

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



**YÜKSEK LİSANS
TARIMSAL BİLİMLER ANABİLİM DALI**

**VİTİS CİNSİNDE PMEİ (PEKTİN METİL ESTERAZ
İNHİBİTÖR) GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK
DEĞERLENDİRMESİ VE BAZI VİTİS TÜRLERİNDE
TUZ STRESİNİN PMEİ GENLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
IN-SILICO ANALİZİ**

Oğuz DİRİCANLI

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

**İkinci Danışman
Prof. Dr. Meltem SESLİ**

MANİSA-2024

TAAHHÜTNAME

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

Oğuz DİRİCANLI



ÖZET

Yüksek Lisans

Oğuz DİRİCANLI
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Dilşat YEĞENOĞLU

İkinci Danışman: Prof. Dr. Meltem SESLİ

Pektin Metil esteraz İnhibitör (PMEI) genleri, bitkiler için çok önemli bir yere sahiptir. Bitkilerde stres yanıtı, bitki gelişimi, meyve oluşumu ve olgunluğu gibi birçok farklı biyolojik süreçte görev almaktadırlar.

Bu çalışmada asma (*Vitis*) bitkisindeki PMEI genleri biyoinformatik analizler aracılığıyla *in-silico* incelenmiştir. *Vitis vinifera* türünde 46 gen, *Vitis riparia* türünde ise 43 gen PMEI genleri olarak saptanmış, *VvPMEI* ve *VrPMEI* olarak adlandırılmışlardır. Bulunan filogenetik ağaçlarda aynı sınıfta yer alan proteinlerin motif kalıplarının benzer olduğu görülmüştür. *VvPMEI* ve *VrPMEI* hedefleyen miRNA'lar bulunmuş, bu genlerin stres yanıtı ile ilişkileri saptanmaya çalışılmıştır. *Vr-PMEI-9*, *VvPMEI-10*, *VvPMEI-18*, *VvPMEI-34* ve *VvPMEI-35* genlerinin tuz, soğuk ve kuraklık stresi ile ilişkili olabilecek potansiyel genler olduğu görülmüş, bunun yanı sıra meyve oluşumu, renklenme ve olgunlaşma ile ilişkili olabilecek potansiyel hedef genler belirlenmiştir.

Ayrıca, veri tabanlarından elde edilen tuz stresine maruz kalmış asma gen dizilerinde gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin *in-silico* olarak elde edilip edilmediği FastPCR programı denenerek araştırılmış ve gen ekspresyonundaki değişimleri belirleyebildiği görülmüştür.

Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığı altında bu çalışmanın daha ileride yapılacak araştırmalara ve ıslah çalışmalarına kaynak olabileceği düşünülmektedir. Tuz stresine ve diğer abiyotik strese dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde *in-silico* çalışmaların zaman ve maliyetten tasarruf gibi birçok avantajının olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asma, Anaç, Bağ, *Vitis vinifera*, *Vitis riparia*, Pektin Metil Esteraz İnhibitörleri (PMEI), Tuzluluk Stresi, Kuraklık stresi, Biyoinformatik Analiz, miRNA, *In-silico* PCR analizi

2024, 67 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Oguz DIRICANLI

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emine Dilsat YEGENOGLU

Co-Supervisor: Prof. Dr. Meltem SESLI

Pectin Methylesterase Inhibitor (PMEI) genes have a very important place for plants. They are involved in many different biological processes in plants such as stress response, plant development, fruit formation and maturity. In this study, PMEI genes in grapevine (*Vitis*) were examined *in silico* through bioinformatic analyses. 46 genes in *Vitis vinifera* and 43 genes in *Vitis riparia* were identified as PMEI genes and were named as *VvPMEI* and *VrPMEI*.

It was observed that the motif patterns of the proteins in the same class were similar in the phylogenetic trees found. *VvPMEI* and *VrPMEI* targeting miRNAs were found and the relationships of these genes with stress response were tried to be determined. *VvPMEI*-10, *VvPMEI*-18, *VvPMEI*-34 and *VvPMEI*-35 genes were found to be potential genes related to salt, cold and drought stress, and potential target genes related to fruit formation, coloration and ripening were determined.

In addition, the FastPCR program was used to investigate *in-silico* whether the changes in gene expression levels in grapevine gene sequences exposed to salt stress obtained from databases detected and it was seen that it could determine the changes in gene expression.

As a result, it is thought that this study can be a source for further research and breeding studies. It was determined that *in-silico* studies have many advantages such as saving time and cost in the development of varieties resistant to salt stress and other abiotic stresses.

Keywords: Vineyard, Grapevine, Rootstock, *Vitis vinifera*, *Vitis riparia*, Pectin Methyl Esterase Inhibitors (PMEI), Salinity Stress, Drought stress, Bioinformatic Analysis, miRNAs, *in-silico* PCR analysis

2024, 67 pages

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Dünya çapında toplam ekili alanların yaklaşık %20'sinin ve sulanan tarım alanlarının %33'ünün yüksek tuzluluktan etkilendiği tahmin edilmektedir. Tuzlu alanlar, düşük yağış, yüksek yüzey buharlaşması, yerel kayaların aşınması, tuzlu suyla sulama ve kötü kültürel uygulamalar dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle yılda %10 oranında artmaktadır ve 2050 yılına kadar ekilebilir arazinin %50'sinden fazlasının etkileneceği tahmin edilmektedir.

Mevcut doğal kaynaklarla, özellikle çeşitli çevresel faktörler ve kentsel genişleme nedeniyle ek araziler tarım için kullanılamaz hale geldiğinde, artan dünya nüfusunun gıda taleplerini karşılamak gelecekte daha da zorlaşacaktır.

Binlerce yıldır tarımı yapılan asma (üzüm) bitkisinin dikildiği tarım alanları da tuzluluktan etkilenmekte, dolayısı ile ekonomik kayıplar artmaktadır. Tuz stresi ve tuz stresi yanıtında rol alan genlerin düzenlenmesinin araştırılması ve potansiyel aday genlerin bulunması tuz stresine dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde önemlidir.

Bu çalışmada *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* asma türlerine ait pektin metil esteraz inhibitörü (PMEI) genleri biyoinformatik analizler aracılığıyla incelenmiş ve bu türlere ait PMEİ genleri çıkarılarak adlandırılmıştır. *VvPMEI* ve *VrPMEI* genlerini hedefleyen miRNA'lar bulunarak tuz stresi ve diğer abiyotik stres türlerinde potansiyel markır olarak kullanılabilecek genler belirlenmiştir. Aynı zamanda FastPCR programı denenmiş, tuz stresine maruz kalmış bitkilere ait gen dizileri NCBI veritabanından indirilerek bilgisayarda Real-Time PCR analizinin simüle edilmesiyle denenmiş ve gen ekspresyonu seviyesindeki değişiklikleri saptayabildiği belirlenmiştir.

Yüksek lisans çalışma konumun belirlenmesinde, hazırlanmasında ve değerlendirilmesinde kıymetli fikirleriyle bana hem çalışmamda hem de okul dönemimde her zaman fikir veren, kendimi bilgi ve beceri olarak daha ileriye taşımama yardımcı olan ve kendisiyle çalışmaktan kıvanç duyduğum çok değerli Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine Dilşat Yeğenoğlu'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Prof. Dr. Meltem SESLİ, Prof. Dr. Çiğdem Takma ve Prof. Dr. Tamer Kuşaksız' a engin akademik bilgi ve tecrübelerini benimle her daim paylaşarak bilimsel anlamda gelişmeme destek olarak katkıda bulundukları için kendilerine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Çalışmanın yürütülmesinde gerekli tüm olanakları ve desteğini sunarak yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen; Sayın Öğr. Gör. Tevfik Hasan Can'a,

Hayatım boyunca ilgi, sabır ve değerli manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her daim yanımda hissettiğim kıymetli aileme,

Destek ve katkılarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Alaşehir Meslek Yüksekokulu'nun tüm personeline teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Oğuz DİRİCANLI
Manisa, 2024

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Amino asit
ATP	Adenozin trifosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
BLASTP	Protein blast
bp	Base pairs (Baz çifti)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ER	Endoplazmik retikulum
E-value	Beklenti değeri
GSDB	Gene Structure Display Server
Mbp	Mega Base Pair (Bir Milyon Baz Çifti)
MEME	Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation
miRNA	Micro RNA
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDB	Protein Data Bank
Pfam	Protein families database
Phyre2	Protein Homology/Analogy Y Recognition Engine
PME	Pektin metil esteraz
PMEI	Pektin metil esteraz inhibitör
RNA	Ribonükleik Asit
Vv	<i>Vitis vinifera</i>
Vr	<i>Vitis riparia</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. PMEİ'lerin bitki hücresindeki rolü [40]	10
Şekil 2. <i>VvPMEI</i> genlerinin <i>Vitis vinifera</i> türünde kromozomlar üzerinde dağılımları.....	15
Şekil 3. <i>VrPMEI</i> genlerinin <i>Vitis riparia</i> 'da kromozomlar üzerinde dağılımları.....	16
Şekil 4. <i>VvPMEI</i> genlerine ait filogenetik ağaç	25
Şekil 5. <i>VrPMEI</i> genlerine ait filogenetik ağaç	26
Şekil 6. <i>VvPMEI</i> ve <i>VrPMEI</i> genlerinin ortak filogenetik ağacı.....	27
Şekil 7. <i>VvPMEI</i> genlerinin korunmuş motif yapısı	29
Şekil 8. <i>VvPMEI</i> genlerinin ekzon/intron yapısı	30
Şekil 9. <i>VrPMEI</i> genlerinin korunmuş motif yapısı	32
Şekil 10. <i>VrPMEI</i> genlerinin ekzon/intron yapısı.....	33
Şekil 11. <i>VvPMEI</i> ve <i>VrPMEI</i> proteinlerinin 3 boyutlu homolojik modellemesi.....	34

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. <i>VvPMEI</i> (1-46) genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler.....	18
Tablo 2. <i>VrPMEI</i> (1-43) genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler.....	21
Tablo 3. <i>VvPMEI</i> ve <i>VrPMEI</i> proteinlerinin hücrealtı lokalizasyonları.....	36
Tablo 4. <i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis riparia</i> türlerinde PMEİ genlerinin analiz sonuçları.....	39
Tablo 5. <i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis riparia</i> 'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	42
Tablo 6. <i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis riparia</i> 'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (<i>Vitis vinifera</i>).....	50
Tablo 7. <i>In-silico</i> PCR sonuçları.....	53

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT	II
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
İÇİNDEKİLER	VII
GİRİŞ	1

BİRİNCİ BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Biyoinformatik Temelleri ve Uygulamaları.....	2
1.2. Asma (Vitis) Hakkında Genel Bilgiler	2
1.3. Asma (Vitis)'nın Tarihçesi	2
1.4. Asma (Vitis)'nın Önemi ve Coğrafi Yayılışı	3
1.5. Asma (Vitis)'in Türkiye ve Anadolu için Önemi.....	3
1.5.1. Ülkemizde Kullanılmakta Olan Başlıca Amerikan Asma Anaçları ve <i>Vitis riparia</i> 'ın Önemi	4
1.5.2. Ülkemizde Tarımı Yapılmakta Olan Üzüm Asması <i>Vitis vinifera</i> 'nın Önemi.....	5
1.6. Bitkilerde Stres	5
1.6.1. Bitkilerde Tuz Stresi ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	6
1.7. Pektin.....	8
1.7.1. Pektin ve Pektin Metilesteraz Enziminin (PME) Bitkilerdeki Rolü	8
1.7.2. Homogalakuronan (HG)'nin Demetilesterifikasyonunu ve Yapısı Üzerindeki Etkileri	8
1.7.3. Pektin Metil Esterazlar	8
1.7.4. Pektin Metilesteraz İnhibitörü (PMEI)	9

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Asma Genomunda PMEİ Genlerinin Tanımlanması	12
2.2. Kromozomal Yerleşimi, Hizalama ve Filogenetik Analizi	12
2.3. Hücre Altı Lokalizasyon, Gen Yapısı ve Korunmuş Motif Belirlenmesi.....	12
2.4. PMEİ Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi	13
2.5. PMEİ Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Bulunması.....	13
2.6. PMEİ Genlerinin Tuz Stresi Altında Ekspresyonlarının <i>in-silico</i> Belirlenmesi	13

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. <i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis riparia</i> 'da PMEİ Genlerinin Tanımlanması ve Kromozomal Dağılımları.....	14
3.2. <i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis riparia</i> PMEİ Genlerinin Filogenetik Ağaçları.....	23
3.3. <i>VvPMEİ</i> ve <i>VrPMEİ</i> Genlerinin Korunmuş Motif Yapısının ve Ekzon- İntron Bölgelerinin Tanımlanması	28
3.4. <i>VvPMEİ</i> ve <i>VrPMEİ</i> Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi.....	34
3.5. <i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis riparia</i> 'da PMEİ'lerin Hücrealtı (Subcellular) Yerleşimlerinin (Localization) Belirlenmesi	35
3.6. <i>VvPMEİ</i> ve <i>VrPMEİ</i> genlerini hedefleyen MikroRNA'lar (miRNA'lar).....	41
3.7. In-silico PCR.....	52

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR	60

GİRİŞ

İnsanların dünya üzerindeki tüm faaliyetlerine bağılı olarak atmosfere salınan sera gazlarının sebep olduğı çevresel faktörlerin istenmeyen yönde değışmesi nedeni küresel ısınma ve iklimsel değışikliğı başta olmak üzere biç çok doğa olayı üzerinde çok yönü olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bu sebeple, küresel ısınmaya bağılı olarak yakın gelecekte dünyamızda büyük iklimsel değışikliklerin yaşanacağı tahmin edilmektedir [1].

Bitkiler yaşamları süresince çok çeşitli ve değışken olumsuz çevre koşullarına maruz kalırlar. Bu olumsuz koşullar bitkilerin büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkilediğinde, bitkide oluşan durum stres olarak tanımlanır.

Meydana gelmesine neden olan faktörler bakımından incelendiğinde stres türleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır. Bitkilerin büyüme ve gelişimini önemli ölçüde engelleyen abiyotik strese; düşük veya yüksek sıcaklık, yetersiz veya aşırı su, tuzluluk, radyasyon, kimyasallar gibi çevresel faktörler neden olurken, hastalık etmeni olan patojenler, yabancı bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar ve hayvanlar biyotik strese neden olan faktörlerdir. Bu stres faktörlerinin sebep olabileceğı zarar; bitkinin türü, toleransı ve adaptasyon yeteneğıyle ilişkili olarak değışkenlik gösterir [2].

Stres tanım olarak, biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin ayrı veya birlikte fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda belli başlı değışimlere neden olması hatta organizmada hasar oluşturma yeteneğı olarak tanımlanmaktadır [3].

Stres faktörlerinin bitkilerde neden olduğı etkiler dünya genelinde bitkisel üretim ve gıda güvenliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Abiyotik stres faktörleri, klorofil biyosentezini, fotosistemlerin performansını, elektron taşıma ve gaz değışim süreçlerini olumsuz yönde etkileyerek bitkilerdeki fotosentez olaylarını sekteye uğratmaktadır [4].

BİRİNCİ BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Biyoinformatik Temelleri ve Uygulamaları

Yaşadığımız dünyada son 40-50 yılda baş döndürücü bir hız ile miktarı artan biyolojik bilginin anlamlandırılması, düzenlenmesi ve erişilmesini sağlayabilmek adına bir ihtiyacın sonucu olarak ortaya çıkan biyoinformatik; biyomoleküllerle ilgili işlenmemiş ham verilerin düzenlenmesi, analiz edilmesi ve saklanması sürecinde matematik, istatistik ve bilgi teknolojilerinden faydalanan disiplinler arası bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır.

Hızlı bir şekilde gelişen ve yaygın bir biçimde kullanılan bazı biyoinformatik araçları ve analizleri sıralamak gerekir ise; verileri elde etme ve depolama, veri tabanlarının kullanılabilirliği, veri analizi, nükleik asit ve protein dizilerinin analiz edilmesi ve özelliklerinin belirlenmesi, proteinlerin üç boyutlu yapılarının tahminlenmesi, protein korunmuş bölgelerinin tahminlenmesi, gen tahminlenmesi, fonksiyonel analizler, gen ve protein etkileşim ağlarının analizleri ve filogenetik karşılaştırma analizleri şeklinde sıralanabilir [5].

1.2. Asma (Vitis) Hakkında Genel Bilgiler

Asma bitkisi dünya genelinde ekonomik öneme sahip çok yıllık bahçe bitkilerindendir. Diğer çok yıllık bitkiler ile kıyaslandığında, kuraklığa karşı dayanıklı olup tuzluluğa karşı ise oldukça hassas bir bitkidir. Bağ alanlarının büyük bir bölümü aktif gelişme döneminde mevsimsel kuraklığın en yoğun olarak ortaya çıktığı bölgelerde kurulmuştur. Bu bölgelerde toprağın su kapasitesinin düşük olması ve evapotranspirasyonun yüksek olmasından dolayı asmalar sıklıkla kuraklık ve tuz stresine maruz kalmaktadır. Asma bitkileri kuraklık stresini; strese maruz kalma süresine bağlı olarak tolere ederler. Asma bitkilerinde tuz toleranslılığı, toksik iyonların bitkinin kök seviyesinde etkin şekilde tutulması ve ksilem yoluyla hava kısımlarına doğru taşınmasının engellenmesi ile ilgilidir [6].

1.3. Asma (Vitis)'nın Tarihçesi

Bağcılık tarımının tarihçesi her yeni arkeolojik bulguyla daha eski tarihlere uzanmaktadır. Sofralık tüketiminin yanı sıra şarap ve şıra olarak da kullanılmıştır.

İnsanlık tarihinde önemli bir tür olan asmanın değişerek gelişen yetiştiricilik anlayışı ve tüketici talepleri doğrultusunda üretimi incelenmeye değerdir [7].

Mezolitik Çağ'dan Demir Çağı'na kadar düzenli olarak bulunan üzüm kalıntıları, insan topluluklarının özellikle Akdeniz'de yabani bitki ve meyveleri yetiştirdikleri düşüncesini ortaya koymaktadır. Bölgede Vitis kalıntıları, Demir Çağı boyunca, yaklaşık MÖ 500'den itibaren önemli ölçüde daha sık ve çok sayıda bulunur olmuş ve bu da bağcılığın hızlı ve güçlü bir şekilde yerleştiğini göstermektedir. Bağ kalıntıları, bağcılığın Akdeniz bölgesi dışına yayılmasının esas olarak Roma döneminde gerçekleştiğini doğrulamaktadır [8].

1.4. Asma (Vitis)'nın Önemi ve Coğrafi Yayılışı

Asma ailesi 16 cins ve 950 alttürden oluşmaktadır. Ekonomik açıdan en önemli meyve veren üzüm türü *Vitis vinifera* L. ile tanınır. Asma ailesinin büyük ve derin filogenetik ilişkileri ile karakter evrimi son yıllarda araştırmacıların yoğun ilgisini çekmektedir [9].

Asma bitkisi taksonu Avrupa ve Yakın Doğu'ya özgüdür ve bugün yaklaşık olarak 10.000 adet kültüre alınmış asma çeşidinin yabani atası olduğu düşünülmektedir [10].

Yabani üzüm türleri, çoğunlukla kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde bulunan ve Vitis cinsini içeren odunsu tırmanıcılardır [11].

1.5. Asma (Vitis)'in Türkiye ve Anadolu için Önemi

Asmanın gen merkezlerinin kesiştiği ve ilk kez kültüre alındığı coğrafyanın merkezinde olan ülkemiz, bağcılığa uygun iklime sahip olmasıyla dünyanın önemli üzüm üreticisi ülkeleri içerisinde yer almaktadır [12].

İlk bağcılık faaliyetlerinin başladığı bölge olarak kabul edilen Kuzey Doğu Anadolu ve Gürcistan havzası, M.Ö. 8000 'den bugüne kadar bağcılığın aktif olarak sürdürüldüğü bir üretim merkezidir. Bu bölgelerde yapılan arkeolojik kazılar ve üzüm çeşitlerinin genetik haritalamaları da bu durumu doğrulamaktadır. Tarihsel süreç içerisinde asma yetiştiriciliğinin coğrafi yayılışının da bu bölgeden başladığı, kabul edilmektedir [13].

Dünyanın en ideal iklim kuşağı üzerinde yer alan ülkemiz; asmanın gen merkezi ve ilk kez kültüre alındığı coğrafyanın merkezi konumundadır. Bu bakımdan

“Küçük Asya” olarak ifade edilen Türkiye, çok eski ve köklü bir bağcılık kültürü ile zengin bir asma gen potansiyeline sahiptir [14].

Asma bitkisinin yetişmesi için, en elverişli iklim kuşağı olarak Türkiye’nin de yer aldığı dünyanın 34°- 49° kuzey ve güney enlemleri arasında yer alan bölgedir [15].

Türkiye dünyada çok önemli tarımsal ürünlerden birisi olan üzümün (*Vitis* spp.) anavatanıdır. Yurdumuz doğal olarak bağcılık için elverişli iklim koşullarına ve dünya bağcılığı içerisinde çok önemli bir yere sahiptir [16].

Türkiye’nin %57,86’lık bölümü iklim ve topoğrafya açısından üzüm yetiştirmeye uygun olarak değerlendirilirken, %40,46’lık bölümü ise üzüm yetiştirmeye uygun olmayan alanlar olarak değerlendirmiştir. Dünya üzüm alan ve üretiminde önemli bir yere sahip olan ülkemizde yıllık değişim göstermekle birlikte 2019 yılı toplam bağ alanı 4.054.387 dekadır [17].

1.5.1. Ülkemizde Kullanılmakta Olan Başlıca Amerikan Asma Anaçları ve *Vitis riparia*’ın Önemi

Nehir kıyısı üzümü olarak bilinen *Vitis riparia* nehir kıyılarında ve diğer birçok alanda yetişir. Hemen hemen tüysüz, parlak yeşil, yapraklarının iri dişli kenarlara sahip olması bu türü diğer asma türlerinden ayırır. Bu türün üzüm daneleri olgunlaştığında bile ekşidir. Ancak kuş ve diğer canlılar için ise yiyecek kaynağıdır [18].

Yurdumuzda kullanılan Amerikan asma anaçlarının birçoğu (Rup. du Lot, 420A, 5BB, SO4, 8B, 110R, 1103P, 140 Ru, 41 B, Ramsey) kendi kökleri üzerine aşısız olarak veya Sultani çekirdeksiz (*Vitis vinifera* L.) çeşidi ile aşılınmaları sonucunda aşılı olarak yetiştirilen bitkilerdir.

Aşılı bitkiler kendi aralarında fidan randımanı açısından karşılaştırıldığında; Vv/ Rupestris du Lot (%54), Vv/5BB (%54) kombinasyonu önem arz ederken; aşısız bitkilerde fidan randımanı *Vitis vinifera*: Vv çeşidi (%84) ve 5BB (%82) anacı; yaş ve kuru kök ağırlığı bakımından ise aşısız bitkilerde 140 Ru (2.8-1.6 g), 5BB (1.8-1.6 g) anaçları ön plana çıkmaktadır [19].

Vitis riparia, *Vitis rupestris* ve *Vitis berlandieri* türleri kullanılarak *Vitis vinifera* arasında türler arası melezlemeler oluşturularak daha iyi köklenen, aşı tutma ve uyuşması daha iyi melezler oluşturularak kullanılmaktadır [20].

Bağlarda anaç kullanımının ana nedenlerden biri de köklerde yara oluşturan filoksera zararlısına karşı asmalarda dayanıklılığı arttırmak içindir. Ülkemizde bu sorun için kullanılmakta olan *Vitis riparia* anacının yer almış olduğu 5BB olarak ta bilinen (*V.berlandieri* × *V.riparia*) melez asma anacıdır [21].

1.5.2. Ülkemizde Tarımı Yapılmakta Olan Üzüm Asması *Vitis vinifera*'nın Önemi

Vavilov'un bitki gen merkezlerinin dünya üzerinde belirtmiş olduğu sekiz gen merkezinden ikisi (Yakın Doğu ve Akdeniz) ülkemiz toprakları üzerinde bulunmaktadır. Ülkemiz yabani asma (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) ve kültür asması (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*) için zengin bir asma gen çeşitliliğine sahiptir [22].

Vitis vinifera L., Vitis cinsine ait Batı Asya ve Güney Avrupa'da iyi tanınan bir üzüm türüdür. Asmanın tohumları ve yaprakları bitkisel tedavide kullanılırken, meyveleri ilaç ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Üzüm yetiştiriciliğinden elde edilen ürünlerin % 50-75'i şarap üretiminde kullanılmaktadır. Bunu sırası ile taze meyve olarak tüketim, kurutulmuş meyve olarak tüketim, meyve suyu olarak tüketim takip etmektedir [23].

1.6. Bitkilerde Stres

Bitkiler çoğunlukla farklı stres faktörleri ile karşı karşıya kalırlar. Yüksek veya düşük sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, seller, ağır metaller gibi abiyotik stres faktörleri ile ve biyotik stres faktörleri olarak da; mantar, bakteri, virüs gibi hastalık etmenlerinden kaynaklanan enfeksiyonlar her yıl bitkilerde önemli zararlar meydana getirmektedirler [24].

Bitkiler, bitki besin element eksikliği, ışık yoğunluğu, pestisitlere yoğun miktarda maruz kalma ve aşırı sıcaklık gibi farklı abiyotik stres türleri ile karşılaşılırlar. Bu stres türleri dünya çapında üretimi ve gıda güvenliğini önemli ölçüde sınırlayabilmektedir. Abiyotik stres türleri, klorofil sentezini, elektron taşıma mekanizmalarını ve bitkilerde, bitki ile dış ortamdaki gaz transfer değerlerini olumsuz etkileyerek bitkilerin fotosentez aktivitelerinin bozulmasına neden olmaktadır [25].

Bitkiler, stres faktörlerinden korunmak veyaolumsuz etkilerini azaltmak için birçok farklı moleküler düzeyde savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar ise (a) makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, (b) koruyucu moleküllerin sentezi, (c) reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve detoksifikasyon olmak üzere üç ayrı sınıfa ayrılmaktadır. Makromoleküllerin homeostasisi bitkilerin su kaybına

karşı oluşturduğu temel yanıt mekanizmalarından biri olarak kabul edilebilir. İyon homeostasisi, su transferi ve iyon dengesinin ve taşıma sistemlerinin kontrolü ile sağlanmaktadır. Stres koşullarına karşı verilen moleküler düzeydeki cevaplardan bir diğeri; düşük moleküler ağırlıklı çözünen maddeler veya ozmolitler (şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler), ısı şoku proteinleri (Heat-Shock Proteins, HSPs) ve geç embriyogenez bağımlı proteinler (Late Embryogenesis Abundants; LEAs) gibi koruyucu moleküllerin üretilmesine dayanmaktadır. Isı şoku proteinleri, hasarlı ve/veya yanlış çoğaltılmış proteinlerin hücreden uzaklaştırılması başta olmak üzere birçok önemli olayda rol almakta ve farklı stres koşullarını tolere etmek için üretilen moleküler şaperonlardır. Stresin olumsuz etkilerine karşı verilen bir diğerk moleküler yanıt türü ise strese maruz kalmış bitkidesentezi ve detoksifikasyonundan sorumlu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların meydana gelmesidir [26, 27].

1.6.1. Bitkilerde Tuz Stresi ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Dünyada tarımı yapılabilir alanlar, karşılaştıkları stres faktörlerine göre incelendiğinde %26 oranında kuraklık, %20 oranında mineral madde stresi %15 lik alanda ise soğuk ve don zararı stresinin etkili olduğu bilgisi ortaya çıkmaktadır. Diğerk stres faktörleri oranının ise %29 oranında olduğu ve geriye kalan %10 oranında alanda ise hiçbir stres faktörü ile karşılaşmadığı belirtilmiştir [28].

Tanım olarak stres, olumsuz çevre koşullarının sebep olduğu canlıların biyolojik faaliyetlerinde meydana gelen düzen bozukluğu sebebi ile gelişen fizyolojik ve biyokimyasal şekilde ortaya çıkan bir tepkidir. Canlıların yaşamsal faaliyetlerini tehdit eden her bir faktör stres kaynağı olarak tanımlanır. Bitkilerde tuzluluk gelişimi engelleyici ve sırlayıcı bir faktör olarak büyümeyi olumsuz etkiler [29].

Dünya genelinde tarım yapılan topraklarda tuzluluk sorunu büyük bir sorun oluşturmaktadır. Dünyaki tarım yapılan alanların %23'ü tuzlu, %37'si ise alkali düzeydedir. Türkiye'de sulu tarım yapılmakta olan 1,5 milyon hektar alanın 2,8 milyar hektar alanında tuzluluk ile alkalilik problemi yaşanmaktadır. Bitkilerdeki en önemli abiyotik stres türü tuzluluk stresidir. Topraktaki yüksek tuz seviyesi bitkilerde fotosentezle ilgili olan pigment miktarını ve fotosentezin mekanizmasını azaltarak bitkilerde büyüme hızını yavaşlatmaktadır [30, 31].

Tuz stresi bitkilerde yer yer nekrotik lekelerin oluşmasına, hormonal dengesizliğe, stoma faaliyetlerinin sekteye uğraması sebebi ile su kaybı yaşamasına

neden olmaktadır. Tuzlu topraklarda az seviyedeki su seviyesi nedeni ile fizyolojik kuraklık ve düşük turgor basıncına bağlı olarak bitki hücrelerinde iyon konsantrasyonu da artmaktadır [32].

Bitkilerde fazla tuz oranına bağlı olarak ortaya çıkan osmotik basıncın artması, bitkilerin hayatta kalmak için kullandığı enerjide artışa sebep olur. Kullanılan fazla enerji solunumun artmasına, ancak bitki büyümesinin ise azalmasına neden olur [33]. Genel olarak tuz stresine maruz kalan bitkilerde turgor kaybı, stomaların dengesiz çalışması ve fotosentez hızında azalma buna bağlı olarak besin dengesizliğinin oluşması, bitkilerde yeşil aksam alanında azalma ve bitki büyüme ve gelişmesinde yavaşlama en yaygın belirtilerdir [34].

Kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklık değişimleri, element toksisiteleri ile eksiklikleri ve oksidatif stresler gibi abiyotik stresler her yıl dünya çapında ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır.

Dünyada toplam 14 milyar hektarlık arazinin yaklaşık 1 milyar hektarı doğal tuzlu topraklardır. Ayrıca, dünya çapında toplam ekili alanların yaklaşık %20'sinin ve sulanan tarım alanlarının %33'ünün yüksek tuzluluktan etkilendiği tahmin edilmektedir. Tuzlu alanlar düşük yağış, yüksek yüzey buharlaşması, yerel kayaların aşınması, tuzlu suyla sulama ve kötü kültürel uygulamalar dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle yılda %10 oranında artmaktadır ve 2050 yılına kadar ekilebilir arazinin %50'sinden fazlasının tuzlanacağı tahmin edilmektedir. Mevcut doğal kaynaklarla, özellikle çeşitli çevresel faktörler ve kentsel genişleme nedeniyle ek araziler tarım için kullanılamaz hale geldiğinde, artan dünya nüfusunun gıda taleplerini karşılamak gelecekte daha da zorlaşacaktır [34, 35].

Gen ekspresyonunun regülasyonu (gen ifadesinin düzenlenmesi), bitkilerin tuz stresine yanıt verdiği ve uyum sağlamaya çalıştığı temel olgulardan biridir. Tuz stresi altında hücre homeostazını ve normal işleyişi yeniden sağlamak için, aktive edilmiş transkripsiyon faktörleri, stres yanıtı ve toleransına katkıda bulunan proteinleri kodlayan genlerin ifadesini veya tuz stresi altında hücrelerin korunmasına ve onarılmasına yol açan yollarda yer alan enzimlerin aktivitesini düzenlemektedir. Moleküler biyoloji ve bilgisayar teknolojilerindeki gelişmeler, biyoinformatik, genetik haritalama ve kantitatif özellik lokusları (QTL'ler) analizi ve transgenik teknolojiler gibi yeni araştırma ve geliştirme araçlarını tarımda kullanılabilir hale getirmiştir. Bitki

tus stresi yanıtı ve bitkinin toleransının geliştirilmesinde genetik, fizyolojik ve biyokimyasal temellerinin daha iyi anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuş ve yeni bitkilerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır [35, 36].

1.7. Pektin

1.7.1. Pektin ve Pektin Metilesteraz Enziminin (PME) Bitkilerdeki Rolü

Pektin, bitkilerin hücre duvarlarında bulunan işlev ve yapı bakımından çok farklı özelliklere sahip bir polisakkarittir. Bitkilerde gelişme, büyüme, morfoloji ve savunma gibi işleve sahiptir [37].

Pektin bitkilerde birincil derecede öneme sahip en önemli bileşenlerdendir. Hücre gelişimi devam ederken pektin, hücre duvarına farklı özellikler vermek için pektin metilesteraz enzimleri tarafından değişikliğe maruz bırakılır. Pektin, ayrıca yüksek bitkilerde bulunan yapısal bir karbonhidrattır. Birincil hücre duvarında yer alır ve orta lamelin temel bileşenini oluşturur [37].

1.7.2. Homogalakturnan (HG)'nin Demetilesterifikasyonunu ve Yapısı Üzerindeki Etkileri

Homogalakturnan (HG), hücre duvarında yer alan yüksek oranda metil esterlenir. PME'ler, Homogalakturnanı blok olarak demetilesterifiye edebilir ve bu da metilester grupları olmadan birkaç ardışık GalA kalıntısına yol açar. HG omurgaları negatif yüklüdür ve bu nedenle kalsiyum iyonları gibi katyonlar ile birlikte çapraz bağlar oluşturarak jel oluşumunu meydana getiren ve 'yumurta kutusu' ismi ile tabir edilen yapıların oluşumunu sağlar. Bununla birlikte, PME'ler, rastgele bir metilesterifikasyon oluşumuna da yol açarak tek GalA kalıntılarını demetilesterifikasyonunu sağlar. Düşük metilesterlenmiş HG, poligalakturnazlar (PG) ve pektin/pektat liyazlar (PL) gibi pektin parçalayıcı enzimler tarafından da depolimerize (monomerlerine ayırma) tabi tutulabilir ve bu etkileşim ile birlikte oligogalakturnitlerin (OG) oluşumuna neden olur. PME aktivitesi aynı zamanda protein yapısındaki inhibitörü olan PMEİ tarafından inhibe edilir [37, 38].

1.7.3. Pektin Metil Esterazlar

Bakteriler, mantarlar ve bitkilerde pektin metilesterazlar, bitki hücre duvarlarının ana bileşenleri olan pektinlerin metilesterifikasyon derecesini değiştiren her yerde bulunan enzimlerdir. Pektin yapısındaki bu tür değişiklikler, hücre

duvarının hücresel yapışma , plastisite, pH ve iyonik içeriklerindeki değişikliklerle ilişkilidir ve bitki gelişimini ve stres tepkilerini etkiler. Bitkilerde bitki-hastalık etmenleri etkileşimlerinin yanı sıra odun dokusu ve polen oluşumu da dahil olmak üzere vejetatif ve üreme biyolojik aktivitelerinde görev alırlar [39].

Pektin metilesteraz (PME), bitki hücre duvarının önemli bir bileşeni olan pektin üzerinde etkili olan ilk enzimdir. PME eylemi, bitki fizyolojisinde önemli bir role sahip olan farklı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip pektin üretir. Bitki PME aktivitesinin düzenlenmesi, çeşitli izoformların farklı dokularda ve gelişim evrelerinde diferansiyel ekspresyonu ve hücre duvarı yerel pH'sının ince modifikasyonları ile elde edilir [40].

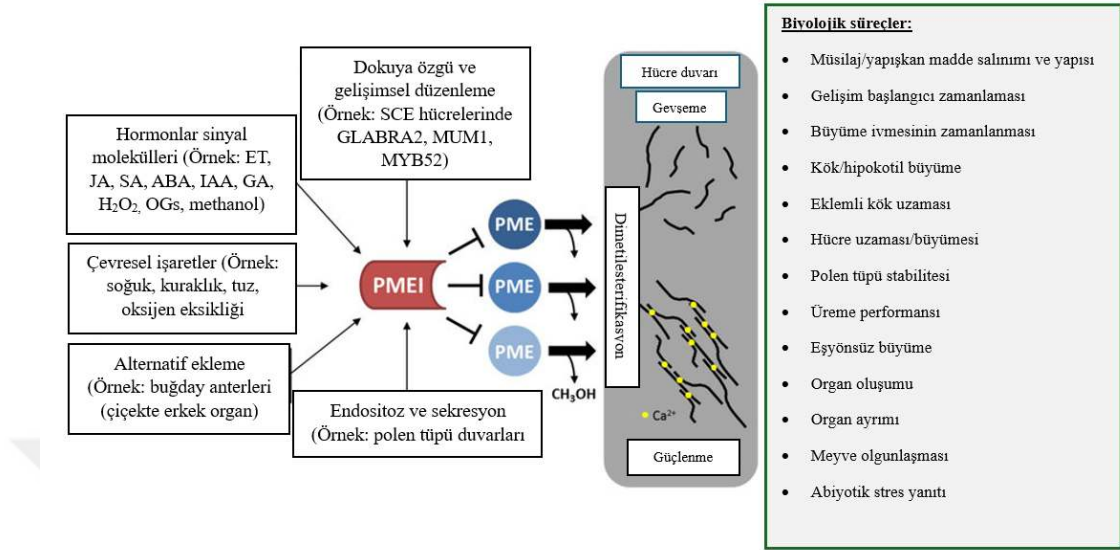
1.7.4. Pektin Metilesteraz İnhibitörü (PMEI)

Pektin metilesteraz inhibitörleri (PMEI'ler), pektin metilesterazın (PME) aktivitesini engelleyerek pektin metilesterifikasyon durumunu düzenler. Son bilimsel çalışmalar, PMEI'lerin bitki hücre duvarı özelliklerini ve savunma mekanizmasının tepkilerini düzenlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir [41]. *Arabidopsis*'te ve diğer bitkilerde PMEI genleri ile yapılan araştırmalar, bu inhibitörün her yerde bulunduğunu, bitki PME'sine yönelik bu özellik ile ilgili inhibitörün bitkilerde fizyolojik bir rolü olduğunu düşündürmektedir [42].

PMEI'ler, dokuya özgü ve gelişime bağlı bir şekilde transkripsiyonel olarak düzenlenir. Birçok farklı bitki hormonları ve bazı sinyal moleküllerinin ile birlikte çevresel stres koşulları da PMEI gen ekspresyonunu başlatabilir. Alternatif ekleme ve yönlendirilmiş endositoz ve sekresyon, hücre duvarında faal olan PMEI'lerin seviyesini düzenler. PMEI birkaç PME enzimini inhibe ederek HG'nin demetilesterifikasyonunu düzenler. Böylece çeşitli biyolojik aktiviteler için bitkilerde gerekli olan gevşemenin sağlanması veya mukavemet kazanma gibi hücre duvarı özelliklerini değiştirerek organize ederler [40].

PMEI'ler, dokuya özel ve doku gelişimine bağlı olarak transkripsiyonel olarak düzenlenir. Farklı bitki hormonları ve sinyal molekülleri ile birlikte çevresel stres faktörleri de PMEI gen ifadesini/ekspresyonunu harekete geçirebilmektedir. Alternatif ekleme ve yönlendirilmiş hücreye alınacak sıvı yada katı maddeler (endositoz) ve hücre salgı (sekresyon) maddeleri, hücre duvarındaki aktif PMEI'lerin seviyesini

düzenlemesinde etkili olmaktadır. Şekil 1’de PMEİ’lerin bitki hücresindeki rolü grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 1. PMEİ’lerin bitki hücresindeki rolü [40]

Biyolojik süreçler içersinde PMEİ’lerin müsilaj salınımı ve yapısı, gelişim başlangıcı zamanlaması, büyüme ivmesinin zamanlanması, kök/hipokotil büyüme, hücre uzaması/büyümesi, polen tüpü stabilitesi, üreme performansı, eş yönsüz büyüme, organ oluşumu, organ ayrımı, meyve olgunlaşması, abiyotik stres tepkisi gibi bir çok olayda rolü olduğu düşünülmektedir [40].

Bitkilerin hücre duvarları büyüme, gelişme ve stres faktörlerine yanıt olarak önemli rollere sahip olan farklı yapılara sahiptir. Pektin, galakturonik asit (GalA) yönünden zengin olan hücre duvarlarının temel polisakkaritidir. Homogalakturonan (HG), bitki hücre duvarlarında en bol bulunan pektin polimeri olarak kabul edilir. Metilasyon derecesinin hücre duvarının biyomekanik özelliklerini, pektini enzimatik depolimerizasyona duyarlı hale getirerek ve jel oluşumunu sağlayarak etkilediği gösterilmiştir. Pektin metilesterazlar (PME’ler), HG omurgasından metil gruplarının uzaklaştırılmasını katalize eder ve aktiviteleri, pektin metilesteraz inhibitörleri (PMEİ) protein inhibitör ailesi tarafından organize edilir. Bu sebeple, PME ve PMEİ arasındaki etkileşim, hücre yapışması, hücre duvarı gözenekliliği ve elastikiyetinin belirleyicisi ve aynı zamanda hücre duvarında oluşacak olası bir stres durumu düzenlemek üzere sinyal moleküllerinin oluşturulmasında görev alan bir kaynak olarak çalışır [40, 41, 42].

Protein-protein etkileşimlerini incelemek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Etkileşimlerin tespitinde *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* olarak adlandırılan 3 temel yaklaşım bulunmaktadır. *In vitro* ve *in vivo* yöntemlerin maliyet, zaman gibi sınırlamaları bulunur. *In silico* yöntemler deneysel yönlendirme ile maliyet ve zaman kazancı için geliştirilmiştir. Protein etkileşim tespit yöntemlerindeki gelişmeler hastalıkların tespit edilmesi, model organizmalara ait yolların ve protein komplekslerinin belirlenmesi gibi birçok alana doğrudan etki etmektedir. *In-silico* İngilizce kelime anlamı olarak "silikonda" demektir. Bilgisayar çiplerinde silikonun toplu halde kullanımına göndermede bulunur. Biyolojik deneylere de atıfta bulunarak "bilgisayar kullanılarak bilgisayar simülasyonu yoluyla gerçekleştirilen" çalışmaları ifade eden bir tanımdır. Yapılan çalışmaların sonrasında tespit edilen etkileşimler veri tabanlarına aktararak saklanmakta ve sonrasında ücretsiz olarak erişilebilmektedir [43, 44].

Bu çalışmada *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* türlerinde PMEİ genlerinin biyoinformatik yöntemlerle *in silico* analizleri gerçekleştirilmiş ve tuz stresine maruz kalmış bitkilerin gen dizileri NCBI veritabanından aktararak, *in-silico* PCR yöntemi gen ekspresyonunun düzeyinin tespitinde denenmiştir.

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Asma Genomunda PMEİ Genlerinin Tanımlanması

Asma genomuna ait gen dizileri National Center for Biotechnology Information Database'den (NCBI) alınan diziler, CLC Workbench 21 programına yüklenerek dizi benzerlikleri BLASTP ile karşılaştırılmıştır [45, 46]. Beklenti değeri $\geq e-60$ olan ve $\geq 60\%$ benzerlik gösteren sorgu eşleşmeleri anlamlı eşleşme olarak kabul edilmiştir. Pfam veri tabanı aracılığı ile PMEİ proteinleri tanımlanmış ve CLC Workbench 21 platformu aracılığıyla asma genomunda bulunan proteinlerle karşılaştırılmıştır [47]. Tekrarlayan diziler elenmiş ve PMEİ genlerinin kodladığı proteinler tahminlenmiştir.

2.2. Kromozomal Yerleşimi, Hizalama ve Filogenetik Analizi

PMEİ genlerinin kromozomal yerleşimleri NCBI'da bulunan asma genomu kromozom dağılımı dosyaları aracılığı ile yapılmış, genlerin kromozomal dağılımı belirlendikten sonra konumlarına göre isimlendirilmiş ve MapChart yazılımı programı ile görselleştirilmiştir [48].

Asmada tespit edilen olası PMEİ protein ailesi dizileri MEGA 11 programında ClustalW algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Maksimum benzerlik algoritması temel alınarak gen dizilerine ait filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur [49]. Her iki türün genlerine ait ortak filogenetik ağaç ise iTOL çevrimiçi aracı kullanılarak görselleştirilmiştir [50].

2.3. Hücre Altı Lokalizasyon, Gen Yapısı ve Korunmuş Motif Belirlenmesi

PMEİ proteinlerinin hücrealtı (subcellular) yerleşimlerinin tahminlenmesinde CELLO v.2.5 programından yararlanılmıştır [51, 52]. Kodlama yapan gen dizileri ile gen yapıları, gen organizasyonunu ve ekzon-intron bölgeleri Gene Structure Display Server aracılığı ile belirlenmiştir [53].

PMEİ proteinlerinin korunmuş motif analizi, maksimum motif sayısı = 20; bölge dağılımları = herhangi bir sayıda tekrar; motif genişliği = 6-50 parametreleri kullanılarak Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) Suite çevrimiçi aracı, aracılığı ile tahminlenmiştir [54].

2.4. PMEİ Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi

PMEİ proteinlerinin olası üç boyutlu yapılarını belirlemek için Protein Veri Bankası'nda BLASTP araması yapılmıştır. PMEİ proteinlerinin tahmini 3D formları Phyre2 veritabanı (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) aracılığı ile yapılmıştır [55, 56].

2.5. PMEİ Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Bulunması

PMEİ proteinlerine ait peptit dizileri psRNAtarget çevrimiçi aracına yüklenmiş, bir kez model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'ya ait kayıtlı 427 miRNA ve bir kez de *Vitis vinifera* türü için kayıtlı olan 186 miRNA dizileri *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'ya ait peptit dizileri ile karşılaştırılmış ve aday hedef genler bulunmuştur. Gen hedefleyen olası miRNA'lar daha sonra miRBase veritabanında taranarak gen regülasyonu ve ekspresyonundaki görevleri saptanmıştır [57, 58].

2.6. PMEİ Genlerinin Tuz Stresi Altında Ekspresyonlarının *in-silico* Belirlenmesi

FastPCR programı gen ekspresyonunun bilgisayar ortamında simüle edilmesi için kullanılmıştır [59]. NCBI veritabanında bulunan SRA (Sekans Read Archive) dosyaları indirilmiştir. Nevada Reno Üniversitesinin yaptığı bir çalışmaya ait *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* 1. Hafta, kök ve yapraklara ait dizi okumaları *in-silico* PCR için kullanılmıştır [45]. Daha önce şeftalide yapılmış bir çalışmaya ait PME/PMEİ primerleri ile Aktin geni primerinden ise gen ekspresyon düzeylerinin değişimini araştırmak üzere *in-silico* Real-Time PCR analizinde yararlanılmıştır [60].

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

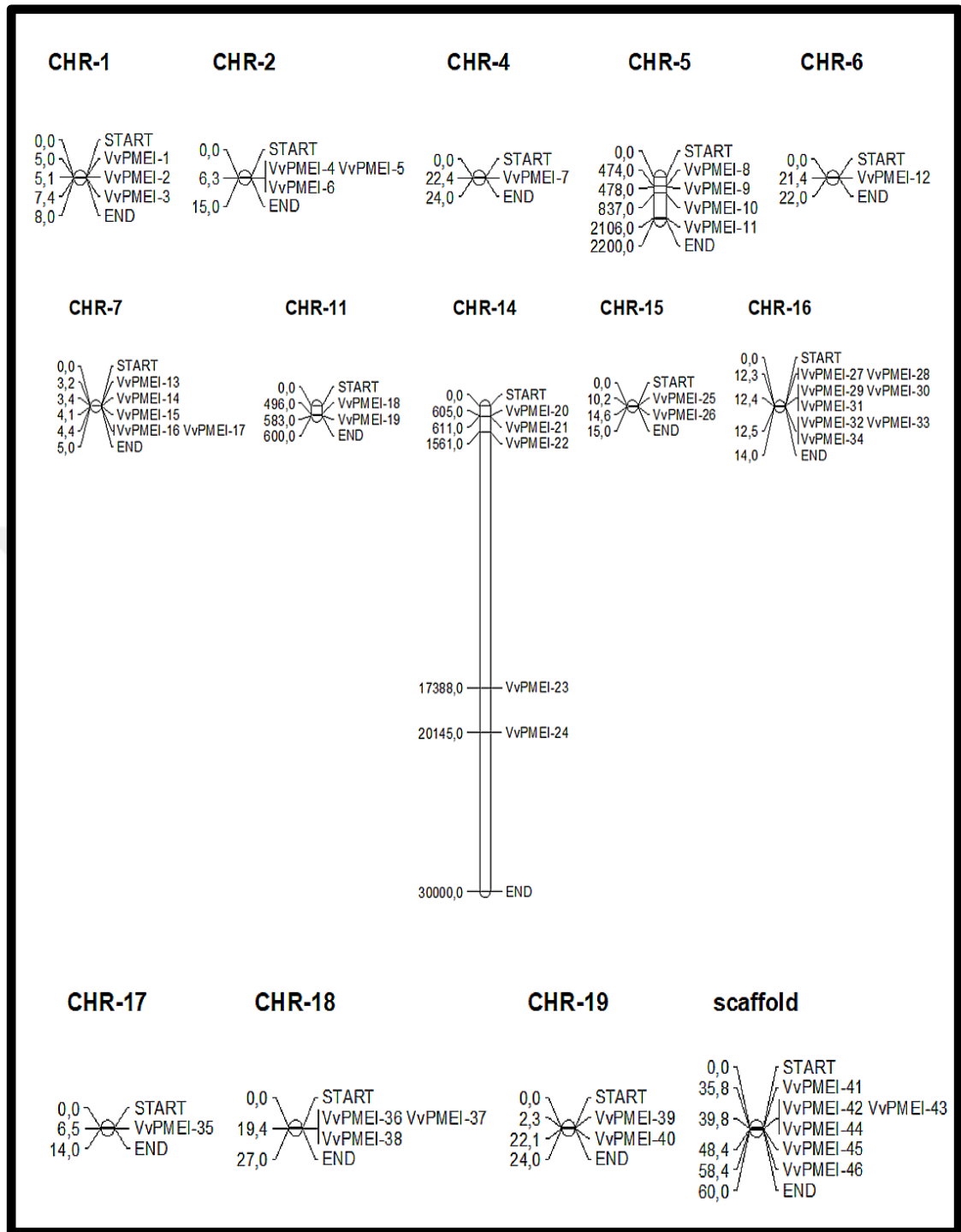
3.1. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da PMEİ Genlerinin Tanımlanması ve Kromozomal Dağılımları

Vitis vinifera türünde PMEİ genleri *VvPMEİ* olarak adlandırılmış ve bu türde 46 tane PMEİ geni tahminlenmiştir. Bu genlere ait kromozom yerleşimleri ile ürünü olan proteinlerin isoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, kararlılık indeksleri gibi parametreler Tablo 1'de verilmiştir.

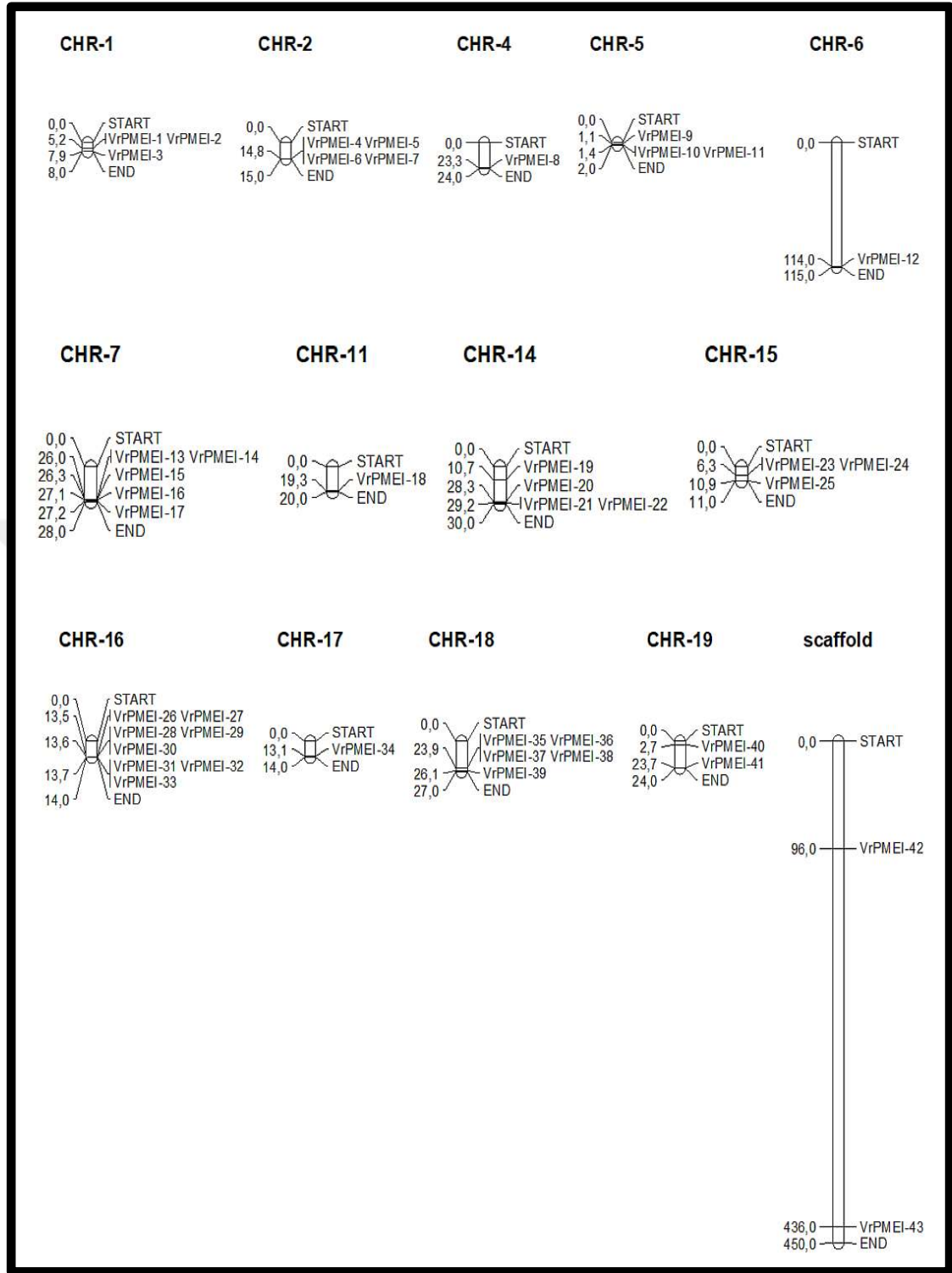
VvPMEİ genlerinin kromozomlar üzerindeki dağılımları incelendiğinde, en fazla PMEİ geninin 8 adet ile 16. kromozomda olduğu, bunu takiben 5'er adet ile 7. ve 14. Kromozomda görüldüğü belirlenmiştir. Kromozom 3, 8, 9, 10, 12 ve 13'de ise PMEİ genlerinin bulunmadığı görülmüştür. En az gen ise kromozom 4, 6, ve 17 (1 adet) bulunmuştur. *VvPMEİ 41-46* genlerinin yerleşimlerinin ise Scaffold olduğu saptanmıştır. *VvPMEİ* genlerinin *Vitis vinifera*'da kromozomlar üzerinde dağılımları Şekil 2'de verilmiştir.

Vitis riparia'da PMEİ genleri *VrPMEİ* olarak adlandırılmış ve bu türde 46 tane PMEİ geni tahminlenmiştir. Bu genlere ait kromozom yerleşimleri ile ürünü olan proteinlerin isoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, kararlılık indeksleri gibi parametreler Tablo 2 'de verilmiştir.

VrPMEİ genlerinin kromozomlar üzerindeki dağılımları incelendiğinde, en fazla PMEİ geninin 6 adet ile 16. kromozomda olduğu, daha sonra 6. ve 18. Kromozomlarda 5 adet *VrPMEİ* genlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Kromozom 3, 8, 9, 10, 12 ve 13'de ise *Vitis vinifera* türünde olduğu gibi PMEİ genlerinin bulunmadığı saptanmıştır. En az sayıda *VrPMEİ* geni ise kromozom 4, 6, 11 ve 17'de (1 adet) bulunmuştur. *VrPMEİ-42* ve *VrPMEİ-43* genlerinin yerleşimlerinin Scaffold olduğu gözlenmiştir. *VrPMEİ* genlerinin *Vitis riparia*'da kromozomlar üzerinde dağılımları Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 2. VvPMEI genlerinin *Vitis vinifera* türünde kromozomlar üzerinde dağılımları



Şekil 3. VrPMEI genlerinin *Vitis riparia*'da kromozomlar üzerinde dağılımları

Aminoasit sayısı cinsinden protein uzunluklarında en kısa proteinin 149 aminoasit ile *VvPMEI-11* genine ait olduğu, en uzun proteinin ise 358 aminoasit uzunluğunda ve 18 geninin ürünü olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak; en ağır protein 18'de (39.384 kDa), moleküler ağırlığı en düşük protein ise *VvPMEI-11*'de (16.29 kDa) bulunmuştur. pI değerlerine göre en düşük değer 4.22 ile 11'de, en yüksek değer ise 9.81 ile *VvPMEI-41*'de görülmüştür. Toplam 46 genin 29 tanesinin kararlı ve 17 tanesinin ise kararsız olduğu belirlenmiştir. Kararlılık indeksine göre en düşük kararlılık indeksi 15.86 ile 30'da, en yüksek kararlılık indeksi ise 63.17 değeri ile *VvPMEI-10*'da bulunmuştur.

Protein uzunlukları karşılaştırıldığında en kısa proteinin 154 amino asit ile *VrPMEI-28* olduğu, en uzun proteinin ise 274 aminoasit ile *VrPMEI-9* olduğu bulunmuştur. Protein uzunluğuna bağlı olarak en ağır protein 28.838 kDa ile *VrPMEI-9*, moleküler ağırlığı en düşük proteinin ise 16.713 kDa ile *VrPMEI-28* olduğu saptanmıştır. *VrPMEI* üyeleri için pI değerlerinin 4.44 ile 9.81 geniş bir aralıkta değiştiği, en düşük pI değerinin *VrPMEI-21*, en yüksek pI değerinin *VrPMEI-7*'de olduğu bulunmuştur. Kararlılık indeksi bakımından en düşük (*VrPMEI-11*) ve en yüksek değerler (*VrPMEI-9*) 16.95 ile 61.45 arasında değişmiştir. Toplam 43 adet *VrPMEI* üyesinin 14 tanesi kararsız, 29 tanesiye kararlı olarak belirlenmiştir.

Vitis vinifera ve *Vitis riparia* türünde gen ve protein parametrelerine ait bulunan değerler Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. *VvPMEI (1-46)* genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler

Gen No	Kromozom No	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/ Kararsız
<i>VvPMEI-1</i>	1	5,025,733	5,026,383	216	6.41	23137.18	29.74	Kararlı
<i>VvPMEI-2</i>	1	5,061,435	5,062,058	207	7.64	22406.32	28.12	Kararlı
<i>VvPMEI-3</i>	1	7,416,174	7,416,710	178	4.76	18681.18	29.92	Kararlı
<i>VvPMEI-4</i>	2	6,337,819	6,338,473	154	4.90	17326.85	44.01	Kararsız
<i>VvPMEI-5</i>	2	6,337,819	6,338,534	162	4.82	18173.70	47.09	Kararsız
<i>VvPMEI-6</i>	2	6,342,467	6,343,129	220	8.55	24650.71	39.20	Kararlı
<i>VvPMEI-7</i>	4	22,447,731	22,448,279	182	5.53	20099.20	43.39	Kararsız
<i>VvPMEI-8</i>	5	474.053	474.586	178	7.00	19686.05	18.24	Kararlı
<i>VvPMEI-9</i>	5	478.539	479.048	169	8.67	18182.93	35.36	Kararlı
<i>VvPMEI-10</i>	5	837.761	838.597	278	4.95	29248.67	63.17	Kararsız
<i>VvPMEI-11</i>	5	2,106,947	2,107,396	149	4.22	16290.17	24.22	Kararlı
<i>VvPMEI-12</i>	6	21,403,977	21,404,525	182	5.58	20530.61	43.01	Kararsız
<i>VvPMEI-13</i>	7	3,194,163	3,194,753	196	9.60	21229.42	38.23	Kararlı
<i>VvPMEI-14</i>	7	3,353,617	3,354,162	181	4.63	20136.85	36.48	Kararlı
<i>VvPMEI-15</i>	7	4,071,642	4,072,286	214	5.11	22840.02	52.02	Kararsız
<i>VvPMEI-16</i>	7	4,427,819	4,428,364	181	5.91	19817.79	35.75	Kararlı
<i>VvPMEI-17</i>	7	4,434,639	4,435,196	185	5.02	20335.29	44.24	Kararsız
<i>VvPMEI-18</i>	11	496.054	497.13	358	5.43	39384.26	35.80	Kararlı
<i>VvPMEI-19</i>	11	583.508	584.077	189	8.94	20529.43	32.92	Kararlı
<i>VvPMEI-20</i>	14	605.891	606.391	166	5.93	18582.20	46.71	Kararsız

Tablo 1. *VvPMEI (1-46)* genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler (devam)

Gen No	Kromozom No	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/ Kararsız
<i>VvPMEI-21</i>	14	611,934	612,47	178	4.36	19443.06	27.68	Kararlı
<i>VvPMEI-22</i>	14	1,561,321	1,561,902	193	4.70	21346.15	36.55	Kararlı
<i>VvPMEI-23</i>	14	17,388,874	17,389,419	181	4.86	19421.15	39.65	Kararlı
<i>VvPMEI-24</i>	14	20,145,443	20,146,033	196	6.41	21097.30	47.80	Kararsız
<i>VvPMEI-25</i>	15	10,194,238	10,194,786	182	7.49	20176.09	32.96	Kararlı
<i>VvPMEI-26</i>	15	14,559,108	14,559,734	208	9.60	22946.30	38.36	Kararlı
<i>VvPMEI-27</i>	16	12,323,891	12,324,499	202	6.28	21756.76	29.53	Kararlı
<i>VvPMEI-28</i>	16	12,343,547	12,344,155	202	6.28	21756.76	29.53	Kararlı
<i>VvPMEI-29</i>	16	12,359,487	12,360,092	201	6.58	21428.40	27.70	Kararlı
<i>VvPMEI-30</i>	16	12,380,477	12,381,079	200	8.38	21645.74	15.86	Kararlı
<i>VvPMEI-31</i>	16	12,414,423	12,415,025	200	6.19	21544.51	29.36	Kararlı
<i>VvPMEI-32</i>	16	12,473,100	12,473,738	212	5.89	22909.33	43.36	Kararsız
<i>VvPMEI-33</i>	16	12,509,104	12,509,739	211	8.88	22871.22	31.98	Kararlı
<i>VvPMEI-34</i>	16	12,518,390	12,517,794	198	9.23	21128.27	26.95	Kararlı
<i>VvPMEI-35</i>	17	6,498,856	6,499,620	254	5.64	27984.10	46.28	Kararsız
<i>VvPMEI-36</i>	18	19,351,756	19,352,301	181	5.92	19448.08	32.99	Kararlı
<i>VvPMEI-37</i>	18	19,358,276	19,358,836	186	4.72	19684.24	36.37	Kararlı
<i>VvPMEI-38</i>	18	19,370,366	19,370,914	182	4.90	19248.75	39.00	Kararlı
<i>VvPMEI-39</i>	19	2,296,057	2,296,629	190	5.33	20735.77	46.68	Kararsız
<i>VvPMEI-40</i>	19	22,089,630	22,090,166	178	5.14	19426.18	44.74	Kararsız

Tablo 1. *VvPMEI (1-46)* genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler (devam)

Gen No	Kromozom No	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/ Kararsız
<i>VvPMEI-41</i>	Scaffold	35.818	36.417	199	9.81	21642.04	24.62	Kararlı
<i>VvPMEI-42</i>	Scaffold	39.755	40.36	201	7.69	21619.48	48.75	Kararsız
<i>VvPMEI-43</i>	Scaffold	39.755	41.972	182	5.62	19643.07	49.72	Kararsız
<i>VvPMEI-44</i>	Scaffold	39.755	42.03	201	7.69	21619.48	48.75	Kararsız
<i>VvPMEI-45</i>	Scaffold	48.423	49.037	204	5.11	21888.87	36.53	Kararlı
<i>VvPMEI-46</i>	Scaffold	58.363	58.977	204	6.58	21926.07	41.62	Kararsız

Tablo 2. *VrPMEI* (1-43) genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler

Gen No	Kromozom No	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/ Kararsız
<i>VrPMEI-1</i>	1	5.156.603	5.157.253	216	6.41	23107.15	28.50	Kararlı
<i>VrPMEI-2</i>	1	5.191.424	5.192.047	207	7.66	22441.41	29.94	Kararlı
<i>VrPMEI-3</i>	1	7.865.024	7.865.560	178	4.79	18669.17	30.90	Kararlı
<i>VrPMEI-4</i>	2	14.787.666	14.788.280	204	5.78	21996.02	39.86	Kararlı
<i>VrPMEI-5</i>	2	14.793.265	14.793.879	204	5.11	21890.84	37.97	Kararlı
<i>VrPMEI-6</i>	2	14.799.836	14.800.441	201	7.04	21751.6	54.58	Kararsız
<i>VrPMEI-7</i>	2	14.803.673	14.804.272	199	9.81	21642.04	24.62	Kararlı
<i>VrPMEI-8</i>	4	23.296.946	23.297.494	182	5.53	20133.22	42.97	Kararsız
<i>VrPMEI-9</i>	5	1.087.594	1.088.418	274	4.75	28838.2	61.45	Kararsız
<i>VrPMEI-10</i>	5	1.416.791	1.417.300	169	9.3	18287.14	35.19	Kararlı
<i>VrPMEI-11</i>	5	1.421.091	1.421.624	177	7	19499.83	16.95	Kararlı
<i>VrPMEI-12</i>	6	114.211	114.759	182	5.54	20435.42	38.89	Kararlı
<i>VrPMEI-13</i>	7	25.982.397	25.982.957	186	4.89	20566.5	45.55	Kararlı
<i>VrPMEI-14</i>	7	25.984.841	25.985.386	181	5.91	19831.81	35.28	Kararlı
<i>VrPMEI-15</i>	7	26.312.316	26.312.960	214	5.09	22840.97	51.12	Kararsız
<i>VrPMEI-16</i>	7	27.079.582	27.080.130	182	4.63	20284.02	36.34	Kararlı
<i>VrPMEI-17</i>	7	27.218.274	27.218.864	196	9.6	21245.4	38.67	Kararlı
<i>VrPMEI-18</i>	11	19.273.496	19.274.344	261	9.07	28426.46	31.44	Kararlı
<i>VrPMEI-19</i>	14	10.659.042	10.659.632	196	6.07	21199.39	49.00	Kararsız
<i>VrPMEI-20</i>	14	28.280.207	28.280.788	193	4.77	21333.11	38.33	Kararlı
<i>VrPMEI-21</i>	14	29.236.728	29.237.264	178	4.44	19460.05	25.94	Kararlı
<i>VrPMEI-22</i>	14	29.242.814	29.243.320	168	5.93	18830.48	46.73	Kararsız

Tablo 2. *VrPMEI (1-43)* genleri ve bu genlerin ekspresyon ürünü olan proteinlerine ait parametreler (devam)

Gen No	Kromozom No	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Kararlılık İndeksi	Kararlı/ Kararsız
<i>VrPMEI-23</i>	15	6.303.083	6.303.835	208	9.71	22982.38	35.02	Kararlı
<i>VrPMEI-24</i>	15	6.303.146	6.303.772	208	9.71	22982.38	35.02	Kararlı
<i>VrPMEI-25</i>	15	10.891.939	10.892.487	182	7.49	20206.12	33.79	Kararlı
<i>VrPMEI-26</i>	16	13.528.582	13.529.190	202	6.95	21730.8	27.03	Kararlı
<i>VrPMEI-27</i>	16	13.544.247	13.544.855	202	6.18	21715.68	29.26	Kararlı
<i>VrPMEI-28</i>	16	13.575.897	13.576.361	154	7.7	16713.24	46.39	Kararsız
<i>VrPMEI-29</i>	16	13.619.335	13.619.937	200	8.38	21603.73	17.24	Kararlı
<i>VrPMEI-30</i>	16	13.641.631	13.642.233	200	6.5	21569.56	28.99	Kararlı
<i>VrPMEI-31</i>	16	13.669.625	13.670.263	212	6.81	22917.4	41.63	Kararsız
<i>VrPMEI-32</i>	16	13.685.417	13.686.052	211	9.14	22958.34	31.49	Kararlı
<i>VrPMEI-33</i>	16	13.694.662	13.695.258	198	9.23	21128.27	26.95	Kararlı
<i>VrPMEI-34</i>	17	13.077.868	13.078.632	254	5.49	27937.06	49.74	Kararsız
<i>VrPMEI-35</i>	18	23.894.006	23.894.545	179	6.95	18999.59	29.45	Kararlı
<i>VrPMEI-36</i>	18	23.900.938	23.901.486	182	5.81	19351.06	30.84	Kararlı
<i>VrPMEI-37</i>	18	23.912.895	23.913.443	182	4.6	19188.61	38.68	Kararlı
<i>VrPMEI-38</i>	18	23.914.704	23.915.216	170	4.7	18821.4	20.57	Kararlı
<i>VrPMEI-39</i>	18	26.138.745	26.139.266	173	5.35	19574.32	42.17	Kararsız
<i>VrPMEI-40</i>	19	2.734.849	2.735.421	190	5.33	20808.82	46.68	Kararsız
<i>VrPMEI-41</i>	19	23.695.122	23.695.658	178	5.14	19427.21	44.00	Kararsız
<i>VrPMEI-42</i>	Scaffold	96.741	97.277	178	5.14	19411.21	44.00	Kararsız
<i>VrPMEI-43</i>	Scaffold	436.980	437.525	181	4.78	19422.14	39.76	Kararlı

3.2. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* PMEİ Genlerinin Filogenetik Ağaçları

Vitis vinifera türünde tahmin edilen 46 adet *VvPMEİ* genlerinin filogenetik olarak ilişkilerinin saptanması için en yüksek olabilirlik (maximum likelihood) algoritması kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. *VvPMEİ* genlerine ait filogenetik ağaç Şekil 4’de verilmiştir.

VvPMEİ genlerinin oluşturduğu filogenetik ağaçta iki ana grubun bulunduğu gözlenmiştir. Buna göre I. Grupta 25 adet *VvPMEİ* geni bulunur iken; II. Grupta 21 adet *VvPMEİ* geninin bulunduğu saptanmıştır. *VvPMEİ*-1, 2, 3, 10, 13, 15, 18, 19, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 genleri I. Grupta yerleşmiş diğer genler ise II. Ana grupta yer almışlardır. Elde edilen filogenetik ağaçtaki yerleşimlerine göre birbirlerine en yakın genlerin I. Grup için *VvPMEİ*-27 ve *VvPMEİ*-28, *VvPMEİ*-30- *VvPMEİ*-31, *VvPMEİ*-45- *VvPMEİ*-46, *VvPMEİ*-42- *VvPMEİ*-44, *VvPMEİ*-32- *VvPMEİ*-33, *VvPMEİ*-1- *VvPMEİ*-2, *VvPMEİ*- *VvPMEİ*-34- *VvPMEİ*-41, *VvPMEİ*-18- *VvPMEİ*-35, *VvPMEİ*-10- *VvPMEİ*-15 olduğu belirlenmiştir. I. Grupta bulunan genlerin kendi aralarında iki ayrı kola ayrıldığı bulunmuş ve *VvPMEİ*-40 geninin tek başına bir dal oluşturduğu diğer genlerin ise kendi aralarında kümelandikleri saptanmıştır.

İkinci ana grupta yerleşen genler incelendiğinde, filogenetik ağaçtaki yerleşimlerine göre *VvPMEİ*-4- *VvPMEİ*-5, *VvPMEİ*-14- *VvPMEİ*-22, *VvPMEİ*-12- *VvPMEİ*-39, *VvPMEİ*-8- *VvPMEİ*-9, *VvPMEİ*-11- *VvPMEİ*-23, *VvPMEİ*-16- *VvPMEİ*-17 ve *VvPMEİ*-37- *VvPMEİ*-38 genlerinin birbirlerine en yakın genler olduğu bulunmuştur. Bu grupta genlerin tek bir ana grupta kümelandikleri görülmüştür. Filogenetik ağaçta yerleşimleri ve kromozomal yerleşimlerine bakıldığında *VvPMEİ*-39 ve *VvPMEİ*-40 genleri haricindeki genlerin aynı ana grupta yerleştikleri belirlenmiştir.

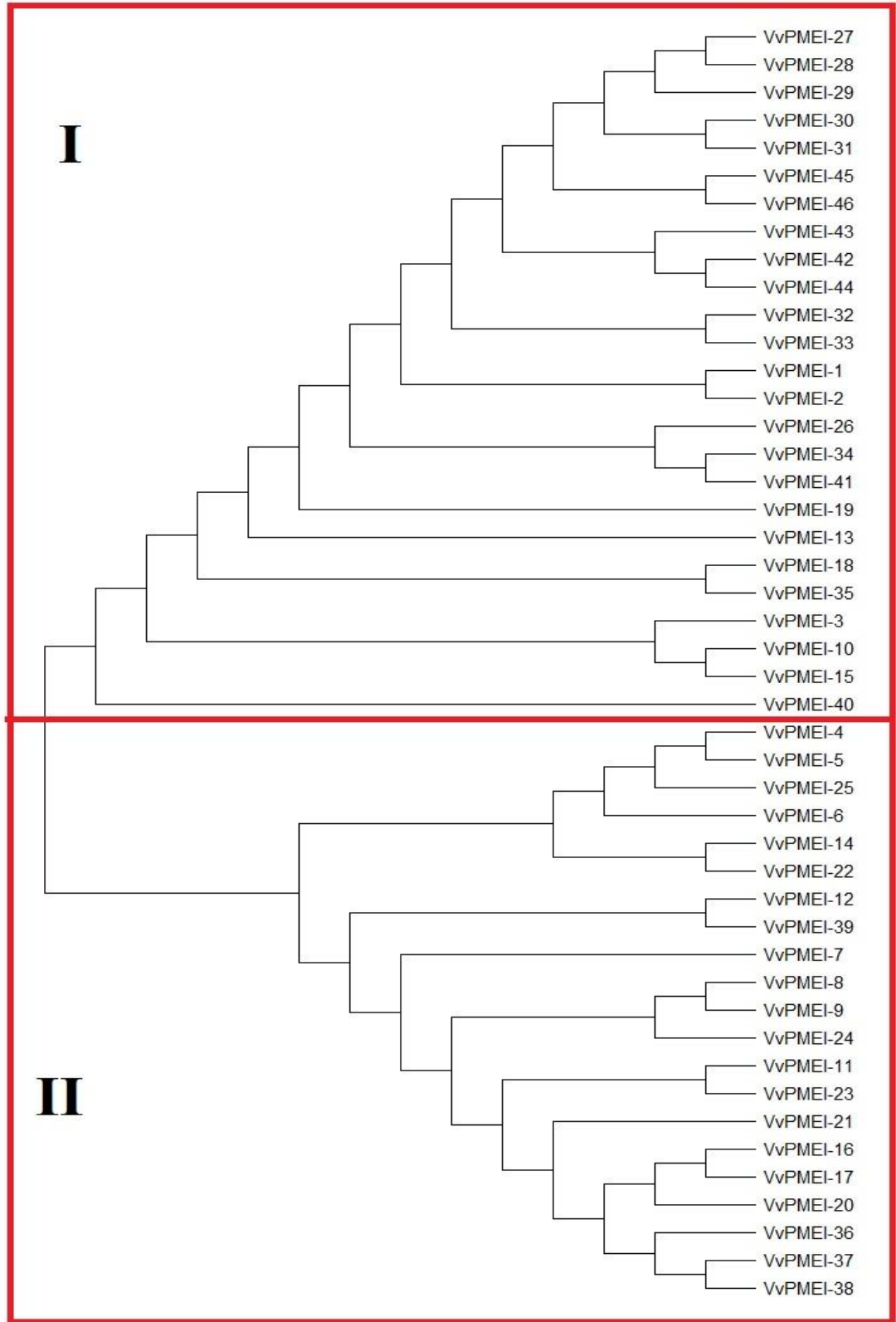
Vitis riparia türünde saptanan toplam 43 adet *VrPMEİ* geninin filogenetik ağacı aralarındaki ilişkinin saptanması amacıyla oluşturulmuştur ve *VrPMEİ* genlerine ait filogenetik ağaç Şekil 5’de verilmiştir.

VrPMEİ genlerinin filogenetik ağacında 2 ana grup olduğu belirlenmiştir. I. Ana grupta *VrPMEİ*-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 15, 17, 18, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 genleri olmak üzere toplam 22 genin yer aldığı; II. Ana grupta da *VrPMEİ*-8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 19, 20, 21, 22, 25, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 genlerinin

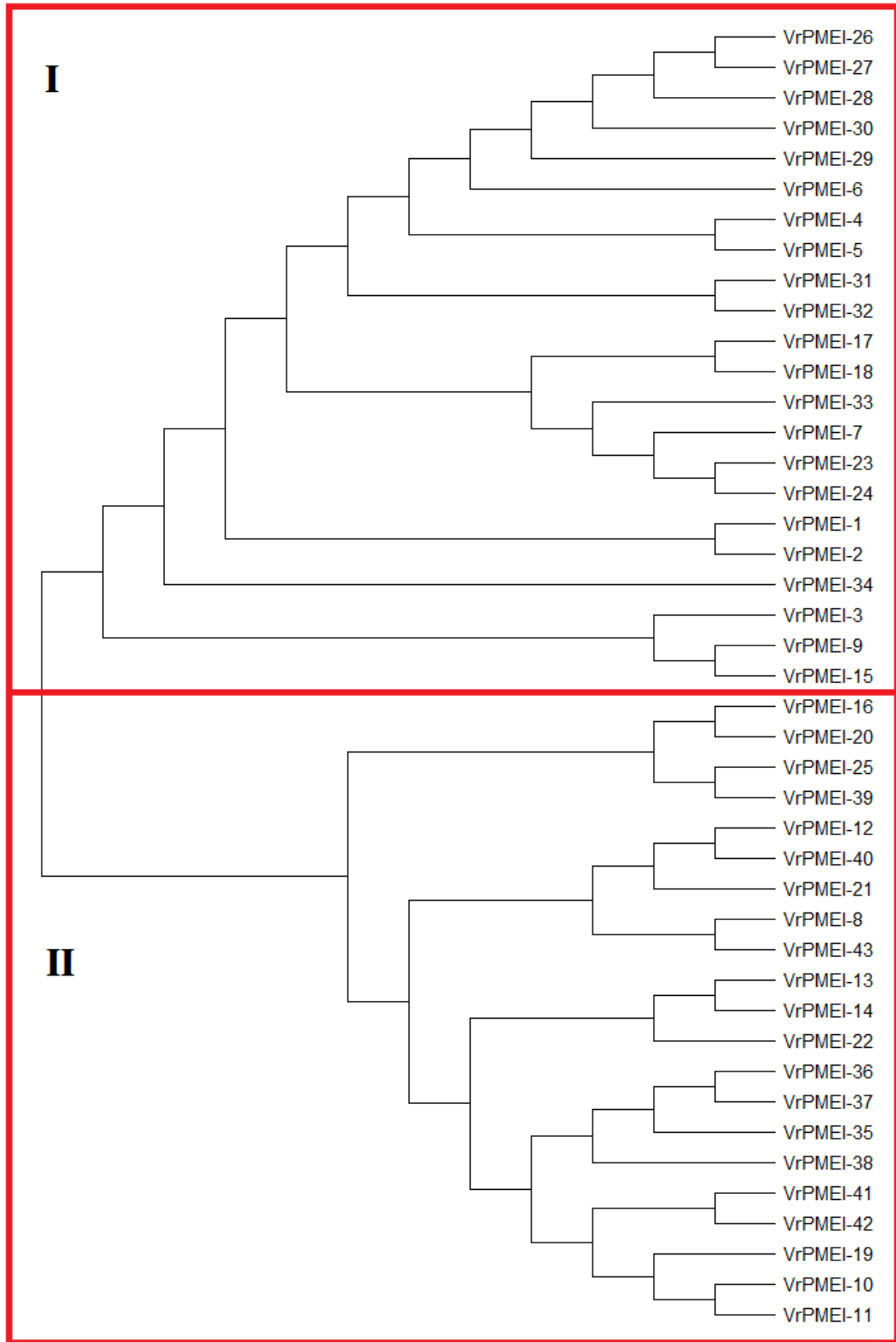
(21 adet) bulunduğu saptanmıştır. I. Ana grupta birbirlerine filogenetik ağaç yerleşimlerine göre en yakın *VrPMEI* üyeleri sırası ile *VrPMEI*-1- *VrPMEI*-2, *VrPMEI*-4- *VrPMEI*-5, *VrPMEI*-9- *VrPMEI*-15, *VrPMEI*-17- *VrPMEI*-18, *VrPMEI*-23- *VrPMEI*-24 *VrPMEI*-26- *VrPMEI*-27 ve *VrPMEI*-31- *VrPMEI*-32 olarak saptanmıştır. Bu grupta *VrPMEI* -34 geninin tek bir dal olarak ayrıldığı görölmüştür.

II. Ana grupta ağaç yerleřimine göre birbirine en benzer bireyler *VrPMEI* -8-43, *VrPMEI*-10- *VrPMEI*-11, *VrPMEI*-12- *VrPMEI*-40, *VrPMEI*-13- *VrPMEI*14, *VrPMEI*-16- *VrPMEI*-20, *VrPMEI*-25- *VrPMEI*-39, *VrPMEI*-36-37, *VrPMEI*-41- *VrPMEI*42 olarak belirlenmiştir.

Vitis vinifera ve *Vitis riparia* *PMEI* genlerinin tek bir filogenetik ağaç üzerinde değerlendirilmesi için ayrıca filogenetik bir ağaç oluşturulmuş ve Itol çevrimiçi aracılığıyla kurulan ağaç şekil 6'da verilmiştir. Ortak oluşturulan ağaca göre her iki türde de birçok genin birbirine en benzer olarak aynı kümelerde yer aldıkları bulunmuştur.



Şekil 4. VvPMEI genlerine ait filogenetik ağaç

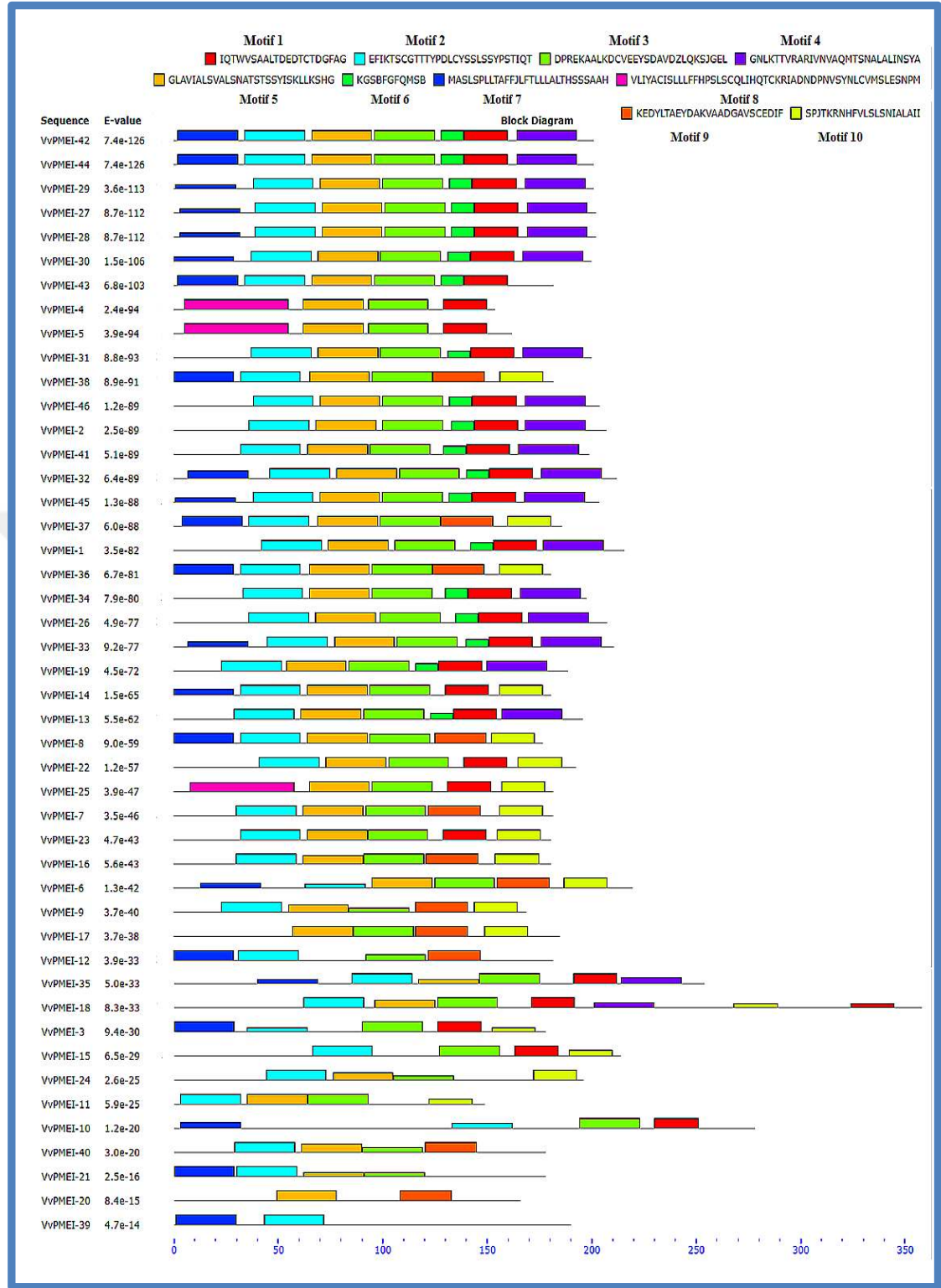


Şekil 5. *VrPMEI* genlerine ait filogenetik ağaç

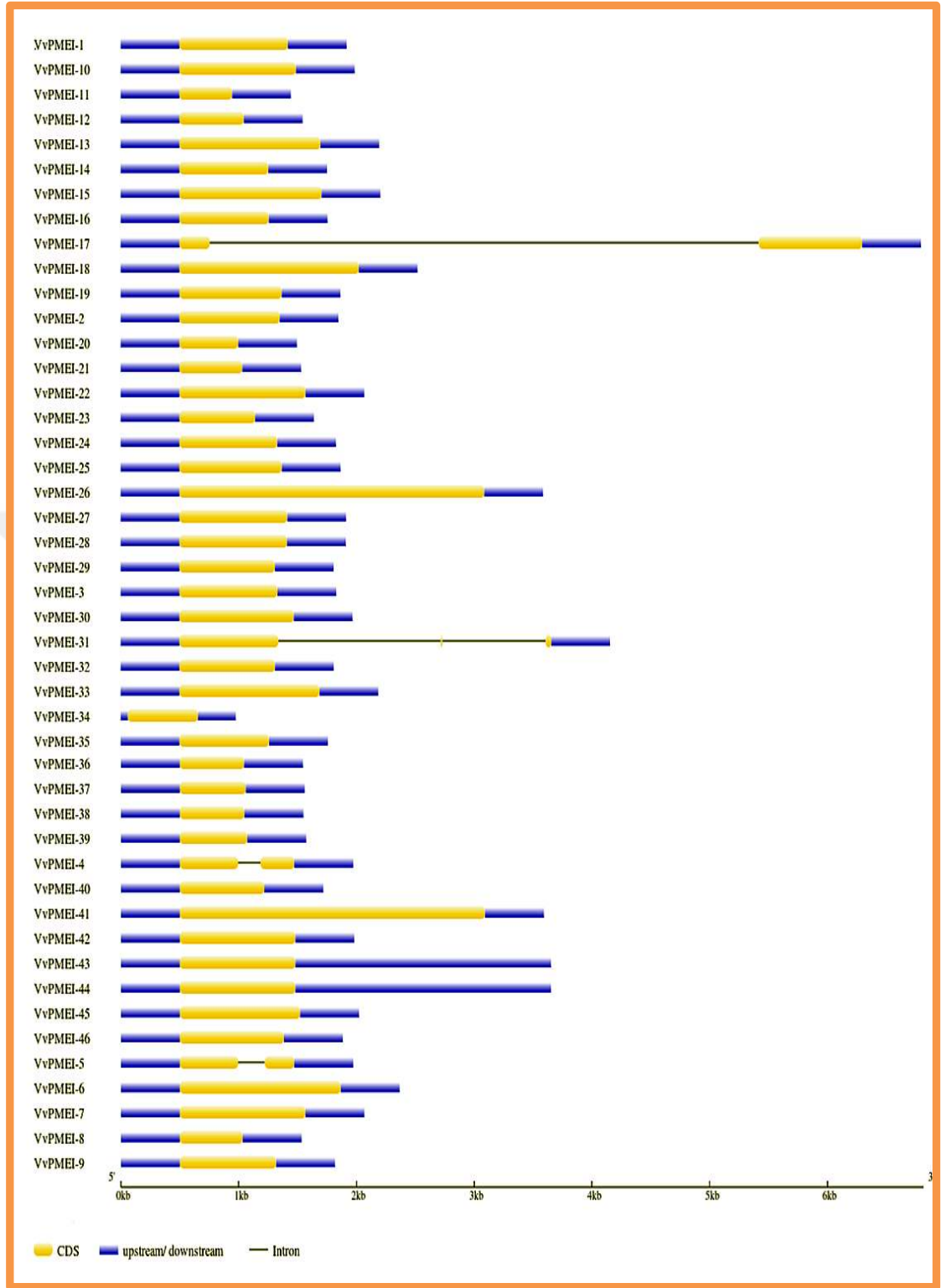
3.3. *VvPMEI* ve *VrPMEI* Genlerinin Korunmuş Motif Yapısının ve Ekzon-İntron Bölgelerinin Tanımlanması

Protein motifleri, farklı proteinler arasında paylaşılan protein üç boyutlu yapı veya amino asit dizisi bölgeleridir. Bu bölgeler kimyasal veya biyolojik bir fonksiyonla ilişkili olabilecek küçük yapılardır. Bununla beraber, bu tekrarlayan ve paylaşılan motiflerin herhangi bir fonksiyonla ilişkisi de olmayabilir. Motif saptama aracı MEME'yi kullanarak, *vPMEI* protein ailesi için 10 tane korunmuş motif bulunmuştur. Elde edilen korunmuş motiflere göre en yakın ilişkili *VvPMEI* üyelerinin benzer motif türünü ve sayısını paylaştıkları, buna göre aralarında olası işlevsel benzerlikler olabileceği tahmin edilmiştir. Şekil 7'de *VvPMEI* ailesi üyelerine ait korunmuş motifler verilmiştir. Korunmuş motiflere ait grafik incelendiğinde motif sayısı ve türü bakımından *VvPMEI* üyelerinin dağılımının filogenetik ağaç ile hayli uyumlu olduğu belirlenmiştir. *VvPMEI* ailesinin 25 üyesi için 3 motifin en sık tekrarlanan motif olduğu bulunmuştur (Motif 2, Motif 3 ve Motif 5). Motif 8 yalnızca *VvPMEI*-4, *VvPMEI*-5 ve *VvPMEI*-25' de saptanmış olup, *VvPMEI*-39'da ise Motif 2 ve Motif 7 dışında bir motif olmadığı gözlenmiştir.

VvPMEI genlerinin yapısını daha iyi anlayabilmek amacıyla bu genlerin ekzon ve intron bölgeleri çıkarılarak görselleştirilmiş ve Şekil 8'de verilmiştir. *VvPMEI* -4, *VvPMEI*-5, *VvPMEI*-17 ve *VvPMEI*-31 genlerinde intron bulunduğu, diğer genlerde ise intron olmadığı saptanmıştır. Tek parça halinde en uzun intron *VvPMEI*-17'de, en kısa intron ise *VvPMEI*-4'te bulunmuştur. Aynı zamanda en uzun tek parça intron *VvPMEI*-11'de ve en uzun upstream/downstream bölgesi ise *VvPMEI*-44 ve *VvPMEI*-45 genlerinde tespit edilmiştir.



Şekil 7. VvPMEI genlerinin korunmuş motif yapısı

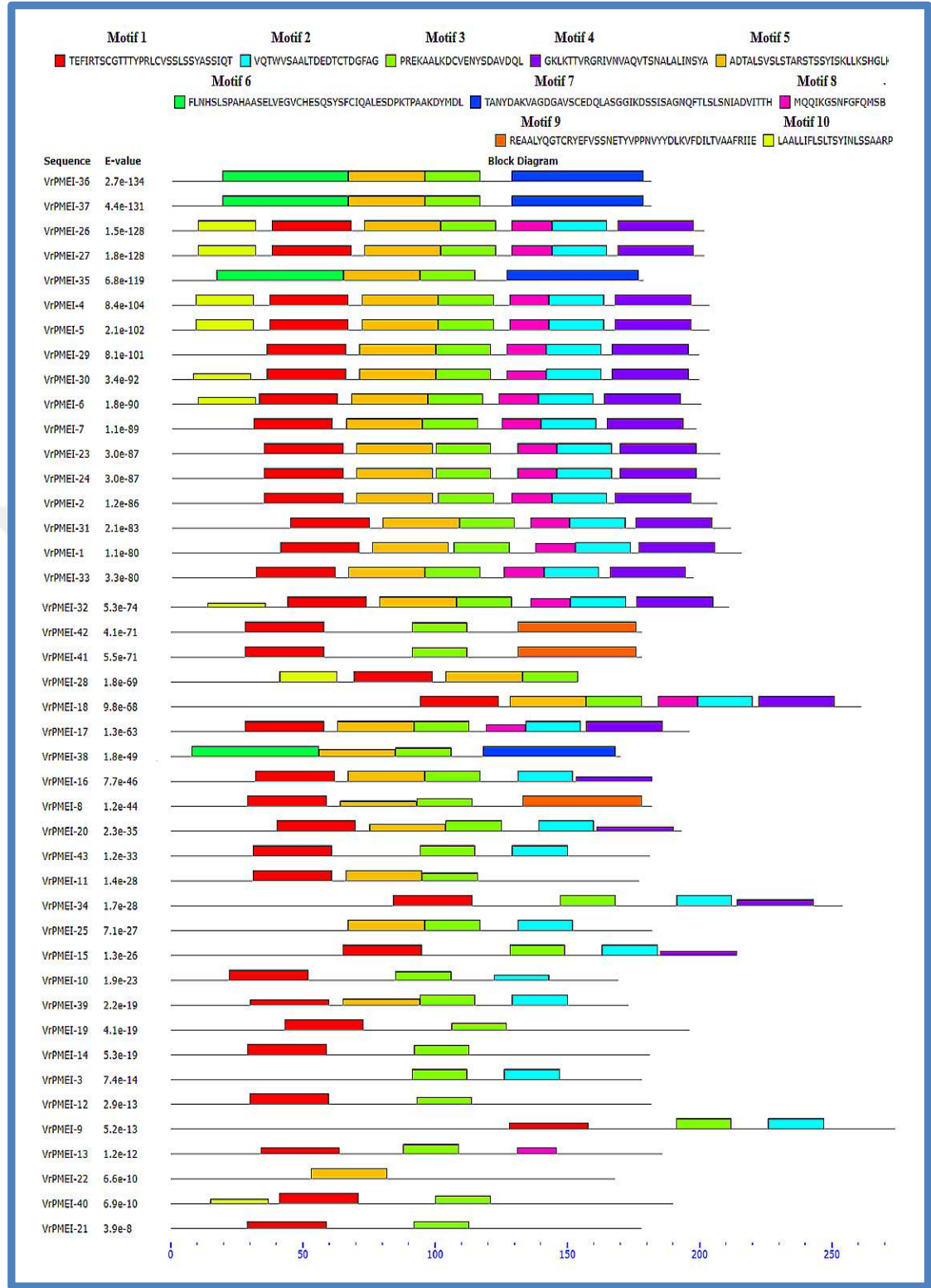


Şekil 8. *VvPMEI* genlerinin ekzon/intron yapısı

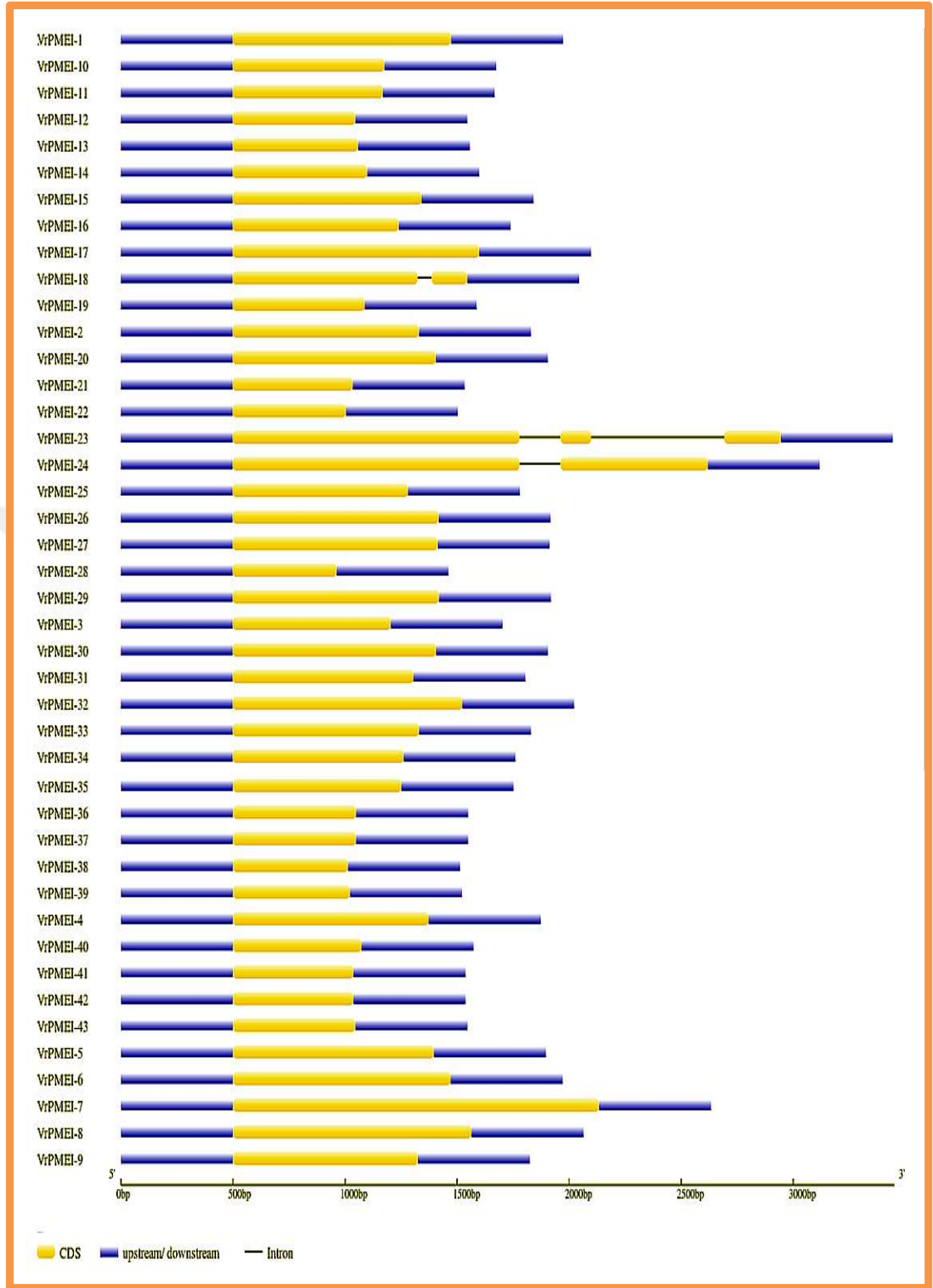
Vitis riparia türünde ise toplam 43 *VrPMEI* ailesi üyesinde 10 adet korunmuş motif bulunmuştur. Bu korunmuş motiflerden Motif 1'in *VrPMEI*-36 ve *VrPMEI*-37 hariç tüm üyelerde tekrarlandığı, benzer şekilde Motif 3 ise *VrPMEI*-22 hariç tüm *VrPMEI* üyelerinde bulunduğu saptanmıştır. *VrPMEI*-22'de sadece 1 tane motif olduğu (Motif 3) görülmüştür. *VrPMEI* -21'de de 2 adet motif olduğu bulunmuştur (Motif 1 ve Motif 3). *VrPMEI*-25 ve *VrPMEI*-27 ile *VrPMEI*-4 ve *VrPMEI*-5'te Motif 1, Motif 2, Motif 3, Motif 4, Motif 5, Motif 8 ve Motif 10'unun benzer şekilde tekrarlandığı, yine *VrPMEI*-1, *VrPMEI*-2, *VrPMEI*-7, *VrPMEI*-23, *VrPMEI*-24, *VrPMEI*-29, *VrPMEI*-31, *VrPMEI*-33'de Motif 1, Motif 2, Motif 3, Motif 4, Motif 5 ve Motif 8'in yinelendiği saptanmıştır. Motif 6 ise yalnızca 4 adet *VrPMEI*'de görülmüştür (*VrPMEI*-35, *VrPMEI*-36, *VrPMEI*, 37, *VrPMEI*-38). Şekil 9'da *Vitis riparia*'da *VrPMEI* üyelerinin korunmuş motifleri verilmiştir.

VrPMEI genlerinin ekzon/intron organizasyonu incelendiğinde sadece *VrPMEI*-18, *VrPMEI*-23 ve *VrPMEI*-24 genlerinde toplam 4 tane intron bölgesinin yer aldığı, diğer *VrPMEI* aile üyelerinde intron bulunmadığı saptanmıştır. En kısa intron bölgesi *VrPMEI*-18'de, *VrPMEI*-23'de iki adet intron bölgesi bulunduğu, toplamda en uzun intron bölgesinin de bu gende yer aldığı görülmüştür. En uzun toplam ekzon uzunluğu ise yine *VrPMEI*-23 ve *VrPMEI*-24 genlerinde saptanmış, en uzun tek parça ekzon ise *VrPMEI*-7 geninde bulunmuştur. *VrPMEI*-41, *VrPMEI*-42, *VrPMEI*-43 genlerinin eşit uzunlukta ekzon ve upstream/downstream bölgelerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Şekil 10'da ise *Vitis riparia* genomunda bulunan *Vr*-PMEI gen aile üyelerinin ekzon/intron yapıları verilmiştir.



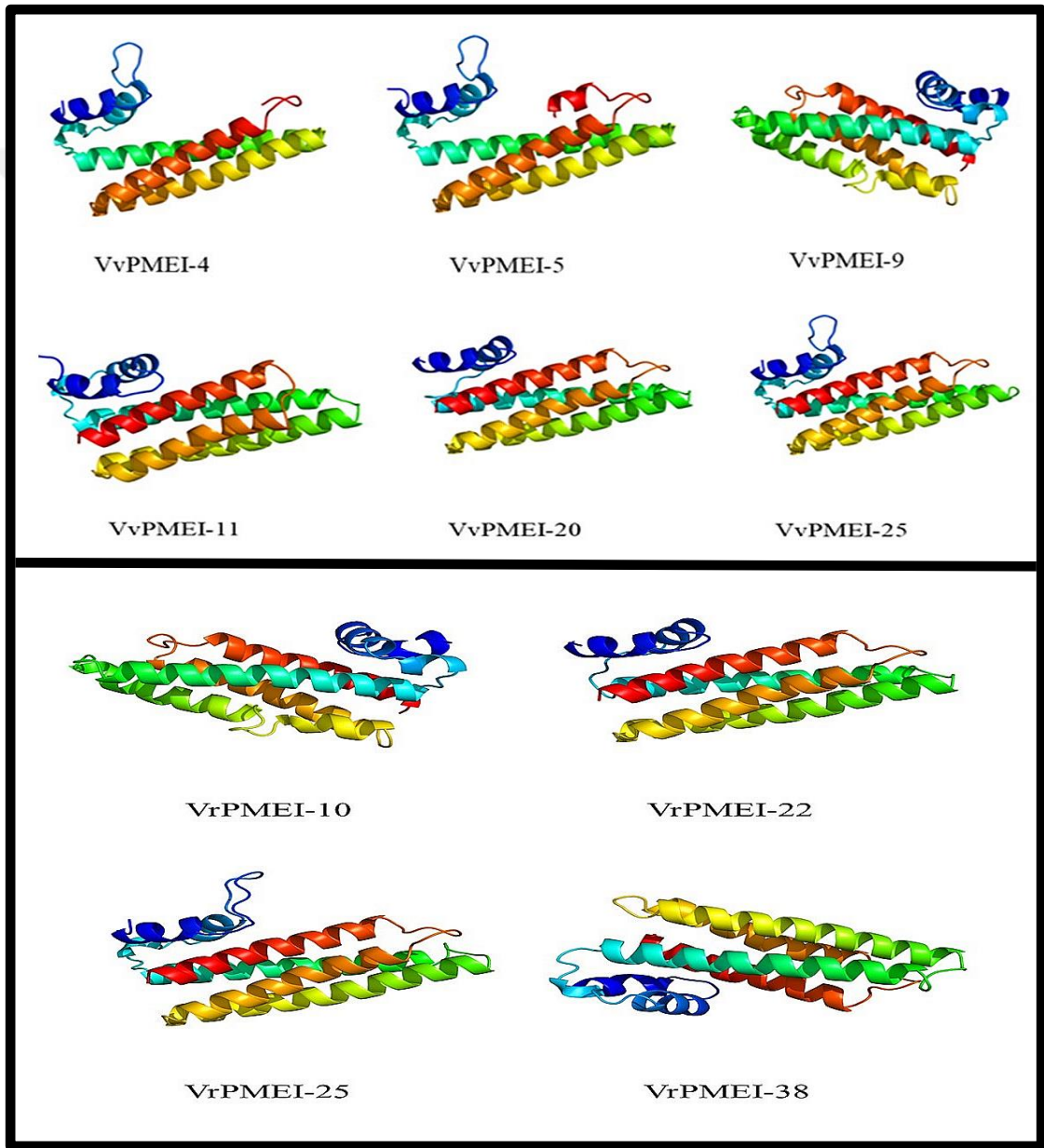
Şekil 9. *VrPMEI* genlerinin korunmuş motif yapısı



Şekil 10. *VrPMEI* genlerinin ekzon/intron yapısı

3.4. *VvPMEI* ve *VrPMEI* Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi

VvPMEI proteinlerinin 3 boyutlu homoloji modellemesi yapılmış ve güven seviyesi ≥ 85 olan proteinler seçilmiştir. Bu proteinler *VvPMEI*-4, *VvPMEI*-5, *VvPMEI*-9, *VvPMEI*-11, *VvPMEI*-20, *VvPMEI*-25 olarak bulunmuştur. *VrPMEI* proteinlerinin 3 boyutlu homolojisine göre *VrPMEI*-10, *VrPMEI*-22, *VrPMEI*-25 ve *VrPMEI*-38 proteinleri saptanmıştır. Şekil 11’de yüksek homoloji ile modellenen *VvPMEI* ve *VrPMEI* proteinlerinin ön görülen 3 boyutlu yapıları verilmiştir.



Şekil 11. *VvPMEI* ve *VrPMEI* proteinlerinin 3 boyutlu homolojik modellemesi

3.5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da PMEİ'lerin Hücrealtı (Subcellular) Yerleşimlerinin (Localization) Belirlenmesi

CELLOver2.5 çevrimiçi aracından elde edilen sonuçlar incelendiğinde *VvPMEİ*'lerin en fazla ekstraselluler olarak lokalize olduğu (41 adet), sırasıyla çekirdekte 6, plazma membranında 4, kloroplastta 2 ve 1 adet sitoplazmik olarak yerleşim gösterdikleri bulunmuştur. Toplamda 54 adet nokta belirlenmiştir. *VvPMEİ-9* (Ekstrasellular-Çekirdek), *VvPMEİ-11* (Sitoplazma-Çekirdek), *VvPMEİ-15* (Çekirdek-Kloroplast), *VvPMEİ-23* (Ekstrasellular-Çekirdek), *VvPMEİ-33* (Ekstrasellular-Plazma Membranı), *VvPMEİ-34* (Ekstrasellular-Kloroplast), *VvPMEİ-46*'nın tek bir lokasyonda değil (Ekstrasellular-Çekirdek) iki farklı hücre bölümünde bulunduğu görülmüştür. *VrPMEİ*'lerde ise 2 tanesi Kloroplast (*VrPMEİ-15* ve *VrPMEİ-33-2*), 40 tanesi Ekstrasellular, 4 adet Çekirdek ve 4 Plazma Membranı olmak üzere toplam 50 adet lokalizasyon bulunmuştur. PMEİ'lerin çoğunluğu tek bir hücre bölmesinde bulunurken; *VrPMEİ-10* (Ekstrasellular-Çekirdek), *VrPMEİ-18* (Plazma Membranı-Ekstrasellular), *VrPMEİ-33* (Ekstrasellular-Kloroplast), *VrPMEİ-38* (Plazma Membranı-Ekstrasellular) ve *VrPMEİ-43* (Ekstrasellular-Çekirdek) ise iki farklı lokasyonda tespit edilmiştir. Tablo 3'de her iki türün PMEİ proteinleri için hücresel bölümleri, Tablo 4'da ise her iki türde PMEİ genleri için elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 3. *VvPMEI* ve *VrPMEI* proteinlerinin hücrealtı lokalizasyonları

Gen No	Hücrealtı Lokalizasyon	Cello R Değeri	Gen No	Hücrealtı Lokalizasyon	Cello R Değeri
<i>VvPMEI-1</i>	Ekstrasellüler	3.395	<i>VrPMEI-1</i>	Ekstrasellular	3.423
<i>VvPMEI-2</i>	Ekstrasellüler	3.905	<i>VrPMEI-2</i>	Ekstrasellular	3.797
<i>VvPMEI-3</i>	Ekstrasellüler	4.233	<i>VrPMEI-3</i>	Ekstrasellular	4.057
<i>VvPMEI-4</i>	Ekstrasellüler	3.001	<i>VrPMEI-4</i>	Ekstrasellular	2.055
<i>VvPMEI-5</i>	Ekstrasellüler	2.844	<i>VrPMEI-5</i>	Ekstrasellular	3.099
<i>VvPMEI-6</i>	Plazma Membranı	3.782	<i>VrPMEI-6</i>	Ekstrasellular	1.545
<i>VvPMEI-7</i>	Ekstrasellüler	3.055	<i>VrPMEI-7</i>	Ekstrasellular	2.089
<i>VvPMEI-8</i>	Ekstrasellüler	2.259	<i>VrPMEI-8</i>	Ekstrasellular	2.828
<i>VvPMEI-9-1</i>	Ekstrasellüler	1.497	<i>VrPMEI-9</i>	Çekirdek	2.604
<i>VvPMEI-9-2</i>	Çekirdek	1.169	<i>VrPMEI-10-1</i>	Ekstrasellular	1.812
<i>VvPMEI-10</i>	Çekirdek	2.432	<i>VrPMEI-10-2</i>	Çekirdek	1.126
<i>VvPMEI-11-1</i>	Sitoplazmik	1.202	<i>VrPMEI-11</i>	Ekstrasellular	2.259
<i>VvPMEI-11-2</i>	Çekirdek	1.154	<i>VrPMEI-12</i>	Ekstrasellular	4.213
<i>VvPMEI-12</i>	Ekstrasellüler	4.110	<i>VrPMEI-13</i>	Ekstrasellular	3.324
<i>VvPMEI-13</i>	Ekstrasellüler	2.480	<i>VrPMEI-14</i>	Ekstrasellular	2.899
<i>VvPMEI-14</i>	Ekstrasellüler	3.310	<i>VrPMEI-15</i>	Kloroplast	1.329
<i>VvPMEI-15-1</i>	Çekirdek	1.220	<i>VrPMEI-16</i>	Ekstrasellular	3.162
<i>VvPMEI-15-2</i>	Kloroplast	1.183	<i>VrPMEI-17</i>	Ekstrasellular	2.741

Tablo 3. *VvPMEI* ve *VrPMEI* proteinlerinin hücrealtı lokalizasyonları (devam)

Gen No	Hücrealtı Lokalizasyon	Cello R Değeri	Gen No	Hücrealtı Lokalizasyon	Cello R Değeri
<i>VvPMEI-16</i>	Ekstrasellüler	2.948	<i>VrPMEI-18-1</i>	Plazma Membranı	2.162
<i>VvPMEI-17</i>	Ekstrasellüler	2.967	<i>VrPMEI-18-2</i>	Ekstrasellular	1.567
<i>VvPMEI-18</i>	Plazma Membranı	1.574	<i>VrPMEI-19</i>	Ekstrasellular	2.940
<i>VvPMEI-19</i>	Ekstrasellüler	2.829	<i>VrPMEI-20</i>	Ekstrasellular	2.519
<i>VvPMEI-20</i>	Ekstrasellüler	2.223	<i>VrPMEI-21</i>	Ekstrasellular	3.597
<i>VvPMEI-21</i>	Ekstrasellüler	3.427	<i>VrPMEI-22</i>	Ekstrasellular	2.379
<i>VvPMEI-22</i>	Ekstrasellüler	2.385	<i>VrPMEI-23</i>	Ekstrasellular	2.714
<i>VvPMEI-23-1</i>	Ekstrasellüler	2.120	<i>VrPMEI-24</i>	Ekstrasellular	2.714
<i>VvPMEI-23-2</i>	Çekirdek	1.576	<i>VrPMEI-25</i>	Ekstrasellular	3.221
<i>VvPMEI-24</i>	Ekstrasellüler	2.985	<i>VrPMEI-26</i>	Ekstrasellular	2.917
<i>VvPMEI-25</i>	Ekstrasellüler	3.305	<i>VrPMEI-27</i>	Ekstrasellular	2.758
<i>VvPMEI-26</i>	Ekstrasellüler	3.080	<i>VrPMEI-28</i>	Ekstrasellular	2.870
<i>VvPMEI-27</i>	Ekstrasellüler	2.465	<i>VrPMEI-29</i>	Ekstrasellular	1.985
<i>VvPMEI-28</i>	Ekstrasellüler	2.465	<i>VrPMEI-29</i>	Plazma Membranı	1.310
<i>VvPMEI-29</i>	Ekstrasellüler	2.435	<i>VrPMEI-30</i>	Ekstrasellular	2.316
<i>VvPMEI-30-1</i>	Ekstrasellüler	1.810	<i>VrPMEI-31</i>	Ekstrasellular	3.473
<i>VvPMEI-30-2</i>	Plazma Membranı	1.493	<i>VrPMEI-32</i>	Ekstrasellular	2.139
<i>VvPMEI-31</i>	Ekstrasellüler	2.451	<i>VrPMEI-33-1</i>	Ekstrasellular	1.984

Tablo 3. *VvPMEI* ve *VrPMEI* proteinlerinin hücrealtı lokalizasyonları (devam)

Gen No	Hücrealtı Lokalizasyon	Cello R Değeri	Gen No	Hücrealtı Lokalizasyon	Cello R Değeri
<i>VvPMEI-32</i>	Ekstrasellüler	3.720	<i>VrPMEI-33-2</i>	Kloroplast	1.313
<i>VvPMEI-33-1</i>	Ekstrasellüler	2.243	<i>VrPMEI-34</i>	Plazma Membranı	1.989
<i>VvPMEI-33-2</i>	Plazma Membranı	1.577	<i>VrPMEI-35</i>	Ekstrasellular	3.482
<i>VvPMEI-34-1</i>	Ekstrasellüler	1.984	<i>VrPMEI-36</i>	Ekstrasellular	3.560
<i>VvPMEI-34-2</i>	Kloroplast	1.313	<i>VrPMEI-37</i>	Ekstrasellular	4.157
<i>VvPMEI-35</i>	Ekstrasellüler	2.262	<i>VrPMEI-38-1</i>	Plazma Membranı	1.648
<i>VvPMEI-36</i>	Ekstrasellüler	3.273	<i>VrPMEI-38-2</i>	Ekstrasellular	1.161
<i>VvPMEI-37</i>	Ekstrasellüler	3.708	<i>VrPMEI-39-1</i>	Ekstrasellular	2.061
<i>VvPMEI-38</i>	Ekstrasellüler	4.179	<i>VrPMEI-39-2</i>	Çekirdek	1.498
<i>VvPMEI-39</i>	Ekstrasellüler	3.754	<i>VrPMEI-40</i>	Ekstrasellular	3.304
<i>VvPMEI-40</i>	Ekstrasellüler	3.408	<i>VrPMEI-41</i>	Ekstrasellular	3.306
<i>VvPMEI-41</i>	Ekstrasellüler	2.089	<i>VrPMEI-42</i>	Ekstrasellular	3.487
<i>VvPMEI-42</i>	Ekstrasellüler	1.499	<i>VrPMEI-43-1</i>	Ekstrasellular	1.956
<i>VvPMEI-43</i>	Ekstrasellüler	2.297	<i>VrPMEI-43-2</i>	Çekirdek	1.547
<i>VvPMEI-44</i>	Ekstrasellüler	1.499	<i>VvPMEI</i> Toplam		54
<i>VvPMEI-45</i>	Ekstrasellüler	2.862	<i>VrPMEI</i> Toplam		50
<i>VvPMEI-46-1</i>	Ekstrasellüler	1.656			
<i>VvPMEI-46-2</i>	Çekirdek	1.172			

Tablo 4. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* türlerinde PMEİ genlerinin analiz sonuçları

	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitis riparia</i>
Toplam PMEİ geni sayısı	46	43
Kromozomal dağılımı gerçekleşen gen sayısı	40	41
Scaffold dizi sayısı	6	2
En çok PMEİ geninin bulunduğu kromozomlar ve gen sayısı	Kromozom 16, 8 <i>VvPMEİ</i> geni	Kromozom 16, 6 <i>VrPMEİ</i> geni
En az PMEİ geninin bulunduğu kromozomlar	Kromozom 4, 1 adet <i>VvPMEİ</i> geni Kromozom 17, 1 adet <i>VvPMEİ</i> geni	Kromozom 4, 1 adet <i>VrPMEİ</i> geni, Kromozom 6 1 adet <i>VrPMEİ</i> geni Kromozom 17, 1 adet <i>VrPMEİ</i> geni
PMEİ geni bulunmayan kromozomlar	Kromozom 3, Kromozom 8, Kromozom 9, Kromozom 10, Kromozom 13	Kromozom 3, kromozom 8, Kromozom 9, Kromozom 10, Kromozom 12, Kromozom 13
En yüksek protein uzunluğu (aa)	358 aa, <i>VvPMEİ</i> -18	274 aa, <i>VrPMEİ</i> -9
En düşük protein uzunluğu (aa)	149 aa, <i>VvPMEİ</i> -11	157 aa, <i>VrPMEİ</i> -28
En yüksek pI değeri	9.81, <i>VvPMEİ</i> -41	9.81, <i>VvPMEİ</i> -9
En düşük pI değeri	4.22, <i>VvPMEİ</i> -11	4.44, <i>VrPMEİ</i> -21
En yüksek moleküler ağırlık (kDa)	39.384 kDa, <i>VvPMEİ</i> -18	28.838 kDa, <i>VrPMEİ</i> -9
En düşük moleküler ağırlık (kDa)	16.29 kDa, 149 aa, <i>VvPMEİ</i> -11	16.723 kDa, <i>VrPMEİ</i> -28
En yüksek kararlılık indeksi	63.17, <i>VvPMEİ</i> -10	61.95, <i>VrPMEİ</i> -9

Tablo 4. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* türlerinde PMEİ genlerinin analiz sonuçları (devam)

	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitis riparia</i>
En düşük kararlılık indeksi	15.86, VvPMEI-30	16.95, VrPMEI -11
Kararlı protein sayısı	29	29
Kararsız protein sayısı	17	14
İntron sayısı	3 (VvPMEI-4, VvPMEI-17, VvPMEI-31)	4 (VrPMEI -18, VrPMEI -23, VrPMEI -24)
En uzun intronun bulunduğu gen	VvPMEI-17	VrPMEI -23
En kısa intronun bulunduğu gen	VvPMEI-4	VrPMEI -18
En uzun ekzonun bulunduğu gen	VvPMEI-26 ve VvPMEI-41	VrPMEI -7, VrPMEI -23, VrPMEI -24
En kısa ekzonun bulunduğu gen	VvPMEI-11	VrPMEI -28
İntronsuz gen sayısı	43	40
Üç boyutlu homolojik modellemede güven seviyesi ≥85 olan protein sayısı	6	4

3.6. *VvPMEI* ve *VrPMEI* genlerini hedefleyen MikroRNA'lar (miRNA'lar)

Mikro RNA'lar (miRNA) küçük, ortalama 22 nükleotid uzunluğunda kodlamayan (non-coding) RNA olup, gen regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar. psRNA target çevrimiçi veritabanı kullanılarak *Arabidopsis thaliana* model bitkisinde bulunmuş 427 miRNA ile *VvPMEI* ve *VrPMEI* genleri hedef genlerin bulunması amacıyla karşılaştırılmıştır.

VvPMEI genleri için, en fazla hedeflenen genlerin *VvPMEI-10* ve *VvPMEI-41* olduğu görülmüştür. Toplamda 319 adet miRNA hedefi saptanmıştır. En çok gen hedefleyen miRNA'ların ise ath-miR-156 ailesi ile ath-miR-854 aileleri olduğu görülmüştür. *VvPMEI-11*, *VvPMEI-16*, *VvPMEI-34* ve *VvPMEI-38* genlerinin herhangi bir miRNA tarafından hedeflenmediği anlaşılmıştır. Bununla beraber, *VvPMEI-8*, *VvPMEI-21* ve *VvPMEI-37* genlerinin sadece bir kez hedeflendikleri bulunmuştur (ath-miR773a, ath-miR5022 ve ath-miR3440b-3p). Bu durum ise bu genler ve miRNA'lar arasında düzenlenmeleri ile alakalı spesifik bir ilişki bulunduğunu gösteriyor olabilir.

VrPMEI genleri için ise, en fazla hedeflenen genin *VrPMEI-7* olduğu benzer şekilde en fazla hedefleyen miRNA'ların ath-mir156 ailesi olduğu görülmüştür. *Vitis riparia*'da toplam 229 kez miRNA tarafından gen hedeflendiği saptanmıştır. *VrPMEI-21*, *VrPMEI-28* ve *VrPMEI-29* genlerinin sadece bir kez ath-miR-5022, ath-miR-5651 ve ath-miR-5028 tarafından hedeflendikleri bulunmuştur. Yine bu genler ile miRNA'lar arasında hedef spesifik bir ilişki olduğu düşünülebilir. Her iki tür için toplamda 548 kez gen hedeflendiği saptanmıştır. *VvPMEI-21* ve *VrPMEI-21* genleri iki türde de ortak olarak tek bir miRNA tarafından (ath-miR-5022) tarafından hedeflenmişlerdir. Tablo 5'de *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* için hedeflenen genler, hedefleyen miRNA'lar (ath-miR), hedef gen ve miRNA ile ilgili veriler verilmiştir.

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
1	ath-miR1887	VrPMEI-1	275	ath-miR426	VvPMEI-15
2	ath-miR396b-3p	VrPMEI-1	276	ath-miR5023	VvPMEI-15
3	ath-miR414	VrPMEI-10	277	ath-miR5641	VvPMEI-15
4	ath-miR426	VrPMEI-10	278	ath-miR5659	VvPMEI-15
5	ath-miR5028	VrPMEI-10	279	ath-miR8165	VvPMEI-15
6	ath-miR5648-5p	VrPMEI-10	280	ath-miR822-3p	VvPMEI-15
7	ath-miR833a-5p	VrPMEI-10	281	ath-miR830-3p	VvPMEI-15
8	ath-miR842	VrPMEI-10	282	ath-miR854a	VvPMEI-15
9	ath-miR5645c	VrPMEI-11	283	ath-miR854b	VvPMEI-15
10	ath-miR773a	VrPMEI-11	284	ath-miR854c	VvPMEI-15
11	ath-miR164a	VrPMEI-12	285	ath-miR854d	VvPMEI-15
12	ath-miR164b-5p	VrPMEI-12	286	ath-miR854e	VvPMEI-15
13	ath-miR164c-5p	VrPMEI-12	287	ath-miR157a-3p	VvPMEI-17
14	ath-miR398a-5p	VrPMEI-12	288	ath-miR157b-3p	VvPMEI-17
15	ath-miR5021	VrPMEI-12	289	ath-miR1886.1	VvPMEI-17
16	ath-miR403-5p	VrPMEI-13	290	ath-miR403-5p	VvPMEI-17
17	ath-miR8176	VrPMEI-13	291	ath-miR5029	VvPMEI-17
18	ath-miR8179	VrPMEI-13	292	ath-miR8176	VvPMEI-17
19	ath-miR8181	VrPMEI-13	293	ath-miR8179	VvPMEI-17
20	ath-miR833a-5p	VrPMEI-13	294	ath-miR830-3p	VvPMEI-17
21	ath-miR159a	VrPMEI-15	295	ath-miR833a-5p	VvPMEI-17
22	ath-miR159b-3p	VrPMEI-15	296	ath-miR5016	VvPMEI-18
23	ath-miR159c	VrPMEI-15	297	ath-miR5021	VvPMEI-18
24	ath-miR426	VrPMEI-15	298	ath-miR5638b	VvPMEI-18
25	ath-miR5659	VrPMEI-15	299	ath-miR5653	VvPMEI-18
26	ath-miR822-3p	VrPMEI-15	300	ath-miR777	VvPMEI-18
27	ath-miR5020a	VrPMEI-16	301	ath-miR8177	VvPMEI-18
28	ath-miR5021	VrPMEI-16	302	ath-miR2112-3p	VvPMEI-19
29	ath-miR5658	VrPMEI-16	303	ath-miR8173	VvPMEI-19
30	ath-miR5665	VrPMEI-16	304	ath-miR8181	VvPMEI-19
31	ath-miR3440b-3p	VrPMEI-17	305	ath-miR824-3p	VvPMEI-19
32	ath-miR399b	VrPMEI-17	306	ath-miR846-3p	VvPMEI-19
33	ath-miR399c-3p	VrPMEI-17	307	ath-miR1887	VvPMEI-2
34	ath-miR5014a-3p	VrPMEI-17	308	ath-miR5998a	VvPMEI-2
35	ath-miR8184	VrPMEI-17	309	ath-miR5998b	VvPMEI-2
36	ath-miR156h	VrPMEI-18	310	ath-miR390a-5p	VvPMEI-20
37	ath-miR5021	VrPMEI-18	311	ath-miR390b-5p	VvPMEI-20
38	ath-miR779.2	VrPMEI-18	312	ath-miR5022	VvPMEI-21

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
39	ath-miR8173	VrPMEI-18	313	ath-miR5016	VvPMEI-22
40	ath-miR8181	VrPMEI-18	314	ath-miR844-5p	VvPMEI-22
41	ath-miR824-3p	VrPMEI-18	315	ath-miR870-5p	VvPMEI-22
42	ath-miR846-3p	VrPMEI-18	316	ath-miR781a	VvPMEI-23
43	ath-miR8167a	VrPMEI-19	317	ath-miR781b	VvPMEI-23
44	ath-miR8167b	VrPMEI-19	318	ath-miR1886.2	VvPMEI-24
45	ath-miR8167c	VrPMEI-19	319	ath-miR5021	VvPMEI-24
46	ath-miR8167d	VrPMEI-19	320	ath-miR5631	VvPMEI-24
47	ath-miR8167e	VrPMEI-19	321	ath-miR5647	VvPMEI-24
48	ath-miR8167f	VrPMEI-19	322	ath-miR776	VvPMEI-24
49	ath-miR1887	VrPMEI-2	323	ath-miR8167a	VvPMEI-24
50	ath-miR390a-5p	VrPMEI-2	324	ath-miR8167b	VvPMEI-24
51	ath-miR390b-5p	VrPMEI-2	325	ath-miR8167c	VvPMEI-24
52	ath-miR826a	VrPMEI-2	326	ath-miR8167d	VvPMEI-24
53	ath-miR855	VrPMEI-2	327	ath-miR8167e	VvPMEI-24
54	ath-miR5016	VrPMEI-20	328	ath-miR8167f	VvPMEI-24
55	ath-miR5023	VrPMEI-20	329	ath-miR837-5p	VvPMEI-24
56	ath-miR844-5p	VrPMEI-20	330	ath-miR156a-3p	VvPMEI-25
57	ath-miR5022	VrPMEI-21	331	ath-miR157a-3p	VvPMEI-25
58	ath-miR390a-5p	VrPMEI-22	332	ath-miR157b-3p	VvPMEI-25
59	ath-miR390b-5p	VrPMEI-22	333	ath-miR2936	VvPMEI-25
60	ath-miR169b-3p	VrPMEI-23	334	ath-miR781a	VvPMEI-25
61	ath-miR169g-3p	VrPMEI-23	335	ath-miR781b	VvPMEI-25
62	ath-miR5020c	VrPMEI-23	336	ath-miR830-3p	VvPMEI-25
63	ath-miR5640	VrPMEI-23	337	ath-miR169g-3p	VvPMEI-26
64	ath-miR8172	VrPMEI-23	338	ath-miR170-3p	VvPMEI-26
65	ath-miR837-5p	VrPMEI-23	339	ath-miR5020c	VvPMEI-26
66	ath-miR837-5p	VrPMEI-23	340	ath-miR5021	VvPMEI-26
67	ath-miR863-5p	VrPMEI-23	341	ath-miR5640	VvPMEI-26
68	ath-miR169g-3p	VrPMEI-24	342	ath-miR5640	VvPMEI-26
69	ath-miR5020c	VrPMEI-24	343	ath-miR5656	VvPMEI-26
70	ath-miR5640	VrPMEI-24	344	ath-miR5998a	VvPMEI-26
71	ath-miR5640	VrPMEI-24	345	ath-miR5998b	VvPMEI-26
72	ath-miR5656	VrPMEI-24	346	ath-miR8172	VvPMEI-26
73	ath-miR837-5p	VrPMEI-24	347	ath-miR8178	VvPMEI-26
74	ath-miR857	VrPMEI-24	348	ath-miR837-5p	VvPMEI-26
75	ath-miR863-5p	VrPMEI-24	349	ath-miR837-5p	VvPMEI-26
76	ath-miR156a-3p	VrPMEI-25	350	ath-miR857	VvPMEI-26
77	ath-miR157a-3p	VrPMEI-25	351	ath-miR863-5p	VvPMEI-26
78	ath-miR157b-3p	VrPMEI-25	352	ath-miR2934-3p	VvPMEI-27

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
79	ath-miR2936	VrPMEI-25	353	ath-miR391-3p	VvPMEI-27
80	ath-miR781a	VrPMEI-25	354	ath-miR5020a	VvPMEI-27
81	ath-miR781b	VrPMEI-25	355	ath-miR5020c	VvPMEI-27
82	ath-miR2934-3p	VrPMEI-26	356	ath-miR5651	VvPMEI-27
83	ath-miR391-3p	VrPMEI-26	357	ath-miR854a	VvPMEI-27
84	ath-miR5020a	VrPMEI-26	358	ath-miR854b	VvPMEI-27
85	ath-miR5020c	VrPMEI-26	359	ath-miR854c	VvPMEI-27
86	ath-miR5648-5p	VrPMEI-26	360	ath-miR854d	VvPMEI-27
87	ath-miR5651	VrPMEI-26	361	ath-miR854e	VvPMEI-27
88	ath-miR2934-3p	VrPMEI-27	362	ath-miR2934-3p	VvPMEI-28
89	ath-miR391-3p	VrPMEI-27	363	ath-miR391-3p	VvPMEI-28
90	ath-miR5020a	VrPMEI-27	364	ath-miR5020a	VvPMEI-28
91	ath-miR5020c	VrPMEI-27	365	ath-miR5020c	VvPMEI-28
92	ath-miR5648-5p	VrPMEI-27	366	ath-miR5651	VvPMEI-28
93	ath-miR5651	VrPMEI-27	367	ath-miR854a	VvPMEI-28
94	ath-miR5651	VrPMEI-28	368	ath-miR854b	VvPMEI-28
95	ath-miR5028	VrPMEI-29	369	ath-miR854c	VvPMEI-28
96	ath-miR836	VrPMEI-3	370	ath-miR854d	VvPMEI-28
97	ath-miR837-5p	VrPMEI-3	371	ath-miR854e	VvPMEI-28
98	ath-miR5630a	VrPMEI-30	372	ath-miR2934-3p	VvPMEI-29
99	ath-miR5630b	VrPMEI-30	373	ath-miR5648-5p	VvPMEI-29
100	ath-miR5638b	VrPMEI-30	374	ath-miR5651	VvPMEI-29
101	ath-miR172a	VrPMEI-31	375	ath-miR779.2	VvPMEI-29
102	ath-miR172b-3p	VrPMEI-31	376	ath-miR836	VvPMEI-3
103	ath-miR172c	VrPMEI-31	377	ath-miR837-5p	VvPMEI-3
104	ath-miR172d-3p	VrPMEI-31	378	ath-miR5019	VvPMEI-30
105	ath-miR1886.3	VrPMEI-31	379	ath-miR5028	VvPMEI-30
106	ath-miR5020a	VrPMEI-31	380	ath-miR1886.1	VvPMEI-31
107	ath-miR5021	VrPMEI-31	381	ath-miR5630a	VvPMEI-31
108	ath-miR5023	VrPMEI-31	382	ath-miR5630b	VvPMEI-31
109	ath-miR5641	VrPMEI-31	383	ath-miR5638b	VvPMEI-31
110	ath-miR5655	VrPMEI-31	384	ath-miR172a	VvPMEI-32
111	ath-miR826b	VrPMEI-31	385	ath-miR172b-3p	VvPMEI-32
112	ath-miR156h	VrPMEI-32	386	ath-miR172c	VvPMEI-32
113	ath-miR1886.2	VrPMEI-32	387	ath-miR172d-3p	VvPMEI-32
114	ath-miR396a-3p	VrPMEI-32	388	ath-miR1886.3	VvPMEI-32
115	ath-miR5021	VrPMEI-32	389	ath-miR5021	VvPMEI-32
116	ath-miR5023	VrPMEI-32	390	ath-miR5023	VvPMEI-32
117	ath-miR854a	VrPMEI-32	391	ath-miR5028	VvPMEI-32
118	ath-miR854b	VrPMEI-32	392	ath-miR5655	VvPMEI-32

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
119	ath-miR854c	VrPMEI-32	393	ath-miR826b	VvPMEI-32
120	ath-miR854d	VrPMEI-32	394	ath-miR1886.2	VvPMEI-33
121	ath-miR854e	VrPMEI-32	395	ath-miR3440b-3p	VvPMEI-33
122	ath-miR868-5p	VrPMEI-32	396	ath-miR3932a	VvPMEI-33
123	ath-miR157a-3p	VrPMEI-33	397	ath-miR3932b-3p	VvPMEI-33
124	ath-miR157b-3p	VrPMEI-33	398	ath-miR396a-3p	VvPMEI-33
125	ath-miR164a	VrPMEI-34	399	ath-miR417	VvPMEI-33
126	ath-miR164b-5p	VrPMEI-34	400	ath-miR5021	VvPMEI-33
127	ath-miR164c-5p	VrPMEI-34	401	ath-miR5658	VvPMEI-33
128	ath-miR5016	VrPMEI-34	402	ath-miR854a	VvPMEI-33
129	ath-miR5020c	VrPMEI-34	403	ath-miR854b	VvPMEI-33
130	ath-miR5658	VrPMEI-34	404	ath-miR854c	VvPMEI-33
131	ath-miR1886.1	VrPMEI-35	405	ath-miR854d	VvPMEI-33
132	ath-miR5021	VrPMEI-35	406	ath-miR854e	VvPMEI-33
133	ath-miR5660	VrPMEI-35	407	ath-miR868-5p	VvPMEI-33
134	ath-miR835-3p	VrPMEI-35	408	ath-miR164a	VvPMEI-35
135	ath-miR842	VrPMEI-35	409	ath-miR164b-5p	VvPMEI-35
136	ath-miR846-3p	VrPMEI-35	410	ath-miR164c-5p	VvPMEI-35
137	ath-miR842	VrPMEI-36	411	ath-miR5016	VvPMEI-35
138	ath-miR173-5p	VrPMEI-38	412	ath-miR5020c	VvPMEI-35
139	ath-miR5637	VrPMEI-38	413	ath-miR5658	VvPMEI-35
140	ath-miR5665	VrPMEI-39	414	ath-miR5660	VvPMEI-36
141	ath-miR774b-5p	VrPMEI-39	415	ath-miR842	VvPMEI-36
142	ath-miR826a	VrPMEI-39	416	ath-miR3440b-3p	VvPMEI-37
143	ath-miR847	VrPMEI-39	417	ath-miR397b	VvPMEI-39
144	ath-miR862-5p	VrPMEI-39	418	ath-miR5657	VvPMEI-39
145	ath-miR160c-3p	VrPMEI-4	419	ath-miR164b-3p	VvPMEI-4
146	ath-miR832-3p	VrPMEI-4	420	ath-miR397a	VvPMEI-4
147	ath-miR839-5p	VrPMEI-4	421	ath-miR397b	VvPMEI-4
148	ath-miR867	VrPMEI-4	422	ath-miR4243	VvPMEI-4
149	ath-miR870-3p	VrPMEI-4	423	ath-miR5020c	VvPMEI-4
150	ath-miR397b	VrPMEI-40	424	ath-miR5022	VvPMEI-4
151	ath-miR5657	VrPMEI-40	425	ath-miR5648-5p	VvPMEI-4
152	ath-miR158a-5p	VrPMEI-41	426	ath-miR5657	VvPMEI-4
153	ath-miR1886.1	VrPMEI-41	427	ath-miR830-3p	VvPMEI-4
154	ath-miR5021	VrPMEI-41	428	ath-miR865-5p	VvPMEI-4
155	ath-miR5658	VrPMEI-41	429	ath-miR1886.1	VvPMEI-40
156	ath-miR8181	VrPMEI-41	430	ath-miR419	VvPMEI-40
157	ath-miR1886.1	VrPMEI-42	431	ath-miR5021	VvPMEI-40
158	ath-miR5021	VrPMEI-42	432	ath-miR5658	VvPMEI-40

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
159	ath-miR5658	VrPMEI-42	433	ath-miR8170-3p	VvPMEI-40
160	ath-miR8181	VrPMEI-42	434	ath-miR8181	VvPMEI-40
161	ath-miR781a	VrPMEI-43	435	ath-miR8182	VvPMEI-40
162	ath-miR781b	VrPMEI-43	436	ath-miR823	VvPMEI-40
163	ath-miR5014a-3p	VrPMEI-5	437	ath-miR156a-3p	VvPMEI-41
164	ath-miR839-5p	VrPMEI-5	438	ath-miR157a-3p	VvPMEI-41
165	ath-miR841a-3p	VrPMEI-5	439	ath-miR157b-3p	VvPMEI-41
166	ath-miR156a-5p	VrPMEI-6	440	ath-miR173-3p	VvPMEI-41
167	ath-miR156b-5p	VrPMEI-6	441	ath-miR3434-3p	VvPMEI-41
168	ath-miR156c-5p	VrPMEI-6	442	ath-miR403-3p	VvPMEI-41
169	ath-miR156d-5p	VrPMEI-6	443	ath-miR5014a-5p	VvPMEI-41
170	ath-miR156e	VrPMEI-6	444	ath-miR5023	VvPMEI-41
171	ath-miR156f-5p	VrPMEI-6	445	ath-miR5631	VvPMEI-41
172	ath-miR156g	VrPMEI-6	446	ath-miR5645a	VvPMEI-41
173	ath-miR156i	VrPMEI-6	447	ath-miR5645b	VvPMEI-41
174	ath-miR156j	VrPMEI-6	448	ath-miR5645d	VvPMEI-41
175	ath-miR5998a	VrPMEI-6	449	ath-miR5645e	VvPMEI-41
176	ath-miR5998b	VrPMEI-6	450	ath-miR5645f	VvPMEI-41
177	ath-miR8166	VrPMEI-6	451	ath-miR5648-5p	VvPMEI-41
178	ath-miR836	VrPMEI-6	452	ath-miR5650	VvPMEI-41
179	ath-miR156a-3p	VrPMEI-7	453	ath-miR5657	VvPMEI-41
180	ath-miR157a-3p	VrPMEI-7	454	ath-miR5665	VvPMEI-41
181	ath-miR157b-3p	VrPMEI-7	455	ath-miR781a	VvPMEI-41
182	ath-miR173-3p	VrPMEI-7	456	ath-miR781b	VvPMEI-41
183	ath-miR3434-3p	VrPMEI-7	457	ath-miR8181	VvPMEI-41
184	ath-miR5014a-5p	VrPMEI-7	458	ath-miR854a	VvPMEI-41
185	ath-miR5631	VrPMEI-7	459	ath-miR854b	VvPMEI-41
186	ath-miR5645a	VrPMEI-7	460	ath-miR854c	VvPMEI-41
187	ath-miR5645b	VrPMEI-7	461	ath-miR854d	VvPMEI-41
188	ath-miR5645d	VrPMEI-7	462	ath-miR854e	VvPMEI-41
189	ath-miR5645e	VrPMEI-7	463	ath-miR864-3p	VvPMEI-41
190	ath-miR5645f	VrPMEI-7	464	ath-miR156a-5p	VvPMEI-42
191	ath-miR5657	VrPMEI-7	465	ath-miR156b-5p	VvPMEI-42
192	ath-miR781a	VrPMEI-7	466	ath-miR156c-5p	VvPMEI-42
193	ath-miR781b	VrPMEI-7	467	ath-miR156d-5p	VvPMEI-42
194	ath-miR8170-5p	VrPMEI-7	468	ath-miR156e	VvPMEI-42
195	ath-miR854a	VrPMEI-7	469	ath-miR156f-5p	VvPMEI-42
196	ath-miR854b	VrPMEI-7	470	ath-miR156g	VvPMEI-42
197	ath-miR854c	VrPMEI-7	471	ath-miR156i	VvPMEI-42
198	ath-miR854d	VrPMEI-7	472	ath-miR156j	VvPMEI-42

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
199	ath-miR854e	VrPMEI-7	473	ath-miR5998a	VvPMEI-42
200	ath-miR2938	VrPMEI-8	474	ath-miR5998b	VvPMEI-42
201	ath-miR398a-5p	VrPMEI-8	475	ath-miR8166	VvPMEI-42
202	ath-miR398b-5p	VrPMEI-8	476	ath-miR836	VvPMEI-42
203	ath-miR398c-5p	VrPMEI-8	477	ath-miR156a-5p	VvPMEI-43
204	ath-miR5021	VrPMEI-8	478	ath-miR156b-5p	VvPMEI-43
205	ath-miR773b-3p	VrPMEI-8	479	ath-miR156c-5p	VvPMEI-43
206	ath-miR8167a	VrPMEI-8	480	ath-miR156d-5p	VvPMEI-43
207	ath-miR8167b	VrPMEI-8	481	ath-miR156e	VvPMEI-43
208	ath-miR8167c	VrPMEI-8	482	ath-miR156f-5p	VvPMEI-43
209	ath-miR8167d	VrPMEI-8	483	ath-miR156g	VvPMEI-43
210	ath-miR8167e	VrPMEI-8	484	ath-miR156i	VvPMEI-43
211	ath-miR8167f	VrPMEI-8	485	ath-miR156j	VvPMEI-43
212	ath-miR8170-3p	VrPMEI-8	486	ath-miR5998a	VvPMEI-43
213	ath-miR870-3p	VrPMEI-8	487	ath-miR5998b	VvPMEI-43
214	ath-miR156a-5p	VrPMEI-9	488	ath-miR8166	VvPMEI-43
215	ath-miR156b-5p	VrPMEI-9	489	ath-miR836	VvPMEI-43
216	ath-miR156c-5p	VrPMEI-9	490	ath-miR156a-5p	VvPMEI-44
217	ath-miR156d-5p	VrPMEI-9	491	ath-miR156b-5p	VvPMEI-44
218	ath-miR156e	VrPMEI-9	492	ath-miR156c-5p	VvPMEI-44
219	ath-miR156f-5p	VrPMEI-9	493	ath-miR156d-5p	VvPMEI-44
220	ath-miR156g	VrPMEI-9	494	ath-miR156e	VvPMEI-44
221	ath-miR156h	VrPMEI-9	495	ath-miR156f-5p	VvPMEI-44
222	ath-miR156i	VrPMEI-9	496	ath-miR156g	VvPMEI-44
223	ath-miR156j	VrPMEI-9	497	ath-miR156i	VvPMEI-44
224	ath-miR401	VrPMEI-9	498	ath-miR156j	VvPMEI-44
225	ath-miR419	VrPMEI-9	499	ath-miR5998a	VvPMEI-44
226	ath-miR5641	VrPMEI-9	500	ath-miR5998b	VvPMEI-44
227	ath-miR5658	VrPMEI-9	501	ath-miR8166	VvPMEI-44
228	ath-miR774b-5p	VrPMEI-9	502	ath-miR836	VvPMEI-44
229	ath-miR835-5p	VrPMEI-9	503	ath-miR3440b-3p	VvPMEI-45
230	ath-miR1887	VvPMEI-1	504	ath-miR5014a-3p	VvPMEI-45
231	ath-miR396b-3p	VvPMEI-1	505	ath-miR839-5p	VvPMEI-45
232	ath-miR156a-5p	VvPMEI-10	506	ath-miR841a-3p	VvPMEI-45
233	ath-miR156b-5p	VvPMEI-10	507	ath-miR841b-3p	VvPMEI-45
234	ath-miR156c-5p	VvPMEI-10	508	ath-miR160c-3p	VvPMEI-46
235	ath-miR156d-5p	VvPMEI-10	509	ath-miR832-3p	VvPMEI-46
236	ath-miR156e	VvPMEI-10	510	ath-miR839-5p	VvPMEI-46

Tablo 5. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Arabidopsis thaliana*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
237	ath-miR156f-5p	VvPMEI-10	511	ath-miR867	VvPMEI-46
238	ath-miR156g	VvPMEI-10	512	ath-miR870-3p	VvPMEI-46
239	ath-miR156h	VvPMEI-10	513	ath-miR164b-3p	VvPMEI-5
240	ath-miR156i	VvPMEI-10	514	ath-miR397a	VvPMEI-5
241	ath-miR156j	VvPMEI-10	515	ath-miR397b	VvPMEI-5
242	ath-miR390a-5p	VvPMEI-10	516	ath-miR4243	VvPMEI-5
243	ath-miR390b-5p	VvPMEI-10	517	ath-miR5020c	VvPMEI-5
244	ath-miR395a	VvPMEI-10	518	ath-miR5022	VvPMEI-5
245	ath-miR395d	VvPMEI-10	519	ath-miR5648-5p	VvPMEI-5
246	ath-miR395e	VvPMEI-10	520	ath-miR5657	VvPMEI-5
247	ath-miR401	VvPMEI-10	521	ath-miR830-3p	VvPMEI-5
248	ath-miR415	VvPMEI-10	522	ath-miR865-5p	VvPMEI-5
249	ath-miR419	VvPMEI-10	523	ath-miR1886.3	VvPMEI-6
250	ath-miR5641	VvPMEI-10	524	ath-miR2936	VvPMEI-6
251	ath-miR5658	VvPMEI-10	525	ath-miR4221	VvPMEI-6
252	ath-miR5658	VvPMEI-10	526	ath-miR4221	VvPMEI-6
253	ath-miR774b-5p	VvPMEI-10	527	ath-miR5013	VvPMEI-6
254	ath-miR835-5p	VvPMEI-10	528	ath-miR5021	VvPMEI-6
255	ath-miR837-3p	VvPMEI-10	529	ath-miR5021	VvPMEI-6
256	ath-miR164a	VvPMEI-12	530	ath-miR5640	VvPMEI-6
257	ath-miR164b-5p	VvPMEI-12	531	ath-miR5640	VvPMEI-6
258	ath-miR164c-5p	VvPMEI-12	532	ath-miR5650	VvPMEI-6
259	ath-miR398a-5p	VvPMEI-12	533	ath-miR857	VvPMEI-6
260	ath-miR5021	VvPMEI-12	534	ath-miR2938	VvPMEI-7
261	ath-miR3440b-3p	VvPMEI-13	535	ath-miR398a-5p	VvPMEI-7
262	ath-miR399b	VvPMEI-13	536	ath-miR398b-5p	VvPMEI-7
263	ath-miR399c-3p	VvPMEI-13	537	ath-miR398c-5p	VvPMEI-7
264	ath-miR5632-3p	VvPMEI-13	538	ath-miR5021	VvPMEI-7
265	ath-miR8172	VvPMEI-13	539	ath-miR773b-3p	VvPMEI-7
266	ath-miR8181	VvPMEI-13	540	ath-miR8170-3p	VvPMEI-7
267	ath-miR5020a	VvPMEI-14	541	ath-miR870-3p	VvPMEI-7
268	ath-miR5021	VvPMEI-14	542	ath-miR773a	VvPMEI-8
269	ath-miR5658	VvPMEI-14	543	ath-miR414	VvPMEI-9
270	ath-miR5665	VvPMEI-14	544	ath-miR426	VvPMEI-9
271	ath-miR159a	VvPMEI-15	545	ath-miR5028	VvPMEI-9
272	ath-miR159b-3p	VvPMEI-15	546	ath-miR5648-5p	VvPMEI-9
273	ath-miR159c	VvPMEI-15	547	ath-miR833a-5p	VvPMEI-9
274	ath-miR4228-5p	VvPMEI-15	548	ath-miR842	VvPMEI-9

VvPMEI ve *VrPMEI* genleri aynı zamanda psRNA target çevrimiçi aracında bulunan *Vitis vinifera* türüne ait 186 adet miRNA için de hedef genleri bulmak amacıyla karşılaştırılmıştır. *VvPMEI* genleri için toplamda 94 kez hedeflendikleri, en çok hedeflenen genin *VvPMEI-10* geni olduğu, en çok hedefleyen ailenin ise vvi-miR-156 ailesi olduğu saptanmıştır. *VvPMEI-1*, *VvPMEI-7* ile *VvPMEI-23* genleri sadece bir kez vvi-miR156a, vvi-miR3639-3p ve vvi-miR3623-5p tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Bu miRNA'ların *VvPMEI* genleri ile hedef spesifik genler olduğu söylenebilir. vvi-miR3624-5p no'lu miRNA ise sadece bir kez *VvPMEI-18* genini hedeflediği bulunmuştur. Bu durum gen ve miRNA arasında hayli özgül bir ilişki olduğunu gösteriyor olabilir.

VrPMEI genleri için ise *VrPMEI-6* ve *VrPMEI-9* genlerinin en çok hedeflenen genler olduğu, *VrPMEI-1*, *VrPMEI-15*, *VrPMEI-30*, *VrPMEI-31*, *VrPMEI-33*, *VrPMEI-35*, *VrPMEI-36*, *VrPMEI-38* ve *VrPMEI-43* genleri tek bir miRNA tarafından hedeflenmişlerdir (vvi-miR156a, vvi-miR159c, vvi-miR3631a-3p, vvi-miR3633a-5p, vvi-miR3637-5p, vvi-miR3633a-5p, vvi-miR3633a-5p, vvi-miR3632-5p ve vvi-miR3623-5p). *VrPMEI* genlerinde 47 kez miRNA hedeflenmesi bulunduğu, her iki tür için toplamda 141 adet hedeflenme saptandığı görülmüştür. *VvPMEI-1* ve *VrPMEI-1* genleri her iki tür içinde ortak olarak vvi-miR156a tarafından hedeflenmesi ve ortak filogenetik ağaçta birbirlerine en benzer genler olarak bulunmasından dolayı, bu genlerin her iki tür içinde ortak olduğu tahminlenebilmektedir.

Vitis vinifera ve *Vitis riparia* için psRNA target çevrimiçi aracından 186 adet bilinen *Vitis vinifera* miRNA'ları için elde edilen miRNA ve hedeflerini gösteren veriler Tablo 6 'da verilmiştir.

Tablo 6. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar (*Vitis vinifera*)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
1	vvi-miR156a	VrPMEI-1	72	vvi-miR3633a-5p	VvPMEI-13
2	vvi-miR164a	VrPMEI-12	73	vvi-miR399a	VvPMEI-13
3	vvi-miR164c	VrPMEI-12	74	vvi-miR399b	VvPMEI-13
4	vvi-miR164d	VrPMEI-12	75	vvi-miR399c	VvPMEI-13
5	vvi-miR159c	VrPMEI-15	76	vvi-miR399f	VvPMEI-13
6	vvi-miR169r	VrPMEI-16	77	vvi-miR399h	VvPMEI-13
7	vvi-miR169t	VrPMEI-16	78	vvi-miR169r	VvPMEI-14
8	vvi-miR169u	VrPMEI-16	79	vvi-miR169t	VvPMEI-14
9	vvi-miR399a	VrPMEI-17	80	vvi-miR169u	VvPMEI-14
10	vvi-miR399b	VrPMEI-17	81	vvi-miR159c	VvPMEI-15
11	vvi-miR399c	VrPMEI-17	82	vvi-miR477b-3p	VvPMEI-15
12	vvi-miR399f	VrPMEI-17	83	vvi-miR3624-5p	VvPMEI-18
13	vvi-miR399h	VrPMEI-17	84	vvi-miR535a	VvPMEI-18
14	vvi-miR390	VrPMEI-2	85	vvi-miR535b	VvPMEI-18
15	vvi-miR828a	VrPMEI-2	86	vvi-miR535c	VvPMEI-18
16	vvi-miR390	VrPMEI-22	87	vvi-miR828a	VvPMEI-2
17	vvi-miR3629a-3p	VrPMEI-3	88	vvi-miR390	VvPMEI-20
18	vvi-miR3629b	VrPMEI-3	89	vvi-miR3623-5p	VvPMEI-23
19	vvi-miR3629c	VrPMEI-3	90	vvi-miR172a	VvPMEI-24
20	vvi-miR3630-5p	VrPMEI-3	91	vvi-miR172b	VvPMEI-24
21	vvi-miR3631a-3p	VrPMEI-30	92	vvi-miR171a	VvPMEI-26
22	vvi-miR3633a-5p	VrPMEI-31	93	vvi-miR171c	VvPMEI-26
23	vvi-miR3637-5p	VrPMEI-33	94	vvi-miR171d	VvPMEI-26
24	vvi-miR164a	VrPMEI-34	95	vvi-miR171i	VvPMEI-26
25	vvi-miR164b	VrPMEI-34	96	vvi-miR171j	VvPMEI-26
26	vvi-miR164c	VrPMEI-34	97	vvi-miR3629a-3p	VvPMEI-3
27	vvi-miR164d	VrPMEI-34	98	vvi-miR3629b	VvPMEI-3
28	vvi-miR3633a-5p	VrPMEI-35	99	vvi-miR3629c	VvPMEI-3
29	vvi-miR3633a-5p	VrPMEI-36	100	vvi-miR3630-5p	VvPMEI-3
30	vvi-miR3632-5p	VrPMEI-38	101	vvi-miR3633a-5p	VvPMEI-32
31	vvi-miR3623-5p	VrPMEI-43	102	vvi-miR3636-5p	VvPMEI-33
32	vvi-miR156a	VrPMEI-6	103	vvi-miR164a	VvPMEI-35
33	vvi-miR156b	VrPMEI-6	104	vvi-miR164b	VvPMEI-35
34	vvi-miR156c	VrPMEI-6	105	vvi-miR164c	VvPMEI-35

Tablo 6. *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia*'da hedeflenen genler ve hedefleyen miRNA'lar
(*Vitis vinifera*) (devam)

No	miRNA	Hedef	No	miRNA	Hedef
35	vvi-miR156d	VrPMEI-6	106	vvi-miR164d	VvPMEI-35
36	vvi-miR156e	VrPMEI-6	107	vvi-miR3633a-5p	VvPMEI-36
37	vvi-miR156h	VrPMEI-6	108	vvi-miR3633a-5p	VvPMEI-37
38	vvi-miR3623-3p	VrPMEI-7	109	vvi-miR169v	VvPMEI-4
39	vvi-miR3629a-5p	VrPMEI-7	110	vvi-miR397a	VvPMEI-4
40	vvi-miR477b-3p	VrPMEI-7	111	vvi-miR3629a-5p	VvPMEI-41
41	vvi-miR3639-3p	VrPMEI-8	112	vvi-miR403a	VvPMEI-41
42	vvi-miR156a	VrPMEI-9	113	vvi-miR403b	VvPMEI-41
43	vvi-miR156b	VrPMEI-9	114	vvi-miR403c	VvPMEI-41
44	vvi-miR156c	VrPMEI-9	115	vvi-miR403d	VvPMEI-41
45	vvi-miR156d	VrPMEI-9	116	vvi-miR403e	VvPMEI-41
46	vvi-miR156e	VrPMEI-9	117	vvi-miR403f	VvPMEI-41
47	vvi-miR156h	VrPMEI-9	118	vvi-miR477b-3p	VvPMEI-41
48	vvi-miR156a	VvPMEI-1	119	vvi-miR156a	VvPMEI-42
49	vvi-miR156a	VvPMEI-10	120	vvi-miR156b	VvPMEI-42
50	vvi-miR156b	VvPMEI-10	121	vvi-miR156c	VvPMEI-42
51	vvi-miR156c	VvPMEI-10	122	vvi-miR156d	VvPMEI-42
52	vvi-miR156d	VvPMEI-10	123	vvi-miR156e	VvPMEI-42
53	vvi-miR156e	VvPMEI-10	124	vvi-miR156h	VvPMEI-42
54	vvi-miR156h	VvPMEI-10	125	vvi-miR156a	VvPMEI-43
55	vvi-miR390	VvPMEI-10	126	vvi-miR156b	VvPMEI-43
56	vvi-miR395a	VvPMEI-10	127	vvi-miR156c	VvPMEI-43
57	vvi-miR395b	VvPMEI-10	128	vvi-miR156d	VvPMEI-43
58	vvi-miR395c	VvPMEI-10	129	vvi-miR156e	VvPMEI-43
59	vvi-miR395d	VvPMEI-10	130	vvi-miR156h	VvPMEI-43
60	vvi-miR395e	VvPMEI-10	131	vvi-miR156a	VvPMEI-44
61	vvi-miR395f	VvPMEI-10	132	vvi-miR156b	VvPMEI-44
62	vvi-miR395g	VvPMEI-10	133	vvi-miR156c	VvPMEI-44
63	vvi-miR395h	VvPMEI-10	134	vvi-miR156d	VvPMEI-44
64	vvi-miR395i	VvPMEI-10	135	vvi-miR156e	VvPMEI-44
65	vvi-miR395j	VvPMEI-10	136	vvi-miR156h	VvPMEI-44
66	vvi-miR395k	VvPMEI-10	137	vvi-miR169v	VvPMEI-5
67	vvi-miR395l	VvPMEI-10	138	vvi-miR397a	VvPMEI-5
68	vvi-miR395m	VvPMEI-10	139	vvi-miR3636-3p	VvPMEI-6
69	vvi-miR164a	VvPMEI-12	140	vvi-miR477b-3p	VvPMEI-6
70	vvi-miR164c	VvPMEI-12	141	vvi-miR3639-3p	VvPMEI-7
71	vvi-miR164d	VvPMEI-12	Toplam		141

3.7. In-silico PCR

FastPCR programı aracılığı ile NCBI veritabanından indirilen SRA (Sequence Read Archive) dosyalarında bulunan tuz stresi uygulanmış örnekler için dizileme verileri üzerinde yayınlanan çalışmalardan saptanan PME1 genleri ile ilişkili primerler kullanarak Real-Time PCR yönteminin bilgisayarda simülasyonu gerçekleştirilmiştir.

SRA dosyalarında bulunan çalışmada uygulanan tuz stresini takiben 1. haftada kök ve yapraklardan elde edilen kontrol ve deneme gruplarına ait dizileme sonuçları bulunmaktadır. Actin geni housekeeping gen olarak kullanılmış ve gen ekspresyon düzeyindeki değişimler incelenmiştir.

Vitis vinifera yapraklarında tuz stresini takiben 1. haftada alınan örneklerin dizileri üzerinden elde edilen sonuçlara göre tüm primerler için gen ekspresyonunda belirgin bir azalma görülmüştür. Köklerde ise gen ekspresyonunda kontrole göre bir artış tespit edilmiştir. *Vitis riparia*'da tüm primerler için yapraklarda gen ekspresyonunda bir artış bulunmuş, benzer şekilde köklerde de tüm primerler için gen ekspresyonunda bir artış görüldüğü saptanmıştır ve *in-silico* PCR sonuçlarına ait veriler Tablo 7'de verilmiştir.

Vitis vinifera yapraklarında kontrole göre ortalama 3.32 düzeyinde bir azalma gerçekleşmiş, en yüksek azalma 4.25 ile 1G114500 no'lu primerde gerçekleşmiştir. Köklerde ise ortalama 0.65 düzeyinde bir artış görülmüş ve en yüksek artışın 0.76 ile 2G279800 no'lu primer tarafından saptandığı bulunmuştur. *Vitis riparia* yapraklarında ortalama 0.84 oranında bir artış bulunmuş, en yüksek artışın sırasıyla Aktin ve 2G279800 no'lu primerde 0.88 ve 0.89 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. *Vitis riparia* köklerinde gen ekspresyonunun ortalama 0.60 düzeyinde arttığı, en yüksek artışın 0.67 ile 1G330900 no'lu primerde görüldüğü, en az artışın ise 0.48 ile 1G114500 no'lu primerde olduğu tespit edilmiştir.

In-silico PCR sonuçları, stres uygulanan bitkilerde gen ekspresyonu değişimlerini tespit etmek için *in-vitro* Real-Time PCR çalışmalarına geçmeden önce FastPCR programı aracılığı ile bilgisayar ortamında primerlerin ve gen ekspresyonlarının simülasyonunun yapılmasının yapılan çalışmalarda zaman ve maliyet açısından önemli bir katkı sağlayacağını göstermektedir.

Tablo 7. *In-silico* PCR sonuçları

Primer	<i>Vitis vinifera</i> Yaprak-Kontrol	Ekspresyon	Primer	<i>Vitis vinifera</i> Yaprak-Tuz Stresi	Ekspresyon	Oran
Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	510	Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	160	3.19
1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	882	1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	251	3.51
1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	557	1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	131	4.25
1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	982	1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	274	3.58
2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	738	2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	287	2.57
2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	804	2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	285	2.82
Primer	<i>Vitis vinifera</i> Kök-Kontrol	Ekspresyon	Primer	<i>Vitis vinifera</i> Kök-Tuz Stresi	Ekspresyon	Oran
Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	132	Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	240	0.55
1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	219	1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	329	0.67
1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	133	1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	229	0.58
1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	272	1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	425	0.64
2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	282	2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	395	0.71
2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	252	2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	331	0.76
Primer	<i>Vitis riparia</i> Yaprak-Kontrol	Ekspresyon	Primer	<i>Vitis riparia</i> Yaprak-Tuz Stresi	Ekspresyon	Oran
Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	172	Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	196	0.88
1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	252	1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	319	0.79
1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	155	1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	203	0.76
1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	344	1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	419	0.82
2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	300	2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	343	0.87
2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	293	2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	330	0.89
Primer	<i>Vitis riparia</i> Kök-Kontrol	Ekspresyon	Primer	<i>Vitis riparia</i> Kök-Tuz Stresi	Ekspresyon	Oran
Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	150	Aktin	gattccgggtgccagaagtccagcagcttcattccaa	237	0.63
1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	202	1G113800	tgctcttcttctgtaacttttgtctgatgaagcccataaaagaaca	334	0.60
1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	105	1G114500	ggtgtaccctactgtctttccatagttcggtgtctgttt	218	0.48
1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	294	1G330900	gttggttttgaccgttggaatgatgaagacggagagaatgga	441	0.67
2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	250	2G279700	ccccgacaagattttctggaggcagtgaggaggagt	401	0.62
2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	243	2G279800	cacaaccacatacccacttgaaactacggaagaggc	408	0.60

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Pektin metil esteraz inhibitörleri bitkilerde hücre duvarının ana bileşenlerinden biri olan pektinin üretimi ve metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Pektin metil esteraz inhibitörleri (PMEI) model organizma olan *Arabidopsis* 'te 71 adet bulunmuş, pirinç ve ketende ise sırasıyla 49 ve 95 tane saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda aynı alt gruplarda yer alan gen çiftlerinde gen yapısı ve korunmuş motif örüntüsü açısından benzerlikler olduğu bulunmuştur. Mısır'da (*Zea mays*) 49 adet PMEİ geni bulunmuş ve bu genler *ZmPMEI1-49* olarak adlandırılmışlardır. Protein uzunluklarının 149 (*ZmPME23*) ile 1.360 (*ZmPME28*) aminoasit arasında değiştiği ve ortalama 346 aminoasit uzunluğunda oldukları saptanmıştır, izoelektrik noktaları (pI) 4,28 ile 10,23 arasında değişmiş, mısır bitkisinin tüm 10 kromozomuna dağıldığı ve kromozom 1, 2, 3, 7 ve 8'de diğerlerinden daha fazla *ZmPMEI* geni olduğu, filogeniye dayanarak, bitkilerdeki PME ve PMEİ ailelerinin 5 ve 12 gruba ayrıldığını, *ZmPME/PMEI*'lerin evrimde korunan bir işleve sahip olabileceği bildirilmiştir [61]. Kolza bitkisinde (*Brassica napus*) yürütülen bir çalışmada 190 PMEİ geni bulunmuş ve *BnPMEI* olarak adlandırılmıştır. Toplam 190 PMEİ proteininin uzunluğu 65 ila 356 amino asit arasında değiştiği, ortalama uzunluğun 189 aminoasit olduğu, moleküler ağırlıklarının MW 6901,94 ila 38796,47 Da arasında bulunduğu, isoelektrik noktalarının pI 4,18 ila 11,87 arasında olduğu bulunmuştur. *BnPMEI*'lerin çoğunluğu hücre dışı hücre duvarı matrisinde yer aldığı saptanmıştır. *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir araştırmada AtPMEİ proteinlerinin hücre duvarında salgılandığı bildirilmiştir [62,63]., *BnPMEI* genlerinin çoğunun (140/190) DNA dizilerinde kodlama dizisini bozan herhangi bir intron olmaksızın yalnızca bir ekzon bulunduğu saptanmıştır. Kromozom analizi sonucunda *BnPMEI* genlerinin 19 kromozomda dağıldığını bildirmişlerdir. Çalışmalardan elde edilen bulguların tez sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Çay bitkisinde (*Camellia sinensis*) 51 *CsPMEI* geni tanımlanmış, uzunlukları 420 ila 924 bp arasında, aminoasit sayısının 139 ila 307 aa arasında değiştiği, moleküler ağırlıklarının 15,48 ila 34,12 kD olduğu ve teorik izoelektrik noktalarının 3,93 ila 9,76 pIs arasında bulunmuştur. Toplamda 35'ten fazla *CsPMEI*'nin sitoplazmada bulunan kararlı proteinler olduğu tahmin edilmiştir [64].

Cennet hurması (*Diospyros kaki*)’da yürütülen bir çalışmada 29 *DkPMEI* geni tanımlanmış ve *DkPMEI1- DkPMEI29* olarak adlandırılmıştır *DkPMEI*’nin moleküler ağırlıklarının 6762,71 Da (*DkPMEI17*)-103.158,13 Da (*DkPMEI29*) arasında olduğu, kodlanan amino asitlerin 66 (*DkPMEI17*) ile 918 (*DkPMEI29*) aa uzunluğu arasında değiştiği ve pI değerlerinin 4,25 (*DkPMEI17*) ile 11,07 (*DkPMEI14*) olduğu belirlenmiştir. Tez bulguları ile benzer bir şekilde *DkPMEI* genlerindeki ekzon sayısının 1 ile 10 arasında bulunduğu, sadece 7 gende intron saptandığı ve çoğu *DkPMEI* geninde intron olmadığını bildirmiştir [65].

Lahana (*Brassica oleracea*) bitkisinde *PMEI* genlerinin saptanması ve sınıflandırılması için yürütülen bir araştırmanın sonucunda 95 tane *PMEI* geni saptanmıştır, bu genler *BoPMEI* olarak adlandırılmıştır. Kromozomal lokasyonların analizi, *BoPMEI1-BoPMEI79*’un dokuz kromozomda görünüşte eşit olmayan bir şekilde dağıldığını ve kalan 16 tanesinin scaffold olarak haritalandığını bildirmiştir. Sahip olunan kromozom başına *BoPMEI* genlerinin sayısı 2 ile 16 arasında bulunmuştur. Bu genlerin büyük çoğunluğunda intron olmadığı bulunmuştur. Bulunan 95 adet *BoPMEI* geni tarafından kodlanan peptit sayısı 80 aa (*BoPMEI8*) ile 393 aa (*BoPMEI31*) arasında değiştiği ve moleküler ağırlıklarının 9,01 kDa ile 43,04 kDa arasında olduğu saptanmıştır. İzoelektrik noktaları ise 3,93 (*BoPMEI7*) ile 11,24 (*BoPMEI30*) arasında tespit edilmiştir. Bulunan *BoPMEI* genlerinin yerleşimlerinin ekstrasellular olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları ile tez çalışması bulgularının uyumlu olduğu görülmüştür [66]. Soya fasulyesi genomunda toplam 127 *GmPMEI* geni bulunmuş, tanımlanan genlerin eşit olmayan bir biçimde 20 kromozoma dağıldığı bulunmuş, eşit olmayan dağılımın gen replikasyonları ve kısmi gen kopyalarından kaynaklanabileceğini, intronların ise bitkilerin evriminde bitki evrimi sırasında gen ailesi genişlemeleriyle ilişkili olduğu ve zaman içinde kademeli olarak silindiklerini bildirmişlerdir [66].

Arabidopsis model bitkisinde tanımlanan miRNA ile karşılaştırılarak elde edilen sonuçlarda, *VvPMEI* genleri için toplam 319 miRNA hedefi saptanmıştır. *VvPMEI* genleri için, en fazla hedeflenen genlerin *VvPMEI-10* ve *VvPMEI-41* olduğu görülmüştür. *VvPMEI-10* genini en fazla hedefleyen miRNA’lar ath-miR-156 ailesi olduğu görülmüştür. ath-miR-156 ailesi SPL (SQUAMOSA-promoter binding protein-like) gen ailesi aracılığı ile kök gelişimi, çiçeklenme, meyve oluşumu, meyve gelişimi ve olgunlaşma esnasında gen regülasyonunda görev almaktadırlar [68].

VvPMEI-10 geninin *ath-miR-156* ailesi tarafından yüksek oranda hedeflenmesi, bu genin bitkinin çiçeklenme, döl tutma ve meyve oluşumu dönemlerinde belirli bir rolü olabileceğini göstermektedir. *VvPMEI-41* geni ise bir çok farklı miRNA tarafından hedeflenmektedir, bu genin birbirinden farklı gen regulasyonlarını içeren bir yolda görev aldığını düşündürmektedir *ath-miR-854* ailesi de *VvPMEI* genlerinde en çok gen hedefleyen ailelerdendir. *miR-854* prekürsör ailesi, *miR-855* ile beraber hayvanlarda ve çiçekli bitkilerde tek ortak olan iki aileden biridir. Yapılan bir çalışmada *mMir-854*'ün pirinçte kuraklık stresi altında çiçeklenme döneminde gen ekspresyonunun arttığı, kükürt (sülfür) metabolizması ile ubiquinon biyosentezinde yer aldığı, oldukça korunmuş bir yapısı olduğu ve hayvan ve bitkilerde ortak olması nedeniyle temel transkripsiyon mekanizmasının düzenleyicilerinden biri olduğu belirtilmiştir [69]. *ath-miR-854*'ün en çok hedef aldığı *VvPMEI-15*, *VvPMEI-27* ve *VvPMEI-28* genlerinin kuraklık stresi altında gen ekspresyonlarının incelenmesi, kuraklık stresine dayanıklılık ile ilgili gen regulasyonlarının anlaşılmasında yardımcı olabilecektir.

VvPMEI-8, *VvPMEI-21* ve *VvPMEI-37* genlerini hedefleyen *ath-miR773a*, *ath-miR5022* ve *ath-miR3440b-3p* adlı mikro RNA'lar incelendiğinde, *ath-miR-773*'ün *Arabidopsis*'te kısıtlı N (azot koşulları altında gen ekspresyonunun arttığı ancak karbon (C) kısıtlı olduğu koşullarda ise ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. DNA metiltransferaz kodlayan bir geni hedeflediği, karbon ve azot eksikliği koşullarında bitkilerin büyümesi ve gelişmesinde rol oynadığı bildirilmiştir [70]. Bunun yanı sıra *ath-miR-773*'ün *Arabidopsis*'te fungal patojenlere karşı immün yanıtta yer aldığı bildirilmiştir [71]. *ath-miR5022* ise polen ve sprem hücrelerinde eksprese olan yeni bir miRNA olarak tespit edilmiştir [72]. *ath-miR3440b-3p*'nin hedef genlerde metilasyonu sağladığı bulunmuştur [73]. miRNA ve hedef genlerin çeşitliliği *PMEI* genlerinin bir çok yolda ve farklı dokuda görev aldığını göstermektedir. *VvPMEI-8* ve *ath-miR773a* ilişkisi nedeniyle bu *PMEI* geninin azot eksikliğinde bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

VrPMEI genleri için benzer şekilde en fazla hedefleyen miRNA'ların *ath-miR156* ailesi olduğu görülmüştür. En fazla hedefledikleri genler olan *VrPMEI-6* ve *VrPMEI-9* genlerinin bitkinin gelişiminde, çiçeklenme, meyve oluşumu ve olgunlaşmasındaki rolleri değerlendirilmelidir. *VrPMEI-21*, *VrPMEI-28* ve *VrPMEI-29* genlerinin sadece bir kez *ath-miR-5022*, *ath-miR-5651* ve *ath-miR-5028* tarafından

hedeflendikleri bulunmuştur. *VvPMEI-21* ve *VrPMEI-21* genleri iki türde de ortak olarak tek bir miRNA tarafından (ath-miR-5022) tarafından hedeflenmişlerdir. ath-miR-5022'nin polen ve sperm hücrelerinde eksprese olduğu değerlendirildiğinde *VvPMEI-21* ve *VrPMEI-21* genlerinin polen ve sperm oluşumu ile ilgili olabilecekleri söylenebilir. *VrPMEI-28* ve *VrPMEI-29* genlerini hedefleyen miR-5651'in meristematik dokularda ifade edildiği, ath-miR-5028'nin ise mantar patojeni *Fusarium graminearum* enfeksiyonunda gen ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir [74, 75].

VvPMEI genleri ve hedefleyen miRNA'lar için *Vitis vinifera*'da tanımlanan miRNA karşılaştırıldığında; en çok hedeflenen genin *VvPMEI-10* geni olduğu, *VvPMEI-10* genini en fazla hedefleyen miRNA'ların vvi-miR-156 ve vvi-miR-395 aile üyeleri olduğu görülmüştür. vvi-miR-156 ailesi üyeleri benzer şekilde çiçeklenme, köklenme, meyve olgunlaşması gibi bitkinin gelişimi ile ilgili olaylarda rol almaktadır. vvi-miR-395 aile üyeleri *Vitis vinifera*'da kök, yaprak, kallus ve stemde ifade edildiği, ben düşme döneminde ekspresyonlarının belirgin bir biçimde arttığı, ben düşme döneminde keskin bir artış gösteren miR-395'in üzümün olgunlaşmasında tarımsal öneme sahip bir özellik olabileceği bildirilmiştir. miR395'in hem sülfat taşıyıcılarını hem de ATP sülfürlaz genlerini hedef alarak kükürt metabolizmasının düzenlenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. ATP sülfürlazlar ile meyve olgunlaşması arasında doğrudan bir bağlantı gösterilmemiştir, ancak Glutasyon S-transferazının meyve olgunlaşması ve özellikle meyve gelişimi sırasında renklenme ile güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu düşünülmektedir [76, 77]. *VvPMEI-10* geninin hem vvi-miR-156 hem de vvi-miR-395 üyeleri tarafından hedeflenmesi bu genin bitki gelişimi, özellikle meyve olgunlaşmasında, renk gelişimi ve olgunlaşma ile ilişkisinin değerlendirilmesini, verim ile ilgili bir markır olarak potansiyelinin araştırılmasını gerektirmektedir. Benzer şekilde *VrPMEI* genlerinde en fazla hedeflenen genlerden biri olan *VrPMEI-9* geninin ortak filogenetik ağaçta *VvPMEI-10* geniyle en benzer çıkması nedeniyle *VrPMEI-9* geninin de *Vitis riparia* türünde bir markır olarak kullanılıp kullanılmayacağı değerlendirilmelidir.

VvPMEI-1, *VvPMEI-7* ile *VvPMEI-23* genleri sadece bir kez vvi-miR156a, vvi-miR3639-3p, vvi-miR390 ve vvi-miR3623-5p tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Bu miRNA'ların *VvPMEI* genleri ile hedef spesifik genler olduğu söylenebilir. vvi-miR3639'un bakır (Cu) stresinde ekspresyonunun arttığı, vvi-

miR3623'ün ise yapraklarda ifade edildiği ancak soğuk stresi esnasında önemli bir artış göstermediği bildirilmiştir [78, 79].

vvi-miR3624-5p no'lu miRNA ise sadece bir kez VvPMEI-18 genini hedeflediği bulunmuştur. Bu durum gen ve miRNA arasında hayli özgül bir ilişki olduğunu gösteriyor olabilir. Vvi-miR3624-3p'nin tuz stresi ile ilişkili olduğu, ifadesinin belirgin bir şekilde uyarıldığı bildirilmiştir (Wei et al, 2023). Vvi-miR3624 ekspresyonunun soğuk stresi ile ilgili olduğu, Vvi-miR3624-3p'nin Metal Bağlanma Proteinini hedeflediği, miR3624'ün Vitis cinsine özgü olduğu saptanmıştır. *Vitis amurensis*'te soğuk stresinde 4- α -GT (4-alpha-glucanotransferase) regülasyonunun vvi-miR3624-5p tarafından sağlandığı, geç soğuk (Aralık) ve derin dormansi (Ocak) dönemlerinde vvi-miR3624-5p'nin ifadesinin belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur [80]. *Vitis vinifera*, Amerikan türlerinden *Vitis riparia* 'ya nazaran soğuk stresine daha duyarlıdır. *Vitis vinifera* 'da potansiyel soğuk stresi ile ilgili ıslah çalışmalarında bu genin değerlendirilmesi yararlı olabilecektir.

Tuz stresi bitki gelişimini ve verimini etkileyen önemli bir sorundur. Bitkilerde tuza dayanıklılığın artırılması ile ilgili çalışmalarda karşılaşılan zorluklardan biri de bu özelliği etkileyen birçok gen olmasıdır. Bitkilerde tuz stresinin ve tuza toleransın genetik mekanizmasının anlaşılması dayanıklı çeşitlerin ve markırların geliştirilmesi için önemlidir. Abiyotik ve biyotik stres tepkilerine yanıt vermede rol oynayan ve kuraklık stresi, tuz stresi ve bakteriyel enfeksiyon dahil olmak üzere farklı streslere karşı bitki direnç mekanizmalarında rol oynayan PMEİ proteinleri birçok tarımsal öneme sahip bitkide araştırılmış, bu gen ailesinin bir çok farklı biyolojik süreçte görev aldığı, abiyotik ve biyotik stres faktörleri karşısında gen ekspresyonlarının arttığı ya da azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, stres ve bitki dayanıklılığı ile PMEİ genleri arasında bir ilişki olduğunu belirtmektedir.

In-silico PCR sonuçları, stres uygulanan bitkilerde gen ekspresyonu değişimlerini tespit etmek için *in-vitro* Real-Time PCR çalışmalarına geçmeden önce FastPCR programı aracılığı ile bilgisayar ortamında primerlerin ve gen ekspresyonlarının simülasyonunun yapılmasının yapılan çalışmalarda zaman ve maliyet açısından önemli bir katkı sağlayacağını göstermektedir.

Bu çalışmada *Vitis vinifera* ve *Vitis riparia* asma türlerine ait pektin metil esteraz inhibitörü (PMEİ) genleri biyoinformatik analizler aracılığıyla incelenmiş ve

bu türlere ait PMEİ genleri çıkarılarak adlandırılmıştır. *VvPMEİ* ve *VrPMEİ* genlerini hedefleyen miRNA'lar bulunarak tuz stresi ve diğer abiyotik stres türlerinde potansiyel markır olarak kullanılabilecek genler belirlenmiştir. Aynı zamanda FastPCR programı denenmiş, tuz stresine maruz kalmış bitkilere ait gen dizileri NCBI veritabanından indirilerek bilgisayarda Real-Time PCR analizinin simüle edilmesiyle denenmiş ve gen ekspresyonu seviyesindeki değişiklikleri saptayabildiği belirlenmiştir.

Topraklardaki tuzluluk asmanın da dahil olduğu tarımsal öneme sahip bitkileri tehdit eden bir abiyotik stres etmenidir. Elde edilen bulgular asmada tuz, kuraklık ve soğuk stresi gibi abiyotik stres etmenlerine karşı dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde kullanılabilecek potansiyel aday genlerin varlığını göstermektedir. Bu çalışmanın, gelecekte yapılacak araştırmalara bilimsel kaynak olmasının yanısıra ıslah programlarının geliştirilmesi için de yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Kılıç, L. (2018). İklim Değişikliğinin Tarım Üzerine Olası Etkileri. *21. Yüzyılda Fen ve Teknik*, 1(9), 1-6.
- [2]. Ceylan, H. A. (2021). GNL/S-12 Bitkilerde Abiyotik Stres Ve Coronatin'in Rolü. *İzmir Demokrasi Üniversitesi Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi 2021*, 103.
- [3]. Levitt, J. (2012). *Chilling, freezing, and high temperature stresses* (Vol. 1). Elsevier.
- [4]. Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Singh Sidhu, G. P., Bali, A. S., ... & Zheng, B. (2020). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 509-531.
- [5]. Baloğlu, M. C. (Editör), (2020). *Biyoinformatik Temelleri ve Uygulamaları* (2.Baskı). Ankara: Pegem Akademi Yayıncılık.
- [6]. Babalık, Z., & Baydar, N. G. (2021). Asmalarda Kuraklık ve Tuz Stresi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (21), 358-368.
- [7]. Gökbayrak, Z., İşçi, B., & Keskin, N., (2021). General View of the Research Studies on World Viticulture In The Last Decade. Dünyada Bağcılık Alanında Son On Yılda Yapılmış Araştırmalara Genel Bir Bakış. *Yüzüncü Yıl University Journal of Agricultural Sciences* , vol.31, no.4, 1041-1055.
- [8]. Bouby, L., Chabal, L., Bonhomme, V., Baly, I., Battentier, J., Makhad, S. B., ... & Matterne, V. (2023). The Holocene history of grapevine (*Vitis vinifera*) and viticulture in France retraced from a large-scale archaeobotanical dataset. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 625, 111655.
- [9]. Ma, Z. Y., Nie, Z. L., Ren, C., Liu, X. Q., Zimmer, E. A., & Wen, J. (2021). Phylogenomic relationships and character evolution of the grape family (Vitaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 154, 106948.
- [10]. Liang, Z., Duan, S., Sheng, J., Zhu, S., Ni, X., Shao, J., ... & Dong, Y. (2019). Whole-genome resequencing of 472 *Vitis* accessions for grapevine diversity and demographic history analyses. *Nature communications*, 10(1), 1190.

- [11]. Zecca, G., Abbott, J. R., Sun, W. B., Spada, A., Sala, F., & Grassi, F. (2012). The timing and the mode of evolution of wild grapes (*Vitis*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(2), 736-747.
- [12]. Başaran, F., & Akçin, Z. T. A. Sıcaklık Faktörünün Bitkiler Üzerindeki Etkileri ve Yüksek Sıcaklık Stresi. *Bahçe*, 51(2), 139-147.
- [13]. DİKA. TRC3 Bölgesi'nde, Bağcılığın Geliştirilmesi Raporu. <https://www.dika.org.tr/assets/upload/dosyalar/trc3-bolgesinde-bagciligin-gelistirilmesi-raporu.pdf>. Erişim:10.10.2024.
- [14]. Çelik, H. (2011). Kokulu Kara Üzüm Bağcılığı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun*.
- [15]. Kiracı, M. A., & Şenol, M. A. (2017). Türkiye bağcılığında ekonomik durum analizi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6, 122-131.
- [16]. Sırlı, B. A., Peşkircioğlu, M., Torunlar, H., Özaydın, K. A., Mermer, A., Kader, S., ... & Kodal, S. (2015). Türkiye'de üzüm (*Vitis* spp.) yetiştirmeye uygun potansiyel alanların Coğrafi Bilgi Sistemleri (CBS) Teknikleri kullanılarak iklim ve topoğrafya faktörlerine göre belirlenmesi. *Journal of Field Crops Central Research Institute (Turkey)*, 24(1).
- [17]. Erhan, K. (2021). Tekirdağ İlinde Bağcılık Ve Bağ Turizmi. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 26(45), 125-138.
- [18]. Anonymous a. *Vitis riparia*. <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/vitis/riparia/>. Erişim:01.10.2024.
- [19]. Sucu, S., & Yağcı, A. (2017). Bazı asma anaçları ve bu anaçlar üzerine aşılı sultani çekirdeksiz çeşidinde fidan randımanı ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 54(1), 53-59.
- [20]. Yağcı, A & Erdem, A. Amerikan Asma Anaçları. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/manisabagcilik/Belgeler/genelbagcilik/AMERIKAN%20ANACLARI%20ADEM%20YAGCI.pdf> . Erişim: 13 Haziran 2024.
- [21]. Yağcı, A., Cangi, R., Kesgin, M., & Kılıç, D. (2023). Bağcılıkta Anaç Islah Çalışmalarında F₁ Popülasyonunun Oluşturulması. *Bahçe*, 52(Özel Sayı 1), 48-54.

- [22]. İşçi, B., & Altındışli, A. (2024). Genetic Potential of Grapevine in Türkiye. *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34(Özel Sayı), 9-25.
- [23]. Parihar, S., & Sharma, D. (2021). A brief overview on *Vitis vinifera*. *Sch Acad J Pharm*, 12, 231-239.
- [24]. Yavaş, İ., & İlker, E. (2020). Çevresel stres koşullarına maruz kalan bitkilerde fotosentez ve fitohormon seviyelerindeki değişiklikler. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 9(2), 295-311.
- [25]. Başaran, F., & Akçin, Z. T. A. Sıcaklık Faktörünün Bitkiler Üzerindeki Etkileri ve Yüksek Sıcaklık Stresi. *Bahçe*, 51(2), 139-147.
- [26]. İşkil, R. (2017). *Bor ve 24-epibrassinolid uygulamalarının arabidopsis thaliana (l.) heynh'da hücre çeperi ile ilgili bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri* (Master's thesis, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [27]. Elmas, S. (2021). *Salvia officinalis* (tıbbi adaçayı) bitkisinin bazı abiyotik stres faktörlerine yanıtları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), 943-959.
- [28]. Yüksel, B., & Aksoy, Ö. (2017). Su stresi koşullarında bitkilerde gözlenen değişimler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(2), 1-5.
- [29]. Dal, B. İ., & Baktır, İ. (2001). Tuz stresi ve bahçe bitkileri üzerindeki etkileri. *Derim*, 18(3), 122-131.
- [30]. Deliboran, A., & Savran, Ş. (2015). Toprak tuzluluğu ve tuzluluğa bitkilerin dayanım mekanizmaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 57-61.
- [31]. Doğru, A., & Canavar, S. (2020). Bitkilerde tuz toleransının fizyolojik ve biyokimyasal bileşenleri. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, 8(1), 155-174.
- [32]. Turhan, E., Dardeniz, A., & Müftüoğlu, N. M. (2005). Bazı Amerikan Asma Anaçlarının Tuz Stresine Toleranslarının Belirlenmesi. *Bahçe*, 34(1), 11-20.

- [33]. Behera, T. K., Krishna, R., Ansari, W. A., Aamir, M., Kumar, P., Kashyap, S. P., ... & Kole, C. (2022). Approaches involved in the vegetable crops salt stress tolerance improvement: Present status and way ahead. *Frontiers in Plant Science*, 12, 787292.
- [34]. Sevgi, B., & Leblebici, S. (2023). Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri ve geliştirilen tolerans mekanizmaları. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(3), 1498-1516.
- [35]. Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2011). Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(5), 435-458.
- [36]. Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P. J. C., & Kwon, T. R. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in agronomy*, 97, 45-110.
- [37]. Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- [38]. Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jörnvall, H., Markovič, O., & Eklund, H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *Febs Letters*, 514(2-3), 243-249.
- [39]. Pelloux, J., Rustérucci, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in plant science*, 12(6), 267-277.
- [40]. Wormit, A., & Usadel, B. (2018). The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2878.
- [41]. Wang, D., Jin, S., Chen, Z., Shan, Y., & Li, L. (2022). Genome-wide identification of the pectin methylesterase inhibitor genes in Brassica napus and expression analysis of selected members. *Frontiers in Plant Science*, 13, 940284.
- [42]. Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'avino, R., Tamburrini, M., ... & Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(2), 245-252.
- [43]. Anonim b. İn vivo ve in vitro nedir? <https://biyoinformatik.net/in-vivo-ve-in-vitro-nedir.2024..> Erişim: 16.08.2024

- [44]. Altuntaş, V., & Murat, G. Ö. K. (2020). Protein–protein etkileşimi tespit yöntemleri, veri tabanları ve veri güvenilirliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 722-733.
- [45]. NCBI. National Center for Biotechnological Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 2024
- [46]. Qiagen. CLC Genomic Workbench. <https://digitalinsights.qiagen.com/>. 2024
- [47]. Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., ... & Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D138-D141.
- [48]. Voorrips, R. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*, 93(1), 77-78.
- [49]. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- [50]. Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 268.
- [51]. Yu, C. S., Lin, C. J., & Hwang, J. K. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein science*, 13(5), 1402-1406.
- [52]. Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- [53]. 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.
- [54]. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. (2015). The MEME suite. *Nucleic acids research*, 43(W1), W39-W49.
- [55]. Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2007). The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D301-D303.

- [56]. 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 protocols*, 10(6), 845-858.
- [57]. Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*, 46(W1), W49-W54.
- [58]. Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155-D162.
- [59]. Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An in-silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109(3-4), 312-319.
- [60]. Zhu, Y., Zeng, W., Wang, X., Pan, L., Niu, L., Lu, Z., ... & Wang, Z. (2017). Characterization and transcript profiling of PME and PMEI gene families during peach fruit maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 142(4), 246-59.
- [61]. Zhang, P., Wang, H., Qin, X., Chen, K., Zhao, J., Zhao, Y., & Yue, B. (2019). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the PME and PMEI gene families in maize. *Scientific reports*, 9(1), 19918.
- [62]. Wang, M., Yuan, D., Gao, W., Li, Y., Tan, J., & Zhang, X. (2013). A comparative genome analysis of PME and PMEI families reveals the evolution of pectin metabolism in plant cell walls. *PloS one*, 8(8), e72082.
- [63]. Wang, D., Jin, S., Chen, Z., Shan, Y., & Li, L. (2022). Genome-wide identification of the pectin methylesterase inhibitor genes in *Brassica napus* and expression analysis of selected members. *Frontiers in Plant Science*, 13, 940284.
- [64]. Li, B., Wang, H., He, S., Ding, Z., Wang, Y., Li, N., ... & Qian, W. (2022). Genome-Wide Identification of the PMEI Gene Family in Tea Plant and Functional Analysis of *CsPMEI2* and *CsPMEI4* Through Ectopic Overexpression. *Frontiers in Plant Science*, 12, 807514.

- [65]. Zhang, Q., Pu, T., Wang, Y., Bai, Y., Suo, Y., & Fu, J. (2022). Genome-wide identification and expression analysis of the PME and PMEi gene families in *Diospyros kaki*: A bioinformatics study. *Horticulturae*, 8(12), 1159.
- [66]. Liu, T., Yu, H., Xiong, X., Yu, Y., Yue, X., Liu, J., & Cao, J. (2018). Genome-wide identification and characterization of pectin methylesterase inhibitor genes in *Brassica oleracea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3338.
- [67]. Wang, L., Gao, Y., Wang, S., Zhang, Q., & Yang, S. (2021). Genome-wide identification of PME genes, evolution and expression analyses in soybean (*Glycine max* L.). *BMC Plant Biology*, 21, 1-20.
- [68]. Feng, X., Zhou, B., Wu, X., Wu, H., Zhang, S., Jiang, Y., ... & Hou, Z. (2023). Molecular characterization of SPL gene family during flower morphogenesis and regulation in blueberry. *BMC Plant Biology*, 23(1), 40.
- [69]. Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4157-4168.
- [70]. Liang, G., Ai, Q., & Yu, D. (2015). Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in *Arabidopsis*. *Scientific reports*, 5(1), 11813.
- [71]. Salvador-Guirao, R., Baldrich, P., Weigel, D., Rubio-Somoza, I., & San Segundo, B. (2018). The microRNA miR773 is involved in the *Arabidopsis* immune response to fungal pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(2), 249-259.
- [72]. Borges, F., Pereira, P. A., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., & Becker, J. D. (2011). MicroRNA activity in the *Arabidopsis* male germline. *Journal of experimental botany*, 62(5), 1611-1620.
- [73]. Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., ... & Jin, H. (2010). siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic acids research*, 38(20), 6883-6894.

- [74]. Breakfield, N. W., Corcoran, D. L., Petricka, J. J., Shen, J., Sae-Seaw, J., Rubio-Somoza, I., ... & Benfey, P. N. (2012). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome research*, 22(1), 163-176.
- [75]. Ferreira, S. S., Pandey, S., Hemminger, J., Bozdag, S., & Antunes, M. S. (2024). Early changes in microRNA expression in *Arabidopsis* plants infected with the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *bioRxiv*, 2024-05.
- [76]. Mica, E., Piccolo, V., Delledonne, M., Ferrarini, A., Pezzotti, M., Casati, C., ... & Horner, D. S. (2009). High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. *BMC genomics*, 10, 1-19.
- [77]. Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., ... & Hamdi, S. (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, 222, 832-847.
- [78]. Sun, X., Fan, G., Su, L., Wang, W., Liang, Z., Li, S., & Xin, H. (2015). Identification of cold-inducible microRNAs in grapevine. *Frontiers in plant science*, 6, 595.
- [79]. Jiu, S., Leng, X., Haider, M. S., Dong, T., Guan, L., Xie, Z., ... & Fang, J. (2019). Identification of copper (Cu) stress-responsive grapevine microRNAs and their target genes by high-throughput sequencing. *Royal Society open science*, 6(1), 180735.
- [80]. Ma, W., Ma, L., Ma, Z., Li, W., Lu, S., Gou, H., ... & Chen, B. (2024). Profiling the lncRNA–miRNA–mRNA interaction network in the cold-resistant exercise period of grape (*Vitis amurensis* Rupr.). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), 143.