

**SIRADIŞI ÇOK KARPELLİ ÇİÇEK YAPISINA
SAHİP ENDEMİK LEGÜM TÜRÜ *THERMOPSIS*
TURCICA'DA BAZI ÇİÇEK ORGAN GENLERİNİN
KİSMİ KLONLANMASI VE SEKANSLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ezgi Melis KOLUKISA

DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman CENKCI
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz, 2014

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

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIRADIŞI ÇOK KARPELLİ ÇİÇEK YAPISINA SAHİP ENDEMİK LEGÜM
TÜRÜ *THERMOPSIS TURCICA*'DA BAZI ÇİÇEK ORGAN GENLERİNİN
KİSMİ KLONLANMASI ve SEKANSLANMASI**

Ezgi Melis KOLUKISA

DANIŞMAN

Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ


BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

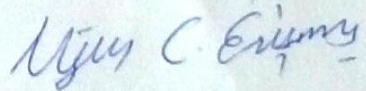
Temmuz, 2014

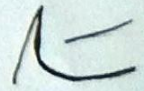
TEZ ONAY SAYFASI

Ezgi Melis KOLUKISA tarafından hazırlanan "Sıradışı Çok Karpelli Çiçek Yapısına Sahip Endemik Legüm Türü *Thermopsis turcica*'da Bazı Çiçek Organ Genlerinin Kısmi Klonlanması ve Sekanslanması" adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 04/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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

Başkan : Prof. Dr. Cevdet UĞUZ 
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ 
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

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

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

.....
Prof. Dr. Yılmaz YALÇIN
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.

04/07/2014

Ezgi Melis KOLUKISA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIRADIŞI ÇOK KARPELLİ ÇİÇEK YAPISINA SAHİP ENDEMİK LEGÜM TÜRÜ *THERMOPSIS TURCICA*'DA BAZI ÇİÇEK ORGAN GENLERİNİN KISMİ KLONLANMASI ve SEKANSLANMASI

Ezgi Melis KOLUKISA

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

Yabani legüm *Thermopsis turcica*'da sıra dışı çiçek morfolojisi, yani tek çiçekten 3-4 serbest karpel üretimini kontrol eden moleküler mekanizmaların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu ana hedefe ulaşabilmek amacı ile bu çalışmada sepal, petal, stamen, karpel ve meyve gibi çiçek organlarının oluşumu ve gelişimini kontrol eden A-[*APETALA1* (*API*), *APETALA2* (*AP2*)], B-[*APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*)], C-[*AGAMOUS* (*AG*)], D-[*SEEDSTICK* (*STK*), *SHATTERPROOF* (*SHP*)] ve E-[*SEPALLATA* (*SEP*)] fonksiyonlu genlerin *T. turcica*'da kısmi klonlanması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

T. turcica çiçek tomurcuklarından izole edilen total RNA özütü ilk iplik cDNA üretiminde kullanılmıştır. Özellikle legümler için bilinen hedef genlere ait nükleotid ve protein dizilerinden dejenere primerler tasarlanmıştır. PCR reaksiyonları cDNA kalıbı, gene özgü dejenere primer çifti ve Phusion™ polimeraz ile kurulmuştur. PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra, hedef DNA parçaları agaroz jelden kesilmiş, çıkarılmış ve saflaştırılmıştır. Hedef DNA parçaları pJET1.2 klonlama vektörüne yüklendikten sonra ligasyon ürünleri yetenekli DH5α *E. coli* hattına transforme edilmiştir. Koloni PCR tekniği transformantların doğru PCR ürünü içerip içermediğini belirlemede kullanılmıştır. Rastgele seçilmiş transformantlardan PCR ürününü bulduran rekombinanat plazmid DNA'lar izole edilmiş ve dizilim analizi yapılmıştır.

Nükleotid ve çıkarılmış protein dizi sonuçları hedefimizdeki tüm çiçek organ meristem kimlik genlerinin *T. turcica*'dan kısmi olarak başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermiştir. *AP1* için 667 nükleotid (nt), *AP2* için 447 nt, *AP3* için 480 nt, *PI* için 249 nt, *AG* için 402 nt, *SHP* için 296 nt, *STK* için 350 nt ve *SEP* için 441 nt dizileri en az üç bağımsız dizilemeyle belirlenmiştir. Bu dizilemelere ilaveten, qPCR gibi daha sonraki fonksiyonel analizlerde içsel kontrol genleri olarak kullanmak üzere *18S rRNA* için 451nt ve *β -ACTIN* için 276 nt de dizilenmiştir. BLASTn, BLASTp ve CLUSTALw analizleri, *T. turcica* çiçek meristem kimlik genlerinin nükleotid ve çıkarılmış protein dizilerinin diğer legüm türlerinde belirlenmiş homologlarına çok benzediğini (%70-100 oranlarında) göstermiştir.

Sonuç olarak, *T. turcica*'da sekiz farklı çiçek organ meristemi kimlik geni mevcut araştırmada kısmen klonlanmış ve dizisel olarak karakterize edilmiştir. Bu dizi bilgileri hedef genlerin tam uzunluk cDNA dizileri ve fonksiyonel analizlerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Çiçek organı meristem genleri, Klonlama, Kısmi sekanslama
Thermopsis turcica

2014, xiii + 111 sayfa

ABSTRACT

M.Sc Thesis

PARTIAL CLONING AND SEQUENCING OF SOME FLORAL ORGAN GENES IN *THERMOPSIS TURCICA*, AN ENDEMIC LEGUME SPECIES WITH AN UNUSUAL STRUCTURE OF MULTI-CARPELLATED FLOWER

Ezgi Melis KOLUKISA

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Süleyman CENKÇİ

The molecular mechanisms controlling unusual floral morphology that is producing 3-4 free carpels from a single flower in the wild legume *Thermopsis turcica* were aimed to be evaluated. The partial cloning and characterization of A-[*APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*)], B-[*APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*)], C-[*AGAMOUS* (*AG*)], D-[*SEEDSTICK* (*STK*), *SHATTERPROOF* (*SHP*)] and E-[*SEPALLATA* (*SEP*)] function genes that controlling the initiation and development of floral organs such as sepals, petals, stamens, carpels and seed pods in *T. turcica* was aimed in this study to reach our major objective.

The total RNA extracted from the floral buds of *T. turcica* was used to produce first strands cDNAs. The degenerate primers were designed from the nucleotide and protein sequences of target genes especially known for the legume species. PCR reactions were set up with cDNA template, gene specific degenerate primer pairs and PhusionTM Polymerase. After separating PCR products on agarose gel, target DNA fragments were cut, removed and then purified from the agarose. After ligating the target DNA fragments into the pJET1.2TM cloning vectors, ligation products were transformed in to competent DH5 α *E. coli* strains. The colony PCR technique was used to identify whether transformants have the right PCR fragment or not. The recombinant plasmid

DNA holding the PCR product was isolated from randomly selected transformants and was sequenced.

The results of nucleotide and deduced protein sequence clearly indicated that all floral meristem identity genes of our target were partially obtained from *T. turcica*. 667 bp for *AP1*, 447 bp for *AP2*, 480 bp for *AP3*, 249 bp for *PI*, 402 bp for *AG*, 296 bp for *SHP*, 350 bp for *STK* and 441 bp for *SEP* were identified with at least three independent sequencing. In addition to these sequencings, 451 bp for *18S rRNA* and 276 bp for β -*ACTIN* were also sequenced to be used as internal control genes in further functional analysis, such as qPCR. BLASTn, BLASTp and CLUSTALw analyses obviously indicated that nucleotide/deduced protein sequences of *T. turcica* floral meristem identity genes obtained in this study were very similar (100%-70%) to their homologues determined for the other legume species.

Consequently, eight different floral meristem identity genes for *T. turcica* were partially cloned and sequentially characterized in the present study. These sequence information would be used to determine the full length cDNA sequences and their functional analyses of the target genes.

2014, xiii + 111 pages

Key Words: Flower organ meristem genes, Cloning, Partial sequencing, *Thermopsis turcica*

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu alışamanın ortaya çıkmasında ve ötesinde benden destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum bilgisini ve deneyimlerini cömertçe benimle paylaşan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Süleyman CENKCI ve kıymetli eőine en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Deneysel alışmalar süresince özveri ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Alperen DEDEOĞLU başta olmak üzere, yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm varlığım boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini daima hissettiğim kıymetli anne ve babama teşekkürü borç bilirim.

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

Ezgi Melis KOLUKISA
AFYONKARAHİSAR, 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Bitkilerde Çiçeklenme.....	3
2.2 Çiçek Meristemi Organ Kimlik Genleri ve ABCDE Modeli.....	6
2.3 MADS Kutusu.....	14
2.4 Legümlerde Çiçeklenme	16
2.5 <i>Thermopsis turcica</i> Çiçek Yapısı	17
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1 Bitki Materyali	19
3.2 <i>Thermopsis turcica</i> Çiçek Tomurcuğundan Total RNA İzolasyonu.....	19
3.2.1 Total RNA ekstraksiyonu	19
3.2.2 DNaz Uygulanması.....	20
3.2.3 Total RNA Miktar Tayini	20
3.2.4 RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrofrezisi	20
3.3 Total RNA'dan Revers Transkriptaz ile cDNA Sentezi.....	21
3.4 cDNA Kalıbından Hedef Genlerin Çoğaltılması	22
3.4.1 Dejenere Primer Tasarımı	22
3.4.2 cDNA Kalıbından PCR Reaksiyon Kurulumu ve PCR Döngüleri.....	26
3.4.3 PCR Ürünlerinin PEG Saflaştırılması.....	28
3.4.4 PCR Ürünlerin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	28
3.4.5 DNA Bantlarının Agaroz Jelden Kesilip Alınması.....	29
3.4.6 Jelden Kesilen DNA Bandının Agaroz Jelden Saflaştırılması.....	29
3.5 Klonlamada Kullanılacak <i>E. coli</i> Hattı ile Yapılan Çalışmalar	30
3.5.1 DH5 α ve TOP10 <i>E. coli</i> Suşları.....	30
3.5.2 <i>E. coli</i> Kültürleme Teknikleri	30
3.5.2.1 Luria-Bertani (LB) Medium	30

3.5.2.2 Starter Kültür	31
3.5.2.3 Gliserol Stok Hazırlama	31
3.5.2.4 Gliserol Kültür Stokundan Katı LB Mediuma Geçiş	31
3.5.3 Kimyasal Yöntemle Yetenekli DH5 α <i>E. coli</i> Hücresi Yapma.....	32
3.6 Ligasyon Reaksiyonu	32
3.7 Transformasyon.....	33
3.8 Koloni PCR	34
3.9 Rekombinant Plazmit DNA Ekstraksiyonu.....	34
3.9.1 Rekombinant Plazmit DNA Ekstraksiyonu Manuel Protokol	34
3.9.2 Rekombinant Plazmit DNA Ekstraksiyonu Kit Kullanımı	35
3.9.3 Rekombinant Plazmit DNA'nın PCR Doğrulaması	36
3.10 DNA Dizileme.....	36
3.11 DNA Dizilerinin Analizi	36
4. BULGULAR	37
4.1 <i>APETALA 1 (AP1)</i>	39
4.2 <i>APETALA 2 (AP2)</i>	46
4.3 <i>APETALA 3 (AP3)</i>	52
4.4 <i>PISTILATA (PI)</i>	58
4.5 <i>AGAMOUS (AG)</i>	63
4.6 <i>SHATTERPROOF (SHP)</i>	68
4.7 <i>SEEDSTICK (STK)</i>	73
4.8 <i>SEPALLATA (SEP)</i>	78
4.9 β - <i>ACTIN</i>	88
4.10 18S rRNA.....	93
5. TARTIŞMA- SONUÇ	96
6. KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	111

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
dH_2O	Distile su
g	Relative Centrifugal Force (rcf)
M	Molarite
Ma	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pmol	pikomol
rpm	Revolutions per minute (r/min)
U	Ünite (birim)
V	Volt

Kısaltmalar

CaCl_2	Kalsiyum klorür
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Dietil pirokarbonat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetat
KCl	Potasyum klorür
MgCl_2	Magnezyum klorür
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)

PEG	Polyethylene Glycol
RNA	Ribo nükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris- borik asit EDTA
TE	Tris- EDTA
Tris-HCl	Trizma hidroklorür
UV	Ultraviyole ışık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Model bitki <i>Arabidopsis</i> 'de çiçek organları ve çiçek halkalarının gösterimi...	5
Şekil 2.2 Çiçek organ kimlik genlerinin oluşturduğu ABCDE modeli ve çiçek dörtlüleri	21
Şekil 3.1 pJET1.2 Klonlama Vektör Haritası.....	33
Şekil 4.1 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen APETALA1- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogramı.....	46
Şekil 4.2 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen APETALA2- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	52
Şekil 4.3. <i>T. turcica</i> 'da belirlenen APETALA3- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	57
Şekil 4.4 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen PISTILLATA- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	63
Şekil 4.5 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen AGAMOUS- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	68
Şekil 4.6 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen SHATTERPROOF- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	73
Şekil 4.7 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen SEEDSTICK- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	78
Şekil 4.8 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen SEPALLATA1- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	85
Şekil 4.9 <i>T. turcica</i> 'da belirlenen SEPALLATA3- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

- Çizelge 3.1** *β-ACTIN*, *18S rRNA*, *APETALA1 (AP1)* ve *APETALA2 (AP2)* homologu *T. turcica* çiçek organ meristem genlerini çoğaltmada doğrudan literatürden faydalanarak kullanılmış dejenere primer dizileri23
- Çizelge 3.2** *T. turcica*'dan *APETALA3 (AP3)*, *PISTILLATA (PI)*, *AGAMOUS (AG)*, *SHATTERPROOF (SHP)*, *SEEDSTICK (STK)* ve *SEPALLATA (SEP)* genlerinin çoğaltılmasında kullanılan dejenere primerler.....24
- Çizelge 3.3** cDNA'dan hedef genlerin Füzyon Yüksek Güvenirlikli Polimeraz enzimi ile çoğaltımında kullanılan PCR döngü koşulları.....27
- Çizelge 4.1** *T. turcica* için elde edilen AP1- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....45
- Çizelge 4.2** *T. turcica* için elde edilen AP2- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....51
- Çizelge 4.3** *T. turcica* için elde edilen AP3- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....56
- Çizelge 4.4** *T. turcica* için elde edilen PI- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....62
- Çizelge 4.5** *T. turcica* için elde edilen AG- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....67
- Çizelge 4.6** *T. turcica* için elde edilen SHP- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....72
- Çizelge 4.7** *T. turcica* için elde edilen STK- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....77

- Çizelge 4.8** *T. turcica* için elde edilen SEP1- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....84
- Çizelge 4.9** *T. turcica* için elde edilen SEP3- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.....87
- Çizelge 4.10** *T. turcica* için elde edilen β -ACTIN- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası nükleotid kodları.....92
- Çizelge 4.11** *T. turcica* için elde edilen 18S rRNA- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası nükleotid kodları.....95

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 4.1 Total RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezi.....	37
Resim 4.2 <i>APETALA1 (AP1)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması...	40
Resim 4.3 <i>APETALA2 (AP2)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması...	47
Resim 4.4 <i>APETALA3 (AP3)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması...	53
Resim 4.5 <i>PISTILLATA (PI)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması....	59
Resim 4.6 <i>AGAMOUS (AG)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması....	64
Resim 4.7 <i>SHATTERPROOF (SHP)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması.....	69
Resim 4.8 <i>SEEDSTICK (STK)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması..	74
Resim 4.9 <i>SEPALLATA (SEP)</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması..	79
Resim 4.10 β - <i>ACTIN</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması.....	89
Resim 4.11 <i>18S rRNA</i> benzeri gen homologunun <i>T. turcica</i> 'dan klonlanması.....	94

1. GİRİŞ

Bitkilerin sürgün uçlarında büyümeyi sağlayan meristem doku, uygun koşullarda sürekli olarak yeni kök hücrelerini ve farklılaşmaya gidecek bitki hücre gruplarını üretmektedir (Weigel and Jürgens 2002). Bitkinin belirli bir morfolojik olgunluğa ulaşması, giberellik asit seviyesi, sakkaroz sentezindeki artış, fotoperiyodik sinyaller ve sıcaklık (vernalizasyon) gibi değişik içsel ve dışsal etmenler sürgün meristeminin çiçek meristemi veya çiçek durumuna dönüşmesine neden olmaktadır (Hempel *et al.* 1997, Blazquez *et al.* 1998, Nilsson *et al.* 1998, Blazquez and Weigel 2000, Yanovsky *et al.* 2001, Corbesier *et al.* 2007). Çiçek morfogenezinin genetik ve moleküler temellerinin anlaşılmasında *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida* ve *Oryza sativa* gibi türler model bitkiler olarak kullanılmaktadır (Weigel and Meyerowitz 1994, Fornara *et al.* 2003, Thompson and Hake 2009, Irish 2010).

Arabidopsis çiçek meristemi, dört çiçek halkasında içten dışa doğru sırayla sepal, petal, stamen ve karpel organlarını farklı primordiyalarda üretmektedir. Birinci çiçek halkasında (en dış) ifade olan A- fonksiyonlu *APETALA1* ve *APETALA2* genleri sepal oluşumunu sağlarken, ikinci halkada A- ve B- fonksiyonlu *APETALA3* ve *PISTILLATA* genlerinin birlikte ifade olması petallerin oluşumunu sağlamaktadır. Üçüncü halkada B- ve C-fonksiyonlu *AGAMOUS* genlerinin birlikte ifade olması stamenlerin oluşmasına neden olurken, dördüncü halkada (en içteki) sadece *AG* geninin ifadesi karpellerin oluşumunu belirlemektedir (Bowman *et al.* 1989, Irish and Sussex 1990, Weigel and Meyerowitz 1994). D-fonksiyonlu *SEEDSTICK (STK)*, *SHATTERPROOF* genleri ise *AG* geni ile birlikte tohum taslağının oluşmasını sağlamaktadır (Favaro *et al.* 2003, Pinyopich *et al.* 2003). E-fonksiyonlu *SEPALLATA* genlerinin protein ürünleri, çiçek organ kimliğinin oluşmasında görev alır.

Bununla birlikte, 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. *Pisum sativum*'dan *API*- benzeri *PEAM4* geni (Berbel *et al.* 2001), *Sophora tetraptera*'dan *API*, *PI* ve *AG* genleri (Song *et al.* 2008) ve *Medicago truncatula*'dan *PI* geni (Benlloch *et al.* 2009) klonlanmıştır. Bunlara ilaveten, Hecht vd. (2005)'e göre *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Glycine max* ve *Lotus japonicus* için bazı ifade olmuş sekans parçaları (EST), genom dizi veritabanları ve klonlama-dizi analizi yöntemleri kullanarak birçok *Arabidopsis* çiçeklenme genlerinin büyük oranda legüm bitkilerinde korunduğunu göstermişlerdir.

Türkiye endemiği ve önemli bir gen kaynağı olan *T. turcica*'nın çoklu serbest karpelli çiçek morfolojisinin ekonomik olarak önemli papilionoitlere kazandırılabilme olanaklarının araştırılması gerekmektedir. Bu kapsamda, bir başlangıç çalışması olarak, *T. turcica*'da çiçek organı meristem kimlik (homeotik) genlerinin karakterize edilmesi çoklu serbest karpel oluşumuna neden olan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve aydınlatılmasına katkı sağlamıştır.

Bu bilgiler ışığında, *Arabidopsis*'teki *APETALA1 (API)*, *APETALA2*, *PISTILLATA (PI)*, *AGAMOUS (AG)*, *SEEDSTICK (STK)*, *SHATTERPROOF (SHP)* ve *SEPALLATA (SEP)* genlerinin homologlarının *T. turcica*'da kısmen klonlanması ve yapısal analizleri bu proje önerisi ile ilk defa gerçekleştirilmiştir. Klonlanacak genlerin nükleotid ve amino asit sekanslarının literatürdeki homologları ile karşılaştırılmasıyla gen parçalarının kesinleştirilmesi yapılmıştır. *T. turcica*'daki çoklu serbest karpele sahip çiçek morfolojisinin oluşum potansiyelindeki genlere ait kesin sekans bilgilerine ulaşılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Bitkilerde Çiçeklenme

Bitki meristem dokuları embriyonik özellikte küçük, her yanı eşit büyüklükte hücreler topluluğuna sahiptir. Sadece kök ve gövdeyi oluşturan özelleşmiş doku hücrelerini üretmekle kalmazlar, aynı zamanda kök hücrelerini yani kendilerini de sürekli olarak yenilerler. Gövdeyi ve gövdeye bağlı yanal organları oluşturan sürgün apikal meristem, farklı işlevsel bölgelerden oluşur. Bu bölgeler sadece hücre boyutu ve aktivitesiyle değil aynı zamanda hücre bölünme düzlemlerinin yönlendirilmesiyle de ayırt edilebilir. Sürgün meristemlerinin farklı bazı tipleri; gelişim kökenleri, oluşturdukları lateral organ tipleri ve büyümelerinde genetik olarak programlanmış bir kısıtlama görülmesine ya da kaynaklar izin verdiği sürece büyümeye devam etmesine bakılarak ayırt edilebilir (Taiz and Zeiger 2002).

Bitkilerin sürgün uçlarında büyümeyi sağlayan meristem doku, uygun koşullarda sürekli olarak yeni kök hücrelerini ve farklılaşmaya gidecek bitki hücre gruplarını üretmektedir (Weigel and Jürgens 2002). Bitki çiçek oluşturmak için uyarıldığında vejetatif meristemler doğrudan çiçeğe ait meristeme yani çiçek meristemine dönüşebilirler. Çiçeğe ait meristemler yaprakların yerine, çiçeğe ait organları oluşturmalarından dolayı vejetatif meristemlerden farklıdır. Çiçeklerin işlevsel olarak özelleşen bir dizi gelişmiş yapıyı temsil ettikleri açıktır. Bu özelleşmiş yapılar biçim ve hücre tipi açısından da bitkinin vejetatif kısımlarından farklılık gösterirler. Bu nedenle çiçeklenmeye geçiş sırasında sürgün apikal meristeminde köklü değişiklikler oluşur (Taiz and Zeiger 2002).

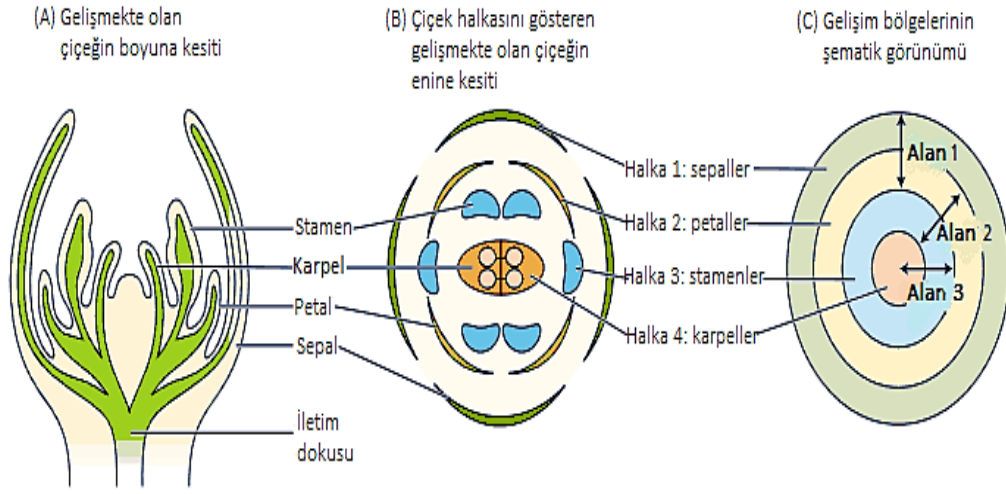
Çiçeklenmenin teşviki genlerin ifade olması ve çiçeklenme durumunun korunması, dışsal ve içsel faktörler tarafından düzenlenir. Bitkinin belirli bir morfolojik olgunluğa ulaşması, giberellik asit seviyesi, apikal meristeme ulaşan sükroz miktarı, vernalizasyon, gün ışığının süre ve kalitesi, yaprak floemlerinden FT proteinin apikal meristeme ulaşması gibi değişik içsel ve dışsal etmenlerin kombinasyonu sürgün meristeminin çiçek durumu veya çiçek meristemine dönüşümünü teşvik eder (Wilson *et al.* 1992, Blazquez and Weigel 2000, Yanovsky *et al.* 2001, Corbesier *et al.* 2007). Bu alanda yapılan birçok çalışma ışığın (gün uzunluğunun ve ışık kalitesinin etkileri) ve

sıcaklığın (vernalizasyon ve ortam sıcaklığının etkileri) çiçeklenmenin ana çevresel düzenleyicileridir. Bununla birlikte, besin durumu, içsel hormon dengesi, stres faktörleri ve bitkinin gelişimsel aşaması da önemlidir. Bu farklılıklar bitki türlerinin belirli yükseltilere ve iklimsel bölgelere adaptasyonunda önemlidir (Hecht *et al.* 2005).

Bitki çiçeklenmeye geçtiğinde sürgün apikal meristemi primer çiçek durumu meristemine yani infloresens meristemine dönüşür. Çiçek meristemi infloresens meristemin dış çevresi üzerinde yanal bir kabartı şeklinde belirginleşir. Bu aşama, çiçeğe özgü gen ifadesinin belirlenebildiği ilk aşamadır (Grandjean *et al.* 2004, Reddy *et al.* 2004, Heisler *et al.* 2005). Çiçekleri üretmek üzere apikal meristemi yönlendiren, sürgün ucunda oluşan olaylar çiçek çıkışı olarak tanımlanır. Floral meristem kurulduktan sonra iyi belirlenmiş aşamalar serisi ile çiçek büyümesi biçimsel tarzda gerçekleşir (Smyth *et al.* 1990).

Her ne kadar floral meristemin farklılaşması ve büyümesini kontrol eden mekanizma hakkında az bilgi mevcut olsa da bazı genlerin yapısal/fonksiyonel analizleri ve birbirleri arasındaki ilişkilerin ortaya konması çiçeklenme ile ilgili bazı bilinmeyen hususları aydınlatmaya başlamıştır. Çiçek morfogenezinin genetik ve moleküler temellerinin anlaşılmasında *Arabidopsis thaliana* L., *Antirrhinum majus* L., *Petunia x hybrida* ve *Oryza sativa* L. gibi türler model bitkiler olarak kullanılmaktadır (Weigel and Meyerowitz 1994, Fornara *et al.* 2003, Thompson and Hake 2009, Irish 2010).

Çiçek meristemleri sepal, petal, stamen ve karpel olmak üzere dört farklı çiçek organının oluşumunu başlatır (Coen and Carpenter 1993). Bu organlar iç içe geçmiş halkalar şeklinde çıkar (Steeves and Sussex 1989, Smyth *et al.* 1990).



Şekil 2.1 Model bitki *Arabidopsis*'de çiçek organları ve çiçek halkalarının gösterimi (Taiz and Zeiger 2002'den alınarak düzenlenmiştir).

Model bitki *Arabidopsis*'de en dış veya birinci halkada dört sepal vardır ve yeşil renklidirler. Bu yapraksı organ çiçek tomurcuğunu korur. Dört beyaz petal ikinci halkada gözlenir ve sepallere alternatif olarak dizilirler. Üçüncü halkada altı adet stamen bulunur ve stamenlerden ikisi diğer dördüne göre daha kısadır. Stamenler; filament ve filamentin uç kısmında bulunan, polen oluşturan anterden oluşur. Merkezdeki dördüncü halka ise; iki kaynaşmış karpelden oluşan ginokeumdur. Ginokeum; iki birleşik karpel sahip bir ovaryumdan oluşmuştur ve döllenme sonrası tohum üretir (Irish 2010). Ginekeum, pistil olarak da adlandırılabilir. Karpellerin her biri çok sayıda tohum taslağı ve kısa stillus içerir.

Normalde apikal meristem sınırsız büyüyen kök hücreleri gibi yapıları vermesine karşın çiçek meristemi sınırlı büyüyerek programlanmış bir farklılık izler. Çiçeğin üretilmesini takiben meristem aktivitesi sonlanır yani çiçeğe ait meristemler sınırlı büyüme gösterirler (Irish 2010).

Çiçek organlarının uyarlanmış yapraklar olduğunu ilk kez 1790'da Goethe tarafından ileri sürülmüştür (Claßen-Bockhoff 2001, Irish 2010). Mevcut bilgiler bu düşünceyi desteklemiştir, aslında yaprak ve yanal sürgün üreten apikal meristemler benzer şekilde çiçek meristemlerini ve çiçek organlarını da üretmektedir (Carles and Fletcher 2003,

Sablowski 2007). Yapılan araştırmalara göre, iek gelişimini kontrol eden bir dizi gen ürünü belirlenmiştir. Çoğu durumda, bu gen ürünleri yanal organların “temel durumu” ile kesişmektedir ve mekanizmada modifikasyonlar yaparak iek dokularını üretmektedir (Irish 2010).

2.2 iek Meristemi Organ Kimlik Genleri ve ABCDE Modeli

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) bitkisinde gerçekleştirilen detaylı genetik analizler çiçeklenme sürecinin aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Küçük, tek yıllık otsu olan *Arabidopsis* ok değişik etkenlere cevap verebilir. *Arabidopsis* fotoperiyot, vernalizasyon ve hormonlara karşı cevaplarda, çiçeklenmenin kontrolünde etkinlik gösteren genel genetik yolların çalışılmasında çok kıymetli bir bitkidir (Amasino 2004, Boss *et al.* 2004, Putterill *et al.* 2004).

Arabidopsis'te yapılan mutasyon çalışmalarında iek gelişimini düzenleyen üç tip genin kimliği ortaya çıkarılmıştır. ieklenmeyi kontrol eden genler işlevlerine göre; iek meristemi kimlik genleri, iek meristemi boyut ve mimarisi genleri (kadastro genleri) ve iek organ meristemi kimlik (homeotik) genleri şeklinde gruplandırılmaktadır (Weiss *et al.* 2005). Meristem kimlik genleri, vejetatif evreden iek durumu ve iek organı meristemlerine geçişi kontrol eder. Bu genler iek organlarının kimliğini belirleyen genlerin ifadesini daha fazla arttıracak şekilde işlev görürler. Bu genlerin bütüncül etkileşimleri, organa özgü ‘gerçekleştirici genleri’ aktive ederek farklı iek organlarına ait kimliğin belirginleşmesine katkı sağlar (Kaufmann *et al.* 2005). iek organının kimliğini belirleyen genler iek organ kimliği genlerini aktive eden ve denetleyen transkripsiyon faktörü proteinleri kodlar (Irish 2010). Kadastro genleri olarak da bilinen iek meristemi boyut ve mimarisi genleri ise; iek organ meristemi kimlik genlerinin ifade yerlerini belirleyici olarak görev yaparlar.

Model bitki sistemlerindeki genomik yöntemlerin avantajıyla birlikte, *Arabidopsis*'den elde edilen bilgilere göre *AGAMOUS-LIKE 20* (*AGL20*), *APETALA1*(*AP1*) ve *LEAFY*(*LFY*) genleri çiçeklenmeye uyarım yollarındaki önemli genlerdir (Irish and

Sussex 1990, Huala and Sussex 1992, Bowman *et al.* 1993, Shannon and Meeks-Wagner 1993).

AGL20 hem içsel hem çevresel uyarılar dahil olmak üzere, farklı metabolik yollardan gelen uyarıları birleştirerek çiçek oluşumunda merkezi bir rol oynar (Borner *et al.* 2000). Bu sebeple, *AGL20* çiçek gelişimini başlatan ana devre olarak iş görmektedir. *AGL20*'nin etkinliği *LFY*'nin ifade olmasını başlatmaktadır. *LFY*' de *API*'in ifade olmasını sağlar (Simon *et al.* 1996). *Arabidopsis*'te *API* ve *LFY* geri besleme mekanizmasıyla çalışır. Yani, *API*'in ifade olması demek aynı zamanda *LFY*'nin de ifade olması için uyarıldığı anlamına gelir.

LEAFY (LFY) floral meristem kimliğinin özelleşmesi için anahtar bir oyuncudur. *LFY* muhtemel çiçek meristemi boyunca başlangıçta çok erken ifade olur ve genin etkinliği floral meristem oluşumunu kontrol eden transkripsiyonel olayların kademeli olarak gerçekleşmesi ile sonuçlanır (Weigel *et al.* 1992, Simon *et al.* 1996). *LFY*'nin başlangıç ifadesinden hemen sonra çiçek meristemi boyunca *API* ifadesi de gözlemlenebilir (Mandel *et al.* 1992, Simon *et al.* 1996, Hempel *et al.* 1997, Wagner *et al.* 1999). Bu durum *LFY*'nin *API*'i doğrudan etkin hale getirdiğini gösterir (Mandel and Yanofsky 1995, Wagner *et al.* 1999). Ciddi *LFY* mutantları çiçek meristemini başlatamazlar ve bunun yerine ikincil infloresans dalları üretirler (Weigel *et al.* 1992). Bunun ötesinde, *LFY* geninin ekotipik ifadesi erken çiçek oluşumunu teşvik eder (Weigel and Nilsson 1995). Bu durum, çiçek meristem kimliğinin özelleşmesinde *LFY* geninin yeterli olduğunu göstermiştir (Maizel *et al.* 2005, Hames *et al.* 2008). *LFY* vejetatif dokularda düşük seviyede ifade olur. Giberellinler ve FT (florigen proteini) yolu aracılığı gibi çiçek teşvik edici sinyallerle cevap olarak *LFY* ifadesi kuvvetli bir şekilde artırılır (Hempel *et al.* 1997, Blazquez *et al.* 1998, Nilsson *et al.* 1998, Wagner *et al.* 1999, Blazquez and Weigel 2000, Eriksson *et al.* 2006, Achard *et al.* 2007, Lee *et al.* 2008).

Homeotik mutasyonlar çiçek organ kimlik genlerinin saptanmasını sağlamıştır. Çiçek organ kimlik genleri çiçek homeotik mutantları olarak keşfedilmiştir. Model bitkilerde yapılan mutasyon çalışmaları transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir dizi homeotik

genin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu mutasyonlar nedeniyle çiçek organlarından bazıları olması gerekenin dışında, yanlış bir yerde oluşur. Örneğin, *APETALA 2 (AP2)* geninde mutasyon oluşmuş bir *Arabidopsis* bitkisi normalde sepallerin oluşması gereken yerde karpelleri, petallerin oluşması gereken yerde ise stamenleri olan çiçekler üretir (Taiz and Zeiger 2002). Homeotik genler klonlanmış transkripsiyon faktörleridir. Transkripsiyon faktörleri diğer genlerin ifade olmasını denetleyen proteinlerdir. Bu transkripsiyon faktörleri özelleşmiş yapıların nerede gelişeceğini belirler. Bu tür genler belirli bir yapı için tüm genetik programı etkinleştiren gelişimle ilgili ana anahtar olarak iş görürler. Yani, bu homeotik genler organlara kimliklerini kazandırır. Bitki homeotik genlerinin çoğu MADS-kutusu genleri olarak bilinen, ilgili bir dizi gen sınıfına aittir.

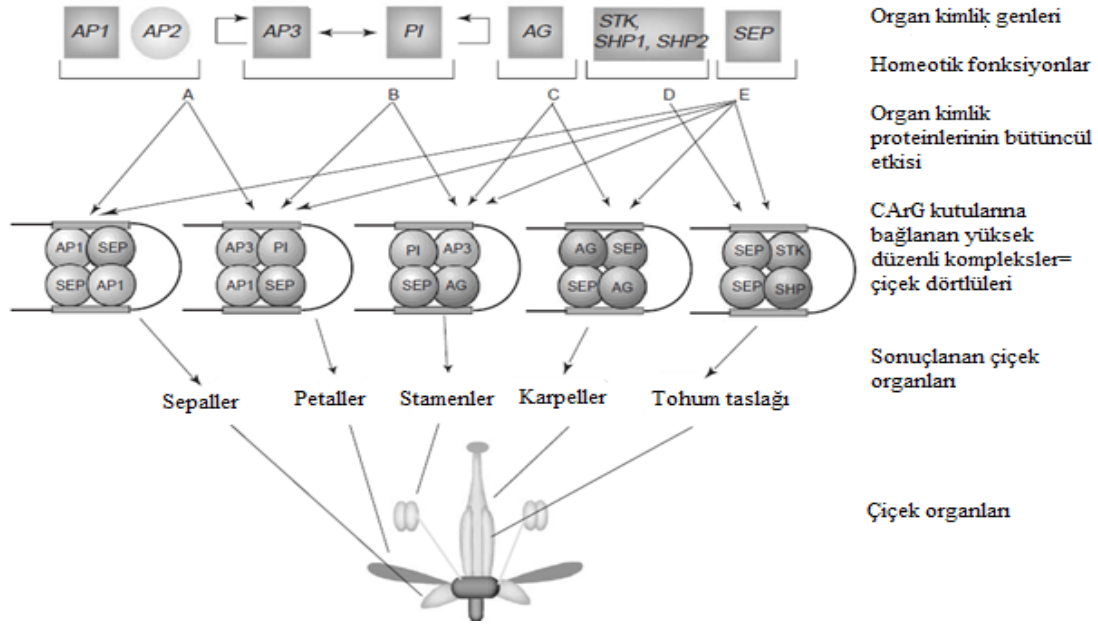
MADS-kutusu genleri birçok bitki, hayvan ve funguslarda sinyal iletim işlevleri veya gelişimin kontrolünde temel rollere sahip olan transkripsiyon faktörü olarak çalışan proteinlerini kodlar (Schwarz-Sommer *et al.* 1990, Messenguy and Dubois 2003). **MADS** adı **MCM1**, **AGAMOUS**, **DEFICIENS** ve **SRF** transkripsiyon faktörleri ailesine ait dört üyeden türetilmiştir.

Arabidopsis'in çiçek organ kimlik genleri, *APETALA2* geni haricinde, MADS kutusu genleridir. MADS kutusu genleri MADS kutusu olarak bilinen karakteristik, korunmuş bir nükleotid dizisini paylaşırlar. MADS kutusu MADS *bölgesi* olarak bilinen bir protein yapıyı kodlar (Kaufmann *et al.* 2005). MADS bölgesi bu transkripsiyon faktörlerinin özel nükleotid dizisine DNA'ya bağlanmalarını sağlar.

Arabidopsis'te beş farklı gen çiçek organının kimliğinin belirlenmesinde rol oynar. Bunlar; *APETALA1 (AP1)*, *APETALA2 (AP2)*, *APETALA3 (AP3)*, *PISTILATA (PI)* ve *AGAMOUS (AG)*'dir (Weigel and Meyerowitz 1994, Taiz and Zeiger 2002). Mutasyonların incelenmesi sonucu çiçek organ kimlik genleri belirlenmiştir. Çiçek organ genlerindeki mutasyonlar bir organdan diğer organa homeotik dönüşümle sonuçlanır. Bu mutasyonların analizleri, çiçek organ kimlik özelleşmesinde klasik "ABC" modelinin formüle edilmesine neden olmuştur (Bowman *et al.* 1991, Coen and

Meyerowitz 1991, Weigel and Meyerowitz 1994). Bu model, her bir organ çeşidinin özel mekansal bir alanda spesifik olarak belirlenmesini sağlar. A sınıfı genlerin ifadesi ilk halkadaki sepal kimliğinin oluşumunu sağlarken, A ve B sınıfı genlerin birlikte çalışması ikinci halkada petal kimliğinin özelleşmesine neden olur. B ve C sınıfı genlerin birlikte aktivitesi ise üçüncü halkada stamen kimliğinin belirlenmesini sağlarken, sadece C sınıfı genlerin ifadesi dördüncü halkada karpel gelişimini belirler (Taiz and Zeiger 2002). *Arabidopsis*'te iki farklı (*AP1* ve *AP2*) A sınıfı geni, iki farklı (*AP3* ve *PI*) B sınıfı geni ve tek (*AG*) C sınıfı geni vardır.

Son yıllarda, genlerin düzenleyici bölgelerine bağlanan kompleks proteinlerin yapısı da göz önüne alınarak ABC modeli 'ABCDE' modeli olarak revize edilmiştir. *Arabidopsis*'te *SEEDSTICK* (*STK*) ve *SHATTERPROOF* (*SHP*) D sınıfı genleri, C sınıfı *AG* ile birlikte tohum taslağının oluşumunu sağlar (Yanofsky *et al.* 1990, Ma *et al.* 1991, Rounsley *et al.* 1995, Angenent and Colombo 1996, Theißen 2000, Favaro *et al.* 2003). E sınıfı *SEPALLATA* genlerinin (*SEP1*, *SEP2* ve *SEP3*) protein ürünleri çiçek organ kimliğinin oluşmasında ve A, B ve C fonksiyonlarının ortaya çıkmasına yardımcı olan proteinler olarak iş görür (Flanagan and Ma 1994, Savidge *et al.* 1995, Mandel and Yanofsky 1998, Pelaz *et al.* 2000). Çiçek organı kimlik gelişimi için ileri sürülen 'ABCDE' gen modeli daha sonra protein temelli 'çiçek dörtlü modeli' ile zenginleştirilmiştir (Theißen 2001, Theißen and Saedler 2001).



Şekil 2.2 Çiçek organ kimlik genlerinin oluşturduğu ABCDE modeli ve çiçek dörtlüleri (Kaufmann vd. (2005)'den alınarak düzenlenmiştir.)

Arabidopsis'de iki A fonksiyonlu gen mevcuttur: *APETALA1* ve *APETALA2*, bu iki genden sadece *API*, MADS-kutulu transkripsiyon faktörünü kodlar (Kater *et al.* 2006). A fonksiyonu olarak *API* ve *AP2*'nin genelde diğer türlerdeki homologlarının sepal ve petal kimliklerinin belirlenmesinde görev almaması bu genlerin rollerinin nispeten yeni bir evrimsel kazanıma sahip olduğunu gösterir (Zik and Irish 2003a, Litt 2007). Bu durum *API* ve *AP2*'nin *Arabidopsis*'de atasal fonksiyona yeni bir düzenlemenin yapıldığını göstermektedir. A fonksiyonuna sahip olan *API*'in sepal ve petal kimliğinin belirlenmesi ve çiçek meristem kimliğinin belirlenmesi gibi genetik olarak birbirinden farklı iki fonksiyonu mevcuttur (Kater *et al.* 2006). *API* sepallerin ve petallerin belirlenmesine katılır ve böylelikle A fonksiyonlu çiçek organı kimlik geni olarak çalışır (Mandel *et al.* 1992). Çiçek meristem kimlik geni olmasının yanı sıra petallerin azalması veya kaybı ve braktelerin sepallere dönüşümlerinin *ap1* mutantlarında gösterildiği gibi *API* doğrudan çiçek organ gelişiminde yer almaktadır (Bowman *et al.* 1991, 1993, Irish and Sussex, 1990).

B fonksiyonlu genler ise *APETALA3* (*AP3*) ve *PISTILLATA* (*PI*) olarak belirlenmiştir. 2. ve 3. halkada yer alan petal ve stamenlerin oluşması aynı şekilde çiçek meristem kimlik genlerinin aktivitesine bağlıdır ve bir takım geri besleme döngülerine maruz kalır (Irish 2010). Petal ve stamen primordiyalarındaki *AP3* ifadesinin çalışması, *LFY* ve *API* ile bağlantılı olarak *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) aktivitesine bağlıdır (Lee *et al.* 1997, Ng and Yanofsky 2001, Chae *et al.* 2008). *API* ile birlikte *LFY* doğrudan *AP3* transkripsiyonunu aktive eder ve bu çiçek özgülüğünü sağlar (Hill *et al.* 1998, Ng and Yanofsky 2001, Lamb *et al.* 2002). *UFO* çok değişik dokularda ifade olurken, çiçekteki ifadesi büyük bir çoğunlukla petal ve stamen oluşumu ile ilişkilidir, buda *AP3* aktivitesi ile bölgesel bir durum almasındandır (Lee *et al.* 1997, Long and Barton 1998, Samach *et al.* 1999).

Her ne kadar *PI* başlangıçta *AP3*'den daha yaygın bir alanda ifade olsa da, otomatik ve çapraz düzenleyici etkileşimler aracılığı ile petal ve stamen primordiyalarındaki *PI* ve *AP3* ifadesi rastlantısaldır, birbirlerinden bağımsızlardır. (Jack *et al.* 1992, 1994, Goto and Meyerowitz 1994). *AP3* ve *PI*, DNA'ya heterodimer olarak bağlanır ve her iki gen ürünlerinin aktivitesi kendilerinin ve diğer gen ifadelerinin muhafaza edilmesinde gereklidir (Jack *et al.* 1992, Goto and Meyerowitz 1994, Riechmann *et al.* 1996). Hetero-dimer iki farklı diziyeye sahip makro-molekülün (DNA:protein veya protein:protein) kovalent olmayan bir bağla bağlanarak oluşturduğu yapıdır. *AP3* durumunda, bu etkileşimler *AP3/PI* heterodimerinin *AP3* düzenleyici elementine doğrudan bağlanması ile gerçekleşir (Hill *et al.* 1998, Tilly *et al.* 1998, Honma and Goto 2000). Petal ve stamen primordiyalarında *AP3* ifadesinin muhafaza edilmesi ayrıca *AG* ve *API*'e bağlıdır (Gomez- Mena *et al.* 2005). Bunun ötesinde *PI* ile bağlantılı olarak *AP3* gen ürünü erken çiçek gelişiminde *API*'in ifadesini negatif düzenler (Sundstrom *et al.* 2006). Birlikte değerlendirilirse, bu pozitif ve negatif geri besleme kontrolleri ABC gen ifadesinin hassaslaştırılması ve muhafaza edilmesi süreçlerini yönetir (Irish 2010).

Arabidopsis'te tek C sınıfı geni bulunmaktadır. *AGAMOUS*, *Arabidopsis*'te çiçek kimliği ve çiçek eşey organı (stamen ve karpel) oluşumu ve gelişimini kontrol eden bir MADS kutusu genidir. *AGAMOUS*'un kelime anlamı erkek ve dişi gametin birleşme

olmadan üremesidir. *AG* transkripsiyon faktörü kök hücre çoğalmasını kısıtlayarak çiçek meristemin sınırlı gelişiminde önemli bir rol oynar (Bowman *et al.* 1989, Yanofsky *et al.* 1990). Vejetatif gelişim sırasında, sürgün apikal meristeminde hücrelerin sürekli çoğalması kök hücre aktivitesinin korunmasına bağlıdır. Bu kök hücre popülasyonunun korunması *WUSCHEL* (*WUS*) gen aktivitesine bağlıdır. *WUS* proteini homeodomain içeren bir transkripsiyon faktörüdür ve sürgün apikal meristeminin organize edici merkezinde ifade olmaktadır. Bu genin ifade olması kök hücre kimliğinin korunması için yeterlidir (Mayer *et al.* 1998, Brand *et al.* 2000, Schoof *et al.* 2000).

LFY'nin önemli rollerinden birisi uygun bir şekilde *AG* ifadesini düzenlemektir. Bu düzenlemenin göreceli zamanlaması önemlidir (Irish 2010). Bu durum, çiçek meristeminin çoğalcı kök hücre aktivitesi ile belirleyici çiçek oluşturması için nihai sonlanması arasında tam bir dengenin sağlanabilmesi için gereklidir (Irish 2010). Çiçek meristemlerinde, *WUS* ve *LFY* proteinleri, *AG* geni düzenleyici bölgesinde yan yana olan yerlere bağlanarak *AG* ifadesinin artmasını sağlarlar (Busch *et al.* 1999, Lenhard *et al.* 2001, Lohmann *et al.* 2001, Hong *et al.* 2003). Bunun tersine, *AG* ifadesinin artışı *WUS* ifadesinin azaltılmasına neden olur, sonuçta kök hücrelerinin çoğalmasında bir azalma, kararlılığın teşviki ile sonuçlanır.

Arabidopsis genomunda *AGAMOUS* (*AG*) benzeri genlerinin dört grubu vardır: *AG*, *AGL1*, *AGL5* ve *AGL11* (Yanofsky *et al.* 1990, Ma *et al.* 1991, Rounsley *et al.* 1995). Bunlardan ilk karakterize edilen *AG*, aslanağzındaki *PLENA* (*PLE*) homologu, çiçek kimliği ile çiçek organları stamen ve karpel kimliği belirlenmesinde *C* fonksiyonu işlevi görür (Yanofsky *et al.* 1990). Daha önceleri *AGL1*, *AGL5* ve *AGL11* olarak adlandırılmış olan sırasıyla *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHATTERPROOF2* (*SHP2*) ve *SEEDSTICK* (*STK*) *Arabidopsis*'in tohum taslağının meyveye dönüşümünde gerekli olan fonksiyonel proteinleri kodlar ve özellikle gelişen tohum taslaklarında ifade olur (Angenent and Colombo 1996, Liljegren *et al.* 2000, Theissen 2000). *AG*, *SHP1*, *SHP2* ve *STK* gibi MADS kutusu genlerinin karpel ve ovül kimliğinin özelleşmesinde de önemli rolleri vardır (Pinyopich *et al.* 2003). Karpel kimliğini teşvik etmedeki görevlerine ek olarak *SHP1* ve *SHP2* olgunlaşan meyvede yan kabuklardaki açılma alanlarının farklılaşmasında da gereklidir (Liljegren *et al.* 2000).

E fonksiyonu taşıyan genler *AGL2*-benzeri genler olarak adlandırılmışlardır. *Arabidopsis*'de *AGL2*, *AGL3*, *AGL4* ve *AGL9* olmak üzere dört çeşit *AGL2*-benzeri gen vardır (Ma *et al.* 1991, Mandel and Yanofsky 1998). *AGL3* bitkinin tüm toprak üstü organlarında ifade olurken, *AGL9* çiçek organ halkalarının ikinci, üçüncü ve dördüncü halkalarına kısıtlanmıştır, *AGL2* ve *AGL4* ise tüm çiçek organı halkalarında ifade olur (Flanagan and Ma 1994, Savidge *et al.* 1995, Mandel and Yanofsky 1998). Çiçek halkalarına özgü *AGL2*-benzeri genleri çiçek organ kimliğinin belirlenmesinde yardımcı protein olarak görev almaktadır. Petal, stamen ve karpel oluşumu ve gelişiminde yardımcı protein olarak görev alan ve çiçek meristeminin sınırsız büyümesinden sorumlu *AGL2*, *AGL4* ve *AGL9* genleri (Pelaz *et al.* 2000) daha sonra sırasıyla *SEPALLATA 1 (SEP1)*, *SEPALLATA 2 (SEP2)* ve *SEPALLATA 3 (SEP3)* olarak adlandırılmıştır. *Arabidopsis*'de *SEP1* ve *SEP2* birbirine çok benzerdir ve muhtemelen bir duplikasyonla oluştuğu düşünülmektedir (Hecht *et al.* 2005). SEP proteinleri A, B ve C proteinleri ile yüksek düzenli kompleks oluşumuna katılır ve bu komplekslerin bazıları yaprakları çiçek organlarına dönüştürebilecek yeterliliktedir (Theissen 2001, Theissen and Saedler, 2001).

SEP1, *SEP2* ve *SEP3* genleri ikinci, üçüncü ve dördüncü halkalarda ifade olurken, *SEP4* tüm çiçek tomurcuğunda ifade olur (Ma *et al.* 1991, Flanagan and Ma 1994, Savidge *et al.* 1995, Ditta *et al.* 2004). Dolayısıyla, çiçeğin farklı bölgelerinde transkripsiyonu teşvik etmek için, SEP proteinleri mekansal olarak kısıtlanmış ABC proteinleri için genel yardımcı faktör olarak işlev görür (Irish 2010). *SEP3*'ün *API* ile birlikte çiçek meristemi kimlik belirlenmesi fonksiyonuna katıldığı bildirilmiştir (Pelaz *et al.* 2001). *SEP3*, *LFY* ile doğrudan fiziksel temas kurarak çiçek organ genleri ve diğer MADS kutusu genlerinin aktivasyonu aracılığı ile çiçek gelişimini teşvik eder (Honma and Goto 2001, Castillejo *et al.* 2005, Immink *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009). *SEP3* aynı zamanda bir *LFY* yardımcı faktörüdür, sadece *AP3* düzenlemesi yapmaz aynı zamanda *PI* ve *AG* aktivitesini de düzenler (Liu *et al.* 2009). *SEP4* ve *API*'in her ikisinin de sepale özgü karakterlerin oluşmasına katkı sağlar, bu da organ kimlik genlerinin rollerini izah eden güzel bir örnektir (Irish and Sussex 1990, Ditta *et al.* 2004). İşlev kaybına uğrayan mutant fenotiplerde gösterildiği gibi *SEP4* meristem kimliğinde

karşılaştırılabilir bir fonksiyona sahiptir (Ditta *et al.* 2004). *SEP4* sadece çiçek organlarında ifade olmaz, tüm toprak üstü vejetatif organda ifade olur, buda bu genlerin çiçeklenme zamanının kontrolü ve diğer olayların kontrolü gibi farklı fonksiyonları yerine getirmesi anlamına gelir (Kaufmann *et al.* 2005)

2.3 MADS Kutusu

Yüksek bitkilerde çiçeklenmenin teşviki ve çiçek oluşumu, genetik ve çevresel faktörlerle kontrol edilen oldukça karmaşık bir süreçtir (Bernier 1988, Yanofsky 1995, Amasino 1996, Levy and Dean 1998). Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ve Aslanağzı (*Antirrhinum majus*) bitkilerinde çiçek meristemi ve çiçek organ meristemi üzerine yapılan moleküler ve genetik çalışmalar çiçek gelişiminin transkripsiyon faktörlerini kodlayan *MADS-kutulu* genler tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. MADS-kutusu genleri birçok bitki, hayvan ve funguslarda sinyal iletim işlevleri veya gelişimin kontrolünde temel rollere sahip olan transkripsiyon faktörü olarak çalışan proteinleri kodlar (Schwarz-Sommer *et al.* 1990, Messenguy and Dubois 2003).

MADS adı *MCM1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS* ve *SRF* transkripsiyon faktörleri ailesine ait dört üyeden türemiştir. Bu genler MADS-kutusu olarak adlandırılan DNA'ya bağlanmada ve protein-protein temasına katılan 60 amino asitlik çok iyi korunmuş ortak bölge bulunduran transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (Kaufmann *et al.* 2005). MADS-kutusuna ek olarak, bu genler yaklaşık 70 amino asitlik zayıf korunan K-kutusu bölgeye sahiptir. Bu bölge protein kıvrım yapısının oluşumunu sağlar. MADS-kutusu genleri amino asit dizilerine, ifade tarzlarına ve fonksiyonlarına göre alt gruplara ayrılırlar.

Hayvan ve funguslarda MADS-domeni proteinleri ARG80/SRF-benzeri (Tip 1) ve MEF2-benzeri (Tip 2) proteinler olmak üzere iki büyük grubu toplanır (Alvarez-Buylla *et al.* 2000, de Bodt *et al.* 2003). Hayvan ve fungus ARG80/SRF-benzeri genleri ile (Theißen *et al.* 1996) K-kutusuna sahip olmayan ve karakterize edilememiş bitki MADS-kutusu genleri Tip I genleri olarak gruplandırılır (Alvarez-Buylla *et al.* 2000, De Bodt *et al.* 2003). Tip II genleri ise hayvan ve fungus MEF2-benzeri genleri ile

bitkilerdeki MIKC-tipi genleri kapsamaktadır (Kaufmann *et al.* 2005). MIKC-tipi genler bitkiler için özeldir (Theissen *et al.* 1996). Dolayısı ile bitki MADS kutusu genleri **MIKC-tipi genler** olarak gruplandırılır.

MICK-tipi MADS-kutulu bitki genleri karakteristik domen yapısına sahiptir. Bu domenler: MADS (**M-**) domen, Intervening (**I-**) domen, keratin-benzeri (**K-**) domen, ve C-terminal (**C-**) domen olarak adlandırılırlar (Ma *et al.* 1991, Theissen *et al.* 1996, Hasebe and Banks 1997, Munster *et al.* 1997).

MICK-tipi MADS-kutulu genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonel bölgeleri DNA ve protein temaslarına katılırlar. En iyi şekilde korunmuş olan MADS-domeni ve daha az korunmuş I-domenleri hedef genlerin düzenleyicisi dizisi **CAR-G-kutusu** ile temas kurma ve proteinlerle dimerizasyon ve bağlanma işlevlerinde aksesuar görevi görür (Shore and Sharrocks 1995, Riechmann and Meyerowitz 1997, Egea-Cortines *et al.* 1999). K-domeni hidrofobik amino asitlerin düzenli aralıklarla iyi korunduğu bir bölgedir. Bu bölge protein dimerizasyonunda görev alan amfipatik heliks oluşumuna katılır (Ma *et al.* 1991, Shore and Sharrocks 1995). K- ve sonrasındaki C-domeni ise diğer proteinler ile temas kurma işlevi görür (Schwarz-Sommer *et al.* 1990, Ma *et al.* 1991, Davies *et al.* 1996). MADS-domenli proteinlerin C- ucundaki uzunluk ve sekans bakımından en az korunmuş olan C-domain ise transkripsiyonel aktivasyonda veya çoklu transkripsiyon faktör kompleksinin oluşumuna katılma görevini yapar (Cho *et al.* 1999, Egea-Cortines *et al.* 1999).

A, B, C, D ve E sınıfı homeotik genlerinin büyük bir çoğunluğu MADS-kutusu gen ailesi üyesidir. Bitkilerde, MADS-kutusu genlerin büyük bir kısmı çiçek meristemi ve çiçek organ gelişiminin kontrol edildiği üreme organlarında ifade olur. Bazı MADS-kutusu genleri çiçek olmayan dokularda ifade olması, bu genlerin çiçek gelişimi ile sınırlı olmadığını gösterir (Kaufmann *et al.* 2005). Günümüze kadar MADS-kutusu genleri *Arabidopsis*'den, çiçeksiz bitkileri de içeren çeşitli bitkilerden klonlanmıştır.

2.4 Legümlerde Çiçeklenme

Fabaceae ailesi genellikle dünyanın tropik ve ılıman bölgelerde yetişen yaklaşık 700 cins ve 18.000 türe sahiptir (Polhill and Raven 1981, Chappill 1995, Doyle 1995, Doyle *et al.* 2000, Tucker 2003). Birçok legüm çiçeği beş sepal, beş petal, iki halkada beşer stamen ve tek karpel bulunduran beşli temel plana sahiptir, yani legüm çiçekleri toplamda 21 çiçek organına sahiptir (Tucker 2003). Papilionoideae'nin çiçek durumu, çiçeklerinin sırayla oluşup geliştiği rasemöz şeklindedir ve çiçekler genellikle zigomorftir. Bununla birlikte Papilinooidlerin *Sophoreae* ve *Swartzieae* oymaklarında radyal çiçek simetrisi, farklı korolla yapısı, bazı petallerin kaybolması, çok sayıda stamen bulunması ve stamen füzyonunda eksiklikler legüm çiçeklerinde gözlenen istisnai durumlardır (Tucker 2003). Çiçeklenme teşviki ve gelişiminde çiçek meristemi ve çiçek organı kimlik genlerinin fonksiyonu için olan ABC modeli legümleri kapsarken, bu model çiçek organlarının ne zaman ve hangi sırada gelişmeye başladığını açıklamada yetersizdir (Tucker 2003).

Legümlerde çiçek organlarının oluşum sırasında karpel oluşumunun petal veya stamenler ile birlikte başlaması, çiçek organlarının farklı halkalar içinde oluşabilmesi ve çiçek organların ortak bir primordiyadan gerçekleşmesi ABC modelinin geliştirildiği Arabidopsis'in çiçeklenmesinden farklı olduğunu göstermektedir (Meyerowitz *et al.* 1991, Irish 1999, Jack 2001, Tucker 2003). Aslanağazı (*Antirrhinum*), petunya (*Petunia hybrida*), domates (*Lycopersicon esculentum*), arpa (*Hordeum vulgare*) ve çeltik benzeri türlerde gerçekleştirilen birçok çalışma çiçekle ilgili gen aileleri ve/veya bireysel genlerin fonksiyonel ve filogenetik analizinin tanımlanmasına yönelik bilgiler sağlamıştır (Carmel-Goren *et al.* 2003, Griffiths *et al.* 2003, Hayama *et al.* 2003, Vandenbussche *et al.* 2003). Bununla birlikte; legümlerde çiçeklenmenin moleküler analizi oldukça dar bir çerçevede kalmıştır. Bazı MADS-kutulu çiçek meristemi ve çiçek organ kimlik genlerinin izolasyon ve karakterizasyonu *Pisum sativum* (Berbel *et al.* 2001, Hecht *et al.* 2005), *Glycine max* (Hecht *et al.* 2005), *Medicago truncatula* (Hecht *et al.* 2005, Benlloch *et al.* 2009), *Lotus corniculatus* (Hecht *et al.* 2005, Dong *et al.* 2005) ve *Sophora tetraptera* (Song *et al.* 2008) gibi legüm bitkilerinde çalışılmıştır.

2.5 *Thermopsis turcica* Çiçek Yapısı

Papilionoideae 30 oymak, 455 cins ve yaklaşık 12.000 türle Fabaceae'nin en geniş alt ailesidir (Tucker 2003). Bu alt ailenin *Thermopsidae* oymağına ait olan *Thermopsis* R. Br. genusunda yaklaşık 25 tür bulunmaktadır (Wojciefowski 2003). Bu türler genellikle Orta Asya ve Kuzey Amerika'nın dağlık nemli bölgelerinde doğal yayılış göstermektedir (Dement and Marby 1975, Davis *et al.* 1988). Tıbbi bitki olarak kullanılan *Thermopsis* türleri alkaloid ve flavonoid bakımından zengindirler (Dement and Mabry 1975). Ayrıca süs bitkisi olarak da kullanılmaktadırlar (Asilbekova 2004, Lockhart 2005). *Thermopsis* R. Br. genusunun Türkiye'deki tek temsilcisi endemik *Thermopsis turcica*, Kit Tan, Vural and Küçüködük'tür (Tan *et al.* 1983, Davis *et al.* 1988). *T. turcica*, Eber Gölü güneyi ve Akşehir Gölü'nün güney-batı kıyıları arasında oldukça dar bir bölgede yayılış göstermektedir. IUCN kriterlerine göre *T. turcica* yabancı türü kritik seviyede tehdit (CR) altındadır (Ekim *et al.* 2000). Bununla birlikte, çiçek gelişiminde 3-4 serbest karpel sahip olması yaklaşık 18.000 legüm türü içinde *T. turcica*'yı olağan dışı bir bitki türü yapmaktadır. Papilionoideae alt ailesi için çoklu serbest karpel yapısı, diğer bir ifade ile aynı çiçekten çok karpelli serbest meyve durumu, sadece *T. turcica* için rapor edilmiştir (Tan *et al.* 1983). Bu morfolojik özelliğin ekonomik olarak önemli olan fasulye, soya fasulyesi ve bezelye gibi diğer papilionoidlere de kazandırılabilmesi olanaklarının araştırılması heyecan verici bir düşüncedir.

Keşfedildiğinden bu yana *T. turcica* bitkisi bazı biyolojik ve kimyasal araştırmalara Şener vd. (1992), Cenkci vd. (2007), Özdemir vd. (2008), Cenkci vd. (2008), Cenkci vd. (2009), Korcan vd. (2009) tarafından konu edilmiş olsa da bu bitki ile yapılan herhangi bir moleküler genetik araştırması mevcut değildir. Türkiye'nin gen kaynaklarından birisi olan endemik *T. turcica*'nın 3-4 serbest karpel oluşumu özelliğini kontrol eden moleküler mekanizmanın veya mekanizmaların aydınlatılması önem arz etmektedir. Bu araştırmada, *AG*, *AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI*, *STK*, *SHP1* ve *SEP* gibi MADS-kutulu (*AP2* haricinde) çiçek meristemi ve/veya çiçek organı kimlik genlerine ait kısmi nükleotid ve protein dizilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu genlere ilaveten, canlı dokularda sürekli ifade olduğu bilinen β -Actin ve 18SrRNA genlerinin *T.turcica*'dan kısmi klonlanması 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. Bu tezden üretilen bulgular ilgili projenin devamında kullanılacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Bitki Materyali

Eber Gölü güney kıyılarında koruma alanı içerisinde bulunan *Thermopsis turcica* popülasyonundan çiçeklenme döneminde 28.04.2013 tarihinde bitki örnekleme yapılmıştır. Çiçekli bitkiler toprağa yakın bölgelerinden kesilerek suya ıslatılmış şekilde Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bitki Moleküler Biyolojisi laboratuvarına transfer edilmiştir. Çiçek tomurcukları birer gram olacak şekilde gruplandırıldıktan sonra alüminyum folyolara sarılmıştır. Ayrıca, çiçeklere ait sepal, petal, stamen ve karpel organları tartılarak ayrı gruplar halinde örneklendirilmiştir. Bitki örnekleri sıvı azotta ani dondurma işleminden sonra -86°C ayarlı ultra derin dondurucuda çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır. Örnekleme işlemleri çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2 *Thermopsis turcica* Çiçek Tomurcuğundan Total RNA İzolasyonu

3.2.1 Total RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonunda kullanılan ortam, beç, cihazlar ve sarf malzemeler RNaseZap™ (Ambion), %75 etanol, yoğun kıvamlı çamaşır suyu ve UV lambası kullanılarak RNaz enzimlerinde arındırılmış ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Ayrıca; çalışmalar sırasında da aynı koşullar sabit tutularak RNaz kontaminasyonu engellenmeye çalışılmıştır.

RNA ekstraksiyonu daha önceden dondurulmuş birer gram tomurcuk dokusundan PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion) RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özetle; 1 gram tomurcuk dokusu RNaz'dan arındırılmış havan ve eli kullanılarak iyice öğütüldükten sonra 150-190 mg dövülmüş doku steril ependorf tüpüne aktarılmıştır. 1 mL Liziz tamponu eklendikten sonra özüt 15 saniye vortekslenmiş ve daha sonra 26 000 x g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Temiz bir tüpe aktarılan süpernatanta yarı hacim absolut etanol eklenerek vortekslenmiştir. RNA homojenatı spin kartuşa yüklendikten sonra, oda sıcaklığında 12

000 x g'de 20-30 saniye santrifüjlenmiştir. Kartuş; Yıkama Tamponu I ve II kullanılarak temizlendikten sonra steril ependorf tüpe yerleştirilmiştir. Total RNA, 100 µL RNaz içermeyen su ile 12 000 x g'de 2 dakika santrifüjlenerek elüte edilmiştir.

3.2.2 DNaz Uygulanması

Total RNA ekstraksiyonun hemen sonrası, RNA ekstratlarına DNA-free™ DNase (Ambion) kiti kullanılarak ekstradaki muhtemel DNA'lar DNaz uygulaması ile temizlenmiştir. 100 µL RNA ekstratesine 10 µL DNazI Tamponu ve 1 µL rDNaz eklenmiştir ve nazikçe karıştırılmıştır. Karışım, 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 inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 000 x g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant temiz bir ependorf tüpe aktarılmıştır.

3.2.3 Total RNA Miktar Tayini

Total RNA miktar tayini Qubit™ (Invitrogene) cihazı kullanılarak yapılmıştır. 1-20 µL RNA örneği Qubit™ çalışma solüsyonları ile ölçüme hazırlanmıştır ve ölçüm yapılmıştır. Total RNA ekstratları aliyotlara ayrıldıktan sonra -86°C ultra derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.4 RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

RNA elektroforezinde kullanılan jel elektroforez sisteminin parçaları (jel tankı, jel tablası ve taraklar) sırasıyla %0,01 SDS, %3 hidrojen peroksit ve DEPC-uygulanmış su ile RNaz kirliliğinden temizlenmiştir. 10x MOPS tamponu (200 mM MOPS, 20 mM NaOAc ve 10 mM EDTA; pH 7,0), DEPC-uygulanmış su ile hazırlanmıştır. RNA örneklerinin yükleneceği %1 agaroz içeren jel hazırlamak için 1 g agaroz, 72 mL DEPC-uygulanmış distile H₂O ve 10 mL 10x MOPS tamponu ile karıştırıldıktan sonra mikrodalga ısıtmasıyla eritilmiştir. Agaroz eriği 60°C su banyosuna soğutulmuştur. 18

mL %37 formaldehit agaroz eriyiğine eklendikten sonra, eriyik jel tablasına dökülmüş ve oda sıcaklığında katılaşması sağlanmıştır. Elektroforez yürütme tamponu olarak 1x MOPS tamponu (1L'si için; 100 mL 10x MOPS tamponu ve 20 mL %37 formaldehit ile son hacim 1000 mL olacak şekilde DEPC-uygulanmış dH₂O ile hazırlanmıştır) kullanılmıştır. RNA örnekleri ve RNA ladder (Thermo Scientific) 2x RNA yükleme tamponu (%95 formamide, %0,025 SDS, %0,025 bromophenol blue, %0,025 xylene cyanol FF, %0,025 ethidium bromide ve 0,5 mM EDTA) ile karıştırıldıktan 70°C'de 10 dakika ısıtılmış, daha sonrasında 3 dakika buz üzerinde soğutulmuştur. Örnekler jele yüklendikten sonra yürütme işlemi 45 dakika boyunca 45 mA'de yapılmıştır. RNA bantlarının görüntülenmesi Gen Box SDR Jel Dökümantasyon Sistemi ile yapılmıştır. RNA bantların değerlendirilmesinde GeneTools paket programı kullanılmıştır.

3.3 Total RNA'dan Revers Transkriptaz ile cDNA Sentezi

T. turcica çiçek tomurcuklarından elde edilen total RNA, Advantage® RT-for PCR (Clontech) kiti kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüş ve -86°C'de saklanarak cDNA sentezinde çalışılacak total RNA örnekleri ile çalışmada RNaz kontaminasyonundan uzak steril koşullar sağlanmıştır. Advantage® RT-for PCR kiti bileşenleri buz üzerinde eritilmiştir ve tüm reaksiyon kurulumu buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon kurulumunda kit üreticisi firmanın yönlendirmeleri dikkate alınmıştır. Özetle, 0,2 mL ince cidarlı steril PCR tüpünde; 1 µg total RNA, 12,5 µL son hacim olacak şekilde DEPC-uygulanmış su ve 1 µL oligo (dT)₁₈ primeri (son konsantrasyon 10 µM) eklenmiştir. Karışım 70°C'de 2 dakika ısıtıldıktan hemen sonra buz üzerine alınmıştır. Bir başka steril bir tüpte 4 µL 5X reaksiyon tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 1 µL dNTP (her bir dNTP'den 1 mM), 0,5 µL rekombinant RNaz inhibitörü (40 U) ve 1 µL MMLV Reverse Transkriptaz (200 U) ile hazırlanan karışım total RNA içeren tüpe aktarılmıştır. Tüp bileşenlerini nazikçe karıştırılmıştır. cDNA sentezi reaksiyonu tüplerin thermal cycler cihazında (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler) 42°C'de 1 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İleri enzim aktivitesinin engellenmesi için örnekler 94°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon hacmi DEPC uygulanmış su ile 100 µL'ye tamamlandıktan sonra, karışımdan 25 µL alikotlar hazırlanarak, PCR reaksiyonunda kullanılmaya kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir. Her bir cDNA sentezinde, kit bileşenlerinin doğru çalıştığını kontrol amaçlı olarak,

Advantage® RT-for PCR kiti ile verilmiş olan Fare Karaciğeri total RNA'sı ile de cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.4 cDNA Kalıbından Hedef Genlerin oğaltılması

3.4.1 Dejenere Primer Tasarımı

Bu alışmada, *Arabidopsis thialana* model bitkisine ait iek organ kimlik gen homologlarının Türkiye endemiği yabani *Thermopsis turcica* iek tomurcuklarından kısmi klonlanması ve dizi analizi hedeflenmiştir. Bu amaçla, ilgili genlere ait gen parçalarının *T. turcica*'dan izole edilmesi ve sekanslanması için her bir gene ait ileri ve geri dejenere primer çifti kullanılmıştır. Bazı genlere ait dejenere primer dizileri literatürden temin edilmiştir (izelge 3.1) (Song *et al.* 2008, Vahala *et al.* 2000). Diğerleri için ise, ya literatürde kullanılan primerler ile başarılı sonuçlar alınamamıştır ya da bu genlere ait dejenere primer dizeleri literatürde bulunamamıştır. Bu nedenle, ilgili genlere ait dejenere primerlerin tasarlanması tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Süleyman CENKCI tarafından yapılmıştır. İlgili çalışmanın bir zeti verilmiştir (izelge 3.2). Çalışmadaki hedef genlerinin her biri için özellikle legüm bitki türlerinden şimdiye kadar elde edilmiş sekanslar BLAST (Altschul *et al.* 1997) ve CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994, Jeanmougin *et al.* 1998) programları ile karşılaştırılarak, dejenere primer tasarımında kullanılabilecek ortak amino asit dizileri belirlenmiştir. Bu kapsamda, dejenere primer tasarımında: The National Center for Biotechnology Information (İnt. Kyn. 1) web sitesinden protein veri tabanı, nükleotid veri tabanı, BLAST analizleri (İnt. Kyn. 2) ve ClustalW (İnt. Kyn. 3) programı primer tasarımında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 β -ACTIN, 18S rRNA, APETALA 1 (AP1) ve APETALA 2 (AP2) homologu *T. turcica* çiçek organ meristem genlerini çoğaltmada doğrudan literatürden faydalanarak kullanılmış dejenere primer dizileri.

Gen Adı	İleri Dejenere Primer Dizisi (5'→3')	Geri Dejenere Primer Dizisi (5'→3')	PCR'da Çoğalacak Bölgenin bp Sayısı	Kaynakça
<i>APETALA 1</i>	AP1F1: GGTAGRGTNCARYTGAAGMG	AP1R1:GAGTCAGDTCVAGMTCRTTCC	667	Song <i>et al.</i> 2008
<i>APETALA 2</i>	AP2F2: CAGTAYMGMGGYGTACNTT	AP2R1: CRAAGTTGGTNACNGCNTCYT	447	Vahala <i>et al.</i> 2001
β -ACTIN	β ACF1: TGAAGGAAAAACATGCSTAYAT	β ACR1:KGAACCACCACTCAAMACAATG	276	Song <i>et al.</i> 2008
18S rRNA	18SF1: TACCGTCCTAGTCTCAACCATAA	18SR1: AGAACATCTAAGGGCATCACA	450	Song <i>et al.</i> 2008

Çizelge 3.2 *T. turcica*'dan *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*), *AGAMOUS* (*AG*), *SHATTERPROOF* (*SHP*), *SEEDSTICK* (*STK*) ve *SEPALLATA* (*SEP*) genlerinin çoğaltılmasında kullanılan dejenere primerler. *AP3*, *PI*, *AG*, *SHP*, *STK* ve *SEP* gen homologlarının bazı legüm bitkilerinde belirlenmiş ve gen bankasına teslim edilmiş nükleotit ve protein dizilerine ait kodlar, bu dizilerin kullanılmasıyla elde edilmiş dejenere ileri ve geri primer dizleri ve PCR'da beklenen DNA parçası ebatları çizelgede belirtilmiştir.

Gen Adı	Bitki adı	NCBI nükleotit dizi kodu	NCBI protein dizi kodu	5'→3' İleri Primer Dizisi	5'→3' Geri Primer Dizisi	PCR'da çoğalacak bölgenin bç sayısı
<i>APETALA 3</i> (<i>AP3</i>)	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XM_002877924.1	XP_002877970.1	AAGAAGGCNAA YGARCTCACA AP3F3:	ATCACNGACTC RTACTCCCTCC AP3R2:	480
	<i>Lotus corniculatus</i>	AY770400.1	AAX13301.1			
	<i>Medicago truncatula</i>	XM_003603673.1	XP_003603721.1			
	<i>Medicago sativa</i>	L41727.1	AAB48660.1			
	<i>Glycine max</i>	NP_001236857.1	NM_001249928.2			
	<i>Glycine max JCVI</i>	BT089362.1	ACU13442.1			
	<i>Glycine max</i>	XM_003523613.1	XP_003523661.1			
<i>PISTILLATA</i> (<i>PI</i>)	<i>Cicer arietinum</i>	XM_004500904.1	XP_004500961.1	GGMAAGATHGA GATMAAGMRG PIF1:	GTTCTCRTGYTT NGCRTCC PIR2:	249
	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002871931.1	XP_002871931.1			
	<i>Medicago truncatula</i>	FJ403468.1	ACJ36228.1			
	<i>Pisum sativum</i>	AY842491.1	AAW29099.1			
	<i>Sophora tetraptera</i>	DQ418762.1	ABD78856.1			
	<i>Lotus japonicus</i>	BT145660.1	AFK45454.1			
	<i>Glycine max</i>	NM_001248456.1	NP_001235385.1			
<i>AGAMOUS</i> (<i>AG</i>)	<i>Cicer arietinum</i>	XM_004502480.1	XP_004502537.1	TCAAGMGATH GARAACACNAC AGF2:	RGAGCGAATYC KRCTDATTCC AGR3:	402
	<i>Lotus japonicus</i>	AY770399.1	AAX13300.1			
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_118013.2	NP_567569.3			
	<i>Medicago truncatula</i>	XM_003629829.1	XP_003629877.1			
	<i>Pisum sativum</i>	AY884291.1	AAX69069.1			
	<i>Cicer arietinum</i>	XM_004504201.1	XP_004504258.1			
	<i>Lotus japonicus</i>	AY770403.1	AAX13304.1			
<i>Glycine max</i>	NM_001255240.2	NP_001242169.1				
<i>Cicer arietinum</i>	XM_004507231.1	XP_004507288.1				
<i>Pisum sativum</i>	AY884290.1	AAX69068.1				

Çizelge 3.2 Devamı

Gen Adı	Bitki adı	NCBI nükleotit dizi kodu	NCBI protein dizi kodu	5' → 3' İleri Primer Dizisi	Geri Primer Dizisi	PCR'da çoğalacak bölgenin bç sayısı
<i>SHATTERPROOF (SHP)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY727644.1	AAU82054.1	TCAAGMGATHG ARAACACNAC AGF2:	ATTCTGATRTCT CGAATYTG SHPRI:	296
	<i>Pisum sativum</i>	AAX69070.1	AAX69070.1			
	<i>Medicago biflora</i>	JX297571.1	AGK25050.1			
	<i>Medicago polyceratia</i>	JX297567.1	AGK25046.1			
	<i>Medicago truncatula</i>	JX308825.1	AFU81372.1			
	<i>Lotus japonicus</i>	AY770404.1	AAX13305.1			
	<i>Medicago papillosa</i>	JX297564.1	AGK25043.1			
<i>SEEDSTICK (STK)</i>	<i>Glycine max</i>	NM_001253171.1	NP_001240100.1	TCAAGMGATHG ARAACACNAC AGF2:	TTAAGYTCCTTCA CNGTCARNGT STKRI:	350
	<i>Phaseolus lunatus</i>	JF411953.1	AEO89559.1			
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_117064.6	NP_192734.1			
	<i>Glycine max</i>	NP_192734.1	XM_006580850.1			
	<i>Glycine max</i>	XM_006580849.1	XP_006580912.1			
	<i>Glycine max</i>	XM_006578948.1	XP_006579011.1			
	<i>Soybean</i>	BT091029.1	ACU15109.1			
<i>SEPALLATA (SEP)</i>	<i>Lotus japonicus</i>	BT145175.1	AFK44969.1	GTNGARYTNA ARAGGATAGA GA SEPRI:	GATCAGCTAA YTGRTCCAGC AT SEPRI	441
	<i>Cicer arietinum</i>	XM_004499510.1	XP_004499567.1			
	<i>Lotus corniculatus</i>	AY770405.1	AAX13306.1			
	<i>Medicago truncatula</i>	XM_003597987.1	XP_003598035.1			
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KF033750.1	AGV54737.1			
	<i>Glycine max</i>	NM_001251367.1	NP_001238296.1			
	<i>Cicer arietinum</i>	XM_004507231.1	XP_004507288.1			
<i>Medicago truncatula</i>	BT142512.1	AFK42306.1				
<i>Pisum sativum</i>	AY884290.1	AAX69068.1				
<i>Medicago polyceratia</i>	JX390717.1	AFU81295.1				
<i>Medicago truncatula</i>	XM_003621471.1	XP_003621519.1				

3.4.2 cDNA Kalıbından PCR Reaksiyon Kurulumu ve PCR Döngüleri

Yüksek güvenilirlikli Füzyon DNA polimeraz (Thermo Scientific) ve *Taq* DNA Polymerase (recombinant) (Thermo Scientific) şeklindeki iki farklı polimeraz enzimi PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır. cDNA sentezi sonrası klonlamada kullanılacak PCR ürününün çoğaltılmasında yüksek güvenilirlikli Füzyon DNA polimeraz kullanılmışken, klonlama sonrası klonların doğru insört DNA'yı içerdiğini göstermek için yapılan koloni PCR ve plazmit DNA ekstraksiyonu sonrası rekombinant plazmidi kontrol için kullanılan PCR'da normal *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu nedenle, iki farklı PCR reaksiyon kurulumu ve PCR döngü programı çalışmalarda kullanılmıştır.

Total RNA özütünden elde edilen cDNA ürünü tüm hedef genlerin çoğaltılmasında kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Her bir hedef gen için standart olarak 5 X 50 µL PCR reaksiyon karışımı hazırlanmış ve her bir reaksiyon için 5 µL cDNA kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Her bir PCR reaksiyonu 0,2 mL ince cidarlı PCR tüplerinde 50 µL toplam reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. 50 µL PCR karışımı; 1x Füzyon HF tamponu, 0,5 µM gene özgü dejenere ileri primeri, 0,5 µM gene özgü dejenere geri primeri, 3,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP karışımı (her bir dATP, dTTP, dGTP ve dCTP için 50 µM), 1 U Füzyon Yüksek Güvenirlikli DNA Polimeraz (Thermo Scientific), 5 µL cDNA ve 50 µL son hacim olacak şekilde dH₂O'dan oluşmuştur. PCR döngüleri BIO-RAD C1000 Touch Thermal Cycler (USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. cDNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı tüm hedef genlerin çoğaltımına yönelik olan PCR döngüleri verilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 cDNA'dan hedef genlerin Füzyon Yüksek Güvenirlikli Polimeraz enzimi ile çoğaltımında kullanılan PCR döngü koşulları

Gen Adı	Başlangıç Denatürasyon	1.Aşama: 5x, saniyede 1 °C artış veya azalış			2. Aşama: 35x			Son Polimerizasyon
		Denatürasyon	Primer bağlanma	Polimerizasyon	Denatürasyon	Primer bağlanma	Polimerizasyon	
<i>API</i>			55.4°C, 45s			60.4°C, 30s		
<i>AP2</i>			55.5°C, 45s			50.5°C, 30s		
<i>AP3</i>			59.5°C, 45s			64.5°C, 30s		
<i>PI</i>			55.6°C, 45s			60.6°C, 30s		
<i>AG</i>	98°C, 60s	98°C, 10s	58.8°C, 45s	72°C, 45s	98°C, 10s	63.8°C, 30s	72°C, 30s	72°C, 8 dk
<i>SHP</i>			52.1°C, 45s			57.1°C, 30s		
<i>STK</i>			58.9°C, 45s			63.9°C, 30s		
<i>SEP</i>			51.6°C, 45s			56.6°C, 30s		
<i>β-Actin</i>			57.1°C, 45s			62.1°C, 30s		

3.4.3 PCR Ürünlerinin PEG Saflaştırılması

PCR reaksiyon hacminin 2 katı hacimde saf ve soğuk etanol eklendikten sonra örnek tüp 5 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Yüksek hızda ve 4°C'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant tüpten uzaklaştırılmıştır. Çökelti, 32 µL çok saf su ile çözüldükten sonra 8 µL 5 M NaCl (son konsantrasyon 0,5 M) ile karıştırılmıştır. Tüpe 40 µl %22'lik PEG 8000 eklenerek karıştırılmıştır (son konsantrasyon %11 PEG; 180 bp'den büyük DNA fragmentlerini çökeltecektir). Tüpler buz üzerinde en az 20 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra pellet, 20 µL 0,3 M sodyum asetat (NaOAc) çözün ve 2,5 hacimli %95'lik etanol ekleyip karıştırılmıştır. 15 dakika buz üzerinde bırakılan tüpler mikrofüjde 15 dakika spin edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 250 µL %70'lik etanol ile yıkanmıştır. 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 3 dakika kuru havada bırakarak kurutulmuştur. DNA pelleti 20 µL deiyonize su eklenerek çözülmüştür. Alternatif olarak, aynı hedef gen için cDNA kalıbı ile kurulmuş 250 µL total hacimli PCR ürünü GeneJET™ PCR Purification Kit (ThermoScientific) kullanılarak hem saflaştırılmış hem de konsantre edilmiştir. Özetle; PCR karışımına 1:1 hacimde Bağlama Tamponu eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışım GeneJET™ saflaştırma kolonuna transfer edildikten sonra 12 000 x g'de 30-60 saniye santrifüj edilmiştir. Yıkama Tamponu kullanılarak GeneJET™ saflaştırma kolonu temizlendikten sonra, kolon steril ependorf tüpe yerleştirilmiştir. Kolona, 30 µL steril distile su eklenerek 12 000 x g'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA elüte edilmiştir. Saflaştırılmış ve konsantre edilmiş PCR ürünü ya aşağıda tarif edildiği gibi hemen agaroz jel elektroforezde yürütülmüş ya da kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.4.4 PCR Ürünlerin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR reaksiyonundan elde edilen ürün 6X yükleme tamponu (10 mM Tris-HCl pH 7,6, %0.03 ksilensiyonol FF, %60 gliserol, 60 mM EDTA) karıştırılmıştır. 1X TBE (88 mM Trizma base, 88 mM borik asit ve 2 mM EDTA) ve 5 µL (100 mL agaroz jelle) RedSafe nükleik asit boyama çözeltisi (20 000X) (INtRON BIOTECHNOLGY) ile %1.8 agaroz

jel hazırlanmıştır. PCR saflaştırma ürünleri ve 100 bp DNA ladder (Fermantas GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus, 10 mM Tris-HCl; pH 7,6, 1 mM EDTA) markörü agaroz jele yüklenmiştir. DNA örnekleri yürütücü tampon çözeltisi (1x TBE) bulunan jel tankı içerisinde (Consort Model, Belçika) 90 voltta 75 dakika yürütülmüştür. DNA bantlarının görüntülenmesi Gen Box SDR Jel Dökümantasyon Sistemi ile yapılmıştır. DNA bantların özellikle ebat değerlendirilmesinde GeneTools paket programı kullanılmıştır.

3.4.5 DNA Bantlarının Agaroz Jelden Kesilip Alınması

Agaroz jel üzerindeki DNA bantlarının görüntüsü UV ışığı altında hızlıca belgelenmiştir. İstenilen boyuttaki DNA parçalarının varlığı belirlendikten sonra, UV ışığı altında DNA bandının çevresi temiz bir jilet yardımıyla hızlıca çevrelenmiştir. DNA bandını içeren jel parçası daha sonra normal ışık altında çıkarılıp alınmıştır. UV ışıkla çalışırken eldiven, önlük ve özel koruyucu gözlük giyilmiştir. Downstream uygulamaları engellememesi ve DNA'da kalıcı bir hasarın oluşmaması amacıyla; kesilip-alınması sırasında DNA'nın UV ışığına maruz kalma süresi minimum (1 dakikadan az bir süre) tutulmuştur. Agaroz jelden ilgili DNA parçasının alınması sonrası jel tekrar fotoğraflanmıştır.

3.4.6 Jelden Kesilen DNA Bandının Agaroz Jelden Saflaştırılması

GeneJET™ Gel ekstraksiyon kiti (ThermoScientific) kullanılarak ilgili DNA parçası, agaroz jelden izole edilmiştir. İlgili DNA parçasını bulduran jel tartılarak temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Jel üzerine 1:1 (w/v) oranda Bağlama Tamponu eklendikten sonra, karışım 60°C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve agaroz jelin erimesi sağlanmıştır. Sıvılaştırılmış agaroz jel çözeltisi GeneJET saflaştırılma kolonuna eklenmiştir. 1 dakika 12 000 x g'de santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 700 µL Yıkama Tamponu kolona transfer edilmiş ve aynı santrifüj koşullarında santrifüj edilmiştir. Dipte toplanan sıvı tekrar uzaklaştırıldıktan sonra, kolon temiz bir ependorf tüpe yerleştirilmiş ve üzerine 30-50 µL elüsyon

tamponu eklenerek 1 dakika santrifüj edilmiştir. GeneJET saflaştırma kolunu atılarak, saflaştırılan DNA'nın miktar tayini Qubit™ cihazı ve kiti kullanılarak yapılmıştır. DNA ligasyon reaksiyonunda kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.5 Klonlamada Kullanılacak *E. coli* Hattı ile Yapılan Çalışmalar

3.5.1 DH5α ve TOP10 *E. coli* Suşları

TOP10 (Invitrogen): [F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-]. Top10 ve DH10B birbirlerine çok yakın genotiplerdir. Kimyasal veya elektro yöntemler ile transformasyona hazırlanabilirler (İnt. Kyn. 4).

DH5α: [F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-]. DH5α hücreleri günlük klonlama çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilir. Bu hücrelerdeki recA1 and endA1 mutasyonları insört dayanıklılığını arttırır ve minipreptete hazırlanan plazmid DNA kalitesini arttırır. DH5α mavi beyaz taramaya da uygundur. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mahinur AKKAYA yüksek bir incelik göstererek bu iki *E. coli* hattını araştırmalarda kullanmak üzere göndermiştir. Her iki *E. coli* hücre hattı gliserol stoklarda -86°C'de saklanmış olmakla birlikte, klonlama çalışmalarımızda DH5α *E. coli* suşu kullanılmaktadır.

3.5.2 *E. coli* Kültürleme Teknikleri

3.5.2.1 Luria-Bertani (LB) Medium

LB, *E.coli* kültürleri ile yapılan çalışmalarda en çok kullanılan besin çözeltilisidir. Hazırlaması kolay olduğundan birçok *E.coli* hattı için hızlı büyüme sağlayan bir besin içeriğine sahiptir. LB kazein enziminin kimyasal sindirim ürünü olan pepton, maya özütü ve sodyum klorür tuzu içerir. Pepton, aminoasit ve peptit bakımından zengindir. Maya ekstresi; aynı zamanda bakterilerin büyümesi için gerekli olan nükleik asit, yağ,

karbonhidrat içerir. LB besiyeri normal bir çalkalama ortamında (250 rpm) OD₆₀₀ 2-3 arası bir büyümeyi destekleyebilir. 1 litre LB; 10 g triptofan + 5 g maya ekstraktı + 10 g NaCl 750 mL suda eritilerek pH 7,0 olacak şekilde ayarlanır. Son hacim 1L'ye tamamlanır. Katılaşma ajanı olarak agar isteğe göre eklenebilir. 1 atm basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlama ile steril edilir. LB medium 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra antibiyotik ekleme işlemi yapılabilir. LB agar, steril teknik kullanarak petri (90 mm) başına 20-25 mL LB dökülür. LB medium 4°C'de 1 ay, antibiyotikli LB mediumlar ise 15 gün saklanabilir.

3.5.2.2 Starter Kültür

Çalışmanın durumuna göre antibiyotik içeren veya içermeyen 5 mL LB medium bulunduran 50 mL Falkon tüp içerisine LB agar üzerindeki "izole" bir koloniyi steril bir kürdan yardımı ile transfer edilmiştir. Koloni ile temas halinde olan kürdan ucunun sıvı içinde kalmasına özen gösterilmiştir. Negatif kontrol amaçlı tüpe sadece steril kürdan eklenmiştir. Tüpler ısıtılmalı çalkalayıcıda (Zhicheng, Çin) 37°C'de 260 rpm'de gece boyunca 16 saat inkübe edilmiştir.

3.5.2.3 Gliserol Stok Hazırlama

Bir gece önceden starter kültür (3.6.2.2) hazırlanmıştır. Eşit hacimde gliserol ve distile su (v/v) çözeltisini hazırladıktan sonra otoklavlama ile steril edilmiştir. Eppendorf tüp veya cryo-tüplerin üzerine etiketlenmiştir (hazırlayan kişi, tarih, vektör, *E.coli* hattı, varsa hangi antibiyotiğe dirençliliği gibi). Tüp içinde 300 µL %50 steril gliserol ve 900 µL starter kültür karıştırılmıştır. Tüpler nazikçe karıştırıldıktan sonra sıvı azotta ön dondurma işlemini yapmadan -80°C'de saklanmıştır.

3.5.2.4 Gliserol Kültür Stokundan Katı LB Mediuma Geçiş

Bir kürdan veya pipet ucu ile donmuş gliserol stokun üzerini nazikçe kazdıktan sonra LB agara bakteri bulaştırılmıştır. Daha sonra tek koloni düşürme tekniği bakteri petri kabına yayılmıştır. Koloni gelişimi için petri kabı 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir.

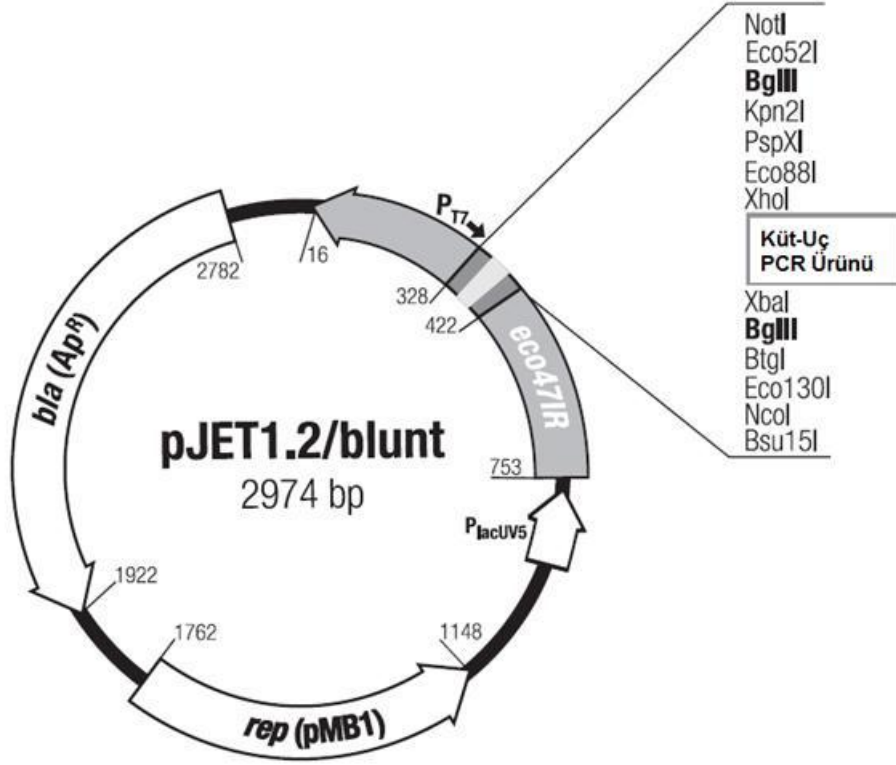
3.5.3 Kimyasal Yöntemle Yetenekli DH5 α *E. coli* Hücresi Yapma

Gliserol stoktan kazanmış olan DH5 α *E. coli* hücreleri LB agar katı besiyerlerine tek koloni düşürecek şekilde aktarılmıştır. Petriler gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Petri kaplarından seçilen tek koloniler 5 mL LB ve 5 mL LB + 50 μ L/mL ampisilin içeren 50 mL falkon tüplere kürdan aktırılarak starter kültür başlatılmıştır. Starter kültür, 16-20 saat 37°C'de 260 rpm/dk çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda ampisilinli tüplerde hücre çoğalmamış olduğuna dikkat edilmiştir. Yetenekli *E. coli* hücreleri hazırlamak için 100 mL LB sıvı besinine hücre ile starter kültürden 1 mL (1:100 oranında seyreltme) steril koşullarda aktarılmıştır. Kültür, 37°C'de 250 rpm'de OD₆₀₀ nm yaklaşık 0,4 oluncaya kadar (ortalama 3-4 saat) inkübe edilmiştir. Etüvden alınan bakteri kültürleri 50 mL Falkon tüplere bölündükten sonra tüpler 15-20 dakika buz üzerine soğutulmuştur. Tüpler, önceden soğutulmuş santrifüjde 4°C'de 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürüldükten sonra sonrası süpernatant dökülmüştür. Hücre tortusu buz soğucu 0,1 M MgCl₂ ile nazikçe karıştırılmıştır ve daha sonra en az 20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Tüpler, önceden soğutulmuş santrifüjde 4°C'de 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürüldükten sonra sonrası süpernatant dökülmüştür. Tüpler, yeniden buz üzerine alınmış ve hücre tortusu soğuk 0,1 M CaCl₂ ilave edilerek nazik bir şekilde birkaç dakikada yavaş çalkalama ile çözülmüştür. Tüpler, buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler, aynı santrifüj koşullarında santrifüjlenmiştir ve süpernatant yeniden uzaklaştırılmıştır. Son adımda, bakteri pelletleri soğuk %15 gliserol içeren 0,1 M CaCl₂ ile tekrar çözülmüştür. Buz üzerinde 20 dakika daha bekletilmiştir. Daha sonra 50 μ L alikotlara bölünerek sıvı azotla muamele edilerek dondurulmuştur ve -86°C'de saklanmıştır.

3.6 Ligasyon Reaksiyonu

T. turcica çiçek tomurcuğu cDNA kullanılarak sentezlenmiş ve saflaştırılmış PCR ürünleri pJET1.2/küt klonlama vektörüne yüklenmiştir (Şekil 3.1). Bu amaçla CloneJet klonlama kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Kısaca, buz üzerinde 1x Reaksiyon tamponu, 0,05 pmol uçlu pJET1.2/küt klonlama vektörü, 0,15 pmol PCR ürünü, 5U T4 DNA ligaz enzimi ve toplam hacim 20 μ L olacak şekilde ddH₂O karıştırılmıştır. Kısaca

vorteksledikten sonra reaksiyon karışımı 10 dakika 22°C’de inkübe edilmiştir. Ligasyon karışımı transformasyon için doğrudan kullanılmıştır.



Şekil 3.1 pJET1.2 Klonlama Vektör Haritası

3.7 Transformasyon

-86°C’de saklanan yetenekli *E. coli* DH5 α hücreleri içeren tüpler, ligasyon ürünün transformasyonunda kullanılmıştır. Yetenekli bakteri hücreleri buz üzerinde bekletilerek çözdürülmüştür. 10 μ L ligasyon ürünü 50 μ L yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine eklenmiştir. Parmak darbeleri vurmak suretiyle nazikçe karıştırıldıktan sonra transformasyon tüpleri, buz üzerinde en az 30 dakika bekletilmiştir. 42°C’de 30 saniye ısı şoku uygulaması yapıldıktan sonra tüpler hızlıca buz üzerine alınmış ve içeriğe 500 μ L sıvı LB besin çözeltisi ilave edilmiştir. Transformasyon tüpleri 37°C’de 1 saat boyunca 220 rpm çalkalama ile inkübe edilmiştir. Daha sonra, steril koşullar altında her bir transformasyon tüpünden 100 μ L sıvı ampisilin içeren LB katı besi yerlerine cam yayıcı ile iyice yayılmıştır. Ampisilin içeren petri kapları 37°C’de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak, ligasyon ürünü yerine sadece su eklenmiş

yetenekli hücre tüpleri de kullanılmıştır. Pozitif kontrol amaçlı olarak, pJET klonlama kiti ile verilmiş olan PCR ürünü uçları kütleştirildikten sonra vektöre kaynaştırılmış ve transformasyonda kullanılmıştır.

3.8 Koloni PCR

Koloni PCR reaksiyonları 0,2 mL ince cidarlı ependorf tipi tüplerde 20 µL toplam solüsyon içerisinde gerçekleştirilmiştir. Analiz edecek koloni sayısında bir fazla olacak şekilde PCR master karışımı hazırlanmıştır. 20 µL PCR karışımı için 2 µL *Taq* tampon çözeltisi (50 mM KCl, 1 mM Tris-HCl; pH 8,8), 1,2 µL MgCl₂ (50 mM), 2 µL dNTPmix (her birisi 50 µM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP), 0,4 µL pJET1.2 ileri ve geri sekanslama primerleri (10 mM), 0,1 µL *Taq* DNA polimeraz (5U, Thermo Scientific) ve 12,9 µL saf su kullanılmıştır. Master karışım kısa vorteksleme ve santrifüj sonrası PCR tüplerine paylaştırılmıştır. Transformasyon petrisinden seçilen tek koloni 20 µL PCR master karışımında süspanse edilmiştir. PCR için örnekler 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu (DNA zincirlerinin ayrılması), 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye annealing (primerlerin bağlanması) ve 72°C'de 1 dakika polimerizasyon (zincirlerin uzaması) programı kullanılmıştır. 72°C'de 8 dakika son polimerizasyon döngüsü gerçekleştikten sonra PCR döngüleri tamamlanmıştır. PCR ürünleri %1,8 agaroz jelde yürütüldükten sonra, DNA bantlarının görüntülenmesi Gen Box SDR Jel Dökümantasyon Sistemi ile yapılmıştır. DNA bantların ebat değerlendirilmesinde GeneTools paket programı kullanılmıştır.

3.9 Rekombinant Plazmit DNA Ekstraksiyonu

3.9.1 Rekombinant Plazmit DNA Ekstraksiyonu Manuel Protokol

Transforme olmuş bakterilerden tek koloni seçilmiş ve antibiyotik içeren 5 mL LB besiyerine inoküle edilerek ampisilin+LB sıvı besi yerinde starter kültür hazırlanmıştır. Bir gece inkübasyon sonrası, 1,5 mL eppendorf tüpler bakteri sıvısı ile doldurularak 8 500 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısmı dökülmüş, aynı tüpe yine 1,5 mL sıvı kültür ekleyerek işlemi tekrarlanmıştır. Tüp temiz bir peçete

üstüne çevrilerek bakteri çökeltisi 5 dakika kurutulmuştur. Pellet üzerine 100 µL Alkalın Liziz I Çözeltisi (5 mM sükröz, 25 mM Tris-Cl; pH 8,0, 10 mM EDTA; pH 8,0) eklenerek bakteriler kuvvetlice vortekslenmiştir. Karışıma, taze olarak hazırlanmış 200 µL Alkalın Liziz II Çözeltisi (0,2 N NaOH, %1 SDS) eklenmiş ve tüpler 4-5 kez ters düz edilerek karıştırılmıştır. Tüpler buz üzerinde 3 dk bekletildikten sonra, 150 µL Alkalın Liziz III Çözeltisi (3 M NaOAc, pH 5,2) eklenmiştir. Tüpler 4-5 kez ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra tekrar 3-5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bakteriyel lizat 5 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. RNA kontaminasyonundan kurtulmak için homojenat içerisine 5 µL RNaz eklenerek 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Eşit hacimde fenol-kloroform ekleme sonrası vortekslenen tüpler 4°C'de 5 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiştir. Supernatant temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra, 2 kat hacimdeki saf etanol eklenmiştir. Buz üzerinde 20 dakika bekletilmiş tüpler 4°C'de 5 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüp içleri %70 etil alkol ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan tüplere 50 µL TE (pH 8,0) tamponunda çözdürülmüştür.

3.9.2 Rekombinant Plazmit DNA Ekstraksiyonu Kit Kullanımı

Plazmit DNA ekstraksiyonu GeneJET™ Plasmid Miniprep kiti (ThermoScientific, Litvanya) kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ampisilin içeren sıvı LB ortamında 37°C'de 260 rpm'de 16-20 saat inkübe edilmiş olan bakteri kültürü 8 000 rpm'de 2 dakika santrifüjleme ile hasat edilmiştir. Çökelti oluşturmuş hücreler 250 µL Re-süspansiyon çözeltisinde çözülmüştür. Ayrıca Re-süspansiyon çözeltisine RNaz A eklenmiştir. Daha sonra 250 µL liziz çözeltisi eklenmiştir. Tüpler karıştırılmıştır ve çözeltinin viskoz hal aldığı gözlenmiştir. 350 µL Nötralizasyon Çözeltisi eklenmiştir ve tüpler tekrar karıştırılmıştır. Hücre atığını ve kromozomal DNA'yı çöktürmek için 12 000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kit içerisinde bulunan GeneJET™ spin kolonuna transfer edilmiştir. 1 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolona 500 µL Yıkama çözeltisi eklendikten sonra 12 000 x g'de 30-60 saniye santrifüj edilmiştir. Santifüjleme işleminden biriken sıvı uzaklaştırılarak kolon steril bir ependorf tüpe yerleştirilir. Kolona 50 µL Elüsyon çözeltisi eklenerek 12

000 x g'de 2 dakika santifüjlendikten sonra kolon uzaklaştırılmıştır. Saflaştırılmış DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.9.3 Rekombinant Plazmit DNA'nın PCR Doğrulaması

Plazmit DNA'ların miktar ve kalite tayini yapıldıktan sonra koloni PCR'daki gibi reaksiyon kurulumu, PCR döngüleri ve agaroz jel elektroforez teknikleri kullanılarak rekombinant plazmit DNA'lardaki insörtlerin varlığı kesin olarak belirlenmiştir. Hedeflenen ebatta insört DNA bulunduran plazmit DNA'lar seçildikten sonra dizi analizine gönderilmiştir.

3.10 DNA Dizileme

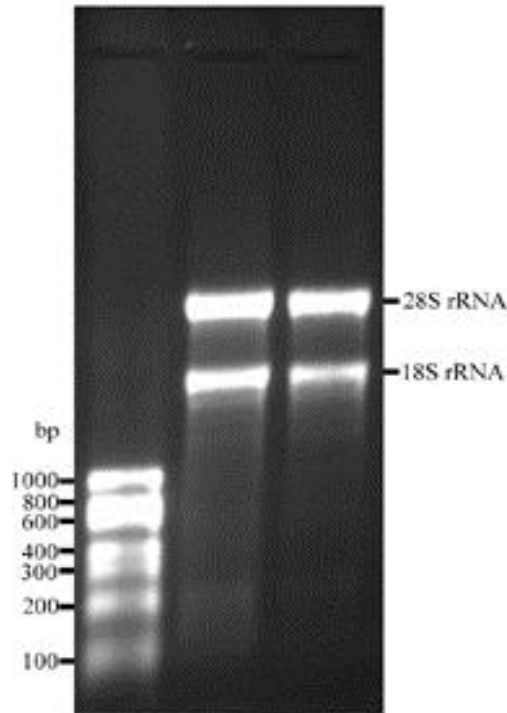
Rekombinat plazmitlerin sekanslanması hizmet alımı karşılığında IONTEK firmasına (Büyükdere Cad. İTÜ Ayazağa Kampüsü, ARI-1 Teknokent Binası 9-2, 34469 Maslak) yaptırılmıştır.

3.11 DNA Dizilerinin Analizi

IONTEK firmasından gelen DNA dizi elektrogramları FinchTV (Geospiza, Inc. USA) programı ile açılmıştır. İstenilen dizi bölgesi kopyalanarak alınmıştır. DNA dizi analizlerinde DNA dizisini protein dizisine dönüştüren translator programı (İnt. Kyn. 5) DNA ve protein dizisini mevcut bilenen nükleotit ve protein dizilerle karşılaştırılmasında BlastN ve BlastP programları elde edilen nükleotid ve amino asit dizilerinin karşılaştırılmasında ClustalW paket programı internet üzerinden kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu araştırmada sıradışı iek morfolojisi ve meyve sayısına sahip olan Türkiye endemiği *Thermopsis turcica* Kit, Vural and Küçüködük bitkisinde iek organ kimlik genlerine ait kısmi gen dizilerinin belirlenmesi ve bu dizilerin gen bankasındaki mevcut diziler ile karşılaştırılarak karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Kısmi klonlanması ve karakterizasyonu yapılan genler; **A** fonksiyonlu *APETALA 1* (*API*) ve *APETALA 2* (*AP2*), **B** fonksiyonlu *APETALA 3* (*AP3*) ve *PISTILLATA* (*PI*), **C** fonksiyonlu *AGAMOUS* (*AG*), **D** fonksiyonlu *SHATTERPROOF* (*SHP*) ve *SEEDSTICK* (*STK*) ile **E** fonksiyonlu *SEPALLATA* (*SEP*). Nisan-Mayıs 2013 tarihlerinde rneklenmiş *T. turcica* genç iek tomurcukları total RNA ekstraksiyonlarında kullanılmıştır. PCR'da gen parçalarının cDNA'lardan çoğaldığından emin olmak için total RNA ztleri DNaz I ile muamele edilerek muhtemel DNA kontaminasyonu uzaklaştırılmıştır. Resim 4.1 *t.turcica* iek tomurcuklarından özütlenen total RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsünü göstermektedir.

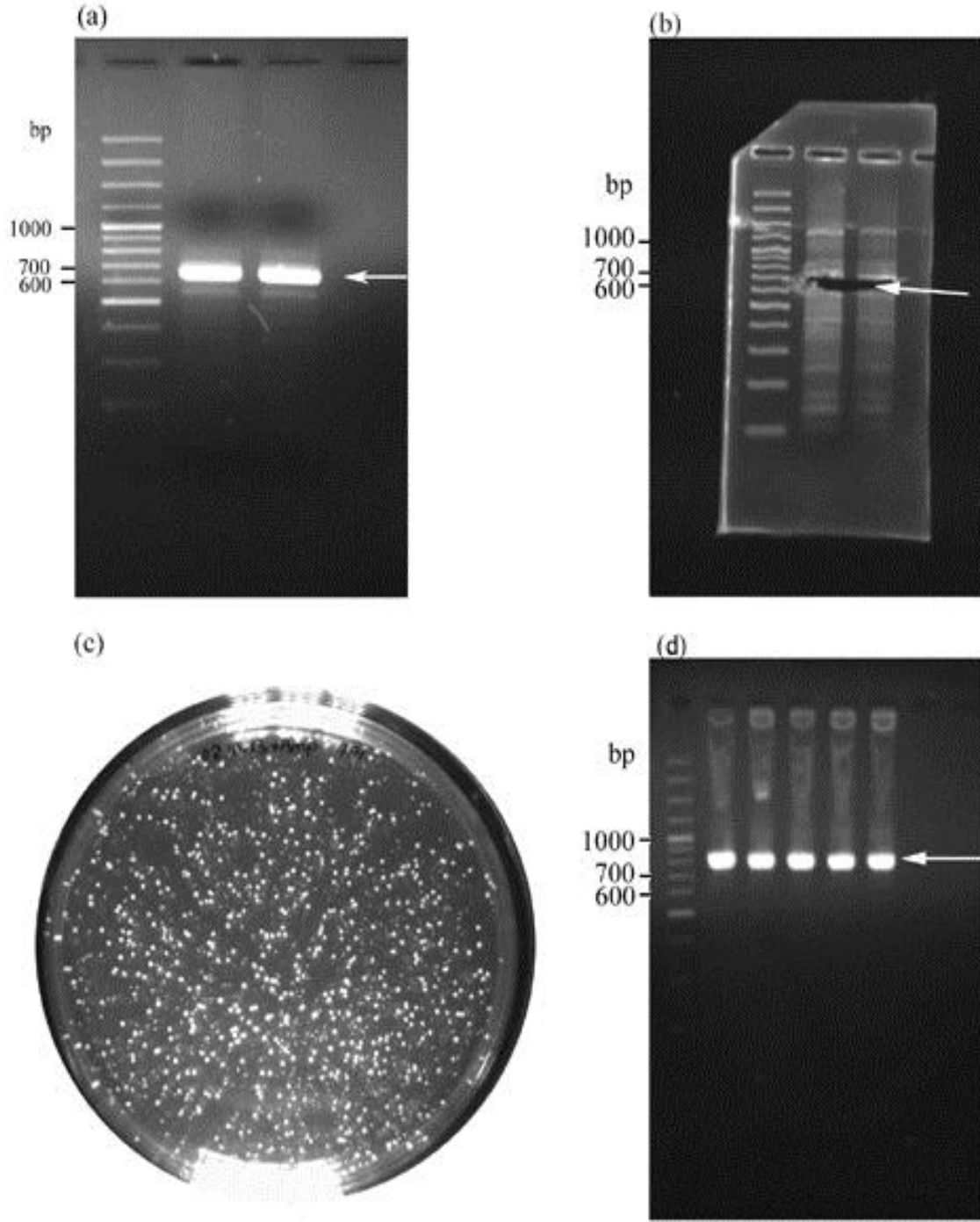


Resim 4.1 RNA ekstraksiyon kiti yardımıyla elde edilen 2 μg (orta hat) ve 1 μg (sağ hat) *T. turcica* iek tomurcuk total RNA'sının formaldehit agaroz jel elektroforezi sonrası elde edilen resmi göstermektedir. Birinci hatta RNA ladder (Thermo Scientific) markörü yürütülmüştür.

T. turcica bitkisi kullanılarak yapılan herhangi bir moleküler biyoloji çalışması olmamasından dolayı literatürde bu yabancı bitki ile ilgili hiçbir gen veya DNA dizi bilgisi mevcut değildir. Bu nedenle ilgili genler dejenere primer çiftleri yardımı ile çoğaltılmıştır. *AP1*, *AP2*, *β -ACTIN* ve 18S rRNA genlerine ait dejenere primerler literatürden temin edilmiştir (Vahala *et al.* 2001, Song *et al.* 2008). Diğer genlere ait dejenere primerler bu çalışma kapsamında tasarlanmıştır. Çiçek tomurcuğu total RNA'sından sentezlenmiş cDNA'lar PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonları 5x50 μ L şeklinde hazırlanmıştır. 250 μ L PCR ürünü saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir. Dejenere primer kullanılması nedeni ile agaroz jel üzerinde birden fazla DNA bandı elde edilmiştir, ancak ebatsal olarak hedef DNA parçasının varlığı çalışmanın bir sonraki aşamasına geçmesini sağlamıştır. Agaroz jel elektroforezde yürütülen saflaştırılmış PCR ürününün görüntülemesi yapıldıktan sonra istenilen ebattaki PCR bandı temiz bir jilet kullanılarak jelden kesilip alınmıştır. PCR ürünü DNA bandının, agarozdan saflaştırılması sonrası miktar ve kalite tayini yapılmıştır. Bu DNA parçası ligasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. PCR ürünü olan hedef DNA parçası, pJET1.2 vektörüne yüklendikten sonra ligasyon ürünü *E. coli* DH5 α yetenekli hücrelere transforme edilmiştir. Gece boyunca ampisilinli plaklarda inkübe edildikten sonra oluşan koloniler transformantlar olarak kabul edilmiştir. Bu gözlemsel veri, koloni PCR uygulaması ile teyit edilmiştir. Gözlemsel ve deneysel olarak transformasyondan emin olduktan sonra en az 20 transformant koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Her bir koloni için ayrı ayrı rekombinant plazmit (rPlazmid) DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra miktar ve kalite tayini yapılmıştır. Plazmit DNA'ların istenilen DNA parçasını (ebatsal olarak) bulundurduğu pJET1.2 sekanslama primerleri kullanılarak PCR'da doğrulanmıştır. Bu testleri geçen 5 adet rekombinant plazmid DNA'nın insört DNA bölgesi IONTEK (ITU, İstanbul) firmasına Sanger's yöntemi temelinde diziletilmiştir. Dizi analizi sonuçlarına göre hedeflenen genlerinin elde edilememesi durumunda gene ait yeni dejenere primerler sentezletilerek çalışmalar tekrarlanmıştır. Hedef genlere ulaşılması durumunda; DNA sekans dizilerinin karşılaştırılması, muhtemel protein dizilerinin belirlenmesi, BLASTn ve BLASTp analizleri ile yapılmıştır. Her bir gen için yapılan çalışmaların ispatı aşağıda verilmiştir.

4.1 APETALA 1 (API)

AP1F1/AP1R1 (Çizelge 3.1) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 670 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.2a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bisturi yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.2b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır (Resim 4.2c). En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.2d). Doğru DNA parçasını bulduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir



Resim 4.2 *APETALA1* (*API*)- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile AP1F1/AP1R1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.1) ile çoğaltılmış 667 bp hedef PCR ürünü jelden kesildikten sonra (a) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (b) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (c) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (c)'de gösterilen PCR ürünü 667 bp *API* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

API geni için dört farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

API- 2 nükleotid dizisi (667 bp)

```
GGTAGGGTGCAGCTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATCGCCAGG
TAACTTTCTCCAAAAGGAGAGCTGGGTTGCTTAAGAAAGCACACGAG
ATCTCTGTGCTCTGCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTCTTCTCCAAC
AAAGGAAAGCTCTTTGAATATGCCACTGATTCATGCATGGAGAAGAT
ACTGGAACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAG
GCAAATGATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAG
ACTCAAGGCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACA
TGGGAGCAGATTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTG
GAACAGCAGTTAGATACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAA
CCAATCATGTACGAGTCCATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAG
TGATACAAGAGCAGAATAACATGCTCGCAAAAAGATCAAGGAGAG
AGAGAAGGTTGCAGCACAGCAGGCTGCACAATGGGATCAATCAAAC
TACAGAGTTGATACATCTTACTTAATACAGCAGCCCCTTTTGGAGATG
GGTGGTAATTATCGTCAGGAAGCACCAGCAGTAGGGAGGAACGATC
TCGAACTGACTC
```

API- 2 protein dizisi (222 aa)

```
GRVQLKRIENKINRQVTFKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSNKGK
LFEYATDSCMEKILERHERYAYAERQMEANDSETQGNWTVEYTRLKAR
IDLLERNHRHYMGADLGSMSELKELQSLEQLDTALKTIRTRRNQLMYES
ISELHKKEKVIQEQNNMLAKKIKEREKVAAQQAQWDQSNYRVDTSYL
IQPLLEMGGNYRQEAPAVGRNDLELT
```

API- 14 nükleotid dizisi (664 bp)

```
GGTAGGGTTAGTTGAAGAGGATAGAGAAAAGATCAATCGCCAGGTA
ACTTTCTCCAAAAGGAGAGCTGGGTTGCTTAAGAAAGCACACGAGATC
```

TCTGTGCTCTGCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTCTTCTCCAACAAA
GGAAAGCTCTTTGAATATGCCACTGATTCATGCATGGAGAAGATACT
GGAACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAGGCA
AATGATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGACT
CAAGGCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACATGG
GAGCAGATTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTGGAA
CAGCAGTTAGATACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAACCA
ACTCATGTACGAGTCCATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAGTGA
TACAAGAGCAGAATAACATGCTCGCAAAAAGATCAAGGAGAGAGA
GAAGGTTGCAGCACAGCAGGCTGCACAATGGGATCAATCAAACCTAC
AGAGTTGATACATCTTACTTAATACAGCAGCCCCTTTTGGAGATGGG
TGGTAATTATCGTCAGGAAGCACCAGCAGTAGGGAGGAACGATCTCG
ACCTGACTC

AP1- 14 protein dizisi (221 aa)

GRVS*RG*RKDQSPGNFLQRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSNKGKLF
EYATDSCMEKILERHERYAYAERQMEANDSETQGNWTVEYTRLKARIDL
LERNHRHYMGADLGSMSELKELQSLEQQLDTALKTIRTRRNQLMYESISSEL
HKKEKVIQEQNNMLAKKIKEREKVAAQQAQWDQSNYRVDTSYLIQQP
LLEMGGNYRQEAPAVGRNDLDLT

AP1- 10 nükleotid dizisi (666 bp)

GGTAGGGTTCAGTTGAAGAGGAAGAGAACAAGATCAATCGCCAGGT
AACTTTCTCCAAAAGGAGAGCTGGGTTGCTTAAGAAAGCACACGAGA
TCTCTGTGCTCTGCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTCTTCTCCAACA
AAGGAAAGCTCTTTGAATATGCCACTGATTCATGCATGGAGAAGATA
CTGGAACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAGG
CAAATGATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGA
CTCAAGGCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACAT
GGGAGCAGATTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTGG
AACAGCAGTTAGATACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAAC
CAACTCATGTACGAGTCCATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAGT

GATACAAGAGCAGAATAACATGCTCGCAAAAAAGATCAAGGAGAGA
GAGAAGGTTGCAGCACAGCAGGCTGCACAATGGGATCAATCAA
ACTACAGAGTTGATACATCTTACTTAATACAGCAGCCCCTTTTGGAGATG
GGTGGTAATTATCGTCAGGAAGCACCAGCAGTAGGGAGGAACGATC
TCGATCTGACTC

AP1- 10 protein dizisi (221 aa)

*GSVEEENKINRQVTFSKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSNKGKLF
EYATDSCMEKILERHERYAYAERQMEANDSETQGNWTVEYTRLKARIDL
LERNHRHYMGADLGSMSLKEQSLQQLDTALKTIRTRRNQLMYESISSEL
HKKEKVIQEQNNMLAKKIKEREKVAAQQAQWDQSNYRVDTSYLIQQP
LLEMGGNYRQEAPAVGRNDLDT

AP1- 13 nükleotid dizisi (666 bp)

GGTAGGGTCAACTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATCGCCAGGTA
ACTTTCTCCAAAAGGAGAGCTGGGTTGCTTAAGAAAGCACACGAGATC
TCTGTGCTCTGCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTCTTCTCCAACAAAG
GAAAGCTCTTTGAATATGCCACTGATTCATGCATGGAGAAGATACTGG
AACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAGGCAAAT
GATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGACTCAAG
GCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACATGGGAGC
AGATTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTGGAACAGCA
GTTAGATACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAACCAACTCAT
GTACGAGTCCATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAGTGATACAAGA
GCAGAATAACATGCTCGCAAAAAAGATCAAGGAGAGAGAGAAGGTTG
CAGCACAGCAGGCTGCACAATGGGATCAATCAA
ACTACAGAGTTGATACATCTTACTTAATACAGCAGCCCCTTTTGGAGATGGGTGGTAATTATC
GTCAGGAAGCACCAGCAGTAGGGAGGAACGAGCTCGACCTGACTC

AP1- 13 protein dizisi (221 aa)

*GQLKRIENKINRQVTFSKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSNKGKLF
EYATDSCMEKILERHERYAYAERQMEANDSETQGNWTVEYTRLKARIDL

LERNHRHYMGADLGSMSELKELQSLEQQLDTALKTIRTRRNQLMYESISSEL
HKKEKVIQEQNNMLAKKIKEREKVAAQQAQWDQSNYRVDTSYLIQQP
LLEMGGNYRQEAPAVGRNELDLT

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu dört diziden ortak bir dizi üretilmiştir.

Thermopsis turcica AP1- benzeri nükleotid dizisi (667 bp)

GGTAGGGTGCAGCTGAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATCGCCAGGT
AACTTTCTCCAAAAGGAGAGCTGGGTTGCTTAAGAAAGCACACGAGAT
CTCTGTGCTCTGCGATGCTGAAGTCGCGTTGATTGTCTTCTCCAACAAA
GGAAAGCTCTTTGAATATGCCACTGATTCATGCATGGAGAAGATACTG
GAACGCCATGAAAGGTATGCCTATGCAGAGAGACAGATGGAGGCAAA
TGATTCTGAGACACAGGGAAATTGGACCGTTGAATATACTAGACTCAA
GGCAAGGATTGACCTTTTGGAGAGAAACCACAGGCATTACATGGGAG
CAGATTTGGGTTCAATGAGCCTCAAAGAGCTTCAAAGTCTGGAACAGC
AGTTAGATACTGCTCTCAAACCATTTCGTACACGCAGAAACCAACTCA
TGTACGAGTCCATTTCTGAGCTTCATAAAAAGGAGAAAGTGATACAAG
AGCAGAATAACATGCTCGCAAAAAGATCAAGGAGAGAGAGAAGGTT
GCAGCACAGCAGGCTGCACAATGGGATCAATCAAACACTACAGAGTTGA
TACATCTTACTTAATACAGCAGCCCCTTTTGGAGATGGGTGGTAATTAT
CGTCAGGAAGCACCAGCAGTAGGGAGGAACGATCTCGAACTGACTC

Thermopsis turcica AP1- benzeri protein dizisi (222 aa)

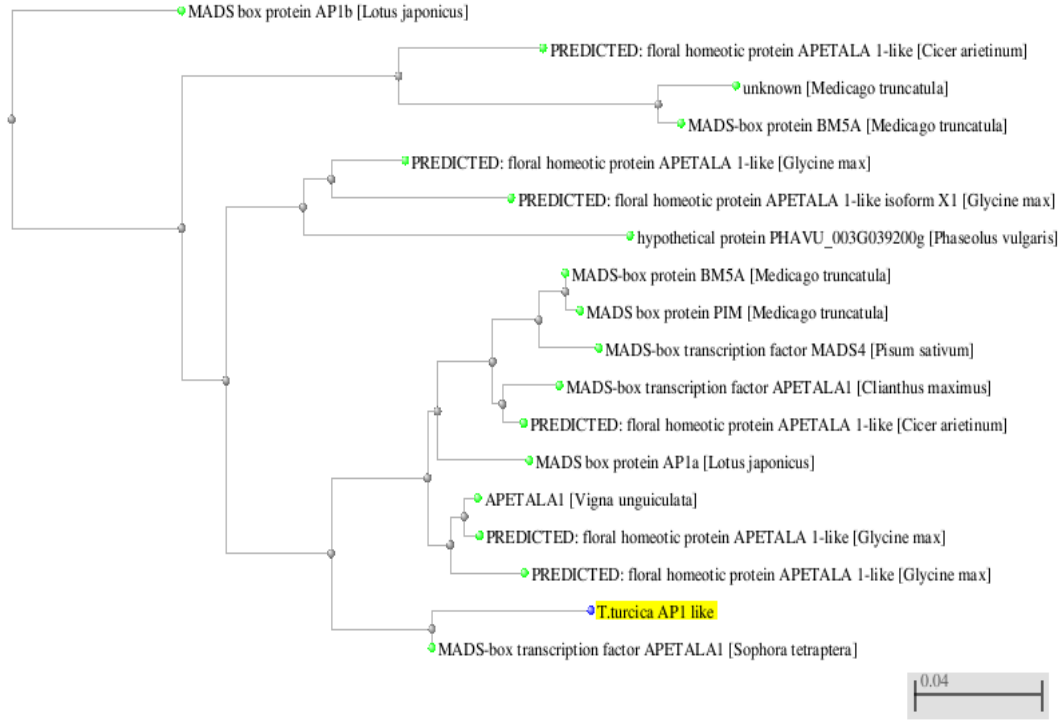
GRVQLKRIENKINRQVTFKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSNKGKL
FEYATDSCMEKILERHERYAYAERQMEANDSETQGNWTVEYTRLKARID
LLERNHRHYMGADLGSMSELKELQSLEQQLDTALKTIRTRRNQLMYESISSE
LHKKEKVIQEQNNMLAKKIKEREKVAAQQAQWDQSNYRVDTSYLIQQ
PLLEMGGNYRQEAPAVGRNDLELT

API-benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin MADS kutulu API-benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.1, *T. turcica* için elde edilen API-benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.1 *T. turcica* için elde edilen API- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları.

	Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1	<i>Sophora tetraptera</i>	MADS-box transcription factor API	DQ418761.1	ABD78855.1	%97
2	<i>Vigna unguiculata</i>	APETALA1	AB588744.1	BAJ22385.1	%87
3	<i>Glycine max</i>	Floral homeotic protein AP1-like	XM_003547744.2	XP_003547792.1	%87
4	<i>Glycine max</i>	Floral homeotic protein AP1-like	XM_003531909.2	XP_003531957.1	%86
5	<i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AP1a	AY770395.1	AAX13296.1	%85
6	<i>Clanthus maximus</i>	MADS-box transcription factor API	DQ418757.1	ABD78851.1	%85
7	<i>M.truncatula</i>	MADS-box protein BM5A	XM_003628694.1	XP_003628742.1	%84
8	<i>Cicer arietinum</i>	Floral homeotic protein AP1-like	XM_004509697.1	XP_004509754.1	%84
9	<i>M.truncatula</i>	MADS box protein PIM	DQ139345.1	AAZ67068.1	%84
10	<i>Glycine max</i>	Floral homeotic protein AP1-like	XM_003516406.2	XP_003516454.1	%83
11	<i>Pisum sativum</i>	MADS-box transcription factor	AF461740.1	AAL66379.1	%83
12	<i>Glycine max</i>	APETALA 1-like isoform X1	XM_003518739.2	XP_003518787.1	%80
13	<i>Cicer arietinum</i>	Floral homeotic protein AP1-like	XM_004490179.1	XP_004490236.1	%78
14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002290.1	ESW25475.1	%77
15	<i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AP1b	AY770396.1	AAX13297.1	%77
16	<i>M.truncatula</i>	Unknown	BT051745.1	ACJ84407.1	%75
17	<i>M.truncatula</i>	MADS-box protein BM5A	XM_003614186.1	XP_003614234.1	%74

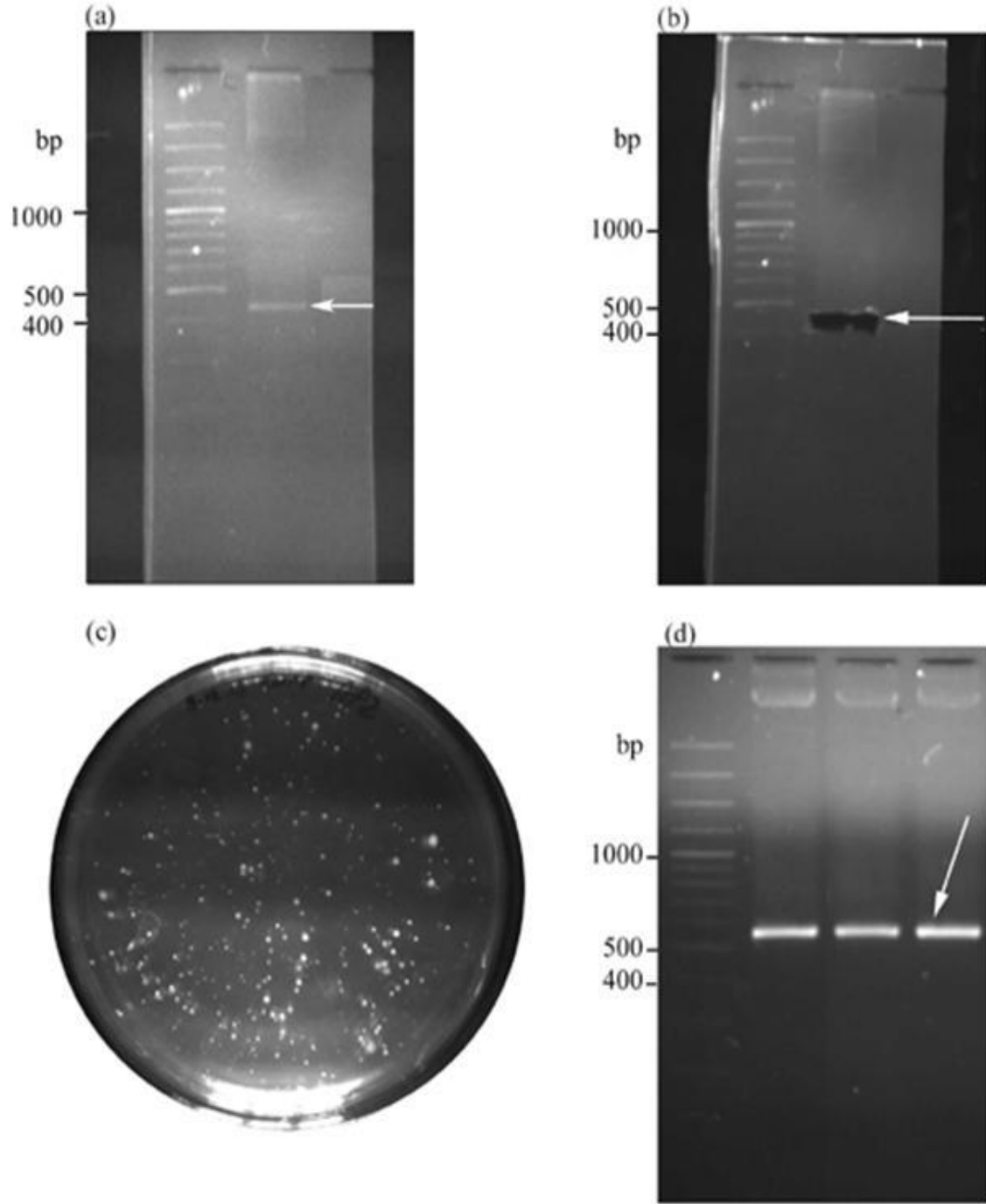
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *APETALA1*-benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.1'de verilen bitkilere ait APETALA1- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram. Bu dendrogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.2 APETALA 2 (AP2)

AP2F1/AP2R1 (Çizelge 3.1) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 450 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.3a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bisturi yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.3b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.3c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.3d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.3 *APETALA2* (*AP2*)- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile AP1F1/AP1R1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.1) ile çoğaltılmış 447 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş (c) ve transformantlarda insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 447 bp *AP2* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

AP2 geni için üç farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

AP2- 3 nükleotid dizisi (447 bp)

```
AGTACAGCGGCGTACTTTTTACAGAAGAACTGGTTCGATGGGAATCTC
ATATATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACAG
CACATGCAGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAG
GAATAGAAGCAGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGAC
TTGAAGCAAATGAGCAATCTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTACTT
CGCCGACAAAGCACTGGATTTCCAAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGG
TGTAACATTGCACAAGTGTGGAAGATGGGAAGCTCGAATGGGCCAATT
TTTAGGAAAAAAGTACGTTTATCTGGGTTTGTGTTGACACTGAGATTGA
AGCAGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGCAATAAAATGCAATGGCAAAG
ACGCCGTCACCAACTTTG
```

AP2- 3 protein dizisi (148 aa)

```
YSGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHAAARA YDRAAIKFRGI
EADINFNIEDYEEDLKQMSNLTKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLH
KCGRWEARMGQFLGKKYVYLGLFDTEIEAARA YDKAAIKCNGKDAVTN
F
```

AP2-10 nükleotid dizisi (447 bp)

```
AGTATCGCGGTGTTACTTTTTACAGAAGAACTGGTTCGATGGGAATCTC
ATATATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACAG
CACATGCAGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAG
GAATAGAAGCAGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGAC
TTGAAGCAAATGAGCAATCTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTACTT
CGCCGACAAAGCACTGGATTTCCAAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGG
TGTAACATTGCACAAGTGTGGAAGATGGGAAGCTCGAATGGGCCAATT
```

TTTAGGAAAAAAGTACGTTTATCTGGGTTTGTGGACTGAGATTGA
AGCAGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGCAATAAAATGCAATGGCAAAG
ATGCCGTCACCAACTTTG

AP2- 10 protein dizisi (148 aa)

YRGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHAARAAYDRAAIKFRGI
EADINFNIEDYEEDLKQMSNLTKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLH
KCGRWEARMGQFLGKKYVYLGLFDTEIEAARAAYDKAAIKCNGKDAVTN
F

AP2- 14 nükleotid dizisi (446 bp)

AGTACGCGGCGTTACTTTTTACAGAAGAACTGGTCGATGGGAATCTCA
TATATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACAGC
ACATGCAGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAGG
AATAGAAGCAGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGACT
TGAAGCAAATGAGCAATCTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTAATTC
GCCGACAAAGCACTGGATTTCCAAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGGT
GTAACATTGCACAAGTGTGGAAGATGGGAAGCTCGAATGGGCCAATTT
TTAGGAAAAAAGTACGTTTATCTGGGTTTGTGGACTGAGATTGAA
GCAGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGCAATAAAATGCAATGGCAAAGA
GGCAGTAACCAACTTTG

AP2- 14 protein dizisi (148 aa)

VRGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHAARAAYDRAAIKFRGI
EADINFNIEDYEEDLKQMSNLTKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLH
KCGRWEARMGQFLGKKYVYLGLFDTEIEAARAAYDKAAIKCN
GKEAVTNF

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu üç diziden ortak bir dizi üretilmiştir.

Thermopsis turcica AP2- benzeri nükleotid dizisi (447 nt)

```
AGTACAGCGGCGTTACTTTTTACAGAAGAACTGGTTCGATGGGAATCTC
ATATATGGGATTGTGGAAAACAAGTGTATCTGGGTGGATTTGACACAG
CACATGCAGCTGCTCGTGCATATGATAGAGCGGCTATTAAGTTCCGAG
GAATAGAAGCAGATATAAACTTCAACATAGAAGACTATGAAGAAGAC
TTGAAGCAAATGAGCAATCTGACTAAGGAAGAATTTGTGCACGTACTT
CGCCGACAAAGCACTGGATTTCCAAGAGGAAGCTCCAAATATAGAGG
TGTAACATTGCACAAGTGTGGAAGATGGGAAGCTCGAATGGGCCAATT
TTTAGGAAAAAAGTACGTTTATCTGGGTTTGTGTTGACACTGAGATTGA
AGCAGCAAGGGCCTATGACAAGGCAGCAATAAAATGCAATGGCAAAG
ACGCCGTCACCAACTTTG
```

Thermopsis turcica AP2- benzeri protein dizisi (148 aa)

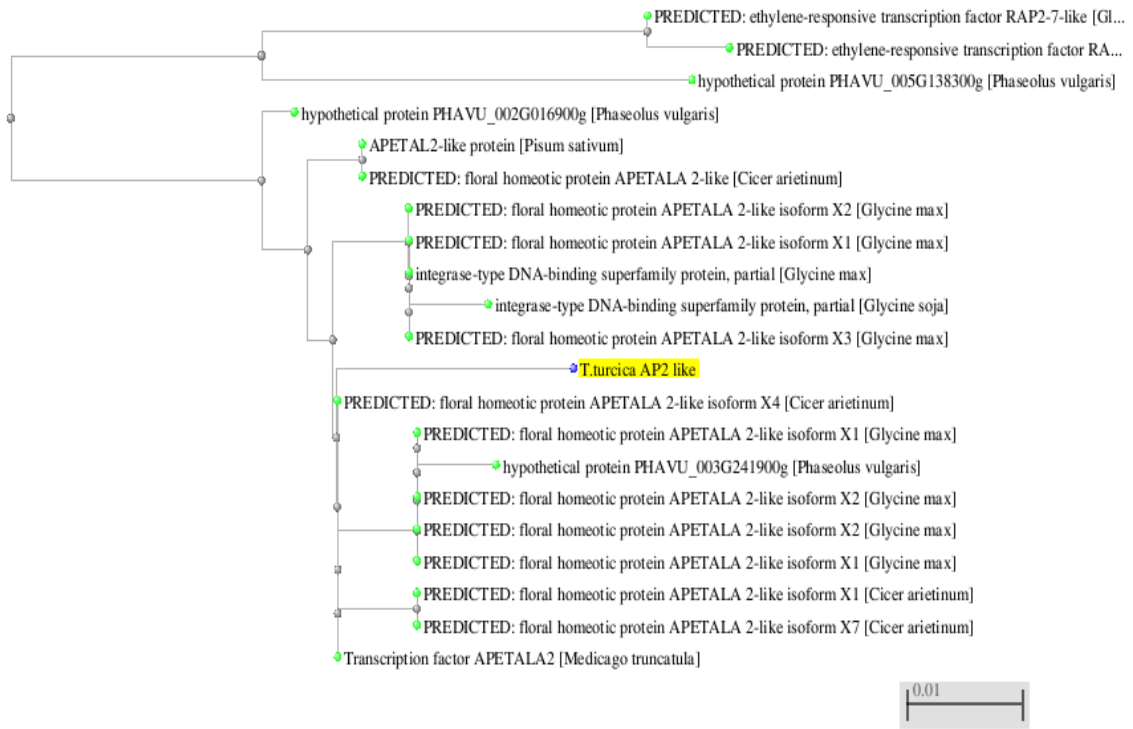
```
YSGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHHAAARA YDRAAIKFRGI
EADINFNIEDYEEDLKQMSNLTKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLH
KCGRWEARMGQFLGKKYVYLGLFDTEIEAARA YDKAAIKCNGKDAVTN
F
```

AP2- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin AP2-benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.2 *T. turcica* için elde edilen AP2-benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.2 *T. turcica* için elde edilen AP2- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>M.truncatula</i>	Transcriptionfactor APETALA2	XM_003611644.1	XP_003611692.1	%98
2 <i>Cicer arietinum</i>	APETALA 2-like isoform X4	XM_004511847.1	XP_004511904.1	%98
3 <i>Glycine max</i>	Integrase-type DNA-binding	KF220834.1	AGP03657.1	%97
4 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X3	XM_006573580.1	XP_006573643.1	%97
5 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform	XM_003517264.2	XP_003517312.1	%97
6 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X2	XM_006573579.1	XP_006573642.1	%97
7 <i>Pisum sativum</i>	APETALA 2-like protein	AF325506.1	AAK14326.1	%97
8 <i>P.vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002289.1	ESW28773.1	%97
9 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X1	XM_003550003.2	XP_003550051.1	%97
10 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X2	XM_006600875.1	XP_006600938.1	%97
11 <i>Cicer arietinum</i>	APETALA 2-like	XM_004509060.1	XP_004509117.1	%97
12 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X2	XM_006579822.1	XP_006579885.1	%97
13 <i>Glycine max</i>	APETALA 2-like isoform X1	XM_003524595.2	XP_003524643.1	%97
14 <i>Glycine soja</i>	Integrase-type DNA-binding	KF220847.1	AGP03670.1	%97
15 <i>P.vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002290.1	ESW27899.1	%97
16 <i>Cicer arietinum</i>	APETALA 2-like isoform X1	XM_004511844.1	XP_004511901.1	%94
17 <i>Cicer arietinum</i>	APETALA 2-like isoform X7	XM_004511850.1	XP_004511907.1	%94
18 <i>Glycine max</i>	Ethylene-resp. transcription factor	XM_003520593.2	XP_003520641.1	%90
19 <i>P.vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002292.1	ESW22242.1	%90
20 <i>Glycine max</i>	Ethylene-resp. transcription factor	XM_003554309.2	XP_003554357.1	%89

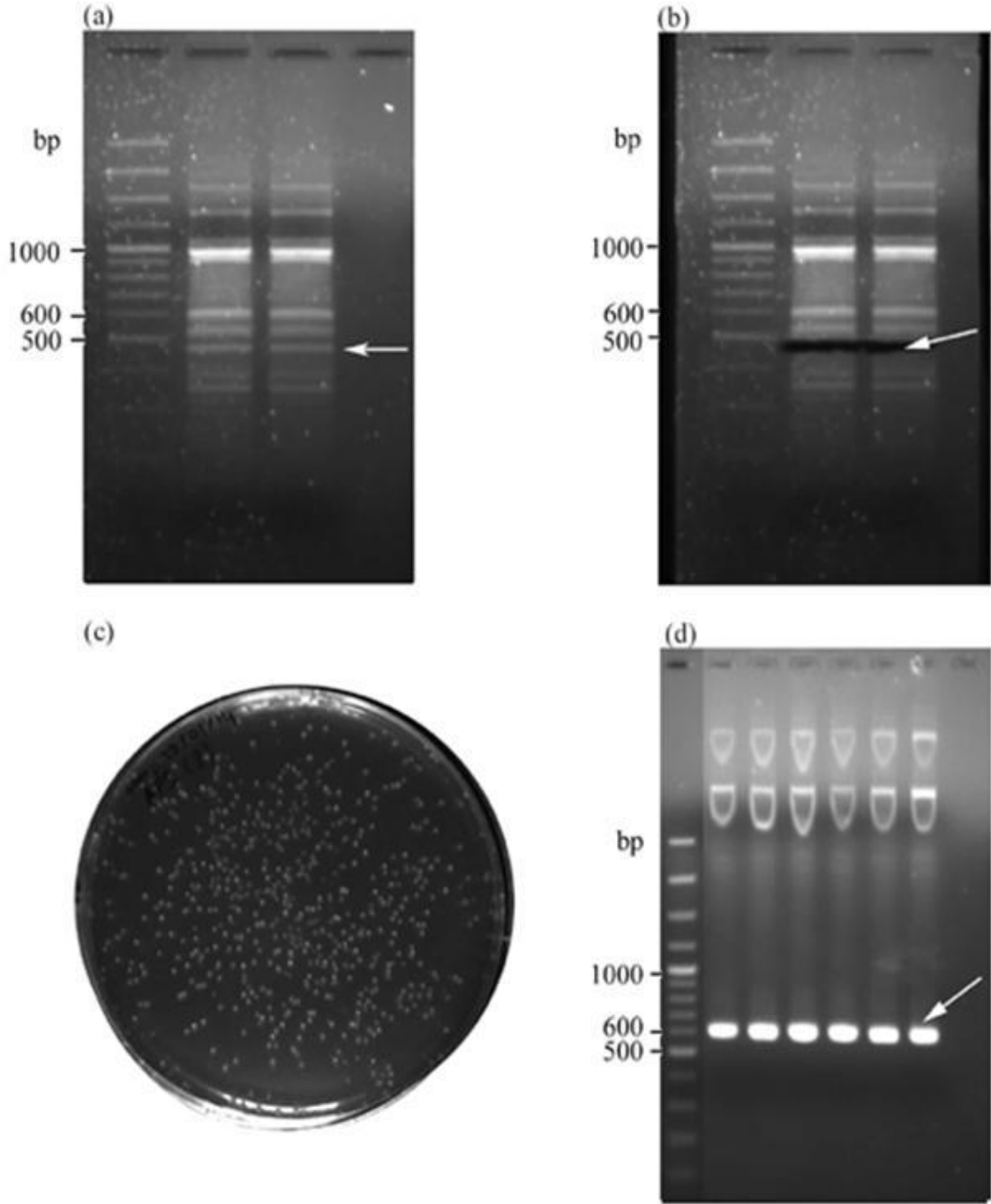
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen APETALA2- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.2'de verilen bitkilere ait APETALA2- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.3 APETALA 3 (AP3)

AP3F3/AP3R2 (Çizelge 3.2) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak 480 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.4a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bistrüri yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.4b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.4c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.4d). Doğru DNA parçasını bulduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.4 *APETALA3*- (*AP3*) benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile AP3F3/AP3R2 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.2) ile çoğaltılmış 480 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 480 bp *AP3* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

AP3 geni için iki farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

AP3- 23 nükleotid dizisi (482 bp)

AAGAAGGCAAACGAACTCACCGTTCTGTGTGATGCTGAGGTTGCTATT
CTTATGTTTTCCAGTACTGGCAAGCTCCACGAGTACATTAGCCCCTCCA
CCTCAACAAAACAGTTCTTCGATCAGTACCAGATGACTGTAGGAATTG
ATCTGTGGAGCTCCCACTATGATAATATGCAAGAGAACTTGAAGAAGC
TGAAAGAGGTGAACAGGAATCTTCGCAAGGAGATTATGCAGAGGATA
GGGGATTGTCTGAACGATCTGAGCATGGA AAAACTGACGCTGCTTGAG
GAAGAAATGGATAAGGCCGCTAAGGTTGTTTCGCGAGCGTAACTATAA
GGTGATATCAAATCACATTGACACCAAAGGAAGAAGTTTAATAACG
AGAAAGAAGTGCAAAGCAGACTCCTGCATGACTTGGATACCAGAGCG
GAAGATCCACGTTATGGATTGGTGGACAATGGAGGGGAGTACGAGTC
AGTGAT

AP3- 23 protein dizisi (160 aa)

KKANELTVLCDAEVAILMFSSTGKLHEYISPSTSTKQFFDQYQMTVGDIL
WSSHYDNMQENLKKLKEVNRNLRKEIMQRIGDCLNDLSMEKLTLLLEEM
DKAAKVVRERNYKVISNHIDTKRKKFNNEKEVQSRLLDLDTRAEDPRY
GLVDNGGEYESV

AP3- 10 nükleotid dizisi (482 bp)

AAGAAGGCAAACGAACTCACCGTTCTGTGTGATGCTGAGGTTTCTATT
CTTATGTTTTCCAGTACTGGCAAGCTCCACGAGTACATTAGCCCCTCCA
CCTCAACAAAACAGTTCTTCGATCAGTACCAGATGACTGTAGGAATTG
ATCTGTGGAGCTCCCACTATGAGAATATGCAAGAGAACTTGAAGAAGC
TGAAAGAGGTGAACAGGAATCTTCGCAAGGAGATTAGGCAGAGGATA
GGGGATTGTCTGAACGATCTGAGCATGGAAGA ACTGACGCTGCTTGAG

GAAGAAATGGATAAGGCCGCTAAGGTTGTTTCGCGAGCGTAAGTATAA
GGTGATATCAAATCAGATTGACACCCAAAGGAAGAAGTTTAATAACG
AGAAAGAAGTGCAAAGCAGACTCCTGCATGACTTGGATACGAGAGCG
GAAGATCCACGTTATGGATTGGTGGACAATGGAGGGGAGTACGAGTC
AATGAT

AP3- 10 protein dizisi (160 aa)

KKANELTVLCDAEVSILMFSSTGKLHEYISPSTSTKQFFDQYQMTVGIDLW
SSHYENMQENLKKLKEVNRNLRKEIRQRIGDCLNDLSMEELTLLEEEMDK
AAKVVRERKYKVISNQIDTQRKKFNNEKEVQSROLLHDLDTRAEDPRYGL
VDNGGEYESM

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu iki diziden ortak bir dizi belirlenmiştir.

Thermopsis turcica AP3- benzeri nükleotid dizisi (482 bp)

AAGAAGGCAAACGAACTCACCGTTCTGTGTGATGCTGAGGTTTCTATT
CTTATGTTTTCCAGTACTGGCAAGCTCCACGAGTACATTAGCCCCTCCA
CCTCAACAAAACAGTTCTTCGATCAGTACCAGATGACTGTAGGAATTG
ATCTGTGGAGCTCCCCTATGAGAATATGCAAGAGAACTTGAAGAAGC
TGAAAGAGGTGAACAGGAATCTTCGCAAGGAGATTAGGCAGAGGATA
GGGGATTGTCTGAACGATCTGAGCATGGAAGAACTGACGCTGCTTGAG
GAAGAAATGGATAAGGCCGCTAAGGTTGTTTCGCGAGCGTAAGTATAA
GGTGATATCAAATCAGATTGACACCCAAAGGAAGAAGTTTAATAACG
AGAAAGAAGTGCAAAGCAGACTCCTGCATGACTTGGATACGAGAGCG
GAAGATCCACGTTATGGATTGGTGGACAATGGAGGGGAGTACGAGTC
AATGAT

Thermopsis turcica AP3- benzeri protein dizisi (160 aa)

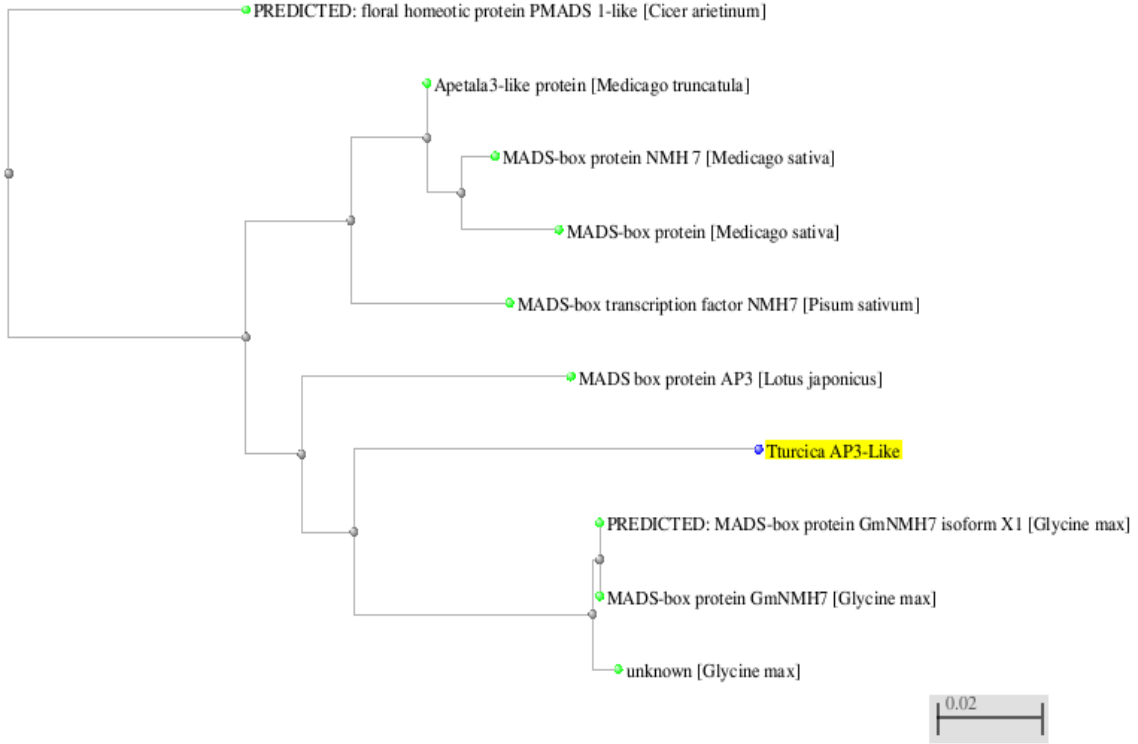
KKANELTVLCDAEVSILMFSSTGKLHEYISPSTSTKQFFDQYQMTVGDLDW
SSHYENMQENLKKLKEVNRNLRKEIRQRIGDCLNDLSMEELTLLEEEMDK
AAKVVRERKYKVISNQIDTQRKKFNNEKEVQSRLLDHDLTRAEDPRYGL
VDNGGEYESM

AP3- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin MADS-kutulu AP3- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.3 *T. turcica* için elde edilen AP3- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin; açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.3 *T. turcica* için elde edilen AP3- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin; tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, NCBI protein ve nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>Glycine max</i>	MADS-box protein GnNMH7 X1	XM_006581000.1	XP_006581063.1	%88
2 <i>Glycine max</i>	Unknown	BT089362.1	ACU13442.1	%88
3 <i>Glycine max</i>	MADS-box protein GnNMH7	NM_001249928.2	NP_001236857.1	%88
4 <i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AP3	AY770400.1	AAX13301.1	%88
5 <i>M. truncatula</i>	APETALA 3-like Protein	XM_003603673.1	XP_003603721.1	%86
6 <i>Medicago sativa</i>	MADS-box NMH 7 (AP3-Like)	AF042068.1	AAC15419.1	%85
7 <i>Medicago sativa</i>	MADS-box protein	L41727.1	AAB48660.1	%84
8 <i>Pisum sativum</i>	MADS-box NMH7 (AP3-Like)	JN412099.1	AEW43604.1	%84
9 <i>Cicer arietinum</i>	Floral homeotic protein PMADS 1L	XM_004500904.1	XP_004500961.1	%83

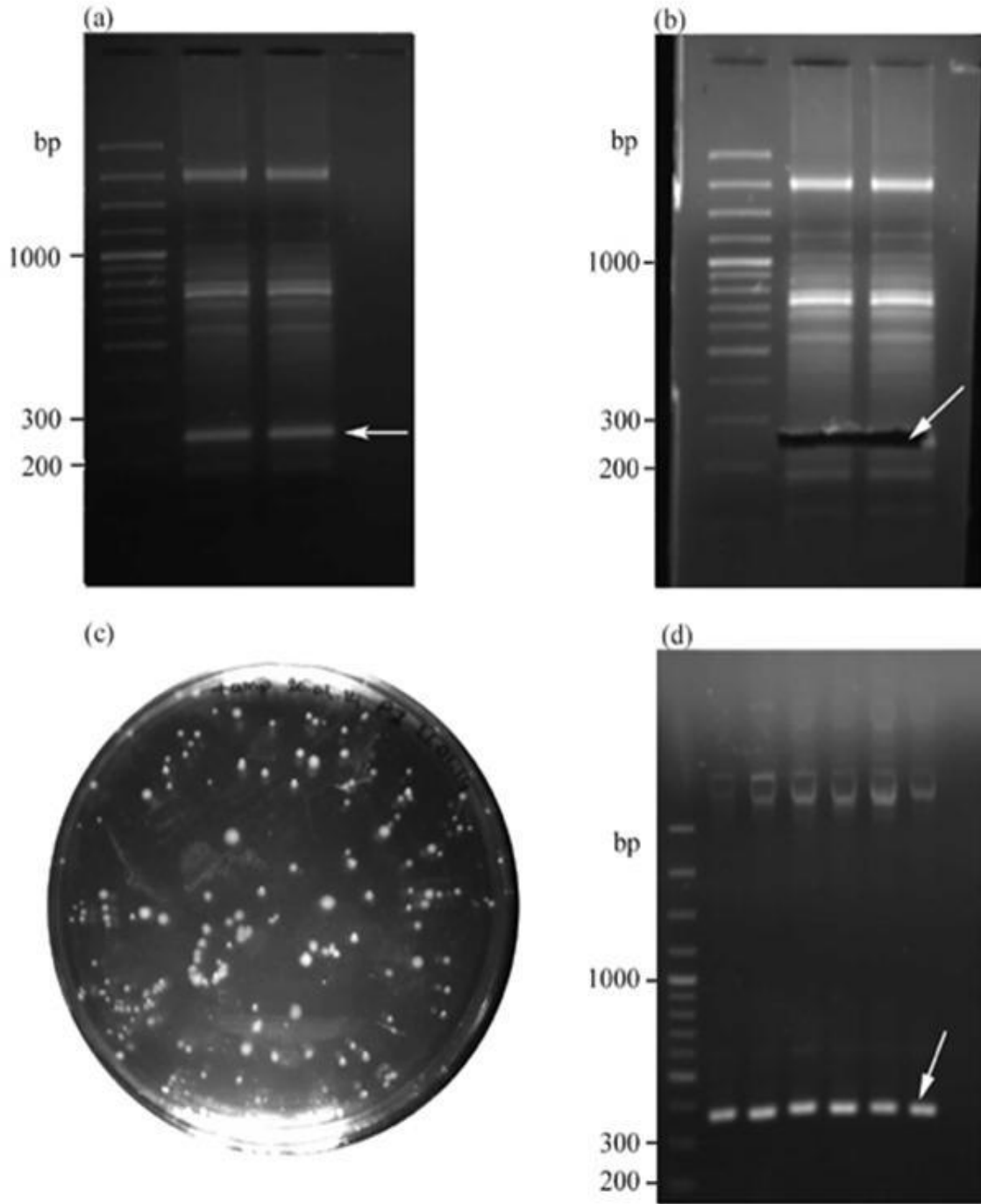
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *APETALA3*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki matematiksel ilişkiyi gösteren dendrogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.3'de verilen bitkilere ait APETALA3- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendrogramı. Bu dendrogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.4 PISTILATA (PI)

PIF1/PIR2 (Çizelge 3.2) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 250 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim4.5a). Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bisturi yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim4.5b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim4.5c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim4.5d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.5 *PISTILLATA* (*PI*)- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile PIF1/PIR2 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.2) ile çoğaltılmış 249 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 249 bp *PI* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

PI geni için üç farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

PI- 15 nükleotid dizisi (248 bp)

GGCAAGATCGAGATCAAGAGGATTGAGAACTCAAGCAACAGCCATAT
AACCTACTCAAAGAGGAAGAATGGGATCCTAAAGAAAGCTTGGAAT
AACTGTTCTATGTGATTCCCAAGTTTCCCTTATTATCTTTGGTTCCTCTG
GGAAGATGCATGAATACATCAGCCCCTCCACCACGTTGATTGATGTCC
TGGACAGATAACCATAAAGCCTCAGGGAAGAGGATCTGGGACGCAAAA
CATGAGAAC

PI- 15 protein dizisi (83 aa)

GKIEIKRIENSSNSHITYSKRKNLILKKAKEITVLCDSQVSLIIFGSSGKMHE
YISPSTTLIDVLDYHKASGKRIWDAKHEN

PI- 23 nükleotid dizisi (248 bp)

GCAAGATCGAGATCAAGAGGATTGAGAACTCAAGCAACAGGCAAGTT
ACCTACTCAAAGAGGAAGAATGGGATCCTAAAGAAAGCAAAGGAAAT
AACTGTTCTATGTGATGCCCAAGTTTCCCTTATTATCTTTGGTTCCTCTG
GGAAGATGCATGAATACATCAGCCCCTCCACCACGTTGATTGATGTCC
TGGACAGATAACCATAAAGCCTCAGGGAAGAGGATCTGGGACGCCAAA
CACGAGAAC

PI- 23 protein dizisi (83 aa)

GKIEIKRIENSSNRQVTYSKRKNLILKKAKEITVLCDAQVSLIIFGSSGKMH
EYISPSTTLIDVLDYHKASGKRIWDAKHEN

PI- 21 nükleotid dizisi (249 bp)

GGCAAGATCGAGATAAAGAGGATTGAGAACTCAAGCAACAGGCAAGT
TACCTACTCAAAGAGGAAGAATGGGATCCTAAAGAAAGCAAAGGAAA
TAACTGTTCTATGTGATGCCCAAGTTCCCTTATTATCTTTGGTTCCTCT
GGGAAGATGCATGAATACATCAGCCCCTCCACCACGTTGATTGATGTC
CTGGACAGATAACCATAAAGCCTCAGGGAAGAGGATCTGGGACGCCAA
GCACGAGAAC

PI- 21 protein dizisi (83 aa)

GKIEIKRIENSSNRQVTYSKRKNGILKKAKEITVLCDAQVSLIFGSSGKMH
EYISPSTTLIDVLD RYHKASGKRIWDAKHEN

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu üç diziden ortak bir dizi üretilmiştir.

Thermopsis turcica PI- benzeri nükleotid dizisi (248 bp)

GCAAGATCGAGATCAAGAGGATTGAGAACTCAAGCAACAGGCAAGTT
ACCTACTCAAAGAGGAAGAATGGGATCCTAAAGAAAGCAAAGGAAAT
AACTGTTCTATGTGATGCCCAAGTTCCCTTATTATCTTTGGTTCCTCTG
GGAAGATGCATGAATACATCAGCCCCTCCACCACGTTGATTGATGTCC
TGGACAGATAACCATAAAGCCTCAGGGAAGAGGATCTGGGACGCCAAA
CACGAGAAC

Thermopsis turcica PI- benzeri protein dizisi (83 aa)

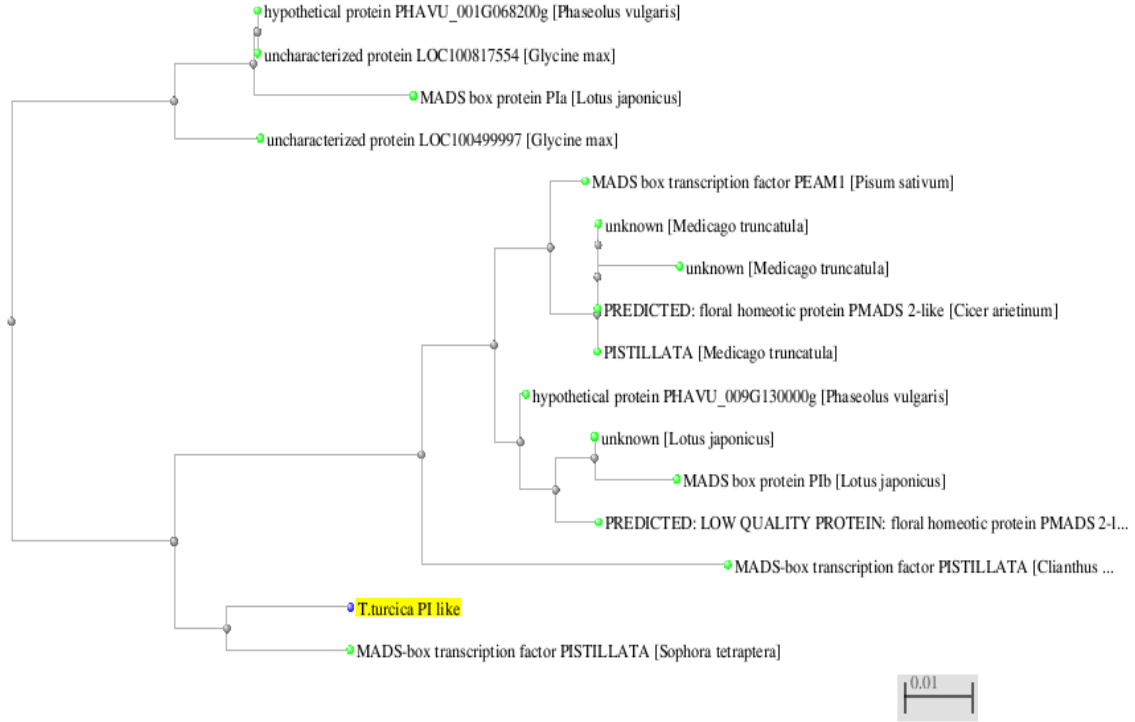
GKIEIKRIENSSNRQVTYSKRKNGILKKAKEITVLCDAQVSLIFGSSGKMH
EYISPSTTLIDVLD RYHKASGKRIWDAKHEN

PI- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin *PI*- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.4 *T. turcica* için elde edilen *PI*- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.4 *T. turcica* için elde edilen *PI*- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>S. tetraptera</i>	PISTILLATA	DQ418762.1	ABD78856.1	%96
2 <i>Lotus japonicus</i>	Unknown	BT145660.1	AFK45454.1	%94
3 <i>P. vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002296.1	ESW09470.1	%93
4 <i>Lotus japonicus</i>	PISTILLATAb (PIb)	AY770399.1	AAX13300	%93
5 <i>Glycine max</i>	Floral homeotic protein	XM_003523374.2	XP_003523422	%93
6 <i>P. vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002288.1	ESW33427.1	%92
7 <i>Glycine max</i>	uncharacterized protein	NM_001248456.1	NP_001235385	%92
8 <i>Glycine max</i>	uncharacterized protein	NM_001254097.2	NP_001241026.1	%92
9 <i>Pisum sativum</i>	PEAM1	AY842491.1	AAW29099.1	%92
10 <i>M. truncatula</i>	Unknown	BT149416.1	AFK49210.1	%90
11 <i>Lotus japonicus</i>	PISTILLATAa (PIa)	AY770398.1	AAX13299	%90
12 <i>Cicer arietinum</i>	PI MADS 2-Like	XM_004502480.1	XP_004502537.1	%90
13 <i>M. truncatula</i>	PISTILLATA	FJ403468.1	ACJ36228.1	%90
14 <i>C. maximus</i>	PISTILLATA	DQ418758.1	ABD78852.1	%89
15 <i>M. truncatula</i>	Unknown	BT051452.1	ACJ84116.1	%89

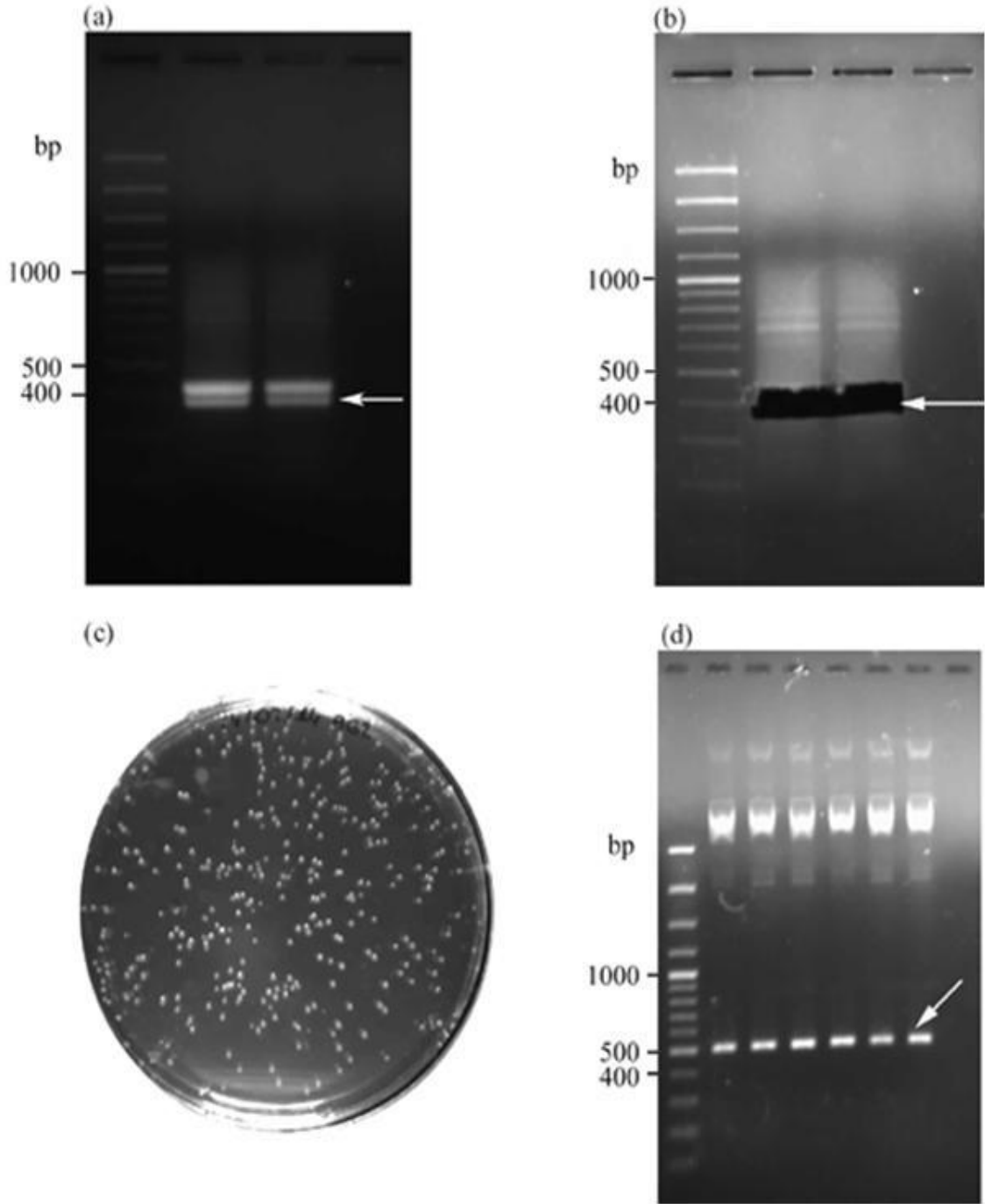
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *PISTILLATA*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.4'de verilen bitkilere ait PISTILLATA- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.5 AGAMOUS(AG)

AGF2/AGR3 (bkz. Çizelge 3.2) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 400 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.6a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bistrüri yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.6b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5a hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.6c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim analizine gönderilmiştir 4.6d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.6 *AGAMOUS* (*AG*)- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile AGF2/AGR3 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.2) ile çoğaltılmış 402 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 402 bp *AG* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

AG geni için iki farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

AG- 22 nükleotid dizisi (390 bp)

AAGAGAACACCACCAAATCGCCAAGTCACCTTCTGCAAGAGAAGAAA
TGGCCTGCTGAAAAAGGCATATGAGTTATCTGTGCTTTGTGATGCTGA
GGTTGCTCTAATAGTCTTCTCTAGCCGTGGCCGCCTCTATGAATATGCT
AATAACAGTGTCAAAGCAACTATTGAGAGGTACAAGAAAGCATGTTC
AGATTCTTCTGGTGCTGGATCTGCTTCTGAGGCTAATGCTCAGTTTTAC
CAGCAAGAAGCAGACAAACTGCGTGCGCAAATTAGTAACCTGCAAAA
TAACAACAGGCAAATGATGGGTGAGGCTTTGGGAAATATGAATGCCA
AGGATCTCAAAAACCTGGAGGGTAAATTAGAGAAGGGAATTAGCCGA
ATTCGCTCC

AG- 22 protein dizisi (130 aa)

KRTPPNRQVTFCKRRNGLLKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANN
SVKATIERYKKACSDSSGAGSASEANAQFYQQEADKLRAQISNLQNNNR
QMMGEALGNMNAKDLKNLEGKLEKGISRIRS

AG- 26 nükleotid dizisi (397 bp)

AAGAGGATTGAGAACACCACCAAATCGCCAAGTCACCTTCTGCAAGA
GAAGAAATGGCCTGCTGAAAAAGGCATATGAGTTATCTGTGCTTTGTG
ATGCTGAGGTTGCTCTAATAGTCTTCTCTAGCCGTGGCCGCCTCTATGA
ATATGCTAATAACAGTGTCAAAGCAACTATTGAGAGGTACAAGAAAG
CATGTTTCAGATTCTTCTGGTGCTGGATCTGCTTCTGAGGCTAATGCTCA
GTTTTACCAGCAAGAAGCAGACAAACTGCGTGCGCAAATTAGTAACCT
GCAAAAATAACAACAGGCAAATGATGGGTGAGGCTTTGGGAAATATGA
ATGCCAAGGATCTCAAAAACCTGGAGGGTAAATTAGAGAAGGGAATC
AGCCGAATTCGCTCC

AG- 26 protein dizisi (132 aa)

RGLRTPPNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYA
NNSVKATIERYKKACSDSSGAGSASEANAQFYQQEADKLRAQISNLQNN
NRQMMGEALGNMNAKDLKNLEGKLEKGISRIRS

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu iki diziden AG- benzeri dizi olarak aşağıdaki dizi kullanılmıştır.

Thermopsis turcica AG- benzeri nükleotid dizisi (397 bp)

AAGAGGATTGAGAACACCACCAAATCGCCAAGTCACCTTCTGCAAGA
GAAGAAATGGCCTGCTGAAAAAGGCATATGAGTTATCTGTGCTTTGTG
ATGCTGAGGTTGCTCTAATAGTCTTCTCTAGCCGTGGCCGCCTCTATGA
ATATGCTAATAACAGTGTCAAAGCAACTATTGAGAGGTACAAGAAAG
CATG TTCAGATTCTTCTGGTGCTGGATCTGCTTCTGAGGCTAATGCTCA
GTTTTACCAGCAAGAAGCAGACAACTGCGTGCGCAAATTAGTAACCT
GCAAATAACAACAGGCAAATGATGGGTGAGGCTTTGGGAAATATGA
ATGCCAAGGATCTCAAAAACCTGGAGGGTAAATTAGAGAAGGGAATC
AGCCGAATTCGCTCC

Thermopsis turcica AG- benzeri protein dizisi (132 aa)

RGLRTPPNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYA
NNSVKATIERYKKACSDSSGAGSASEANAQFYQQEADKLRAQISNLQNN
NRQMMGEALGNMNAKDLKNLEGKLEKGISRIRS

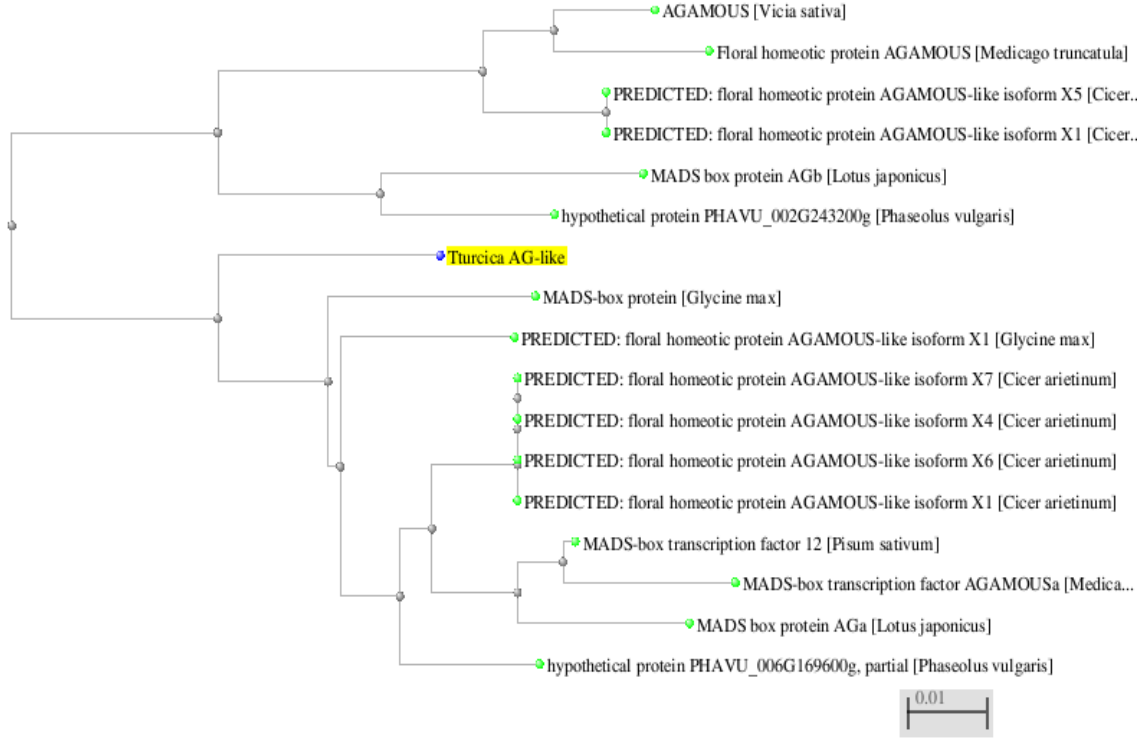
AG- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin AG- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.5 *T. turcica* için elde edilen AG- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin

açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.5 *T. turcica* için elde edilen AG- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelere göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>Glycine max</i>	AGAMOUS-like isoform X1	XM_003546007.2	XP_003546055.1	%94
2 <i>Glycine max</i>	MADS-box protein	NM_001250575.1	NP_001237504.1	%92
3 <i>Cicer arietinum</i>	AGAMOUS-like isoform X7	XM_004485901.1	XP_004485958.1	%92
4 <i>Cicer arietinum</i>	AGAMOUS-like isoform X4	XM_004485898.1	XP_004485955.1	%92
5 <i>P. vulgaris</i>	Hypothetical protein	XM_003523374.2	XP_003523422	%92
6 <i>Pisum sativum</i>	MADS-box transcription factor 12	KF147912.1	AGV40795.1	%92
7 <i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AGa	AY770402.1	AAX13303.1	%91
8 <i>Cicer arietinum</i>	AGAMOUS-like isoform X6	XM_004485900.1	XP_004485957.1	%90
9 <i>Cicer arietinum</i>	AGAMOUS-like isoform X1	XM_004485895.1	XP_004485952.1	%90
10 <i>M. truncatula</i>	MADS-box AGAMOUSa	KF159804.1	AGV55405.1	%89
11 <i>M. truncatula</i>	Floral homeotic protein AGAMOUS	XM_003629829.1	XP_003629877.1	%89
12 <i>Cicer arietinum</i>	AGAMOUS-like isoform X5	XM_004504202.1	XP_004504259.1	%89
13 <i>Cicer arietinum</i>	AGAMOUS-like isoform X1	XM_004504198.1	XP_004504255.1	%89
14 <i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AGb	AY770403.1	AAX13304.1	%87
15 <i>Vicia sativa</i>	AGAMOUS	JF313850.1	AEL31340.1	%86

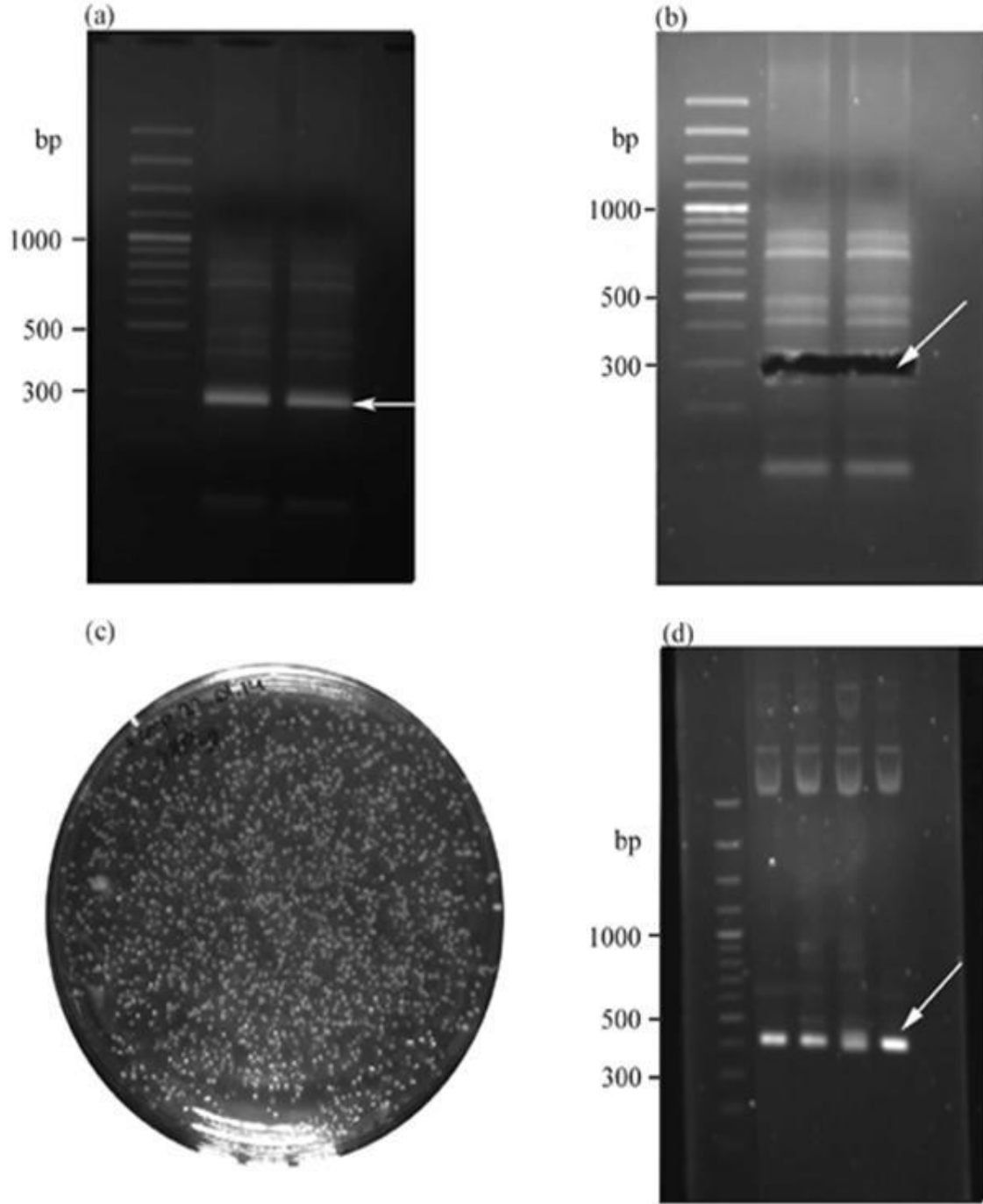
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *AGAMOUS*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.5'de verilen bitkilere ait AGAMOUS- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.6 SHATTERPROOF (SHP)

AGF2/SHPR1 (Çizelge 3.2) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 300 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.7a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bistiiri yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.7b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.7c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.7d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.7 *SHATTERPROOF* (*SHP*)- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile AGF2/SHPR1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.2) ile çoğaltılmış 296 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 296 bp *SHP* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

SHP geni için üç farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

SHP- 3 nükleotid dizisi (296 bp)

TCAAGCGGATCGAGAACACAACGAATAGACAAGTTACGTTCTGCAA
CGCCGCAACGGGTTGCTGAAGAAAGCGTATGAACTATCTGTTTTATGT
GATGCTGAAGTTGCCCTTGTTGTCTTCTCAGCCCGTGGCCGTCTTTATG
AGTATGCCAACAGCAGTGTTAGAGGAACTATCGAAAGGTACAAAAA
GCATCGGCTGCTTCCACAAATGCAGAATCTGTATCTGAAGCTAATACA
CAGTTTTATCACCAGGAGTCATCCAAATTA AAAAGACAGATTTCGAGAC
ATTCAGAAT

SHP- 3 protein dizisi (98 aa)

KRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALVVFSARGRLYEY
ANSSVRGTIERYYKKASAASTNAESVSEANTQFYHQESSKLK RQIRDIQN

SHP- 23 nükleotid dizisi (296 bp)

TCAAGAGGATCGAGAACACAACGAATAGACAAGTCACTTTCTGCAAG
CGGCGCAATGGGTTGCTGAAGAAAGCGTATGAACTATCTGTTTTATGT
GATGCTGAAGTTGCCCTTGTTGTCTTCTCAGCCCGTGGCCGTCTTTATG
AGTATGCCAACAGCAGTGTTAGAGGAACTATCGAAAGGTACAAAAA
GCATCGGCTGCTTCCACAAATGCAGAATCTGTATCTGAAGCTAATACA
CAGTTTTATCACCAGGAGTCATCCAAATTA AAAAGACAGATTTCGAGAC
ATTCAGAAT

SHP- 23 protein dizisi (98 aa)

KRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALVVFSARGRLYEY
ANSSVRGTIERYYKKASAASTNAESVSEANTQFYHQESSKLKRQIRDIQN

SHP- 9 nükleotid dizisi (296 bp)

TCAAGCGGATAGAGAACACAACGAATAGACAAGTTACGTTCTGCAGA
CGCCGCAACGGGTTGCTGAAGAAAGCGTATGATCTATCTGTTTTATGT
GATGCTGAAGTTGCCCTTGTTGTCTTCTCAGCCCGTGGCCGTCTTTATG
AGTATGCCAACAGCAGTGTTAGAGGAACTATCGAAAGGTACAAAAAA
GCATCGGCTGCTTCCACAAATGCAGAATCTGTATCTGAAGCTAATACA
CAGTTTTATCACCAGGAGTCATCCAAATTA AAAAAGACAGATTTCGAGAC
ATTCAGAAT

SHP- 9 protein dizisi (98 aa)

KRIENTTNRQVTFRRRNGLLKKAYDLSVLCDAEVALVVFSARGRLYEY
ANSSVRGTIERYYKKASAASTNAESVSEANTQFYHQESSKLKRQIRDIQN

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu üç diziden ortak bir dizi üretilmiştir.

Thermopsis turcica SHP- benzeri nükleotid dizisi (296 bp, SHP- 23)

TCAAGAGGATCGAGAACACAACGAATAGACAAGTCACTTTCTGCAAG
CGGCGCAATGGGTTGCTGAAGAAAGCGTATGAACTATCTGTTTTATGT
GATGCTGAAGTTGCCCTTGTTGTCTTCTCAGCCCGTGGCCGTCTTTATG
AGTATGCCAACAGCAGTGTTAGAGGAACTATCGAAAGGTACAAAAAA
GCATCGGCTGCTTCCACAAATGCAGAATCTGTATCTGAAGCTAATACA
CAGTTTTATCACCAGGAGTCATCCAAATTA AAAAAGACAGATTTCGAGAC
ATTCAGAAT

Thermopsis turcica SHP- benzeri protein dizisi (98 aa, SHP- 23)

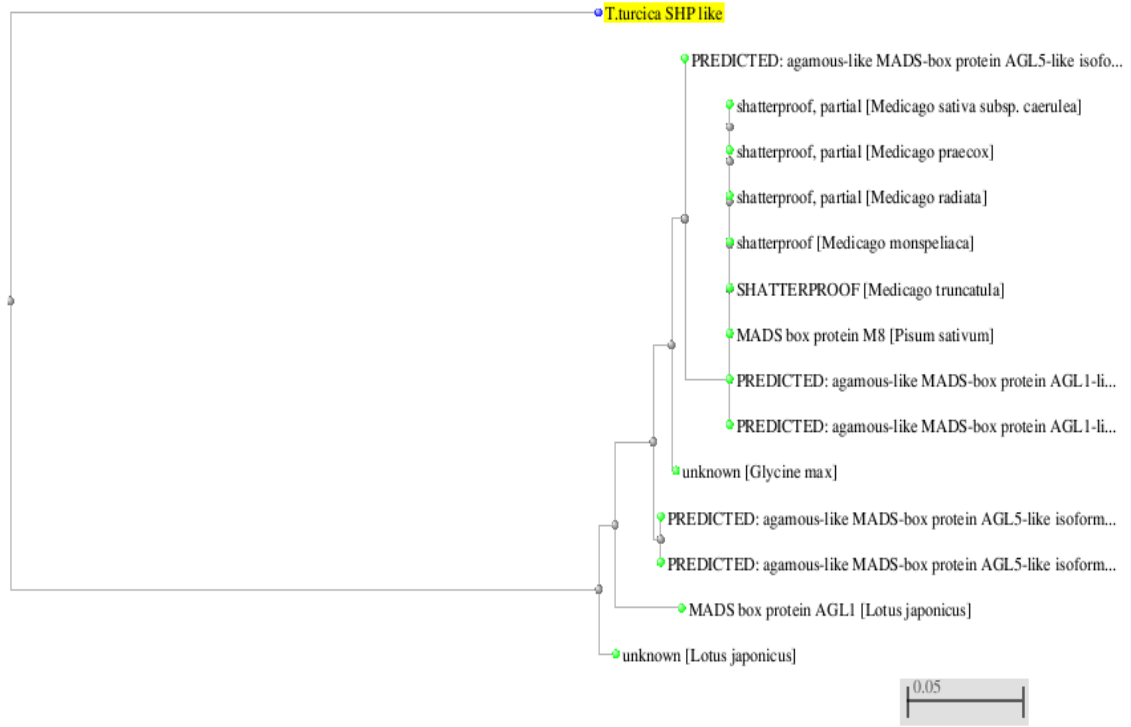
KRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALVVFSARGRLYEY
ANSSVRGTIERYKKASAASTNAESVSEANTQFYHQESSKLRQIRDIQN

SHP- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin *SHP*-benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.6 *T. turcica* için elde edilen *SHP*-benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelere göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.6 *T. turcica* için elde edilen *SHP*- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelere göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>Glycine max</i>	MADS-box protein (SHP2)	AGL5 XM_006575603.1	XP_006575666.1	%95
2 <i>Glycine max</i>	Unknown	BT093859.1	ACU18208.1	%94
3 <i>M.sativa subsp. caerulea</i>	SHATTERPROOF	CM002296.1	AGK25044.1	%94
4 <i>M. praecox</i>	SHATTERPROOF	JX297559.1	AGK25038.1	%94
5 <i>M. radiata</i>	SHATTERPROOF	JX297569.1	AGK25048.1	%94
6 <i>M. monspeliaca</i>	SHATTERPROOF	JX297566.1	AGK25045.1	%94
7 <i>M. truncatula</i>	SHATTERPROOF	JX308825.1	AFU81372.1	%94
8 <i>Pisum sativum</i>	MADS box protein M8	AY884292.1	AAX69070.1	%94
9 <i>Glycine max</i>	MADS-box protein (SHP2)	AGL5 XM_006595684.1	XP_006595747.1	%93
10 <i>Glycine max</i>	MADS-box protein (SHP2)	AGL5 XM_003545074.2	XP_003545122.1	%93
11 <i>Cicer arietinum</i>	MADS-box protein (SHP1)	AGL1 XM_004513666.1	XP_004513723.1	%92
12 <i>Cicer arietinum</i>	MADS-box protein (SHP1)	AGL1 XM_004513662.1	XP_004513719.1	%92
13 <i>Lotus japonicus</i>	Unknown	BT135371.1	AFK35166.1	%89
14 <i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein (SHP1)	AGL1 AY770404.1	AAX13305.1	%89

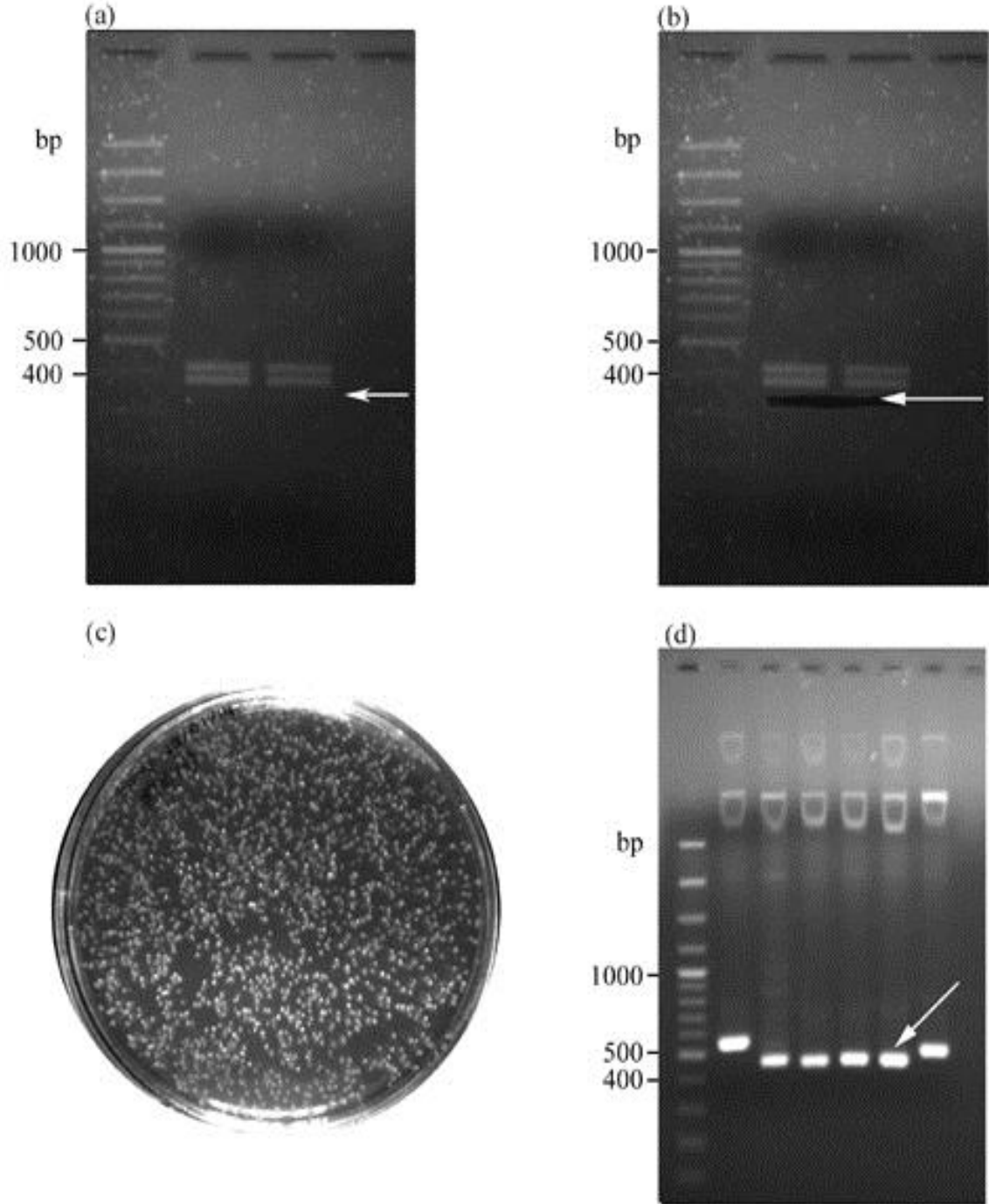
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *SHATTERPROOF*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4'de verilen bitkilere ait SHATTERPROOF-benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.7 SEEDSTICK (STK)

AGF2/STKR1 (Çizelge 3.2) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak 350 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.8a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bistrü yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.8b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.8c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.8d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir



Resim 4.8 *SEEDSTICK (STK)*- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Tomurcuğa ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile AGF2/STKR1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.2) ile çoğaltılmış 350 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 350 bp *STK* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

STK geni için iki farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir

STK- 6 nükleotid dizisi (352 bp)

TCAAGAGGATTGAGAACACGACGAATCGGCAGGTGACGTTCTGCAA
GCGAAGAAATGGGCTTCTGAAGAAAGCTTATGAGCTATCAGTGCTTT
GTGATGCAGAGGTTGCCCTCATTGTCTTCTCAAGCCGCGGTGGCCTCT
ACGAGTATTCAAACAACAACATAAGATCAACTATTGACAGGTACAGA
AAAGCAAGCTCAGATAATTCAAATACGAGCTCTGCCACGGAAATTAA
TGCCCAGTATTATCAACAAGAATCTGCAAAGCTGCGGCAGCAAATAC
AAATGCTGCAAACTCTAACAGGCATTTGATGGGTGATGCCTTGAGC
ACGTTGACCGTGAAGGAACTTAA

STK- 6 protein dizisi (116 aa)

KRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGGLYEYS
NNNIRSTIDRYRKASSDNSNTSSATEINAQYYQQESAKLRQQIQMLQNSNR
HLMGDALSTLTVKEL

STK-19 nükleotid dizisi (350 bp)

TCAAGAGGATTGAGAACACAACGAATCGGCAGGTGACGTTCTGCAAG
CGAAGAAATGGGCTTCTGAAGAAAGCTTATGAGCTATCAGTGCTTTGT
GATGCAGAGGTTGCCCTCATTGTCTTCTCAAGCCGCGGTGCGCCTCTACG
AGTATTCAAACAACAACATAAGATCAACTATTGACAGGTACAGAAAA
GCAAGCTCAGATAATTCAAATACGAGCTCTGCCACGGAAATTAATGCC
CAGTATTATCAACAAGAATCTGCAAAGCTGCGGCAGCAAATACAAAT
GCTGCAAACTCTAACAGGCATTTGATGGGTGATGCCTTGAGCACTCT
GACAGTGAAGGAGCTTAA

STK- 19 protein dizisi (116 aa)

KRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYS
NNNIRSTIDRYRKASSDNSNTSSATEINAQYYQQESAKLRQQIQMLQNSNR
HLMGDALSTLTVKEL

Yukarıdaki dizilerden STK- 19 dizisi üzerinden *Thermopsis turcica* için *SEEDSTICK*-benzeri gen parçası taraması yapılmıştır.

Thermopsis turcica *SEEDSTICK*- benzeri nükleotid dizisi (350 bp)

TCAAGAGGATTGAGAACACAACGAATCGGCAGGTGACGTTCTGCAAG
CGAAGAAATGGGCTTCTGAAGAAAGCTTATGAGCTATCAGTGCTTTGT
GATGCAGAGGTTGCCCTCATTGTCTTCTCAAGCCGCGGTCGCCTCTACG
AGTATTCAAACAACAACATAAGATCAACTATTGACAGGTACAGAAAA
GCAAGCTCAGATAATTCAAATACGAGCTCTGCCACGGAAATTAATGCC
CAGTATTATCAACAAGAATCTGCAAAGCTGCGGCAGCAAATACAAAT
GCTGCAAAACTCTAACAGGCATTTGATGGGTGATGCCTTGAGCACTCT
GACAGTGAAGGAGCTTAA

Thermopsis turcica *SEEDSTICK*- benzeri protein (116 aa)

KRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYS
NNNIRSTIDRYRKASSDNSNTSSATEINAQYYQQESAKLRQQIQMLQNSNR
HLMGDALSTLTVKEL

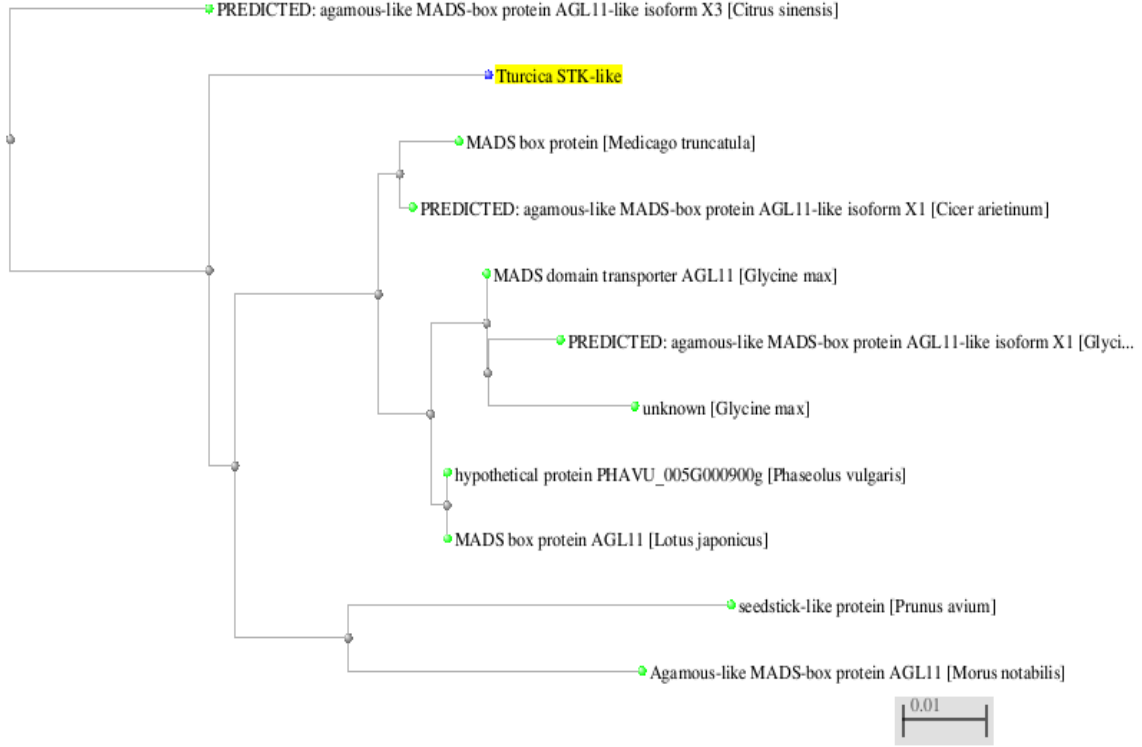
STK- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin *STK*- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.7 *T. turcica* için elde edilen *STK*- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin; açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını

vermektedir. Tablodaki bazı bitki türleri yeterli dizi bilgisi bulunmadığından legümler dışından da seçilmiştir.

Çizelge 4.7 *T. turcica* için elde edilen STK- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>Cicer arietinum</i>	AGL11-like isoform X1	XM_004499509.1	XP_004499566.1	% 95
2 <i>M. truncatula</i>	MADS box protein	XM_003597987.1	XP_003598035.1	% 94
3 <i>Phaseolus vulgaris</i>	hypothetical protein	XM_007148547.1	XP_007148609.1	% 94
4 <i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein AGL11	AY770405.1	AAX13306.1	% 94
5 <i>Glycine max</i>	MADS domain transporter AGL11	NM_001249201.1	NP_001236130.1	% 93
6 <i>Citrus sinensis</i>	AGL11-like isoform X3	XM_006478145.1	XP_006478208.1	% 93
7 <i>Glycine max</i>	AGL11-like isoform X1	XM_003523436.2	XP_003523484.1	% 92
8 <i>Morus notabilis</i>	MADS-box protein AGL11	KE344949.1	EXB88208.1	% 92
9 <i>Glycine max</i>	unknown	BT091029.1	ACU15109.1	% 91
10 <i>Prunus avium</i>	SEEDSTICK-like protein	JF894322.1	AEH41428.1	% 90

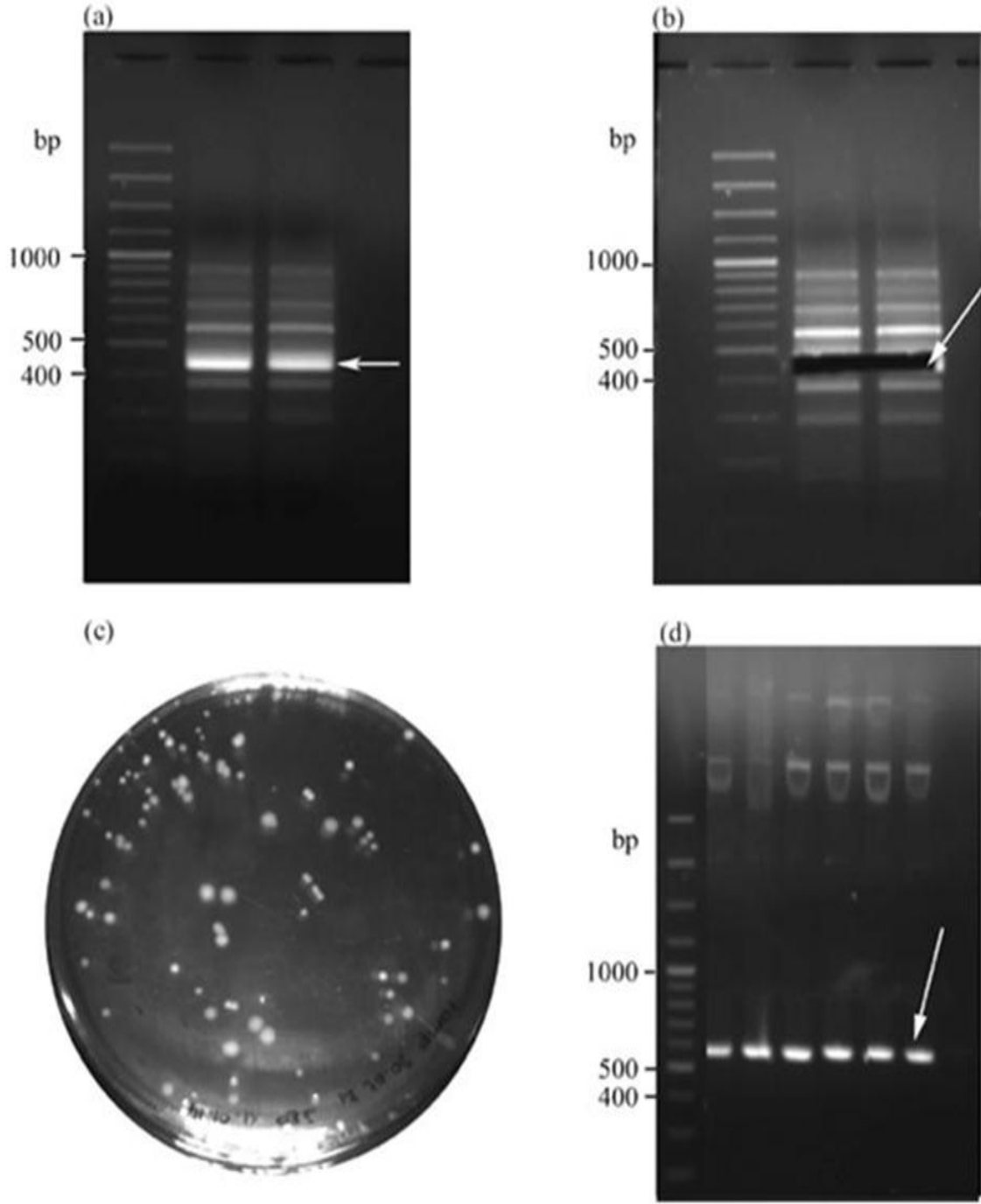
BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *SEEDSTICK*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram aşağıda verilmiştir (Şekil 21).



Şekil 4.7 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.7'de verilen bitkilere ait *SEEDSTICK*-benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.8 *SEPALLATA (SEP)*

SEPF1/SEPR1 (Çizelge 3.2) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 440 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.9a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bistrüri yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.9b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.9c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.9d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.9 *SEPALLATA* (*SEP*)- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile SEPF1/SEPR1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.2) ile çoğaltılmış 441 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 441 bp *SEP* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA'sı içermektedir.

SEP geni için dört farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

SEP- 15 nükleotid dizisi (442 bp)

GTGGAGCTTAAGAGGATAGAGAACAAAATCAATAGGCAAGTCACATT
TGCCAAGAGAAGAAATGGGTTGCTTAAGAAGGCTTATGAGCTCTCTGT
CCTTTGTGATGCTGAAGTTGCCCTCATCATCTTCTCTAACCGTGGCAAG
CTTTATGAGTTCAGCAGCACCTCCTGCATGATGAAAACACTGGAGAAG
TACCAAAAGTACAGTTACAGTGCCTGGAGAGCAGCCGATCAGTCAGT
GACACTCAGAACAACACTACCAAGAATATGTGAGACTAAAAGCAAAGGT
AGAAGTCCTGCAACGCTCACAGAGGAACCTACTCGGGGAAGATATTG
CCCAAATGAATACAAGTGAGCTGGAGCAGCTTGAGAATCAACTGGAG
GCAGCACTGAGGAATATTAGGTCATCAAAGACTCAATTCATGCTGGAC
CAATTAGCTGATC

SEP- 15 protein dizisi (147 aa)

VELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYE
FSSTSCMMKTLEKYQKYSYSALESSRSVSDTQNNYQEYVRLKAKVEVLQ
RSQRNLLGEDIAQMNTSELEQLENQLEAALRNIRSSKTQFMLDQLAD

SEP- 20 nükleotid dizisi (448 bp)

GTGGAGCTTAAGAGGATAGAGAACAAAATCAATAGGCAAGTCACATT
TGCCAAGAGAAGAAATGGGTTGCTTAAGAAGGCTTATGAGCTCTCTGT
CCTTTGTGATGCTGAAGTTGCCCTCATCATCTTCTCCAACCGTGGCAAG
CTTTATGAGTTCAGCAGCACCTCCTGCATGATGAAAACACTGGAGAAG
TACCAAAAGTACAGTTACAGTGCCTGGAGAGCAGCCGATCAGTCAGT
GACACTCAGAACAACACTACCAAGAATATGTGAGACTAAAAGCAAAGGT
AGAAGTCCTGCAACGCTCACAGAGGAACCTACTCGGGGAAGATATTG
CCCAAATGAATACAAGTGAGCTGGAGCAGCTTGAGAATCAACTGGAG

GCAGCACTGAGGAATATTAGGTCATCAAAGACTCAATTCATGCTGGAC
CAATTAGCTGATC

SEP- 20 protein dizisi (147 aa)

VELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYE
FSSTSCMMKTLEKYQKYSYSALESSRSVSDTQNNYQEYVRLKAKVEVLQ
RSQRNLLGEDIAQMNTSELEQLENQLEAALRNIRSSKTQFMLDQLAD

SEP- 19 nükleotid dizisi (444 bp)

GTGGAGTTAAGAGGATAGAGAACAAGATAAACAGACAAGTAACATTT
GCAAAGAGGAGAAATGGGCTTCTCAAAAAGCTTATGAGTTATCTGTT
CTTTGTGATGCTGAGGTTGCACTCATCATCTTCTCCAACCGAGGAAAG
CTTTATGAGTTCTGTAGCAGCTCTAGCATGCCCAAGACACTTGAAAGG
TACCAGAAGTGCAGTTATGGTGCTGTGGAAGTTAGCAAGCCTGCCAAA
GAGCTAGAGCAGAGCAGCTACCGTGAGTACTTGAAGTTGAAATCAAG
ATTTGAATCTCTTCAAAGGACCCAGAGAAACCTTCTAGGAGAAGACTT
GGGCCCACTGAATACCAAAGAAGTTGAGCAGCTTGAACGGCAATTGG
ATTCCTCTCTGAAGCAAGTGAGGTCCACAAAGACACAATTCATGCTGG
ATCAATTAGCTGATC

SEP- 19 protein dizisi (147 aa)

GVKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYEF
CSSSSMPKTLERYQKCSYGAVEVSKPAKELEQSSYREYLKLSRFESLQRT
QRNLLGEDLGPLNTKELEQLERQLDSSLKQVRSTKTQFMLDQLAD

SEP- 11 nükleotid dizisi (448 bp)

GTTGAGTTGAAGAGGATAGAGAACAATAACAGGCAAGTGACCTT
CGCAAACGAAGGAACGGACTTTTGAAGAAAGCTTATGAACTTCCCGT

TCTTTGCGATGCTGAAGTTGCTCTCATCATCTTCTCCAATAGGGGAAAA
TTGTACGAGTTTTGCAGCAGCTCAAGCATGCTAAAAACGCTAGAGAGG
TACCAGAAATGTA ACTATGGAGCGCCAGAGGCTAACGTGTCTACACGG
GAAGCCTTGGAGTTAAGCAGTCAACAGGAATACTTGAAGCTGAAGGC
ACGTTATGAAGCCCTCCAAAGGTCCCAGAGGAACCTTATGGGAGAAG
ATCTTGGCCCTCTAAGCAGCAAAGAGCTCGAGTCACTTGAAAGGCAAC
TAGATTCTTCCTTGAAGCAAATCAGATCAACAAGGACCCAATTCATGC
TGGACCAATTAGCTGATC

SEP- 11 protein dizisi (448 aa)

VELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYE
FCSSSMLKTLERYQKCNYGAPEANVSTREALELSSQQEYLKPKARYEAL
QRSQRNLMGEDLGPLSSKELESRLQLDSSLKQIRSTRTQFMLDQLAD

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu dört diziden ortak bir dizi üretilmiştir. Bu dizilerden SEP- 19 *SEPALLATA1* dizisine, SEP- 11 ise *SEPALLATA3* benzediği için bu iki dizi BLASTp programı ile ayrı ayrı çalışılmıştır.

Thermopsis turcica *SEPALLATA1*- benzeri nükleotid dizisi (SEP- 19)

GTGGAGTTAAGAGGATAGAGAACAAGATAAACAGACAAGTAACATTT
GCAAAGAGGAGAAATGGGCTTCTCAAAAAGCTTATGAGTTATCTGTT
CTTTGTGATGCTGAGGTTGCACTCATCATCTTCTCCAACCGAGGAAAG
CTTTATGAGTTCTGTAGCAGCTCTAGCATGCCCAAGACACTTGAAAGG
TACCAGAAGTGCAGTTATGGTGCTGTGGAAGTTAGCAAGCCTGCCAAA
GAGCTAGAGCAGAGCAGCTACCGTGAGTACTTGAAGTTGAAATCAAG
ATTTGAATCTCTTCAAAGGACCCAGAGAAACCTTCTAGGAGAAGACTT
GGGCCCACTGAATACCAAAGA ACTTGAGCAGCTTGAACGGCAATTGG
ATTCCTCTCTGAAGCAAGTGAGGTCCACAAAGACACAATTCATGCTGG
ATCAATTAGCTGATC

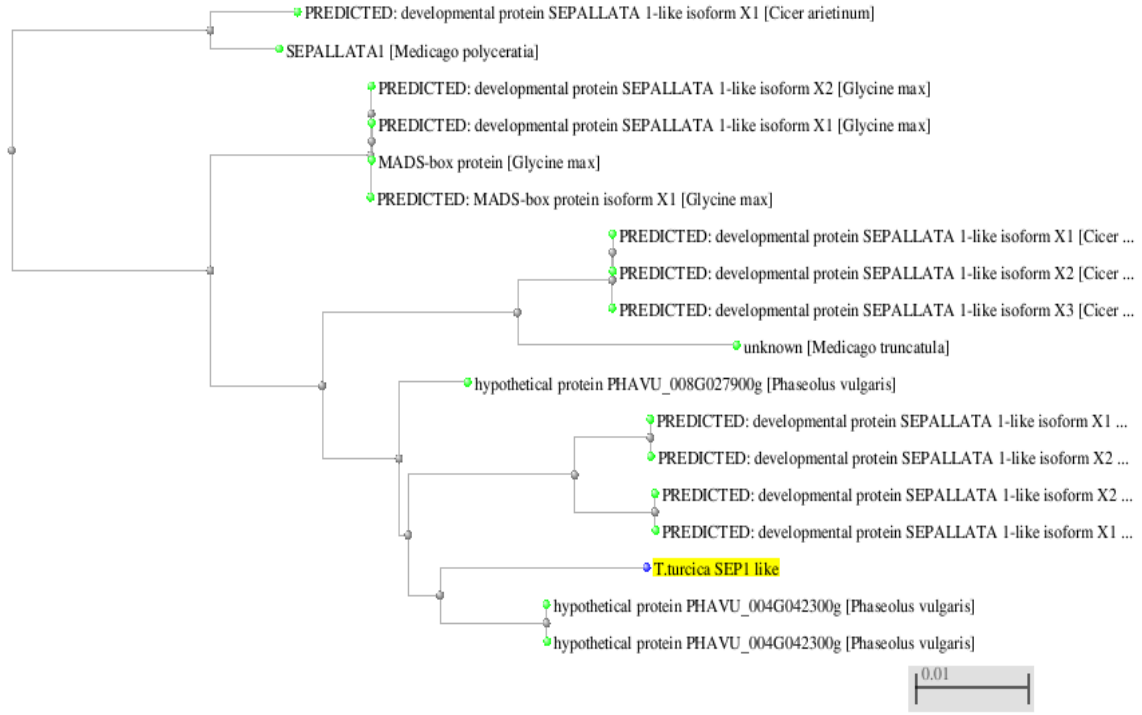
Thermopsis turcica SEPALLATA1- benzeri protein dizisi (SEP- 19)

GVKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYEF
CSSSSMPKTLERYQKCSYGAVEVSKPAKELEQSSYREYLKLSRFESLQRT
QRNLLGEDLGPLNTKELEQLERQLDSSLKQVRSTKTQFMLDQLAD

SEPI- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin *SEPI*- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.8 *T. turcica* için elde edilen *SEPI*- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir. BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *SEPALLATA*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.8 *T. turcica* için elde edilen SEP1- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

	Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002291.1	ESW23382.1	%97
2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002295.1	ESW11414.1	%97
3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002291.1	ESW23383.1	%97
4	<i>Glycine max</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_003531829.2	XP_003531877	%96
5	<i>Glycine max</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_006602899.1	XP_006602962.1	%96
6	<i>Glycine max</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_006585743.1	XP_006585806	%95
7	<i>Glycine max</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_003552561.2	XP_003552609.1	%95
8	<i>Glycine max</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_006593640.1	XP_006593703.1	%95
9	<i>Glycine max</i>	MADS-box protein isoform X1	XM_006603693.1	XP_006603756	%95
10	<i>Cicer arietinum</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_004507230.1	XP_004507287.1	%95
11	<i>Cicer arietinum</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_004507232.1	XP_004507289.1	%95
12	<i>Glycine max</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_003543964.2	XP_003544012.1	%94
13	<i>Glycine max</i>	MADS-box protein	NM_001251367.1	NP_001238296	%94
14	<i>Cicer arietinum</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_004507231.1	XP_004507288.1	%94
15	<i>Cicer arietinum</i>	Developmental protein SEP1-like	XM_004491846.1	XP_004491903.1	%92
16	<i>M. truncatula</i>	Unknown	BT142512.1	AFK42306.1	%92
17	<i>M. polyceratia</i>	SEPALLATA1	JX390717.1	AFU81295.1	%92



Şekil 4.8 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.8'de verilen bitkilere ait SEPALLATA1- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

Thermopsis turcica SEPALLATA3- benzeri nükleotid dizisi (SEP- 11)

GTTGAGTTGAAGAGGATAGAGAACAAAATCAACAGGCAAGTGACCTT
 CGCAAACGAAGGAACGGACTTTTGAAGAAAGCTTATGAACTTTCCGT
 TCTTTGCGATGCTGAAGTTGCTCTCATCATCTTCTCCAATAGGGGAAAA
 TTGTACGAGTTTTGCAGCAGCTCAAGCATGCTAAAAACGCTAGAGAGG
 TACCAGAAATGTA ACTATGGAGCGCCAGAGGCTAACGTGTCTACACGG
 GAAGCCTTGGAGTTAAGCAGTCAACAGGAATACTTGAAGCTGAAGGC
 ACGTTATGAAGCCCTCAAAGGTCCCAGAGGAACCTTATGGGAGAAG
 ATCTTGGCCCTCTAAGCAGCAAAGAGCTCGAGTCACTTGAAAGGCAAC
 TAGATTCTTCCTTGAAGCAAATCAGATCAACAAGGACCCAATTCATGC
 TGGACCAATTAGCTGATC

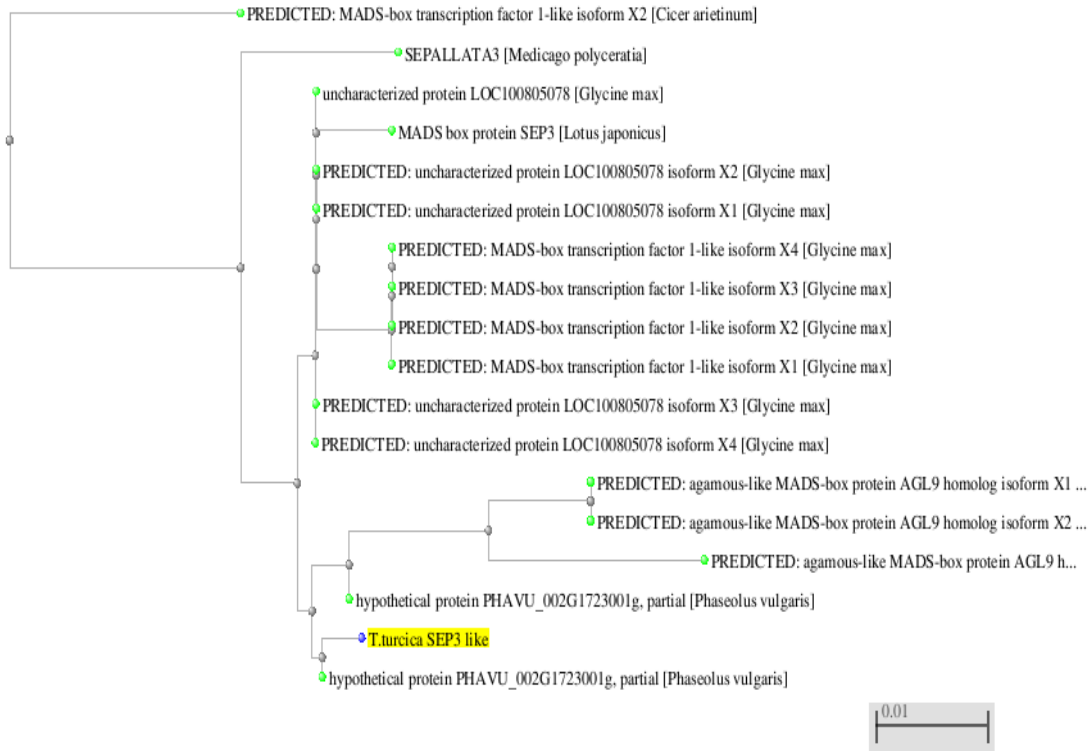
Thermopsis turcica SEPALLATA3- benzeri protein dizisi (SEP- 11)

VELKRIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYE
FCSSSSMLKTLERYQKCNYGAPEANVSTREALELSSQQEYLKCLKARYEAL
QRSQRNLMGEDLGPLSSKELESLESLERQLDSSLKQIRSTRTQFMLDQLAD

SEP3- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin *SEP3*- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.9 *T. turcica* için elde edilen *SEP3*- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir. BLASTp analizine göre elde ettiğimiz dizi en çok legüm bitkilerine ait bitkilerden elde edilen *SEPALLATA3*- benzeri dizilere benzemektedir. Bu diziler arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.9 *T. turcica* için elde edilen SEP3- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası protein ve nükleotid kodları

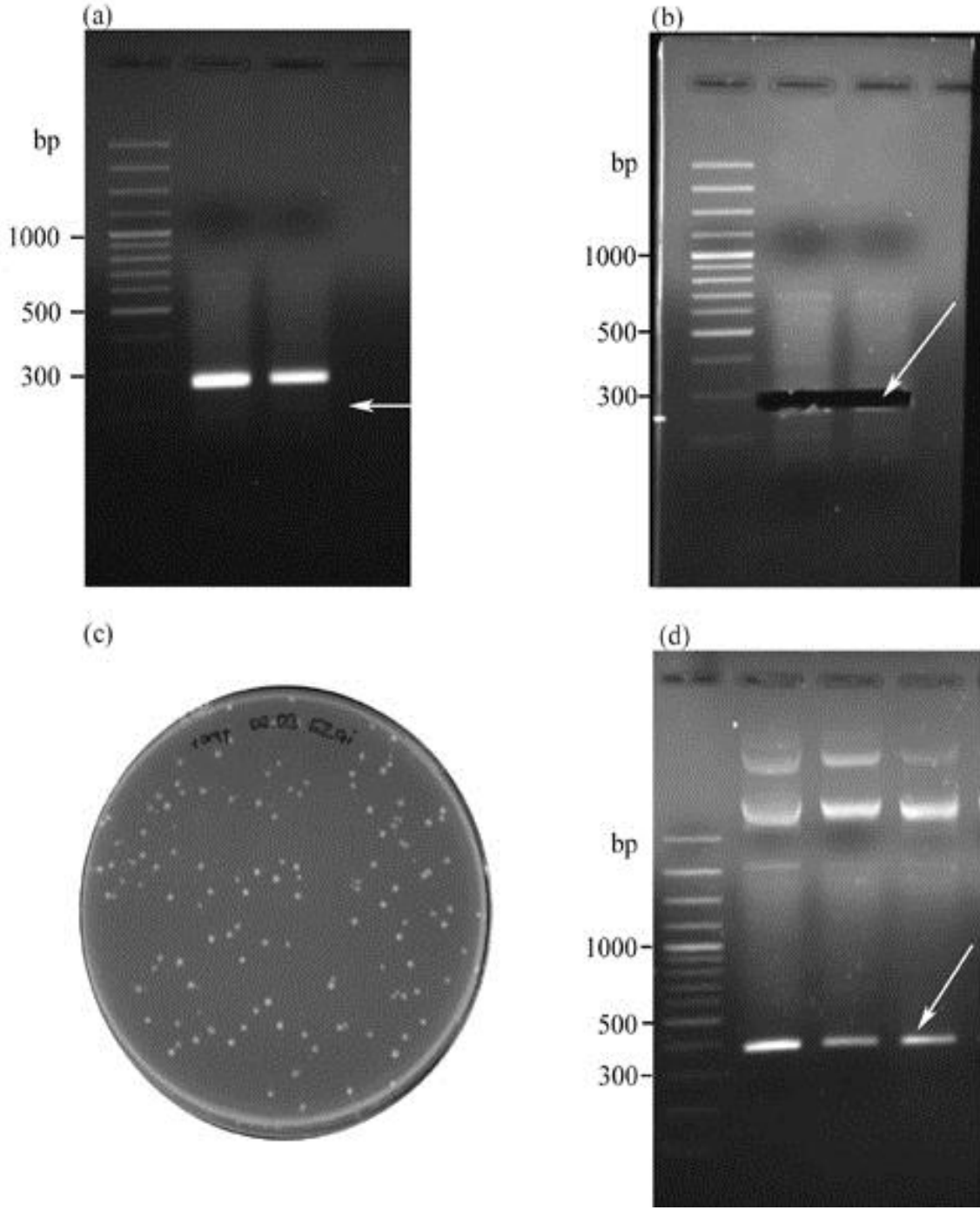
	Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Gen Bankası Protein Kodu	Benzerlik Oranı
1	<i>P. vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002289.1	ESW30659.1	%100
2	<i>Glycine max</i>	Uncharacterized protein	NM_001255813.1	NP_001242742.1	%99
3	<i>Glycine max</i>	Uncharacterized protein	XM_006579372.1	XP_006579435.1	%99
4	<i>Glycine max</i>	Uncharacterized protein	XM_006579373.1	XP_006579436.1	%99
5	<i>Lotus japonicus</i>	MADS box protein SEP3	AY770397.1	AAX13298.1	%99
6	<i>Glycine max</i>	MADS-box transcription factor	XM_006585069.1	XP_006585132.1	%99
7	<i>Glycine max</i>	MADS-box transcription factor	XM_006585068.1	XP_006585131.1	%99
8	<i>P. vulgaris</i>	Hypothetical protein	CM002289.1	ESW30660.1	%99
9	<i>Glycine max</i>	Uncharacterized protein	XM_006579370.1	XP_006579433.1	%98
10	<i>Glycine max</i>	Uncharacterized protein	XM_006579371.1	XP_006579434.1	%98
11	<i>Glycine max</i>	MADS-box transcription factor	XM_006585067.1	XP_006585130.1	%97
12	<i>Glycine max</i>	MADS-box transcription factor	XM_006585066.1	XP_006585129.1	%97
13	<i>Cicer arietinum</i>	MADS-box protein AGL9 (SEP3)	XM_004504340.1	XP_004504397.1	%97
14	<i>Cicer arietinum</i>	MADS-box protein AGL9 (SEP3)	XM_004504341.1	XP_004504398.1	%97
15	<i>M. polyceratia</i>	SEPALLATA3	JX390718.1	AFU81296	%97
16	<i>Cicer arietinum</i>	MADS-box transcription factor	XM_004502218.1	XP_004502275	%95
17	<i>Cicer arietinum</i>	MADS-box protein AGL9 (SEP3)	XM_004504342.1	XP_004504399.1	%95



Şekil 4.9 *T. turcica*'da belirlenen ve Çizelge 4.9'de verilen bitkilere ait SEPALLATA3- benzeri proteinlerin dizileri arasındaki genetik ilişki dendogramı. Bu dendogram BLASTp analizi sonrası elde edilmiştir.

4.9 β -ACTIN

β -ACTF1/ β -ACTR1 (bkz. Çizelge 3.1) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak yaklaşık 275 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.10a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bisturi yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.10b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.10c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.10d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.10 β -ACTIN - benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile β -ACTF1/ β -ACTR1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.1) ile çoğaltılmış 276 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 276 bp β -ACTIN parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA parçasını içermektedir.

β-ACTIN geni için üç farklı insört DNA nükleotid dizileri ve bu dizilerden çıkarılmış olan protein dizileri aşağıda verilmiştir.

β-ACTIN- 14 nükleotid dizisi (275 bp)

```
GTGAAGGAAAACATGCCTACATTGCTCTTGATTATGAACAAGACATGG
AAACTTCAAAGACAAGCTCAGCTGTTGAGAAGAGCTATGAACTACCTG
ATGGCCAGGTGATAACAATAGGCGCTGAAAGATTCAGGTGCCCTGAA
GTTCTGTTCCAGCCATCCATGATTGGGATGGAATCTCCCGGCATCCAC
GAAACCACATATAACTCGATCATGAAGTGCGATGTCGATATTAGGAAG
GATCTCTATGGTAACATTGTGTTGAGTGGTGGTTCA
```

β -ACTIN- 14 protein dizisi (91 aa)

```
EGKHAYIALDYEQDMETSKTSSAVEKSYELPDGQVITIGAERFRCPEVLFQ
PSMIGMESPGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIVLSGGS
```

β -ACTIN- 15 nükleotid dizisi (275 bp)

```
GTGAAGGAAAACATGCGTACATTGCTCTTGATTATGAACAAGAGATGG
AAACTTCAAAGACAAGCTCAGCTGTTGAGAAGAGCTATGAACTACCTG
ATGGCCAGGTGATAACAATAGGCGCTGAAAGATTCCGTTGCCCTGAAG
TACTCTTCCAGCCATCCATGATTGGGATGGAAGCTCCTGGCATCCACG
AAACCACATATAACTCGATCATGAAGTGCGATGTCGATATTAGGAAGG
ATCTCTATGGTAACATTGTTTTGAGTGGTGGTTCA
```

β -ACTIN- 15 protein dizisi (91 aa)

```
EGKHAYIALDYEQEMETSKTSSAVEKSYELPDGQVITIGAERFRCPEVLFQ
PSMIGMEAPGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIVLSGG
```

β -ACTIN- 142 nükleotid dizisi (275 bp)

GTGAAGGAAAACATGCCTATATTGCTCTTGATTATGAACAAGAGCTAG
AAACTTCCAAGACCAGCTCAGCTGTTGAGAAGAGCTATGAGCTACCTG
ATGGACAAGTTATCACAATAGGCGCTGAAAGATTCAGGTGCCCTGAAG
TTCTGTTCCAGCCATCCATGATTGGGATGGAATCTCCCGGCATCCACG
AAACCACATATAACTCGATCATGAAGTGCGATGTCGATATTAGGAAGG
ATCTCTATGGTAACATTGTTTTGAGTGGTGGTTCA

β -ACTIN- 142 protein dizisi (91 aa)

EGKHAYIALDYEQELETSKTSSAVEKSYELPDGQVITIGAERFRCPEVLFQP
SMIGMESPGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIVLSGGS

Yukarıda belirlenen ham veriler, kendi aralarında ve literatürdeki benzer diziler arasında dikkatli karşılaştırma ve düzeltme işlemleri sonrası bu üç diziden ortak bir dizi üretilmiştir.

Thermopsis turcica β - ACTIN- benzeri nükleotid dizisi (β - ACTIN- 14, 275 bp)

GTGAAGGAAAACATGCCTACATTGCTCTTGATTATGAACAAGACATGG
AAACTTCAAAGACAAGCTCAGCTGTTGAGAAGAGCTATGAACTACCTG
ATGGCCAGGTGATAACAATAGGCGCTGAAAGATTCAGGTGCCCTGAA
GTTCTGTTCCAGCCATCCATGATTGGGATGGAATCTCCCGGCATCCAC
GAAACCACATATAACTCGATCATGAAGTGCGATGTCGATATTAGGAAG
GATCTCTATGGTAACATTGTGTTGAGTGGTGGTTCA

Thermopsis turcica β - ACTIN- benzeri protein dizisi (β - ACTIN- 14, 91 aa)

EGKHAYIALDYEQDMETSKTSSAVEKSYELPDGQVITIGAERFRCPEVLFQ
PSMIGMESPGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIVLSGGS

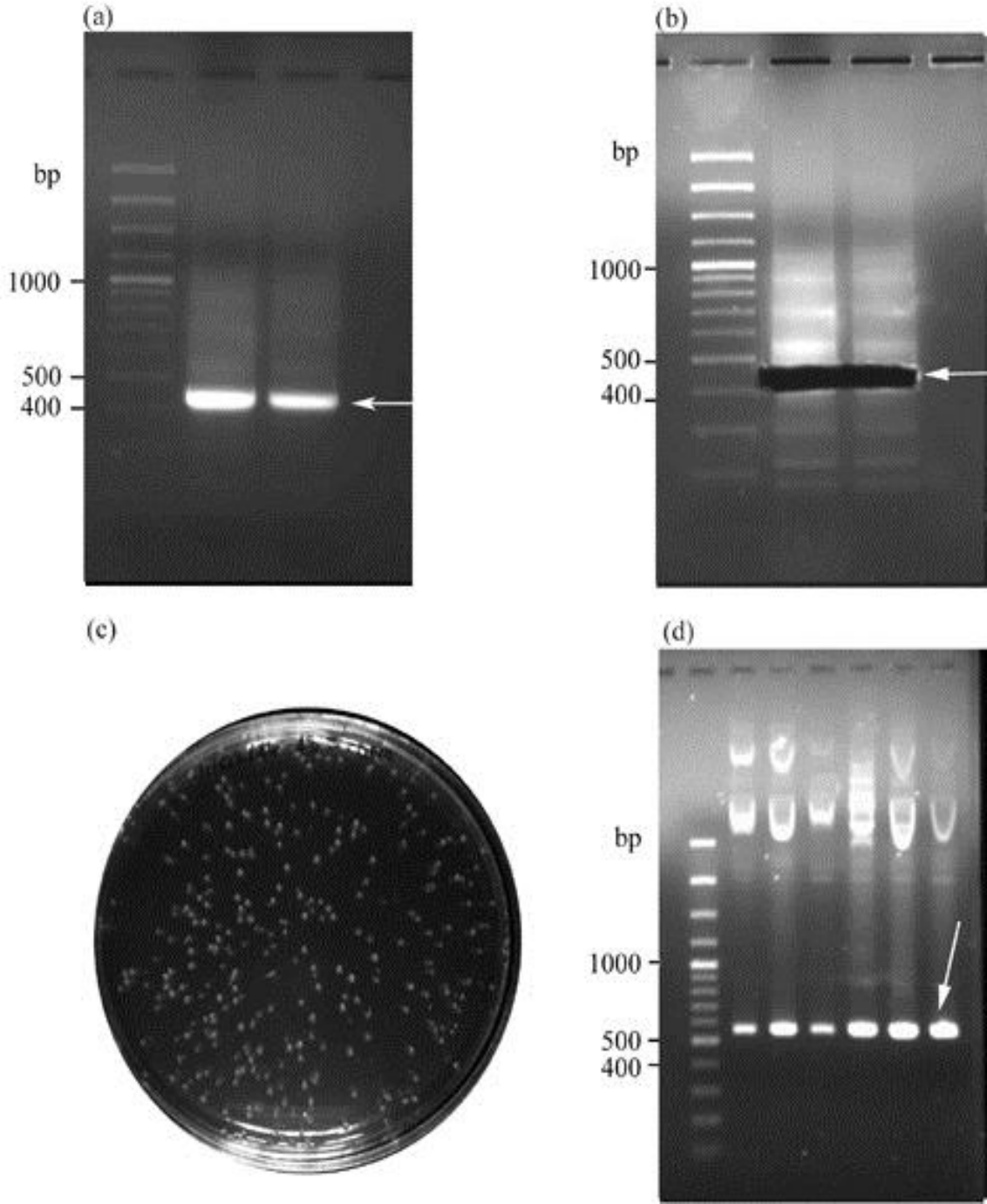
β -ACTIN- benzeri nükleotid dizisinden çıkarılmış olan protein dizisine NCBI protein BLAST analizi uygulanmıştır. BLASTp analizi *T. turcica*'dan elde ettiğimiz dizilerin β -ACTIN- benzeri protein olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.10 *T. turcica* için elde edilen β -ACTIN- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin açıklamalarını, tanımlandıkları bitki adlarını, gen bankası nükleotid ve protein kodlarını vermektedir.

Çizelge 4.10 *T. turcica* için elde edilen β -ACTIN- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası nükleotid kodları

	Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Benzerlik Oranı
1	<i>Maackia amurensis</i>	Maackia amurensis actin 1 mRNA	GU074380.1	%97
2	<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	Ammopiptanthus mongolicus actin mRNA	HM209307.1	%93
3	<i>A. hypogaea</i>	Arachis hypogaea actin mRNA	DQ873525.1	%91
4	<i>Glycine max</i>	Glycine max actin-3-like mRNA	NM_001254249.1	%89
5	<i>Glycine max</i>	Glycine max clone	AC166091.3	%89
6	<i>Glycine max</i>	Glycine max actin-3-like mRNA	XM_006576791.1	%88
7	<i>Glycine max</i>	Glycine max actin-3-like mRNA	XM_003521168.2	%88
8	<i>Soybean clone</i>	Soybean clone mRNA	BT098081.1	%88
9	<i>Glycine max</i>	Glycine max cDNA clone	AK243852.1	%88
10	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Clone actin-3-like protein mRNA,	KF033476.1	%88
11	<i>P. vulgaris</i>	Cultivar Carioca actin mRNA	EU581898.1	%87
12	<i>Cicer arietinum</i>	Cicer arietinum actin-like mRNA	XM_004497837.1	%87
13	<i>Glycine max</i>	Glycine max actin-like mRNA.	XM_006575146.1	%85
14	<i>Glycine max</i>	Glycine max actin-like mRNA	XM_006575145.1	%85
15	<i>Glycine max</i>	Glycine max actin-like mRNA.	XM_003518989.2	%85

4.10 18S rRNA

18SF1/18SR1 (bkz. Çizelge 3.1) primer çifti ve çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak 450 bp PCR ürünü çoğaltılmıştır (Resim 4.11a) Bu DNA parçası agaroz jelden temiz bir bisturi yardımıyla kesilip alınmıştır (Resim 4.11b). Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Thermo Scientific) kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir (Resim 4.11c). Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir (Resim 4.11d). Doğru DNA parçasını bulunduran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.



Resim 4.11 *18S rRNA*- benzeri gen homologunun *T. turcica*'dan klonlanması. Çiçek tomurcuğuna ait total RNA'dan sentezlenen cDNA ile 18SF1/18SR1 dejenere primer çifti (bkz. Çizelge 3.1) ile çoğaltılmış 450 bp hedef PCR ürünü (a) jelden kesildikten sonra (b) yetenekli *E.coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformantlarda (c) insört varlığının ispatı pJET1.2 sekanslama primeri kullanarak PCR doğrulaması (d) ile gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki oklar hedef DNA bandını göstermektedir. (d)'de gösterilen PCR ürünü 450 bp *18S rRNA* parçasına ek olarak 120 bp pJET1.2 vektör DNA parçasını içermektedir.

18S rRNA nükleotid dizisi (449 bp)

TACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCAGCGGA
TGTTGCTCTTAGGACTCCGCTGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTG
GGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGA
CGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACAACA
CGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGACTGAG
AGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGG
TGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTCAGCCT
GCTAACTAGCTATGTGGAGGTAACCTCCACGGCCAGCTTCTTAGAGG
GACTATGGCCGCTTAGGCCACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGT
GAAGCCCTTAGATGTTTT

Çizelge 4.11 *T. turcica* için elde edilen 18S rRNA- benzeri protein dizisine benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış proteinlerin tanımlandıkları bitki adları, açıklamaları, gen bankası nükleotid kodları

Bitki İsmi	Gen Açıklaması	Gen Bankası Nükleotid Kodu	Benzerlik Oranı
1 <i>Calpurnia aurea</i>	18S ribosomal RNA gene	GU476474.1	% 99
2 <i>Sophora tomentosa</i>	18S ribosomal RNA gene	GU476473.1	% 99
3 <i>Sophora tetraptera</i>	18S ribosomal RNA gene	GU476472.1	% 99
4 <i>Cicer arietinum</i>	18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene	AJ577394.1	% 99
5 <i>Dioclea guianensis</i>	18S ribosomal RNA gene	AF525698.1	% 99
6 <i>Cleobulia multiflora</i>	18S ribosomal RNA gene	AF525697.1	% 99
7 <i>Calopogonium caeruleum</i>	18S ribosomal RNA gene	AF525696.1	% 99
8 <i>Mucuna pruriens</i>	18S ribosomal RNA gene	AF525695.1	% 99
9 <i>Cymbosema roseum</i>	18S ribosomal RNA gene	AF525694.1	% 99
10 <i>Pachyrhizus erosus</i>	18S ribosomal RNA gene	AF525693.1	% 99
11 <i>Astragalus hoantchy</i> subsp. <i>dshimensis</i>	18S ribosomal RNA gene,	AF359600.1	% 99
12 <i>Astragalus lepsensis</i>	18S ribosomal RNA gene	AF359597.1	% 99
13 <i>Cicer arietinum</i>	18S ribosomal RNA, clone CapR18S	AJ011011.4	% 99
14 <i>Medicago truncatula</i>	18S ribosomal RNA gene	AF093506.1	% 99
15 <i>Pisum sativum</i>	18S small sub unit nuclear rRNA	U43011.1	% 99

5. TARTIŞMA- SONUÇ

Yabani endemik *Thermopsis turcica* Kit Tan, Küçüködük and Vural *Thermopsis* cinsinin Türkiye'deki tek temsilci türüdür. Bu türü türdeşlerinden ayıran en önemli morfolojik özellik tek çiçekten çoklu karpel oluşturmasıdır. Bu özellik bitkiyi tüm legümler içerisinde ayrıcalıklı bir konuma koymaktadır. Bu araştırmada *Thermopsis turcica* çiçek oluşumu ve gelişimini kontrol eden çiçek organ meristemi kimlik genlerinin kısmi klonlanması ve nükleotid dizilerinin karakterize edilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada *Thermopsis turcica* çiçek organ meristem kimlik genlerinden *Arabidopsis* homologları olarak *APETALA1*, *APETALA2*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, *AGAMOUS*, *SHATTERPROOF*, *SEEDSTICK* ve *SEPALLATA* genleri kısmi olarak klonlanmış ve sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri ve bu dizilerden üretilmiş protein dizilerinin hedef genlere ait olduğu ispatlanmıştır.

Çiçek tomurcuğu total RNA'sından elde edilen cDNA kalıbı kullanılarak çizelge 3.1 ve 3.2'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak, tanımlanan PCR koşullarında hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Bu DNA parçaları agaroz jele yüklenerek koşturulmuştur ve daha sonrasında agaroz jelden temiz bir bistrü yardımıyla kesilip alınmıştır. Yaklaşık 75 ng PCR ürünü ligasyon reaksiyonunda pJET1.2/küt klonlama vektörüne kaynaştırılmıştır. Ligasyon ürünü DNA daha sonra yetenekli *E. coli* DH5a hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası transformant seçimi ampisilin içeren LB agar plaklardan yapılmıştır. En az 20 farklı koloniden starter kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu sonrası insört DNA varlığı PCR doğrulama ile kontrol edilmiştir. Doğru DNA parçasını bulandıran plazmid DNA'lardan bazıları dizi analizine gönderilmiştir.

Dizi analizinden elde edilen nükleotid dizileri NCBI adı verilen veri tabanına yüklenerek diğer legüm türleriyle karşılaştırılmıştır. Oluşturulan tablolarda *Thermopsis turcica* diğer legüm türleriyle karşılaştırılarak, tablolardaki veriler oluşturulmuştur.

Elde edilen veriler ışığında *Thermopsis turcica*'da hedeflenen çiçek organ meristem kimlik genlerinin klonlanması ve karakterizasyonu başarıyla gerçekleşmiştir. IUCN kriterlerine göre *T. turcica* yabancı türü kritik seviyede tehdit (CR) altındadır buna rağmen çiçek gelişiminde 3-4 serbest karpel sahip olması yaklaşık 18.000 legüm türü içinde *T. turcica*'yı olağan dışı bir bitki türü yapmaktadır. Papilionoideae alt ailesi için çoklu serbest karpel yapısı, diğer bir ifade ile aynı çiçekten çok karpelli serbest meyve durumu, sadece *T. turcica* için rapor edilmiştir. Bu morfolojik özelliğin ekonomik olarak önemli olan fasulye, soya fasulyesi ve bezelye gibi diğer papilionoidlere de kazandırılabilmesi olanaklarının araştırılması heyecan verici bir düşüncedir.

Keşfedildiğinden bu yana *T. turcica* bitkisi bazı biyolojik ve kimyasal araştırmalara konu edilmiş olsa da Şener vd. (1992), Cenkcı vd. (2007), Özdemir vd. (2008), Cenkcı vd. (2008), Cenkcı vd. (2009), Korcan vd. (2009) tarafından çalışılan bu bitki ile yapılan herhangi bir moleküler genetik araştırması mevcut değildir. Türkiye'nin gen kaynaklarından birisi olan endemik *T. turcica*'nın 3-4 serbest karpel oluşumu özelliğini kontrol eden moleküler mekanizmanın veya mekanizmaların aydınlatılması önem arz etmektedir. Bu araştırmada, *AG*, *AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI*, *STK*, *SHP1* ve *SEP* gibi MADS-kutulu (*AP2* haricinde) çiçek meristemi ve/veya çiçek organı kimlik genlerine ait kısmi nükleotid ve protein dizilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu genlere ilaveten, canlı dokularda sürekli ifade olduğu bilinen β -Actin ve 18S rRNA genlerinin *T.turcica*'dan kısmi klonlanması 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. Bu tezden üretilen bulgular ilgili projenin devamında kullanılacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T. and Harberd, N.P. (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.USA*, **104**: 6484–6489.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.
- Alvarez-Buylla, E. R., Pelaz, S., Liljegren, S. J., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Pouplana, L.R., Martinez- Castilla, L. and Yanofsky, M. F. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 5328-5333.
- Amasino, R. M. (1996). Control of flowering time in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, **6**: 480-487.
- Amasino, R. (2004). Vernalization, competence and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell* , **16**: 2553–2559
- Angenent, G.C. and Colombo, L. (1996). Molecular control of ovule development. *Trends in Plant Science*, **1**: 228-232.
- Asilbekova, D. T. (2004). Lipids of *Thermopsis alterniflora* bean seeds and shells. *Chemistry of Natural Compounds*, **40**: 532-534.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. and Madueño, F. (2007). Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Annals of Botany*, **100**: 659-676.
- Berbel, A., Navarro, C., Ferrándiz, C., Cañas, L. A., Madueño, F. and 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**: 441-451.
- Bernier, G. (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**: 175-219.
- Blazquez, M.A. and Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, **404**: 889–892.

- Blazquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R. and Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell*, **10**: 791–800.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleißner, R., Wisman, E., Apel, K. and Melzer, S., (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **24**: 591-599
- Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. and Dean, C. (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, **16**: S18–S31
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and Meyerowitz, E.M. (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **1**: 37–52.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and Meyerowitz, E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development*, **112**: 1–20.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M. and Smyth, D.R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. *Development*, **119**: 721–743.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M. and Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, **289**: 617–619.
- Busch, M.A., Bomblies, K. and Weigel, D. (1999). Activation of a floral homeotic gene in Arabidopsis. *Science*, **285**: 585–587.
- Carles, C.C. and Fletcher, J.C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Science* **8**: 394–401
- Carmel-Goren, L., Liu, Y. S., Lifschitz, E. and Zamir, D. (2003). The SELF-PRUNING gene family in tomato. *Plant Molecular Biology*, **52**: 1215-1222.
- Castillejo, C., Romera-Branchat, M. and Pelaz, S. (2005). A new role of the Arabidopsis SEPALLATA3 gene revealed by its constitutive expression. *The Plant Journal*, **43**: 586–596.
- Cenkci, S., Kargioğlu, M., Dayan, S. and Konuk, M. (2007). Endangered Status and Propagation of an Endemic Plant Species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae). *Asian Journal of Plant Sciences*, **6**: 288 - 293
- Cenkci, S., Kargioğlu, M., Dayan, S. and Konuk, M. (2008). In vitro propagation of an endangered plant species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae). *Biologia*, **63**: 652-657.

- Cenkci, S., Temel, M., Kargioğlu, M. and Dayan, S. (2009). Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük using conventional and in vitro techniques. *Turkish Journal of Biology*, **33**: 327-333
- Chae, E., Tan, Q.K., Hill, T.A. and Irish, V.F. (2008). An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development*, **135**: 1235–1245.
- Chappill, J. A. (1995). Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. *Advances in legume systematics*, **part 7**: 1-9.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, K. M., Moon, Y. H., An, G. and Jang, S. K. (1999). Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* APETALA1 as a transcription activation domain. *Plant molecular biology*, **40**: 419-429.
- Claßen-Bockhoff, R. (2001). *Annals of Botany*, **88**: 1153-1172
- Clustal, W. (1994). improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice Thompson, Julie D.; Higgins, Desmond G.; Gibson, Toby J. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-80.
- Coen, E. S. and Carpenter, R. (1993). The Metamorphosis of Flowers. *The Plant Cell*, **5**: 1175.
- Coen, E.S. and Meyerowitz, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353**: 31–37.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. and Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, **316**: 1030-1033.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. and Sommer, H. (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *The EMBO Journal*, **15**: 4330.
- Davis, P. H., Cullen, J. and Coode, M. J. E. (Eds.) (1988). *Flora of Turkey and the east Aegean islands* (Vol. 10). Edinburgh University Press.
- De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y. and Theissen, G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in Plant Science*, **8**: 475-483.

- Dement, W. A. and Mabry, T. J. (1975). Biological implications of flavonoid chemistry in Baptisia and Thermopsis. *Biochemical Systematics and Ecology*, **3**: 91-94.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. and Yanofsky, M.F. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, **14**: 1935–1940.
- Dong, Z. C., Zhao, Z., Liu, C. W., Luo, J. H., Yang, J., Huang, W. H. and Luo, D. (2005). Floral patterning in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, **137**: 1272-1282.
- Doyle, J. J. (1995). DNA data and legume phylogeny: A progress report. In: MD Crispy and JJ Doyle, eds. *Advanced in Legume Systematics, Phylogeny*. vol. 7 pp:11-30 Royal Botanic Garden, Kew
- Doyle, J. J., Chappill, J. A., Bailey, C. D. and Kajita, T. (2000). Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. *Advances in Legume Systematics*, **9**: 1-20.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H. and Sommer, H. (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal*, **18**: 5370-5379.
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N (2000). Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Spermatophyta), TDKA and Van Centennial University Press, Ankara.
- Eriksson, S., Bohlenius, H., Moritz, T. and Nilsson, O. (2006) GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *Plant Cell*, **18**: 2172–2181.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M.F., Kater, M.M. and Colombo, L. (2003) MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**: 2603–2611.
- Flanagan, C.A. and Ma, H. (1994) Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene AGL2 in wild type and mutant Arabidopsis flowers. *Plant Molecular Biology*, **26**: 581–595.
- 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

- Gomez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M.M., Angenent, G.C. and Sablowski, R. (2005) Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development*, **132**: 429–438.
- Goto, K. and Meyerowitz, E.M. (1994) Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes & Development*, **8**: 1548–1560.
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y. and Traas, J. (2004) In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**: 74–87.
- Griffiths, S., Dunford, R. P., Coupland, G. and Laurie, D. A. (2003). The evolution of *CONSTANS*-like gene families in barley, rice, and Arabidopsis. *Plant Physiology*, **131**: 1855-1867.
- Hames, C., Ptchelkine, D., Grimm, C., Thevenon, E., Moyroud, E., Gerard, F., Martiel, J.L., Benlloch, R., Parcy, F. and Muller, C.W. (2008) Structural basis for *LEAFY* floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. *EMBO Journal* **27**: 2628–2637.
- Hasebe, M. and Banks, J. A. (1997). Evolution of *MADS* gene family in plants. In *Evolution and diversification of land plants* (pp. 179-197). Springer Japan.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M. and Shimamoto, K. (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, **422**: 719-722.
- Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Vardy, M.E., Ellis, N., Beltran, J.P., Rameau, C. And Weller, J. L. (2005). Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiology*, **137**: 1420-1434.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A. and 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**: 1899–1911.
- Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J. and Yanofsky, M.F. (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development*, **124**: 3845–3853.

- Hill, T.A., Day, C.D., Zondlo, S.C., Thackeray, A.G. and Irish, V.F. (1998). Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA3. *Development*, **125**: 1711– 1721
- Hong, R. L., Hamaguchi, L., Busch, M. A. and Weigel, D. (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene AGAMOUS identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *The Plant Cell Online*, **15**: 1296-1309.
- Honma, T. and Goto, K. (2000). The Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development*, **127**: 2021–2030.
- Honma, T. and Goto, K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, **409**: 469–471.
- Huala, E. and Sussex, I.M. (1992). LEAFY interacts with floral homeotic genes to regulate Arabidopsis floral development. *Plant Cell*, **4**: 901–913.
- Immink, R.G., Tonaco, I.A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A.D., Busscher-Lange, J., Borst, J.W. and Angenent, G.C. (2009). SEPALLATA3: the ‘glue’ for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology*, **10**: R24.
- Irish, V. F. (1999). Patterning the flower. *Developmental biology*, **209**: 211-220.
- Irish, V.F. (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*, **61**: 1014-1028.
- Irish, V.F. and Sussex, I.M. (1990). Function of the apetala-1 gene during Arabidopsis floral development. *Plant Cell*, **2**: 741–753.
- Jack, T. (2001). Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends in Plant Science*, **6**: 310-316.
- Jack, T., Brockman, L.L. and Meyerowitz, E.M. (1992). The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, **68**: 683–697.
- Jack, T., Fox, G.L. and Meyerowitz, E.M. (1994). Arabidopsis homeotic gene APETALA3 ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell*, **76**: 703–716.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**: 403-405.

- Kater, M. M., Dreni, L. and Colombo, L. (2006). Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 3433-3444.
- Kaufmann, K., Melzer, R. and Theissen, G. (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, **347**: 183-198.
- Korcan, S. E., Cigerci, I. H., Dilek, M., Kargioglu, M., Cenkci, S. and Konuk, M. (2009). Antimicrobial activity of an endemic species, *Thermopsis turcica*, Turkey. *Kuwait Journal of Science & Engineering*, **36**: 101-112.
- Lamb, R.S., Hill, T.A., Tan, Q.K. and Irish, V.F. (2002). Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development*, **129**: 2079–2086.
- Lee, I., Wolfe, D.S., Nilsson, O. and Weigel, D. (1997). A LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS. *Current Biology*, **7**: 95–104.
- Lee, J., Oh, M., Park, H. and Lee, I. (2008) SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant Journal*, **55**: 832–843.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G. and Laux, T. (2001). Termination of Stem Cell Maintenance in Arabidopsis Floral Meristems by Interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*, **105**: 805–814.
- Levy, Y. Y. and Dean, C. (1998). The transition to flowering. *The Plant Cell Online*, **10**: 1973-1989.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L. and Yanofsky, M.F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*, **404**: 766–770.
- Litt, A. (2007) An evaluation of A-function: evidence from the APETALA1 and APETALA2 gene lineages. *International Journal of Plant Sciences*, **168**: 73–91.
- Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C. and Yu, H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell*, **16.5**: 711-722.
- Lockhart, B. E. L. (2005). Three Previously Unrecorded Viral Diseases of Astilbe, Fuschia, and Thermopsis Species in Minnesota. *Plant Disease*, **89**: 775-775.

- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R. and Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, **105**: 793–803.
- Long, J.A. and Barton, M.K. (1998) The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development*, **125**: 3027–3035.
- Ma, H., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M. (1991) AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Development*, **5**: 484–495.
- Maizel, A., Busch, M.A., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M. and Weigel, D. (2005) The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science*, **308**: 260–263.
- Mandel, M.A. and Yanofsky, M.F. (1995) A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, **377**: 522–524.
- Mandel, M. A. and Yanofsky, M. F. (1998). The *Arabidopsis* AGL9 MADS box gene is expressed in young flower primordia. *Sexual Plant Reproduction*, **11**: 22-28.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, M.F. (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature*, **360**: 273–277.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, **95**: 805–815.
- Messenguy, F. and 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. and Weigel, D. (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **113**: 157-167.
- Munster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J., Martin, W., Saedler, H. and Theissen, G. (1997). Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**: 2415-2420

- Ng, M. and Yanofsky, M.F. (2001) Activation of the Arabidopsis B class Homeotic Genes by APETALA1. *Plant Cell*, **13**: 739–753.
- Nilsson, O., Lee, I., Blazquez, M.A. and Weigel, D. (1998) Flowering time genes modulate the response to LEAFY activity. *Genetics*, **150**: 403–410.
- Özdemir, C., Dural, H., Ertuğrul, K., Küçüködük, M., Baran, P. and Şanda, M. A. (2008). Morphology and anatomy of endemic *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük. *Bangladesh Journal of Botany*, **37**: 105-114.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, **405**: 200–203.
- Pelaz, S., Tapia-Lopez, R., Alvarez-Buylla, E.R. and Yanofsky, M.F. (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Current Biology*, **11**: 182–184.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M.F. (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, **424**: 85–88.
- Polhill, R. M. and Raven. (1981). Advances in legume systematics. Parts 1 and 2. *Royal Botanic Gardens*, Kew, UK.
- Putterill, J., Laurie, R. and Macknight, R. (2004) It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays*, **26**: 363–373
- Reddy, G.V., Heisler, M.G., Ehrhardt, D.W. and Meyerowitz, E.M. (2004) Realtime lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **131**: 4225–4237.
- Riechmann, J.L., Wang, M. and Meyerowitz, E.M. (1996) DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research*, **24**: 3134–3141.
- Riechmann, J. L. and Meyerowitz, E. M. (1997). Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Molecular Biology of the Cell*, **8**: 1243-1259.
- Rounsley, S.D., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F. (1995) Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *Plant Cell*, **7**: 1259–1269

- Sablowski, R. (2007) Flowering and determinacy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 899–907.
- Samach, A., Klenz, J.E., Kohalmi, S.E., Risseuw, E., Haughn, G.W. and Crosby, W.L. (1999) The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of Arabidopsis thaliana is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *The Plant Journal*, **20**: 433–445.
- Savidge, B., Rounsley, S.D. and Yanofsky, M.F. (1995) Temporal relationship between the transcription of two Arabidopsis MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell*, **7**: 721–733
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jurgens, G. and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, **100**: 635–644.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser P., Nacken, W., Saedler, H. And Sommer, H. (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, **250**: 931-936
- Shannon, S. and Meeks-Wagner, D.R. (1993) Genetic Interactions That Regulate Inflorescence Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **5**: 639-655
- Shore, P. and Sharrocks, A. D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry*, **229**: 1-13.
- Simon, R., Igeno, I.M. and Coupland, G. (1996) Activation of floral meristem identity genes in Arabidopsis. *Nature*, **384**: 59–62.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2**: 755–767.
- Song, J., Clemens, J. and 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**: 247-259.
- Steeves, S.T. and Sussex, I.M. (1989) Patterns in plant development 2 edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sundstrom, J.F., Nakayama, N., Glimelius, K. and Irish, V.F. (2006) Direct regulation of the floral homeotic APETALA1 gene by APETALA3 and PISTILLATA in Arabidopsis. *Plant Journal*, **46**: 593–600.

- Şener, B., Koyuncu, M., Ergun, F., (1992). *Thermopsis turcica* Bitkisinde Anagirin'inin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi İle Tayini" 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler (Ed. K. H. C. Başer), s. 411, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir
- Tan, K., Vural, M. and Küçüköyük, M. (1983). An unusual new *Thermopsis* from Turkey. *Notes Royal Botany Garden Edinburgh*, **40**: 515-518.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd. Ed. Pub. Sinauer, 41-99.
- Theissen, G., Kim, J. T. and Saedler, H. (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, **43**: 484-516.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Winter, K.U. and Saedler, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, **42**: 115-149.
- Theissen, G. (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion Plant Biology*, **4**: 75–85.
- Theissen, G. and Saedler, H. (2001). Plant biology: 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.
- Tilly, J., Allen, D.W. and Jack, T. (1998). The CArG boxes in the promoter of the Arabidopsis floral organ identity gene APETALA3 mediate diverse regulatory effects. *Development*, **125**: 1647–1657.
- Tucker, S. C. (1989). Overlapping organ initiation and common primordia in flowers of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae). *American Journal of Botany*, 714-729.
- Tucker, S. C. (2003a). Floral development in legumes. *Plant Physiology*, **131**: 911-926.
- Vandenbussche, M., Zethof, J., Souer, E., Koes, R., Tornielli, G. B., Pezzotti, M. and Gerats, T. (2003). Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require SEPALLATA-like MADS box genes in petunia. *The Plant Cell Online*, **15**: 2680-2693.

- Vahala, T., Oxelman, B. and von Arnold, S. (2001). Two APETALA2-like genes of *Picea abies* are differentially expressed during development. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1111-1115.
- Wagner, D., Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, **285**: 582–584.
- 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. and Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, **377**: 495–500.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, **69**: 843– 859.
- Weiss, J., Delgado-Benarroch, L. and Egea-Cortines, M. (2005). Genetic control of floral size and proportions. *International Journal of Developmental Biology*, **49**: 513.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W., and Somerville, C.R.(1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology*. **100**: 403–408.
- Wojciefowski MF (2003). Reconstructon the Phylogeny of Legumes (Leguminosea): An early 21st Century Perpesctive. In *Advances in Legume Systematics*. Klitgaard BB and Bruneau A (eds), Part 10, Higher Level Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew, pp: 5-35.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. and Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, **346**: 35–39.
- Yanofsky, M. F. (1995). Floral meristems to floral organs: genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annual Review of Plant Biology*, **46**: 167-188.
- Yanovsky, M. J., Mazzella, M. A., Whitelam, G. C. and Casal, J. J. (2001). Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Rhythms*, **16**: 523-530.

Zik, M. and Irish, V.F. (2003a) Flower development: initiation, differentiation, and diversification. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, **19**: 119–140.

İNTERNET KAYNAKLARI

- 1- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 08.03.2014
- 2- blast.ncbi.nlm.nih.gov 14.04.2014
- 3- <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html> web 15.04.2014
- 4- (http://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells) 10.01.2014
- 5- (<http://www.fr33.net/translator.php>), 25.09.2013

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ezgi Melis Kolukısa

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 14.10.1988

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Eryaman Lisesi, 2006

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2011

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014