



Fasulye Bitkisinde Phospholipase D Gen Ailesinin Tuz Ve Kuraklık Stresi Altında Genom Çaplı Karakterizasyonu

Murat İsiyel^{1*}, Burak Muhammed Öner¹, Esra Yaprak¹, Sümeyra Uçar¹, Ayşe Gül Kasapoğlu¹, Ahmed Sidar Aygören¹, Selman Muslu¹, Recep Aydın¹, Emre İlhan¹, Murat Aydın²

^{1*} Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-4157-2729), murat.isiyel13@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-2785-2089), burakmuhammed.oner3@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8753-494X), esra.yaprak2@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-7629-0206), sumeyra.ucar61@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6447-4921), aysegul.kasapoglu@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6264-9935), ahmed.aygoren17@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-4777-0726), selman.muslu25@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-3743-1835), recep.aydinyurt62@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8404-7900), emre.ilhan@erzurum.edu.tr

² 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.)

ATIF/REFERENCE: İsiyel, M., Öner, B. M., Yaprak, E., Uçar, S., Kasapoğlu, A. G., Aygören, A. S., Muslu, S., Aydın, R., İlhan, E., & Aydın, M., (2022). Fasulye bitkisinde *phospholipase D* gen ailesinin tuz ve kuraklık stresi altında genom çaplı karakterizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (34), 585-593.

Öz

Fosfolipaz, bitkilerde fosfolipidlerin metabolizmasından ve sentezinden sorumlu bir enzim sınıfıdır. Bitkilerdeki en önemli fosfolipaz türü, fosfolipitleri hidrolize edebilen *PLD* (Phospholipase D)'dir. *PLD* birçok bitki türünde biyotik ve abiyotik stres koşulları altında çalışmıştır. Ancak yapılan literatür taramalarında *P. vulgaris* genomunda herhangi bir genom çaplı karakterizasyon yapılmadığı görülmüştür. Yapılan analizler sonucunda *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* türlerine ait sırasıyla 17, 27 ve 12 adet aday *PLD* geni tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada tanımlanan 17 *PvPLD* geni fasulyenin 2, 5, 7, 8, 9 ve 10 numaralı kromozomları üzerinde dağıldığı tespit edilmiştir. Belirlenen kromozomlar üzerinde en düşük bir, en yüksek 5 *PvPLD* geni olduğu bulunmuştur. *PvPLD* genlerine ait teorik izoelektrik noktaları (pI) 5,3-8,21 değerleri arasında değişmekte olduğu ve on yedi *PvPLD* geninin 14'ü asidik özellik ve 3 tanesi de bazik özellik göstermektedir. Moleküler ağırlıklar analiz edildiğinde ortaya çıkan en düşük ağırlık (17,5 kDa) *PvPLD-15*'te iken en yüksek (127,8 kDa) ağırlık *PvPLD-12*'de olduğu belirlenmiştir. *PvPLD* genlerinin muhtemel 5 farklı domaine ayrıldığı görülmüştür. Yapılan filogenetik analizler sonucunda *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* türlerine ait karşılaştırmada *PLD* gen ailesi üyelerinin 6 farklı gruba ayrıldığı tespit edildi. *PvPLD* genleri arasında yapılan tandem ve segmental duplikasyon analizleri sonucunda 5 adet segmental ve 3 adet tandem duplikasyon belirlenmiştir. Tuz ve kuraklık altındaki ifade seviyeleri incelendiğinde 4 farklı *PvPLD* geninde kontrole göre belirgin farklılıklar görülmüştür. Bu çalışmada yapılan in silico analizler fasulyede *PLD* genlerinin işlevi hakkında önemli bilgiler sunulmakta ve yapılması planlanan çalışmalar için temel niteliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *PLD*, Fosfolipaz, Biyoinformatik, Fasulye, Stres

* Sorumlu Yazar: murat.isiyel13@erzurum.edu.tr

Genome-Wide Characterization Of The Phospholipase D Gene Family Under Salt And Drought Stress In The Bean Plant

Abstract

Phospholipase is a group of enzymes in plants that are involved in the metabolism and production of phospholipids. *Phospholipase D* (*PLD*) is the most significant form of phospholipase in plants, as it can hydrolyze phospholipids. Many plant species have been studied for *PLD* under biotic and abiotic stress conditions. However, no genome-wide characterisation of the *P. vulgaris* genome was found in the literature reviews. The research found 17, 27, and 12 potential *PLD* genes in the *P. vulgaris*, *G.max*, and *A. thaliana* species, respectively. The 17 *PvPLD* genes identified in this study are distributed on chromosomes 2, 5, 7, 8, 9, and 10 of beans. On the determined chromosomes, one lowest and five highest *PvPLD* genes were discovered. *PvPLD* genes have theoretical isoelectric points (pI) ranging from 5.3 to 8.21, with 14 of the seventeen *PvPLD* genes having acidic values and three having basic values. The lowest molecular weight (17.5 kDa) was identified in *PvPLD*-15, while the highest (127.8 kDa) was recorded in *PvPLD*-12. *PvPLD* genes were found to be grouped into five potential domains. In the study of *P. vulgaris*, *G.max*, and *A. thaliana* species, phylogenetic analysis revealed that the *PLD* gene family members were separated into six distinct groups. Five segmental and three tandem duplications were discovered as a result of tandem and segmental duplication analyses between *PvPLD* genes. Significant changes in expression levels under salt and drought were found in four separate *PvPLD* genes when compared to the control. The in-silico analyses used in this study provide crucial information regarding the function of *PLD* genes in beans, which will be useful in future research.

Keywords: *PLD*, *Phospholipase*, *Bioinformatics*, *Beans*, *Stress*.

1. Giriş

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), ulaşılabilirliği kolay olan ana besin kaynaklarını arasında yer almaktadır (Nichols et al., 2011). Bazı temel abiyotik faktörler olan soğuk, kuraklık ve tuz gibi stres koşulları altında fasulye bitkisinin gelişimi olumsuz etkilenebilir. Bu sebeplerden ötürü fasulyede abiyotik stres koşullarına karşı bir direnç kazandırma ihtiyacı duyulur (Delgado-Salinas et al., 1999). Çoğu bitki gelişim evresinde abiyotik ve biyotik streslere maruz kaldıkları ortamlarda bulunurlar. Büyümenin devamını sağlamak için bitkinin bulunduğu ortama uyum sağlaması gereklidir. Oluşabilecek herhangi bir hücre hasarı bu uyum sağlama süreci sonucunda en düşük seviyede tutabilmektedirler (Wan et al., 2019). Oluşan abiyotik stresler, aralarında lipit sinyal yolunun da bulunduğu bir takım metabolik sistemler kullanılarak en düşük seviyeye indirgenir ve birçok yüksek bitki hücresel süreçlerinde kazanılan modifikasyonlar ile stres koşullarına karşı hızlı yanıtlar verir (Bargmann and Munnich, 2006; Simonntachi et al., 2015).

Fosfolipaz, bitkilerde bulunan fosfolipitlerin metabolizmasında ve üretiminde görevli önemli bir enzim grubudur (Tang et al., 2016). Bitkilerde bulunan fosfolipaz türleri arasında en önemlisi fosfolipitleri hidrolize etme yeteneğine sahip olan *PLD* (Fosfolipaz D) grubudur. Bitkilerin büyüme ve gelişme dönemlerinde ortaya çıkan abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı verilen tepkilerde *PLD*'nin rol oynadığı görülmüştür (Wang, 2002; Wang, 2005). Bazı abiyotik stres faktörlerinden olan kuraklık, soğuk ve tuz streslerine karşı verilen hücresel tepkide *PLD*'nin rol oynadığı görülmüştür (Bargmann et al, 2009; Mane et al., 2007; Welti et al., 2002). *PLD* işlevini genel olarak PA'nın (fosfatidik asit) enzimatik hidroliz ürünü yolu ile gerçekleştirir. PA, temel olarak her yerde bulunan hücre zarında bulunan lipit içeriğinin dengesini düzenleyen ve hücre zarını stabil bir durumda tutmakla görevli olan bir lipit sinyal bileşiğidir (Li et al., 2021). *PLD*, 1940'lı yılların başında hücre membranının yeniden şekillenmesinde ve lipit metabolizmasında görevli bir enzim olarak tanımlaması gerçekleştirilmiştir (Hanahan and Chaikoff, 1947). *PLD* gen ailesi günümüzde *Arabidopsis thaliana* (Elias et al., 2002; Qin and Wang, 2002), *Cicer arietinum* (Sagar et al., 2021), *Camellia sinensis* (Roshan et al., 2021), *Glycine max*

(Zhao et al., 2012), *Oryza sativa* (Li et al., 2007), *Vitis vinifera* (Liu et al., 2010), gibi birçok yüksek bitki türlerinde tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramaları sonucunda *PLD* geninin *P. vulgaris* bitkisinde genom çaplı karakterizasyonuna ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Gerçekleştirilmesi planlanan bu çalışmada amaç fasulye *PLD* genlerinin genom çaplı karakterizasyonu gerçekleştirilerek *PLD* genlerinin fasulye genomundaki işlevinin anlaşılmasını sağlamak, *PvPLD* genlerinin kuraklık ve tuz koşulları altında fasulyede oluşturduğu stres yanıtını tespit etmek ve evrimsel süreçte edindiği konumu görmektir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Fasulye genomunda bulunan *PLD* gen ailesi üyelerinin proteinlerinin tespit edilmesi

Fasulye genomunda bulunan *PLD* gen ailesi üyelerinin protein dizileri Pfam veri tabanında bulunan erişim numarasından (PF00614) yararlanılarak Phytozome veri tabanı v13'te tespit edilmiştir (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Fasulye genomunda bulunma olasılığı yüksek olan bütün *PLD* proteinlerini tespit etmek için Phytozome veri tabanı v13'te bulunan blastp ve gizli Markov model (HMM) aracı yardımıyla mevcut parametrelerle *P. vulgaris* genomu taranmıştır.

İlişkili dizilerde bulunması muhtemel *PLDc*, *PH*, *C2*, *PLD_C* ve *PLDc_2* gibi farklı *PLD* genine ait domainlerin varlığı HMMER veri tabanı yardımıyla tespit edilmiştir (<http://hmmer.org/>). Fasulye genomunda belirlenen tüm *PLD* proteinlerinin sahip olduğu moleküler ağırlığı, amino asit sayıları, instabilite indeksi, teorik izoelektrik noktası (pI) ve stabilite durumu "protparam aracı" yardımı ile tespit edilmiştir (<https://web.expasy.org/protparam/>). *PLD* genlerinin hücre içi lokalizasyonları WoLF PSORT'dan yararlanılarak belirlenmiştir (Horton et al., 2007).

2.2. *PLD* genlerinin yapısı, fiziksel konumları, korunmuş bölge motifleri ve gen duplikasyonlarının belirlenmesi

PvPLD proteinlerinde bulunan intron-ekzon bölgeleri ile alakalı detaylı bilgi edinmek için Gene Structure Display Server v2.0'den yararlanılmıştır (Hu et al., 2015). Gene Structure Display Server v2.0 genom dizileri ve kodlanan DNA (CDS) dizileri yardımıyla *PvPLD* genlerinin hangi bölgede olduğunu göstermekte kullanılmıştır. Phytozome veri tabanı v13 yardımıyla *PvPLD* genlerinin büyüklükleri ve kromozomal konumları belirlenmiştir.

PvPLD genleri fasulyede bulunan bütün kromozomlarda taranıp *PvPLD* genlerinin bulunduğu kromozomlar belirlenip MapChart programından yardım alınarak çizilmiştir (Voorrips, 2002). *PvPLD* gen duplikasyonları arasında olan Non-sinonim oranları (Ka), sinonim oranları (Ks) ve evrimsel zorlamalar (Ka/Ks) PAL2NAL (<http://www.bork.embl.de/pal2nal/>)'da bulunan PAML aracından (Yang, 2007) yardım alınarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Suyama et al., 2006).

PvPLD proteinlerinin ilave korunmuş bölge motiflerini belirlemek için "Multiple EM for Motif Elicitation (MEME) aracından" yardım alınmıştır (Bailey et al., 2006). Minimum/maksimum genişlik ve bulunması planlanan motiflerin maksimum sayısı için sınırlar; 6, 50 ve 10 olarak ayarlanmıştır. Motif bölgeleri 2 ile 300 arasında seçilmiştir. Bölge dağılımı olarak tekrarların herhangi bir sayısı seçilmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen motifler InterPro veri tabanında bulunan mevcut ayarlar kullanılarak aranmıştır (Quevillon et al., 2005).

2.3. Dizi Hizalama ve Filogenetik Analizler

Filogenetik analizler, 1000 tekrarlı bootstrap değeri kullanılarak Neighbor -joining (NJ) yöntemi ile belirlenmiştir. *PvPLD* protein dizileri ClustalW metodundan yararlanılarak hizalanmıştır (Thompson et al., 1997). *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* bitkilerinde bulunan *PLD* proteinleri kullanılarak MEGA v11 programından yararlanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Tamura et al., 2011). Filogenetik ağaç "İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL)" arayüzünden faydalanılarak çizdirilmiştir (Letunic and Bork, 2011).

2.4. Sinteni Analizi

P. vulgaris, *G. max* ve *A. thaliana* genomlarında bulunan *PLD* genleri ortologlarının protein dizileri Phytozome veri tabanı v13 yardımı ile tespit edilmiştir. Sinteni haritası TBtools programı (Chen et al., 2020) kullanılarak oluşturulmuştur.

2.5. Cis-acting Element Analizi

Cis-acting elementleri taramak için Phytozome veri tabanı v13 yardımıyla 5' yukarı akış bölgesi (2 kb'lik DNA dizisi) PlantCARE veri tabanı (Lescot et al., 2002) kullanılarak elde edilip TBtools programından yardım alınarak gerekli şekillendirmeler yapılmıştır.

2.6. In-Silico Gen İfade Analizi

İlimuna RNAseq veri setleri NCBI SRA veri tabanından alınarak elde edilmiştir. *PvPLD* genlerinin ifade profilleri bitkinin kuraklık (SRR8284481, SRR8284480) ve tuz (SRR957668, SRR958469) koşullarına maruz kalmış özel doku kütüphaneleri olan SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)'dan alınarak gerekli analizler gerçekleştirilmiştir. İn siliko gen ifade profilleri

RPKM birimlerinde Cufflinks metodundan yardım alınarak analiz edilmiştir (Trapnell et al., 2012). RPKM değerleri log2 tabanında hesaplanarak CIMminer algoritmasından yararlanılarak heatmap oluşturulmuştur.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Araştırma Sonuçları

3.1.1. *P. vulgaris* genomundaki *PLD* gen ailesinin belirlenmesi

Phytozome veri tabanı v13'ten yardım alınarak fasulye genomunda Pfam veri tabanı ile belirlenen Pfam erişim numaraları ile anahtar kelime araması yapılarak *PLD* gen ailesi üyeleri taranmıştır. Yapılan bu analiz sonucunda *PLD* protein homolojisine sahip olduğu belirlenen 17 gen bulunmuştur. *PLDc*, *PH*, *C2*, *PLD_C* ve *PLDc_2* domainlerinin varlığı HMMER veri tabanından yardım alınarak doğrulanmıştır. *PLDc*, *C2* ve *PLD_C* domainleri tespit edilen çoğu *PLD* gen ailesi üyelerinde ortak olarak bulunmuştur. Doğrulanmış diğer domainlerin aksine *PH* domaini yalnızca *PvPLD-7* geninde olduğu görülmüştür (Tablo 1.)

Yapılan analizler sonucu *P. vulgaris* genomunda olduğu belirlenen 17 aday *PLD* geni Tablo 2'de listelenmiştir. Ayrıca belirlenen tüm *PvPLD* genlerinin moleküler ağırlıkları, amino asit sayıları, teorik izoelektrik noktaları, instabilite indeksi, stabilite durumu ve hücre içi lokalizasyonları da dahil olmak üzere gerekli birçok bilgi de Tablo 1'de verilmiştir. *PvPLD* genleri fasulyenin 2, 5, 7, 8, 9 ve 10 numaralı kromozomları üzerinde dağılmış halde olduğu görülmüştür. Belirlenen kromozomlar üzerinde en düşük bir, en yüksek 5 adet gen olduğu bulunmuştur (Şekil 1).

Yapılan literatür taramalarında daha önce *PLD* gen ailesine ait birçok bitkide benzer çalışmalar olduğu görülmüştür.

Tablo 1. Fasulye genomunda bulunan PvPLD proteinleri hakkında bilgiler

Gene Name	Aa Sayısı	MW (kDa)	pI	Stabilite	Hücre içi lokalizasyonu
PvPLD-1	859	96,83	7,61	stable	nucl: 4
PvPLD-2	859	97,52	6,53	stable	nucl: 6
PvPLD-3	850	96,02	8,21	stable	nucl: 8
PvPLD-4	807	91,86	5,66	unstable	chlo: 4
PvPLD-5	808	92,26	5,89	unstable	cyto: 7
PvPLD-6	757	87,55	6,41	unstable	nucl: 9
PvPLD-7	1071	122,35	5,99	unstable	nucl: 9
PvPLD-8	1098	122,8	6,83	unstable	nucl: 7
PvPLD-9	847	96,59	7,64	stable	pero: 5
PvPLD-10	518	58,61	6,38	stable	chlo: 6
PvPLD-11	827	93,98	5,84	stable	nucl: 6
PvPLD-12	1122	127,6	6,01	unstable	nucl: 6
PvPLD-13	824	94,15	6,56	stable	chlo: 4
PvPLD-14	777	89,49	6,08	unstable	nucl: 8
PvPLD-15	154	17,5	5,3	stable	cysk: 11
PvPLD-16	809	91,52	5,77	stable	cyto: 7
PvPLD-17	1070	120,4	6,15	unstable	nucl: 7

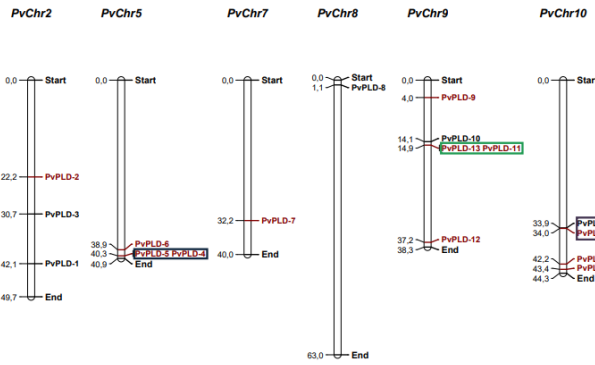
PvPLD proteinlerine ait amino asit uzunluğu 154-1122 aralığında değiştiği görülmüştür. PvPLD genleri arasında en uzun amino asit sayısına (1122) sahip olan gen PvPLD-12 olmuştur. En kısa amino asit sayısına (154) sahip olan gen ise PvPLD-15 olarak belirlenmiştir. Teorik izoelektrik noktaları (pI) 5,3-8,21 değerleri

arasında değişmekte olup 17 PvPLD geninin 14'ü asidik özellik ve 3 tanesi de bazik özellik göstermiştir. En yüksek pI değeri (8,21)

PvPLD-3'te iken en düşük pI değeri (5,3) PvPLD-15'te görülmüştür. Moleküler ağırlıklar analiz edildiğinde ortaya çıkan en düşük ağırlık (17.5 kDa) PvPLD-15'te iken en yüksek (127,8 kDa) ağırlık PvPLD-12'de olduğu belirlenmiştir. PvPLD proteinlerinin 9 tanesinin stabil olduğu 8 tanesinin ise stabil olmadığı görülmüştür. Ayrıca WoLFPSORT veri tabanından yardım alınarak gerçekleştirilen analizler sonucunda PvPLD genlerinin ağırlıklı olarak nükleusta bulunduğu, az da olsa diğer hücre altı kompotentlerde de bulunduğu saptanmıştır.

Tablo 2. Fasulye genomunda bulunan phospholipase D (PLD) genlerine ait domain analizleri (A, B, C, D, E olarak gösterilen domain isimleri sırasıyla C2, PH, PLDc, PLD_C ve PLDc_2 olarak tanımlanmıştır)

Gene No	Phytozome ID	Domainler				
		A	B	C	D	E
PvPLD-1	Phvul.002G248700.1	✓		✓	✓	
PvPLD-2	Phvul.002G104200.1	✓		✓	✓	
PvPLD-3	Phvul.002G153400.1	✓		✓	✓	
PvPLD-4	Phvul.005G177300.1	✓		✓	✓	
PvPLD-5	Phvul.005G177200.1	✓		✓	✓	
PvPLD-6	Phvul.005G160400.1	✓		✓	✓	
PvPLD-7	Phvul.007G198600.1		✓	✓		✓
PvPLD-8	Phvul.008G013400.1	✓		✓	✓	
PvPLD-9	Phvul.009G020200.1	✓		✓	✓	
PvPLD-10	Phvul.009G087000.1					✓
PvPLD-11	Phvul.009G093500.1	✓		✓	✓	
PvPLD-12	Phvul.009G251700.1			✓		✓
PvPLD-13	Phvul.009G093400.1	✓		✓	✓	
PvPLD-14	Phvul.010G139800.1	✓		✓	✓	
PvPLD-15	Phvul.010G088850.1			✓	✓	
PvPLD-16	Phvul.010G155000.1	✓		✓	✓	
PvPLD-17	Phvul.010G088900.1	✓		✓	✓	



Şekil 1. PvPLD genlerinin fasulye genomundaki dağılışı (Kırmızı renkle gösterilmiş genler segmental duplike genler, etrafı çevrili olarak gösterilenler ise tandem duplike genleri göstermektedir.)

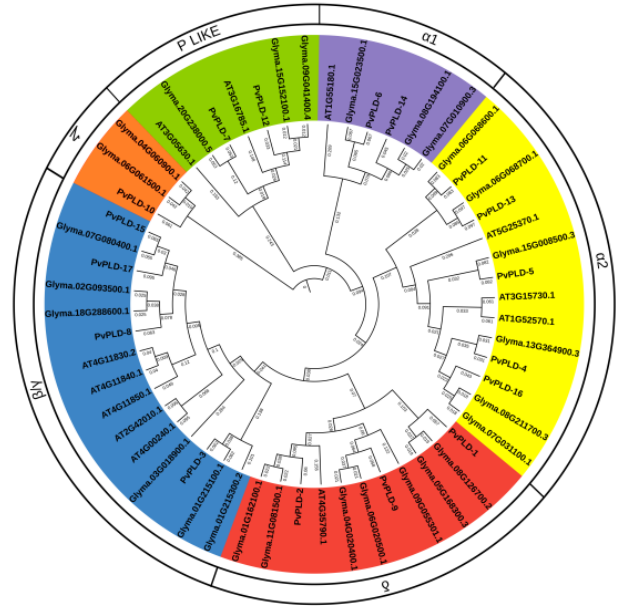
Analizler sonucunda PvPDL genleri içerisinde 3 tandem ve 5 segmental duplikasyon olduğu belirlenmiştir. *P. vulgaris* genomunda tespit edilen segmental ve tandem duplike PLD genlerine ait Ka, Ks ve Ka/Ks değerleri Tablo 3’de gösterilmiştir. Tespit edilen duplike genler arasında Ka/Ks oranı 1’den büyük herhangi bir değere rastlanmamıştır. Duplikasyon görülen *PvPLD* genlerinin Ka/Ks değeri birden küçük olduğundan evrimsel süreçte arındırıcı (negatif) seleksiyona uğramıştır (Juretic et al., 2005). Duplike gen çiftleri arasındaki Ka/Ks oranı bire eşit ise nötr, birden büyük ise pozitif ve birden küçük ise negatif seçim olduğu kabul edilmektedir (Kasapoglu et al., 2020; Büyük et al., 2019; İlhan et al., 2018).

Tablo 3. *PvPLD* gen duplikasyonları olayları ve Ka, Ks, Ka/Ks değerleri

Gene-1	Gene-2	Ka	Ks	Ka/Ks	Duplikasyon tipi
<i>PvPLD</i> -5	<i>PvPLD</i> -4	0.092	0.656	0.1404	Tandem
<i>PvPLD</i> -13	<i>PvPLD</i> -11	0.216	0.864	0.2505	Tandem
<i>PvPLD</i> -15	<i>PvPLD</i> -17	0.087	0.350	0.2493	Tandem
<i>PvPLD</i> -2	<i>PvPLD</i> -9	0.226	1.673	0.1352	Segmental
<i>PvPLD</i> -5	<i>PvPLD</i> -16	0.111	1.002	0.1109	Segmental
<i>PvPLD</i> -6	<i>PvPLD</i> -14	0.128	0.525	0.2443	Segmental
<i>PvPLD</i> -7	<i>PvPLD</i> -12	0.196	1.686	0.1168	Segmental
<i>PvPLD</i> -13	<i>PvPLD</i> -16	0.263	3.507	0.075	Segmental

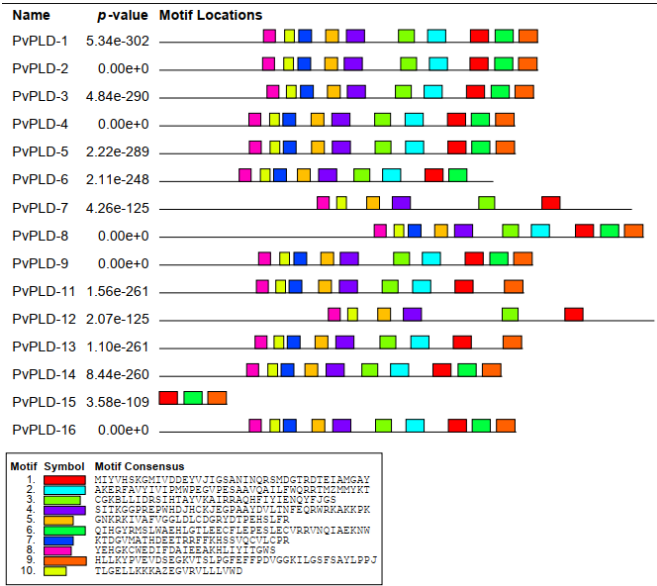
3.1.2. PLD gen ailesi üyelerinin gen yapısı, filogenetik ve korunmuş motif analizleri

PLD gen ailesi üyelerinin proteinleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek için *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* bitkilerinde bulunan *PLD* genleri kullanılarak filogenetik ağaç çizdirilmiştir. Filogenetik ağaç *PLD* proteinlerinin amino asit dizisine göre Clustal W aracından yardım alınarak hizalanmıştır. Hizalanan protein dizileri ‘newick’ formatında alınıp İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) arayüzünden yararlanılarak çizdirilmiştir (Letunic and Bork, 2011). *PLD* proteinleri P like, Alpha 1, Alpha 2, Delta, Beta/Gamma ve zeta olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* bitkilerinin *PLD* genlerine ait protein dizileri kullanılarak çizilen filogenetik ağaç

MEME (v5.3.3) (Bailey et al., 2006) programından yararlanılarak *PvPLD* proteinlerinde 10 korunmuş motif tespit edilmiştir. Bulunan motiflerin amino asit uzunluğu 22-42 aralığındadır. Analiz sonucunda en az 3, en fazla 10 motif olduğu tespit edilmiş ve Şekil 3’te bu motiflere ait dizi bilgileri de gösterilmiştir. Motif 1, 6 ve 9’un tüm genlerde ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir.



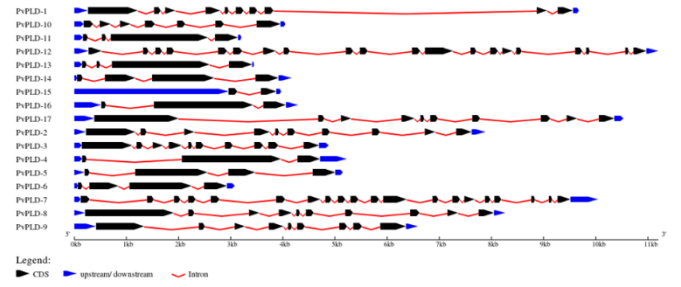
Şekil 3. PvPLD genlerinde bulunması muhtemel motifler

Ayrıca InterProScan ara yüzünde gerçekleştirilen analizler sonucunda Motif 1, 2, 3, 4 ve 6'da Phospholipase D family (IPR015679) domaininin ortak olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 4).

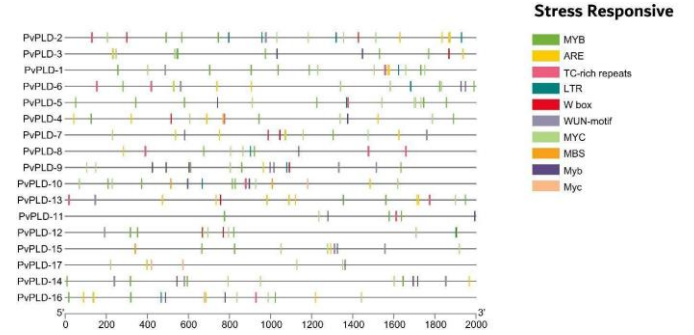
Tablo 4. PvPLD genlerine ait tahmin edilen motiflere ait amino asit uzunluğu ve domain bilgisi

Motif ID	Width	Domain
1	41	Phospholipase D family
2	41	Phospholipase D family
3	36	Phospholipase D family
4	41	Phospholipase D family
5	29	N/A
6	41	Phospholipase D family
7	29	N/A
8	27	N/A
9	42	N/A
10	22	N/A

Gene Structure Display Server v2.0 yardımıyla PLD genlerine ait ekzon ve intron sayıları belirlenmiştir (Şekil 4). Yapılan analizler sonucunda en fazla intron sayısı 19 intron ile PvPLD-7 ve PvPLD-12 de tespit edilirken en az intron sayısı PvPLD-15'te görülmüştür. Ayrıca en az ekzon sayısı PvPLD-2' de tespit edilirken, en yüksek ekzon sayısı PvPLD-7 ve PvPLD-12'de tespit edilmiştir.



Şekil 4. PvPLD genlerindeki intron-ekzon sayısı, pozisyonu ve uzunluğu

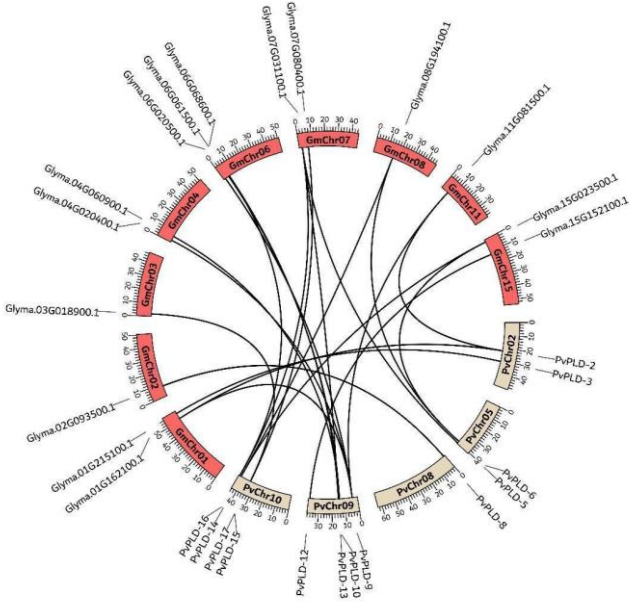


Şekil 5. PvPLD genlerinin 5' üst akış bölgesindeki cis acting elementlerin dağılımı

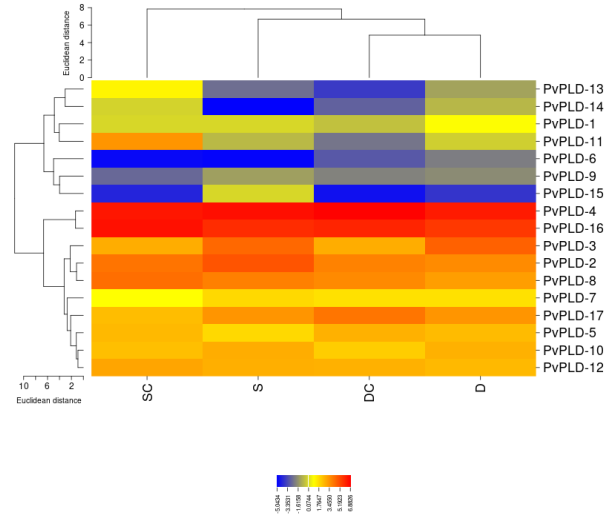
PlantCARE veri tabanı yardımıyla analiz edilen cis elementleri TBtools programı yardımıyla çizdirilmiştir (Şekil 5). Analizler sonucunda stres yanıtında görevli elementlerin bulunduğu genlere göre konumları verilmiştir. En fazla bulunan elementler TATA-box (%37,2), CAAT-box (%24,1), AT~TATA-box (%3,2), Box 4 (%2,1), MYB (%2), ARE (%1.39)'dir. Stres elementlerine bakıldığında en fazla element PvPLD2'de bulunurken (20) en az element PvPLD17'de (7) bulunmuştur. Bir gen üzerinde en fazla bulunan element PvPLD-8, PvPLD-9 ve PvPLD-10 geni üzerinde 8 tekrarlı MYB olmuştur.

3.1.3. P. vulgaris, G. max ve A. thaliana bitkilerindeki PLD genlerinin karşılaştırılması ve sinteni analizi

P. vulgaris, G. max ve A. thaliana bitkilerine ait olan PLD proteinleri arasında bulunan sinteni haritası oluşturulmuştur. Sinteni analizi sonucunda P. vulgaris ve G. max türleri arasında ise 23 sinteni ilişkisi tespit edilmiştir (Şekil 6A). Ayrıca P. vulgaris ve A. thaliana bitkileri arasında da 10 adet sinteni ilişkisi tespit edilmiştir (Şekil 6B).



Şekil 6A. *P. vulgaris* ile *G. max* bitkileri arasında PLD genlerinin genom çaplı sinteni analizi *P. vulgaris* genomunda bulunan sinteni ilişkisi



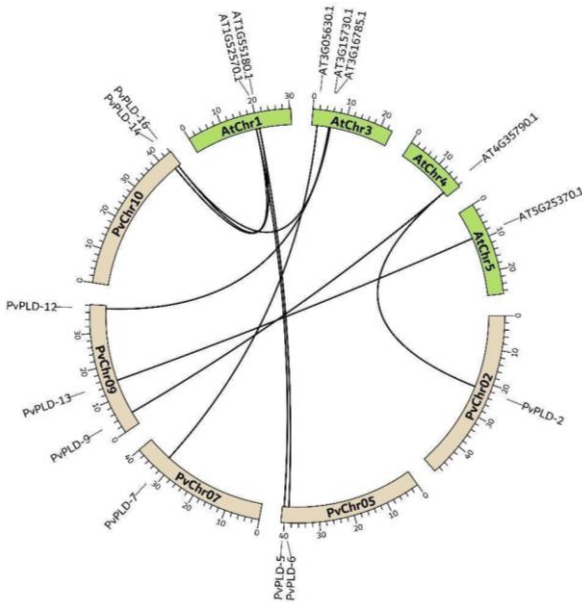
Şekil 7. Tuz ve kuraklık stresi altında PvPLD genlerinin in siliko gen ifade analizi

3.2. Tartışma

Yapılan bu çalışmada fasulye genomunda 17 adet PLD geni tespit edildi. *PvPLD* proteinlerine ait amino asit uzunluğu 154-1122 aralığında değiştiği görülmüştür. Teorik izoelektrik noktaları (pI) 5,3-8,21 değerleri arasında değişmektedir. En yüksek pI değeri (8,21) *PvPLD-3*'te iken en düşük pI değeri (5,3) *PvPLD-15*'te görülmüştür. Moleküler ağırlıklar analiz edildiğinde ortaya çıkan en düşük ağırlık (17,5 kDa) *PvPLD-15*'te iken en yüksek (127,8 kDa) ağırlık *PvPLD-12*'de olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalar incelendiğinde *Solanum tuberosum* bitkisinde PLD genlerine ait amino asit sayısı uzunluğunun 755-873 amino asit aralığında, moleküler ağırlıkların 86,95-126,2 kDa aralığında ve izoelektrik noktasının 5,4-8,52 değerleri arasında olduğu belirlenmiştir (Li et al., 2021). *Corchorus capsularis* bitkisinde bulunan PLD genlerinin amino asit sayısı uzunluğunun 773-1129, moleküler ağırlığının 88,3-126,11 ve izoelektrik noktasının 5,4-8,64 değerleri arasında değiştiği bulunmuştur (Sadat et al., 2022).

PvPLD genleri fasulyenin 2, 5, 7, 8, 9 ve 10 numaralı kromozomları üzerinde dağılmış halde olduğu görülmüştür. *Arabidopsis thaliana* (Elias et al., 2002), *Glycine max* (Zhao et al., 2012), *Oryza sativa* (Li et al., 2007) gibi türler ile yapılan çalışmalara benzer olarak *PvPLD* gen ailesi üyelerinde de *PLDc*, *PH*, *C2*, *PLD_C* ve *PLDc_2* gibi domainlerin varlığı tespit edildi. PLD proteinleri *P like*, *Alpha 1*, *Alpha 2*, *Delta*, *Beta/Gamma* ve *zeta* olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. PLD genlerine ilgili diğer bitki türlerinde yapılan bir çalışmada patates (Li et al., 2021), çeltik (Li et al., 2007) ve *A. thaliana* (Elias et al., 2002) türleri arasında gerçekleştirilen filogenetik analizlerde benzer alt aile üyelerine ve sonuçlara rastlanmıştır (Li et al., 2021). Yapılan analizler sonucunda en yaygın bulunan domainin *PLDc* olduğu görülmüştür. Gen duplikasyon olayları gen ailelerinin gelişmesi ve çok daha fazla büyümesi için oldukça önemli bir yere sahiptir (Mehan et al., 2004).

Bundan dolayı *PvPLD* gen ailesi üyeleri arasında bulunan segmental ve tandem duplikasyon olaylarının bulunması için gerekli analizler yapılmıştır. Yapılan literatür taramalarında daha önce PLD gen ailesi üyelerinin *S. tuberosum* bitkisinde tanımlandığı ve kromozom analizlerinde 2 tandem duplikasyonuna rastlandığı bildirilmiştir (Li et al., 2021). Bu çalışmada *PvPLD* genlerine ait kromozomal analizlerde 5 adet segmental ve 3 adet tandem duplikasyon gen tespit edilmiştir.



Şekil 6B. *P. vulgaris* ile *A. thaliana* bitkileri arasında PLD genlerinin genom çaplı sinteni analizi

3.1.4. *PvPLD* genlerinin tuz ve kuraklık stresi altındaki ifade seviyeleri

PvPLD genlerinin kuraklık ve tuz stresi altındaki ifade profilleri özel doku kütüphanelerin yardım alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. İfade düzeylerine bakıldığında tuz stresi altında *PvPLD-11*, *PvPLD-13* ve *PvPLD-14* genlerinin ifade düzeyinde belirgin derecede azalış gözlemlenirken kuraklık stresinde artış gözlemlenmiştir. Diğer genlerde ise belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Tuz stresinde *PvPLD-15*'in ifade seviyesinde artış görülmüştür. Diğer genlerde ise belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 7).

Solanum tuberosum bitkisinde stres ile bağlantılı olduğu düşünülen 13 adet cis acting elementin varlığı tespit edilmiştir (Li et al., 2021). Yapılan bu çalışmada fasulyede stres ile alakalı olduğu düşünülen 10 adet cis acting element tespit edilmiştir ve *PvPLD* genleri üzerinde en fazla bulunan element MYB olarak belirlenmiştir.

Analizler sonucunda *P. vulgaris* ve *G. max* türleri arasında ise 23 sinteni ilişkisi (Şekil 6B), *P. vulgaris* ve *A. thaliana* bitkileri arasında da 10 adet sinteni ilişkisi tespit edilmiştir. (Şekil 6C). Benzer olarak *Solanum tuberosum* ve *A. thaliana* bitkileri arasında 13 sinteni ilişkisi tespit edilmiştir (Li et al., 2021). *S. tuberosum* bitkisinde *PLD* genleri abiyotik stres altında incelenmiş ve Absisik asit (ABA), kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuz stresi altında 6 farklı gende yüksek ifade durumu gözlenmiştir (Sadat et al., 2022). Benzer şekilde bu çalışmada da fasulye genomunda bulunan 4 *PvPLD* geninin kuraklık ve tuz stresi altında kontrole göre yoğun ifade farklılıkları gözlenmiştir (Şekil 7).

4.Sonuç

P. vulgaris genomunda tespit edilen *PvPLD* gen ailesi ile yapılan in silico analizler sonucunda 17 *PvPLD* gen ailesi üyesi belirlenmiştir. Tespit edilen genler altı farklı kromozom üzerinde dağılım göstermiştir. *P. vulgaris*, *G. max* ve *A. thaliana* bitkilerindeki *PLD* genleri 5 farklı grupta sınıflandırılmıştır. Yapılan taramalar sonucunda *PvPLD* gen ailesi üyelerinde *PLDc*, *PH*, *C2*, *PLD_C* ve *PLDc_2* olmak üzere toplam 5 adet domain tespit edilmiştir. Korunmuş motif analizi sonucunda tüm *PvPLD* gen ailesi üyelerinde ortak olarak bulunan 3 farklı benzersiz motif tespit edilmiştir. Yapılan cis acting element analizi sonucuna göre *PvPLD* genleri üzerinde en fazla MYB elementi olduğu görülmüştür.

P. vulgaris bitkisinin kuraklık ve tuz stresi altında gen ifade analizlerinde *PvPLD-11*, *PvPLD-13*, *PvPLD-14* ve *PvPLD-15* genlerinde belirgin farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada yapılan in silico analizler fasulyede *PLD* genlerinin işlevi hakkında önemli bilgiler sunulmakta ve yapılması planlanan çalışmalar için temel niteliği taşımaktadır.

5.Kaynaklar

Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., & Li, W. W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W369-W373.

Bargmann, B. O., & Munnik, T. (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current opinion in plant biology*, 9(5), 515-522.

Bargmann, B. O., Laxalt, A. M., Riet, B. T., Van Schooten, B., Merquiol, E., Testerink, C., ... & Munnik, T. (2009). Multiple *PLDs* required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant and Cell Physiology*, 50(1), 78-89.

Büyük, İ., İlhan, E., Şener, D., Özsoy, A. U., & Aras, S. (2019). Genome-wide identification of CAMTA gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. *Molecular biology reports*, 46(3), 2721-2732.

Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.

Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A., & Lavin, M. (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany*, 438-460.

Eliš, M., Potocký, M., Cvrčková, F., & Žárský, V. (2002). Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC genomics*, 3(1), 1-15.

Hanahan, D. J., & Chaikoff, I. L. (1947). A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *Journal of Biological Chemistry*, 169(3), 699-705.

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587.

Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* (Oxford, England), 31(8), 1296-1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>

İlhan, E. (2018). *Eucalyptus grandis* YABBY Transkripsiyon Faktörlerinin Genom Bazında Analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 5(2), 158-166.

Juretic, N., Hoen, D. R., Huynh, M. L., Harrison, P. M., & Bureau, T. E. (2005). The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. *Genome research*, 15(9), 1292-1297.

Kasapoglu, A. G., İlhan, E., Kızılkaya, D., Pour, A. H., & Haliloğlu, K. (2020). Sorgum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Genomunda BES1 Transkripsiyon Faktör Ailesinin Genom Çaplı Analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(1), 85-95.

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 research*, 39(suppl_2), W475-W478.

Li, G., Lin, F., & Xue, H. W. (2007). Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of *PLDβ1* in seed germination. *Cell research*, 17(10), 881-894.

Li, L., Zhang, C., Zhang, M., Yang, C., Bao, Y., Wang, D., ... & Chen, Y. (2021). Genome-wide analysis and expression profiling of the Phospholipase D gene family in *Solanum tuberosum*. *Biology*, 10(8), 741.

Liu, Q., Zhang, C., Yang, Y., & Hu, X. (2010). Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in Poplar and Grape. *BMC plant biology*, 10(1), 1-15.

Mane, S. P., Vasquez-Robinet, C., Sioson, A. A., Heath, L. S., & Grene, R. (2007). Early *PLDα*-mediated events in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis. *Journal of experimental botany*, 58(2), 241-252.

Mehan, M. R., Freimer, N. B., & Ophoff, R. A. (2004). A genome-wide survey of segmental duplications that mediate common human genetic variation of chromosomal architecture. *Human genomics*, 1(5), 1-10.

Nichols, N. N., Sutivisedsak, N., Dien, B. S., Biswas, A., Lesch, W. C., & Cotta, M. A. (2011). Conversion of starch from dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ethanol. *Industrial Crops and Products*, 33(3), 644-647.

Qin, C., & Wang, X. (2002). The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and

- phosphatidylcholine-selective *PLD*ζ1 with distinct regulatory domains. *Plant physiology*, 128(3), 1057-1068.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W116-W120.
- Roshan, N. M., Ashouri, M., & Sadeghi, S. M. (2021). Identification, evolution, expression analysis of phospholipase D (*PLD*) gene family in tea (*Camellia sinensis*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(6), 1219-1232.
- Roshan, N. M., Ashouri, M., & Sadeghi, S. M. (2021). Identification, evolution, expression analysis of phospholipase D (*PLD*) gene family in tea (*Camellia sinensis*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(6), 1219-1232.
- Sadat, M., Ullah, M., Hossain, M., Ahmed, B., & Bashar, K. K. (2022). Genome-wide in silico identification of phospholipase D (*PLD*) gene family from *Corchorus capsularis* and *Corchorus olitorius*: reveals their responses to plant stress. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-12.
- Sagar, S., Biswas, D. K., Chandrasekar, R., & Singh, A. (2021). Genome-wide identification, structure analysis and expression profiling of phospholipases D under hormone and abiotic stress treatment in chickpea (*Cicer arietinum*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 264-273.
- Simontacchi, M., Galatro, A., Ramos-Artuso, F., & Santa-María, G. E. (2015). Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 6, 977.
- Suyama, M., Torrents, D., & Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W609-W612.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tang, K., Dong, C. J., & Liu, J. Y. (2016). Genome-wide comparative analysis of the phospholipase D gene families among allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *PLoS one*, 11(5), e0156281.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, 25(24), 4876-4882.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., . . . Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3), 562-578.
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*, 93(1), 77-78.
- Wan, S., Li, M., Ma, F., Yuan, J., Liu, Z., Zheng, W., & Zhan, J. (2019, June). Genome-wide identification of phospholipase D (*PLD*) gene family and their responses to low-temperature stress in peach. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2110, No. 1, p. 020011). AIP Publishing LLC.
- Wang, X. (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 408-414.
- Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant physiology*, 139(2), 566-573.
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H. E., ... & Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase Dα in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31994-32002.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1586-1591.
- Zhao, J., Zhou, D., Zhang, Q., & Zhang, W. (2012). Genomic analysis of phospholipase D family and characterization of *GmPLD*αs in soybean (*Glycine max*). *Journal of plant research*, 125(4), 569-578.