

**TÜRKİYE ENDEMİĞİ *THERMOPSIS*
TURCICA'DAN *APETALA1* VE *APETALA2*
GENLERİNİN KLONLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Alperen DEDEOĞLU

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Mart, 2015

Bu tez çalışması 212T099 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

**TÜRKİYE ENDEMİĞİ *THERMOPSIS TURCICA*'DAN *APETALA1*
VE *APETALA2* GENLERİNİN KLONLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Alperen DEDEOĞLU

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Mart, 2015

TEZ ONAY SAYFASI

Alperen DEDEOĞLU tarafından hazırlanan “Türkiye Endemiği *Thermopsis turcica*’dan *Apetalla1* ve *Apetalla2* Genlerinin Klonlanması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 06/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç Dr. Mustafa KARGIOĞLU
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Başkan : Doç Dr. Yaşar KARAKURT
Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi

Üye : Doç Dr. Süleyman CENKÇİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. İbrahim Erol
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/03/2015

Alperen DEDEOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE ENDEMİĞİ *THERMOPSIS TURCICA*'DAN *APETALA1* VE *APETALA2* GENLERİNİN KLONLANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Alperen DEDEOĞLU

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

MADS kutulu *APETALA1* (*AP1*) ve iki *AP2* kutulu *APETALA2* (*AP2*) transkripsiyon faktörleri bitki çiçeklenmesinde sepal gelişiminden sorumlu A-fonksiyonlu genlerdir. Bu araştırmada, çok-karpelli *Thermopsis turcica* genç tomurcuklarından *Arabidopsis* *AP1* ve *AP2* homologları izole edilmiş ve farklı dokularda ifadesel analizleri yapılmıştır. Dejenere primerler ile klonlanan gen parçalarının tam uzunluk cDNA'ları cDNA uçlarının hızlı çoğaltımı (RACE) ile belirlenmiştir. 1074 bp tam uzunluk *TtAP1* cDNA'sı 714 bp protein kod bölgesine sahiptir. MADS-I-K-C domenleri belirlenmiş *TtAP1* proteini 238 amino asit uzunluğundadır. Hizalama ve filogenetik analizler *TtAP1*'in diğer legüm türlerinde belirlenen homologlarına benzer olduğunu ispatlamıştır. *TtAP2* cDNA'sı 545 amino asit için 1638 bp protein kodlama bölgesine sahiptir. *TtAP2* proteini 70 amino asitlik korunmuş bölgede iki *AP2* domenine sahiptir. Proteinin diğer kısımları çok değişken ve korunmamıştır. Çiçek tomurcukları ve yarı açılmış çiçeklerin sepal, petal, stamen ve karpel dokularında *TtAP1* ve *TtAP2* göreceli ifadesi gerçek zamanlı nicel PCR analizi ile belirlenmiştir. Bu genlerin göreceli gen ifadesi belirgin bir şekilde sepal dokusunda fazla bulunmuştur. *TtAP1*'nin göreceli gen ifadesi sepal > tomurcuk > petal > karpel > stamen dokuları şeklinde belirlenmişken, *TtAP2*'nin göreceli gen ifadesi sepal > karpel > tomurcuk > petal > stamen şeklinde belirlenmiştir. Yapısal ve fonksiyonel analiz bulgularımız *TtAP1* ve *TtAP2* genlerinin sırasıyla *AP1* ve *AP2* homologları olduğunu ispatlamıştır.

2015, xi + 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çiçek organı meristem genleri, RACE, RT-qPCR, *Thermopsis turcica*, *APETALA1*, *APETALA2*

ABSTRACT

M.Sc Thesis

CLONING AND CHARACTERIZATION OF *APETALA1* AND *APETALA2* GENES FROM TURKISH ENDEMIC *THERMOPSIS TURCICA*

Alperen DEDEOGLU

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa KARGIOGLU

The MADS-boxed *APETALA1* (*AP1*) and two AP2-boxed *APETALA2* (*AP2*) are A-function genes responsible for initiation and development of sepal and petals during the flowering of plants. In this research, *Arabidopsis AP1* and *AP2* homologous were isolated from young floral buds of multiple-carpellated *T. turcica* and their relative expressions were analyzed in reproductive tissues. Full length cDNAs of partially cloned genes were determined by using RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) strategy. The full length cDNA of *TtAP1* is 1074 bp and contains 714 bp protein coding sequence. It encodes a protein of 238 amino acids with functional MADS and K domains. Alignments and phylogenetics analysis indicated that *TtAP1* was more similar to *AP1* homologues determined for other legume species. The cDNA of *TtAP2* encodes 545 amino acid from 1638 bp protein coding sequence. *TtAP2* protein contains two well conserved AP2 domains, each 70 amino acids in length. The other parts of *TtAP2* protein were more variable and less conserved. The relative expression analysis of *TtAP1* and *TtAP2* genes were determined in floral buds and floral organs (sepals, petals, stamens and carpels) of semi-opened flowers by using real-time quantitative PCR analysis. The highest transcript level of both genes were obviously determined in sepal tissue. The transcript level of *TtAP1* was in order of sepals > young floral buds > petals > carpels > stamens. The order was sepals > carpel > young floral buds > petal > stamens for the *TtAP2* transcripts. The MADS-boxed *APETALA1* (*AP1*) and two AP2-boxed *APETALLA2* (*AP2*) are A-function genes responsible for initiation and development of sepal and petals during the flowering of plants. The results of structural

and functional analyses clearly proved that TtAP1 and TtAP2 were Arabidopsis homologous of AP1 and AP2, respectively.

2015, xi + 91 pages

Key Words: Floral organ meristem genes, RACE, RT-qPCR, *Thermopsis turcica*, *APETALA1*, *APETALA2*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans araştırmalarım süresince bana her Şekilde destek çıkan, yardımlarını hiçbir Şekilde esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında benden destek ve yardımlarını esirgemeyen hatta zamanının büyük çoğunluğunu ailesinden çok benimle birlikte geçiren öğrencisi olmak bir yana kendisiyle tanışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam Sayın Doç. Dr. Süleyman CENKCI ve kıymetli ailesine en içten dileklerle teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar süresince sabırlı bir Şekilde bana katlanan ve her koşulda yardım eden Sayın Ezgi Melis KOLUKISA başta olmak üzere yüksek lisans ve laboratuvar arkaşlarım Sayın Ali KIYAK, Sayın Büşra KAHRAMAN ve Sayın Sultan DEMİR'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve beni her koşulda destekleyen kıymetli annem Őerife DEDEOĞLU, babam Akın DEDEOĞLU ve kardeşim Nesteren DEDEOĞLU'na teŐekkürü borç bilirim.

Ayrıca bu tez çalışmasını 212T099 numaralı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Alperen DEDEOĞLU
AFYONKARAHİSAR, 2015

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTARCT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Bitkilerde Çiçek Meristeminin Oluşumu ve Çiçeklenmenin Gelişimi.....	4
2.2 Çiçek Organ Kimliğini Düzenleyen Genler ve ABCDE Modeli	9
2.2.1 A Sınıfı Genler	10
2.2.2 B Sınıfı Genler	11
2.2.3 C Sınıfı Genler	11
2.2.4 D Sınıfı Genler	12
2.2.5 E Sınıfı Genler	12
2.3 MADS Kutusu.....	14
2.4 Legümlerde Çiçeklenme	19
2.5 <i>Thermopsis turcica</i> Çiçek Yapısı ve Gen Kaynağı Olarak Kullanılması.....	20
2.6 <i>APETALA1</i>	20
2.6 <i>APETALA2</i>	26
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1 Bitki Materyali	30

3.2 <i>Thermopsis turcica</i> Çiçek Dokularından Total RNA İzolasyonu.....	30
3.2.1 Total RNA Ekstraksiyonu	30
3.2.2 DNaz Uygulaması	31
3.2.3 Total RNA Miktar Tayini.....	31
3.2.4 RNA Formaldehitli Agaroz Jel Elektrofrezisi	32
3.3 Gene Özgü Primer Tasarımı	33
3.3.1 <i>APETALA1</i> Gene Özgü Primer Tasarımı	33
3.3.2 <i>APETALA2</i> Gene Özgü Primer Tasarımı	34
3.4 <i>APETALA1</i> ve <i>APETALA2</i> Genlerinin RACE Analizi.....	34
3.4.1 5' ve 3' RACE İçin Kullanıma Hazır İlk İplik cDNA Sentezi.....	35
3.4.2 5' ve 3' RACE PCR Tekniği.....	36
3.5 <i>APETALA1</i> ve <i>APETALA2</i> Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	37
3.5.1 cDNA Sentezi.....	37
3.5.2 RT-qPCR Analizi	37
4. BULGULAR	39
4.1 <i>APETALA1</i> Moleküler Karakterizasyonu ve İfade Analizi	40
4.1.1 <i>APETALA1</i> cDNA'sının 5' ve 3' Uçlarının Hızlı Çoğaltımı.....	40
4.1.2 Filogenetik İlişki	48
4.1.3 <i>T.turcica</i> 'nın Farklı Dokularında <i>TtAPI</i> Geni İfadesi	51
4.2 <i>APETALA2</i> Moleküler Karakterizasyonu ve İfade Analizi	53
4.2.1 <i>APETALA2</i> cDNA'sının 5' ve 3' Uçlarının Hızlı Çoğaltımı.....	53
4.2.2 Filogenetik İlişki	62
4.2.3 <i>T.turcica</i> 'nın Farklı Dokularında <i>TtAP2</i> Geni İfadesi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
6. KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
ddH ₂ O	Bi distile su
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
pg	Pikogram
g	Relatif Santrifüj Kuvveti
U	Ünite (birim)

Kısaltmalar

MOPS	3-(N-morpholino) propansülfonik asit
CDS	cDNA synthesis primer (cDNA sentez primeri)
Ct	Threshold cycle (Eşik değeri)
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen di amin tetra asetat
GC	Guanin-Sitozin
cDNA	Komplementer DNA
RACE	cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı
RT qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo nükleik asit
SDS	Sodium dodesil sülfat
T _m	Erime sıcaklığı
UV	Ultraviyole
UPM	Evrensel Primer Karışımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>Arabidopsis</i> Çiçeği.....	5
Şekil 2.2 Floral meristemin kurulumuna katılan genler	8
Şekil 2.3 Çiçek organ kimlik faktörleri tarafından çiçek organlarının özellikleri.....	13
Şekil 2.4 MIKC tipi MADS proteinlerinin domen yapısı	17
Şekil 2.5 MADS domenli proteinlerin oluşturduğu kompleksin işlev modeli	17
Şekil 4.1 <i>TtAP1</i> genine ait açık okuma çerçevesi, nükleotid ve aminoasit sekansları ...	47
Şekil 4.2 <i>T. turcica APETALA1 (TtAP1)</i> protein dizisinin filogenetik ilişkisi	49
Şekil 4.3 β - <i>Actin</i> ve <i>AP1</i> genleri için gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri	52
Şekil 4.4 β - <i>Actin</i> ve <i>AP1</i> genlerinin standart erime eğrisi grafiği.....	52
Şekil 4.5 <i>AP1</i> geninin karpel, petal, sepal, stamen ve tomurcuk dokularında ifade seviyesini gösteren bar grafiği	52
Şekil 4.6 <i>TtAP2</i> genine ait açık okuma çerçevesi, nükleotid ve aminoasit sekansları ...	61
Şekil 4.7 <i>T. turcica APETALA2 (TtAP2)</i> protein dizisinin filogenetik ilişkisi	63
Şekil 4.8 β - <i>Actin</i> ve <i>AP2</i> genleri için gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri	66
Şekil 4.9 β - <i>Actin</i> ve <i>AP2</i> genlerinin standart erime eğrisi grafiği.....	66
Şekil 4.10 <i>AP2</i> geninin karpel, petal, sepal, stamen ve tomurcuk dokularında ifade seviyesini gösteren bar grafiği.....	67
Şekil 5.1 <i>AP1</i> protein dizisinin <i>T.turcica</i> ve diğer legüm türleri arasındaki korunmuş bölgeleri.....	70
Şekil 5.2 <i>AP2</i> protein dizisinin <i>T.turcica</i> ve diğer legüm türleri arasındaki korunmuş bölgeleri	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

- Çizelge 3.1** 3'- ve 5'-RACE ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere ileri (dış ve iç) ve geri (dış ve iç) gene özgü primer dizileri, primerlerin T_m ve annealing sıcaklıkları..... 33
- Çizelge 3.2** 3'- ve 5'-RACE ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere ileri (dış ve iç) ve geri (dış ve iç) gene özgü primer dizileri, primerlerin T_m ve annealing sıcaklıkları..... 34
- Çizelge 4.1** *T.turcica AP1* proteini ile 20 *AP1* benzeri proteinin benzerlikleri ve protein/gen kodları. Mevcut analiz BLASTp analiz sonucunda elde edilmiştir (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 50
- Çizelge 4.2** *T.turcica AP2* proteini ile 18 *AP2* benzeri proteinin benzerlikleri ve protein/gen kodları. Mevcut analiz BLASTp analiz sonucunda elde edilmiştir (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 64

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 4.1 Formaldehit agaroz jel elektroforezi sonrası dokuların jel görüntüleri	39
Resim 4.2 <i>T.turcica</i> API- RACE ürünlerinin jel görüntüsü.....	40
Resim 4.3 β -Actin ve API geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	51
Resim 4.4 (A) UPM ve dış primer çiftleri ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü. (B) İç primer çiftleriyle yapılan nested PCR sonucu PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	53
Resim 4.5 β -Actin ve AP2 geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	65

1. GİRİŞ

Meristem doku bitkilerde sürgün uçlarında büyümeyi sağlarken, optimum koşullarda sürekli şekilde yeni kök hücrelerini ve farklılaşmaya gidecek bitki hücre gruplarını üretmektedir (Weigel and Jürgens 2002). Bitkiler, çiçek başlatma yeteneğinin gelişimsel aşamasında oldukları zaman çoğu fotoreseptör ve transkripsiyon faktörlerini içeren bir dizi protein aracılığıyla çeşitli çevresel ipuçlarını algılayacak ve harekete geçecektir. Çiçek başlangıcının zamanlamasının kararı verilirken çevresel ve endojen sinyalleri birleştiren fotoperiyod, vernalizasyon, otonom ve giberellin (GA) seviyesi gibi tanımlanmış olan ve birbirleriyle ortak şekilde çalışan genetik metabolik yollar sürgün meristemine çiçeklenme meristemine dönüşmesini yani çiçek oluşumunu sağlar (Simpson and Dean 2002). Çiçek metabolik yolu entegratörleri olarak bilinen üç gen grubu çiçeklenme zamanının kontrolü için bir araya gelir. Bu gen grupları; *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *LEAFY (LFY)* ve *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*'dir. Bu çiçek metabolik yolu entegratörleri vejetatif apikallerin çiçeklenme meristemine dönüşmesini sağlayan *APETALA1 (AP1)*, *FRUITFUL (FUL)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *LFY* ve *SEPALLATA4 (SEP4)* gibi çiçek meristem kimlik genlerini aktive etmektedir. Meristemlerdeki çiçeklenme durumunun belirlenmesinden sonra çiçek organ kimlik genlerinin azalan ifadelerinin ortaya çıkması çiçek oluşumunu sağlar (Tan and Swain 2006).

Arabidopsis çiçekleri konsentrik çiçek halkalarının düzenlenmesiyle çiçek organlarının dört farklı tipinden oluşmaktadır. En dıştaki birinci halkadan merkezdeki dördüncü halkaya doğru sırasıyla sepal, petal, stamen ve karpel organları bulunmaktadır. Bu çiçek organları çiçek organ kimlik genleri olarak adlandırılan düzenleyici genler tarafından oluşmaktadır (Krizek and Fletcher 2005, Causier *et al.* 2010, Bowman *et al.* 2012). ABCDE çiçek modeline göre A sınıfı gen grubuna dahil *APETALA1 (AP1)* ve *APETALA2 (AP2)* genleri sepal ve kısmen de olsa petal oluşumunu sağlarken B sınıfı gen grubuna dahil *APETALA3 (AP3)* ve *PISTILLATA (PI)* genleri A sınıfı genler ile birlikte petal oluşumuna katılırken kendi aralarında stamen oluşumundan sorumludurlar. C sınıfı içerisinde yer alan *AGAMOUS (AG)* geni ise etkili bir biçimde karpel oluşumundan sorumludur. D sınıfına ait iki gen grubu *SHATTERPROOF (SHP)* ve

SEEDSTICK (*STK*) genleri *AG* yardımcıları olarak karpel oluşumunda yer alırken, E sınıfı içerisinde yer alan *SEPPELLATA* (*SEP*) geni ise kendi içerisinde dört gruba ayrılarak (*SEP 1-4*) diğer genler ile birlikte ortak çalışarak tüm çiçek organlarının oluşumuna katkı sağlamaktadır (Krizek and Fletcher 2005, Bowman *et al.* 2012).

Bitkilerde çiçek organlarının gelişimi ve tam bir çiçek oluşumunun genetik ve moleküler mekanizmasının ortaya çıkarılmasında *Arabidopsis thaliana*, *Petunia hybrida*, *Antirrhinum majus*, *Oryza sativa* gibi türler model bitkiler olarak kullanılmaktadır (Weigel and Meyerowitz 1994, Fornara *et al.* 2003, Thompson and Hake 2009, Irish 2010).

Legüm türlerine baktığımızda ise legüm çiçeklerinde tüm çiçek organları tek primordiyadan gelişebilir (Tucker 1989). Ayrıca, çiçek halkalarının oluşmaya başlama zamanı çakışabilir, örneğin papilionitlerin çiçeklerinde karpel oluşumu sepal veya stamen oluşumu ile birlikte başlar (Tucker 2003a). Bu çeşit farklılıklara rağmen, çiçek meristemi kimlik genlerinin sekansları ve fonksiyonları tüm çiçekli bitkilerde oldukça iyi korunmuştur. Bazı papilionit bitkilerine ait çiçek meristemi ve organ kimlik genleri klonlanarak karakterize edilmiştir. Bu tez kapsamında çalışılmış olan genleri gösterecek olursak *API*, *Glycine max*'dan *API*- benzeri *GmAPI* geni Chi vd. (2011), *Pisum sativum*'dan yine *API*- benzeri *PEAM4* geni Berbel vd. (2001), *Medicago truncatula*'dan *API*- benzeri *MtPIM* geni Benlloch vd. (2006), endemik legüm türü *Sophora tetraptera*'dan *API*- benzeri *StAPI* geni Song vd. (2008), yine endemik legüm türü *Clanthus maximus*'dan *API*- benzeri *CmAPI* geni Song vd. (2011), *Lotus japonicus*'dan *API*- benzeri *LtAPIa* ve *LtAPIb* geni Dong vd. (2005) sekanslanmıştır. *AP2* geni ise *Glycine max*'dan *AP2*- benzeri *GmERF* Zhang vd. (2008) sekanslanmıştır.

Türkiye'de yer alan endemik legüm türü *Thermopsis turcica* önemli bir gen kaynağıdır ve sıradışı çok karpelli yapısı da oldukça ilgi çekicidir. Bu çok karpelli yapısının ekonomik değere sahip çeşitli legüm türlerine aktatırılması gerekmektedir. Bu kapsamda, bu çalışma *T.turcica* çiçek organı meristem kimlik genlerinin karakterize edilmesi ve çoklu karpel oluşumunu sağlayan moleküler yapının anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

Bu bilgiler ışığında model bitkiler ve diğer legüm türlerindeki *APETALA1* (*AP1*) ve *APETALA2* (*AP2*) gen homologlarının *T.turcica*'da tam nükleotid sekanslarının elde edilmesi ve bu dizilerin nükleotid ve amino asit sekanlarının literatürdeki homologları ile karşılaştırılarak kesinleştirilmesi ve genlerin çeşitli dokulardaki ifade düzeylerinin belirlenmesi yapılmıştır.

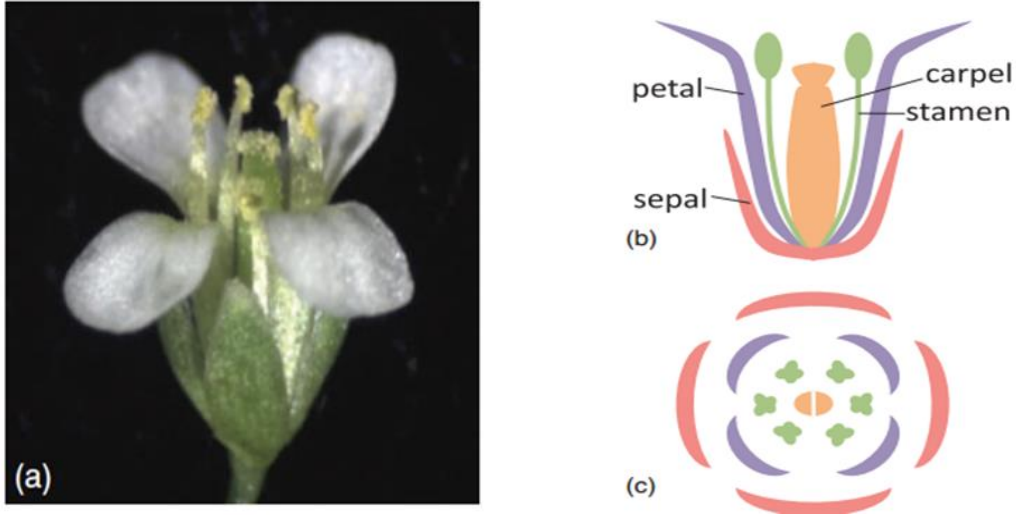
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Bitkilerde Çiçek Meristemini Oluşumu ve Çiçeklenmenin Gelişimi

Bitkiler meristemleri vasıtasıyla sürekli olarak büyürler. Zıt faaliyetlere sahip kök hücre popülasyonları meristemleri oluştururlar; Meristemler de farklılaşmaya gidecek olan kök hücre türevlerinin oluşumunu sağlarlar ve kök hücre popülasyonunu yenilerler. Vejetatif büyüme sırasında, sürgün apikal meristemi yanlardan yaprakları ve koltuk altı tomurcuklarını üretirler. Çevresel ip uçlarının algılanmasından sonra, sürgün apikal meristemi üreme işlemi tanımlanmış çiçeklenme meristemini oluşturmak için değişime uğrarlar (Amasino 2010). *Arabidopsis thaliana*'da olgun bitkinin karakteristik yapısını ortaya çıkarmak için çiçeklenme meristemi yanlardan çiçek meristemi gibi ikincil çiçeklenme meristemini oluşturur.

Bir çiçek meristemini diğer meristemlerden ayıran birkaç farklı önemli yol mevcuttur. Özellikle çiçek meristemi sırasıyla çiçek organları sepal, petal, stamen ve karpeli üretir. Bu organlar konsentrik halkaları meydana getirirler (Steeves and Sussex 1989, Smyth *et al.* 1990). *Arabidopsis*'de en dıştaki veya birinci halka olarak adlandırılan kısımda sepal vardır ve bu yaprak benzeri organ geliştirmekte olan çiçek tomurcuğunu korur. 4 beyaz petal ikinci halkada sepallere alternatif olarak dizilirler. Üçüncü halkada bir filament ve tepesinde polen oluşturan anterden oluşan altı stamen yer alır. Merkezdeki dördüncü halka ise iki birleşik karpelden oluşan ve ginekeum adını alan dişi üreme yapılarını üretir. Ginekeum, fertilizasyon sonrası tohumu üretecek olan ovülleri içerir. Vejetatif sürgün apikal meristemini sürekli olarak yaprakları ve aksiller tomucukları üretmesine karşın çiçeklenme meristemi sınırlıdır yani çiçeği üretir ve sonunda gelişimini sonlandırır (Irish 2010).

Goethe 1970 yılında çiçek organlarının modifiye edilmiş yapraklar olduklarını ileri sürmüştür (Goethe 1790). Son bulgular tarafından büyük ölçüde takviye edilmiş ortak bir mekanizmanın altında yatan bu fikir, çiçek organlarının oluşumunda çiçek meristeminin faaliyetinin yaprakların oluşumunda sürgün apikal meristeminin faaliyeti ile önemli ölçüde benzerlik taşıdığını göstermektedir (Carles and Fletcher 2003, Sablowski 2007). Bununla birlikte çiçek gelişimi sırasında özelleşmiş bir takım gen ürünü belirlenmiştir. Çoğu durumda bu yapılar yanal organların “temel durumu” ile kesişirler ve mekanizmada modifikasyonlar yaparak çiçek dokularını üretirler (Irish 2010).



Şekil 2.1 *Arabidopsis* çiçeği. (a) Antesiz aşamasındaki olgun çiçek. (b) Organ çeşitlerini de gösteren olgun çiçeğin yan kesitinin çizilmiş şekli (c) Çiçek organlarının muhtemel yerlerini gösteren çiçek diyagramı (Irish, V. F. (2010)'den alınarak düzenlenmiştir.)

Çiçek meristemi, çiçeklenme meristemine çevresi üzerinde yanal olarak dışa doğru büyümesiyle veya çıkıntı oluşturarak ortaya çıkmaktadır. Çiçeğe özgü gen ifadesinin bazı ilk belirteçleri bu aşamada yer almaktadır (Grandjean *et al.* 2004, Reddy *et al.* 2004, Heisler *et al.* 2005). Çiçek meristemi kurulduktan sonra büyüme iyi tanımlanmış aşamalar ile biçimsel bir şekilde gerçekleşir (Smyth *et al.* 1990).

Diğer sürgün apikal meristemlerinde olduğu gibi *Arabidopsis* çiçek meristemi üç farklı klonal hücre tabakasından oluşmaktadır. Dış kısımdaki L1 ve bir altındaki L2 tek hücre tabakasıdır ve bu iki tabaka bu durumlarını apikal eksene dik bölünmelerle

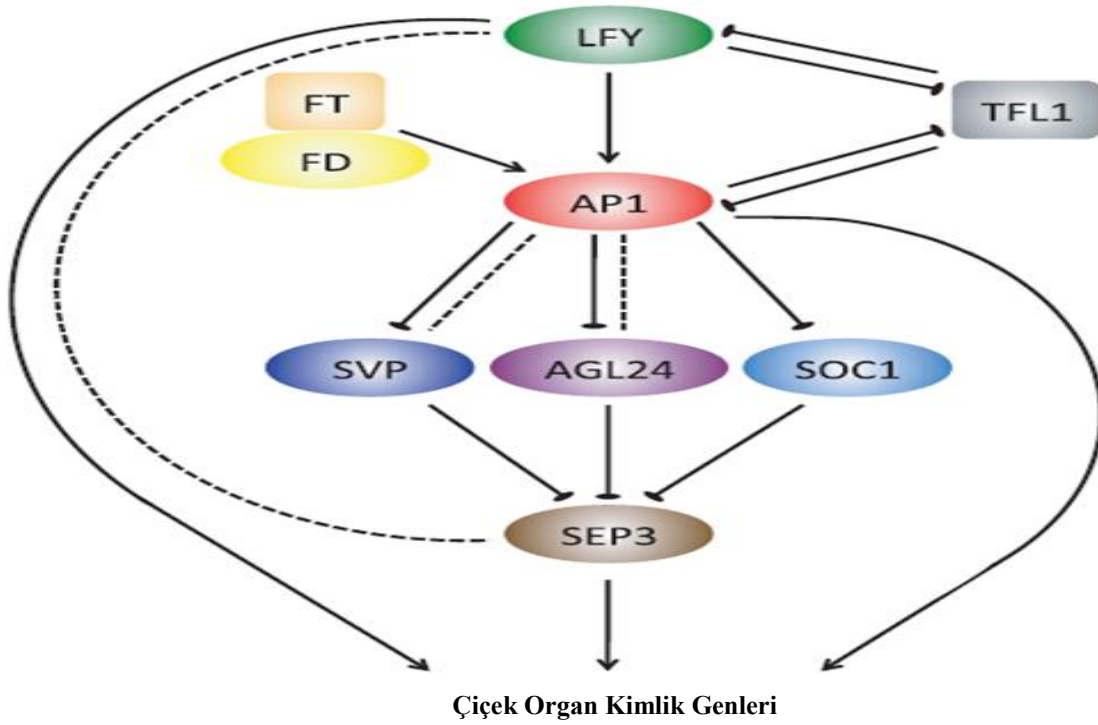
organizasyonlarını muhafaza etmektedir (Steeves and Sussex 1989). Alt tabakadaki L3 ise her yöne bölünen birkaç hücre tabakasından oluşmaktadır. Amaca yönelik hücre bölünmelerinin düzenlenmesi nispeten düzenli olsa da çiçek yapımında kritik bir aşama olan çiçek meristem hücreleri arasındaki sinyalizasyon bu düzende zaman zaman sapmalar olduğunu göstermiştir (Jenik and Irish 2000, Reddy *et al.* 2004, Kwiatkowska 2006). Her ne kadar floral meristemin farklılaşması ve büyümesini kontrol eden mekanizma hakkında çok fazla şey bilinmiyorsa da, bazı genlerin analizleri ve birbirleri arasındaki ilişkinin analizleri bazı bilinmeyen hususları aydınlatmaya başlamıştır.

LEAFY(LFY) çiçek meristem kimliğinin belirlenmesinde anahtar role sahiptir. Şiddetli *LFY* mutasyonları çiçek meristemi başlatmazlar ve bunun yerine ikincil çiçeklenme dallarını üretirler (Weigel *et al.* 1992). Ayrıca *LFY*'nin ektopik ifadesi erken çiçek oluşumunu uyarır bu da *LFY*'nin çiçek meristem kimliğinin oluşumunda yeterli olduğunu gösterir (Weigel and Nilsson 1995). *LFY* bitkiler aleminde bulunan homologları ile birlikte yeni bir tip transkripsiyon faktörünü kodlar (Maizel *et al.* 2005, Hames *et al.* 2008). Çiçeksiz bitkilerde ise *LFY*'nin sporofit gelişiminde genel bir rol oynadığı gözlenmektedir (Maizel *et al.* 2005, Tanahashi *et al.* 2005). Çiçekli bitkilerde, *LFY*'nin floral meristem kimliğinin özelleşmesinde yeni rollerinin olduğunu gözlenmektedir (Coen *et al.* 1990, Souer *et al.* 1998, Molinero-Rosales *et al.* 1999, Bomblies *et al.* 2003).

lfy mutanlığı olan bitkiler *APETALA1 (API)* etkinliğinden dolayı doğal olarak bazı floral kimliğe sahip aksilar meristem üretirler (Huala and Sussex 1992, Mandel *et al.* 1992, Bowman *et al.* 1993, Mandel and Yanofsky 1995). *API*'de fonksiyonunu kaybetmiş mutasyonlar floral meristemlerin daha çok çiçeklenme benzeri kimliğe kısmen dönüşümüne neden olur ve *apl* ile *lfy* çift mutantlarının birlikte oluşturulması sonucu çiçek oluşmaz, bu bulgular bu iki genin birlikte çalışarak çiçek meristeminin özelleşmesinden sorumlu olduğunu göstermektedir (Irish and Sussex 1990, Huala and Sussex 1992, Bowman *et al.* 1993, Shannon and Meeks-Wagner 1993). *API* bir MADS kutusu transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır ve diğer birçok MADS-kutusu genleri çiçek meristemi kimliğinin teşvikinde çalışmaktadır (Mandel *et al.* 1992). Burada yer alan *API* paralogları *CAULIFLOWER(CAL)*, *FRUITFULL(FUL)* Bowman vd. (1993),

Kempin vd. (1995), Ferrandiz vd. (2000a), *AGAMOUS-LIKE24(AGL24)*, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* ve *SUPPRESSOR OF CONSTANS1(SOC1)* Gregis vd. (2008), Melzer vd. (2008)'dir. Bu MADS kutulu gen ürünlerinin çakışan fonksiyonları çiçek gelişimi için gerekli olan hedef genlerin transkripsiyonlarının düzenlenmesinde bu genlerin ortaklaşa çalıştıklarını yansıtmaktadır.

Floral meristem belirlenmesinde çeşitli geri bildirim döngüleri bu genlerin hareketlerini düzenlemektedir. Bu şekilde, hem kararlı çiçek meristem kaderini teşvik ederek ve hem de karasız (özelleşmemiş) apikal meristem geleceğini baskılayarak, çok sağlam ve istikralı bir çiçeklenmeye geçişin gerçekleşmesini sağlamaktadır. *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)*, belirsiz sürgün kaderi için gereklidir çünkü *tfl1* mutantları çiçek meristemlerinin çiçeklenme meristemine dönüşümünü göstermektedir (Bradley *et al.* 1997, Ratcliffe *et al.* 1998). *API* ve *LFY*'in bir rolü *TFL1*'i baskılamaktır (Weigel *et al.* 1992, Liljegren *et al.* 1999, Ratcliff *et al.* 1999). Buna karşılık *TFL1* geninin de çiçeklenme meristeminde *LFY* ve *API* genlerini baskı altına alma görevi vardır (Ratcliffe *et al.* 1998). *TFL1* ve çiçek meristem kimlik genleri arasındaki bu denge uygun yer ve zamanda çiçeklenmenin oluşumunu sağlayarak genel sürgün mimarisini düzenler. Bu dengedeki ince kaymalar çiçeklenen bitki türlerindeki sürgün mimarisindeki çeşitlenmelerden sorumludur (Prusinkiewicz *et al.* 2007).



Şekil 2.2 Floral meristemin kurulumuna katılan genler. İlişki ağı, floral gen kimliği genlerinin aktivasyonunun en yüksek seviye çıktığı bir anda çok çeşitli gen ürünlerinin fonksiyonu ile yönetilir. Transkripsiyon faktörleri yuvarlak, diğer faktörler dikdörtgendir. Pozitif düzenleyici temaslar oklarla gösterilmiştir, negatif düzenleyici ilişkiler küt uçla biten çizgilerle gösterilmiştir. Protein-Protein ilişkileri noktalı çizgilerle gösterilmiştir (Irish (2010)'den alınarak düzenlenmiştir).

LFY'nin tahminen başlangıçta çiçek meristeminin çok erken safhalarında ifade olduğu düşünülmektedir ve genin aktivitesi çiçek meristem oluşumunu ard arda düzenleyen transkripsiyonel olaylar ile sonuçlanmaktadır (Weigel *et al.* 1992, Simon *et al.* 1996). Başlangıçta *LFY*'nin ifadesinden sonra çiçek meristemi boyunca *AP1* ifadesi iyi bir şekilde tespit edilebilir (Mandel *et al.* 1992, Simon *et al.* 1996, Hempel *et al.* 1997, Wagner *et al.* 1999). Bu durumda *LFY*'nin *API*'in transkripsiyonunu doğrudan aktive ettiğini göstermektedir (Mandel and Yanofsky 1995, Wagner *et al.* 1999). *AP1* sırasıyla *AGL24*, *SVP* ve *SOCI*'in ifade olmasını baskılamaktadır (Yu *et al.* 2004a, Liu *et al.* 2007, 2009). *AGL24*, *SVP* ve *SOCI* diğer bir MADS kutulu gen olan *SEPALLATA3(SEP3)* geninin ifadesini baskılar ve *API*'in *AGL24*, *SVP* ve *SOCI*'in ifadelerini baskılamasıyla *SEP3*'ün baskılanma durumu ortadan kalkar. *SEP3*, *LFY* ile etkileşime girerek diğer MADS kutulu proteinler ile etkileşirler ve çiçek organ kimlik genlerinin aktivasyonu ile çiçek gelişimine katkı sağlar (Honma and Goto 2001, Castillejo *et al.* 2005, Immink *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009). Kademeli bir şekilde

gerçekleşen bu olaylar floral meristemin kurulmasındaki hassas zamanlamayı iyi bir şekilde kontrol edebilir; sonrasında bu genlerin ifadelerinin azalması çiçek organlarının oluşumu ve çiçek meristeminin farklılaşmasını teşvik etmektedir (Irish 2010).

2.2 Çiçek Organ Kimliğini Düzenleyen Genler ve ABCDE Modeli

Çiçek meristem kimlik genlerinin başka bir rolü çiçek organı kimlik genlerini aktive etmesidir. Çiçek organı kimlik genlerindeki mutasyonlar bir organdan diğer çeşidine homeotik dönüşümü ile sonuçlanır. Bu mutasyonların analizleri çiçek organ kimliği oluşumunun günümüzdeki klasik ABC modelinin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Bowman *et al.* 1991, Coen and Meyerowitz 1991, Weigel and Meyerowitz 1994). Bu model belirli bir mekânsal alanda gen fonksiyonlarının üç sınıfını gösteren A, B ve C'nin kombinasyonel olarak her bir organ çeşidinin özel olarak belirlenmesinde rol oynamaktadır. A fonksiyonu birinci halkada sepal kimliğinin oluşumunu sağlarken A ve B fonksiyonu birlikte ikinci halkada petal kimliğinin oluşumunu sağlamaktadır. B fonksiyonu, C fonksiyonuna katkı sağlayarak üçüncü halkada stamen kimliğinin oluşumunu sağlarken C fonksiyonu yalnız başına dördüncü halkada karpel kimliğinin oluşumunu sağlamaktadır. Tüm bunlara ilave olarak A ve C fonksiyonların karşılıklı olarak birbirlerinin ifadelerini negatif olarak baskıladıkları belirlenmiştir. Bu model genetik kriterler baz alınarak oluşturulmuş olmasına rağmen moleküler temelli genetik kodlamalar ABC modelinin birçok prensibini kanıtlamıştır (Irish 2010).

Çiçek morfogenezinin anahtar düzenleyicileri olan MADS kutulu transkripsiyon faktörleri, çift çenekli bitki türleri *Antirrhinum majus* and *Arabidopsis thaliana*'nın florak homeotik mutantları üzerinde yapılan genetik ve moleküler analizler aracılığıyla gösterilmiştir ve 1991 yılında, MADS kutusunun tipik çift çenekli çiçeğin dört halkasının kimliğini oluşturan genetik bir mekanizma olduğu ileri sürülmüştür (Coen and Meyerowitz 1991). O zamandan bu yana ABC modeli olarak adlandırılan bu yapı angiospermlerdeki çiçek deseni ve çiçek oluşum çalışmalarının her biri için başlangıç noktası haline gelmiştir. 1995 yılında yapılan çalışmalar sonucunda ayrı bir organ olarak kabul edilmiş olan ovüllerin kimliğini belirlemek için ABC modeline D fonksiyonu eklenmiştir (Colombo *et al.* 1995). 2000'li yıllarda ise içteki üç halkanın

kimliğinin belirlenmesinden sorumlu kofaktörler olarak E sınıfı genleri bu çiçeklenme modeline dahil olarak ABC modelinden ABCDE modeline geçiş olmuştur (Pelaz *et al.* 2000, Theissen *et al.* 2001).

2.2.1 A Sınıfı Genler

Arabidopsis’de *APETALA1* ve *APETALA2* olmak üzere iki tane gen mevcuttur ve bunlardan *API*, MADS kutulu transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. *API*’in genetik olarak ayrılmış iki fonksiyonu vardır. Bunlar; sepal ve petal kimliğinin belirlenmesindeki A fonksiyonu ve ayrıca çiçek meristem kimliğinin belirlenmesidir. Bu fonksiyonlar daha önceden sepal ve petalin yerine yaprak benzeri braktelerin genellikle mevcut olmadığı tekli *ap1* mutantında yansıtılmıştır (Bowman *et al.* 1993). Ayrıca birincil çiçek organlarının aksillerinden birincil *ap1* çiçeği içerisinde yeni bir ektopik çiçeklenme ortaya çıkmaktadır. *CAULIFLOWER(CAL)* ve *FRUITFULL(FUL)* ile birlikte *SQUA* benzeri genler olarak adlandırılan bu gruba *API* MADS kutulu transkripsiyon faktörünün dahil olması ile Arabidopsis MADS kutulu transkripsiyon faktörleri filogenetik olarak yeniden düzenlenmiştir. Tek bir çiçek veren yabani tiplerin her bir pozisyonunda çiçek meristeminin yoğun bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen bir ‘cauliflower’ fenotipi *cal* mutantları ile *ap1* mutantlarının kombinasyonu ile sonuçlanmaktadır (Kempin *et al.* 1995). *ap1 cal* çiftli mutantlarına *ful* mutantının katılmasıyla üçlü hale gelen bu mutant yapısı *ap1 cal* çiftli mutantını geliştirmiştir (Ferra’ndiz *et al.* 2000). Bu mutant fenotipler tüm bu *SQUA* benzeri genlerin çiçek meristemi kimlik genleri olduğunu göstermektedir. *FUL* geninin çiçek meristem kimliğini belirlemenin yanı sıra kimlik belirleme fonksiyonunda mevcuttur (Kater *et al.* 2006).

2.2.2 B Sınıfı Genler

Arabidopsis’de sırasıyla *DEF* benzeri ve *GLO* benzeri gen gruplarına dahil *APETALA3* ve *PISTILLATA* olmak üzere iki tane çiçek organ kimlik geni mevcuttur (Jack *et al.* 1992, Goto and Meyerowitz 1994). Petal ve stamen kimliğini kontrol eden bu genler açıkça göstermektedir ki fonksiyon kaybı yaşayan *ap3* ve *pi* mutantlarında karpeller tarafından petaller, sepal ve stamenler ile yer değiştirmektedir. Günümüze kadar ulaşan gymnosperm analizleri erkek üreme organının gelişiminin belirlenmesinde B sınıfı genlerin atasal fonksiyonları olduğunu göstermiştir. Yani B sınıfı gen ifadesinin yokluğu karpel gelişimi ile sonuçlanırken, B sınıfı gen ifadesinin varlığı stamen gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Angiosperm evrimi boyunca farklı *DEF* ve *GLO* benzeri genler, zorunlu heterodimer proteinlerin homodimerizasyonundan gelişen bunların gen ürünleri ve gen duplikasyonları tarafından oluşturulmuştur. Bu *DEF* ve *GLO* benzeri genler stamen gelişiminin yanı sıra petal kimliğinin belirlenmesine de katkı sağlamaktadır (Winter *et al.* 2002).

2.2.3 C Sınıfı Genler

Arabidopsis’de *AGAMOUS*(*AG*) olmak üzere bir tane tipik C sınıfı gen bulunur (Yanofsky *et al.* 1990). Çiçek belirlenmesi ile stamen ve karpel belirlenmesi için gerekli olan *AG* geni göstermektedir ki pistillerin yerine çiçeğin merkezinde yeni bir *ag* mutantlı çiçek gelişir ve stamenlerin yerine petaller gelişir. İlginç bir şekilde *AG*’den bağımsız olarak varolan bir karpel metabolik yolu *ap2 ag* çiftli mutantlarında sepallerin yerine ektopik karpeloid organların geliştiğini göstermektedir (Bowman *et al.* 1991). Pinyopich ve arkadaşları (2003), *AG*’den bağımsız olarak karpel gelişimini sağlayan *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) ve *SHP2* genlerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Bu iki MADS kutulu gen karpel kimliğini kontrol etmelerinin yanı sıra karpel tespit zonunun oluşumunda rol almaktadır (Liljegren *et al.* 2000). Bu iki *SHP* geni Arabidopsis *AG* ve *SEEDSTICK* (*STK*) genleri ile yakından ilişkilidir. Böylelikle C sınıfı genler (stamen ve/veya karpelde ifade olan) ve D sınıfı genler (ovüllerin belirlenmesinde ifade olan) *AG* grubunun iki sınıfı olarak tanımlanabilmektedir (Zahn *et al.* 2006).

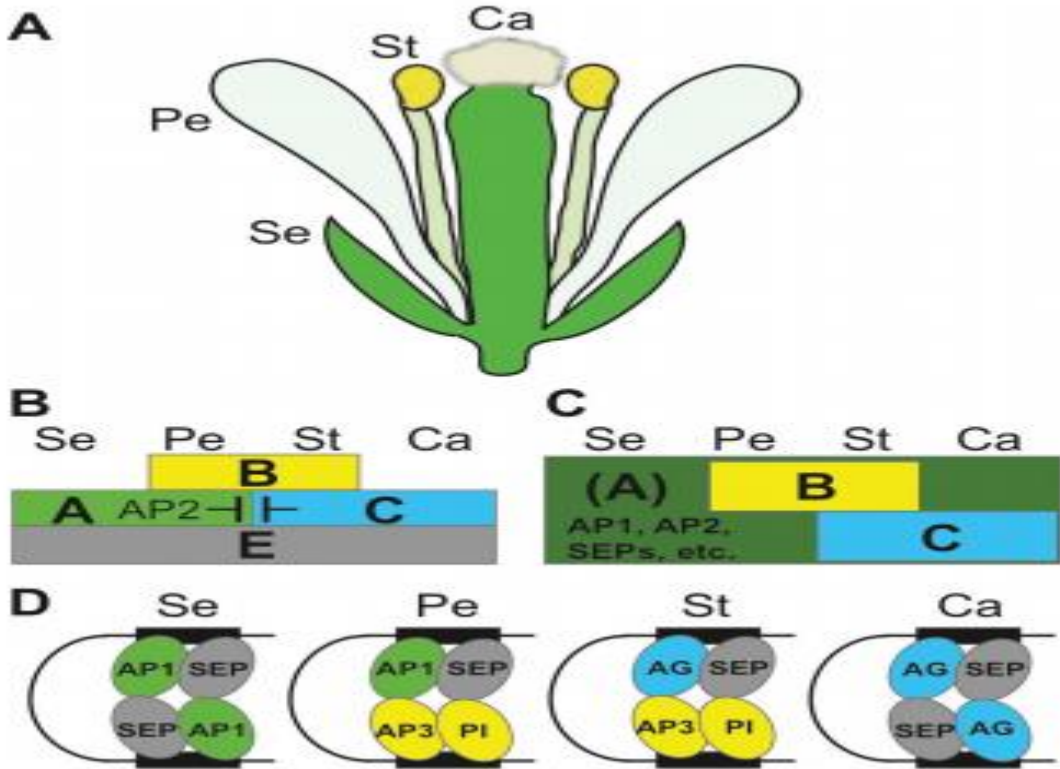
2.2.4 D Sınıfı Genler

D sınıfı genler ovül kimliğini belirler ve monofiletik *AG* benzeri gen ailesine aittirler. Arabidopsis D sınıfı geni *STK*, özel olarak ovüllerde ifade edilmektedir. Pinyopich ve arkadaşları (2003), *stk* tekli mutantlarının ovül kimliklendirilmesini etkilemediğini ve plesentayı ovüle bağlayan umbilikal benzeri yapılar ve funikulus gelişiminde kusurlar meydana getirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca *AG* ailesinin dört üyesi olan *STK*, *SHP1*, *SHP2*, *AG*'nin farklı mutantlarının kombinlenmesi ovül kimliğinin belirlenmesinde rol aldığı ortaya çıkarılmıştır (Kater 2006).

2.2.5 E Sınıfı Genler

Arabidopsis E sınıfı geni olarak gösterilen MADS kutulu geni olan *SEPALLATA (SEP)* sepal, petal, stamen, karpel ve ovül kimliğinin belirlenmesinde yer almaktadır. Bu genin aktivitesi, yüksek dereceli MADS kutulu protein komplekslerini oluşturmak için A, B, C, D sınıfı gen ürünleriyle oluşturduğu komplekslere dayanmaktadır (Honma and Goto, 2001, Pelaz *et al.* 2001, Favaro *et al.* 2003). ABC isimlendirme doğrultusunda çiçek organ kimlik genlerin bu yeni sınıfı E-fonksiyon genleri olarak adlandırılmıştır (Theissen 2001).

Arabidopsis E sınıfı genleri, çiçek organ kimliğinin belirlenmesinde yedek fonksiyonlar göstererek MADS kutulu faktörleri kodlayan *SEP1*, *SEP2*, *SEP3*, *SEP4* genlerinden oluşmaktadır (Kater 2006). Gen fonksiyonunu kaybetmiş *sep1 sep2 sep3* üçlü mutantları petal, stamen ve karpellerin sepallere dönüşmesinden dolayı belirsiz çiçeklere sahiptir. *SEP* genleri, B ve C sınıfı genlerin aktivasyonu için gerekli değildir ve bu sınıflara ait genlerin ifadesinin azalmasına neden olmamaktadır. Ayrıca üçlü *sep* mutantlarında da B ve C sınıfı genlerin ifadelerinde bir değişiklik olmamıştır (Pelaz *et al.* 2000). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda *sep1 sep2 sep3 sep4* dördümlü mutantlarında tüm çiçek organlarının yaprak benzeri yapılara dönüştüğü tespit edilmiştir (Ditta *et al.* 2004). Bu sonuçlar göstermektedir ki *SEP* genleri A, B, C sınıfı genlerin fonksiyonları için gereklidir çünkü *sep1 sep2 sep3 sep4* mutantları *abc* üçlü mutantları ile fenotipik benzerlik göstermektedir (Kater 2006).



Şekil 2.3 Çiçek organ kimlik faktörleri tarafından çiçek organlarının özellikleri. (A) Arabidopsis çiçeğindeki dört tip çiçek organının şeması (Se, sepal; Pe, petal; St, stamen; Ca, Karpel). (B ve C) ABC çiçeklenme modeli ve bu modelin modifikasyonu. (D) Çiçek organ gelişimini kontrol eden her biri dört tane MADS domain proteininden oluşan dört farklı transkripsiyon faktör kompleksi (Wellmer vd. (2013)'den alınarak düzenlenmiştir).

2.3 MADS KUTUSU

MADS kutulu genler, MADS domain ailesinin transkripsiyon faktörlerini kodlayan, toprak bitkilerinin yaşamının tüm önemli yönlerinin kontrolünde yer almaktadırlar. MADS domain ailesi, yüksek derecede korunmuş DNA bağlayıcı MADS domaini tarafından karakterize edilmektedir (Messenguy and Dubois 2003). MADS domaini yaklaşık olarak 58 amino asit uzunluğundadır ve MADS kutusu olarak adlandırılan bir DNA dizisi tarafından kodlanmaktadır. İlk MADS kutulu gen *Saccharomyces cerevisiae*'den izole edilmiş olan *ARG80* genidir (Dubois *et al.* 1987). MADS kutulu genlerin isimlendirilmesi kurucu aile üyelerinin karakterizasyonundan sonra şu şekilde yapılmıştır: *S.cerevisiae*'den *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1 (MCM1)*, *Arabidopsis thaliana*'dan *AGAMOUS(AG)*, *Antirrhinum majus*'dan *DEFICIENS(DEF)*, *Homo sapiens*'den *SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)* (Schwarz-Sommer *et al.* 1990). Son veriler, MADS kutusunun örneğin DNA replikasyonunda yer alan sarmal ya da sarmal olmayan DNA topoizomeraz II A enziminin A alt ünitesinin bir bölümünü kodlayan bir DNA dizisinden orjinlendiğini göstermektedir (Gramzow *et al.* 2010). Topoizomeraz II A alt ünitesini kodlayan bir genin günümüze kadar ulaşan ökaryotların ortak bir atadan çoğaltılmış olduğunu sağlayan kanıtlar bulunmuştur. Sonraki gen çoğaltılması ve oluşan farklılıkların sonucu olarak MADS kutulu genleri içerisine alan iki grup oluşmuştur, bunlar; Tip 1 veya SRF benzeri ve tip 2 veya MEF benzeri (*MYOCYTE ENHANCER FACTOR 2*) olarak adlandırılmışlardır (Gramzow *et al.* 2010). Bu iki tipin sekanslarının birbirlerinden farklı olduğu temelinde ayırt edilmektedir ve ayrıca neden oldukları DNA bağlayıcı sekans spesifikliği açısından da farklılık göstermektedirler (Messenguy and Dubois 2003).

MADS kutusu ailesi evrim boyunca çeşitli ökaryotik soylarda oldukça farklı şekillerde çeşitlenmiştir. MADS kutulu genler protistalar, hayvanlar ve funguslarda oldukça az sayıdadır. Bunun aksine, bazı bitki soylarında sayıları oldukça artış göstermiştir, *A. thaliana*, *Populus trichocarpa* (poplar) ve *Oryza sativa* (rice) gibi çiçekli bitkiler – angiosperm bitkilerde sayıları 100 civarındadır (Parenicová *et al.* 2003, Arora *et al.* 2007, Leseberg *et al.* 2006). MADS kutulu transkripsiyon faktörleri, mantarlarda feromon yanıtlarından hayvanlarda kas gelişimi, hücre proliferasyonu ve

farklılaşmasına kadar değişim göstererek biyolojik süreçlere geniş bir yelpazede katkı sağlamıştır (Messenguy and Dubois 2003).

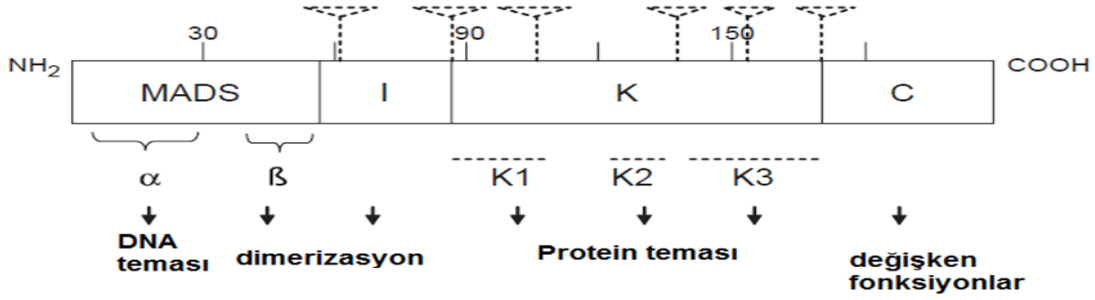
Protein düzeyinde, MADS domain proteinlerinin iki tipinin domain yapıları farklıdır. Bitkilerin tip II MADS domain transkripyon faktörleri bir keratin benzeri etki alanının varlığı ile karakterize edilmektedir ve bu etki alanının yapısı: MADS, intervening(I), K, karboksi terminal domain C'den oluşur ve MIKC tipi proteinler olarak adlandırılır (Parenicová *et al.* 2003, Arora *et al.* 2007, Leseberg *et al.* 2006, Becker and Theissen 2003). Tip I proteinler ise K domainine sahip değildir. Bitkilerin Tip I MADS domain proteinleri, karboksi terminal bölgesinde korunmuş motiflerin varlığı veya yokluğuna göre M α , M β ve M γ olmak üzere üç alt gruba ayrılabilir (Parenicová *et al.* 2003, De Bodt *et al.* 2003, Yoo *et al.* 2006). Tip II MADS domain proteinleri ise K domainindeki yapısal farklılıklar ve I domainini kodlayan ekzon sayıları tarafından belirlenmesi gibi MIKC^C ve MIKC* alt gruplarına ayrılmıştır (Henschel *et al.* 2002). MIKC^C proteinleri, filogenetik yapılanmanın ortaya koyduğu antik soyların sayısına göre gruplanmış olabilir (Becker and Theissen 2003). Aynı şekilde MIKC* proteinleri S ve P olarak iki sınıf şeklinde ayırt edilmektedirler (Adamczyk and Fernandez 2009).

MADS domaininin DNA bağlayıcı bölgesi genellikle bir ekzon üzerinde lokalize olmuş MADS kutusu tarafından kodlanmaktadır (Henschel *et al.* 2002). Bitki MADS domainlerinin kristal yapısı bilinmemektedir. Bununla birlikte *S.cerevisiae*'den elde edilen *MCM1* ile insandan elde edilen *SRF* ve *MEF2* yapıları (Pellegrini *et al.* 1995, Santelli and Richmond 2000, Tan and Richmond 1998), MADS domainlerinin uzun bir amfipatik α heliksi ve iki β şeridini takiben 14 amino asitin amino terminal ucu içersine katlandığını göstermektedir (Pellegrini *et al.* 1995). DNA'nın küçük olukları ile kontak kurma işlemine amino terminal uzantısı aracılık ederken, büyük olukları ile kontak kurma işlemi α heliksinin bir yüzü yapmaktadır. Bitki proteinlerini içeren MADS proteinleri, homo- veya heterodimer olarak DNA'ya bağlanmaktadır (Kaufmann *et al.* 2005). Ortak bir şekilde etkileşim gösteren iki β şeriti ile bir β tabakası dimerizasyon için gereklidir (Pellegrini *et al.* 2005).

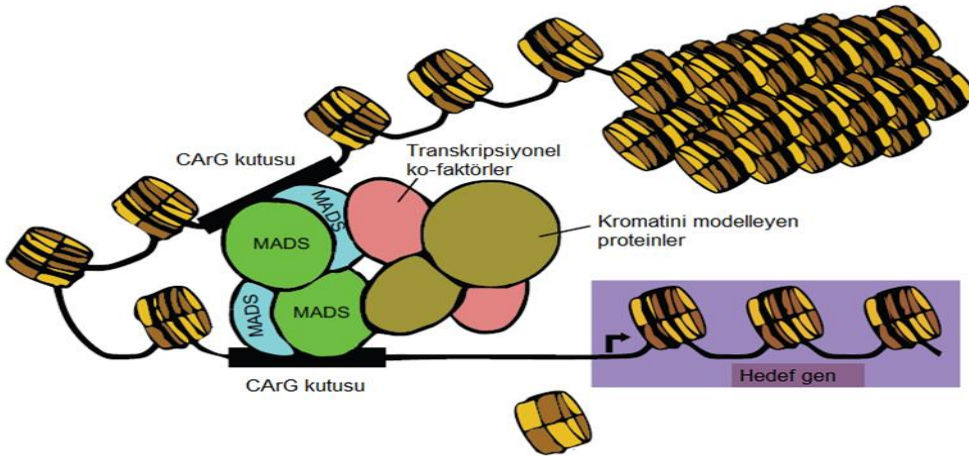
MADS domain transkripsiyon faktörlerinin dimerleri CArG kutularına bağlanmak için 5'-CC[A/T]6GG-3'(20) dizisi veya buna benzer diziler ile konsensüs oluştururlar (Zobell *et al.* 2010). CArG kutulu motifler kısa ve değişken olarak genomda oldukça yaygındırlar (Verelst *et al.* 2007). MADS domain proteinlerinin hedef genlerin özgünlüğünü nasıl belirlediği günümüzde belirsizliğini korumaktadır (Melzer *et al.* 2009).

Çoğu bitki MADS domain proteinleri için MADS domaini, proteinin amino terminal domainini temsil etmektedir (Parenicová *et al.* 2003, Arora *et al.* 2007). Ancak bazı bitki MADS domaini transkripsiyon faktörlerinin farklı amino-terminal bölgeleri bulunmaktadır. Onların dizileri oldukça çeşitlidir ve bugüne kadar bu amino terminal bölgelerinin fonksiyonları tespit edilememiştir. MADS domaini dışında tip I MADS domain proteinlerinde korunmayan bölgeler belirlenmiştir. M α , M β ve M γ grupları için özel çeşitli korunmuş diziler tespit edilmiştir (Parenicová *et al.* 2003, Arora *et al.* 2007, De Bodt *et al.* 2003).

Daha öncede belirtildiği gibi bitkilerin tip II MIKC tip proteinleri tip I proteinlerinden çok daha belirgin ve korunmuş bir yapıya sahiptir. MADS domaininden sonra K domaini tip II proteinlerin en iyi korunmuş bölgesidir. K domaini genellikle üç ekzondan kodlanmaktadır ve 70 aminoasit uzunluğunda olup K1, K2 ve K3 olmak üzere üç alt domaine ayrılmıştır (Kaufmann *et al.* 2005). Bu alt domainler büyük ölçüde ekzonlarla örtüşmektedir. Her bir alt domain genellikle hidrofobik aminoasitleri içeren a ve d pozisyonlarındaki yedili tekrar grupları [abcdefg]_n tarafından karakterize edilmiştir (Yang *et al.* 2003). MADS domain proteinlerinin protein-protein etkileşimlerine aracılık eden ve sarmal yapıları oluşturduğu düşünülen amfipatik α helezonları bu alt domainleri oluşturur (Yang *et al.* 2003). Daha detaylı olarak bazı durumlarda K1 domaini DNA bağlayıcı dimer oluşumu için gereklidir. K1 ve K2 domainleri DNA bağlayıcı dimerlerin oluşumunu desteklerken K3 domaini multimerizasyona katkıda bulunur (Kaufmann *et al.* 2005).



Şekil 2.4 MIKC tipi MADS proteinlerinin domen yapısı. MADS-, I-, K-, ve C- domenlerinin şematik gösterimi. MADS domeninin N- kısmı bir heliks oluşturur ve partner proteinle birlikte DNA'nın CArG kutusuna bağlanır. MADS domeninin diğer kısmı I-domenle birlikte iki antiparalel h ipliğinden oluşan dimerizasyon motifi oluşturur. K domeni burbu yapısındaki üç amfipatik α heliks meydana getirir (K1, K2, K3). Şema üzerinde gösterilen rakamlar amino asitlerin pozisyonunu göstermektedir. Intron pozisyonları ise üçgenlerle gösterilmiştir (Kaufman vd. (2005)'den uyarlanmıştır).



Şekil 2.5 MADS domeni proteinlerin oluşturduğu kompleksin işlev modeli. Bu modelde, MADS domeni proteinleri (mavi ve yeşil) dörtlü kompleks oluştururlar ve birbirine yakın iki adet CArG kutusuna bağlanırlar (siyah bölge). Bu bağlanma sonunda DNA'da bir bükülme meydana gelir. Bunun devamında MADS domeni proteinler diğer transkripsiyonel faktörlerin (pembe) bu bölgede toplanmasını sağlarlar. Bunun sonucu olarak hedef genin spesifitesi değişir ve kromatini tekrardan modelleyen proteinlerin (kahverengi) bu bölgeye toplanması sağlanır, gevşeyen kromatin yapısı hedef genin transkripsiyona başlaması için gerekli olan başlama bölgesini rahatlatır (Smaczniak vd. (2012)'den düzenlenmiştir).

I ve C domainleri MIKC tipi proteinlerin en az korunmuş olan domainleridir (Parenicová *et al.* 2003). K domainindeki yapısal farklılıkların yanı sıra dizi uzunluğu ve I domainini kodlayan ekzonların sayısı MIKC* ile MIKC^C proteinlerinin ayırt edilmesini sağlamaktadır (Hensche *et al.* 2002). MIKC^C proteinleri bir veya iki ekzon tarafından kodlanan kısa bir I domainine sahipken MICK* tipi proteinler ise dört veya beş ekzon tarafından kodlanan uzun bir I domainine sahiptir (Hensche *et al.* 2002, Zobell *et al.* 2010). I domaini DNA bağlayıcı dimer oluşumunun özgünlüğünü etkilemektedir. I domaini MADS domaini ile birlikte DNA bağlayıcı dimerlerin oluşumu için yeterlidir. C domaini bazı proteinler ve çeşitli sayıdaki ekzonlar tarafından kodlanmaktadır. Bu oluşum hedef genlerin transkripsiyonunun aktivasyonu için önemlidir ve ayrıca multimerik komplekslerin oluşumu içinde önemli olabileceği düşünülmektedir (Hensche *et al.* 2002, Zobell *et al.* 2010) .

MIKC^C grubu proteinlerin multimerik kompleksleri sepal, petal, stamen, karpel gibi çiçek organlarının belirlenmesi için gerekli oldukları öne sürülmüştür (Theissen and Saedler 2001). Dörtlü çiçek modeli hipotezine göre MADS domain proteinlerinin iki dimeri komşu CArG kutusu ile bağlanır ve birbirleri ile etkileşim halinde olduklarını varsaymaktadır.

Tip I MADS domainleri hakkında uzun zamandır yeterli bilgi elde edilememesinden dolayı onlara aynı zamanda MADS evreninin karanlık dünyası da denmekteydi. Tip I genleri genomik çalışmalar ile tespit edilmiştir (Bemer *et al.* 2008). Ayrıca tip I genleri şimdiye kadar analiz edilmiş tüm türlerde zayıf bir şekilde ifade olmuştur (Parenicová *et al.* 2003, Arora *et al.* 2007, Leseberg *et al.* 2006, De Bodt *et al.* 2003, Yoo *et al.* 2006, Bemer *et al.* 2008, Portereiko *et al.* 2006, Colombo *et al.* 2008, Kang *et al.* 2008, Kohler *et al.* 2003). Son yıllarda ise bu durum önemli ölçüde değişmiştir. *Arabidopsis thaliana*'da tip I MADS kutulu genleri ile yapılan bazı öncül çalışmalar bu genlerin dişi gametofit, embriyo kesesi ve tohum gelişimi için önemli olduğunu ortaya koymuştur (Bemer *et al.* 2010, Yoo *et al.* 2006, Bemer *et al.* 2008, Colombo *et al.* 2008, Kang *et al.* 2008).

Tip II MIKC tipi MADS kutulu genler hakkında bilinenler oldukça fazladır. MIKC^C grup genler sporophyte gelişiminin çeşitli yönlerini kontrol etmektedir (Parenicová *et al.* 2003, Arora *et al.* 2007, Leseberg *et al.* 2006, Becker and Theissen 2003, Kaufmann *et al.* 2005, Melzer *et al.* 2010, Theissen *et al.* 2000). Bu genler *A.thaliana* gibi çiçekli bitkilerde üreme gelişimini kontrol gen düzenleyici ağın hemen hemen tüm seviyelerinde özellikle belirgindir. Buna göre MIKC^C grubu genler çiçeklenme zamanını (*SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *AGL24*, *MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF1)*, ve *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*); çiçek meristem kimliğini (*API*, *FRUITFULL (FUL)*, *CAULIFLOWER (CAL)*); çiçek organ kimliğini (*API*, *SEP1*, *SEP2*, *SEP3*, *SEP4*, *AP3*, *PI*, ve *AG*); meyve gelişimini (*SHATTERPROOF 1 (SHP1)* ve *SHP2*, ve *FUL*); tohum pigmentasyonunu (*ABS*) belirler (Parenicová *et al.* 2003, Kaufmann *et al.* 2005).

2.4 Legümlerde Çiçeklenme

Legüm ailesi (Fabaceae ya da Leguminosae olarak da bilinir) 60 milyon yıl önce evrimleşmiş olup caesalpinoids, mimosoids ve papilionoids olmak üzere 3 alt familyaya ayrılmıştır (Lavin *et al.* 2005). Çiçekli bitkilerin en büyük üçüncü ailesini oluşturan legümler sucul bitkilerden büyük orman ağaçlarına kadar 700 cins ve 18.000 türe sahiptir (Lewis *et al.* 2005, Capoen *et al.* 2010, Tabosa *et al.* 2012). Çoğu legüm çiçeği beş sepal, beş petal, her biri beş stamenden oluşan iki çiçek halkası ve tek karpelden oluşan beşli çiçek yapısına sahip 21 çiçek organından oluşmaktadır fakat çiçek organlarının azalmasını veya çoğalmasını içeren bu yapı tür varyasyonları ile ortaya çıkmaktadır (Lewis *et al.* 2005, Tucker 2003a). Papilionoid taksonu Swartzieae'nın birçok üyesi tek bir petal ile karakterize edilirken (Lewis *et al.* 2005), genel olarak üç legüm alt ailesi stamenlerden bol ürün elde edildiğini açıkça ortaya koymuştur (Tucker 2003b). *Pisum sativum*, *Medicago truncatula* ve *Lotus japonicus* gibi tipik papilionoid çiçekleri petal ve stamenlerden oluşan geçici meristemlere sahiptir (Ferrandiz *et al.* 1999, Weng *et al.* 2011, Benlloch *et al.* 2003).

Legümlerin çiçek yapısıyla ilgili ortaya konulan bu çalışmalar ABC modeli ile ilişkili legüm çiçek gelişimi ve organ kimliğini belirleyecek moleküler kaynaklı çalışmalar için temel oluşturma açısından gereklidir (Meyerowitz *et al.* 1991; Irish, 1999; Jack, 2001). Model dikot türler ile legümler arasındaki özgünlüğü ve çiçek organ kimliğinin genetik kontrolünü karşılaştırmak ve ABC gen homologlarının ifadesini izlemek için organ dizilimindeki karşılaştırmalar iyi bir kaynak oluşturmaktadır (Tucker, 2003a). Çiçek kimlik genlerinin dizileri ve fonksiyonları göz önüne alındığında angiosperm türleri boyunca iyi bir şekilde muhafaza edildiği görülür (Becker and Theissen 2003) ve belirli bir MADS kutulu genin ifade deseni genin fonksiyonel alanı ile iyi bir bağlantı oluşturmuştur (Ferrario *et al.* 2004), yani bu genlerin ifade desenleri kendi fonksiyonlarının iyi bir belirleyicisi olabilmektedir (Zahn *et al.* 2006). Ayrıca *Arabidopsis* çiçek genlerinin büyük bir çoğunluğu *Medicago truncatula*, *Glycine max* ve *Lotus corniculatus* sekanslarının veri tabanında yer almaktadır (Hecht *et al.* 2005). Bunların dışında *Arabidopsis* çiçek organ kimlik genlerinin izolasyon ve karakterizasyonu *Pisum sativum* Berbel vd. (2001), *Sophora tetraptera* Song vd. (2008) ve *Clanthus maximus* Song vd. (2011) gibi çeşitli legüm türlerinde de çalışılmıştır.

2.5 *Thermopsis turcica* Çiçek Yapısı ve Gen Kaynağı Olarak Kullanılması

Fabaceae familyası Papilionoideae (=Faboideae), Mimosoideae ve Caesalpinoideae olmak üzere 3 alt familyaya ayrılmıştır (Davis 1969). Tropik bölgelerdeki legümler odunsu bitkilerden oluşurken tropik bölge dışındakiler ise genellikle otsu bitkilerden oluşmaktadır (Baytop 1991).

Papilionoideae yaklaşık 12 000 tür, 455 cins ve 30 takım ile legümlerin üç alt ailesinin en büyük grubudur. Morfolojik ve moleküler kanıtlara dayanarak papilionoideanın, caesalpinioid alt aile içerisinden türetilmiş özel bir monofiletik grup olduğu ortaya konmuştur (Doyle 1995, Doyle *et al.* 2000). Sophoreae ve Swartzieae takımlarının çiçek yapılarında istisnalar olmasına rağmen çoğu takson bilinen “papilionoid” çiçek formuna sahiptir (Tucker 2003b). Papilionoideae’de çiçeklenme genel olarak rasemöz formundadır. Rasemözlerde çiçek gelişimi sıralı bir şekilde başlatılmış olup gelişim sıralıdır. Bu nedenle çiçeklenme, alt kısımda yaşlı çiçeklerin üst kısımda genç çiçeklerin

yer aldığı farklı yaşlardaki çiçeklerden oluşur. Papilionoideae'lerin çoğu özelleşmiş zigomorfik çiçeklere sahiptir. Papilionoid çiçekler, birbiriyle komşu olan halkalardaki değişen organlarla beşli çiçek yapısına sahiptir (Tucker 2003b).

Papilionoideae alt ailesinin üyesi olan Thermopsidae Kuzey-Doğu Asya merkezinden Akdeniz havzası boyunca yayılmış 6 cins içerirken güney yarım kürede ise yayılış göstermemektedir. *Thermopsis* ayrıca rizom yapılarını üretmektedir (Wang *et al.* 2006). Kuzey Amerika ve Asya'nın dağlık bölgelerinde dağılış gösteren yaklaşık olarak 25 *Thermopsis* cinsi mevcuttur (Davis *et al.* 1988).

Thermopsis yayılış alanı olarak Orta Asya ve Doğu Amerika ile sınırlanmış olup Türkiye'de tek endemik türü *T.turcica* ile temsil edilmektedir (Özdemir *vd.* 2008). *Thermopsis* cinsine ait *Thermopsis turcica* (Kit Tan, Vural & Küçüköyük) ilk teşhis edildiğinde doğal yayılış alanının Konya İli sınırları içinde, Akşehir Gölü'nün güneyinde yer alan Gölçayır mevkiisi olduğu bildirilmiştir (Tan *vd.* 1983). Ancak Tan *vd.* (2006), *T. turcica*'nın doğal habitatını Afyonkarahisar İli sınırları içinde yer alan Eber Gölü'nün güneyi ve Akşehir Gölü'nün güney batısı olarak yeniden tanımlamışlardır.

Thermopsis turcica'nın tüm Fabaceae bitkileri arasında oldukça sıra dışı bir çiçek ve meyve morfolojisine sahip olması, bu endemik bitkinin önemini daha da arttırmaktadır. Fabaceae ailesi bitkilerinde karakteristik olarak çiçekler beş sepal, beş petal, iki halkada beşer stamen ve tek karpel bulundurmaktadır (Tucker 2003a). Papilionoideae alt ailesi için aynı çiçekten çok karpelli serbest meyve durumu, sadece *T.turcica* için rapor edilmiştir (Tan *vd.* 1983). *T.turcica* çiçeğinde beş sepal, beş petal, iki halkada on stamen ve dörde kadar serbest karpel mevcuttur (Tan *vd.* 1983). Bezelye, fasulye, soya fasulyesi, nohut ve yonca gibi ekonomik olarak önemli türleri de kapsayan yaklaşık 12000 papilionoid türü içinde *T. turcica*'nın bu sıra dışı morfolojik özelliği bu türü ayrıcalıklı bir yabancı bitki türü yapmaktadır (Tan *vd.* 1983). Bu morfolojik özelliğin ekonomik değere sahip legüm türlerine aktarılabilmesi üzerine gerçekleştirilebilecek araştırmalar heyecan verici bir düşüncedir.

T.turcica ile bugüne kadar biyolojik ve kimyasal olarak çalışmalar yapılmış olsa da yapılan literatür taramalarında herhangi bir moleküler genetik araştırması mevcut değildir. Türkiye'nin önemli gen kaynaklarından biri olan *T.turcica*'nın 3-4 serbest karpel oluşumu özelliğini kontrol eden moleküler mekanizmanın aydınlatılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada, çiçek meristemi ve/veya çiçek organ kimlik geni olan *API* ve *AP2*'nin tam nükleotid ve protein dizilerinin belirlenmesi ile genlerin farklı dokulardaki ifade analizlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 212T099 nolu ve 'Türkiye Endemiği *Thermopsis turcica*'da MADS Kutusuna Sahip Çiçek Organı Meristem Kimlik Genlerinin Klonlanması ve Karakterizasyonu' başlıklı projenin bir kısmını oluşturmuştur.

2.6 APETALA 1

Arabidopsis thaliana ve *Antirrhinum majus* ile ilişkili dikotiledon çalışmaları çiçeklenme sürecindeki bazı moleküler genetik mekanizmalara ışık tutmuştur (Bowman *et al.* 1993). Örneğin çiçek organ kimliğinin belirlenmesi homeotik genlerin üç sınıfının ayrı ayrı ya da oluşturdukları kombinasyonlara bağımlıdır (Bowman *et al.* 1989, 1991; Carpenter and Coen, 1990; Schwarz-Sommer *et al.* 1990). Çiçek meristemlerinin kimliğini erken evrede kontrol eden genler yapılan çalışmalarla karakterize edilmiştir (Bowman *et al.* 1993). Bu genler *Arabidopsis*'de *LFY* geni (Weigel *et al.* 1992) ve *API* genidir (Mandel *et al.* 1992). *Arabidopsis thaliana*'nın genleri olan *API* ve *LFY*, çiçek meristemini tanımlayarak, çiçeğin oluşum sürecinde önemli rol oynamaktadır (Coen *et al.* 1990, Davies *et al.* 1999, Huijser *et al.* 1992, Mandel *et al.* 1992, Weigel *et al.* 1992). *LFY* veya *API* geninin aşırı ifadesi, sürgünleri çiçeğe dönüştürür (Mandel and Yanofsky 1995, Weigel and Nilsson 1995). *LFY*'nin aksine *API* transkripsiyon faktörü kodlamaktadır ve çoklu gen ailesi olan MADS kutulu gen ailesinin bir üyesidir (Mandel *et al.* 1992). *API*, *LFY*'ye benzer şekilde genç çiçek meristemleri boyunca ifade olur ve sonrasında bu meristemlerde *LFY* ifadesi üzerinde kurulur (Mandel *et al.* 1992). Aslında *API* doğrudan *LFY* tarafından aktive edilmektedir (Wagner *et al.* 1999). Bir çiçek meristeminin çiçeklenmeye geçişi sırasında *API* ve *LFY*, sepal ve petal primordiyalarının gelişiminde *AGL24*'ün ifadesini bastırmak için harekete geçmiştir. *API*'in yokluğunda *AGL24* ifadesi gelişmekte olan organlarda ve meristemler boyunca

devam etmektedir. *AGL24* fonksiyon kaybı *ap1* mutantında çiçeklenme karakteristiğinin önemli ölçüde azalmasına neden olur. *ap1 agl24* çift mutantında meristemler yabani tipteki gibi tek çiçek meydana getirirler ve böylece petal kimliği kısmen restore edilmiştir (Yu *et al.* 2004). *ap1 agl24* mutantındaki petal kimliğinin bu kısmi restorasyonu, *API* fonksiyonunun bu organın gelişimi ve oluşumu için kesinlikle gerekli olmadığını göstermiştir (Yu *et al.* 2004).

API ve *LFY* ayrıca hormonal yollarla ilgili genlerin ifadesini kontrol eder. *API*, çiçeklenme ve giberellin metabolizması ile ilişkili çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlerken (Kaufmann *et al.* 2010), *LFY* ise oksin biyosentezini inhibe eder ve floral meristemde ortaya çıkan oksin sinyalizasyonunu teşvik eder (Li *et al.* 2013, Yamaguchi *et al.* 2013).

Antirrhinum'da *Arabidopsis*'deki *LFY* geninin homoloğu *FLORICAULA* (Coen *et al.* 1990) ve *API* geninin homoloğu ise *SQUAMOSA* (Huijser *et al.* 1992)'dir. *APETALA1(API)* ve homolog gen *SQUA*, model bitki *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da çiçek meristeminin tanımlanmasında anahtar rol oynayan düzenleyici genlerdir (Ana Berbel *et al.* 2001). *API* VE *SQUA* genlerinin sekansı, ekspresyonu ve fonksiyonları benzerlik göstermesine rağmen sadece *API* geninin, sepal ve petal oluşumu gibi ek görevleri bulunmaktadır (Berbel *et al.* 2001). *API* ve *SQUA*, diğer birçok bitki türünden MADS kutulu genleri kapsayan *SQUA* alt familyasına ait MADS kutlu genlerdir (Theissen *et al.* 2000). *API*, *SQUA* ve diğer homolog genler tarafından kodlanan polipeptidlerin C-terminal ucu, protein prenilasyonu için hedef bir sinyal olan Caax kutusunu oluşturmaktadır (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 1999).

Arabidopsis'de iki A sınıfı gen mevcuttur: *API* ve *AP2*, bu iki genden sadece *API*, MADS-kutulu transkripsiyon faktörünü kodlar (Kater *et al.* 2006). A fonksiyonu olarak *API* ve *AP2*'nin genelde diğer türlerdeki homologları sepal ve petal kimliklerinin belirlenmesinde görev almaması bu genlerin rollerinin nispeten yeni bir evrimsel kazanıma sahip olduğunu gösterir (Zik and Irish, 2003a; Litt 2007). A sınıfı fonksiyonuna sahip olan *API*'in sepal ve petal kimliğinin belirlenmesi ve çiçek meristem kimliğinin belirlenmesi gibi genetik olarak birbirinden ayrı iki fonksiyonu

mevcuttur (Kater *et al.* 2006). C fonksiyonel geni olan *AG*'nin baskılayıcı aktivitesi nedeniyle *API*'in ifadesinin en dıştaki iki halkayla sınırlı olduğu bulunduktan sonra A sınıfı gen ailesine katılmıştır.

Arabidopsis'de *API*'de meydana gelen mutasyonlar sepal ve petal kimliklendirilmesinde değişiklik meydana getirerek sürgünlerin kısmi çiçeklenmelerine neden olur (Bowman *et al.* 1993). *apl* mutantlı bitkilerde dallanmaların artması ve çiçeklenmenin azalışı belirlenmiş tam bir çiçeğe geçiş aşaması için *API*'e ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Bu durum brakte benzeri yapıların sepallere homeotik dönüşümü ile desteklenmiştir. *API* fonksiyonunun yokluğunda *Arabidopsis* çiçeğinin dış halkalarındaki organlar eş zamanlı olarak brakte benzeri yapılara dönüşmektedir (Irish and Sussex 1990, Bowman *et al.* 1993). Bu durumda bitkinin petal yapıları kaybolmuştur. Bunun yerine ikinci çiçek halkasında birincil çiçek organları yapısına benzeyen fakat tam olarak petallerin yerini almayan ikincil çiçekler vardır. Birincil çiçek halkasında yer alan stamen ve karpeller nispeten normal ve verimlidir. Böylece *API*, sepal ve petal kimliğinin belirlenmesini sağlayan A fonksiyonunun gelişimine katkı sağlamıştır. Bununla birlikte *ap2* mutantında gözlenen durumun tam aksine *apl* mutantlı bitkilerde *AG*'nin ifade alanı hiçbir şekilde değişmemiştir ve C fonksiyonlu genlerin aktivitesinin düzenlenmesinde *API*'in rolü olmadığı böylelikle gösterilmiştir. Aslında ABC modelinin erken formulasyonunda A fonksiyonlu genler grubuna dahil edilmemiştir (Bowman *et al.* 1991, Coen and Meyerowitz 1991). C fonksiyonunun odak noktası olan *AG* geni tarafından *API* geninin ifadesinin ifade alanının dıştaki iki halkayla sınırlandırıldığı keşfedilmesi ile *API*, *AP2* ile birlikte *Arabidopsis* A fonksiyonlu genler grubuna dahil edilmiştir (Gustafson-Brown *et al.* 1994).

Dörtlü çiçek modeli *API*'in sepal (*API/API/SEP/SEP*) ve petal (*API/SEP/AP3/PI*) belirlemesi için gerekli olan fonksiyonel tetramer grubunun bir üyesi olduğunu öne sürmüştür (Theissen 2001, Theissen and Saedler 2001, Kaufmann *et al.* 2005). *AP3* ve *PI* petal kimliğinin belirlenmesinde ayrı bir rol oynarken, *API* ve *SEP* ise meristem kimlik rollerinden dolayı sepal ve petal gelişiminde daha paylaşımcı bir rol üstlenmiştir.

API, MIKC tipi MADS kutusu faktörüdür. Bu faktör çiçeklenmenin başlangıcı ve faz geçişleriyle ilişkili genlerin regülasyonu tarafından çiçek meristem kimliğinin belirlenmesini gösterir (Mandel *et al.* 1992, Kaufmann *et al.* 2010). *API*, MADS kutulu *SQUA* alt familyasının bir üyesidir. Bugüne kadar çalışılan çiçek MADS kutulu genleri arasında *API/SQUA* alt familyasının üyeleri ilgi çekicidir çünkü çiçeklenmenin gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. *Arabidopsis*'de *API*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *FRUITFULL (FUL)* ve *AGAMOUS-LIKE 79 (AGL79)* olmak üzere dört adet *API/SQUA* benzeri gen vardır (De Bodt *et al.* 2003a, Parenicova *et al.* 2003). Güçlü *ap1* mutasyonları brakte benzeri yapıların sepallere dönüşümüne neden olması ve her bir braktenin ekseninde ek çiçeklerin oluşumuna eşlik etmesi ve zayıf *ap1* mutasyonlarının sepal ve petallerde kusurlara yol açması nedeniyle *API* çiçek organ kimliklendirme geni ve çiçek meristem kimliklendirme geni olarak tanımlanmıştır (Bowman *et al.* 1993, Irish and Sussex, 1990, Mandel *et al.* 1992). *Arabidopsis*'de *API* ile yakından ilişkili olarak çiçek meristem oluşumunun kontrolünde *API*'in yedeği olarak hareket eden *CAL* geni vardır (Bowman *et al.* 1993; Kempin *et al.* 1995; Lawton-Rauh *et al.* 1999). Tekli *cal* mutantları belirgin anormalliklere sahip değildir fakat *ap1* çiçek meristeminde tekrarlanan dallanma deseninin gelişimine neden olmuştur (Bowman *et al.* 1993, Kempin *et al.* 1995). *FUL* geni *API* ve *CAL* genlerinden oldukça farklı bir şekilde C terminal ucu ile bir protein kodlamaktadır (Mandel and Yanofsky 1995). *FUL* geni de çiçek meristemin kontrolünde rol oynamaktadır; *ap1 cal ful* üçlü mutanti oluştuğunda, tüm çiçek meristem karakterleri kaybolur ve çiçek formu oluşmaz (Ferrandiz *et al.* 2000a). *CAL* geninin aksine *FUL* geninin yaprak ve meyve gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir ve genç meyvelerde ifade olmaktadır (Gu *et al.* 1998; Mandel and Yanofsky 1995). *AGL79* geninin fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen köklerde ifade olduğu tespit edilmiştir (De Bodt *et al.* 2003b, Parenicova *et al.* 2003).

2.7 APETALA 2

A sınıfı gen grubuna dahil olan *AP2* diğer ABC genlerinden çok farklı özelliklere sahiptir. ABC genleri bir MADS domaini içermesine rağmen *AP2* iki tane APETALA2/ethylene-responsive element binding protein (*AP2/EREBP*) domaini içerir (Jofuku *et al.* 1994). *AP2* / EAF domaini (Ethylene Responsive Element Binding Factor) yaklaşık 60 korunmuş amino asit kalıntısı içeren bir DNA-bağlayıcı etki alanıdır (Jofuku *et al.* 1994; Hao *et al.* 1998). Sakuma ve arkadaşları (2002), *Arabidopsis thaliana* genomunda 145 *AP2* / *EREBP* geni bulmuştur. Bu çoklu gen ailesi iki alt aileye ayrılmıştır: tek *AP2/ERF* domainine sahip *EREBP* (ethylene responsive element binding protein) alt ailesi ve iki *AP2* domainine sahip *AP2* ailesi. *EREBP* alt ailesinin çoğu üyesi çevresel stres yanıtları ve biyotik sinyal iletim yollarında görev alırken bazı üyeleri ise kambiyal doku gelişiminde görev almaktadır (Riechmann and Meyerowitz 1998, van der Graaff *et al.* 2000, 2003). *AP2* alt ailesi *AP2* ve *AINTEGUMENTA(ANT)* olmak üzere iki monofiletik gruba ayrılmıştır (Shigyo and Ito 2004). Hücre sayısını ve büyümeyi kontrol ederek yanal organ gelişimine katılan çiçek homeotik genleri *AP2* ve *ANT* dahil olmak üzere *AP2* alt familyasında belirlenmiş genlerin vejetatif ve üreme organlarının gelişiminde düzenleyici rol oynadıkları belirlenmiştir (Riechmann and Meyerowitz 1998, Jofuku *et al.* 1994, Elliott *et al.* 1996; Klucher *et al.* 1996, Mizukami and Fischer 2000, Mizukami 2001).

Bitkiler arasında *AP2* / *EREBP* multigen ailesinin filogenetik ilişkileri belirleyen bu gelişimsel ve fizyolojik önemi gen ailesinin evriminin aydınlatılmasında önemli bir adım olmuştur. *AP2* / *EREBP* genleri birçok angiospermlerde ve kozalaklı ağaçlarda rapor edilmiştir (Vahala *et al.* 2001, Shigyo and Ito, 2004). *AP2* / *ERF* domaini ile dizi benzerliği paylaşan domainler bitkiler aleminin dışında bulunmamıştır ve *AP2* / *ERF* domaini bitkilere özgü olarak kabul edilmiştir (Riechmann and Meyerowitz 1998, Krizek 2003).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar microRNA'ların hayvanlar ve bitkiler aleminde translasyon düzeyinde önemli düzenleyiciler oldukları bulunmuştur (Lagos-Quintana *et al.* 2001, 2002, Lau *et al.* 2001, Lee and Ambros 2001, Llave *et al.* 2002, Mourelatos *et al.* 2002, Park *et al.* 2002, Reinhart *et al.* 2002). *miRNA 172*'nin AP2 alt ailesindeki çeşitli *Arabidopsis* genlerini düzenlediği rapor edilmiştir (Aukerman and Sakai, 2003, Chen 2004). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile mısırdaki *AP2* geni benzeri olan *glossy15* geninin *miRNA172* tarafından baskılandığı belirlenmiştir (Lauter *et al.* 2005). *Arabidopsis*'de çiçek homeotik geni AP2'nin üç kritik rolü vardır. Bunlardan birincisi AP2 çiçek meristeminin kurulmasında rol almaktadır (Irish and Sussex 1990, Huala and Sussex 1992, Bowman *et al.* 1993, Schultz and Haughn 1993, Shannon and Meeks-Wagner 1993). İkinci olarak çiçek organ kimliğinin belirlenmesinde görev almaktadır (Komaki *et al.* 1988, Bowman *et al.* 1989, Kunst *et al.* 1989). Üçüncü ve son görevi ise çiçek homeotik gen ifadesinin zamansal ve mekânsal ifadesini düzenlemesidir (Bowman *et al.* 1991a, Drews *et al.* 1991a).

Çiçek gelişimi boyunca AP2'nin erken evredeki bir fonksiyonu çiçek meristeminin kurulmasını teşvik etmesidir. AP2 bu işlevi diğer üç çiçek meristem geni olan *API*, *LFY* ve *CAL* ile bir işbirliği içerisinde gerçekleştirmektedir (Irish and Sussex 1990, Bowman 1992, Huala and Sussex 1992, Bowman *et al.* 1993, Schultz and Haughn, 1993, Shannon and Meeks-Wagner 1993). Çiçek organ gelişimini düzenlemesi AP2'nin ikinci fonksiyonudur. *Arabidopsis*'de çiçek meristemi çiçek organları olan sepal, petal, stamen ve karpeli üretir. Zayıf olarak *ap2* mutantlarının kısmi fonksiyonel kaybı sepallerin yapraklara dönüşmesini ve petallerin polen üreten stamenoid organlara dönüşmesine neden olmaktadır (Bowman *et al.* 1989, 1991b). Buna karşılık güçlü *ap2* sepaller mutantlarında ovül taşıyan karpellere dönüşmüştür, petal gelişimi baskılanmıştır, stamenlerin sayısında azalma gözlenmiştir ve karpel oluşumu da genellikle kusurlu bir şekilde gerçekleşmiştir (Komaki *et al.* 1988, Kunst *et al.* 1989, Bowman *et al.* 1991b). Son olarak çiçek organ gelişiminde *ap2*'nin etkileri arasında yer alan bazı çiçeğe özgü düzenleyici genlerin ifadesini doğrudan veya dolaylı olarak düzenlemesi AP2'nin üçüncü fonksiyonunun bir parçasıdır (Bowman *et al.* 1991a, Drews *et al.* 1991a, Jack *et al.* 1992, Mandel *et al.* 1992a).

Çiçek organ kimliğinin belirlenmesinde *AP2* ve diğer çiçek organ kimlik genlerinin rolünü açıklamak için zamansal ve birleştirici bir model öne sürülmüştür (Haughn and Somerville 1988; Bowman *et al.* 1991a, Coen and Meyerowitz 1991, Drews *et al.* 1991b, Meyerowitz *et al.* 1991, Bowman *et al.* 1993, Coen and Carpenter 1993). Bu modelin gösterdiği önemli sonuçlardan biri *AP2* ile diğer bir çiçeklenme geni olan *AG*'nin karşılıklı olarak zıt bir şekilde çalışmasıdır. Buna göre *AP2*, sepal ve petalde *AG*'nin ifadesini baskımlarken *AG*'de stamen ve karpelde *AP2*'nin ifadesini baskılamaktadır. *ap2* mutantlı çiçekler ve *AG* gen ifadesinin in situ hibridizasyon analizleri *AP2*'nin *AG* ifadesinin negatif regülatörü olduğunu göstermiştir (Bowman *et al.* 1991a, Drews *et al.* 1991a).

ABC modelinden çıkarılan varsayımlara göre A ve C sınıfı genlerin birbirleriyle karşılıklı ifadelerini bastırdıkları tespit edilmiştir. *ap2* mutantlı çiçeklerde genişletilmiş *AG* aktivitesi çiçeğin çevresindeki çiçek üreme organlarının gelişmesine yol açmıştır. Bunun aksine *ag* mutantları çiçeğin merkezine doğru A fonksiyonunun genişlemesini, periant organlarının üreme organlarına dönüşümünü göstermiştir. ABC modeline göre *Arabidopsis*'de A sınıfı fonksiyonu bu nedenle C sınıfı fonksiyonunun baskısına ve periant kimliğine ihtiyaç duymaktadır. A fonksiyonunun bu çift işlevli durumu yani A sınıfı fonksiyonunun genelliğini ve periant kimliğinin belirlenmesindeki rolünü sorgulaması *Arabidopsis* dışında başka hiçbir türde keşfedilmemiştir (Causier *et al.* 2010).

MADS kutulu genlerin yüksek seviyede özgün ifadesine karşın *AP2* mRNA birikiminin sadece periantta değil üreme organı primordiyalarında olduğu gözlenmiştir. ABC modeli birincil *AP2* ifadesinin ve promotör aktivitesinin tüm çiçek halkası boyunca olduğunu göstermiştir (Jofuku *et al.* 1994, Würschum *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2007). *Arabidopsis* ile birlikte aslanağzı, mısır ve petunya türlerinde yapılan *AP2* çalışmaları *AP2* mRNA birikiminin çiçek primordiyalarında farklı seviyede olduğunu ve çiçeklenmede çok özgün ifade desenleri oluşturduğunu göstermiştir (Alvarez-Venegas *et al.* 2003, Maes *et al.* 2001, Chuck *et al.* 1998, Keck *et al.* 2003).

Arabidopsis'deki *AP2* genine benzer bir A fonksiyonlu gen diğer türlerde henüz keşfedilmemiştir (Causier *et al.* 2010). *Antirrhinum majus*'daki iki *AP2* ortoloğu olan *LIPLESS1 (LIP1)* ve *LIP2*'nin fonksiyonel olarak yedek görevleri bulunmaktadır (Keck *et al.* 2003). *LIP1/2* ve *AP2* genleri periant organ deseninde benzer fonksiyonlar paylaşırlar fakat *AP2*'nin aksine *LIP1/2* aktivitesi *Antirrhinum C* sınıfı geni *PLENA (PLE)*' yi baskılamak için gerekli değildir (Keck *et al.* 2003). *LIP2*'den ziyade *LIP1* ifadesi *AP2* ile benzer özellikler paylaşmaktadır yani her ikisininde 3.ve 4. çiçek aşamasında merkezi meristemi çevreleyen sepal primordiyalarında gelişmekte olduğu tespit edilmiştir (Keck *et al.* 2003). *AP2* ile benzer şekilde *LIP1* ifadesi gelişmekte olan sepalde azalış gösterir. Çiçek gelişiminin 6. evresinde petal primordiyalarının distalinde tespit edilmiştir ve karpel ile stamen primordiyalarında zayıf olarak tespit edilmiştir (Keck *et al.* 2003). Mutant analizleri, *AP2*'nin *Petunia hybrida*'daki ortoloğu *PhAP2A*'nın periant deseninin oluşmasında hiçbir görevinin olmadığını kanıtlamıştır (Maes *et al.* 2001).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali

Afyonkarahisar sınırları içerisinde yer alan Eber Gölü civarında koruma alanı içerisinde bulunan *Thermopsis turcica* popülasyonundan tomurcuk ve çiçek organları şeklinde bitki örnekleme yapılmıştır. Örnekleme işlemi iki kez olacak şekilde 09.04.2014 ve 18.04.2014 tarihlerinde ve örnekleme tomurcuk, sepal, petal, stamen, karpel şeklinde yapılmıştır. Çiçekli bitkiler gövde kısımlarından kesilerek hızlı bir şekilde suya konulup Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bitki Moleküler Biyolojisi laboratuvarına transfer edilmiştir. Örnekleme yapılan bitki dokuları, her bir örnek birer gram olacak şekilde hassas terazide alüminyum folyo yardımıyla tartılmış ve ardından hızlı bir şekilde sıvı azotta dondurma işlemi yapılarak -86°C ayarlı ultra derin dondurucuda çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2 *Thermopsis turcica* Çiçek Dokularından Total RNA İzolasyonu

3.2.1 Total RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyon çalışmalarında RNase kontaminasyonunu önlemek için çalışma ortamının temizliği dikkatli ve özenli bir biçimde yapılmıştır. Ekstraksiyonun gerçekleştirileceği ortam, benç, cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin temizliği öncelikli olarak çamaşır suyu, %70 etanol ile gerçekleştirilmiş olup, çalışma ortamı çalışma yapılmadan bir gün önce UV lamba aracılığıyla RNaz enzimlerinden arındırılmış bir ortam haline getirilmiştir. Ayrıca çalışma boyunca kullanılacak olan cam malzemeler, havan ve eli, spatüller 180°C'de 5 saat etüvde bekletilmiştir. Çalışmanın yapılacağı gün ise çalışma ortamı ve tüm malzemeler ekstra olarak RNase ve DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla RNASE AWAY (Molecular BioProducts) ile temizlenmiştir. Çalışmalar sırasında tek kullanımlık steril eldivenler kullanılmaya özen gösterilmiştir.

RNA ekstraksiyonu, -86°C ayarlı ultra derin dondurucuda muhafaza edilen birer gram doku örneklerinden PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion) RNA izolasyon kiti kullanılarak protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre 1 gram doku örneği RNASE AWAY ile RNazdan arındırılmış havan ve eli kullanılarak iyice öğütme işlemi yapıldıktan sonra 150-200 mg dövülmüş doku sıvı azot yardımıyla soğutulmuş steril ependorf tüpüne aktarılmıştır. Tüp içersine hızlı bir şekilde 1 mL Lizis tamponu eklenerek doku özütü 15 saniye vortekslenmiş ve sonra 26 000 x g'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım steril bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine 0,5 mL absolut etanol eklenerek kısaca vortekslenmiştir. RNA örneği spin kartuşa aktarılarak 12 000 x g'de 90 saniye santrifüjlenmiştir. RNA örneğini içeren kartuş yıkama tamponu I ve II ile temizlendikten sonra steril ependorf tüpe aktarılmıştır. Spin kartuşun tam ortasına 100 µL RNaz içermeyen su eklendikten sonra örnek oda sıcaklığında bir dakika bekletilmiş ve 12 000 x g'de 3 dakika santrifüjlenerek elüte edilmiştir.

3.2.2 DNaz Uygulaması

RNA ekstraksiyonundan hemen sonra cDNA sentezinde kullanılacak RNA'nın saflığını arttırmak amacıyla total RNA, DNA-free™ DNase (Ambion) kiti kullanılarak ekstredeki olası DNA'lar temizlenmiştir. DNaz uygulaması elde edilen RNA örneğinin tamamına uygulanmıştır. 100 µL RNA örneğine 10 µL DNaz I Tamponu ve 1 µL rDNaz eklenmiştir ve nazikçe karıştırılmıştır. RNA üzerine eklemeler yapıldıktan sonra 37°C su banyosunda 20-30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyonun durdurulması için, örneğe 5 µL DNaz inaktivasyon ajanı eklenerek, iyice karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 2 dakika arada bir karıştırılarak bekletilmiştir. RNA örneği oda sıcaklığında 10 000 x g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, üstte kalan RNA pelete değmeden dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe aktarılmıştır.

3.2.3 Total RNA Miktar Tayini

Elde edilen RNA'ların kalitesi ve miktarı Qubit™ (Invitrogene) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Qubit™ ölçüm standart kiti ile ölçüm aralığı ayarlandıktan sonra 1-20 µL arasındaki RNA örneği Qubit™ tamponu ve ajanı ile muamele edildikten sonra

ölçüm işlemi yapılmıştır ve örnekler tam uzunlukta cDNA analizi ve qPCR çalışmalarında kullanılmak üzere -86°C ultra derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.4 RNA Formaldehitli Agaroz Jel Elektroforezi

Çalışmaya başlamadan önce cihazlar ve kullanılan mekan RNASE AWAY kimyasalı ve % 0,5'lik SDS çözeltisi ile temizlendikten sonra çalışma ortamı UV lamba aracılığıyla RNaz enzimlerinden arındırılmış bir ortam haline getirilmiştir. RNA molekülleri sıklıkla ikincil yapılar oluşturduklarından dolayı RNA jellerine bu ikincil yapıları bozacak olan formaldehit eklenir. RNA jel elektroforezi için gerekli tüm çözeltilerin hazırlanmasında DEPC uygulanmış su kullanılmıştır. Öncelikli olarak 250 mL 10X MOPS tamponu (200 mM MOPS, 50 mM Sodium acetate, 10 mM EDTA) hazırlanmıştır. Yürütme tamponu için 1X MOPS Buffer 1 litre olacak şekilde (100 mL 10X MOPS tamponu, 20 mL %37 Formaldehit, 880 mL DEPC'li su) hazırlanmıştır. Örneklerin yükleneceği %1'lik jeli hazırlamak için öncelikle 0,5 g agaroz, 36 mL DEPC-uygulanmış distile H₂O ve 5 mL 10x MOPS tamponu karıştırılarak mikrodalga fırında eritilmiştir. Eritilmiş olan agaroz 60°C su banyosunda soğutulmuştur ve 9 mL %37 formaldehit eritilmiş agaroz eklenmiştir. Total RNA'lar her çalışmada taze olarak hazırlanan 100 µL hacimli (13 µL %37 Formaldehit, 22 µL Formamid, 65 µL 10X MOPS tamponu) denatürasyon karışımı ile muamele edilmiştir. 5 µg total RNA örneği 9 µl denatürasyon karışımı ile muamele edilmiştir. Denatürasyon karışımı ile muamele edilmiş RNA örnekleri ve RNA markörü (Thermo Scientific) 2X RNA yükleme boyası (%95 formamide, %0,025 SDS, %0,025 bromophenol blue, %0,025 xylene cyanol, %0,025 ethidium bromide, 0,5 mM EDTA) ile 1:1 hacminde karıştırılmış ve 65°C'de su banyosunda 10 dakika ısıtılmış ve hemen ardından 3 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra jele yüklenmiştir. Jel 80 dakika 70 mA'de yürütülmüştür. RNA bantlarının görüntülenmesi Gen Box SDR Jel Dökümantasyon Sistemi ile yapılmıştır

3.3 Gene Özgü Primer Tasarımı

Gene özgü primer tasarımı yapılırken daha önceden sekanslanmış kısmi *API* ve *AP2* dizileri kullanılmıştır. Gene özgü primer tasarlanırken primer dizilerinin 23-28 nükleotid arasında olması, GC oranının %50-70 olması, Tm değerlerinin 65°C'nin üzerinde olmasına dikkat edilmiştir. 5' ve 3' RACE analizlerinde kullanılmak üzere iç ve dış olmak üzere 4 adet primer dizayn edilmiştir. Sentezlenen iç primer çiftleri aynı zamanda RT-qPCR çalışmalarında da kullanılmıştır.

3.3.1 *APETALA 1* Gene Özgü Primer Tasarımı

>AP1-2, *T. turcica*, 667 bp [MST medikal 28.11.2013]

GGTAGGGTGCAGCTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATCGCCAGGTAAC
TTTCTCCAAAAGGAGAGCTGGGTTGCTTAAGAAAGCACACGAGATCTCTGT
GCTCTGCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTC TTCTCCAACAAAGGAAAGCTC
TTTGAATATGCCACTGATTCATGCATGGAGAAGATACTGGAACGCCATGAA
AGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAGGCA AATGATTCTGAGACACAG
GGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGACTCAAGGCAAGGATTGACCTTTTG
GAGAGAAACCACAGGCATTACATGGGAGCAGA TTTGGGTTCAATGAGCCTC
AAAGAGCTTCAAAGTCTGGAACAGCAGTTAGATACTGCTCTCAAACCATT
CGTACACGCAGAAACCAACTCATGTACGAGTCCATTTCTGAGCTTCATAAA
AAGGAGAAAGTGATACAAGAGCAGAATAACATGCTCGCAAAAAGATCAA
GGAGAGAGAGAAAGGTTGCAGCACAGCAGGCTGC ACAATGGGATCAATCAA
ACTACAGAGTTGATACATCTTACTTAATACAGCAGCCCCTTTTGGAGATGGG
TGGTAATTATCGTCAGGAAGCACCAGCAGTAGGGAGGAACGATCTCGAACT
GACTC

Çizelge 3.1 3'- ve 5'-RACE ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere ileri (dış ve iç) ve geri (dış ve iç) gene özgü primer dizileri, primerlerin Tm ve tavlama sıcaklıkları.

Primer Adı	Primer Dizisi	Tm (°C)
3APIF1 _{dış}	GCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTC	67,10
3APIF2 _{iç}	CCTATGCAGAGAGACAGATGGAGGCA	65,51
5APIR1 _{dış}	GCAGCCTGCTGTGCTGCAACCTTCTC	61,54
5APIR2 _{iç}	TCTGCTCCCATGTAATGCCTGTGGTT	66,34

3.3.2 APETALA 2 Gene Özgü Primer Tasarımı

>AP2, *T. turcica*, 447 bp [MST medikal 28.11.2013]

AGTATCGCGGGCGTTACTTTTTACAGAAGAAGCTGGTCGATGGGAATCTCATAT
ATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACAGCACATGC
AGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAGGAATAGAAGC
AGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGACTTGAAGCAAATGAG
CAATCTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTACTTCGCCGACAAAGCACTGG
ATTTCCAAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGGTGTAACATTGCACAAGTGTGG
AAGATGGGAAGCTCGAATGGGCCAATTTTTAGGAAAAAAGTACGTTTATCT
GGGTTTGTGGACTGAGATTGAAGCAGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGC
AATAAAATGCAATGGCAAAGATGCCGTCACCAACTTTG

Çizelge 3.2 3'- ve 5'-RACE ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere ileri (dış ve iç) ve geri (dış ve iç) gene özgü primer dizileri, primerlerin Tm ve annealing sıcaklıkları.

Primer Adı	Primer Dizisi	Tm (°C)
3AP2F1 _{dış:}	GGGTGGATTTGACACAGCACATGCAGC	68,71
3AP2F2 _{iç:}	TGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTA	65,80
5AP2R1 _{dış:}	TGCTGCCTTGTCATAGGCCCTTGCT	68,58
5AP2R2 _{iç:}	TTGTCGGCGAAGTACGTGCACAAAT	65,84

3.4 APETALA1 ve APETALA2 Genlerinin RACE Analizi

Genlerin tam uzunlukta cDNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi için SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual (Clontech Laboratories, Inc., TAKARA) kullanılmıştır.

Geriye transkripsiyonu takiben SMART teknolojisine göre 5' ve 3' RACE PCR reaksiyonlarında direkt olarak ilk iplik cDNA'nın kullanımına izin vermiştir. İlk iplik cDNA sentezi boyunca tek adımda universal primer bağlanma bölgelerinin dahil edilmesi adaptör ligasyon ve ikinci iplik sentezi için olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır ve bu da kitin en önemli avantajını oluşturmuştur.

3.4.1 5' ve 3' RACE İçin Kullanıma Hazır İlk İplik cDNA Sentezi

5'- ve 3'- RACE ready cDNA sentezi kit içerisinde verilen kimyasallar kullanılarak ve kitin öngördüğü protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezini gerçekleştirebilmek için kullandığımız total RNA miktarı 100-1000 ng/ μ L arasındadır. cDNA sentezi gerçekleştirilirken şu adımlar sırasıyla uygulanmıştır. Her biri 10 μ L olan 5' ve 3' cDNA sentez reaksiyonu için iki ayrı steril tüp hazırlanarak içerisine sırasıyla 2,0 μ L 5X ilk iplik tamponu, 1,0 μ L DTT (20 mM), 1,0 μ L dNTP Mix (10 mM) eklenerek nazikçe pipetleme ile karıştırılarak ardından vortekleme işlemi uygulanmıştır ve ileriki aşamalarda kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. 5' ve 3' RACE cDNA'sı için ekstra olarak ayrı ayrı iki steril tüp hazırlanmıştır. Hazırlanan tüplerden 5' RACE cDNA tüpünün içerisine 2 μ L RNA, 1 μ L CDS Primer A ve 0,75 μ L dH₂O; 3' RACE cDNA tüpünün içerisine 2 μ L RNA, 1 μ L 3' CDS Primer A ve 1,75 μ L dH₂O eklenerek tüpler mikrosantrifüjde kısaca spin edilmiştir. Daha sonra tüpler 72°C'de 3 dakika inkübe edilmiş olup sonrasında 42°C'de 2 dakika soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Soğutma işleminden sonra içeriğin tüpün dibinde iyi bir şekilde toplanabilmesi için 14 000 g'de 10 saniye kısaca spin edilmiştir. Bu aşamadaki inkübasyon ve soğutma işlemleri thermal cycler cihazında yapılmıştır. Bu işlemden sonra sadece 5' RACE cDNA sentezi reaksiyonu için tüp içerisine 1 μ L SMARTer IIA oligo eklenerek, karışım vortekslenmiştir ve tüpler kısaca mikrosantrifüjde spin edilmiştir. Daha sonra her iki tüpede ilk adımda hazırlanmış olan içerisinde 2,0 μ L 5X ilk iplik tamponu, 1,0 μ L DTT (20 mM), 1,0 μ L dNTP Mix (10 mM) olan tampon karışımı ile sırasıyla, 0,25 μ L RNaz inhibitör (40 U/ μ L), 1 μ L SMARTScribe™ Revers transkriptaz (100 U) eklenerek son hacimi 10 μ L olan 5' ve 3' cDNA sentezi için gerekli olan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışımı nazikçe pipetlenerek, karışımın tüpün dibinde iyi bir şekilde toplanması için kısaca spin edilmiştir. Tüpler thermal cyclerda 90 dakika 42° C'de inkübe edildikten sonra 10 dakika 70° C'de ısıtılmıştır. Kullandığımız total RNA'lar 200 ng/ μ L'den büyük olduğu için reaksiyonların üzerine 100 μ L Tricine-EDTA tamponu eklenerek seyreltme işlemi uygulanmıştır ve cDNA'lar hemen reaksiyonda kullanılmıştır ve kullanılıncaya dek -86° C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 5' ve 3' RACE PCR Tekniği

RACE-Ready cDNA oluşturulduktan sonra, farklı genler ile 5' ve 3' RACE işlemine gerçekleştirmek için sadece farklı gen spesifik primerler kullanmak yeterli olmuştur. SMARTer RACE protokolündeki tüm PCR reaksiyonları Advantage[®] 2 Polimeraz Mix ile kullanım için optimize edilmiştir. Advantage 2 otomatik bir başlangıç sıcaklığı ve ürünüñüzün orijinal sekansı için yüksek seviyede uygunluk sağlayacağı PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek için olanak sağlamaktadır (Barnes 1994; Cheng *et al.* 1994). Sonuç olarak, RACE prosedürleri bize mümkün olduğundan daha uzun şablonları amplifiye etmek imkanı sunmuştur.

5'- ve 3'- RACE reaksiyonları kit içerisinde verilen kimyasallar kullanılarak ve kitin öngördüğü protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Her bir 50 µL'lik reaksiyon için 34,5 µL PCR-Grade water, 5 µL 10x Advantage 2 PCR buffer, 1 µL dNTP, 1 µL 50x Advantage 2 Polimeraz mix'den oluşan master karışım hazırlanmıştır. Karışım içerisinde baloncuk oluşmayacak şekilde vortekslenmiş ve sonrasında tüpler mikrosantrifüjde kısaca spin edilmiştir. 5'- RACE fragmentlerinin sentezi için 2,5 µL 5'- RACE cDNA, 5 µL UPM (10x), 1 µL *API* ve *AP2* genine özgü i veya dış primer (10 µM) master karışımdan oluşan 0,5 µL steril tüpün üzerine eklenerek son hacim 50 µL'ye tamamlanmıştır. Aynı şekilde 3'- RACE fragmentlerinin sentezi için de 2,5 µL 3'- RACE cDNA, 5 µL UPM (10x), 1 µL *API* ve *AP2* genine özgü i veya dış primer (10 µM) master karışımdan oluşan 0.5 µL steril tüpün üzerine eklenerek son hacim 50 µL'ye tamamlanmıştır. PCR tüpleri döngüleri 5x 94 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 3 dakika, 5x 94 °C'de 30 saniye, 70 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 3 dakika, 20x 94 °C'de 30 saniye, 68 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 3 dakika olacak şekilde thermal cycles'a yüklenmiştir.

3.5 APETALA1 ve APETALA2 Gen İfadelerinin Belirlenmesi

3.5.1 cDNA Sentezi

Gen ifade analizlerini belirlemek amacıyla tomurcuk, sepal, petal, stamen, karpel RNA'larından RT-qPCR uygulamaları için optimize edilmiş Thermo Scientific The Maxima® İlk İplik cDNA Sentez kiti kullanılarak ilgili cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kitin sağladığı en büyük avantajlardan biri geniş aralıkta total RNA (1 pg - 5 µg) ile çalışılabilmesidir. Reaksiyonları hazırlarken kullandığımız total RNA miktarları 200 – 1000 ng/µL arasındadır. Kitin sağladığı protokole göre ilgili dokular için sırasıyla 4 µL 5x Reaksiyon karışımı, 2 µL Maxima Enzim karışımı, 1 µg olacak şekilde total RNA ve üzerine yeterli miktarda ddH₂O eklenerek 20 µL hacminde cDNA sentez reaksiyonu kurulmuştur. cDNA sentez reaksiyonu Applied Biosystem ProFlex™ PCR sistemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Her adım 1 döngü olacak şekilde 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 20 dakika ve son olarak 85°C'de 5 dakika ısıtma işlemi yapılarak sentez reaksiyonu tamamlanmıştır ve örnek hemen kullanılmıştır veya kullanılıncaya dek -86°C'de saklanmıştır.

3.5.2 RT-qPCR Analizi

AP1 ve AP2 genlerinin ifadesini belirlemek için tomurcuk, sepal, petal, stamen ve karpel dokularından elde edilen cDNA'lar kullanılmıştır. RT-qPCR uygulamalarında kontrol grubu geni olarak *T. turcica*'dan daha önce klonlanmış ve dizilenmiş olan β -Actin geni kullanılmıştır. β -Actin genine ait primer çiftleri RT-qPCR uygulamalarında kullanılacak şekilde 164 bp ürün veren TtActinF ve TtActinR primer çiftleri kullanılmıştır ve bu primerlerin dimer oluşturmadıkları test edilmiştir. TtActinF gen dizisi 5'-AGCTCAGCTGTTGAGAAGAGC-3' şeklinde TtActinR dizisi ise 5'- ACATCGCACTTCATGATCGAG-3' şeklinde tasarlanmıştır. Çalışmada kullanılacak olan AP1 genine ait primer çiftleri ise Çizelge 3.1'de gösterilmiş olan ve 127 bp uzunluğunda ürün veren 3AP1F2 ile 5AP1R2 primerleridir. AP2 genine ait primer çiftleride Çizelge 3.2'de gösterilmiş olan 142 bp uzunluğunda ürün veren 3AP2F2 ile 5AP2R2 primer çiftleridir. Kullanılan bu dört primerin de yine dimer oluşturmadıkları

hem tasarım aşamasında hem de ön deneme aşamasında test edilmiştir. İlgili genlerin çeşitli dokulardaki ifadesini belirlemek için BIO-RAD CFX96™ Real Time PCR cihazı kullanılmıştır. Bu cihazın çalışmalar sırasında bize sağladığı en büyük avantajları cihaz ile birlikte temin edilen Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software bilgisayar paket programı sayesinde erime eğrisi analizi yapabilmek ve grafiğini ortaya koyması, ilgili genlerin çalışılan dokulardaki ifadelerini gösteren bar grafiğini vermesi ve son olarak da primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye de olanak sağlamasıdır. Çalışma Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı (2X) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR Reaksiyon Kurulumu:

Maxima SYBR Green Karışımı	12,5 µL
Forward Primer (0,3 µM)	0,75 µL
Reverse Primer (0,3 µM)	0,75 µL
Kalıp DNA ≤500 ng	2,0 µL
ddH ₂ O	9,0 µL

Toplam Hacim: 25 µL

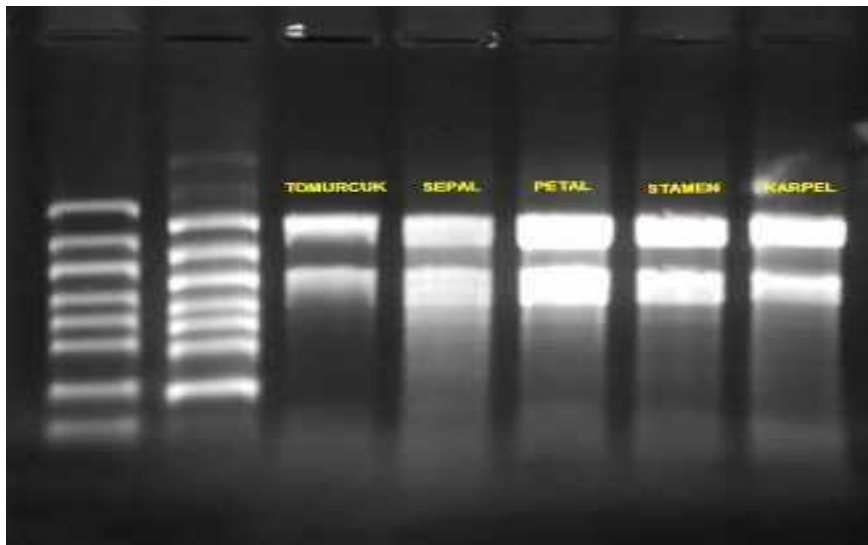
25 µl hacimli RT-PCR reaksiyonu BIO-RAD CFX96™ Real Time PCR cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95°C'de 10 dakika	} 40 Döngü
95°C'de 15 saniye	
60°C'de 30 saniye	
72°C'de 30 saniye	
95°C'de 10 saniye	

Son adımda ise erime sıcaklığı (melting curve) belirlemek için 65°C'den 95°C'ye 5 saniyede 0,5°C'ye çıkacak şekilde uygulanarak reaksiyon tamamlanmıştır.

4. BULGULAR

Bu araştırmada, çalışmamızın bir önceki basamağını oluşturan Türkiye endemiği (Afyonkarahisar) *Thermopsis turcica*'da çiçeklenme genlerinin kısmi sekanslanması ve karakterizasyonundan yola çıkararak çiçeklenmede sepal ve petal oluşumunda görev alan *APETALA1 (API)* ve *APETALA2 (AP2)* genlerinin cDNA uçlarının hızlı oğaltımı (RACE) ve RT-qPCR aracılığıyla genlerin *Thermopsis turcica*'dan alınan tomurcuk, sepal, petal, stamen ve karpel dokularındaki ifade seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak kısmi sekanslama sonucu elde edilen dizilerden gerekli analizler yapılarak *API* ve *AP2* genleri için izelge 3.1 ve izelge 3.2'de verilen gene özgü primer sentezi yapılmıştır. RACE analizleri sonucu elde edilen sekans analizlerinde *TtAPI* geninin tam cDNA uzunluğunun 1324 nükleotid, protein kod bölgesinin 714 nükleotid ve proteininin 238 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir. *TtAP2* geninin de RACE analizleri sonucunda tam cDNA uzunluğunun 2308 nükleotid, protein kod bölgesinin 1638 nükleotid ve proteininin 545 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir. Tomurcuk, sepal, petal, stamen, karpel dokuları kullanılarak yapılan RT-qPCR analizleri sonucunda *TtAPI* ve *TtAP2* genlerinin en fazla sepal en az stamende ifade olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın temelini oluşturan tomucuk ve diğer iek dokularının RNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen total RNA'larının formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüleri Resim 4.1'de gösterilmektedir.

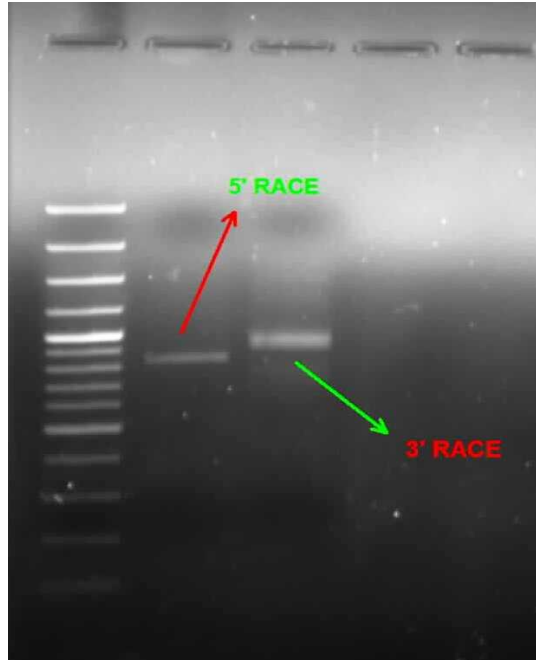


Resim 4.1 Formaldehit agaroz jel elektroforezi sonrası dokuların jel görüntüleri.

4.1 *APETALAI* Moleküler Karakterizasyonu ve İfade Analizi

4.1.1 *APETALAI* cDNA'sının 5' ve 3' Uçlarının Hızlı Çoğaltımı

5'- ve 3'- RACE çalışmalarında öncelikli olarak kısmi sekanslamalardan elde edilen dizilerden *API*- benzeri gene özgü primer çiftleri tasarlanmıştır (Çizelge 3.1). 5'- ve 3'- RACE çalışmalarında öncelikli olarak ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve sonrasında bu cDNA'lar kullanılarak cDNA uçlarının hızlı çoğaltım işlemi thermal cycler'da yapılmıştır. Çalışmalarda öncelikli olarak UPM ile dış primer çiftleri kullanılmıştır ve yapılan çalışmalar sonrası jel analizlerinden iç primer çiftlerinin kullanılmasına gerek olmadığı karar verilmiştir. Resim 4.1 *API*- benzeri gene ait 5'- 3'- RACE PCR ürünlerinin agaroz jeldeki boyutlarını vermektedir. 5'- ve 3' RACE analizleri için ikişer PCR ürünü sekanslanmıştır. Elde edilen dizilerin doğruluğu (İnt. Kyn. 4) internet sitesinden karşılaştırılarak kanıtlanmıştır ve sonrasında 5'- ve 3'- dizileri birleştirilerek *T.turcica APETALAI (TtAPI)* genine ait tam uzunlukta cDNA dizisi elde edilmiştir.



Resim 4.2 *T.turcica API*- RACE ürünlerinin jel görüntüsü.

5'- ve 3'- RACE ürünlerinin dizi analizleri aşağıda verilmiştir.

>5'- AP1A

CTTTTTCTTGATCTTTTTTGCGAGCATGTTATTCTGCTCTTGTATCACTTTCTC
CTTTTTATGAAGCTCAGAAATGGACTCGTACATGAGTTGGTTTCTGCGTGTA
CGAATGGTTTTGAGAGCAGTATCTAACTGCTGTTCCAGACTTTGAAGCTCTT
TGAGGCTCATTGAACCCAAATCTGCTCCCATGTAATGCCTGTGGTTTCTCTC
CAAAGGTCAATCCTTGCCCTGAGTCTAGTATATTCAACGGTCCAATTTCCC
TGTGTCTCAGAATCATTGCTCCATCTGTCTCTCTGCATAGGCATACCTTTC
ATGGCGTTCCAGTATCTTCTCCATGCATGAATCAGTGGCATATTCAAAGAGC
TTTCCTTTGTTGGAGAAGACAATCAACGCGACTTCAGCATCGCAGAGCACA
GAGATCTCGTGTGCTTTCTTAAGCAACCCAGCTCTCCTTTTGGAGAAAGTTA
CCTGGCGATTGATCTTGTCTCTATCCTCTTCAGCTGTACCCTACCCCTTCCC
ATCTTATTATAATAGTTTGTATTATACCTAACAACTTACCCAATTAGTTCTT
CTTCCCTTTTTTACCAAAGGAAAATCCCAAACATGGAAAAGGAAACAAACC
CCAGAAATATGCTTTAAAGGCTGGCTAATATAGCGAAACGAGCGTGAGAAA
GTGTGTTTCATGGGTCTTTCTTCTTCTGGACAGGTATGGAGCTGTGTGATGAG
AAAGCACTGTGAGTGTAACCATCCCCTTTGCCTTTGGACCCACACCCCGCC
CCGGCCCAAGGGGGAGGAGAAAAAAATGCTTTTTTTTTTGTCTTCTATGA

>5' - AP1B

CTTTTCTTGACTTTTTTGGCGAGCATGTTATTCTGCTCTTGTATCACTTTCTCCT
TTTTATGAAGCTCAGAAATGGACTCGTACATGAGTTGGTTTCTGCGTGTACG
AATGGTTTTGAGAGCAGTATCTAACTGCTGTTCCAGACTTTGAAGCTCTTTG
AGGCTCATTGAACCCAAATCTGCTCCCATGTAATGCCTGTGGTTTTCTCTCCA
AAAGGTCAATCCTTGCCTTGAGTCTAGTATATTCAACGGTCCAATTTCCCTG
TGTCTCAGAATCATTTGCCTCCATCTGTCTCTCTGCATAGGCATACCTTTCAT
GGCGTTCCAGTATCTTCTCCATGCATGAATCAGTGGCATATTCAAAGAGCTT
TCCTTTGTTGGAGAAGACAATCAACGCGACTTCAGCATCGCAGAGCACAGA
GATCTCGTGTGCTTTCTTAAGCAACCCAGCTCTCCTTTTGGAGAAAGTTACC
TGGCGATTGATCTTGTTCTCTATCCTCTTCAGCTGTACCCTACCCCTTCCCAT
CTTATTATAATAGTTTGTTATTATACCTAACAACCTTACCCAATTAGTTCTTCT
TCCCTTTTTTACCAAAGGAAAATCCCAAACATGGAAAAGGAAACAAACCCC
AGAAATATGCTTTAAAGGCTGGCTAATATAGCGAAACGAGCGTGAGAAAGT
GTGTTTCATGGGTCTTTCTTCTTCTGGACAGGTATGGAGCTGTGTGATGAGAA
AGCACTGTGAGTGTAAGCATGCACATGGGCCTCGATACTGATGCCTTGTGCT
TGCCCTAGACGGAGTAGATATAAGACCCCCCTCTCACCGATTGGATTATAA
GAAGACTATGCTACTTCGTATTGGTATATTTTTATGTCATCATTGACATCGA
ATGTGATAGACTAATGCTTCTGCTGTCGCGATGGGATGGTCAAGGACAACC
CATTCCCGGGCTATCTCAAGTCTATGTGTCCAGGCACCAGCTCGATCCAGCC
GAGCAGTGCTTTGCTTTACTGCAAACGAATCTAGGATTGCAAATAAAGTCG
AGTACATGTATCTGGAAACTAAGTATTCTCGCATCATGGTATGATAAAAATC
AACGTGAGCGAGTCCTATTTTACGAGTTAGACGTAGTTGCATAATTTACCGT
TTCTTGTGATTTAGCGATGAGATCTGCCATAGCTCACCGATAACAGATAGCT
CGCTATTCTAGGACCTCTCTTTGGCAAAGCGTCAGGCAAAAGTTCTTGCAAT
CTCGATAGGTGAAGC

> 3'AP1A

CTTCCACAACGGAAGCTCTCTTGATATGCCACTGATTCATGCATGTGAGAAG
ATACTGTGAACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAGGC
AAATGATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGACTCAA
GGCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACATGGGAGCAGA
TTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTGGAACAGCAGTTAGA
TACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAACCAACTCATGTACGAGTCC
ATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAGTGATACAAGAGCAGAATAACATG
CTCGCAAAAAGATCAAGGAGAGAGAGAAGGTTGCAGCACAGCAGGCTGC
ACAATGGGATCAATCAAACACTACAGAGTTGATACATCTTACTTAATACAGCA
GCCCCTTTTGGAGATGGGTGGTAATTATCGTCAGGAAGCACCAGCAGTAGG
GAGGAATGAGCTTGACCTCACCTGGAACCATTATATACCTGCCACCTTGA
TGCTTTTGAAAACCTTGTTTTCTTTGATCAGGTGGATGATTTTATAATATAACT
TCAGGCATATGAACTAGTATATGTCGTCGTGTTTGAGGGCTTTATATATGGC
TCTATGTTATATGGTTTTTCTACTTTTTAAGACATTAATTAATTTGAAGTGT
GTTTGTTGTAATCATCTTGAATTCGAACTCAGATTGTATTTTTATGAATCCCT
CAAACCTATTACGCTGTGTTTTCAAAGTGTTTGCAAAAATGAATTTTAATAA
ACTAAGTTTTTGTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAT
TATGAATTTTTTTATTTAATATTTATTTATTTAATTTTAAAATAAT

> 3AP1B

CGTCCACCCACGGTAAGCTCTTATGATATGCCATCTGATTCATGCATGGAGA
AGATACTGTGAACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAG
GCAAATGATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGACTC
AAGGCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACATGGGAGCA
GATTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTGGAACAGCAGTTA
GATACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAACCAACTCATGTACGAG
TCCATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAGTGATACAAGAGCAGAATAAC
ATGCTCGCAAAAAAGATCAAGGAGAGAGAGAAGGTTGCAGCACAGCAGGC
TGCACAATGGGATCAATCAAACACTACAGAGTTGATACATCTTACTTAATACA
GCAGCCCCTTTTGGAGATGGGTGGTAATTATCGTCAGGAAGCACCAGCAGT
AGGGAGGAATGAGCTTGACCTCACCTGGAACCATTATATACCTGCCACCTT
GGATGCTTTTGAAAACCTTGTTTTCTTTGATCAGGTGGATGATTTTATAATATA
ACTTCAGGCATATGAACTAGTATATGTCGTCGTGTTTGAGGGCTTTATATAT
GGCTCTATGTTATATGGTTTTTCCTACTTTTTAAGACATTAATTAATTTGAAG
TGTGTTTGTTGTAATCATCTTGAATTCGAACTCAGATTGTATTTTTATGAATC
CCTCAAACCTTATTACGCTGTGTTTCAAAGTGTTTGCAAGAATGAGTTTTAA
TAAACTAAGTTTTTTGTAATAAAAGAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAATAGATTTTTTATATTTATTTTGTAAATAATTGGTTTATTTTTTTTTTTATA
ATTTAATTTTATAAATAATAATTTAATAAATAT

Elde edilen tüm diziler daha önceden dizilenmesi yapılmış farklı türlere ait bilinen diziler ile karşılaştırılarak CLUSTALW programı ile birleştirilmiş (İnt. Kyn. 1), doğruluğu kontrol edilmiş ve *API* geninin tüm cDNA sekansı elde edilmiştir. Buna göre *Thermopsis turcica*'da *API* genini kodlayan dizi aşağıda verilmiştir. Nükleotid dizisinde koyu taralı ATG başlama, TAG ise dur kodonudur ve AATAAA poliadenilasyon sinyalini göstermektedir. Aşağıdaki dizide altı çizili bölge dejenere primerle elde edilmiş diziyi, bu bölgenin üst kısmı ise 5'-RACE ile elde edilmiş diziyi ve poly(A) kuyruğunu da içine alan bölge 3'-RACE analizleri ile elde edilmiş diziyi göstermektedir. Bu diziden üretilen 238 amino asitlik dizisi de aşağıda verilmiştir. *T. turcica*'dan elde edilen *API* homologunun tam uzunluk cDNA'sı 1074 bç olarak belirlenmiştir. Bu dizide 57 bç 5'-UTR (translasyona uğramayan bölge), 714 bç protein kodlama bölgesi, 270 bç 3'-UTR ve 33 bç poli(A) kuyruğundan oluşmuştur. *TtAPI*'in kodlama dizisinden çıkarılmış protein 238 amino asitten meydana gelmektedir ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

TtAPI proteini 238 amino asitten oluşmaktadır. NCBI'da yapılan BLASTp analizi sonucunda (İnt. Kyn. 2) ilgili protein dizisinin MADS transkripsiyon faktörü gen ailesinin bir üyesi olduğunu göstermiştir. Protein dizisinin N-terminal ucunda 59 aa. (2. - 60. aa) MADS domeni, 14 aa (61. - 74. aa.) I domeni bulunmaktadır. I domenini takiben 100 amino asitten oluşan (75. - 174. aa.) K domeni ve proteinin C-terminal ucunda 63 amino asitten oluşan (175. - 238. aa.) C domeni mevcuttur. Bu transkripsiyon faktörü tarafından kodlanan *MADS/API* proteinleri çiçek organı meristem kimlik geni ve sepal, petal gibi çiçek organlarının oluşumunu sağlayan proteindir. ExPASy ProtParam aracı (İnt. Kyn. 3) kullanılarak elde edilen protein dizisi üzerine bazı teorik yorumlar yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz *TtAPI* proteini moleküler ağırlığı (MW) 27655.5 kDA'dur. Dizide bulunan asidik amino asit sayısı 33, bazik amino asit sayısı ise 38 olarak belirlenmiştir. Protein dolayısı ile hafif bazik özellik göstermektedir. Proteinin teorik izoelektrik noktası (PI) 8,93 olarak belirlenmiştir. Hesaplanmış ortalama yarı ömrü 30 saat civarındadır.

714 nucleotides, 238 amino acids, structure: [sequence](#)

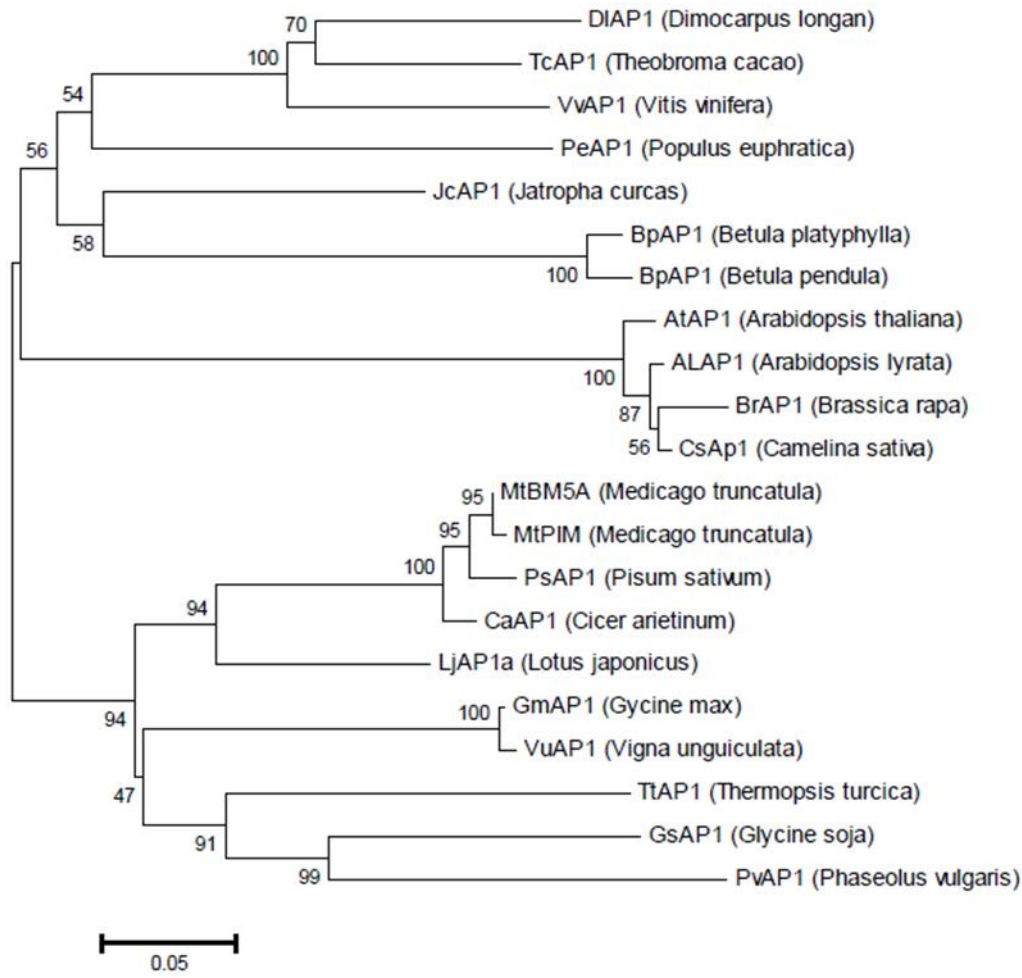
```

1 ATGGGAAGGGGTAGG GTGCAGCTGAAGAGG ATAGAGAACAAGATC AATCGCCAGGTAAC TTCTCCAAAAGGAGA
1 M G R G R V Q L K R I E N K I N R Q V T F S K R R
76 GCTGGGTTGCTTAAG AAAGCACACGAGATC TCTGTGCTCTGCGAT GCTGAAGTCGCGTTG ATTGTCTTCTCCAAC
26 A G L L K K A H E I S V L C D A E V A L I V F S N
151 AAAGGAAAGCTCTT GAATATGCCACTGAT TCATGCATGGAGAAG ATACTGGAACGCCAT GAAAGGTATGCCTAT
51 K G K L F E Y A T D S C M E K I L E R H E R Y A Y
226 GCAGAGAGACAGATG GAGGCAAATGATTCT GAGACACAGGGAAAT TGGACCGTTGAATAT ACTAGACTCAAGGCA
76 A E R Q M E A N D S E T Q G N W T V E Y T R L K A
301 AGGATTGACCTTTTG GAGAGAAACCACAGG CATTACATGGGAGCA GATTTGGGTTCAATG AGCCTCAAAGAGCTT
101 R I D L L E R N H R H Y M G A D L G S M S L K E L
376 CAAAGTCTGGAACAG CAGTTAGATACTGCT CTCAAAACCATTTCGT ACACGCAGAAACCAA CTCATGTACGAGTCC
126 Q S L E Q Q L D T A L K T I R T R R N Q L M Y E S
451 ATTTCTGAGCTTCAT AAAAAGGAGAAAGTG ATACAAGAGCAGAAT AACATGCTCGCAAAA AAGATCAAGGAGAGA
151 I S E L H K K E K V I Q E Q N N M L A K K I K E R
526 GAGAAGGTTGCAGCA CAGCAGGCTGCACAA TGGGATCAATCAAAC TACAGAGTTGATACA TCTTACTTAATACAG
176 E K V A A Q Q A A Q W D Q S N Y R V D T S Y L I Q
601 CAGCCCTTTTGGAG ATGGGTGGTAATTAT CGTCAGGAAGCACCA GCAGTAGGGAGGAAT GAGCTTGACCTCACC
201 Q P L L E M G G N Y R Q E A P A V G R N E L D L T
676 CTGGAACCATTATAT ACCTGCCACCTTGGG TGCTTTTGA
226 L E P L Y T C H L G C F *
```

Şekil 4.1 *TtAPI* genine ait açık okuma çerçevesi, nükleotid ve aminoasit sekansları

4.1.2 Filogenetik İlişki

TtAPI proteinine ait dizinin NCBI gen bankasına daha önceden girilmiş dizlerle hizalama ve filogenetik ilişki kurmak için MEGA6 paket programı kullanılmıştır. Elde edilen dizinin birçok bitkiye ait *TtAPI* geni ile büyük benzerlik içinde olduğu belirlenmiştir. Gen bankasında bulunan yaklaşık 100 farklı *APETALAI* benzeri gen ile %67-88 arası benzerlik oranı tespit edilmiştir. MEGA6 paket programı ile yapılan filogenetik ilişki Şekil 4.2’de ve bununla ilişkili olarak benzerlik oranlarının yer aldığı veriler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Analizde bu çalışmada belirlenmiş diziye en yüksek oranda benzerliğe sahip 20 farklı bitki türüne ait *TtAPI* benzeri gen protein dizisi ile karşılaştırma yapılmıştır. 10000 bootstrap ile yapılan *Neighbor-Joining* metoduna göre 21 farklı dizi iki ana kümede gruplanmıştır. Birinci kümede kendi içinde dört alt kümeye ayrılmıştır. 1. alt kümede, longan (*Dimocarpus longan*), kakao (*Theobroma cacao*), üzüm (*Vitis vinifera*) ve kavak (*Populus euphratica*) türlerine ait *API* proteinleri yer almıştır. İkinci alt grupta ise hint fıstığı olarak bilinen bir ağaç türü (*Jatropha curcas*) tek başına küme oluşturmuştur. Üçüncü alt kümede ise Adi Huş Ağacı (*Betula pendula*) ve beyaz huş ağacı (*Betula platyphylla*) olarak bilinen iki bitkiye ait *API* proteini bulunmaktadır. 1. kümenin dördüncü alt grubunda ise Brassica ailesine ait yem şalgamı (*Brassica rapa*), keten (*Camelina sativa*), *Arabidopsis lyrata* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerine ait *API* proteinleri yer almıştır. İkinci ana kümede ise tüm *T. turcica* ile birlikte legüm bitkileri yer almıştır. Bunlar ise nohut (*Cicer arietinum*), soya fasulyesi (*Gycine max*), yabani soya fasulyesi (*Glycine soja*), lotus (*Lotus japonicus*), yonca, (*Medicago truncatula*) bezelye, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) ve börülce (*Vigna unguiculata*) olarak belirlenmiştir.



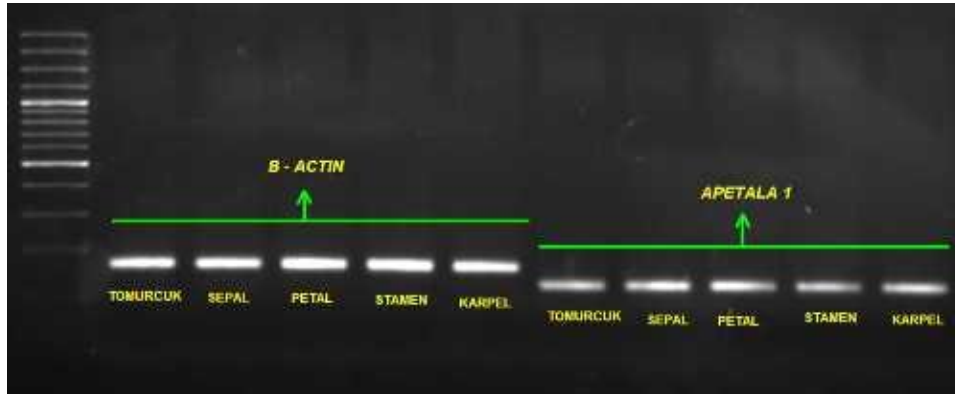
Şekil 4.2 *T. turcica* APETALA1 (TtAP1) protein dizisinin filogenetik ilişkisi. MEGA6 programı ile oluşturulmuş olan filogenetik ağaçta sıralanmış türlerin GenBank (İnt. Kyn. 4)'de yer alan protein kodları alfabetik olarak verilmiştir : *Arabidopsis lyrata* AP1 (AAM28462.1); *Arabidopsis thaliana* AP1 (NP_177074.1); *Betula pendula* AP1 (CAA67967.1); *Betula platyphylla* AP1 (AFV92462.1); *Brassica rapa* AP1 (XP_009105460.1); *Camelina sativa* AP1 (XP_010511937.1); *Cicer arietinum* AP1(XP_004509754.1); *Dimocarpus longan* AP1 (AEZ63951.1); *Glycine max* AP1(XP_003547792.1); *Glycine soja* AP1(KHN29957.1); *Jatropha curcas* AP1 (KDP41335.1); *Lotus japonicus* AP1a (AAX13296.1); *Medicago truncatula* BM5A (XP_003628742.1); *Medicago truncatula* PIM (AAZ67068.1); *Phaseolus vulgaris* AP1 (XP_007153481.1); *Pisum sativum* MADS4(AAL66379.1); *Populus euphratica* AP1 (XP_011018990.1); *Theobroma cacao* AP1 (XP_007045796.1); *Vigna unguiculata* AP1(BAJ22385.1); *Vitis vinifera* AP1 (AAT07447.1).

Çizelge 4.1 *T.turcica* AP1 proteini ile 20 AP1 benzeri proteinin benzerlikleri ve protein/gen kodları. Mevcut analiz BLASTp analiz sonucunda elde edilmiştir (İnt. Kyn. 4).

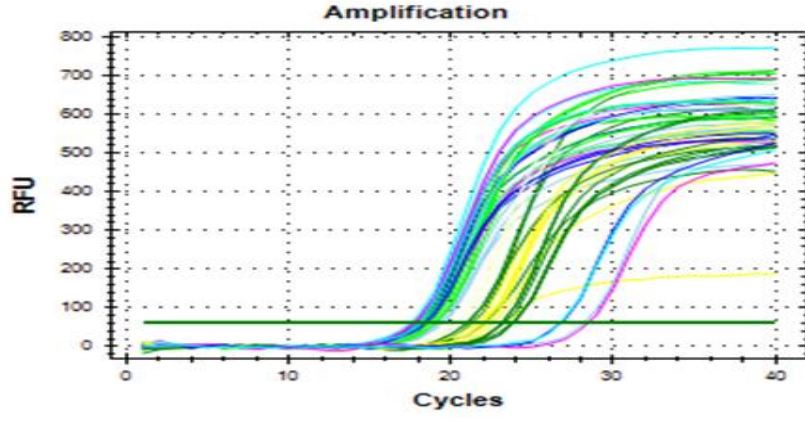
No	Tür Adı	Protein Adı	Maks. Puan	Toplam Puan	TtAP1'yi kapsamı	E değeri	Benzerlik	Protein Kodu	Gen Kodu
1	<i>Vigna unguiculata</i>	APETALA1	434	434	%100	7e-152	%88	BAJ22385.1	AB588744.1
2	<i>Glycine max</i>	APETALA 1-like	432	432	%100	3e-151	%88	XP_003547792.1	XM_003547744.2
3	<i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AP1a	402	402	%100	4e-139	%87	AAX13296.1	AY770395.1
4	<i>Medicago truncatula</i>	MADS-box protein BM5A	401	401	%100	8e-139	%86	XP_003628742.1	XM_003628694.1
5	<i>Cicer arietinum</i>	APETALA 1-like	400	400	%100	2e-138	%86	XP_004509754.1	XM_004509697.1
6	<i>Medicago truncatula</i>	MADS box protein PIM	399	399	%100	6e-138	%85	AAZ67068.1	DQ139345.1
7	<i>Pisum sativum</i>	MADS4	395	395	%100	2e-136	%85	AAL66379.1	AF461740.1
8	<i>Glycine soja</i>	APETALA 1	384	384	%100	4e-132	%81	KHN29957.1	KN652024.1
9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHAVU_003G039200g	386	386	%100	7e-133	%78	XP_007153481.1	XM_007153419.1
10	<i>Jatropha curcas</i>	JCGZ_15742	361	361	%100	6e-123	%75	KDP41335.1	KK914318.1
11	<i>Betula platyphylla</i>	Mads-box protein	363	363	%100	5e-124	%73	AFV92462.1	JX565468.1
12	<i>Betula pendula</i>	MADS3 protein	361	361	%100	5e-123	%73	CAA67967.1	X99653.1
13	<i>Vitis vinifera</i>	AP1-like protein	363	363	%100	1e-123	%73	AAT07447.1	AY538746.1
14	<i>Theobroma cacao</i>	K-box region and MADS-box transcription factor family protein	361	361	%100	5e-123	%73	XP_007045796.1	XM_007045734.1
15	<i>Dimocarpus longan</i>	APETALA 1-1	348	348	%100	1e-117	%73	AEZ63951.1	JN609254.1
16	<i>Populus euphratica</i>	CAULIFLOWER A-like	345	345	%100	1e-116	%70	XP_011018990.1	XM_011020688.1
17	<i>Arabidopsis lyrata</i>	apetala 1, partial	340	340	%98	9e-115	%68	AAM28462.1	AF466786.1
18	<i>Camelina sativa</i>	APETALA 1	347	347	%100	3e-117	%68	XP_010511937.1	XM_010513635.1
19	<i>Brassica rapa</i>	APETALA 1	346	346	%100	9e-117	%67	XP_009105460.1	XM_009107212.1
20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	APETALA 1	330	330	%100	1e-110	%67	NP_177074.1	NM_105581.2

4.1.3 *T. turcica*'nın Farklı Dokularında *TtAPI* Geni İfadesi

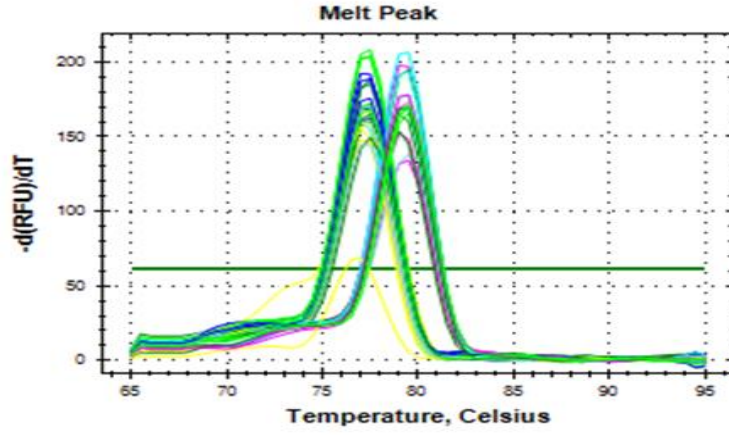
TtAPI geninin fonksiyonel rolü hakkında bilgi edinebilmek için *TtAPI* cDNA'sının göreceli seviyesi *T. turcica* çiçek tomurcuğu, sepal, petal, stamen ve karpel organlarında gerçek zamanlı PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Kurulan reaksiyon sonucu cDNA ile hazırlanan kontrol geni β -Actin ve hedef gen *TtAPI*'in amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Reaksiyonun doğruluğunu gözlemek amacıyla öncelikle kontrol gen, hedef genin agaroz jel elektroforez görüntüleri ile kontrol geni ve hedef genin beklenen uzunlukta ürün verdiği tespit edilmiştir (Resim 4.3). Sonrasında ise reaksiyon sonucunda oluşan ve sistemin otomatik olarak verdiği erime eğrisi grafiğinde kontrol geni ile hedef genlerin kendi içlerinde aynı T_m derecesinde tepe noktası vermesi ile reaksiyonun doğruluğu tespit edilmiştir (Resim 4.4). Son olarak *TtAPI* geninin 5 farklı çiçek organındaki ifadesi tespit edilmiştir ve en fazla ifadesi sepal organında, en az ifadesi ise stamen organında tespit edilmiştir (Resim 4.5).



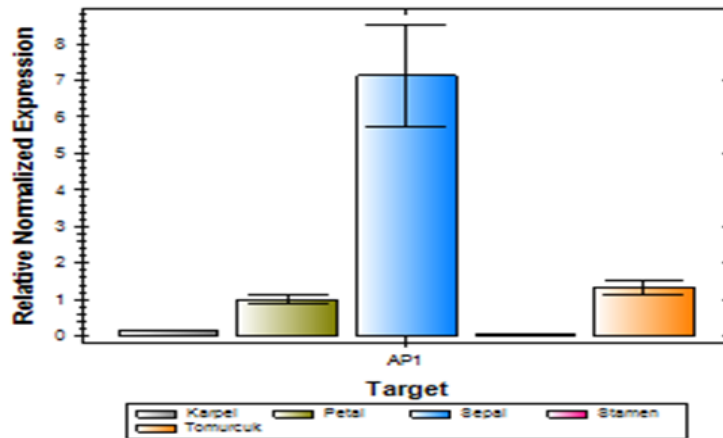
Resim 4.3 β -Actin ve *TtAPI* geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.3 β -Actin ve TtAPI genleri için gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.4 β -Actin ve TtAPI genlerinin standart erime eğrisi grafiği

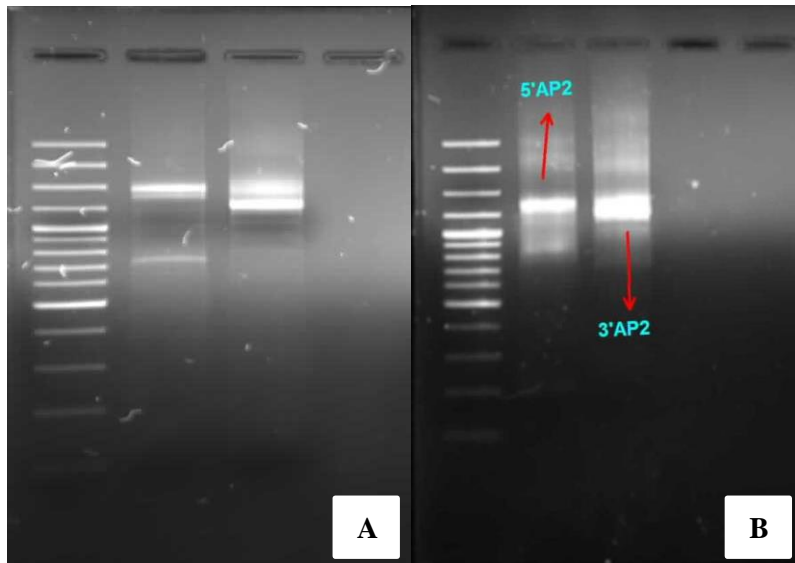


Şekil 4.5 TtAPI geninin karpel, petal, sepal, stamen ve tomurcuk dokularında ifade seviyesini gösteren bar grafiği

4.2 APETALA2 Moleküler Karakterizasyonu ve İfade Analizi

4.2.1 APETALA2 cDNA'sının 5' ve 3' Uçlarının Hızlı Çoğaltımı (5'-3'- RACE)

5'- ve 3'- RACE çalışmalarında öncelikli olarak kısmi sekanslamalardan elde edilen dizilerden AP2- benzeri gene özgü primer çiftleri tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). 5'- ve 3'- RACE çalışmalarında öncelikli olarak ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve sonrasında bu cDNA'lar kullanılarak cDNA uçlarının hızlı çoğaltım işlemi thermal cycler'da yapılmıştır. Çalışmalarda öncelikli olarak UPM ile dış primer çiftleri kullanılmıştır ve yapılan çalışmalar sonrası jel analizlerinden ekstra bant oluşumu gözlenmiştir. Bunun üzerine dış primer ile çoğaltım yapılan PCR ürünlerinden UPM primer ile iç primer çiftlerinden nested PCR uygulamasının yapılmasına karar verilmiştir. Yapılan nested PCR sonucunda PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve hedeflenen tek bantlar elde edilmiştir. Resim 4.3 AP2- benzeri gene ait 5'- 3'- RACE PCR ürünlerinin agaroz jeldeki boyutlarını vermektedir. 5'- ve 3' RACE analizleri için ikişer PCR ürünü sekanslanmıştır. Elde edilen dizilerin doğruluğu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> internet sitesinden karşılaştırılarak doğruluğu kanıtlanmıştır ve sonrasında 5'- ve 3'- dizileri birleştirilerek *T.turcica* APETALA2 (*TtAP2*) genine ait tam uzunlukta cDNA dizisi elde edilmiştir.



Resim 4.4 (A) UPM ve dış primer çiftleri ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü. (B) İç primer çiftleriyle yapılan nested PCR sonucu PCR ürünlerinin jel görüntüsü

5'- ve 3'- RACE ürünlerinin dizi analizleri aşağıda verilmiştir.

> 5'- AP2A

CGAAAAAGGTAGCTGATGAAGTATTCAGCAGAGTGGTGTCTTTTCAACACT
TCATATGGATGGAGATGATGATGACAACAATGGAAGAAAAAGTAGGATCTT
CTGTCAACTACAAGTTGTTCTGCAGCGGTGGTCGAAGACGGATCAGCAGAA
GAAGAAGAAAACAGAACCATAAAGAAACGAAGTAGCAAGATTTTTGGGTT
CTCTGTTACTCATGAAAATGATGAGTCCATGGATAGTGAAATCCCACAACA
AATTTTGTCTCGGCAGTTTTTTCCGGTGGAGGAGAGTGATATCGCCGCCGCA
TCAAGTGGTGGTGGTGGTGGTAGTTCAGCTTTCCTCGTGTTCAATTGGGTTG
GTGCGAAATTTTGTCAATCAGAAAATCTCGGTACTGGAAAATCAGTGGAAG
TTTCACAACCCATGAAGAAGAGTAGTAGAGGACCAAGGTCAAGGAGTTCAC
AATATAGAGGTGTCACTTTTTACAGAAGAACTGGTCGATGGGAATCTCATAT
ATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACAGCACATGC
AGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAGGAATAGAAGC
AGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGACTTGAAGCAAATGAG
CAATGTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTACTTCCCCGGCAAAGCGCTGG
ATTTCCCAGCGGAAGCTCCAAATATAGAGGGTGTAACATTGCACGGAGTGT
GGAAGATGGGCAAGCTCGAATGGGCCAAGCCTAGGAAAAGAGAGTGGCGC
TAATAGCGCGTGGCTGACACTCAGACGAACCCC

> 5'- AP2B

TTGTTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGGCCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTA
GTAAATGGTGGTGTTCGTATAAAAAAGATGTATTATTTATAATAATAGTTAGT
TGAGAAGATAATAATATTCATCTTTGTGCATAATAATGTGGGATGTCAATGA
CTCACCCGATCAGCGGAAAAAAGATGGTGAGGAATATTCAGAAGGGTGTG
TTCTTTCCTCACGTCAACGGATGGAGATGATGATGACAATAAAGGAGAAAA
AGAAGGATGTGTTTCTAACTCAAGTTGTTCTTCAGCAGTAATAGTAGACGGA
TCAGAAGAAGAAGAAGAAAACAGAACCATAAAGAAACGAAGTAGCAAGAT
TTTTGGGTTCTCTGTTACTCATGAAAATGATGAGTCCATGGATAGTGAAATC
CCACAACAAATTCTGACTCGGCAGTTTTTTCCGGTGGAGGAGAGTGATATCG
CCGCCGCATCAAGTGGTGGTGGTGGTAGTTCAGCTTTTCCTCGTGCTCA
TTGGGTTGGTGTGAAATTTTGTCAATCAGAAAATCTCGGTACTGGAAAATCA
GTTGAAGTTTCACAACCCATGAAGAAGAGTCGTAGAGGACCAAGGTCAAGG
AGTTCACAATATAGAGGTGTCACTTTTTACAGAAGAAGTGGTCGATGGGAA
TTCATATATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACA
GCACATGCAGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAGGA
ATAGAAGCAGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGACTGAAG
CAAATGAGCAATCTGACTAGAGAACCGA

> 3'- AP2B

ATTGCTGCATCGCTATAGATAGATCGGCGATCTGTTCCGAGGATACAGTCAG
AATACATCTACAACATAGAAGATATGAAGAAGACTTGAAGCATATGAGCAT
CTGACTAAGGAGGAATTTGTGCACGTACTTCGCCGACAAAGCACTGGATTT
CCGAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGGTGTAAC TTTGCACAAATGTGGAAGA
TGGGAAGCTCGAATGGGCCAATTTTTAGGAAAAAAGTACGTTTATCTGGGT
TTGTTTGATACCGAGACTGAAGCTGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGCAATA
AAATGCAATGGCAAAGAGGGCCGTCACCAATTTTGACCCCAGCATCTATGAC
GATCTCCTCTCTGATTCTACAGGTACCAAAAAACGCTGATCATCTCTGCTTG
ATTTATATTGGTTCCTCCAGCTCTACTGTCAATAATCATCCATTGTTGAAGA
ATCACCCCCCTACTGCTGCTCCTGATCAAAATTTGCTATCTGAATCTAATTG
GAGGAATGGGGGAAGCAAGCCTAAGCTGTTGAGCATACTACCAAAACCATG
TAGTAGAAGCAACATGGAAGCATTGTCACATGATGAGAGTGAAAACAGGG
AGATGTTGCGACTGTTACCTACATCCTCCTCACTCTCCAGACTCTAATAGA
TGTAATGCCCTACTATGCTCCTGTCGACTCTCCTATGCTAGCACTCTTTTGCT
TCATCATCTTGCACATCATCATCTTCTCCCACCAGATTTCTATGTTTCGCAGAA
TTGGAAGTGAAGTCTCATATATGCAATGAGATGATCTCATTATATGTGAGC
GATCGACCAACACAGTATATTAGGA

> 3'- AP2B

TTCAGTCGAGGATAGAGCAGATATAACTTCACATAGAAGACTATGAAGAAG
ACTTGAAGCAAATGAGCAATCTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTACTTC
GCCGACAAAGCACTGGATTTCCAAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGGTGTAA
CATTGCACAAGTGTGGAAGATGGGAAGCTCGAATGGGCCAATTTTTAGGAA
AAAAGTACGTTTATCTGGGTTTGTGTTGACACTGAGATTGAAGCAGCAAGGG
CCTATGACAAGGCAGCAATAAAATGCAATGGCAAAGAGGCCGTCACCAATT
TTGATCCAAGCATCTATGATGAACTCAACTCTGAATCTACAGGTACCACAAA
TGCAGATCACAATCTGGATTTAAGTTTAGGCAATTCCAGCTCGAAGCCTGGT
AATAGCCAAGCATTGGGGAATCACACCCCAAATACTTCAACTCATGATCAA
CACATGCTATCTGAATCTAATTGGAGGAGTGGGGGTAGCAAGCCTAAGCTG
GTGAGTATATTACCAAACCATGTAGTAATAGAAACAACACGGAATTAGCA
CATGGTGAGAGTGAAGCCTTGCGGATGCTAAGTCAAACCTCACCTTCATTCTT
CAGTCTCACATGACATACAAAGATATGATGCCCTACAAGGGCTCCTGTAGA
ATCTCACATGCTTGCACAAATTTTGCACATCTTCACTCGCACCAACATTTTC
ATTTTCCCAGCAGCAGCAATGGTAGGCAGAATTGGAAGTGACCTTTCCATTA
TCAATGAATGATCACAACCATGGCATCATGGGCATCCACATTATTTAGCACT
GCTGCAGCATCATCAAGATTCCCACCCA

Elde edilen tüm diziler daha önceden dizilenmesi yapılmış farklı türlere ait bilinen diziler ile karşılaştırılarak (İnt. Kyn. 1) internet sitesine ait CLUSTALW programı ile birleştirilmiş, doğruluğu kontrol edilmiş ve AP2 geninin tüm cDNA sekansı elde edilmiştir. Buna göre *Thermopsis turcica*'da *TtAP2* genini kodlayan dizi aşağıda verilmiştir. Nükleotid dizisinde koyu taralı ATG başlama, TAG ise dur kodonu ve **CATCATCATCAGATT** nükleotid dizisi miRNA172'ye bağlanma bölgesidir. Aşağıdaki dizide altı çizili bölge dejenere primerle elde edilmiş diziyi, bu bölgenin üst kısmı ise 5'-RACE ile elde edilmiş diziyi ve poly(A) kuyruğunu da içine alan bölge 3'-RACE analizleri ile elde edilmiş diziyi göstermektedir. *T. turcica*'dan elde edilen *TtAP2* geninin tam uzunluk cDNA'sı 2308 bç olarak belirlenmiştir. Bu dizide 473 bç 5'-UTR, 1638 bç protein kodlama bölgesi ve 200 bç 3'-UTR bölgesinden oluşmuştur. Bu diziden üretilen 545 amino asitlik dizisi de aşağıda verilmiştir. Tüm çabalarımıza rağmen dizide poliadenilasyon bölgesine ve poly(A) kuyruğuna ulaşamamıştır. *TtAP2* genine ait açık okuma çerçevesi, nükleotid ve aminoasit sekansları toplu olarak Şekil 4.6'de verilmiştir.

> *T. Turcica APETALA2 (AP2)* Full cDNA 2.308 nt ve protein kod bölgesi (cds) 1.638 nt.

```
ACGGAGGCGGCGTCTAGCTATTACATAAATATATTAAGTGTGTGTTATTAG
TGTAAGGTGCGTAGATCATATAAACGTGGGGTGTAGAGGGCGAGGAGAGA
ATACGACGCCACACACACCCTCCCTCTTCTTTCTCTCATGCGGGGGGGG
GATTTTTTCTCATCTACAACACGCAACCACCAATTATACTCTTTTTTTTTT
TTTTTTTTCCCCCCCCCTCTTTTTTTTTCCCCCCCCGAGGGAGAAAAAAA
AGGGACACAGAAAGGCCCCCCCCCCCCCCCTTTTTTTTTTCAAAAAAAA
AACCCCGGGGTTTTTTTTTTTTGTTGGGGGAAAAAAGAACCGGGGGGCC
CCCCTTTTTTTTTTTAGTAAAAAGATCGTGTGGGTAGAAAAAAGATGGTT
TTTTTACAGCAATAGCTGGGGGAGGAAGAAAAAAATCTCATCCTTTGTG
CATAATAATGTGGGATCTCAACGACTCCCCGCTCAGAAAAAAAAAAGTGG
TGAGGAGTTTTCTGAAGGGTGTCTTCTTTCATCACTTCATCGGAGGAGGAT
GATGATAACAACAAGAAAAAAAAGAAGGATTTTTTCTAACACA ACTACT
TCTGCAGCGGTAATAGAAGACGGATCAGAAGAAGAAGAAGAAAACAGAAC
CATAAAGAAACGAAGTAGCAAGATTTTTGGGTTCTCTGTTACTCATGAAAAT
```

GATGAGTCCATGGATAGTGAAATCCCACAACAAATTCTGACTCGGCAGTTTT
TTCCGGTGGAGGAGAGTGATATCGCCGCCGCATCAAGTGGTGGTGGTGGTG
GTAGTTCAGCTTTTCCTCGTGCTCATTGGGTTGGTGTGAAATTTTGTCAATCA
GAAAATCTCGGTACTGGAAAATCAGTTGAAGTTTCACAACCCATGAAGAAG
AGTCGTAGAGGACCAAGGTCAAGGAGTTCACAATATAGAGGTGTCACTTTT
TACAGAAGAACTGGTTCGATGGGAATCTCATATATGGGATTGTGGAAAACAA
GTGTATCTGGGTGGATTTGACACAGCACATGCAGCTGCTCGTGCATATGATA
GAGCGGCTATTAAGTTCCGAGGAATAGAAGCAGATATAAACTTCAACATAG
AAGACTATGAAGAAGACTTGAAGCAAATGAGCAATCTGACTAAGGAAGAA
TTTGTGCACGTACTTCGCCGACAAAGCACTGGATTTCCAAGAGGAAGCTCC
AAATATAGAGGTGTAACATTGCACAAGTGTGGAAGATGGGAAGCTCGAATG
GGCAATTTTTAGGAAAAAAGTACGTTTATCTGGGTTTGTTTGACACTGAGA
TTGAAGCAGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGCAATAAAATGCAATGGCAA
GAGGCCGTCACCAATTTTGATCCAAGCATCTATGATGAACTCAACTCTGAAT
CTACAGGTACCACAAATGCAGATCACAATCTGGATTTAAGTTTAGGCAATTC
CAGCTCGAAGCCTGGTAATAGCCAAGCATTGGGGAATCACACCCCAAATAC
TTCAACTCATGATCAACACATGCTATCTGAATCTAATTGGAGGAGTGGGGGT
AGCAAGCCTAAGCTGGTGAGTATATTACCAAACCATGTAGTAATAGAAGC
AACACGGAATTAGCACATGGTGAGAGTGAAGCCTTGCGGATGCTAAGTCAA
ACTCACCTTCATTCTTCAGTCTCAAATGAAATACAAAGATATGGTCCCTACA
GGTCTCCTGGAGAATCTCAAATGCTTCACAATTTTGCACATCTTCACCCACC
ACATTTTCATTTTCCCAGCAGCATCAATGGAGGCAGAATTGGAAGTGACCTT
TCATTATCAATGAATGATCAACAACAATGGAATCATGGCCTCACATTATTTA
GCACTGCTG **CATCATCATCAGATT**CCCACCACAGATCAGATACCCTCTCTC
AAGGTTGGCTGCAGAAGAATGGGTTCCACACTCTCATGAGACCCTCTGGAT
CACTAAACTGTAGCAAATTTTCTGCCTACCGCCTTGTCATCAAATCATCAT
ATCTCCTCATATTTTCTATCTAGCTAGTAAACAAGAAGTATGATGATGCGT **TGA**
CTGATGTACATCGAGTTCGACTGCGACCCTTCTGTCCGATGCCATACAGACA
AAGGGTACCATCGAGTGAAGAAGATAGAAAGATATAATCAATGGATCGGA
TCACCTCCATGCATCGGGTCGAGAGCATCTTAGCGTCAACTTCTACAGTAAG
ACGTACATGACGTTAAGACCGAGTATGCATCGTAGCATGATTG

>*T. turcica*'da **APETALA 2 (AP2)** protein dizisi, 545 amino asit, **2 AP2-domeini**
MWDLNDSPAQKKKSGEEFSEGCSSTFSSSEEDDDNNKEKKEGSFSNTTTSAAVI
EDGSEEEEEENRTIKKRSSKIFGFSVTHEENDESMDSEIPQQILTRQFFPVEESDIAAA
SSGGGGSSAFPRAHWVGVKFCQSENLTGKSVVEVSQPMKKSRRGPRSRSSQY
RGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHHAAARA YDRAAIKFRGIEADIN
FNIEDYEEDLKQMSNLTKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLHKCGRWEAR
MGQFLGKKYVYLGFLDTEIEAARA YDKAAIKCNGKEAVTNFDPSIYDELNSEST
GTTNADHNLDSLGNSSSKPGNSQALGNHTPNTSTHDQHMLSESNWRSGGSKP
KLVSILPKPCSNRSNTELAHGESEALRMLSQTHLHSSVSNEIQRYGPYRSPGESQ
MLHNFAHLHPPHFHFPSSINGGRIGSDLSLSMNDQQQWNHGLTLFSTAASSSDS
HHRSDTLSQGWLQKNGFHTLMRPSGSLNCSKIFCLPPCHQIISPHIFYLASKQEL
MMR

TtAP2 proteini 545 amino asitten oluşmaktadır. NCBI'da yapılan BLASTp analizi sonucunda (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ilgili protein dizisinin AP2/EREBP (ethylene responsive element binding protein) transkripsiyon faktörü gen ailesinin bir üyesi olduğu kanıtlanmıştır. Bu transkripsiyon faktörü tarafından kodlanan AP2 proteinleri çiçek organı meristem kimlik geni ve sepal, petal gibi çiçek organlarının oluşumunu sağlayan proteindir. ExPASy ProtParam internet sayfası uygulama aracı (İnt. Kyn. 3) kullanılarak elde edilen protein dizisi üzerine bazı teorik yorumlar yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz *TtAP2* proteini moleküler ağırlığı (MW) 60744.1 kDA'dur. Dizide bulunan asidik amino asit sayısı 66, bazik amino asit sayısı ise 62 olarak belirlenmiştir. Protein dolayısı ile hafif asidik özellik göstermektedir. Proteinin teorik izoelektrik noktası (PI) 6,67 olarak belirlenmiştir. Hesaplanmış ortalama yarı ömrü 30 saat civarındadır.

1638 nucleotides, 546 amino acids, structure: [sequence](#)

```

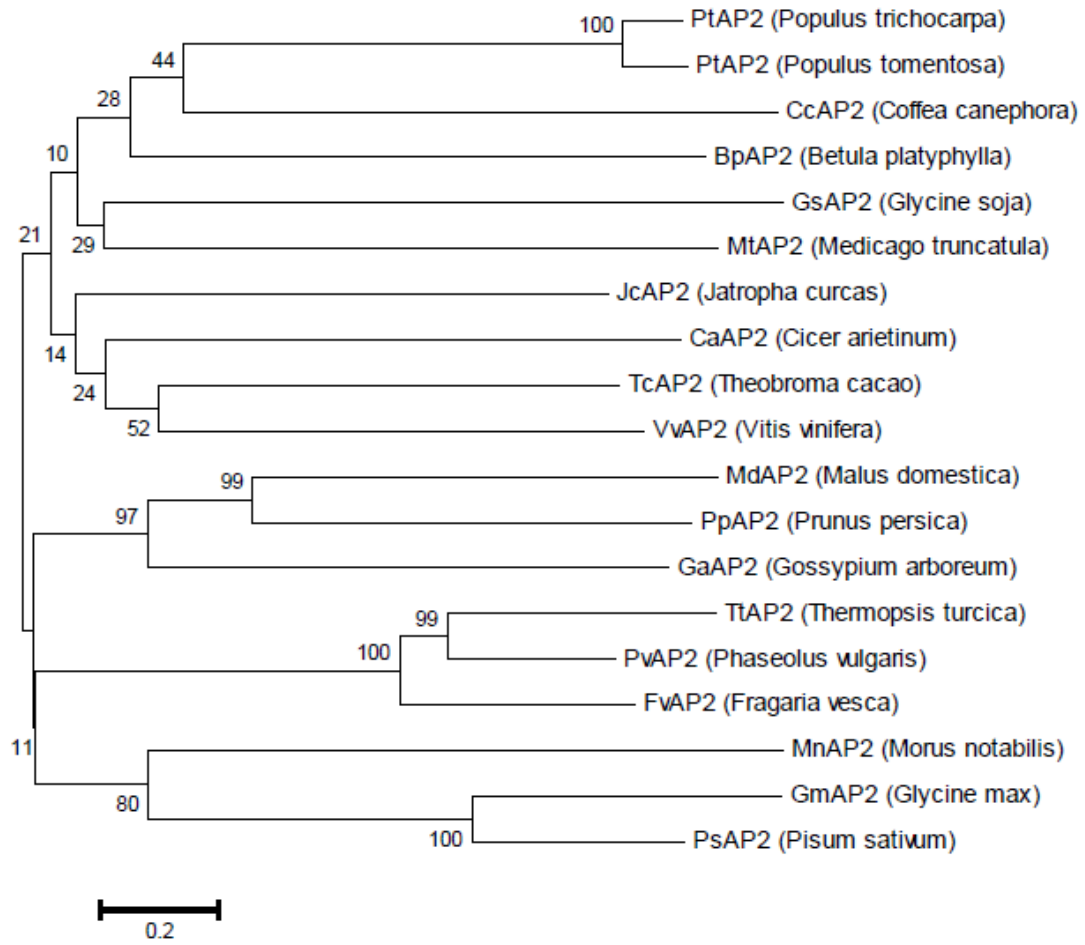
1ATGTGGGATCTCAAC GACTCCCCCGCTCAG AAAAAAAAAAAGTGGT GAGGAGTTTTCTGAA GGGTGTCTCTCTTTCT
1 M W D L N D S P A Q K K K S G E E F S E G C S S F
76ATCACTTCATCGGAG GAGGATGATGATAAC AACAAAGAAAAAAAAA GAAAGATCTTTTTCT AACACAACACTACTCT
26 I T S S E E D D D N N K E K K E G S F S N T T T S
151GCAGCGGTAAATAGAA GACGGATCAGAAAGAA GAAGAAGAAAACAGA ACCATAAAGAAACGA AGTAGCAAGATTTTT
51 A A V I E D G S E E E E E N R T I K K R S S K I F
226GGGTCTCTGTACT CATGAAAATGATGAG TCCATGGATAGTGAA ATCCCAACAACAAATT CTGACTCGGCAGTTT
76 G F S V T H E N D E S H D S E I P Q Q I L T R Q F
301TTCCGGTGGAGGAG AGTGATATCGCCGCC GCATCAAGTGGTGGT GGTGGTGGTAGTTCA GCTTTTCTCTGTGCT
101 F P V E E S D I A A A S S G G G G G S S A F P R A
376CATTGGGTGGTGGT AAATTTTGTCAATCA GAAAAATCTCGGACT GAAAAATCAGTTGAA GTTTCACAACCCATG
126 H W V G V K F C Q S E N L G T G K S V E V S Q P H
451AAGAAGAGTCGTAGA GGACCAAGGTCAAGG AGTTCACAATATAGA GGTGTCACTTTTAC AGAAGAAGTGGTCGA
151 K K S R R G P R S R S S Q Y R G V T F Y R R T G R
526TGGGAATCATATA TGGGATTGTGAAAA CAAGTGTATCTGGGT GATTGACACAGCA CATGCAAGTGTGCT
176 W E S H I W D C G K Q V Y L G G F D T A H A A A R
601GCATATGATAGAGCG GCTATTAAGTCCGA GGAATAGAAGCAGAT ATAAACTTCAACATA GAAGCATGAAAGAA
201 A Y D R A A I K F R G I E A D I N F N I E D Y F E
676GACTTGAAGCAATG AGCAATCTGACTAAG GAAGAATTTGTGCAC GACTTCGCCGACAA AGCACTGGATTTCCA
226 D L K Q H S N L T K E E F V H V L R R Q S T G F P
751AGAGGAACTCCAAA TATAGAGGTGTAACA TTGCACAAGTGTGGA AGATGGGAAGCTCGA ATGGGCCAATTTTTA
251 R G S S K Y R G V T L H K C G R W E A R H G Q F L
826GGAAAAAAGTACGTT TATCTGGTTTGTGTT GACACTGAGATTGAA GCAGCAAGGGCCTAT GACAAGCAGCAATA
276 G K K Y V Y L G L F D T E I E A A R A Y D K A A I
901AAATGCAATGGCAAA GAGGCCGTCAACAA TTTGATCCAAGCATC TATGATGAACCAAC TCTGAATCTACAGGT
301 K C N G K E A V T N F D P S I Y D E L N S E S T G
976ACCACAAATGCAGAT CACAATCTGGATTTA AGTTTAGGCAATTCC AGCTCGAAGCCTGGT AATAGCCAAGCATTG
326 T T N A D H N L D L S L G N S S S K P G N S Q A L
1051GGGAATCACACCCCA AATACTTCAACTCAT GATCAACACATGCTA TCTGAATCTAATTGG AGGAGTGGGGTATGC
351 G N H T P N T S T H D Q H H L S E S N W R S G G S
1126AAGCCTAAGCTGGTG AGTATATTACCAAAA CCATGTAATAATAGA AGCAACACGGAATTA GCACATGGTGAAGT
376 K P K L V S I L P K P C S N R S N T E L A H G E S
1201GAAGCCTTGGGATG CTAAGTCAAACTCAC CTTCATTCTTCAAGT TCAAAATGAAATACAA AGATATGGTCCCTAC
401 E A L R H L S Q T H L H S S V S N E I Q R Y G P Y
1276AGGTCTCCTGGAGAA TCTCAAATGCTTTCAC AATTTTGCACATCTT CACCCACCACATTTT CATTTCCTCCAGCAGC
426 R S P G E S Q H L H N F A H L H P P H F H F P S S
1351ATCAATGGAGGCAGA ATTGGAAGTGACCTT TCATTATCAATGAAT GATCAACAACAATGG AATCATGGCCTCACA
451 I N G G R I G S D L S L S H N D Q Q Q W N H G L T
1426TTATTTAGCACTGCT GCATCATCATCAGAT TCCCACCACAGATCA GATACCTCTCTCAA GGTGGCTGCAAGAG
476 L F S T A A S S S D S H H R S D T L S Q G W L Q K
1501AATGGTTCCACACT CTCATGAGACCTCTCT GATCACTAAACTGT AGCAAAATTTTCTGC CTACCGCCTTGTCTAT
501 N G F H T L H R P S G S L N C S K I F C L P P C H
1576CAAATCATCATATCT CCTCATATTTTCTAT CTAAGTAAAGTAAACAA GAACTGATGATGCGT TGA
526 Q I I I S P H I F Y L A S K Q E L H H R H

```

Şekil 4.6 *TtAP2* genine ait açık okuma çerçevesi, nükleotid ve aminoasit sekansları

4.2.2 Filogenetik İlişki

TtAP2 proteinine ait dizinin NCBI gen bankasına daha önceden girilmiş dizilerle hizalama ve filogenetik ilişki kurmak için MEGA6 paket programı kullanılmıştır. Elde edilen dizinin birçok bitkiye ait *TtAP2* geni ile büyük benzerlik içinde olduğu belirlenmiştir. Gen bankasında bulunan yaklaşık 100 farklı *APETALA2* benzeri gen ile %59-80 arası benzerlik oranı tespit edilmiştir. MEGA6 paket programı ile yapılan filogenetik ilişki Şekil 4.7’de ve bununla ilişkili olarak diziler arasındaki benzerlik oranları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Analizde bu çalışmada belirlenmiş diziyeye en yüksek oranda benzerliğe sahip 18 farklı bitki türüne ait *TtAP2* benzeri gen protein dizisi ile karşılaştırma yapılmıştır. 10000 bootstrap ile yapılan Neighbor-Joining metoduna göre *T. turcica TtAP2* ile birlikte 19 farklı dizi iki ana kümede gruplanmıştır. Birinci kümede kendi içinde dört alt kümeye ayrılmıştır. 1. alt kümede, *Populus trichocarpa*, *Populus tomentosa*, *Coffea canephora* ve *Betula platyphylla* türlerine ait AP2 proteinleri yer almıştır. İkinci alt grupta ise *Glycine soja* ve *Medicago truncatula* yer almıştır. Üçüncü alt kümede ise *Jatropha curcas* AP1 proteini tek başına yer almıştır. 1. kümenin dördüncü alt grubunda ise *Cicer arietinum*, *Theobroma cacao* ve *Vitis vinifera* bitkilerine ait AP1 proteinleri yer almıştır. *T. turcica* ise ikinci ana kümede birkaç legüm ve diğer bitkiler ile birlikte yer almıştır. İkinci küme 3 alt kümeden oluşmuştur. 1. alt kümede *Malus domestica*, *Prunus persica* ve *Gossypium arboreum*’dan oluşmuştur. 2. alt küme ise *Thermopsis turcica*, *Phaseolus vulgaris* ve *Fragaria vesca*’dan oluşmuştur. 3. alt küme *Morus notabilis*, *Glycine max* ve *Pisum sativum*’dan oluşmuştur.



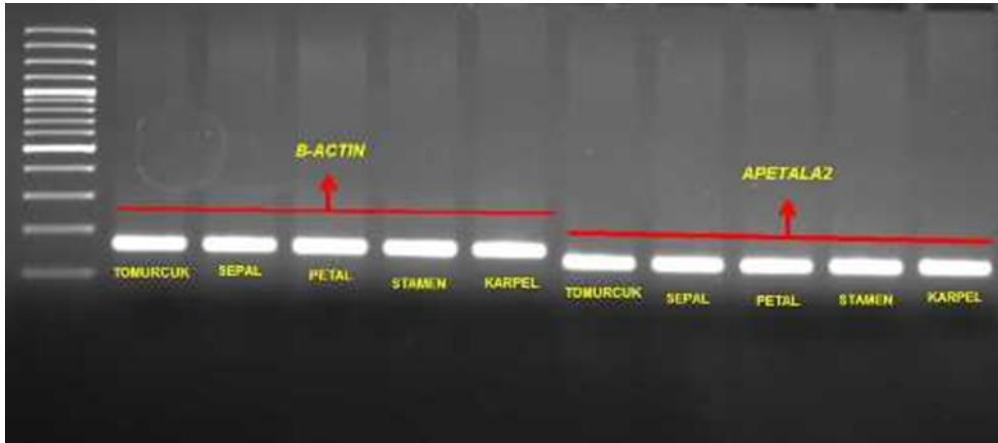
Şekil 4.7 *T. turcica* APETALA2 (TtAP2) protein dizisinin filogenetik ilişkisi. MEGA6 programı ile oluşturulmuş olan filogenetik ağaçta sıralanmış türlerin GenBank (İnt. Kyn. 4)'de yer alan protein kodları alfabetik olarak verilmiştir : *Betula platyphylla* AP2 (AEL29576.1), *Cicer arietinum* AP2 (XP_004511907.1), *Coffea canephora* AP2 (CDP02515.1), *Fragaria vesca* AP2 (XP_004288014.1), *Glycine max* AP2 (XP_003550051.1), *Glycine soja* AP2 (KHN42100.1), *Gossypium arboreum* AP2 (KHG27059.1), *Jatropha curcas* AP2 (BAJ53193.1), *Malus domestica* AP2 (NP_001280879.1) *Medicago truncatula* AP2 (XP_003611692.1), *Morus notabilis* AP2 (XP_010109804.1), *Phaseolus vulgaris* AP2 (XP_007155905.1), *Pisum sativum* AP2 (AAK14326.1), *Populus tomentosa* AP2 (AGM20693.1), *Populus trichocarpa* AP2 (XP_002306481.1), *Prunus persica* AP2 (AEB92231.1), *Theobroma cacao* AP2 (XP_007047337.1), *Vitis vinifera* AP2 (NP_001267881.1).

Çizelge 4.2 *T.turcica* AP2 proteini ile 18 AP2 benzeri proteinin benzerlikleri ve protein/gen kodları. Mevcut analiz BLASTp analiz sonucunda elde edilmiştir (İnt. Kyn. 4).

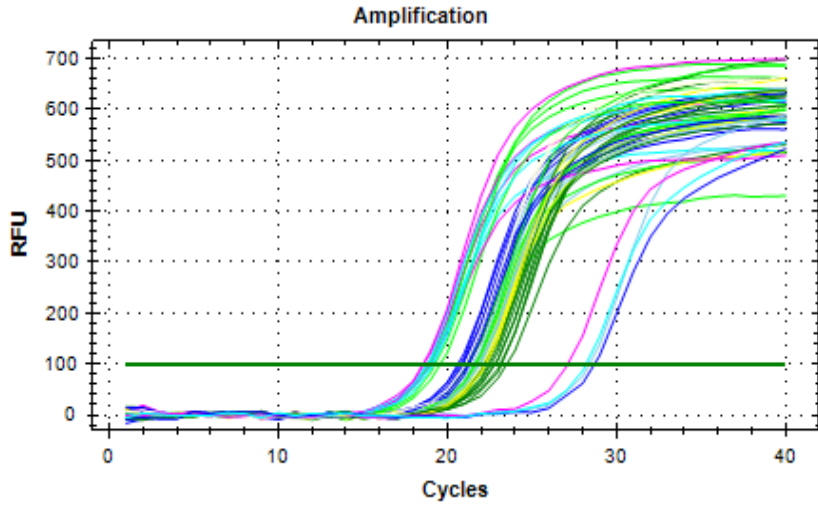
No	Tür Adı	Protein Adı	Maks. Puan	Toplam Puan	TtAP2'yi kapsamı	E değeri	Benzerlik	Protein Kodu	Gen Kodu
1	<i>Glycine soja</i>	Floral homeotic protein APETALA 2	497	551	%80	2e-168	%80	KHN42100.1	KN644745.1
2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHAVU_003G241900g	712	712	%93	0.0	%78	XP_007155905.1	XM_007155843.1
3	<i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X1	696	696	%93	0.0	%76	XP_003550051.1	XM_003550003.2
4	<i>Cicer arietinum</i>	APETALA 2-like isoform X7	553	553	%81	0.0	%73	XP_004511907.1	XM_004511850.1
5	<i>Medicago truncatula</i>	Transcription factor APETALA2	615	615	%93	0.0	%72	XP_003611692.1	XM_003611644.1
6	<i>Theobroma cacao</i>	Transcription factor APETALA2 isoform 1	565	565	%93	0.0	%67	XP_007047337.1	XM_007047275.1
7	<i>Morus notabilis</i>	Floral homeotic protein APETALA 2	498	498	%84	8e-168	%65	XP_010109804.1	XM_010111502.1
8	<i>Pisum sativum</i>	APETAL2-like protein	574	574	%93	0.0	%65	AAK14326.1	AF325506.1
9	<i>Vitis vinifera</i>	transcription factor APETALA2	558	558	%93	0.0	%64	NP_001267881.1	NM_001280952.1
10	<i>Prunus persica</i>	APETALA2 protein	479	479	%77	4e-161	%63	AEB92231.1	JF683605.1
11	<i>Jatropha curcas</i>	JHL03K20.2	527	527	%93	2e-179	%62	BAJ53193.1	AP011968.1
12	<i>Populus trichocarpa</i>	APETAL2-like family protein	444	444	%84	8e-147	%62	XP_002306481.1	XM_002306445.2
13	<i>Gossypium arboreum</i>	Floral homeotic protein APETALA 2	526	526	%93	5e-179	%62	KHG27059.1	KN439717.1
14	<i>Coffea canephora</i>	unnamed protein product	514	514	%93	5e-174	%60	CDP02515.1	HG739092.1
15	<i>Betula platyphylla</i>	APETALA2	507	507	%93	4e-171	%60	AEL29576.1	JN247408.1
16	<i>Populus tomentosa</i>	AP2-1	493	493	%93	1e-165	%60	AGM20693.1	KC477295.1
17	<i>Fragaria vesca</i>	APETALA 2-like	494	494	%93	7e-166	%59	XP_004288014.1	XM_004287966.1
18	<i>Malus domestica</i>	APETALA 2	516	516	%93	2e-174	%59	NP_001280879.1	NM_001293950.1

4.2.3 *T. turcica*'nın Farklı Dokularında *TtAP2* Geni İfadesi

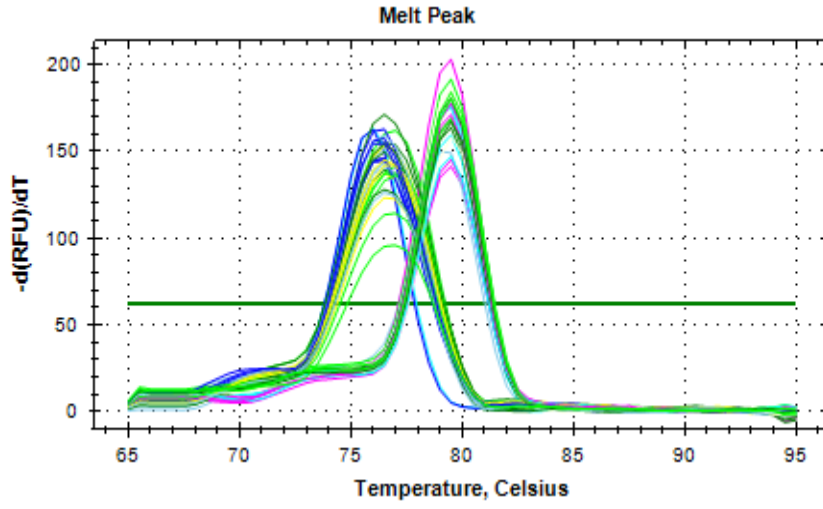
TtAP2 geninin fonksiyonel rolü hakkında bilgi edinebilmek için *TtAP2* cDNA'sının göreceli seviyesi *T. turcica* çiçek tomurcuğu, sepal, petal, stamen ve karpel organlarında gerçek zamanlı PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Kurulan reaksiyon sonucu cDNA ile hazırlanan kontrol geni β -Actin ve hedef gen *TtAP2*'in amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Reaksiyonun doğruluğunu gözlemek amacıyla öncelikle kontrol geni ile hedef genin agaroz jel elektroforez görüntüleri ile kontrol geni ve hedef genin beklenen uzunlukta ürün verdiği tespit edilmiştir (Resim 4.5). Sonrasında ise reaksiyon sonucunda oluşan ve sistemin otomatik olarak verdiği erime eğrisi grafiğinde kontrol geni ile hedef genlerin kendi içlerinde aynı T_m derecesinde tepe noktası vermesi ile reaksiyonun doğruluğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9). Son olarak *TtAP1* geninin 5 farklı çiçek organındaki ifadesi tespit edilmiştir ve en fazla ifadesi sepal organında, en az ifadesi ise stamen organında tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



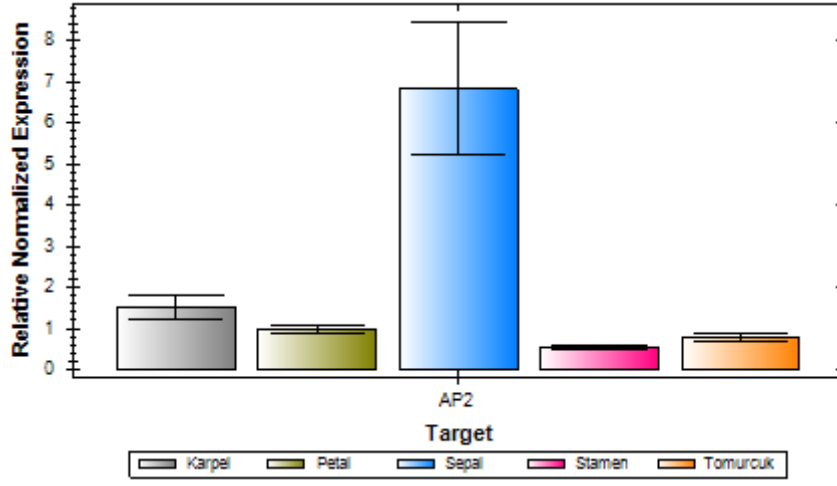
Resim 4.5 β -Actin ve *TtAP2* geninin RT-qPCR sonrası agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.8 β -Actin ve TtAP2 genleri için gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.9 β -Actin ve TtAP2 genlerinin standart erime eğrisi grafiği



Şekil 4.10 *TtAP2* geninin karpel, petal, sepal, stamen ve tomurcuk dokularında ifade seviyesini gösteren bar grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Vejetatif üreme, çiçeklenmenin kurulumu, çiçek organları sepal, petal, stamen ve karpel kimliklerinin oluşumu, çiçek organlarının gelişimi, tozlaşma, embriyo gelişimi ve nihayetinde meyve oluşumuna kadar geçen gelişimsel süreç bitki biliminin en ilginç araştırma konularından birisini oluşturmaktadır. Çiçek meristemi ve çiçek organ kimlik genleri genelde homeotik transkripsiyon faktörlerini kodlar ve bu faktörler ilgili genlerin ifade olmasını sağlayarak bitkinin çiçeklenmeye geçişini ve bitki çiçeği oluşumunu sağlarlar. Çiçek organlarının sayısı ve petal rengi gibi çiçek yapısı ve şekli bitkilere özgüdür. Bitkiler tür, cins ve familya seviyesinde farklı çiçeklenme planlarına sahiptir. Ancak; bu farklılıklara rağmen çiçeklenmenin kurulumunda ve çiçek organ kimlik genlerinin oluşumunda çalışan homeotik transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler çiçekli bitkilerde korunmuştur. Bu çalışmada, tüm legüm bitkileri içinde çoklu karpel üretimine sahip olması yönü ile özel bir yere sahip olan Türkiye endemiği gen kaynağımız *Thermopsis turcica*'nın bazı çiçek meristem ve çiçek organ meristemi genlerinin izolasyonu ve ifade karakterizasyonu TÜBİTAK 212T099 nolu proje kapsamında devam etmektedir. Çiçek organ kimlik genleri ABCDE modeli çerçevesinde sepal (A-E sınıfı genler), petal (ABE sınıfı genler), stamen (BCE sınıfı genler), karpel (CE) ve tohum taslağı (CDE sınıfı genler) oluşumundan sorumludur. *T. turcica*'nın bu ilginç morfolojik özelliğinin anlaşılmasında tüm genlerin yapısal ve fonksiyonel analizleri araştırılmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında ise A-fonksiyonlu MADS kutulu transkripsiyon faktörü *AP1* ve *AP2* ailesi transkripsiyon faktörü *AP2* gen homologları PCR temelli yöntemle *T. turcica* çiçek tomurcuklarından izole edilmiştir. Bu genlerin çiçek tomurcuğu ve çiçeklenme öncesi yarı-açık çiçekten alınan sepal, petal, stamen ve karpel dokularındaki göreceli gen ifadesi gerçek zamanlı nicel PCR (RT-qPCR) yöntemi ile analiz edilmiştir.

Arabidopsis genomunda 100 civarı MADS kutulu gen olduğu belirlenmiştir (Ratcliffe and Riechmann 2002, Riechmann *et al.* 2000, Pilletteri *et al.* 2004). Bu genlerin dokuz alt grupta toplanabileceği ileri sürülmüştür (Theissen *et al.* 2000, Pilletteri *et al.* 2004). Bu genlere ait dizilerin benzerliği gen kopyalanması ve bazı genlerin diğer genlere ait görevleri de yerine getirip getiremeyeceği üzerinedir (Pilletteri *et al.* 2004). *Arabidopsis*

APETALA1 (*API*) ve *Antirrhinum* homologu *SQUAMOSA* (*SQUA*), *SQUA* altailesine ait (aynı zamanda *API/AGL9*) alt ailesi) MADS kutulu genlerdir (Theissen *et al.* 2000, Tsaftaris *et al.* 2004). *API* ve *SQUA* sırasıyla *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da çiçek meristeminin kurulmasında *LEAFY* geni ile birlikte anahtar düzenleyici bir role sahiptir. Bunun yanısıra, A sınıfı gen olarak *APETALA2* (*AP2*) geni ile birlikte çiçek organları sepal ve petal kimliğinin kazanılması ve gelişiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir. *API*'in *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'daki bu çift rolü *API* homologu olan bezelye *PEAM4* geni içinde geçerli olduğunun ispatlanması bu çift rolün diğer bitkilerde de korunduğunu göstermiştir (Berbel *et al.* 2001). *API/SQUA* gen homologları *Arabidopsis thaliana* Bowman vd. (1993), *Antirrhinum majus* Carpenter and Coen (1990), *Glycine max* Chi vd. (2011), *Crocus sativus* Tsaftaris vd. (2004), *Cyclamen persicum* Tanaka vd. (2011), *Sophora tetraptera* Song vd. (2008), *Citrus sinesensis* Pllitteri vd. (2004), *Nymphaea* spp. Luo vd. (2012), *Medicago truncatula* Benlloch vd. (2006), Chi vd. (2011), *Pisum sativum* Berbel vd. (2001), Chi vd. (2011) gibi bitkilerden tam veya kısmen izole edilerek yapısal karakterizasyonu yapılmıştır.

Nükleotid dizisinden çıkarılmış 238 amino asitten oluşan TtAP1 proteinin MADS, I, K ve C domen yapıları ile legüm bitkileri için daha önceden belirlenmiş AP1 benzeri protein dizileri büyük bir yapısal benzerlik içindedir (Dong *et al.* 2005, Chi *et al.* 2011). MADS kutulu genlerin ürettiği proteinlerin yapısındaki dört protein domeni arasında en çok değişken amino asit dizisine sahip olanı C domenidir (Litt and Irish 2003). euAP1 benzeri motif, RRNaLAT/NLa ve fernelizasyon motifi olarak bilinen CAAX şeklinde iki korunmuş bölge içermektedir (Litt and Irish 2003, Chi *et al.* 2011). *Antirrhinum*'un *SQUA*, *Arabiopsis*'in *FRUITFULL* (*AGL8*), *API* (*AGL9*) ve *CAULIFLOWER* (*AGL10*) grubu MADS kutulu genlerin C domeninde euAP1 benzeri bir motif bulundurur. Dolayısıyla bu genler yapısal olarak benzer kabul edilirler (Tsaftaris *et al.* 2004, Kempin *et al.* 1995, Yalovsky *et al.* 2000, Berbel *et al.* 2001). Farnesil transferaz enzimi CAAX motifine sahip proteinlerin C terminal uçlarına farnesil olarak adlandırılan 15 karbonlu izoprenoid sistein (C) amino asidine ekler. *API*'in fernelizasyonu, fonksiyonunu ve transkripsiyon faktörü olarak özelliğini etkileyebilir (Tsaftaris *et al.* 2004). *TtAP1* proteinin C domeni ucundaki son amino asitlerde net bir şekilde euAP1-benzeri motif belirlenmiştir (Şekil 5.1). *L. japonicus*, *P. sativum* ve *G. max* gibi

Bu çalışmada, *T. turcica* *TtAP2* geninin 544 amino asitten oluşan bir proteini kodladığı belirlenmiştir. Ancak, genin 3' ucunda poliadenilasyon sinyali (AATAA) ve poli(A) kuyruğu 3'RACE PCR ürünlerini defalarca diziletmemize veya primer değiştirmemize rağmen tespit edilememiştir. *TtAP2* proteini *Arabidopsis AP2* geninde olduğu gibi amino asit dizisi iyi korunmuş iki AP2 domenine sahiptir (Şekil 5.2) ve filogenetik analiz (Şekil 4.7) izole edilmiş *TtAP2*'nin euAP2 kökeninde bir gen olduğunu göstermiştir (Luo *et al.* 2011, Luo *et al.*2012). Şekil 5.2'de görüldüğü gibi bu protein diğer legümlerde belirlenmiş AP2 homologlarından yaklaşık 30-40 amino asit daha uzundur. *TtAP2* proteinin C domen kısmı diğer AP2 benzeri proteinler karşılaştırıldığında çok değişken bulunmuştur. Benzer durum *CsatAP2a/b/c* proteinleri için de rapor edilmiştir (Tsaftaris *et al.* 2012). *TtAP2* üzerinde diğer benzer AP2'lerde de iyi korunmuş bazı bölgeler tespit edilmiştir. Bu bölgelerden ilki bu proteine karakteristik özelliği veren ve 58 (163-220 aa) ve 61 (254-314 aa) amino asitten oluşan iki adet AP2 tekrarı (R1 ve R2) domeni varlığıdır. 68-71 amino asitler "KKSR" nükleer lokalizasyon sinyali hemen AP2-R1 öncesindedir (Jofuku *et al.* 1994, Tsaftaris *et al.* 2012). AP2 tipi proteinlerin nükleosa lokalize olurken "KKSR" motifinin bu olay için gereklidir. *TtAP2* proteininde 1-5 amino asitler "MLDLN" motifini (motif 1), 96-102 aa "VTRQFFP" motifini (motif 2) ve 333-338 aa "LDLSLG" motifi (motif 3) belirlenmiştir. Bunlara ilaveten *TtAP2*'de ATG protein kodlama başlangıç dizinden itibaren 1442-1456 nükleotidlerinin ("CAGCATCATCAGATT") göre miR172 'ye "CAGCATCATCAGGATTCTCTT" bağlanma yeri oluşturma potansiyeli vardır (Duan *et al.* 2013). miRNA'nın hedefine bağlanabilmesi için 5' tarafından 2-7 nükleotitler için %100 eşleşme olması gerekliliği vurgulanmıştır (Brennecke *et al.* 2005, Tsaftaris *et al.* 2012). Çalışmamızda belirlenen dizide 1-12 nükleotidlerde %100 eşleşme belirlenmiştir.



Şekil 5.2 AP2 protein dizisinin *T.turcica* ve diğer legüm türleri arasındaki bulunmuş bölgeleri.

RT-qPCR analizinde kullanılan *TtAP1*, *TtAP2* ve β -*ACTIN* genleri için tasarlanmış primer çiftleri ile PCR ürünü olarak tek bant çöğalmiş olduğu agaroz jelde teyit edilmiştir (Resim 4.3 ve Resim 4.5). Her qPCR analizi sonucunda elde edilen erime sıcaklığına göre β -*actin* geni için sabit olarak 79.5 °C erime sıcaklığı belirlenmiştir. Ayrıca, *TtAP1* ve *TtAP2* genlerinin transkript seviyelerini belirlemek için çoğaltılan PCR ürünleri erime sıcaklıkları sırasıyla 65.51 °C ve 65.80 °C olarak belirlenmiştir. *TtAP1* ve *TtAP2* transkript seviyeleri çalışırken kullanılan referans β -*ACTIN* geni için farklı dokularda C_t değerleri 17-22 döngüleri arası değişmiştir. *TtAP1* ve *TtAP2* için C_t değerleri dokulara özgü olmak üzere sırasıyla 19-27 ve 18-24 döngü aralıkları şeklinde gerçekleşmiştir. RT-qPCR analizleri süresince takip edilen erime sıcaklıkları, C_t değerleri ve tüm PCR ürünlerinin agaroz elektroforezde yürütülerek hedef bantların çoğaldığının teyit edilmesi qPCR analizleri sonucu elde edilen bulgularımızın güvenilirliğini arttırmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Adamczyk, B. J., Fernandez, D. E. (2009). MIKC* MADS domain heterodimers are required for pollen maturation and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **149(4)**: 1713-1723.
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., Avramova, Z. (2003). ATX-1, an Arabidopsis Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes. *Current Biology*, **13(8)**: 627-637.
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, **61(6)**: 1001-1013.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A. K., Singh, V. P., Tyagi, A. K., Kapoor, S. (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*, **8(1)**: 242.
- Aukerman, M. J., Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell Online*, **15(11)**: 2730-2741.
- Barnes, W. M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**: 2216–2220.
- Baytop, A., Günergun, F. (2003). Türkiye'de botanik tarihi araştırmaları. Çetin Matbaacılık.
- Becker, A., Theißen, G. (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29(3)**: 464-489.
- Bemer, M., Gordon, J., Weterings, K., Angenent, G. C. (2010). Divergence of re-cently duplicated My-type MADS-box genes in Petunia. *Molecular Biology and Evolution*, **27(2)**: 481-495.
- Bemer, M., Wolters-Arts, M., Grossniklaus, U., Angenent, G. C. (2008). The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in Arabidopsis ovules. *The Plant Cell Online*, **20(8)**: 2088-2101.

- Benlloch, R., d'Erfurth, I., Ferrandiz, C., Cosson, V., Beltrán, J. P., Cañas, L. A., Ratet, P. (2006). Isolation of mtpim proves Tnt1 a useful reverse genetics tool in *Medicago truncatula* and uncovers new aspects of AP1-like functions in legumes. *Plant Physiology*, **142(3)**: 972-983.
- Benlloch, R., Navarro, C., Beltrán, J., Cañas, L. A. (2003). Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sexual Plant Reproduction*, **15(5)**: 231-241.
- Berbel, A., Navarro, C., Ferrándiz, C., Cañas, L. A., Madueño, F., Beltrán, J. P. (2001). Analysis of PEAM4, the pea AP1 functional homologue, supports a model for AP1-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *The Plant Journal*, **25(4)**: 441-451.
- Bombliès, K., Wang, R. L., Ambrose, B. A., Schmidt, R. J., Meeley, R. B., Doebley, J. (2003). Duplicate FLORICAULA/LEAFY homologs zfl1 and zfl2 control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development*, **130(11)**: 2385-2395.
- Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M., Smyth, D. R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA 1 and interacting genes. *DEVELOPMENT-CAMBRIDGE*, **119**: 721-721.
- Bowman, J. L., Drews, G. N., Meyerowitz, E. M. (1991a). Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development. *The Plant Cell Online*, **3(8)**: 749-758.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **1(1)**, 37-52.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., Meyerowitz, E. M. (1991b). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, **112(1)**: 1-20.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., Meyerowitz, E. M. (2012). The ABC model of flower development: then and now. *Development*, **139(22)**: 4095-4098.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R., Coen, E. (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, **275(5296)**: 80-83.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA–target recognition. *PLOS Biology*, **3(3)**: 85.

- Capoen, W., Oldroyd, G., Goormachtig, S., Holsters, M. (2010). *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. *New Phytologist*, **186(2)**: 340-345.
- Carles, C. C., Fletcher, J. C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science*, **8(8)**: 394-401.
- Carpenter R., Coen ES. (1990) Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Development*, **4**: 1483–1493.
- Castillejo, C., Romera-Branchat, M., Pelaz, S. (2005). A new role of the Arabidopsis SEPALLATA3 gene revealed by its constitutive expression. *The Plant Journal*, **43(4)**: 586-596.
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. (2010, February). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *In Seminars in Cell & Developmental Biology*, **21(1)**: 73-79.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, **303(5666)**: 2022-2025.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M. Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**: 5695–5699.
- Chi, Y., Huang, F., Liu, H., Yang, S., Yu, D. (2011). An APETALA1-like gene of soybean regulates flowering time and specifies floral organs. *Journal of Plant Physiology*, **168(18)**: 2251-2259.
- Chuck, G., Meeley, R. B., Hake, S. (1998). The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes & development*, **12(8)**: 1145-1154.
- Coen, E. S., Carpenter, R. (1993). The Metamorphosis of Flowers. *The Plant Cell*, **5(10)**: 1175.
- Coen, E. S., Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353(6339)**: 31-37.
- Coen, E. S., Romero, J., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., Carpenter, R. (1990). Floricaula: A homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell*, **63(6)**: 1311-1322.

- Colombo, L., Angenent, G. C. (1999). MADS box genes controlling ovule and seed development in *Petunia*. In *Fertilization in Higher Plants* (pp. 351-360). *Springer Berlin Heidelberg*.
- Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M. M., Colombo, L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **54(6)**: 1037-1048.
- Davies, B., Sommer, H., Schwarz-Sommer, Z. (1999). Flower development: genetic views and molecular news. In *Development* (pp. 167-183). *Springer Berlin Heidelberg*.
- Davis, P. H., Cullen, J., Coode, M. J. E. (Eds.). (1988). *Flora of Turkey and the east Aegean islands* (Vol. 10). *Edinburgh University Press*.
- De Bodt, S., Raes, J., Florquin, K., Rombauts, S., Rouzé, P., Theißen, G., Van de Peer, Y. (2003a). Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *Journal of Molecular Evolution*, **56(5)**: 573-586.
- De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y., Theißen, G. (2003b). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in Plant Science*, **8(10)**: 475-483.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in Floral Organ and Meristem Identity. *Current Biology*, **14(21)**: 1935-1940.
- Dong, Z. C., Zhao, Z., Liu, C. W., Luo, J. H., Yang, J., Huang, W. H., Luo, D. (2005). Floral patterning in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, **137(4)**: 1272-1282.
- Doyle, J. J. (1995). DNA data and legume phylogeny: a progress report.
- Doyle, J. J., Chappill, J. A., Bailey, C. D., Kajita, T. (2001). Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. *Advances in Legume Systematics*, **9**: 1-20.
- Drews, G. N., Bowman, J. L., Meyerowitz, E. M. (1991a). Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell*, **65(6)**: 991-1002.
- Drews, G. N., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. (1991b). Floral patterning. *Current Opinion in Genetics & Development*, **1(2)**: 174-178.

- Duan, C., Argout, X., Gébelin, V., Summo, M., Dufayard, J. F., Leclercq, J., Montoro, P. (2013). Identification of the *Hevea brasiliensis* AP2/ERF superfamily by RNA sequencing. *BMC Genomics*, **14**(1): 30.
- Dubois, E., Bercy, J., Descamps, F., Messenguy, F. (1987). Characterization of two new genes essential for vegetative growth in *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence determination and chromosome mapping. *Gene*, **55**(2): 265-275.
- Elliott, R. C., Betzner, A. S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W. Q., Gerentes, D., Smyth, D. R. (1996). AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *The Plant Cell Online*, **8**(2): 155-168.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Colombo, L. (2003). MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **15**(11): 2603-2611.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., Yanofsky, M. F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development*, **127**(4): 725-734.
- Ferrandiz, C., Navarro, C., Gomez, M. D., Canas, L. A., Beltran, J. P. (1999). Flower development in *Pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia. *Developmental Genetics*, **25**(3): 280-290.
- Ferrario, S., Immink, R. G., Angenent, G. C. (2004). Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(1): 84-91.
- Fornara, F., Marziani, G., Mizzi, L., Kater, M., and Colombo, L. (2003). MADS-box genes controlling flower development in rice. *Plant Biology*, **5**: 16–22
- Goethe, J.W.(1790). Goethe's botany: the metamorphosis of plants. Translated by A. Arber as Goethe's Botany (1946). *Chronica Botanica*,**10**: 63–126.
- Goto, K., & Meyerowitz, E. M. (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes & Development*, **8**(13): 1548-1560.
- Gramzow, L., Ritz, M. S., Theißen, G. (2010). On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends in Genetics*, **26**(4): 149-153.

- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y., Traas, J. (2004). In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **16(1)**: 74-87.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., Kater, M. M. (2008). AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **56(6)**: 891-902.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F., Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development*, **125(8)**: 1509-1517.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, M. F. (1994). Regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Cell*, **76(1)**: 131-143.
- Hamès, C., Ptchelkine, D., Grimm, C., Thevenon, E., Moyroud, E., Gérard, F., Müller, C. W. (2008). Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. *The EMBO Journal*, **27(19)**: 2628-2637.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M., Sarai, A. (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *Journal of Biological Chemistry*, **273(41)**: 26857-26861.
- Haughn, G. W., Somerville, C. R. (1988). Genetic control of morphogenesis in Arabidopsis. *Developmental Genetics*, **9(2)**: 73-89.
- Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Weller, J. L. (2005). Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiology*, **137(4)**: 1420-1434.
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A., Meyerowitz, E. M. (2005). Patterns of Auxin Transport and Gene Expression during Primordium Development Revealed by Live Imaging of the Arabidopsis Inflorescence Meristem. *Current Biology*, **15(21)**: 1899-1911.
- Hempel, F. D., Weigel, D., Mandel, M. A., Ditta, G., Zambryski, P. C., Feldman, L. J., Yanofsky, M. F. (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development*, **124(19)**: 3845-3853.
- Henschel, K., Kofuji, R., Hasebe, M., Saedler, H., Münster, T., Theißen, G. (2002). Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology and Evolution*, **19(6)**: 801-814.

- Honma, T., Goto, K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, **409(6819)**: 525-529.
- Huala, E., Sussex, I. M. (1992). LEAFY interacts with floral homeotic genes to regulate Arabidopsis floral development. *The Plant Cell Online*, **4(8)**: 901-913.
- Huijser, P., Klein, J., Lönnig, W. E., Meijer, H., Saedler, H., Sommer, H. (1992). Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene squamosa in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal*, **11(4)**: 1239.
- Immink, R. G., Tonaco, I. A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A. D., Busscher-Lange, J., Angenent, G. C. (2009). SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology*, **10(2)**: R24.
- Irish, V. F. (1999). Patterning the flower. *Developmental biology*, **209(2)**: 211-220.
- Irish, V. F. (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*, **61(6)**: 1014-1028.
- Irish, V. F., Sussex, I. M. (1990). Function of the apetala-1 gene during Arabidopsis floral development. *The Plant Cell Online*, **2(8)**: 741-753.
- Jack, T. (2001). Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends in Plant Science*, **6(7)**: 310-316.
- Jack, T., Brockman, L. L., Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, **68(4)**: 683-697.
- Jenik, P. D., Irish, V. F. (2000). Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during Arabidopsis floral development. *Development*, **127(6)**: 1267-1276.
- Jofuku, K. D., Den Boer, B. G., Van Montagu, M., Okamuro, J. K. (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell Online*, **6(9)**: 1211-1225.
- Kang, I. H., Steffen, J. G., Portereiko, M. F., Lloyd, A., Drews, G. N. (2008). The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **20(3)**: 635-647.
- Kater, M. M., Dreni, L., & Colombo, L. (2006). Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **57(13)**: 3433-3444.

- Kaufmann, K., Melzer, R., Theissen, G. (2005). MIKC-type MADS domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, **347**: 183–198.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., Riechmann, J. L. (2010). Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science*, **328(5974)**: 85-89.
- Keck, E., McSteen, P., Carpenter, R., Coen, E. (2003). Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *The EMBO Journal*, **22(5)**: 1058-1066.
- Kempin, S. A., Savidge, B., Yanofsky, M. F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science*, **267(5197)**: 522-525.
- Klucher, K. M., Chow, H., Reiser, L., Fischer, R. L. (1996). The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell Online*, **8(2)**: 137-153.
- Komaki, M. K., Okada, K., Nishino, E., Shimura, Y. (1988). Isolation and characterization of novel mutants of Arabidopsis thaliana defective in flower development. *Development*, **104(2)**: 195-203.
- Köhler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Grissem, W., Grossniklaus, U. (2003). The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes & Development*, **17(12)**: 1540-1553.
- Krizek, B. A. (2003). AINTEGUMENTA utilizes a mode of DNA recognition distinct from that used by proteins containing a single AP2 domain. *Nucleic Acids Research*, **31(7)**: 1859-1868.
- Krizek, B. A., Fletcher, J. C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, **6(9)**: 688-698.
- Kunst, L., Klenz, J. E., Martinez-Zapater, J., Haughn, G. W. (1989). AP2 gene determines the identity of perianth organs in flowers of Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell Online*, **1(12)**: 1195-1208.
- Kwiatkowska, D. (2006). Flower primordium formation at the Arabidopsis shoot apex: quantitative analysis of surface geometry and growth. *Journal of Experimental Botany*, **57(3)**: 571-580.

- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, **294(5543)**: 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, **12(9)**: 735-739.
- Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M., Moose, S. P. (2005). microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102(26)**: 9412-9417.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., Wojciechowski, M. F. (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*, **54(4)**: 575-594.
- Lawton-Rauh, A. L., Buckler, E. S. T., Purugganan, M. D. (1999). Patterns of molecular evolution among paralogous floral homeotic genes. *Molecular Biology and Evolution*, **16(8)**: 1037-1045.
- Lee, R. C., Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294(5543)**: 862-864.
- Leseberg, C. H., Li, A., Kang, H., Duvall, M., Mao, L. (2006). Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene*, **378**: 84-94.
- Lewis, G. P., Schrire, B., Lock, M. (Eds.). (2005). Thermopsidae. Legumes of the World. *Royal Botanic Gardens*, **14**: 263-265.
- Li, W., Zhou, Y., Liu, X., Yu, P., Cohen, J. D., Meyerowitz, E. M. (2013). LEAFY controls auxin response pathways in floral primordium formation. *Science Signaling*, **6**: 23.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, **404(6779)**: 766-770.
- Litt, A. (2007). An evaluation of A-function: evidence from the APETALA1 and APETALA2 gene lineages. *International Journal of Plant Sciences*, **168(1)**: 73-91.

- Litt, A., Irish, V. F. (2003). Duplication and diversification in the APETALA1/FRUITFULL floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development. *Genetics*, **165(2)**: 821-833.
- Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C., Yu, H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell*, **16(5)**: 711-722.
- Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T., Yu, H. (2007). Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*, **134(10)**: 1901-1910.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., Carrington, J. C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell Online*, **14(7)**: 1605-1619.
- Luo, H., Chen, S., Jiang, J., Chen, Y., Chen, F., Teng, N., Huang, C. (2011). The expression of floral organ identity genes in contrasting water lily cultivars. *Plant Cell Reports*, **30(10)**:1909-1918.
- Luo, H., Chen, S., Jiang, J., Teng, N., Chen, Y., Chen, F. (2012). The AP2-like gene NsAP2 from water lily is involved in floral organogenesis and plant height. *Journal of Plant Physiology*, **169(10)**: 992-998.
- Maes, T., Van de Steene, N., Zethof, J., Karimi, M., D'Hauw, M., Mares, G., Gerats, T. (2001). Petunia Ap2-like genes and their role in flower and seed development. *The Plant Cell Online*, **13(2)**: 229-244.
- Maizel, A., Busch, M. A., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M., Weigel, D. (2005). The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science*, **308(5719)**: 260-263.
- Mandel, M. A., Yanofsky, M. F. (1995). A gene triggering flower formation in Arabidopsis. *Nature*, **377(6549)**: 522-524.
- Mandel, M. A., Bowman, J. L., Kempin, S. A., Ma, H., Meyerowitz, E. M., & Yanofsky, M. F. (1992). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell*, **71(1)**: 133-143.
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature*, **360**: 273 - 277

- Melzer, R., Theißen, G. (2009). Reconstitution of ‘floral quartets’ in vitro involving class B and class E floral homeotic proteins. *Nucleic Acids Research*, **37(8)**: 2723-2736.
- Melzer, R., Wang, Y. Q., Theißen, G. (2010, February). The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *In Seminars in Cell & Developmental Biology*, **21(1)**: 118-128.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A., Beeckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, **40(12)**: 1489-1492.
- Messenguy, F., Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, **316**: 1-21.
- Meyerowitz, E. M., Bowman, J. L., Brockman, L. L., Drews, G. N., Jack, T., Sieburth, L. E., Weigel, D. (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **113(Supplement 1)**: 157-167.
- Mizukami, Y. (2001). A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **4(6)**: 533-539.
- Mizukami, Y., Fischer, R. L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97(2)**: 942-947.
- Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Zurita, S., Gómez, P., Capel, J., Lozano, R. (1999). FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal*, **20(6)**: 685-693.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development*, **16(6)**: 720-728.
- Özdemir, C., Dural, H., Ertuğrul, K., Küçüködük, M., Baran, P., Şanda, M. A. (2008). Morphology and anatomy of endemic *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük. *Bangladesh Journal of Botany*, **37(2)**: 105-114.

- Paşenicov, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Colombo, L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis new openings to the MADS world. *The Plant Cell Online*, **15(7)**: 1538-1551.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, **12(17)**: 1484-1495.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, **405(6783)**: 200-203.
- Pelaz, S., Tapia-Lopez, R., Alvarez-Buylla, E. R., Yanofsky, M. F. (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Current Biology*, **11(3)**: 182-184.
- Pellegrini, L., Tan, S., Richmond, T. J. (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature*, **376**: 490 – 498.
- Pillitteri, L. J., Lovatt, C. J., Walling, L. L. (2004). Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER homolog and its correlation with juvenility in citrus. *Plant Physiology*, **135(3)**: 1540-1551.
- Pinyopich, A., Ditta, G. S., Savidge, B., Liljegren, S. J., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M. F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, **424(6944)**: 85-88.
- Portereiko, M. F., Lloyd, A., Steffen, J. G., Punwani, J. A., Otsuga, D., Drews, G. N. (2006). AGL80 is required for central cell and endosperm development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **18(8)**: 1862-1872.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L. D., Coen, E. (2007). Evolution and development of inflorescence architectures. *Science*, **316(5830)**: 1452-1456.
- Ratcliffe, O. J., Riechmann, J. L. (2002). Arabidopsis transcription factors and the regulation of flowering time: a genomic perspective. *Current Issues in Molecular Biology*, **4**: 77-92.
- Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S., Bradley, D. J. (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, **125(9)**: 1609-1615.

- Reddy, G. V., Heisler, M. G., Ehrhardt, D. W., Meyerowitz, E. M. (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **131(17)**: 4225-4237.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, **16(13)**: 1616-1626.
- Riechmann, J. L., Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*, **379**: 633-646.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Yu, G. L. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290(5499)**: 2105-2110.
- Rodríguez-concepción, M., Yalovsky, S., Gruissem, W. (1999). Protein prenylation in plants: old friends and new targets. *Plant Molecular Biology*, **39(5)**: 865-870.
- Sablowski, R. (2007). Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **58(5)**: 899-907.
- Santelli, E., Richmond, T.J. (2000). Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, **297**: 437-449.
- Schultz, E. A., Haughn, G. W. (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development*, **119(3)**: 745-765.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, **250(4983)**: 931-936.
- Sessions, A., Yanofsky, M. F., Weigel, D. (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science*, **289(5480)**: 779-781.
- Shannon, S., Meeks-Wagner, D. R. (1993). Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **5(6)**: 639-655.
- Shigyo, M., & Ito, M. (2004). Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes. *Development Genes and Evolution*, **214(3)**: 105-114.
- Simon, R., Igeño, M. I., Coupland, G. (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* **384**: 59 – 62.
- Simpson GG, Dean C (2002) *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science*, **296**: 285–289.

- Smaczniak, C., Immink, R. G., Muiño, J. M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., Kaufmann, K. (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109(5)**: 1560-1565.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **2(8)**: 755-767.
- Song, J., Clemens, J., Jameson, P. E. (2008). Quantitative expression analysis of the ABC genes in *Sophora tetraptera*, a woody legume with an unusual sequence of floral organ development. *Journal of Experimental Botany*, **59(2)**: 247-259.
- Song, J., Clemens, J., Jameson, P. E. (2011). Expression of floral identity genes in *Clanthus maximus* during mass inflorescence abortion and floral development. *Annals of Botany*, **107(9)**: 1501-1509.
- Souer, E., van der Krol, A., Kloos, D., Spelt, C., Blied, M., Mol, J., Koes, R. (1998). Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development*, **125(4)**: 733-742.
- Steeves, T. A., Sussex, I. M. (1989). Patterns in plant development. *Cambridge University Press*.
- Tabosa, A. B., Matias, L. Q., Martins, F. R. (2012). Live fast and die young: The aquatic macrophyte dynamics in a temporary pool in the Brazilian semiarid region. *Aquatic Botany*, **102**: 71-78.
- Tan, F. C., Swain, S. M. (2006). Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. *Physiologia Plantarum*, **128(1)**: 8-17.
- Tan, K., Vural, M., Kucukoduk, M. (1983). An unusual new Thermopsis from Turkey. *Notes Royal Botanic Gardens Edinburgh*, **40(3)**: 515-518.
- Tan, S., Richmond, T. J. (1998). Crystal structure of the yeast MAT α 2/MCM1/DNA ternary complex. *Nature*, **391(6668)**: 660-666.
- Tanahashi, T., Sumikawa, N., Kato, M., Hasebe, M. (2005). Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, **132(7)**: 1727-1736.
- Tanaka, Y., Yamamura, T., Terakawa, T. (2011). Identification and expression analysis of the *Cyclamen persicum* MADS-box gene family. *Plant Biotechnology*, **28(2)**: 167-172.

- Theissen, G. (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, **4(1)**: 75-85.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Saedler, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *In Plant Molecular Evolution*, **42**: 115-149.
- Theissen, G., Saedler, H., (2001). Floral quartets. *Nature* **409**: 469–471.
- Thompson, B. E. and Hake, S. (2009). Translational biology: from Arabidopsis flowers to grass inflorescence architecture. *Plant Physiology*, **149**: 38-45.
- Tsaftaris, A. S., Pasentsis, K., Iliopoulos, I., Polidoros, A. N. (2004). Isolation of three homologous AP1-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression. *Plant Science*, **166(5)**: 1235-1243.
- Tsaftaris, A. S., Pasentsis, K., Madesis, P., Argiriou, A. (2012). Sequence characterization and expression analysis of three APETALA2-like genes from saffron crocus. *Plant Molecular Biology Reporter*, **30(2)**: 443-452.
- Tucker, S. C. (1989). Overlapping organ initiation and common primordia in flowers of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae). *American Journal of Botany*, **76**: 714-729.
- Tucker, S. C. (2003a). Floral development in legumes. *Plant Physiology*, **131(3)**: 911-926.
- Tucker, S. C. (2003b). Floral ontogeny in *Swartzia* (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae): distribution and role of the ring meristem. *American Journal of Botany*, **90(9)**: 1271-1292.
- Vahala, T., Oxelman, B., von Arnold, S. (2001). Two APETALA2-like genes of *Picea abies* are differentially expressed during development. *Journal of Experimental Botany*, **52(358)**: 1111-1115.
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A. D., Hooykaas, P. J., Keller, B. (2000). Activation tagging of the LEAFY PETIOLE gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **127(22)**: 4971-4980.
- van der Graaff, E., Nussbaumer, C., Keller, B. (2003). The *Arabidopsis thaliana* rlp mutations revert the ectopic leaf blade formation conferred by activation tagging of the LEP gene. *Molecular Genetics and Genomics*, **270(3)**: 243-252.

- Verelst, W., Twell, D., de Folter, S., Immink, R., Saedler, H., Munster, T. (2007). MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biology*, **8(11)**: 249.
- Wagner, D., Sablowski, R. W., Meyerowitz, E. M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, **285(5427)**: 582-584.
- Wang, H. C., Sun, H., Compton, J. A., Yang, J. B. (2006). A phylogeny of Thermopsidae (Leguminosae: Papilionoideae) inferred from nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151(3)**: 365-373.
- Weigel, D. and Jürgens, G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, **415**: 751-754.
- Weigel, D. and Meyerowitz, E.M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, **78**: 203–209.
- Weigel, D., Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, **377(6549)**: 495-500.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, **69(5)**: 843-859.
- Weng, L., Tian, Z., Feng, X., Li, X., Xu, S., Hu, X., Yang, J. (2011). Petal development in Lotus japonicus. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53(10)**: 770-782.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science*, **309(5737)**: 1056-1059.
- Winter, K. U., Weiser, C., Kaufmann, K., Bohne, A., Kirchner, C., Kanno, A., & Theißen, G. (2002). Evolution of class B floral homeotic proteins: obligate heterodimerization originated from homodimerization. *Molecular Biology and Evolution*, **19(5)**: 587-596.
- Wu, X., Dinneny, J. R., Crawford, K. M., Rhee, Y., Citovsky, V., Zambryski, P. C., Weigel, D. (2003). Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex. *Development*, **130(16)**: 3735-3745.
- Würschum, T., Groß-Hardt, R., Laux, T. (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. *The Plant Cell Online*, **18(2)**: 295-307.

- Yalovsky, S., Rodríguez-Concepción, M., Bracha, K., Toledo-Ortiz, G., Gruitsem, W. (2000). Prenylation of the floral transcription factor APETALA1 modulates its function. *The Plant Cell Online*, **12(8)**: 1257-1266.
- Yamaguchi, N., Wu, M. F., Winter, C. M., Berns, M. C., Nole-Wilson, S., Yamaguchi, A., Wagner, D. (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Developmental Cell*, **24(3)**: 271-282.
- Yang, Y., Fanning, L., Jack, T. (2003). The K domain mediates heterodimerization of the Arabidopsis floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *The Plant Journal*, **33(1)**: 47-59.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, **346(6279)**: 35-39.
- Yoo, S. K., Lee, J. S., Ahn, J. H. (2006). Overexpression of AGAMOUS-LIKE 28 (AGL28) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **348(3)**: 929-936.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F., Meyerowitz, E. M. (2004). Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nature Genetics*, **36(2)**, 157-161.
- Zahn, L. M., Leebens-Mack, J. H., Arrington, J. M., Hu, Y., Landherr, L. L., DePamphilis, C. W., Ma, H. (2006). Conservation and divergence in the AGAMOUS subfamily of MADS-box genes: evidence of independent sub- and neofunctionalization events. *Evolution & Development*, **8(1)**: 30-45.
- Zhang, G., Chen, M., Chen, X., Xu, Z., Guan, S., Li, L. C., Ma, Y. (2008). Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Experimental Botany*, **59(15)**: 4095-4107.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T. T., Chen, X. (2007). miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems. *The Plant Journal*, **51(5)**: 840-849.
- Zik, M., Irish, V. F. (2003). Flower development: initiation, differentiation, and diversification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **19(1)**: 119-140.

Zobell, O., Faigl, W., Saedler, H., Münster, T. (2010). MIKC* MADS-box proteins: conserved regulators of the gametophytic generation of land plants. *Molecular Biology and Evolution*, **27(5)**: 1201-1211.

İNTERNET KAYNAKLARI

1- <http://www.ch.embnet.org/> 10.12.2014

2- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 18.11.2014

3- <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> 07.01.2015

4- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 08.12.2014

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alperen DEDEOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Lüleburgaz / 10.01.1990
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0(532) 245 07 23 / alperen_dede@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Lüleburgaz Atatürk Lisesi, 2008
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyoloji, 2012
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Biyoloji ve Genetik, 2015

Bildiriler ; Cenkci, S., Kolukısa E.M., Karakurt Y., **Dedeoğlu A.** Çiçek Organ Meristemi Kimlik Genlerinin *Thermopsis turcica*'dan Kısmi Klonlanması ve Karakterizasyonu. Ulusal Botanik Bitki Bilimi Kongresi. Antalya, 25-28 Ekim, 2014.