

***ARABIDOPSIS CLAVATA2* VE *CRABSCLAW*
GEN HOMOLOGLARININ *THERMOPSIS TURCICA*'DAN
KLONLANMASI VE GEN İFADE ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sultan DEMİR ŞİMŞEK

Danışman
Doç. Dr. Ferruh AŞÇI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Aralık, 2018

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***ARABİDOPSIS CLAVATA2* VE *CRABSCLAW* GEN
HOMOLOGLARININ *THERMOPSIS TURCICA*'DAN
KLONLANMASI VE GEN İFADE ANALİZLERİ**

Sultan DEMİR ŞİMŞEK

Danışman

Doç. Dr. Ferruh AŞÇI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ARALIK, 2018

TEZ ONAY SAYFASI

Sultan DEMİR ŞİMŞEK tarafından hazırlanan “Arabidopsis *Clavata2* ve *Crabscraw* gen homologlarının *Thermopsis Turcica*'dan klonlanması ve gen ifade analizleri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 19/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ferruh Aşçı

Başkan : Prof. Dr. Sezgin Çelik

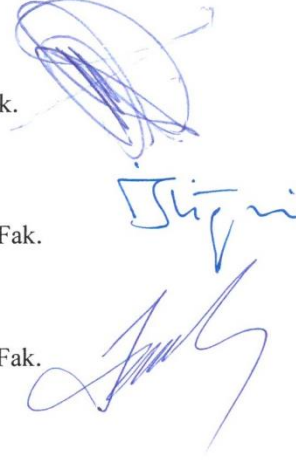
Yıldız Teknik Üniv., Fen Edebiyat Fak.

Üye : Prof. Dr. İbrahim Hakkı Cigerci

Afyon Kocatepe Üniv., Fen Edebiyat Fak.

Üye : Doç. Dr. Ferruh Aşçı

Afyon Kocatepe Üniv., Fen Edebiyat Fak.



Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

- 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.

19/12/2018


Sultan DEMİR ŞİMŞEK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ARABİDOPSIS CLAVATA2 VE *CRABSCLAW* GEN HOMOLOGLARININ *THERMOPSIS TURCICA*'DAN KLONLANMASI VE GEN İFADE ANALİZLERİ

Sultan DEMİR ŞİMŞEK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferruh AŞCI

Türkiye endemik türü *Thermopsis turcica* tek çiçekten çoklu serbest karpel üreten sıra dışı morfolojik özellik sahibi yabancı baklagil türüdür. Önemli gen kaynağımız bu bitkinin ilginç özelliği kontrol eden faktörlerin belirlenmesi amacıyla yönelik olarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir. ‘Bitkilerde çiçek meristem boyutunu kontrol eden ve karpel oluşumuna eşlik bu çalışmaya ait iki gende oluşabilecek mutasyonlar çiçek organ sayısı ve oluşma yerlerinde anormalliklere neden olabilir mi?’ sorusuna cevap aranmıştır. *Thermopsis turcica* genç tomurcuklarından *Arabidopsis CLV2* ve *CRC* gen homologları izole edilmiş ve farklı dokularda ifadesel analizleri yapılmıştır. Öncelikle bitkiden izole edilen total RNA ile ilk iplik cDNA ifadeleri sentezlenmiş, dejenere primerler ile kısmi uzunluk cDNA’ları çoğaltılıp klonlama işlemi yapılmış ve dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. İlgili genlerin tam uzunluk cDNA’ları RACE analizleri ile dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR yöntemi ile de genin fonksiyonel analizleri tomurcuk, sepal, petal, stamen ve karpel dokularında genlerin göreceli ifade analizleri yapılmıştır. *CLV2* geni için tam uzunluk cDNA dizisi 2557 bp, kodlanan protein 716 aminoasit, *CRC* geni için tam uzunluk cDNA dizisi 901 bp, kodlanan protein 174 aminoasit olarak tespit edilmiştir. Hizalama ve filogenetik analizler *CLV2* ve *CRC* genlerinin diğer legüm türlerinde belirlenen homologlarına benzer olduğunu ispatlamıştır. Gerçek zamanlı (RT-qPCR) PCR ile genler için göreceli sonuçlar çalışma içerisinde mevcuttur. Bunlara ek olarak in situ hibridizasyon tekniği denenmiş olup bulgular verilmiştir.

2018, xi + 73 sayfa.

Anahtar Kelimeler: *Thermopsis turcica*, *CLV*, *CRC*, cDNA, PCR, RACE, RT-qPCR, in situ

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

CLONING AND EXPRESSING ANALYSES OF *ARABIDOPSIS CLAVATA2* AND *CRABSCLAW* GENE HOMOLOGS FROM *THERMOPSIS TURCICA*

Sultan DEMİR ŞİMŞEK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ferruh AŞÇI

Turkey endemic type *Thermopsis turcica* produces one flower pistils multiple free n unusual morphological property owner is a type of wild legumes. Important source of genes, the determination of the factors that control the interesting feature of this plant for the purposes of this study. 'In plants flower meristem buyot accompanied the formation of that control and the pistils that mutations in two genes belonging to work that may occur in the number of flower organs and can cause abnormalities in the formation of? ' answer to the question. Thermopsis tour are the young bud n *Arabidopsis CLV2* and *CRC* gene homologs isolated and expressive analysis in different tissues. First of all, with total RNA isolated from the first thread has degenerated primers synthesized cDNA expressions, with partial length cDNA cloning process made and the replicated set of analyses. The full length cDNA of genes related to RACE analysis was carried out with the sequencing process. Real time PCR method and gene functional analyses with buds, sepals, petal, stamen and relative expression analysis of genes in the tissue of pistils. Full length cDNA sequence for the gene *CLV2* 2557 bp, the encoded protein 716 amino acids, *CRC* 901 for full length cDNA sequence of the gene--bp, the encoded protein 174 has been identified as amino acids. Alignment and phylogenetic analyses *CLV2* and *CRC* genes are similar to other types of legüm is homologous set. Real time (RT-qPCR) PCR results relative to study courses with genes. In addition to in situ hybridization technique is called the findings.

2018, xi + 73 pages

Keywords: *Thermopsis turcica*, *CLV*, *CRC*, cDNA, PCR, RACE, RT-qPCR, in situ

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel alışmaların ynlendirilmesi, sonuların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolay danışmanım ve diğer hocalarıma, araştırma ve yazım sresince yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Sayın Alperen Dedeoğlu'na, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolay aileme, özellikle ablam Hanife Kuruaga'a teşekkür ederim.

Sultan DEMİR ŞİMŞEK
AFYONKARAHİSAR, 2018

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Bitkilerde Çiçeklenme	3
2.2 Crabs Claw (CRC)	4
2.3 <i>Clavata2</i> (<i>CLV2</i>).....	8
2.4 <i>Thermopsis turcica</i> Tan, Vural & Küçüködük.....	10
3. MATERYAL ve METOT	12
3.1 Bitki Örneklemeşi	12
3.2 <i>Thermopsis turcica</i> Tomurcuklarından Total RNA İzolasyonu	13
3.2.1 Total RNA İzolasyonu	13
3.2.2 DNaz Uygulaması	13
3.2.3 RNA Miktar Tayini.....	14
3.2.4 Total RNA'dan İlk İplik cDNA Sentezi	14
3.3 cDNA Kalıbı Kullanılarak Hedef Genin Çoğaltılması	14
3.3.1 Dejenere Primer Tasarımı	14
3.3.2 <i>CLV2</i> İçin Dejenere Primer Tasarımı.....	15
3.3.3 <i>CRC</i> İçin Dejenere Primer Tasarımı	21
3.4 cDNA Kullanılarak PCR Kurulumu	25
3.4.1 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi	26
3.4.2 PCR Ürünlerinin Kit Kullanılarak Saflaştırılması	26
3.4.2.1 PCR Ürünlerinin PEG Saflaştırması.....	26
3.4.3 DNA Ürünlerinin Diziletilmesi ve Analizi	27
3.5 RACE Analizleri.....	27
3.5.1 RACE Analizleri İçin cDNA Sentez Reaksiyonu.....	27

3.5.2 <i>CLV2</i> ve <i>CRC</i> Genleri İçin Gene Özgü Primer Tasarımı	28
3.6 <i>CLV2</i> ve <i>CRC</i> Gen İfadelerinin Belirlenmesi	29
3.6.1 qPCR için cDNA Sentezi	29
3.6.2 RT-qPCR Kurulumu	30
3.6.3 Southern Blotlama analizi	31
3.7 In Situ Hibridizasyon	31
3.7.1 Örnek Sabitleme ve Doku Gömme	32
3.7.2 Prob Hazırlama	32
3.7.2.1 Klonlama	32
3.7.2.2 Gliserol Stok Hazırlama	33
3.7.2.3 İn Vitro Transkripsiyon	35
3.7.2.4 Dot Blot Analizi ve Kesit Alma	35
3.7.3 İn Situ Hibridizasyon	36
3.7.3.1 Ön İşlem	36
3.7.3.2 Hibridizasyon.....	36
3.7.3.3 Son İşlem	37
3.7.4 Montaj	38
4. BULGULAR	39
4.1 Bitki Materyali	39
4.2 Bitki Materyalinden Toplam RNA İzolasyonu.....	40
4.3 Tam Uzunluk cDNA Analizleri	40
4.3.1 <i>TtCLV2</i> ve <i>TtCRC</i> Kısmi cDNA Dizilerinin Belirlenmesi	40
4.3.2 Tam uzunluk cDNA analizleri	44
4.4 <i>TtCLV2</i> Genine Ait Nükleotid Ve Protein Dizi Analizleri	45
4.5 <i>TtCRC</i> Genine Ait Nükleotid Ve Protein Dizi Analizleri.....	48
4.6 Biyoinformatik Analizler	49
4.6.1 BALSTp Analizleri	49
4.6.2 Hizalama Analizleri	50
4.7 Filogenetik İlişki	53
4.8 Southern Blotlama Analizleri	56
4.9 Yarı Nicel RT-PCR Analizleri.....	57
4.10 İn Situ Hibridizasyon Analizleri	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	62

5.1 Meristem Geni <i>TiCLV2</i>	64
5.2 <i>TiCRC</i> geni	65
5.3 Sonuç	66
6. KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
ddH ₂ O	Ultra distile su
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
g	Relatif Centrifugal Force (rcf)
U	Ünite (birim)

Kısaltmalar

CDS	cDNA synthesis primer (cDNA sentez primeri)
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen di amin tetra asetat
cDNA	Komplementer DNA
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RT qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RNA	Ribo nükleik asit
SDS	Sodium dodecyl sulfat
UV	Ultraviyole
UPM	Universal Primer Mix (Evrensel Primer Karışımı)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>Arabidopsis</i> çiçeği.	4
Şekil 2.2 Genlerin ifade olduğu adaksiyal ve abaksiyal bölgeler.	5
Şekil 2.3 Yabani <i>T. turcica</i> resimleri	11
Şekil 3.1 Tozlaşma sonrası <i>T. turcica</i> tomurcuk boyutları	12
Şekil 4.1 Analizlerde kullanılmış <i>T. turcica</i> dokuları.	39
Şekil 4.2 <i>T. turcica</i> çiçek tomurcuk total RNA'sı.	40
Şekil 4.3 Tomurcuk cDNA özütünden üretilmiş PCR ürünleri	42
Şekil 4.4 Kısmi <i>TtCLV2</i> protein dizisinin BLAST analizi	43
Şekil 4.5 Kısmi <i>TtCRC</i> protein dizisinin BLAST analizi	43
Şekil 4.6 RACE ve qPCR analizlerinde kullanılmış primerlerin jel görüntüleri	44
Şekil 4.7 <i>TtCLV2</i> geni RACE-PCR ürünleri	45
Şekil 4.8 <i>TtCRC</i> geni RACE-PCR ürünleri.	45
Şekil 4.9 Hedef genlere ait tam uzunluk cDNA'larının ölçeklendirilmesi.	49
Şekil 4.10 <i>TtCRC</i> protein dizisi ile seçilmiş protein homologlarının dizi hizalaması. ...	52
Şekil 4.11 <i>TtCLV2</i> protein dizisi ile seçilmiş protein homologlarının dizi hizalaması. ...	52
Şekil 4.12 <i>TtCLV2</i> proteini için filogenetik ilişki analizi.	54
Şekil 4.13 <i>TtCRC</i> proteini için filogenetik ilişki analizi.	55
Şekil 4.14 2 genin <i>T. turcica</i> genomundaki Southern Blotlama analizleri.	56
Şekil 4.15 <i>TtCLV2</i> geninin yarı-nicel RT-PCR analizi.	58
Şekil 4.16 <i>TtCRC</i> geninin yarı-nicel RT-PCR analizi.	59
Şekil 4.17 İn Situ hibridizasyon görüntüleme sonuçları ve dot blot analizi.	61
Şekil 5.1 Çoklu serbest karpelli bitkilere örnekler.	64
Şekil 5.2 CRC proteini.	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 <i>CLV2</i> ve <i>CRC</i> Dejenere Primer Dizileri	25
Çizelge 3.2 <i>T.turcica</i> <i>CLV2</i> ve <i>CRC</i> genlerinin RACE ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmış olan primerler.....	28
Çizelge 3.3 RACE-PCR, kantitatif RT-PCR analizlerinde kullanılmış primerler	29
Çizelge 4.1 <i>T. turcica</i> 'nın çiçeklenme ile ilgili genlerin nükleotid ve tahmin edilmiş protein dizisi analizleri	49
Çizelge 4.2 <i>TtCLV2</i> ve <i>TtCRC</i> hedef proteinleri için BLASTp analizleri.	51
Çizelge 4.3 qPCR analizlerinde belirlenmiş olan C_T değerleri. 18 farklı <i>T. turcica</i> vejetatif ve üreme dokusunda bireysel olarak belirlenmiş 12 farklı gen için eşik noktasına denk gelen döngü (C_T , Threshold Cycle) değerleri	60

1. GİRİŞ

Bitkinin sürgün ve apikal uçlarında bulunan meristem doku, büyümeyi sağlarken en uygun koşullarda sürekli yeni kök hücrelerini ve farklılaşmaya gidecek bitki hücre gruplarını üretmektedir (Weigel and Jürgens 2002). Bitkiler, çiçek başlatma yeteneğinin gelişimsel aşamalarında oldukları zaman çoğu ve transkripsiyon faktörlerini içeren bir dizi protein aracılığıyla çeşitli çevresel ipuçlarını algılayacak ve harekete geçecektir. Çiçek başlangıcının zamanlamasının kararı verilirken çevresel ve endojen sinyalleri birleştiren fotoperiyod, vernalizasyon, otonom ve giberellin (GA) seviyesi gibi tanımlanmış olan ve birbiriyle ortak şekilde çalışan genetik metabolik yollar sürgün meristeminin çiçeklenme meristemine dönüşmesini yani çiçek oluşumunu sağlar (Simpson and Dean 2002).

Thermopsis R. Br. genusuna ait yaklaşık 25 tür, genellikle Orta Asya ve Kuzey Amerika'nın dağlık nemli bölgelerinde doğal yayılış göstermektedir (Dement and Marby 1975). *Thermopsis* genusunun Türkiye'deki tek temsilcisi endemik *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük türüdür (Tan *et al.* 1983). *T. turcica*, Eber Gölü güneyi ve Akşehir Gölünün güney-batı kıyılarında yayılış göstermektedir. Caesalpinioideae, Mimosoideae ve Papilionoideae (Faboideae) alt ailelerini bulunduran Fabaceae (Leguminosae) ailesi bitkilerinde genel olarak çiçekler beş sepal, beş petal, iki halkada beşer stamen ve tek karpel bulundurur, yani baklagil çiçekleri toplamda 21 çiçek organına sahiptir (Tucker 2003). 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. Tek çiçekten çoklu serbest meyve oluşturan yapının moleküler düzeyde anlaşılması, incelenmesi, kültürü yapılan bitkilere transferinin sağlanması ile ekonomiye kazandırılması önemli olacaktır.

Bu tez çalışmasında *T. turcica* meristem geni olan ve mutasyonu durumunda çoklu karpele neden olabilen *CLAVATA2* (CLV2) (Durbak and Tax 2011)ve karpel oluşumunda görevli *CRABS CLAW* (CRC)'in (Fourquin *et al.* 2005) yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda bitkinin ilgili dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. Genlerin izolasyonunda kısmen dizilenmesinde dejenere primerler ve çiçek tomurcuğuna ait ilk iplik cDNA'lardan

faýdalanılmıştır. Tam uzunluk cDNA dizilerinin belirlenmesi için cDNA uçlarının hızlı çoğaltımı (RACE) analizi kullanılmıştır. Nükleotid ve amino asit dizileri biyoinformatik araçlarla test edilmesi sonucu hedef genlerin izolasyonları ispatlanmıştır. Ayrıca, bu genlerin *T. turcica* genomundaki muhtemel kopya sayısı Southern Blotlama yöntemi ile analiz edilmiştir. Son olarak; çiçeklenme ile doğrudan veya dolaylı ilgisi olan ve bu çalışmada tam uzunluk cDNA'ları belirlenmiş 2 genin 18 farklı üreme, meyve ve vejetatif dokudaki yarı nicel ifade analizleri başarılı bir şekilde yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bitkilerde Çiçeklenme

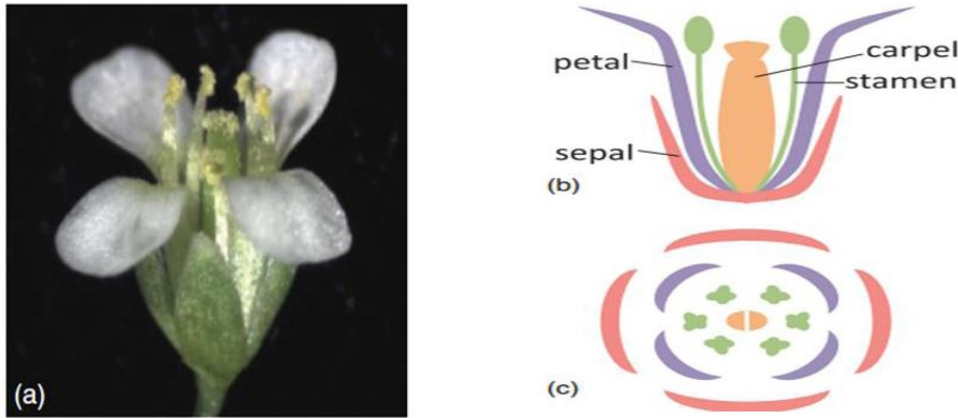
Bitkiler, meristem dokuları aracılığıyla sürekli olarak büyüme gösterirler. Meristemler embriyonik özellikte küçük, her yanı eşit büyüklükte hücreler topluluğudur (Taiz and Zeiger). Kök ve gövdeyi oluşturacak özelleşmiş doku hücrelerinin oluşmasını sağlamakla beraber sürekli olarak kendilerini de yenilerler. Sürgün meristem hücrelerin sürekli bölündüğü, yeni organlar oluşturan dinamik bir yapıdır. Çiçekler bu meristem yapının değişmesiyle ortaya çıkar; çiçek meristemi sürgün meristemine benzer bir yapıya sahiptir (Holt *et al.* 2014).

Bitki çiçek oluşturmak için uyarıldığında vejetatif meristemler köklü değişimlere uğrayarak doğrudan çiçeğe ait meristeme dönüşebilir. Çiçeklenmenin teşviki genlerin ifade olması ve çiçeklenme durumunun korunması, dışsal ve içsel faktörler tarafından düzenlenir. Morfolojik olgunluk, GA seviyesi, apikal meristeme ulaşan sükröz miktarı, vernalizasyon, gün ışığının süre ve kalitesi gibi etmenler teşvik için önemlidir (Wilson *et al.* 1992, Blazquez and Weigel 2000, Yanovsky *et al.* 2001)

Özellikle *Arabidopsis*'te yapılan mutant çalışmalar çiçek gelişimini düzenleyen gen grupları olduğunu göstermiştir. Çiçeklenmenin başlatılması ve gerçekleştirilmesi meristem dokuda ifade olan transkripsiyon faktör genleri ile kontrol edilir. Bu transkripsiyon faktör genleri; çiçeklenmeyi teşvik eden genler, çiçek meristem kimlik genleri, çiçek organ kimlik genleri ve çiçeklenmede kadastro genler olarak gruplandırılabilir (Zhang *et al.* 2011). Çiçeklenme zamanını belirleyen florigen, vernalizasyon, kısa-uzun gün, GA3 gibi bitki büyüme düzenleyicileri çiçek meristem genlerini teşvik ederek sürgün meristemlerde çiçeklenmeyi başlatır (Moon *et al.* 2005, Lee and Lee 2010).

Çiçek meristem genleri ilerleyen aşamalarda çiçek meristem organ kimlik genlerini teşvik ederek uç meristemin kanatlarındaki primordiyanın çiçek meristemine dönüşmesi için aktifleşmelidir. Bu aşamalar çeşitli metabolik yollarla kontrol edilir.

Çiçekler karmaşık yapılarıyla çeşitlilik göstermelerine rağmen çiçeklenmenin temel yapısı değişmezdir. Dikotil bitkiler için referans bitki *Arabidopsis thaliana* çiçekleri eş merkezli helezon halkalar şeklinde organize olmuştur. İlk halka yeşil çanak yapraklar (sepal), ikinci halka renkli çiçek yaprakları (petal), iç iki halka üremeyle ilgili stamen ve ginekium ile kaynaşmış karpel ile kaplanmıştır. Dört farklı halkadaki organ sayıları genellikle bitki türleri içerisinde sabittir. *Arabidopsis thaliana* 'da 4 sepal, 4 petal, 6 stamen, 2 karpel şeklindedir (Lohmann *et al.* 2002).



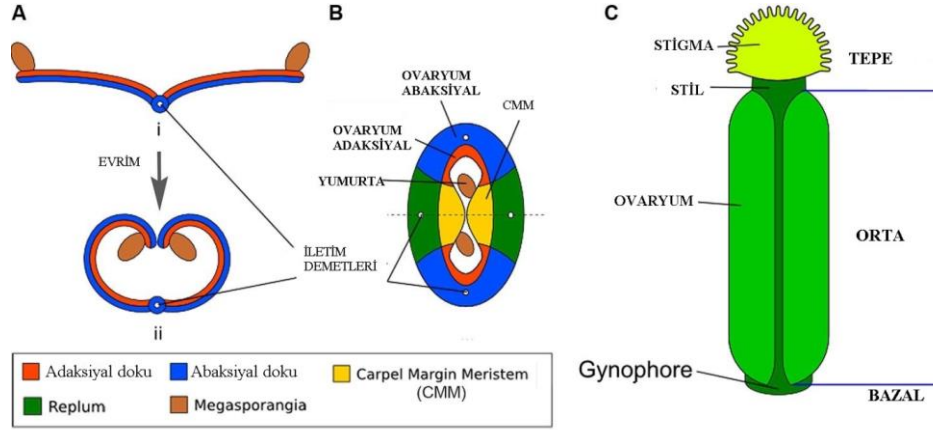
Şekil 2.1 *Arabidopsis* çiçeği. (a) Antesiz aşamasındaki olgun çiçek. (b) Organ çeşitlerini de gösteren olgun çiçeğin yan kesitinin çizilmiş şekli (c) Çiçek organlarının muhtemel yerlerini gösteren çiçek diyagramı (Irish (2010)'den alınarak düzenlenmiştir.)

Arabidopsis ve diğer model bitkilerle yapılan çalışmalar sürgün apikal meristemin, vejetatif büyümenin ardından üreme fazına geçişte çiçeklenme meristemine dönüştüğünü göstermiştir. Yeni oluşan yanal primordia çiçek meristemini oluşturur. Vejetatif evreden generatif evreye geçiş endojen ve hormonal sinyaller, fotoperiyodik indükdiyön, sıcaklık gibi çevresel uyarılar tarafından kontrol edilir (Mouradov *et al.* 2002).

2.2 Crabs Claw (CRC)

Arabidopsis genomu *YABBY* gen ailesinin 6 üyesine sahiptir ve tüm genler lateral organlarda abaksiyal olarak ifade olur (Bowman and Smyth, 1999, Sawa *et al.* 1999, Siegfried *et al.* 1999, Villanueva *et al.* 1999). Flamentöz Flower ve *YABBY3* genlerinin yaprakların adaksiyal bölgesinde ektopik ifadeleri abaksiyal hücre çoğalmasının sonlandırılması için yeterlidir. Bu çalışmalar yanal organların kutuplaşmasının

oluşumunda bu genlerin görev aldığını göstermektedir. (Sawa *et al.* 1999, Siegfried *et al.* 1999)



Şekil 2.2 Genler adaksiyal ve abaksiyal dokularda lateral şekilde ifade olur. Evrimsel süreçte organların oluşması ve gelişmesi için bu durum elverişli olandır. (a) Tomurcukların adaksiyal dokuda konumları. (b) tomurcuk dokuda organların gelişimleri. (c) gelişen dokularda organların konumları

Benzer şekilde karpelde adaksiyal abaksiyal kutuplaşmanın sağlanmasında *CRC* geni önemlidir. *CRABS CLAW* geni *YABBY* domain olarak adlandırılan çinko parmak ve heliks- ilmek-heliks domain içeren muhtemel bir transkripsiyon faktörünü kodlar (Bowman and Smyth 1999, Siegfried *et al.* 1999). Bunun aksine *crc* tek mutantları karpel kutuplaşmasında her hangi bir değişiklik göstermemiş, *crc canadlı* çift mutantlarında karpelin iç kısmındaki bölgede (abaksiyal) karpelin dış kısmındaki doku (adaksiyal) gelişmiştir. Buna ilaveten yaprak ve petaller gibi yanıl organlarda *CRC* geninin ektopik adaksiyal ifadesi abaksiyal hücrenin kaderini belirlemede yeterli olduğunu göstermiştir (Alvarez and Smyth 1999, Eshed *et al.* 1999). *CRC* karpelin abaksiyal epidermisinde aynı zamanda iç bölgelerinde ifade olur. Bu gen ifadeleri abaksiyal kaderinin teşvik edilmesi için önemlidir (Bowman and Smyth 1999, Eshed *et al.* 1999). Bununla birlikte karpellerde *CRC*'nin rolü angiospermiler içerisinde ilkel bir fonksiyon olabilir. Çünkü pirinçte *CRC* ortoloğu *DROOPING-LEAF* karpel kimliğini belirler, aynı zamanda çiçek nektar dokusu oluşumunda gereklidir. *CRC* nektar ve karpel dokularında aktiftir. Bu dokularda aynı zamanda b ve c sınıfı Mads kutusu genler de aktiftir. Nektar dokularında *CRC* ile B ve C sınıfı Mads box genleri birbirlerinin görevini yerine getirebilirler (Lee *et al.* 2005) *CRC* geninin karpelde ve nektar

dokularında nasıl aktive olduklarını belirleyebilmek için *CRC* promotor dizisini arabidopsis bitkisinden izole edip diğer bitkilerle karşılaştırmışlardır. Yaptıkları analizler sonucunda *SEPELLATA3* geninin *CRC* genini aktive ettiği görülmüştür (Scutt *et al.*, 2004). *CRC* geninin sadece karpel de ve nektarda ifade olduğu ve bu dokuların gelişimini kontrol ettiği ifade edilmiştir. *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada *CRC* genlerinin anlatımının karpel dokularındaki anlatımının mekan ve süreye bağlı olarak çok iyi şekilde korunduğunu göstermiştir. *YABBY* gen ailesine ait genler *INO*, *CRC*, *YABBY2*, *FIL/YABBY3* ve *YABBY5*'tir. *GHIRSITUM* ve *cfeksuosa* nın ekstra organ nektarlarının gelişimi ile *CRC* ifadesinin ilişkisi bu organların gelişimi üzerine araştırma yapılmasını sağlamıştır (Scutt *et al.* 2004). Birbirlerine yakın türlerde yapısal olarak farklı nektarlarda gözlenen *CRC* ifadesinden dolayı eudicot türlerdeki nektarlarda *CRC* analizlerinin yapılmasına neden olmuştur. *Petunya hybrida* da ovaryumun tabanında nektar dokuları bir disk şeklinde gelişir ve bu bitkide yapılan analizler *CRC* ifadesinin karpel ve nektar dokularıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Scutt *et al.* 2004). Filogenetik olarak dağılık türlerin nektarlarında *CRC*'nin ortak ifadesi hem rosid (*Arabidopsis*) hem asteridde (tütün) nektar gelişimi için *CRC*'ye ihtiyaç duyulması nektar dokusunun pozisyonu ve morfolojisine bakmaksızın temel eudicot bitkilerde nektar oluşumunda *CRC*'nin rol aldığını desteklemektedir. Rosid ve asterid türlerden farklı olarak *aquilegia* da temel bir eudicot tür nektar dokularında *CRC*'nin ifade olmadığı gözlenmiştir.

Karpel angiosperm veya çiçeklenen bitkilere özgü dişi üreme organıdır. Bir çok türde karpel, stigma, stil ve ovary dokularına farklılaşabilir, ayrı bir yapı olarak bulunabileceği gibi pistilden birleşmiş şekilde diğer karpellerle birleşebilir (Scutt *et al.*, 2004). Karpel gelişimine katkısı olan *CRC* ve spatula genlerinin karpel gelişimi ile ilgili olduğu ve bu iki genin agamus ile ilişkili bir şekilde çalıştığı gözlenmiştir. *Arabidopsiste* *crc* mutanlığı durumunda karpel daha geniş daha kısa ve iki karpel uç taraflarından kaynaşmamış şekildedir. Spatula geni ise daha çok karpelin stigmatı ile ilişkilidir. *CRC* geninin gelişen karpel dokusunun radyal büyümesini engellediği ancak uzunlamasına büyümeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir. Mutasyon çalışmalarında *crc* mutantlarında karpel sayısı iki iken *crc* ve *ag* mutantlarında karpel sayısı 10'dan fazla olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde *crc* ve spatula çift mutanlığı da aynı etkiyi göstermiştir. Bu ilkel türlerde nektar gelişimi için *CRC*'ye ihtiyaç duyulmadığını

göstermiştir. Karpeller çiçeklerin dışı üreme organ birimidir. Dışı gametofitleri içeren ovulleri korur ve erkek gametlerin dışı gametofitlere ulaşması için uygun morfolojik destek sağlar. Karpellerin ve diğer çiçek organlarının kimliği A B C D E sınıfı MADS kutusu genleriyle sağlanır (Alvarez and Smyth 1999).

Homeotik çiçek mutantların analizi çiçek organlarının kimliğini birkaç kısıtlı düzenleyici genin birlikte veya kombinasyonla çalışmasıyla belirleneceğini göstermiştir. Genel olarak ABC modeli olarak bilinen çiçeklenme modeli çok çeşitli bitki türlerine uygulanabilir (Coen and Meyerowitz 1991, Weigel and Meyerowitz 1994). Arabidopsis çiçeklerinde karpel kimliğini belirleyen anahtar düzenleyici gen AGAMUS tur. (Bowman *et al.* 1989, 1991). Bu C fonksiyonlu gen MADS kutusuna ait transkripsiyon faktörü kodlar. (Yanofsky *et al.* 1990) Genetik moleküllerin tamamı, transgenik bitkilerde AG'nin ektopik ifadesi de dahil, AG'nin yabani tip çiçeklerde karpellerin özelleşmesi için gerekli olduğunu göstermiştir (Bowman *et al.* 1989, 1991). Bazı karpel özellikleri örneğin, stigmatik doku, çiçek organ sınırlarının birleştiği nokta ve ovüllerin üretimi AG aktivitesinin yokluğunda da gerçekleşir (Bowman *et al.* 1991). Bundan dolayı AG gen fonksiyonu yokluğunda karpel gelişiminin belirlenmesi için diğer genlerin var olduğunu göstermektedir. Spatula ve CRC gibi iki genin mutasyonları durumunda karpel morfogenezi özellikle bozulmuştur. CRC görünüşte ginokium genişliğini ve uzamasını kontrol ederken SPT karpel marjinlerinin gelişimini ve karpelden oluşan dokuların gelişmesini teşvik eder (Alvarez and Smyth 1999). Buna ilaveten CRC arabidopsis çiçeklerinde stamenlerin tabanlarında oluşan nektarların gelişimi için gereklidir. (Davis 1994, Smyth *et al.* 1990).

Mutant bitkilerle yapılan çalışmalar CRC geni karpel dokusunun genişlemesini engellediği karpelin uzamasını teşvik ettiği ve nektar gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir. CRC geni çinko parmak modeli ve heliks ilmek- heliks domaini bir transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. Heliks ilmek- heliks domaininin ilk iki bölgesi HMG kutusu olarak adlandırılmaktadır ve bu bölge DNA ya bağlanır. Arabidopsis te benzer domain kombinasyonuna sahip 5 diğer gen mevcuttur. Bu genlerin tümüne YABBY gen ailesi adı verilir. Gen ifade analizleri CRC'nin gen ifadesinin karpel ve nektarlarla sınırlı olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar A ve B organ kimlik genlerinin CRC ifadesini azaltmaktadır. MADS kutulu çiçek organı homeotik genlerine

ilave olarak iki farklı karpel gelişimi ile ilgili gen analiz edilmiştir. Bunlardan birincisi *YABBY* sınıfı transkripsiyon faktörünü kodlayan karpel ve nektar dokularının gelişimine katılan *CRABS CLAW (CRC)* genidir (Bowman and Smyth 1999). *YABBY* gen ailesi üyeleri genelde bitki yanal organlarının gelişimi sırasında abaksiyal hücre kimliğinin belirlenmesinde iş görürler (Bowman 2000). Benzer şekilde serin tironin protein kinaz kodlayan *TOUSLED* geni karpel ucunun gelişimi için gereklidir ve bu bölgede bu genin yüksek ifadesi tespit edilmiştir (Fourquin *et al.* 2005, Scutt *et al.* 2006).

2.3 *Clavata2 (CLV2)*

Clavata genleri ilk kez vejetatif apikal ve çiçeğe ait meristemlerdeki boyut artışına yol açan mutasyonlarda tanımlanmıştır. *CLV1* tipik bir reseptör benzeri protein kinazı kodlarken; *CLAVATA2 (CLV2)* geni sürgün meristem gelişimi düzenleyen bir lösinzengini tekrar proteini kodlar. Kök hücre kimliği taşıyan *CLV* genleri tüm dokuların oluşumunu başlatır.

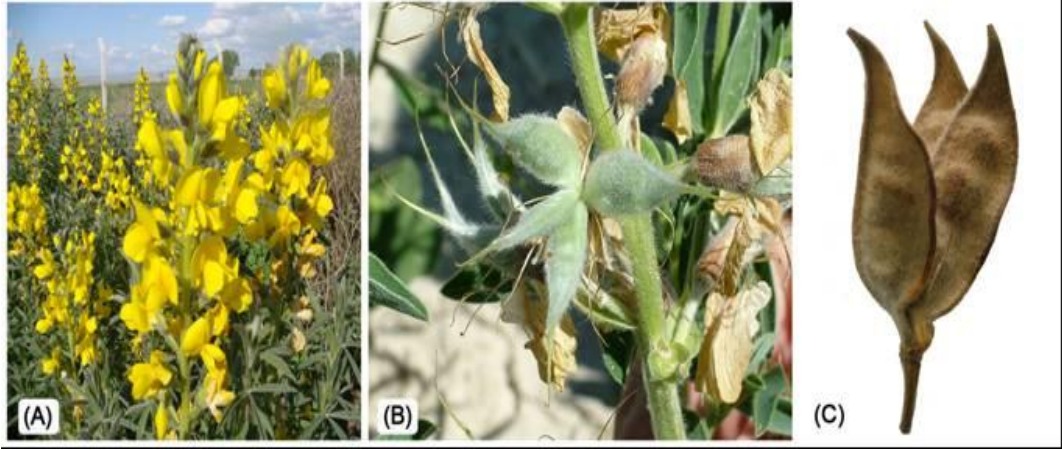
Bitkinin toprak üstü aksamı, sürgün meristemi tarafından oluşturulur. Sürgün meristemi meristem merkezinden farklılaşmamış hücrelerin bir havuzunu muhafaza ederek ve organ oluşumuna doğru farklılaşmayla birlikte organ oluşumuna hücreleri yönlendirerek sürekli organ oluşumunu gerçekleştirir. *Arabidopsis*'te sürgün meristem gelişmesini düzenleyen bazı genler belirlenmiştir. *CLV1* ve *CLV3* sürgün meristemde aşırı miktarda farklılaşmamış hücreleri bulundururken *WUS* ve *STM* mutantları organlaşmayı gerçekleştiremez. *Arabidopsis*'in *clv2* mutantlarında sürgün ve çiçek meristemleri genişler ve aynı zamanda karpel ve stamen gelişiminde farklılıklar oluşur (Kayes and Clark 1998). *CLV2* meristem gelişiminin düzenlenmesinde *CLV1* ve *CLV3* gibi aynı yolda işlev gösterirken organ gelişiminin düzenlenmesinde görev üstlenirken farklı bir işleve sahiptir.

CLV1 ve *CLV2* birlikte sitoplazmik kinaz domainlerine sahip bir reseptör kompleksi kodlar. *CLV3* proteini peptid ligandıdır. *CLV*' ye benzer şekilde *CLV1* ve *CLV3* genlerinin işlev kaybı farklılaşmamış kök hücrelerin sayısını artırır. Bu da sürgün ucu meristemlerinin genişlemesine neden olur. Ayrıca çiçek organ sayılarında da artış gözlenir. *Arabidopsis*'de sürgün meristem gelişmesini düzenleyen bazı genler

belirlenmiştir. *Arabidopsis CLV2* mutantlarında sürgün ve çiçek meristemleri genişler, aynı zamanda karpel ve stamen gelişiminde farklılıklar oluşur (Kayes and Clark 1998, Ferrándiz *et al.* 1999). Reseptör benzeri proteinler (RLP) hücre yüzeyi reseptörleridir. Bu proteinler hücre dışı leusin zengini tekrar (eRRLP) domaini, transmembran domaini ve kısa sitoplazmik kuyruktan meydana gelir. İlk tespit edilen *RLP* geni domateste belirlenmiştir ve bu gen fungal yaprak küfü patojenlerine karşı direnç oluşturur. Patojenlere karşı savunmaya ek olarak *AtRLP* genleri bitki gelişiminde rol oynarlar. Gelişimsel *AtRLP* genleri *Arabidopsis* toomany molf şeklinde isimlendirilen *TMM* geni olarak isimlendirilir. Bu gen yaprak altındaki stomaların dağılımından sorumludur. En iyi çalışılmış *RLP* geni *Arabidopsis CLV2*; *AtRLP10* genidir. Bu genin mısırdaki ortoloğu *FEA2* genidir. *CLV2* reseptör benzeri kinaz (RLK) *CLV* ile birlikte bir reseptör kompleksi kodlar. *RLK*' lar *RLP*' lerden farklı hücre reseptörleridir. Çünkü sitoplazmik kinaz domenlerine sahiptir. *CLV1* ve *CLV2* fiziksel temas kurarak heterodimer bir yapıyı oluşturur ve *CLV3* peptit ligandı için bir reseptör kompleksi oluştururlar. *CLV3*' ün bağlanmasından sonra *CLV1* domaini nasıl olduğu bilinmez bir şekilde sinyal dizileri üretir ve kök hücresi oluşumunu teşvik eden WUSSHELL transkripsiyon faktörünün ifadesini baskılar böylece kök hücre popülasyonu sınırlandırılmış olur. *CLV2*'ye benzer şekilde *CLV* ve *CLV3*'ün işlev kaybı farklılaşmamış kök hücrelerin sayısını artırır. Bu da sürgün apikal meristemlerinin genişlemesine neden olur. Ayrıca çiçek organ sayılarında da artış gözlenmiştir. Bununla birlikte kısa gün mutantlarında *clv2* çiçeklerinde ilave organ gelişimi gözlenmezken sürgün apikal meristemi genişler. Bu bulgu çiçek meristemini *CLV2* Tarafından düzenlenmesinin bitkinin fizyolojik durumuna bağlı olduğunu göstermiştir. Alternatif olarak henüz belirlenememiş bir *RLP* geni ki bu gen özellikle kısa günlerde ifade olur *CLV2* genini aktivitesini yerine getirir. Bunun ötesinde son zamanlarda *CLV2*'nin bir reseptör kinazı olan *CRN* ile birlikte fonksiyon gördüğü belirlenmiştir. *CRN*'deki bir mutasyon *CLV1* ve *CLV2* kök hücre sayısının artmasına sebep olur. Bununla birlikte *CRN* bitki gelişiminde *CLV2* ile çiçek organı ve kök gelişimi gibi ilave fonksiyonlara sahiptir (Wang *et al.* 2009)

2.4 *Thermopsis turcica* Tan, Vural & Küçüköyük

Fabaceae (Leguminosae) ailesinin en geniş alt ailesi olan Papilionoideae (Faboideae), 455 cins ve yaklaşık 12.000 türle temsil edilmektedir (Tucker 2003). 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* genusunun Türkiye'deki tek temsilcisi endemik *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük türüdür (Tan *et al.* 1983, Davis *et al.* 1988). *T. turcica*, Eber Gölü güneyi ve Akşehir Gölünün güney-batı kıyılarında yayılış göstermektedir. Fenolik, alkaloid ve flavonoid bakımından zengin olan *T. turcica* için tıbbi bitki veya süs bitkisi olarak kullanımı tespit edilmemiştir (Şener *et al.* 1992, Cenkci *et al.* 2007, Özdemir *et al.* 2008, Aksoy *et al.* 2013). *T. turcica* yaprak ve diğer organ ekstraktlarının antimikrobiyal ve genotoksik aktiviteleri tespti edilmiştir (Korcan *et al.* 2009, Bali *et al.* 2014, Ciğerci *et al.* 2016 basımda). Yöre insanları tarafından 'piyan' olarak adlandırılan *T. turcica*, IUCN kriterlerine göre nesli kritik seviyede tehlikededir (Ekim vd. 2000). Bu nedenle, keşfedildiğinden bu yana bazı in vitro ve ex situ koruma ve kollama çalışmalarına konu edilmiştir (Cenkci *et al.* 2007, 2008, 2009). Papilionoideae alt ailesi için çoklu serbest karpel yapısı, diğer bir ifade ile aynı çiçekten çok karpelli serbest meyve durumu *T. turcica* için rapor edilmiş bir özelliktir. (Şekil 2.3). *T. turcica* çiçeğinde beş sepal, beş petal, iki halkada on stamen ve dörde kadar olan serbest karpeller mevcuttur (Tan *et al.* 1983). Bezelye, fasulye, soya fasulyesi, nohut ve yonca gibi ekonomik olarak önemli türleri de kapsayan yaklaşık 12.000 papilionoit türü içinde bu sıradışı morfolojik özellik, *T. turcica*'yı ayrıcalıklı ve özel bir yabancı bitki türü yapmaktadır (Tan *et al.* 1983).



Şekil 2.3 Yabani *T. turcica* resimleri (a) Korumaya alınmış Eber popülasyonundan genel görünüşü, (b) tek çiçekten gelişmiş olgunlaşma aşamasındaki 4 serbest karpelli meyve ve (c) tek çiçekten gelişmiş 3 serbest karpelli kurumuş meyve (Fotoğraflar: Dr. Süleyman Cencki)

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Örnekleme

Afyonkarahisar Eber Gölü güney kıyılarında, koruma alanı içerisinde yayılış gösteren *T. turcica* bitkilerinden 20 Nisan - 20 Mayıs günleri arasında 2015 yıllarında örnekleme yapılmıştır. Gen dizileme ve kantitatif PCR çalışmalarında kullanılacak vejetatif ve üreme dokuları mevcudiyetine bağlı olarak 150-1000 mg olacak şekilde alüminyum folyo paketlere sarılmıştır. Bitkinin tozlaşma öncesi, tozlaşma sonrası, genç meyve dönemi ve olgun meyve dönemi olmak üzere dört ayrı zamanda bitki örnekleme yapılmıştır. Rasemös çiçek durumundaki *T.turcica* bitkisinin tepe ucundan en alt seviyedeki tomurcuklar boyutlarına göre yedi farklı tomurcuk, tozlaşma öncesi ve sonrası çiçeklerden sepal, petal, stamen, karpel dokuları, vejetatif (sürgün kök, genç ve olgun yaprak) ve meyve dokuları (genç meyve, olgun meyve, olgun meyve kabuğu ve olgun meyve tohumu) dokuları örneklendirilmiştir. Örneklendirilmiş bitki dokuları birer gram paketlenerek sıvı azotta dondurulmuş ve çalışma zamanına kadar -86°C ultra derin dondurucuda saklanmıştır. Örnekleme işlemleri dokulardaki DNA/RNA varlıklarına zarar vermemek için hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Tozlaşma sonrası *T. turcica* tomurcuk boyutları

3.2 *Thermopsis turcica* Tomurcuklarından Total RNA İzolasyonu

3.2.1 Total RNA İzolasyonu

Gen izolasyonlarında *T.turcica* 'nın genç çiçek tomurcuklarından izole edilen total RNA kullanılmıştır. qPCR analizlerinde kullanılmak üzere yukarıda (Şekil 3.1) bahsedilen dokuların tümünden total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyon kullanılan ortam, benç, cihazlar ve sarf malzemeler RNaseZap™ (Ambion), %75 EtOH, yoğun kıvamlı çamaşır suyu ve UV lambası kullanılarak RNaz enziminden arındırılmış ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Ayrıca; çalışmalar sırasında da RNaz kontaminasyonu engellenmek için steril çalışmaya aşırı özen gösterilmiştir.

RNA ekstraksiyonu, PureLink™ RNA Mini (Ambion, USA) RNA izolasyon kiti kullanılarak kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Özetle 250 mg doku örneği; soğutulmuş steril havanda sıvı azotta dövülerek kına kıvamına getirilmiştir. Önceden soğutulmuş 1.5 mL Ependorf tüpe 150 mg dövülmüş doku örneği aktarılmış ve tüpe 1 mL lizis tamponu ilave edilmiştir. Kısa bir vorteks sonrası tüp en yüksek hızda 5 dakika oda şartlarında santrifüj edilmiştir. 1 mL süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. 0,5 mL absolute etanol eklenerek kısaca vortekslenmiş ve karışım spin kartuşlara yüklenmiştir. 12 000 g'de 90 saniye santrifüjleme sonrası RNA örneği Yıkama tamponu I ve II ile temizlenmiştir. Temiz bir tüpe alınan kartuşa 100 µl RNaz içermeyen su eklenerek oda şartlarında santrifüj edilerek RNA elüte edilmiştir.

3.2.2 DNaz Uygulaması

RNA ekstresi DNA-free™ DNase (Ambion, USA) kiti kullanılarak muhtemel DNA kontaminasyonundan temizlenmiştir. Kısaca, RNA ekstresine 10 µl DNaz I Tamponu ve 1 µL rDNaz eklenerek nazikçe karıştırılmıştır. 37°C su banyosunda 30 dakika inkübasyon sonrası karışıma 5 µL DNaz inaktivasyon ajanı eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 000 x g'de 2 dakika santrifüj sonrası şeffaf sıvı faz dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe aktarılmıştır.

3.2.3 RNA Miktar Tayini

Elde edilen RNA'ların miktar tayini Qubit™ (Invitrogene) Assay kiti kullanılarak Qubit fotometre 2 cihazında ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Qubit™ protokolüne uygun ölçüm karışımı hazırlanarak 1-20 µL arasında RNA örneği ile ölçüm yapılmıştır. Her örnek için 199 µL Qubit tamponu ve 1 µL Qubit ajanı ile karışım hazırlanmıştır. Son hacim 200 µL olacak şekilde örnek ve ölçüm karışımı aynı tüp içerisine aktararak kısaca vortekslenmiştir. 2 dakika inkübe edilerek ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir. Ölçümü yapılan örnekler kullanılacağı zamana kadar -86°C ultra derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.4 Total RNA'dan İlk İplik cDNA Sentezi

Dokulardan izole edilmiş total RNA'dan cDNA sentezi RevertAid ilk iplik cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. -86 °C'de saklanmış ve cDNA sentezinde çalışılacak total RNA örnekleri ile çalışmada RNaz kirliliğinden uzak steril koşullar sağlanmıştır. Özetle 1 µL Oligo(dT)₁₈ primer (100 mM), doku için ölçüm sonrası belirlenmiş miktarda total RNA (0,1 ng-5 µg), 12 µL'ye kadar su eklenmiş; 5 dakika 65°C'de tutulmuştur. Tüpe 4 µL 5x reaksiyon tamponu, 2 µL 10 mM dNTP karışımı, 1 µL 20U/ µL Ribolock RNase Inhibitor, 1 µL 200U/ µL RevertAid M-MuLV RT eklenmiş, 60 dakika 42 °C'de inkübe edilmiştir. İlk iplik cDNA'lar ya hemen kullanılmıştır ya da kullanılmaya dek -86°C'de saklanmıştır.

3.3 cDNA Kalıbı Kullanılarak Hedef Genin Çoğaltılması

3.3.1 Dejenere Primer Tasarımı

Bu çalışmada *CLV2* ve *CRC* gen homologları *T.turcica* bitkisinden izole edilmiştir. Dejenere primer tasarımında özellikle legümen bitkiler için daha önceden gen bankasına teslim edilmiş nükleotid ve protein dizilerinden yararlanılmıştır.

Çalışma hedef genler için özellikle baklagil bitki türlerinden şimdiye kadar elde edilmiş sekanslar BLASTp/n ve CLUSTALw programları ile karşılaştırılarak, dejenere primer

tasarımında kullanılabilir ortak amino asit sekansları ve nükleotid dizileri belirlenmiştir. Dejenere primer tasarlarken her bir gen için baklagil bitkilerinden belirlenmiş protein ve nükleotid dizilerine ulaşılmıştır (Çizelge 3.3). Protein dizileri CLUSTALw programı ile hizalanarak ortak amino asit dizi bölgeleri belirlenmiştir. Daha sonra bu ortak dizileri kodlayan nükleotid dizileri belirlenmiş ve nihayetinde dejenere primerler tasarlanmıştır.

3.3.2 CLV2 İçin Dejenere Primer Tasarımı

Aşağıda CLV2 için primer tasarımında kullanılan legümen bitkilere ait nükleotit ve protein dizileri verilmiştir. Primer tasarlamada kullanılan ortak aminoasit ve nükleotid dizileri koyu taralı olarak gösterilmiştir.

>gi|571480585|ref|XP_003533585.2| PREDICTED: leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2-like, partial [Glycine max]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPARIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPFSIVGCFQLY
ALILNNNNLSGVIQPEFDALDILRILDISNNRFSGAIPLTLAGCKSLEIVDFSSNEL
SGSLNDAITKWTNLRYLSLAQNKFSENLPSWLFTFNAIEMMDFSHNKFTGFIPDI
NFKGSLIFNTRNVTVKEPLVAARKVQLRVSAVVSDSNQLSFTYDLSSMVGIDLS
SNSLHGEIPRGLFGLSGLEYLNLSCNFLYGQLPGLQKMQSLKALDLSHNSLS**SGHI**
PGNIS

>gi|571480584|ref|XM_003533537.2| PREDICTED: *Glycine max* leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2-like (LOC100814791), partial mRNA

AAAATTACTGAGTTGAAAAGCTTGCAGGCCTTGTTTCTCTCTCACAATCTTC
TCTCAGGAGAAATTCCTGCTAGAATTGGAAATTTGACTTATCTGCAGGTCAT
TGATCTCTCACAACTCTTTGTCTGGAACCATTCATTAGTATTGTTGGGT
GCTTTCAGCTGTATGCTCTGATACTTAACAACAACAATCTTTCTGGTGTAAT
TCAACCGGAGTTTGATGCGTTGGATATCTTGAGGATACTGGATATAAGCAA
CAACAGGTTTTCCGGGGCTATCCCCTCACTTTGGCTGGATGCAAATCTTTG
GAGATTGTAGACTTTAGTTCCAATGAGCTTTCTGGATCGTTGAATGATGCAA
TAACCAAATGGACAAACCTCAGGTATTTGTCTCTTGCTCAGAACAAGTTCAG
TGAAAATCTGCCTAGTTGGTTGTTACATTTAACGCAATAGAAATGATGGAT

TTCTCGCATAACAAGTTTACTGGCTTCATACCGGATATTAATTTTAAGGGTA
GCTTAATATTTAACACTAGGAATGTCACTGTAAAGAGCCATTGGTTGCAGC
AAGAAAGGTTCAACTCAGAGTTTCGGCGGTTGTTTCTGATAGCAATCAACTC
AGTTTCACTTATGATCTTTCCTCAATGGTTGGAATTGATCTATCCAGCAACTC
GCTTCATGGGGAAATTCCAAGGGGCTTATTTGGTCTATCTGGCCTAGAATAT
CTGAATTTGTCATGCAACTTCTTTACGGACAGCTTCCGGGGTTGCAGAAAA
TGCAGAGTTTGAAAGCCTTGGATTTGTCACAT **AATTCCTTGTCAGGACATAT**
CCCAGGAAACATCTCT

>gi|336088213|dbj|BAK39955.1| leucine-rich repeat receptor-like protein [*Lotus japonicus*]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPARIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPFSIVGCFQLY
ALILNNNNLSGVIQPEFDALDILRILDISNNGFSGAIP LLAGCKSLEIVDFRSNDL
SGSLNDAITKWTNLRYLSLAENKFSGDLPSWLFTFESIETMDFSHNKFSGFIPDIN
FKGSLIFNTRNVTVKEPLAAPKEFQLRVSAVVSDSNQLSFTYDLSSMVGIDLSSN
LLHGEIPRGLFGLTSLEYMNL SYNFLDGQLPGLQKMQSLKALDLSHNSLS**SGHIP**
GNIS

>gi|336088212|dbj|AB638614.1| *Lotus japonicus Clavata2* mRNA for leucine-rich repeat receptor-like protein, complete cds

AAAATTACTGAGTTGAAAAGTTTGCAGGCCTTGTTCCCTTCTCACAATCTTC
TTTCAGGAGAAATTCCTGCTAGAATTGGAACTTGACTTATCTTCAAGTTAT
TGATCTCTCACAACTCTTTGTCTGGTACCATTCCATTCAGTATTGTTGGAT
GCTTTCAGCTGTATGCTTTAATACTTAATAACAACAATCTTCTGGTGTGATT
CAACCTGAGTTTGATGCATTGGATATCTTGAGGATACTGGATATAAGCAAC
AACGGGTTTTCTGGTGCTATTCCTCACTTTGGCTGGATGCAAATCTCTGG
AGATTGTAGATTTTAGGTCCAATGATCTTCTGGATCCTTGAATGATGCAAT
AACCAAGTGGACAAACCTCAGGTATCTTCTCTTGCTGAGAACAAGTTCAGT
GGCGATTTGCCTAGTTGGTTGTTACGTTTCGAATCAATAGAAACAATGGATT
TCTCTCACAACAAGTTTTCTGGCTTCATACCTGATATTAATTTTAAGGGTAG
CTTAATATTTAACACAAGGAATGTCACTGTAAAGGAGCCACTGGCTGCACC
AAAAGAGTTTCAACTCAGAGTTTCAGCTGTTGTTTCTGATAGCAATCAACTT
AGTTTCACTTATGATCTCTCATCAATGGTTGGAATCGATCTATCCAGCAACT

TGCTACATGGGGAGATTCCAAGGGGCTTGTTTGGCCTAACTTCCCTAGAATA
CATGAATTTGTCTTACAATTTTCTAGATGGACAGCTTCCTGGTTTGCAGAAA
ATGCAGAGTTTGAAAGCCTTGGATTTGTCACATAATTCTCTGTCAGGACATA
TCCCAGGAAACATTTCT

>gi|571548682|ref|XP_006602840.1| PREDICTED: leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2-like [*Glycine max*]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPARIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPFSIVGCFQLY
ALILTNNNLSGVIQPEFDALDILRILDISNNRFSGAIPPLTAGCKSLEIVDFSSNELS
GSLNDAITKWTNLRNVTVKEPLVAARKVQLRVSAVVSDSNQLSFTYDLSSMVG
IDLSSNSLHGEIPRGLFGLAGLEYLNLSCNFLYGQLPGLQKMHSLKALDLSHNSL
SGHIPGNIS

>gi|571548681|ref|XM_006602777.1| PREDICTED: *Glycine max* leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2-like (LOC100798103), mRNA

AAAATCACTGAGTTGAAAAGCTTGCAGGCCTTGTTTCTCTCTCACAATCTTC
TCTCTGGAGAAATTCCTGCTAGAATTGGAAATTTGACTTATCTGCAGGTCAT
TGATCTCTCACAACTCTTTGTCTGGAACCATTCCATTCAGTATTGTTGGGT
GCTTTCAGCTGTATGCTCTAATACTTACTAACAACAATCTTCTGGTGTAATT
CAACCGGAGTTTGATGCGTTGGATATCTTGAGGATTCTGGATATAAGCAAC
AACAGGTTTTCCGGGGCTATCCCACTCACTCTGGCTGGATGCAAATCTCTGG
AGATTGTAGATTTTAGTTCCAATGAGCTTTCTGGATCCTTGAATGATGCAAT
AACCAAATGGACAAACCTCAGGAATGTCACTGTAAAGAGCCATTGGTTGC
AGCAAGAAAGGTTCAACTGAGAGTTTCGGCGGTTGTTTCTGATAGCAATCA
GCTCAGTTTCACTTATGATCTTTCCTCAATGGTTGGAATTGATCTATCCAGCA
ATTCGCTTCATGGGGAAATTTCCAAGGGGCTTATTTGGTCTAGCTGGCCTAGA
ATATCTGAACTTGTCATGCAACTTCTTTACGGACAGCTTCCGGGGTTGCAG
AAAATGCATAGTTTGAAAGCCTTGGATTTGTCACATAATTCCTTGTCTGGAC
ATATCCCAGGAAACATTTCT

>gi|502105522|ref|XP_004492826.1| PREDICTED: leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2-like [*Cicer arietinum*]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPARIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPFSIVGCFQLY
ALILNNNNLSGVIQPEFDALDILRILDISNNRFSGAIPLTLAGCKSLEIVDFSSNDL
SGSLNDAITKWINLRYLSLARNKFDGTLPSWLFTFQAIETLDLSHNKFSGFIPDIN
LKGSLVFNTRNVTVKELLVEERKVEPRVSVVVSDDNQLSFTYDLSSMFGIDLSN
NLLHGEIPRGLFGLAGLQYLNLSYNFLNGQLPGLQKMQSLKAIDL**SHNSLSGHI**
PGNIS

>gi|502105521|ref|XM_004492769.1| PREDICTED: *Cicer arietinum* leucine-rich repeat receptor-like protein CLAVATA2-like (LOC101504135), mRNA

AAAATTACCGAGTTGAAAAGCTTGCAGGCCTTGTTCTTTACACAATCTTC
TTTCAGGAGAAATTCCTGCTAGAATTGGAAATTTGACATATCTTCAAGTCAT
TGATCTCTCACACAACCTTTGTCCGGTACCATTCCATTCAGCATTGTTGGGT
GCTTTCAGTTGTATGCTCTAATACTTAATAACAACAACCTTTCGGGTGTAAT
TCAACCGGAGTTTGACGCGTTGGATATCTTGAGGATACTAGATATAAGCAA
CAATAGGTTTTCTGGGGCTATTCCACTCACTTTGGCTGGATGTAAATCTTTG
GAGATTGTAGATTTTAGTTCCAATGACCTTCTGGATCTTTAAATGATGCAA
TAACCAAATGGATAAACCTCAGGTATCTTCTCTTGCTCGAAACAAATTCGA
TGGAACCTTGCCTAGTTGGTTGTTACATTTCAAGCTATAGAAACATTGGAT
TTGTCGCACAACAAGTTTTCTGGATTTATACCTGATATTAATTTGAAGGGTA
GCTTAGTATTTAACACAAGGAATGTTACTGTAAAGAGCTTTTGGTTGAAGA
AAGAAAGGTTGAACCAAGAGTTTCAGTAGTTTCTGATAACAATCAACTT
AGTTTTACGTATGATCTTTCGTCGATGTTTCGGAATCGATCTATCCAATAACTT
GCTGCATGGGGAGATTCCAAGGGGTTTATTTGGCCTAGCTGGCCTACAATAT
CTGAATTTGTCATACAATTTTCTCAATGGACAGCTTCCTGGTTTGCAGAAAA
TGCAAAGTTTGAAAGCCATAGACCTGTCGCAT**AATTCCTGTCGGGACATAT**
CCCGGGAAACATTCG

>gi|593332629|ref|XP_007139740.1| hypothetical protein PHAVU_008G055400g [*Phaseolus vulgaris*]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPARIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPFSIVGCFQLY
ALILNNNNLSGVIQPEFDALDILRILDISNNRFSGAIPLTLAGCKSLEIVDFSSNEL

SGSLNDAITKWSNLRNVTVKEPLVAARNVQLRVSAVVSDSNQLSFTYDLSSMI
GIDLSSNLLHGEIPRGLFGLAGLEYLNLSCNFLYGQLPGLQKMQSLKALDLSNN
SLSGHIPGNIS

>gi|593332628|ref|XM_007139678.1| *Phaseolus vulgaris* hypothetical protein
(PHAVU_008G055400g) mRNA, complete cds

AAAATTACTGAGTTGAAAAGTTTGCAGGCCTTGTTTCTCTCTCACAATCTTC
TCTCTGGAGAAATTCCTGCCAGAATTGGAAATTTGACCTATCTTCAGGTCAT
TGATCTCTCACAACTCTTTGTCTGGTACCATTCCATTCAGCATTGTTGGGT
GCTTTCAGCTGTATGCTCTAATACTGAATAACAACAATCTTTCTGGTGTAAT
TCAACCGGAGTTTGATGCATTGGATATCTTGAGGATACTGGATATAAGCAA
CAACAGGTTTTCCGGGGCTATCCCCTCACTCTGGCTGGATGTAAATCTCTC
GAGATTGTAGATTTTAGTTCCAATGAGCTTTCTGGATCCTTGAATGATGCAA
TAACGAAATGGTCAAACCTCAGGAATGTCCTGTAAAGAGCCATTGGTTG
CAGCAAGAAATGTTCAACTGAGAGTTTCAGCTGTTGTTTCTGATAGCAATCA
ACTCAGTTTTACTTATGATCTATCCTCAATGATTGGAATCGATCTATCCAGC
AACTTGCTCCACGGAGAGATTCCAAGGGGCTTATTTGGTCTAGCTGGTCTAG
AATATCTGAATTTGTCATGCAACTTTCTCTATGGACAGCTTCCAGGTCTGCA
GAAAATGCAGAGTTTGAAAGCCTTAGATTTGTCAAATAATTCCTTGTCAGGA
CATATCCCAGGAAACATTTCT

>gi|357507683|ref|XP_003624130.1| Receptor-like protein kinase [*Medicago
truncatula*]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPARIGNLTYLQVIDISHNSLSGTIPFSIVGCFQLYA
LILNNNNLSGVIQPEFDALDILRILDISNNRFSGAIPLTLAGCKSLEIVDFSSNDLS
GSLNDAITKWTNLRYLSLAWNKFNGNLPSWLFAFQAIETMDLSHNKFSGFIPDI
NLKGSLLFNTRNVTVKEPFVEATKVFEPVSVVVSDSNQLSFTYDHSSMFGIDL
SDNLLHGEIPRGLFGLSGLEYLNLNNSNFLNGQLPGLQKMQSLKAIDLSHNLSL
SGHIPGNIS

>gi|357507682|ref|XM_003624082.1| *Medicago truncatula* Receptor-like protein kinase
(MTR_7g079550) mRNA, complete cds

AAAATTAAGTAAAGCTTGCAGGCTTTGTTTCCTTCTCACAATCTTC
TTTCTGGAGAAATTCCTGCTAGAATTGGAAATTTGACTTATCTTCAAGTCAT
TGATATTTACACAACCTTTGTCTGGTACCATTCCATTCAGTATTGTTGGAT
GCTTTCAGTTGTATGCTCTAATACTTAATAATAACAATCTTCTGGTGTGATT
CAACCGGAGTTTGACGCGTTGGATATCTTGAGGATACTAGATATAAGCAAC
AATAGGTTTTCCGGGGCTATTCCACTCACTTTGGCTGGTTGTAAATCTTTGG
AGATTGTAGATTTTAGTTCCAATGATCTTCTGGATCCTTGAACGATGCAAT
AACCAAATGGACAAACCTCAGGTATCTTCTCTTGCGTGGAAACAATTC AAT
GGAAACTTGCCTAGTTGGTTGTTTCGCATTTCAAGCTATTGAAACAATGGATT
TGTCACACAACAATTTTCTGGCTTTATACTGATATTAATTTGAAGGGTAG
CTTATTATTTAACACACGGAATGTTACTGTTAAAGAGCCTTTTGTGGAAGCT
ACAAAGGTGTTTGAACCAAGAGTTTTCAGTAGTTGTTTCTGATAGCAATCAAC
TCAGTTTCACATATGATCATTTCATCGATGTTTCGGAATCGATCTCTCCGATAA
CTTGTTGCATGGTGAGATTCCAAGGGGCTTATTTGGCCTATCTGGCTTAGAA
TATCTGAATTTGTCAAACAATTTTCTCAACGGACAGCTTCCTGGTTTGCAGA
AAATGCAGAGTTTGAAGCTATAGATTTGTCGCAT AATCCCTATCAGGACA
TATCCCGGGAAACATTTCC

>gi|336088211|dbj|BAK39954.1| leucine-rich repeat receptor-like protein [*Pisum sativum*]

KITELKSLQALFLSHNLLSGEIPSRIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPFSIVGCFQLY
ALILNNNNLSGIIQPEFDALDILRILDISNNRFSGAIPLTLAGCKSLEIVDFSSNDLS
GSLNDAITKWMNLRYLRLARNKFDGSLPGWLFTFQALETMDLSHNKFSGFIPDI
NWKSSLLFNIRDVTVKEEPVVEARRVEPRVSVVVSNSQLSFTYDLSSMFGIDL
SNNLLHGEIPRGLFGLAGLEYLNLSGNFLNGQLPGLQKMQSLKAIDLSH NSLSG
HIPGNIS

>gi|336088210|dbj|AB638613.1| *Pisum sativum Clavata2* gene for leucine-rich repeat receptor-like protein, complete cds

AAAATCACCGAGTTGAAAAGCTTGCAGGCTTTGTTTCCTTCTCACAATCTTC
TTTCGGGGGAAATTCCTTCTAGAATTGGAAATTTGACTTATCTTCAAGTCAT
TGATCTCTCACACAACCTCTCTGTCTGGTACCATTCCATTCAGCATTGTTGGGT
GCTTTCAGTTGTATGCTCTTATACTTAATAACAACAATCTTCTGGCATAATT

CAACCGGAGTTCGATGCGTTGGATATTTTGAGGATACTAGATATAAGCAAC
AATAGGTTTTTCGGGGGCTATCCACTCACTTTGGCTGGATGTAAATCTTTGG
AGATTGTGGATTTTAGTTCCAACGATCTTTCTGGATCATTGAATGATGCAAT
AACCAAATGGATGAACCTCAGGTATCTTTCTCTTGCTCGGAACAAATTCGAT
GGCAGCTTGCCTGGTTGGTTGTTTACATTTCAAGCTTTAGAAACAATGGATT
TGTCACACAATAAGTTTTCTGGCTTTATACCTGATATTAATTGGAAGAGTAG
CTTATTATTTAACATAAGGGATGTTACTGTTAAAGAAGAGCCTTTGGTTGAA
GCGAGAAGGGTTGAACCAAGAGTTTCAGTAGTTGTTTCTGATAGCAACCAA
CTCAGTTTCACATACGATCTTTCATCAATGTTTGGAAATCGATCTATCCAATA
ATCTGTTGCATGGAGAGATTCCAAGGGGCTTATTTGGCCTAGCTGGTCTAGA
ATATCTGAATTTGTTCGGGCAATTTTCTCAACGGACAGCTCCCTGGTTTGCAG
AAAATGCAAAGTTTGAAGCCATAGATTTGTTCGCAT **AATTCCTTATCGGGAC**
ATATCCCGGGAAACATTTC

3.3.3 CRC İçin Dejenere Primer Tasarımı

Aşağıda CRC için primer tasarımında kullanılan legümen bitkilere ait nükleotit ve protein dizileri verilmiştir. Primer tasarlamada kullanılan ortak aminoasit ve nükleotid dizileri koyu taralı olarak gösterilmiştir.

>gi|357487827|ref|XP_003614201.1| CRABS CLAW [*Medicago truncatula*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDTVTVKCGHCSNLSFLTTRPPSSKNQTVDH
TL
SLQGIYSSKKGQPSSSSSPTTSTESLSRPPPFVVKPPEKKHRLPSAYNRFMKEEI
QRIKVANPQ **IPHREAFSA** **AAKNWAR**

>gi|357487826|ref|XM_003614153.1| *Medicago truncatula* CRABS CLAW
(MTR_5g046230) mRNA, complete cds

TGTTACGTTTCGTTGCAACTTCTGTAACTGTCCTAGCTGTTGGCATAACCAT
GCAAGAGGCTGCTAGATACTGTGACAGTGAAGTGTGGTCACTGCAGCAACC
TCTCTTTTCTCACAACAAGACCACCAAGTTCCA AAAAATCAA ACTGTTGATCA
CACCTCAGTCTCCAGGGGATTTACAGTAGCAAAAAGGGCCAACCATCATC
TTCTTCTTCACTACTACATCAACTGAGTCACTGTCCCCTAGACCACCGCCA
TTTGTGTCAAACCACCTGAGAAGAAGCACCGTCTCCCATCTGCATATAACC

GTTTCATGAAAGAAGAGATACAGCGCATCAAAGTAGCCAACCCTCAGATCC
CACATCGAGAAGCTTTCAGTGCTGCTGCCAAAAATTGGGCTAGG

>gi|356502641|ref|XP_003520126.1| PREDICTED: protein CRABS CLAW-like
[*Glycine max*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDTVTVKCGHCSNLSFLSTRPPSSQSQSVDHTL
SLQGFYSNAKKGQASSSSSPTTSNESVSPKAASFVVKPPEKKHRLPSAYNRFM
KEEIQRKAANPEIPHREAFSAAAKNWAR

>gi|571439781|ref|XM_003520078.2| PREDICTED: *Glycine max* protein CRABS
CLAW-like (LOC100819079), mRNA

TGCTACGTTTCGTTGCAACTTCTGCAACACTGTCCTCGCGGTTGGTATCCCAT
GCAAGAGGCTGTTAGACACTGTGACAGTGAAGTGTGGTCACTGCAGCAACC
TCTCCTTTCTGAGCACCAGACCCCAAGTTCTCAAAGCCAAAGCGTTGATCA
CACCTCAGTCTGCAGGGGTTTTACAGTAATGCCAAAAGGGACAAGCATC
ATCTTCATCTTCTCACCAACAACATCTAACGAGTCAGTGTCCCAAAAGCA
GCATCATTGTTGTGAAACCACCTGAGAAAAGCACCGTCTCCCTTCTGCTT
ACAACCGTTTCATGAAAGAGGAGATACAGCGCATCAAAGCTGCGAACCTG
AGATCCCACATCGAGAAGCTTTCAGTGCTGCAGCGAAAAATTGGGCTAGG

>gi|502094476|ref|XP_004490226.1| PREDICTED: protein CRABS CLAW-like
isoform X2 [*Cicer arietinum*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDTVTVKCGHCSNLSFLTTRPPTS KNHTLVDHT
LTLQGVYSCKKGQATSSSSSPTTSTESLSPKAAPFVVKPPEKKHRLPSAYNRFM
KEEIQRKAANPQIPHREAFSAAAKNWAR

>gi|502094475|ref|XM_004490169.1| PREDICTED: *Cicer arietinum* protein CRABS
CLAW-like (LOC101497348), transcript variant X2, mRNA

TGTTACGTTTCGTTGCAACTTCTGTAACACTGTCCTTGCTGTTGGAATCCCATG
CAAGAGGCTTCTAGACACTGTGACAGTAAAATGTGGACACTGCAGCAACCT
CTCTTTTCTCACCCTAGACCACCGACTTCCAAAATCATACTCTAGTCGAT
CACACCCTCACTCTCCAGGGAGTTTACAGTTGCAAAAAGGTCAAGCAACG
TCTTCTTCGTCCTTCTCACCAACTACATCGACCGAGTCATTGTCTCCTAAAGC

AGCACCATTTGTTGTAAACCACCTGAAAAGAAGCACCGTCTCCCATCTGCA
TACAACCGTTTCATGAAAGAGGAGATCCAGCGCATCAAAGCAGCCAACCCT
CAGATCCACATCGAGAAGCTTTCAGTGCTGCTGCAAAAAATTGGGCTAGA

>gi|593780893|ref|XP_007153487.1| hypothetical protein PHAVU_003G039800g
[*Phaseolus vulgaris*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDTVTVKCGHCSNLSFLSTRPPNSQNQSIDHTLS
LQGFYSNAKKGQASSSSSSPTTSNESVSPKAASFVVKPPEKKHRLPSAYNRFMK
EEIQRIKAANPEIPHREAFSAAAKNWAR

>gi|593780892|ref|XM_007153425.1| *Phaseolus vulgaris* hypothetical protein
(PHAVU_003G039800g) mRNA, complete cds

TGCTACGTTTCGTTGCAACTTCTGCAACACTGTCCTCGCGGTTGGTATTCCAT
GCAAGAGGCTGTTAGACTGTGACAGTGAAGTGTGGCCACTGCAGCAACC
TCTCCTTTCTGAGCACCAGACCCCTAATTCTCAAACCAAAGCATTGATCA
CACCTCAGTCTCCAGGGGTTTTACAGTAATGCCAAAAGGGACAAGCATC
GTCTTCATCTTCCTCACCAACCACATCCAACGAGTCAGTGTCCCCAAAAGCA
GCATCTTTTGTGTTGTGAAACCACCTGAGAAAAAGCACCGTCTCCCATCTGCTT
ACAATCGTTTCATGAAAGAGGAGATACAGCGCATCAAAGCAGCGAACCCTG
AGATCCACATCGAGAAGCTTTCAGCGCTGCAGCCAAAATTGGGCAAGG

>gi|356498029|ref|XP_003517857.1| PREDICTED: protein CRABS CLAW-like
[*Glycine max*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDTVTVKCGHCSNLSFLSTRPPSSQNQSIDHTTL
SLQGFYSNAKKGQASSSSSSPTTSNESVSPKAASFVVKPPEKKHRLPSAYNRFM
KEEIQRIKAANPEIPHREAFSAAAKNWAR

>gi|571434313|ref|XM_003517809.2| PREDICTED: *Glycine max* protein CRABS
CLAW-like (LOC100795791), mRNA

TGCTACGTTTCGTTGCAACTTCTGCAACACTGTCCTCGCGGTTGGTATCCCAT
GCAAGAGGCTGTTAGACTGTGACAGTGAAGTGTGGTCACTGCAGCAACC
TCTCCTTTCTGAGCACCAGACCCCAAGTTCTCAAACCAAAGCATTGATCA
TACCACCCTAAGTCTGCAGGGGTTTTACAGTAATGCCAAAAGGGGCAAGC

ATCATCTTCATCTTCCTCACCAACAACATCCAACGAGTCAGTGTCCCCAAAA
GCAGCATCATTGTTGTGAAACCACCTGAGAAAAAGCACCGTCTCCCTTCTG
CTTACAACCGTTTCATGAAAGAGGAGATACAGCGCATCAAAGCTGCGAACC
CTGAGATCCACATCGAGAAGCTTTCAGTGCTGCAGCGAAAAATTGGGCTA
GG

>gi|502094471|ref|XP_004490225.1| PREDICTED: protein CRABS CLAW-like isoform X1 [*Cicer arietinum*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDTVTVKCGHCSNLSFLTTRPPTSKNHTLVDHT
LTLQQGVYSCKKGQATSSSSSPTTSTESLSPKAAPFVVKPPEKKHRLPSAYNRF
MKEEIQRIKAANPQIPHREAFSAAAKNWAR

>gi|502094470|ref|XM_004490168.1| PREDICTED: *Cicer arietinum* protein CRABS CLAW-like (LOC101497348), transcript variant X1, mRNA

TGTTACGTTTCGTTGCAACTTCTGTAACACTGTCCTTGCTGTTGGAATCCCATG
CAAGAGGCTTCTAGACACTGTGACAGTAAAATGTGGACACTGCAGCAACCT
CTCTTTTCTCACCCTAGACCACCGACTTCCAAAAATCATACTCTAGTCGAT
CACACCCTCACTCTCCAGCAGGGAGTTTACAGTTGCAAAAAAGGTCAAGCA
ACGTCTTCTTCGTCCTCTTACCAACTACATCGACCGAGTCATTGTCTCCTAA
AGCAGCACCATTGTTGTTAAACCACCTGAAAAGAAGCACCGTCTCCCATCT
GCATAACAACCGTTTCATGAAAGAGGAGATCCAGCGCATCAAAGCAGCCAAC
CCTCAGATCCACATCGAGAAGCTTTCAGTGCTGCTGCAAAAAATTGGGCT
AGA

>gi|502154590|ref|XP_004509753.1| PREDICTED: protein CRABS CLAW-like [*Cicer arietinum*]

CYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLVDTVTVKCGHCSNLSFLSTRPSYNQNHAIDHSL
TLHHQRFYSDLKKKGQASSSSSSTTSGEVSPKAAPFVVKPPEKKHRLPSAYNRF
MKEEIQRIKAANPEIPHREAFSAAAKNWAR

>gi|502154589|ref|XM_004509696.1| PREDICTED: *Cicer arietinum* protein CRABS
CLAW-like (LOC101515488), mRNA

TGCTACGTTTCGTTGCAATTTCTGTAACACTGTTCTTGCGGTTGGCATCCCTTG
CAAGAGGCTTGTAGATACTGTGACGGTGAAGTGTGGTCACTGCAGCAACCT
CTCATTTCCTTAGCACCAGACCTTCATACAATCAAAATCATGCCATTGATCAT
TCACTCACTCTTCATCACCAGAGGTTTTACAGTGATTTGAAAAAAGGCCAAG
CATCATCTTCATCATCCTCAACAACCACTTCTGGAGAGCCCGTGTCCCCTAA
AGCTGCACCCTTTGTTGTCAAACCACCTGAGAAGAAGCATAGGCTCCCATCT
GCTTACAATCGTTTCATGAAAGAGGAGATACAGCGCATAAAAAGCAGCAAAC
CCTGAAATCCACATCGAGAAGCTTTCAGTGCTGCAGCAAAAAATTGGGCT
AGG

3.3.4 CLV2 ve CRC Dejenere Primerleri

CLV2 ve CRC genlerinin *T.turcica* dan izole edilebilmesi için değerlendirilme sonucunda tasarlanmış olduğumuz dejenere primerlerin adları, dizileri ve PCR da çoğaltılacak olan DNA parçasının büyüklüğü Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 CLV2 ve CRC Dejenere Primer Dizileri

Gen adı	Primer adı	Primer dizisi	DNA uzunluğu
CLV2	dCLV2F	CYGAGTTGAAAAGYTTGCAGGCYTTG	700-850 nt
	dCLV2R	GARATGTTTCCYGGGATATGTCCHGA	
CRC	dCRCF	TACGTTTCGTTGCAACTTCTGYAACAC	405-417nt
	dCRCR	GCRCTGAAAGCTTCTCGATGTGGGAT	

Not: Yukarıdaki primer dizi bilgilerinde geçen Y=C ve T, R=Ave G, H=A, C ve T’ dir.

3.4 cDNA Kullanılarak PCR Kurulumu

Total RNA’dan elde edilen cDNA kullanılarak ilgili genin kısmi bölgesi çaksiyon karışımı, 21,5 µl dH₂O, 10 µl 5x Füzyon HF tamponu, 5 µl 0,2 mM dNTP karışımı, 3 µl 50 mM MgCl₂, 2,5 µl gene özgü tasarlanmış ileri ve geri primerler (dCLV2F&R, dCRCF&R), 5 µl cDNA ve 0,5 µl 2U/µl Füzyon yüksek güvenilirlikli DNA polimeraz (Thermo Scientific) ile 50 µl toplam reaksiyon hazırlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu Applied Biosystem ProFlex™ PCR ısı döngü cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon döngüleri; ilk denatürasyon 98°C 2 dakika; 5 döngü 98°C 0,15 sn, 59°C 0,30 sn ve 72°C 30 saniye; 35 döngü 98°C 0,15 sn, 66°C 0,30 sn ve 72°C 0,30 saniye; son olarak 72°C 5 dakika şeklindedir.

3.4.1 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünlerinin doğrulaması jel görüntülemesi ile yapılmıştır. Jel tamponu ve çözelti hazırlanması için 1x TBE (Trizma Baz, Borik Asit, EDTA, dH₂O) karışımı kullanılmıştır. 1,8 g agaroz tartılarak, 100 mL TBE tampon içerisinde sıcaklık ile katı partiküller tamamen çözdürülmüş, böylece %1,8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. RadSafe™ jel boyası (Nucleic Acid Staining Solution) 100 mL jel içerisine 8 µl eklenerek UV ışık altında görüntü alınması sağlanmıştır. PCR ürünü yükleme tamponuyla karıştırılmış, ürünler jele yüklenerek 120 voltta 1 saat 15 dakika boyunca yürütülmüştür. DNA bantlarının görüntülenmesi Gen Box SDR Bio-Imaging System ile gerçekleştirilmiştir. DNA ebatların belirlenmesinde Image-Plaza paket programı kullanılmıştır.

3.4.2 PCR Ürünlerinin Kit Kullanılarak Saflaştırılması

DNA örneklerinin dizilemeye gönderilmesi öncesinde PCR ürünleri saflaştırılmıştır. Özetle, PCR ürünü 1,5 mL ependorf tüpe alınmıştır. Ürünün 10'da 1'i hacminde 3 M sodyum asetat (pH:5,2); üzerine karışımın 2,5 katı hacimde -20°C'de muhafaza edilen saf etanol eklenmiş, tüpler nazikçe karıştırılarak gece boyunca -20°C'de tutulmuştur. 4°C'de maksimum hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırılarak pellet üzerine %70 etanol eklenerek aynı koşullarda 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve DNA pelleti 30 µl TE veya dH₂O içerisinde çözdürülmüştür.

3.4.2.1 PCR Ürünlerinin PEG Saflaştırması

PCR reaksiyon hacminin 2 katı hacimde saf ve soğuk etanol eklendikten sonra örnek tüp 5 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Yüksek hızda ve 4 oC'de 10 dakika santrifüj

edildikten sonra süpernatant tüpten uzaklaştırılmıştır. Çökelti, 32 µl çok saf su ile çözüldükten sonra 8 µl 5M NaCl (son konsantrasyon 0.5 M) ile karıştırılmıştır. Tüpe 40 µl %22'lik PEG8000 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 0.3M sodyum asetat (NaOAc) çözünmüş ve 2.5 hacimli %95'lik etanol eklenip 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 bırakılarak kurutulmuştur. DNA pelleti 20 µl deiyonize su eklenerek çözünmüştür.

3.4.3 DNA Ürünlerinin Diziletilmesi ve Analizi

RT-PCR'da çoğaltılmış olan *CLV2* ve *CRC* genlerine ait DNA parçaları BM Laborsis firması (Ankara) aracılığı ile Makrogen (Kore) şirketine hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Sanger yöntemi ile elde edilmiş diziler FinchTV programında değerlendirilmiştir. Alınan dizi bilgisi NCBI'da blast analizine tabi tutulmuş ve dizilerin hedef genlerimize ait olduğu ispatlanmıştır.

3.5 RACE Analizleri

3.5.1 RACE Analizleri İçin cDNA Sentez Reaksiyonu

Hedef genlerin tam uzunluk cDNA dizi analizleri, SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kiti (Clontech Laboratories, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özetle, her biri 10 µl olan cDNA sentez reaksiyonu için 2 µl 5x ilk iplik tamponu, 1 µl DTT 20 mM (ditioetiyol), 1 µl dNTP mix 10 mM eklenerek nazikçe pipetleme yapılmış ve oda koşullarında diğer aşamalar için muhafaza edilmiştir. 2 ayrı steril mikrosantrifüj tüpüne 3' RACE Ready cDNA için 2,75 µl RNA, 1 µl 3'CDS primer A; 5' RACE Ready cDNA için 3,75 µl RNA, 1 µl 5' CDS primer A eklenmiş, mikrosantrifüjde kısaca spin edilmiştir. Tüpler 72°C'de 3 dakika inkübe edilmiş ve 42°C'de 2 dakika soğutma işleminden sonra tüpler 10 sn yüksek hızda spin edilmiştir. İnkübasyon ve

soğutma basamakları thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. 5' RACE ready cDNA tüpüne 1 µl SMARTer IIA oligo eklenerek tüp kısaca vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir. Daha sonra her iki tüpe ilk aşamada hazırlanmış 4 µl master karışımı, 0.25 µl (40 U/MI) RNaz inhibitör, 1 µl (100 U) SMARTScribe™ Revers Transkriptaz eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım önce vortekslenmiş ve kısaca santrifüj edilmiştir. Tüpler termal döngü cihazında 90 dakika 42° C'de inkübe edildikten sonra 10 dakika 70° C'de tutularak reaksiyon sonlandırılmıştır. Ürünlere 100 µl Tricine-EDTA tamponu eklenerek seyreltme işlemi uygulanmış ve cDNA'lar kullanılıncaya dek -86° C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.2 CLV2 ve CRC Genleri İçin Gene Özgü Primer Tasarımı

RACE ve qPCR ifade analizlerini gerçekleştirmek için dejenere primerlerle elde edilmiş olan genlere ait kısmi cDNA dizileri kullanılarak *TtCLV2* ve *TtCRC* için ikiye çift gene özgü primer (F;ileri ve R;geri) tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). RACE analizlerinde *TtCLV2*'nin 5' cDNA ucuna ulaşamadığından ilave 3 adet geri primeri daha sentezlenmiştir.

Çizelge 3.2 T.turcica *CLV2* ve *CRC* genlerinin RACE ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmış olan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	T _m Değeri (Füzyon Taq)	RT-PCR ürün Uzunluğu (bp)
<i>CLV2F1</i>	ACCTAGTTGGTTGTTTCGCGTTTGAAGC		156
<i>CLV2R1</i>	ACCTTTCTTGCTGCAACCAATGGCTC		
<i>CLV2F2</i>	GCCATTGGTTGCAGCAAGAAAGGTTCAA		161
<i>CLV2R2</i>	CAGCTAGGCCAAATAAGCCCCTTGGA		
<i>CLV2R5</i>	GGCAGTGAACCTCCCAAATCAGGGTT		
<i>CLV2R4</i>	ATCCAAGTAGGCAGTGAACCTCCCAA	72 °C	
<i>CLV2R3</i>	GCTGCAAAGCAAGGCAAAGTACCCG		
<i>CRCF1</i>	ACTGCAGCAACCTCTCCTTTCTCAGC		172
<i>CRCR1</i>	TGGAGCTGCTTTAGGGGACACTGACT		
<i>CRCF2</i>	ACCATCGATCACACCCCTCACTCTCCA		171
<i>CRCR2</i>	GTTGTAAGCAGATGGGAGACGGTGCT		

Çizelge 3.3 RACE-PCR, kantitatif RT-PCR analizlerinde kullanılmış primerler

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi
<i>β-ACTIN</i>	TtACTINF*	AGCTCAGCTGTTGAGAAGAGC
	TtACTINR*	ACATCGCACTTCATGATCGAG
RACE evrensel pirmerleri	Uzun UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT
	Kısa UMP	CTAATACGACTCACTATAGGGC

3.5.3 RACE-PCR Kurulumu

RACE için sentezlenmiş cDNA'dan PCR kurulumu Advantage® 2 Polimeraz Enzim Sistemi (Clontech, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisindeki bileşenler kullanılarak kitin öngördüğü protokole uygun reaksiyonlar kurulmuştur. Özetle her bir reaksiyon tüpüne, 34,5 µl PCR-ölçekte su, 5 µl 10x Advantage 2 PCR tamponu, 1 µl dNTP, 5 µl 10x UPM (Universal Primer Karışımı), 1 µl (10 µM) gene özgü primer (Çizelge 3.?) eklenerek kısaca vortekslenmiş ve ardından santrifüj edilmiştir. 5' cDNA parçalarının çoğaltımı için reaksiyon tüpüne 2,5 µl 5' RACE Ready cDNA, 3' cDNA parçalarının çoğaltımı için 3' RACE Ready cDNA, 1 µl 50x Advantage 2 Polimeraz eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR döngüleri BIO-RAD CFX96 termal döngü cihazında 94°C'de 2 dk; 5 döngü 94°C'de 30 sn, 70°C'de 30 sn, 72°C'de 3 dk; 30 döngü 94°C'de 30 sn, 68°C'de 30 sn, 72°C'de 3 dk; 72°C'de 5 dk şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6 *CLV2* ve *CRC* Gen İfadelerinin Belirlenmesi

3.6.1 qPCR için cDNA Sentezi

Gen ifade analizleri için 22 ayrı dokudan izole edilmiş total RNA'lar kullanılmıştır. Dokulardan izole edilmiş total RNA'dan cDNA sentezi RevertAid ilk iplik cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özetle 1 µL Oligo(dT)₁₈ primer (100 mM), 1 µg total RNA, 12 µL'ye kadar su eklenmiş; 5 dakika 65°C'de tutulmuştur. Tüpe 4 µL 5x reaksiyon tamponu, 2 µL 10 mM dNTP karışımı, 1 µL 20U/ µL Ribolock RNase Inhibitor, 1 µL 200U/ µL RevertAid M-MuLV RT

eklenmiş ve reaksiyon karışımı vortekslenmiş sonrasında spin edilmiştir. 60 dakika 42 °C’de inkübe edilmiş cDNA’lar kullanılmaya dek -86°C’de saklanmıştır.

3.6.2 RT-qPCR Kurulumu

qPCR kurulumu için Maxima SYBR Green qPCR Master (Thermo Fisher Scientific, USA) kiti kullanılmıştır. Kit bileşenleri hot start polimeraz, dNTP, SYBR Green I boyası, reaksiyon tamponundan oluşmaktadır. İlgili genlerin dokulardaki ifade analizi BIO-RAD CFX96™ Real Time PCR cihazında Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software bilgisayar paket programı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol grubu geni olarak *T.turcica*’dan daha önce klonlanmış ve dizisi belirlenmiş β -Actin geni kullanılmıştır. β -Actin genine ait primer çifti qPCR analizleri için 164 bp ürün veren *TtActinF* ve *TtActinR* primerleridir. *TtActinF* primer dizisi 5’-AGCTCAGCTGTTGAGAAGAGC-3’ ve *TtActinR* primer dizisi 5’-ACATCGCACTTCATGATCGAG-3’ şeklinde tasarlanmıştır. Reaksiyonlarda kullanılacak *TtCLV2* ve *TtCRC* genlerine ait Çizelge 3.2’de verilmiş olan 161 bp ürün veren *CLV2F2* ve *CLV2R2*, 171 bp ürün veren *CRCF2* ve *CRCR2* primerleri kullanılmıştır. Kullanılan bu primer çiftlerinin dimer oluşturmadığı hem tasarlama aşaması hem deney aşamasında test edilmiştir. Tüm qPCR çalışmalarında her hangi bir kontaminasyon veya primer dimerlerinin oluşmadığını göstermek amacıyla primer çiftleri için en az 1 tane olacak şekilde cDNA eklenmemiş (No Template Controls, NTC) grup çalışılmıştır.

RT-qPCR karışımı reaksiyon başına 9 µL ddH₂O, 12,5 µL Maxima SYBR Green karışımı, 0,75 µL forward ve reverse primerler, 2 µL cDNA bileşenleri ile toplam 25 µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

RT-qPCR döngüleri 95 °C’de 10 dk 1 döngü, 95 °C’de 15 sn- 60 °C’de 30 sn- 72 °C’de 30 sn 35 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Son olarak her qPCR için 95 °C’de 10 dakika tutularak erime sıcaklığı (melting curve) verileri alınmıştır.

3.6.3 Southern Blotlama analizi

Southern Blotlama çalışmaları Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Teknoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin *T. turcica* kaç kopya ile temsil edildiğini belirlemek için Southern Blotlama yöntemi kullanılmıştır. *T. turcica* yaprak dokularından genomik DNA'lar CTAB metodu (Doyle and Doyle 1990) kullanılarak çıkarılmıştır. Bu amaçla, 300 mg yaprak dokusu sıvı azot içinde iyice öğütüldükten sonra temiz bir tüpe transfer edilmiştir. Örneğe 1 mL CTAB tamponu eklendikten sonra özüt 60 °C'de 1 saat bekletilmiştir. 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmesi sonrası steril tüpe aktarılmış süpernatanta eşit hacimde izoamilalkol:kloroform (24:1 v/v) eklenmiştir. Tüpler 5 dakika ters-düz ederek karıştırıldıktan sonra, 20.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüpe aktarılmıştır. Bu aşama en az iki kez tekrarlanmıştır. RNaz uygulaması sonrası izopropanol ile çöktürülecek genomik DNA peleti, %70 etanol ile yıkandıktan sonra oda ortamında kurutulmuş ve TE tamponunda çözülmüştür. Genomik DNA'nın miktar ve kalitesi spektrofotometri ile belirlenmiştir. Ayrıca, genomik DNA kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. Southern Blotlama analizi Sambrook ve ark. (1989)'a göre yapılmıştır. 30 µg genomik DNA restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve DNA parçaları agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Daha sonra naylon bir membrana transfer edilmiştir. Hedef gen parçası cDNA'dan RT-PCR ile çoğaltılmış ve prob olarak kullanılmıştır. Bu amaçla her bir gen için kullanılmış primerler Çizelge 3.4'de verilmiştir. DNA probu 'DIG DNA işaretleme kiti' ile işaretlenmiştir (Roche protokolü uygulanmıştır). Blotlama ile hibridizasyondan sonra, hibridizasyon sinyali kimyasal aydınlatma ile belirlenmiş ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak GL1500) analiz edilmiştir.

3.7 In Situ Hibridizasyon

İlgili genlerin dokulardaki ifade analizleri için in situ hibridizasyon yöntemi kullanılmıştır. Hibridizasyon adımı dahil olmak üzere tüm adımlar RNAaz etkinliğine duyarlıdır. Bu nedenle temiz koşullarda çalışmak çok önemlidir. Tüm solüsyonları RNAaz' dan uzaklaştırmak için DEPC'li su kullanılmış ve cam malzemeler 180°C'de

en az 3 saat fırınlama ile steril edilmiştir. Kullanılacak plastik kaplar 30 dakika boyunca 0,2 N NaOH ile muamele yoluyla temizlenmiştir.

3.7.1 Örnek Sabitleme ve Doku Gömme

Mevsiminde hasat edilmiş ve çalışma prensibine uygun şekilde boyutlarına göre gruplandırılmış dokular, taze hazırlanmış ve soğuk %4'lük paraformaldehit (PFA) fiksatifine alınmıştır. Örnekler buz üzerinde vakum uygulaması yapılarak sabitleme işleminin en iyi şekilde gerçekleşmesi sağlanmış ve 4°C'de kullanılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir.

Doku gömme işlemi susuzlaştırma, yıkama ve son olarak parafine bloklar oluşturma esasına dayanır. Örnekler 30'ar dakika iki tekrarlı soğuk 1xPBS içinde yıkanır. Daha sonra belirli konsantrasyonlarda, belirli sürelerde etanol serilerinden geçirilerek susuzlaştırma işlemi yapılmıştır. İçerisinde eozin buluna saf etanol içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Eozin hücre duvarlarını boyadığından, gömme ve kesit alma sırasında numunelerin görünür olmasını sağlar. Ertesi gün dokuları etanolden arındırmak için histoclear (HC) serilerinden geçirilmiştir. Gün sonu HC içerisine bir miktar parafin eklenerek dokular parafine doyurma işlemi başlatılmış, HC parafin değiştirme işlemi birkaç gün devam etmiştir. Kalıbın içerisine kesit alınacak şekle uygun yerleştirilen doku üzerine sıvı hale getirilmiş parafin dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Elde edilen parafin bloklar 4°C'de kullanılacağı zamana kadar saklanmıştır.

3.7.2 Prob Hazırlama

3.7.2.1 Klonlama

Klonlama çalışmalarında DH5 α ve TOP10 E. coli suşları kullanılmıştır. Top10 ve DH5 α birbirlerine çok yakın genotiplerdir. Kimyasal veya elektro yöntemler ile transformasyona hazırlanabilirler. Her iki E. coli hücre hattı gliserol stoklarda -86 °C'de saklanmış olmakla birlikte, klonlama çalışmalarımızda DH5 α E.coli suşu kullanılmıştır.

Luria-Bertani (LB) besini E.coli kültürleri ile yapılan çalışmalarda en çok kullanılan besin çözeltilisidir. LB kazein enziminin kimyasal sindirim ürünü olan pepton, maya özütü ve sodyum klorür tuzu içermektedir. Katılma 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 besini 4 °C’de 1 ay, antibiyotikli LB besinler ise 15 gün saklanabilir.

Başlangıç kültürü olarak çalışmanın durumuna göre antibiyotik içeren veya içermeyen 5 mL LB besini bulunduran 50 mL falkon tüp içerisine LB agar üzerindeki “izole” bir koloni 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 bekletilmiştir.

3.7.2.2 Gliserol Stok Hazırlama

Klonlama yapılacak DH5α E.coli hücreleri gliserol stok hazırlanarak -86 °C’de muhafaza edilmiştir. İşlem basamakları sırayla şöyledir: bir gece önceden başlangıç kültür hazırlanmıştır. Eşit hacimde gliserol ve distile su (v/v) çözeltilisini hazırladıktan sonra otoklavlama ile steril edilmiştir. Kriyo 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 başlama kültürü karıştırılmıştır. Tüpler nazikçe karıştırıldıktan sonra sıvı azotta ön dondurma işlemini yapmadan -86 °C’de saklanmıştır.

Gliserol kültür stoktan katı besiyerine ekim işlemi yapılmıştır. 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 bekletilmiştir.

Kimyasal yöntemle kullanılacak olan E. Coli hücreleri klonlamaya yetenekli hale getirilmiştir. Gliserol stoktan kazılmış olan E. coli hücreleri LB agar katı besi yerlerine

tek koloni düşürecek şekilde aktarılmıştır. Petriler gece boyunca 37 °C’de bekletilmiştir. Petri kaplarından seçilen tek koloniler 5 mL LB ve 5 mL LB + 50 µL / mL amfisilin içeren 50 mL falkon tüplere kürdan aktırılarak başlama kültürü başlatılmıştır. Başlama kültürü, 16-20 saat 37°C’de 260 rpm/dk çalkalamalı etüvde çalkalanmıştır. İnkübasyon sonunda amfisilinli tüplerde hücre çoğalmamış olduğuna dikkat edilmiştir. Yetenekli E. coli hücresi hazırlamak için 100 ml LB sıvı besinine hücre ile başlama kültürden 1 mL (1:100 oranında seyreltme) steril koşullarda aktarılmıştır. Kültür, 37 °C’de 250 rpm’de OD600nm 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 soğulmuştur. Tüpler, önceden soğutulmuş masa üstü santrifüj cihazında 4 °C’de 4000 rpm’de 10 dakika döndürülerek hücreler çöktürülmüş ve sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre tortusu buz soğuğu 0.1 M MgCl₂ ile nazikçe karıştırılmıştır ve daha sonra en az 20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Tüpler, önceden soğutulmuş santrifüjde 4 °C’de 4000 rpm’de 10 dakika çevrilerek hücreler çöktürüldükten sonra sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. 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 bekletilmiştir. Tüpler, aynı koşullarında tekrar çevrilmiş ve süpernatant yeniden uzaklaştırılmıştır. Son adımda, bakteri çökeltileri soğuk %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözülmüştür. Buz üzerinde 20 dakika daha bekletilmiştir. Daha sonra 50 µL alikotlara bölünerek sıvı azotla muamele edilerek dondurulmuştur. Yetenekli hücreler ya hemen kullanılmış ya da 6 aya kadar -86 °C’de ultra derin dondurucuda saklanmıştır.

Klonlanacak DNA parçaları pJET1.2/küt klonlama vektörüne (Şekil 3.2) yüklenmiştir. Bu amaçla CloneJet klonlama kiti (ThermoScientific) 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 mL olacak şekilde PCR ölçekte dsH₂O karıştırılmıştır. Kısaca tüp karıştırma cihazında karıştırıldıktan sonra reaksiyon karışımı 10 dk 22°C’de bekletilmiştir edilmiştir. Ligasyon karışımı transformasyon için doğrudan kullanılmış veya kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

-86°C'de saklanan yetenekli E. coli hücreleri içeren tüpler ligasyon ürünün transformasyonunda kullanılmıştır. Yetenekli bakteri hücreleri buz üzerinde bekletilerek eritilmiştir. 10 µL ligasyon ürünü 50 mL yetenekli E. coli hücrelerine eklenmiştir. Parmak darbeleri vurarak nazikçe karıştırıldıktan sonra transformasyon tüpleri, buz üzerinde en az 30 dakika bekletilmiştir. 42 °C'de 30 sn ısı şoku uygulaması yapıldıktan sonra tüpler hızlıca buz üzerine alınmış ve içeriğe 500 µL sıvı LB besin çözeltisi ilave edilmiştir. Transformasyon tüpleri 37 °C'de 1 saat boyunca 220 rpm çalkalama ile bekletilmiştir. Daha sonra, steril koşullar altında her bir transformasyon tüpünden 100 ml sıvı amfisilin içeren LB katı besi yerlerine cam yayıcı ile iyice yayılmıştır. Amfisilin içeren petri kapları 37°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. 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.

3.7.2.3 İn Vitro Transkripsiyon

Plazmit restriksiyon enzimleri ile yaklaşık olarak 5 µg DNA sindirerek doğrusallaştırılmıştır. Reaksiyonun tamamlandığını doğrulamak için jel elektroforezi yapılmıştır. İn vitro transkripsiyon karışımı, 1 µl saflaştırılmış DNA (1µg/µl), 2 µl 10x transkripsiyon tamponu, 2 µl 10x DIG RNA labeling karışımı, 1 µl RNAaz out, 20 µl'ye kadar H₂O, hazırlanmıştır. 1-2 saat boyunca 37°C'de inkübe edilerek jel üzerinde görüntülenmiştir. Hazırlanan prob içerisine 1 µl tRNA (100 mg/ml), 1/10 hacimli 3M NaAc pH 5.2, 2.5 hacimli soğuk %100 etanol ekleyerek saflaştırılmış, -80 C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. RNA yüksek hızda 20 dakika 4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım uzaklaştırılarak pellet etanol ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj edilmiş sıvı kısım uzaklaştırılarak RNA pelleti µl %50 deiyonize formamid içinde çözdürülmüştür.

3.7.2.4 Dot Blot Analizi ve Kesit Alma

Prob konsantrasyonu ve DIG-UTP birleşmesi dot blot analizi ile değerlendirilmiştir. Etiketlenmiş DIG-UTP RNA probu içeren in vitro transkripsiyon kiti kullanılmıştır (Roche). 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 Mm NaCl ile 1xTBS tamponu hazırlanmıştır.

Membran üzerine seri seyreltme ile hazırlanan RNA probları sabitlenmiştir. Çalkalama platformu üzerinde içerisinde TBS ile membran dengeye getirilmiş, bloklama tamponu ile muamele edilmiş, TBS içerisinde yıkama işlemi yapılmış, 10 ml 1xTBS içinde seyreltilmiş 1µl anti-diyoksijen ile 45 dakika inkübasyon yapılmıştır. TBS içerisinde yıkama işlemi tekrarlanmış ardından 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 Mm NaCl ile hazırlanmış TN tamponu içerisinde tutulmuştur. 1xTN tamponu içinde NBT/BCIP 1/50 (v/v) inkübe edilmiş böylece membran boyaması ardından yıkama işlemi ve UV altında görüntülemesi yapılmıştır.

4°C’de tutulan parafin bloklar oda ısısına gelmesi için bekletilmiş ve kesitlerin en iyi şekilde alınması sağlanmıştır. Blok mikrotoma yerleştirilerek 8 – 10 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler işaretli lamalar üzerine yerleştirilerek 1 mL H₂O ile dağıtılmış ve ısıtma işlemi ile dokular sabitlenmiştir. Bu şekilde 4°C’de bir süre daha saklanabilir.

3.7.3 İn Situ Hibridizasyon

3.7.3.1 Ön İşlem

10 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA ile hazırlanan proteaz tamponu 37° C’ye kadar ısıtılmıştır. Doku kesitleri HC ve EtOH serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidrate edilmiştir. PBS içerisinde inkübasyon işlemi yapılmış ardından inkübasyon işlemine 250 mL proteaz tamponu ile devam edilmiştir. 1xPBS içinde % 0.2 glisin ile proteaz aktivitesi ile nötralizasyon işlemi ardından 1xPBS ile durulama yapılmıştır. Slaytalara % 4 PFA çözelti muamelesi ile RNA’nın proteazdan hasar görmemesi için re-fixasyon işlemi yapılmıştır. Durulama işlemi tekrarlanarak alkol serilerinden geçirme işlemi ile hibridizasyon öncesi işlemler tamamlanmıştır.

3.7.3.2 Hibridizasyon

Hibridizasyon tamponu 10 ml için, falkon tüp içine 1.25 ml in situ hibridizasyon tuzu (3M NaCl, 100 Mm Tris-HCl pH 8.0, 100 Mm Na fosfat pH 6.8, 50 Mm EDTA), 5 ml deiyonize formamid, 2.5 ml % 50’lik dekstran sülfat, 250 µl 50x denhard, 125 µl 100 mg/ml tRNA ve 875 µl H₂O ile hazırlanmıştır. Her kesit için, 1 µl prob ile 9 µ mili Q

H₂O ve 10 µl deiyonize formamid ile her gen için farklı poblemler hazırlanarak 2-3 dakika 85 °C'ye ısıtılmıştır. Kesitler temiz bir yüzeye alınarak 5-10 dakika tamamen havada kurutulmuştur. Prob/hibridizasyon tamponu pipetlenerek kesitin doğru kısmına bırakılmış istenilen hibridizasyon sıcaklığında inkübe edilmiştir (16-20 saat, 50-55 °C). Bir sonraki sabah kullanmak için; 1 L 0.2 xSSC hazırlayın ve 55 °C'de saklanmış buna ek olarak 1 litre NTE tamponu (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0) hazırlayın ve 37 °C'de saklanmıştır

3.7.3.3 Son İşlem

Lameller kesitlere zarar vermeden kaldırılır. Kesitler raka yerleştirilerek 1 saat boyunca 0.2x SSC ile durulanmıştır. 500 ml yıkama tamponu (% 1 BSA, % 0.3 TBS tamponu içinde triton) ve 100 ml blok çözeltisi (TBS içinde % 0.5'lik bloklama ayracı) hazırlanmıştır. TBS içine bloklama tozu karıştırılarak ve yavaş yavaş 70 °C'ye ısıtılmış daha sonra çözülmesi için oda sıcaklığına kadar soğumasını sağlanmıştır. 1x NTE çözeltisinde 2 dakika boyunca kesitlerin dengeye gelmesini beklenerek inkübe edilmiştir. Kesitlere 1 xNTE tamponuna aktarılıp 20 µg/ml RNAaz A eklenerek hem tek sarmallı RNA'daki hem de RNA dubleksindeki uyumsuzlukların parçalanması amaçlanmıştır. Kesitleri 1x NTE ile durulama, 0.2x SSC ile yıkama, 1x PBS içinde bekletme, 45 dk yıkama tamponu ile çalkalamalı bir platformda yıkama işlemleri sırayla yapılmıştır. Antikor inkübasyonu, yıkama tamponu (1:5 v/v) içinde anti-dioksigen antikorunu seyreltilerek her kesite minimal volümde uygulanmış ve antikor çözeltisinin minimal hacimde kesiti kaplaması sağlanmıştır. Kesitler karanlık bir ortamda 2-3 saat oda sıcaklığında 4 °C'de inkübe edilmiştir. Yıkama kurutma işlemleri sırasıyla yapılarak boyama işlemine başlanmıştır. Boyama tamponu 20 µl NBT/BCIP başına 1 ml TN tamponu eklenerek hazırlanmıştır. Kesitler birbirine bakacak şekilde sandviç haline getirilmiş boyama solüsyonuna daldırılarak kılcal etki ile lamaların çekmesi sağlanmıştır. Karanlık ortamda inkübasyona bırakılan kesitlere boyama işlemi belli aralıklarla devam edilmiştir.

3.7.4 Montaj

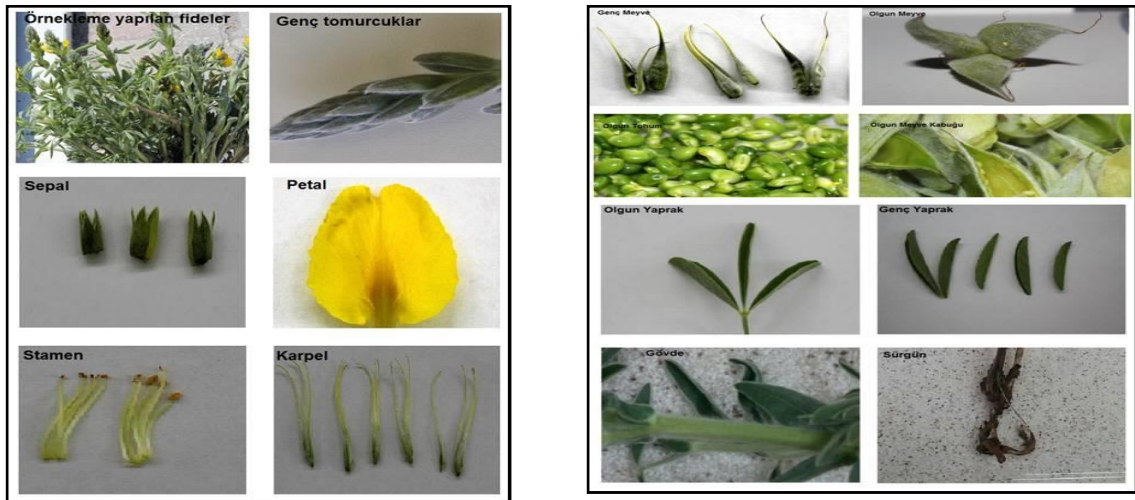
Kesitleri mili Q H₂O'da yıkanmış ve etanol serisinden geçirerek dehidrate edilmiştir. Her kesitin üstüne 1-2 damla tolüen bazlı ayraç damlatılarak kesit üzerine lamel yerleştirilmiş mikroskopta analiz etmeden önce sertleşmesi için bekletilmiştir. Böylece örnekler yıllarca saklanabilir. Mikroskop altında görüntüleme yapılarak veriler saklanmıştır.

4. BULGULAR

Bu araştırmada, Türkiye Afyonkarahisar ili endemiği *Thermopsis turcica*'dan iki farklı transkripsiyon geni izolasyonu gerçekleştirilmiştir: sürgün meristemi geni *CLAVATA2* (*TtCLV2*) ve karpel oluşumunda görev alan *CRABS CLAW* (*TtCRC*) geni. Araştırma kapsamında, her iki genin tam uzunluk cDNA nükleotid dizilerine RACE analizleri ile ulaşılmıştır. Her iki genin 18 farklı *T. turcica* dokusundaki transkriptlerinin seviyesi RT-qPCR analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, In situ tekniği kullanılarak her iki genin farklı ebatlardaki iek tomurcuk dokularında ifade analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1 Bitki Materyali

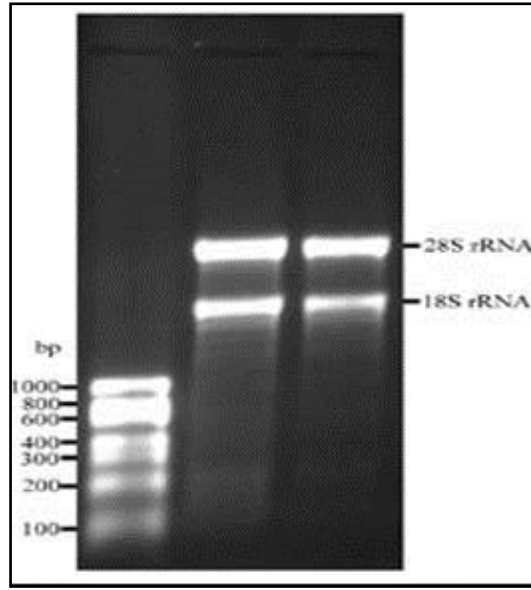
T. turcica'nın doğal yayılış alanı Türkiye Afyonkarahisar ilinden örneklenen kullanılmış bazı dokular şekil 4.1'de gösterilmiştir. Genç tomurcuklardan izole edilmiş mRNA'lar kısmi ve tam uzunluk cDNA dizilemelerde kullanılmıştır. Kantitatif RT-PCR analizlerinde 18 farklı doku kullanılmıştır. Bunlar; vejetatif (gövde, sürgün, genç yaprak ve olgun yaprak), üreme (iek tomurcuğu, tozlaşma öncesi ve sonrası sepal, petal, stamen ve karpel) ve meyve (genç meyve, genç meyve tohumu, genç meyve kabuğu, olgun meyve tohumu ve olgun meyve kabuğu) dokularıdır.



şekil 4.1 Analizlerde kullanılmış *T. turcica* dokuları. (Tozlaşma ncesi sepal, petal stamen ve karpel dokuları gösterilmemiştir).

4.2 Bitki Materyalinden Toplam RNA İzolasyonu

Kısmi ve tam uzunluk cDNA'ların belirlenmesinde tomurcuk toplam RNA'ları, kantitatif RT-PCR analizlerinde 18 farklı dokudan izole edilmiş toplam RNA'lar kullanılmıştır. İzole edilmiş toplam RNA'lardaki muhtemel DNA kirlilikleri DNaz I uygulaması ile temizlendikten sonra RNA miktar tayinleri Qubit assay ile yapılmıştır. RNA kalitesi ise RNA formaldehit agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *T. turcica* çiçek tomurcuk total RNA'sı. 2 µg (orta hat) ve 1 µg (sağ hat) toplam RNA. İlk hat markör RNA

4.3 Tam Uzunluk cDNA Analizleri

Tam uzunluk cDNA belirleme çalışmalarında tomurcuk dokusundan izole edilmiş total RNA'lar kullanılmıştır. Kısmi cDNA belirlemede normal revers transkripsiyon ile elde edilmiş ilk iplik cDNA'lar kullanılmıştır. cDNA'ların her iki ucunun belirlenmesi için tomurcuk total RNA'lardan elde edilmiş RACE-ready cDNA'lar kullanılmıştır.

4.3.1 *TtCLV2* ve *TtCRC* Kısmi cDNA Dizilerinin Belirlenmesi

Tomurcuk cDNA kalıbından *TtCLV2* ve *TtCRC* için hazırlanmış olan dejenere primerler ile PCR'da çoğalmış DNA parçaları Şekil 4.1'de gösterilmiştir. *TtCLV2* için hedeflenen 762 bp, *TtCRC* için yaklaşık 400 bp ebatlarındaki PCR ürünleri başarılı bir şekilde ve

tek bant olacak şekilde elde edilmiştir. PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra dizileme işlemi yapılmış için hizmet alınan firmaya gönderilmiştir. Her iki gene ait kısmi nükleotid ve protein dizileri aşağıda verilmiştir. Kısmi *TiCLV2* protein dizisinin Leüsin zengin tekrar reseptör benzeri bir protein olduğu ve diğer legüm bitkileri için daha önceden gen bankasına teslim edilmiş *CLAVATA2*-benzeri gen olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2D). Diğer taraftan, kısmi *TiCRC* protein dizisinin YABBY TF gen ailesine ait bir protein olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Bu analizler sonrası gene özgü primerler tasarlanmıştır. Her iki gen için olan primer yapışma bölgeleri nükleotid dizilerinde gösterilmiştir.

>*T. turcica* Leucine-rich repeat receptor-like protein, *CLAVATA2* 762 nt, partial
ACTTACCTCCATGTCATTGCTCTCGCTCACAACCTCTCTGTTTCGGTACCATTCC
GTTGAGTATTGTGGGCTGCGTTCATCTGCTTGTCTAATACTTAAAATGAAC
AATCTTTCCGGTGTCAATCAACCGGAGTTCGATGCATTGGATAGCTTGAAGA
TCATGGATATAAGCAACAACAGGTTTTCTGGGGTTATCCCCTCACTTTAGC
TGGATGTAAATCTCTTGAGATTGTACACTTTAATTCCAATGATCTTTCTGGTT
CCTTGAATGAAGCGATAACAAAATGGACAAACCTCAGGTATCTTTCTCTAG
CTCATAACAAGTTCAGTGGAACCTTACCTAGTTGGTTGTTTCGCGTTTGAAGC
AATAGAAATGATGGATTTCTCACACAATAAATTTTCTGGCTTCATACCTGAT
ATTAATTTTAAGGGTAGCTTATTATTTAACACAAGAGATGTGACTGTTAAAG
AGCCATTGGTTGCAGCAAGAAAGGTTCAGTAAGAGTTTCAGTGGTTGTTTC
TGATAGCAATCAATCCAGTTTCACTTATGATCTCTCGTCAATGGTTCGGAATC
GATCTATCCAACAACCTTTCTTCATGGGGAAATTCCAAGGGGCTTATTTGGC
CTAGCTGGACTAGAAATATCTGAATTTGTCATGCAACTTTCTTGATGGACAG
GTTCCAGGTTTGCAGAAAATGCACGGTTTGAGAGCCTTATATTTGTCACACA
ATTCGTTGTCGGGACATATCCCAGGAAAACATCTC

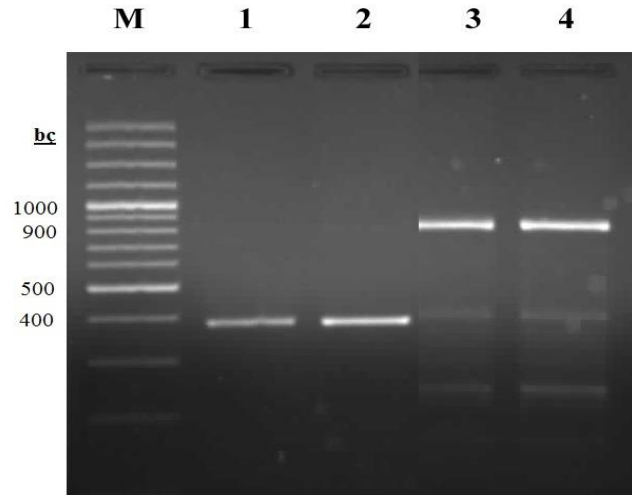
>*T. turcica* Leucine-rich repeat receptor-like protein, *CLAVATA2* 254 aa, partial
TYLHVIALAHNSLFGTIPLSIVGCVHLLALILKMNNLSGVIQPEFDALDSLKIMDI
SNNRFSGVIPLTLAGCKSLEIVHFNSNDLSGSLNEAITKWTNLRYS LAHNKFSG
TLPSWLF AFEAIEMMDFSHNKFSGFIPDINFKGSLLFNTRDVTVKEPLVAARKV
QVRVSVVVSDSNQSSFTYDLSSMVGIDLSNNFLHGEIPRGLFGLAGLEYLNLSC
NFLDGQVPGLQKMHLRALYLSHNSLSGHIPGKHL

>*T. turcica* *CRABS CLAW* mRNA, partial cds, 366 nt

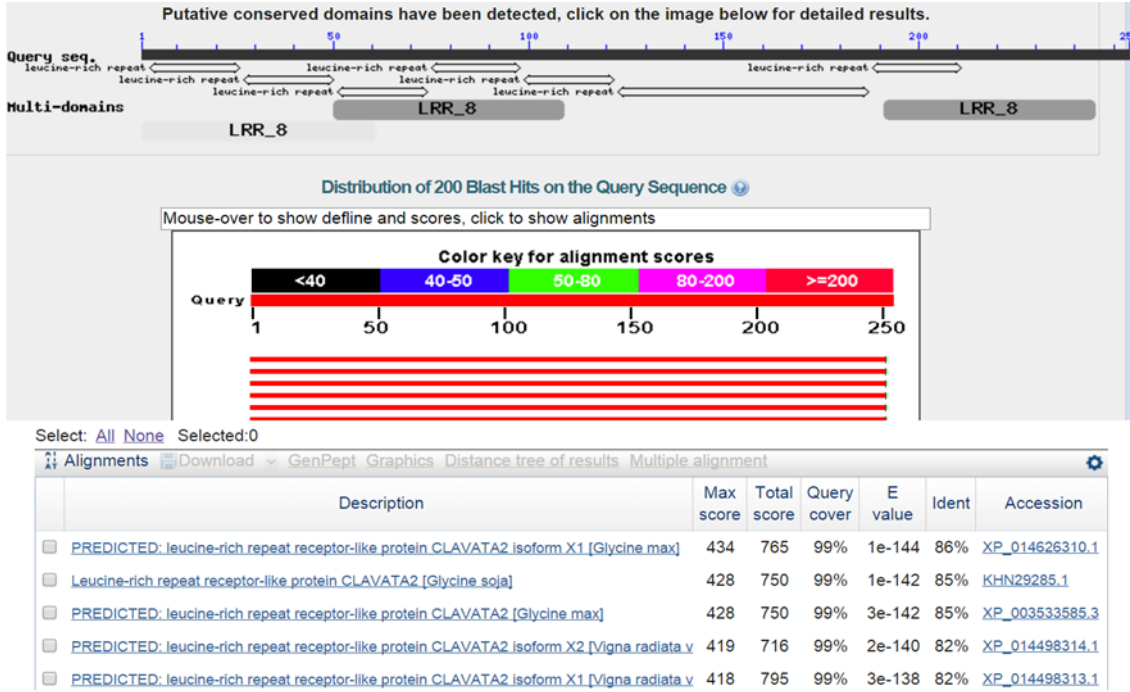
AACACTGTGCTTGCGGTTGGGATCCCATGCAAGAGGCTGTTAGATACTGTA
ACAGTGAAGTGTGGTCACTGCAGCAACCTCTCCTTTCTCAGCATAAAAACCC
ATAATTCTCAAAATCAAACCATCGATCACACCCTCACTCTCCAGGGGTTTTA
TGGTGATTCCAAAAAGGGTCAAGCATCATCTTCATCTTCCTCACCAACTACA
TCTAACGAGTCAGTGTCCCCTAAAGCAGCTCCATTTGTTGTCAAACCACCTG
AGAAGAAGCACCGTCTCCCATCTGCTTACAACCGTTTCATGAAAGAGGAG
ATACAGCGCATCAAAGCAGCCAACCCTGAGATCCCACATCGAGAAGCTTTC
AGCGCA

>*T. turcica* *CRABS CLAW* protein, partial, 122 a.a.

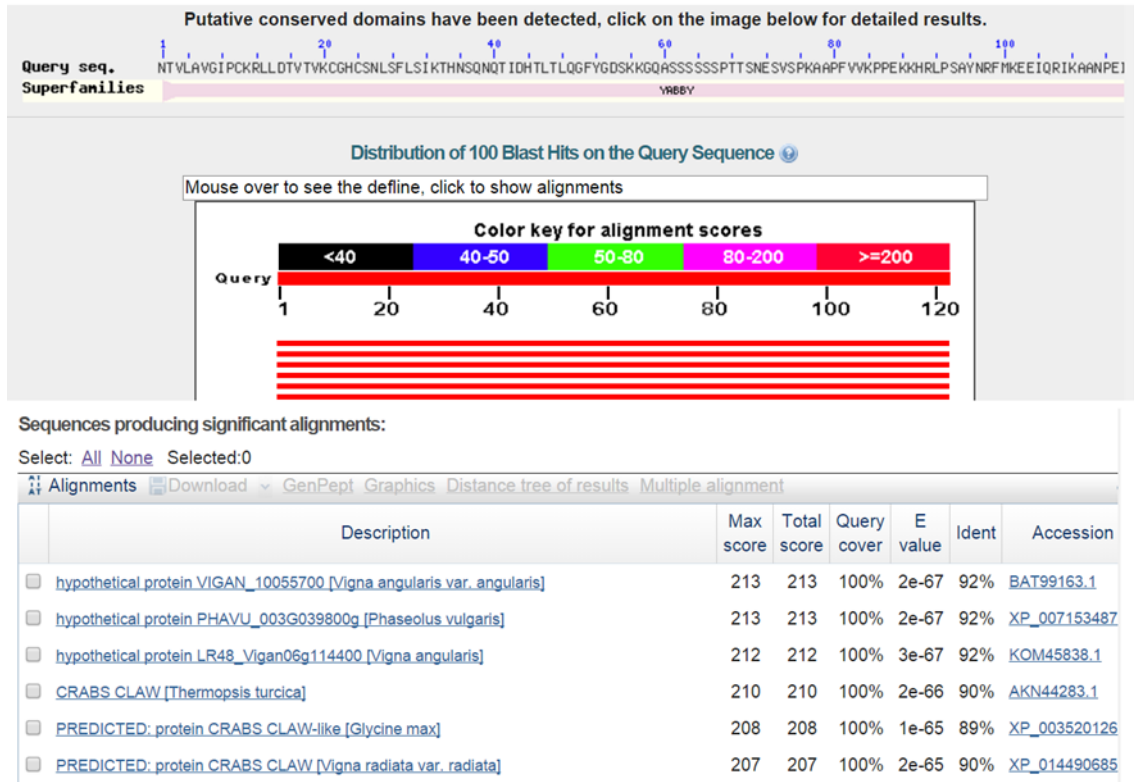
NTVLAVGIPCKRLLDVTVKCGHCSNLSFLSIKTHNSQNQTIDHTLTLQGFYGD
SKKGQASSSSSPTTSNESVSPKAAPFVVKPPEKKHRLPSAYNRFMKEEIQRIKA
ANPEIPHREAFSA



Şekil 4.3 Tomurcuk cDNA özütünden RT-PCR ile üretilmiş 762 nt ebatlı *TiCLV2* (3. ve 4. hatlar) ve 366 nt ebatlı *TiCRC* (1. ve 2. hatlar) fragmanları. (M: markör).



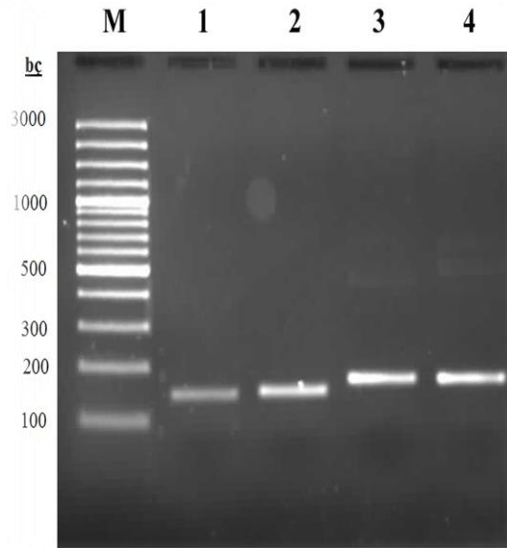
Şekil 4.4 Kısmi *TtCLV2* protein dizisinin BLAST analizi



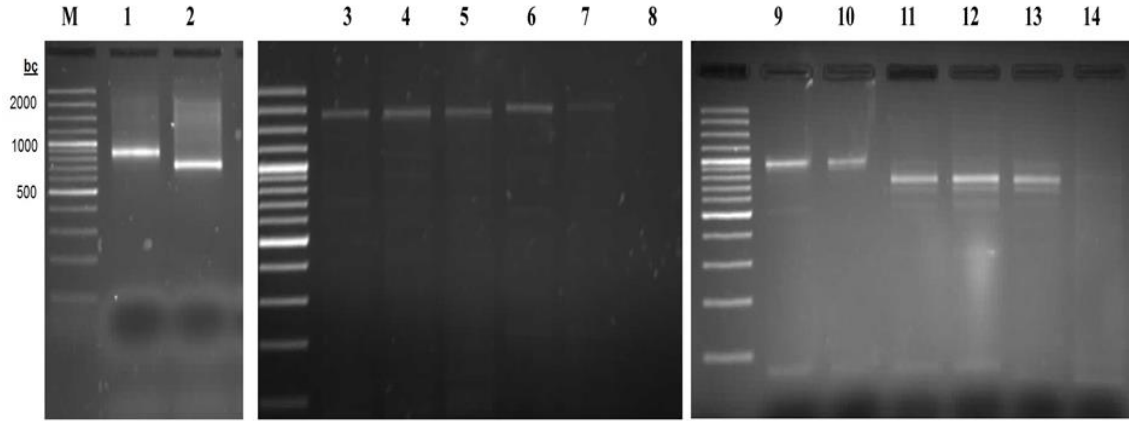
Şekil 4.5 Kısmi *TtCRC* protein dizisinin BLAST analizi

4.3.2 Tam uzunluk cDNA analizleri

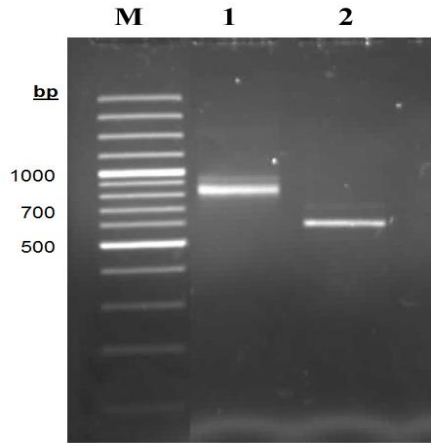
Tam uzunluk cDNA belirlemede RACE analizi kullanılmıştır. Her iki gen için gene özgü primerlerin cDNA kalıbında tek bant üretip üretmediği kontrol edilmiştir. Şekil 4.4'de 156 bç ebatlı *TtCLV2* ve 170 bç ebatlı *TtCRC* RT-PCR ürünü alınmıştır. Bu primerler RACE analizlerinde evrensel primer ile birlikte kullanılmıştır. *TtCLV2* geni oldukça uzun nükleotid dizisine sahip olduğundan tek aşamada tam cDNA dizisine ulaşılamıştır. Bu nedenle, *TtCLV2F1/2*, *TtCLV2R1-R5* olmak üzere toplamda 7 farklı gene özgü primer kullanılmıştır (Şekil 4.5). *TtCRC* 3'- ve 5'-RACE analizlerinde çoğalmış olan RACE-PCR ürünleri ise Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 RACE ve qPCR analizlerinde kullanılmış olan *TtCLV2* (hat 1 ve 2) ve *TtCRC* (Hat 3 ve 4) genleri için tasarlanmış olan primerlerin test edilmesi. RT-PCR'da kullanılmış olan primerler: Hat 1; *TtCLV2F1/R1* (...bç), Hat 2; *TtCLV2F2/R2* (...bç), Hat 3; *TtCRCF1/R1* (...bç) ve Hat 4; *TtCRCF2/R2* (...bç)



Şekil 4.7 *TiCLV2* geni için 3'- ve 5'-RACE ürünleri. RACE-PCR'da kullanılmış olan primerler: Hat 1; *TiCLVF1*, Hat 2; *TiCLVF2*, Hat 3-5; *TiCLVR1*, Hat 6-8; *TiCLVR2*, Hat 9-10; *TiCLVR3*, Hat 11-12; *TiCLVR4* ve Hat 13-14; *TiCLVR5*



Şekil 4.8 *TiCRC* geni için 3'- (1. hat, 830 bç) ve 5'- (2. hat, 600 bç) RACE-PCR ürünleri.

4.4 *TiCLV2* Genine Ait Nükleotid Ve Protein Dizi Analizleri

>*T. turcica* *CLAVATA2* benzeri ,mRNA, CDS 2557 nt, 63nt 5'UTR, ORF 2151nt, 181 3'UTR

GAGGAGCCACTAAGTGAGGAACCAAAGAGTCACTCAAAGAACAAGGTACG
TAGTGCCCTATGTATGTTGTTCCACCTTCTCTTCTTCTGTCTTTGTTTTGTG
TTACTCACTGTATTTTTTTCTTAAAATCTTCAAATCTTGCCCCAAGTTCATC
TTTTGCATCTTCTGCACCTTAAAATCTTCTTTCCCTTCTTCAAATTCACC
TTACTCTCATAGTCA**ATG**GGACACACCTCATCACTCATACTCCTCTTTCT
GATTCTTCTATCTTCAAACCCTTCACTCACTTGATATTCACCCACAAGAC
AAAATTCACCTTTTGCTCTTCAAATCATGGCTTCAAGACCCTAATCAAAGCT

TATCCA ACTGGGTAGGGTCTAACTGCACTACCTGGAATGGAATCACATGTG
ACAACATCACTGGAAGGGTGGTTTCAATCAACCTGATAAATATGAATTTGTC
TGGCCAAATCAACCCAGTTTCTGTAACCTTTCATATCTTAACAAATTGGGG
TTGTCCACAACA ACTTCACATGCCCTATTCCATTGTGTTTTGGAAATTTGCT
TAATCTCAGAACAATTGATCTCAGCCCCAACAGGTTTCATGGTAGAATACCA
GATTCTTTCATGAGACTTAAGTACCTTACTGAGCTTGTTTTGAATGAGAACC
CTGATTTGGGAGGTTCACTGCCTAGTTGGATAGGTAATTTCTCTACAAATCT
GGAAAGGGTGCATCTTGGTTTCAGTTCTTTTATTGGGGGTATTCTTGAGAGC
TTGATTTATTTGAAGTCCCTCAAGTATTTGGACCTTGAAAGCAATTTCTTGTC
TGGTAATTTAGTTGATTTTCAGCAGTCTTTGGTTTTAATCAACCTTGCTTCGA
ATCGGTTTTCGGGTACTTTGCCTTGCTTTGCAGCTTCAGCTCAGTCACTAAAT
GTGTTAAATCTGTCTTACAATTCTATTGTGGGGGGACTACCTGCTTGTATTG
GATCCTTCAAGCTTTGACTCATCTGAACCTATCAGGGAACCACTTGAAGTA
TAGGATATCTCCAAGACTTGTGTTTTCGGAGAAGCTTCTTGTTTTGGACTTG
AGTAATAATGATTTCTCTGGTCCTATTCCAAGTAAAATTGCAGAGACAACGG
AGAAATTGGGACTTGTCTTCTTGACCTTTCTCACAATCAATTCTCTGGTGA
AATCCCTTGAAAATTACAGAATTGAAAAGCTTGCAGGCTTTGTTCCTTTCT
CACAATCTTCTGTCTGGAGAAATTCCTGCTAGAATTGGAAACCTGACTTACC
TCCAAGTCATTGATCTCTCTCACA ACTCTTTGTCCGGTACGATTCGGTTGAAC
ATTGTTGGGTGCTTTCAGCTGCTTGCTCTAATACTTAATAACAACAATCTTTC
CGGTGTCATTCAACCGGAGTTCGATGCATTGGATAGCTTGAAGATCATGGAT
ATAAGCAACAACAGGTTTTCTGGGGTTATCCCACTCACTTTAGCTGGATGTA
AATCTCTTGAGATTGTACACTTTAATTCCAATGATCTTTCTGGTTCCTTGAAT
GAAGCGATAACAAAATGGACAAACCTCAGGTATCTTTCTCTAGCTCATAAC
AAGTTCAGTGGAACCTTACCTAGTTGGTTGTTTCGCGTTTGAAGCAATAGAAA
TGATGGATTTCTCACACAATAAATTTTCTGGCTTCATACCTGATATTAATTTT
AAGGGTAGCTTATTATTTAACACAAGAGATGTGACTGTAAAGAGCCATTG
GTTGCAGCAAGAAAGGTTCAAGTAAGAGTTTCAGTGGTTGTTTTCTGATAGC
AATCAATCCAGTTTCACTTATGATCTCTCGTCAATGGTCGGAATCGATCTAT
CCAACA ACTTTTCTCATGGGGAAATTCCAAGGGGCTTATTTGGCCTAGCTGG
ACTAGAATATCTGAATTTGTCATGCAACTTTCTTGATGGACAGGTTCCAGGT
TTGCAGAAAATGCACGGTTTGAGAGCCTTAGATTTGTCACACAATTCGTTGT
CGGGTCATATTCCAGGAAACATTACTAGCCTTCAAGATCTGAGCCTTTTGAA

TTTGTCTTACAACACTGTTTTTCTGGATATGTTCCCCAGAAGCAGGGTTATGGG
AGATTCCTGGTGCATTTGCTGGGAATCCAAATTTATGCTTGGAATTTTCCA
GTGGAAGATGTGATGGTGGAAAGGGTCCATCACTGCAAGGAAGTTCTTTTG
GGGAAGATAAAAATGGATGGACCAATATCTGTAGGGATTTTCTTTATCAGTG
CGTTTATTAGTTTTGATTTTGGTGTATTGTTCTCTTCTGTTCTGCTCGAGCGC
GAAATTACATTCTGCAGACAAAAGTTTGAATTCAATGTTTGTGACAATGACAA
ACTTTCACCTGTAAATTCATTTTGCAACTTGGTAGCTCTCTTCTCATTTC
GTGAACTAACTCATTCTGTGACTGGGAATACCTTCTAGTCATCAAACCTTCC
TAACTAGTCCTCTAAACTCCTCACGGGTTGAACCAGTCGTCGAAAAAATG
AC

> *T. turcica* CLAVATA2 Protein [*Thermopsis turcica*], Sinyal peptidi; 716 aa.
LRRNT_2-domain (N-ucu Lösence zengin bölge) ve LRR-8-domain. Aynı zamanda
LRR-RI (lösence zengin reseptör RNaz inhibitör benzer bölge de var, ancak iç içe
geçtiğinden hepsi gösterilemedi)

MGHTSSPLILLFLILLSSNP SHSLDIHPQDKTSLLLFKSWLQDPNQSLSNWVGSN
CTTWNGITCDNITGRVVSINLINMNL SGQINPSFCNLSYLNKLG LSHNNFT CPIPL
CFGNLLNLR TIDLSPNRFHGRIPDSFMRLKY TELVLNENPDLGGSLPSWIGNFS
TNLERVHLGFSSFIGGILESLIYLKSLKYLDLESNFLSGNLVDFQQSLVLINLASN
RFSGTLPCFAASAQSLNVLNLSYNSIVGGLPACIGSFQAL THLNLSGNHLKYRIS
PRLVFSEKLLVLDLSNND FSGPIPSKIAETTEKLGLVLLDLSHNQFSGEIPLKITE
KSLQALFLSHNLLS GEIPARIGNLTYLQVIDLSHNSLSGTIPLNIVGCFQLLALILN
NNNLSGV IQPEFDALDSLKIMDISNNRFSGVIPLTAGCKSLEIVHFNSNDLSGSL
NEAITKWTNLR YLSLAHNKFSGTLPSWLF AFEAIEMMDFSHNKFSGFIPDINFKG
SLLFNTRDVTVKEPLVAARKVQVRVSVVSDSNQSSFTYDLSSMVGIDLSNNFL
HGEIPRGLFGLAGLEYLNLS CNFLDGQVPGLQKMHGLRALDLSHNSLSGHIPGN
ITSLQDLSLLNLSYNCFSGYVPQKQGYGRFPGAFAGNP NLCLEFSSGRCDGGRV
PSLQGS SFGEDKMDGPISVGIFFISAFISDFGVIVLFC SARARNYILQTKV *

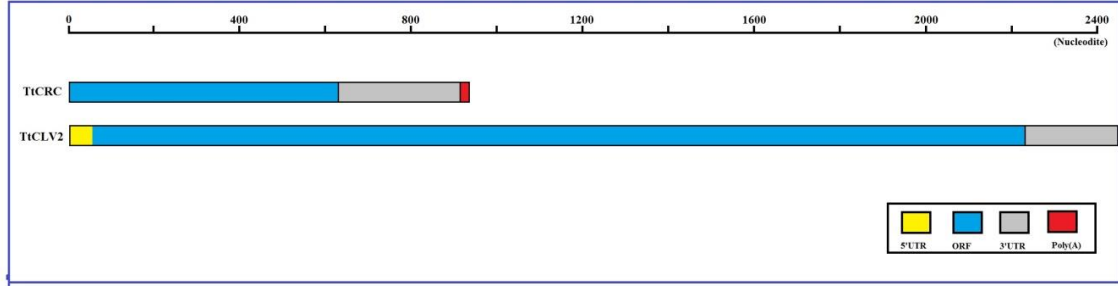
4.5 *TiCRC* Genine Ait Nükleotid Ve Protein Dizi Analizleri

> gi|848659175|gb|KR011924.1| *Thermopsis turcica* *CRABS CLAW* mRNA, partial cds
901 bp

ATGAACCATGAGGATCAGAAAGTCACCATGGACCTTGTTCCACCATCTGAG
CACCTCTGCTACGTTTCGTTGCAACTTCTGTAACACTGTGCTTGCGGTTGGGA
TCCCATGCAAGAGGCTGTTAGATACTGTAACAGTGAAGTGTGGTCACTGCA
GCAACCTCTCCTTTCTCAGCACTAGACCTCCATATTCTCAAAATCAAACCAT
TGATCACACCCTCACTCTCCAGGGGTTTTATGGTGATTCCAAAAAGGGTCAA
GCATCATCTTCATCTTCCTCACCAACTACATCTAACGAGTCATCAGTGTCCC
CTAAAGCAGCTCCATTTGTTGTCAAACCACCTGAGAAGAAGCACCGTCTCCC
ATCTGCTTACAACCGTTTCATGAAAGAGGAGATACAGCGCATCAAAGCAGC
CAACCCTGAGATCCCACATCGAGAAGCTTTCAGCGCTGCAGCCAAAAATTG
GGCTAGATTCATTCCAAATTCGCCAACCAGTTCAGCTTCAGCAAGCAAAAA
AATTGAATGAAAGAACTGTGGCAGTGGAGATATTGGGAGAGAATTGGAGG
AAGTCAATTAGGTGTCCTGTCTTAGTTTTAATAAACTACGTACTATATGTT
GCTTTTCTATCTATCTTTTAATTCCTTGAGTGTGGAAGTGGACTTTATGGCA
GCATGTAGGAGATATGAAACTGGTGTAAACGAAGGCCAGACTTAATATATTA
AGAGTCATGTTAACGAGTGCTCTAAAAGTACTCTTTAAAAATATCAAAAAA
ACCAATGTTTTATGAAAAAAGTAGAACTTGAATACCTTGGTACACGTTCCCT
CTCTTGTAATAATGTTAATGTGCCTTTTTAAAATAAAAAGCAATGAAGCACA
TATGACCCTTCTAAAAA

>|848659176|gb|AKN44283.1| *CRABS CLAW*, partial [*Thermopsis turcica*], 174 aa,
YABBY domain ve HMGB-UBF Domain

MNHEDQKVTMDLVPPSEHLCYVRCNFCNTVLAVGIPCKRLLDVTVVKCGHCS
NLSFLSTRPPYSQNQTIDHTLTLQGFYGDSSKKGQASSSSSPTTSNESSVSPKAAP
FVVKPPEKKHRLPSAYNRFMKEEIQRKAANPEIPHREAFSAAAKNWARFIPNSP
TSSASASKKIE



Şekil 4.9 Hedef genlere ait tam uzunluk cDNA'larının ölçeklendirilmesi.

Çizelge 4.1 *T. turcica*'nın çiçeklenme ile ilgili genlerin nükleotid ve tahmin edilmiş protein dizisi analizleri

GEN	GEN	AİLESİ	NÜKLEOTİD				
			Gen Bankası	Full Length	5'-UTR	ORF	3'-UTR
<i>TtCLV2</i>	LRR	TE	2557	225	2151	181	–
<i>TtCRC</i>	YABBY	KR011924	901	–	525	363	13

Devamı

	TAHMİN	EDİLMİŞ	PROTEİN	
	Gen Bankası	(aa)	(kDa)	(pI)
<i>TtCLV2</i>	TE	716	84.84	6.88
<i>TtCRC</i>	KR011924	174	19.18	9.30

4.6 Biyoinformatik Analizler

4.6.1 BALSTp Analizleri

Tam uzunluk cDNA'ları belirlenmiş genlerin BLASTp analizleri yapılarak hedef genler olduğu gösterilmiştir (Çizelge 4.2). BALSTp analizlerinde mevcut çalışmada elde edilmiş genlerin diğer baklagil ailesi için belirlenmiş ve gen bankasına teslim edilmiş homologlarına yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi, anlamlı bir karşılaştırma olması için her bir hedef gen *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* ve *Pisum sativum* için belirlenmiş dizilerle karşılaştırılmıştır. Dış grup olarak da hedef genlerin *A. thaliana* homologları ile karşılaştırılmıştır. Genler baklagil homologları ile büyük bir benzerlik (%80-%95) içerisinde, *A. thaliana* homologları ile daha düşük (%60-%70) bir benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir. Ancak, *P.*

sativum için *CRC* benzeri protein için dizi tespiti yapılamadığından değerlendirmeye alınmamıştır.

4.6.2 Hizalama Analizleri

Biyoinformatik analizler çerçevesinde hedef genlerin izole edildiğinin bir ispatı olarak protein dizilerinin homologları ile hizalaması ile gösterilmesi uygundur. Protein dizilerinin hizalanmasında Clustalw programından yararlanılmıştır.

Arabidopsis mutasyonları durumunda karpel sayısında artma tanımlanan *CRC* geninin tam uzunluk cDNA'sı izole edilmiştir. 174 amino asitten oluştuğu tahmin edilen *TtCRC* proteini klasik *YABBY* domaine ve DNA'ya bağlanma işlevine sahip HGM domainine sahiptir (Şekil 4.30). *YABBY* proteinleri bitkiye özgü bir grup transkripsiyon faktörleridir ve yanal organların eksen dışına doğru büyümesinde görev alır. HMG kutu süper ailesi proteinleri DNA'ya bağlanan proteinlerdir. Bu proteinler DNA'nın küçük oluşuna diziye spesifik olmadan bağlanan bir veya iki tekrarlı rastgele HMG kutulara sahiptir. *TtCRC* ve homologlarının büyük bir dizi benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30).

716 amino asitten meydana geldiği tahmin edilmiş *TtCLV2* proteini lösin amino asidi bakımından oldukça zengindir ve onlarca kez lösin zengini bölgeler tekrarlamaktadır. Bu proteinlerin Çizelge 4.2' deki proteinlerle olan hizalaması Şekil 4.31A'de verilmiştir. Hizalanan proteinlerin oldukça yüksek dizi benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. *CLV2* reseptör proteini üzerinde peptid sinyalizasyonu (membran yönlendirici), lösin zengini tekrarlar N-ucu (LRRNR) ve LRR-RNaz İnhibitör benzeri diziler mevcuttur (Şekil 4.31B).

Çizelge 4.2 *TtCLV2* ve *TtCRC* hedef proteinleri için BLASTp analizleri.

T. turcica CRC AKN44283.1

Tür Adı	Protein Adı	Maks. Puan	Toplam Puan	Kapsama	E değeri	Benzerlik	Protein Kodu
<i>Cicer arietinum</i>	CRC	278	278	95%	3e-92	86%	XP_004509753.1
<i>Glycine max</i>	CRC	304	304	98%	2e-102	92%	XP_003520126.1
<i>Medicago truncatula</i>	CRC	265	265	98%	2e-86	79%	XP_003614201.1
<i>Pisum sativum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRC	199	199	90%	4e-64	68%	NP_177078.1

T. turcica CLV2

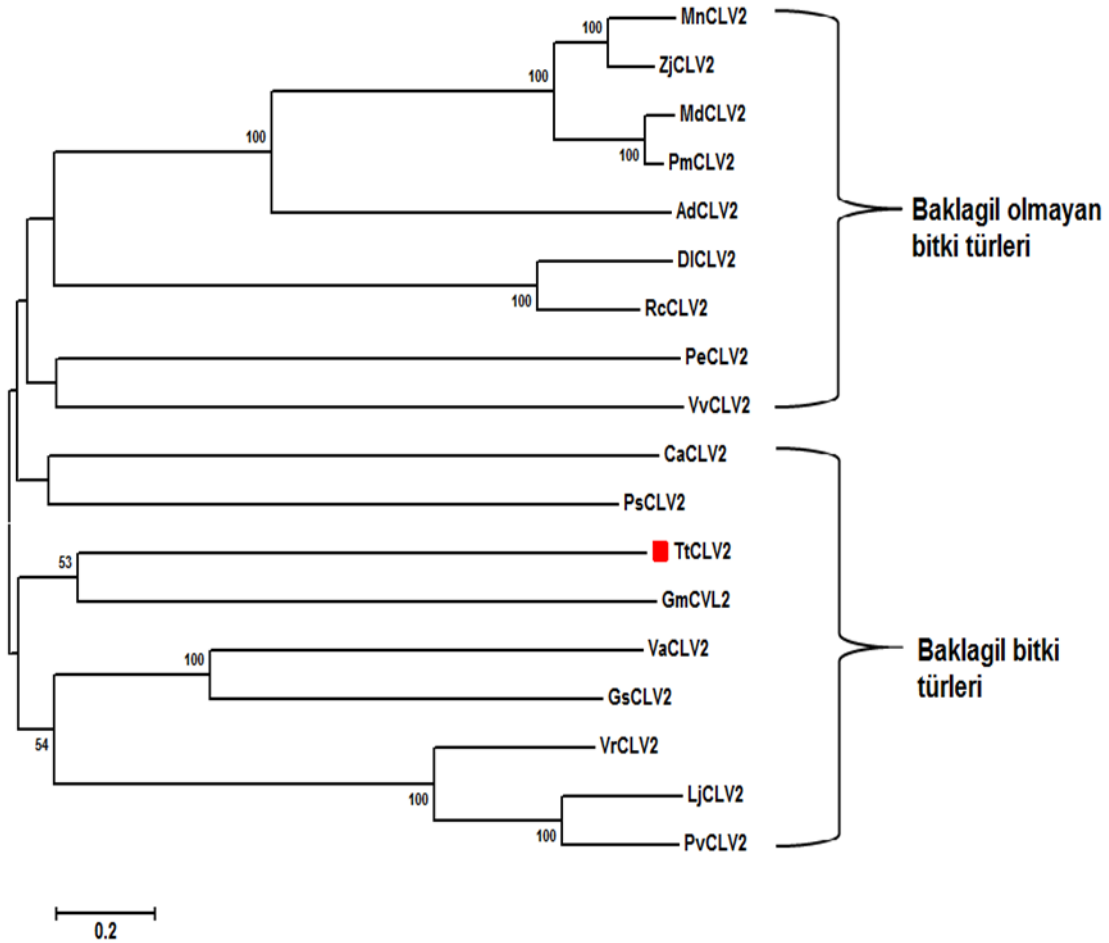
Tür Adı	Protein Adı	Maks. Puan	Toplam Puan	Kapsama	E değeri	Benzerlik	Protein Kodu
<i>Cicer arietinum</i>	CLV2/RLP10	1155	1155	100%	0.0	82%	XP_004492826.1
<i>Glycine max</i>	CLV2/RLP10	1197	1197	100%	0.0	85%	XP_014626310.1
<i>Medicago truncatula</i>	CLV2/RLP10	1142	1142	99%	0.0	82%	XP_003624130.1
<i>Pisum sativum</i>	CLV2/RLP10	1132	1132	97%	0.0	83%	BAK39954.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CLV2/RLP10	844	844	96%	0.0	64%	AAF02655.1

4.7 Filogenetik İlişki

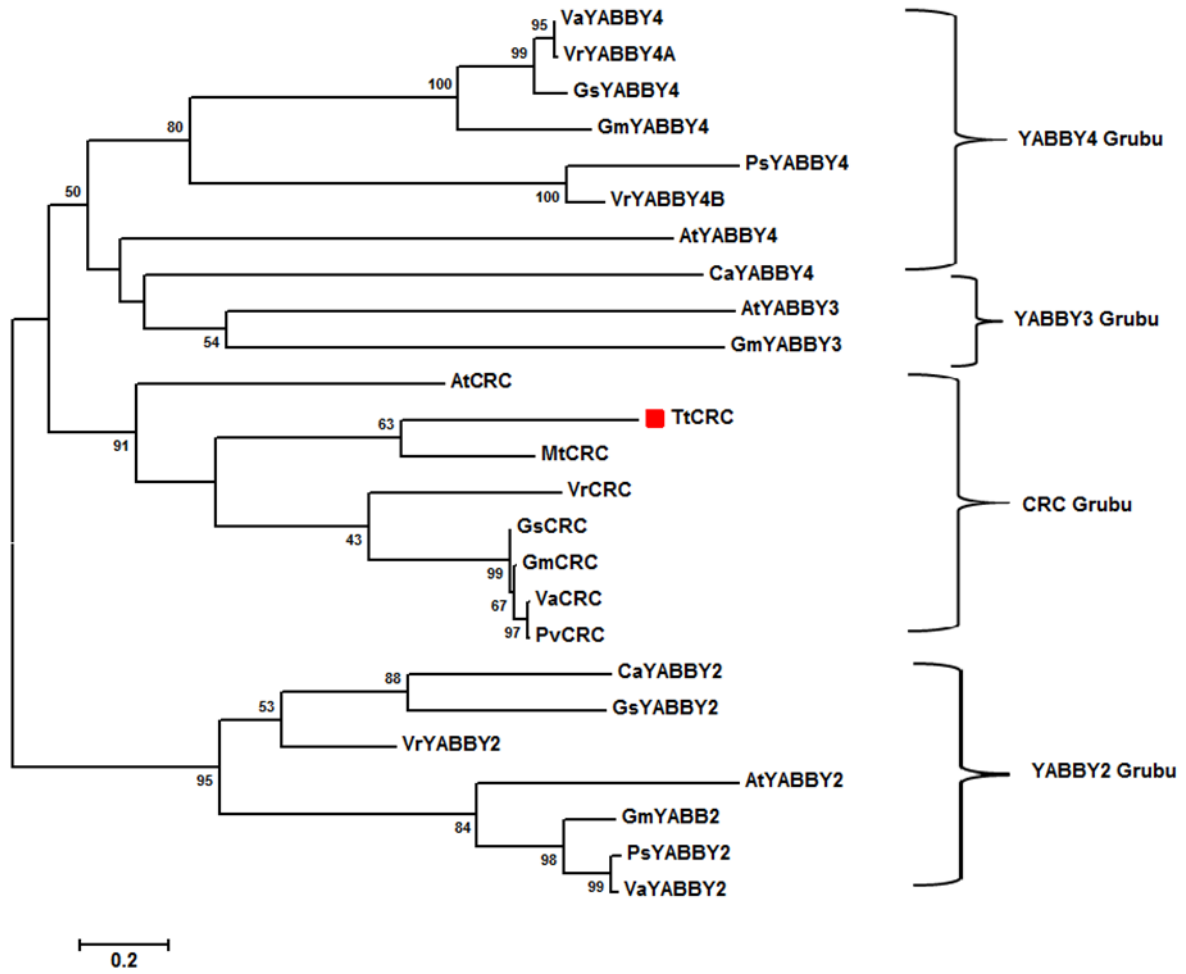
T. turcica'dan elde ettiğimiz CLV2 (LRR10; Leucine Rich Receptor 10 proteins) geni tarafından kodlandığı tahmin edilen protein yaklaşık 716 amino asit uzunluğundadır ve NCBI'da yapılan taramalarda CLV2 proteinleri genelde benzer uzunluktadır. CLV2 lösün tekrarları ile zengin bölgelere sahip bir reseptör proteindir. Transkripsiyon faktörü çok iyi korunmuş net bir protein domain bölgesine sahip değildir. Bu nedenle CLV2 proteinlerinin filogenetik ilişkisinde düşük bootstrap değerlerinde bir kümeleme yapılmıştır (Şekil 4.12). NCBI'dan filogenetik karşılaştırmalarda kullanılacak CLV2 proteinlerinin seçiminde *T. turcica*'ya en fazla dizi benzerliğine sahip baklagil (*C. arietinum*, *G. max*, *G. soja*, *Lotus japonicus*, *P. sativum*, *P. vulgaris*, *V. angularis* ve *V. radiata*) türlerinden elde edilmiş CLV2 amino asit dizileri kullanılmıştır. Baklagil olmayan bitki türlerinden (*Arachis duranensis*, *Dimocarpus longan*, *Malus domestica*, *Morus notabilis*, *Populus euphratica*, *Prunus mume*, *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Ziziphus jujuba*) elde edilmiş CLV2 amino asit dizileri de analizlere dahil edilmiştir (Şekil 4.12). N-J kümeleme analizi kullanılmış olan CLV2 proteinlerini üç ana kümede toplamıştır. Birinci kümede baklagil olmayan bitkilerden elde edilmiş CLV2 proteinleri (*A. duranensis*, *D. longan*, *M. domestica*, *M. notabilis*, *P. mume*, *R. communis* ve *Z. jujuba*) yer almıştır. Üçüncü kümede aralarında TtCLV2 protein dizisinin de bulunduğu baklagil bitkilerden elde edilmiş CLV2 proteinleri (*G. max*, *G. soja*, *L. japonicus*, *P. vulgaris*, *T. turcica*, *V. angularis* ve *V. radiata*) toplanmıştır. İkinci küme ise hem baklagil (*C. arietinum* ve *P. sativum*) hem de baklagil olmayan (*P. euphratica* ve *V. vinifera*) CLV2 proteinlerini içermiştir (Şekil 4.12).

CRABS CLAW geni *YABBY* gen ailesindeki alt gen gruplarından birisidir. Bu genler ortak *YABBY* ve tek adet DNA bağlanma domaini olan HMG kutusu bulundurmaktadır. CRC proteini için filogenetik analiz yapmada CRC, YABBY2, YABBY3 ve YABBY4 protein dizileri kullanılmıştır (Şekil 4.13). YABBY5 ailesi proteinler filogenetik ağaçta rastgele dağılım gösterdiğinden N-J analizinde kullanılmamıştır. N-J filogenetik analizlere göre YABBY proteinleri iki ana kümede toplanmıştır (Şekil 4.13). 1. kümede YABBY2 protein ailesine ait baklagil bitkilerden elde edilmiş diziler ve ilaveten *Arabidopsis* YABBY2 proteinleri birlikte kümelenebilir. İkinci ana küme ise 3 alt gruptan oluşmuştur. 1. alt grupta YABBY4 proteinleri 2. alt grupta YABBY4 ile

YABBY3 proteinleri birlikte kümelenmiştir. Ancak bu alt kümenin YABBY4 ve YABBY3 proteinleri oldukça zayıf bir bootsrapt oranı (%40'dan aşağı) ile birlikte kümelenmiştir. Bunlara ilaveten, baklagil ve Arabidopsis CRC proteinleri üçüncü alt kümeyi oluşturmuştur. *T. turcica* CRC proteini bu alt grubun 3 daha alt grubu içinde GmCRC ile birlikte kümelenmiştir (Şekil 4.13).



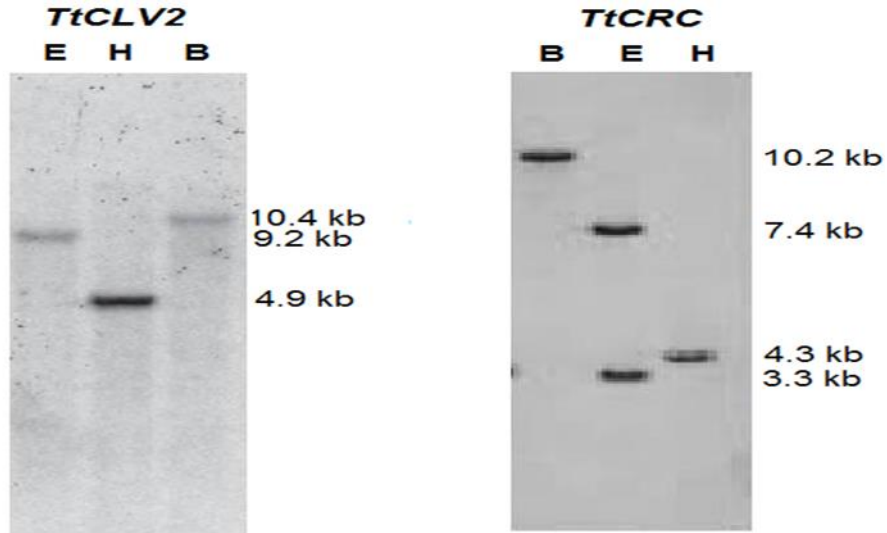
Şekil 4.12 TtCLV2 proteini için filogenetik ilişki analizi. *T. turcica* CLV2 (kırmızı kutulu) ve NCBI'dan BLASTp analizi ile seçilmiş CLV2 ailesinden proteinlerin Neighbor-Joining temelli kümelemesi. %40'dan daha yüksek olan bootsrapt (1000 tekrar) oranları dallanma yerlerinde gösterilmiştir. Filogenetik ilişkide kullanılmış olan CLV2 protein dizi bilgileri şu şekildedir: AdCLV2; *Arachis duranensis* (XP_015962146.1), CaCLV2; *Cicer arietinum* (XP_004492826.1), DiCLV2; *Dimocarpus longan* (AIZ46839.1), GmCLV2; *Glycine max* (XP_014626310.1), GsCLV2; *Glycine soja* (KHN40461.1), LjCLV2; *Lotus japonicus* (BAK39955.1), MdCLV2; *Malus domestica* (XP_008345743.1), MnCLV2; *Morus notabilis* (XP_010111061.1), PeCLV2; *Populus euphratica* (XP_011012698.1), PmCLV2; *Prunus mume* (XP_008218434.1), PsCLV2; *Pisum sativum* (BAK39954.1), PvCLV2; *Phaseolus vulgaris* (XP_007139740.1), RcCLV2; *Ricinus communis* (XP_002512621.1), TtCLV2; *Thermopsis turcica*, VaCLV2; *Vigna angularis* (KOM37031.1), VrCLV2; *Vigna radiata* var. *radiata* (XP_014498313.1), VvCLV2; *Vitis vinifera* (XP_002272643.1), ZjCLV2; *Ziziphus jujuba* (XP_015875656.1)



Şekil 4.13 TtCRC proteini için filogenetik ilişki analizi. *T. turcica* CRC (kırmızı kutulu) ve NCBI'dan BLASTp analizi ile seçilmiş YABBY transkripsiyon faktörü gen ailesinden proteinlerin Neighbor-Joining temelli kümelemesi. %40'dan daha yüksek olan bootstrap (1000 tekrar) oranları dallanma yerlerinde gösterilmiştir. Filogenetik ilişkide kullanılmış olan YABBY proteinlerinin dizi bilgileri şu şekildedir: AtCRC; *Arabidopsis thaliana* (AEE34891.1), AtYABBY2; (AAD33716.1), AtYABBY3; (AAD33717.1), AtYABBY4; (AEE30385.1), CaYABBY4; *C. arietinum* (XP_004509753.1), CaYABBY2; (XP_004487438.1), GmCRC; *G. max* (XP_003520126.1), GmYABB2; (KRH56184.1), GmYABBY3; (XP_003517025.1), GmYABBY4; (XP_003523786.2), GsCRC; *G. soja* (KHN29962.1), GsYABBY2; (KHN41251.1), GsYABBY4; (KHN14566.1), MtCRC; *M. truncatula* (XP_003614201.1), PsYABBY2; *P. vulgaris* (XP_007132510.1), PsYABBY4; (XP_007157432.1), PvCRC; *P. vulgaris* (XP_007153487.1), TtCRC; *T. turcica* (AKN44283.1), VaCRC; *V. angularis* (BAT99163.1), VaYABBY2; (BAT90331.1), VaYABBY4; (KOM45700.1), VrCRC; *V. radiata* (XP_014490685.1), VrYABBY2; (XP_014490394.1), VrYABBY4; (XP_014520420.1).

4.8 Southern Blotlama Analizleri

İzolasyonu ve kantitatif PCR analizleri hedeflenmiş olan genlerin *T. turcica* genomunda kaç kopya ile temsil edildiğini belirleyebilmek için Southern Blotlama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, *T. turcica* yaprak dokusundan genomik DNA klasik CTAB metodu ile çıkarılmıştır. Genomik DNA'nın miktar ve kalitesi spektrofotometre ile belirlenmiştir. Southern Blotlama analizi için 30 µg genomik DNA üç farklı restriksiyon enzimi ile ayrı reaksiyonlarda kesilmiş ve DNA parçaları agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Naylon membrana transfer edilmiş ve hedef gen cDNA'dan RT-PCR ile çoğaltılmış ve prob olarak kullanılmıştır. Genler için kullanılmış primerler Çizelge 4.1'de verilmiştir. DNA probu DIG DNA işaretleme kiti ile işaretlendikten sonra hibridizasyon sinyali kimyasal aydınlatma ile belirlenmiş ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak GL1500) analiz edilmiştir. Çalışma kapsamındaki 2 genin Southern blotlama analizleri sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. *TtCLV2* üç farklı enzim durumunda tek DNA bandı üretmiştir. *TtCRC* geni için sadece EcoRI sindirimi için çift bant (7.4 bp ve 3.3 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.38). Elde edilen bulgular *TtCLV2* ve *TtCRC* genlerinin *T. turcica* genomunda tek kopya ile temsil edildiğini göstermiştir.



Şekil 4.14 2 genin *T. turcica* genomundaki Southern Blotlama analizleri. Hedef genler (*TtCLV2* ve *TtCRC*), restriksiyon enzimleri (B=BamHI, E=EcoRI ve H=HindIII) ve blotlanmış olan DNA parça ebatları şekil üzerinde gösterilmiştir.

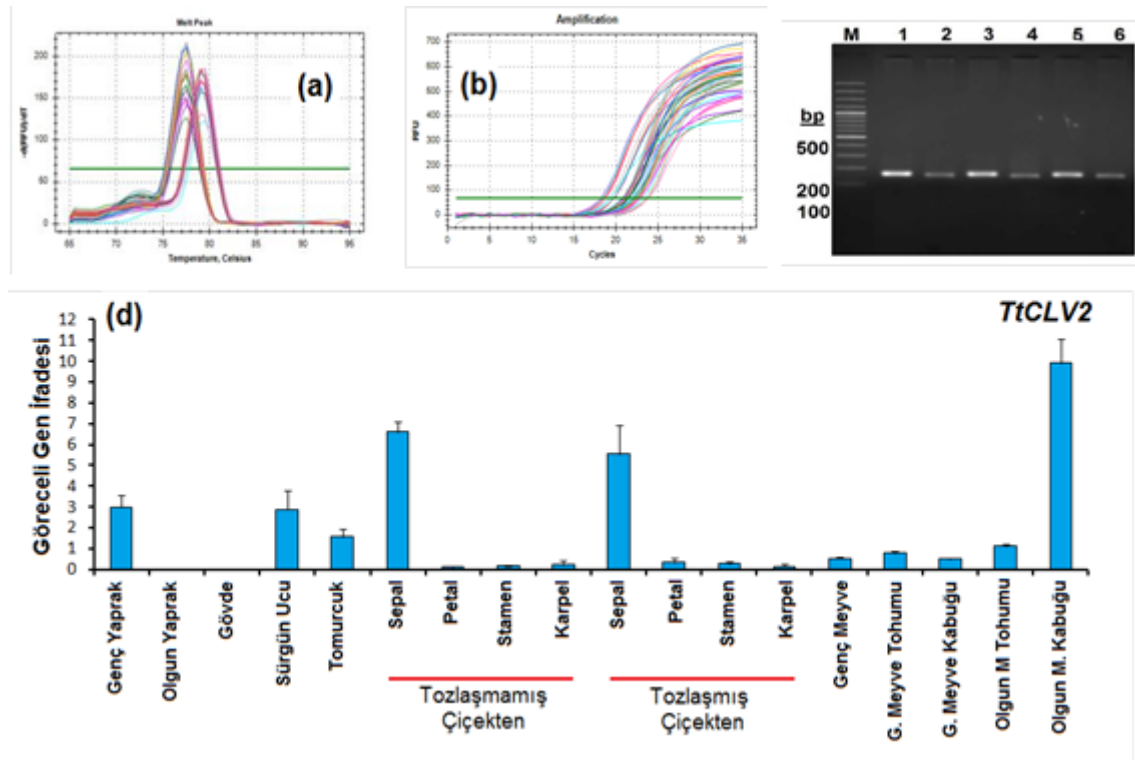
4.9 Yarı Nicel RT-PCR Analizleri

Tam uzunluk cDNA'ları belirlenmiş olan genler için *T. turcica*'nın toplamda 18 farklı vejetatif, üreme ve meyve dokularındaki transkript seviyeleri yarı kantitatif RT-PCR analizleri ile belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda hedef genlerin bu dokulardaki gen ifade seviyeleri göreceli olarak tespit edilmiştir. Her bir gen için analizde her doku örneğinden bağımsız izole edilmiş RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar biyolojik tekrar olarak kullanılmıştır. Her bir dokudaki gen ifade analizlerinde hedef genler çalışılırken *Tt β ACTIN* geni aynı dokuda referans gen olarak kullanılmıştır. Biyolojik tekrara ilaveten, her bir reaksiyonun en az üç tüp reaksiyon karışımı teknik tekrar olarak kurulmuştur. Dolayısı ile her bir genin ilgili dokudaki ifade analizi için en az 6 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Ayrıca başarısız olan reaksiyon ve/veya kontaminasyon göstergesi olan NTC grubu da deneylere dahil edilmiştir. Sağlıklı sonuçlar alınıncaya kadar reaksiyonlar tekrarlanmıştır. 2 farklı genin 18 farklı *T. turcica* dokusundaki gen ifade analizlerine ait sonuçlar Şekil 4.12 ve 4.13 te özetlenmiştir. Her bir diyagramda dört farklı RT-qPCR bilgisi mevcuttur. Şekil 4.12 ve 4.13 te tozlaşma öncesine ait qPCR analizlerinde elde edilmiş erime eğrileri (A Şekilleri), PCR bandı çoğalma eğrileri (B Şekilleri) ve üçer referans ve hedef gen ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (C Şekilleri) her bir gen için örnek olarak verilmiştir. Her bir RT-qPCR yürütmesi sonrası hedef ve referans gen için erime eğrisi grafikleri çıkarılmıştır. Referans gen *β-ACTIN* için erime sıcaklığı (T_m) değeri tüm RT-qPCR analizlerinde 79.5 °C olarak gerçekleşmiştir. *TtCLV2* için 77.5 °C, *TtCRC* için 75.5 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12-4.13, A Şekilleri). Referans gen *β-ACTIN* için PCR ürün boyutu 164 bp'dir. Hedef genler için RT-qPCR ürün boyları: *TtCLV2* için 156 bp; *TtCRC* için 172 bp olarak belirlenmiştir (Şekil 4.39-4.50, C Şekilleri). Genlere ait göreceli gen ifade analizleri Şekil 4.12-4.13 için (D) şekillerindeki grafiklerde gösterilmiştir. Grafiklerde gösterilen çubuklar standart hata çubuklarıdır. Her bir genin her bir doku için belirlenmiş olan Ct değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

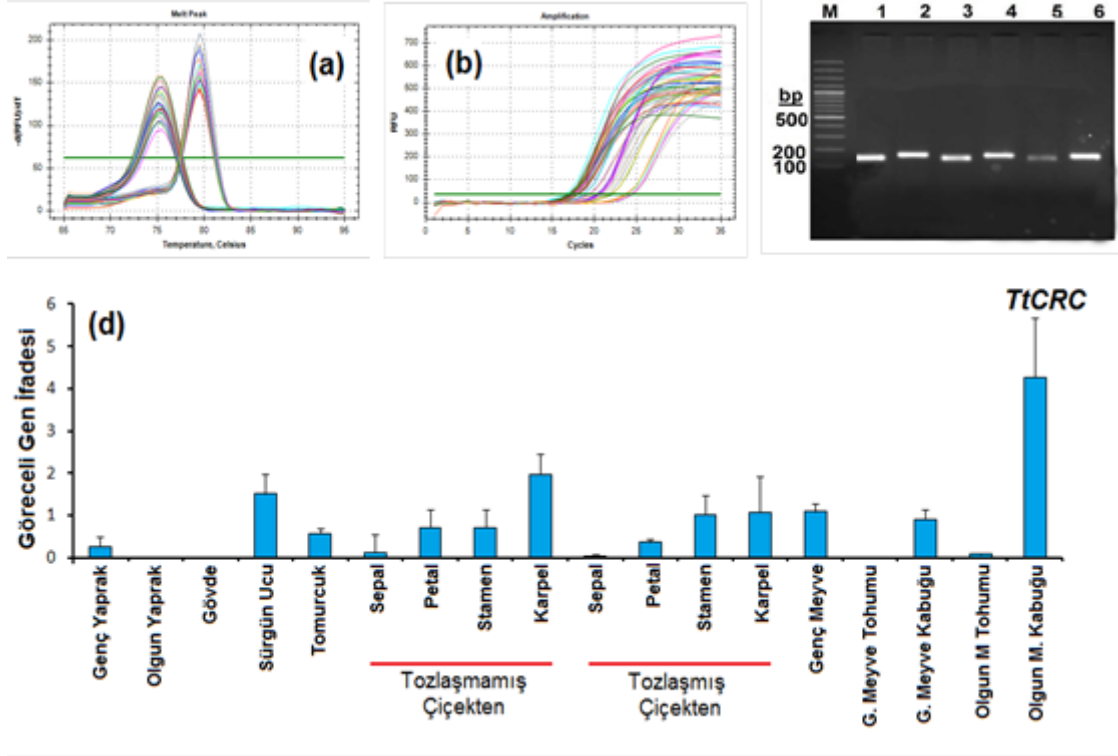
Reseptör protein benzeri protein kodlayan ve bir meristem geni olan *TtCLV2* *T. turcica*'nın genç yaprak, sürgün ucu, çiçek tomurcuğu, sepal dokuları ve olgun meyve kabuğunda yüksek transkript seviyesine sahiptir (Şekil 4.12, Çizelge 4.3). Bu dokulardan ise en yüksek *TtCLV2* transkriptine sahip olan doku olgun meyve

kabuğudur. Diğer meyve dokularında oldukça az bir *TtCLV2* gen ifadesi tespit edilmiştir. Sepal haricindeki çiçek dokularında *CLV2* ifadesi çok az veya yok denecek kadar azdır.

Diğer bir MADS kutulu gen olmayan *TtCRC* geni sürgün ucu, çiçek tomurcuğu ve sepaller haricinde tüm çiçek dokularında mevcuttur (Şekil 4.13, Çizelge 4.3). Üreme dokuları içinde en yüksek *TtCRC* ifadesi karpel dokularında gözlenmiştir. Diğer taraftan genç ve olgun tohumlarda *TtCRC* gen ifadesi yok denecek kadar azken meyve kabuklarında belirgin bir *TtCRC* ifadesi mevcuttur. *TtCRC* geninin en yüksek transkript seviyesine olgun meyve kabuğunda rastlanmıştır.



Şekil 4.15 *TtCLV2* geninin yarı-nicel RT-PCR analizi. (a) Referans gen (β -ACTIN) ile birlikte *TtCLV2* qPCR ürününün erime eğrisi. (b) Çoğalma grafiği. (c) qPCR ürünü β -Actin (164 bp; hat 1, 3 ve 5) ve *TtCLV2* (156 bp; hat 2, 4 ve 6) DNA parçalarının agaroz jel analizi ve (d) *TtCLV2* genin *T. turcica* 18 farklı üreme ve vejetatif dokusunda göreceli gen ifade analizi

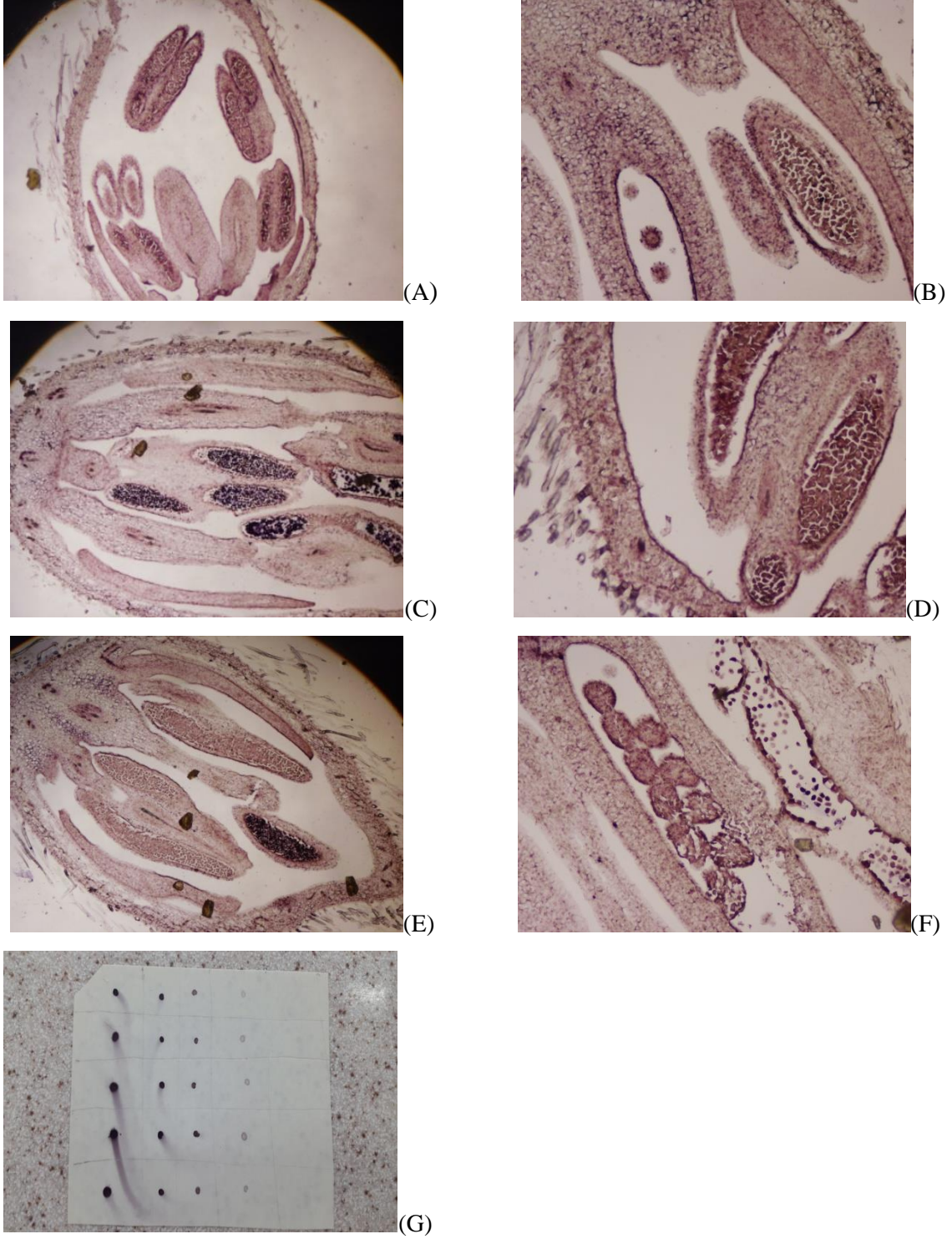


Şekil 4.16 *TtCRC* geninin yarı-nicel RT-PCR analizi.(a) Referans gen (β -ACTIN) ile birlikte *TtCRC* qPCR ürününün erime eğrisi. (b) Çoğalma grafiği. (c) qPCR ürünü β -Actin (164 bp; hat 1, 3 ve 5) ve *TtCRC* (172 bp; hat 2, 4 ve 6) DNA parçalarının agaroz jel analizi ve (d) *TtCRC* genin *T. turcica* 18 farklı üreme ve vejetatif dokusunda göreceli gen ifade analizi

Çizelge 4.3 qPCR analizlerinde belirlenmiş olan C_T değerleri. 18 farklı *T. turcica* vejetatif ve üreme dokusunda bireysel olarak belirlenmiş 12 farklı gen için eşik noktasına denk gelen döngü (C_T, Threshold Cycle) değerleri

Dokular	<i>TiCLV2</i>	<i>TiCRC</i>	Dokular	<i>TiCLV2</i>	<i>TiCRC</i>
Genç Yaprak	20,5	19,2	Tozlaşma Sonrası Sepal	21,4	24,8
Olgun Yaprak	ND	ND	Tozlaşma Sonrası Petal	19,5	19,9
Gövde	ND	ND	Tozlaşma Sonrası Stamen	22,3	18,4
Sürgün Ucu	21,7	18,6	Tozlaşma Sonrası Karpel	22,4	18,8
Tomurcuk	21,1	20,7	Genç Meyve Tohumu	22,6	24,2
Tozlaşma öncesi Sepal	21,3	17,5	Genç Meyve	21,0	17,5
Tozlaşma öncesi Petal	23,0	17,2	Genç Meyve Kabuğu	21,3	17,8
Tozlaşma öncesi Stamen	23,4	18,7	Olgun Meyve Tohumu	21,1	18,7
Tozlaşma öncesi Karpel	25,1	18,7	Olgun Meyve Kabuğu	22,4	19,4

4.10 İn Situ Hibridizasyon Analizleri



Şekil 4.17 İn Situ hibridizasyon görüntüleme sonuçları ve dot blot analizi. (A) *CLV* tomurcuk1. (B) *CLV2* tomurcuk2. (C) *CLV2* tomurcuk3. (D) *CRC* tom1 (E) *CRC* tom2. (F) *CRC* tom3 (G) dot blot analizi sonucu

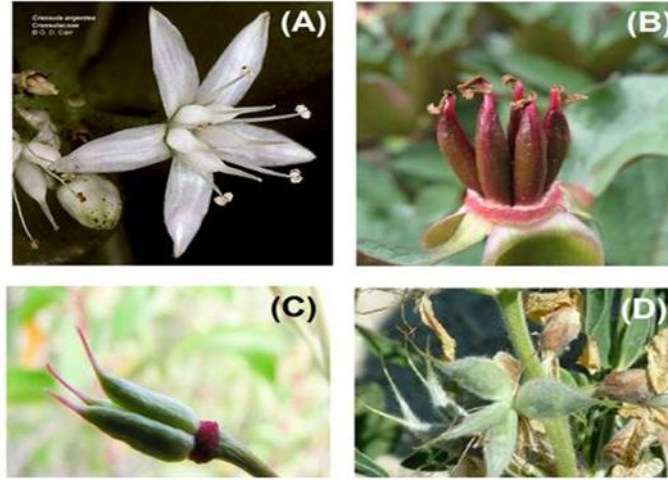
5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Vejetatif evreden çiçeklenmeye geçiş, çiçeklenmenin kurulumu, çiçek organları sepal, petal, stamen ve karpel kimliklerinin oluşumu, çiçek organlarının gelişimi, tozlaşma, embriyo gelişimi ve nihayetinde meyve oluşmasına kadar geçen gelişimsel süreç bitki biliminin en ilginç araştırma konularından birisini oluşturmaktadır. Çiçek meristemi ve çiçek organ kimlik meristemi genleri genelde homeotik transkripsiyon faktörlerini kodlar. Bu faktörler ilgili yapısal genlerin ifade olmasını düzenleyerek bitkinin çiçeklenmeye geçişini ve bitki çiçeği oluşumunu sağlar. Çiçek organlarının sayısı ve petal rengi gibi çiçek yapısı ve şekli bitkilere özgüdür. Bitkiler tür, cins ve familya seviyesinde farklı çiçeklenme planlarına sahiptir. Ancak bu farklılıklara rağmen, çiçeklenmenin kurulumunda ve çiçek organ kimliğinin oluşumunda ve gelişiminde çalışan homeotik transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler çiçekli bitkilerde korunmuştur.

Bitki mimarisi kapsamında, çiçeklenmenin ve meyve oluşumunun moleküler mekanizmasını aydınlatmak için 1990'lı yılların başından bu yana yoğun bir araştırma yapılmaktadır. Bitkilerde vejetatif meristem dokudan çiçek meristem dokusuna geçişte ve çiçeklenme zamanının belirlenmesindeki karmaşık moleküler mekanizmaların aydınlatılması yolunda oldukça mesafe alınmış ve alınmaya devam edilmektedir. Çiçek organ kimlik genleri ile ilgili çalışmalardan elde edilen bilgilerin büyük bir kısmı tek yıllık otsu bitki *Arabidopsis* ve *Antirrhinum* model bitkilerinden elde edilmiştir. Her ne kadar çiçeklenmenin moleküler biyolojisi ve fizyolojisi ile ilgili bilgilerin büyük bir kısmı bu model bitkilerden gelse de, ilgi çekici çiçek morfolojisine sahip yabani ve kültür bitkilerinde veya ekonomik öneme sahip bitkilerde de benzer araştırmalar yaygın bir şekilde yapılmaktadır (örneğin; Hsu and Yang 2002; Drea *et al.* 2007; Tanaka *et al.* 2011). Bu gibi bitkilerden elde edilen bilgiler çiçeklenmenin moleküler temelleri konusunda kazanılmış bilgilerin evrenselleşmesine veya istisnaların belirlenmesine büyük katkı sağlamaktadır. Bu kapsamda; serbest çok karpelli çiçek morfolojisine ve baklagil meyve dökmeye sahip *T. turcica* yabani bitkisi ilgi çekmiştir. *T. turcica* aynı zamanda çok yıllık otsu bitki grubuna girdiğinden, bu bitkiden elde edilecek bilgilerin çok yıllık otsu bitkilerde çiçeklenme ile ilgili değerli bilgiler vereceği de şüphesizdir.

Baklagiller bitki ailesi Thermopsis R. cinsine ait bitki türleri genelde Orta Asya ve Kuzey Amerika'nın dağlık nemli bölgelerinde yayılış gösterir (Wojciechowski, 2003); ancak Anadolu'da bu cinse ait *T. turcica* tek bitki türüdür ve baklagiller için normal olmayan çoklu serbest karpelli çiçeklere sahiptir (Tan *et al.*, 1983). Latince dişi+evi anlamına gelen 'gynoecium', çiçeğin tohumları koruyan dişi organı şeklinde tanımlanabilir ve birçok durumda karpel olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerde gynoecium bileşeni tek karpel (baklagillerde olduğu gibi), çoklu serbest karpelli (düğün çiçeğigiller ailesi veya çilek türleri) ve çoklu kaynaşmış karpelli (lale ve birçok çiçek) şeklinde olabilir (<http://gutenberg.us/articles/carpel> son ziyaret 24.4.2016). *T. turcica*'nın bu morfolojik özelliği nohut, bezelye, soya ve fasulye gibi özelliği tarımsal olarak önemli olan baklagil bitkileri için ürün artışına neden olabileceği düşüncesini vermiştir. Bununla birlikte, tek çiçekten çoklu serbest karpel veya meyve üretimi bitkiler arasında çok yaygın bir özellik değildir. Literatürde bu yaygın olmayan morfolojik özelliğin moleküler temelleri ile ilgili bir bilgi de mevcut değildir. Aslında çoklu (dört veya daha fazla) serbest karpelli çiçek planı Crassulaceae, Paeoniaceae ve Ranunculaceae bitki aileleri içindeki bazı türler için belirgin bir özelliktir (Davis *et al.* 1965). Bu bitki ailelerine ait örnek türler ile *T. turcica* için aynı çiçeğe ait çoklu serbest karpelleri veya meyveleri karşılaştırma amacı ile Şekil 5.1'de verilmiştir.

Nihai amacımız *T. turcica*'daki çok karpelli meyve üretiminde *CLV2* (çiçek meristem geni) ve *CRC* (karpel oluşum geni) genlerinin etkilerini araştırmak, moleküler bilgilere ulaşmak, bunları literatür ile karşılaştırmak ve ulaştığımız bilgileri literatüre kazandırmaktır. Bununla birlikte bu özelliği ekonomik öneme sahip diğer baklagil bitkilere kazandırmaktır.



Şekil 5.1 Çoklu serbest karpelli bitkilere örnekler. (A) Crassulaceae ailesinden *Crassula argentea* (B) Paeoniaceae ailesinden *Paeonia cambessedesii*, (C) Ranunculaceae ailesinden *Delphinium cardinale* ve (D) Leguminosae ailesinden *Thermopsis turcica*.

[Resimlerin kaynakları: (A) <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/crassul.htm>, (B) http://mundani-garden.blogspot.com.tr/2012_02_01_archive.html, (C) <https://www.flickr.com/photos/aking1/5909356480> ve (D) Dr. Süleyman Cenkeci; Web sitelerine en son giriş tarihi 24.4.2016]

5.1 Meristem Geni *TtCLV2*

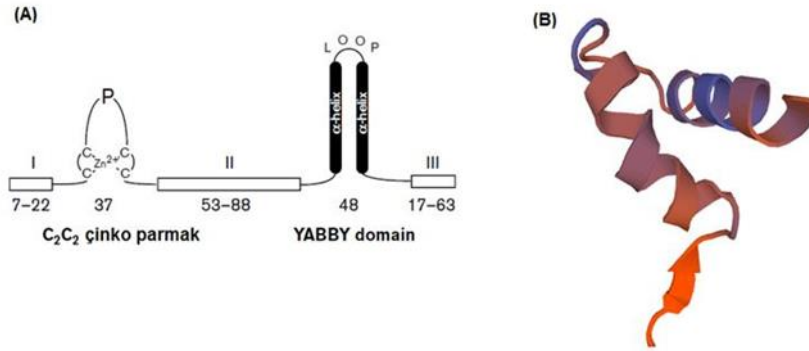
716 amino asitten meydana geldiği tahmin edilmiş *TtCLV2* proteini lösin amino asidi bakımından oldukça zengindir ve 12 defa lösin zengini tekrar bölgesi tekrarlamaktadır. Bu proteinin homologları ile hizalaması ve bulundurduğu korunmuş diziler Şekil 4.4 ve 4.11'de verilmiştir. CLAVATA1 (CLV1) ve CLV2 reseptör proteinleri CLV3 ligandlarına bağlandıklarında *Arabidopsis*'te sürgün ucu meristeminde hücre çoğalmasını transkripsiyon faktörü *WUSCHEL*'in ifadesini baskılama mekanizmasını aktive ederek kontrol etmektedir (Durbak and Tax 2011). Sürgün ucu kök hücre popülasyonunun büyüklüğü *CLV* sinyalizasyon sistemi ile düzenlenmektedir ve sistemin unsurları küçük bir salgı peptidi olan CLV3, reseptör benzeri kinaz olan CLV1 ve CORNYE (CRYNE) ve reseptör benzeri protein olan CLV2' den oluşmaktadır (Muller et al. 2008). Dolayısıyla *CLV2* geni bir transkripsiyon faktörü değildir. *Arabidopsis* LRR10 olarak da bilenen *CLV2*'nin *T. turcica* homologu *TtCLV2* tam uzunluk cDNA'sı 2557, ORF'si ise 2155 nükleotitten oluşur. Bu gen muhtemelen 716 amino asitten oluşan bir protein kodlamaktadır. Benzer şekilde, gen bankasında *Arabidopsis* CLV2 proteini (AAF02655.1), baklagil bitkilerinden izole edilmiş CLV2 benzeri proteinler (örneğin XP_003624130.1, XP_014626310.1, BAK39954.1 ve XP_004492826.1)

yaklaşık 720 amino asitten oluşmaktadır. Bu proteinde lösin zengini reseptör N terminali, 12 adet tekrarlayan LRR motifi ve en az dört bölgede (overlapped) LRR-RNaz inhibitor benzeri bölge bulunmaktadır. CLV2 bir lösin zengini reseptör proteindir ve 8 farklı korunmuş bölge içermektedir. Hizalanan proteinlerin oldukça yüksek dizi benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. TtCLV2 proteinin amino asit içeriği ve üzerinde bulundurduğu korunmuş bölgeler diğer baklagiller bezelye ve lotus ile büyük bir benzerlik içerisinde (Krusell et al. 2011). TtCLV2 proteini tahmin edilmiş protein dizisi ile baklagil ve baklagil olmayan 17 bitkiden elde edilmiş CLV benzeri protein dizisi ile filogenetik analiz yapılmıştır. N-J filogenetik analizine göre TtCLV2 proteini diğer baklagil bitkilerinden elde edilmiş CLV2 benzeri proteinlerle birlikte kümelenmiştir. Ancak bootstrap değerleri çoğu dallanma noktası için %50 veya daha az çıkmış olması filogenetik ağaç üzerinde değerlendirme yapmamızı zayıflatmıştır. CLV2 benzeri genler sürgün meristem büyüklüğünü kontrol eden reseptör protein benzeri protein kodlayan genlerden birisidir. Arabidopsis'te bu genin ifadesini mutasyonla bloke edildiğinde meristem büyüklüğünde artma ve karpel gibi çiçek organlarının sayısında artma belirlenmiştir (Clark et al. 1993; Clark et al. 1995; Kayes and Clark, 1998) . Bu genin ifadesinde olan bir gen olan *TtCLV2* *T. turcica*'nın genç yaprak, sürgün ucu, çiçek tomurcuğu, sepal dokuları ve olgun meyve kabuğunda yüksek transkript seviyesine sahiptir (Şekil 4.15, Çizelge 4.3). Bu dokulardan ise en yüksek *TtCLV2* transkriptine sahip olan doku olgun meyve kabuğudur. Diğer meyve dokularında oldukça az bir *TtCLV2* gen ifadesi tespit edilmiştir. Sepal haricindeki çiçek dokularında CLV2 ifadesi çok az veya yok denecek kadar azdır.

5.2 *TtCRC* geni

MADS kutusu olmayan ve *Arabidopsis* mutasyonları durumunda karpel sayısında artışların tanımlandığı *CRC* homologunun tam uzunluk cDNA'sı *T. turcica*'dan izole edilmiştir. 174 amino asitten oluştuğu tahmin edilen TtCRC proteini klasik iki korunmuş bölgeye sahiptir (Şekil 4.31). Çinko parmak ve YABBY (bir tür ıstakoz) domaine sahiptir (Bowman and Smyth 1999) (Şekil 5.2). YABBY domainin, DNA'ya bağlanma işlevine sahip ve 3 alfa helikse sahip HGM kutusunun ilk iki heliksine sahiptir (Bowman and Smyth 1999). Çinko parmak ve YABBY domainlerine sahip 6 farklı alt gen grupları vardır ve genelde *CRC*, *YABBY1* (veya *FILAMENTOUS*

FLOWER, FIL), *YABBY2*, *YABBY3*, *YABBY4* (veya *INNER NO OUTER, INO*) ve *YABBY5* benzeri genler olarak adlandırılmaktadır (Bowman and Smyth 1999; Siegfried et al. 1999; Bowman 2000). Tam uzunluk cDNA dizisi ve kodladığı muhtemel protein dizisi *TtCRC* geninin *CRC* gen homologu olduğunu göstermiştir. *TtCRC* proteininin filogenetik analizinde *CRC*, *YABBY2*, *YABBY3* ve *YABBY4* protein dizileri kullanılmıştır (Şekil 4.36). Filogenetik analizlere göre *TtCRC* proteini *G. max* *CRC* protein dizisi ile birlikte *CRC* kümesinde gruplanmıştır. *TtCRC* geni sürgün ucu, çiçek tomurcuğu ve sepal dokuları haricinde tüm çiçek dokularında mevcuttur. Fonksiyonel analizlerden elde edilen bilgilerle uyum içinde; çiçek dokuları içinde en yüksek *TtCRC* transkript seviyesi karpel dokusunda belirlenmiştir (Alvarez and Smyth 1999; Bowman and Smyth 1999; Fourquin et al. 2005). Bulgularımıza göre stamen dokuda da yüksek *TtCRC* ifadesi belirlenmiştir. Diğer taraftan genç ve olgun tohumlarda *TtCRC* gen ifadesi yok denecek kadar azken meyve kabuklarında belirgin bir *TtCRC* ifadesi mevcuttur. *TtCRC* geninin en yüksek transkript seviyesine olgun meyve kabuğunda rastlanmıştır.



Şekil 5.2 *CRC* proteini. (A) Çinko parmak ve YABBY domainler (Bowman 2000'den). (B) *TtCRC* proteini YABBY domaini 3 boyutlu SWISS MODEL yapısı.

5.3 Sonuç

Karpel gelişimi ile ilgili olduğu bilinen *CRC* gen homologunun da *T. turcica* benzer bir işleve sahip olduğu görülmüştür. Bu genin tohum gelişimine katkı sağlayabileceği *TtCRC* ifadesi ile belirlenmiştir.

CLAVATA2 ve *CRABS CLAW* mutantlarında veya bu genlerin aşırı ifadesinde başlıca karpel sayısı olmak üzere çiçek organlarının sayısında artmalar olabileceği *Arabidopsis*

ile yapılmış mutant çalışmalarda belirlenmiştir (Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Running and Meyerowitz, 1996; Kayes and Clark, 1998; Durbak and Tax 2011; Wen and Walker 2012; Landau et al. 2015). *TtCLV2* ve *TtCRC* geninin fonksiyonel analizi *Arabidopsis* veya benzeri model bir bitkide yapılarak bu genlerin fonksiyonel analizleri belirlenebilir.

Bu araştırmada *CLAVATA2* (*CLV2*) ve *CRABS CLAW* (*CRC*) *Arabidopsis* gen homologlarının *T. turcica*'da klonlanarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmamızda (1) dejenere primerlerden faydalanarak hedef genlere ait kısa parçaların elde edilmesi ve dizilenmesi, (2) bu dizilerden RACE analizleri için gene özgü primerlerin tasarlanması, (3) gene özgü primerler ile hedef genlere ait cDNA'ların 3'-ve 5'-uçlarının hızlı çoğaltılması, klonlanması ve dizilenmesi, (4) cDNA dizi parçalarının birleştirilmesiyle tam uzunluktaki cDNA nükleotid dizilerinin belirlenmesi, (5) nükleotid ve amino asit sekanslarının yazılım programları ile analiz edilmesi, (6) hedef genlerin genomdaki temsil sayısının Southern Blotlama yöntemi ile analiz edilmesi, (7) hedef genlere ait nükleotid ve amino asit sekansları, gen bankalarında mevcut homologları ile karşılaştırılarak filogenetik ve moleküler evrimsel ilişkilerin analiz edilmesi, ve (8) hedef genlerin gelişimsel ve organa özgü ifadelerinin yarı kantitatif RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bulgularımıza göre stamen dokuda da yüksek *TtCRC* ifadesi belirlenmiştir. Diğer taraftan genç ve olgun tohumlarda *TtCRC* gen ifadesi yok denecek kadar azken meyve kabuklarında belirgin bir *TtCRC* ifadesi mevcuttur. *TtCRC* geninin en yüksek transkript seviyesine olgun meyve kabuğunda rastlanmıştır.

TtCLV2 *T. turcica*'nın genç yaprak, sürgün ucu, çiçek tomurcuğu, sepal dokuları ve olgun meyve kabuğunda yüksek transkript seviyesine sahiptir. Bu dokulardan ise en yüksek *TtCLV2* transkriptine sahip olan doku olgun meyve kabuğudur. Diğer meyve dokularında oldukça az bir *TtCLV2* gen ifadesi tespit edilmiştir. Sepal haricindeki çiçek dokularında *CLV2* ifadesi çok az veya yok denecek kadar azdır.

6. KAYNAKLAR

- Aksoy, L., Kolay E., Ağılönü Y., Aslan Z., Kargıoğlu M. 2013. “Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*”, Saudi journal of biological sciences, 20(3), 235-239.
- Alvarez, J. and. Smyth, D.R (1999). ‘*CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*’. Development 126, 2377- 2386
- Asilbekova D.T., 2004. “Lipids of *Thermopsis alterniflora* Bean Seeds and Shells”, Chemistry of Natural Compounds, 40, 532-534.
- Bali, E. B., Açık L., Akca G., Sarper M., Elçi M. P., Avcu F., Vural M. 2014. “Antimicrobial activity against periodontopathogenic bacteria, antioxidant and cytotoxic effects of various extracts from endemic *Thermopsis turcica*”, Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 4(7), 505-514.
- Blazquez, M.A., and Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Natura*, 404: 889-892
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., & Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 1(1), 37-52.
- Bowman, J. L., Drews G. N., Meyerowitz E. M. 1991. “Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development”, *The Plant Cell Online*, 3(8), 749-758.
- Bowman, J. L., and Smyth, D. R. (1999). *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix- loop-helix domains. *Development* 126: 2387-2396
- Bowman, J. L. 2000. “The *YABBY* gene family and abaxial cell fate”, *Current opinion in plant biology*, 3(1), 17-22.
- Cenkci, S., Kargioglu M., Dayan S., Konuk M. 2007. “Endangered status and propagation of an endemic plant species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae)”, *Asian J Plant Sci*, 6, 288-293
- Cenkci, S., Kargioglu M., Dayan S., Konuk M. 2008. “In vitro propagation of an endangered plant species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae)”, *Biologia*, 63(5), 652-657.

- Cenkci, S., Temel M., Kargioğlu M., Dayan S. 2009. "Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Tan, Vural Küçüködük using conventional and in vitro techniques", Turkish Journal of Biology, 33(4), 327-333.
- Ciğerci, İ. H., Cenkci S., Kargioğlu M., Konuk M. 2016. "Genotoxicity of *Thermopsis turcica* on *Allium cepa* L. roots revealed by alkaline comet and random amplified polymorphic DNA assays", Cytotechnology, baskıda
- Clark, S. E., Running M. P., Meyerowitz E.M. 1993. *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*," Development, 119, 397-418.
- Clark, S.E., Running, M.P. Meyerowitz E. M. 1995. "*CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*," *Development*, 121, 2057-2067.
- Coen, E.S., and Meyerowitz E.M. 1991. "The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development", Nature, 353(6339), 31-37.
- Davis P.H., Mill R.R., Kit T., "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", Vol: 10, Edinburgh, 1988. Pp: 111–112.
- Dement W.A., Mabry T.J. 1975. "Biological Implication of Flavonoid Chemistry in *Baptisia* and *Thermopsis*", Biochemical Systematics and Ecology, 3, 91-94.
- Drea, S., Hileman L.C., De Martino G. and Irish V. 2007. "Functional analyses of genetic pathways controlling petal specification in poppy", Development, 134(23), 4157- 4166.
- Durbak, A.R., Tax, F.E. 2011. "CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems", Genetics, 189(1), 177-194.
- 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.
- Eshed, S.F., Siegfried, K.R, Baum, D. Otsuga, G.N. Drews, J.L. Bowman Development 1999 Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis* 126: 4117-4128;
- Ferrándiz, C., Pelaz S., Yanofsky M. F. 1999. "Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*", Annual review of biochemistry, 68(1), 321-354.

- Fourquin, C., Vinauger-Douard M., Fogliani B., Dumas C., Scutt CP. 2005. "Evidence that *CRABS CLAW* and *TOUSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestor of the extant angiosperms", Proceedings of the *National Academy of Sciences*, USA 102, 4649–4654.
- Holt, A.L., van Haperen, J., Groot, E.P. and Laux, T. (2014). Signaling in shoot and flower meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology*, 17: 96-102.
- Hsu, H. F., Yang C. H. 2002. "An orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) AP3-like MADS gene regulates floral formation and initiation", *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1198-1209.
- Kayes, J.M. and Clark, S.E. (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*, *Development* 125, 3843-3851
- Korcan S.E., Cığerci İ.H., Dilek M., Kargioğlu M., Cenkci S., Konuk M. 2009. "Antimicrobial Activity of an Endemic Species, *Thermopsis turcica*", Turkey, Kuwait Journal of Science and Engineering, 36, 101-112.
- Landau, U., Asis L., Williams L.E. 2015. "The *ERECTA*, *CLAVATA* and class III HD-ZIP Pathways Display Synergistic Interactions in Regulating Floral Meristem Activities", *PloS one*, 10(5), e0125408.
- Lee, J., Baum, F.S., Alvarez, J., Patel, Chitwood, D.H. and Bowman, J.L. January 2005 Activation of *CRABS CLAW* in the Nectaries and Carpels of *Arabidopsis* *The Plant Cell*, Vol. 17, 25–36
- Lee, J., Lee, I., (2010). Regulation and function of *SOCI*, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 2247-2254
- Lohmann, J.U., Weigel, D. (2002). Building beauty: the genetic control of floral patterning. *Development Cell*, 2: 135-142.
- Lockhart B.E.L., 2005. "Three Previously Unrecorded Viral Diseases of *Astilbe*, *Fuschia* and *Thermopsis* Species in Minnesota", *Plant Disease*, 89, 775.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M., Lee, I. (2005). Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 46: 111-130
- Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G. (2002). Control of flowering time:interacting pathways as a basis for diversity, *Plant Cell*, 14: 111-130

- Müller, R., Bleckmann A., Simon R. 2008. "The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal *CLAVATA3* independently of *CLAVATA1*", *The Plant Cell*, 20(4), 934-946.
- Özdemir, C., Dural H., Ertuğrul K., Küçüködük M., Baran P., Şanda M. A. 2008. "Morphology and anatomy of endemic *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural Küçüködük", *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), 105-114.
- Running, M.P., Meyerowitz E.M. 1996. "Mutations in the PERIANTHIA gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern". *Development*, 122, 1261- 1269.
- Scutt, C.P., Fourquin, C., Vinauger-Douard, M., Fogliani, B., Dumas, C. (2004). Evidence that *CRABS CLAW* and *TOUSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestor of the extant angiosperms
- Scutt, C. P., Vinauger-Douard M., Fourquin C., Finet C., Dumas C. 2006. "An evolutionary perspective on the regulation of carpel development", *Journal of Experimental Botany*, 57(10), 2143-2152.
- Şener B., Koyuncu M., Ergun F., 1992. "*Thermopsis turcica* Bitkisinde Anagirin'inin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Tayini", 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, (Ed. Başer K.H.C.), Anadolu Üniversitesi Basımevi: Eskişehir Pp: 411.
- Tan, K., Vural, M., & Küçüködük, M. (1983). An unusual new *Thermopsis* from Turkey. *Notes Royal Botanic Gardens Edinburgh*, 40(3): 515-518.
- Tanaka, Y., Yamamura T. and Terakawa T. 2011. "Identification and expression analysis of the *Cyclamen persicum* MADS-box gene family", *Plant Biotechnology*, 28(2), 167-172.
- Tucker, S. C. 2003. "Floral development in legumes", *Plant Physiology*, 131(3), 911-926.
- Wang, G. Long, Y. Thomma, P.H.J., de Wit, J.G.M. Angenent, G.C., and Fiers, M 2009 'Functional Analyses of the *CLAVATA2*-Like Proteins and Their Domains That Contribute to *CLAVATA2* Specificity, *Plant Physiology*, January 2010, Vol. 152, pp. 320–331,
- Weigel, D. and Meyerowitz E. 1994. "The ABCs of floral homeotic genes", *Cell*, 78(2), 203- 209.

- Weigel, D. and Jürgens, G. (2002). Stem cells that make stems. *Natura*, 415: 751-754
- Simpson GG, Dean C (2002) *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science*, 296: 285–289.
- Wen, J., Li J., Walker, J.C. 2012. "Overexpression of a serine carboxypeptidase increases carpel number and seed production in *Arabidopsis thaliana*". *Food and Energy Security*, 1(1), 61-69.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W., and Someville, C.R. (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology*. 100
- Wojciechowski, MF 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective In: B.B. Klitgaard and A. Bruneau, editors. *Advances in Legume Systematics*, 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., & Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 346(6279): 35-39.
- Yanovsky, M. J., Mazzella, M. A., Whitlam, G. C., and Casal, J. J. (2001). Ressetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *Journal of Biology Rhythms*, 16: 523-530
- Zhang, D., Qui, L., Huang, L., Huang, L., Yu, X., G., Cao, J. (2011). Isolation and characterization of an anther-specific polygalacturonase gene, *BcMF16*, in *Brassica campestris* ssp. *Chinensis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, doi:10.1007/11105-011-0341-2.

İNTERNET KAYNAKLARI

<http://gutenberg.us/articles/carpel>

<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/crassul.htm>

http://mundani-garden.blogspot.com.tr/2012_02_01_archive.html

<https://www.flickr.com/photos/aking1/5909356480> Dr. Süleyman Cenkeci; Web sitelerine en son giriş tarihi 24.4.2016]

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sultan DEMİR ŞİMŞEK
Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir / 03.08.1991
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0537 977 9125 / karandel@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İzmir Hoca Ahmet Yesevi Lisesi, (2005-2008)
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, (2010-2014)