



PvTLP genlerinin genom çaplı tespit ve karakterizasyonu

Ayşe Gül Kasapoğlu^{1*}, Ahmed Sidar Aygören², Selman Muslu³, Burak Muhammed Öner⁴, Murat Isıyel⁵, Esra Yaprak⁶, Sümeyra Uçar⁷, Recep Aydın⁸, Büşra Uzun⁹, Emre İlhan¹⁰, Murat Aydın¹¹

¹¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6447-4921), aysegul.kasapoglu@erzurum.edu.tr

² Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6264-9935), ahmed.aygoren17@erzurum.edu.tr

³ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-4777-0726), selman.muslu25@erzurum.edu.tr

⁴ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-2785-2089), burakmuhammed.oner3@erzurum.edu.tr

⁵ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-4157-2729), murat.isiyel13@erzurum.edu.tr

⁶ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8753-494X), esra.yaprak2@erzurum.edu.tr

⁷ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-7629-0206), sumeyra.ucar61@erzurum.edu.tr

⁸ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-3743-1835), recep.aydinyurt62@erzurum.edu.tr

⁹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-5682-6739), eylembusrauzun@gmail.com

¹⁰ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8404-7900), emre.ilhan@erzurum.edu.tr

¹¹ Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye (ORCID: 0000-0003-1091-0609), maydin@atauni.edu.tr

(2nd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences ICAENS 2022, March 10-13, 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1083519)

ATIF/REFERENCE: Kasapoğlu, A. G., Aygören, A. S., Muslu, S., Oner, B. M., Isıyel, M., Yaprak, E., Uçar, S., Aydın, R., Uzun, B., İlhan, E., & Aydın, M. (2022). PvTLP genlerinin genom çaplı tespit ve karakterizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (34), 676-684.

Öz

TUBBY-like proteinleri (TLP) C terminal bölgede TUB domaini ve ilave olarak N terminal bölgede F-Box domaini içeren çok işlevli bir proteindir. Memelilerde nöronal gelişme ve farklılaşmada rol oynarken bitkilerde strese karşı yanıtta, sinyal iletimi ve hücre döngüsünün kontrolü gibi birçok işleve sahiptir. Bitkiler sesil organizmalar olduğu için çevresel streslerden kaçamazlar. Bu yüzden strese karşı savunma mekanizmalarını aktifleştirmektedirler. Bu savunma mekanizmalarından biri de çeşitli gen ya da gen ailelerinin ifade seviyelerinin artırılması ya da azaltılmasıdır. TLP genleri ilk olarak obez farelerde tanımlanmış olup ardından diğer ökaryotik hücrelerde de tanımlanmaya başlamıştır. Fakat *Phaseolus vulgaris* genomunda TUBBY-like proteinlerinin karakterizasyonu henüz yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı *P. vulgaris* genomundaki TLP genlerini tespit ve karakterize ederek çeşitli biyoinformatik araçlarla genom bazında analizini gerçekleştirmektir. *P. vulgaris* genomunda 10 adet TLP geni belirlenmiştir. PvTLP7 geni hariç diğer PvTLP genleri F-Box domaini içermekte ve tüm PvTLP genleri TUB domainini barındırmaktadır. PvTLP proteinlerinin amino asit sayıları 360-431, moleküler ağırlıkları 40,46-48,12 kDa ve teorik izoelektrik noktası 9,09-9,71 arasında olup PvTLP proteinleri bazik özellik göstermektedir. *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* ve *P. vulgaris* TLP genleri arasındaki filogenetik ilişkiler tespit edilmiş olup 3 ana gruba ayrıldığı bulunmuştur. Kuraklık ve tuz stresi altındaki PvTLP genlerinin ifade seviyeleri in silico olarak incelenmiş olup PvTLP1 ve PvTLP7 genlerinin ifade seviyelerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında TLP genlerinin fasulyedeki işlevi aydınlatılarak gelecekte yapılacak olan fonksiyonel çalışmalara zemin oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: TUBBY, F-Box, karakterizasyon, filogenetik, sinteni.

¹ Corresponding Author: aysegul.kasapoglu@erzurum.edu.tr

Genome-wide characterization and identification of PvTLP genes

Abstract

TUBBY-like proteins (TLP) are multifunctional proteins that contain a TUB domain in the C-terminal region and an additional F-Box domain in the N-terminal region. While it plays a role in neuronal development and differentiation in mammals, it has many functions such as the response to stress, signal transduction and cell cycle control in plants. Since plants are sessile organisms, they cannot escape from environmental stresses. Therefore, they activate their defense mechanisms against stress. One of these defense mechanisms is to increase or decrease the expression levels of various genes or gene families. TLP genes were first identified in obese mice and then began to be expressed in other eukaryotic cells. However, characterization of TUBBY-like proteins in the *Phaseolus vulgaris* genome has not yet been performed. The purpose of this study is to detect and recognize TLP genes in the *P. vulgaris* genome, as well as to analyze them using various bioinformatics tools across the genome. Ten TLP genes were identified in the *P. vulgaris* genome. Except for the PvTLP7 gene, other PvTLP genes contain the F-Box domain and all PvTLP genes contain the TUB domain. PvTLP proteins have an amino acid number of 360-431, a molecular weight of 40.46-48.12 kDa, and a theoretical isoelectric point of 9.09-9.71, and PvTLP proteins show basic properties. Phylogenetic relationships between *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* and *P. vulgaris* TLP genes were determined and they were found to be divided into 3 main groups. Expression levels of PvTLP genes under drought and salt stress were examined in silico, and differences in expression levels of PvTLP1 and PvTLP7 genes were observed. In the light of the information obtained from this study, the function of TLP genes in beans will be clarified and will form the basis for future functional studies.

Keywords: TUBBY, F-Box, characterization, phylogenetic, synteny.

1. Giriş

Bitkilerin yaşamları için gerekli olan optimal şartların dışındaki tüm durumlar bitkiler tarafından stres olarak algılanmaktadır (Korkmaz ve Durmaz, 2017). Bitkiler bir stres faktörüyle karşılaştığında çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde tepkiler oluşturmaktadır. Moleküler seviyede stresle ilişkili genlerin veya gen ailelerinin ifade seviyelerinde farklılıklar meydana gelmektedir (Kırıcı, 2019). Stresle ilişki gen ailelerinden biri olan TUBBY-like proteinleri (TLP) ilk olarak obez farelerde tanımlanmıştır (Liu, 2008). TLP'ler fare, *Arabidopsis*, çeltik gibi çok hücreli organizmaların yanı sıra tek hücreli organizmalarda da yaygın olarak bulunur ve birçok hücresel işleve sahiptir (Wang et al., 2018; Wang et al., 2021). Memelilerde TLP genleri, farklılaşma ve gelişme sonrası nöronal hücrelerin korunması ve işleyişinde rol alırken bitkilerde ise büyüme ve gelişme, abiyotik ve biyotik streslere karşı yanıt, sinyal yollarının düzenlenmesi ve tohum çimlenmesi gibi birçok mekanizmada işlev göstermektedir (Ikeda et al., 2002; Wang et al., 2021).

TLP genlerinin C-terminal bölgesinde ortalama 270 amino asitlik TUBBY (TUB) domaini bulunmaktadır (Yang et al., 2008) ve hayvanların aksine bitki TLP'lerinin çoğu TUB domainine ek olarak yüksek oranda korunmuş F-box domainlerini de içermektedir (Gagne et al., 2002). F-box proteinlerinin C-terminal bölgelerinde çeşitli tekrarlar (Lösün açısından zengin tekrar (LRR), kelch tekrarı, tetratrikopeptit tekrarı (TPR) ve WD40 tekrarı) bulunmaktadır. Bu tekrarlar farklı proteinlerle etkileşimde buldukları bir ya da daha fazla oldukça değişken protein-protein etkileşim alanı içermektedir (Jain et al., 2007). TUB domaini, farklı türler arasında %55 ila %95 arasında benzerlik göstermektedir (Ikeda et al., 2002; Yang et al., 2008; Kim et al., 2017). TLP'lerin korunmuş C-terminal TUB domaininin aksine, N-terminalindeki tekrarlar türler arasında büyük değişkenlik göstermektedir (Gagne et al., 2002; Kim et al., 2017). F-box proteinleri, hücre döngüsü, translasyon-transkripsiyon kontrolü ve sinyal iletimi başta olmak üzere farklı biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde aktif bir şekilde rol oynamaktadır (Lai et al.,

2012; Wang et al., 2020). Ayrıca TLP'lerin transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü tahmin edilmektedir (Boggon et al., 2000).

Bir çalışmada *A. thaliana*'da 11 aday TLP geni tespit edilmiştir (Lai et al., 2004). Bu genlerden AtTLP9'un tuz ve kuraklık stresine yanıtta bitki toleransını artırdığı ve AtTLP3'ün ise tohum çimlenmesi sırasında ABA sinyal iletim yolağının düzenlenmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Lai et al., 2004; Bao et al., 2014). Çeltikte yapılan bir çalışmada ise 14 aday TLP geni belirlenmiş olup ekspresyon profili analizi sonucunda OsTLP14'ün tohum çimlenmesi ve fide oluşumunda aktif olarak rol aldığı rapor edilmiştir (Liu, 2008). *Cicer arietinum*'da CaTLP1 geninin ve elma TLP genlerinden biri olan MdTLP7'nin *Arabidopsis*'te aşırı ifadesinin, tuz, kuraklık ve oksidatif stres toleransını artırdığı bildirilmiştir (Wardhan et al., 2012; Xu et al., 2019). Ayrıca, çeltikte yapılan iki çalışmada, biyotik streslerden biri olan patojen istilasında konakçı ve patojen arasındaki etkileşimde TLP'lerin önemli işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Cai et al., 2008; Kou et al., 2009).

Daha önce yapılan çalışmalarda *Arabidopsis*'te 11 (Lai et al., 2004), çeltikte 14 (Liu et al., 2008), elmada 9 (Xu et al., 2016), *Salvia miltiorrhiza* 12 (Wang et al., 2021), *Brassica napus* 28 (Wang et al., 2020) ve mısırdaki 15 (Yulong et al., 2016) aday TLP geni tespit edilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda *Phaseolus vulgaris*'e ait TLP genleriyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. *P. vulgaris* hem yetiştirme kolaylığı hem de besin değeri açısından oldukça önemli bir bitki olmasının yanı sıra az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler için önemli bir geçim kaynağıdır (Sirat, 2020). Bu çalışmada biyoinformatik araçlar kullanılarak PvTLP genlerinin kromozomal lokasyonları, intron ekzon yapısı, korunmuş motiflerin belirlenmesi, evrimsel süreçteki seleksiyon baskısı ve abiyotik koşullar altındaki ifade profilleri belirlenmiştir. Ayrıca *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* TLP genleri arasında filogenetik ve sentenik ilişkiler tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında TLP genlerinin fasulyedeki işlevi aydınlatılarak gelecekte yapılacak olan fonksiyonel çalışmalara zemin oluşturacaktır.

2. Materyal ve Metot

2.1. TLP Genlerinin Tespit Edilmesi

TUB domainine ait olan Pfam Erişim Numarası (PF01167) Pfam veri tabanından (<http://pfam.xfam.org/family/PF01553>) alınarak Phytozome veritabanı v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)'den *G. max* (Valliyodan et al., 2019), *P. vulgaris* (Schmutz et al., 2010) ve *A. thaliana* (Lamesch et al., 2011) genomlarındaki TLP gen ailesi üyelerinin protein dizilerini elde edilmiştir. Bu üç bitkinin genomundaki aday TLP proteinlerini tespit etmek için hem Phytozome veritabanı v13'teki blastp hem de gizli Markov model (HMM) (<http://www.ebi.ac.uk>) taramasıyla üç bitkinin kendi genomlarında tespit edilmiştir. Fasulyede ilişkili dizilerdeki TLP domaininin varlığı HMMER (<http://hmmer.org/>) veritabanı vasıtasıyla taranmıştır. Fasulyedeki TLP proteinlerinin amino asit sayısı, stabilizasyon durumu, instabilite indeksi, teorik izoelektrik noktası (pI) ve moleküler ağırlığı " ProtParam aracı" (<https://web.expasy.org/protparam/>) vasıtasıyla belirlenmiştir. WoLF PSORT programı vasıtasıyla PvTLP protein dizileri girilerek bulunduğu hücre altı komponentler belirlenmiştir (Horton et al., 2007).

2.2. PvTLP genlerinin yapısı ve kromozom lokasyonunun belirlenmesi

PvTLP, AtTLP ve GmTLP genlerinin kodlanan ve kodlanmayan bölgeleriyle ilgili bilgi edinmek amacıyla, Gene Structure Display Server v2.0 veri tabanından faydalanılmıştır (Guo et al., 2020). Kodlanan DNA dizileri (CDS) ve genom dizileri kullanılarak PvTLP genlerinin yer aldığı konumlar tahmin edilmiştir. Phytozome veritabanı v13 aracılığıyla, PvTLP genlerinin kromozomal lokasyonları ve boyutları tespit edilmiştir. PvTLP genlerinin konumları bütün fasulye kromozomlarında işaretlenip MapChart programıyla çizilmiştir (Voorrips, 2002).

2.3. PvTLP genlerinin gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerin belirlenmesi

PvTLP amino asit dizilerinin ek olarak korunmuş motiflerini saptamak için, "Multiple EM for Motif Elicitation (MEME)" aracından faydalanılmıştır (Bailey et al., 2006). Motiflerin genişlik aralığı en az 2 ve en fazla 50 ve motiflerin maksimum sayısı ise 10 olarak belirlenmiştir. Motif bölgeleri 6 ila 300 aralığındadır. Bölge dağılımı tekrarların herhangi bir sayısı olarak belirlenmiştir. Saptanan motifler InterPro veritabanının varsayılan ayarları kullanarak taranmıştır (Quevillon et al., 2005). PvTLP genlerinin gen duplikasyonları MScanX (The Multiple Collinearity Scan Toolkit) aracı kullanılarak saptanmıştır (Wang et al., 2012). PvTLP genlerinin ikili çiftleri arasındaki Non-sinonim oranları (Ka), sinonim oranları (Ks) ve evrimsel zorlamalar (Ka/Ks) PAL2NAL (Suyama et al., 2006) tarayıcısı aracılığıyla PAML (Yang, 2007) arayüzünde hesaplanmıştır.

2.4. Filogenetik analizler, dizi hizalama ve sinteni analizi

Filogenetik analizler, 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile Neighbor-joining (NJ) modeline göre yapılmıştır. PvTLP protein dizileri ClustalW arayüzü kullanılarak hizalanmıştır (Thompson et al., 1997). Hizalanan veriler kullanılarak MEGA v7 programından filogenetik ağaç elde edilmiştir (Kumar et al., 2016). Filogenetik ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) tarayıcısı vasıtasıyla şekillendirilmiştir (Letunic and Bork, 2011). PvTLP, AtTLP ve GmTLP genlerinin ortologları MScanX (The Multiple

Collinearity Scan Toolkit) aracı kullanılarak (Wang et al., 2012) saptanmıştır. Ortolog genlerin protein dizileri Phytozome veritabanı v13 tarayıcısı ile belirlenmiştir PvTLP, AtTLP ve GmTLP genlerinin sinteni haritaları TbTool aracı kullanılarak şekillendirilmiştir (Chen et al., 2020).

2.5. PvTLP genlerinin promotör bölge analizi

PlantCARE veritabanı kullanılarak fasulye TLP gen ailesi üyelerinin herbirinin 5' upstream bölgesinden yaklaşık 2000 bp DNA parçası alınarak cis acting element analizi gerçekleştirilmiştir (Lescot et al., 2002).

2.6. PvTLP proteinlerinin 3D yapısı

Phyre2 veritabanına PvTLP protein dizileri girilerek protein homoloji modellemesi ve 3D yapısı belirlendi (Kelley et al., 2015). Protein modellerinin güvenilirlik oranları karşılaştırılarak en iyi 3D görüntü elde edildi.

2.7. İn siliko gen ifade analizi

PvTLP genlerinin ifade profillerini incelemek için Illumina RNA-seq verileri için NCBI veritabanındaki Sequence Read Archive (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) adlı veri kütüphanesinden elde edilmiştir. İlgili RNA-seq verilerini bulmak için tuz ve kuraklık stresi katılım sayıları tespit edilmelidir. SRR957668 (tuz stresiyle muamele edilmiş yaprak), SRR958469 (yaprak tuz kontrol), SRR8284481 (kuraklık stresiyle muamele edilmiş yaprak) ve SRR8284480 (yaprak kuraklık kontrol) katılım sayıları kullanılmıştır. Gen ifade değerlerini normalleştirmek için bir milyon eşlenmiş okuma (RPKM) algoritması başına ekzon modelinin kilobaz başına okuma algoritması kullanılmıştır (Mortazavi et al., 2008). RPKM değerleri log²'ye dönüştürülüp CIMminer (<http://discover.nci.nih.gov/cimminer>) algoritması ile heatmap haritası temin edilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Araştırma Sonuçları

PvTLP, AtTLP ve GmTLP genleri Pfam veri tabanından alınan Pfam erişim numarası (PF01167) kullanarak Phytozome tarayıcısından anahtar kelime taraması yapılarak tespit edilmiştir. Bu gen taraması sonucunda aynı genin farklı alternatif formları çıkarılıp TUB ve F-Box domaini içeren TLP genleri belirlenmiştir. *Arabidopsis*'te 11, *G. max*'ta 22 ve fasulyede 10 TLP geni saptanmıştır. PvTLP genlerinden PvTLP7 hariç tüm PvTLP genleri C terminal bölgede TUB domainine ek olarak N terminal bölgede F-Box domaini içermektedir. PvTLP proteinleri ve bu proteinlere ait kimlik bilgileri Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'de bu genlerin kromozomal lokasyonları, Phytozome numaraları, amino asit sayısı, moleküler ağırlıkları, teorik izoelektrik noktaları, stabilite durumu ve hüresel lokalizasyonları verilmiştir. PvTLP genleri fasulyenin 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. kromozomlarına dağılmıştır. PvTLP proteinlerinin amino asit sayıları 360-431 aralığında olup en yüksek amino asit sayısı PvTLP10'a aitken en düşük amino asit sayısı PvTLP3'e aittir. PvTLP proteinlerinin moleküler ağırlıkları 40,46-48,12 kDa aralığındadır. En yüksek moleküler ağırlık PvTLP10'a aitken düşük moleküler ağırlık PvTLP3'e aittir. Teorik izoelektrik noktaları incelendiğinde en düşük 9,09 (PvTLP3) ve en yüksek 9,71 (PvTLP10)'dir. Tüm PvTLP proteinleri bazik özellik sergilemektedir. Kararlılık durumları incelendiğinde sadece PvTLP7 stabilken diğer genler unstabil durumdadır. PvTLP

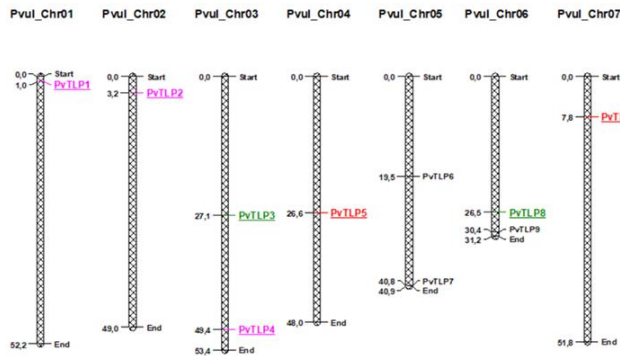
genleri çoğunlukla nükleusta ve az da olsa diğer hücre altı komponentlerde de bulunmaktadır.

Tablo 1. PvTLP proteinleri hakkında bilgi

Gen No	Phytozome ID	Chr No	Chr Lokalizasyonu	aa	MA (kDa)	pl	WoL F PSORT
PvTLP1	Phvu1.001G013500	1	1031136..1035051 (+)	429	47.79	9.34	nucl: 6
PvTLP2	Phvu1.002G031500	2	3196104..3199201 (-)	414	46.04	9.46	nucl: 6
PvTLP3	Phvu1.003G100700	3	27129617..27133239 (+)	360	40.46	9.09	nucl: 6
PvTLP4	Phvu1.003G254900	3	49403904..49412013 (-)	413	46.21	9.21	chlo: 8.5
PvTLP5	Phvu1.004G095000	4	26567067..26571691 (+)	425	47.56	9.56	nucl: 7.5
PvTLP6	Phvu1.005G082200	5	19485596..19490141 (+)	375	41.64	9.33	mito: 6.5
PvTLP7	Phvu1.005G183800	5	40763640..40766134 (-)	370	42.25	9.60	nucl: 9
PvTLP8	Phvu1.006G161100	6	26498672..26503928 (+)	383	43.20	9.46	mito: 5.5
PvTLP9	Phvu1.006G210500	6	30445319..30449372 (+)	427	47.95	9.47	nucl: 7
PvTLP10	Phvu1.007G079900	7	7834128..7837930 (+)	431	48.12	9.71	nucl: 9

*(-): reverse strand, (+): forward strand, chr: kromozom, nucl: nükleus, chlo: kloroplast, mito: mitokondri

MapChart programı kullanılarak PvTLP genleri fasulyenin 7 kromozomunda işaretlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. PvTLP genlerinin fasulye kromozomlarındaki lokasyonları

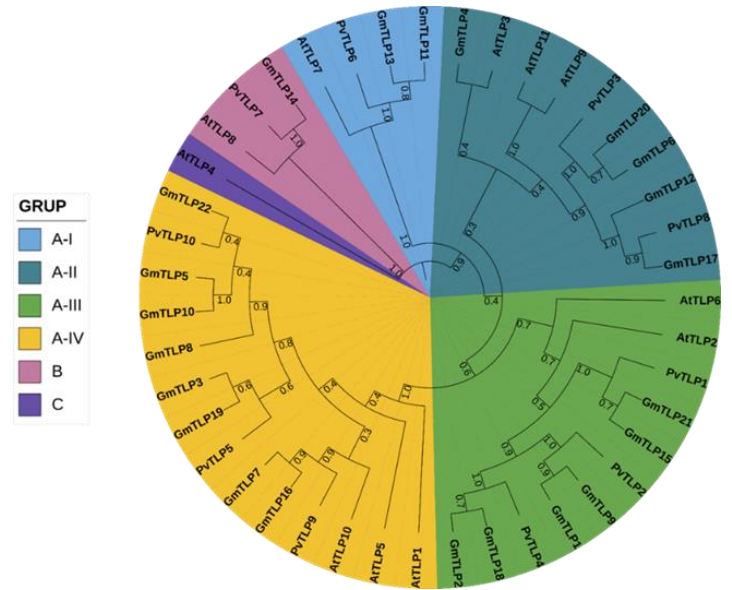
*Yeşil, pembe ve kırmızı renkteki genler segmental duplike genlerdir.

Gen duplikasyonları MCScanX arayüzü kullanılarak saptanmıştır. Bu analiz sonucunda PvTLP1, PvTLP2 ve PvTLP4 genlerinin, PvTLP3 ve PvTLP8 genlerinin ve PvTLP5 ve PvTLP10 genlerinin segmental duplike genler olduğu saptanmıştır. Bu duplike genlerin evrimsel süreci hakkında yorum

yapabilmek için gerekli olan Ka, Ks ve Ka/Ks oranları, kaç milyon yıl önce (MYÖ) ayrıldıkları ve seleksiyon baskısı Tablo 2’de verilmiştir. PvTLP duplike genlerinin Ka/Ks oranları 1’den küçük olduğundan negatif seleksiyona uğramıştır. Ayrıca bu analiz sonucunda tandem duplike genlere rastlanmamıştır.

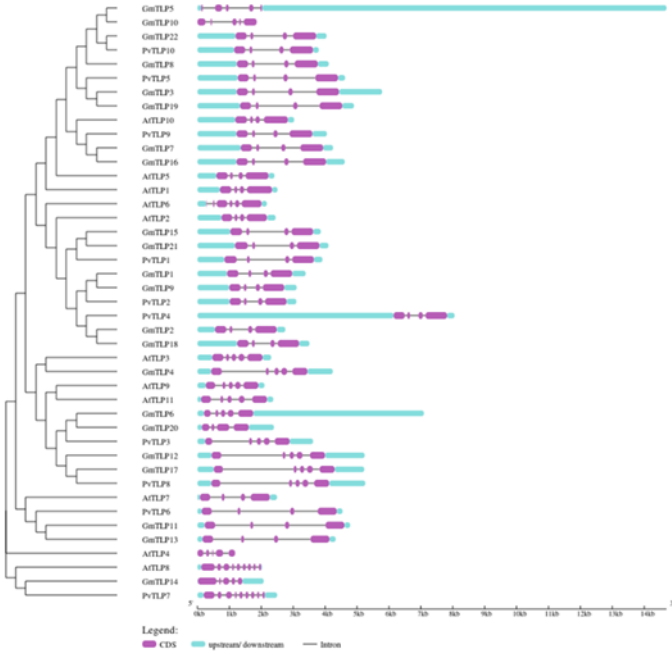
Tablo 2. Duplike gen çiftleri hakkında bilgi

Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MY Ö	Seleksiyon baskısı
PvTLP1	PvTLP4	0.26	2.67	0.10	20.35	Negatif
PvTLP1	PvTLP2	0.26	2.28	0.11	17.38	Negatif
PvTLP2	PvTLP4	0.13	0.69	0.19	5.26	Negatif
PvTLP3	PvTLP8	0.14	0.64	0.22	4.88	Negatif
PvTLP5	PvTLP10	0.09	0.72	0.12	5.49	Negatif



Şekil 2. PvTLP, AtTLP ve GmTLP genlerinin renklendirilmiş filogenetik ağacı

P. vulgaris, *A. thaliana* ve *G. max* bitkilerinin TLP genlerine ait protein sekansları alınarak filogenetik ağaç çizilmiştir. Filogenetik ağaç sayesinde PvTLP genleri arasındaki evrimsel ilişki tespit edilmektedir. Filogenetik ağaç TLP proteinlerinin amino asit sekanslarına bağlantılı olacak şekilde 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile neighbor joining yöntemi vasıtasıyla çizilip iTOL programında renklendirilmiştir (Şekil 2). Filogenetik ağaç incelendiğinde TLP proteinleri temelde A, B ve C olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. A grubu da kendi içerisinde 4 farklı dallanma göstermiştir. AtTLP4 diğer proteinlerden ayrı olacak şekilde gruplanmıştır.

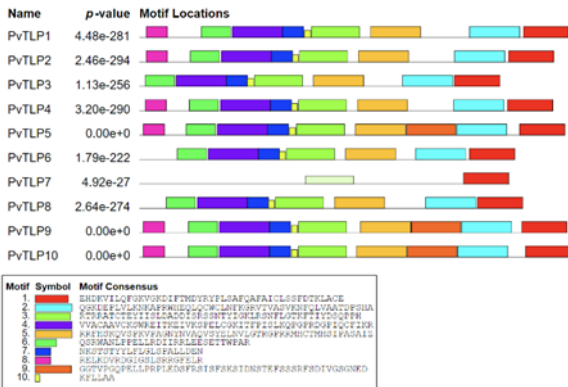


Şekil 3. Fasulye, Arabidopsis ve G. max TLP sekanslarının arasındaki filogenetik ilişki ve gen yapısı.

*Mor kutular ekzon, siyah çizgiler intron ve mavi kutular 5' ve 3' UTR bölgelerini göstermektedir.

PvTLP, AtTLP ve GmTLP genlerinin CDS ve genom dizileri kullanılarak GSDS veritabanı vasıtasıyla bu genlerin intron ekzon yapıları elde edilmiştir (Şekil 3). PvTLP genlerinin intron sayıları 3-8 arasında ve ekzon sayıları 4-9 arasında değişmektedir. En fazla intron-ekzon sayısı PvTLP7'ye aitken en düşük intron-ekzon sayısı PvTLP1, 2, 4, 5, 6, 9 ve 10'a aittir. Filogenetik ağaçta aynı grupta bulunan genler hemen hemen birbiriyle aynı intron-ekzon yapısına sahiptir.

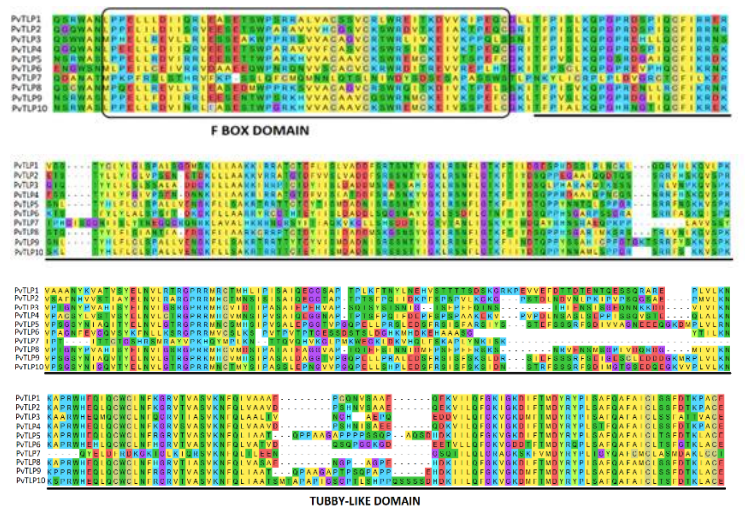
MEME (v5.1.0) arayüzü kullanarak fasulyedeki TLP proteinlerindeki korunmuş motifler tespit edilmiştir (Şekil 4). Korunmuş motif analizinde 10 korunmuş motif saptanmış olup motiflerin amino asit sayıları 21 ve 50 aralığındadır. Motif 1 tüm PvTLP genlerinde bulunmakta olup TUB domaini barındırır. En fazla motif içeren genler PvTLP9 ve 10'dur ve tüm korunmuş motifleri içermektedir. En az motifi içeren gen ise PvTLP7 genidir (Şekil 4). PvTLP genlerinde en iyi muhtemel eşleşmeler ve bu dizilerin içerdiği domainler Tablo 3'te verilmiştir. PvTLP genlerine ait protein dizileri MEGA programında hizalanıp TUBBY-like ve F-Box domainleri gösterilmiştir (Şekil 5).



Şekil 4. Fasulye TLP proteinlerinin motif diyagramı

Tablo 3. PvTLP genlerindeki muhtemel en iyi eşleşme

Motif No	En İyi Muhtemel Eşleşme	Domain
Motif 1	EHDKVLQFGKVGKDI FTMDYRYPLSAFQAF AICLSSFDTKLACE	Tubby_C/ Tub/ Supertubby/TUB BY-LIKE F-BOX PROTEIN/Tubby -like-c
Motif 2	QGKDEPLVLKNKAPR WHEQLQCWCLNFKG RVTVASVKNFQLVAAT DPSHA	Tubby_C/ Tub/ Supertubby/TUB BY-LIKE F-BOX PROTEIN/Tubby -like-c
Motif 3	RTRRATCTEYIISLDAD DISRSSNTYIGKLRSNF LGTKFTIYDSQPPH	Tubby_C/ Tub/ Supertubby/TUB BY-LIKE F-BOX PROTEIN/Tubby -like-c
Motif 4	VVACAAVCKSWREIT KEIVKSPELCGKITFPI SLKQPGPRDGPICFIK R	TUBBY-LIKE F- BOX PROTEIN/Tubby -like-c
Motif 5	RRFHSKQVSPKVPAG NYNVAQVSYELNVLG TRGPRRMHCTMHSIPA SAIZ	Tubby_C/ Tub/TUBBY- LIKE F-BOX PROTEIN/Tubby -like-c
Motif 6	QSRWANLPELLRDIIR RLEESETTPAR	N/A
Motif 7	NKSTSTYYLFLGLSPA LLDEN	N/A
Motif 8	RELKDVRDYGIGLSRR GFELR	N/A
Motif 9	GGTVPGQPELLPRPLE DSFRSISFSKSIDNSTEF SSSRFSDIVGSGNED	TUBBY-LIKE F- BOX PROTEIN
Motif 10	KFLCAA	N/A



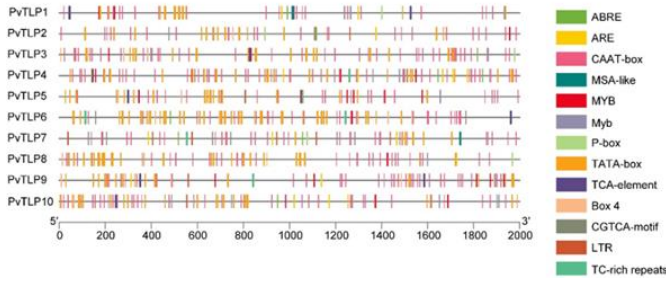
Şekil 5. PvTLP genlerine ait korunmuş TUBBY-like ve F-Box domainleri

PvTLP genlerinin promotor bölgesindeki cis-acting elementlerin belirlenmesi PvTLP genlerinin transkripsiyonel regülasyonunu anlamak için TLP genlerinin 2000 bp üst akış bölgesi alınıp PlantCARE veri tabanında analizi yapılmıştır. TLP genlerinin

promotor bölgelerinde 13 farklı cis-acting element tespit edilmiştir ve bu veriler TbTools aracı ile şekillendirilmiştir (Şekil 6). Promotor bölgeleri, abiyotik ve biyotik strese yanıtta bazı genlerin transkripsiyonu durdurarak ya da artırarak spesifik cis regülatörlerle gen ifadesinin düzenlenmesini sağlamaktadır. Tablo 4'te cis acting elementlerin fonksiyonları verilmiştir.

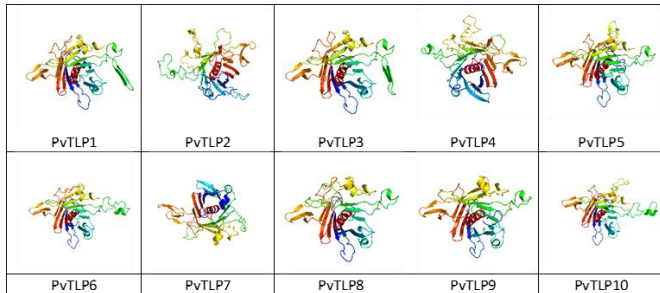
Tablo 4. Cis acting elementlerin fonksiyonu

Cis acting element	Fonksiyonu
ABRE	Absisik asit yanıtı
ARE	Anaerobik indüksiyon
CAAT-box	Promotör ve geliştirici bölgeler
MSA-like	Hücre döngüsü düzenlemesi
MYB-Myb	Stres yanıtı
P-box	Gibberellin-yanıtı
TATA-box	Transkripsiyon başlangıcı
TCA-element	Salisilik asit yanıtı
Box 4	Işık yanıtı
TC-rich repeats	Stres yanıtı
CGTCA-motif	MeJA-yanıtı
LTR	Düşük sıcaklık yanıtı



Şekil 6. PvTLP genlerinin cis-acting element analizi

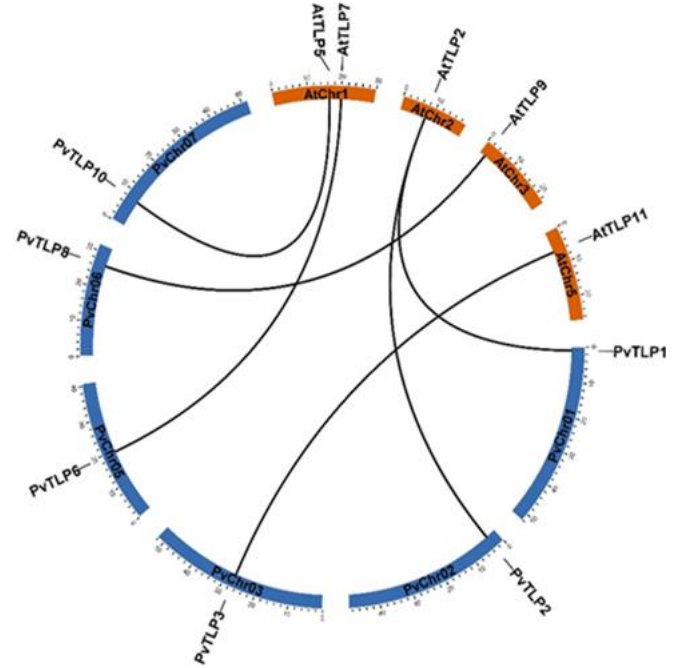
Protein Veri Bankasında (PDB) bulunan TLP proteinleri Blastp ile taranmış ve TLP proteinlerinin yapı ve fonksiyonunu tahmin etmek için kullanılan bir veri tabanı olan Phyre2 kullanılarak bu proteinlerin 3 boyutlu homoloji modellemesi görsel olarak anlaşılır bir şekilde aktarılmıştır. Şekil 7, bu çalışmada tanımlanan proteinlerin 3D homoloji modellerini göstermektedir.



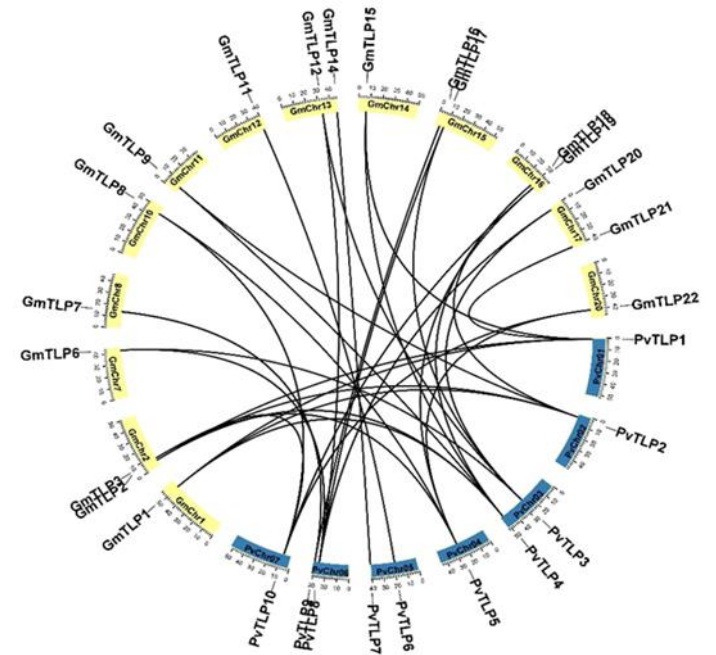
Şekil 7. PvTLP proteinlerin 3 boyutlu homoloji modellemesi

P. vulgaris, *A. thaliana* ve *G. max* bitkilerinin TLP proteinleri arasında sinteni haritası hazırlanmıştır. *P. vulgaris* ile *A. thaliana* (Şekil 8) ve *P. vulgaris* ile *G. max* (Şekil 9) arasında yapılan sinteni analizinde ilişki saptanmıştır. *P. vulgaris* ile *A. thaliana* TLP genleri arasında 6 sintenik ilişki tespit edilmiştir. AtTLP5-PvTLP10, AtTLP7-PvTLP6, AtTLP9-PvTLP8, AtTLP11-PvTLP3, AtTLP2-PvTLP1 ve AtTLP2-PvTLP2 genleri arasında ortoloji tespit edilmiştir. *P. vulgaris* ile *G. max* TLP genleri

arasında 33 sintenik ilişki tespit edilmiştir. PvTLP1-GmTLP1, PvTLP1-GmTLP2, PvTLP1-GmTLP15, PvTLP1-GmTLP21, PvTLP2-GmTLP1, PvTLP2-GmTLP2, PvTLP2-GmTLP9, PvTLP2-GmTLP18, PvTLP3-GmTLP6, PvTLP3-GmTLP12, PvTLP3-GmTLP17, PvTLP3-GmTLP20, PvTLP4-GmTLP1, PvTLP4-GmTLP2, PvTLP4-GmTLP9, PvTLP4-GmTLP15, PvTLP4-GmTLP18, PvTLP5-GmTLP3, PvTLP5-GmTLP8, PvTLP5-GmTLP19, PvTLP5-GmTLP22, PvTLP6-GmTLP11, PvTLP7-GmTLP14, PvTLP8-GmTLP6, PvTLP8-GmTLP12, PvTLP8-GmTLP17, PvTLP8-GmTLP20, PvTLP9-GmTLP7, PvTLP9-GmTLP16, PvTLP10-GmTLP3, PvTLP10-GmTLP8, PvTLP10-GmTLP19, PvTLP10-GmTLP22 genleri arasında ortoloji tespit edilmiştir.



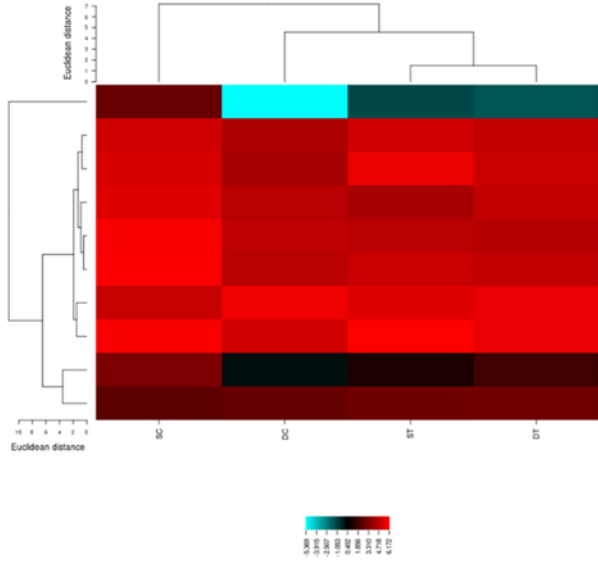
Şekil 8. PvTLP ve AtTLP genlerinin sinteni analizi



Şekil 9. PvTLP ve GmTLP genlerinin sinteni analizi

Tuz ve kuraklık streşi uygulanan fasulye yapraklarından alınan özel doku kütüphanelerinde PvTLP genlerinin ifadeleri CIMminer

programında analiz edilmiştir (Şekil 10). Yapılan analiz sonucunda tuz stresinde kontrole göre kıyaslandığında PvTLP7 ve PvTLP1 genlerinin ifade seviyesi düşmüştür. Kuraklık stresinde kontrole göre kıyaslandığında PvTLP7 ve PvTLP1 genlerinin ifade seviyesi artmıştır. Diğer genlerde ise hem tuz hem de kuraklık stresinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 10. Tuz ve kuraklık stresi altındaki PvTLP genlerinin in siliko ifade seviyeleri

3.2. Tartışma

TUBBY-like proteinleri hayvanlardan, bitkilere bitkilerden tek hücreli ökaryotlara kadar birçok türde tanımlanmıştır. TLP'ler hayvanlarla kıyaslandığında çok az bitki türünde karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda *Arabidopsis*'te 11 (Lai et al., 2004) çeltikte 14 (Liu, 2008), elmada 9 (Xu et al., 2016), *Salvia miltiorrhiza* 12 (Wang et al., 2021), *Brassica napus* 28 (Wang et al., 2020) ve mısırdada 15 (Yulong et al., 2016) aday TLP geni tespit edilmiştir. Bu çalışmada fasulye genomunda 10 TLP geni tespit edilmiştir.

Çalışmamızda PvTLP genlerin karakteristik özellikleri de tanımlanmıştır. *Salvia miltiorrhiza* (Wang et al., 2021), elmada (Xu et al., 2016) ve çeltikte (Liu, 2008) de TLP genlerinin amino asit sayıları çalışmamızda olduğu gibi hemen hemen yakın sayılarda olup tüm TLP proteinleri bazik özellik sergilemektedir. Gen ve protein yapısının analizi, çoğu TLP'nin hem Tub hem de F-box domainine sahip olduğunu ve daha önce bildirilen sonuçlarla tutarlı olduğunu ortaya koydu (Liu, 2008; Lai et al., 2004; Xu et al., 2016; Yulong et al., 2016). Benzer şekilde, PvTLP proteinlerinin 3D modelleme analizi, PvTLP7'nin dışındaki PvTLP'lerin, 12 anti-paralel şeritli kapalı bir β tabakası ve merkezi bir hidrofobik α sarmalından oluşan tam TUB alanına sahip olduğunu desteklemektedir. SmTLP'lerde yapılan bir çalışmada da SmTLP11'in benzer sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (Wang et al., 2021).

Arabidopsis, fasulye ve *G. max* TLP'lerin filogenetik ağacı TLP genlerinin üç gruba ayrıldığını göstermektedir (Şekil 2). *Arabidopsis*, kavak ve çeltikte yapılan filogenetik ağaçta da TLP genleri üç gruba ayrılmıştır (Wang et al., 2021). Benzer sonuçlar MdTLP genlerinin karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada da görülmektedir (Xu et al., 2016). C grubunda diğer genlerle evrimsel uzaklığı fazla olan AtTLP4 geni bulunmaktadır. Bir

çalışmada da bu şekilde filogenetik ilişki göstermiştir (Yang et al., 2008). B grubunda ise yapısında PvTLP7, AtTLP8 ve GmTLP14 genlerinde sadece TUB domaini bulunup F-Box domaini içermemektedir. A grubu ise 4 alt gruba bölünmüştür. Benzer sonuçlar *Arabidopsis*, kavak ve çeltikte de rapor edilmiştir (Wang et al., 2021). AI grubu 4, AII grubu 10, AIII grubu 11 ve AIV grubu 14 TLP geni içermektedir. PvTLP, AtTLP ve GmTLP genlerindeki intron/ekzon dağılımını belirlemek ve gen yapısı ve organizasyonunun protein işlevselliği ve türler arasındaki evrimsel değişiklikler üzerindeki kurallarını ve olası sonuçlarını anlamak için ekzon/intron organizasyonu veritabanlarında depolanan genomik DNA dizilerinden gerçekleştirilmektedir (Wang et al., 2013). Benzer motifleri içeren genler aynı gruplarda yer almakta olup hemen hemen benzer gen yapısını içermektedir.

PvTLP genleri, absisik asit, salisilik asit, gibberellin ve MeJA yanıt öğeleri dahil olmak üzere çeşitli hormon yanıt öğeleri ve ışık, düşük sıcaklık gibi stres yanıt öğeleri içermektedir. Önceki çalışmalar, TLP'lerin ışık, sıcaklık, hipoksi ve tuz stresine de yanıt verebildiğini göstermiştir (Zhang et al., 2014). PvTLP7 bitkinin soğuk direncinde önemli bir rol oynadığını gösterebilecek çok sayıda LTR elementi içermektedir (Şekil 6). SmTLP10 geni de aynı şekilde düşük sıcaklığa tepki unsurları içermektedir (Wang et al., 2021).

Duplikasyonlar, yeni gen fonksiyonlarının, yeni gelişimsel ve fizyolojik yolların evriminde ve genişlemesinde önemli bir rol oynamıştır. (Hanada et al., 2008). Bitkilerde, tandem ve segmental duplikasyon olayları genellikle mevcut gen ailelerinin yeni üyelerinin oluşmasına yol açar (Cannon et al., 2004). Duplike genlerin Ka/Ks oranı 1'den küçük ise evrimsel süreçte arındırıcı seleksiyona, büyük ise pozitif seleksiyona ve 1'e eşit ise nötr seleksiyona uğramaktadır (Kasapoğlu et al., 2020; Kızılkaya et al., 2020). PvTLP genlerinde de segmental duplike genler bulunurken tandem duplike genlere rastlanmamıştır. Ayrıca bu duplike genlerin birbirlerinden kaç milyon yıl önce ayrıldıkları hesaplanmıştır. PvTLP5 ve PvTLP10 genleri bundan yaklaşık 5 milyon yıl önce birbirlerinden ayrılmışlardır.

Arabidopsis, fasulye ve *G. max* genomlarındaki ortolog TLP genleri belirlenmiştir. *Arabidopsis* TLP genlerinden 5'i PvTLP genlerinden 6'sı ile ortoloji göstermiştir. *G. max* TLP genlerinden 18'i PvTLP genlerinden 10'u ile ortoloji göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da *Arabidopsis*, çeltik, kavak, elma ve mısır gibi bitkiler arasında TLP genleri ortoloji göstermektedir (Yang et al., 2008; Xu et al., 2016).

İn siliko gen ifade analizi sonucunda PvTLP7'nin tuz ve kuraklık stresi altındayken ifade seviyesinde değişiklik gözlemlenmiştir. PvTLP7'nin gen ve motif yapısı bakımından diğer PvTLP'lerden farklı olması stres şartlarında farklı gen ifadesi göstermesine neden olmuş olabilir. Ayrıca PvTLP7'nin doğrudan abiyotik stresle ilişkili bir gen olduğu da düşünülmektedir. Bu görüş farklı deneysel çalışmalarla da desteklenmelidir. Daha önceki çalışmalar TLP genlerinin stresle ilişkili olduğunu göstermiştir. Örneğin; AtTLP9 tuz ve kuraklık stresine verilen yanıtta rol aldığı rapor edilmiştir (Bao et al., 2014).

4. Sonuç

Fasulye genomunda yapılan in siliko analizler sonucunda fasulyenin 7 kromozomuna dağılmış TLP gen ailesi üyelerinden 10 tane PvTLP geni saptanmıştır. PvTLP genlerinden PvTLP7 sadece TUB domainini içerirken diğer PvTLP genleri TUB domainine ilave F-Box domaini de içermektedir. PvTLP1, PvTLP2

ve PvTLP4 genleri, PvTLP3 ve PvTLP8 genleri ve PvTLP5 ve PvTLP10 genleri segmental duplike genlerdir. Tuz stresinde PvTLP7 ve PvTLP1 genlerinin ifade seviyesi düşerken kuraklık stresinde PvTLP7 ve PvTLP1 genlerinin ifade seviyesi artmıştır. Diğer genlerin ifade seviyeleri her iki stres koşulunda yüksek oranda ifade olmaktadır. PvTLP genleri abiyotik stres şartlarına karşı dirençte etkili bir rol oynamaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında TLP genlerinin fasulyedeki işlevi aydınlatılarak gelecekte yapılacak olan fonksiyonel çalışmalara zemin oluşturacaktır.

Kaynakça

- Bailey TL, Williams N, Mischak H, Li WW (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 34:W369-W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl198>
- Bao Y, Song W-M, Jin Y-L, Jiang C-M, Yang Y, Li B, Huang W-J, Liu H, Zhang H-X. 2014. Characterization of Arabidopsis Tubby-like proteins and redundant function of AtTLP3 and AtTLP9 in plant response to ABA and osmotic stress. *Plant Molecular Biology* 86:471–483 DOI 10.1007/s11103-014-0241-6.
- Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L. 2000. Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography* 56:s263–s263 DOI 10.1107/S0108767300025642.
- Cai, M., Qiu, D., Yuan, T., Ding, X., Li, H., Duan, L., et al. (2008). Identification of novel pathogen-responsive cis-elements and their binding proteins in the promoter of OsWRKY13, a gene regulating rice disease resistance. *Plant Cell Environ.* 31, 86–96.
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., & May, G. (2004). The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 4(1), 1-21.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., and Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, S. H., Durski, A. M., & Vierstra, R. D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(17), 11519-11524.
- Guo Y, Qiao DH, Yang C, Chen J, Li Y, Liang SH, Lin KQ, Chen ZW (2020) Genome-wide identification and expression analysis of SABATH methyltransferases in tea plant (*Camellia sinensis*): insights into their roles in plant defense responses. *Plant Signal Behav* 15(10). <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1804684>
- Hanada, K., Zou, C., Lehti-Shiu, M. D., Shinozaki, K., and Shiu, S. (2008) Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant Physiol.* 148, 993–1003.
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35:W585-W587. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>
- Ikeda, A., Nishina, P. M., and Nagert, J. K. (2002) The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function. *J. Cell Sci.* 115, 9–14.
- Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Kapoor, S., Tyagi, A. K., and Khurana, J. P. (2007) F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiol.* 143, 1467–1483.
- KASAPOĞLU, A. G., İLHAN, E., KIZILKAYA, D., POUR, A. H., and HALİLOĞLU, K. (2020). Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Genomunda BES1 Transkripsiyon Faktör Ailesinin Genom Çaplı Analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(1), 85-95.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10(6):845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kırıcı A. Fasulye (Phaseolus vulgaris L.) bitkisinde Yabby ve Dof genlerinin kuraklık stresi ile olan ilişkilerinin salisilik asit etkisiyle karşılaştırmalı olarak gen ifadesi düzeyinde incelenmesi. 2019. M. thesis, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- KIZILKAYA, D., KASAPOĞLU, A. G., HOSSEINPOUR, A., HALİLOĞLU, K., MUSLU, S., and İLHAN, E. (2020) Sorghum bicolor L. CAMTA Transkripsiyon Faktörlerinin Genom Çaplı Analizi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 51(3), 267-278.
- Kim S, Sung HJ, Lee JW, Kim YH, Oh Y-S, Yoon K-A, Heo K, Suh P-G. 2017. C-terminally mutated tubby protein accumulates in aggresomes. *BMB Reports* 50:37–42 DOI 10.5483/BMBRep.2017.50.1.140.
- Korkmaz, H., & Durmaz, A. (2017). Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Karşı Geliştirilen Cevaplar. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2), 192-207.
- Kou, Y., Qiu, D., Wang, L., Li, X., and Wang, S. (2009). Molecular analyses of the rice tubby-like protein gene family and their response to bacterial infection. *Plant Cell Rep.* 28, 113–121. doi: 10.1007/s00299-008-0620-z
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874
- Lai C-P, Lee C-L, Chen P-H, Wu S-H, Yang C-C, Shaw J-F. 2004. Molecular analyses of the Arabidopsis TUBBY-like protein gene family. *Plant Physiology* 134:1586–1597 DOI 10.1104/pp.103.037820.
- Lai, C. P., Chen, P. H., Huang, J. P., Tzeng, Y. H., Chaw, S. M., and Shaw, J. F. (2012) Functional diversification of the Tubby-like protein gene families (TULPs) during eukaryotic evolution. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1, 2–8.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Huala, E. (2011). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1202–D1210. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1090>
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., ... & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Letunic I, Bork P (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39:W475-W478. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr201>
- Liu, Q. (2008). Identification of rice TUBBY-like genes and their evolution. *The FEBS Journal*, 275(1), 163-171.

- Mortazavi A, Williams BA, Mccue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5(7):621-628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33:W116-W120. <https://doi.org/10.1093/nar/gki442>
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Jackson, S. A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>
- SİRAT, Abdulveli. "Yerel Kuru Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Tane Verimi, Verim Unsurları ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi." *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 17.2 (2020): 245-254.
- Suyama M, Torrents D, Bork P (2006) PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res* 34:W609-W612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl315>
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24):4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Valliyodan, B., Cannon, S. B., Bayer, P. E., Shu, S., Brown, A. V., Ren, L., ... & Nguyen, H. T. (2019). Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal*, 100(5), 1066-1082.
- Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93(1):77-78. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>
- Wang, K., Cheng, Y., Yi, L., He, H., Zhan, S., & Yang, P. (2021). Genome-wide identification of the Tubby-Like Protein (TLPs) family in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza*. *PeerJ*, 9, e11403.
- Wang, M., Xu, Z., & Kong, Y. (2018). The tubby-like proteins kingdom in animals and plants. *Gene*, 642, 16-25.
- Wang, Tong, et al. "Identification, evolution and expression analyses of whole genome-wide TLP gene family in *Brassica napus*." *BMC genomics* 21.1 (2020): 1-14.
- Wang, Y., You, F. M., Lazo, G. R., Luo, M. C., Thilmony, R., Gordon, S., ... & Gu, Y. Q. (2013). PIECE: a database for plant gene structure comparison and evolution. *Nucleic acids research*, 41(D1), D1159-D1166.
- Wang, Yupeng, et al. "MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity." *Nucleic acids research* 40.7 (2012): e49-e49.
- Wardhan V, Jahan K, Gupta S, Chennareddy S, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N. 2012. Overexpression of CaTLP1, a putative transcription factor in chickpea (*Cicer arietinum* L.), promotes stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 79:479–493 DOI 10.1007/s11103-012-9925-y.
- Xu J, Xing S, Sun Q, Zhan C, Liu X, Zhang S, Wang X. 2019. The expression of a tubby-like protein from *Malus domestica* (MdTLP7) enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 19:60 DOI 10.1186/s12870-019-1662-9.
- Xu, Jia-Ning, et al. "Genome-wide identification and expression analysis of the tubby-like protein family in the *Malus domestica* genome." *Frontiers in Plant Science* 7 (2016): 1693.
- Yang ZH (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 24(8):1586-1591. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm088>
- Yang, Z., Zhou, Y., Wang, X., Gu, S., Yu, J., Liang, G., ... & Xu, C. (2008). Genomewide comparative phylogenetic and molecular evolutionary analysis of tubby-like protein family in *Arabidopsis*, rice, and poplar. *Genomics*, 92(4), 246-253.
- Yulong, C., Wei, D., Baoming, S., Yang, Z., and Qing, M. (2016). Genome-wide identification and comparative analysis of the TUBBY-like protein gene family in maize. *Genes Genom.* 38, 25–36. doi: 10.1007/s13258-015-0338-6
- Zhang L, Wu B, Zhao D, Li C, Shao F, Lu S. 2014. Genome-wide analysis and molecular dissection of the SPL gene family in *Salvia miltiorrhiza*: the SPL gene family in *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Integrative Plant Biology* 56:38–50 DOI 10.1111/jipb.12111.

