı miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir (Şekil 13).

VvLEA2-21 en çok (30 kez), ardından VvLEA2-34 (23 kez), ardından VvLEA2-7 (22 kez) miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir (Şekil 14).

VvLEA2-32 ise en az (1 kez) ath-miR402 tarafından hedeflendiği, ardından VvLEA2-30 (2 kez) ath-miR774b-5p ve ath-miR780.2 tarafından hedeflendiği, VvLEA2-27 (2 kez) ath-miR5021 ve ath-miR862-5p tarafından hedeflendiği, VvLEA2-20 (2 kez) ath-miR4221 ve ath-miR2934-3p tarafından hedeflendiği, VvLEA2-14 (2 kez) ath-miR5658 ve ath-miR165a-5p tarafından hedeflendiği, VvLEA2-10 (2 kez) ath-miR5653 ve ath-miR2937 tarafından hedeflendiği görülmüştür.

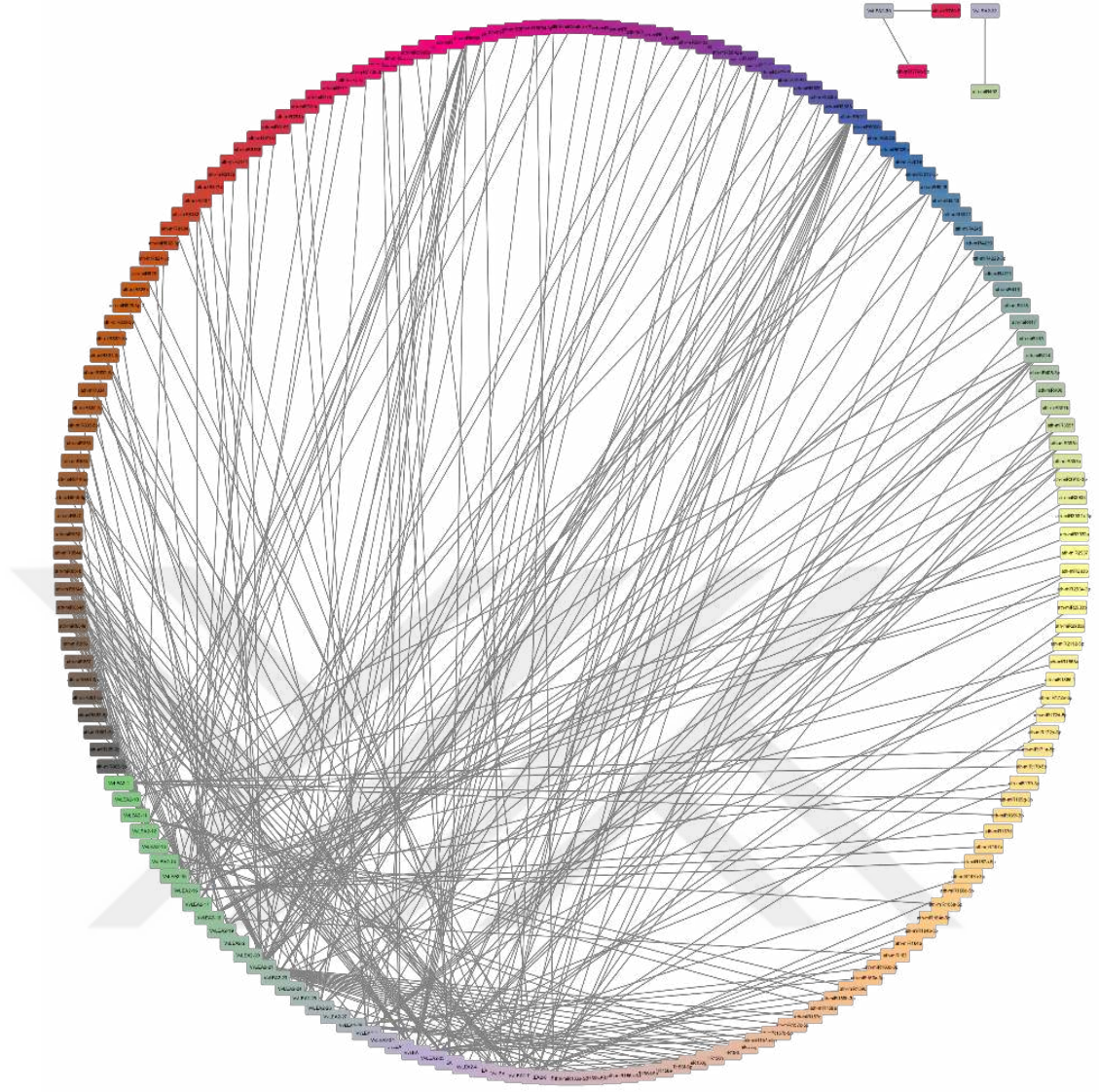
Ath-miR5021 ise en çok (15 kez), ardından ath-miR5658 (11 kez), ardından ath-miR854e, ath-miR854d, ath-miR854c, ath-miR854b ve ath-miR854a (her biri 5 kez) VvLEA2 genler tarafından hedeflendiği görülmüştür (Şekil 15).

WOX'ye bakıldığında toplam 31 farklı üzüm WOX geninin miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Toplamda 205 farklı miRNA tarafından, VvWOX-1'den VvWOX-31'e kadar genlerinin hedeflendiği görülmüştür (Şekil 16).

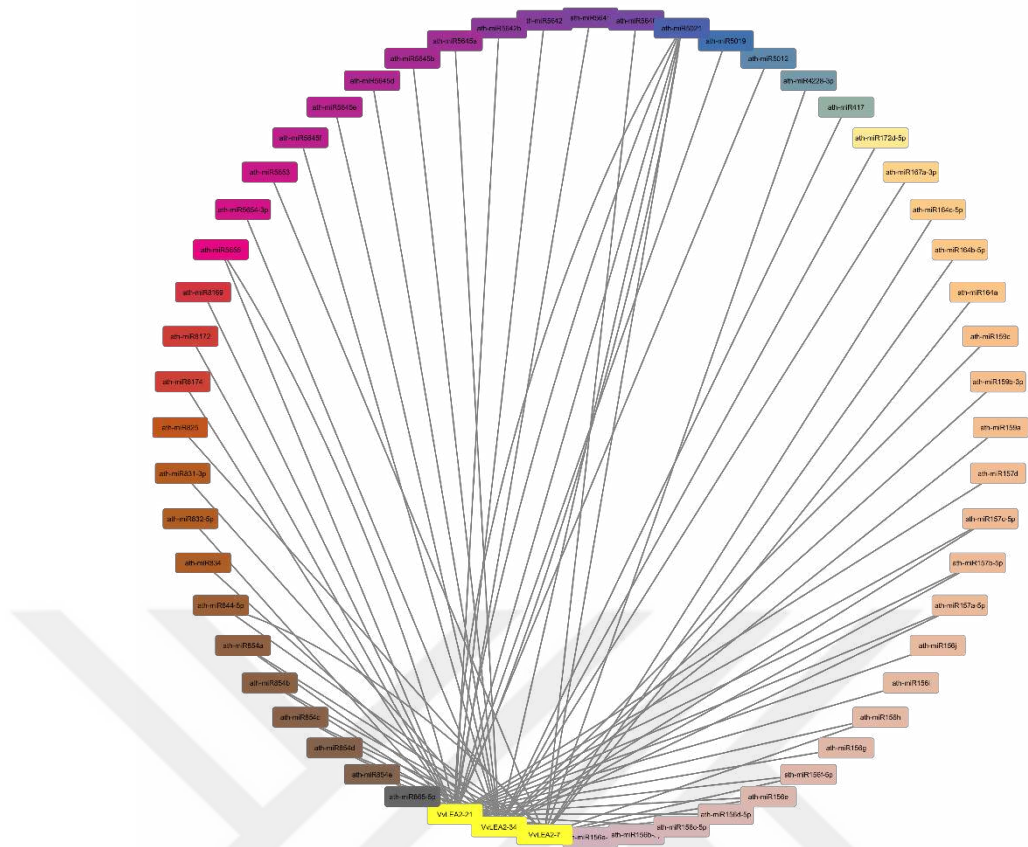
VvWOX-14 en çok (39 kez), ardından VvWOX-31 (38 kez), ardından VvWOX-23 (32 kez) ardından VvWOX-25 ve VvWOX-30 (her biri 29 kez) miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir (Şekil 17).

VvWOX-29 ise en az (1 kez) ath-miR5018 tarafından hedeflendiği, ardından VvWOX-20 (2 kez) ath-miR5021 ve ath-miR775 tarafından hedeflendiği görülmüştür.

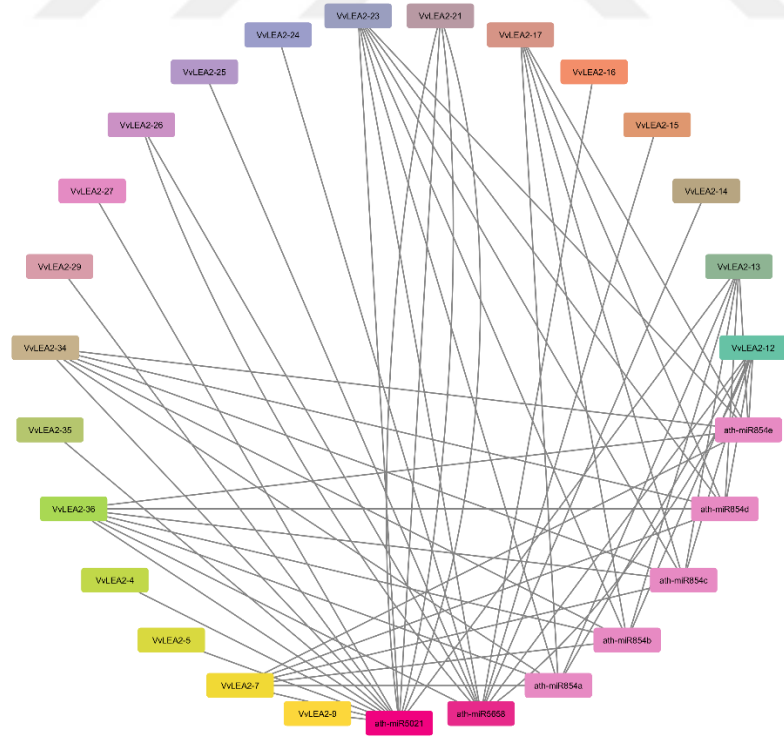
Ath-miR5021 ise en çok (13 kez), ardından ath-miR414 (9 kez), ardından ath-miR838 ve ath-miR4221 (her biri 8 kez) VvWOX genler tarafından hedeflendiği görülmüştür (Şekil 18).



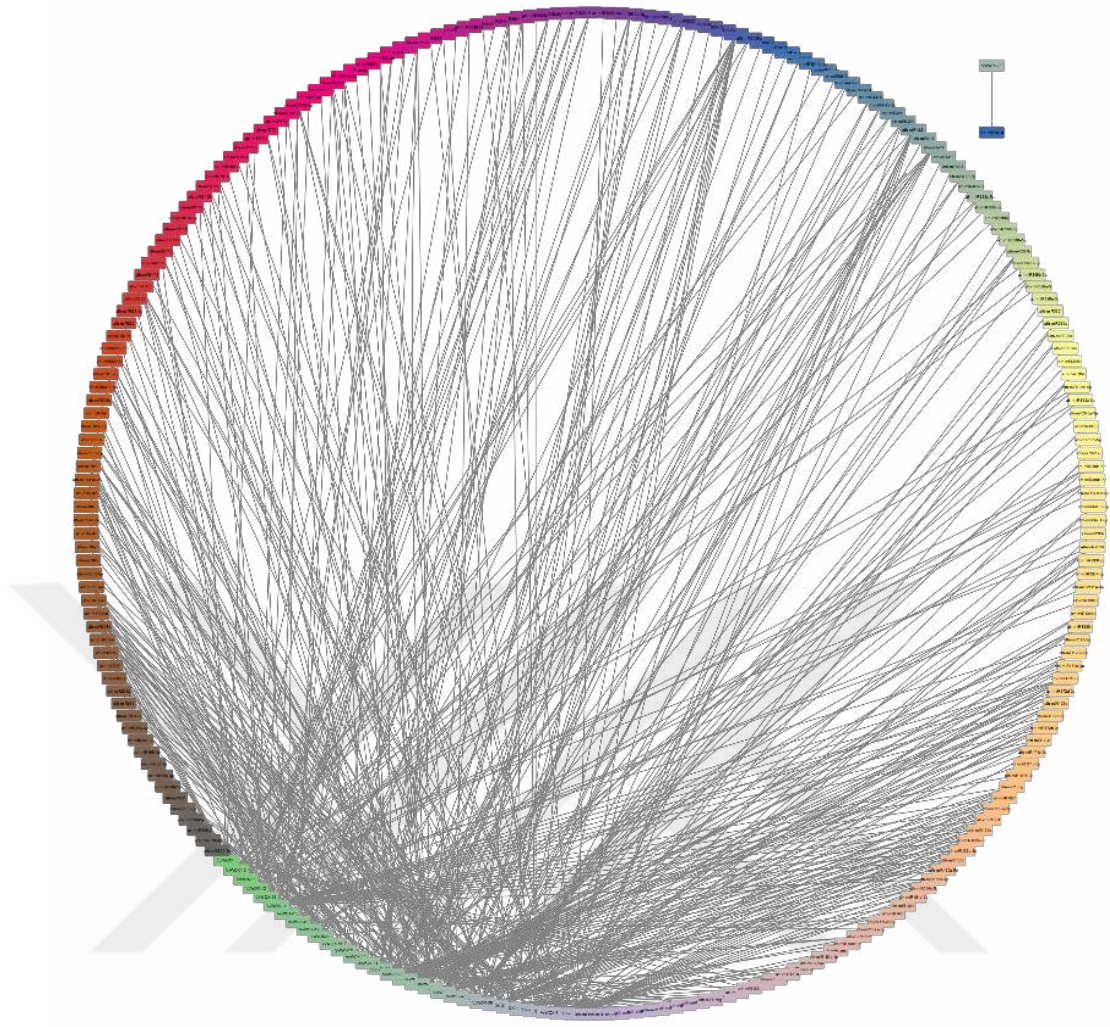
Şekil 13: LEA2 Genlerini hedefleyen miRNA'lar



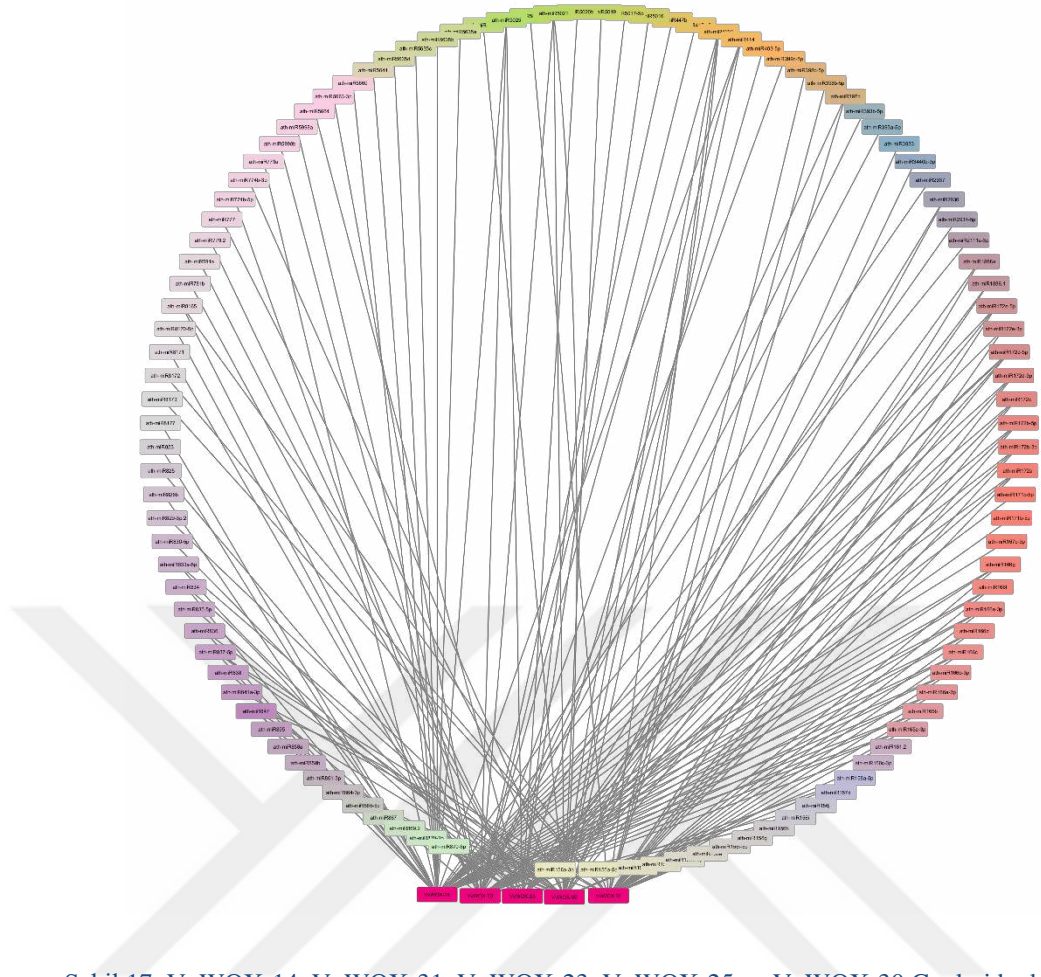
Şekil 14: VvLEA2-21, VvLEA2-34 ve VvLEA2-7 Genleri hedefleyen miRNA'lar



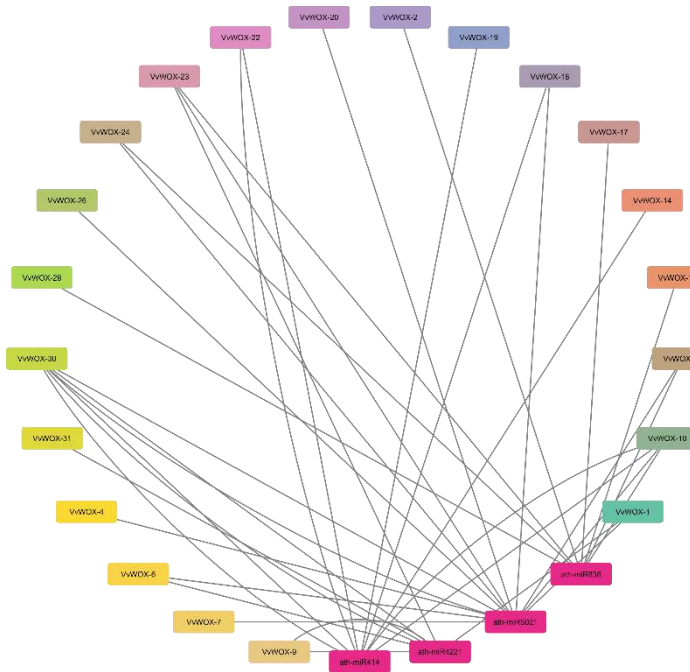
Şekil 15: Ath-miR5021, ath-miR5658, ath-miR854e, ath-miR854d, ath-miR854c, ath-miR854b ve ath-miR854a hedefleyen VvLEA2 genleri



Şekil 16: WOX Genlerini hedefleyen miRNA'lar



Şekil 17: VvWOX-14, VvWOX-31, VvWOX-23, VvWOX-25 ve VvWOX-30 Genleri hedefleyen miRNA'lar



Şekil 18: Ath-miR5021, Ath-miR 414, Ath-miR 838 ve Ath-miR 4221 hedefleyen VvWOX genleri

4.8. Üzüm Bitkisinde LEA2 ve WOX Genlerinin Promotör Bölge Analizi

Promotör analizi, LEA2 genlerinin potansiyel cis düzenleyici elementlere sahip olduğu ortaya çıkmıştır; bunlar abiyotik strese duyarlı (DRE, MYC, MYB, Sp1, G-box, I-box, MBS, GATA-motif, TCT-motif, MRE, GTGGC-motif, GT1-motif, TCCC-motif, AE-box, LTR, Box 4, L-box, ACE, GA-motif, 3-AF1, chs-CMA2a), hormona özgü (ABRE, TCA, ERE, P-box, AuxRR-core, SARE, TGA, GARE-motif), biyotik strese duyarlı (WBox, TC-rich repeats), meristeme özgü (CAT-box) olarak ayrılabilir.

WOX genlerinin de potansiyel cis düzenleyici elementlere sahip olduğu ortaya çıkmıştır; bunlar abiyotik strese duyarlı (ACE, LTR, G-Box, MBS, MRE, I-box, ATCT-motif, GATA-motif, TCT-motif, Box 4, CAG-motif, GTGGC-motif, TCCC-motif, AE-box, Gap-box, Box II, Sp1, chs-CMA2a, LAMP-element, ATCT-motif, ACA-motif, sbp-CMA1c), hormona özgü (TGA-element, TCA-element, ABRE, TATC-box, AuxRR-core GARE-motif, P-box, AuxRE), biyotik strese duyarlı (TC-rich repeats, W box), meristeme özgü (CAT-box) olarak ayrılabilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Önceki çalışmalarda, LEA gen ailesinin dokuz alt aileye (DHN, LEA1, LEA2, LEA3, LEA4, LEA5, LEA6, WHY ve SMP) sınıflandırılan 60 üyesini tanımlanmıştır. LEA2 alt ailesi ise 35 üyeyle en büyük alt grubu oluşturmuştur [2]. Nagaraju ve arkadaşları (2019), *Sorghum bicolor*'daki 8 familyaya ait toplam 68 LEA genini ortaya çıkarmıştır. Tipik bir hidrofobik aile olan LEA-2, en bol bulunan ailedir [12]. Muzda bulunan LEA genlerinin çok sayıda ve çeşitliliği, bunların abiyotik stres toleransında önemli olduğunu göstermektedir [18]. Bu çalışmada, toplam 36 VvLEA2 geni tanımlanmıştır. Bu da literatürdeki bilgiler ile eşleşme göstermektedir.

LEA kodlayan genler çoğu üzüm kromozomunda rastgele olmayan bir şekilde dağılmıştır [2]. ZjuLEA genleri hünnaptaki on iki kromozomun tamamına eşit olmayan bir şekilde yayılmıştır. Hünnap genomunun en büyük kromozomu olan Kromozom 1, on üç sayısıyla en fazla gen içeriğine sahiptir. Ayrıca toplam 22 adet ZjuLEA geni herhangi bir kromozom üzerine yerleştirilememiş ve scaffold düzeyinde belirtilmiştir [15]. Muzda (*Musa acuminata*) MaLEA genleri tüm kromozomlar boyunca eşit olmayan bir şekilde dağılmışlardır [18]. Bu çalışmada ise, LEA2'ye ait genler üzüm bitkisinin 13 kromozomu üzerinde eşit olmayan bir şekilde dağılmıştır.

Bu da diğer türlere benzer şekilde VvLEA'ların önemli bir kısmının segmental veya tandem kopyalardan kaynaklandığını düşündürmektedir [2].

Bu çalışmada VvLEA2'nin protein uzunluklarının 151 ile 310 aa arasında değiştiği, çoğunun (32 tanesi) bazik özellikte olduğu (izoelektrik etki değeri 4.77 ile 10.58 arasında değiştiği), Moleküler ağırlık 16566.98 ile 34744.89 Da değiştiği, 17 genin kararsız ve 19 tanesinin kararlı olduğu, görülmüştür (Tablo 1). Hünnapta ZjuLEA proteinlerinin amino asit uzunluğu 89-515 amino asit arasında değişmiştir. Proteinlerin moleküler ağırlığı 4.14982 kDa ile 29.12380 kDa arasında değişmiştir. ZjuLEA proteinlerinin izoelektrik noktaları (pI) 4.72 ile 10.81 arasında değişmiş ve proteinlerin çoğu (78 protein) alkali karakter göstermiştir [15]. Bunun da bizim sonuçlarımız ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada LEA2 alt ailesi için toplamda 20 tane farklı motif belirlenmiştir. Bunun sonucunda LEA2'ye ait motifler incelendiğinde, 3 baskın motif kalıbı görülmüştür. Yanı sıra aynı motif kalıbına sahip genlerin filogenetik ağaçta da aynı

sınıfta yer aldığı belirlenmiştir. Bu da aynı grupta yer alan proteinlerin benzer özelliklere sahip olduğunu gösterir (Şekil 5). Aynı gruptaki farklı motif desenleri, proteinler arasındaki fonksiyonel farklılıkları düşündürmektedir [15].

LEA alt ailelerini ve filogenetik ağacı derinlemesine anlamak için ZjuLEA proteinlerinde bulunan korunmuş motif kompozisyonları ve ekson-intron yapısı incelenmiştir. ZjuLEA genlerinden 37'sinde intron bulunmazken, 3 introna sahip tek gen olan ZjuLEA8 dışında diğer genlerde bir veya iki intron vardır. İntronsuz genlerin büyük bir kısmı ZjuLEA2 alt grubunda toplanmıştır. ZjuLEA1, ZjuLEA3, ZjuLEA5 alt ailelerinin üyeleri yalnızca bir intron bölgesine sahiptir [15]. Muzda MaLEA'ların az sayıda intronu vardır (< 3) [18]. *Sorghum bicolor* LEA (SbLEA) genlerinin çoğunluğu daha az introndur veya daha az intron içermiştir [12].

Stresle ilgili genlerin, stres koşulları altında hemen tepki verebilmek için daha az sayıda introna sahip olduğu bildirilmiştir [15]. Sonuçlarımızda, LEA2 genlerinin çoğunlukla ekzondan (az sayıda introna sahip olduğu) oluştuğu görülmüştür.

Biyoinformatik analizler, üzüm LEA2 proteinlerinin çoğunluğunun plazma zarı ile ilişkili olduğunu, diğer ailelerin birçok üyesinin ise sitoplazma, çekirdek ve mitokondri gibi farklı hücre altı konumlarda bulunmasının muhtemel olduğunu ileri sürmüştür [2]. ZjuLEA proteinlerinin hücresel bileşenleri incelendiğinde, çoğunun membran ve membran kısımlarında dağıldığı bildirilmiştir [15]. Muzda (*Musa acuminata*) MaLEA proteinlerinin çoğunluğu sitoplazma ve kloroplast ile ilişkilidir, diğerleri ise farklı hücre altı bölmelerde bulunur [18].

Bu çalışmada ise VvLEA2 proteinleri 6 lokalizasyonda görülmüştür. Bunlar Mitokondri, Hücre dışı, çekirdek, Kloroplast, Hücre zarı ve Sitoplazmadır. En çok (21 tanesi) Hücre zarında bulunmuştur. Ardından 15 tanesi çekirdekte. En az (4 tanesi) ise sitoplazmadadır (Şekil 9).

ZjuLEA proteinlerinin modellenmesi sonucunda, ZjuLEA proteinlerinde Alfa Sarmal yapısının baskın olduğu görülmüştür. ZjuLEA proteinlerinin moleküler fonksiyonuna göre, Alfa Sarmal yapısı ZjuLEA proteinlerinin rolüyle ilişkilidir [15].

VvLEA2 proteinleri ise yapılarında daha çok Beta strand yapının hâkim olmasına rağmen Alfa sarmal de tespit edilmiştir. Bu da [14] ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

Bu yapı, bitki dokularındaki stres veya yaralanmaların etkilerini azaltmak için sıvı kaybında rol oynayabilir. Bu öngörülen protein yapıları, LEA proteinlerinin moleküler işlevlerinin anlaşılmasını kolaylaştırabilir [37].

ZjuLEA genlerini hedefleyen miRNA'lar analiz edildiğinde, miRNA'lar tarafından en çok hedeflenen ZjuLEA genleri sırasıyla ZjuLEA-88 (33 miRNA), ZjuLEA-29 (31 miRNA), ZjuLEA-28 (30 miRNA) ve ZjuLEA-6'dır (26 miRNA). Ayrıca ZjuLEA-24, ZjuLEA-38, ZjuLEA-55, ZjuLEA-57, ZjuLEA-61 ve ZjuLEA-64 genlerinde herhangi bir miRNA hedeflenmemiştir. Evrimsel süreçte bitkilerde en çok korunan miRNA'lardan biri miR156'dır. miR156 ve miR157 son derece benzerdir ve bitkilerde yüksek oranda korunmuştur. ZjuLEA genlerinin çoğunluğu miR156 (58 gen) ve miR157 (24 gen) tarafından hedeflenmiştir [15]. 25 SbLEA'yı hedef alan on beş miRNA'nın, abiyotik stres toleransının yanı sıra gelişime de katıldığı görülmüştür [12].

VvLEA2 genlerinde ise en çok VvLEA2-21 (30 kez), ardından VvLEA2-34 (23 kez), ardından VvLEA2-7 (22 kez) miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Ath-miR5021 ise en çok (15 kez), ardından ath-miR5658 (11 kez), ardından ath-miR854e, ath-miR854d, ath-miR854c, ath-miR854b ve ath-miR854a (her biri 5 kez) VvLEA2 gen tarafından hedeflendiği görülmüştür.

Ath-miR854 ailesi üyelerinin strese yanıt veren genleri düzenlemek için birbirleriyle iş birliği yaptıkları görülmüştür [38]. Transkripsiyonel mekanizmaların düzenleyici bir elemanı olan miR854 ailesi hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunmaktadır [37]. Bu da miRNA'ların bazal transkripsiyonel mekanizmaların düzenleyicileri olarak ortak bir kökene sahip olduğunu göstermektedir [39]. Ayrıca miRNA854, pirinçte su eksikliği koşulları altında rapor edilmiştir [39]. ath-miR5658'in hedefleri, NAC ailesi ve bHLH gibi kuraklıkta önemli genlerdir [40]. Ayrıca miR5658 zencefil, yaban mersini, *Ferula gumosa*'da gözlemlenmiştir ve domateste kuraklık toleransını düzenlemekte rol oynamaktadır [14].

Ath-miR5021, DNA rekombinasyonu ve onarımı, nükleozom montajı, polinasyon, yaprak morfogenezi, anatomik yapı morfogenezisinin düzenlenmesi ve glutamin ailesi amino asit katabolik sürecinde yer alan transkriptleri düzenler. ath-miR5021 aynı zamanda *A. thaliana* sperm hücreleri ve polenlerinde işlenen yeni bir miRNA olarak tanımlanmıştır. Ath-miR5021'in çeşitli işlevlerde transkriptleri

düzenlediğini ve farklı miRNA aileleri ile iş birliği yaparak bu miRNA ailelerinin ağ içerisinde iletişim kurabildiği ortaya çıkmıştır [38].

Ek olarak, gelişimi kontrol eden düzenleyici ağlarda ve stres faktörlerine verilen yanıtlarda önemli bir rolü olan MYB transkripsiyon faktörünün bildirildiği görülmüştür. miR5021 tarafından rozet çiçeğinde hedeflenmiştir [39].

198 AtMYB geninin analizi, ath-miR5021'in hedef genlerinden birinin MYB geni olduğunu göstermiştir. MYB transkripsiyon faktörleri, öncelikle ABA sinyalleriyle kuraklık stres yanıtını düzenlemekten sorumludur [40].

ath-miR5021, *Arabidopsis*'te hedef tahminine dayalı olarak stresle ilişkili yanıt işlevine sahip bir miRNA olarak tanımlanmıştır. Tuzluluk ve viral enfeksiyon yanıtları gibi diğer stres yanıtlarında önemli bir rol oynamaktadır [40].

ath-miR5021, ARGONAUTE (AGO) proteinlerinin geninin hedefidir. Bu genler virüs savunma yanıtında önemli bir role sahiptir. *Marsupenaeus japonicus*'un ath-miR5021 ifadesi virüs enfeksiyonundan sonra değişmiştir. Buğdayda (*Triticum aestivum*) yapılan mikroRNA mikrodizi testi, ath-miR5021'in tuz stresi yanıtında farklı şekilde ifade edildiğini görülmüştür. Bu, ath-miR5021'in strese duyarlı bir miRNA olabileceğini ve kuraklık stresinde önemli olduğunu öne sürmüştür [40].

miR402 ise sadece VvLEA2-32 genini hedeflemiştir. Yapılan çalışmalarda miR402'nin aşırı ifadesinin *Arabidopsis thaliana*'da stres koşulları altında çimlenmeyi artırdığı ve kuraklık stresinde ekspresyon seviyesinin yükseldiği bulunmuştur. Böylece sadece tek bir miRNA ile etkileşim göstermesi nedeniyle VvLEA2-32 geninin stres koşulları altında tohum çimlenmesinde ve kuraklık stresi yanıtında görev aldığı söylenebilir [60, 61].

Bu miRNA'lar tarafından hedeflenen VvLEA2 genlerinin tanımlanması, üzümdeki rollerinin anlaşılmasını kolaylaştırabilir. Öte yandan, bu çalışma, miRNA yapısının keşfi, her dokuya özgü olan miRNA'ların belirlenmesine olanak sağlayabilir.

G-box, GCC-box, CAMTA, NAC, WRKY AuxRE, CBF, C-Box, MYB, DRE AC, ABRE ve MYB gibi bilinen strese duyarlı cis-etkili düzenleyici elementleri sayılabilmektedir [41].

Promotör analizi, SbLEA genlerinin potansiyel cis düzenleyici elemanlara sahip olduğunu ortaya çıkmıştır. Bunlar abiyotik strese duyarlı (DRE, DPBF, MYC,

MYB, HSE, LTRE, GT1GM, Cu'ya duyarlı, Sp1, G-box ve I-box), hormona özgü (ABRE, TCA, ERE, vb.), biyotik strese duyarlı (WBox), gelişime özgü (polen, endosperm özgü) ve bekçi hücrelerine özgü (CGCG) elemanlar olarak sınıflandırılmıştır [12].

Çevresel stres tepkisi, bitki büyümesi ve gelişimi ve hormon tepkisi ile ilgili BcLEA genlerinin promotör bölgelerinde çok sayıda cis-etkili eleman olduğunu göstermiştir. Stresle ilişkili tepki elemanları çoğunlukla ARE, STRE, LTR, MBS, TCA ve DRE'yi içermiştir. Daha önce taranan sekiz düşük sıcaklık tepki geninin promotörlerinin analizi yoluyla, hepsinin düşük sıcaklık tepkisiyle ilişkili LTR ve CRT/DRE elemanlarını içerdiği ortaya çıkmıştır [42].

ABRE, abiyotik streslere yanıt olarak absisik asit sinyalizasyonunda büyük ölçüde yer alan bir cis-etkili elementtir; DRE/CRT ve LTRE ise su eksikliğine (DRE/CRT) ve soğuğa (DRE/CRT ve LTRE) yanıt olarak ABA bağımsız gen ifadesinde yer alan büyük cis-etkili düzenleyici elementlerdir. MYBS, kuraklık, tuz ve soğuğa yanıt olarak absisik asit bağımlı sinyalizasyon yolunda önemli bir rol oynayan bir cis-etkili promotör elementtir. Ayrıca LEA 2, LEA3, SMP ve dehidrinler gen ailelerinden gelen yayla pamuğu LEA genleri, strese duyarlı unsurların en yüksek ortalama oranlarını içerirken, LEA 1 ve LEA 6'dan gelenler en düşük oranları içermiştir [43].

Fitohormonlara duyarlı cis-elementler, bitkilerin çevresel değişiklikler altında hayatta kalma potansiyelini artırır. ABRE'nin ABA sinyalizasyonunda ve abiyotik stres toleransında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Benzer şekilde, DRE/CRT/LTRE (kuraklığa duyarlı/ düşük sıcaklığa duyarlı) elementler, CBF/DREB1 gibi transkripsiyon faktörlerini kontrol ederek kuraklığa, soğuğa ve tuza duyarlı gen ifadesini artırır. SbLEA'lar ayrıca yaralara, patojenlere ve salisilik aside yanıt veren biyotik strese duyarlı cis elementleri; WBOXNTERF3, WBOXATNPR1 ve CGTCA içerir. Aynı çalışmada tanımlanan MYB cis-etkili promotör elemanları, kuraklık, tuz ve soğuğa yanıt olarak absisik asit bağımlı sinyal yolunda önemli bir rol oynamaktadır [12].

Diğer çalışmalarda görüldüğü gibi bu çalışmada Promotör analizi, VvLEA2 genlerinin potansiyel cis düzenleyici elementlere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Hormona özgü, gelişime özgü, biyotik strese duyarlı ve birkaç abiyotik strese duyarlı

elementi tanımlanmıştır. Daha ayrıntılı bir şekilde bunlar abiyotik strese duyarlı (DRE, MYC, MYB, Sp1, G-box, I-box, MBS, GATA-motif, TCT-motif, MRE, GTGGC-motif, GT1-motif, TCCC-motif, AE-box, LTR, Box 4, L-box, ACE, GA-motif, 3-AF1, chs-CMA2a), hormona özgü (ABRE, TCA, ERE, P-box, AuxRR-core, SARE, TGA, GARE-motif), biyotik strese duyarlı (WBox, TC-rich repeats), meristeme özgü (CAT-box) olarak ayrılabilir.

Bu cis-elementlerin VvLEA2 genlerinde bulunması, geniş bir yelpazede cis-elementlerin tanımlanması, bunların farklı stres ve gelişimsel süreçlerde hayati roller oynadığını göstermektedir.

Pamuk (*Gossypium hirsutum*)'da 32 WOX geni bulunmuştur [44]. Bu çalışmada toplam 31 VvWOX geni tanımlanmıştır. Soya fasulyesi (*Glycine max*) genomunda ise toplam 33 adet soya WOX geni belirlenmiştir. Bu da *Arabidopsis*'in (16) ve pirincin (14) neredeyse iki katıdır [7]. Bu da literatürdeki bilgiler ile eşleşme göstermektedir.

WOX genlerinin kromozomal dağılımına bakıldığında ise, GhWOX genlerinin genomik lokalizasyonu, 20 GhWOX geninin 16 kromozoma konulduğunu, 12 GhWOX geninin ise kromozomlara atanmamış iskele dizilerine eşlendiğini göstermiştir [44]. Yenidünya (*Eriobotrya japonica*)'da 18 EjWOX geninin 17 kromozomun 12'sinde konumlandığını göstermiştir [45]. Pirinç OsWOX ailesinin genleri, 1,3,4,5,7,8,11 numaralı kromozomlarda eşit olmayan bir şekilde dağılmıştır. Geriye kalan 5 kromozom ise bu aileye ait genler içermemiştir [23].

Soya fasulyesi genomunda WOX genleri kromozom 16 hariç 19 kromozoma dağıtılmıştır. GmWOX genlerinin en yoğun olduğu kromozom 4 üye ile 7. kromozomdur; 11, 13 ve 18. kromozomlarda üç GmWOX geni; 2, 4, 6, 10 ve 17. kromozomlarda iki gen; diğer kromozomlarda (1, 3, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19 ve 20) ise sadece birer GmWOX geni bulunmuştur [7].

Bu çalışmada WOX genlerinin üzüm bitkisinin 12 kromozomu üzerinde dağıldığı belirlenmiştir. Genlerin en fazla 4. kromozomda (5 gen) yerleştiği görülmektedir. Ardından 1. ve 6. ve 10. kromozomlarda (4 gen) bulunmaktadır. Ardından 2. ve 8. Kromozomlarda (3 gen) bulunur. Ardından 7. ve 12. Kromozomlarda (2 gen) bulunur. Ardından 3. ve 9. ve 11. ve 13. Kromozomlarda (1 gen) bulunur (Şekil 2).

VvWOX'nin protein uzunluklarının 168 ile 1772 aa arasında değiştiği, çoğunun (23 tanesi) asidik özellikte olduğu (izoelektronik etki değeri 4.68 ile 9.39 arasında değiştiği), Moleküler ağırlık 18552.03 ile 198582.74 Da değiştiği, hepsinin kararsız olduğu görülmüştür (Tablo 2).

Çay (*Camellia sinensis*) CsWOX proteinlerinin moleküler ağırlığı (MW) 19,46 ile 81,15 kDa arasında değiştiği, izoelektrik nokta (pI) 5,09 ile 9,30 arasında değiştiği görülmüştür [46].

İki tür kivi hem AcWOXs hem de AeWOXs proteinlerinin amino asit uzunluğu 199 aa ile 354 aa ve 169 aa ile 371 aa arasında büyük ölçüde değiştiği, AcWOX ve AeWOX proteinlerinin öngörülen moleküler ağırlığı 22,3 ile 39,2 kDa ve 19,4 ile 42,2 kDa arasında değiştiği. İzoelektrik nokta (pI) AcWOXs için 5,30 ile 9,75 arasında ve AeWOXs için 5,66 ile 9,76 arasında değiştiği görülmüştür [47].

Yenidünya EjWOX proteinlerinin uzunluğu 176 aa ile 409 aa arasında değiştiği, Moleküler ağırlıkları 20.16 KDa ile 45.14 KDa arasında değiştiği, Ek olarak, bu proteinler çoğunlukla izoelektrik noktaları 4.71 ile 9.26 arasında değiştiği görülmüştür [45]. Bunun da bizim sonuçlarımız ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

Filogenetik analiz, pamuğun WOX proteinlerinin üç bölüme ayrılabilceğini göstermiştir: eski, orta ve WUS kuşakları. WUS dalındaki WOX proteinlerinin sayısı (23 GhWOX proteini içerir), diğer iki daldaki proteinlerin toplamından daha fazla görülmüştü; Antik klad altı GhWOX proteinine sahiptir. Geriye kalan üyeler orta klada aittir [44].

Soya fasulyesi filogenetik ağacında, WOX genlerinin üç ana sınıfa (modern/WUS, orta ve eski) ayrılabilceği görülmüştür. Modern/WUS grubu, 21 üye içeren bu filogenetik ağaçtaki en büyük gruptur. Orta grup, 6 üye içermiştir. Antik grupta da 6 üye vardır [7].

Pirinçte OsWOX gen ailesi 3 dala bölünebilmiştir; bunlardan yalnızca 1'i antik evrim dalına, 6'sı orta evrim dalına ve 6 modern evrim dalına aittir [23].

VvWOX'ın filogenetik ağaçta 3 ana kola ayrıldığı belirlenmiştir. Bu kollar sınıflandırıldığında; Sınıf 1(antik/eski)'de 7 protein, Sınıf 2 (orta)'de 10 protein, Sınıf 3 (modern/WUX)'te 14 protein bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). Bu da literatürdeki bilgiler ile eşleşme göstermektedir.

Bu çalışmada WOX ailesi için toplamda 20 tane farklı motif belirlenmiştir. Bunun sonucunda WOX'ye ait motifler incelendiğinde baskın olarak 2 tane motif kalıbı görülmüştür. Bu da aynı motif kalıbına sahip genlerin filogenetik ağaçta da aynı sınıfta yer aldığını göstermektedir (Şekil 6). Bu da aynı grupta yer alan proteinlerin benzer özelliklere sahip olduğunu gösterir.

Pamuktaki WOX genlerinin çeşitliliğini daha iyi anlamak ve keşfetmek için, GhWOX genlerinin korunan motiflerini ve ekzon/intron yapılarını analiz edilmiştir. Beş ayrı korunan motif belirlenmiştir. Motiflerin bileşim desenleri filogenetik ağaçla tutarlı olma eğilimindedir. Antik kladdaki GhWOX proteinleri üç özdeş motif içerir; bu da kladdaki proteinlerin aynı işleve sahip olduğunu ve işlevlerin yedekli olduğunu gösterebilir [44].

Bir çalışmada iki protein filogenetik ağaçta birbirine çok yakındır; bu da ortak bir işleve sahip olabileceklerini gösterir. Ancak, yeni bir motif GhWOX1_At proteinine yeni bir işlev kazandırabilir [44].

Soya fasulyesindeki WOX genleri filogenetik analizle sınıflandırılan her grubun benzer korunmuş motif kompozisyonlarını paylaştığını göstermiş, ancak farklı alt gruplar arasında bazı farklılıklar vardır. Bir dereceye kadar, bu alt aileye özgü motifler soya fasulyesindeki WOX genlerinin işlevsel farklılıklarına yol açabilir [7].

Belirli motifler, ilgili kladdaki üyelerin uzmanlaşmış biyolojik işlevlerine katkıda bulunabilir [48].

FvWOX genlerinin çeşitliliğini daha iyi anlamak için, FvWOX proteinlerindeki korunan motifler MEME ile analiz edilmiştir. Bu tür karakterizasyon, aynı kladın benzer motif dağılımları için benzer biyolojik işlevlere sahip olabileceğini göstermektedir [49].

Ekzon-intron yapısı bir gen ailesinin birincil evrimsel özelliğidir ve işlev çeşitliliği ve sınıflandırması için bir ipucu sağlar [47].

VvWOX ailesinin ekzon-intron bölgelerine bakıldığında ise; bütün VvWOX genlerinin (VvWOX-29 hariç) intronları vardır. Filogenetik ağaç ile benzerlik gösteren WOX ekzon-intron bölgeleri, motif kalıpları ile de uyuşmaktadır. Örneğin; aynı ekzon-intron yapısına sahip VvWOX-9, WOX-14, WOX-23, WOX-27 ve WOX-31 filogenetik ağaç üzerinde aynı kolda yer almaktadır ve aynı motif kalıbına sahiplerdir (Şekil 8).

Başka bir çalışmada WOX proteinlerinin ekson-intron yapısı ve motif organizasyonunun modelleri filogenetik sonuçlarla uyumludur [50].

Yenidünya (*Eriobotrya japonica*)’da Gen yapı analizi, tüm EjWOX genlerinin intron içerdiğini, bunların 11 EjWOX geninin çevrilmemiş bölgeler içerdiğini görülmüştür [45].

Ekzon/intron yapı analizi, (Tüm GhWOX genlerinin intronları vardır ve her GhWOX proteini birden fazla motif içerir.) çoğu GhWOX geninin iki intron içerdiğini ve diğerlerinin en az bir intron içerdiğini göstermiştir; bu da GhWOX gen yapısının korunduğunu göstermektedir [44].

GmWOX'larda intron sayısı bir ile üç arasında değişmiştir. Filogenetik ağaçların sonuçlarıyla birleştirildiğinde, grup A'nın (modern/WUS) 1-3 intron bulunduğu görülmüştür. Grup A (modern/WUS) iki alt klada ayrılmıştır. İlk alt grup 1 veya 3 intron içermiştir. İkinci alt grup sadece iki üye içermiştir: GmWOX01 ve GmWOX18 ve iki intronu vardır. Grup B (orta) ve grup C (antik) her ikisi de iki intron içermiştir. Aynı alt familyalardaki yakın ilişkili soya fasulyesi WOX üyelerinin çoğu benzer intron sayılarına ve ekzon uzunluklarına sahiptir [7].

Çayda CsWOX genlerindeki intron sayısı 0 ile 10 arasında değişmiştir. Modern kladdaki 10 CsWOX geninde 1–3 intron, orta klad üyelerinde 0–2 intron ve antik kladdaki 5 CsWOX geninde 2–10 intron bulunmakta ve bu da antik klad ile diğer kladlar arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Antik kladdaki ve diğer kladlardaki CsWOX genleri arasındaki farklılıklar, korunan motif analizi ile daha da desteklenmiştir [46].

Farklı filogenetik gruplarda bulunan farklı gen yapıları, genlerin farklı işlevleri yerine getirmek üzere çeşitli ekzon-intron yapılarına evrimleştiğini düşündürmektedir [7].

Pirinçte gen yapısı büyük ölçüde farklıdır; bu da WOX gen fonksiyonunun farklılık ve çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir [23].

AcWOX ve AeWOX'ların ekzon sayısı iki ile dört arasında değişmiştir. Her türde, aynı kladdaki WOX genleri farklı kladlar arasındakilerden daha benzerdir. Dahası hem AcWOX hem de AeWOX genlerinin ekzon-intron yapısı modern/WUS kladında daha fazla farklılaşmış ve bu, iki kivi meyvesinde bu kladdaki WOX'ların işlevsel farklılaşmasına neden olduğu düşünülmektedir [47].

Ekzon-intron yapısı sonuçlarına benzer şekilde, filogenetik olarak yakından ilişkili WOX genleri, motif sayısı ve organizasyonu da dahil olmak üzere korunmuş motif yapıları göstermiş; bu da aralarında benzer işlevlerin olduğunu göstermiştir [47].

VvWOX proteinleri lokalizasyonunun tahminine bakıldığında 3 lokalizasyonda görülmüştür. Çekirdek, Hücre zarı ve Sitoplazmadır (Şekil 10).

Kivi meyvesi WOX proteinlerinin hücre altı lokalizasyonu tahmin edilmiş ve tüm AcWOX ve AeWOX proteinleri çekirdekte lokalize edilmiştir [47]. FvWOX proteinlerin çekirdekte yer aldığı görülmüştür. Bu da FvWUSb'nin çekirdekte spesifik olarak biriktiğini düşündürmektedir [49]. Biber (*Capsicum annuum*) çeşidi Zunla-1'de çekirdekte bulunmuştur [51]. Tahmin edilen DcaWOX proteinleri çekirdekte lokalizedir ve bitki büyümesini ve gelişimini düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak işlev görebilir. Bu, tahmin edilen sonuçlarla tutarlıdır ve DcaWOX proteinlerinin transkripsiyon faktörleri olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir [52].

WOX genlerini hedefleyen miRNA'ların analizleri bakıldığında toplam 31 farklı üzüm WOX geninin miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Toplamda 205 farklı miRNA tarafından, VvWOX-1'den VvWOX-31'e kadar genlerinin hedeflendiği görülmüştür (Şekil 16).

VvWOX-14 en çok (39 kez), ardından VvWOX-31 (38 sefer), ardından VvWOX-23 (32 kez) ardından VvWOX-25 ve VvWOX-30 (her biri 29 kez) miRNA'lar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir (Şekil 17).

Ath-miR5021 ise en çok (13 kez), ardından ath-miR414 (9 kez), ardından ath-miR838 ve ath-miR4221 (her biri 8 kez) VvWOX genler tarafından hedeflendiği görülmüştür (Şekil 18).

Ath-miR5021'in çeşitli işlevlerde transkriptleri düzenlediğini ve farklı miRNA aileleri ile iş birliği yaparak bu miRNA ailelerinin ağ içerisinde iletişim kurabildiğini ortaya çıkarmıştır [38].

Ek olarak, gelişimi kontrol eden düzenleyici ağlarda ve stres faktörlerine verilen yanıtlarda önemli bir rolü olan MYB transkripsiyon faktörünün bildirildiğini görülmüştür. Bu, miR5021 tarafından pembe pervane çiçeğinde hedeflenmiştir [39].

198 AtMYB geninin analizi, ath-miR5021'in hedef genlerinden birinin MYB geni olduğunu göstermiştir. MYB transkripsiyon faktörleri, öncelikle ABA sinyalleriyle kuraklık stres yanıtını düzenlemekten sorumludur [40].

ath-miR5021, *Arabidopsis*'te hedef tahminine dayalı olarak stresle ilişkili yanıt işlevine sahip bir miRNA olarak tanımlanmıştır. Tuzluluk ve viral enfeksiyon yanıtları gibi diğer stres yanıtlarında önemli bir rol oynamaktadır [40].

ath-miR5021, ARGONAUTE (AGO) proteinlerinin geninin hedefidir. Bu genler virüs savunma yanıtında önemli bir role sahiptir. *Marsipenaeus japonicus*'un ath-miR5021 ifadesi virüs enfeksiyonundan sonra değişmiştir. Buğdayda (*Triticum aestivum*) yapılan mikroRNA mikrodizi testi, ath-miR5021'in tuz stresi tedavisinde farklı şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Bu, ath-miR5021'in strese duyarlı bir miRNA olabileceğini ve kuraklık stresinde önemli olduğunu öne sürmüştür [40].

miR838, zencefil, *Brassica juncea*, *Arabidopsis*, *Salvia miltiorrhiza* ve *Brassica napus*'ta bulunan korunan bir miRNA'dır. Buğdayda miR838'in ısı şoku protein genini hedef alarak kuraklık tepkisini düzenlediği gösterilmiştir [14].

Bitki türleri arasında korunan bir diğer miRNA olan miR414, *Physcomitrella patens*'te kuraklık direnciyle ilişkilendirilmiştir [14].

GO analizine göre *Arabidopsis*'te miR414'ün hedefleri özellikle bitki büyüme, gelişme ve savunma mekanizmalarında önemli olan bZIP, WRKY, MYB, B3, ısı şoku proteinleri ve TCP gibi transkripsiyonel düzenleyicilerdir [37].

Arabidopsis'te miR414'ün hedeflediği proteinlerin transkripsiyonel düzenleme, protein modifikasyonu, DNA onarımı veya kromatin modifikasyonunda rolleri bulunmaktadır. Bu da miR414'ün bitki büyümesinin düzenlenmesinde çok önemli olduğunu gösterebilir [39].

ath-miR414'ün kuraklık stresi koşullarında ilgili hedef genlerinin ifadesiyle ters bir ilişkisi vardır. Bir çalışmada, ath-miR414'ün kuraklık ve *Pseudomonas syringae* enfeksiyonunun bireysel ve birleşik stresi altında aşağı düzenlendiğini bulunmuştur. Bu da ath miR414'ün strese duyarlı miRNA olabileceğini ve kuraklık koşulları altında önemli hedef genleri düzenleyebileceğini öne sürmüştür [40].

miR4221'nin düşük sıcaklık stresi altında önemli değişiklikler gösterdiğini ve soğuk stresine yanıt olarak düzenleyici bir mekanizmaya sahip olduğunu görülmüştür [53].

Belirli bir genin transkripsiyonunu başlatan bir DNA bölgesi olan promotör, gen ifadesinin zamansal ve mekansal düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [7].

Promotörlerdeki cis-etkili elementlerin analizleri, gen düzenlemelerinin biyolojik işlevlerini ortaya koymak için gen düzenlemelerini anlamamızı sağlayacak önemli olan gen transkripsiyonel düzeylerinin düzenleyicileri hakkında bilgi sağlayabilir [48].

GmWOX'ların dahil olabileceği biyolojik işlevleri ve düzenleme ağını daha iyi anlamak için, her GmWOX geni, cis-düzenleyici elementler için promotör analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, GmWOX genlerinin fitohormonlar, biyotik ve abiyotik faktörler ve altta yatan gelişim düzenleme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından yaygın olarak düzenlenebileceğini ortaya koymuştur [7].

Birkaç başka cis-element bitki büyümesi ve gelişimi, strese duyarlı ve hormona duyarlı olmak üzere üç kategoriye sınıflandırılmıştır. İlk kategoride (bitki büyümesi ve gelişimi), ışığa yanıt veren Box 4 ve MRE, meristem ekspresyonuyla ilişkili CAT-box ve CCGTCC-box, zein metabolizması düzenlemesinde rol oynayan O2-site, endosperm ekspresyonunda rol oynayan GCN4_motif, palisade mezofil hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayan HD-Zip 1 ve sirkadiyen kontrolünde rol oynayan sirkadiyen olmak üzere sekiz tip cis-element belirlenmiştir [46].

İkinci kategoride (strese duyarlı), altı tip cis-element tespit edilmiştir; Bunlar arasında anaerobik indüksiyon için gerekli olan ARE, kuraklık indüklenabilirliğinde rol oynayan MBS, düşük sıcaklık tepkimesinde rol oynayan LTR, yaralara tepki veren WUN-motifi, savunma ve stres tepkimesinde rol oynayan TC-rich repeats ve anoksik spesifik indüklenabilirlikte rol oynayan GC-motifi yer almaktadır [46].

Üçüncü kategoride (hormon duyarlı), özellikle etilene yanıt veren ERE, MeJA yanıtında rol oynayan CGTCA-motifi, absisik asit yanıtında rol oynayan ABRE ve gibberellin yanıtında rol oynayan üç tip cis element (P-box, TATC box ve GARE-motifi) olmak üzere dokuz tip cis element belirlenmiştir [46].

MBS, tüm CsWOX genlerinin promotör bölgesinde mevcuttur ve kuraklık stresine yanıt vermiş, bu da CsWOX genlerinin çay bitkisinin kuraklık stresine verdiği

yanıtlarda aktif bir rol oynayabileceğini daha da göstermiştir. Artan kanıtlar, fitohormonların bitki büyümesini, gelişimini ve çevresel strese karşı direnci düzenlemede merkezi bir rol oynadığını göstermiştir [46].

MsWOX genlerinin çoğunun ifadesinin, gelişimsel, biyotik veya abiyotik sinyallere yanıt olarak fitohormonlar tarafından kontrol edilebileceğini öne sürmüştür [48].

FvWOX genlerinin transkripsiyonunun esas olarak ışık, hormonlar ve stres sinyalleri tarafından düzenlenebileceğini göstermektedir [49].

Jatropha curcas WOX genlerinin (JcWOXs) promotöründe çeşitli cis etkili düzenleyici elementlerin / MYCs (abscisik asit (ABA) indüksiyonuyla ilişkili), AREs (anaerobik stres tepkisiyle ilişkili), MYB elementi (kuraklık stres tepkisiyle ilişkili) ve LTR elementi (düşük sıcaklık stres tepkileriyle ilişkili), ABREs (ABA reaksiyon elementiyile ilişkili), G-box (ışık tepki elementiyile ilişkili) / bulunması, farklı fonksiyonları yansıtmaktadır [54].

BdWOX promotörlerinde ABA'ya duyarlı cis-element ABRE'yi, MeJA'ya duyarlı element TGACG-motif'i, oksine duyarlı element TGA-elementi, gibberellin (GA) -duyarlı element P-box'ı, salisilik aside duyarlı element TCA-elementi vb. tahmin edilmiştir [55].

Kök düzenleme cis-element G-box'ı, tohumla özgü düzenleme RY-elementi, meristem ekspresyonu ile ilişkili cis-element CAT-box'ı, ışığa duyarlı element Sp1'i, sirkadiyen kontrolü (CAAAGATATC), metabolizmayla ilişkili cis-element O2-site'yi vb. öngörülmüştür [55].

BdWOX genlerinin hormon sinyalleşmesine katıldığını ve bitki büyüme ve gelişimini düzenlediğini göstermektedir [55].

Birçok çalışmada (CBF/DREB1) ve ABA ile ilişkili genlerin soğuk ve kuraklık stresinde rol oynadığı bildirilmiştir. Cis-element analizi, CmWOX genlerinin abiyotik streslere tepki verebileceğini göstermiştir [56].

PbWOX promotörlerinde abiyotik stres tepkisi elementleri; 38 düzenleyici anaerobik indüktör element (ARE), MYBs bağlayabilen 20 kuraklığa-tepkisel element, 15 düşük sıcaklığa-tepkisel element (LTR), 8 savunma ve strese tepkisel element tahmin edilmiştir [57].

Ayrıca, gelişimle ilişkili cis-etkisel elementlerde sırasıyla 14 CAT box, 12 O₂-sites ve 6 RY elementi tahmin edilmiştir. PbWOX promotörlerinde en yaygın cis-etkili elementler G-boxes (ışıkla ilgili), ABREs (ABA ile ilgili), CGTCA motif içeren elementler (MeJA ile ilgili) ve AREs (kuraklıkla ilgili)'dir. Bunun ışığında, PbWOX'un bitki büyüme sürecine ve stres tepkisine katıldığını ima etmiştir [57].

Başka bir çalışmada, abiyotik ve biyotik strese duyarlı kategorilerde dört tip cis-element tanımlanmıştır. Bunlara TC-rich repeats (savunma ve strese duyarlılık), LTR (düşük sıcaklığa duyarlılık), ARE (anaerobik indüksiyon) ve MBS (kuraklığa duyarlılığa katılan MYB bağlanma yeri)'dir. İlginç bir şekilde, MdWUS-2 ve MdWOX13-2 hariç tüm MdWOX genlerinin promotör bölgesinde en az bir kuraklık indükleyici element (ARE veya MBS) bulunmuştur. Bu da MdWOX genlerinin elma kuraklık stresine yanıtta aktif bir rol oynayabileceğini göstermektedir [58].

Buğdayda Cis-düzenleyici elementler ACE, G-Box, Box4, TCT-motif, MRE, Sp1, AE-box, ATTAAT ışık tepkili elementler olarak tanımlanmıştır. Dahası, G-box (CACGTG) elementi absisik asit, anaerobik ve metil-jasmonata yanıt olarak da önemli bir rol oynar ve tohumla özgü ifadeyle birlikte etilen indüksiyonunda aktif bir role sahiptir. Stres yanıt elementleri altında, metil jasmonat yanıt elementleri (CGTCA motifi ve TGACG motifi), bitki savunma yanıtları sırasında aktif olan GC ve GT motiflerine sahip anaerobik yanıt elementleri (ARE), CAACTG, MBS ve LTR sıklıkla tespit edilmiştir. Büyüme ve gelişmeyle ilgili cis-düzenleyici elementler; CAT-box, meristem-spesifik aktivasyonda yer alan GCCACT, O₂ site zein metabolizmasında ve sirkadiyen motifte rol oynar, tohum ve filiz gelişimine özgü RY elementleri WOX genlerinin çoğunda öngörülmüştür [59].

Ekmeklik buğday TaWOX genlerinin çeşitli stres, hormon ve gelişimle ilgili faktörlere yanıt verebilecek çeşitli cis düzenleyici elementlere sahip olduğu ortaya çıkmış ve bu da çeşitli biyolojik yollardaki rollerini daha da ileri sürmektedir. Çay ve soya fasulyesinde de benzer sonuçlar bildirilmiştir [59].

OsWOX genleri, fotosentez ve stres tepkisinde daha fazla rol oynayabilecek çok sayıda ışık tepkisi ve stres tepkisi ögesi içermiştir. OsWOX genleri, pirinç tohumu çimlenmesinde, fide aşamasında ve çeşitli abiyotik streslerde bol ve çeşitli ekspresyon modelleri göstermiştir [23].

Diğer çalışmalarda görüldüğü gibi bu çalışmada Promotör analizi, VvWOX genlerinin potansiyel cis düzenleyici elementlere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Hormona özgü, gelişime özgü, biyotik strese duyarlı ve birkaç abiyotik strese duyarlı elementi tanımlanmıştır. Daha ayrıntılı bir şekilde bunlar abiyotik strese duyarlı (ACE, LTR, G-Box, MBS, MRE, I-box, ATCT-motif, GATA-motif, TCT-motif, Box 4, CAG-motif, GTGGC-motif, TCCC-motif, AE-box, Gap-box, Box II, Sp1, chs-CMA2a, LAMP-element, ATCT-motif, ACA-motif, sbp-CMA1c), hormona özgü (TGA-element, TCA-element, ABRE, TATC-box, AuxRR-core GARE-motif, P-box, AuxRE), biyotik strese duyarlı (TC-rich repeats, W box), meristeme özgü (CAT-box) olarak ayrılabilir.

Bu cis-elementlerin VvWOX genlerinde bulunması, geniş bir yelpazede cis-elementlerin tanımlanması, bunların farklı stres ve gelişimsel süreçlerde hayati roller oynadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, iklim değişiklikleri nedeniyle abiyotik streslerin sıklığının büyük bir oranda artması beklenmektedir. Bu nedenle, stresle ilişkili genler ve farklı stresler arasındaki ilişkiyi en iyi şekilde tanımlayan moleküler mekanizmaları ve hücrel süreçleri anlamak çok önemlidir.

Önceki çalışmalarda LEA proteinleri, bitki stresine ilişkili tepkilerde yer alan belirgin motiflere sahip, oldukça çeşitli bir protein grubudur. WOX gen ailesinin de bitki büyümesi ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir.

Elde edilen bulguların ışığında, LEA2 proteinleri stresle mücadele etmek ve strese dayanıklı bitkiler geliştirmek üzere kullanılabilecek etkili proteinler olabilirler. WOX ailesi ise, abiyotik stres koşulları altında yanıt verme potansiyeline sahip olabilir. Bu nedenle, WOX genlerinin işlevsel karakterizasyonu, abiyotik stres düzenlemesindeki rollerine ilişkin anlayışımızı genişletebilir ve bu da üzüm bitkilerinde abiyotik stresin görülme sıklığının ve sonuçlarının iyileştirilmesiyle sonuçlanabilir. Ayrıca bu çalışma, LEA2 ve WOX genlerinin, abiyotik stres toleransı açısından özgül işlevlerinin daha fazla araştırılması için bir temel oluşturmaktadır.

Ancak LEA2 ve WOX proteinlerinin işlevsel özellikleri hakkında *in vitro* deneyler yoluyla analiz etmesi yeterli değildir. Aksine LEA2 ve WOX genlerini kullanarak strese dayanıklı bitkileri etkili bir şekilde yetiştirmek için *in vivo* çalışmalar yapılmalıdır.

Abiyotik stres koşulları altında LEA2 ve WOX gen ifadesine yanıt olarak bitkilerdeki morfolojik değişikliklerin araştırılması, bitki morfolojik değişiklikleri yoluyla stres toleransındaki işlevlerini belirlemek için de yararlı olacaktır.

LEA2 ve WOX gen ifadesinin bitki hormonu ve abiyotik streslere maruz kalan morfolojik değişikliklerle ilişkisi üzerine daha fazla çalışma, bitkilerin abiyotik streslere karşı stres tolerans mekanizmalarını belirlemek ve bu çok yönlü proteinin çeşitli stres koşulları altındaki özelliklerini gstermek için önemli olacaktır.



KAYNAKLAR:

- [1] M. Abdul Aziz, M. Sabeem, S. K. Mullath, F. Brini, and K. Masmoudi, “Plant Group II LEA Proteins: Intrinsically Disordered Structure for Multiple Functions in Response to Environmental Stresses,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 11. MDPI, Nov. 01, 2021. doi: 10.3390/biom11111662.
- [2] M. İbrahim *et al.*, “Genome-wide identification of the LEA protein gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.),” *Tree Genet Genomes*, vol. 15, no. 4, Aug. 2019, doi: 10.1007/s11295-019-1364-3.
- [3] M. A. S. Artur, T. Zhao, W. Ligterink, E. Schranz, and H. W. M. Hilhorst, “Dissecting the genomic diversification of late embryogenesis abundant (LEA) protein gene families in plants,” *Genome Biol Evol*, vol. 11, no. 2, pp. 459–471, Feb. 2019, doi: 10.1093/gbe/evy248.
- [4] P. Boccacci *et al.*, “Cultivar-specific gene modulation in *Vitis vinifera*: Analysis of the promoters regulating the expression of WOX transcription factors,” *Sci Rep*, vol. 7, Mar. 2017, doi: 10.1038/srep45670.
- [5] M. M. Daude, T. W. Dos Santos Silva, N. C. Freitas, S. A. Ságio, L. V. Paiva, and H. G. Barreto, “Transcriptional analysis of WUSCHEL-related HOMEODOMAIN (WOX) genes in *Coffea arabica* L.,” *Biologia (Bratisl)*, vol. 75, no. 9, pp. 1483–1495, Sep. 2020, doi: 10.2478/s11756-020-00460-8.
- [6] G. Gambino, M. Minuto, P. Boccacci, I. Perrone, R. Vallania, and I. Gribaudo, “Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*,” *J Exp Bot*, vol. 62, no. 3, pp. 1089–1101, Jan. 2011, doi: 10.1093/jxb/erq349.
- [7] Q. Hao, L. Zhang, Y. Yang, Z. Shan, and X. A. Zhou, “Genome-wide analysis of the wox gene family and function exploration of gmwox18 in soybean,” *Plants*, vol. 8, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/plants8070215.
- [8] C. Arik and Ş. Aydın, “Manisa-Alaşehir Yöresinde Bağcılığın Önemi ve Bağlarının Beslenme Durumunun İncelenmesi,” *MCBÜ Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, vol. 1, no. 23, pp. 49–58, 2017.
- [9] Ö. Çalkan Sağlam and H. Sağlam, “İnsanlık tarihinde üzümün önemi, Özlem Çalkan Sağlam, Hayri Sağlam İnsanlık Tarihinde Üzümün Önemi,” *Journal of Agriculture*, vol. 1, no. 2, pp. 1–10, 2018.
- [10] Ö. Çalkan Sağlam and H. Sağlam, “Türkiye Bağcılığına Tarihsel Bir Bakış; Asma Genetik Kaynaklarının Önemi,” *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, vol. 32, no. 3, pp. 601–606, Dec. 2018, doi: 10.15316/sjafs.2018.142.

- [11] S. Bhattacharya, S. Dhar, A. Banerjee, and S. Ray, “Structural, functional, and evolutionary analysis of late embryogenesis abundant proteins (LEA) in *Triticum aestivum*: A detailed molecular level biochemistry using in silico approach,” *Comput Biol Chem*, vol. 82, pp. 9–24, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.06.005.
- [12] M. Nagaraju, S. Anil Kumar, P. S. Reddy, A. Kumar, D. Manohar Rao, and P. B. Kavi Kishor, “Genome-scale identification, classification, and tissue specific expression analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes under abiotic stress conditions in *Sorghum bicolor* L.,” *PLoS One*, vol. 14, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0209980.
- [13] W. Geng *et al.*, “Genome-wide identification and expression analyses of late embryogenesis abundant (LEA) gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) reveal their function in abiotic stress responses,” *Gene*, vol. 836, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.gene.2022.146665.
- [14] A. Uğurlu Bayarslan, “Identification and Characterization of LEA Genes in Ash Tree (*Fraxinus excelsior*) Genome,” *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, vol. 19, no. 3, pp. 299–309, Dec. 2019, doi: 10.17475/kastorman.662581.
- [15] K. B. Ceylan, Y. Ceylan, B. Ustaoglu, M. Cengiz Baloğlu, and Y. Çelik Altunoğlu, “Molecular Identification and Characterization of LEA Proteins in Jujube Genome,” *KUJES*, vol. 5, no. 2, pp. 101–146, 2019, [Online]. Available: <https://www.blast2go.com>
- [16] X. Jin *et al.*, “Genome-wide identification and expression analyses of the LEA protein gene family in tea plant reveal their involvement in seed development and abiotic stress responses,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50645-8.
- [17] J. Gao and T. Lan, “Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabuliformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*,” *Sci Rep*, vol. 6, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19467.
- [18] S. Piyatissa and D. Bandupriya, “Genome-wide Identification and Analysis of Late Embryogenesis Abundant (LEA) Genes in *Musa acuminata*,” *Trop Plant Biol*, vol. 14, no. 3, pp. 295–312, Sep. 2021, doi: 10.1007/s12042-021-09289-0.
- [19] J. Zheng *et al.*, “Isolation and characterization of an atypical LEA gene (IpLEA) from *Ipomoea pes-caprae* conferring salt/drought and oxidative stress tolerance,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50813-w.
- [20] L. Shi, K. Wang, L. Du, Y. Song, H. Li, and X. Ye, “Genome-wide identification and expression profiling analysis of wox family protein-encoded genes in triticeae species,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 17, Sep. 2021, doi: 10.3390/ijms22179325.
- [21] V. E. Tvorogova, E. Y. Krasnoperova, E. A. Potsenkovskaia, A. A. Kudriashov, I. E. Dodueva, and L. A. Lutova, “What Does the WOX Say? Review of Regulators,

- Targets, Partners,” *Molecular Biology*, vol. 55, no. 3. Pleiades journals, pp. 311–337, May 01, 2021. doi: 10.1134/S002689332102031X.
- [22] H. Li *et al.*, “Molecular characterization and gene expression analysis of tomato WOX transcription factor family under abiotic stress and phytohormone treatment,” *J Plant Biochem Biotechnol*, vol. 30, no. 4, pp. 973–986, Dec. 2021, doi: 10.1007/s13562-021-00723-8.
 - [23] Q. Zhang, A. Zhang, J. Jia, H. Zhao, J. Liu, and B. Chen, “Rice WOX family gene identification and expression analysis of seeds germinated under stress,” *Journal of Southern Agriculture*, vol. 53, no. 7, pp. 1809–1820, 2022, doi: 10.3969/j.issn.2095-1191.2022.07.003.
 - [24] X. Shi *et al.*, “The complete reference genome for grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetics and breeding,” *Hortic Res*, vol. 10, no. 5, May 2023, doi: 10.1093/hr/uhad061.
 - [25] E. Gasteiger *et al.*, “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server,” in *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, Ed., Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005, pp. 571–607.
 - [26] R. E. Voorrips, “Computer Note MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs,” *Journal of Heredity*, vol. 93, no. 1, pp. 77–78, 2002, doi: <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>.
 - [27] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, “MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11,” *Mol Biol Evol*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027, Jul. 2021, doi: 10.1093/molbev/msab120.
 - [28] B. G. Milligan, “Maximum-Likelihood Estimation of Relatedness,” *Genetics*, vol. 163, no. 3, pp. 1153–1167, 2003.
 - [29] I. Letunic and P. Bork, “Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool,” *Nucleic Acids Res*, Apr. 2024, doi: 10.1093/nar/gkae268.
 - [30] B. Hu, J. Jin, A. Y. Guo, H. Zhang, J. Luo, and G. Gao, “GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 8, pp. 1296–1297, Apr. 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btu817.
 - [31] T. L. Bailey, J. Johnson, C. E. Grant, and W. S. Noble, “The MEME Suite,” *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. W1, pp. W39–W49, 2015, doi: 10.1093/nar/gkv416.
 - [32] C. S. Yu, Y. C. Chen, C. H. Lu, and J. K. Hwang, “Prediction of protein subcellular localization,” *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, vol. 64, no. 3, pp. 643–651, Aug. 2006, doi: 10.1002/prot.21018.
 - [33] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, and M. J. E. Sternberg, “The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis,” *Nat Protoc*, vol. 10, no. 6, pp. 845–858, Jun. 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.053.

- [34] X. Dai, Z. Zhuang, and P. X. Zhao, "PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server (2017 release)," *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. W1, pp. W49–W54, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky316.
- [35] P. Shannon *et al.*, "Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks," *Genome Res*, vol. 13, no. 11, pp. 2498–2504, Nov. 2003, doi: 10.1101/gr.1239303.
- [36] M. Lescot *et al.*, "PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no. 1, pp. 325–327, 2002, doi: 10.1093/nar/30.1.325.
- [37] Y. Celik Altunoglu, P. Baloglu, E. N. Yer, S. Pekol, and M. C. Baloglu, "Identification and expression analysis of LEA gene family members in cucumber genome," *Plant Growth Regul*, vol. 80, no. 2, pp. 225–241, Nov. 2016, doi: 10.1007/s10725-016-0160-4.
- [38] X. Wu *et al.*, "A microRNA–microRNA crosstalk network inferred from genome-wide single nucleotide polymorphism variants in natural populations of *Arabidopsis thaliana*," *Front Plant Sci*, vol. 13, Aug. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.958520.
- [39] Y. Celik Altunoglu, M. C. Baloglu, P. Baloglu, E. N. Yer, and S. Kara, "Genome-wide identification and comparative expression analysis of LEA genes in watermelon and melon genomes," *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 23, no. 1, pp. 5–21, Jan. 2017, doi: 10.1007/s12298-016-0405-8.
- [40] M. P. Arjmand, H. S. Lahiji, M. H. Biglouei, and M. M. Golfazani, "Identification of drought-responsive hub genes and their related miRNAs in *Arabidopsis thaliana*," 2021, doi: 10.21203/rs.3.rs-773568/v1.
- [41] D. C. J. Wong, R. L. Gutierrez, G. A. Gambetta, and S. D. Castellarin, "Genome-wide analysis of cis-regulatory element structure and discovery of motif-driven gene co-expression networks in grapevine," *DNA Research*, vol. 24, no. 3, pp. 311–326, Jun. 2017, doi: 10.1093/dnares/dsw061.
- [42] G. Wang, X. Xu, Z. Gao, T. Liu, Y. Li, and X. Hou, "Genome-wide identification of LEA gene family and cold response mechanism of BcLEA4-7 and BcLEA4-18 in non-heading Chinese cabbage [*Brassica campestris* (syn. *Brassica rapa*) ssp. *chinensis*]," *Plant Science*, vol. 321, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111291.
- [43] R. O. Magwanga *et al.*, "Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton," *BMC Genet*, vol. 19, no. 6, Jan. 2018, doi: 10.1186/s12863-017-0596-1.
- [44] P. He *et al.*, "Comprehensive analysis of WOX genes uncovers that WOX13 is involved in phytohormone-mediated fiber development in cotton," *BMC Plant Biol*, vol. 19, no. 312, Jul. 2019, doi: 10.1186/s12870-019-1892-x.

- [45] Y. Yu *et al.*, “Genome-wide analysis of the WOX gene family and the role of EjWUSa in regulating flowering in loquat (*Eriobotrya japonica*),” *Front Plant Sci*, vol. 13, no. 1024515, Nov. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.1024515.
- [46] P. Wang *et al.*, “Genome-wide identification of WOX genes and their expression patterns under different hormone and abiotic stress treatments in tea plant (*Camellia sinensis*),” *Trees*, vol. 33, no. 2, pp. 1129–1142, Aug. 2019, doi: 10.1007/s00468-019-01847-0.
- [47] C. Feng, S. Zou, P. Gao, and Z. Wang, “In silico identification, characterization expression profile of WUSCHEL-Related Homeobox (WOX) gene family in two species of kiwifruit,” *PeerJ*, vol. 9, Oct. 2021, doi: 10.7717/peerj.12348.
- [48] A. Xu *et al.*, “Characterization and expression profiles of WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.),” *BMC Plant Biol*, vol. 23, no. 471, Dec. 2023, doi: 10.1186/s12870-023-04476-5.
- [49] X. Yang, X. Zhao, Y. Miao, D. Wang, Z. Zhang, and Y. Liu, “Genome-Wide Identification and Expression Profile Analysis of the WUSCHEL-Related Homeobox (WOX) Genes in Woodland Strawberry (*Fragaria vesca*),” *Horticulturae*, vol. 8, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/horticulturae8111043.
- [50] X. Li *et al.*, “Identification and characterization of the WOX family genes in five solanaceae species reveal their conserved roles in peptide signaling,” *Genes (Basel)*, vol. 9, no. 5, May 2018, doi: 10.3390/genes9050260.
- [51] Y. ZHANG, X. WANG, L. WANG, J. TONG, Z. WU, and Y. GAO, “Identification, Evolution and Expression Analysis of WOX Gene Family in *Capsicum annuum*,” *Journal of Henan Agricultural Sciences*, vol. 52, no. 5, pp. 130–141, 2023, doi: 10.15933/j.cnki.1004-3268.2023.05.015.
- [52] H. Li, C. Li, Y. Wang, X. Qin, L. Meng, and X. Sun, “Genome-Wide Analysis of the WOX Transcription Factor Genes in *Dendrobium catenatum* Lindl.,” *Genes (Basel)*, vol. 13, no. 8, Aug. 2022, doi: 10.3390/genes13081481.
- [53] X. Yang, F. Liu, Y. Zhang, L. Wang, and Y. fu Cheng, “Cold-responsive miRNAs and their target genes in the wild eggplant species *Solanum aculeatissimum*,” *BMC Genomics*, vol. 18, no. 1000, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12864-017-4341-y.
- [54] Z. Wang *et al.*, “Genome-Wide Identification and Comparative Analysis of WOX Genes in Four Euphorbiaceae Species and Their Expression Patterns in *Jatropha curcas*,” *Front Genet*, vol. 13, no. 878554, Jun. 2022, doi: 10.3389/fgene.2022.878554.
- [55] H. Ren, S. Chen, J. Hou, and H. Li, “Genome-wide identification, expression analyses of Wuschel-related homeobox (WOX) genes in *Brachypodium distachyon* and functional characterization of BdWOX12,” *Gene*, vol. 836, no. 146691, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.gene.2022.146691.

- [56] L. Tang, Y. He, B. Liu, Y. Xu, and G. Zhao, "Genome-Wide Identification and Characterization Analysis of WUSCHEL-Related Homeobox Family in Melon (*Cucumis melo* L.)," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 15, Aug. 2023, doi: 10.3390/ijms241512326.
- [57] M. Zhang *et al.*, "Identification of WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family members and determination of their expression profiles during somatic embryogenesis in *Phoebe bournei*," *Forestry Research*, vol. 3, no. 5, 2023, doi: 10.48130/FR-2023-0005.
- [58] J. Lv *et al.*, "Genome-wide identification of WOX family members in nine Rosaceae species and a functional analysis of MdWOX13-1 in drought resistance," *Plant Science*, vol. 328, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111564.
- [59] M. Rathour, A. Sharma, A. Kaur, and S. K. Upadhyay, "Genome-wide characterization and expression and co-expression analysis suggested diverse functions of WOX genes in bread wheat," *Heliyon*, vol. 6, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05762.
- [60] S. Sarkar Das, Y. Sandeep, S. Archita, G. Vibhav, K. S. Ananda, K. N. Asis, K. Prakash, M. Manoj, and S-M. Neeti, "Expression dynamics of miRNAs and their targets in seed germination conditions reveals miRNA-ta-siRNA crosstalk as regulator of seed germination." *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 1233.
- [61] S. Rasheed, K. Bashir, A. Matsui, M. Tanaka and M. Seki, "Transcriptomic analysis of soil-grown *Arabidopsis thaliana* roots and shoots in response to a drought stress," *Frontiers in plant science*, 7, p.180. 2016.