



**TUZ ve KURAKLIK KOŞULLARI ALTINDA  
FASULYE GENOTİPLERİNDE CHS GEN AİLESİNİN  
GENOM ÇAPLI KARAKTERİZASYONU**

**Murat ISİYEL**

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

**2023  
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TUZ ve KURAKLIK KOŞULLARI ALTINDA FASULYE GENOTİPLERİNDE  
CHS GEN AİLESİNİN GENOM ÇAPLI KARAKTERİZASYONU**

**Murat İSİYEL**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emre İLHAN**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2023**

**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.

08 / 08 / 2023

İmzası

Murat ISİYEL

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### TUZ ve KURAKLIK KOŞULLARI ALTINDA FASULYE GENOTİPLERİNDE CHS GEN AİLESİNİN GENOM ÇAPLI KARAKTERİZASYONU

Murat ISIYEL

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN

Fasulye, sürdürülebilir tarım ve insan beslenmesine büyük katkı sağlayan bir üründür. Ancak, iklim değişikliği gibi faktörler, mevcut genetik çeşitliliğin artırılmasını ve yerel çeşitlerin özelliklerinin belirlenmesini gerektirir. Kuraklık, fasulye üretimini sınırlayan önemli bir abiyotik stres faktörüdür. Bu stresi azaltmak için çeşitli yöntemler uygulanırken, kalıcı ve temel bir çözüm, kuraklığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir. Bu tez çalışmasının amacı, fasulye genotiplerinde kuraklık ve tuz stresi altında CHS gen ailesi üyelerinin genom çaplı analizi, gen ifade seviyelerinin belirlenmesi ve karakterize edilmesidir. Bu çalışmada, farklı in silico yöntemleri kullanılarak fasulye genomunda 14 CHS gen ailesi üyesi tespit edilmiştir. Bu genler 37,38 ila 43,34 kDa ağırlığında ve 341-393 arasında değişen aminoasit sayısına sahiptir. Pvul-CHS genleri arasındaki ekzon sayısı tüm genlerde 2'dir. *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* arasında yapılan filogenetik analizler, Pvul-CHS gen ailesinin 3 ana grupta kümelendiğini göstermiştir. qRT-PCR analizleri sonucunda Pvul-CHS genlerinin kök ve yaprak dokularında ifade edildiğini ve bitkinin abiyotik streslere karşı farklı fizyolojik roller aldığını ortaya koymaktadır. Fasulye CHS gen ailesi üyelerinin kromozomal lokasyonları, akraba genomlarla olan ortolog ilişkileri ve cis-acting element analizleri in silico olarak belirlenmiştir. Bu araştırmanın sonuçları, tuz ve kuraklık koşulları altında fasulye ıslahına yardımcı olabilir.

**2023, 70 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Duplikasyon, Filogenetik Analiz, Gen İfadesi, Gen Ontolojisi, qRT-PCR

## ABSTRACT

MS. Thesis

### GENOME WIDE IDENTIFICATION of CHALCONE SYNTHASE GENE FAMILY UNDER DROUGHT and SALT STRESS in *Phaseolus vulgaris* L.

Murat ISIYEL

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre İLHAN

Beans are an important crop in terms of sustainable agriculture and their contribution to human nutrition. Factors such as climate change necessitate increasing genetic diversity and identifying the characteristics of local varieties. Drought is a significant abiotic stress factor that limits bean production. While various methods are applied to reduce the effects of drought stress, the permanent and fundamental solution is to develop drought-resistant varieties. The aim of this study was to determine and characterize the CHS gene family in bean genotypes under drought and salt stress through genome-wide analysis and gene expression levels. Using various *in silico* methods, 14 CHS gene families were identified in the bean genome. These genes ranged in weight from 37.38 to 43.34 kDa and consisted of 341-393 amino acids. The number of exons identified among the Pvul-CHS genes was 2 in all genes. Phylogenetic analyses among *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max* showed that the Pvul-CHS gene family clustered into 3 major groups. The expression levels of Pvul-CHS genes showed that they were expressed in different tissues and played various physiological roles in response to abiotic stresses. The chromosomal locations of CHS gene family members in beans, their orthologue relationships with related genomes, and *cis*-acting element analyses were determined *in silico*. The results of this study may contribute to bean breeding under salt and drought conditions.

**2023, 70 Page**

**Keywords:** Duplication, Gene Expression, Gene Ontology, Phylogenetic Analysis, qRT-PCR

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim süresince; tez çalışmalarımın tüm aşamalarında bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana rehberlik eden, çıktığım bu akademik yolun her anında beni destekleyip yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN'a,

Sağladığı laboratuvar imkanları nedeniyle Erzurum Teknik Üniversitesi 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, Ahmed Sidar AYGÖREN, Recep AYDINYURT ve Burak Muhammed ÖNER'e,

Hayatımın her anında yanımda olan, verdiğim her kararda beni koşulsuz destekleyen ve saygı duyan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (ETÜ-BAP: 2022/2). Desteğinden dolayı ETÜ-BAPK'a teşekkür ederim.

**Murat ISİYEL**  
**Ağustos 2023**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	6
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	11
3.1. Fasulye Genomunda CHS Proteinlerinin Tespit Edilmesi.....	11
3.2. Pvul-CHS Genlerinin Fiziksel Lokasyonları, Yapısı, Gen Duplikasyonları ve Korunmuş Motiflerinin Tespit Edilmesi.....	11
3.3. Filogenetik Analizler ve Dizi Hizalama.....	12
3.4. Fasulye ve Diğer Türler Arasında Karşılaştırmalı Haritalama.....	12
3.5. Fasulye CHS Gen Ailesinin Promotör ve Hücre İçi Lokalizasyon Analizleri.....	12
3.6. Fasulyede CHS Proteinlerinin Homoloji Modellemesi.....	13
3.7. Fasulye CHS Protein-Protein Etkileşimleri ve Gen Ontoloji Analizi.....	13
3.8. İn Siliko Gen İfade Analizi.....	13
3.9. Bitkilerin Yetiştirilmesi, Büyüme Koşulları ve Stres Uygulamaları.....	14
3.10. RNA İzolasyonu.....	15
3.11. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ve Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	15
3.12. cDNA Sentezi.....	16
3.13. Kantitatif Real Time PCR Analizleri.....	16
3.14. Çalışmada Kullanılan Primerler.....	17
3.15. Verilerin Değerlendirilmesi.....	18
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA</b> .....	19
4.1. Fasulye Genomunda Tanımlanan CHS Gen Ailesinin Özellikleri.....	19
4.2. Pvul-CHS Genlerinin Kromozomal Dağılımı.....	21
4.3. Pvul-CHS Gen Ailesinin Karşılaştırmalı Haritalaması.....	22

4.4. Pvul-CHS genlerinin Ekzon ve İtron Bölgeleri .....	23
4.5. Pvul-CHS Proteinlerinin Türler Arası Filogenetik Analizi.....	24
4.6. Pvul-CHS Genlerinin Korunmuş Dizi Motifleri .....	25
4.7. Fasulye Genomunda Bulunan CHS Genlerine Ait Duplikasyonlar .....	27
4.8. Pvul-CHS Genlerinin Promotor Analizi .....	29
4.9. Pvul-CHS Genlerinin Ontoloji Analizleri .....	31
4.10. Tanımlanan Pvul-CHS Genlerinin Hücre İçi Lokalizasyonu.....	31
4.11. Pvul-CHS Proteinlerinin Homoloji Modellemesi .....	32
4.12. Pvul-CHS Protein-Protein Etkileşimleri .....	33
4.13. Fasulyede Tuz ve Kuraklık Stresi ile ilişkili CHS Genlerinin İn Siliko İfade Analizi .....	34
4.14. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Analizleri .....	35
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>53</b>
EK-1 .....	53

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°	Derece
C	Çevrim zamanı (dakika)
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram

### Kısaltmalar

cDNA	Komplementer DNA
CHS	Kalkon sentaz
CoA	Koenzim A
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
M	Molar
M.Ö.	Millattan önce
MCSscanX	Çoklu Kolineerlik Tarama Aracı
mg	Miligram
mM	Milimolar
mRNA	Haberci RNA
O.D.	Optik Densite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ülkemizde 2022 yılında üretimi yapılan fasulye ekim alanı ve üretim miktarı.....	2
Şekil 1.2. Ülkemizde 2022 yılında üretilen fasulye miktarından alınan verim .....	2
Şekil 1.3. Flavonoid biyosentez yolağında meydana gelen kalkon oluşumu.....	4
Şekil 4.1. Fasulye CHS genlerinin kromozomal dağılımları (Benzer renklerde ve altı çizili olarak gösterilenler tandem duplike genleri göstermektedir). .....	22
Şekil 4.2. <i>P. vulgaris</i> , <i>G. max</i> ve <i>A. thaliana</i> genomlarına ait CHS genlerinin karşılaştırmalı haritası. Siyah çizgiler <i>P. vulgaris</i> , <i>G. max</i> ve <i>A. thaliana</i> arasında tespit edilen sintetik ilişkiyi gösterir. ....	23
Şekil 4.3. Fasulye CHS genlerinin ekzon ve intron bölgeleri.....	24
Şekil 4.4. Üç farklı bitki türünden elde edilen CHS proteinlerinin filogenetik ağacı. Ağaç komşu katılım (NJ) metodu ile MEGA programı kullanılarak amino asit benzerliğine dayalı olarak çizildi. ....	25
Şekil 4.5. <i>Pvul</i> -CHS genlerinin korunmuş dizi bölgeleri .....	26
Şekil 4.6. <i>Pvul</i> -CHS genlerine ait cis-acting element haritası.....	30
Şekil 4.7. <i>Pvul</i> -CHS proteinlerinin 3 boyutlu yapı modellemesi .....	33
Şekil 4.8. <i>Pvul</i> -CHS genlerinde bulunan protein- protein etkileşimler .....	34
Şekil 4.9. <i>Pvul</i> -CHS genlerine ait in siliko ifade seviyeleri (SC: tuz kontrol, S: tuz, DC: kuraklık kontrol, D: kuraklık). .....	35
Şekil 4.10. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde yaprak dokusuna ait tuz stresi altındaki qRT-PCR sonuçları. ....	37
Şekil 4.11. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde kök dokusuna ait tuz stresi altındaki qRT-PCR sonuçları. ....	38
Şekil 4.12. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde yaprak dokusuna ait kuraklık stresi altındaki qRT-PCR sonuçları. ....	39
Şekil 4.13. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde kök dokusuna ait kuraklık stresi altındaki qRT-PCR sonuçları. ....	40

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> qRT-PCR çalışmalarında kullanılan <i>Pvul-CHS</i> genlerine ait primer dizileri.....	18
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>P. vulgaris</i> CHS protein kataloğu .....	20
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>Pvul-CHS</i> genlerinin korunmuş motiflerinin özellikleri .....	27
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>Pvul-CHS</i> gen duplikasyonlarının Ka/Ks oranı.....	29
<b>Çizelge 4.4.</b> Cis-acting elementlerin fonksiyonları.....	30
<b>Çizelge 4.5.</b> DAVID biyoinformatik kaynak veritabanı analizleri sonucu elde edilmiş veriler.....	31
<b>Çizelge 4.6.</b> <i>Pvul-CHS</i> genlerinin hücre içi lokalizasyonları .....	32

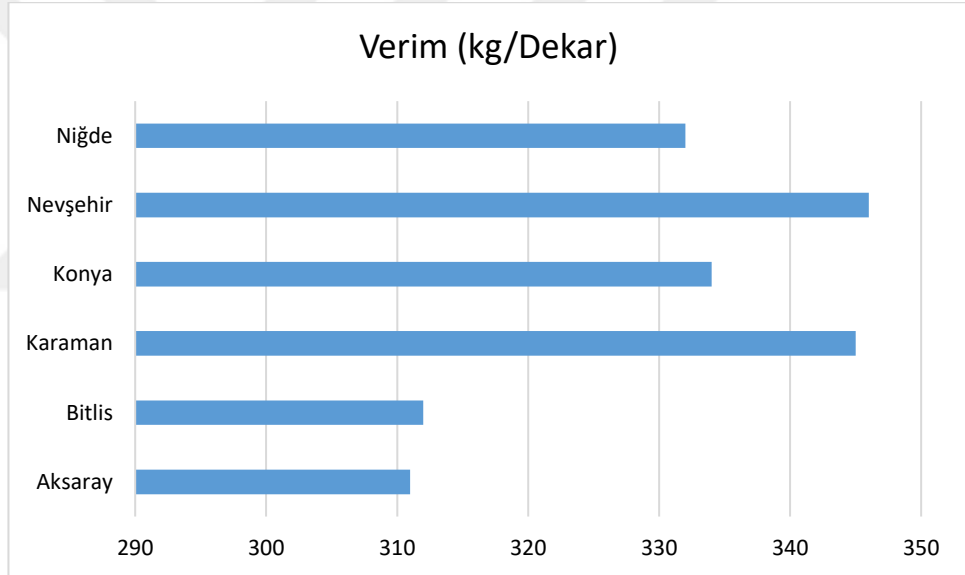
### 1. GİRİŞ

Besine ihtiyaç duyan nüfusun artması ve hızla değişen iklim nedeniyle tarım sistemimiz büyük zorluklarla karşı karşıyadır (Lobell et al. 2008). Daha sürdürülebilir bir tarım sistemine geçişte, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) gibi baklagil bitkileri kilit öneme sahiptir. Fasulyenin azotu sabitleme yeteneği, onu gübreye daha az bağımlı hale getirir ve bu da tarım sistemimizin enerji tüketimini azaltır (Herridge et al. 2008; Thilakarathna and Raizada 2018; Reinprecht et al. 2020). Ayrıca, fasulye karbonhidratlar, mineraller, vitaminler, lifler ve özellikle proteinler açısından zengin bir besin kaynağıdır (Doria et al. 2012; Campos-Vega et al. 2013; Ganesan and Xu 2017). Bu da onu çevresel açıdan daha maliyetli olan hayvansal kaynaklı proteinler için mükemmel bir alternatif kaynak haline getirmektedir (Pimentel and Pimentel 2003; Nasrabadi et al. 2021).

Fasulye ülkemizde hemen hemen her bölgede yetişmekte olup genel itibariyle verimi artış gösteren ve üretim miktarı bakımından oldukça yüksek oranlara sahip bir bitkisel üründür. Dünya genelinde ise bu durum üretim miktarı, ekim alanı ve alınan verim göz önünde bulundurulduğunda sırasıyla Hindistan, Myanmar, Brezilya, Meksika ve Kenya başta olmak üzere 5 ana ülkeye dağılım gösterdiği görülmektedir (Anonymous 2023f). Dünya genelinde toplam fasulye 33 milyon hektar alanda yaklaşık 29 milyon tonluk bir üretime sahiptir. Alınan ortalama verim ise 87 kg/da'dır (Anonymous 2023f). Ülkemizde fasulye üretiminin en fazla yapıldığı bölgelere ait üretim miktarları (milyon ton), ekim alanları TÜİK 2022 yılı verileri kullanılarak Şekil 1.1'de ve verimleri (kg/da) Şekil 1.2'de verilmiştir (Anonim 2023).



Şekil 1.1. Ülkemizde 2022 yılında üretimi yapılan fasulye ekim alanı ve üretim miktarı



Şekil 1.2. Ülkemizde 2022 yılında üretilen fasulye miktarından alınan verim

Flavonoidler, fenilalaninden türetilen bir  $C_6-C_3-C_6$  karbon iskeleti içeren önemli aktif bileşenlerdir ve birçok biyolojik süreçte ve bitkilerde biyotik ve abiyotik strese verilen yanıtlarda önemli roller oynarlar (Shen et al. 2022). Flavonoidler bitki büyümesi, gelişimi, çevresel adaptasyon, biyotik veya abiyotik streslere yanıtta önemli işlevler yerine getirir (Petruşa et al. 2013). Flavonoidlerin ayrıca çiçek pigmentasyonu, UV radyasyonuna karşı koruma, patojen savunması, oksin taşınması ve polen verimliliğinde çeşitli biyolojik işlevleri vardır (Winkel-Shirley 2002; Buer et al. 2010; Falcone Ferreyra et al. 2012; Raza et al. 2023). Flavonoidler doğal antioksidanlar olarak da bilinirler. Antibakteriyel, anti-enflamatuar, analjezik ve antipiretik özelliklere sahiptirler (Zhu et

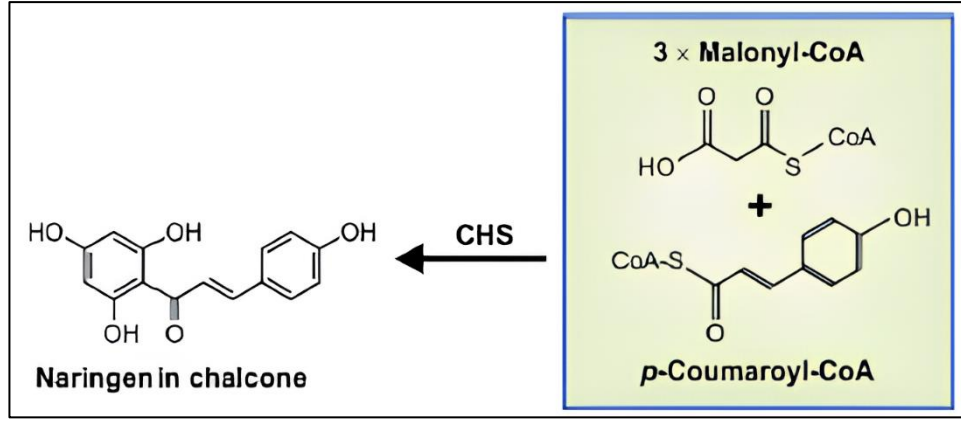
## 1. GİRİŞ

---

al.2022). *Arabidopsis thaliana* L. (Saito et al. 2013), *Zea mays* L. (Falcone Ferreyra et al. 2015) ve *Petunia hybrida* (E.Vilm.)'da (Wang et al. 2009) dahil olmak üzere çeşitli bitkilerde flavonoid biyosentezi üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmış ve bu süreçte yer alan bir dizi yapısal ve düzenleyici gen tanımlanmıştır. CHS, flavonoid biyosentez yolunun ilk işlenmiş adımını katalize eden ilk özel enzimdir (Zhu et al. 2022).

İlk bitki CHS (Kalkon sentaz)'sinin 1983 yılında klonlanmasından bu yana dört binden fazla bitki CHS'si klonlanmıştır (Reimold et al. 1983); bunların yanı sıra *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae* ve *Gramineae* türlerinden de klonlamalar gerçekleştirilmiştir (Chen et al. 2017). Farklı bitki türlerinde CHS genlerinin çeşitli işlevlerine ilişkin birkaç çalışma bulunmaktadır. Bitki patojenlerine karşı savunmada ve çiçek pigmentlerinin oluşumunda rol aldıkları bildirilmiştir (Dhawale et al. 1989; Koes et al. 1990; Christie and Jenkins 1996; Christensen et al. 1998; Wade et al. 2001; Liu et al. 2012; Zhou et al. 2013). Dahası, CHS genleri yaralanma, düşük sıcaklık, tuz ve azot yetersizliği gibi çevresel streslere uyum sağlamada da önemli roller oynamaktadır (Lijuan et al. 2015).

CHS; kalkon, flavon, flavanol, antosiyanin ve glikozitler gibi flavonoid türevlerinin geniş bir yelpazesinin sentezinde öncüdür (Zhang et al. 2017). Bitkilerde, CHS geni birçok fizyolojik ve biyolojik süreçle güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu süreçler arasında *Matthiola incana* (L.) W.T.Aiton'da antosiyanin oluşumu (Hemleben et al. 2004) ve sorgumda hastalık direnci de (Cui et al. 1996) yer almaktadır. Kalkon sentaz (CHS), bitkilerde flavonoidlerin biyosentezinde önemli bir enzimdir ve bir fenilpropanoid CoA esterini (örn. p-kumaroil-CoA) malonil-CoA moleküllerinden üç asetat birimi ile yoğunlaştırır ve Şekil 1.2'de görülebileceği üzere çeşitli flavonoidlerin öncüsü olan bir kalkon (örn. naringenin kalkon) üretmek için ortaya çıkan ara ürünü kullanır (Koduri et al. 2010). Bu, bitkilerin fenilpropanoid yoluyla flavonoidlerin biyosentezine yönelik ilk adımı oluşturur (Ferrer et al. 1999; Lijuan et al. 2015). Fenilpropanoid yolağı tarafından sentezlenen flavonoidler, dünyadaki en büyük polifenolik sekonder metabolit ailelerinden biri olup, bitkinin gelişimine ve çevresel koşullarına bağlı olarak farklı organ ve dokularda yaygın olarak bulunurlar (Tohge et al. 2013; Wang et al. 2022).



**Şekil 1.3.** Flavonoid biyosentez yolağında meydana gelen kalkon oluşumu (Anguraj Vadivel et al. 2018).

Larcher (1995), bitkilerin günlük hayatta çevreleriyle olumlu ve olumsuz bazı etkileşimlerde bulunduğunu gözlemlemiş ve bu etkileşimleri biyotik ve abiyotik faktörler olarak sınıflandırmıştır. Biyotik faktörler, bitkilerin zararlı hayvanların saldırıları, mikroorganizmalar (örneğin, bakteri, virüs ve fungus), yangın ve diğer insan kaynaklı stres faktörleri gibi etkileşimleri içerir. Abiyotik faktörler ise, çeşitli stres faktörleri (örneğin, ultraviyole ışınlar, radyasyon, değişen sıcaklıklar, kuraklık ve tuzluluk) gibi nedenlerden kaynaklanan çevresel şartlarla ilgilidir (Hirayama and Shinozaki 2010). Bitki verimi ve gelişmesine etki eden en önemli abiyotik stres faktörleri olarak kuraklık ve tuz stresi gösterilmektedir.

Abiyotik stresler arasında bulunan tuzluluk stresi, osmotik etkisi ile kullanılabilir su oranını azaltmakta iken iyonik etkisiyle iyon içeriğinin zehirli düzeye ulaşmasına sebep olmaktadır (Çulha ve Çakırlar 2011). Dünyadaki toplam ekim alanlarının %6'sında (800 milyon ha) tuzluluk sorunu baş göstermektedir (Zurnacı 2019; Munns 2002). Tuzlu şartlarda büyüyen bitkilerde yaprak alanı, büyüme ve gelişme, tomurcuk meydana gelmesi ve stomalar üzerine olumsuz etkiler oluşmaktadır. Bu olaylar verim ve kalitede yüksek derecede azalmalara neden olmaktadır (Allakhverdiev et al. 2000). Kuraklık, bitki büyümesini ve gelişimini büyük ölçüde etkileyen diğer bir önemli abiyotik stres faktörüdür ve tarımsal üretimi büyük oranda etkilemektedir. Kuraklık stresinin doğrudan sonucu topraktan su alımının azalmasıdır; hücrelerdeki etkisi ise mitokondriden elektron kaçıdır, bu da hücredeki reaktif oksijen türleri (ROT) konsantrasyonunu artırır ve böylece hücrenin antioksidan kapasitesini zayıflatır (Choudhury et al. 2013; Sachdev et al. 2021). Bu abiyotik strese uyum sağlamak için bitkiler, serbest oksijen radikallerini

## 1. GİRİŞ

---

temizleme yeteneğine sahiptir. Önceki araştırmalar, flavonoidlerin abiyotik stres altındaki bitkiler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerini temizleyebildiğini ve böylece bitkinin strese toleransını artırdığını göstermiştir (Ma et al. 2014; Naing and Kim, 2021). Kuraklık, CHS gen ifadesinin yukarı regülasyonunu indükleyebilir ve böylece bitkilerin kuraklığa toleransını artırabilir (Chen et al. 2017; Wang et al. 2017a).

Yapılan bu tez çalışmasının amacı biyoinformatik analizlerle fasulye genomunda bulunan CHS gen ailesi üyelerinin tespit edilmesi, karakterize edilmesi, diğer bitki genomları ile olan akrabalık ve ortolog ilişkilerinin belirlenmesi, tuz ve kuraklık stresi altında gen ifade analizlerinin yapılmasıdır.



### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kalkon sentaz (CHS, EC 2.3.1.74), bitkilerde flavonoid biyosentez yolunun ilk önemli enzimidir. Bir molekül 4-kumaroil koenzim A (CoA) ve üç molekül malonil CoA'nın kondensasyonunu katalizleyerek, kalkon ürününü oluşturur. Kalkon, flavonoid ve antosiyanin biyosentezinin ilk adımının giriş bileşimidir. CHS'ler tüm bitki türlerinde bulunmuştur ve bu enzimler, çiçek pigmentleri, antimikrobiyal bileşikler, UV koruyucuları ve böcek kovucuları gibi çiçekli bitkilerde çeşitli ve önemli roller oynadıkları bilinmektedir. 1983 yılında ilk bitki CHS'si klonlandığından bu yana, Fabaceae, Solanaceae, Brassicaceae ve Gramineae gibi diğer ailelerin türlerinden olmak üzere, dört binden fazla bitkiye ait CHS geni klonlanmıştır (Reimold et al. 1983). Birçok bitkide kalkon sentazlar, çoklu gen aileleri tarafından kodlanır. *Gerbera hybrida* L.'de en az üç CHS geni (Deng et al. 2014), *Phalaenopsis orchid*'de beş CHS geni (Han et al. 2006), *Brassica rapa* L.'de ise altı CHS geni (Zhou et al. 2013) ve *Petunia hybrida*'da ise sekiz CHS geni bulunmuştur (Koes et al. 1989).

Bitkiler sürekli olarak sayısız çevresel faktörler tarafından zorlanır ve karmaşık gelişim aşamalarından geçer. CHS'lerin çeşitli fonksiyonel rolleri ve aktivitelerinin çok sayıda içsel ve dışsal uyaranlar tarafından düzenlendiği bilinmektedir. UV radyasyonu (Dao et al. 2011; Sun et al. 2014), yaralanma (Richard et al. 2000), yüksek tuz (Lijuan et al. 2015), mikrobiyal patojen saldırısı (Nagy et al. 2004; Zabala et al. 2006) dahil olmak üzere dış uyaranlar ve salisilik asit ile tedavi (Schenk et al. 2000), CHS'lerin ifadesini değiştirebilir. CHS gen ailesi, bu karmaşık gelişimsel ve çevresel bağlamlarda değişen rollerde işlev görecektir şekilde evrimleşmiştir (Chen et al. 2017).

UV ışınları, yüksek tuz ve kuraklık stresi dahil olmak üzere abiyotik stres, bitkilerde ROT oluşumunu ve birikimini hızlandırabilir (Apel and Hirt 2004; Suzuki et al. 2012). Flavonoidler, ROT oluşumunu azaltmak ve ROT temizleme aktivitesini artırmak için antioksidan olarak görev yaparlar (Liu et al. 2014; Agati et al. 2012).

Lijuan et al. (2015) tütünde EaCHS1 (*Eupatorium adenophorum*) geninin aşırı ifadesinin bitkilerin yüksek tuz stresine dayanıklılığını artırdığını ve flavonoid

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

birikiminin ROT homeostazını koruyarak bitki tuz stresine dayanıklılığına katkıda bulunduğunu rapor etmiştir.

Chen et al. (2017) *Nicotiana tabacum*'da CHS genleri ile gerçekleştirdiği çalışmada tütün yapraklarının flavonoid içeriğinin yüksek tuz ve kuraklık tedavisi altında önemli ölçüde azaldığını ve bu durumun flavonoidlerin ROT temizleme için kullanıldığını, flavonoidlerin azalmasıyla birlikte elde edilen sonuçların NtCHS1 ve -3'ün ifade seviyelerinin hem yüksek tuz hem de kuraklık stresi tarafından indüklendiğini ve ROT temizleme aktivitesine katkı sağladığı gösterilmiştir.

Wang et al. (2018) *Abelmoschus esculentus* bitkisinde yapılan analizler sonucunda AeCHS geninin *Arabidopsis*'te aşırı ekspresyonu sonucu biriken flavonoidler yardımıyla ROT temizleme sisteminin uyarılması ile ROT temizleme genlerinin ifadesini artırarak ROT temizleme sistemini uyardığını rapor etmiştir.

Zhu et al. (2022) *Chrysanthemum nankingense* bitkisinde yaptığı çalışmada, bitkiye ait 16 CHS genini tanımlayıp analiz etmiştir. Yapılan analizler sonucunda bu genlerin gen yapıları, ifade profilleri ve evrimsel desenleri CnCHS geninin korunaklı ve yavaş evrimleştiğini ancak özellikle farklı işlevi olan genlerin farklılaştığını göstermektedir. Yapılan sistematik analizler ışığında CnCHS-6, -7, -13 ve -14 antisaynidin sentezi yerine muhtemel olarak flavonoid biyosentezinde yer alabileceğini belirtmiştir.

Flavonoidler bitkilerin abiyotik strese karşı tepkilerini düzenlemede rol oynayan kritik metabolitlerdir. CHS flavonoid biyosentez yolundaki ilk önemli enzimi katalize eder. Yang et al. (2023) yaptıkları çalışmada *Dendrobium catenatum* L. bitkisinde CHS genlerinin farklı abiyotik stres koşullarında tepkilerini incelemiş ve qRT-PCR analizleri sonucu ifade seviyelerini tespit etmiştir. Yapılan analizler sonucu *D. catenatum* genomunda toplam 14 CHS geni tespit edilmiştir. Tespit edilen genler ile *Apostasia shenxhenica* ve *Arabidopsis thaliana* L. arasında gerçekleştirilen filogenetik ilişki analiz sonucunda CHS proteinlerinin 3 farklı gruba dağılışı gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan motif analizleri sonucunda 10 adet motif tespit edilmiş, tespit edilen motifler incelendiğinde tüm DcChs genlerinde Motif -3 ve -2'nin ortak bulunduğu belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

Yang et al. (2023) farklı abiyotik stres koşulları altında gerçekleştirdikleri bu çalışmada *D. catenatum* genomunda belirlenen CHS genlerinden DcCHS-6'nın kuraklık stresi tarafından yüksek oranda indüklendiğini, aynı şekilde DcCHS-5 ve -6'nın ısı stresi tarafından indüklendiği, soğuk stresi incelendiğinde DcCHS-13 ve -14'ün ifade seviyelerinde azalış meydana geldiği ve DcCHS-6, -8, -9 ve -13'ün tuz stresine duyarlı olduğu ortaya konulmuştur. Alınan bu sonuçların *D. catenatum* çevresel streslere karşı çeşitli işlevler görebileceği bildirilmiştir. Tespit edilen sonuçlar ışığında Yang et al. (2023) CHS genlerinin *D. catenatum*'da abiyotik streslere karşı yanıtta önemli roller oynayabileceğini ve bu sonuçların ileride yapılabilecek çalışmalara temel niteliği kazandırdığını rapor etmiştir.

CHS, flavonoid biyosentez yolu için önemli bir enzimdir. Isı stresi altında flavonoid biyosenteziyle ilişkili genlerin çoğu düşük düzeyde ifade edilmiştir. Wu et al. (2020) yaptığı çalışmada *Solanum melongena* L. bitkisinde tespit edilen CHS genlerinin ısı stresine bağlı ifade seviyeleri ölçmüştür. Yapılan analizler sonucunda flavonoid biyosentez yolundaki genlerin dokuya özgü ifade gösterdiği, farklı aşamalarda ifade edilen genlerin zamanla değişim eğiliminde olduğu belirtilmiştir. Isı stresi altında SmCHS-4 ve bazı antisianin biyosentezi ile ilgili genlerin 38°C'de ve zamana bağlı olarak farklı ifade profilleri gösterdiği rapor edilmiştir. Bu durum birbirine bağlı genlerin ısı stresi başlangıcında bitkiyi korumaya yardımcı olduğunu göstermektedir. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada, ısı stresi altında Lv et al. (2019) sonuçlarına benzer şekilde 52 gen ifade seviyesi azalırken, 35 gen ifade seviyesinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Elde edilen bu sonuçlar ışığında, bazı önemli antisianin biyosentez genlerinin *Solanum melongena* L. abiyotik stres faktörlerine karşı hasardan korumaya yardımcı olduğunu göstermektedir.

Bitkilerin büyümesi ve gelişmesi genellikle yaşam döngüleri boyunca kuraklık, düşük sıcaklık ve yüksek tuzluluk gibi çevreden gelen stresler tarafından tehdit edilir. Bu çevresel streslere uyum sağlamak için stresle ilgili birçok gen indüklenmiştir (Albrecht et al. 2013; Kasuga et al. 1999). Han et al. (2016) yaptığı çalışmada CHS genlerinin çoğunun salisilik asit gibi abiyotik streslere yanıt olarak önemli roller oynadığını varsaymıştır. Elde edilen sonuçlar, CHS genlerinin çoğunun salisilik asit tarafından indüklendiğini ve *Zea mays* L. abiyotik streslere veya hastalık direncine karşı savunmaya katkıda

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

bulunabileceğini gösterilmiştir (Coram and Pang 2007; Duan et al. 2015; Häffner et al. 2014). İki çift çoğaltılmış gen olan ZmCHS01/02 ve ZmCHS13/14'ün salisilik asit uygulamasına yanıt olarak çok benzer ifade modellerine sahip olduğunu fark edilmiştir. Bu, çoğaltılmış genlerin abiyotik strese yanıt olabilecek bazı işlevlere sahip olabileceği rapor edilmiştir.

Tarımsal ürünlerin ıslahındaki amaçlardan biri kuraklığa tolerans gösterme kabiliyetlerini artırmaktır. CHS genlerinin bitkilerin kuraklığa dayanıklılığında önemli bir rol oynadığı ancak kirazlarda çok az çalışma olduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada Hou et al. (2022) *Cerasus pseudocerasus* L. bitkisinde yapılan analizler sonucu tespit edilen genlerden kalkon sentaz kodlayan bir geni izole etmiş ve bu geni transgenik olarak *Nicotiana tabacum* L. (tütün) aktararak ifade seviyesini artırmıştır. Çin kirazında bulunan ve izole edilip aktarımı gerçekleştiren CpCHS1 geninin tütünde aşırı ekspresyonu sonucu bulunan verilerde tohum çimlenme sıklığı ve kuraklık stresine maruz kalan tütün fidelerinin kuraklığı toleransının arttığı rapor edilmiştir. Alınan sonuçlar ışığında Hou et al. (2022) Çin kirazı CHS geninin (CpCHS1) tütünde aşırı ekspresyonunun kuraklık stresi ile ilişkisini araştırmış ve yapılan bu analizlerin Çin kirazında kuraklık toleransının moleküler mekanizması ile ilgili gelecekte yapılacak çalışmalara bir referans sağlayacağı bildirilmiştir.

Dünya genelinde sıcaklığın endişe verici şekilde artması bitkisel ürün üretimini ciddi ölçüde kısıtlamıştır ve hızla artan bu stres koşullarına karşı *Cucumis sativus* L (salatalık) da dahil olmak üzere tüm bitkilere tolerans kazandırılması önemli bir amaç haline gelmiştir (Ahmad et al. 2023). *Cucumis sativus* L. bitkisinde Ahmad et al. (2023) yaptığı çalışmada *Cucumis sativus* L. genomunda biyoinformatik analiz yöntemleri kullanarak tespit ettikleri CHS genlerinin abiyotik stres koşulları altında verdikleri tepkileri ve bu tepkilerin bitkinin (*C. sativus*) büyüme ve gelişmesine etkilerini araştırmıştır. Ahmad et al. (2023) gerçekleştirdiği biyoinformatik analizler sonucu *C. sativus* genomunda toplam 4 adet CsCHS geni tespit etmiştir. Tespit ettiği bu 4 genin *C. sativus* genomunda bulunan 1,3,4 ve 6 numaralı kromozomlar üzerinde dağılışı gösterdiğini bildirmiştir. Yapılan motif analizleri sonucunda elde edilen 4 CsCHS genine ait toplam 5 motif tespit edilmiştir. Tespit edilen bu motiflerin CsCHS4 geni hariç diğer tüm CHS genlerinde eşit olarak dağılışı gösterdiğini bulmuşlardır. Yapılan ekspresyon

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

analizleri sonucu yüksek ısı stresinde 3. ve 6. Saatlerdeki ifade seviyeleri göz önüne alındığında CsCHS1 geninin ifade seviyesin başlangıca (0. saat kontrol) azalış meydana gelmiştir. Diğer genler incelendiğinde yüksek ısı stresi altında CsCHS2'nin ifade seviyesinde aşırı yüksek bir düşüş meydana gelirken CsCHS3'ün ifade seviyesinde aşırı yüksek bir artış olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen veriler ışığında CsCHS genlerinin *C. sativus* genomunda stres koşullarına karşın verdikleri temel tepkiler incelenerek bu sonuçların ileride gerçekleştirilecek fonksiyonel çalışmalara yardımcı olacağı rapor edilmiştir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Fasulye Genomunda CHS Proteinlerinin Tespit Edilmesi

Fasulye genomunda bulunan CHS gen ailesinin protein dizileri, Pfam veri tabanından alınan Pfam Erişim Numarasıyla (PF00195) ve (PF027979) Phytozome v13 veri tabanı (Anonymous 2023a)'dan elde edilmiştir. Fasulye (Schmutz et al. 2014), *Glycine max* (Valliyodan et al. 2019) ve *Arabidopsis thaliana* (Lamesch et al. 2012) genomundaki tüm muhtemel CHS proteinlerini belirlemek için Phytozome v13 veri tabanındaki blastp analizi ve gizli Markov model (HMM) (Anonymous 2023b) araması varsayılan değerler ile *P. vulgaris* genomunda analiz edilmiştir. İlgili olmayan diziler “decrease redundancy aracı” (Anonymous 2023c) yardımıyla belirlenmiştir. İlişkili dizilerde bulunan CHS domaininin varlığı, HMMER (Anonymous 2023d) veri tabanı kullanılarak incelenmiştir. Belirlenen CHS proteinlerine ait teorik izoelektrik noktası (pI) ve moleküler ağırlığı “ProtParam aracı” (Gasteiger et al. 2005) kullanılarak belirlenmiştir.

#### 3.2. Pvul-CHS Genlerinin Fiziksel Lokasyonları, Yapısı, Gen Duplikasyonları ve Korunmuş Motiflerinin Tespit Edilmesi

Pvul-CHS proteinlerinde bulunan ekzon-intron bölgelerinin tanımlanması için, Gene Structure Display Server v2.0 (GSDS) veri tabanından yararlanılmıştır (Guo et al. 2007). GSDS veri tabanı kullanılarak kodlanan DNA (CDS) dizileri ve genomik diziler, Pvul-CHS genlerine ait konum bilgisini tahmin etmede kullanılmıştır. Phytozome v13 veri tabanı kullanılarak, Pvul-CHS genlerine ait kromozomal lokasyonlar ve büyüklükler tespit edilmiştir.

Pvul-CHS genleri tüm *P. vulgaris* kromozomlarına işaretlenmiş ve MapChart yazılımı kullanılarak görselleştirilmiştir (Voorrips 2002). *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* arasındaki gen duplikasyon ilişkileri, varsayılan parametrelerle MCScanX (Çoklu Kolineerlik Tarama Aracı) (Wang et al. 2012) kullanılarak belirlendi. Pvul-CHS genlerinin duplike çiftleri arasındaki homolog özellikte olmayanlar için (Ka), homolog özellikte olanlar (Ks) ve homolog olmayanın homolog olana bölümünü ifade eden (Ka/Ks) değişim oranları TBtools programında (Chen et al. 2020) bulunan Ka/Ks

hesaplama aracı yardımı ile belirlenmiştir. Duplikasyon olaylarının tahmini olarak,  $8,46 \times 10^{-9}$ 'luk fasulyedeki homolog yer değiştirme oranları ( $\lambda$ ) cinsinden  $T = Ks / 2\lambda \times 10^{-6}$  MYÖ (milyon yıl önce) formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Schmutz et al. 2014).

Pvul-CHS proteinlerine ait korunmuş motiflerini bulmak için, “Multiple EM for Motif Elicitation (MEME)” yazılımından yararlanılmıştır (Bailey et al. 2006). Minimum genişlik 2, maksimum genişlik 50 ve motiflerin maksimum sayısı için sınır 10 olarak seçilmiştir. Motif bölgeleri 2 ile 300 arasındadır. Bölge dağılımı tekrarların herhangi bir sayısı olarak seçilmiştir. Tespit edilen motifler InterPro veri tabanının varsayılan ayarlarıyla analiz edilmiştir (Quevillon et al. 2005).

#### 3.3. Filogenetik Analizler ve Dizi Hizalama

Pvul-CHS protein dizileri ClustalW aracı yardımıyla hizalanmıştır (Thompson et al. 1997). Filogenetik Analizler, 1.000 tekrarlı bootstrap değeriyle Neighbor-joining (NJ) metoduna göre MEGA v11 programı (Tamura et al. 2011) kullanılarak yapılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) veri tabanı yardımıyla görselleştirilmiştir (Letunic and Bork 2011).

#### 3.4. 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 nitelendirilmesi, karşılaştırmalı genomikteki temel hedeflerden biridir (Sinha and Meller 2007). TBtools programı (Chen et al. 2020) kullanılarak *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* genomlarında yer alan CHS genlerine ait sinteni haritası oluşturulmuştur.

#### 3.5. Fasulye CHS Gen Ailesinin Promotör ve Hücre İçi Lokalizasyon Analizleri

Fasulye CHS gen ailesi üyelerinin her bir genine ait yaklaşık 2 kb'lık DNA parçasını içeren 5' üst akış bölgesi (EK-1) PlantCARE (Lescot et al. 2002) veri tabanı

yardımıyla cis-acting element analizi yapılmıştır. WoLF PSORT veri tabanı yardımıyla (Horton et al. 2007) hücre içi konumlar belirlenmiştir.

#### **3.6. Fasulyede CHS Proteinlerinin Homoloji Modellemesi**

Daha önceden tespit edilen CHS protein dizileri kullanılarak proteinlerin homoloji modellemesine Phyre<sup>2</sup> veri tabanı yardımı ile 3 boyutlu yapılarına ulaşılmıştır (Kelley et al. 2015). Protein modellerine ait güvenilirlik değerleri %100 olanlar tercih edilip yapılan değerlendirme sonunda en iyi 3 boyutlu görüntü alınmıştır.

#### **3.7. Fasulye CHS 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 (Szklarczyk et al. 2023) veri tabanı 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. Pvul-CHS genlerine ait ontoloji verileri DAVID Biyoinformatik kaynakları veri tabanı kullanılarak Pvul-CHS proteinlerinin fonksiyonel bilgilerine erişilmiştir (Sherman et al. 2022).

#### **3.8. İn Siliko Gen İfade Analizi**

Fasulye CHS genlerinin ifade profillerini tespit etmek için Illumina RNA-seq verileri, NCBI veri tabanındaki Sequence Read Archive (SRA) veri kütüphanesinden alınmıştır. İlgili RNA-seq verilerini elde etmek için tuz stresinde PRJNA216981 ve kuraklık stresinde PRJNA508605 Bioproject erişim numaraları kullanılarak 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) (Gregorio Jorge et al. 2020) erişim numaralarından yararlanılmıştır. Gen ifade değerlerini normalleştirmek için bir milyon

eşlenmiş okuma başına ekzon modelinin kb başına okuma (RPKM) algoritmasından yararlanılmıştır (Mortazavi et al. 2008). RPKM değerleri  $\log_2$ 'ye dönüştürülüp CIMMiner (Anonymous 2023e) algoritması ile heatmap haritası temin edilmiştir.

#### 3.9. Bitkilerin Yetiştirilmesi, Büyüme Koşulları ve Stres Uygulamaları

Çalışmada stres uygulamaları Aygören et al. (2022)'ye göre yapılmıştır. Kısacası Serra ve Elkoca-05 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 aynı gelişim dönemindeki fideler alınarak 200 mL modifiye 1/10 Hoagland çözeltisi içeren saksılarda hidroponik olarak yetiştirilmiştir. Hoagland çözeltisi 2 mM Ca,  $10^{-6}$  M Mn, 4mM  $\text{NO}_3$ ,  $2 \cdot 10^{-7}$  M Cu, 1 mM Mg,  $10^{-8}$  M  $\text{NH}_4$ , 2 mM 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 ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve KCl) ve mikro besin elementleri ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{Mo}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) içermektedir. Fasulye fideleri %70 nem içeren,  $25^\circ\text{C}$  sıcaklıkta  $250 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  16/8 saat fotoperiyotta bitki büyütme odasında kontrollü koşullarda ilk üç yapraklı döneme kadar bekletilmiştir. İlk üç yapraklı döneme erişen fidelere 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 %20 PEG6000 içerecek şekilde Hoagland çözeltisinde 24 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda fasulye genotiplerinden yaprak dokusu sıvı azot içerisine alınarak çalışma yapılıncaya kadar  $-80^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Çalışmada kullanılacak fasulye genotipleri 3 tekerrürlü olarak ekilmiş olup qRT-PCR analizleri de 3 biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.10. RNA İzolasyonu

Kuraklık ve tuz stresi uygulanan dokulardan elde edilen bitki örneklerinin RNA izolasyonları Aygören et al. (2023)'de belirtildiği gibi yapılmıştır. RNA izolasyonları TRIzol® reagent (Invitrogen Life Technologies, ABD) kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır. İzolasyon basamakları aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

1. Önceden havanda öğütülen örnekler 50–100 mg doku gelecek şekilde tartılarak eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
2. 0,5 mL denatürasyon çözeltisinden alınıp eppendorf tüplerine eklenmiştir.
3. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
4. 0,5 mL ekstraksiyon çözeltisi eklenerek hızlı bir şekilde 15 sn elle çalkalanmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. 15 dakika boyunca 12.000g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir.
6. Üst faz steril bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.
7. RNA'yı çöktürmek için 0,5 mL izopropanol eklenip oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
8. 8 dakika boyunca 12.000g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA peletine 1 mL %75 EtOH eklenerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır.
10. 5 dakika boyunca 7.500g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir.
11. EtOH uzaklaştırılmış ve 5 dakika boyunca hava kurutması yapılmıştır.
12. RNA peleti 100 µl DEPC muameleli su ile çözdürülmüştür.
13. Solüsyon 55°C'de 10 – 15 dakika inkübe edilmiştir.
14. A<sub>260/280</sub> O.D. (Optik Densite) değerinde RNA örnekleri 1,6–1,9 değer aralığında bulunduğu görülmüştür.

#### 3.11. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

Total RNA konsantrasyonlarının ölçümleri Nanodrop'da gerçekleştirilerek A<sub>260/280</sub> O.D. değerindeki veriler elde edilmiştir. %1,2'lik agaroz jel hazırlanmış 10 mg/mL konsantrasyonundan 3 µl etidyum bromid (EtBr) eklenmiş, 6X loading dye, 3 µl

yükleme boyası, 3 µl RNA örneği 80-100 voltta, 40 dk süresince 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	--- µL
5x TransAmp Buffer	4 µL
Reverse Transkriptaz	1 µL
DNase/RNase free su	10 µL
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 dk. primer bağlanma
  - 42°C’de 15 reverse transkripsiyon
  - 85°C’de 5 dk. inaktivasyon
  - 4°C’de veya buz üzerine alınmıştır ve -20°C’de saklanmıştır.

#### 3.13. Kantitatif Real Time PCR Analizleri

*Pvul-CHS* gen ailesi üyelerinin ifade seviyeleri RotorGene Real-Time PCR Sistemi (Venlo-Hollanda) kullanılarak ölçülmüştür. Deneyle aşağıdaki protokol doğrultusunda yapılmıştır. Gerekli görüldüğü durumlarda bağlanma sıcaklıkları ve döngü sayılarında değişiklikler yapılmıştır. qRT-PCR deneyleri Thermo firmasının 2X’lik Fast SYBR® Green Master Mix kullanılarak yapılmıştır. Deneyle üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

qRT-PCR analizinde, 1:10 oranında seyreltilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. qRT-PCR reaksiyon içeriklerine ve reaksiyon sıcaklık döngüsüne ait program adımları aşağıda verilmiştir.

#### Real-Time PCR reaksiyon içerikleri

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
cDNA [1:10]	2.0 µl
Son hacim	25 µl

#### Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	
Ön	95	10 dk	
Denatürasyon			40 döngü
Denatürasyon	95	15 sn	
Bağlanma	55-63	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Melt	65°C'den 94°C'ye	3sn/her bir sıcaklık	

#### 3.14. Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmada yer alan primerler Çizelge 3.1'de yer almaktadır. İlgili genlere ait CDS sekansı kullanılarak Integrated DNA Technologies (IDT) Primer Quest aracı kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Housekeeping gen olarak fasulye bitkisine ait aktin geni (Aygören et al. 2023) kullanılmıştır.

**Çizelge 3.1.** qRT-PCR çalışmalarında kullanılan *Pvul-CHS* genlerine ait primer dizileri

Primer Adı	İleri Primer	Geri Primer
<i>Pvul-CHS-1</i>	CTCAAGGGTCTTCCTGATCTTATT	GTCCACCAGGATGCACTATC
<i>Pvul-CHS-2</i>	TGGTCTGACATTCCATGTTCTC	CAGAGAGGCTTAGTGGTTGAAA
<i>Pvul-CHS-3</i>	GACCAGGTTGAGGAGAAGTTAC	GCACTTGACATGTTCCATACTC
<i>Pvul-CHS-6</i>	TCCTGGGATTGTCTCAAAGAAC	CAGGGTGTGCAATCCAGAATA
<i>Pvul-CHS-13</i>	ACTTCGGCCTTATGTGAAGAG	CCTTGTTGTTCTCAGCCAAATC
<i>Pvul-CHS-14</i>	GGAGCTTCATCCGTGATTGT	CCCTCAGAGTTGGGTAGAATTG
<i>Pvul-ACT</i>	TGAGCAAGGAGATTACAGCATTGG	CATACTCTGCCTTCGCAATCCAC

#### 3.15. Verilerin Değerlendirilmesi

Kontrol, kuraklık ve tuz stresi uygulanmış fasulye bitkilerinde *Pvul-CHS* genlerine ait ifade profilleri ACT ile kıyaslanmıştır. İstatistiksel olarak belirlenen veriler  $2^{-\Delta\Delta ct}$  (Livak and Schmittgen 2001) yöntemine göre ve kontrol ile uygulamalar arasındaki fark One Way ANOVA (Dunnett) ile analizi gerçekleştirilmiştir (Dunnett 1955). Tüm qRT-PCR örnekleri 3 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrarlı olarak yürütülmüştür. Bu verilere ait istatistiksel anlamlılık oranları, standart sapma ve ortalamaları Graphpad Prism 9 yazılımı aracılığıyla yapılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. Fasulye Genomunda Tanımlanan CHS Gen Ailesinin Özellikleri

*P. vulgaris* genomunda Pfam veri tabanından elde edilen PF00195 ve PF02797 numaraları ve EC 2.3.1.74 nolu enzim komisyon numarası ile Phytozome v13 veri tabanında arama gerçekleştirilerek toplamda 14 adet kalkon sentaz geni tespit edilmiştir ve bu genler Pvul-CHS-1, Pvul-CHS-2, Pvul-CHS-3, Pvul-CHS-4, Pvul-CHS-5, Pvul-CHS-6, Pvul-CHS-7, Pvul-CHS-8, Pvul-CHS-9, Pvul-CHS-10, Pvul-CHS-11, Pvul-CHS-12, Pvul-CHS-13 ve Pvul-CHS-14 olarak adlandırılmıştır. Yapılan literatür taramalarında farklı bitki türlerinde CHS gen ailesi üyelerinin tanımlaması yapılmıştır. Buna göre *Solanum melongena* L. (Wu et al. 2020)'da 7 adet, *Nicotiana tabacum* L. (Chen et al. 2017)'da 5 adet, *Chrysanthemum nankingense* (Zhu et al. 2022)'da 16 adet, *Zostera marina* L. (Ma et al. 2021)'da 11 adet, *Mangifera indica* L. (Hu et al. 2022)'da 21 adet ve *Zea mays* L. (Han et al. 2016)'de 14 adet CHS gen ailesi üyesi tespit edilmiştir.

Pvul-CHS genlerinin konumları, başlangıç ve bitiş noktaları, protein uzunlukları, izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları ve kararsızlık indeksleri, Çizelge 4.1'de açıklanmıştır. Fasulyede tanımlanan CHS proteinlerinin uzunlukları 341 ile 393 adet amino asit, moleküler ağırlıkları 37,38 ile 43,34 kDa, izoelektrik noktasının asidik bölgede bulunduğu ve 5,82 ile 6,40 arasında değerler alarak değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Pvul-CHS-3 hariç diğer tüm CHS genlerinin kararlı yapıda olduğu belirlenmiştir. *Mangifera indica* L.'de protein uzunlukları 304 ile 411 aminoasit, moleküler ağırlıkları 33,47 ile 46,06 kDa, izoelektrik noktalarının hem asidik hem de bazik bölgelerde bulunduğu ve 5,97 ile 8,74 arasında olduğu belirlenmiştir (Hu et al. 2022). *Zostera marina*'da protein uzunlukları 241 ile 396 aminoasit, moleküler ağırlıkları 23,23 ile 43,64 kDa, izoelektrik noktalarının hem asidik hem de bazik bölgelerde bulunduğu ve 6,25 ile 7,58 arasında olduğu belirlenmiştir (Ma et al. 2021). Mısırdaki protein uzunlukları 326 ile 472 aminoasit, moleküler ağırlıkları 35,27 ile 49,69 kDa, izoelektrik noktalarının hem asidik hem de bazik bölgelerde bulunduğu ve 5,35 ile 7,58 arasında olduğu belirlenmiştir (Han et al. 2016). Elde edilen bu verilere göre CHS proteinlerinin izoelektrik noktalarında meydana gelen değişimler incelendiğinde hem

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

asidik hem bazik karaktere sahip oldukları, protein uzunlukları ve moleküler ağırlıklarında farklı farklı değerler alabildiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *P. vulgaris* CHS protein kataloğu

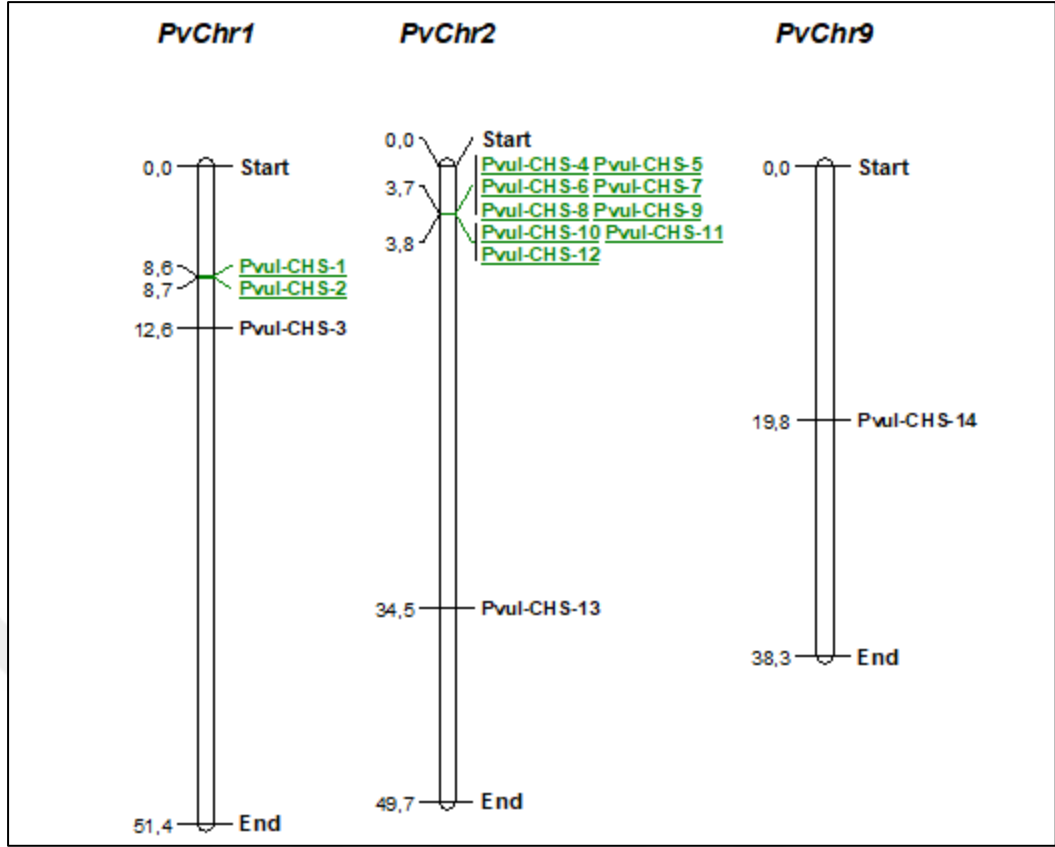
Gen Adı	Phytozome ID	Kromozomal Lokasyonlar			AA Uzunluğu	Molekül Ağırlığı (KDa)	pI	Kararlılık İndeksi
Pvul-CHS-1	Phvul.001G067800	8612565	8613862	Geri Chr01	389	43.04	5,82	Stabil
Pvul-CHS-2	Phvul.001G067950	8657704	8659078	Geri Chr01	389	43.11	6,39	Stabil
Pvul-CHS-3	Phvul.001G083000	12575232	12577364	İleri Chr01	391	43.04	6,24	Stabil Değil
Pvul-CHS-4	Phvul.002G038600	3704298	3705927	Geri Chr02	389	42.68	6,1	Stabil
Pvul-CHS-5	Phvul.002G038700	3710852	3712431	Geri Chr02	389	42.72	5,82	Stabil
Pvul-CHS-6	Phvul.002G038800	3716703	3718257	Geri Chr02	389	42.69	6,27	Stabil
Pvul-CHS-7	Phvul.002G038900	3726333	3727795	Geri Chr02	389	42.73	5,96	Stabil
Pvul-CHS-8	Phvul.002G039000	3734660	3736221	Geri Chr02	389	42.70	6,1	Stabil
Pvul-CHS-9	Phvul.002G039100	3744175	3745756	İleri Chr02	389	42.68	6,27	Stabil
Pvul-CHS-10	Phvul.002G039166	3749576	3751066	İleri Chr02	341	37.38	6,4	Stabil
Pvul-CHS-11	Phvul.002G039232	3756479	3757928	İleri Chr02	389	42.70	6,1	Stabil
Pvul-CHS-12	Phvul.002G039300	3760668	3762142	Geri Chr02	389	42.73	6,27	Stabil
Pvul-CHS-13	Phvul.002G184300	34495833	34497370	Geri Chr02	389	42.68	6,11	Stabil
Pvul-CHS-14	Phvul.009G131000	19791491	19792969	Geri Chr09	393	43.34		Stabil

pI: Teorik izoelektrik noktası, AA: Amino asit

### 4.2. Pvul-CHS Genlerinin Kromozomal Dağılımı

Phytozome veri tabanı, *P. vulgaris*'e ait Pvul-CHS genlerinin pozisyon bilgisi ve kromozomal lokasyonlarını belirlemek için kullanılmıştır. Fasulye CHS genlerinin kromozomal dağılımları ve dağılım oranları ise Voorrips (2002) tarafından geliştirilen MapChart programı kullanılarak çizilmiştir. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, CHS genlerine ait kromozom dağılıŐları 1, 2 ve 9. kromozom üzerinde olduğu görülmüştür. 1. kromozom üzerinde 3, 2. kromozom üzerinde 10 ve 9. kromozom üzerinde yalnızca 1 gen bulunduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde *Zea mays* bitkisinde CHS genine ait kromozom dağılıŐları 1, 2, 3, 4, 5 ve 7. kromozomlar üzerinde dağıldığı tespit edilmiştir. 2, 5 ve 7. kromozomlarda 2 gen dağılım gösterirken 1. kromozomda 1, 3. kromozomda 3 ve 4. kromozomda 4 adet genin bulunduğu belirlenmiştir (Han et al. 2016). Benzer Şekilde yapılan farklı bir çalışmada *Glycine max* bitkisinde CHS genlerinin kromozomlara dağılımları incelenmiş ve 8 farklı kromozom üzerinde dağılım gösterdiği görülmüştür. Bu dağılımların 2, 5, 6, 9, 11 ve 19. kromozomlarda 1 tane, 1. kromozomda 2 ve 8. kromozomda 9 tane CHS geni olacak Şekilde dağıldığı tespit edilmiştir (Anguraj et al. 2018).

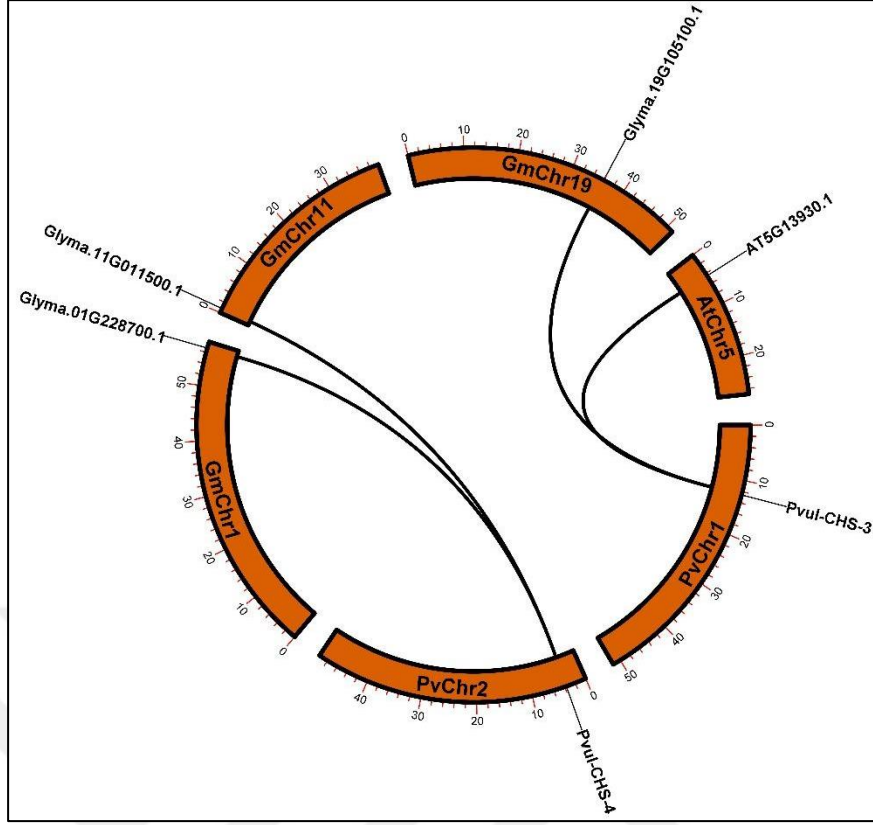


**Şekil 4.1.** Fasulye CHS genlerinin kromozomal dağılımları (Benzer renklerde ve altı çizili olarak gösterilenler tandem duplike genleri göstermektedir).

### 4.3. Pvul-CHS Gen Ailesinin Karşılaştırmalı Haritalaması

Yapılan analizler sonucunda Şekil 4.2’de gösterildiği gibi *P. vulgaris*, *Glycine max* ve *A. thaliana* bitkileri arasında sintenik ilişkiler tespit edilmiştir. Pvul-CHS-4 geni ile Glyma.01G228700.1 ve Glyma.11G011500.1 genleri arasında ve Pvul-CHS-3 geni ile AT5G13930.1 ve Glyma.19G105100.1 genleri arasında ortolog bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

Benzer şekilde yapılan çalışmalar incelendiğinde çeltikte (*Oryza sativa*) gerçekleştirilen sintetik ilişki analizlerinde *O. sativa-Z. mays* ile *O. sativa-Sorghum bicolor* türleri arasında karşılaştırma gerçekleştirilmiş ve birçok sintetik ilişki tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda *O. sativa-Z. mays* arasında 4 ve *O. sativa-S. bicolor* arasında 4 olacak şekilde 3 tür arasında toplamda 8 sintetik ilişki belirlenmiştir (Han et al. 2017).



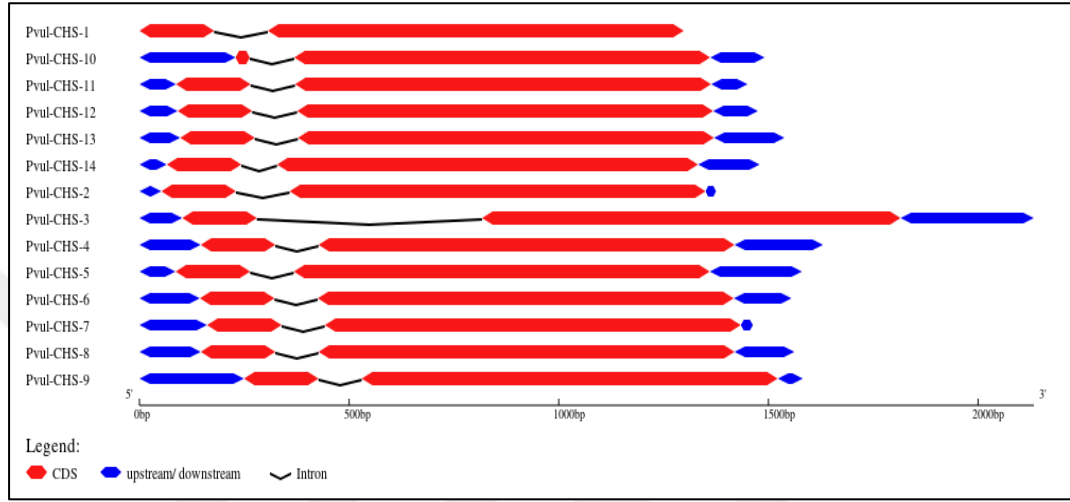
**Şekil 4.2.** *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* genomlarına ait CHS genlerinin karşılaştırmalı haritası. Siyah çizgiler *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* arasında tespit edilen sintetik ilişkiyi gösterir.

#### 4.4. Pvul-CHS genlerinin Ekzon ve İntron Bölgeleri

Çoklu gen ailelerinin evriminde önemli bir rol oynayan ve gen ailesi üyeleri arasındaki ekzon ve intron çeşitliliği temel olarak üç mekanizmaya sahiptir: ekzon/intron kazanımı veya kaybı, ekzonizasyon (ekzonik halde bulunan intronik veya intergenik bir dizi) / psödoekzonizasyon (ekzonizasyonun tersi halde bulunan dizi) ve insersiyon/delesyon (Xu et al. 2012; Kasapoğlu vd 2020). Pvul-CHS genlerinin ekzon-intron durumunu belirlemek için Gene Structure Display Server v2.0 (Hu et al. 2015) veritabanından faydalanılmıştır. Şekil 4.3'te gösterildiği gibi, Pvul-CHS genlerinin boyutları (bp) ve intron sayıları tespit edilmiştir. Analizler sonucunda, Pvul-CHS genlerinin 14 adet intron ve 28 adet ekzon içerdiği belirlenmiştir. Tespit edilen intron/ekzon içeriğinin tüm Pvul-CHS'lerde 1 intron ve 2 ekzon olacak şekilde tüm genlerde eşit olarak dağıldığı tespit edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

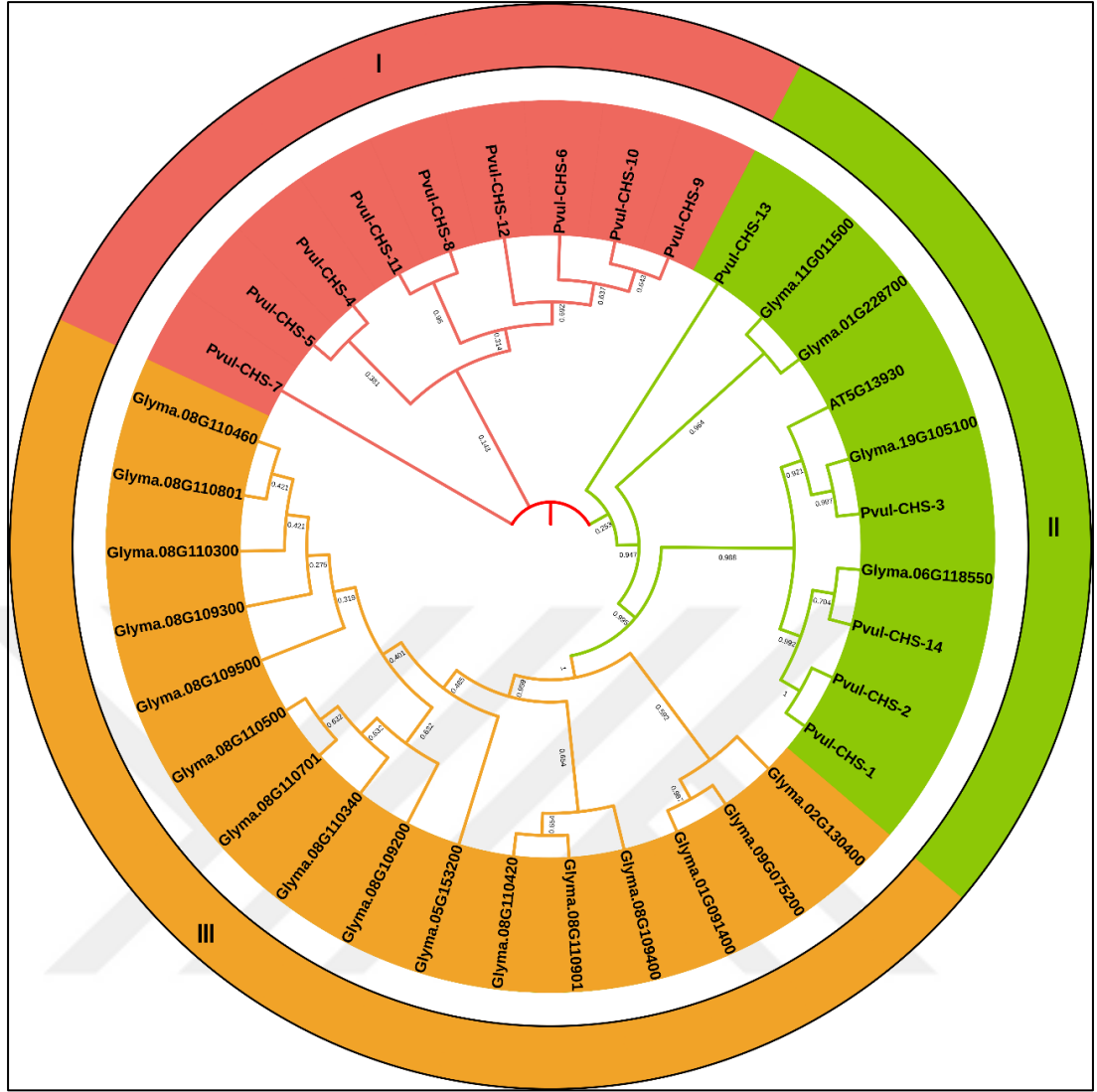
Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde tespit edilen CHS genlerinde bulunan intron ve ekzon sayıları *G.max* (Anguraj et al. 2018)'da 21 adet intron ve 38 adet ekzon, *S. melongena* (Wu et al. 2020)'da 8 adet intron ve 15 adet ekzon ve *Z. mays* (Han et al. 2016)'da 14 adet intron ve 28 adet ekzon belirlenmiştir. Belirlenen intron ve ekzon sayılarının tüm genlerde eşit dağılmadığı rapor edilmiştir.



Şekil 4.3. Fasulye CHS genlerinin ekzon ve intron bölgeleri

#### 4.5. Pvul-CHS Proteinlerinin Türler Arası Filogenetik Analizi

CHS proteinlerinin evrimsel ilişkilerini açıklamak ve potansiyel fonksiyonlarını tahmin etmek için *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* türlerine ait CHS protein dizileri Phytozome veri tabanından indirilmiştir. Bu çalışmada, CHS proteinleri I, II, III şeklinde üç gruba ayrılarak, neighbor-joining (komşu katılım) metodu ve 1.000 tekrarlı bootstrap değeri kullanılarak ağaç çizilip görsel olarak sunulmuştur (Şekil 4.4). I nolu grupta yalnızca *P. vulgaris* genomuna ait CHS genleri bulunurken, III nolu grupta yalnızca *G. max* genomuna ait CHS genleri bulunmaktadır. I ve III. Grubun aksine II. grupta *P. vulgaris*, *G.max* ve *A. thaliana* arasında ortoloji görülmüştür. Farklı türler ile yapılan diğer çalışmalarda benzer şekilde *Chrysanthemum nankingense* (Zhu et al. 2022)'da 4 ve *Solanum melongena* L. (Wu et al. 2020)'da 10 farklı gruba ayırım olduğu görülmüştür.



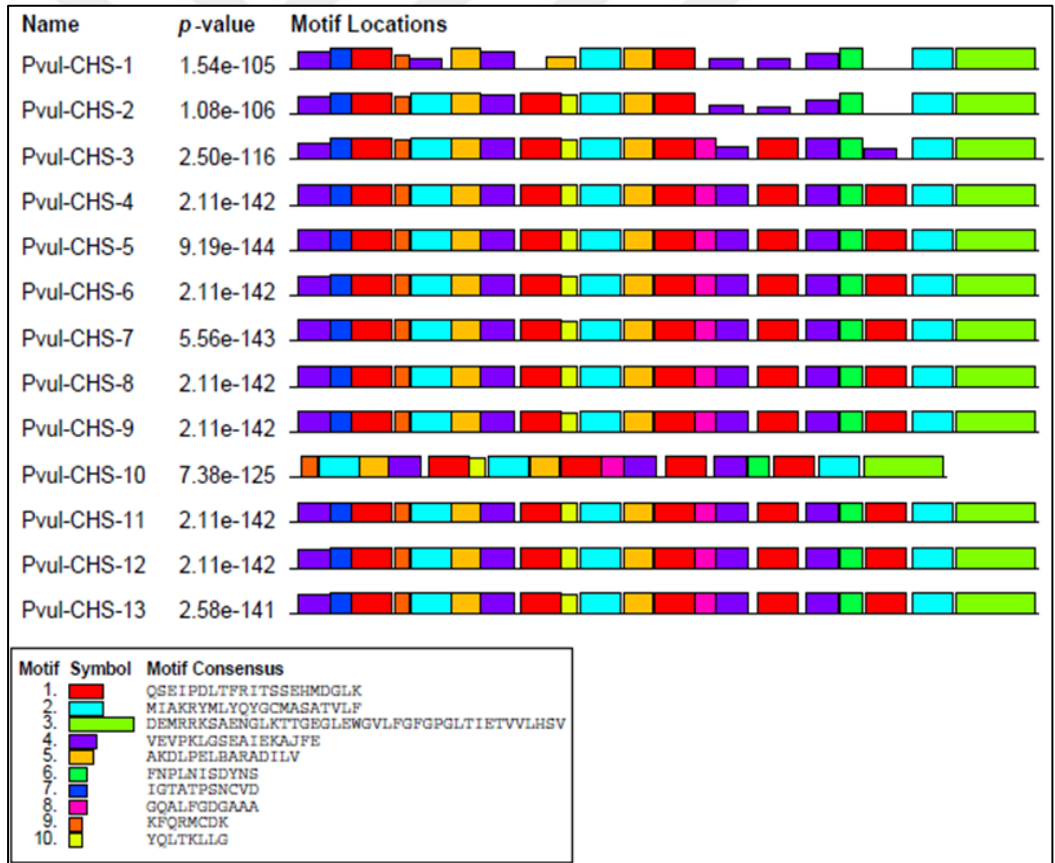
**Şekil 4.4.** Üç farklı bitki türünden elde edilen CHS proteinlerinin filogenetik ağacı. Ağaç komşu katılım (NJ) metodu ile MEGA programı kullanılarak amino asit benzerliğine dayalı olarak çizildi.

#### 4.6. Pvul-CHS Genlerinin Korunmuş Dizi Motifleri

Pvul-CHS proteinlerine ait peptid dizilerinde bulunan korunmuş bölgeler, yapılan filogenetik analizleri doğrular niteliktedir. Fasulyede tespit edilen 14 CHS proteinine ait korunmuş motif analizinde 10 adet motif tespit edilmiştir. Benzer motif grupları CHS 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). Pvul-CHS proteinlerine ait motiflerin genişlik (aa), muhtemel en iyi eşleşme değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde *Solanum melongena* al.’da 10 adet motif

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

bulunmuştur (Wu et al. 2020). Bulunan bu motiflere ait diziler incelendiğinde Pvul-CHS genlerinde tespit ettiğimiz motiflere ait dizileri içerdiği ve her iki bitkide’de tespit edilen motiflerin benzerlik gösterdiği görülmüştür. *S. melongena*’da tespit edilen Motif 1’in Pvul-CHS genlerinde tespit ettiğimiz Motif 10’u ve aynı şekilde *S. Melongena*’da tespit edilen Motif 4’ün de Pvul-CHS genlerinde tespit edilen Motif 7’yi içerdiği görülmüştür. CHS genlerine ait korunmuş motif dizileri InterPro-Scan arayüzü kullanılarak tarandı. Yapılan analizler sonucunda belirlenen motiflerden Motif 3’ün Chal-sti-synt\_C (Chalcone/stilbene synthase, C-terminal) domainini içerdiği tespit edildi. CHS genleri ile farklı bitki genomlarında yapılan çalışmalar incelendiğinde *Chrysanthemum nankingense* (Zhu et al. 2022), *Zea mays* (Han et al. 2016)’da ve *Solanum melongena* (Wu et al. 2020) gibi benzer çalışmalarda yapılan analizler sonucunda aynı domainlerin varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Pvul-CHS genlerinin korunmuş dizi bölgeleri

**Çizelge 4.2.** Pvul-CHS genlerinin korunmuş motiflerinin özellikleri

MOTIF ID	GENİŞLİK	MUHTEMEL EN İYİ EŞLEŞME	DOMAIN
1	21	WSEYPHYFYFCITSHEHMPGLK	yok
2	21	MYKKRYMHYQYGCMSSNCNMC	yok
3	41	DEMRRKSAENGLKTTGEGLEWGVLFGE GPGLTIETVVLHSV	Chal-sti-synt_C
4	17	VEVPQIQRENIPKAIFE	yok
5	15	AYMAPSNNKRQRIVV	yok
6	11	FNPLNISDYNS	yok
7	11	IGTATPSNCVD	yok
8	11	GQALFGDGAAA	yok
9	8	KFQRMCDK	yok
10	8	YQLTKLLG	yok

#### 4.7. Fasulye Genomunda Bulunan CHS Genlerine Ait Duplikasyonlar

Gen duplikasyonları, farklı bitki türlerinde CHS gen ailesinin varlığını gösterir ve genel olarak benzer olan genler arasındaki ilişkiyi açıklamada önemli bir rol oynar. Gen ailelerinin büyümesinde ve genişlemesinde en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilirler. Ayrıca, proteinlerde yeni fonksiyonların belirlenmesine yardımcı olmak için evrimsel ilişkilerin tespitinde kullanılırlar. Gen duplikasyonları, segmental ve tandem duplikasyon olarak iki gruba ayrılır. Eğer aynı kromozomda bulunuyorlarsa, bu tandem duplikasyon olarak adlandırılır. Ancak aynı genin farklı alleli farklı kromozomlar üzerinde bulunuyorsa, bu durum segmental duplikasyon olarak bilinir (Clancy and Shaw 2008).

*P. vulgaris* genomundaki gen duplikasyon olayları, varsayılan parametrelerle MCScanX (Wang et al. 2012) kullanılarak belirlenmiştir. ClustalW ile hizalanan tandem olarak duplike olmuş Pvul-CHS gen dizilerinin homolog olan (Ks) ve homolog olmayan (Ka) değerleri TBtools programı yardımıyla (Chen et al. 2020) Ka/Ks hesaplama aracı kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Duplikasyon süresi (milyon yıl önce, Mya) ve her Pvul-CHS geninin ayrışması, Çizelge 4.3’de detaylı olarak gösterilmiştir (Schmutz et al. 2014). Yapılan CHS genleriyle ilgili gen duplikasyon analizlerinde, 8 adet tandem duplikasyonuna rastlanmıştır fakat segmental duplikasyon tespit edilmemiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde CHS gen ailesi üyelerine ait hem segmental hem de tandem

duplikasyonlarının varlığı rapor edilmiştir (Han et al. 2016; Ma et al. 2021; Hu et al. 2022; Zhu et al. 2022).

Evrimsel süreçte gen duplikasyon olayları, proteinlerin yeni fonksiyonel özellikler kazanmasını sağlar (Kondrashov et al. 2002). Darwinian pozitif seleksiyon yoluyla belirlenen gen ailelerinin gelişimi, genlerin ayrıştırılması ve çoğaltılması araştırılmıştır. Bu ilişkileri yorumlamak için homolog olmayan (Ka) ve homolog olan (Ks) değişim oranları (Ka/Ks), tandem ve segmental gen duplikasyonuna uğramış gen çiftleri ve ortolog gen çiftleri için hesaplanmıştır. Ayrıca, Ka/Ks oranı 1'den büyük olduğunda evrimsel süreçte pozitif seleksiyonu, 1'den küçük olduğunda arındırıcı seleksiyonu ve 1'e eşit olduğunda doğal seleksiyonu göstermektedir (Juretic et al. 2005, İlhan 2018a, İlhan 2018b, İlhan et al. 2023, Kızılkaya vd 2020, Kasapoğlu vd 2020). Yapılan bu çalışmada herhangi bir segmental duplikasyona rastlanmamış olup yalnızca tandem duplikasyonun varlığı tespit edilmiştir. Çizelge 4.3'de görülebileceği üzere yapılan analizler sonucunda *P. vulgaris* genomunda bulunan CHS genleri incelendiğinde tüm duplike genlerin arındırıcı seleksiyona maruz kaldığı görülmüştür. Han et al. (2016) yaptıkları çalışmada, Mısırdaki 2 ZmCHS paralog çiftinin tümünde Ka/Ks oranının <1 olduğunu ve bu genlerin arındırıcı seleksiyona maruz kaldığını belirlemiştir. Zhu et al. (2022) yaptıkları çalışmada *Chrysanthemum nankingense*'de bulunan 6 CnCHS paralog çiftinin tümünde Ka/Ks oranının <1 olduğunu ve bu genlerin arındırıcı seleksiyona maruz kaldığını tespit etmiştir.

CHS gen ailesindeki evrimsel yayılımın incelenmesi için, fasulye genomunda tespit edilen tandem duplike genlerinin homolog olmayan (Ka), homolog olan (Ks), Ka/Ks değişim oranları hesaplanmıştır. Pvul-CHS genlerinin tandem duplikasyon olayları incelendiğinde ilk gen ayrılmasının Pvul-CHS-4 ve Pvul-CHS-5 genleri arasında tahmini olarak 8,63 MYÖ meydana geldiği, en son ayrımın ise Pvul-CHS-1 ve Pvul-CHS-2 genleri arasında tahmini olarak 1,55 MYÖ gerçekleştiği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.3.** Pvul-CHS gen dupliksayonlarının Ka/Ks oranı

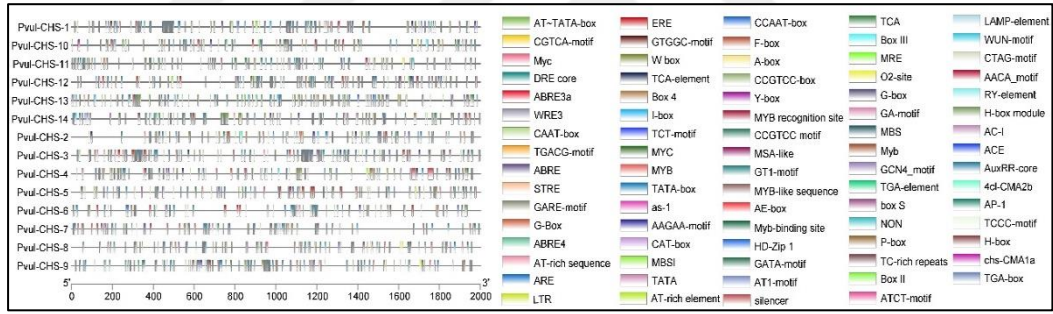
Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ	Seleksiyon	Duplikasyon
<i>Pvul-CHS-1</i>	<i>Pvul-CHS-2</i>	0,02	0,03	0,60	1,55	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-4</i>	<i>Pvul-CHS-5</i>	0,00	0,15	0,02	8,63	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-6</i>	<i>Pvul-CHS-7</i>	0,01	0,08	0,07	4,62	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-7</i>	<i>Pvul-CHS-8</i>	0,01	0,06	0,12	3,4	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-8</i>	<i>Pvul-CHS-9</i>	0,00	0,05	0,08	3,17	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-9</i>	<i>Pvul-CHS-10</i>	0,00	0,07	0,04	3,96	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-10</i>	<i>Pvul-CHS-11</i>	0,01	0,10	0,07	5,63	Arındırıcı	Tandem
<i>Pvul-CHS-11</i>	<i>Pvul-CHS-12</i>	0,00	0,06	0,07	3,65	Arındırıcı	Tandem

#### 4.8. Pvul-CHS Genlerinin Promotor Analizi

Promotör bölgeleri, gen transkripsiyonunun başlangıç bölgesine yakın DNA bölgeleridir ve direkt olarak gen ifadesinin kontrolünü sağlayan en önemli gen elemanlarıdır. Promotörler, spesifik cis düzenleyici elemanlar tarafından düzenlenerek çevresel streslere yanıt olarak gen ifadesini kontrol ederler. ABA'ya yanıt olarak ABA duyarlı eleman olan ABRE ve yüksek tuzluluk, dehidrasyon, düşük sıcaklığa ve kuraklığa duyarlı olan DRE/CRT gibi farklı bitki türlerinde iyi karakterize edilmiş çeşitli abiyotik streslere duyarlı cis-acting elementler vardır (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). Tüm CHS genlerinin 5' üst akış bölgesinin 2 kb gerisinden elde edilen sekanslar incelenmiş ve CHS genlerindeki promotör bölgesi elemanlarının bitkisel gelişimde, değişen çevresel koşullara uyum sağlamada ve abiyotik streslere karşı verilen moleküler cevaplarda etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışması, fasulye genomunda tanımlanan CHS genlerine ait promotör bölgelerinde yer alan cis-acting elementlerin analizini içermekte olup, tespit edilen cis elementler belirtilmiştir. Bu çalışmada *P. vulgaris* türüne ait 79 adet cis-acting element tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bunlar ışığa duyarlı elemanlar, çevresel stresle ilişki elemanlar, promotör ile ilgili elemanlar, hormona duyarlı elemanlar gibi birçok fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiş ve bu fonksiyonların ne olduğuna dair açıklamalar Çizelge 4.4'de belirtilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda *Mangifera indica* L. (Hu et al. 2022)'da 57 adet, *Zostera marina* (Ma et al. 2021)'da 297 ve aynı şekilde *Solanum melongena* L. (Wu et al. 2020)'da 297 adet cis-acting element tespit edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bitkilerin abiyotik stres faktörlerine tepkisi büyük ölçüde transkripsiyon faktörleri ile cis-acting elementler arasındaki etkileşimle belirlenir (Liu et al. 2014). Transkripsiyon faktörleri, bitkilerin gen ifadesini düzenlemesine, abiyotik ve biyotik stres faktörlerine yanıt vermesine ve gelişimsel süreçleri değiştirmesine olanak tanıyan düzenleyici sistemlerdir (Mitsuda and Ohme-Takagi 2009). Yapılan analizler sonucunda Pvul-CHS genleri üzerinde abiyotik stres faktörleriyle ilişkili ABRE, ARE, DRE ve MYB cis-acting elementlerini içerdikleri belirlenmiştir. Bu analizler sonucu abiyotik streslere karşı savunma ile ilişki olan ABRE, ARE, DRE ve MYB gibi elementlerin Pvul-CHS genlerinin promotör bölgesinde bulunduğu tespit edildi. ABRE ve MYB elementi tüm CHS genlerinde bulunurken ARE elementi Pvul-CHS -3, -8 ve -11 harici tüm genlerde tespit edilmiştir. DRE elementi ise Pvul-CHS-1 ve -2 genlerinde belirlenmiştir. Benzer çalışmalar incelendiğinde *Solanum melongena* L. (Wu et al. 2020)'da MBS elementiyle ilişkili 1, CGTCA-motif ile ilişkili 4, MYB ile ilişkili 13 ve ABRE ile ilişkili 5 adet gen tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Pvul-CHS genlerine ait cis-acting element haritası

Çizelge 4.4. Cis-acting elementlerin fonksiyonları

Cis acting element	Fonksiyonu
ABRE	Abisisik asit yanıtı
ARE	Anaerobik indüksiyon
CAAT-box	Promotör ve geliştirici bölgeler
MSA-like	Hücre döngüsü düzenlemesi
MYB	Tuz ve kuraklık stresi yanıtı
DRE	Kuraklık stresi yanıtı
TATA-box	Transkripsiyon başlangıcı
TCA-element	Salisilik asit yanıtı
Box 4	Işık yanıtı
TC-rich repeats	Stres yanıtı
CGTCA-motif	MeJA yanıtı
LTR	Düşük sıcaklık yanıtı
MSB	Kuraklık yanıtı

#### 4.9. Pvul-CHS Genlerinin Ontoloji Analizleri

DAVID Biyoinformatik kaynakları veritabanı analizlerine göre Chalcone synthase (CHS) hücre içerisinde Flavonoid Biyosentez yolağında görev yaptığı ve moleküler fonksiyonunun Narencin-kalkon sentaz aktivitesini katalizlediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Benzer olarak yapılmış çalışmalar incelendiğinde *Z. mays*'da bulunan CHS genleri ile yapılan gen ontoloji analizlerinde fasulyede olduğu gibi hücre içi Chal\_sti\_synt\_N domainine bağlı chalcone synthase aktivitesi gösterdiği görülmüştür (Han et al. 2016). Diğer bir çalışmada ise *Cucumis sativus* L. bitkisinde gerçekleştirilen gen ontoloji analizleri sonucu CHS genlerinin bitki büyümesinde ve abiyotik stres faktörlerine verilen yanıtta görev yaptığı tespit edilmiştir (Ahmad et al. 2023).

**Çizelge 4.5.** DAVID biyoinformatik kaynak veritabanı analizleri sonucu elde edilmiş veriler.

Gen Adı	Phytozome No	Protein No	GO Id	Fonksiyon
Phvul.001G067800.1	Pvul-CHS-1	XP_007161427.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi
Phvul.001G083000.1	Pvul-CHS-3	XP_007161599.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi
Phvul.002G038600.1	Pvul-CHS-4	XP_007157042.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi
Phvul.002G038700.1	Pvul-CHS-5	XP_007157043.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi
Phvul.002G039300.1	Pvul-CHS-12	XP_007157053.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi
Phvul.002G184300.1	Pvul-CHS-13	XP_007158815.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi
Phvul.009G131000.1	Pvul-CHS-14	XP_007137487.1	GO:0016210	Narencin-kalkon sentaz aktivitesi

#### 4.10. Tanımlanan Pvul-CHS Genlerinin Hücre İçi Lokalizasyonu

Fasulyede bulunan CHS genlerinin hücre içi lokalizasyonu Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. WoLFPSORT (Horton et al. 2007) veri tabanından elde edilen bilgiler neticesinde hücre içinde en fazla bulunma miktarı 8 farklı bölge ile Pvul-CHS- 2 geninde belirlenirken en az yerleşim gösteren genler ise 4 farklı bölge ile Pvul-CHS-4, -8, -10, -11, -12 ve -14 olarak tespit edilmiştir. Diğer bitki türlerinde yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde *Chrysanthemum nankingense* (Zhu et al. 2022) bitkisinde bulunan CHS genlerine ait hücre içi lokalizasyonlar incelendiğinde 5 CHS geninin kloroplastta, 10 CHS geninin sitoplazmada ve sadece 1 CHS geninin çekirdekte bulunduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada *Solanum melongena* L. (Wu et al. 2020)

bitkisinde tespit edilen 7 CHS geninin biri çekirdekde, ikisi kloroplastta ve geriye kalan 4 CHS genininde sitoplazmada dağılış gösterdiği rapor edilmiştir.

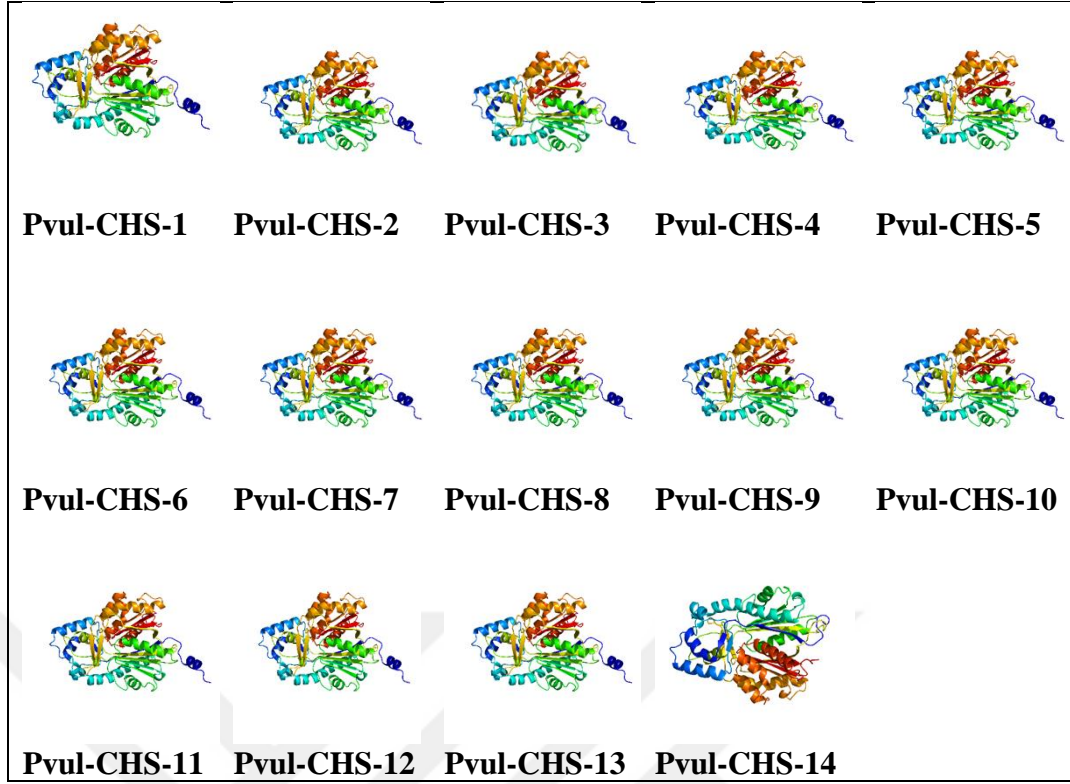
**Çizelge 4.6.** Pvul-CHS genlerinin hücre içi lokalizasyonları

Gen Adı	WolfPsort
<i>Pvul-CHS-1</i>	cyto: 9, chlo: 2, plas: 2, E.R._vacu: 1
<i>Pvul-CHS-2</i>	cyto: 8, chlo: 1, nucl: 1, mito: 1, plas: 1, pero: 1, E.R._vacu: 1
<i>Pvul-CHS-3</i>	cyto: 9, cysk: 2, chlo: 1, nucl: 1, E.R._vacu: 1
<i>Pvul-CHS-4</i>	chlo: 6, cyto: 6, nucl: 1, mito: 1
<i>Pvul-CHS-5</i>	chlo: 6, cyto: 5, nucl: 1, mito: 1, vacu: 1
<i>Pvul-CHS-6</i>	chlo: 6, cyto: 5, nucl: 1, mito: 1, vacu: 1
<i>Pvul-CHS-7</i>	chlo: 6, cyto: 5, nucl: 1, mito: 1, vacu: 1
<i>Pvul-CHS-8</i>	chlo: 6, cyto: 6, nucl: 1, mito: 1
<i>Pvul-CHS-9</i>	chlo: 6, cyto: 5, nucl: 1, mito: 1, vacu: 1
<i>Pvul-CHS-10</i>	cyto: 10, pero: 2, nucl: 1, mito: 1
<i>Pvul-CHS-11</i>	chlo: 6, cyto: 6, nucl: 1, mito: 1
<i>Pvul-CHS-12</i>	chlo: 6, cyto: 6, nucl: 1, mito: 1
<i>Pvul-CHS-13</i>	chlo: 6, cyto: 3, cysk: 2, nucl: 1, mito: 1, vacu: 1
<i>Pvul-CHS-14</i>	cyto: 10, nucl: 2, mito: 1, golg: 1

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

#### 4.11. Pvul-CHS Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

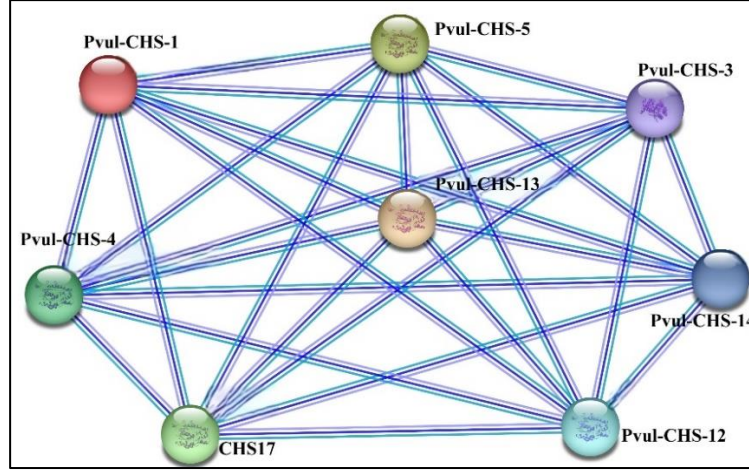
Protein Veri Bankası (PDB) içindeki CHS proteinleri blastp aracılığıyla taranmış ve bu proteinlerin 3 boyutlu homoloji modelleri görsel olarak açıklanabilir şekilde Phyre<sup>2</sup> (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) veri tabanı yardımıyla elde edilmiştir. Şekil 4.5'te, saptanan proteinlerin 3 boyutlu homoloji modelleri yer almaktadır. 14 CHS geninin 3 boyutlu yapıları homoloji modellemesi kullanılarak %100 doğruluk oranıyla tespit edilmiştir. Proteinlerin 3 boyutlu yapısı incelendiğinde tamamında alfa-helikal yapının ağırlıklı olduğu görülmüştür. Buna istinaden genel olarak protein yapıları incelendiğinde alfa-helikal yapının çoğunlukta olduğu görülse de beta tabakalarında yoğunluğunun bulunduğu tespit edilmiştir. *P. vulgaris*'de bulunan 14 CHS geninin 13'ünde benzer alfa-helikal ve beta tabaka oranı görülürken Pvul-CHS-14 de meydana gelen katlanmalar incelendiğinde alfa-helikal yapıların beta tabakalara göre çok daha yüksek yoğunlukta olduğu görülmüştür.



Şekil 4.7. PvuI-CHS proteinlerinin 3 boyutlu yapı modellemesi

#### 4.12. PvuI-CHS Protein-Protein Etkileşimleri

PvuI-CHS proteinlerinin protein-protein etkileşimleri Şekil 4.8’de görsel olarak anlaşılır hale getirilmiştir ve bu gösterim için STRING (Szklarczyk et al. 2023) veri tabanı kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucu tespit edilen protein-protein etkileşimlerine dayalı olarak PvuI-CHS proteinlerinin tamamının dahil oldukları biyolojik aktivitelerin flavonoid biyosentezinde narengin-chalcon sentaz aktivitesinde görev yaptığı görülmüştür. Çizelge 4.5’te belirtilen CHS proteinleri, biyolojik aktivitelerine göre fonksiyonel gruplara ayrılmıştır. Protein-protein etkileşimleri göz önüne alındığında tüm proteinlerin birbirleri ile eşit oranda etkileşimde bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.8).

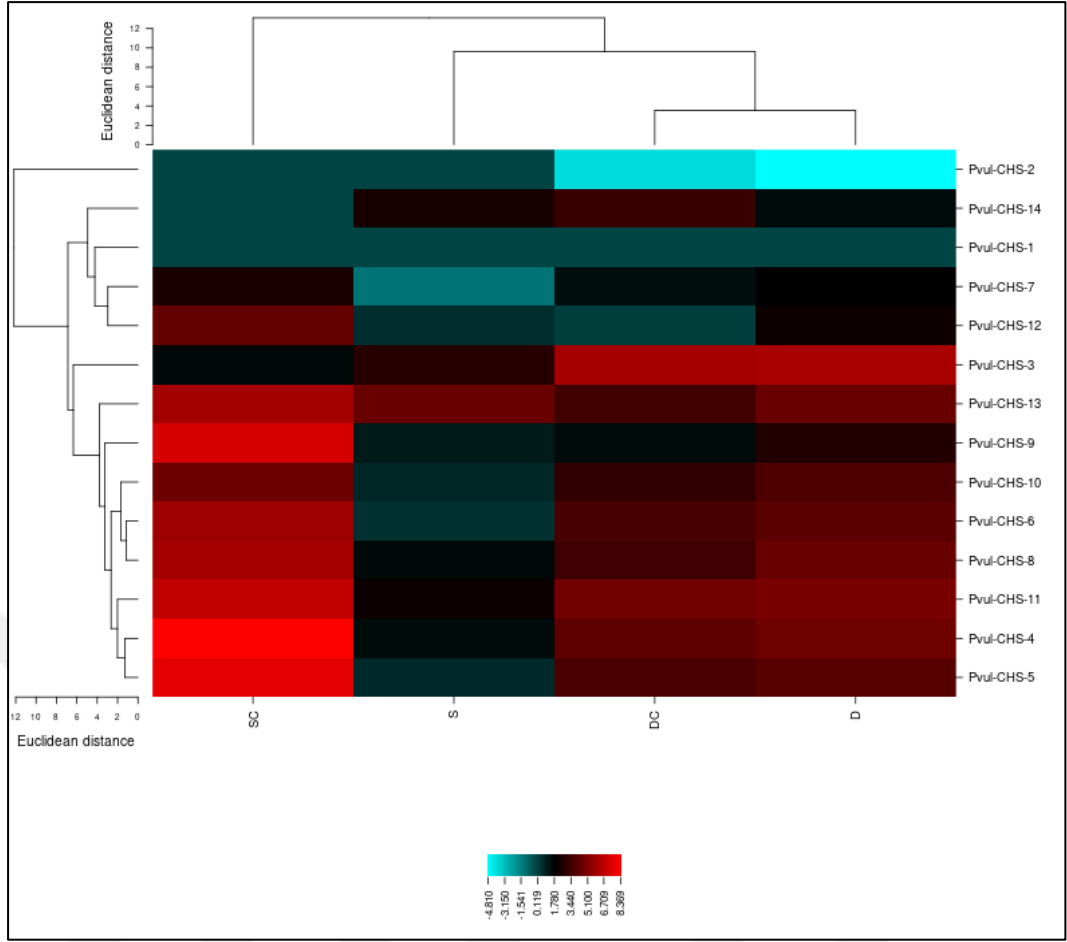


Şekil 4.8. *Pvul-CHS* genlerinde bulunan protein- protein etkileşimler

#### 4.13. Fasulyede Tuz ve Kuraklık Stresi ile ilişkili CHS Genlerinin İn Siliko İfade Analizi

Fasulye CHS genlerinin tuz ve kuraklık stresiyle ilişkili in silico 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 stresiyle muamele edilmiş yaprak) ve SRR8284480 (yaprak kuraklık kontrol) (Gregorio Jorge et al. 2020) RNAseq verileri kullanılarak görsel açıdan anlaşılır hale getirilmiştir. RNAseq verisinin analizinden elde edilen RPKM değerlerinin  $\log_2$ 'ye dönüştürülmesi ile oluşturulan heatmap grafiğine göre bazı *Pvul-CHS* genlerinin ifade seviyeleri tuz ve kuraklık stresi uygulaması ile ifade seviyeleri arasında değişimler gözlemlenmiştir.

Bu kapsamda tuz stresi uygulaması altında ifade seviyesinde artış gözlenen *Pvul-CHS-3* ve *-14* iken kontrole göre ifade seviyesinde düşüş meydana gelen genler ise *Pvul-CHS-4*, *-5*, *-6*, *-7*, *-8*, *-9*, *-10*, *-11*, *-12* ve *-13*'tür. Kuraklık stresi uygulaması altında ifade seviyesinde artış gösteren genler *Pvul-CHS-5*, *-6*, *-8*, *-9*, *-12* ve *-13* iken ifade seviyesinde önemli düzeyde düşüş meydana gelen tek gen ise *Pvul-CHS-14*'tür (Şekil 4.9). Yapılan çalışmalar incelendiğinde *Nicotiana tabacum*'da yüksek tuz ve kuraklık stresi altında farklı dokularda yapılan analizler sonucu oluşturulan heatmap sonuçları incelendiğinde tespit edilen 5 CHS geninin 4 tanesinde yüksek ifade seviyeleri meydana gelirken *NtCHS-5* geninde belirgin ifade farklılıklarına rastlanıldığı rapor edilmiştir (Chen et al. 2017).



**Şekil 4.9.** Pvul-CHS genlerine ait in siliko ifade seviyeleri (SC: tuz kontrol, S: tuz, DC: kuraklık kontrol, D: kuraklık).

#### 4.14. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Analizleri

Pvul-CHS gen ailesinin tuz ve kuraklık stresleri altındaki rollerini keşfetmek için 9 günlük 150 mM tuz ve 24 saatlik %20 PEG6000 (polietilen glikol) stresine maruz bırakılmıştır. qRT-PCR analizleri gerçekleştirilebilmek için RNAseq verileri baz alınarak belirlenen genlere uygun primerler tasarlanmıştır. qRT-PCR sonuçları Şekil 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13’de belirtilmiştir. Pvul-CHS’nin gen ifadesindeki değişiklikleri belirlemede iki adet fasulye (Elkoca-05 ve Serra) çeşidi kullanılarak qRT-PCR analizleri yapılmıştır.

Bu çalışmada; belirlenmiş olan Pvul-CHS genlerinin tuz ve kuraklık stresi uygulaması altında ifade edilme durumları RNAseq verilerine bakılarak değerlendirilmiş olup bu veriler ışığında 5 farklı primer ile gerçekleştirilen yaprak ve kök dokusunda 150 mM NaCl uygulamasına göre Pvul-CHS-2, -3, -6 ve -13 genlerinde

Serra çeşidinde kontrole göre ifade seviyelerinde artış gözlemlenirken, Pvul-CHS-14 geninde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Tuz stresi altında yaprak dokusunda Elkoca-05 çeşidinde kontrole göre Pvul-CHS-2, -3, -6 ve -13'de kontrole göre azalışlar görülürken Pvul-CHS-14'de kontrole göre artış görülmüştür.

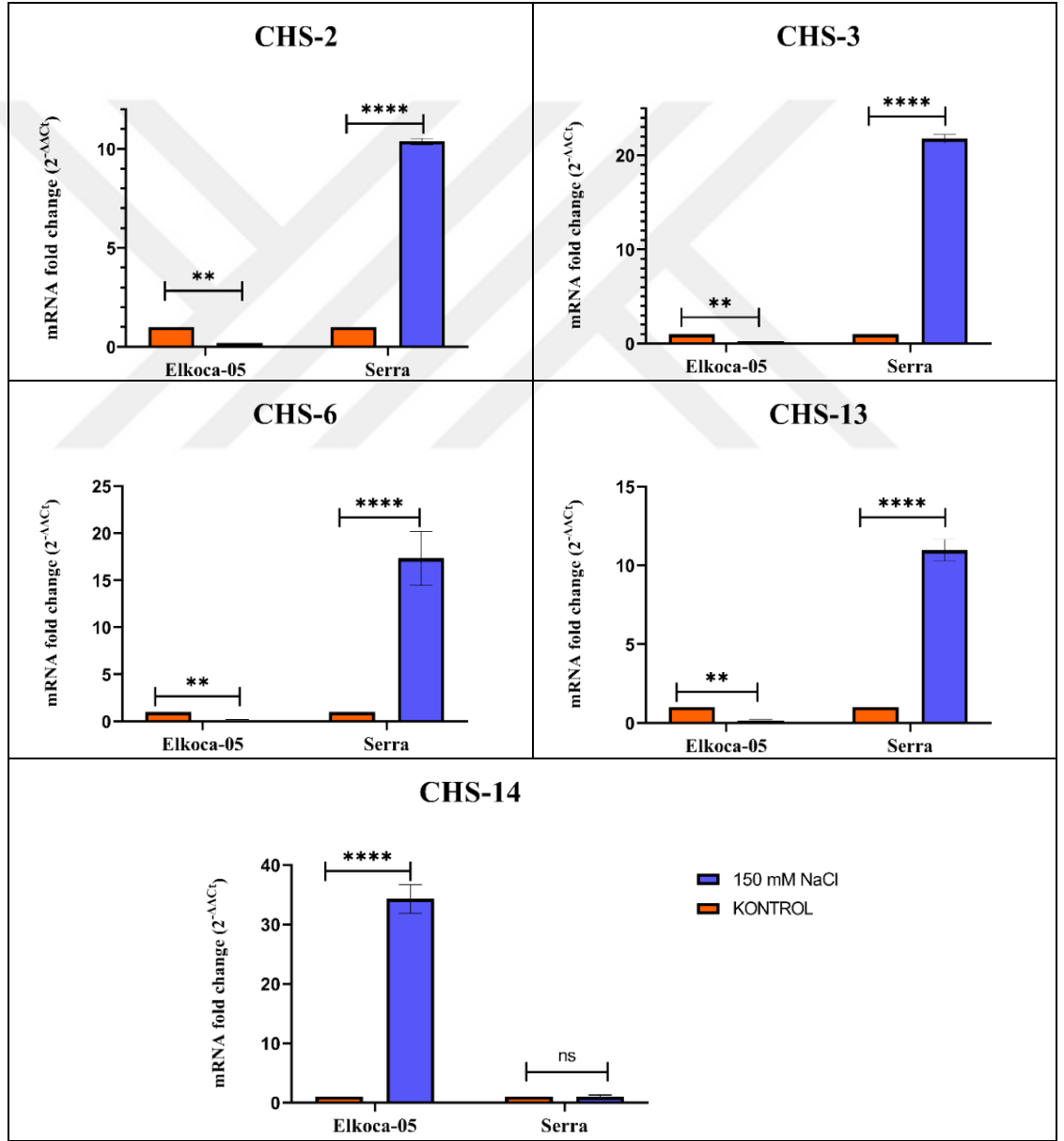
Benzer şekilde tuz stresi altında Elkoca-05 çeşidinde Pvul-CHS-3, -6, -13 ve -14 nolu genlerinde ifade farklılıkları görülürken Pvul-CHS-2'de herhangi bir değişiklik görülmemiştir. %20 PEG6000 uygulaması sonucu kuraklık stresine bağlı olarak yaprak dokusunda Serra genotipinde Pvul-CHS-2, -3, -6 ve -13'de kontrole göre ifade farklılıkları görülürken Pvul-CHS-14'de kontrole göre ifade farklılıkları görülmemiştir. Benzer şekilde kuraklık stresi altında kök dokusunda Serra çeşidinde Pvul-CHS-2, -6 ve -13'de ifade farklılıkları görülürken Pvul-CHS-3 ve -14'de herhangi bir ifade farklılığı görülmemiştir. Bunların yanı sıra Elkoca-05 çeşidinde kuraklık stresi uygulamasında yaprak dokusunda Pvul-CHS-2 ve -14'ün yukarı regüle olduğu görülürken Pvul-CHS-3, -6 ve -13 aşağı regüle olmuştur. Elkoca-05 çeşidinde kuraklık stresi uygulaması altında kök dokusu incelendiğinde analizi gerçekleştirilen 5 Pvul-CHS geninin tamamının yukarı regüle olduğu görülmüştür.

Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda farklılaşan genler incelendiğinde Pvul-CHS-3 geninin Serra çeşidinde yaprak dokusunda %20 PEG6000 uygulamasında kontrole göre ifade seviyesinde artış meydana gelirken, kökte herhangi anlamlı bir değişim görülmemektedir. Bu veriler ışığında Pvul-CHS-3 geninin kuraklık stresine duyarlı olduğu ve bitkiye tolerans kazandırabileceği sonucuna varılabilir. *N. tabacum* bitkisinde yapılan benzer bir çalışmada tespit edilen 5 CHS geninin kuraklık ve yüksek tuz stresi altında ifade seviyeleri incelenmiştir. Chen et al. (2017) yaptıkları bu çalışmada Pvul-CHS-3 geninin ifade seviyelerine benzer nitelikte NtCHS-2 geninde %20 PEG6000 uygulamasında kökte kontrole göre artış meydana gelirken, yaprak dokusunda herhangi bir değişim tespit etmemiştir. Bu sonuca dayanarak Chen et al. (2017) NtCHS-2 geninin kuraklık stresine duyarlı olduğunu ve bitkide kuraklık için tolerans geliştirmede kullanılabileceğini bildirmiştir.

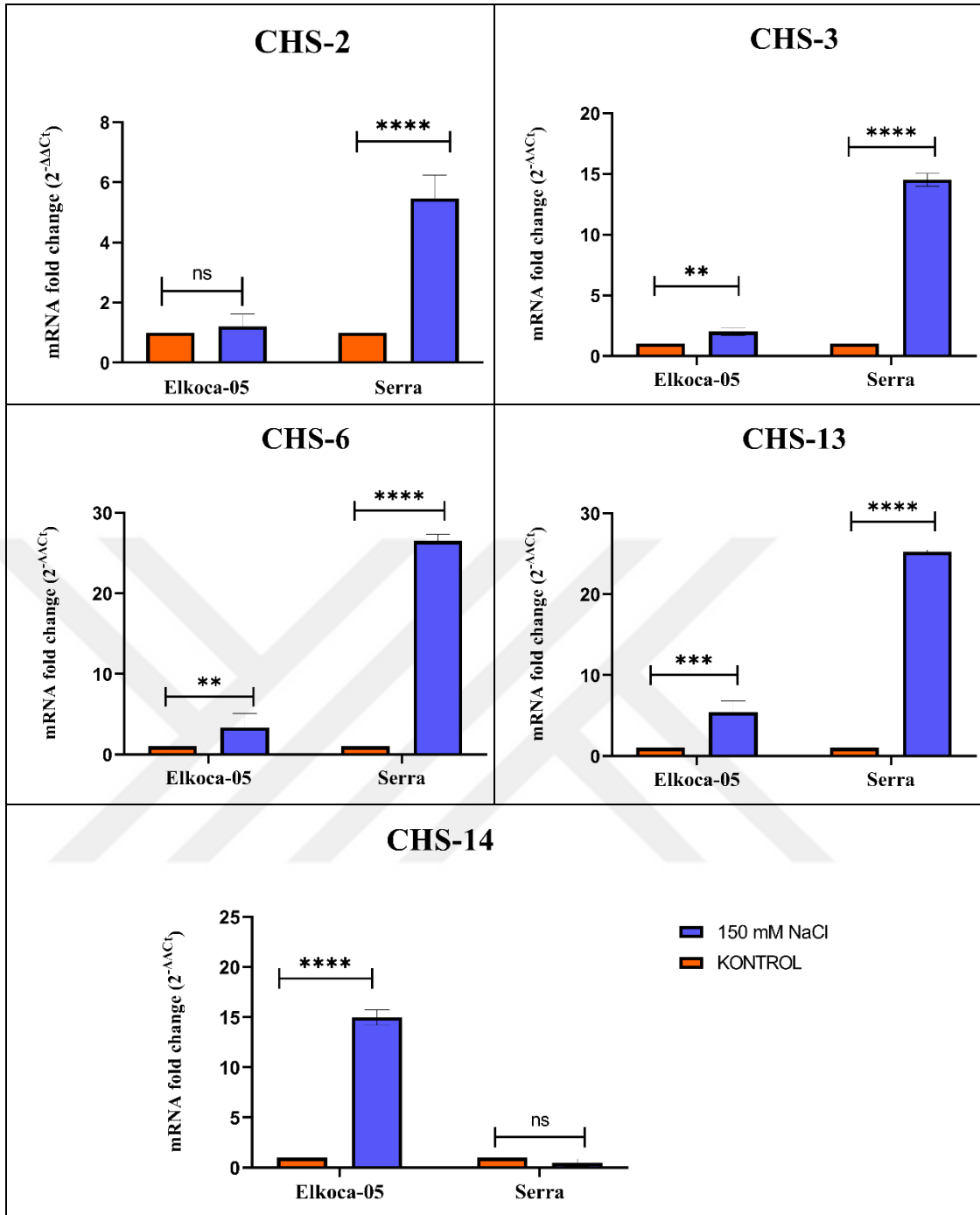
Farklı bir çalışmada Han et al. (2016) *Z. mays*'da biyotik ve abiyotik streslere karşı salisilik asit uygulaması altında CHS genlerinin ifade seviyelerini

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

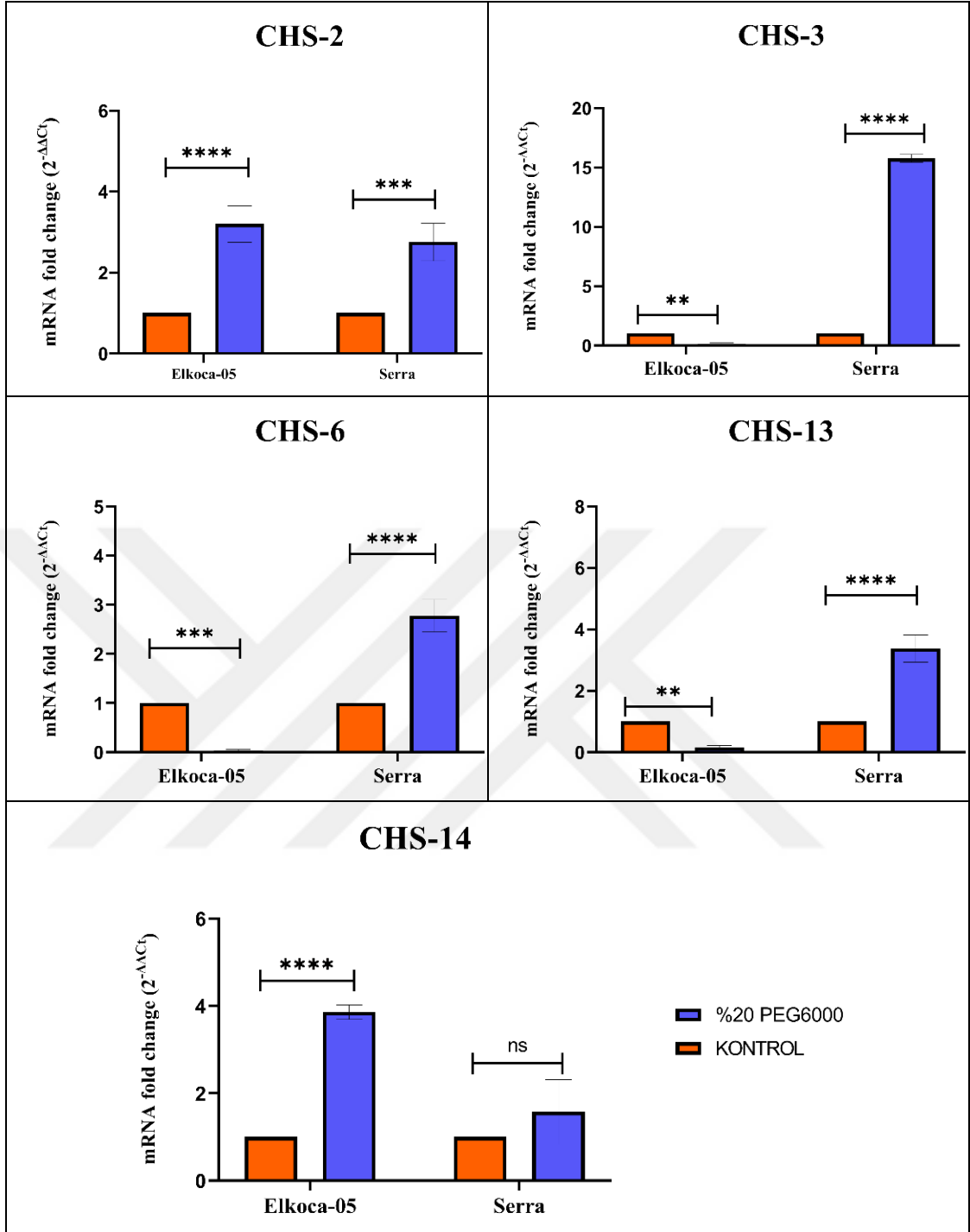
gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında farklı streslere karşı ZmCHS-1,-2, -3, -5, -7, -11 ve -12 geninin aşağı yönde regüle olduğu görülürken ZmCHS-13 ve -14'ün yukarı yönde regüle olduğu görülmüştür. Yapılan bu tespitlere benzer olarak Pvul-CHS-3, -6 ve -13 geni tuz ve kuraklık uygulaması altında aşağı yönde regüle olurken Pvul-CHS-14'ün hem tuz hem de kuraklık uygulamasına karşı yukarı yönde regüle olduğu görülmüştür. Alınan bu sonuçlar ışığında CHS genlerinin abiyotik stres koşulları altında farklı bitkilerde yapılan tolerans uygulamalarında benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.



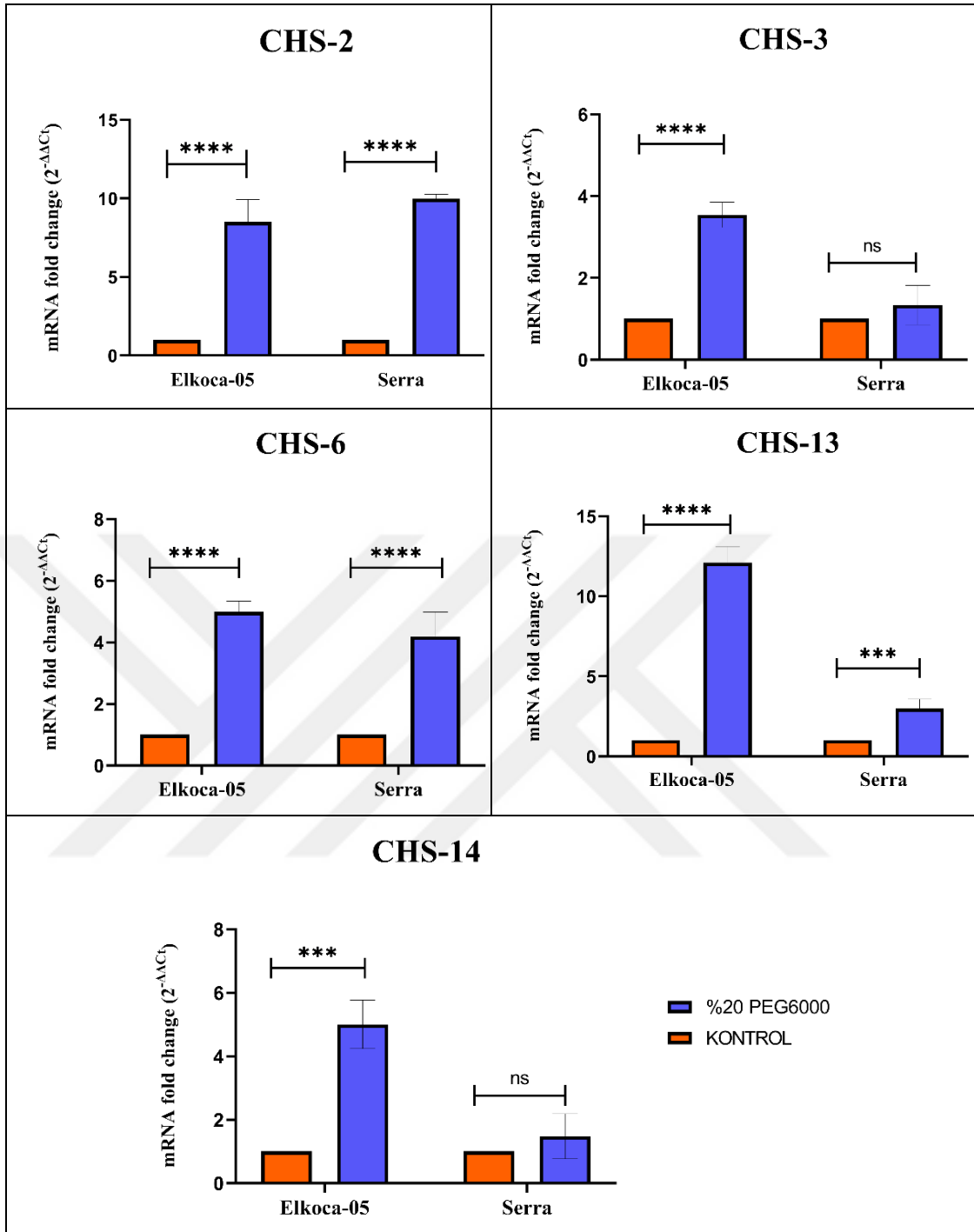
Şekil 4.10. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde yaprak dokusuna ait tuz stresi altındaki qRT-PCR sonuçları.



Şekil 4.11. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde kök dokusuna ait tuz stresi altındaki qRT-PCR sonuçları.



Şekil 4.12. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde yaprak dokusuna ait kuraklık stresi altındaki qRT-PCR sonuçları.



Şekil 4.13. Elkoca-05 ve serra çeşitlerinde kök dokusuna ait kuraklık stresi altındaki qRT-PCR sonuçları.

### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında, ticari ve beslenme açısından önemli bir bitki olan *P. vulgaris*'in genomunda 14 CHS geni bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, kromozomal konum, gen yapısı, evrimsel analiz, hüresel lokalizasyon, korunmuş motifler ve biyolojik işlevlerde dahil olmak üzere Pvul-CHS genlerinin genom çapında karakterizasyonu çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Pvul-CHS genlerinin evrimsel sürecini daha iyi anlamak için, *A. thaliana* ve *G. max* CHS proteinleri ile karşılaştırmalı bir filogenetik harita ve sinteni analizi yapılmıştır. qRT-PCR kullanılarak, Pvul-CHS genlerinin tuz ve kuraklık stresi altındaki *P. vulgaris* çeşitlerindeki ifade profilleri tanımlanmıştır. Bu araştırmada, *P. vulgaris*'teki CHS genlerini ilk kez karakterize edilmiştir. CHS genlerinin tuz ve kuraklık stresindeki işlevinin belirlenmesi bu çalışmayı özgün kılmaktadır. Ayrıca fasulye genomundan elde edilen CHS genlerinin klonlamaları yapılarak model organizmalarda ifade ettirilmeleri ile fonksiyonel olarak kuraklık ve tuz stresi de dahil olmak üzere biyotik ve abiyotik stres faktörleri altında sahip oldukları işlevlerin tespit edilmesi önerilebilir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler fasulyede yapılacak ileri moleküler biyoloji, fizyoloji ve ıslah çalışmaları için yol gösterici ve *P. vulgaris*'te gelecekte yapılabilecek klonlama ve fonksiyonel çalışmalar için değerli bir kaynak olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Ahmad, S., Ali, S., Shah, A. Z., Khan, A., Faria, S. 2023. *Chalcone synthase (CHS)* family genes regulate the growth and response of cucumber (*Cucumis sativus L.*) to *Botrytis cinerea* and abiotic stresses. *Plant Stress*, 8, 100159.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, Ü., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., Kudla, J. 2003. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 36(4), 457-470.
- Allakhverdiev, S. I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus sp.* *Plant Physiology*, 123(3), 1047-1056.
- Anguraj Vadivel, A. K., Krysiak, K., Tian, G., Dhaubhadel, S. 2018. Genome-wide identification and localization of chalcone synthase family in soybean (*Glycine max* [L] Merr). *BMC Plant Biology*, 18, 1-13.
- Anonim, 2023. Web Sitesi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/>, Erişim Tarihi: 06.07.2023.
- Anonymous, 2023a. Web Sitesi: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, Erişim Tarihi: 27.02.2023
- Anonymous, 2023b. Web Sitesi: <http://www.ebi.ac.uk>, Erişim Tarihi: 27.02.2023.
- Anonymous, 2023c. Web Sitesi: [http://web.expasy.org/dec-rease\\_redundancy/](http://web.expasy.org/dec-rease_redundancy/), Erişim Tarihi: 27.02.2023.
- Anonymous, 2023d. Web Sitesi: <http://www.ebi.ac.uk>, Erişim Tarihi: 27.02.2023.
- Anonymous, 2023e. Web Sitesi: <http://discover.nci.nih.gov/cimminer>, Erişim Tarihi: 27.02.2023.
- Anonymous, 2023f. Web sitesi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>, Erişim Tarihi: 27.07.2023.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Aygören, A. S., Güneş, E., Muslu, S., Kasapoğlu, A. G., Yiğider, E., Aydın, M., Büyük, İ., İlhan, E. 2023. Genome-wide analysis and characterization of SABATH gene family in *Phaseolus vulgaris* genotypes subject to melatonin under drought and salinity stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 41(2), 242-259.
- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., Li, W. W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl\_2), W369-W373.

- Braun, P. ve Gingras, A. C. 2012. History of protein–protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics*, 12(10), 1478-1498.
- Buer, C. S., Imin, N., Djordjevic, M. A. 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 98-111.
- Campos-Vega, R., Oomah, B. D., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H. A. 2013. Common beans and their non-digestible fraction: cancer inhibitory activity—an overview. *Foods*, 2(3), 374-392.
- 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.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., Xia, R. 2020. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, S., Pan, X., Li, Y., Cui, L., Zhang, Y., Zhang, Z., Pan, G., Yang, J., Cao, P., Yang, A. 2017. Identification and characterization of chalcone synthase gene family members in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 374-384.
- Chen, S., Zhang, Y. C., Pan, X. H., Li, Y. T., Cui, L. J., Wu, F. Y., et al. 2017. Isolation and expression analysis of *NtCHS6*, a new chalcone synthase gene from *Nicotiana tabacum*. *Journal of Integrative Agriculture* 16(7), 1443–1450.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S. K. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 8(4), e23681.
- Christensen, A. B., Gregersen, P. L., Schröder, J., Collinge, D. B. 1998. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Molecular Biology*, 37, 849-857.
- Christie, J. M., Jenkins, G. I. 1996. Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *The Plant Cell*, 8(9), 1555-1567.
- Clancy, S., Shaw, K. 2008. DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders. *Nature Education* 1,23
- Coram, T. E., Pang, E. C. 2007. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated by salicylic acid, methyl jasmonate and aminocyclopropane carboxylic acid to reveal pathways of defence-related gene regulation. *Functional Plant Biology*, 34(1), 52-64.
- Cui, Y., Magill, J., Frederiksen, R., Magill, C. 1996. Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(3), 187-199.

- Çulha, Ş., Çakırlar, H. 2011. Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2), 11-34.
- Dao, T. T., Linthorst, H. J., Verpoorte, R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 10(3), 397–412.
- Deng, X., Bashandy, H., Ainasoja, M., Kontturi, J., Pietiäinen, M., Laitinen, R. A., Albert, A. V., Valkonen, J. P. T., Elomaa, P., Teeri, T. H. 2014. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida*. *New Phytologist*, 201(4), 1469-1483.
- Dhawale, S., Souciet, G., Kuhn, D. N. 1989. Increase of chalcone synthase mRNA in pathogen-inoculated soybeans with race-specific resistance is different in leaves and roots. *Plant Physiology*, 91(3), 911-916.
- Doria, E., Campion, B., Sparvoli, F., Tava, A., Nielsen, E. 2012. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 72-80.
- Duan, Y., Jiang, Y., Ye, S., Karim, A., Ling, Z., He, Y., Yang, S., Luo, K. 2015. PtrWRKY73, a salicylic acid-inducible poplar WRKY transcription factor, is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 34(5), 831–841.
- 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.
- Falcone Ferreyra, M. L., Emiliani, J., Rodriguez, E. J., Campos-Bermudez, V. A., Grotewold, E., Casati, P. 2015. The identification of maize and *Arabidopsis* type I flavone synthases links flavones with hormones and biotic interactions. *Plant Physiology*, 169(2), 1090-1107.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., Emiliani, J., Pourcel, L., Feller, A., Morohashi, K., Casati, P., Grotewold, E. 2010. Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. *The Plant Journal*, 62(1), 77-91.
- Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P. 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology*, 6(8), 775-784.
- Ganesan, K., Xu, B. 2017. Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2331.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Humana Press, 571-607.
- Gregorio Jorge, J., Villalobos-López, M. A., Chavarría-Alvarado, K. L., Ríos-Meléndez, S., López-Meyer, M., Arroyo-Becerra, A. 2020. Genome-wide transcriptional changes triggered by water deficit on a drought-tolerant common bean cultivar. BMC Plant Biology, 20, 1-20.
- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Chen, X., Luo, J. C. 2007. GSDS: a gene structure display server. Yi chuan= Hereditas, 29(8), 1023-1026.
- Guo, H., Pei, X., Wan, F., Cheng, H. 2011. Molecular cloning of allelopathy related genes and their relation to HHO in *Eupatorium adenophorum*. Molecular Biology Reports, 38, 4651-4656.
- Häffner, E., Karlovsky, P., Splivallo, R., Traczewska, A., Diederichsen, E. 2014. ERECTA, salicylic acid, abscisic acid, and jasmonic acid modulate quantitative disease resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Verticillium longisporum*. BMC Plant Biology, 14, 1-16.
- Han, Y. Y., Ming, F., Wang, W., Wang, J. W., Ye, M. M., Shen, D. L. 2006. Molecular evolution and functional specialization of chalcone synthase superfamily from *Phalaenopsis orchid*. Genetica, 128, 429-438.
- Han, Y., Cao, Y., Jiang, H., Ding, T. 2017. Genome-wide dissection of the chalcone synthase gene family in *Oryza sativa*. Molecular Breeding, 37, 1-12.
- Han, Y., Ding, T., Su, B., Jiang, H. 2016. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the chalcone synthase family in maize. International Journal of Molecular Sciences, 17(2), 161.
- Hemleben, V., Dressel, A., Epping, B., Lukačín, R., Martens, S., Austin, M. 2004. Characterization and structural features of a chalcone synthase mutation in a white-flowering line of *Matthiola incana* R. Br. (Brassicaceae). Plant Molecular Biology, 55(3), 455-465.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., Boddey, R. M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil, 311, 1-18.
- Hirayama, T., 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(suppl\_2), W585-587.

- Hou, Q., Li, S., Shang, C., Wen, Z., Cai, X., Hong, Y., Qiao, G. 2022. Genome-wide characterization of chalcone synthase genes in sweet cherry and functional characterization of CpCHS1 under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 989959.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., Gao, G. 2015. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hu, H., Shi, B., Zhu, W., Zheng, B., Zhou, K., Qian, M., Wu, H. 2022. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of Mango (*Mangifera indica* L.) chalcone synthase (CHS) genes in response to light. *Horticulturae*, 8(10), 968.
- 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.
- İlhan, E., Kasapoğlu, A. G., Muslu, S., Aygören, A. S., Aydın, M. 2023. Genome-wide analysis and characterization of *eucalyptus grandis* TCP transcription factors. *Journal of Agricultural Sciences*, 29(2), 413-426.
- 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.
- 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.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17(3), 287-291.
- 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., Kasapoglu, A. G., Hosseinpour, A., Haliloğlu, K., Muslu, S., İlhan, E. 2020. *Sorghum bicolor* L. CAMTA transkripsiyon faktörlerinin genom çaplı analizi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 51(3), 267-278.
- Koduri, P. H., Gordon, G. S., Barker, E. I., Colpitts, C. C., Ashton, N. W., Suh, D. Y. 2010. Genome-wide analysis of the chalcone synthase superfamily genes of *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology*, 72, 247-263.
- Koes, R. E., Spelt, C. E., van den Elzen, P. J., Mol, J. N. 1989. Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene*, 81(2), 245-257.

- Koes, R. E., Van Blokland, R., Quattrocchio, F., Van Tunen, A. J., Mol, J. N. 1990. Chalcone synthase promoters in petunia are active in pigmented and unpigmented cell types. *The Plant Cell*, 2(5), 379-392.
- 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
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, L. D., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, S. A., Lee, H. C., Nelson, D. W., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., Huala, E. 2012. The *Arabidopsis* information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1202-D1210.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, 506, Berlin.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-327.
- Letunic, I. ve Bork, P. 2011. Interactive tree of life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl\_2), W475-W478.
- Lijuan, C., Huiming, G., Yi, L., Hongmei, C. 2015. Chalcone synthase Ea*CHS1* from *Eupatorium adenophorum* functions in salt stress tolerance in tobacco. *Plant Cell Reports*, 34, 885-894.
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., Yin, H. 2021. The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12824.
- Liu, X. J., Chuang, Y. N., Chiou, C. Y., Chin, D. C., Shen, F. Q., Yeh, K. W. 2012. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium* orchid cultivars. *Planta*, 236(2), 401-409.
- Liu, Z., Shi, M. Z., Xie, D. Y. 2014. Regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* red pap1-D cells metabolically programmed by auxins. *Planta*, 239(4), 765-781.
- 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.
- Lo, C., Coolbaugh, R. C., Nicholson, R. L. 2002. Molecular characterization and in silico expression analysis of a chalcone synthase gene family in *Sorghum bicolor*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(3), 179-188.
- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P., Naylor, R. L. 2008. Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science*, 319(5863), 607-610.

- Lv, L. L., Feng, X. F., Li, W., Li, K. 2019. High temperature reduces peel color in eggplant (*Solanum melongena*) as revealed by RNA-seq analysis. *Genome*, 62(7), 503-512.
- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y., Guo, T. 2014. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 60-66.
- Ma, M., Zhong, M., Zhang, Q., Zhao, W., Wang, M., Luo, C. 2021. Phylogenetic implications and functional disparity in the *Chalcone synthase* gene family of common Seagrass *Zostera marina*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 760902.
- Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M. 2009. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1232-1248.
- 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.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell & Environment*, 25(2), 239-250.
- Nagy, N. E., Fossdal, C. G., Krokene, P., Krekling, T., Lönneborg, A., Solheim, H. 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology*, 24(5), 505-515.
- Naing, A. H., Kim, C. K. 2021. Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1711-1723.
- Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., Mezzenga, R. 2021. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106789.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A. 2013. Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal Of Molecular Sciences*, 14(7), 14950-14973.
- Pimentel, D., Pimentel, M. 2003. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 660-663.
- 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.
- Raza, A., Mubarik, M. S., Sharif, R., Habib, M., Jabeen, W., Zhang, C., Chen, H., Chen, H-Z., Siddique, M. H. K., Zhuang, W. Varshney, R. K. 2023. Developing drought-smart, ready-to-grow future crops. *The Plant Genome*, 16(1), e20279.
- Reimold, U., Kröger, M., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K. 1983. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. *The EMBO Journal*, 2(10), 1801-1805.

- Reinprecht, Y., Schram, L., Marsolais, F., Smith, T. H., Hill, B., Pauls, K. P. 2020. Effects of nitrogen application on nitrogen fixation in common bean production. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1172.
- Richard, S., Lapointe, G., Rutledge, R. G., Séguin, A. 2000. Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant and Cell Physiology*, 41(8), 982-987.
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., Hasanuzzaman, M. 2021. Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), 277.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., Fernie, A. R. 2013. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 21-34.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11655-11660.
- 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.
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B. 2022. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 383, 132531.
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., Chang, W. 2022. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216-W221.
- 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
- Sun, L. L., Li, Y., Li, S. S., Wu, X. J., Hu, B. Z., Chang, Y. 2014. Identification and characterisation of *DfCHS*, a chalcone synthase gene regulated by temperature and ultraviolet in *Dryopteris fragrans*. *Cellular and Molecular Biology*, 60(6), 1-7.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S. H. A. I., Mittler, R. O. N., Miller, G. A. D. 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 259-270.

- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., Von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638–D646.
- 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.
- Thilakarathna, M. S., Raizada, M. N. 2018. Challenges in using precision agriculture to optimize symbiotic nitrogen fixation in legumes: Progress, limitations, and future improvements needed in diagnostic testing. *Agronomy*, 8(5), 78.
- 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.
- Tohge, T., de Souza, L. P., Fernie, A. R. 2017. Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4013-4028.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., Fernie, A. R. 2013. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2), 123-152.
- Valliyodan, B., Cannon, S. B., Bayer, P. E., Shu, S., Brown, A. V., Ren, L., Jenkins, J., Chung, C. Y., Chan, T. F., Daum, C. G., Plott, C., Hastie, A., Baruch, K., Barry, K. W., Huang, W., Patil, G., Varshney, R. K., Hu, H., Batley, J., Yuan, Y., Son, Q., Stupar, M. R., Goodstein, M. D., Stacey, G., Lam, H., Jackson, A. S., Schmutz, J., Grimwood, J., Edwards, D., Nguyen, H. T. 2019. Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 100(5), 1066–1082.
- Voorrips, R. E., 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1), 77-78.
- Wade, H. K., Bibikova, T. N., Valentine, W. J., Jenkins, G. I. 2001. Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *The Plant Journal*, 25(6), 675-685.
- Wang, C., Zhi, S., Liu, C., Xu, F., Zhao, A., Wang, X., Tang, X., Li, Z., Huang, P., Yu, M. 2017. Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 107-118.
- Wang, F., Ren, G., Li, F., Qi, S., Xu, Y., Wang, B., Yang, Y., Ye, Y., Zhou, Q., Chen, X. 2018. A chalcone synthase gene *AeCHS* from *Abelmoschus esculentus* regulates flavonoid accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-13.

- Wang, J., Zhang, C., Li, Y. 2022. Genome-Wide identification and expression profiles of 13 key structural gene families involved in the biosynthesis of rice flavonoid scaffolds. *Genes*, 13(3), 410.
- Wang, L., Wei, L., Hong, X. 2009. The enzyme and gene transcription regulation in the biosynthesis pathway of anthocyanins in *Petunia hybrida*. *Chinese J. Cell Biology*, 31, 641-650.
- Wang, Y., Tang, H., Debarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., Lee, T. H., Jin, H., Marler, B., Guo, H., Kissinger, J. C., Paterson, A. H. 2012. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research*, 40(7), e49.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218-223.
- Wu, X., Zhang, S., Liu, X., Shang, J., Zhang, A., Zhu, Z., Zha, D. 2020. Chalcone synthase (*CHS*) family members analysis from eggplant (*Solanum melongena* L.) in the flavonoid biosynthetic pathway and expression patterns in response to heat stress. *PLoS One*, 15(4), e0226537.
- 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.
- Yang, T., Zhang, T., Li, Y., Kang, Y., Wang, P., Liu, W., Wang, Y., Tian, L., Dai, J., Zhou, Y. 2023. Genome-Wide identification and expression analysis of the *Chalcone Synthase* (*CHS*) gene family in *Dendrobium catenatum*. *Agronomy*, 13(6), 1488.
- 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.
- Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., Gonzalez, D. O., Clough, S. J., Vodkin, L. O. 2006. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of glycine max in response to *Pseudomonas syringae*infection. *BMC Plant Biology*, 6(1), 1-18.
- Zhang, F., Guo, H., Huang, J., Yang, C., Li, Y., Wang, X., Qu, L., Liu, X., Luo, J. 2020. A UV-B-responsive glycosyltransferase, OsUGT706C2, modulates flavonoid metabolism in rice. *Science China. Life Sciences*, 63(7), 1037–1052.
- Zhang, X., Abraham, C., Colquhoun, T. A., Liu, C. J. 2017. A proteolytic regulator controlling chalcone synthase stability and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 29(5), 1157-1174.
- Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S., Dai, S. 2013. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *Journal of Proteomics*, 82, 230-253.
- Zhou, B., Wang, Y., Zhan, Y., Li, Y., Kawabata, S. 2013. Chalcone synthase family genes have redundant roles in anthocyanin biosynthesis and in response to blue/UV-A light in turnip (*Brassica rapa*; Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 100(12), 2458-2467.

Zhu, L., Ding, Y., Wang, S., Wang, Z., Dai, L. 2022. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of *CHS* gene family members in *Chrysanthemum nankingense*. *Genes*, 13(11), 2145.

Zurnacı, K., 2019. Tuz stresi koşullarında salisilik asit uygulamasının marul (*Lactuca sativa*) bitkisinin gelişimi ve bitki besin elementi içeriğine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı, 49, Çanakkale.



## EKLER

### **EK-1 *Pvul-CHS* gen ailesinin cis-acting elementlere ait protein dizileri**

#### **>*Pvul-CHS-1***

TCCTTTCCGAAAATACAATGTAGAGAGTATTTGTGCAGATGTGGTAAAGCAT  
TCGGTGAAGAGTGAAGGTGAAGGAATGAGGCGATTTGCAGAACTGCCAA  
GTGGCAATTTCTATGCCTCATACAAACCTGCCTTATACAAACCTTTGCTGGAATA  
ACTAGGAATATGCACATGGTTCCTAAACCATGAATGCCAAACGATGCATAC  
AACTTTATAAGGCCACAATCCCCTATTTTCTCTTAATAGGCATCATAGAATG  
AGACTGTGCAGGTGTTGTTTCCTTTGTTTAGAGGTGGATTTTGGGATTATTAT  
GTATCTGTTGGAATTGATCTTATATTTATTTTGTATGAACCGGAGCCGACTG  
TAGCGTTGGATTCCAAGATTTTGTATACGGGTTGAGGTACCCTGAAGTATC  
TCCTTTATTCTATTTTATTCTTTGCTAATAAAAATATATATATATATATATA  
TATATATATATATATATATATATATATATACTACAAGTTTTATTTTCAA  
CTTATACATAAATGTTTGAATATCTCACATTCACATTGATTAAAGACACTTT  
TGTTTATTCTTCAATGCAAATTACAACCTCATGCTAATTAAGATACTTTTGTGA  
TTGTTTCGCTAGTCGGTTAACAACTCTTAAACGTAATTAAGCATGGTCGTCT  
TAATTTGATGAACTGTGGATTAATTGTTATTCTAATTAGATTTATTATCACTT  
AGAGAAAGAAAAATAAAAAAAGAGTCGTGGGTTTTATTCCATTTATTGAC  
AAATATTTGTAATTATCGTTATTTTTCTATAATGTAAGAACTGGTAGTCGAT  
CAGATCGAGTTGAATATAAATACTGGTAAATTAGTTTAGTGTCTATTTAATT  
AATTGACAGCGGTTTAACCGAAAAACTTCCTTCAATTTTTTCTAAAAGAT  
AAAAAATATATAAATTTTTTTTCTTTTAAAAACATTATCAATTTTAATATTAT  
CTTAGAAAAATAAACTTTAAGTGAACATAAATAATAGAATCTCCATAAAA  
GAAATTACACCTATTTATATATATATATATATTATATTTTGATTATATCCATGAA  
ATATTTAATATATTTTTTATGAGTAGTAGATATGTTGAATGTGAAACTGTAT  
ATATAATGGCCGACAATAAATTACGTGATATATGTCTAATAATCTTTATAAA  
AATAAATTATTAATTGAATATTTATCTTTATTTTCAAATAATAGTATTTTAA  
ACTCAATTACTGTAAAGTATTTTATTTTACCTGTATTTTGAATATGAAAAAT  
TTTAAATGTAATATTTTAATTTTTAATATTATTAAACTACGTTATTAATGTT  
ATTTTATATATTTTATTTATACTGCTTGAAAATCAGAGGTGAAGTAATTATTC

TTAAATAGGTGTTTTGACCTGTTGAATCAGGGTCAGTTTTTTTTCTTATATTA  
AATGAAAGATGCAGAATGAGTTGGGTGATAGTGAAATGGAGTCTTGCAAGT  
TGCAACATACCCAGTCAAATTAGGGTAGATCTCATGATGCAACCGCAACC  
GCAACCGCTTCGCACCGCAACCGCTTCGCACCCACACTCCTTGCGTTTGAGC  
AGCACCCACTTAGGGTTCAGGGATTTGTATTGCCGATCAAAAAAAAAAAG  
AGGGTTCAGGGATTTGTGAAACAAAATTCAAATTCCTTTTACAAAAACGC  
CATGCCACGTCAGCGATGTCATTTTACAAAATGACATGCCACGTAAGCTAT  
ACATCCACCTAAGCTAGATGTATTCTGGCGCAAACAAATCAGGGGTGTCTA  
AAAATCATTATTCATTCTGGCGCAAGCAAATCAGGGTGTCTAAAAATCATT  
TTTTTTGCGAGAACAACCTTTCAACGTGTGTCATAGTGCCCTTTTCCCTCCTTT  
TTCTTTATATACACCCCTTTTTCCATGGTCTAAGTGCACCTTCTTCTTTCTACT  
TATAAGCACTAGAGAAAAA

*>Pvul-CHS-2*

CGCTAGACGATGTTCAAACATTGAAGATCTAAACAAAAGTCTCACAATTTTT  
TTAATCCAGTTTCTATTACAAAATATTGTTATATTGAGTTTCCATTTTTTTTA  
GTTTTTCCTAGTTACCTTGTTAATTTTGTTCATCAACAAAATGAAGTGTGTTG  
AACCAAGTGGTGTTCAGCTTTGAAGAATCTAAAACCCTTTGAAGGATGTT  
GAAAGGTTGTGCTTGTTGTTGCTGAGTTGTCTTAGATAGGATCTGGGGTAGT  
TTGAGTTTTGTAATTCACCCTTGATCGAATCCAAAGCATAGGCAGTCTTAAT  
CTTTTCAAAGAAAAGTGTTTTTCAAACCTAAGTGAAAACAACCTGTTGTTTT  
GTCGAAACAACCGATTGTTTTATACTTAGGTATTTTTAGAAAAGATTGAAAA  
TTGTTTTTCAAATGGTTAAGCTGTTAAAACCAAACAACCGATTGATTCGAG  
GAAACAACCGATTGTTTGTGTTTGGTATCATAACAGAAAAGTGGTTTTTGCTT  
TGATTGAGCTTTAAATGTTTTTCTAACTGTTTACGCTCCAGTCTTTAATGCTT  
TGACCAATCTATTAATGCAATGAATAAGGTTGTTAAGATTTGATAACAAA  
CAACATCTTTGAATATATTCAGAAAAACAGATTTGAGAAATAACAATTAAC  
AAAAGTTTTTGAGTTTTTCAAAGAGTTGAGATTGCTTAGAGATTGAGATTGA  
TCAAAGTGTGTGAGATAGGATTTCTGCTTGTATTGATTTTCATATTTGCTTCTG  
TAACAAGTGTAATCCTTGATTTGTTGAATAAATATTTTTGTGTGGTTGCTGA  
GAAGTGTGTGTGTTCTTGAGGGGATCAAGATCAACATTCTTAGTGTTGGTG  
TGTTGGCCAAGAGAAGTGTGTGCTTGAGGGGATCAATGTCACCTTCTTGGT  
TGTGTTGTAAGTGATCTAGGTTTGATTGCTTAGTGGAATTCCTCAGTGGTTTC

TGAGAAGACTGGATGTAGCTCTGGGTTTAGAGTGAACCAGTATAAATCTCT  
GTGTGCATTCTCCCTATCCCTTAACTCTTTAAATTCAGTTTTGATATTTGTAA  
ATGGTATAACAACCGATTGTTTCTGAGAAACAATCGATTGTTTTGCTGGTG  
TTGTGCTTTTAGCTTTGTGTTTTGAAAACTGATTTCTTTATCAAGATATTCT  
CGAAGAAATTCATTCAAGGCTTAAAAGTTTTTGAAATCCCTATTTAAACCA  
TTCACCCCTGTAGTTTAAAGTCATATATTCTAACAAAGTGGTCATTAGTTTT  
GTCTTTCCATCTCTAACTCGTTACTCAACTCGCTCATTTTTTCTCCAATTTTT  
CAAACCTCGCAGCCAATTTGTTCTTTTCCCTCTTCCGAAGCAAGTTGACAAAC  
AAATTAGAGCAAATTGAAAAGGGAAGAGTCAATAGACCCATGAGTTAGAA  
AAAAAAGACAAAATAATAGTTACTTCATCTCATTAAATTACAAAATCAAAT  
GACGGAATCCTTAGACAATTTTTTTTAAAATAACACTCATTTTTTTTAAACAA  
AAAACCAATTAATAACACAAATTTGTGAGTTAGTTAAAACCTAATATTAA  
AATATTTTTTAAGTTATCTATGTGATAAAAAATCTTACGTATGTGAGACGG  
CATACTAGTTAATCTACACAAAGTCATATAGACAAACCTATTTAAATTTAAA  
AACATAATAACTGTATTAATTATCTCATTAAATCATAAATATTATTATAATAT  
AGTTGTAGTTGTGAAAGTACATTTTTTTTATTCCAAAAAAGAAGAACATT  
CCTTTTCCCTGGTTAATAAGCGTCGGCAGCATCTAATTCTAAGGTAAAGTTTG  
TAATATGTGTCATCCATTTTTAGTAATTTGCCAAAACACTTTCAACGTGTGTC  
ATAGAGCCCCATTTTCCCTCCTTTTTCTTTATATACCCCTTTTTCCATCGTCTA  
AAGTTCATGTCCACCACTC

*>Pvul-CHS-3*

TAAGTTTCAAAGATAGTTGTTATGAGATATATTGTCCAAATTTGCTAGTTT  
CTTGTCCATAAGTTTTTTTCGAACTATTATTTATTAATATATAGATTAAAATTA  
TTAAGTCATTAATTAATAATTATCTATGTAATTTAGTACTTATCCATTTAATT  
ATTAATTTAAATTATTTAAGTCATTAATTAATAATTATATATGTAATTTAGTAC  
TTATCTATCTAATTATTAATTTAAATAATTATTTAAGTCATTAATTAATAATTATC  
TATATAATTTAGTACTTATCCATCTAACTATTAATTTAAATAATTTATATG  
ACAAATATATATATATATATATATATATGTTATATCTAATTTTAAATTAATGATT  
AAATTAACAAATTTAACTATATTATGTCAATAACGGTTAATGATTTAAATAA  
TTAAGTTAGGTGTGTTAGGTAATGTCCCAAATCTATCGTATCATCGCATCGT  
TGTATATGTTTTGCAAGAATTTATTTTTTTGTCGTATTTTATATAAACATATT  
GAACTTTATCAACATGAAATCCAGAGAGGGAGCTTCCAGAAAAAATATGG

ACAGGTAGAGTTACTCCATTCAATGAGCACGAAAGCATAAGTTTTAATTTG  
ATAACAAAAATTACAATACAGGTAGAGTCCATGTATGATATTTTTTGTGTTG  
AACTAAAAAAGGATTTTTTTTTTCTTTTAAAACAAATTTACTCTTCATTGT  
TAAATGAAGAAAGTAAAAGAAATACTTAGGTGTTTGATCAGTGAATTA  
ATACCTGTTGATAAGTTTGAACTTGACAGTTTTCAAGAGCTAGATGTATA  
AAATATCCAATATAAAAAATTATGTCTCTCGTTTTTTATATATTTTTTCTTCAA  
AATTGTATTTACCATCTAAAATATTTCTTAAAATAAAAAAATTA  
AAATTA  
ATACTTTTAGAAAACACAATTTATCCCTAATAATGTTTCTTGTAATTTATTCC  
CAATATTTCTTGTATGTATGTTTTTTTATCTAATAATGCTTTCAAAATGTTCT  
CAAGATACAAAATATTATTTTAAAACACTATCGATATGGTTAGTATTA  
AATAT  
TACCCTATCCGTTCCAACATGATAATATATATATATATATATATATATATAT  
ATATATATAAAATGGTATATATCTATATAGTTTTTATTAAAGAAAACGTCATT  
CTTATATAATAATTGAATTGTATTGGTATTTAAATTTAACTTTTATGAAAGG  
AAATAAAAGAAAAGTCATTGTTGATATAATTTTAAAGTAGTTATTATA  
AAAA  
GAAAAAAGATGTATTAAGCTTGTTTTGTAATTGAATCACTGTTTATATATA  
TCTAAAATTTCTATTATTATTATTATTATAAAACTATTCAATAACAAAC  
AACTGTGCAAATAAATTCATCAGTTTTTATAATAAGTGTGAATAATTAAG  
TAGAATTATTAGATGTATATGAACTGTATTATTATTATTATTGTCTATGTG  
CCAATAAAATATAAAAAAAATCGTTAATTTATGAAAGAATTCATCTCATT  
TTTTTAAATTCCTTTTTTTTATAACTACTTTAAAACACATTA  
AAAAACATGTG  
AGAACTTGTACAGACATATATGAATTATGAAATTA  
ACTCTTTTTCTTTTTT  
CATATCATGTAAAAAAATCATGAAAGAATAGATATTTATTCATTT  
CAGTAA  
AAAAAATTCATTTATGATTAACCTTTGAGAAGAATAGTAGGTAAATATCCT  
TGACACTAGAGTGAAGCATTTAATAAATTGCATGGTGACGTGGTTGCAAGA  
AGAAGGTTGTTTTGGTAGGAAGAGGAACGGGTAGGAAGAATGAGAAGTTG  
GAATGTTAATCTATGTGGCTCCAAATCTACCACAGGTAAACTGCCTACCT  
TTATCCACGTGTCTCTTCATCCGTCGGTCCCTCAAACCTACTCGCTCCTCCCT  
AGGCCCTTATAAC

*>Pvul-CHS-4*

CATGTTGACTTACCTACGAATTTGATTGTTACCTATGGAATTCTTCGATAG  
ATAAATTGATTTTTTTCTTGTAGTGGGACTTTCTCATCTTATTCTTCTTTTT  
TCTTTTCATTATTATATTTCTTTTTTAATTTTATATTAGTAACAAATCAA  
AATT

AATGATTTACAAGTCTTGAGAATGAAACAAATGACGTAATTGCTTTAATATA  
ATTATGTTTCATTGTGTTATAAATTTGAATTTGTGTAATATATTTTGTACTATA  
ACTTAATTATTA AAAATTGTATGTTGTATGTTGAAACTCATAGTTGATGAGAG  
AAAATATTTTTATCTTATTTTTTTTTAGTGATATTTGACATTTAAAATATACGA  
ATACACATATAATAATATACATACAATAATAAAAAATAAAAAATGTGGACAC  
ACATTCATATTCATAAGCTGGAGATGATATACTTTCTTCAAAGCCACCTAAG  
AAAGAAGTAGGGGTGAGAGAGCCAACGTGCCATTCCAATTGCCAATCACCT  
AAGACTCGTTTTAGATAAAAATGATGGAACAAAATGGCAGTGTATGTGGAGT  
TCATGCAATGATAGACCAAGGATTTTTGGAAGGTTTTTGGGCAAGCTGTTGT  
GATGTACGATGCAAATGTAAGATCAACATTGATGTGGGAAGGGGACTTAGG  
TCCCTACATTTTCTTCCTTTGTGTTTCGGTAACCAAGTTGTGGATGAAAACTTT  
GGTTCCGCTAGATATTATGCAGCTTTATGTCACTCTTTGTAGTTGCTATTCTT  
ATTTTTTCTTTAGACTTGTTGATGGTATTTGTATAAAGAGTTGGAATACCCTGA  
AGTATCATTAAATTTACTTAATTCTTTGCTGATAAAAAAAAAATACAAATTACA  
ATTAACTTTTTATTATTATCTTTTTATTATTATTATTGGACAAATGTGGAATT  
CTAAACCACTACAATATTTAACTCCGGCACTTTAGTTATATCAACCCATGAT  
AAATAAGTCATGATTA AATTACTTCTCACAGGTATCGTTTTTATTTAGGATG  
GTAATATATTA AAACTCTCAATAGTAAAACATACCCTTCACCTTTTAATAA  
ATTAATATATATATATATATATATATTAATTTAAAAATATTATTATATTATGA  
TAAACAATGTCAAAAAGTGTTTTTTACTCTTCATATTTCAACAAAACTTTTCTC  
TTTTATTTATTCAGATAAAAAGGAGATACTCTTATAGTTCAGTAACATCAAC  
AAACATATACCGAAAATGTTATCTAAAAACTTGTTATTGTATAAATAAAGG  
AGCATCAAGCAAACCTAAAAATGCTTCTTTGGTTCAAATGGGTAGGTAGCT  
CTATTACCTTGACCGTTCAAGAATAAACTTCTCTCGTTGAAATTTAATTA  
ATATTCAGTGCCACATTTTTTTTTGGCTTAATAGAACTCAATTATGCTTGAC  
CTTGACCAACCATGTAACCAAGTAGAAAATATACAATAAAATATATGAAAG  
AGGTAGTGTGTGCAATTCAAAAACCTGACGTGGCGCAAATCTGCCCGTAG  
AATTTACTTTCAATTTGATTGTGGCCGTCGATGTTATTTAACAGTCCACCTACC  
AATACAAGTGGTAGACAATCTTGCTGCGCTACCAAGCTTGACTCAAATTA  
AAGTTAAAAACACACAAAAAGTTGGACGCACTGTGATTAAATATTTTCATA  
GGGTAGAGATGCATAAAATATCACCAATTATTGGTTACTAAATTTAACAGT  
GAATGAATGAATGAGTTATATGTGGATGGAGATGGTCTTCAAAAATATGCC  
ACCAAACCTCCTACCTCACGAACCTAGGAAGCAGACATGGTAGGCAGTGCAAA  
AAATATATGTTTTCAACGTAAGAAGGCTTTGGTGTGTCACGTGATACTCACC

TACCCTACTTCCTATCCACCCTTGCATACATATAAAATGCTAACTCCTCCAA  
CATCTTCAAACACACAACCTTCAG

*>Pvul-CHS-5*

ATTTTTTTATTTTTACTTTTTTATGCAAATTGTAGTCACAATCAATTATATTCT  
CATTCATAATCAATTATGTTTTTGTCTTTCATAATCGATTATGTCTTGAACAT  
AATTGATTGATATTGATTAATTTTTTATTCATATTTACGTTTTTAAATTATTAT  
AGTAAAATAAATAATATAATATTATTAATAAATAAAAAAAAAAATCAATCATA  
TCTACAAACTTTATATTCAAATATATTTAATTTTCTTTAATCCAAACATACTA  
ATTTTGTATTATCTTTCTAATCATTTTGTTTTTTCTCTCCACTCCCAATCAAAC  
AAAATGTGTTTAGATTAAGAAAATGACGAGATAAAAAAAAAAGATAAAAAAC  
AGTGTGGAAAGTGAGATTGTAGATTTAGTGAAAGTGAGTACAAATTTTATT  
GTATATAAATGCATCTAGAAAATAATTTATAAATAATTTTTTTAAAAAAT  
TAAATGTAAAAAATAAACTTCTTTAAATTTGTAAATTAAGTAAAAATAAT  
AATAAATTACACTATAAGCAAAGCATAAAACATAAAGGACCACTTTATACT  
TTGCAAAATATTTTTTCATGTTTGGTCTACCATTTGTACCTAAGACTCAAAG  
TTAACTCCTCTTTAACCAACTCTGCTTGCAGATCTTCATCTGTCACCTAATTA  
AGTGATTGACTATCTTTTGATCGACTAGAAGTCAATTATTCTTACAAGTAGA  
CAATCCATGTTTCGGTTATATAATCCTAATCGACATTAACCTTTGAAAAAATT  
ATCAACACTTACATACGCCTACCCAAAGTCACTCATTGTAACTTACATGCC  
AACACTTGCAAAAATATAAAAATGAAAATGTTACTGAGGAAACCATCAAAC  
AGTCCCTAGCCACCTAATCGAGTCTCATTTACGAACCTCAAATAATCGTTT  
TCCAACGGGTAAATCTCTTGGTCTAATGATCCACGAGTGAAAAAATTCATT  
TACTAAAAACATAATTAATATAAATTAATTTTAAAGATAAAAAGTAATTA  
GTTACTGTGTTCACTAAATTATATATTATTTTAAAGACTACAAAATTTATTA  
GTATCTAAAATAATTTATATTATTAATAAATAAATTTTAAATTGATATCTAA  
TTAGTTAATAAAAAATCAAGTAACAAATTTTAAATATGAAATATGAAAAA  
AAAAAGCATTTAAGAATGTTATTAAAAAATATGATATAAATAGAAGGGCA  
AATCAAAGAATGGTAGCTCTAATAGGTTGACCGTAGAAGAATGAACTAAT  
CACTTTGAATTTTAAATTTAAAATATTGAGTGGGCACATTCTTTTATGGGTTC  
TAGAACTTAATGCTGCTTGATGATGACAAACGAAAGTAACCAACAGGAGAG  
AATGTACAATAAAACAATATGAAGAATTAGTGGTCTCTGATTTAATTGGGA  
TTTCATTGTGACCGTTCGATTACTTCACCTGCAACCTACCAACACTATTGCCT

CCGGTATCTTCCTGCGCTACCACCGTTCACTCCAATTAACGTTACAAAACCTG  
TGTTAATTATTTAGGAAAATATACTTTACAACCTCTTAAAGTTCTAAACAACCT  
TTTGATTAAAACCTAGTAAAACCTAAATAACAGCATTAGCATAAATTAACCCT  
GGATTAAAAAAGTCAACCCACAGCATCTGTAGTTGATGGACGGTAGGAGAA  
TAATTCATTCAATATTTTCACTCCACGGCCAAGTTGACACACGTTGATAAAA  
TATCACCAATTATTGGTTGGTCAATTCAAAGATAGATGACGAGTTAACGGA  
GGTAGATATCGTCTTCTAAAATATGCCACCAAACCTCTACGTCACAAACCTACC  
ACATGATATACTAACACTACAACAAATGTGTTTGCAACGTAAGTTGGCAAT  
TGGTCATGCACGTGATGCTCACCTACTCTTCTTCTTCTATCCACCCTTGCATTCA  
TATAAAATGCTAACTCCTCCAACATCTTC

*>Pvul-CHS-6*

CATAGCCATGTGTGTTCTTGGCTAAAGATTGCTAGAACATGTTGCAAGGAG  
AAATTAACCTTTATTACTTCTCACTTTCACAATGAATTAATTATTAGATGCATT  
TCAAATAAAGACCTTAATTTAAAATATTTCAAATTATGAAAATTAAATAT  
TAACAATTATAACTACAACCTAAAATTGCACATAAAATATACATACATCAAA  
AGCTAAAACAAAATAAATCAGATTTTTTTGAAGTATGAGCTTCTGACAAAA  
AAAACCTAGGAATTATATAACCAACTACTATCAACCATAAGAAATATGCAA  
ATACCATTGAAATACTTATTATCCAAGATTAGTTGTTGAAATACTTATTATC  
CAAGGTTATTTTGCTGAGTTTTTAAAATAAATTTTTGAACTTTATAAAACTT  
ATTTGTAATGTAAAGTTACACTTTCAAAATTTAGAGAATTTAGTTATAAAA  
TATATTAAACTATATAATTTTTAATTATTTATTTATAAATAGATTTAATTAT  
ATTTATTTATTAAGTTTCGAAAAATCTAGAGTGTTTTATTGAGGTTCTACAA  
TAAATTTTTGAAATTTAACAAAGGTTAAAAAACTTCTGTTATTTTGTTGAA  
GTTTAAGAATAAACCTTTGAAATTTAACGAAGTTTAAAAAAATGTTTCGTTAT  
TTTGCTGAGGTTTTAGAATAAACCTTTGAAATTTACCGAAAGTTAAAAAAA  
ACTCCGTTATTTTGTTGAGATTTTAAAATAAACCTTTGAAATTTAACGAATG  
TTAAGAAACCTCATTTATTTTGATGAGGTTTTAAAATAAACCTTTAAAATGT  
AACGAAAATTAAAAAAATCTCAATTACTTTGCTGAGGTTTTAGAATAATCTT  
TGAAACTTAAATAAGATTAAAAAAACCTTAGTTACTTTGCTGAGGTTTTATA  
ATAACCTTTGAACTTAGTTATGGTTAAAAAAAACATTCGTTACCTAAATCA

ATTCCTAAGGTTATATTAAGGTTTGCTAAATATCCTCCCTTAAAACTCCTTTT  
TTTTGTAGTAATAATTTTAATTTTATTACTTTATTTAAAAGTGTATATACAAA  
TAAAAATTATAAATAAATAATAGATAATAAGTAAAAGCTATTGCTTTGAAT  
TAGTAAGGACATAATTAATAAATTGTACATATATTATTAACCTGTATATAT  
TATAGGTATATGATTTCTTTTACTCTCTAGTTACTTTTGAAAAGCATATTGC  
TGCACTTGAGATGTTTAGGTGATACTCTTATTATCCAATAAGAGCAACAAAT  
ATACAAGAATGTTATCTAAAACCTTATATTATAAAGAGAATATCATCAAGCA  
AACTACAAATGCTTTAATGGTAGAAAATGGGTAGGTAGCTCCTCAACCTTG  
ACTGTTAAAGAAACAACCTTCTTTATTTGAAATATAAGTTACAATATTCAGTG  
GCCACACTTTTTTATGGGTTTATAAAGTTATTGATGCTTGATCATGACCTCCA  
GTGTAACCAAGTAGAAAACATACAGATTTTAGTTTCATTTGTTTGTGGCCGT  
TGATGTAATTTAAGATGTTATCTACCAGCACAAGTGTTTGACTTTTCTTGCTG  
CGTACCAAGGTTGACTCAAATATCACAAACACACAAAAAAGAAATAATAAT  
ATTTTAAATTAAAAAATAAATAAATATGATTAATAATATTAGTTTATTGGTA  
TATGAAGTGCATGGATTTTACTGTGTCAGGACCTAATTTAATAGGGTAGAGA  
TGCATAAAATATTACCAATTATTGGTTGATAAATATAAAAATAAAAGAACC  
AATGAGCTATATGGTGGCTGAGATGGTCTTCTAAAACATGCCACCAAACCTG  
ATAAATATGTTTTCAACGTAAGATGGCTTTCCTTTTTCCACGTGATACTCACC  
CACCTACTTCCTATCCACTCTTCCATGCATATAAAACGCTGCCTCCTCCAA  
CATCTTCAAACACACAACCTTCAGCA

*>Pvul-CHS-7*

AAACTAGCAATTATATAAACCAACTACTATCAACCATAAGAAATATCCAAA  
TACCGTTGAAATACTTATTATCCAAGATTAGTTGTTGAAATACTTATTAACC  
AAGGTTATTTTGCTAAGTTTTTAAAATAAATTTTTGAAAATTTAGAGAATTT  
AGTTATAAAATATATTAAACTATATCATTTTTAATTATTTATTTATAAATAG  
ATTTAATTATATTTATTTATTAAGTTTGAAAAATCTAGAGTGTTTTATTGAG  
GTTTTACAATAAATTTTTGAAATTTAACGAAGGTTAAAAAACATTCGTTAT  
TTTATTGAGGTTTTAGAATAAACCTTTGAAATTTAAAGAAGGTTAAGAAACC  
TCCTTTATTTTGCTAAGGTTTTAAAATAAACCTTTGAAATGTAACGAAAGTT  
AAAAAACTTTTCGTTACTTTGCTGAAGTTTTAGAATAATCTTTGAAACTTAA

CCAAGATTAAAAAACACTTTCATTACTTTGCTGAGGATTTAGAATAATTTTT  
GAACTAACCATGATTAAAAAACCTTCATTAATTCAATCAATTCCTAGGAT  
TATATTAAGGTTAGTTAAATATCCTCTCTCTTAAAACTTTTTTTTTTAGTGAT  
AATTTTAATTTTATTACTTTATTTAAAACGTATATCCAAATAAAAATTATAA  
ATAAATAATAGATAACAAGTAAATGCTATTGCTTTGAGTTAGTAAGGACAT  
AATTAATAAATTGTACATATTATTAAGGTGTATGTATTATAGGTATATGAT  
TTCTTTTTACTCTAGTTACTTTTGAAAAGCATATTTCTTATTCATTTAGATAA  
AATGCACCTGAGATGTTTAAGATCAACAAATATACAAGAATGTTATCTAAA  
ACTTATATTATAAATAGAAGATCATCAAGCAAACCTACAAATGCTTTAATGGT  
AGAAAATGGGTAGGTAGCTCCTCAACCTTGACTGTTAAAGAATCAACTTCTT  
TATTTGAAATATAAGTTACAATATTCAGTGGCCACACTTTTTTATGGGTTTAT  
AAAGCTCATTAATGCTTGACCATGACCTGCAATGTAACCAAGTAGAAAACA  
TAGAGTCAAATATAGGAAGAGGAAGTGGTGTGCCATCCAAAACACTGGAA  
AGTCATACCCATGACATGGCGCAACTCTACACATAGATTTTAGTTTCATTTG  
TTTGTGGCCGTTGATGAAATTTAAGATGCTACCTACCACCACAAGAGCTATA  
TACTTTTCTTGCTGCGCTACCAGGGTTGACTCAAACATCACAAACACACAAA  
AAGAACCAAGCAAATAGCTGTGATAGACTAATTTAATAGGGTAGAGATGCA  
TAAAATATCAGTGTGAGGTTCCAATATGAAGGCAGTGTTAGGTTTTGTAGGC  
ATCCTCTCTTGTTACAAAGAAGCATTAGCGGTGCTCTATGCATGCCTTTTAA  
GTTCTGGTGTTTAGCTTTTGAGGTGTAAACCTTAGCATGAGCCAAAGTAGTA  
TGCTAAAGCTGCAAAAACCTTAAGAAGTGAGGTAATGTCTATCTGGACCGCT  
TCAAGAAGGTGTTAGTGGAGTTTTACAACATCATATTTTCTAAAGGAGAATG  
GGATGGGCTTGTGTTAGGGATTTACAACATGAGGATGGAAATCATAGGAAGAA  
ATTTCTTCTTAGGTGGAGTAATGAGTTGAAGGATGGAAATCATAGGAAGAA  
TCACCCTGTTGTTAGGTTGGAATATATTGTTTGGCATCTCTGCTGTAATTTAT  
GTAGGAACCTTGAATCTGTTTTCTGTTTTAGCTCTTTAATACTGGCGTGTGTA  
GAATTTTAGCGTGTGTAGAATTTTATGTAGCTTCTACAAGGTTTGGACATTA  
CTAAAGTGTCTCTTTAATTTAATTTTATTTTTGTTGATAAAAATTGTTTTCAA  
CTTGAGATGGCTTTCCATTTTGCACGTGATACTCACCCATCCACCTTCCTATC  
CACTCTTCCATGCATATAAAAACGC

>*Pvul-CHS-8*

CATAATCCCGAAGTCTTATTTAACTTCTGGATTATGTAATCCGGAATTCTTTT  
TTCAAATGAGTTTTTCGACTTACATAATCTGGAAACATGGGGGTGACACAAG  
AAGGACAAAAATGTATTTTTATGTTGCGTATGGAGGTGGCAGAAGAAGATA  
TGGAGGTGCAGGAAGAAATAGTCAACTGACTGCATGTATAATAAGATGCAG  
ATAGGAAAAATTATGGGCAAGATGAATGGGCCCAAGTTTTACGAAATATGG  
TG TAGATATATGAAGAATACAGTGAAATAGTAAATTTCTGGGAGTGGGAAT  
ATATAAGAGAGGGGTTCTGAAAAAATTTGTACTAATTAATAATAATTTTA  
GAATTTTCAAATAACTAAATTCTCATAAAAAATTTAGTACTAGATATAGTT  
TTATTTTTAACAAATAATTTTGTTTAAAATATTTATTATATATATACATTTAC  
AAGAAATTAAGCTGGGGTGTATAAAAATAAAAAGGGACGACAGTTAGGA  
AAAGTATGAGTCATTCGAATCATCCTAGGTTTTGAACCTGAGTGGATATATA  
TAATAAGGGTGTTCATAAATTTAGATCAAATTCACACCAGTATAGGAAC  
ATACTTTAATAAAAAAATATCTTATATATATATACATATATTCTAAGGAA  
CGAGCGAAGAAATTATGTGTCTATTGCATAAAATACAATGTCCTACTGCATA  
ATATTAGACCTAATTATTGTAGTAGTTGCTCAAATCAATAATGTGATTTTCAG  
AGAAATCCCAATAAATGTATCAGATGTTCTCATTATTTTTACTTTGGGGA  
TACACCTTTTTTTATTCAGCTTTGGCAGATTTTATTTTTGTTTATGGTAGTCT  
TTCTTGAAACTGTTTAAATTTTTGGGCAAATGTTTATTTGCATCAGGTGGATT  
GGATGTGAGTATATGAATTGGGATTAGATATTTTGATAGATATCCTTTGGTA  
ATTTCTTAGAGTTGTAATATCCCTTAAAAATACTTTCATGAATTTATTTTTTT  
AATAATCATAAAAAATATAGTGTAACACCTAGTTCTAATGAAACGTACGCAC  
AATTAATTAATTTTTCACGATGAATATTTTATAATGAATTTGTGATGGTAAT  
TATATAACATTTTTCAATGACAATATATGTAAAATTTTATTTTAAATTTGTTC  
AATAATACTCTCATCACTACAACATTTGTCCCCACTATCCATGAGATAAGGA  
GAAAAAATATCTACAATTTTTTTTCACTTGAGATGTTTAGGCGATACTCTT  
ATTATCCAGTAAGATCAACAATATACAAGAATGATATCTAAAACCTTATATTA  
TAAAGAGAAGATCATCAAGCAAATTACAAATGCTTTAATGGTAGAAAATGG  
GTAGGTAGCTCCTCAACCTTGACTGTTAAAGAATCAACTTCTTTATTTGAAA  
TATAAGTTACAATATTCAGTTGCCACACTTTTTTATGGGTTTATAATGCTCAT  
TGATGCTTGACCATGACCTCCAGTGTAACCAAGTAGAAAACATAGAGTCAA  
ATATAGGAAGAGGAAGTGGTGTGCCATCAAAAAACTGGATAGTCATACCCC  
ATGACATGGCACAATCTACACATAGATTTTAGTTTCATTTGTTTGTGGCCG  
TTGATGTAATTTAAGATGCTACATACCACCACAAGAGCTATACTTTTCTTGC  
TGCGCTACCAAGGTTGACTCAAACATCACAAACACACAAAAAGATCCAACC

AAATAGCTGTGATAGACTAATTTAATAGGGTAGAGATGCATAAAATATCAC  
CAATGACCAATGAGTTATATGGTGGCTGAGATGGTCTTCTATAACATGCCAC  
CAAACCGATAAAAATGATTTCAACTAAGATGGCTTTCCTTTTTGCACGTGAT  
ACTCACCCACCCTACTTCCCTATCCACTCTTCCGTGCATATAAAAACGCTAACT  
CCTCCAACATCTTCAAACACACAACTTCAG

*>Pvul-CHS-9*

TTGATTTATCACTTAATATTATAAATGAAGACATTA AAAAATAAAGAACATG  
CTATTCTATAAGATTTTATAAGGTAATAAATTTAAAAATAAAATGTTGTCAC  
TAATCTACAATGTTTAAAGTAAGTAAAATGTTTTATGTGTAAGGAGTAAAAT  
CATATACAATATTGTGTGATCTTGCAACAATATACTAAGTGCATCTGCTTGC  
CTTTAAGTTGAAAACAGCTAACAGTTCGGGATGACTTCCCTACTTTGTAACC  
GAGTCGTTACTTGTTATTAATGACTATTATAATGAAACAGTCTAATCAATAA  
GCCTTAAATGATGAACGACTATTTATGAAAAAATGTATAACAGTTATATGA  
CCAAGTCAAGGGACTCATAACAGTTCATTCAAAGATAACACTTGATTAAT  
CTATAAACATCTAGTCTCCAAAAAATAACAATCTATCTTATATGATAGTAAC  
ATTGATACTAACATACTTTTAAATACTTACTATATTTGTGCTCCTACTTACTC  
AACTCGATCCTCTTCGAATTACACTTCCAACTCATTTCATAAGAAGTGGAG  
CAATGGACATTGATGTTGCATTAGAGAATAATTATTGTAAAATATTTAAATA  
GTTGTTTCTAACCTATTTAATAAAAAATAATTGACTACTCACGTGTATATATA  
TGAAATAAAATACATTTGTCTCTCTCCTTTAACTAAGTGGTTGACATTTAT  
ATTTCTATTTCTTAATGGATGAATCATTTGAAAGTTAAGAAAGTTATTACAC  
ATGTCATGTTTTGTCCTTATTTACACATAATCAAACATATACTTAAATTATT  
TAAAAGTTGATCAATTATATAATATTATATACATATAATGTTTATTATAATG  
TTTCTAAGATATAAAAGATCGGTACTTAAAATGTTTATTATTAATAATTAATT  
AATTATATATATATATATATATATATATATATAAATTTTAATAATATAATTT  
TTTTTACAAGAAACAATAAATAAATAAGAATTATTTAAGGATGGACCCAAC  
CCTAATAAAAAAATAAGAAAAAAAAGAATATAAAATCCCACTCCTTAACTT  
GCCTCAAACAACCAACAAAACTATCAATAATTTCTTATCCAAAACCAACA  
AAAAAAAACCTTGCCTTTAACAACCATCAAATATAACCTCACGTCATAAA  
ATACATACCAACACTAAAATACTAACAATTAACCTTTTATTATTATTGTTGTT  
GCTAAAAAGGAAATACTAAATCACTAAAATATTCAAGTATTCCTTGAAGA  
GACAGTCACCCCATGGTGTAAGTCAGGAAGAAGTCACCTCTCACAAGTATA

ATTGTTCTCATTTATTTAGATAAAAATCCAAATAAGATGTTTAGGACATACTA  
TTATAGTTAATAAGATTATAAAAAAACGTATACAATAATGATATCTAAAA  
CTTATTGTATAAATAGAAGAGCATCAACCAAACCTAAAACACTTTATTAGT  
AGAAAATGGGTAGGTAGCTGGACCTTGACCGTTCAATAATCATATTCTCTTT  
TTGAAATTTATGTTAAAATATTCAATGCCACATTTTTTTGTGTTTGTAGAACT  
CAATCATGCTTCATCATCACCCACAATCTCACTAAATACAAATTATACAATA  
AAATAAATAAAGACACAAACACTGAATATTAAGAGGCTACCCGATGACATG  
GCGCAATTGTACCCATTGATTTTAGTTTCATGTCATTCTAGCCGTTGATGTAA  
TTAAGAGGCCACCTACCACCACAAGTGGTTTACTTTTCTAGCTGCCCTACC  
AAGGTTGACTGAAAGGTCAGAGAGAGACACAAAAAGTTCAAAGCAAGT  
GGCACAGATAGAATAATCTCATAAGGTAGAGATGCATAAAATATCACCAAT  
TATTGGTTGCTACTTTTGGAAATGAATGAACCAATTAGTTATATGGTGGCAG  
AGAGATGGTCTTCTAAACTATGCCACCAAACC

*>Pvul-CHS-10*

ATATTGCTGAGTGTGATTCAACCTCTGATACTGGGGAGGAGCAAAGAACCA  
ACATACCTTTGTGGAGATGTCATGCCTTATATCCTGGACATGGGTTATGTTG  
TTGCCTTATTTTTTTGTATTATAGTAAGCTGGATATGTACAAATTTTGGCTAAG  
AACTAGGCGTATTGTACGTGGATTGGAGTACCCAAGTATTCTCATTTATATT  
ATTTTTTATTGTTAATTAACAACAAAAGTGTTTAGATCTAACAATTGAGACAC  
CAAATCATTGAAAAACACAATTTTTATGATAAAAAATTCTTTGCATAAGA  
GCGAAGATTTATGCAAATTATAGTCATTTTTTTATGCAAATTGTAGTCATAA  
TAAATTATATTCTTATTCATAACCGATTATGTTGGTCTTTCATAATCGATACG  
TCTTGAACATAATTGATTGATGTTGGTTAATTTTTTATTAATATTTATGTTTT  
TATTTATTATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
TAAAAAAATCAATCATATCTGCAACTTTATACTCAAATATATTTATTTTTCTT  
TAATCCAAACCACCTATTTTTTTATTGTTTTTCTCATTTTTGTTTCTTTCTC  
CACTTCCAATCAAACAAATTGTGTTTAGATTAAGAAAAGGATGAAAAAGG  
TAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
GTGAAAGTGAGTAAATTTTTTTTAAAGATTTGATTGTGATAGAATAAATTA  
TTGTGTATAAATGCATATAGAAAATAGTTTATGGAATCAATTTTTAAAAAAT  
TGAATGTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
TTAAATTACACTATAAGCAAAGCATAAAACCTAAAAACCCTTATACTTT

GGAAAAGATTATTTTCATGTTTGATTCTATCATTTCGTAAGACTCAAAG  
TGATTCTTCCTCAACCAATTCTACTTGCACATCTTCATCTGTCACTTGGTTAA  
AGATAAAATTAATTATTATATTCCTAAATTATATATTATTTCAAAGACTAA  
AACTTTATTAGTATCTAAAATAATTGATATTATTAATAAATAATTTTTAAA  
TTAATATTTAATTAGTTAATAGAAAAATTTAGGTAACAAATTTTTAAAATAT  
AAAGTACGAAAAAATGCATTAAGAATGTTATTAATAAATAATGATATAA  
ATAGAAGAGCAAAGTAGAAAATGGTAGCTCCAATAGGTTGACCGTTGAAGA  
ATGAACTAACCCTTTGAATTTTAAATTTAAAATATTGAGTGGAAAAATCTT  
TTATGGGTTTCATAGAACTTAATGCTGCTTGACGATGACAAACGAAGTAACC  
AACAGGAGAGAATATAACAATAAATAATATGAAGAATTAGTGGTCTCTGAT  
TTTATTGGGATTTTCATTGTGACCGTTCGATTACTTCACCTGCAACCTACCAAC  
ACTATTGCCTCCGGTATCTTCCTGCGCTACCACCGTTCCTCCATTAACGTTA  
CAAAAGTGTGTTAATTATTTAGGAAAATATACTTTACAGCTCTTAAAGTTCT  
AAACAACTTTTGATTAAAAGTAAAAGTAAAATAACAGCATTAGCATAAA  
TTAACCTGGATTAAAAAAGTCAACCCACAGCATCTGTAGTTGATGGACGG  
TAGGAGAATAATTCATTCAACATTTTCACTCCAAGCCAAGTTGACGCACA  
CGTGATAAAATATCACCAATTATTGGTTGGTCAATTCAAAGATAGATGACG  
AGTTAACGGAGTTAGAGATGGTCTTCTAAACCGAACTTCTCATATGTCACAA  
ACTACCACATGGAACTATAACAATGTGCTTTTCGACGAAAGGTGGAAATT  
GGTCATACACGTGATGCTCACCTACTCTTCTTCTATCCACCCTCCATGCATA  
TAAAACGCTAACTCCTCCAACATCTTC

*>Pvul-CHS-11*

ATTGTTAATATTATATTCATATATTGTTAATATTATATTCATATATTGTTAAT  
ATTATATTCATATATTGTTAATATTATATTCATATATTGTTAATATTATTAATAA  
TAATAAGTATAATAAAAATCATAATAATACTAAAGAATTTGTTTGGTGTAGT  
GGTTAATTTTTTTTGGTTACTGAAGGAACCTGGGTTTCGAATTTCAATCACCGT  
TTACATACGAAATGTCTACACAATCCCAAACACCTGTGCAGAGAGGTAG  
TAACTAATTATGCGGTTACTAACTCCCTAAGACCCCAAATAAAAAGTAAGCA  
TATTTCAATTTAATTTACACTACACTCATATTTTTATGCTCTCATTGACTTGAC  
CGTCGTAGTCTTGTCAACAGGTGGAGCTTCTCTCATTGTGATCTTCAAGCAT  
ATCGAAACGACAATCTTGAAAGGTTGACCCAGAATCCACCTTCAAGATCCG  
ACTCAGGTTTGTGCGATGAGAACATTTGGTGTCCACCGTGGGACAGATAAAA

TTGATCCCGCTAATACTTATACACTGAATAGTCAGACGATATGAGAAAAAC  
AACACAAGGAAGGCATACACAGATTCATTCCCTGGATACACTTCATTAAGG  
GAAAGTCCACAATCGACAAAGAAAAAAAAAATCTTTTAAACCCTCCTTCAAT  
GATTCCTATATGAGGAAACGTGTCAAACACGACCACCACTACAAAGGATAG  
AAAGATAAGAGAACAACAAGGAAGAGGGCAAAAACAAAAGTGTTTTACT  
TCTTATGTTCAATTTTAAACATCCTCATTTCATTGAGAGTGTTGATCTTGTTG  
CATATGTGGTCACAGTAACTAAGATAAGAGTGTGTATCCAAATAAAAAATT  
ACATAATAAAATATTAATACAAATAAATTTAATCTTTTAAAAAACAAATTTA  
AATAAATTACACCGCCAAATATAGTTTTGAAAACTATTTTTTTTTTAAATA  
ACTTTAATTTCTAACATTTTTAATTGTTAATGTTTTTTTCATCAATATCTTTAA  
TTTGATTACTTTATTTAGAACCTGTATATCCAAATAAATAACAGATAACAAG  
TATATCAAGTGTATATCCAAATATAAATTATAAATAAATAATAGATAACAA  
GTAAATACTATTGCTTTTAGTTAGTAAGGACATAATTAATAAATTGTACAT  
ATTATTAAGGTGTATGTATTATAGGTATATGATTTCTTTATACTCTAGTTACT  
TTTGAAAAGCATATTTCTTATTCATTTAGATAAAAATGCACTTGAGATGTTA  
GGTGATACTCTTATTATCCAGTAAGATCAACAAATATAAAAGAATGTTATCT  
AAAACCTTATATTATAAAGAGAAGATCATCAAGCAAACCTACAGATGCTTTAA  
TGGTAGAAAATGGGTAGGTAGCTCCTCAACCTTGACTGTTAAAGAAACAAC  
TTCTTTATTTGAAATATAAGTTACAATATTCAGTTGCCACACTTTTTTATGGG  
TTTATAATGCTCATTGATGCTTGACCATGACCTGCAATGTAACCAAGTAGAA  
AACATAAAGTCAAATATAGGAAGAGGTAGTGGTGTGCCATCCAAAACACTG  
GATAGTCATACACCATGACATGGCGCAACTCTACACATAGATTTTAGTTTCA  
TTTGTTTGTGGCCGTTGATGTAATTTAAGATGCTACCTACCACCACAAGAGC  
TATACTTTTCTTGCTGCGCTACCAAGGTTGACTCAAACATCACAAACACACA  
AAAAGATCCAACCAATAGCTCTGATAGACTAATTTAATAGGGTATAGAGA  
TGCATAAAATATACCAATGACCAATGAGTTATACGGTGGCTGAGATGGTC  
TTCTATAACATGCCACCAAACCTGATAAAAATGTTTTCAACTAAGATGGCTTT  
CCTTTTTGCACGTGATACTCACCCACACCCTACTTCCTATCCACTCTTCCATT  
CATATAAACGCTAACTCCTCCAACATCTTC

*>Pvul-CHS-12*

CATAGTAACATGGTAAAATAGCAAAATAGATATAAAAATCATATTTGAGTG  
GGAAATATGTTTAATAATATGACAAAATTCATAACGAAAATAAAAGTTACT

TCATAGGATAAAAATGATATAAGTCCCTATTATAGATAAATAAGTCTTTTTA  
AAATAATATTTTACAATAATTAACCAAAATTTATGATATTATAGGGACA  
AAAAATGATTTCAAAGGAGTGAAAACACCTAACTCTTTTTATATGAACCA  
AAGTCAAATTAGTTCATTTACTATACATCTATAACTTAAAAACAAAATGC  
ATCTATATGTTTTAAAATTAACAATTTAAATGTAAAATAAAATAAATA  
AATTTAATACTTTAATTTAGGGGTTGAAATTATTCTATATTATAATAA  
ATAAAAGTCTTGAAAAGTATTATAACCCTAACAAAATACAGCAAATAATA  
ATTTCTCTCCCCTAATTTTTGTTCTTATTACCATTTAGAAGTTGTTCAAGCC  
CACATGTTACTTTGAGTTTGTTAAAATGTCACTTTGAGTTCCTTATTATCTTT  
ATTACAACCTACTTTGCATCAGGATTTATTTAATAATCTTAAATTTAAGTATA  
TGTTTTAAATATCTAAAAAATCTTTAAAAAATTGCAAAATGTTTTCTCTGT  
AGACTAGTTGATCCACCACCGTATAACTTCATCTCAGTTCTTCGTGGCCGCC  
ATTGATGTCTGCTTCTGAGTTTCAGAGACACGAGAAACACAAAATAGTGAA  
TCAGTTTTAAATAATATTATCATATTATAAAATCCCAACTGAGTAAGTATAC  
CAAACACTTTATCAAGACTTATTATTATTTTATTCTTGTAATCTGAAGTTTTC  
TTAGGTTATTTCCAATCCACTTTTATATATAAACTTTATAACTTAACAAATAA  
AAAACCTCAAATATTACTAAATAGGTCTCATAATAACCTATTTATATATTTA  
GTCAATATCAATTACTATTATTTCTATTTTTATTATTAGCAGAAACACCTATA  
TTAAAGCTACTAAAAAATTATTAATAAAAACTAACTTTAAAAATTAATA  
TAATTAGTTACTATATTAATTAATTATAAATAATTTTATAAACTAAAAAAT  
TATTAATATTCTATTATCAATAAAAAATTTATAAAGTAATTTCTAAATTGATA  
TGTTAGTTACTAAGATTTTAACTACTAACTACTTATCTTCTACATTAATTTTT  
ATTCTCTTTTTTAGAGGCTAATTTATAATATAAAATATTAGTAACTAAAATTT  
TGATAACTAATTTAAATACCAATTTTAAAACTATTTTATAATATTTTATTAA  
TAATAAAAATTACATTAGATATCAATAATTTTTTAGTCTTTAAATTAATATA  
TAATTTAGTCAACCCAATGAATAATTTATTATCTCTAAATTTAATTATTA  
TTAATAAATTTTTTATAATAACCATACATAAAATGACAAGACAACTTGTTG  
AGAAAAATCATCTTATTTGTTTGAATAAAATTCCAAATACGATATTCTTCAC  
TCCGATAACTAACGTCCACCAACGTGCACAACTGTGTATATTTTTAAAAA  
TGTTCTTTGGCAATGGGTAGGTAGCTCCATTAGGTTGACCGTTAAAGAAAG  
ATATAATCACTTTGAATTTTATTTTAAATATTCAGTGGACACAATCTTATATG  
GGTTCACGGAACCTAATGTTGCTTCACACGACAAAACGAAGTAACCAAGTA  
GTTTTCATATACAATAAATAAAGAAAACCTTAGTGGTTTCTGATTTTATTT  
GCATTTCAATTGTGGCCGTTTCATATGACTTCAAATGCAACCTACCAACGTTGT

TGCTTCCAATATCTTCCTGCGCTACCTCGTTGCGACTTAAGATGGCTTTCTTT  
TTGCACGTGATGCTCACCTACTCTTCTTCCCATCCACCCTGCATGCATATAA  
AATGCTAACTCCTCCAACAT

*>Pvul-CHS-13*

GACGTGAAGGTAAAATTCTATTATAACAAGAAATGGAATTGGGAATAAAA  
GAAAAGGTAATTAATAAAAAAAGGAAAAGTAATTAATAAAGAAGTGATA  
ATCGGGAAGGAAAGAAATTTATTACCTTTCAAAGAATGATTTAGAAAATTG  
CGTTTTTTTTTTCATTGATTATCTTGTAATAATTAAGTACATTGTAGATTTAGA  
ATTTTTATTTTTTCCATTGGTTATGTTGTAATAATTAAGTACATTATACATTT  
AGAAGTTTTTATTTTTTCAATGTATTTAAAAGAAATTATTGTGTTTAAAATA  
TTTATAATATATATATATATATATATAATTTCAAAAAATAAATTTAAAAGC  
TAGTGGGTGTAGAAAATATATAGGTGTTGTCAAGTTCACGCAAGTTTTTTTT  
CCCTTAAATTTTGCCTCAGTTTGGTCCATGCAAAATCTGATTATATTTTTTAT  
GTTTTTATATTTTTTTTTGGCAAACCGATGCATGCATGTTTTTCTAATATA  
TTTGTGTTAGTTTGGTTCACCAATAAACAGATGATATTACGTTGTTTTTACAA  
TAACTTGATCTACACAAAATGCGTCGCTCGTAATGGCAGACGCATTGGCTA  
ATGAAAAAAGCACTTTGCTTTCTGCGACTTTTTTGTCCGATGCTTGATCGA  
TGCAATTCTGACATTTTTTTCGTTGGTTTTGAATTATTTGTGTCTTTTTTTTTCGT  
CGACAAAGTACAGTGTTTTTCTTTAATATATGATTCAAACCTATCTCCCATA  
GATTATTCTGCTCAACTTTTTGGAAGTATATAGCAAAGTAAGTTCTAATATA  
GCAAGAGTAACCTAAAAGTTTTCACGGTATGTAATAATAATATTTCTAACT  
GTTTATGAAGACAAATTTCTTTTTGTGATATTCTTGATGTTATATATTCAAAA  
GAATAGGTAATAATCTAGGTGCTCACTGTATTTTTGTAATTGCAGTTTCAAT  
AACTGTTTACTCTAATTACTCTTATATTTATAATTTTTTCTGATAAAAAATA  
TTTTCATAGTTGACTAATTTACTATGGATTCACGATTGTTATTATATAATGTT  
TAAGAATGATTTTATATAATATTTTAGATTGAAACTGAATGATTATTAATAA  
TACACAGGATTATTTTTAAATTATAAAAGTTGAATTAATTAATTTGCAAAA  
ATTAATTTTAGTTTAATTCAGTTTAGATTATTAATCACAATAAGTTACAAAC  
TAAAACTTTTAATTAATGTAGTATAGAATTAATACTAACTTTTCAGTACGAATA  
TTTTATAACGAATTTATGATTGTAATTATATAACATTTTACAATGACTAATAT  
TATAAATAGAAGATCATCAAGCAAGGTAGAAAATGGGTAGGTACGTAGCTC  
CTCAACCTTGACTGAATCAACTTCTTTATTTGAAGTATAAGTTACAATATTC

AGTGGCCACACTTTTTTATGGGTTTATAAAGCTCATTGCTTGACCATGATCT  
GCAATATAACCAAGTAGAAAACATACGGTCAAATATAGGAAGAGGAAGTG  
GTGTGCCACCCAAAACTGGATAGTCATACCCCATGACATGGCGCAATTCT  
ACACATAGATTTTAGTTTCATTTGATTGTGGGCGTTGATGTAATTTAAGATG  
CTACCTACCACCACAAGTGGTACACTTTTCTTCCTGCGCTACCAAGGTTGAC  
TCAAACATCACAAAGACACAAAAAAGTTACAAGCAAATAGCAGTGATAGT  
GATAGAATGATTTAATAGGGTAGAGATGCATAAAATATCACCACTTATTGG  
TTCCTAAATTTAAAAATGATGAATGAACTAATGAGTTATATGGTGGCTGAG  
ATGGTCTTCTAAAACATGCCACCAAAGTATAAATGTGTTTTCAACGTAAGA  
TGGCTTTCCTTTTGCACGTGATACTCACCCACCCTACTTCCTATCCACCCTGC  
CTGCATATAAAACGCTAACTCCTC

*>Pvul-CHS-14*

TACGTATATGATTTATAATGTAATAAATAATGTTTAATTTTGTATCAGATGG  
TTATTCTTAAAATGGTTTTTATTTATTTTTTATTTTTATTAATAAAATAAATA  
AATAATATAGGATGTGAAATTCTTGAAAAGAAAAGAAAAATAATATTAACA  
TATAATTTTGTATACAAAAGTTAACATAAGATAAGAGAGAGTTCTTCTCAA  
CCTGAAATAAAATAGTTTATAACAATTCATGTGTACGAAAAGAATGTAATA  
CTATTATAAACATATTATCTAATTTTTTTATTTTTAAGAATAATGTTTATTCG  
TATGATGTCAGTGTATGAAAACGTGTGTGCATGATACGAATGGATGAAGTA  
TACAATTTGGACAAGTGATTTGATAAAGATATTTTATTCAATTAATTTAAAT  
TACTTCAACAATATATATTACAGGTGTAAGCAAATTTTATCCGGAGACATAA  
TTACGCAAATATTATGTTATAGGTAAATTTTCAATCTTCTGATTCAAACATC  
AATTTTTGTGTGTGTAGTACTTCATATAATTATATACATGTTTTTCTAGTCTT  
TCTTTTTCATTTATAAATATTTTAAAACTATTGTTCAAATTAAGAAAACA  
TATTTTTATCAAATCTTATGTATATTTTGTACAATTAAGCGGTGAGAGAA  
ATACTCCACAGTTTTATTCTTAAATTTTATGCATTTTTTCATACATGCAAAGCT  
TTTATATATATAAATATATATATATATATATATATATATAGTTGTTAAATGTT  
GTTTTAGTTGTAATAACTACTTTTTTAAAAAATCATATATACAACTGACGT  
TCTAATTCAGTTTTACATCCCATTTTTATATGCATTTTGTACACTTGTTTGA  
AAATAAATATAAACTACAGTAGAATTTTTTTATGCTGAATAAAAAAGAAAT  
AGAGTATATATAATGTTTTTTATTTTATTCTCGAAAGAATAGCAACAAAAGG  
ATAAAATAAAAGTCTGTATACACATAACAATATTGCTGATGTTATGTTACTTA

CATGATCGACTAAGTATGATAGTTGTGTGAAATTGAGGCACTCCAAACTAA  
TAATTTCAAGACGAGGAAAGAAATATTATTATTATTATCATTATTATTA  
TTATTATTATGCGATGATCCTTACACTTAAATATTTATAAATTCTCTGTCTTCT  
GCTGATTCTAACAATTTTATTTATAGCCAACCTATATTTATTTATTTATTAAGG  
TCTCTATTACCTCATTAAACGGGTATGATTTCCATTTAGATTTATTATACTGT  
CTTATGTATTTATTTATTTTAAATTATTTATAAAAATCCTTCTATAACCATGAG  
ATGAATATCTTCTACTTTTGTTAACTAATATTAGTATTTTAAATAGGAAAATG  
ATAGTTTCCTCAGAATTGTTTACAACCTATTAACGTGGATTTAGAAATATATA  
ATAAAAGATAAATTTGAAATTAATTGATATGGAAAATATTAATAATAAAT  
ATTAAAAATTATAATATAATAGTATAAATATTTAATATTTCTCATTAGTATTT  
AACATAATAGTATGAGTTATCAATGTATCATATTTTAAATATTTAATATTTCTC  
ATTAGTATGATGATAGGATCTACTTGAGTTAAGTCGAAATTCTGTGAAATCT  
AGAATTAATTAATTAATAGAAATAGCATGAATACATATGACATTTTTTTGGG  
GTGAAACAAATATGCAATGGATAGAAAAATGAAAAGACGTATATAAAAAT  
TTGGTATAAACCAATGGCATAACATGAAGTGCAATGGACTGCATATTTTTTTGG  
TAGATTTTTCTTCTTGCTCTCGATAGTAGATGGTTAATTATATATGTAGATAA  
ACCCTGCAGCTGAAGCACGTGTCGGGCACCAAACCTTATTGCAGATACGTG  
GATATATTAGATTAGTGAGAATAGGTTATGAGAATCCAACCTATAAATAGAT  
GCAAAGGGATTTTCTCAAATC