



**MELATONİN UYGULANAN FASULYE
GENOTİPLERİNDE KURAKLIK VE TUZ
STRESLERİ ALTINDA SABATH GEN AİLESİNİN
KARAKTERİZASYONU ve GENOM ÇAPLI ANALİZİ**

Ahmed Sidar AYGÖREN

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN**

**2021
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MELATONİN UYGULANAN FASULYE GENOTİPLERİNDE KURAKLIK VE
TUZ STRESLERİ ALTINDA SABATH GEN AİLESİNİN
KARAKTERİZASYONU VE GENOM ÇAPLI ANALİZİ**

Ahmed Sidar AYGÖREN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emre İLHAN

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2021

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

11 / 08 / 2021

Ahmed Sidar AYGÖREN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELATONİN UYGULANAN FASULYE GENOTİPLERİNDE KURAKLIK ve TUZ STRESLERİ ALTINDA SABATH GEN AİLESİNİN KARAKTERİZASYONU ve GENOM ÇAPLI ANALİZİ

Ahmed Sidar AYGÖREN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN

Fasulye günümüzde insan beslenmesinde doğrudan kullanılan bir baklagil bitkisidir. Bitkiler sesil organizmalar olmaları dolayısı ile yaşadıkları çevrede birtakım zorluklarla mücadele etmek zorundadır. Bitkilerin karşı kaldığı bu tür durumlara stres denilmektedir. Bitki yaşamında tuz ve kuraklık stresi bu stres koşullarından en önemli iki problemdir. Küresel iklim değişikliği göz önüne alındığında bu iki stres etmenine maruz kalan bitkilerde verimde azalmalar dolayısı ile bitkisel üretimde de azalmalar meydana gelmektedir. Çalışmanın amacı fasulye genotiplerinde kuraklık ve tuz stresi ve bu streslere karşı koruyucu olarak uygulanan melatoninin SABATH gen ailesi üyelerinin genom çaplı analizi ve gen ifade seviyelerinin belirlenmesi ve karakterize edilmesidir. Yapılan bu çalışmada çeşitli in siliko yöntemler kullanılması sonucunda fasulye genomunda 18 SABATH gen ailesi tespit edilmiştir. Bu gen ailesi 30,12 ile 42,73 kDa ağırlığına sahip olup, 268-387 arasında değişen aminoasitten oluşmuştur. *Pvul-SABATH* genleri arasında belirlenen ekzonların sayısı en düşük 3, en yüksek 4 olarak tespit edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda *Pvul-SABATH* gen ailesi 3 ana grupta kümelenemiştir. *Pvul-SABATH* genlerinin ifade seviyeleri farklı dokularda ifade edildiğini ve bitkinin abiyotik streslere karşı tepkide çeşitli fizyolojik roller alabildiklerini göstermiştir. Fasulye bitkisinde SABATH gen ailesi üyelerinin kromozomal lokasyonları, akraba genomlarla olan filogenetik ilişkileri, cis-acting element analizleri in siliko olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları tuz ve kuraklık koşulları altında fasulye bitkisinin ıslahına yardım edebilir.

2021, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: duplikasyon, filogenetik analiz, gen ifadesi, gen ontolojisi, protein-protein etkileşimi, qRT-PCR

ABSTRACT

MS. Thesis

GENOME WIDE ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF SABATH GENE FAMILY in *Phaseolus vulgaris* GENOTYPES SUBJECT TO MELATONIN under DROUGHT and SALINITY STRESSES

Ahmed Sidar AYGÖREN

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre İLHAN

Common bean is a legume plant used directly in human nutrition today. Since plants are sessile organisms, they have to struggle with a number of difficulties in their environment. These kinds of situations that the plants face are called stress. Salt and drought stresses are the two most important problems in plant life among these stress conditions. Considering the global climate change, decreases in plant yield due to these two stress factors are commonly observed. The aim of this study was to determine and characterize the genome-wide analysis and gene expression levels of the members of the SABATH gene family of drought and salt stress in common bean genotypes and melatonin applied as a protector against these stresses. Using various in silico methods, 18 SABATH gene families were identified in the common bean genome. The molecular weights of proteins involved in this family ranged from 30.12 kDa to 42.73 kDa and the predicted proteins varied from 268 to 387 amino acids. The lowest and the highest of the estimated number of exons for the *Pvul-SABATH* genes were 3 and 4, respectively. The result of phylogenetic analysis showed that *Pvul-SABATH* were clustered into 3 main groups. Expression levels of *Pvul-SABATH* genes were found to be increased in leaf tissues and these genes had function in a variety of physiological processes during plant response to abiotic stresses. In the common bean, phylogenetic relationships, cis-acting elements, and chromosomal locations of SABATH genes was identified using in silico analysis. The results of this study may help breeding of common bean under salt and drought stress conditions.

2021, 83 page

Keywords: duplication, gene expression, gene ontology, protein-protein interaction, phylogenetic analysis, qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca; tez çalışmalarımın her aşamasında gerek bilgi, birikim ve tecrübeleri ile gerekse akademik ve manevi açıdan sağladığı desteklerden ötürü değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN'a (Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik),

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a (Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Laboratuvar kullanımını nedeniyle Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne, arkadaşlarıma ve bilhassa edindiği bilgileri benimle paylaşan, desteğini ve yardımını benden hiç esirgemeyen değerli dostlarım Arş. Gör. Ayşe Gül KASAPOĞLU, Selman MUSLU, Ebru GÜNEŐ'e,

Tez çalışmamda maddi kaynak sağladığı için Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne,

Hayatım boyunca maddi ve manevi tüm destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ahmed Sidar AYGÖREN
Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi, Büyüme Koşulları, İyileştirici Ajan ve Stres Uygulamaları	15
3.2. Fasulye Genomunda SABATH Proteinlerinin Belirlenmesi	16
3.3. Pvul-SABATH Genlerinin Yapısı, Fiziksel Lokasyonları, Gen Duplikasyonları ve Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi	16
3.4. Filogenetik Analizler ve Dizi Hizalama.....	17
3.5. Fasulye ve Diğer Türler Arasında Karşılaştırmalı Haritalama	17
3.6. Fasulye SABATH Gen Ailesinin Hücre İçi Lokalizasyon ve Promotor Analizleri	17
3.7. Fasulyede SABATH Proteinlerinin Homoloji Modellemesi	18
3.8. Fasulye SABATH Protein-Protein Etkileşimleri ve Gen Ontoloji Analizi.....	18
3.9. İn Siliko Gen İfade Analizi	18
3.10. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	19
3.11. RNA Konsantrasyonlarının Tespit Edilmesi ve Agaroz Jel Elektroforezi	19
3.12. cDNA Sentezi.....	20
3.13. Kantitatif Real Time PCR Analizleri	20
3.14. Çalışmada Kullanılan Primerler	21
3.15. Verilerin Değerlendirilmesi	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	23
4.1. Fasulye Genomunda Tanımlanan SABATH Gen Ailesinin Özellikleri	23

4.2. <i>Pvul-SABATH</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı	25
4.3. <i>Pvul-SABATH</i> Gen Ailesinin Karşılaştırmalı Haritalaması	25
4.4. <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin Ekzon ve İntron Bölgeleri.....	26
4.5. <i>Pvul-SABATH</i> Proteinlerinin Türler Arası Filogenetik Analizi	27
4.6. <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin korunmuş dizi motifleri	28
4.7. Fasulye Genomunda Bulunan SABATH Genlerine Ait Duplikasyonlar.....	33
4.8. <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin Promotor Analizi.....	34
4.9. <i>Pvul-SABATH</i> Genlerinin Ontoloji Analizleri	37
4.10. Tanımlanan <i>Pvul-SABATH</i> Genlerinin Hücre İçi Lokalizasyonu.....	41
4.11. <i>Pvul-SABATH</i> Proteinlerinin Homoloji Modellemesi	42
4.12. <i>Pvul-SABATH</i> Protein-Protein Etkileşimleri.....	44
4.13. Fasulyede Tuz ve Kuraklık Stresi ile ilişkili SABATH Genlerinin İn Siliko İfade Analizi	44
4.14. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Analizleri	48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	73
EK-1 <i>Pvul-SABATH</i> gen ailesinin cis-acting elementlere ait protein dizileri	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°	Derece
C	Santigrat
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
cDNA	Komplementer DNA

Kısaltmalar

ABA	Absisik asit
BAMT	Benzoik Asit Karboksil Metiltransferaz
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GA	Giberellik asit
IAA	İnidol-3-asetik asit
JA	Jasmonik asit
M	Molar
M.Ö.	Millatan önce
mg	Miligram
mM	Milimolar
mRNA	Haberci RNA
O-MT	O-Metiltransferaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleikasit
SA	Salisilik asit
SABATH	S-adenosil-L-metiyonin bağımlı metiltransferaz
SAH	S-adenosil-L-homosistein
SAM	S-adenosil-L-metiyonin
SAMT	Salisilik Asit Karboksil Metiltransferaz
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Ülkemizde 2018 yılında tarımı yapılan fasulyenin illere göre ekim alanları, verim ve üretim miktarları.....	3
Şekil 4.1 Fasulye SABATH genlerinin kromozomal dağılımları (Benzer renkler segmental duplike genleri göstermektedir).....	25
Şekil 4.2 <i>Pvul-SABATH-Glycine max</i> karşılaştırmalı haritası.....	26
Şekil 4.3 Fasulye SABATH genlerinin ekzon ve intron bölgeleri.....	27
Şekil 4.4 On iki bitki türünden SABATH proteinlerinin filogenetik ağacı. Ağaç komşu katılım (NJ) metodu kullanılarak amino asit benzerliğine dayalı olarak çizildi.	28
Şekil 4.5.a <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin korunmuş dizi bölgeleri.....	30
Şekil 4.5.b <i>A. thaliana</i> ve <i>P. vulgaris</i> 'te SABATH proteinlerinin korunmuş bölge dizileri ve motifleri.....	31
Şekil 4.6 SABATH enzimi ontoloji analizi (Hücresel Bileşenler).....	38
Şekil 4.7 SABATH enzimi ontoloji analizi (Biyolojik süreçler).....	39
Şekil 4.8 SABATH enzimi ontoloji analizi (Moleküler fonksiyonlar).....	40
Şekil 4.9 <i>Pvul-SABATH</i> proteinlerinin 3 boyutlu yapı modellenmesi.....	43
Şekil 4.10 Tanımlanan SABATH proteinlerinin dahil oldukları biyolojik aktiviteler ...	45
Şekil 4.11 Tanımlanan SABATH proteinlerinin protein-protein etkileşimleri (PPI).....	47
Şekil 4.12 <i>Pvul-SABATH</i> in siliko ifade seviyeleri.....	48
Şekil 4.13 Elkoca yaprak tuz stresi qRT-PCR.....	49
Şekil 4.14 Serra tuz stresi qRT-PCR.....	50
Şekil 4.15 Elkoca kuraklık stresi qRT-PCR.....	51
Şekil 4.16 Serra kuraklık stresi qRT-PCR.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 qRT-PCR çalışmasında kullanılan primerler.....	22
Çizelge 4.2 <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin korunmuş motiflerinin özellikleri.....	32
Çizelge 4.3 <i>Pvul-SABATH</i> gen duplikasyonları.....	34
Çizelge 4.4 <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin promotor bölgeleri.....	35
Çizelge 4.5 <i>Pvul-SABATH</i> genlerinin hücre içi lokalizasyonu.....	41
Çizelge 4.6 SABATH proteinleri için Gen Ontolojisi (GO) terminolojisi, moleküler fonksiyon ve biyolojik yol terimleri.....	46



1. GİRİŞ

Bitkiler, insanların yaşamlarını devam ettirebilmek için ihtiyaçları olan gerekli enerjinin çoğunu karşılamaktadır. Protein ve kalori yetersizliği, gelişmekte olan ülkelerde en ciddi sorundur. Bu sorun gerekli olan bitkisel ve hayvansal proteinlere olan ihtiyacı önemli bir şekilde arttırmaktadır. Bitkisel protein fiyatlarının hayvansal protein fiyatlarına göre daha ucuz olması, gerekli olan protein ve kalori ihtiyacında insanların bitkisel proteinlere yönelmesine yol açmıştır. M.Ö 5000 yılından beri ekimi yapılan yemeklik tane baklagiller insanların diyetlerindeki en önemli unsurlardan biri olmuştur. Börülce, bezelye, bakla, nohut, mercimek ve kuru fasulyeyi içinde barındıran baklagiller; diğer bitkisel baklagillere nazaran düşük bitkisel yağ, yüksek protein ve daha yüksek oranda mineral ve vitamin içermektedir. İnsanlar, proteinlerin yapı taşı olan amino asitleri sentezleme yeteneğine sahip olmadığından sekiz amino asidi (izolösin, lösin, lizin, metiyonin, treonin, triptofan ve valin) içeren besinlerle günlük olarak mutlaka beslenmelidir (Şehirali 1988). Dünyada insan diyetindeki bitkisel proteinlerin %22'sinin, karbonhidratların %7'sinin, hayvan diyetindeki proteinlerin %38'inin ve karbonhidratların %5'inin yemeklik baklagillerden sağlandığı bilinmektedir (Wery and Grinac 1983). Ayrıca, baklagillerin sap ve samanlarındaki protein miktarı, tahıl tanelerinden yaklaşık iki kat daha fazla (ortalama olarak %20-25 oranında) (Pekşen ve Artık 2005; Güldüren 2012) miktarda olmasından dolayı hayvan besiciliğinde kaba yem ihtiyacının giderilmesinde ciddi bir öneme sahiptir.

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.); Fabaceae (baklagiller) familyası, *Phaseolus* cinsi içerisinde yer almaktadır. 40 takım içerisinde 640 cins ile bitkiler aleminin en büyük üçüncü ailesini baklagiller oluşturur (Büyük 2014). Dünyada fasulyenin yaklaşık 230 türü olduğu ve bunların 20 tanesinin insan beslenmesinde kullanıldığı bilinmektedir. *P. vulgaris* ise bunların içerisinde en fazla yetiştiriciliği yapılan tür olduğu bilinmektedir (Broughton 2003).

Dünyada tahıllardan sonra en geniş ekim alanı, üretim miktarına ve piyasa değerine (36,45 milyon ha alan, 61 milyon tonun üzerinde ürün ve 38,2 milyar dolarlık piyasa değeri) sahip kuru fasulye (*P. vulgaris*) yemeklik tane baklagil bitkisi olarak bilinmektedir. Ayrıca 86,14 kg/da verime sahiptir. Kuru fasulye; Amerika Birleşik

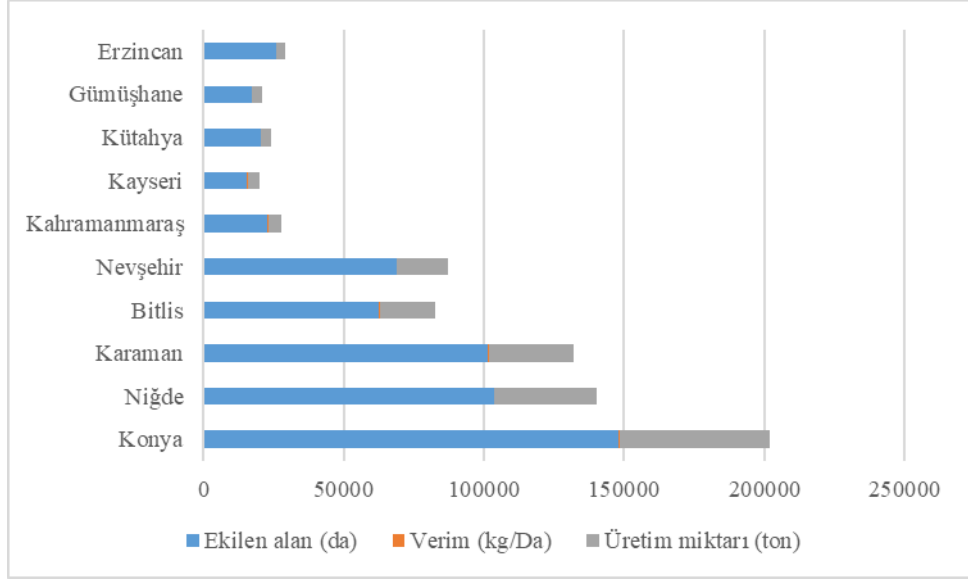
1. GİRİŞ

Devletleri, Avrupa, Orta Doğu, Çin ve Kanada gibi dünya geneline yayılmış en çok üretilen ürün olarak bilinmektedir. Türkiye’de ise kuru fasulye ekim alanları yaklaşık 89678 ha, 239000 ton üretim ve verimi 267 kg/da dolaylarındadır (FAO 2019). Yaygın bir şekilde kuru tane yanında taze sebze olarak da tüketilmektedir. Kuru fasulye genel olarak Latin Amerika’da geleneksel mutfak kültüründe yer almakta, Afrika’daki insanlar için temel yiyecek gıdası olarak ve Çin gibi büyük bir ülkede ise diğer baklagillere nazaran önemi pek bilinmese de ihracata yönelik ekimi ve üretimi çokça yapılmaktadır. Türkiye’de ise kuru fasulye için bu durum, mutfak kültüründe yer almasının yanı sıra ekonomik anlamda kırsal kesimlerde yaşayan insanlar için önemli bir geçim kaynağı olarak yer alır.

Ülkemizde 2018 yılında tarımı yapılan fasulyenin illere göre ekim alanları, verim ve üretim miktarları Şekil 1.1’de yer verilmiştir (TÜİK 2019). Ülkemizde neredeyse tüm bölgelerimizde yetiştirilmekte olan ve geniş bir varyasyon gösterip iyi adapte olan fasulye A, B1, B2 ve C vitaminleri bakımından zengindir. Vücutta biriken asidi nötralize edebilecek baz yoğunluğuna sahiptir. Fasulyenin vücutta hazmedilebilirlik oranı yaklaşık %84,1’dir. Ayrıca içinde barındırdığı phasol ve phaseolin maddelerinin diyabet ve şeker hastalığında kullanılan insülin özellikli olduğu ve bundan dolayı kandaki şeker oranının düşürülmesinde yardımcı olduğu bildirilmektedir (Keleş 2015).

Fasulyeler kök bakımında zayıf bir görünüme sahiptir. Köklerin büyümesi çiçeklenme evresine kadar hızlı bir şekilde artar, çiçeklenme evresinde yavaşlamaya başlar ve meyve oluşumunda ise bu büyüme duraklama evresine geçer. Kökler, çiçeklenme evresine yakın köklerde bulunan *Rhizobium* bakterilerinin oluşturmuş olduğu nodoziteler aracılığı ile havada bulunan azotu kullanmasında bitkiye yardımcı olur. Bunun yanı sıra toprakta bulunan besin maddelerini de gelişmiş kök sistemleri ile toprak yüzeyine çıkarır (Özkan 2018). Bu yüzden, sulanan tarım alanlarında ekim nöbetinde kullanılan en önemli bitkilerin başında fasulye gelmektedir (Graham and Vance 2003; Müller et al. 2015).

1. GİRİŞ



Şekil 1.1 Ülkemizde 2018 yılında tarımı yapılan fasulyenin illere göre ekim alanları, verim ve üretim miktarları

Metilasyon, S-adenosyl-L-methionine bağımlı metiltransferazlar (SAM-MT'ler) tarafından katalizlenir ve S-adenozil-L-metiyonin (SAM) metil grubunun karbon, azot, oksijen veya sülfür atomları transferine karışır ve S-adenozil-L-homosistein (SAH) ve metillenmiş ürünlerin oluşmasıyla DNA, RNA, proteinler veya küçük molekülleri modifiye eder (Attieh et al. 2002). Metilasyon, bakteriler, mantarlar, bitkiler ve memelilerde meydana gelen ve küçük molekül metabolitler ve doğal ürünler gibi çeşitli biyomoleküller üzerinde geniş çapta dağıtılmış bir kimyasal modifikasyondur (Chen et al. 2020).

Hidroksil ve karboksil bileşenlerinin enzimatik metilasyonu, protein X-ışını kristalografisi (Wang et al. 2017) ile tanımlanmış üç tipi olan O-metiltransferazlar (O-MT'ler) (Effmert et al. 2005) tarafından katalizlendiği tespit edilmiştir. Tip 1 O-MT'ler fenilpropanoid bazlı bileşiklerin hidroksil kısımlarının oksijen atomlarını metillediği gözlemlenmiştir (Noel et al. 2003). Tip 2 O-MT'ler koenzim A'nın fenilpropanoid esterlerine özgüdür ve lignin üreten tüm bitkilerde bulunur (Wang et al. 2017). Tip 3 O-MT'ler ise küçük moleküllerin karboksil gruplarını ve ayrıca teobromin ve kafein gibi bazı alkaloidlerin azot atomlarını özellikle metiller. İlk tanımlanan bu 3 gen topluca SABATH olarak isimlendirilir ve SABATH ismi SAMT (salisilik asit karboksil metiltransferaz) (Ross et al. 1999), BAMB (benzoik asit karboksil metiltransferaz) (Murphy et al. 2000) ve teobromin sentaz'ın (D'Auria et al. 2003) oluşumudur.

1. GİRİŞ

Metiltransferazların SABATH ailesi temel olarak bitkilerde bulunan küçük moleküllü bir metiltransferaz sınıfıdır. Karakterize edilmiş SABATH metiltransferazların çoğu, karboksilik asitlerin metilasyonunu katalizler (Zhao et al. 2012). İlk tanımlanan üç SABATH metiltransferaz dışında, bu gen ailesinin giderek daha fazla sayıda başka üyesi, farklı türlerde bulunmuştur. İlk olarak *Arabidopsis thaliana*'da jasmonik asit karboksil metiltransferaz (JMT) (Seo et al. 2001), indol-3-asetik asit karboksil metiltransferaz (IAMT) (Qin et al. 2005), farnesoik asit karboksil metiltransferaz (FAMT) (Yang et al. 2006) ve giberellik asit karboksil metiltransferaz (GAMT) (Varbanova et al. 2007) tanımlanmıştır. Daha sonra, tatlı fesleğen (*Ocimum basilicum*) içinde sinamat / p-kumarat karboksil metiltransferaz (CCMT) bulunmuştur (Kapteyn et al. 2007). *Catharanthus roseus* bitkisinde loganik asit metiltransferaz (LAMT) (Murata et al. 2008) ve *Zea mays* bitkisinde ise antranilik asit metiltransferaz (AAMT) (Köllner et al. 2010) tanımlanmıştır. Aynı zamanda karboksil metiltransferazlara ilaveten, SABATH ailesi, karboksil SABATH metiltransferazlarının homologu olan ve kafein biyosentezinde de rol oynayan bir dizi azot metiltransferazları da içerdiği belirtilmiştir. (Ogawa et al. 2000). Birincil enzimler, çay veya kahve bitkilerinden izole edilmiş 7-metilksantin metiltransferaz (MXMT), 3,7-metilksantin metiltransferaz (DXMT) ve ksantosin metiltransferaz (XMT) içerdiği tespit edilmiştir (Ogawa et al. 2001). Ayrıca araştırmacılar, *Physcomitrella patens* yosunundan PpSABATH 1'in bir SABATH metiltransferazının tiyollerin S-metilasyonunu katalize edebileceğini tespit etmişlerdir (Zhao et al. 2012).

Bu enzimlerin substratları, jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA), giberellik asit (GA) ve indol-3-asetik asit (IAA) gibi önemli bitki hormonları ve sinyal molekülleridir ve bunlar, bitki büyümesi ve gelişiminden çevre ile bitki etkileşimlerine kadar değişen çeşitli biyolojik süreçlerde kritik roller oynarlar (Zhao et al. 2009). Bitkilerde SABATH proteinleri için bileşenlerin ilk taramasında hızlı bir biyokimyasal kit kullanarak, bitkilerde var olduğu bilinen 59 potansiyel substrat tespit edilmiştir. (Yang et al. 2006). Dahası, SABATH'ın sonuçlanan reaksiyon ürünleri, genellikle bir bitkinin karakteristik kokusuna veya tadına katkıda bulunan ve onları insanlara, hayvanlara veya böceklere çekici kılan metil jasmonat, metil salisilat ve metil benzoat gibi metil esterlerdir. Ayrıca bu ürünlerin, kök büyümesi, tohum çimlenmesi, çiçek veya meyve gelişimi ve yaprak dökülmesi gibi çeşitli gelişim süreçlerinin düzenlenmesinde de rol oynadığı bulunmuştur (Wasternak et al. 2002; Ljung et al. 2002).

1. GİRİŞ

Bitkiler, büyüme ve gelişimi düzenlemek için biyosentez, konjugasyon / dekonjugasyon ve bozunma yoluyla hormonların, sinyal moleküllerinin ve metil esterlerin konsantrasyonunu ayarlama bu metiltransferazlara sahip çeşitli mekanizmaları kullanabildiği tespit edilmiştir (Ljung et al. 2002; Woodward et al. 2005). Örneğin, IAA-metiltransferaz (IAMT1), IAA homeostazını düzenleyerek bitki yaprağı gelişimine katılır (Wang et al. 2017).

SABATH metiltransferaz esas olarak bitki savunmasında işlev görür. Savunmacı bir role sahip olduğu gösterilen SAMT geninin ilki, abiyotik strese bir yanıt olarak doğrudan savunmaya katılan *Arabidopsis* BSMT1'dir. Daha sonra, *Oryza sativa*'nın OsBISAMT1'inin çeltikteki yara yanıtının yanı sıra hastalık direnci yanıtlarında da rol aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca SABATH'lar tarafından üretilen azot içeren bileşikler otçul böcekler için toksiktir; bu nedenle, birçok azot metiltransferazın bitki savunmasında da rolleri olabildiği tespit edilmiştir. Dahası, *O. basilicum*'da metil-p-kumaratin böcek öldürücü veya böcek caydırıcı olduğu kadar antifungal özelliklere de sahip olduğu gösterilmiş ve bu metiltransferazın böcek direnci ile ilgili olabildiği tespit edilmiştir. (Wang et al. 2017). Benzer şekilde, *Z. mays*'ta tanımlanan AAMT'ler dolaylı yollardan bitki savunmasında yer alabilecek metil antranilat için bitki savunma yanıtlarına bağlanabildiği belirtilmiştir. Ek olarak, Seo et al. (2001) yaptıkları çalışmada SABATH metiltransferazların diğer biyolojik fonksiyonlarını da keşfetmişlerdir. Örneğin *Arabidopsis* JMT, jasmonat tarafından düzenlenen bitki tepkileri için anahtar bir enzim olduğu ve mantarlara karşı bitki savunmasında rolü olduğu tespit edilmiştir. *Arabidopsis* GAMT'lerin tohum çimlenmesini düzenlediği Varbonova et al. (2007) tarafından gösterilmiştir. Beyaz ladinde (*Picea glauca*) tanımlanan PgIAMT1, muhtemelen IAA homeostazının modülasyonu yoluyla embriyogenezde rol oynayabildiği belirtilmiştir (Zhao et al. 2009). *P. patens* yosunundan izole edilen PpSABATH1, detoksifikasyonda ve ayrıca toksik tiyollere toleransta rol oynar (Zhao et al. 2012).

Küresel tarımsal üretimi kuraklık ve tuzluluk büyük ölçüde temel çevresel kısıtlamaları ile karşı karşıya olduğu bilinmektedir. Bu iki olumsuz çevresel baskı, dünyadaki ekilebilir arazilerin yüzde 10'dan fazlasını etkilemektedir (Bray et al. 2000). Kuraklık ve tuzluluk, tarımsal üretkenlikte ciddi düşüşe neden olarak küresel öneme sahip mahsullerde düzenli verimin %50'den fazla azalmasına neden olur. Bu nedenle, kültür

1. GİRİŞ

bitkilerinde kuraklık ve tuz toleransının iyileştirilmesi, ürün yetiştiriciliği için önemli bir hedeftir.

Toleransın doğasına ilişkin temel anlayış, kuraklık ve tuz toleransları için kültür bitkilerinin geliştirilmesinde temel şarttır. Bu streslere karşı bitki toleransı, olumsuz kuraklık ve tuzluluk sonuçlarının varlığında çok sayıda fizyolojik özellik ve birkaç metabolik işlemin birleştirilmesi ile elde edilebilir ve bu tolerans için atfedilen temel süreci belirlemede zorluklara yol açar (Flowers 2004).

Kuraklık veya tuz stresine maruz kalma, bitkilerde birçok yaygın reaksiyonu tetikler. Her iki streste hücrel dehidrasyona yol açar, bu da ozmotik strese ve sitoplazmadan suyun hücre dışı boşluğa çıkarılmasına neden olarak sitosolik ve vakuolar hacimlerin azalmasına neden olur. Diğer bir sonuç, reaktif oksijen türlerinin üretimidir, bu da daha sonra hücrel yapıları ve metabolizmayı olumsuz yönde etkiler. İyonik bileşenler dışında su ve tuz stresine verilen erken tepkiler genellikle aynıdır. Bu benzerlikler, örneğin fotosentezde azalma gibi metabolik süreçleri veya bitki hormonu ABA'nın yükselen seviyeleri gibi hormonal süreçleri içerir (Bartels and Sunkar 2005). Yüksek hücre içi sodyum ve klorür iyon konsantrasyonları, tuzluluk stresi için ek bir problemdir. Tuzluluk ve kuraklığa adaptasyon, şüphesiz, zayıflatılmış büyüme, genlerin aktivasyonu / artmış ekspresyonu veya indüksiyonu, ABA seviyelerinde geçici artışlar, uyumlu çözelti ve koruyucu proteinlerin birikimi, enerji tüketen yolların artan antioksidan seviyeleri ve baskılama gibi çeşitli değişiklikleri içeren karmaşık süreçlerden biridir. Ancak toleransı belirleyen anahtar süreçler ve ikincil takip süreçlerinin tanımlanmasında fikir birliğine varılamamıştır. Yüksek verimli DNA teknolojilerinin ilerlemesiyle, yüzden fazla stres kaynaklı veya yukarı regüle edilmiş gen tanımlanmıştır. *A. thaliana*'da stresle ilişkili genlerin fazlaca olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, yalnızca sınırlı sayıda gen ürününün işlevi bilinmektedir. Biyoteknolojik yaklaşımlarla kültür bitkilerinde stres toleransını iyileştirmek ve bu genlerin olası kullanımı için daha titiz çalışmalar ve saha çalışmaları gereklidir (Bartels and Sunkar 2005).

N-asetil-5-metoksitriptamin olarak da bilinen melatonin, hayvanlarda sirkadiyen ritim, cinsel davranış, yaşlılık, antioksidan aktiviteler ve antidepresan gibi birçok biyolojik aktivitede yer aldığı belirtilmiştir (Hardeland 2012; Pytka et al. 2017). Ek

1. GİRİŞ

olarak, farklı bitki türlerinde melatonin varlığı tespit edilmiştir (Arnao and Hernandez-Ruiz 2013, 2009a; Murch et al. 2009). Bitki büyümesi ve gelişiminde önemli bir modölatör olarak melatonin, klorofil korunmasında, fotosentez teşvikinde, kök sistemi mimarisini uyarımında ve rejenerasyonunda ve gecikmiş yaprak yaşlanmasında önemli roller oynadığı tespit edilmiştir (Arnao and Hernandez-Ruiz 2009b; Wang et al. 2012; Tan et al. 2012). Melatonin ayrıca bitkilerde tuz, kuraklık, soğuk ve yüksek sıcaklık gibi çoklu abiyotik streslere karşı koruma sağlar. Dikkat çekici bir şekilde, melatonin reaktif oksijen / azot türlerini (ROS / RNS) temizler, hücreleri, dokuları ve organizmaları oksidatif hasardan korur. Daha da önemlisi, melatonin ürün üretimini geliştirme potansiyeline sahiptir (Huangfu et al. 2020).

Bu tez çalışmanın amacı, fasulye genotiplerinde kuraklık ve tuz stresinin ve bu streslere karşı koruyucu olarak uygulanan melatoninin SABATH gen ailesi üyelerinin genom çaplı analizi ve gen ifade seviyelerinin belirlenmesi ve karakterize edilmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Metilasyon, bitkilerde sekonder metabolizmadaki en yaygın enzimatik modifikasyon olaylarından birisidir. Amino asitler, alkaloidler, fenilpropanoidler, şekerler, pürinler, steroller, tiyoller ve flavonoidler dahil olmak üzere bitkiye özel metabolitlerin neredeyse tüm sınıflarının metillenmiş olduğu bilinmektedir. Metil transferi en yaygın olarak C, N, S ya da O atomlarından meydana gelir.

S-adenozil-L-metiyonin (SAM) tarafından sağlanan metil grubuna bağlı olarak, O-metiltransferazlardan (O-MT'ler) (Attieh et al. 2002) biri özellikle salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve giberellik asit (GA) gibi küçük moleküllerin karboksil gruplarını ve ayrıca teobromin ve kafein gibi bazı alkaloidlerin azot atomlarını metilatlayabilir. Bu sebeple, bu aileye ait en erken tanımlanmış genler olan SAMT (salisilik asit karboksil metiltransferaz) (Ross et al. 1999), BAMT (benzoik asit karboksil metiltransferaz) (Murfitt et al. 2000) ve teobromin sentaz (D'Auria et al. 2003) temel alınarak topluca "SABATH" olarak adlandırılırlar.

O-metil eterler ve esterler, metillenmiş özel metabolitlerin en büyük sınıfını oluşturur. Örneğin, yapısal dokuları ve trake elementlerini güçlendirmede destek için kullanılan fenilpropanoid bir polimer olan ligninin ana bileşenleri, metillenmiş bileşikler fenoloik asit ve sinapik asit dahil olmak üzere hidroksile sinamik asitlerden türetilen alkollerden oluşur. (D'auria et al. 2003).

Birçok bitkide bulunan SABATH genlerinin ortaya çıkan reaksiyon ürünleri, bitki gelişiminin çeşitli süreçlerinde, bitki savunmasında ve birçok metabolik süreçte önemli bir rol oynar. SABATH genlerinin evrimsel ilişkisi daha önce analiz edilmiş olmasına karşın, evrimi etkileyen faktörler derinlemesine çalışılmamıştır (Wang et al. 2019).

Enzimler, hücrelerdeki kimyasal aktivite süresini azaltan biyoaktif bileşiklerdir. En büyük protein grubudur. Canlı organizmalarda benzer şartlara sebep olan benzer kimyasal sistemlere sahip enzimler izozimler olarak adlandırılır (Keha ve Küfrevioğlu 1993). İzozimi ilk tanımlayan Markert ve Moller (1959)'a göre, izozim aynı moleküler enzimdir ve farklı zamanlarda diğer organizmalar tarafından düzenlenir (Bilgen vd.

1995). Ayrıca Rodwell (1993), izozimlerin farklı doku türlerine ve benzer moleküllere benzeyen aynı tür reaktif türler olmadığını belirtmiştir (Taşpınar ve Tosun 2002).

Enzimatik metiltransferazlar için en yaygın olarak kullanılan metil donörü, kofaktör S-adenozil-L-metiyonin'dir. L-metiyonin üzerindeki metil parçası, bilinen başka bir metil donörü olan N⁵-metil tetrahidrofolat tarafından sağlanır. (Ravanel et al. 1998) Bugüne kadar bitkilerde SAM'a bağlı metilasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren çok sayıda enzim tanımlanmıştır ve bunların evrimsel ilişkilerini çözmeye çalışan yayınlanan birkaç rapor vardır. (Kagan and Clarke 1994; Joshi and Chiang 1998, Ibrahim et al. 1998) Yaklaşık 40 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip çok büyük bir monofiletik O-metiltransferazlar (OMT) grubu tanımlanmıştır. Bu gruptaki enzimler genelde küçük moleküllü O-MT (SMOMT) ailesi olarak adlandırılır. Bu aile içinde, dizi benzerliğinin derecesine dayalı olarak enzimlerin etki ettiği bileşiklerin türleri ile ilişkili olan birkaç alt aile karakterize edilmiştir (Gang et al. 2002; Schröder et al. 2002).

İkinci bir O-MT grubu, bilinen substratları hidrokstile sinnamik asitlerin (HCCoA'lar) CoA esterleri olan 23-27 kDa moleküler kütleli proteinlerden oluşur. (Ye et al. 1994; Maury et al. 1999; Boudet 2000; Day et al. 2001). Genellikle birbirleriyle %70-95 özdeşlik paylaşan bu enzimler, sıçan ve insandan alınan katekol O-MT'lerin N-terminal bölgesine de homologtur (Ibrahim and Muzak 2000). Bitki SMOMT'ları ile karşılaştırıldığında, HCCoA O-MT'ler, SAM bağlanmasında rol oynadığına inanılan SMOMT'lerde ortak olan küçük amino asit kalıntıları uzantıları içerir, ancak genel olarak iki OMT tipi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir benzerlik olmadığı görülmektedir. (Gang et al. 2002).

Üçüncü bir O-MT grubu, moleküler kütlesi yaklaşık 27 kDa olan protein karboksil MT'lerdir. (Kagan and Clarke 1994). Bu proteinler hemen hemen tüm organizmalarda bulunur ve hasarlı proteinleri onarmaya hizmet ederler. Bitkilerde, stres sırasında ve tohum canlılığında önemli oldukları gösterilmiştir (Mudgett et al. 1997; McDonald 1999; Thapar and Clarke 2000; Thapar et al. 2001) Dizileri, hayvan glisin N-metiltransferazları (NMT'ler) ve RNA / DNA MT'leri ile ilgilidir. Dahası, bitki proteini karboksil MT'leri, özel metabolizmada yer alan diğer bitki MT'leri ile hiçbir benzerlik göstermez. Bir metilester üretmek için Mg-protoporfirin 9'un bir karboksil fonksiyonelliğini metilleyen

2. KAYNAK ÖZETLERİ

enzim, dördüncü tip bitki O-MT'sini oluşturur. Olgun formu 31 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip olan bu kloroplastik protein, fotosentetik bakterilerde benzer işlevlere sahip MT'lerle ilgili olduğu, ancak diğer bitki OMT'leriyle yakından ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Block et al. 2002).

Şimdiye kadar karakterize edilen tüm SABATH proteinleri 357 ile 389 adet arasında amino asit içerir ve alt birimin moleküler kütlesi 40-49 kDa aralığında olduğu ve bu enzimlerin bazıları ile gerçekleştirilen boyut dışlama kromatografisi, doğal enzimlerin moleküler kütesinin, dimerik bir yapıya işaret eden kabaca 80 kDa olduğu tespit edilmiştir. Sitozolik lokalizasyon, bu enzimlerden ikisi, BAMT ve CaMXMT için deneysel olarak doğrulanmıştır (Ogawa et al. 2001; Kolosova et al. 2001).

A. thaliana ve çeltikte SABATH ailesi üyelerinin belirlenmesi yaklaşımına göre, çeltik veritabanını 24, *Arabidopsis* ve diğer 15 SABATH geninin amino asit sekansları ile blastanması sonucu çeltikte 27 SABATH geni olduğunu göstermiştir (Wang et al. 2019).

Salvia miltiorrhiza genom veri tabanında SABATH genlerinin 30 üyesini belirlenmiş, ayrıca tanımlanan SmSABATH genleri, gen yapısı analizleri, SABATH alan karakterizasyonu, filogenetik analizler, korunmuş motif tanımlama, pozitif seleksiyon analizleri, fonksiyonel açılım analizleri ve dokuya özgü ifade dahil olmak üzere kapsamlı bir yaklaşım kullanılarak karakterize edilmiştir. Dokuya özgü ifade, *S. miltiorrhiza*'daki SABATH gen ailesinin öncelikle gövde ve yapraklarda ifade edildiğini gösterilmiştir (Wang et al. 2017).

Ludwig et al. (2015) *Plasmodiophora brassicae*'nin, bitki sinyal molekülü olan salisilik asidin (SA) yanı sıra benzoik ve antranilik asitleri metile edebilen SABATH tipi bir metiltransferaza (PbBSMT) sahip olduğu bildirilmiştir.

Aoyama and Chua (1997) bir deksametazon indüklenbilir promotörün kontrolü altında PbBSMT genini ifade ederek transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin üretimini sağlamıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Qu et al. (2010) SABATH enzimlerinin, bitki sinyallemede, SA ve JA dahil olmak üzere metile edici substratlar, savunma mekanizmasında görev alan fitohormonlar ve büyümede yer alan en temel bitki oksin hormonu olan IAA gibi önemli roller oynadığını rapor edilmiştir.

Zhao et al. (2012) tohumlu bitkilerden elde edilen SABATH genleri ile PpSABATH'ler arasındaki önemli dizi benzerliği ve korunmuş gen yapısından dolayı, bitki SABATH genlerinin ortak bir evrimsel kökene sahip olduğu gösterilmiştir. Dört üye içeren *P. patens* genomundaki SABATH ailesinin boyutu, çiçekli bitkilerde bulunan SABATH ailesinin boyutundan çok daha küçük olduğu belirtilmiştir.

Zhang et al. (2019) *Conocephalum salebrosum*'da SABATH ailesinin, transkriptom analizine dayalı en az dokuz üyeye sahip olduğunu, bunların altısının tam uzunlukta olduğuna ve çalışmalarında karakterizasyon için seçilmesine karar verilmiştir. *C. salebrosum*'daki SABATH ailesi üyelerinin, *A. thaliana* ve çeltik gibi çiçekli bitkilerdeki SABATH ailesine benzer şekilde farklı substrat özelliklerine sahip olduğu açıklanmıştır.

Hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bir indolamin olan melatonin, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere verilen tepkileri etkileyen bir fitohormon olarak nitelendirilir. Bitkilerde melatonin, IAA ile benzer bir etkiye sahiptir ve IAA ve melatonin aynı biyosentetik öncü olan triptofana sahiptir. Tuz stresi, bitkilerde hızlı melatonin birikimine neden olur. Melatonin, bitkinin tuz stresine karşı direncini iki şekilde artırır: biri, reaktif oksijen türlerinin doğrudan temizlenmesi gibi direkt yol aracılığıyla; diğeri ise antioksidan enzim aktivitesini, fotosentetik etkinliği ve metabolit içeriğini artırarak ve stresle ilişkili transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek indirekt bir yol aracılığıyla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca melatonin, genlerin ifadesini etkileyerek bitkilerin büyüme ve gelişimini etkileyebilir. Ek olarak, melatonin ile ilişkili diğer öncüler ve metabolit molekülleri de bitkilerin tuz stresine toleransını artırabilir. Li et al. (2019), yaptıkları çalışmada melatoninin antioksidanlar, fotosentez, iyon regülasyonu ve stres sinyali üstündeki etkileri ile tuz stresindeki mekanizmaları araştırmışlardır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kuraklık stresi, bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerini olumsuz etkileyerek bitki verimliliğinde azalmaya neden olur. Bitkiler iç savunma sistemlerini aktive ederek kendilerini korumaya çalışırlar ancak şiddetli kuraklık bu savunma sisteminin işlevsiz kalmasına neden olur. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve atılması arasındaki dengesizlik oksidatif strese yol açar. Çok işlevli bir molekül olan melatonin, ROT temizleme verimliliğini artırarak bitkileri kuraklık stresinin olumsuz etkilerinden koruma potansiyeline sahiptir. Fotosentetik aparatın korunmasına ve kuraklığın neden olduğu oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olur. Melatonin, bitki süreçlerini moleküler düzeyde düzenler, bu da kuraklık stresine karşı daha iyi direnç sağlar. Sharma and Zheng (2019), kuraklık koşulları altında bitkilerde melatonin tarafından düzenlenen çeşitli fizyolojik ve moleküler yönleri ve bunların altında yatan mekanizmaları araştırmışlardır.

Bir indoleamin molekülü olan melatonin, bitkilerin büyüme, morfogenez, biyotik ve abiyotik streslere tepkisi sırasında çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenler. Kabiri et al. (2018) çalışmasında farklı kuraklık seviyelerinde (%100 (kontrol), %80, %60) yetiştirilen Moldovya melisa bitkilerinin (*Dracocephalum moldavica*) yapraklarında melatonin (0 (distile su), 50, 100 ve 150 μ M) eksojen uygulamasının etkisini incelemişlerdir. Sonuçlarında, 100 μ M melatonin ile muamele edilen bitkilerin en büyük yaprak yüzey alanı, yan dallanma, çiçek uzunluğu ve antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, guaiakol peroksidaz ve askorbat peroksidaz) aktivitelerini gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar ile 100 μ M melatoninin yapraktan uygulanmasının, orta ve şiddetli kuraklık stresinin yan etkilerini azaltmada 50 ve 150 μ M melatonin konsantrasyonlarından daha etkili olduğunu gösterilmiştir.

Kuraklık stresine karşı bitki toleransını iyileştirmede melatonin uygulamalarının işlevi olmakla birlikte özel rolü ve etkileri yeterince araştırılmamıştır. Sadak and Bakry (2020) iki adet keten çeşidinde (Letwania-9 ve Sakha-2) farklı konsantrasyonlarda (2,5, 5,0 ve 7,5 mM) melatonin ile muamelenin ardından bitki büyümesi, bazı biyokimyasal olayları ve normal koşullarda verim üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada kuraklık stresi, incelenen iki keten bitkisinin büyüme parametrelerini, fotosentetik pigmentlerini, üründe verimi önemli ölçüde azalttığı; fenolik içeriğini, toplam çözünür şekerlerini (TSS), prolin ve serbest amino asitleri önemli ölçüde arttırdığı

gözlemlenmiştir. 5,0 mM melatoninin yapraktan muamele edilmesi ile kullanılan bitkilerde en büyük yaprak büyümesini, verim miktarını ve kalitesini arttırdığına dair bulgular elde etmişlerdir. Yapılan bu melatonin uygulamasının, fotosentetik pigmenti, ozmoprotektanları ve antioksidan enzim sistemlerini güçlendirerek iki keten çeşidinin büyüme ve verimi üzerindeki kuraklık stresinin olumsuz etkisini iyileştirdiği ve azalttığı sonucuna varmışlardır.

Çeltikte melatonin ile ilgili genlerin transkripsiyonel profili büyük ölçüde bilinmemektedir. Wei et al. (2016) yaptıkları çalışmada, farklı uygulamalara yanıt olarak çeltikte farklı periyotlarda ve dokularda melatonin ile ilgili 11 genin ifade paternlerini belirlenmiş, mikroarray verilerini kullanarak sentetik olarak analiz etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda, melatonin ile ilişkili genlerin çeltik gelişim aşamalarında önemli ve ikili roller oynayabileceğini bildirmişlerdir. Çeltik melatonin ile ilgili genlerin ABA, JA, çeşitli abiyotik stresler ve patojen enfeksiyonu tarafından yaygın olarak düzenlenmesini vurgulayarak, bu genlerin çoklu stres tepkilerinde ve bitki hormonlarının altında yatan çapraz karışıklıklar özellikle ABA ve JA üzerindeki olası rolünü göstermiştir. Wei et al. (2016) yapılan bu çalışmada çeltikte melatonin biyosentezi ve katabolik yol, bitki gelişimi ve stres tepkileri arasındaki ilişki hakkında raporlar sunulmuştur.

Ahmad et al. (2019) yapılan çalışmada, melatoninin fotosentetik özelliklerdeki koruyucu rolünü ve kuraklık stresi altındaki mısır fidelerinin antioksidan savunma sistemini araştırmışlardır. Mısır fideleri, iki haftalık fide çıkışından sonra kuraklık stresine (%40-45 FC), ardından yapraktan (0, 25, 50, 75, 100 μ M) ve toprağa spreyle uygulanan melatonine (0, 25, 50, 75, 100 μ M) maruz bırakılmıştır. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlar doğrultusunda, kuraklık stresinin mısır fidesini olumsuz etkilediğini ve bitki büyümesini ve gelişmesini, biyokütle birikimini, klorofil ve karotenoid içeriğini ve fotosentetik hızı ve stoma iletkenliğini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Öte yandan, kuraklık stresi altında reaktif oksijen türleri, çözünür protein ve prolin içeriğinin de arttığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, eksojen melatonin uygulaması, kuraklık stresi altında çeşitli antioksidan enzimlerin aktivasyonu yoluyla hasarlardan koruyarak reaktif oksijen türlerinin birikimini azaltmış ve fotosentetik aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Mevcut bulgular, bitki büyümesini sürdürerek, antioksidan enzimlerin fotosentetik

özelliklerini ve aktivitelerini geliştirerek kuraklık stresi için melatonin uygulamasının bu stresi azaltıcı yönde potansiyeli olduğu doğrulanmıştır.

Aguilera et al. (2014) yapılan çalışmada, mercimek (*Lens culinaris* L.) ve yeşil fasulyede (*P. vulgaris*) çimlenme sırasında (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık vs. 24 saat karanlık) iki farklı aydınlatma koşulunun melatonin ve fenolik içeriği üzerindeki etkilerinin yanı sıra bileşiklerin antioksidan aktivite etkilerini incelemişlerdir. Çimlenme melatonin içeriğinde nispi artışa ve önemli antioksidan aktiviteye yol açarken fenolik bileşiklerin içeriği azaldığı görülmüştür. En yüksek melatonin içeriği, her iki baklagil için 24 saat karanlıkta 6 gün çimlenmeden sonra elde edilmiştir. İyileştirilmiş melatonin seviyelerine sahip bu çimlenmiş baklagil tohumları, serbest radikallere karşı koruyucu bir rol oynayabildiği ve böylece melatoninin güçlü antioksidan aktivitesi göz önüne alındığında, bu filizlerin doğrudan gıda olarak tüketilebilir ve diyet yoluyla kronik hastalıklarla mücadelede koruyucu gıda stratejileri olarak sunulabileceğini açıklamışlardır.

ElSayed et al. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada yeşil fasulye fidelerine 150 µM melatonin (MT) ve 200 mM NaCl muamele etmişlerdir. Çalışmada tuz stresi daha düşük klorofil içeriğine, azalmış fotosentetik aktiviteye, artan reaktif oksijen türleri (ROT) içeriğine ve azalmış fotosistem II (PSII) aktivitesine yol açtığını gözlemlenmiş. Tuz stresi altında yeşil fasulye fidelerine eksojen MT uygulanması, fotosentetik aktiviteyi iyileştirdiğini ve antioksidan enzimlerinin aktivitesini artırarak oksidatif hasarları hafiflettiği görülmüştür. Katalaz (CAT1), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (Cu/ZnSOD1), askorbat peroksidaz (APX), Peroksiredoksin Q (PrxQ) ve 2-sistein peroksiredoksin (2-Cys-Prx) kodlayan genlerin ifadesi, yeşil fasulye fidesinde tuz stresi ile muamele edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, eksojen MT ve NaCl ile muamele edilen bitkiler, tek başına NaCl stresine kıyasla sırasıyla %28,8, 21,1, 26,1, 20, 26,2 ve 22,4 daha yüksek Cu/ZnSOD, CAT1, APX, GR, PrxQ ve 2-Cys-Prx transkript seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, NaCl stresinin azaltılmasında eksojen MT uygulamasının aracılık ettiği koruyucu mekanizmaları ortaya koyduğu ve elde edilen bulguların, tuzluluğa eğilimli topraklarda yeşil fasulye yetiştiriciliğinin önünün açılmasında önemli rol alabileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi, Büyüme Koşulları, İyileştirici Ajan ve Stres Uygulamaları

Serra ve Elkoca ticari fasulye çeşitleri bitki materyali olarak çalışmada kullanılmış olup Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden elde edilmiştir. Genotiplere ait tohumlar 5 dakika süreyle %1'lik NaOCl içeren çözeltide yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Ardından tohumlar ön çimlendirme işlemi için perlit içeren saksılara 100'er adet gelecek şekilde ekilerek saf su ile sulanmıştır. Çimlenen tohumlar içerisinde benzer büyüklüğe sahip olan fideler alınarak 200 mL modifiye 1/10 Hoagland çözeltisi içeren saksılarda hidroponik olarak yetiştirilmiştir. Hoagland çözeltisi 2mM Ca, 10^{-6} M Mn, 4mM NO₃, $2 \cdot 10^{-7}$ M Cu, 1mM Mg, 10^{-8} M NH₄, 2mM K, 10^{-6} M Zn, 0,2 mM P, 10^{-4} M Fe ve 10^{-6} M B final konsantrasyonları olacak şekilde makro besin elementleri (K₂SO₄, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, Ca(NO₃)₂.4H₂O ve KCl) ve mikro besin elementleri (H₃BO₃, MnSO₄, CuSO₄.5H₂O, NH₄Mo, ZnSO₄.7H₂O) içermektedir. Fasulye fideleri %70 nem içeren, 25°C sıcaklıkta 250 mmol 16/8 saat ışık taksimli fotoperiyotta bitki büyüme odasında kontrollü koşullarda ilk üç yapraklı döneme kadar bekletilmiştir. İlk üç yapraklı döneme erişen fidelere tuz ve kuraklık stresi uygulanmadan 24 saat önce 0 (kontrol; saf su) ve 200 µM konsantrasyonunda melatonin yapraktan sprey şeklinde uygulanmıştır. 24 saat sonunda 0 (kontrol) ve 150 mM NaCl içeren Hoagland çözeltisi uygulanmıştır. Tuz stresinin iyon etkisinin değerlendirmek için uygulamanın 9. gününde fasulye genotiplerinden yaprak dokusu alınmıştır. Kuraklık stresi ise benzer koşullarda yetiştirilen fasulye genotiplerine 0 (kontrol) ve %30 PEG6000 içerecek şekilde Hoagland çözeltisinde 24 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda fasulye genotiplerinden yaprak dokusu sıvı azot içerisine alınarak çalışma yapılıncaya kadar -80°C'de bekletilmiştir. Çalışmada kullanılacak fasulye genotipleri 3 tekerrürlü olarak ekilmiş olup qRT-PCR analizleride 3 biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Fasulye Genomunda SABATH Proteinlerinin Belirlenmesi

Fasulye genomundaki SABATH gen ailesinin protein dizileri Pfam veritabanından elde edilen Pfam Erişim Numarası (PF03492) kullanılarak Phytozome v12.1 veritabanı (Anonymous 2021a)'dan elde edilmiştir. Fasulye genomundaki (Schmutz et al. 2014) tüm muhtemel SABATH proteinlerini belirlemek için hem Phytozome v12.1 veritabanındaki blastp hem de gizli Markov model (HMM) (Anonymous 2021b) araması varsayılan parametrelerle *P. vulgaris* genomunda taranmıştır. İlişkili olmayan diziler “decrease redundancy aracı” (Anonymous 2021c) kullanılarak elde edilmiştir. İlişkili dizilerdeki SABATH domaininin varlığı HMMER (Anonymous 2021d) veritabanı kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen SABATH proteinlerinin moleküler ağırlığı ve teorik izoelektrik noktası (pI) “ProtParam aracı” (Anonymous 2021e) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3 Pvul-SABATH Genlerinin Yapısı, Fiziksel Lokasyonları, Gen Duplikasyonları ve Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi

Pvul-SABATH proteinlerinin ekzon-intron bölgeleri hakkında bilgi edinmek için, Gene Structure Display Server v2.0 kullanılmıştır (Guo et al. 2007). Hem genom dizileri hem de kodlanan DNA (CDS) dizileri *Pvul-SABATH* genlerinin pozisyon bilgisini tahmin etmede kullanılmıştır. Phytozome veritabanı v12.1 kullanılarak, *Pvul-SABATH* genlerinin kromozomal lokasyonları ve büyüklükleri belirlenmiştir.

Pvul-SABATH genleri tüm *P. vulgaris* kromozomlarına işaretlenmiş ve MapChart programı ile çizilmiştir (Voorrips 2002). Gen duplikasyon olayları “Plant Genome Duplication Veritabanı” (PGDD) sağlayıcısı (Anonymous 2018a) kullanılarak belirlenmiştir. *Pvul-SABATH* genlerinin duplike çiftleri arasındaki homolog özellikte olmayanlar için (K_a), homolog özellikte olanlar (K_s) ve homolog olmayanın homolog olana bölümünü ifade eden (K_a/K_s) değişim oranları PAL2NAL (Suyama et al. 2006) programı kullanılarak PAML arayüz aracında (Yang 2007) hesaplanmıştır. Duplikasyon olaylarının kabaca zamanı, $8,46 \times 10^{-9}$ 'luk fasulyedeki homolog yer değiştirme oranları (λ) cinsinden $T = K_s / 2\lambda \times 10^{-6}$ M.Ö (milyon yıl önce) kullanılarak belirlenmiştir (Schmutz et al. 2014).

Pvul-SABATH proteinlerinin ilave korunmuş motiflerini belirlemek için, “Multiple EM for Motif Elicitation (MEME) Aracı” kullanılmıştır (Bailey et al. 2006). Minimum/maksimum genişlik ve motiflerin maksimum sayısı için sınırlar sırasıyla 2, 50 ve 10 olarak ayarlanmıştır. Motif bölgeleri 2 ile 300 arasındadır. Bölge dağılımı tekrarların herhangi bir sayısı olarak ayarlanmıştır. Belirlenen motifler InterPro veritabanının varsayılan ayarları kullanılarak taranmıştır (Quevillon et al. 2005). Ayrıca korunmuş bölge dizi analizleri için SABATH domainlerinin dizi logo analizleri WEBLOGO online web aracı kullanılarak çizilmiştir (Crooks et al. 2004).

3.4 Filogenetik Analizler ve Dizi Hizalama

Filogenetik Analizler, 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile Neighbor-joining (NJ) metoduna göre yapılmıştır. *Pvul-SABATH* protein dizileri ClustalW kullanılarak hizalanmıştır (Thompson et al. 1997). MEGA v7 programı kullanılarak filogenetik ağaç elde edilmiştir (Tamura et al. 2011). Ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) arayüzü kullanılarak şekillendirilmiştir (Letunic and Bork 2011).

3.5 Fasulye ve Diğer Türler Arasında Karşılaştırmalı Haritalama

Sinteni, yani gen bloklarının veya evrimsel olarak korunmuş diğer belirteçlerin tanımlanması ve kromozomal yeniden düzenlemeler açısından genomlar arasındaki evrimsel ilişkinin nicelendirilmesi, karşılaştırmalı genomikteki temel hedeflerden biridir (Sinha and Meller 2007). *P. vulgaris* ile *Glycine max*'ta bulunan *SABATH* genlerinin sinteni haritası MapChart veritabanı kullanılarak çizilmiştir.

3.6 Fasulye SABATH Gen Ailesinin Hücre İçi Lokalizasyon ve Promotor Analizleri

Fasulye SABATH gen ailesi üyelerinin her bir genine ait yaklaşık 2 kb'lık DNA parçasını içeren 5' üst akış bölgesi PlantCARE (Anonymous 2021f) veritabanı kullanılarak cis acting element analizi yapılmıştır. Hücre içi lokalizasyonları ise WoLF PSORT (Horton et al. 2007) kullanılarak tahmin edilmiştir.

3.7 Fasulyede SABATH Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Daha önceden tespit edilen SABATH protein dizileri kullanılarak proteinlerin homoloji modellemesine Phyre² veri tabanı yardımı ile 3 boyutlu yapılarına ulaşılmıştır (Kelley et al. 2015). Protein modellerinin güvenilirlik oranları değerlendirilerek en iyi 3 boyutlu görüntü alınmıştır.

3.8 Fasulye SABATH Protein-Protein Etkileşimleri ve Gen Ontoloji Analizi

Protein-protein etkileşimlerinin (PPI) hücrenin kontrolü, metabolik gelişimi ve hücreler arası iletişim gibi birçok biyolojik süreçleri temsil eder (Braun and Gingras 2012). Protein-protein etkileşimlerinin fiziksel ve fonksiyonel etkileşimlerinin belirlenmesi için STRING (Anonymous 2021g) veritabanı kullanılmıştır. Alınan veriler sınıflandırılmış ve tüm protein-protein etkileşimleri için güven skoru ile bütünleştirilmiştir. Bitki biyoteknoloji araştırmalarında fonksiyonel genomik yaklaşımlarının kullanılması, yeni dizi verilerinin fonksiyonel açıklaması konusunda önemli bir gerekliliktir. Bu bağlamda Blast2GO programı, özellikle model olmayan türlerde bu yaklaşımlara faydalı olacak şekilde geliştirilmiştir (Conesa and Götz 2008). *Pvul-SABATH* genlerine ait ontoloji verileri Blast2GO programı kullanılarak *Pvul-SABATH* proteinlerinin fonksiyonel bilgilerine erişilmiştir.

3.9 İn Siliko Gen İfade Analizi

Fasulye SABATH genlerinin ifade profillerini incelemek için Illumina RNA-seq verileri, NCBI veri tabanındaki Sequence Read Archive (SRA) adlı veri kütüphanesinden elde edilmiştir. İlgili RNA-seq verilerini bulmak için tuz ve kuraklık stresi erişim numaraları tespit edilmiştir. SRR957668 (tuz stresiyle muamele edilmiş yaprak), SRR958469 (yaprak tuz kontrol) (Hiz et al. 2014), SRR8284481 (kuraklık stresiyle muamele edilmiş yaprak) ve SRR8284480 (yaprak kuraklık kontrol) (Anonymous 2021h) erişim numaraları kullanılmıştır. Gen ifade değerlerini normalleştirmek için bir milyon eşlenmiş okuma başına ekzon modelinin kilobaz başına okuma (RPKM) algoritması kullanılmıştır (Mortazavi et al. 2008). RPKM değerleri log₂'ye dönüştürülüp CIMMiner (Anonymous 2021i) algoritması ile heatmap haritası temin edilmiştir.

3.10 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

TRIZol® reagent (Invitrogen Life Technologies, ABD) kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamaları aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

1. Daha önce havanda öğütülen örnekler 50 – 100 mg doku gelecek şekilde eppendorf tüplerine tartılarak alınmıştır.
2. Denatürasyon solüsyonundan eppendorf tüplerine 0,5 mL bırakılmıştır.
3. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 0,5 mL ekstraksiyon solüsyonu eklenerek hızlı bir şekilde 15 sn elle çalkalanmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
5. 12000g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
6. En üstteki faz temiz bir eppendorf tüpe alınmıştır.
7. RNA'yı çöktürmek için 0,5 mL izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. 12000g'de 4°C'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA peletine 1 mL %75 EtOH eklenerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır.
10. 7500g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
11. EtOH uzaklaştırılmış ve 5 dakika hava kurutması yapılmıştır.
12. RNA peleti 100 µl DEPC muameleli su ile çözdürülmüştür.
13. Solüsyon 10 – 15 dakika 55°C'de bekletilmiştir.
14. A_{260/280} O.D. değerinde RNA örnekleri 1,6 – 1,9 değerlerine sahip olmuştur.

3.11 RNA Konsantrasyonlarının Tespit Edilmesi ve Agaroz Jel Elektrofrez

Total RNA konsantrasyonları Nanodrop'da ölçümleri yapılarak A_{260/280} O.D. değerindeki veriler alınmıştır. %1,2'lik agaroz jel hazırlanmış 10 mg/mL konsantrasyonundan 3 µl etidyum bromid (EtBr) eklenmiş, 3 µl yükleme boyası, 6X loading dye, 3 µl RNA örneği 80-100 voltta, 40 dk boyunca yürütülmüştür. Jel UV-Transilimünatör'de gözlemlenmiştir.

3.12 cDNA Sentezi

Ölçümleri yapılan toplam RNA'lar eşitlenerek SensiFAST™ cDNA sentez kitinin (BIO-65053) talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

1. Buz üzerinde master karışımı hazırlanmıştır.

Toplam RNA veya mRNA (1 µg'a kadar)	---µL
5x TransAmp Buffer	4 µL
Reverse Transkriptaz	1 µL
DNase/RNase free su	----
Toplam	20 µL

2. Kullanmadan önce solüsyonlar vortekslenip santrifüj edilmiştir.
3. Pipet yardımıyla hassas bir şekilde karıştırılmıştır.
4. PCR cihazında aşağıdaki program ayarlanmıştır.
 - 25°C'de 10 dakika primer bağlanma
 - 42°C'de 15 reverse transkripsiyon
 - 85°C'de 5 dakika inaktivasyon
 - 4°C'de veya buz üzerine alınır.
5. -20°C'de saklanmıştır.

3.13 Kantitatif Real Time PCR Analizleri

Pvul-SABATH gen ailesi üyelerine ait spesifik primerler dizayn edilerek qRT-PCR deneyleri ile ölçülmüştür. Deneyler aşağıdaki protokol doğrultusunda yapılmıştır. Gerekli görüldüğü durumlarda bağlanma sıcaklıkları ve döngü sayılarında değişiklikler yapılmıştır. qRT-PCR deneyi gerçek zamanlı qPCR sistemi olan (RotorGene Real-Time PCR System) Thermo firmasının 2X'lik Fast SYBR® Green Master Mix kullanarak yapılmıştır. Deney üreticinin yönlendirmelerine göre yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tüm qRT-PCR örnekleri 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. qRT-PCR analizinde, 1:10 oranında seyreltilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon sıcaklık döngüsüne ait program aşağıda verilmiştir.

Real-Time PCR reaksiyon bileşenleri

Total Mix	12.5 µl
İleri primer (10 µM)	0.2 µl
Geri primer (10 µM)	0.2 µl
ROX	0.1 µl
Ultra pure water	8.0 µl
<u>cDNA [1:10]</u>	<u>2.0 µl</u>

Son Hacim 25 µl

Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
Hot Start	95	10 dk
Denatürasyon	95	15 sn
Bağlanma	58-63	30 sn
Uzama	72	30 sn
Melt	65°C'den 94°C'ye	3 sn/her bir sıcaklık

40 döngü

3.14 Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.1'de verilmiştir. İlgili genlere ait transkript sekansı kullanılarak Integrated DNA Technologies (IDT) Primer Quest Araç kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Housekeeping gen olarak fasulye bitkisine ait aktin geni (Büyük and Aras 2017) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 qRT-PCR çalışmasında kullanılan primerler

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer
<i>Pvul-SABATH-6</i>	TGCATTTTGCCACTCCTCT	TGGGCTTGTTCTACCTAGGT
<i>Pvul-SABATH-9</i>	TGCATTTTGCCACTCCTCT	GGTCATAGTAAGCTCTCACAACA
<i>Pvul-SABATH-13</i>	TCATTCCTCCAACAGTCTACACT	AAGCTTTGTGTACCTCAGGAG
<i>Pvul-SABATH-15</i>	TTCCCGACCAATCCATGCA	TGGGCTCGTGTGTGGAAGT
<i>Pvul-SABATH-16</i>	GCAACACCCGGAAACTTCTA	ATGTTGGTCGAAGTTGGTGC
<i>Pvul-SABATH-17</i>	TCCTCCTACAGTCTGCATTGG	TGAAGCAGGGTTGGCACTTT
<i>Pvul-SABATH-18</i>	TCCTCCTACAGTCTGCATTGG	CTGAAGGAGGGTTGGCACTT
ACT (Actin)	TGAGCAAGGAGATTACAGCATTGG	CATACTCTGCCTTCGCAATCCAC

3.15 Verilerin Değerlendirilmesi

Kuraklık ve tuz stresi uygulanmış bitkilerde SABATH genlerine ait ifade profilleri ve kontrol profilleri ACT ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) metoduna göre ve kontrol ile uygulamalar arasındaki fark One Way ANOVA (Dunnett) ile analiz edilmiştir (Dunnett 1955).

Normalizasyon işlemi, ct değerleri ve housekeeping olarak kullanılan ACT gen ifade verileri ile yapılmıştır. Bu verilere ait istatistiksel anlamlılık dereceleri, ortalamaları, standart sapma Graphpad Prizm 8 ile yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Fasulye Genomunda Tanımlanan SABATH Gen Ailesinin Özellikleri

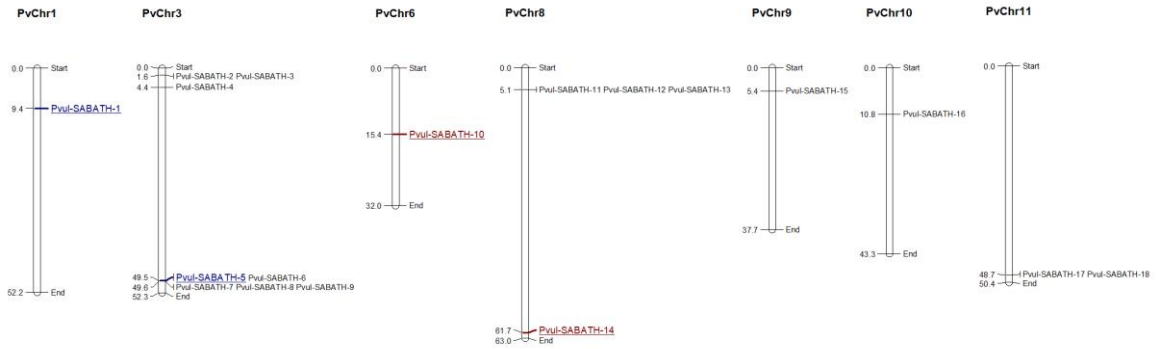
Gerçekleştirilen analizler sonucunda fasulye genomunda 18 adet SABATH geni olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan SABATH genleri *Pvul-SABATH-1*, *Pvul-SABATH-2*, *Pvul-SABATH-3*, *Pvul-SABATH-4*, *Pvul-SABATH-5*, *Pvul-SABATH-6*, *Pvul-SABATH-7*, *Pvul-SABATH-8*, *Pvul-SABATH-9*, *Pvul-SABATH-10*, *Pvul-SABATH-11*, *Pvul-SABATH-12*, *Pvul-SABATH-13*, *Pvul-SABATH-14*, *Pvul-SABATH-15*, *Pvul-SABATH-16*, *Pvul-SABATH-17*, *Pvul-SABATH-18* olarak adlandırılmıŐtır. *Pvul-SABATH* genlerine ilişkin hangi kromozomda bulunduğu, başlangıç ve bitiŐ noktaları, protein uzunlukları, izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, kararsızlık indeksleri ve NCBI erişim numaraları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre SABATH proteinleri 268–387 adet amino asit uzunluğunda ve moleküler ağırlıkları 30,18–42,73 kDa arasında değişim göstermektedir. Ayrıca tanımlanan SABATH genlerinden *Pvul-SABATH-15*, *Pvul-SABATH-17*, *Pvul-SABATH-18* hariç diğer tüm genlerinin kararsız yapıda olduğu görülmüştür ve kararsızlık indekslerinin ise 35,54 ile 59,42 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 *Phaseolus vulgaris* L. SABATH protein kataloğu

Gen Adı	Phyzyome ID	Kromozom No	Kromozom Lokasyonu	AA uzunluğu	Molekül Ağırlığı (kDa)	pI	Kararsızlık İndeksi	Stabilite Durumu	NCBI Erişim No
Pvul-SABATH-1	Phvul.001G012300.1	1	937849..941738 ileri	379	42,65	5,73	46,55	Stabil değil	XP_007160730.1
Pvul-SABATH-2	Phvul.003G016400.1	3	1615483..1619083 ileri	360	40,67	6,08	44,82	Stabil değil	XP_007153211.1
Pvul-SABATH-3	Phvul.003G016500.1	3	1621613..1624475 ileri	371	41,94	6,08	43,11	Stabil değil	XP_007153212.1
Pvul-SABATH-4	Phvul.003G039900.1	3	4413467..4416422 ileri	361	41,25	6,02	51,69	Stabil değil	XP_007153488.1
Pvul-SABATH-5	Phvul.003G255801.1	3	49509886..49511742 ileri	368	41,47	5,08	44,44	Stabil değil	XP_007156070.1
Pvul-SABATH-6	Phvul.003G255900.1	3	49533593..49535597 ileri	368	41,62	5,09	44,85	Stabil değil	XP_007156071.1
Pvul-SABATH-7	Phvul.003G256000.1	3	49555692..49558147 ileri	363	41,14	5,38	51,71	Stabil değil	XP_007156072.1
Pvul-SABATH-8	Phvul.003G256100.1	3	49565969..49567868 ileri	359	40,50	4,95	40,76	Stabil değil	XP_007156073.1
Pvul-SABATH-9	Phvul.003G256300.1	3	49581233..49583149 ileri	356	40,24	5,12	43,82	Stabil değil	XP_007156076.1
Pvul-SABATH-10	Phvul.006G048600.1	6	15356660..15360717 geri	383	41,99	5,76	47,57	Stabil değil	XP_007146531.1
Pvul-SABATH-11	Phvul.008G057600.1	8	5118910..5120684 geri	371	42,00	5,32	51,15	Stabil değil	XP_007139770.1
Pvul-SABATH-12	Phvul.008G057700.1	8	5123945..5128251 geri	360	41,09	5,25	45,68	Stabil değil	XP_007139771.1
Pvul-SABATH-13	Phvul.008G057800.1	8	5144650..5146192 geri	360	40,63	5,92	59,42	Stabil değil	XP_007139773.1
Pvul-SABATH-14	Phvul.008G272800.1	8	61669425..61673954 geri	387	42,73	5,49	45,62	Stabil değil	XP_007142346.1
Pvul-SABATH-15	Phvul.009G022200.1	9	5373057..5374864 ileri	368	41,20	5,17	35,54	Stabil	XP_007136149.1
Pvul-SABATH-16	Phvul.010G062100.3	10	10780983..10795345 geri	319	36,15	5,42	40,87	Stabil değil	XP_007134618.1
Pvul-SABATH-17	Phvul.011G176100.1	11	48681993..48685600 geri	268	30,18	5,05	39,08	Stabil	XP_007133406.1
Pvul-SABATH-18	Phvul.011G176200.1	11	48689570..48691136 geri	368	41,86	5,38	38,82	Stabil	XP_007133407.1

4.2 *Pvul-SABATH* Genlerinin Kromozomal Dağılımı

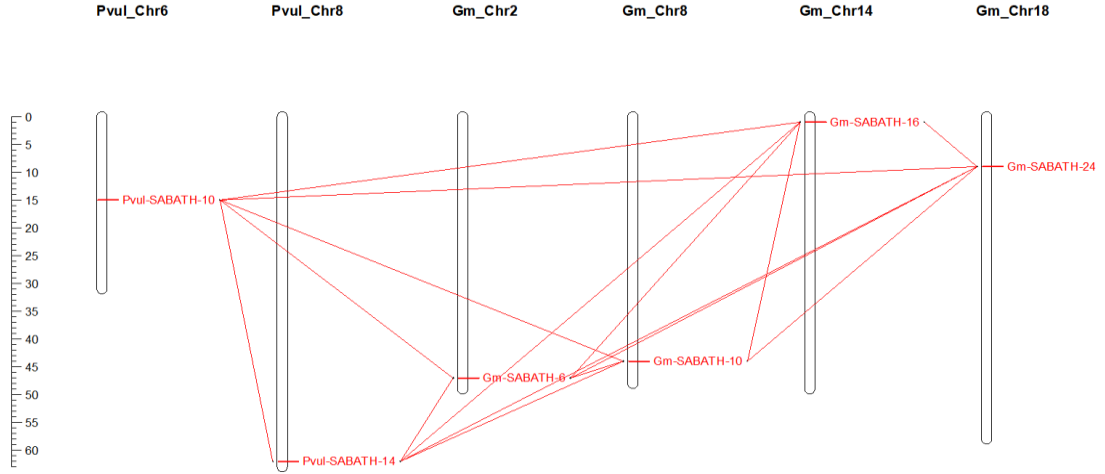
Pvul-SABATH genlerinin pozisyon bilgisi ve kromozomal lokasyonlarını belirlemek için ise Phytozome v12.1 veritabanı kullanılmıştır. *P. vulgaris*'e ait SABATH genlerinin kromozomal dağılımları ve dağılım oranları MapChart ile çizilmiştir (Voorrips 2002). Tanımlanan fasulye SABATH genlerinin fasulye genomunda 1, 3, 6, 8, 9, 10 ve 11. kromozomları üzerinde yerleşik olduğu Şekil 4.1'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Fasulye SABATH genlerinin kromozomal dağılımları (Benzer renkler segmental duplike genleri göstermektedir).

4.3 *Pvul-SABATH* Gen Ailesinin Karşılaştırmalı Haritalaması

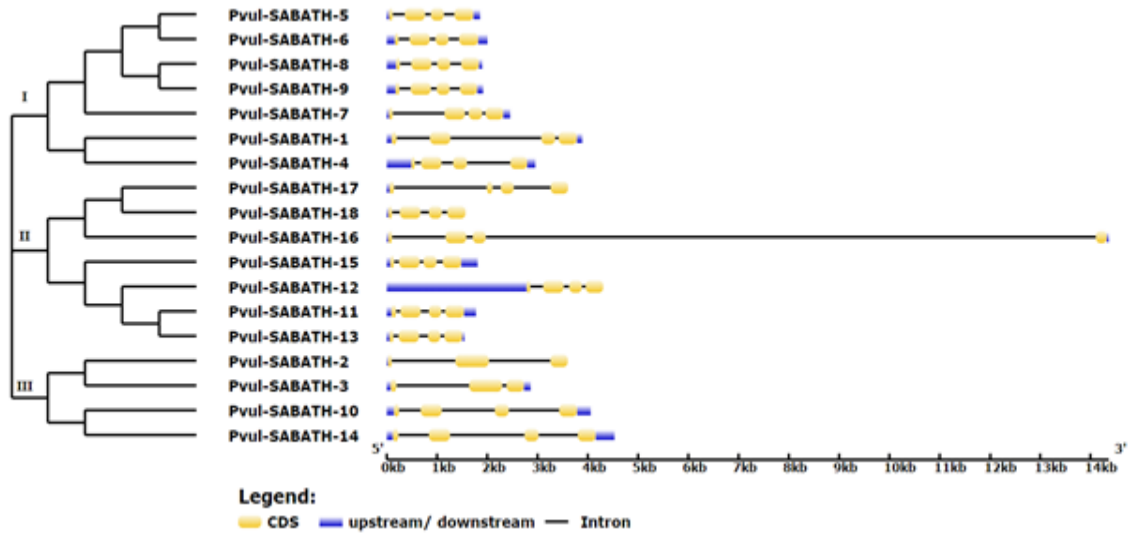
Yapılan analizler sonucunda Şekil 4.2'de gösterildiği gibi *P. vulgaris* ile *Glycine max* bitkileri arasında sintenik ilişki tespit edilmiştir. *Pvul-SABATH 10* ve *Pvul-SABATH 14* genleriyle *Gm-SABATH 6*, *-10*, *-16* ve *-24* genleri arasında ortolog bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan SABATH genleri bakımından *Arabidopsis thaliana* ile *P. vulgaris* genomları arasında herhangi bir ortoloji tespit edilememiştir.



Şekil 4.2 Pvul-SABATH-Glycine max karşılaştırmalı haritası

4.4 *Pvul-SABATH* genlerinin Ekzon ve İntron Bölgeleri

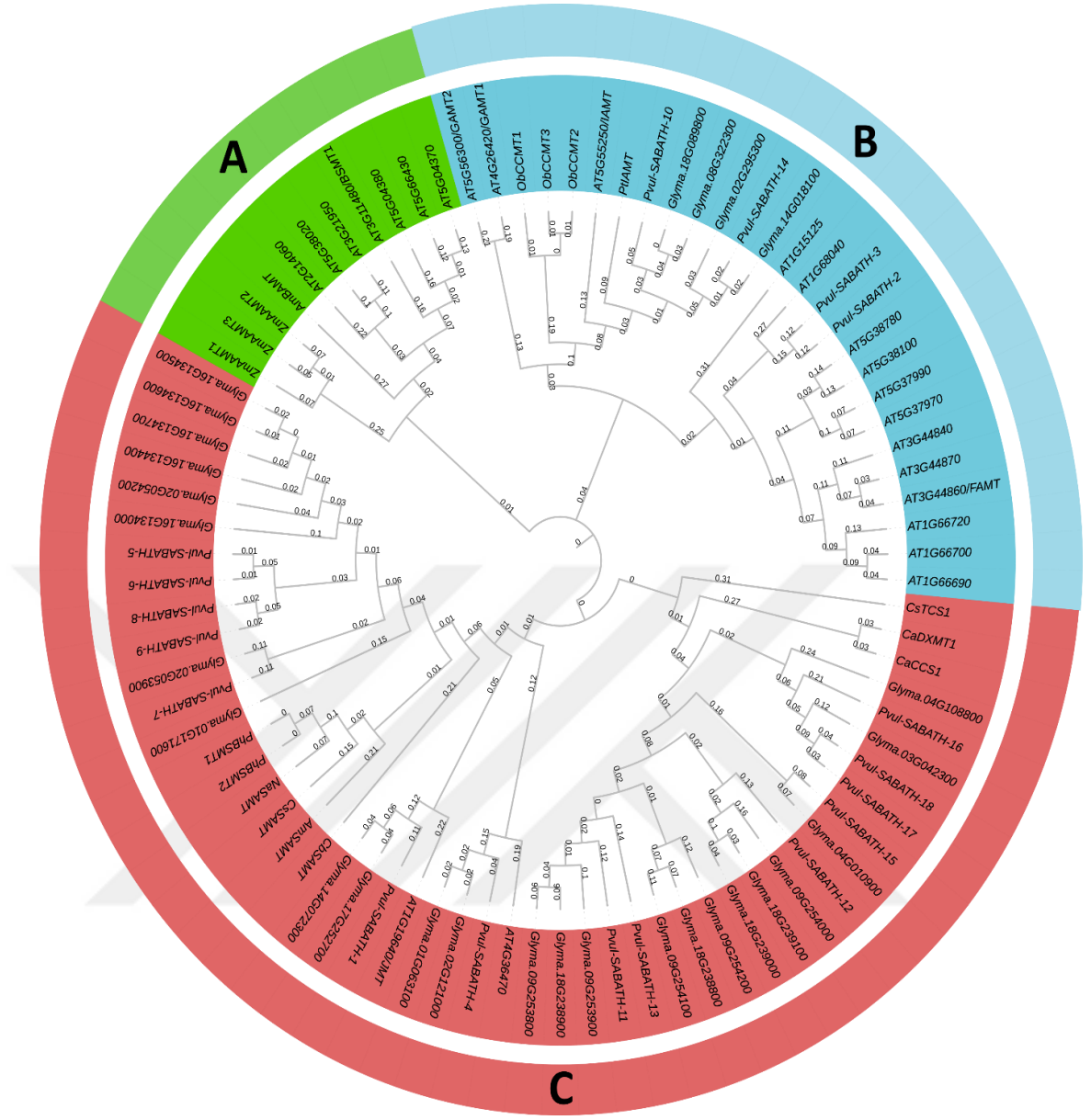
Çoklu gen ailelerinin evriminde önemli bir yere sahip olan ve gen ailesi üyeleri arasında bulunan ekzon ve intron çeşitlenmesi temelde 3 mekanizmaya sahiptir. Bunlar ekzon/intron kazanımı veya kaybı, ekzonizasyon (ekzonik halde bulunan intronik veya intergenik bir dizi) /psödoekzonizasyon (ekzonizasyonun tersi halde bulunan dizi) ve insersiyon/delesyondur (Xu et al. 2012; Kasapoğlu et al. 2020). *Pvul-SABATH* genlerinin ekzon-intron durumu hakkında bilgi edinmek için Gene Structure Display Server v2.0 (Anonymous 2021) veritabanından yararlanılmıştır (Guo et al. 2007). *Pvul-SABATH* genlerinin boyutları (bp) ve intron sayıları tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Yapılan analizler sonucu, *Pvul-SABATH* 52 adet intron ve 70 adet ekzon tespit edilmiştir. Ekzon sayıları *Pvul-SABATH-2* ve *Pvul-SABATH-3*'te 3 diğer genlerde ise 4 olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Fasulye SABATH genlerinin ekzon ve intron bölgeleri

4.5 *PvuI-SABATH* Proteinlerinin Türler Arası Filogenetik Analizi

PvuI-SABATH proteinlerinin evrimsel ilişkilerini açıklamak ve potansiyel fonksiyonlarını tahmin etmek için *P. vulgaris*, *Antirrhinum majus*, *A. thaliana*, *Camellia sinensis*, *Clarkia breweri*, *Coffea arabica*, *G. max*, *Nicotiana glauca*, *O. basilicum*, *Petunia × hybrida*, *Populus trichocarpa*, *Z. mays* türlerinin genom çaplı proteinleri veritabanlarından indirilmiştir. On iki bitki türünden toplam 87 SABATH proteininin filogenetik ağaç analizi yapmak amacıyla MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) programı ile Komşu Katılım (Neighbor Joining: NJ) metodu kullanılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi bu proteinler 3 ana gruba (A, B ve C grupları) ayrılmıştır. A grubu Arabidopsis ve mısır bitkisinin AAMT, BAMT ve BSMT genlerinden oluşmaktadır. Bu grupta *PvuI-SABATH* proteinlerinden hiçbiri bulunmamaktadır. B grubu 4 *PvuI-SABATH* geni ile birlikte Arabidopsis SABATH proteinlerinin 15'ini de içermektedir. GAMT, CCMT, IAMT ve FAMT karboksil metiltransferaz proteinleri bu grupta yer almaktadır. *PvuI-SABATH-2* ve *-3* proteinleri FAMT karboksil metiltransferaz ile yakın bir ilişki içerisindedir. Benzer şekilde *PvuI-SABATH-10* ve *-14* ise IAMT karboksil metiltransferaz proteinleri ile yakından ilişkilidir. Yine bu proteinler CCMT ve GAMT karboksil metiltransferaz proteinleri ile de ilişki içerisindedir. C grubu en fazla SABATH üyesini içeren gruptur. C grubu SAMT, BSMT ve JMT gibi karboksil metiltransferazları içermektedir. Onların arasında *PvuI-SABATH-1*, AT1G19640/JMT ile yakından ilişkilidir.



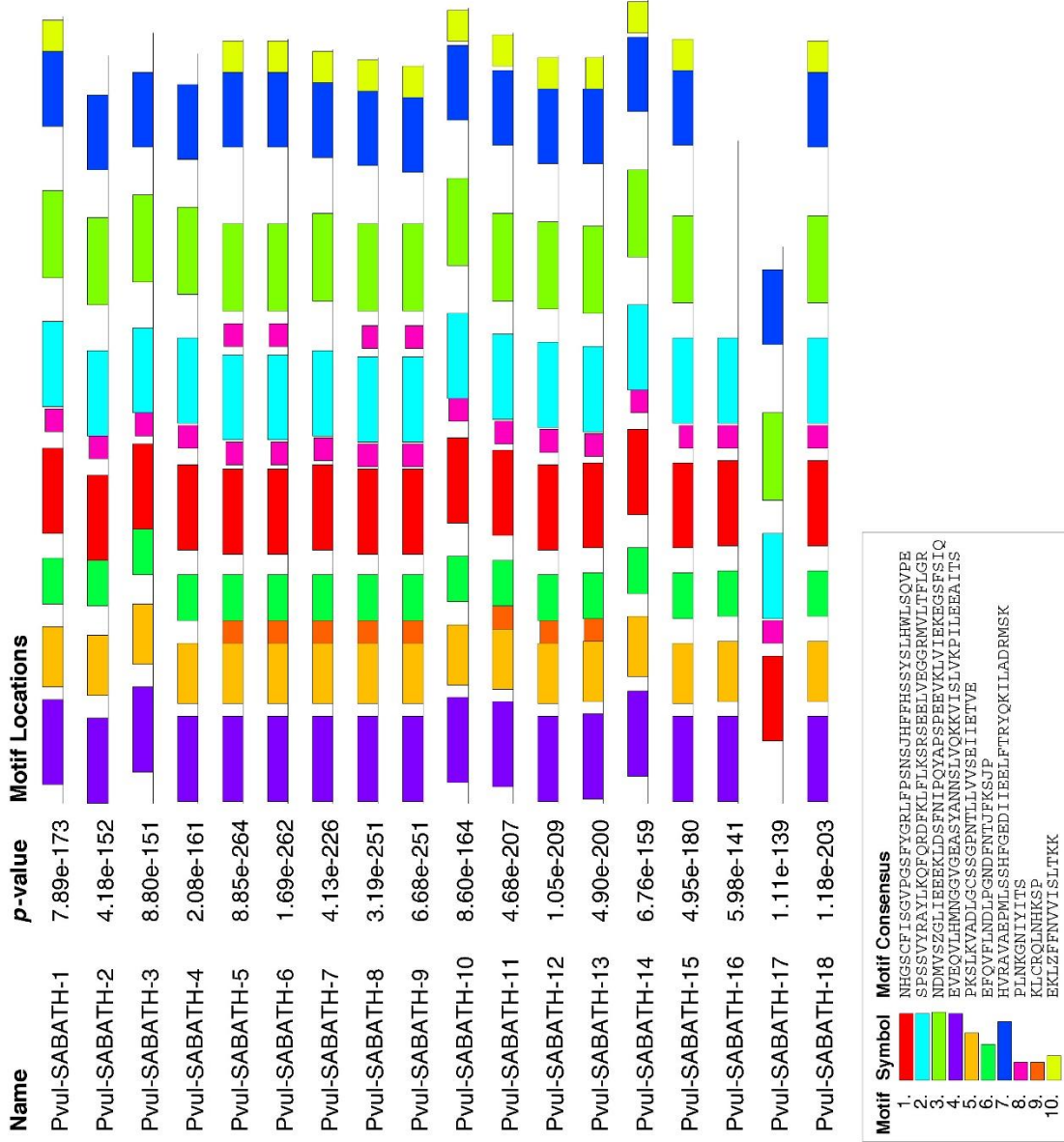
Şekil 4.4 On iki bitki türünden SABATH proteinlerinin filogenetik ağacı. Ağaç komşu katılım (NJ) metodu kullanılarak amino asit benzerliğine dayalı olarak çizildi.

4.6 *Pvul-SABATH* genlerinin korunmuş dizi motifleri

Pvul-SABATH proteinlerine ait peptid dizilerinde bulunan korunmuş bölgeler, yapılan filogenetik analizleri doğrular niteliktedir. Fasulyede 18 adet SABATH proteinlerine ait ağırlıklı olarak 10 korunmuş bölge belirlenmiştir. Benzer motif grupları SABATH proteinleri arasında yapısal benzerliğin belirlenmesi için kolaylık sağlamaktadır. Yapılan analize göre benzer motif kalıplarını içeren proteinlerin filogenetik ağaçta aynı sınıfta olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5.1). *Pvul-SABATH* proteinlerine ait motiflerin genişlik (aa), muhtemel en iyi eşleşme ve içerdiği domain

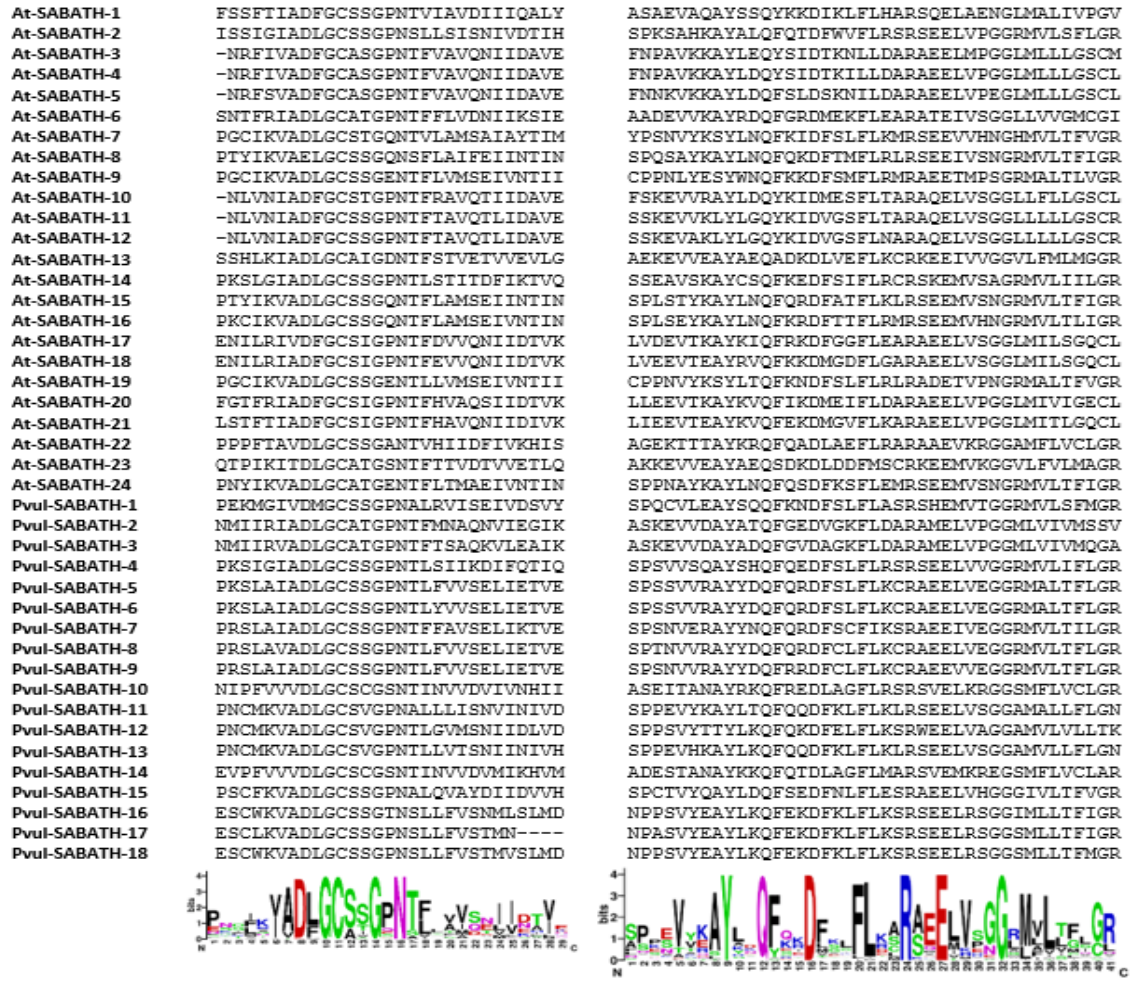
Çizelge 4.2’de verilmiştir. WEBLOGO veritabanı kullanılarak *A. thaliana* ve *P. vulgaris* bitkilerinin SABATH gen ailelerine ait korunmuş alan dizileri ve motif logoları Şekil 4.5.2’de belirtilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda *At-SABATH* ve *Pvul-SABATH* arasında eşleşme gösteren domainlerin genişlikleri (aa) 11 ile 42 arasında olduğu ve içerdikleri domainin çoğunlukla SAM bağımlı karboksil metiltransferaz olduğu tespit edilmiştir. Muhtemel en iyi eşleme verileri baz alınarak *At-SABATH* ve *Pvul-SABATH* motifleri, motif 5 ve motif 2 ile en iyi eşleşme gösterdiği tespit edilmiştir.





Şekil 4.5.a *Pvul-SABATH* genlerinin korunmuş dizi bölgeleri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.5.b *A. thaliana* ve *P. vulgaris*'te SABATH proteinlerinin korunmuş bölge dizileri ve motifleri

Çizelge 4.2 *PvuII*-*SABATH* genlerinin korunmuş motiflerinin özellikleri

MOTİF ID	GENİŞLİK	MUHEMEL EN İYİ EŞLEŞME	İÇERDİĞİ DOMAIN
1	41	NHGPCFIHGTPGSFYGRLFPDRSIHFFHSSYSLHWLSQVPE	SAM bağımlı karboksil metiltransferaz
2	41	SPPSVYRAYYDQFQRDFCLFLKCRAEELVEGGRMVLTFGLGR	SAM bağımlı karboksil metiltransferaz
3	42	NDMVQQGLJKEEKVDSFNIPQYAPSPPEEVKQVIEKEGSFTIQ	SAM bağımlı karboksil metiltransferaz
4	41	ETAQVLHMNGGVGEASYANNSYVQRKHICKTKHIREEAITR	N/A
5	29	PRCWKVADLGSSGPNTLFFVVSNIHETVD	SAM bağımlı karboksil metiltransferaz
6	22	EYQVYFNDLPGNDFNTIFKSIP	SAM bağımlı karboksil metiltransferaz
7	36	WMRAVMEPMLSAHFGEIIDELEFTRYQKIVAQRMQK	SAM bağımlı karboksil metiltransferaz
8	11	PCNKGNCYIWW	N/A
9	11	KLCRQLNHKSP	N/A
10	15	EKTQYINVTISLTRK	N/A

N/A: Eşleşme olmayan motifleri belirtir.

4.7 Fasulye Genomunda Bulunan SABATH Genlerine Ait Duplikasyonlar

Duplikasyonlar farklı bitki türlerinde SABATH gen ailesinin varlığı göstermektedir. Genel anlamda birbirleriyle benzer olan genlerin sebebini açıklayan gen duplikasyon olayları gen ailelerinin genişlemesi ve büyümesinde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir. Proteinlerde yeni fonksiyonların belirlenmesinde evrimsel ilişkilerin tespitini desteklemektedir. Gen duplikasyonları segmental ve tandem duplikasyon olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Gen duplikasyonları eğer aynı kromozom üzerinde bulunuyorsa bu tandem duplikasyonu, aynı genin farklı alleli farklı kromozom üzerinde bulunuyorsa segmental duplikasyon olarak adlandırılır (Clancy and Shaw 2008). SABATH genleriyle yapılan gen duplikasyon analiz sonuçlarına göre; 2 adet segmental duplikasyon bulunduğu gözlemlenmiştir.

Evrimsel süreçte gen duplikasyon olayları, proteinlerin yeni fonksiyonel özellikler kazanmasını sağlar (Kondrashov et al. 2002). SABATH gen ailesi içerisinde evrimsel yayılmayı değerlendirmek amacı ile duplikasyon gösteren genlerin homolog özellikte olmayanlar için “Ka”, homolog özellikte olanlar “Ks” ve homolog olmayanın homolog olana bölümünü ifade eden “Ka/Ks” değişim oranları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). *Pvul-SABATH 1* ve *Pvul-SABATH 5* genlerinin Ks değeri 3,3290 ve bu genler arasındaki Ka/Ks oranı 0,1437, *Pvul-SABATH 10* ve *Pvul-SABATH 14* genlerinin Ks değeri 0,5871 ve bu genler arasındaki Ka/Ks oranı 0,1636 olarak belirlenmiştir.

Duplike gen çiftleri, Plant Genom Duplication Database veritabanında (Anonymous 2018a) 100 kb’lik bir aralıkta tanımlanmıştır. ClustalW ile hizalanan segmental olarak duplike olmuş *Pvul-SABATH* gen dizilerinin homolog olan (Ks) ve homolog olmayan (Ka) değerleri CODEML bir olan PAL2NAL (Suyama et al. 2006) ile hesaplanmıştır. Duplikasyon süresi (milyon yıl önce, Mya) ve her *Pvul-SABATH* geninin ayrışması, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

$T = Ks / 2 \lambda$ ($\lambda = 8,46 \times 10^{-9}$) Çizelge 4.3’de detaylı olarak gösterilmiştir (Schmutz et al. 2014). Yapılan analize göre *Pvul-SABATH 1* ve *Pvul-SABATH 5* genleri arasındaki duplikasyon olaylarının 196,7 MYÖ, *Pvul-SABATH 10* ve *Pvul-SABATH 14* genleri arasındaki duplikasyon olaylarının 34,69 MYÖ olduğu söylenebilir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 *Pvul-SABATH* gen dupliksayonları

Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ	Seleksiyon Baskısı	Duplikasyon türü
<i>Pvul-SABATH-1</i>	<i>Pvul-SABATH-5</i>	0,4787	3,3290	0,1437	196,7	Arındırıcı	Segmental
<i>Pvul-SABATH-10</i>	<i>Pvul-SABATH-14</i>	0,0961	0,5871	0,1636	34,69	Arındırıcı	Segmental

4.8 *Pvul-SABATH* genlerinin Promotor Analizi

Promotör bölgeleri gen transkripsiyonun başlangıç bölgesine yakın lokasyonlarda bulunan DNA bölgeleridir. Direkt olarak gen ifadesinin kontrolünü sağlayan en önemli gen elemanlarıdır. Bu tez çalışmasında fasulye genomunda tanımlanan SABATH genlerine ait promotör bölgelerinde yerleşim gösteren cis-acting elementler analiz edilmiş ve tespiti sağlanan cis elementler belirtilmiştir. Sonuç olarak *Pvul-SABATH* genlerinin tamamında toplamda 82 adet cis-acting element olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). Tüm SABATH genlerinin 5' üst akış bölgesinin 2 kb gerisinden elde edilen sekanslar incelenmiştir ve SABATH genlerinde bulunan promotör motiflerinin bitkisel gelişimde, değişen çevresel koşullara uyum sağlamada, abiotik ve biyotik strese karşı verilen moleküler cevaplarda etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 PvuII-SABATH genlerinin promotor bölgeleri

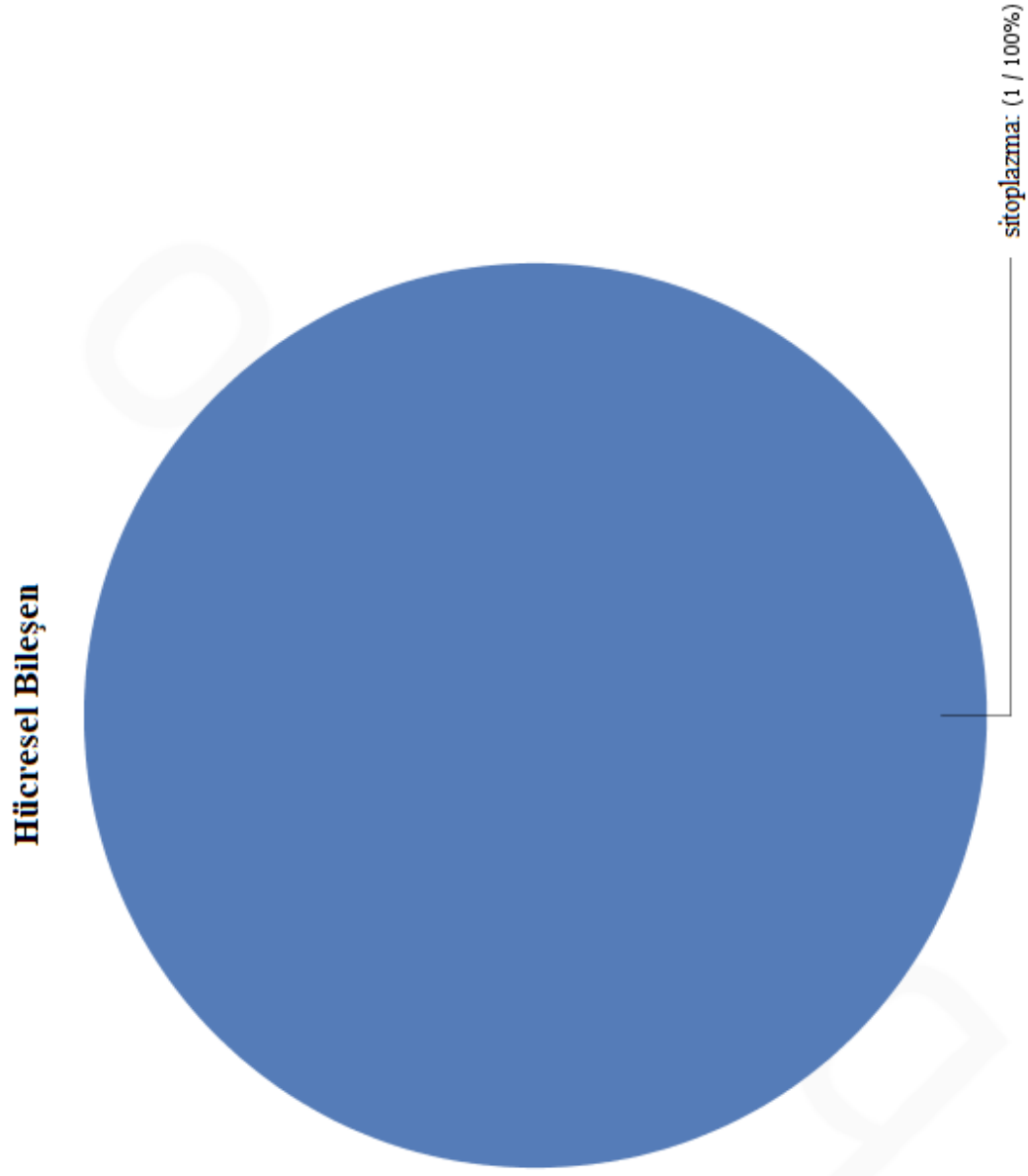
	SABATH.1	SABATH.2	SABATH.3	SABATH.4	SABATH.5	SABATH.6	SABATH.7	SABATH.8	SABATH.9	SABATH.10	SABATH.11	SABATH.12	SABATH.13	SABATH.14	SABATH.15	SABATH.16	SABATH.17	SABATH.18
İŞGÄ DÜYARLI ELEMANLAR	✓		✓		✓		✓			✓		✓		✓		✓		✓
AE-box	✓																	
ACE	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
Box 1	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
G-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
GATA-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
GC-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
chs-CMA1a																		
I-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
Sp1																		
LAMP-element		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
GT1-motif		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
MRE			✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
TCCC-motif																		
TC1-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
GA-motif			✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
Gap-box																		
ATCT-motif																		
ABRE	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
ABREa	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
ABREa	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
ABRE4	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
ERE	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
P-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
GARE-motif																		
IGAGC-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
IGA-element			✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
ICA-element			✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
CGTCA-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
TATC-box																		
ARE	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
IC-rich repeats	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
W-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
MBS																		
LTR																		
WUN-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
MYC	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
MYB	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
AT-TATA-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
CAAT-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
TATA	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
TATA-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
A-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
CCGTC-motif	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
CCGTCC-box	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		✓
PROMOTOR İLE İLGİLİ ELEMANLAR																		
CEVRESSEL ELEMANLAR																		
STRSLE İLİŞKİLİ ELEMANLAR																		
İŞGÄ DÜYARLI ELEMANLAR																		

Çizelge 4.4 (Devam)

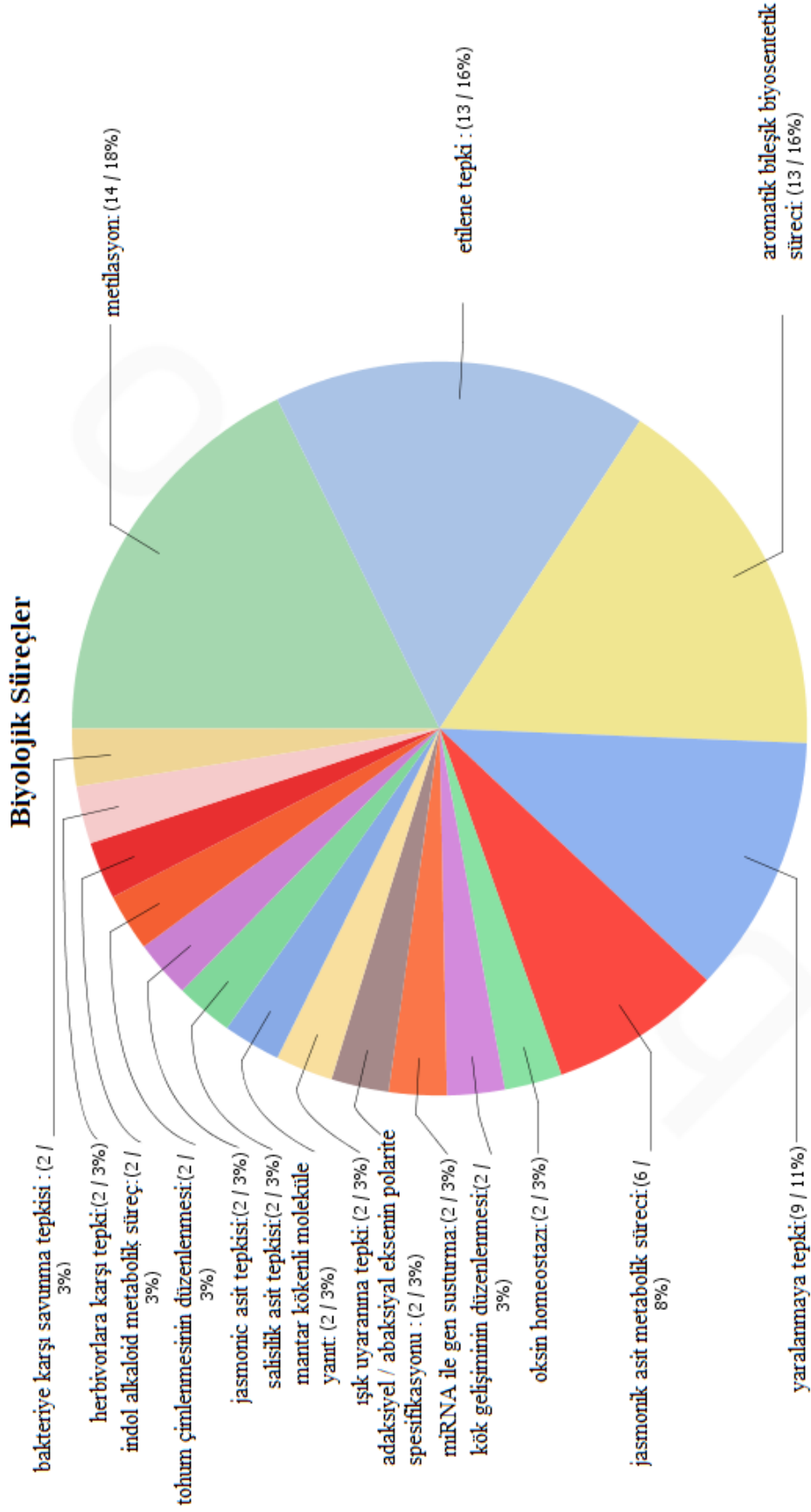
İçerik	SABATH-1	SABATH-2	SABATH-3	SABATH-4	SABATH-5	SABATH-6	SABATH-7	SABATH-8	SABATH-9	SABATH-10	SABATH-11	SABATH-12	SABATH-13	SABATH-14	SABATH-15	SABATH-16	SABATH-17	SABATH-18
İçerik																		
AAGAA-motif	✓	✓	✓	✓			✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GCN4 motif			✓	✓								✓		✓				
CAT-box				✓								✓		✓				
CCAAT-box	✓		✓						✓	✓	✓							
O2-site			✓															
ctcddian			✓															
Unnamed_1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Unnamed_6		✓	✓		✓							✓						
AT-rich element	✓		✓									✓						
AT-rich sequence									✓	✓								
CCAAT-box									✓		✓							
HD-Zip 1								✓										
MBSI				✓														
Unnamed_4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Myb	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Myc	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
STRE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
as-1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
WRE3	✓																	
MYB recognition site																		
AP-1			✓		✓									✓				
Myb-binding site			✓		✓									✓				
ICA		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYB-like sequence		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DRE core				✓														
ACTCATCT sequence									✓									
AAA-C-motif																		
DRE1																		
3-AF1 binding site	✓																	
AT-ABRE		✓		✓											✓			
AT1-motif	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
AuxRR-core																		
F-box			✓											✓				
GTGGC-motif			✓															
MSA-like												✓						
RY-element													✓					
SARE			✓															
TGA-box																		
Unnamed_2			✓					✓	✓		✓							✓

4.9 *Pvul-SABATH* Genlerinin Ontoloji Analizleri

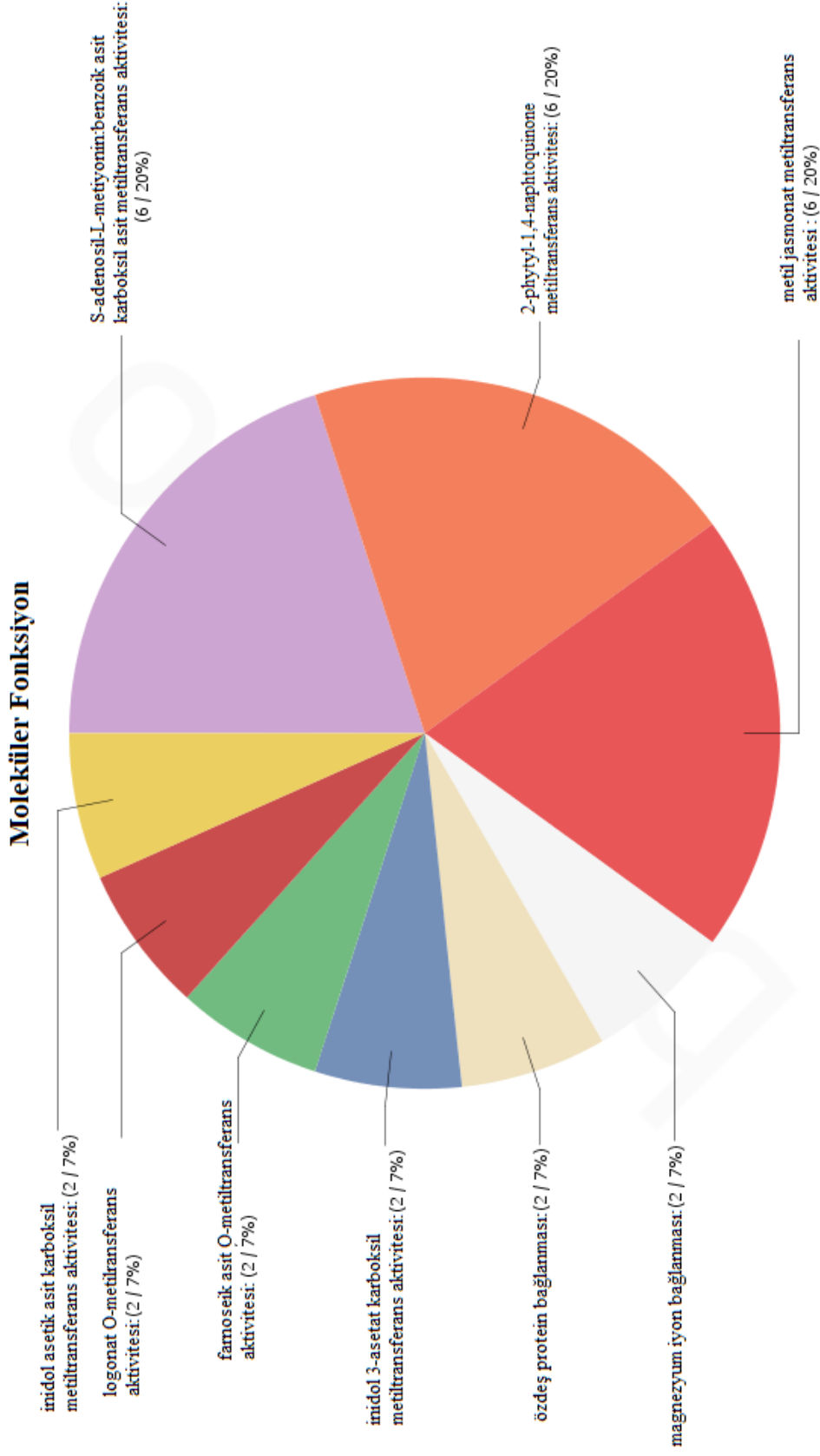
Blast2GO gen ontoloji analizlerine göre SAM-bağımlı karboksil metiltransferaz (SABATH) enzimi hücre içerisinde sitoplazmada bulunmaktadır (Şekil 4.6). SAM-MT enziminin hücre döngüsünde en fazla metilasyon süreçlerinde rol aldığı görülürken bunun yanı sıra etilene tepki ve biyosentetik aromatik bileşikler gibi süreçlerde de görev almaktadır (Şekil 4.7). SAM-MT enziminin moleküler fonksiyonları incelendiğinde ise S-adenosil-L-metiyonin:benzoik asit karboksil asit metiltransferans aktivitesi, 2-phytyl-1,4-naphthoquinone metiltransferans aktivitesi ve metil jasmonat metiltransferans aktivitesi temel metabolik aktivite olarak gözükmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.6 SABATH enzimi ontoloji analizi (Hücresel Bileşenler)



Şekil 4.7 SABATH enzimi ontoloji analizi (Biyolojik süreçler)



Şekil 4.8 SABATH enzimi ontoloji analizi (Moleküler fonksiyonlar)

4.10 Tanımlanan *Pvul-SABATH* Genlerinin Hücre İçi Lokalizasyonu

Fasulyede bulunan SABATH genlerinin hücre içi lokalizasyonu Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. WoLF PSORT (Horton et al. 2007) veri tabanından elde edilen bilgiler neticesinde *Pvul-SABATH 3* ve *Pvul-SABATH 13* genleri hariç tüm genler sitoplazma, mitokondri, kloroplast gibi 13 farklı bölgede yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. *Pvul-SABATH 3* ve *Pvul-SABATH 11* genleri diğer genlere göre sırasıyla 18 ve 15,5 farklı bölgelerde yerleşim göstermiştir.

Çizelge 4.5 *Pvul-SABATH* genlerinin hücre içi lokalizasyonu

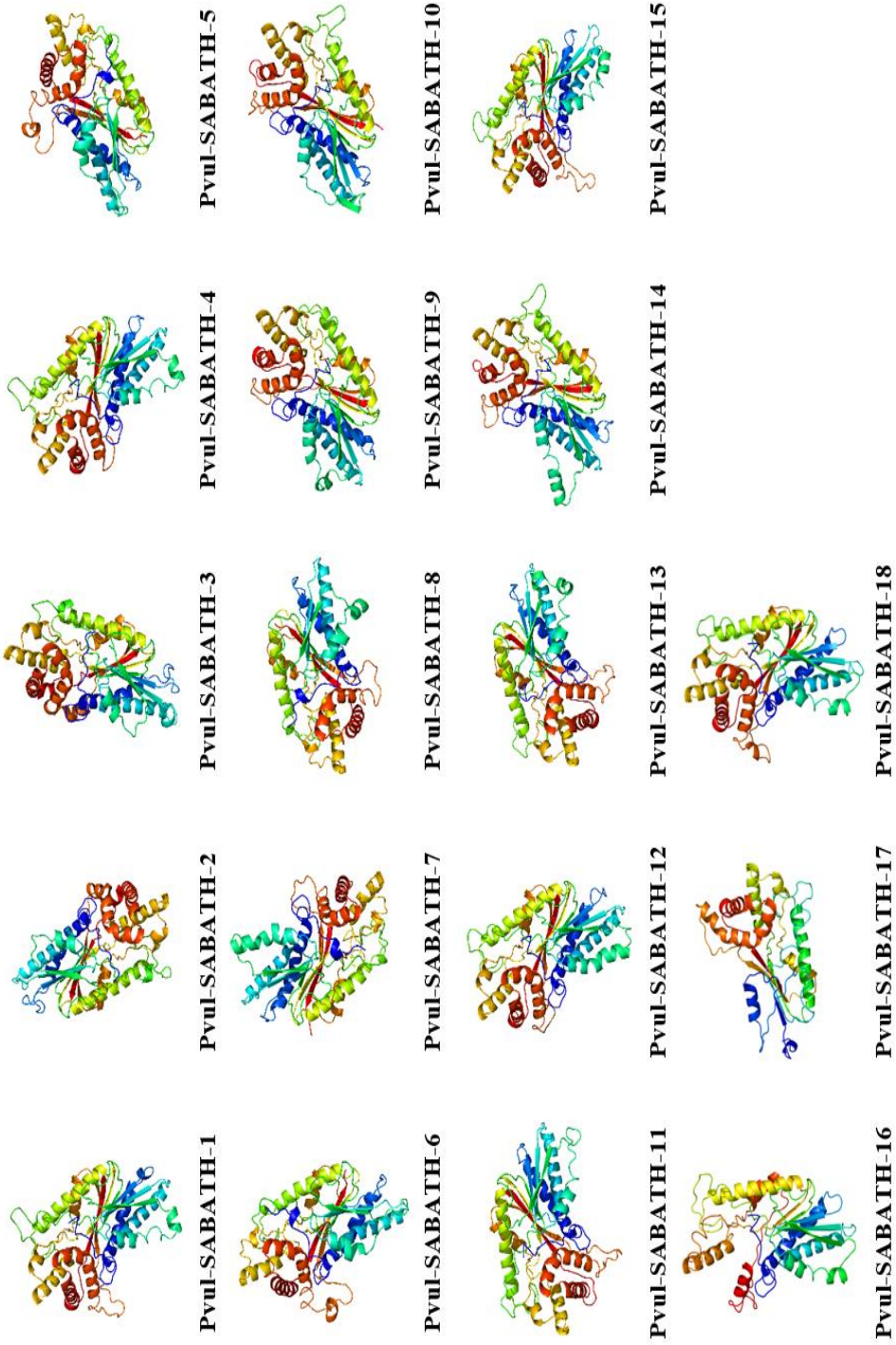
Genler	WoLF PSORT
<i>Pvul-SABATH 1</i>	*nucl: 6, cyto: 3, mito: 3, chlo: 1
<i>Pvul-SABATH 2</i>	nucl: 6, cyto: 6, vacu: 1
<i>Pvul-SABATH 3</i>	nucl: 5.5, cyto_nucl: 5, pero: 4, cyto: 3.5
<i>Pvul-SABATH 4</i>	cyto: 5, cysk: 4, nucl: 2, mito: 2
<i>Pvul-SABATH 5</i>	nucl: 7, cyto: 5, chlo: 1
<i>Pvul-SABATH 6</i>	nucl: 11, chlo: 1, cyto: 1
<i>Pvul-SABATH 7</i>	nucl: 6, cyto: 5, chlo: 1, vacu: 1
<i>Pvul-SABATH 8</i>	nucl: 7, cyto: 5, chlo: 1
<i>Pvul-SABATH 9</i>	nucl: 7, cyto: 5, chlo: 1
<i>Pvul-SABATH 10</i>	cyto: 9, nucl: 3, plas: 1
<i>Pvul-SABATH 11</i>	cyto: 7, nucl: 4.5, nucl_plas: 3, chlo: 1
<i>Pvul-SABATH 12</i>	chlo: 6, cyto: 2, mito: 2, nucl: 1, plas: 1, extr: 1
<i>Pvul-SABATH 13</i>	nucl: 6, cyto: 6, chlo: 1
<i>Pvul-SABATH 14</i>	cyto: 11, chlo: 2
<i>Pvul-SABATH 15</i>	cysk: 8, nucl: 3, cyto: 2
<i>Pvul-SABATH 16</i>	cyto: 10, chlo: 1, nucl: 1, mito: 1
<i>Pvul-SABATH 17</i>	cyto: 9, nucl: 4
<i>Pvul-SABATH 18</i>	cyto: 8, pero: 3, chlo: 1, mito: 1

*: Cyto: Sitoplazma, nucl: çekirdek, chlo: kloroplast, mito: mitokondri, pero: peroksizom, vacu: vakoul, plas: plazma, cysk: iskelet,

4.11 *Pvul-SABATH* Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Protein Data Bank (PDB)'da bulunan SABATH proteinleri ile blastp taraması yapılmıő olup, Phyre² veri tabanı yardımı ile bu proteinlerin 3 boyutlu homoloji modellemesi görsel açıdan anlaşılır bir Şekilde aktarılmıştır. SABATH proteinlerinin yapı ve fonksiyon tahminlemesi kullanılan veri tabanı ile saptanmıştır. Bu çalışmada, saptanan proteinlerin 3 boyutlu homoloji modellerine Şekil 4.9'de yer verilmiştir.





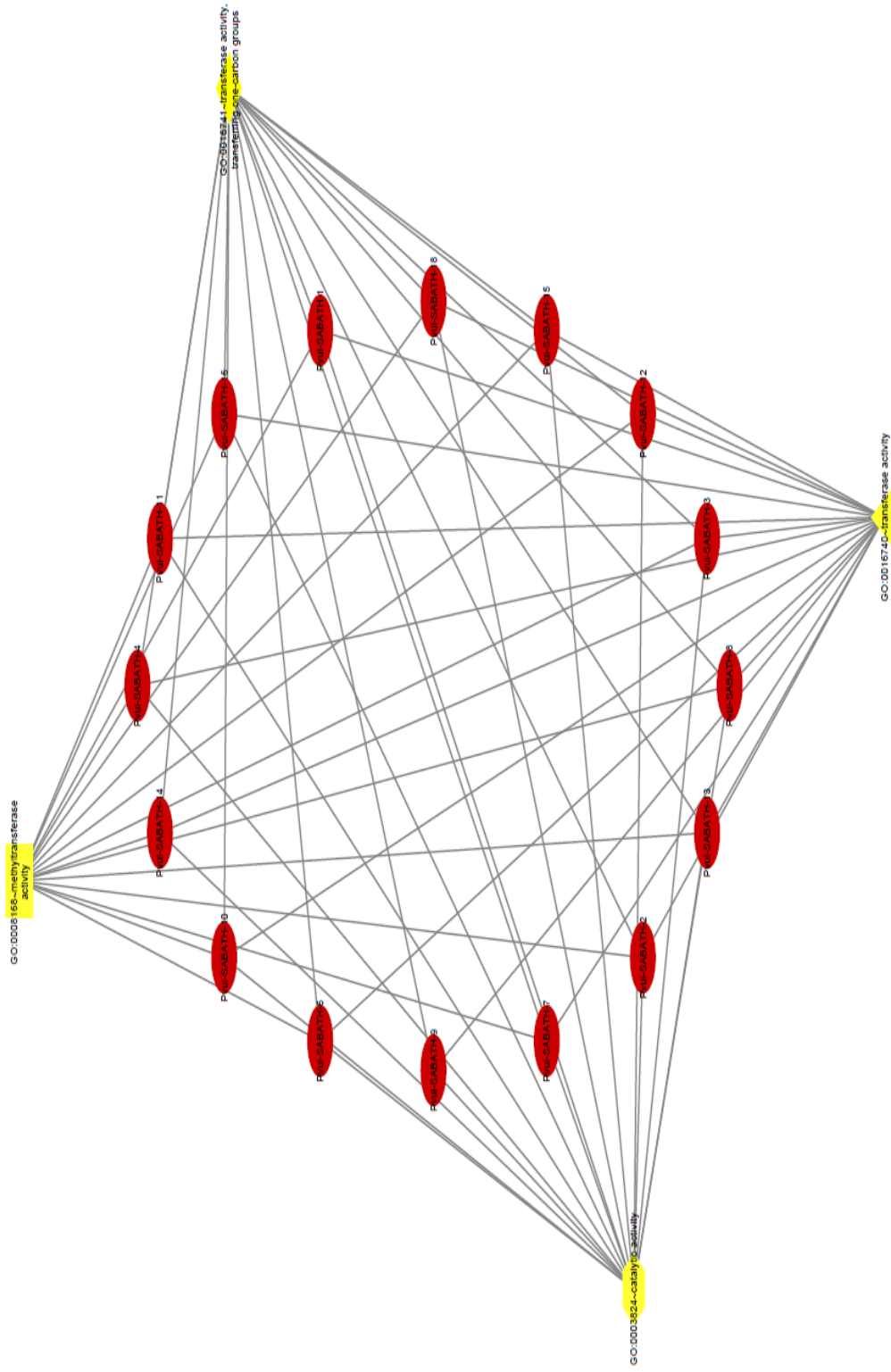
Şekil 4.9 *PvuII*-SABATH proteinlerinin 3 boyutlu yapı modelleri

4.12 *Pvul-SABATH* Protein-Protein Etkileşimleri

Tanımlanan SABATH proteinleri, dahil oldukları biyolojik aktivitelere göre fonksiyonel gruplara ayrıldığı Şekil 4.10'te belirtilmiştir. Proteinler için Gene Ontolojisi (GO), moleküler fonksiyon ve biyolojik yol terimleri Çizelge 4.7'te sunulmaktadır. Ayrıca tanımlanan SABATH proteinlerinin protein-protein etkileşimleri Şekil 4.11'de görsel açıdan anlaşılır olması için STRING veri tabanı ile iyileştirilerek gösterilmiştir.

4.13 Fasulyede Tuz ve Kuraklık Stresi ile ilişkili SABATH Genlerinin İn Siliko İfade Analizi

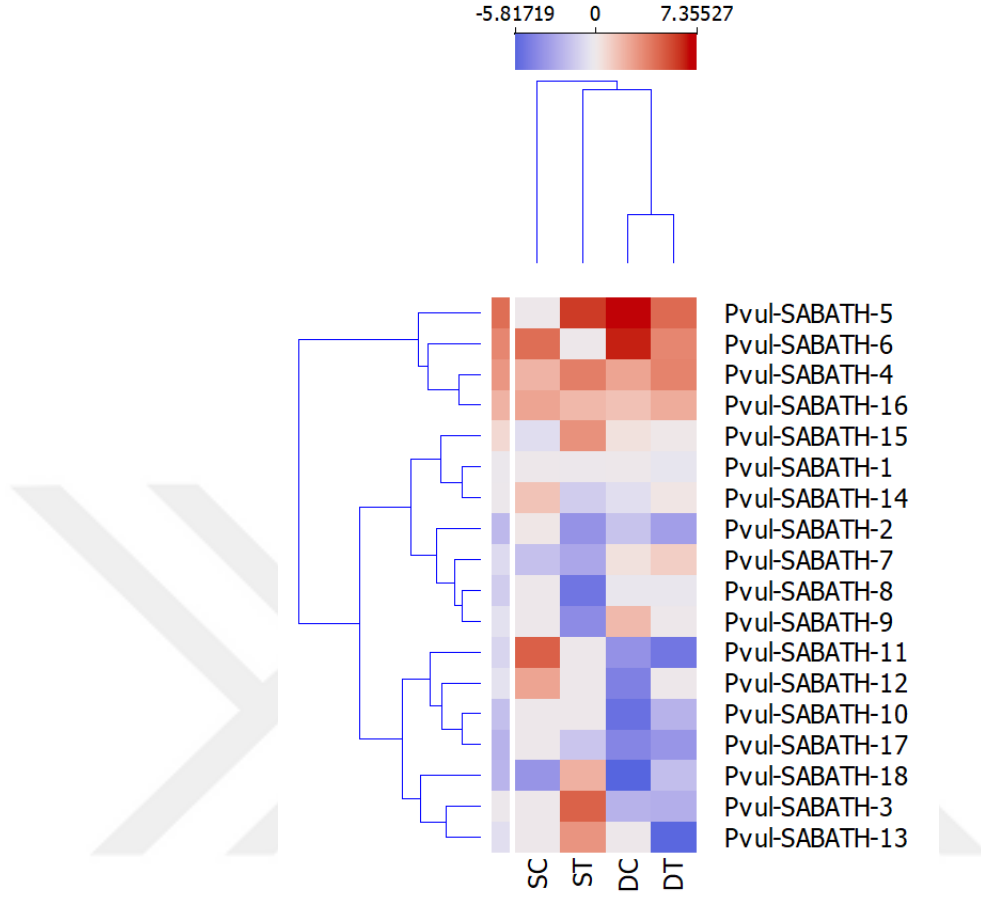
Fasulye SABATH genlerinin tuz ve kuraklık stresine ilişkin in siliko ifade analizinin tespiti SRA (Sequences Read Archive) veri tabanından elde edilen SRR957668 (tuz stresi ile muamele edilmiş yaprak), SRR958469 (yaprak tuz kontrol) (Hiz et al. 2014), SRR8284481 (kuraklık stresiyile muamele edilmiş yaprak) ve SRR8284480 (yaprak kuraklık kontrol) RNAseq verileri kullanılarak görsel açıdan anlaşılır hale getirilmiştir. RNAseq verisinin analizinden elde edilen RPKM değerlerinin log2 transformasyonu ile oluşturulan heatmap grafiğine göre bazı *Pvul-SABATH* genlerinin ifade seviyeleri tuz ve kuraklık stresi uygulaması ile farklılaştığı gözlemlenmiştir. Bu kapsamda tuz stresi uygulaması altında ifade seviyesinde artış gözlenen *Pvul-SABATH-3, -4, -5, -13, -15* ve *-18*'dir. Kuraklık stresi uygulaması altından ifade seviyesinde artış gösteren genler *Pvul-SABATH-4, -7, -15* ve *-16*'dir. Tuz stresi altında kontrole göre ifade seviyesinde düşüş meydana gelen genler ise *Pvul-SABATH-6, -7, -8, -9, -11, -12, -14, -16* ve *-17*'dir. Kuraklık stresi altında kontrole göre ifade seviyesinde düşüş meydana gelen genler ise *Pvul-SABATH-2, -5, -6, -9, -11* ve *-13*'dir. Özellikle *Pvul-SABATH-1* geninde ifade seviyesinde strese bağlı kayda değer bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.10 Tanımlanan SABATH proteinlerinin dahil oldukları biyolojik aktiviteler

Çizelge 4.6 SABATH proteinleri için Gen Ontolojisi (GO) terminolojisi, moleküler fonksiyon ve biyolojik yol terimleri

Terminoloji	Pvalue	Toplam Listenen	Pop Hit2	Pop Toplam	Kat sayı değerleri	Benferroni	Benjamini	FDR
GO:0008168~metiltransferaz aktivitesi	2,58E-10	16	26	14178	4.957.342.657.342.650	1,03E-09	1,03E-09	5,17E-10
GO:0016741~transferaz aktivitesi, tek karbon gruplarının aktarılması	5,67E-11	16	301	14178	4.710.299.003.322.250	2,27E-10	1,13E-09	5,67E-11
GO:0016740~transferaz aktivitesi	1,06E+06	16	3072	14178	4.615.234.375	4,24E+05	1,41E+06	1,06E+06
GO:0003824~katalitik aktivite	1,57E+12	16	7911	14178	17.921.880.925.293.800	6,29E+10	1,57E+12	1,57E+12

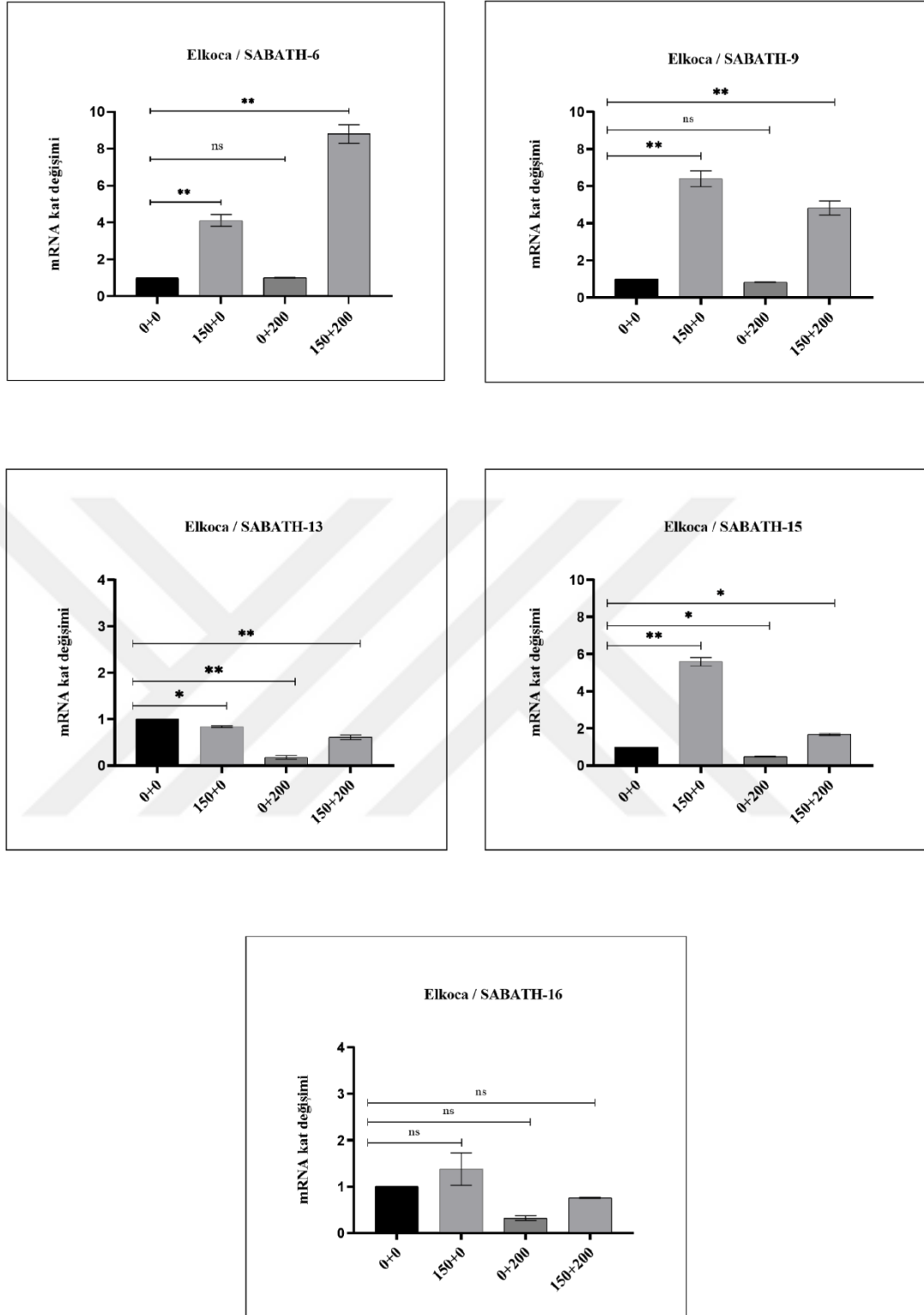


Şekil 4.12 *PvuI-SABATH* in siliko ifade seviyeleri

4.14 Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Analizleri

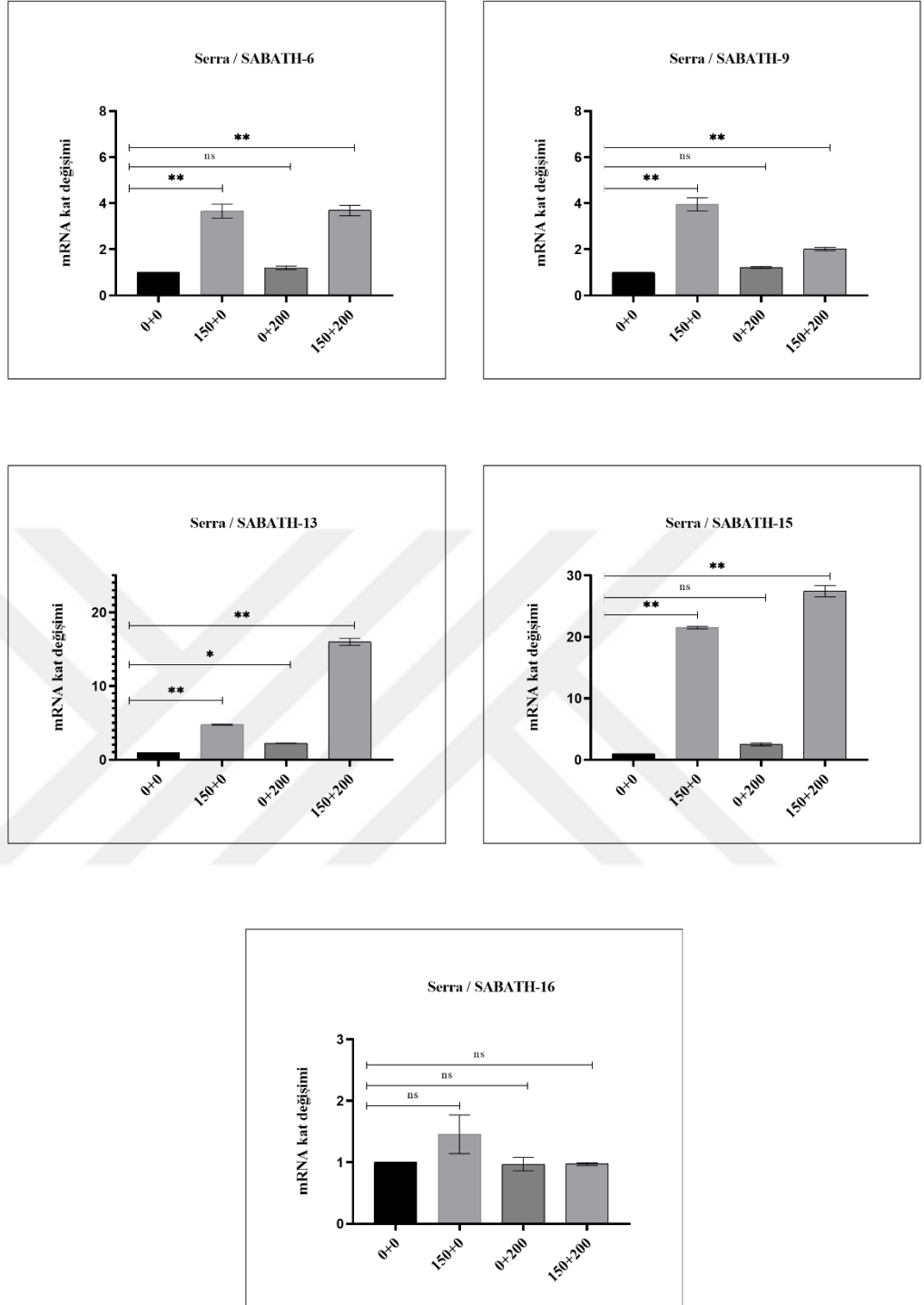
PvuI-SABATH gen ailesinin rollerini keşfetmek için 9 günlük 150 mM tuz ve PEG6000 (polietilen glikol) stresine maruz bırakılmıştır. qRT-PCR analizleri gerçekleştirebilmek için RNAseq verileri baz alınarak belirlenen genlere uygun primerler tasarlanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.13–16’te görsel açıdan anlaşılabilir olması için grafikler olarak belirtilmiştir. *PvuI-SABATH*’ın gen ifadesindeki değişiklikleri belirlemek için iki adet fasulye (Elkoca ve Serra) çeşidi kullanılarak qRT-PCR analizleri yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



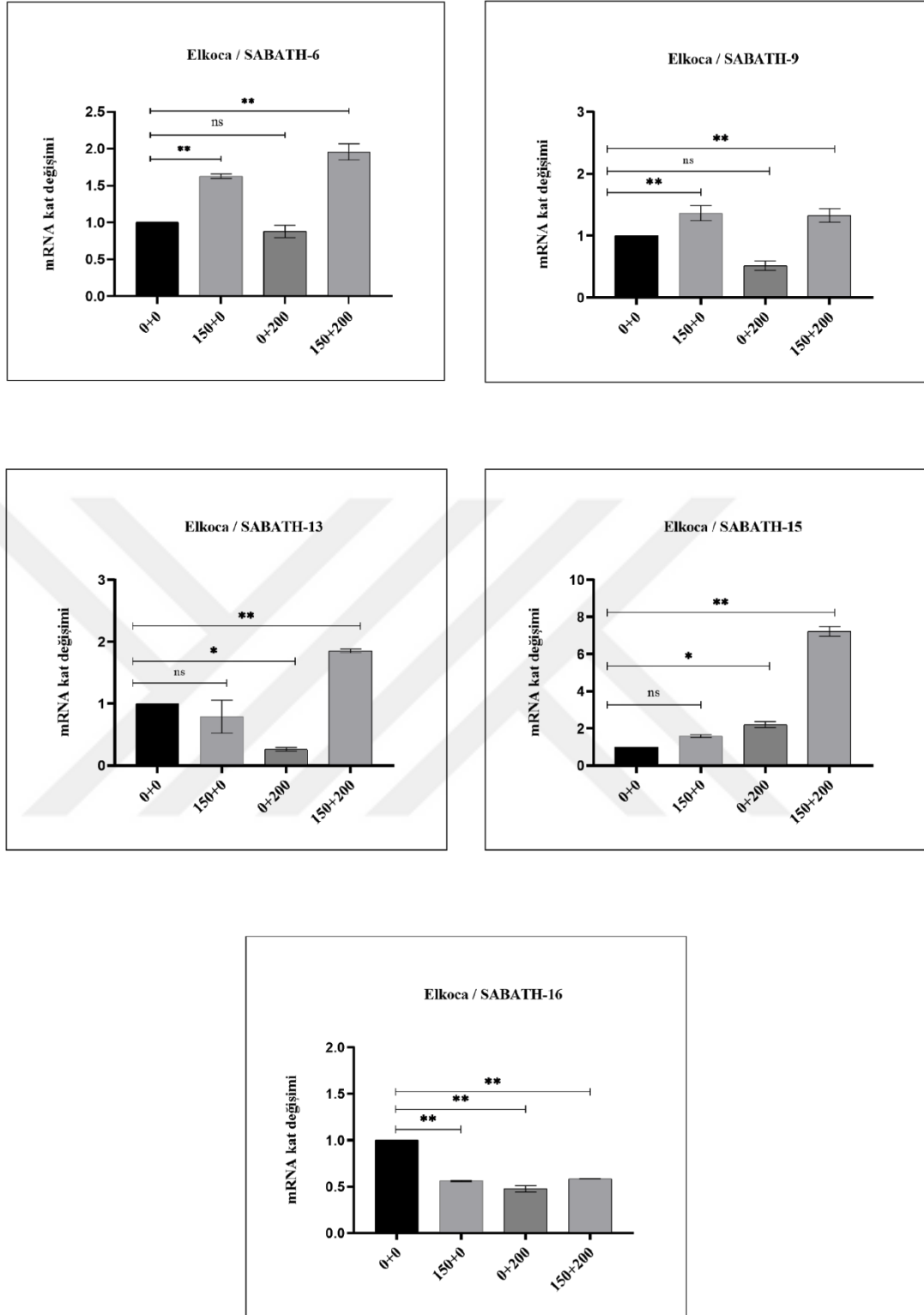
Şekil 4.13 Elkoca yaprak tuz stresi qRT-PCR

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



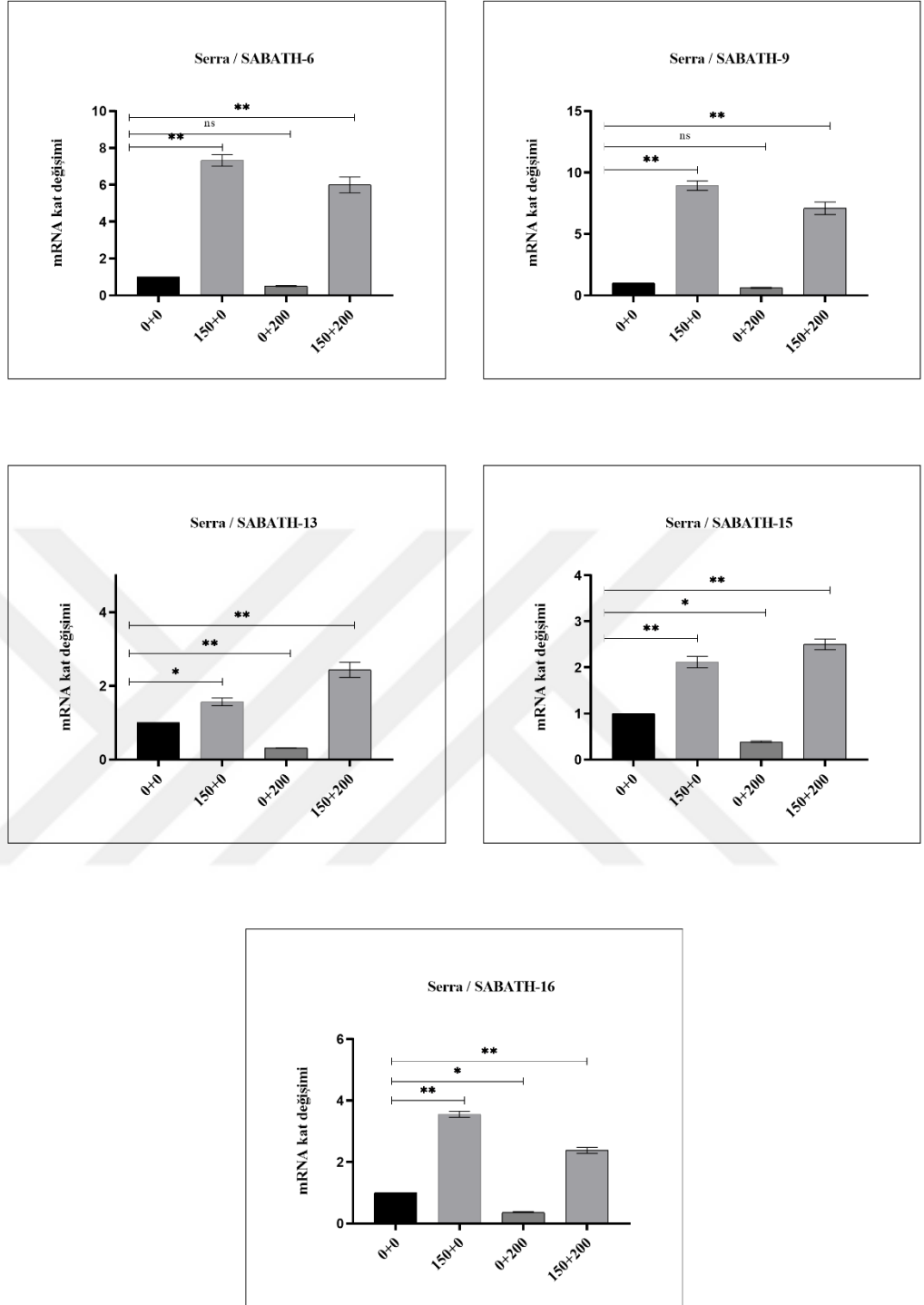
Şekil 4.14 Serra tuz stresi qRT-PCR

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.15 Elkoca kuraklık stresi qRT-PCR

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.16 Serra kuraklık stresi qRT-PCR

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sesil organizmalar olmalarından dolayı bitkiler, sürekli olarak çevreleriyle bir etkileşim içindedir. Bu gerçekleştirilen etkileşimlerin faydalı olduğu kadar zararları da göz önüne alınmalıdır. Bitkilerin maruz kaldığı etkileşimleri Larcher (1995), biyotik ve abiyotik olarak ikiye ayırmıştır. Biyotik faktörler; bitkilerin, zararlı hayvanların saldırıları, bakteri, virüs ve fungus gibi bazı mikroorganizmaların, toprak kirlenmesi, yangın ve benzeri antropogenik etki sonucu meydana gelen stres faktörleri iken (Larcher 1995), abiyotik faktörler ise; karışık çevresel şartlar nedeni ile oluşan birçok stres, ultraviyole ışınlar, radyasyon, değişen sıcaklıklar, kuraklık ve tuzluluk gibi faktörleri kapsayan durumdur (Hirayama and Shinozaki 2010).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, fasulyede S-adenosil-L-metiyonin enziminin (SAM) yapısı, fonksiyonları, özellikleri ve genetik kontrolü hakkında genel bilgi sahibi olunması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, fasulye bitkisinde (*P. vulgaris*) SABATH gen ailesinin biyoinformatik yaklaşım aracılığı ile tanımlanması, gen ve protein seviyesinde detaylı şekilde karakterize edilmesi ve bulunan SABATH üyelerinin abiyotik stres koşullar altındaki rollerinin kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile mRNA seviyesinde analizine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Erişilen sonuçlar doğrultusunda fasulye genomunda toplamda 18 adet SABATH geni tespit edilmiş ve isimlendirilmeleri '*Pvul-SABATH*' şeklinde yapılmıştır. Farklı türlerde genom çapında karakterizasyonu ve tanımlanması yapılan SABATH gen ailesinde *A. thaliana*'da 24 D'Auria (2003), *O. sativa* ve *Populus trichocarpa*'da sırasıyla 41 ve 33 Zhao et al. (2008), *P. glauca*'da 3 Zhao et al. (2009), *P. patens*'de 4 Zhao et al. (2012), *S. miltiorrhiza*'da 30 Wang et al. (2017), *P. aibes*'te 10 Chaiprasongsuk et al. (2018), *A. thaliana* ve *O. sativa*'da sırasıyla 24 ve 21 Wang et al. (2019), *S. lycopersicum*'da 20 Wei et al. (2020), *C. sinensis*'te 32 Guo et al. (2020), *B. pendula* 'da 10 Singewar et al. (2021), SABATH geni tanımlanmıştır.

SABATH genlerine ait kromozom dağılımları 1, 3, 6, 8, 9, 10 ve 11 şeklindedir. 1, 6, 9 ve 10. kromozomlarda birer adet, 3. kromozomda 8, 8. kromozomda 4 ve 11. kromozomda 2 adet SABATH geni bulunmaktadır.

Fasulyede tanımlanan SABATH proteinlerinin uzunlukları 268 ile 387 adet amino asit, moleküler ağırlıkları 30.18 ile 42.73 kDa, izoelektrik noktasının asidik bölgede bulunduğu ve 4,95 ile 6,08 arasında değerler alarak değiştiği gözlemlenmiştir. *A. thaliana*'da protein uzunlukları 348 ile 415 aminoasit, moleküler ağırlıkları 38.15 ile 47.26 kDa, izoelektrik noktalarının hem asidik hem de bazik bölgelerde bulunduğu ve 4,92 ile 8,90 arasında olduğu belirlenmiştir (Wang et al. 2019). *O. sativa*'da protein uzunlukları 287 ile 419 aminoasit, moleküler ağırlıkları 32.39 ile 47.53 kDa, izoelektrik noktalarının çoğunlukla asidik bölgede bulunduğu ve 4,91 ile 9,49 arasında olduğu belirlenmiştir (Wang et al. 2019). *S. lycopersicum*'da protein uzunlukları 127 ile 410 aminoasit, moleküler ağırlıkları 14.37 ile 45.38 kDa, izoelektrik noktasının asidik bölgede bulunduğu ve 4,8 ile 7,69 arasında belirlenmiştir (Wei et al. 2020). Bu bilgiler ışığında SABATH proteinlerinin izoelektrik noktalarındaki değişime bakılarak hem asidik hem de bazik karaktere sahip olduğu, moleküler ağırlıkları ve protein uzunluklarındaki değişen büyüklüklerde boyutlara sahip olabileceği söylenebilir.

Cannon et al. (2004) yaptıkları çalışmalarda, gen ailelerinin büyümesinde ve çoğalmasında önemli faktörlerden biri olan gen duplikasyon olaylarının, birbiriyle benzer olan genlerin açıklanmasını sağlayarak gen duplikasyonunun önemini bildirmektedir. Gen ailelerindeki genlerin kopyaları, genomda gerçekleşen tandem veya segmental duplikasyonlarının sağlamış olduğu esneklik sebebiyle gelişebilir. Pek çok yayında SABATH proteinleri için yapılan gen duplikasyon çalışmaları mevcuttur (Hippauf et al. 2010; Wang et al. 2017, Wang et al. 2019). Darwinian pozitif seleksiyonu yardımı ile belirlenen gen ailelerinin gelişimini tanımlamak, genlerin ayrıştırılması ve çoğaltılmasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Bu ilişkileri yorumlayabilmek için ise homolog olmayan (K_a) ve homolog olan (K_s) değişim oranları (K_a/K_s), tandem ve segmental gen duplikasyonuna maruz kalmış gen çiftleri ve ortolog gen çiftleri için hesaplanması yapılmıştır. Diğer taraftan K_a/K_s değeri 1'den büyük olduğunda evrimsel süreçte pozitif seleksiyonu, 1'den küçük olması durumunda arındırıcı seleksiyonu ve 1'e eşit olması halinde ise duplikasyon olaylarında doğal seleksiyonu göstermektedir (Juretic et al. 2005, İlhan 2018a; İlhan 2018b, Büyük et al. 2019; Kızılkaya et al. 2020; Kasapoğlu et al. 2020). Yapılan bu tez çalışmasında segmental duplike olmuş *Pvul-SABATH 1* ve *Pvul-SABATH 5* genlerinin K_s değeri 3,3290 ve bu genler arasındaki K_a/K_s oranı 0,1437, *Pvul-SABATH 10* ve *Pvul-SABATH 14* genlerinin K_s değeri 0,5871 ve bu genler arasındaki

Ka/Ks oranı 0,1636 olarak belirlenmiştir ve bu genlerin arındırıcı seleksiyon baskısı altında oldukları belirlenmiştir. Wang et. al. (2017) yaptıkları çalışmada, *S. miltiorrhiza*'da ki 11 SmSABATH paralog çiftinin tümünde Ka/Ks oranının <1 olduğunu ve bu genlerin arındırıcı seleksiyon baskısı altında olduğunu belirlemiştir. Wang et. al. (2019) *A. thaliana* ve *O. sativa* bitki türlerinde yaptıkları çalışmada 12 SABATH paralog çiftinin tümünde Ka/Ks oranının <1 olduğunu ve bu durumun SABATH genlerinin Arabidopsis ve çeltikte arındırıcı seleksiyon baskısı altında olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısı ile yukarıda verilen bilgiler sonucunda SABATH gen aileleri arasında evrimsel süreçte yüksek oranda arındırıcı seleksiyon baskısı altında olduğu anlaşılmaktadır.

Proteinlerde yeni fonksiyonların evrimini sağlaması noktasında gen duplikasyonları önemli bir yer tutar (Kondrashov et al. 2002). SABATH gen ailesi içerisindeki evrimsel yayılmaların değerlendirilmesi için, fasulye genomunda tespit edilen segmental duplikasyon genlerin benzer olmayan (Ka), benzer olan (Ks), Ka/Ks değişim oranları hesaplanmıştır. Gen duplikasyonlarının değişim oranları farklı türler arasında da saptanmıştır. *P. vulgaris*'deki SABATH genlerinin ortologu olan *G. max*'dan ilk ayrılmanın *Pvul-SABATH 14* geni tarafından olduğu ve 37,35 MYÖ önce başladığı, en son ayrılmanın ise *Pvul-SABATH 10* geni tarafından olduğu ve 13,30 MYÖ gerçekleştiği tespit edilmiştir. *Pvul-SABATH* genlerinin segmental duplikasyon olayları incelendiğinde ilk gen ayrılmasının *Pvul-SABATH-1* ve *Pvul-SABATH-5* genleri arasında 196,7 MYÖ gerçekleştiği ve sonrasında *Pvul-SABATH 10* ve *Pvul-SABATH 14* genleri arasında 34,69 MYÖ gerçekleştiği saptanmıştır. Elde edilen bulgular neticesinde, fasulye genomunun SABATH genleri açısından kuvvetli bir seleksiyona uğradıkları yorumunu karşımıza çıkarabilir. *Pvul-SABATH* genleri ile *A. thaliana* arasında herhangi bir gen duplikasyon olayına rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada *P. vulgaris* türüne ait 82 adet cis-acting element tespit edilmiştir. Bunlar ışığa duyarlı elemanlar, çevresel stresle ilişki elemanlar, promotor ile ilgili elemanlar, hormona duyarlı elemanlar, gelişim ile ilgili elemanlar, yer bağlanma ile ilgili elemanlar ve diğer elemanlar olmak üzere 7 ana başlıkta yer verilmiştir. Diğer çalışmalarda ise; *G. max* türüne ait 53 (Hao et al. 2019) *Junglans regia* L. türüne ait 37 (Chang et al. 2020), *Fragaria vesca*, *Prunus persica* ve *Prunus mume* türlerine ait 55 (Cao et al. 2017) adet cis-acting element tespit edilmiştir. Bu gerçekleştirilen tespitler

sonucunda fasulyede diğer türlere göre sayıca daha fazla cis-acting elemente rastlanmıştır. Bugüne kadar, kültür bitkilerinde birkaç abiyotik stresle ilgili indüklenebilir transkripsiyon faktör ailesi karakterize edilmiştir; bunlar AP2/ERF, bZIP, MYB ve MYC, çinko parmak proteinleri, HD-ZIP, NAC, vb faktörlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında kuraklık stresine karşı savunma ile ilişki olan MBS elementi *Pvul-SABATH 5, -6, -7, -11, -16 ve -17* genlerinde bulunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca hormona duyarlı elemanlardan biri olan CGTCA-motif elemanı *Pvul-SABATH 1, -4, -5, -6, 10, -11, -12, -15 ve -17* genlerinde bulunduğu gözlemlenmiştir. Guo et. al. (2020) *C. sinensis* türüne ait yaptıkları çalışmada ise MBS elementi ile ilişki 15 *CsSABATH* geni ve CGTCA-motifi ile ilişkili 15 *CsSABATH* geni olduğu bildirilmiştir. Promotörler, çevresel streslere yanıt olarak transkripsiyon etkinliğini arttırarak veya baskılayarak spesifik cis düzenleyici elemanlar tarafından gen ifadesini düzenlerler. Çeşitli abiyotik strese duyarlı cis-acting elementler, ABA'ya yanıt olarak ABA duyarlı element olan ABRE ve yüksek tuzluluk, dehidrasyon, düşük sıcaklığa ve kuraklığa duyarlı olan DRE/CRT farklı bitki türlerinde iyi karakterize edilmiştir (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005).

Pvul-SABATH proteinleri arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek için *A. thaliana* ve *G. max* bitkilerinin *SABATH* genleri kullanılarak filogenetik ağaç görsel açıdan anlaşılır bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Filogenetik ağaç *SABATH* proteinlerinin aminoasit dizilerine bağlı olarak 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile neighborjoining metodu kullanılarak çizilmiştir. Yapılan bu çalışmada *SABATH* proteinlerini A, B, C olmak üzere 3 grupta belirledik. A grubundaki diğer proteinler ile *Pvul-SABATH* proteinleri arasında hiçbir ortoloji görülmemiştir. B grubundaki *Pvul-SABATH 2, -3, -10 ve -14* proteinleri *Glyma.18G089800, Glyma.08G322300, Glyma.02G295300 ve Glyma.14G018100* proteinleri ile; *AT5G56300/GAMT2, AT4G26420/GAMT1, AT5G55250/IAMT, AT1G15125, AT1G68040, AT5G38780, AT5G38100, AT5G37990, AT5G37970, AT3G44840, AT3G44870, AT3G44860/FAMT, AT1G66720, AT1G66700 ve AT1G66690* proteinleri ile; *ObCCMT-1, ObCCMT-2, ObCCMT-3 ve PtIAMT* ile ortoloji gösterdiği belirlenmiştir. C grubundaki *Pvul-SABATH 1, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -13, -15, -16, -17 ve -18* proteinleri *Glyma.04G108800, Glyma.03G042300, Glyma.04G010900, Glyma.09G254000, Glyma.18G239100, Glyma.18G23900, Glyma.09G254200, Glyma.18G238800, Glyma.09G254100, Glyma.09G253900, Glyma.18G238900, Glyma.09G253800, Glyma.02G121000, Glyma.01G063100, Glyma.17G251700,*

Glyma.14G072300, *Glyma.01G171600*, *Glyma.02G053900*, *Glyma.16G13400*, *Glyma.02G054200*, *Glyma.16G134400*, *Glyma.16G134700*, *Glyma.16G134600* ve *Glyma.16G134500* proteinleri ile; *AT4G36470* ve *AT1G19640/JMT* proteinleri ile; *CsSAMT* ve *CsRCSI* proteinleri ile; *CaDXMT1*, *CaCCS1* proteinleri ile; *CbSAMT*, *AmSAMT*, *NaSAMT*, *PhBSMT1* ve *PhBSMT2* proteinleri ile ortoloji gösterdiği belirlenmiştir. Guo et al. (2017) yaptıkları çalışmada çay bitkisine (*C. sinensis*) ait filogenetik ağaç sınıflandırmasında belirledikleri 32 *CsSABATH* genlerinin 3 gruba ayrıldığını, grup 1 ve grup 3'ün aynı sayıda üye içerdiğini, grup 2'nin ise sadece iki üye içerdiğini göstermiştir. Bu bilgiler ışığında *SABATH* genlerine evrimsel açıdan bakıldığında genellikle 3 gruba ayrıldığını ve bu genlerin çoğunlukla *A. thalina* ve *G. max* türleri arasında ilişkisi olduğuna varılmıştır.

Pvul-SABATH proteinlerinde yapılan korunmuş motif analizlerinde 10 korunmuş motif MEME (v4.12.1) (Bailey et al. 2006) programı kullanılarak tespit edilmiştir. Belirlenen motiflerin uzunluğu 11-42 aminoasit aralığında olduğu tespit edilmiştir. En fazla motif (8. motiften ikişer tane olmak kaydı ile) *Pvul-SABATH* 5, -6, -8, -9 (11 motif), en az motif ise *Pvul-SABATH* 17'de (5 motif) elde edilmiştir. Ayrıca tüm *Pvul-SABATH* motif 1, 2, 3, 8 motiflerini içerdiği tespit edilmiştir. *S. miltiorrhiza*'da 13 farklı motiften 5 tanesinin (Wang et al., 2017), *C. sinensis*'te 19 farklı motiften 7 tanesinin (Guo et al. 2020), *S. lycopersicum*'da 10 farklı motiften 7 tanesinin (Wei et. al. 2021) ağırlıkta olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasında *Pvul-SABATH* proteinlerinin tamamı sitoplazmada bulunduğu tespit edilmiştir. *SABATH* transkripsiyon faktörü hücre döngüsünde en fazla metilasyon sürecinde yer alırken bunun yanı sıra etilen tepki ve aromatik bileşenlerin biyosentetik süreci gibi metabolik süreçlerde de görev aldığı belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli etkenler nedeniyle oluşan yaralanmalara tepki ve JA bağlantılı metabolik süreçlerde de görev almaktadır. Genel olarak hormonlar ile biyosentetik metabolik süreçlerinde, homeostazi, kök gelişiminin düzenlenmesinde, dengelenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda çeşitli abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı yanıtta da görev almaktadır. Moleküler fonsiyondaki görevleri ise çoğunlukla S-adenosil-L-metiyonin: benzoik asit karboksil asit metiltransferaz aktivitesi, 2-phytyl-1,4-naphthoquinone metiltransferaz aktivitesi, metil jasmonat metiltransferaz aktivitesi gibi

olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. SABATH genlerinin biyolojik fonksiyonu MYB, bHLH, AP2/ERF, WRKY, SPL, EIL, ARF ve NAC genleri gibi birçok transkripsiyon ve stres faktörü geni tarafından düzenlenebildiği belirlenmiştir (Guo et. al. 2020).

Pvul-SABATH genlerinin WoLF PSORT veri tabanı ile elde edilen bilgiler sonucunda hücre içi lokalizasyonu genel olarak sitoplazma, mitokondri ve kloroplast gibi 13 farklı bölgede olduğu belirlenmiştir. Guo et. al. (2020) yaptıkları çalışmada *C. sinensis* bitki türünde genlerin çoğunlukla sitoplazma ve çekirdek bölgelerinde yerleşim gösterdiği bildirilmiştir.

Belirlenen *Pvul-SABATH* proteinleri dahil oldukları biyolojik aktivitelere göre 4 gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Bu aktivitelerin STRING veri tabanı aracılığı ile katalitik aktivite, metiltransferaz aktivitesi, transferaz aktivitesi ve tekli karbon gruplarının aktarılması gibi oldu görsel açıdan iyileştirilerek gösterilmiştir. Elde edilen veriler ışığında katalitik aktivitenin *Pvul-SABATH* 2, -6, -7, -9 ve -13 ile, metiltransferaz aktivitesinin *Pvul-SABATH* 4, -6, -10, -11 ve -14 ile, transferaz aktivitesinin *Pvul-SABATH* 3, -6, -12, -13 ve -15 ile ve tekli karbon gruplarının aktarılmasında ise *Pvul-SABATH* 1, -11, -15, -16 ve -18 ile etkileşim gösterdiği belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında; belirlenmiş olan *Pvul-SABATH* genlerinin tuz ve kuraklık stresi ve iyileştirici etki olarak kullanılan melatonin uygulaması altında ifade edilme durumları RNAseq verilerine bakılarak değerlendirilmiş olup ve bu veriler ışığında *Pvul-SABATH* 6, *Pvul-SABATH* 9, *Pvul-SABATH* 13, *Pvul-SABATH* 15 ve *Pvul-SABATH* 16 genlerinin ifade düzeylerinin yapraktaki tuz ve kuraklık stresi ile ilişkili olarak farklılaştığı gözlemlenmiştir. Elde edilen verilerden yola çıkarak belirlenen 5 gene ait primerler tasarlanmış ve bu genlerin tuz ve kuraklık stresine karşı olan yanıtlarını qRT-PCR kullanılarak Elkoca ve Serra fasulye türlerinde karşılaştırmalı olarak analizi sağlanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışılan *SABATH* genlerinin ifade edilme seviyeleri tuz ve kuraklık stresine bağlı olarak iki fasulye çeşidi arasında kontrol uygulamasına göre farklılaştığı gözlemlenmiştir.

150 mM NaCl stresi uygulamasına bağlı olarak çalışılan genlerin ifade seviyeleri Elkoca ve Serra fasulye çeşitlerinde kontrole göre arttığı belirlenirken, bu artışların istatistiki olarak anlamlılık ifade ettiği genler ise Elkoca çeşidinde *Pvul-SABATH 6*, *Pvul-SABATH 9* ve *Pvul-SABATH 15*, Serra çeşidinde ise *Pvul-SABATH 6*, *Pvul-SABATH 9*, *Pvul-SABATH 13* ve *Pvul-SABATH 15*'tir. Ayrıca 150+200 mM NaCl+Mel uygulamasında, uygulanan strese göre Elkoca çeşidinde *Pvul-SABATH 6*' da Serra çeşidinde ise *Pvul-SABATH 13* ve *Pvul-SABATH 15*'te ifade seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında Elkoca çeşidinde *Pvul-SABATH 6*, Serra çeşidinde ise *Pvul-SABATH 13* ve *Pvul-SABATH 15* direkt olarak tuz stresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Uygulanan bir diğer stres olarak 150 mM PEG6000 stresine bağlı çalışılan genlerin ifade seviyeleri iki çeşit arasında istatistiki açıdan ciddi farklılıklar ortaya koyduğu gözlemlenmiştir. Bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlılık ifade ettiği genler Elkoca çeşidinde *Pvul-SABATH 6* ve *Pvul-SABATH 9*, Serra çeşidinde ise çalışılan tüm genlerin olduğu görülmüştür. 150+200 PEG+Mel stres uygulamasında ise Elkoca çeşidinde *Pvul-SABATH 6*, *Pvul-SABATH 13* ve *Pvul-SABATH 15*, Serra çeşidinde ise *Pvul-SABATH 13* ve *Pvul-SABATH 15*'te ifade seviyelerinde 150 mM PEG6000 stres uygulamasına göre anlamlı artışlar gözlemlenmiştir.

Wang et al. (2017) yaptıkları çalışmada *S. miltiorrhiza* bitkilerinde *SABATH* gen ailesinin doku spesifik ekspresyonunu tespit etmek için köklerinde, gövdelerinde, yapraklarında ve çiçeklerinde analizini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda tanımladıkları 30 *SmSABATH* genlerinde %10'u köklerde, %23,3'ü yapraklarda, %43,3'ü gövdelerde ve %6,7'sinin çiçeklerde baskın olarak ifade edildiğini bildirmişlerdir. Genel olarak bakıldığında, yaptıkları çalışmada *S. miltiorrhiza*'daki *SABATH* gen ailesinin bitkide gövdelerde ve yapraklarda ifade edildiğini ve bunun sonucunda *SABATH* gen ailesinin bitkilerin yapraklarını ve gövdelerini kemiren böceklere karşı bitki savunmasıyla ilgili olduğu kanısına varmışlardır.

Bir başka çalışmada Guo et. al. (2020) düşük sıcaklık, kuraklık, metil jasmonat (MeJA), savunma ve stres tepkisi ile ilişki birçok cis elementinin olduğunu gösterdiğinden, kuraklık (PEG) ve tuzluluk (NaCl) muamelesinde, MeJA muamelesinde

ve RNA'ya dayalı *Ectropis obliqua* hasarı altında *CsSABATH* genlerinin ifade seviyeleri incelenmiştir. MeJA ve *Ectropis obliqua* muameleleri karşılaştırıldığında, *CsSABATH* genleri, düşük sıcaklık ve kuraklık veya tuz stresine bağlı tepkilerde belirgin bir rol oynamadığını, bunun da abiyotik strese tepki olarak özel işlevleri olmayabileceklerini belirtmiştir. Daha sonra uygulanan MeJA muamelesine tepkide toplam 30 *CsSABATH* geninin ekspresyon seviyelerinde 10 genin yukarı doğru (upregule) ifade seviyesinde düzenlenirken, diğer 20 genin aşağı doğru (downregule) ifade seviyesi düzenlenmiş ifade gösterdikleri aktarılmıştır. Bu bulgular; MeJA ve *Ectropis obliqua* muamelesi uygulanan *C. sinensis* bitkisinde SABATH gen ailesinin ifade edilme seviyeleri sonucunda, bitkide çeşitli abiyotik streslere karşı savunmada rolü olduğu kanısına varılmıştır.

Tuz ve kuraklık stresine karşı yanıtları farklı olan bu iki fasulye çeşidinde çalışılan *SABATH* genlerinin ifade seviyelerinin de farklı değerlerde olması, *Pvul-SABATH* genlerinin tuz ve kuraklık stresine karşı yanıtta ve adaptasyonda, bitki savunmasında rol alabileceğini gözler önüne sermektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında;

- (i) *P. vulgaris* türüne ait *SABATH* genlerinin biyoinformatik analizleri çeşitli veri tabanları ve programları kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- (ii) Hedeflenen genlerinin iki farklı fasulye (Elkoca ve Serra) çeşidine tuz ve kuraklık muamelesi sonrası mRNA ifade değişimleri incelenmiştir.
- (iii) Belirlenen genlerin qRT-PCR verileri sonrası tuz ve kuraklık stresi ile ilişkisinin olduğu kanaatine varılmıştır.

Biyotik ve abiyotik streslere karşı mücadele noktasında ilgili genleri ve mekanizmaların araştırılması bitki biyoteknolojisi alanında yapılması gereken çalışmalar arasındadır. Bu streslerle mücadele etme konusunda strese neden olan genlerin tanımlanması, karakterizasyonu ve ifade düzeylerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Buradan hareketle gerçekleştirilen bu tez çalışmasında bitki savunması ve gelişiminde, kök büyümesinde, tohum çimlenmesinde, çiçek veya meyve gelişiminde ve yaprak dökülmesi gibi bitki hücreleri için önemli olan SABATH gen ailesi detaylı bir şekilde

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

incelenmekle birlikte belirlenen gen ailelerinin tuz ve kuraklık stresi ve bu streslere karşı melatonin uygulmasının vermiş olduğu cevaplar değerlendirilmiştir. Belirlenen genlerin qRT-PCR verileri sonrası tuz ve kuraklık stresi ile ilişkisinin olduğu kanaatine varılmıştır. *P. vulgaris* türüne ait ilk defa gerçekleştirilen bu çalışma, bitki biyoteknolojisi ve moleküler biyoloji alanlarında araştırma yapan bilim insanlarına literatür bakımından önemli bir kaynak oluşturabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Aguilera, Y., Liebana, R., Herrera, T., Rebollo-Hernanz, M., Sanchez-Puelles, C., Benitez, V., Martín-Cabrejas, M. A. 2014. Effect of illumination on the content of melatonin, phenolic compounds, and antioxidant activity during germination of lentils (*Lens culinaris* L.) and kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(44), 10736-10743.
- Ahmad, S., Kamran, M., Ding, R., Meng, X., Wang, H., Ahmad, I., Han, Q. 2019. Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. PeerJ, 7, e7793.
- Anonymous, 2018a Plant Genome Duplication Database. <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/index/locus> (Erişim Tarihi: 26.02.2018).
- Anonymous, 2021a. Phytozome Database. <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> (Erişim tarihi: 20.04.2021).
- Anonymous, 2021b. Hidden Markov Model (HMM). <http://www.ebi.ac.uk> (Erişim tarihi: 20.04.2021).
- Anonymous, 2021c. Decrease Redundancy Tool. http://web.expasy.org/decrease_redundancy/ (Erişim tarihi: 20.04.2021).
- Anonymous, 2021d. HMMER. <http://www.ebi.ac.uk> (Erişim tarihi: 20.04.2021).
- Anonymous, 2021e. ProtParam. <http://web.expasy.org/protparam> (Erişim tarihi: 20.04.2021).
- Anonymous, 2021f. PlantCARE <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant-care/html/> (Erişim tarihi: 12.05.2021).
- Anonymous, 2021g. STRING. <https://string-db.org/> (Erişim tarihi: 12.05.2021).
- Anonymous, 2021h. Sequence Read Archive <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject-PRJNA508605> (Erişim tarihi: 13.05.2021).
- Anonymous, 2021i. CIMMiner <http://discover.nci.nih.gov/cimminer> (Erişim tarihi: 18.05.2021).
- Anonymous, 2021i. GSDS <http://gsds.gao-lab.org/> (Erişim tarihi: 18.05.2021).
- Aoyama, T., Chua, N. H. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. The Plant Journal, 11(3), 605-612.
- Arnao, M. B. ve Hernández-Ruiz, J. 2009a. Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. Journal of Pineal Research, 46(3), 295-299.
- Arnao, M. B. ve Hernández-Ruiz, J. 2013. Growth conditions influence the melatonin content of tomato plants. Food Chemistry, 138(2-3), 1212-1214.

- Arnao, M. B. ve Hernández-Ruiz, J. 2009b. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 58-63.
- Attieh, J., Djiana, R., Koonjul, P., Étienne, C., Sparace, S. A., Saini, H. S. 2002. Cloning and functional expression of two plant thiol methyltransferases: a new class of enzymes involved in the biosynthesis of sulfur volatiles. *Plant Molecular Biology*, 50(3), 511-521.
- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., Li, W. W. 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34: W369-W373.
- Bartels, D. ve Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23-58.
- Bilgen, G., Erdoğan, M., Özdemir, N., Yavuzylmaz, E. 1995. Melez mısır ticari varyetelerinde izoenzim elektroforez yöntemiyle genetik saflık kontrolü üzerine bir araştırma. *Workshop Biyoteknoloji ve Bitki Islahı Bildirileri*. 17-19 Nisan 1995, 119-125, Gebze/Kocaeli.
- Block, M. A., Tewari, A. K., Albrieux, C., Maréchal, E., Joyard, J. 2002. The plant S-adenosyl-l-methionine: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. *European Journal of Biochemistry*, 269(1), 240-248.
- Boudet, A. M. 2000. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 81-96.
- Braun, P. ve Gingras, A. C. 2012. History of protein-protein interactions: From egg-white to complex networks. *Proteomics*, 12(10), 1478-1498.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., Buchanan, B., Jones, R. 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (eds). American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 149-158, Maryland.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. *Plant Soil*, 252: 55-128.
- Büyük, İ. 2014, Tuz ve kuraklık stresi altında geliştirilmiş farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinde Lea-3 Geni mRNA ifade seviyelerinin kantitatif Real-Time Pcr yöntemiyle incelenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 133, Ankara.
- Büyük, İ. ve Aras, S. 2017. Genome-wide in silico identification, characterization and transcriptional analysis of the family of growth-regulating factors in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to polyethylene glycol-induced drought stress. *Archives of Biological Sciences*, 69(1), 5-14.

- Büyük, İ., İlhan, E., Şener, D., Özsoy, A. U., Aras, S. 2019. Genome-wide identification of CAMTA gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. *Molecular Biology Reports*, 46(3), 2721-2732.
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., May, G. 2004. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 4(1), 1-21.
- Cao, Y., Han, Y., Meng, D., Li, G., Li, D., Abdullah, M., Cai, Y. 2017. Genome-wide analysis suggests the relaxed purifying selection affect the evolution of WOX genes in *Pyrus bretschneideri*, *Prunus persica*, *Prunus mume*, and *Fragaria vesca*. *Frontiers in genetics*, 8, 78.
- Chaiprasongsuk, M., Zhang, C., Qian, P., Chen, X., Li, G., Trigiano, R. N., Chen, F. 2018. Biochemical characterization in Norway spruce (*Picea abies*) of SABATH methyltransferases that methylate phytohormones. *Phytochemistry*, 149, 146-154.
- Chang, Y., Song, X., Zhang, Q., Liu, H., Bai, Y., Lei, X., Pei, D. 2020. Genome-Wide Identification of WOX Gene Family and Expression Analysis during Rejuvenational Rhizogenesis in Walnut (*Juglans regia* L.). *Forests*, 11(1), 16.
- Chen, S., Cai, X., Luo, M. 2020. Mechanistic aspects of Methyltransferases with small-molecule metabolites and natural products as substrates. *Elsevier*, 474-496.
- Clancy, S. ve Shaw, K. M. 2008. DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders.
- Conesa, A. ve Götz, S. 2008. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics*, 2008.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., Brenner, S. E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6): 1188-1190.
- D'Auria, J. C., Chen, F., Pichersky, E. 2003. The SABATH family of MTS in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. In: *The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones—Recent Advances in Phytochemistry*. Romeo, J. T. (eds.), Elsevier, 37: 253-283, Amsterdam, Netherland.
- Day, A., Dehorter, B., Neutelings, G., Czeszak, X., Chabbert, B., Belingheri, L., David, H. 2001. Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase enzyme activity, protein and transcript accumulation in flax (*Linum usitatissimum*) stem during development. *Physiologia Plantarum*, 113(2), 275-284.
- Dunnett, C. W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50 (272), 1096-1121.
- Effmert, U., Saschenbrecker, S., Ross, J., Negre, F., Fraser, C. M., Noel, J. P., Piechulla, B. 2005. Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from in vitro to in planta function. *Phytochemistry*, 66 (11), 1211-1230.

- ElSayed, A. I., Rafudeen, M. S., Gomaa, A. M., Hasanuzzaman, M. 2021. Exogenous melatonin enhances the reactive oxygen species metabolism, antioxidant defense-related gene expression, and photosynthetic capacity of *Phaseolus vulgaris* L. to confer salt stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 1–13.
- FAOSTAT, 2019. Food And Agriculture Organization of The United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim Tarihi:25.12.2019).
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 307-319.
- Gang, D. R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Pichersky, E. 2002. Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *The Plant Cell*, 14(2), 505-519.
- Graham, P. H. ve Vance, C. P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131,872-87.
- Guo, A., Zhu, Q., Chen, X., Luo, J. 2007. GSDS: a gene structure display server. *Yi Chuan Hereditas*, 29(8): 1023-1026.
- Guo, Y., Qiao, D., Yang, C., Chen, J., Li, Y., Liang, S., Chen, Z. 2020. Genome-wide identification and expression analysis of SABATH methyltransferases in tea plant (*Camellia sinensis*): insights into their roles in plant defense responses. *Plant Signaling and Behavior*, 15(10), 1804684.
- Güldüren, Ş. 2012. Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi ve Çoruh Vadisi'nden Toplanan Bazı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Tuza Toleransı. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 81, Erzurum.
- Hao, Q., Zhang, L., Yang, Y., Shan, Z., Zhou, X. A. 2019. Genome-Wide Analysis of the WOX Gene Family and Function Exploration of GmWOX18 in Soybean. *Plants (Basel)*, 8(7):215.
- Hardeland, R., Madrid, J. A., Tan, D. X., Reiter, R. J. 2012. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *Journal of pineal research*, 52(2), 139-166.
- Hippauf, F., Michalsky, E., Huang, R., Preissner, R., Barkman, T. J., Piechulla, B. 2010. Enzymatic, expression and structural divergences among carboxyl O-methyltransferases after gene duplication and speciation in *Nicotiana*. *Plant molecular biology*, 72(3), 311-330.
- Hirayama, T. ve Shinozaki, K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal*, 61(6), 1041-1052.
- Hiz, M. C., Canher, B., Niron, H., Turet, M. 2014 Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. *PLoS One*, 9(3): e92598.

- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue): W585–587.
- Huangfu, L., Zhang, E., Fang, H., Li, P., Xu, Y., Chen, R., Zhou, Y. 2021. Exogenous melatonin promotes rice seed germination under salinity through regulating antioxidants and metabolic homeostasis. *Research Square*.
- Ibrahim, R. K. ve Muzac, I. 2000. The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches. *Recent Advances in Phytochemistry*, 34, 349-384.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A., Bantignies, B. 1998. Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology*, 36(1), 1-10.
- İlhan, E. 2018a. Genome-Wide Characterization and Analysis of SBP Transcription Factor Family in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(5), 5467-5480.
- İlhan, E. 2018b. *Eucalyptus grandis* YABBY Transkripsiyon Faktörlerinin Genom Bazında Analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 5(2), 158-166.
- Joshi, C. P. ve Chiang, V. L. 1998. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, 37(4), 663-674.
- Juretic, N., Hoen, D. R., Huynh, M. L., Harrison, P. M., Bureau, T. E. 2005. The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. *Genome Research*, 15(9), 1292-1297.
- Kabiri, R., Hatami, A., Oloumi, H., Naghizadeh, M., Nasibi, F., Tahmasebi, Z. 2018. Foliar application of melatonin induces tolerance to drought stress in Moldavian balm plants (*Dracocephalum moldavica*) through regulating the antioxidant system. *Folia Horticulturae*, 30(1), 155.
- Kagan, R. M. ve Clarke, S. 1994. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2), 417-427.
- Kapteyn, J., Qualley, A. V., Xie, Z., Fridman, E., Dudareva, N., Gang, D. R. 2007. Evolution of cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *The Plant Cell*, 19(10), 3212-3229.
- Kasapoğlu, A. G., İlhan, E., Kızılkaya, D., Pour, A. H., Haliloğlu, K. 2020. Sorgum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Genomunda BES1 Transkripsiyon Faktör Ailesinin Genom Çaplı Analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(1), 85-95.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, İ. 1993. *Biyokimya*. Derya Kitapevi Yayıncılık, 90-134, Trabzon.

- Keleş, D. 2015. Fasulye Yetiştiriciliği, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocol*, 10, 845–858.
- Kızılkaya, D., Kasapoğlu, A. G., Hosseinpour, A., Haliloğlu, K., Muslu, S., İlhan, E. *Sorghum bicolor* L. CAMTA Transkripsiyon Faktörlerinin Genom Çaplı Analizi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 51(3), 267-278.
- Kolosova, N., Sherman, D., Karlson, D., Dudareva, N. 2001. Cellular and subcellular localization of S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers. *Plant Physiology*, 126(3), 956-964.
- Kondrashov, F. A., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. 2002. Selection in the evolution of gene duplications. *Genome biology*, 3(2), 1-9.
- Köllner, T. G., Lenk, C., Zhao, N., Seidl-Adams, I., Gershenzon, J., Chen, F., Degenhardt, J. 2010. Herbivore-induced SABATH methyltransferases of maize that methylate anthranilic acid using S-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiology*, 153(4), 1795-1807.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, 506, Berlin.
- Letunic, I. ve Bork, P. 2011. Interactive tree of life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, 39: W475-W478.
- Li, J., Liu, J., Zhu, T., Zhao, C., Li, L., Chen, M. 2019. The role of melatonin in salt stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1735.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25(4):402–408.
- Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., Sandberg, G. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. In: *Auxin Molecular Biology*. Springer. Perrot-Rechenmann C. ve Hagen, G. (eds), 249-272, Dordrecht.
- Ludwig-Müller, J., Jülke, S., Geiß, K., Richter, F., Mithöfer, A., Šola, I., Bulman, S. 2015. A novel methyltransferase from the intracellular pathogen *Plasmodiophora brassicae* methylates salicylic acid. *Molecular plant pathology*, 16(4), 349-364.
- Markert, C. L. ve Moller, F., 1959. Multiple forms of enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45:753-763.
- Maury, S., Geoffroy, P., Legrand, M. 1999. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-

- hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiology*, 121(1), 215-224.
- McDonald, M. B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27(1), 177-237.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7):621–628.
- Mudgett, M. B., Lowenson, J. D., Clarke, S. 1997. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants (phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds). *Plant Physiology*, 115(4), 1481-1489.
- Murata, J., Roepke, J., Gordon, H., De Luca, V. 2008. The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *The Plant Cell*, 20(3), 524-542.
- Murch, S. J., Alan, A. R., Cao, J., Saxena, P. K. 2009. Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *Journal of Pineal Research*, 47(3), 277-283.
- Murfitt, L. M., Kolosova, N., Mann, C. J., Dudareva, N. 2000. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(1), 145-151.
- Müller, B. S. F., Jr, G. J. P., Valdisser, P. A. M. R., Coelho, G. R. C., Menezes, I. P. P. d., Abreu, A. G., Borba, T. C. O., Sakamoto, T., Brondani, C., Barros, E. G. ve Vianello, R.P. 2015. An operational SNP panel IntPvulted to SSR marker for the assessment of genetic diversity and population structure of the common bean. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 1697–1711.
- Noel, J. P., Dixon, R. A., Pichersky, E., Zubieta, C., Ferrer, J. L. 2003. Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In: *The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones—Recent Advances in Phytochemistry*. Romeo, J. T. (eds.), Elsevier, 37: 37-58, Amsterdam, Netherland.
- Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. 2001. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants gene isolation and enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8213-8218.
- Ogawa, M., Yoda, H., Kusano, T., Sano, H. 2000. Cloning and characterization of a TMV-responding gene encoding a WRKY transcription factor from tobacco plants. *Plant and cell physiology*, 41, s86.
- Özkan, G. 2018. İspir fasulyesi (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinde SSR moleküler belirteçler ile genetik çeşitliliğin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Tahıllar ve Yemeklik Baklagiller Bilim Dalı, 64, Erzurum.

- Pekşen, E. ve Artık, C. 2005. Anti besinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(2): 110-120.
- Pytka, K., Młyniec, K., Podkowa, K., Podkowa, A., Jakubczyk, M., Żmudzka, E., Filipek, B. 2017. The role of melatonin, neurokinin, neurotrophic tyrosine kinase and glucocorticoid receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports*, 69(3), 546-554.
- Qin, G., Gu, H., Zhao, Y., Ma, Z., Shi, G., Yang, Y., Qu, L. J. 2005. An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *The Plant Cell*, 17(10), 2693-2704.
- Qu, L., Li, S., Xing, S. 2010. Methylation of phytohormones by the SABATH methyltransferases. *Chinese Science Bulletin*, 55(21), 2211-2218.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R. 2005. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(2): W116-W120.
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D., Douce, R. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7805-7812.
- Rodwell, V. W. 1993. Enzimler: Genel Özellikleri. Harper'ın Biyokimyası. R. K. Murray, P. A. Mayes, D. K. Granner and V. W. Rodwell (eds); Çeviren: G. Menteş, B. Ersöz, Barış Kitapevi, 73-86.
- Ross, J. R., Nam, K. H., D'Auria, J. C., Pichersky, E. 1999. S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 367(1), 9-16.
- Sadak, M. S., Bakry, B. A. 2020. Alleviation of drought stress by melatonin foliar treatment on two flax varieties under sandy soil. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(5), 907-919.
- Schmutz J., McClean P. E., Mamidi S., Wu G. A., Cannon S. B., Grimwood J., Jenkins J., Shu S., Song Q., Chavarro C., Torres-Torres M., Geffroy V., Moghaddam S. M., Gao D., Abernathy B., Barry K., Blair M., Brick M. A., Chovatia M., Gepts P., Goodstein D. M., Gonzales M., Hellsten U., Hyten D. L., Jia G., Kelly J. D., Kudrna D., Lee R., Richard M. M., Miklas P. N., Osorno J. M., Rodrigues J., Thareau V., Urrea C. A., Wang M., Yu Y., Zhang M., Wing R. A., Cregan P. B., Rokhsar D. S., Jackson S. A. 2014. A Reference Genome for Common Bean and Genome-Wide Analysis of Dual Domestications. *Nature Genetics*, 46: 707-713.
- Schröder, G., Wehinger, E., Schröder, J. 2002. Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases. *Phytochemistry*, 59(1), 1-8.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Do-Choi, Y. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-

- regulated plant responses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(8), 4788-4793.
- Sharma, A. ve Zheng, B. 2019. Melatonin mediated regulation of drought stress: Physiological and molecular aspects. Plants, 8(7), 190.
- Singewar, K., Moschner, C. R., Hartung, E., Fladung, M. 2021. Genome-wide bioinformatics analysis revealed putative substrate specificities of SABATH and MES family members in silver birch (*Betula pendula*). Silvae Genetica, 70(1), 57-74.
- Sinha, A. U. ve Meller, J. 2007. Cinteny: flexible analysis and visualization of synteny and genome rearrangements in multiple organisms. BMC Bioinformatics, 8(1), 1-9.
- Suyama, M., Torrents, D., Bork, P., 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. Nucleic Acids Research, 34: W609-W612.
- Şehirali, S. 1988. Yemelik Dane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Kitabı, 314, Ankara.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R. J. 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. Journal of Experimental Botany, 63(2), 577-597.
- Taşpınar, M. S. ve Tosun, M. 2002. İzoenzim Elektroforez Tekniğinin Bitki İslahında Kullanımı/Use of Isoenzyme Electrophoretic Technique in Plant Breeding. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 33(4).
- Thapar, N. ve Clarke, S. 2000. Expression, purification, and characterization of the protein repair L-isoaspartyl methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Protein Expression and Purification, 20(2), 237-251.
- Thapar, N., Kim, A. K., Clarke, S. 2001. Distinct patterns of expression but similar biochemical properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase in higher plants. Plant Physiology, 125(2), 1023-1035.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25(24): 4876-4882.
- TUİK, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr/Start.do> (Erişim tarihi: 25.12.2019).

- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Ma, C. J. 2007. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *The Plant Cell*, 19(1), 32-45.
- Voorrips, R. E., 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1): 77-78.
- Wang, B., Li, M., Yuan, Y., Liu, S. 2019. Genome-wide comprehensive analysis of the SABATH gene family in *Arabidopsis* and rice. *Evolutionary Bioinformatics*, 15, 1176934319860864.
- Wang, B., Wang, S., Wang, Z. 2017. Genome-wide comprehensive analysis the molecular phylogenetic evaluation and tissue-specific expression of SABATH gene family in *Salvia miltiorrhiza*. *Genes*, 8(12), 365.6.
- Wang, P., Yin, L., Liang, D., Li, C., Ma, F., Yue, Z. 2012. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*, 53(1), 11-20.
- Wasternack, C., Hause, B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 72(165-221).
- Wei, X., Tao, K., Zhang, J., Lu, S., Chen, S., Liao, J. 2020. Identification of SABATH Family Members in *Solanum lycopersicum* and Their Expression Patterns Under Abiotic/Biotic Stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-16.
- Wei, Y., Zeng, H., Hu, W., Chen, L., He, C., Shi, H. 2016. Comparative transcriptional profiling of melatonin synthesis and catabolic genes indicates the possible role of melatonin in developmental and stress responses in rice. *Frontiers in Plant Science*, 7, 676.
- Wery, J., Grinac, P., 1983. Use of Legumes and Their Economic Importance. In: *Technical Handbook on Symbiotic Nitrogen Fixation*. FAO, Rome, Italy.
- Woodward, A. W., Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735.
- Xu, G., Guo, C., Shan, H., Kong, H. 2012. Divergence of duplicate genes in exon–intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1187-1192.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 10(2), 88-94.
- Yang, Y., Yuan, J. S., Ross, J., Noel, J. P., Pichersky, E., Chen, F. 2006. An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 448(1-2), 123-132.
- Yang, Z. H., 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586-1591.

- Ye, Z. H., Kneusel, R. E., Matern, U., Varner, J. E. 1994. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *The Plant Cell*, 6(10), 1427-1439.
- Zhang, C., Chen, X., Crandall-Stotler, B., Qian, P., Köllner, T. G., Guo, H., Chen, F. 2019. Biosynthesis of methyl (E)-cinnamate in the liverwort *Conocephalum salebrosum* and evolution of cinnamic acid methyltransferase. *Phytochemistry*, 164, 50-59.
- Zhao, N. 2008. Comparative Functional Genomics of the SABATH family of Methyltransferases in Plants.
- Zhao, N., Boyle, B., Duval, I., Ferrer, J. L., Lin, H., Seguin, A., Chen, F. 2009. SABATH methyltransferases from white spruce (*Picea glauca*): gene cloning, functional characterization and structural analysis. *Tree Physiology*, 29(7), 947-957.
- Zhao, N., Ferrer, J. L., Moon, H. S., Kapteyn, J., Zhuang, X., Hasebe, M., Chen, F. 2012. A SABATH Methyltransferase from the moss *Physcomitrella patens* catalyzes S-methylation of thiols and has a role in detoxification. *Phytochemistry*, 81, 31-41.

EKLER

EK-1 *PvuI-SABATH* gen ailesinin cis-acting elementlere ait protein dizileri

>*PvuI-SABATH-1*

tatattatagagtggtcattatgcaatatttattatattgaggtttaatga
tatattcaaccatataataacataatgagagtgatgaatataatcaagtaataa
ttagtaatttatattcatgaaattatataaaaaattattatgtgttacgaatttt
gaataactattcattaggttataaaagggtcttgagacatcgtagctgttagaatgg
agttactctactttattgtgatcttaaacattfgaaagttacaatccaaaaattga
ctcagagacaagttccaagatctgatccagagacaagttccaagatctgaccgagagtg
ttgacgagaacaaaaacaattaacattgtatatttattgtgatgagatgataatatt
gatagattatacctaattatacatatataataatattatggttagttatattgtta
attaaftaactcacctactcttttttttagcctgcttagtataattttgagtgga
agtaggtggtgagctgtgagagtttagctactctttttttattatctttattct
aattgtatagctgagaaaaaaactaattattttaggtataaacacatactaataag
gtaacagataataatattatgtattttaggagacgtaaaactagaatcctagca
tgctttgaaaaaaggagagttttgatttaataaaatttattgaaataataaataat
agaatacaatttttagttaattatcattttcttacgttttaaacatataaaagttt
gaacggttggaatatttttaataaaaataagtaaaattttagttgaaatatttact
cctaataaagtaaaagctttttatcgtggttctaaaaaatcagaaaagttgtttca
tttagaaccacagttatataatttttagaatttgagagataaaaataaaataaaat
cacatgtaaaaaataaaataaaatcaaaagttactattttgctgaatataataagta
aaaaacatttttataaaagttaaacaataatttaacaatcctaactaaatgtgtgt
tagagtttagaattataaatttatgggctccagaactacctaattataatagaat
aattttaaaaatataataatagggaatataatagattagattataatftaaaaa
ataaaaaattataatftaaattagttttatataataaataatfttaaaattgat
atctaattagctaaaatttgatagctaatttagtactactatttattgataatataa
ctaatttagtactaatagttttctaataatctaaaatagtgataatttagttaatag
tgactaattttttttctctaaaataatttttatttaagattttcttataatgat
gattataaaaatttaaaactaagaaaaccattaaatagaaatagcaaaaaagaat
tggtgttatatcactaaagtaggtagattatacaaaataattgatataaaattag
ttttactattcataaatagttttaaaaataatfttaattggtaccaaaagtttaact
accaattatcaaaagtttcaaaaataaataatgtaataatftattttatgctctaaa
tttttataataacttttttataatgaatcattaaaatcaattaaagttataaataat
aaaagtgacccaaaataatataaagaacgagtaggtatgatataagaagcgtg
atacttgacaaccctattatataatcatttattgaatgtgatattagggtatacaaaa
aaagagttgcatctctctctttttggttcttattctttcttggtaaaagttttat
gacctctctattataca

>*PvuI-SABATH-2*

tattgatataattgaaatattttatcttattaatataatattatgtgaaaataattt
ttttattaggcaaaaaagacttagtgatttttaaaatttaataatcagtttcattagttt
cttattgctccactgtgagaaaattaacgtaaccatattttccccaccataatatt
cttctcaatagttacttttttaagaggaaagttatgtatgaaaagccattttgaaaa
aagagaagaggttaataataatcttagagaaaaatftaatccgaaataaagttcatt
aatgaaataaagggataaagttgtttatggaagaaatggatgagagagaatacagaga
tagggcactttacttttttaacaaaaagtttaactfttaattactaatatttatcgat
aaaaaagaaaaataatftaaaataagttgactattataagtaatttaataatgat
atttatataatataatatttatttttaatacaataaagaatcgttaatagac
tctaataaatttttagtaacataagttataaaaataagattgtatgttatgaataatc
tctaataaaaatgtgaaagttacaattacaatagtttgacacctttttgtgcttca
agataaacgctccaagaagaaaaaaaactatacacatagcacaagatcccgtataa
aaaaaacagaagaaaaaggccagcagaaaaacaaaaagggccacagcccacaacaaaa
aactaagcccaaaagactaaatagaagcccaaaactaaacttaactgaaaacagactg
attttctgaccttacttctgtgtcacctccataccaaatatagaataacct

ttatcctttgtgccaccctctaatcttgaagatgttttgaatccataagtattct
ttagattatgaaatctggaagctttttgaattgagataagtctatgacttatgtaa
tctgtcacacatttgaaaaaagactcttgattgcataatccagaagctaacttaatcc
agaaaaagacttccgattatgtaacttgaagtaatacaacatttgaaaaaaggcttc
tgattatataatccagaactaatcacaagacttccagattacataatttaaatat
taaagaaaaatattttagaattaaaaacttatgggtggcacaagaaattatggaactg
cagaagaagcaatccttaaacattatcacaaccaatcggcttcatgttcatat
ttatgttttataataaaattttaaactgtcaaatgataaataaacactggagtgat
tacctaattgagattctatgcttgcataactatataatcggaaacttttttatttaciaa
agtcaatgttccaacaatcatagaaaatgaaatataacttttatagacaaaatgtat
aaacaaaagaacattgtataaattgttttattttgttttcccttgccttcacaagtc
caatccagataacctaacaacgtcgattaatgcaattgaaatttttcaatgataca
atgcatagaaattttgtatataafacaagaataattgatttttttcatacaaatata
aaaatttaaattctaacttaacctagatatttgcacaacacagtgacggtgg
gtccagggttgtaggtaaaccaacaactcttataattttgaaagttgaggaaatgac
atftttgatggcttactttaaattcttggataagcaattttgtttacgtatgata
aaaggataaaaaagttcaacatgttcataaacattttcagttactatgacacat
aaaataattttttattatgtcttcaactacactctccattatgaaagaatgctt
catgagttatcgtgaaaca

>PvuI-SABATH-3

tttggctctaaaaattggttctatttcatggtttctttagtgtaattttaaagtc
tacaataattgattatttactaaattaaagataatttataaactaaaaaattat
tggtatttaaagctttttattataaaaaagttataaaatagtttcaattgtta
ttcaaatagttttattagcttttagaaaataattataatctaaaatataatagc
taaaatctgataaatttagataccaattaaaaataatttagaaaataattttta
ttaataataaaaactattttagataataataatttttaactctaaaatagtatcaat
ttagtataataaactaatttttttactaaatttagtactatgattacttat
tatttattttattgtttaaactcaacttgagtgataagttgtagtttttcaactt
tagtagacatgccacataatcaaataaacacttaagaagataattttttttaaac
ttcattttaaactaacgtgagcaagcaaatgaaggagcagaaagtataaacgcttc
atatctgttattttaaataaattgatttttttaccgaaatgcggtatgcttga
ttactttgaaagaaggtttgactaattctatagataattttaaataaaaaagt
aaagcttcagataggttttcaaaatttagacttcaataaatatgtataatagat
aaagtgcacagacaaaagttctgtattgtcacaataataacaatgttgcataaa
tcaaaagcacataatcaatttcaatcacaanaatgtttgataactaatgaaattatc
tatcaaaaagaacacataatactttgaaagaacaaataggaatataattttata
tagaaagaataatctttaaactgttatatagaaactcaaaagggaacaatttgaac
ataatattctcattaaagcttattgttttatgttatttttcaagagaagc
tcattaaagcttattgttttatgttatttttcaagagaagctcattcgtat
tcaaaaccatataagctcttagtaaacatattggaagagatgcaatgtaagatcttg
tagtgacaatgttactagatcctaacatttttttgaagcaatggttatcttgaag
atctataagaaggaatcaagatgaagataataaatttttttacaagtgctataca
accctcgagctgcattagaaggtttttgtgagtagtaaaaactttgtatttgacca
tctttctcatgtattgacctttttacaattcgtataaaactcagactttaaatt
gttgaacacttagcctagcctagaagaaatacagaataaaaaaaaacattttta
tgaggaaacgtctccaataaatctctctctcccactaattgagggtatcaataat
taactctctacgaccatagcttttaacagaattgtcttgatcaacgtctagtggat
ttcaaaagaaaaaaaatattatctatcgtatcattttaaactaaaacattaa
tcgttcaagatcaagatattatagacagtaattctatttttaaacatcctc
cttactcaattactgaaaaggaatagccattgatctgaagttcaacaatagccatag
attatagattcttaaccaggtcatgatggcacaacaatgggtccaaagggtgaacct
aaagccacaagaatgccattttatgcctttatatactttaaattatctttaaagt
gaaatcgaagttcctgagacaacctgaaagggaagggtaataaacttgagattac
attaatgcatgttctatgg

>PvuI-SABATH-4

ggttatttcaaacgacaatcattttatgaaaatttcaactcatagattttgctgag
gttcttaaacctatgatgtttacggagggttttaaacctatgatttcaacagggttc
tgaaggcttttctgaggtttaaatactccgaaaaaacattccccaggaatggtta

gcggggaaactgcaaccttaggtaataacttaataagaggtttaaccttfgataatg
aaaaataaacttctgtttaaaccattttctgtaatgattctaaaaatacaagggtat
acattaaaaataaatgataatataataaaaaatagtgataataatgataatgagtt
ataaaaaatattttcaaaaataaattaaattattttatttaaaaaataaaagt
agtgttcaaaaataaaatgagagtgaaactataaaaattaaaatatcatatttcaac
tagttatacagtttttaataaaffaaactaaaataaattgggtgcaaaagtttt
atacaattgatccaagtgaatacaaaatttagtttagttcatactttatgaacaacct
aataaaaaaaaggatattggctagttgttttgcataaggtatgaagaagaagagg
tttgtttttatggagagaacatattcttaactcattattgatggagttcaaaagtcg
gccaaaccaaaccctaggttaataataatgatggacctctcattccaaagtttca
accaatcacgctcaacaccttttctgcaaaatttctagttctattgagcaaacac
ataattttgacactttataattgagaataaccttcttctgcaatttttataaaaa
taaatttaagtttaactttttataaaagtaatttataaaaaataaattattga
attataaaagtattgtttcaagataattatcgatcatctataattacataatctata
tgtaattcacaatctatacgaagaaaaataaaaaacgtgaatcaaaagcttactt
tattaaaaataaaaatactttacaatatagaattgatataaaatttacttataaatt
aattttataaaaataagttaaactcataaaatttaattgtaataattattattgtgt
ctaactaccaacatttaccgcaattcccagagtgctcaattggtaacctgacctcc
aaaactggacctttttcatgctcaagcactggcgtgggacaaattatggtcctgtt
gaaaattcgtgtttcccagtgcatgtaggaatgattgaatgaattatcatgacaacata
ccatccactaagcaccacattttccacactgtcaacaacccattgctcgttctctata
ttcaataacatttttttcatcactttacgtgctttttaggagaatcaccacaaaa
ttcaaccataatcaataaaaacatccaattcacaccatttccattatgaattttt
atataacttctcaactcatggttataatcaatggaatagtttagactggaatcagatt
atatactgtagagggtaagtgatcaccacaacatagatgatttatgtatctgcaa
cacaactcaggctcactggttaactaaaacaacatctgatacaccagtgaggtaactg
aataaatggtttgaatttaaggaattgtgtgctgtaaaatacaatataaattaccat
ctaaagctatactgatttgatggactcaaaagttgtgatccagacaaaaggcagtgact
agcaccatcaaaagttggtccaactctactcaatcacaggcccttcaacaaatgatc
aaactttcggggacaaaatagtgaaatcactataggacttccactcaatgatgcc
taacatcaacttttgaca

>Pvul-SABATH-5

aatgacatttaatatataaaatcaacctcaattttctcattaacaaaaatgtttt
agaagaatgcaatagcttattatattgatttagaaatgaaattataaagaacaaaaac
ttgatagttttagtcaatcaaaacaaagcttagggaaaaaaattcacaactttaattat
taaaattatatttataataataaaatcactttaaagtatttaataaataattat
tatttaacaaatagaacaaaacactctaaattgacttaagactcaataatttaata
tattaaaaagtttttaatacattaaacatagtaaatgctcactttcaagtttat
attatttaattggttaattgacatattgtaaaatatttctaaattttgtcatca
aaactaagaacatctaaatagattaaaaatctattttaataatcaattaaacccagt
gcatatgattaaactcatgacaaacataacacattgattaaatcactattgaaagtc
ctcaacaacttttaggttagaagttccaccacttgaactttatcatatagtcactgc
attgtagagtattcaaaatgatcactccaatttcttacctatagtaaaattgtagatga
taagatgtaagttagaataaaaaatataaaaaacataaattgaattaaagctaat
tttattaaaaatacaagaaaaaggatacaaaatattttatgatttaattttttcat
ttatatgttattattatttagtaaaaaagaaaactatttgacgtgtgagaagagag
aggaagaagaaaaaagaaatgttggagtgagatggatataacttaaaatgtgtgg
atgtgattctattgaaacatgtgattcatctgtacgaagattatgatgtctacggatt
tgcaacattgctgatttaattcgttccaactgacacactttgactttttgtgga
gtaagttgtttttattttatfaaaatcaatttttgaataaataaataatg
ttgaaagcactgaattgtaataactcacttttaataactatattaattttattt
ttattataaattgagaataaaaaatgatttttaatttttagtfaaataatattt
aaaaaataattacgtattttatctattfaaaatctgaatgataaaaaataaataaata
tttaataaacatacaaaaataaaaaataaataaataaataaagaagaagaata
acaacaaaaataaaaaataaaagacattattataaacatttaataataca
aggaaaaagaagaagataaagaataatgaatgaaataagaaaaaaatacaaaaaat
gaaattatagccatgacaatgggtaaaagggaacatatacagttgacattaataatga
aagagaagaagaaaggaacaaagttgtgttgaagaagatgctaataatcat
tttattataaattccaaccttctttttatattttcattgaaatactattttt

ataaaaaacatccactcaaaagagatgtgtggtgtagattgaatctttggcagaat
atatctccaaaaggataaaacattcgtgaactttggaagcaaaaagaatataaaaagt
atcaaaagttgaataactttatgtaactttttatattgtcatctttctttacatag
aaacatgtggaagatgagaataaaaacagtggaacttaccattataacaagttggactttc
cattfacagcaagacacaggaagtgtttgtaaggaggaataaaagtttagacattttt
tttaatacactcctttcatattcttacgaaatattgaaaaacaaaacacctgtcaa
gagagaggttcaactttcttcgaagaattgagtgaaaatattatataaaaaatagtt
taatgcatatattaagaaagtcttaataataaattataaataatttgatattgta
agaataaattttaaattfaactcaatctacatctcaattataagatggtgagatttg
tattcattatagctataaattttttttttgtatgatcttaataacatataac
atcgaccttagttatcatattttttaactggaaattgaacctaaaggatacatata
ttaggaatacattatacaaaaattgtgaacactagtgtgaaaaaaaagataaaaaata
aatatttaaaaataaaaataaacttatatttttaatacgaatttaattatgcaa
gtattttttatattgttaattcgaataagaatctttcttaataagataatftt
ttgttcactttaaagtcagttgtgtcatataaatttctgtttttataagattatc
ctgttaaatattattgactttctcatagggattattagcctgaataaaaaaattat
aattagtgttaattttgaaataaataaataatttctttcacgtgtaaacacct
atggtatgtaagaaacatgattttgttgtaaaaaatgagtatataagtgcatgtag
tatgaagttggatgacacga

>PvuI-SABATH-8

ggaaacaatagataaccacaaaattctaaatttttaaaaatttattgttttttt
attaataatattttaaactttttattatagtaaaagggtatgtttttttcttt
tcttaccatcatccaagccaatggttacacctataaagacggtgaaagggtctaca
tcaaagtaccctatgtttataacacttacaactcaagatgtacaagtgagcatctaaag
catgtacaagtgagcatctagagagagtgctactatatacggagtatctaatgttact
caatgcatcaattacattttataaatttaattattgtaatttaattattgtattgt
atcgattttttcttcttattattattttacgaattgtgtgtttgtttgt
ttggaattgaaatgtttacatcatcgttaaatgataattgtgaaattatcaattgag
gaaatgtgtcactctcttttaataatgagatgtttgtccaatatttctactagaaaat
aataaattcatttttaataatttgcacatcaattacccttaattttattgtatcatgt
tttttaattattatgattttactcatttacgaaaattgtgtgtggtttattagaaac
acaccaattcttataatgttaaatgataattgttaagtaccaaaatgcatatatt
tcactctctccattattgaggaggtatattataatattgaaatgaaaaaaaatag
taaattcatttttaaatattttgcatttttatattttataatatttaatttttat
gtatattattttataattatttactcatttacaaatfacatgtttgtctcattggaaa
ctaaaatgtttagtaacaatataatgataaactgagtcacaaaatgtgtactcatt
tcactctctcaattattgagatattgtccaatatttaatttaaaaaacaataatftt
atfttaaatatttttaaatatttaatttttagtgcacatatttttaattattatt
attataaatgaaaagtgataaataaggtaaatgctataaatctggtaacacgatatt
caagtaattatatttagtaagatattgtaaaagtaactcataagcaaaaataacaca
taattgacactataaaaagcattgtcacacaaaaataaggtatgcttttataatata
aatcactcttatataaaaagtatttactttatcgttggaagaactttaccgttfaactc
cgaccgagtagtagagcagtagtacaagaaagggaagagaagtagccaggtacaagag
acaatggttcaaacagggaagattagacaatctagaatcaatttttaaaaaaatttaa
attataagagaagataattgaaagtataataatgaagaaaaaattgtgagtgga
tttaattaataataatttttaaaaaatataatattataaaaaataaccaaacaacat
aaccttagaaattcaacctaaagataaaagataaggtaattataagaacaaaatgaa
attatagcattatgactaaaaagggaacagttatataaccgctgacatttatgaaga
aagagaacgagaaggaacaaaattgtttgtgaaaaagtagctactaattatcatt
ttactacaattcaacttctttctgtttcactcatttactccatttaataaacct
tattccactttaatttttctctctgtatttttctcctcaccatttttat
ccaagcatcaaaacaaagggtaaggtcgttatcaactcactatgttcgatgtttc
tgactttaatgaatagcctaattgtagttaatatatagtttgcaaccagaagttctc
agtaataaggaccaacatt

>PvuI-SABATH-9

aaactctacccctggtcagaataatatacaaatgcggttatttttaataaccacatt
gtaaactcaattttataaatgctgattctatgaccgattttgtatatctccgatttacgaat
gcggtgcgatcaaatgtgtctataaccgatttgtagatgtaaaatgaccgatttat

tttacatttaccatcattaaatgataattgagttatcaagagtggaatgtgtcact
cttttfaatgattgatgtttgtccaataatttccactagaaaataataaattcgtttt
taaatatttgcacatcaattacccttaattgtttattgtatcatgttttaattattat
gatttactcattacaaaaattgtgtggtggtttattagaacagaaaaattctta
aagtgtcaatgataattgttaagttacaaaatgcatatctttcactcctttcca
ttattgaggtatattctaattttaaattgaaaaaaaaatagtaattcattttaaat
atfttagcatttttatattttacaatattaataattttgtatagatttttaat
tattattactcattfacaattgcatgtttgatcttattggaactttcgtacaat
atfaaatgataataactgagttaccaaaagggtagctttcactccttcaatgat
tgagatatgttcaatatttaattaaaaataatttttaataattttacaata
tttaagtatttagtgcataatttttaattattattataataaaaaacgtgat
aaatcagataatgtfataaatccagtaacacacaatattcaagtaatgatgttttag
caagatagcaaaagatggatattaagtacaaccataagcaataaccattacgag
tactataaataagcattgacacacaagaataagctatgctttatcaatataatcat
tctfatacaaaaacatttactttatcgtcgaagaacctttatcgttaactccagaccg
aatatcagagagcaagtacaaagaaggagaagaggagtagctggggaacaagacaatt
gtagaaaccggttaacaggtacaatctaaaacctataaaagtatatgtatatttattgt
gacatgacccaatgaagtgtgtggtgggatcctcctcaaatcctaagtataactg
tgaaaaataaagtaacttgggatgaccacacaaccttagaattaaatttaaaaaatt
aaattataagagaaaataaattgaattaaaaatacaatgaagaaaagtgtgtgagtggt
ttaattggtataataaataaaaaaaagataattfataacaataaccaaaacacataa
ccttagaaattcaacctfaaaagataaggttaacttaataaggagaaaaattaatgaa
tgaaaataagaaaatgcaaatgagaaaaaaatgaaattatagcattatgactaaaaat
agcattatgagtaaacatagcattatgactaaaaggggaaacagttatatacagctaac
atftataaagaaaagaccagaagagagaaggagcaaatgtgtgtgtagaaaaatgatg
ctactaattatcatttactacaaccttctttctttatattttcattgaaacact
tattttttacatttctcctcaatttctttctgttccactaatttaccattfaaaga
accttatttcccaacttaatttttcttctctatattttttcattccttctcttt
ttgatccaagcatcaaaagagctaaggctgtatcaactttgcatgtttcgtatgtttc
gtgacctgaaatgaatagcctaaggttagttaatataatttggcaaccagaagttcttag
taataaaggaccacattgt

>PvuI-SABATH-10

cttaagttttacctaatttacacaattgcttttactatttctttggcctttggttc
tttcattgaaagaacttttttctattttgttgattcgaattcactaagtttaactcc
actctcaaggaaattttcttcatcacaacctcaattacaacttctttcatttggat
gttctcattcaaatagtttgcatttcaagaatataaatatcaatttcatttaataat
catttctagagtacacattgataaattatacttttttaaaaaaattgtgtttgtg
tttaattttgtcatgtgaaggataattcaagtggtctatcacgtaaaccttaatta
atggacaacctacaaaattatcttcttttcttttagttcttatattcatttcaatt
gaaaaacacttcttaactacacaattttcagttfaltaactctccactcatctaata
tccaccaagttcacttaaatctataatcatttctctcaacattttcaaaaaatatt
aaatattgtactggacattgaatcattgacaatattatatttcttttattacaattttt
taataaataaattactaattaattttggaaggatagaagacattacaagtatatgtat
gtccattatccgacaaaaatgacaatcaatacaaaattttatattgacgaatgaaatgc
aaatttcaatttgacaaaataaagataataaagatgaaaatgataaaatttttagt
ttaaaaatggaacgaggaagaatacatattttagggtataatgatcaaatgagact
catecttttgacattattactfaaagaaaatattctctgtttattaatcaataatgt
aacaattgaaaaataaftaatgccccaaatacaccacactaacaacaaaacagggaa
taaatctccattagctattttttatttttaattgagttcattaaatfaatctaa
ttgtagaagggtcaagaaagtgatttagtctgattgaatcaaaatccacataagaaaa
caaaaaatgaatcaacatggattctaattatgtaaaaatcaatttattgattggaattac
gatgctgatttcttataaaatgggttaagtaggaaatctcccaggacattttctta
aagattagtaaacggaacttaaatattttagaagaattttttatataaagatattg
aatfttaattgtagttttgtgaacattattttgtatccttctaaaattgctctttt
aacagaattcaatttttagattctgcaaaatatttaacattataaagtctgaaattat
tcctatcatcgtttgatataagataaattgacattcaaattttaaaagtattatatt
aattaacacgataacataaacactaacggatgtggttfaaaatcatttaacttccat
aaaacaattaaacagttacaataataatgcaacaataaaaaatfaattaatataat
aataaaaaatactcatttcacataactaaaatcaaatftaactgaattattcatttatta

atctaagcatttfcgaataagttggttgggcataaaaatcaaaatctggcgccaatc
ttgggccttcctattttgcatgcaagcccatattctatgctttcaactttttctgtg
ttttatctttattattattattaattgttattattattattatttttaattac
tattattattattattgtgttttccctctgaaatattatcagaataatgcatctt
ttagacttataactccttcttgaatctatatagcagtaaaaaggaggctatagctaa
tagaatatagaattagcagacataataatataattgagaagagcttctctccttg
tctattatattaactctct

>PvuI-SABATH-11

gaagaaaaattgtgactcctctatatactattagttgaaaagatttatgataatcc
aaagataagaatgatgatagagaatgattatgtatatttattcttattcctaagaacg
agatgatcgaacaaaatgtataagagaattagaagattaagaagaagttggtcaacgga
tcacaacactccataaataacgaatctaattaggatataatcctcaaggaaactctgacg
ttttgtttgcatgatctgaccactaaaatttggtagaaggttgaatcatactccgg
gacagtggaaagatctatcgaactccttattgattgatggataatggatgtccagtt
gctcggaaaatgattaagcatagatggaatgacagattccaatgaatacatcagttfa
catgatatagataagcatatacattatggacgataccgctatgtcgcagcattccaat
attcttgaaggcatgagccctcgattgattgattaaagacatttatccaagttggga
tgcattcgcgacaagtaaatgtcaccacctcacctcaataaccttgaataatcacc
aaagagaattatggaaaaggttggagaagataacttfaaatattcaaccttagcttgat
gtggtttgaccacatggacaagccttaaggtcgagactttaccgacagcctatgca
agaagtcagtcattgactggatgggtcgagatgggtccaaaaaagaagagccgagaa
gtaagaccgacatcaaacgataccaagagagaaaattaggggaagaaaaaagaaaaact
gaaaaggagaggtcgacaagatacaattcaaggagaagccttagagcctttctcaag
aataagtgtctaacgactcttctccacaccacaggggacaccgatcactcatcaaa
ggtataccatgtctcaaaagattgtccttagtgggaatgacactacataggacctcaa
gccataaattgtccgaaggtaaagtttttagagtcagaaatctcgaatagtctca
accattagagactcctcccatgagaatattataggctgccttcacataatattattat
tttaattgcagttaggattgaaactcaggaccaagtagacagatcaacctaaccctgg
aacaatgatcattctgaaatataaggattgtatgctcttattttctacaacaa
gaaaagaccttgaattatacactgttgaactcagattagaggacgaatatttga
taatttagagaggtttctactagggttttccctgtatcttgcgactctatcaaga
atccactaattcttggcgatcatctttaggcttatcaactttgtctgtgacgccttc
ctttaccaggttttattgtactgtttgaattatccgttctgtaaccctaaatc
ccaatttatgtcatgtctatttgattcatacagatgatttgttagtcacctttt
tcacagcttaatgacaaaatctcgaacgattttatcacacacctaccagtaaac
ctaaactcaaatcctaccattaaattgtttatactcaagtaaaaaaagaatatacagac
aattttatgttctgacttaaaatttacccttatatgatcatcaaggtgaaagttgac
ttgaatccaagcttttataatataatgtgtgtgagaaaagatagacatacatggc
ttcattcggatcatcaaatggaagataactattaatcattcaataataactattata
ttaaacaactctttaccataaaaagtggttaactggaactgggataccatttgtgtc
caatataagaggaaatgagaaagatttcttttctttaaataatcaattttatgttt
ttgatggggaaggcgtaac

>PvuI-SABATH-12

tgtgataactccgcagcagcttctttctaaaaacgacaagattcctcaaggtgctaaa
catatggaattgaaactttgccgttaaaagaaggtcagaacataaaggtcaata
gaacatattagcactgatcttattgattgctgaccttcaacaaaagggtaccgccccaa
acattfactggtcatgttgaataatgggcattatgtctactagtgaattatgaatgtg
ttaatgcttattgacactctgagctcattgataaataaaattctgaaattatgtgt
tttctactttatgtatgatgcaaatatgtattatgtgtgaaacaaatattgt
tgttattgatgacaatgacattatgttgaacctattatgaattctactataaagtca
tattaaggagaagaatgatacaggagatgtgtgattcaaatgacatgtaaccgcatg
actcttattattatgtattcttgattatgaataatgatagaaccaatttatgtaaggcc
tttfaatgcgatttatgtcattataatcatgaaagtattataactcatatgagtca
agtgggagaatgtaagaattatgtataaattctataaagtgactcacatgacttag
agtttggcctttggcccaaatatgatttaataataataatagaattaaaggccattgg
ttaattgagaaatataatctgatgatatacctaattgaaaacctacatctgatgaga
ttgggtactaaaaggctatagggtctgtctctgcaataatagttgtctactgttaacc
atcacgaaaggtgtgacaagtagcgaattgctaagagatagattgggataaaggagata

aagtaactgctcaattaggatcactcatggatcaaggaagtgctattccttctcatt
gatgtttgtgagaaatcatgatgataagatctattgtgaacataattgcatgtg
tcaattggaaccgctcaactactccttataaggagtgatgtaactagtgaact
actcattcgaagaaagtgatgtaaatggtgacggtgaaaactacggaagaaagtgta
accgctcagtaataatcaaatgttcacgttggccactactgcacatcctaattta
ttctctctataaaacaactccctctcattatgcaattaattttcaaaataaatta
tctcttcaattcaaacggttctcccttatttcaaatatttataaatttattctc
tctcatacaaaagacactctctcattatgcaattaattttcaaaataaattatctcttc
aattcataatcactctccactctcttcaattcataatcgttccctccactctcttc
aattcatttccacatcttcaattcaaacgcttcaaacgcatttcacctc
tcttcaattcaaacgccccactacgtatacaaatatggtgaaaaataagaag
gacacaatgaccataatacaataaaataaataaataaaggataaaatgagaaa
aaaatgaagaaagtaaaagaaaataagaatgacacaatgacaataatacaataa
aattaaataataataaggatagaataaaaaaaaaaataagagcaatgaagggaa
accctttatataaggtatagattatcacattttcaaatcaattaataaaaaat
gataaaaaaaagatatgcttattgtgtaacttttacattgagtgagtaatcgcac
ctagaaaaatgttttaggtttagtatcacccaacattaagaaaatagtttt
atatgggtttccaacatgaatataaataatttttaacatagcggttaccacttt
ttgttagtctttgttgg

>PvuI-SABATH-13

tcacatcttggtttaaaacaaaagcttctgattcacaacctaactattaaaa
attatataaaacaatttttttagacttagagagaagctctagtttcatataag
atgttttaagattatatttaagatgaaggtgtaaaagatgtgcaaaaaatcaagta
taagttgaattctcagtaaaaatcagcaaatgagcaaatataataaaaaacccta
taaataatgttttaaatgtttagcttgggtggtataataatccatatactgactgact
taggatttattattaaatcttaagactttttcctcaaacactcattaaacctac
tactgttaataaaaaatacaaacactatgttatcaattaaattatgaaatcagttctt
taaattttaaaatggaagaaggttagattcaaaaatattttattcttatata
gcgagaaatttatattataaaactgcttataatagtcacaataaactcagatt
atgattcctcatacatcctattaaataaaattgttcaattcactaattattatata
tatattattttttataataataaaaaaaatagaatgaacatactatatta
caaacactcttaattttctggaatttcatatatttgccttctttgcataataata
cttagatttacataaagaaaattataactacacactcatttctcattatctcattat
cactttattataataactttttatcattgtcattattttataaacctgattttattt
tccccaaagttttctatcattccatcaatttggcccttttaatatcattactcattta
caaacattttttaaaactataataaattttgcttctactatttgcacaaccaattt
tctttcttttgaatacatctattataaaaaaatcattaaatcaacgctagttaaag
acaaaaaaatattcattgtataaagtgattcataaacatgttaaaaaataagaatga
ttgattttaaaagtatgctctattatcaaatatttttttttaactaaattatata
ttataaactattcataacttatttattctctcctcttttttattagttaaacat
gggattattatgtgcaaaaattcttagataaagatgattcatgtgcaaatgagacaac
ttgcacaccattaaaaaaataaatgacacaactgcaacaactataatcctaaaaaaa
ttgttgacaataacattaattatacatagtgtagagacatttttttatcaaaaaata
tatattaaatgaaaatagttgaagtattcctcataatattttactggacttccacaaa
ataaataaactactctcaaacgtctgttctcttctctctcactcactcagaatg
ttacttggatataattttattcttctcacagctctcagatgtttgtaagtatt
tgtcaagtggtgacttgcaggtctctgatgataaaatcagaagatttaattattct
ttataaaaaaacctccacatgtgatcagctacatttataatacaaaatattgagg
gcagttctctcctgaccctaggtgcagaagaagaatcaatattgagattctcagcc
ttattagacttttagtatttacttttaactaagttcacacctatatacatg
aagatgaaaatatagaattaagaagaggaccaaaagaaaatcatatagaagatgaaaa
aaatcacatgtcctgtctctgaaccacatgcacatttttttttatcggcaaccac
atgcacgattgttacaagattgataagattttaaataatfagaatgaagttcaata
tttcatagtttataaagg

>PvuI-SABATH-14

agaaaagaatataaatgaaggtattcaagaatctcaaccactgatagaactga
ttttggagcatcactcactctgaggtttatttataaattcttattttttgc
tgataaagaaaatcagaaaaaaaactcaaggagaagcatgaactgtggtatgag

aaaagtagtataactcactatgctttatcaaaactaaattccttttttttggaa
aagggcattgtaaaaccgtccattttagccataaftaagggtcctcaattctacc
ttaaaatatgaaatgaaatgttatccaacaaaaagataaaagttaggaatat
aaaaaagtgaatacaactcaaacaaaagtaaagtgaaccatggtgaaagtaataat
tgattaacttatttgattaattagcattacatcccacagaggaaatggttgtaggt
ataaactgtggaacctgatttctggggtgataacttaataagaatgaaataataatc
atgattggctttttatggacttctgactcaatatttataataaagctctgaaatag
acaaaagtaataactctcacaagaataaaccaatagaaaaatgaaaagttgctta
gfaaaagtaataacttacgtggttattgttatatgaaacttggggaagtgaagg
aaacttacgtagccttaggaaccattattcaccatagtgatcatgcttaattgatcc
ttaaatacgtatcattactcaataatccaacattatatttaactaaactgcttaatt
actgtatcattatactcactctctttttatataagctgaaaaggctatgtatg
atgaaaacttgcataaccagtactcactatgattcacttctttgacagataata
taaccaatcactctcataaaaattatatttttcaacaaaaataaataaataat
aaaatgagacggattatcaatccttactacaagaataatgaaataaataaataat
ttggttttaaatgatttctattattattatgagatttcaattggtatctaat
agctaccaaggttttctaccaattagaatctaaataattgtagttaaaccctga
aaactaattagataccaattagaaactatttaacaataatagaaccgattagaatc
aaaaaatttataatggtctataattgacttattgtaactaattatttt
agtctctaaaataatttattttttgatggtttcttataatattatacaaacac
tcaagagtggtcaattatgfaaaaagtgaacaaagcaacatccaattgaactaca
aacatacttctataaaccactaatttctatttctatttatataatgatt
aattatgagctctgatatactgtatcattatataaagcattataatttagatttt
gttcaatccatgaactgtaatacaattttatattcctaatcaattctttgccat
gaactgaaacaaaactagagtggtttgtttgatcagaattgagaacaaaagctatg
ttgatattcataatgttctctgaaacaaagatccggcggcagtttggccttgtgt
gttgcacatgagggccacattctctgcttttaacttttctgagttctttgttatta
tatacttttctcattgcctagtttagtaattatttataatgataacagcaacagaaa
taataatgacagattgctgcaattgtatctactagtaacaccacaagttaacataat
atacttaacaaaataataataataataataataataaagtagccttctctgctc
tatataccaactctctact

>Pvul-SABATH-15

ataaatccaaagaaagatatagattcttttgggctgctgattcaagctcataggctat
gatcctcaccagaagattgaaatgaagatggctgtctaaagtgtggggttctcactttc
aggctgttctgcttttgaattgagcgcgagtagtggtttgggtttgttttacata
gaactctactggaattctgtaccattattattataaaaaggatttcagtaaatgttt
tttggcttcttttagcctatgatcagtagtaactatggtgattaagtaataatcaa
caccttctggcaaatgaatgatttaaatcttaagctatttgcacaccctctt
ctgtactctccggagataaattctagaatcgcctgaaaaaggatggttcaactaaca
tghtaaggatagtgcaaaaggtaattccctccatgacctgatcagagccaatttcaat
ggccacgactgcagagcttcaaatgaaaggagtaggaaaaagaaatagaactcttt
atttaattattacgcagtagtagcttcaaaatttggatttggacttttgaacaagtt
ttaaactaatactgataggaaaatgatacttgaacacctgatatagtttaaaatatt
tatataataaaggtaatttgaattaaatgatagaaaaatattaaaataataat
tgggacttagtagtattataaaaaatgtaggtgtcagtattattaccactgat
atagttagagtgactgttcataattgaaatggtaccacataaaaataattgacacc
aatttcaatacacatttctgtgtatgttctgcttttggagaatgtattacaagc
tttgggtgataaataatgtgctgcaatttttaataaacagtagtactatatttccat
tttctatctggcgtttatttctgttcttggatgttattcttctgttctctgtgtt
tcaggcacaacgataggaaatgattgtaaaattgtgactattataaagatcatctga
tagacacgacttagtctacatggttggtaaatcttgggtccatgtgttacg
gctctaagggtgatttagaactcaatttctccttccaatgtacacgctccacta
taatttgaaggatctattactcagattttagataaacaatttctattgtttattat
ttgaactatgatggacaagcagcttcaagctcattcaacaagtttttaaatgttta
tcataaatttaactataaattatcaaaatatttgaacttaattgaaatggtata
aattaaattaaagttcaaatgagcctggtatgatttttttctcaaaagcctcggg
tatattttgctgaacctgtatatactgcaaaagtacatcctgaaatgtgcttggat
ttttagtaattataaataattatgaactaaaagattgagatttgaatgcaatcagat

caaagtcgccattggaatagcttaccaaatattctattttcatgctatctcatctatt
aaatgcaagttctcataaacaatgatcagttcgaactacttccgatgtaagttgcat
gcatcaaatattttggaccattgaaaataagttggaacttagttattacaacactaac
acgaattfaaaataaaaataaaaagactaaaaatatttctaaaatcatatatttg
gagacacatactactgtttgagaaggtaacgagctgggtcaatgcaaatgtggctatt
tttattcgtatgtgctgacgtaagaattttggactaacgtggaactgaaaggctccgc
ttctttaaaggcgatccag

>PvuI-SABATH-16

aatgtccatgtcaaaactctccaacttttagtaattaacaacctcaatctcaacttata
ttaccacactaccaagttttaactaaattatattttgtttataaaatttggtataa
tatacttttccctttaaataaaaaatatttaatttctaaattgaaaagatatatt
taatccttaagctcgataactttaatgattcattacatacaaaaaggatcaaaagtaca
atattgtagcaacagataattttctgggtcaatatttttagtactccaaaatg
atftttgctctaattcaactgtatgattgaaagttctgtagtcagaaagtgattgg
ataagtccttggcagcagacgacgcaaattttgcgtccacatggctcattccctat
gacttagtgttttgactgtgagtgatatagttgagttctctgtttttcaaatfc
taactactgatagctgctctcttattctcattatctttttgtctctctctgat
tttgtttatttctcatttcttaagaatggttctcatatagtttgaacaacga
ccattgaaaaagtcagacaagataaagttacctacaattctctgtctatgatgc
atagcctgacctcttgacttctcaattttcccttctctgaaatctgaaatctgaa
attagccgattgcaatccacacaactgtgacccaacaagaagaataagtaagacc
aaaatgccatgtccatggtgttcttttctctttatgtttgttattgaaatgaa
aaggcatttaagttggtttaatcatttttaaaattggtggggtggtatgggaaatg
agactcgggtagatggattgaaattgaaatgaagattgtttgtttagggttagggta
tgaatggaggaaatgagagagaagggtggaaggtgattgaaactgaaatgaaggtgtt
tgtgtggggtgggatggaagtcgtgaaccgaggagagatgaagggaaaaaggaagagag
aaagaagcttcaacatcatgtgaacgcaaatatgattgaattatattgaattagccat
atgaaacgcaaaaaaaattcaactgacactgcattagccacgtgaaataaattgac
atcgtctgtgtgtgcaaaagacctcatctaatcattgttactacaagatttfaatg
ctctaaaatttgaccacaacgaaatcaattttatataatagggacgaaacat
atftaattctatatttctgattattaaactaaaactatgttttttttaaaattgca
aaactatttttaactaaaagactaaaattagattattccaatttttgatctaaaag
caaagttataagttattttgggttaaacactagaatgtattttgaagttgaggataaa
acgatgtaaaatttctattttattgcaagaacaattgcttgaattcaaacataaag
acataactaagcctactattttattctaatgataggaactcactcactcaaatgttt
aaatattgttcacaatagttatttaaatcatcacgtaacacataaattttcatttc
tctgatttattctttaaaattatagtcgtatattggcactttatccatgtgcatg
cagatatttttttacataaagtagaattaatgtgcatctcagacataatgctttaga
tattttatagctcgcgataaacattgttctcaacaattaaaaatcctccaattatt
gtagttgagcttagtgatgtctgttttttttttttgaaaaaaaggaagcaaga
accagttgataatcatcctaacaataacgtgtgtatataaatgttgacactccaatg
cctaacataattgtttgact

>PvuI-SABATH-17

ttcatacttcttcccttcttgcgctcgtgttctctctatttctactctggtgt
ttcgttttcttttgcgagcttcattgtgtgtcgtgccattgtaagttcgttggagctc
tctttcttctccaatgattataaaaaaaattgttctcttacttgtttgtttc
ttgcatctcgaagtagtttcttgccttcgtagctactgtgtgagttttgcttt
gttccggcgtcgtgccacgtccgttgcgctctgctgctgccagtcttggcactct
tcaccaacgttgccttcacgcacaaggtgggtgtttfaaattgtttgaatttttt
aatgttatgaattgttttttttttattataaatttttttaaaattataat
atftgtatttagtafaattgtattattataattatattagttagttgatt
agaatagaattatcgtgttgattgagtcagggtgttggacctcagcaaatgtgtg
agatagaactcattattaacagctgaatgactattacaggatataattgatgaaat
tggattaaattttgctcagataagtgatgatacaaaagagaataaagaatttactt
ttgcataacgtcatgaataataatgtgcatgatggagcaaaagaacagtgccgtgt
gttaactattgaaatgaagataattagggaacacattctatgggatgagttctctgat
cttatacaactggacatgacatggtgaattataaattaccacatgtttttgtaactg
aagaatattgtggatccaccatggatgatgcaatacatgataatgacatgatgatgat

tgtaggacatgattcgtgatgtggaaactgagctttttagaagcgcgatggataggaa
ttatgtcaagc gatgcagagactccattgatcctggatcaactaacacacagttgt
cgacggtgttaagattaatgaattagaaggcaataaatggatggattgataaaacttaa
tgaaattgcttcagttgtgaagatatacactacaagaaaatccaattacatacaacc
aaaatccgtagtaagaccataatccgtagtaaaacagagttacatacgaatccgtag
gtaacaattttaatttttaaaataaagtgtaatgcaacatattttaacgcttcgca
ggatcaggtgaagtagtaggggtacatcgagttgagaacgaccttctctgatagaccg
tggctaggacaattaccattgtggttaaacacgcttcctggcttataaaactttaattaacc
ttgaaaataatattgaatgggattfaaaattgtgagagtaataaaattgttaattt
aaaaacaaaagcgtgggaaaattatagttggatagataaaagtaaaataataaaata
atacacaattatagaaaaacatagattcaagcctctctaaaatttcgagttggtg
tataacttttttaaaattataatggcctctataaaatgaactaagtttgctattgt
gagaaaaaaaggtttaaacttgcccctactaaaataatcccatactttgaaagttc
aatcataaaagacaagtgactactaaaacaaaagaaaatgaaagataaggtcccata
acacaaaaagtttgcgccggcattgttagtgtttcatattgatacatgtgcaaa
tgtgtaatagttttttaaaacaattagtttaataaaatagtttatatattttta
ttaaacaacaaacgcataataaaatacaaaagggttttcttttctgactgcaaatatgc
taaaaagaaaagagtttagacaatgatataatataatataatattagatggtag
ccaaattaaattggtgtag

>PvuI-SABATH-18

ggacttaactgaaaactctgttgactcactatcctccatacccatctatccattgttc
catctcgagcatcttattagatcaactctaagagttgactttctgctcctcttccca
agcaaacaaaccctctccaccttaatttccactcccaggacctgtccccatattcc
gcaatcacataatttgcctcttattaacagacaagaaaataaccttgaaatagct
ttcaagtctctgagctatccaattgtctgacaaaacataacctctctcccgttacc
gacctcaaaagacaacgatctcaaaactccctctctattatcagacctccagacct
tcttaaatctctccaccacagagaccttactattaatctctggtgctctcaaac
ctctccatctccacacttagaatccaatacctccctccacaacccccgttccggtt
taggcgccaaccattttccaacaacgcaaatfaattgctgatattaataatgct
gagccctctgcatcttggattfacaaatcttaccatgccaccatgcaaccttct
tccatctgacccccacccacaaaaatccctctgcagactcacaatcttftaaac
aatagacggtatctgaaacagagaaagatagaacaaaggtattgacaacaagacaact
aattaagcatatctcctgccatcgagataaatctctttccacctactagccctt
ctttaccctattaaccattcatccagaactcactcctctatgacacccccctacagg
catccccaaatattaaaaggaattctcatcactcacaattfaaaatagttgcaaagt
gagaatctctgctgctccaccccaatcccacaaatctactcttgagaaatcacctt
aagaccagatgccaactcaaaacagttcaacataacctttatattaatacacttttgc
ctttgcttacaagaacaaaatgtcatcagcatcctagagcatattactttaccga
tttattccaatctcaagctcaatcaagttttctcaaccacggtcctagatacctc
ggctaaccctcagtcgctataagaacaagaatgagtaaacagatcaccttctctcaa
ccctttctcggaaaaaatccttagtaggactcctgtttacgagaattgacatcgatgc
tgattccaacaagcttfaatccaagaatccacttttcgaaaagccaagcctcttag
catataatataaaaatcccacctcacagagttgtaagcctctcataatccacctgaa
aaacacacaactttcttctctcaactcttcaaggcttcttggctacaaaat
actatccaataacccattctcaagaaagacagattgcttaacgctgataactttact
gatgactttttcaacctaatagtcaaaatctcgaaccgtttatacactcaacca
acgaaattggtctataatcattaagctgtgagattatagataattgataatgagga
gatcatggtcaaaatatactaacacaagatggagtcacacaagaacaaggaaagta
aaggaaaggaaaagaatacaggtcatcgaagagccttcaaggagctttataagcagca
aagctaaaggagttgaagaaaacttcttaagtaagaagactttaggactttacaaa
atgtaaaaaaagaaaagaaaatccaagagaaaaagctacaacttttgggtcttgt
ttggtcatcttcttatagttttgtttgtttcttaggataagatagtagaataaga
aaatgggaccacactcattcaacaataaagtgtatataaatgttgacactcccgtg
gccttacataattggttggc