ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Hayat TOPÇU

ANTEPFISTIĞI ÇİÇEK TOMURCUKLARINDA ERKEK VE DİŞİ ORGANLARININ GELİŞİMİNDE ETKİLİ OLAN miRNA'LARIN BELİRLENMESİ VE EKSPİRESYONU

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTEPFISTIĞI ÇİÇEK TOMURCUKLARINDA ERKEK VE DİŞİ ORGANLARININ GELİŞİMİNDE ETKİLİ OLAN miRNA'LARIN BELİRLENMESİ VE EKSPİRESYONU

Hayat TOPÇU

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu Tez 16 / 07 / 2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

……..	……	……...
Prof.Dr. Salih KAFKAS	Prof.Dr. N. Ebru KAFKAS	Prof.Dr. Hakan ÖZKAN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE
……	……..	
Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ	Dr. Öğr.Üyesi. Murat GÜNEY	
ÜYE	ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2017-9232

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

ANTEPFISTIĞI ÇİÇEK TOMURCUKLARINDA ERKEK VE DİŞİ ORGANLARININ GELİŞİMİNDE ETKİLİ OLAN miRNA'LARIN BELİRLENMESİ VE EKSPİRESYONU

Hayat TOPÇU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Salih KAFKAS
Yıl: 2019, Sayfa: 137
Jüri : Prof. Dr. Salih KAFKAS
: Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS
: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
: Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ
: Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNEY

Çiçek açan bitkilerin büyük çoğunluğu hermafrodit çiçeklere sahip iken çok az bir kısmı ayrı ayrı erkek ve dişi bitkilere sahip olan dioik türleri içerir. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) dioik bir türdür ve rüzgârla tozlanır. Bu çalışmanın amacı, antepfıstığı dişi ve erkek çiçek tomurcukları içerisindeki cinsiyet organlarının büyüme ve gelişmelerini taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile izlemek ve cinsiyet organlarının gelişmesinde etkili olan miRNA'ları ve bunların hedeflediği genleri küçük RNA (sRNA) sekanslaması ile belirlemektir. SEM analizleri ve sRNA sekanslaması için ilkbaharda çiçek tomurcuklarının gelişmeye başlamasından itibaren bir sonraki yıl çiçek açıncaya kadar haftalık olarak örnekler alınmıştır. SEM analizleri sonucunda hem dişi hem de erkek çiçek tomurcuklarının gelişimlerinin ilk aşamalarında her iki cinsiyete ait organların oluştuğu ancak haziran ayı sonundan itibaren karşı cinsiyet organ gelişminin durduğu belirlenmiştir. İlkbaharda tomurcuk gelişiminin ilk aşamalarını kapsayan 10 dönemde ve çiçeklenme öncesi 3 dönemde alınan örneklerde sRNA sekanslaması yapılmıştır. Sekanslama soucunda dişi çiçek tomurcuklarından 159 ile 181 arasında bilinen ve 289 ile 360 arasında değişen sayılarda yeni mikroRNA (miRNA) belirlenmiştir. Erkek çiçek tomurcuklarında ise 134 ile 174 arası bilinen ve 224 ile 335 arasında değişen sayılarda yeni miRNA belirlenmiştir. Dişi ve erkek örnekler arasında 18 tanesi dişilerde ve 7 tanesi ise erkeklerde yüksek seviyede farklı ekspirese olan toplamda 25 adet miRNA belirlenmiş ve bunlar qRT-PCR ile valide edilmiştir. Farklı ekspirese olan miRNA'lardan 11 tanesinin Siirt çeşidi genomunda 78 adet ve Bağyolu genomunda 157 adet geni hedeflediği tespit edilmiştir. Hedeflenen genlerin bir kısmının farklı bitki türlerinde çiçek organlarının gelişmesinden sorumlu genler olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia,* SEM, miRNA, sekanslama, sRNA

ABSTRACT

PhD THESIS

DETERMINATION AND EXPRESSION OF miRNAs DURING DEVELOPMENT OF FEMALE AND MALE ORGANS IN THE INFLORESECENCE BUDS OF PISTACHIO

Hayat TOPÇU

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Salih KAFKAS
Year: 2019, Pages:137
Jury : Prof. Dr. Salih KAFKAS
: Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS
: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
: Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ
: Asst. Prof. Dr. Murat GÜNEY

The great majority of flowering plants are hermaphrodites, while only a few of them contain dioecious species having separate male and female plants. Pistachio (*Pistacia vera* L.) is a dioecious species and wind is pollinating agent. In this study, it was aimed to investigate the growth of sex organs in female and male inflorescence buds of pistachios by scanning electron microscopy (SEM) and to identify differentially expressed sex related miRNAs and their targeted genes during the bud development by small RNA (sRNA) sequencing. For SEM analyzes and sRNA sequencing, the buds were sampled weekly from the beginning of the development of flower buds in spring to until the next year before flowering. As a result of the SEM analysis, it was determined that both sexes were formed in the first stages of the development of both male and female inflorescence buds in the spring, while the opposite sex organ development was stopped after at the end of June. sRNA sequencing was performed in the samples collected in 10 periods covering the first stages of bud development in the spring and three periods before flowering. As a result of sRNA sequencing, known miRNAs changed from 159 to 181 and novel miRNAs were between 289 and 360 in female samples, while known miRNAs ranged from 134 to 174 and novel miRNAs were between 224 and 335 in male samples. A total of 25 differentially expressed miRNAs were identified between female and male samples: 18 of them were highly expressed in females while seven of them were highly expressed in males, and were validated by qRT-PCR. Eleven of differentially expressed miRNAs targeted 78 genes in female Siirt genome and 157 genes in male Bağyolu genome. It was determined that some of the targeted genes are responsible for the development of flower organs in different plant species.

Key words: *Pistacia,* SEM, miRNA, sequencing, sRNA

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) rüzgârla tozlanan ve dioik özelliğe sahip Anacardiaceae familyasının bir üyesidir. Antepfıstığı sert kabuklu bir meyve türüdür. Antepfıstığının besin değeri yüksek olması nedeniyle sağlık açısından oldukça önemli ve ticari değeri olan bir bitkidir. 2017 yılında en çok antepfıstığı üreten ülkeler sıralamasında; İran 574.987 ton ile birinci, ABD 272.328 ton ile ikinci, Çin 95.294 ton ile üçüncü, Türkiye 78.000 ton ile dördüncü ve beşinci olarak ise Suriye 56.508 ton üretimle ana üretici ülkeler arasında yer almıştır.

Dioik özelliğe sahip olan antepfıstığının çiçek tomurcukları bir önceki yıl meydana gelir ve hem erkek hem de dişi çiçek salkımları birkaç yüz çiçek içerir. Antepfıstığında stamen ve karpel primordiyumlarının hem erkek hem de dişi çiçek tomurcuklarının ilk gelişme aşamalarında oluştuğu ancak karşı cinsiyet organlarının gelişimlerinin erken aşamada baskılandığı daha önce yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. Dioik bitkilerin genel olarak birçok bağımsız yolla hermafrodit atalarından farklı evrimsel süreçlerle geliştiği varsayılmaktadır. Bitkilerde cinsiyetin belirlenme mekanizması karmaşık bir genetik ağın kontrolü altındadır. Dolayısıyla, cinsiyetin belirlenmesini kontrol eden mekanizmaların açığa çıkması ve bu süreçlerin moleküler temellerini anlamak önemli bir adımı oluşturmaktadır.

Bitkilerde sRNA'lar transkripsyon ve translasyon esnasındaki düzenlemelerde hedef mRNA'ya bağlanarak gen susturulmasında rol oynarlar. sRNA'ların birçoğu gelişim aşamalarında, çevresel sinyallere/streslerde, polen ve ovaryum gelişimi, bitkilerin çiçeklenme zamanları ve cinsiyet belirleme sistemlerinin düzenlenmesi sırasında gen ekspiresyonunun kontrolüne katılan genelde 21-24 nükleotit (nt) uzunluğundaki kısa RNA molekülleridir. Yüksek yapılı bitkilerde kodlanmayan gen susturma işleminde (RNAi) görev alan sRNA'ların iki önemli sınıfı; endojen temelli tek iplikli miRNA ve ekzojen tabanlı çift iplikli siRNA'lar yer almaktadır. miRNA'lar tamamlanmamış saç tokası

yapısına sahip öncüllerden üretilir ve hedef genlerini transkripsiyon sonrası seviyedeki mRNA bölünmesi veya translasyon inhibisyonu yoluyla susturur. miRNA'lar cinsiyet farklılaşmasında ve cinsiyet belirleyici kromozomal bölgenin karakterizasyonu ve bitkilerde cinsiyet belirlenmesinde önemli rollere sahiptirler.

Bu çalışmanın amacı, antepfıstığı dişi ve erkek çiçek tomurcuklarındaki cinsiyet organlarının büyüme ve gelişmelerini taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile izlemek ve cinsiyet organlarının gelişmesinde etkili olan miRNA'ları ve bunların hedeflediği genleri küçük RNA (sRNA) sekanslaması ile belirlemektir.

Bu çalışma kapsamında antepfıstığı çiçek tomurcuğu örnekleri 2016-2017 ile 2017-2018 dönemlerinde ilkbaharda çiçek tomurcuklarının gelişmeye başlamasından itibaren bir sonraki yıl çiçek açıncaya kadar haftalık olarak alınmıştır. Öncelikle çiçek tomurcuklarında SEM ile çiçek cinsiyet organlarının büyüme ve gelişme durumları incelenmiştir. SEM analizleri için örnekler farklı alkol konsantrasyonlarından geçirilerek kurutulmuş ve tomurcuk pulları temizlenerek cinsiyet organlarının görülür hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra taramalı elektron mikroskobunda incelenerek dişi ve erkek organ gelişimleri gözlemlenmiştir.

SEM çalışması kapsamında dişi Siirt ile erkek Kaşka antepfıstığı çeşitlerinin farklı dönemlerde alınan tomurcuk örneklerinde her iki cinsiyet organının büyüme ve gelişme durumları incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu kullanılarak her iki cinsiyete ait çiçek tomurcukları incelenmiş ve başlangıçta her bir cinsiyetteki bitkide karşı cinsiyete ait organ gelişiminin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında karşı cinsiyete ait organ gelişiminin mayıs ayının ortalarında tam çiçeklenmeden 42 gün sonra oluşmaya başladığı görülmüştür. Dişi çiçek tomurcuğu örneklerinde haziran ayı sonlarından itibaren stamen primordiyumlarının gelişmesinin baskılandığı ve durduğu görülmüştür. Erkek çiçek tomurcuklarındaki karşı cinsiyete ait organ gelişiminin de haziran ortalarından itibaren (tam çiçeklenmeden yaklaşık 2 ay sonra) durduğu ve bu aşamadan sonra SEM'de görülür bir değişiklik gözlemlenmediği belirlenmiştir.

SEM sonuçlarına göre, her iki cinsiyete ait çiçek tomurcuklarındaki karşı cinsiyet organının gelişim dönemleri ve gelişimin durduğu dönemler belirlenmiş ve bu dönemlere ait dişi ve erkek örneklerde karşı cinsiyete ait örneklerdeki cinsiyeti baskılayan genleri belirlemek amacıyla sRNA sekanslaması yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyonu qRT-PCR ile yapılmıştır.

sRNA sekanslaması sonucunda dişi çiçek tomurcuklarından 159-181 arası bilinen ve 289-360 arasında değişen sayılarda yeni miRNA'lar belirlenmiştir. Farklı dönemlerde alınan dişi çiçek tomurcuklarında ekspirese olan toplam miRNA sayısı ise 484 ile 539 arasında değişmiştir. Farklı dönemlerde alınan erkek çiçek tomurcuklarında ise 134 ile 174 arası bilinen ve 224-335 arasında değişen sayılarda yeni miRNA belirlenmiş ve toplam miRNA sayısı ise 393 ile 503 arasında değişmiştir. Dişi ve erkek çiçek tomurcukları arasında farklı ekspirese olan 25 adet miRNA'nın hiyerarşik kümeleme analizleri yapılmıştır. Bunlardan 18 tanesi dişilerde 7 tanesi ise erkeklerde farklı ekspirese olan 25 adet miRNA belirlenmiştir.

Dişilerde yüksek seviyede ekspirese olan miRNA'ların tamamı yeni bulunan miRNA'lar iken, erkeklerde yüksek seviyede ekspirese olan miRNA'ların altı tanesinin bilinen ve sadece bir tanesinin yeni bulunan miRNA olduğu belirlenmiştir. Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyonu qRT-PCR ile yapılmıştır. Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyon analizlerinde referans gen belirlenmesinde miRNA'ların sekanslama sonucu ortaya çıkan ekspiresyon değerlerine göre 3 farklı miRNA (miRn46, miRn224, miRn285) referans olarak seçilmiştir. Seçimde her örnekleme döneminde her iki cinsiyette de benzer ekspiresyon değerleri veren miRNA'lar seçilmiştir. RefFinder kullanılarak yapılan analizler sonucunda referans olarak miRn46 seçilmiştir.

Dişi ve erkek örnekleri arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların hedeflediği genler de belirlenmiştir. Hedef genlerin belirlenmesinde dişi Siirt ve erkek Bağyolu antepfıstığı çeşitlerinin genom dizileri kullanılmıştır. Farklı

ekspirese olan ve 25 bazdan daha kısa dizilere sahip olan 11 adet miRNA'nın Siirt çeşidi genomunda 78 adet ve Bağyolu genomunda 157 adet geni hedeflediği tespit edilmiştir.

Çeşitli transkripsiyon faktörleri hücresel ve metabolik yollarda yer alan genlerin ekspiresyonunu modüle ederek cinsiyet farklılaşmasında önemli rol oynarlar**.** Transkripsiyon faktörleri bitkilerde organ gelişimini yönlendiren düzenleyici kademelerin ana anahtarları olarak işlev görürler. Bu çalışmada farklı ekspirese olan miRNA'ların bazı transkripsiyon faktörlerini hedeflediği belirlenmiştir. Bu genlerin farklı bitki türlerinde cinsiyet gelişimi, çiçeklenme dönemine geçiş, polen ve embriyo oluşumu, stamen ve karpelin gelişimi ile ilgili genler olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada sonuç olarak, antepfıstığında erkek ve dişi çiçek tomurcukları içerisindeki cinsiyet organlarının gelişimi SEM ile incelenmiş ve küçük RNA sekanslaması ile çiçek organlarının gelişmesinden sorumlu bazı miRNA'ları ve bunların hedef aldığı genler belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle Doktora tez konumun belirlenmesinde, beni araştırmaya yönlendiren ve bugüne kadar yapmış olduğum çalışmalarda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Salih KAFKAS'a sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora'ya başladığım günden itibaren, ilgisini esirmeyen ve her konuda yardımları, fikir ve yorumlarıyla bana destek olan kıymetli jüri üyesi hocam Prof. Dr. Nesibe Ebru KAFKAS'a yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamda elektron mikroskobu çalışmalarımda bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Sinan ETİ ve Dr. Şenay KARABIYIK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli zamanlarını ve fikirlerini esirgemeyen değerli jüri üyeleri hocalarım Prof. Dr. Hakan ÖZKAN, Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ ve Dr. Öğretim Üyesi Murat GÜNEY'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen, laboratuvar analizlerimde bana yardımcı olan Bahçe bitkileri Moleküler Genetik Laboratuvarı ve Tarla Bitkileri Moleküler Genetik Laboratuvarındaki değerli arkadaşlarımın hepsine teker teker en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezim süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, beni sabır ve anlayışla karşılayan çok değerli annem Kezban TOPÇU ve diğer aile fertlerime (Nurşen KARCI, Gülşen ÖLKE ve Mehmet Ali TOPÇU) büyük fedakârlıklarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT I
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
2.1. Cinsiyet Belirlemede ve Cinsiyet Gelişimlerinin İzlenmesinde Taramalı Elektron Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar 13
2.2. Antepfıstığında Cinsiyet Belirleme ve Gen Ekspiresyonu ile İlgili Çalışmalar 15
2.3. Diğer Türlerde Yapılan Cinsiyet Belirleme ve Gen Ekspiresyonu ile İlgili Çalışmalar 19
2.4. MicroRNA'nın Cinsiyet Belirleme Mekanizmasındaki Yeri ve MicroRNA ile İlgili Çalışmalar 40
3. MATERYAL VE METOT 53
3.1. Materyal 53
3.1.1. Örneklerin toplanması 53
3.2. Metot 54
3.2.1. SEM Analizleri 54
3.2.1.1. Örneklerin Kurutulması 54
3.2.1.2. Örneklerin Taramalı Elektron Mikrokobunda (SEM) İncelenmesi 55
3.2.2. Küçük RNA sekanslaması ve gen ekspresyon analizleri 56

3.2.2.1. RNA izolasyonu 56
3.2.2.2. Biyoinformatik analizler 60
3.2.2.3. Farklı ekspirese olan miRNA'ların qRT-PCR ile ekspresyon analizleri 60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 63
4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Bulguları 63
4.1.1. Dişi Siirt Antepfıstığı Çeşidinin Çiçek Tomurcuklarında Cinsiyet Organlarının Gelişimi 63
4.1.2. Erkek Kaşka Antepfıstığı Çeşidinin Çiçek Tomurcuklarında Cinsiyet Organlarının Gelişimi 66
4.1.3. SEM İle İlgili Bulguların Genel Değerlendirilmesi 68
4.2. Antepfıstığında Cinsiyet Organlarının Gelişimi İle İlgili Küçük RNA'ların Belirlenmesi 69
4.2.1. Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcuklarında Küçük RNA Sekanslaması 70
4.2.2. Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcukları Arasında Farklı Ekspirese Olan Küçük RNA'ların Belirlenmesi 74
4.2.3. Farklı Ekspirese Olan miRNA'ların qRT-PCR İle Validasyonu 75
4.2.4. Farklı Ekspirese olan miRNA'ların Hedeflediği Genlerin ve İşlevlerinin Belirlenmesi 80
4.2.5. miRNA ile İlgili Bulguların Genel Değerlendirilmesi 105
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 111
KAYNAKLAR 115
ÖZGEÇMİŞ 137

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. RNA izolasyonunda kullanılan CTAB ekstraksyon tampon çözeltisinin içeriği 57
Çizelge 3.2. miScript® II RT Kit ile oluşturulan cDNA PCR döngü koşulları. 61
Çizelge 3.3. miScript® miRNA PCR kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilen miRNA qPCR analizleri döngü koşulları 62
Çizelge 4.1. Dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında örnek alma tarihlerine göre belirlenen bilinen, yeni ve toplam miRNA sayıları. 70
Çizelge 4.2. Dişi ve erkek örneklerde yeni ve bilinen miRNA'ların hedef genleri, bulundukları kromozom, genlerin görevleri, ve GO sınıflandırmaları. 81
Çizelge 4.3. *P. vera*'da bazı yeni ve bilinen miRNA'ların kodladıkları genlerin TF'lerinin Domainleri, TF'ler, görevleri. 99
Çizelge 4.4. *P. vera*'daki miRNA'ların hedeflediği bazı genlerin *A. thaliana*'daki homologları, görevleri ve ait oldukları TF domainleri. 104

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Antepfıstığı dişi çiçeklerin iki döneme ait örneklerin gelişiminin SEM'de incelenmesi ile elde edilen görüntüler. Ölçek = 50 urn..... 65

Şekil 4.2. Antepfıstığı erkek çiçeklerin iki döneme ait örneklerin gelişiminin SEM'de incelenmesi ile elde edilen görüntüler. Ölçek = 50 urn. 67

Şekil 4.3. Aktif büyüme döneminde alınan dişi çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları. 72

Şekil 4.4. Çiçeklenme öncesi dinlenme döneminde alınan dişi çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları. 72

Şekil 4.5. Aktif büyüme döneminde alınan erkek çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları. 73

Şekil 4.6. Çiçeklenme öncesi dinlenme döneminde alınan erkek çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları. 73

Şekil 4.7. Dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında çiçeklenme öncesi dinlenme döneminde ve çiçeklenme sonrası dönemlerde farklı şekilde ekspirese olan toplam miRNA'ların sayısı. 74

Şekil 4.8. Heatmap ile farklı şekilde ekspire olmuş miRNA'ların hiyerarşik kümeleme analizleri. 75

Şekil 4.9. NormFinder ile gen stabilitesinin sonuçları. 76

Şekil 4.10. Delta Ct metodu ile gen stabilitesinin sonuçları. 77

Şekil 4.11. pv_miRn377 miRNA'nın farklı dönemlerdeki qPCR analiz sonucu..... 78

Şekil 4.12. pv_miRn89 miRNA'nın farklı dönemlerdeki qPCR analiz sonucu ... 78

Şekil 4.13. miR157a-5p miRNA'nın farklı dönemlerdeki qPCR analiz sonucu..... 79

Şekil 4.14. miR156_2 miRNA'nın farklı dönemlerdeki qPCR analiz sonucu. 79

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	: Tam çiçeklenmeden önce
BF	: Tam çiçeklenmeden sonra
bp	: Base Pair
BGI	: Beijing Genomik Enstitüsü
Chr	: Kromozom
cM	: centiMorgan
CTAB	: Cetyl Trimethyl Amonyum Bromide
^{0}C	: Santigrad derece
C	: Hücresel bileşen
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Cycle threshold (Döngü Eğrisi)
dk	: Dakika
d/dk	: Devir/ dakika
dNTP	: Deoksi- Nükleozid Trifosfat
DEG	: Diffrentially Expressed Gene (Farklı ifade olan genler)
DEPC	: Dietilprokarbonat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Ethylenediamine tetra acetic acid
EST	: Expressed Sequence Tag (İfade dizisi etiketi)
F	: Moleküler fonksyon
FAO	: Food and Agriculture data (Gıda ve Tarım verileri)
GO	: Gen Ontoloji
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IPA	: Iran Pistachio Association (İran Antepfıstığı Derneği)
KEGG	: Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
M	: Molar

ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
NGS	: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Sekanslama)
ng	: Nanogram
P	: Biyolojik işlemler
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	: Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Power of Hydrogen(Hidrojenin gücü)
PTGS	: Transkripsyon sonrası gen susturma
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
RAPD	: Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNAseq	: RNA sekanslama
RNAi	: müdahale eden RNA
RISC	: RNA içeren susturma kompleksi
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
rRNA	: ribozomal RNA
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	: Küçük Müdahaleci RNA
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
snRNA	: küçük nükleer RNA
SSR	: Basit Dizi Tekrarları
sn	: Saniye
snoRNA	: küçük nükleolar RNA
sRNA	: küçük Ribonükleik Asit
TBE	: Tris/Borik asit/EDTA Tampon çözeltisi

TF	: Transkrisyon faktörü
TGS	: Transkripsyonel gen susturma
TUİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TRİS	: Trisaminometan
tRNA	: Taşıyıcı RNA
UV	: Ultraviole
µM	: Mikromolar
µl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Yaprağı döken, rüzgârla tozlanan ve dioik özelliğe sahip bir ağaç türü olan antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Anacardiaceae ailesinin bir üyesidir (**Kafkas, 2000**). Yaklaşık 73 cins ve 600 türden oluşan Anacardiaceae familyası, kaju (*Anacardium occidentale* L.), mango (*Mangifera indica* L.), ambarella (*Spondias dulcis* Forst.), zehirli sarmaşık ve zehirli meşe (*Toxicodendron spp*.), biber ağacı (*Schinus* spp.) ve sumak (*Rhus* spp.) gibi cinsleri içermektedir (**Hormaza ve Wünsch 2007**).

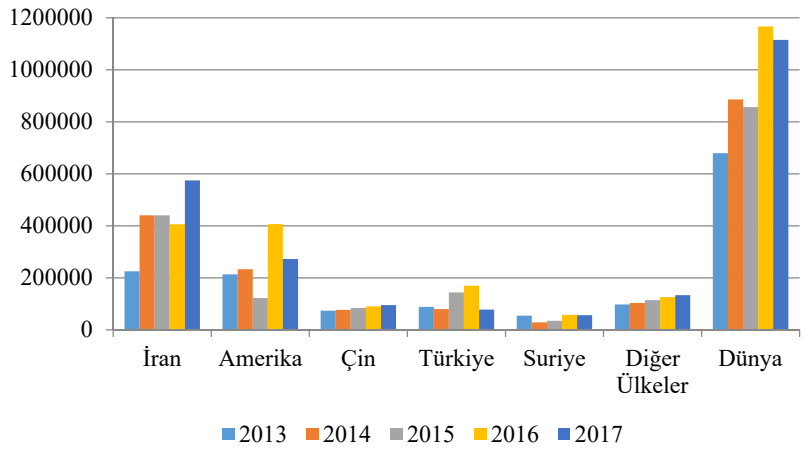
Zengin gen havuzu, geniş genetik farklılığı ve en önemlisi kuraklığa iyi adaptasyonlarından dolayı bu familyaya giren türler oldukça önemlidir (**Moyo ve Staden 2013**). *Pistacia* cinsi yaklaşık 13'ten fazla tür içermektedir ve sadece *Pistacia vera* L. türü ekonomik değere sahiptir. Diğer türler yabani türler olup bazıları antepfıstığına anaç olarak kullanılmaktadır (**Kafkas ve Perl-Treves 2002; Kafkas ve ark, 2006a**).

Antepfıstığı meyvesi etli bir ekzokarp ile mesokarp (dış kabuk) ve sert bir endokarp ile sert kabuklu bir meyve türüdür. Meyvenin olgunlaşması ile sert kabuğu çıtlayabilen (çıtlak) ya da çıtlamayan çeşitleri bulunmaktadır. Ticari değere sahip antepfıstığında çıtlama oranı yüksek çeşitler tercih edilir (**Hormaza ve Wünsch 2007**).

MÖ 6.000 yıllarına dayanan kökeni ile antepfıstığı Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilmesine rağmen, muhtemel kökeninin orta ve güneybatı Asya olduğu bildirilmiştir. Antepfıstığının köken olarak kültür formlarının ilk yetiştiriciliği eski Pers İmparatorluğunda başlamış (**Hormaza ve Wünsch 2007**) ve ardından Anadolu, Suriye ve Afganistan'da da yabani formları kültüre aldıkları belirlenmiştir. Antepfıstığı günümüzde 30-45 güney-kuzey paralelleri arasında ve genellikle kuzey yarım kürede, mikroklima olarak ifade edilen alanlarda yetiştirilmektedir (**Tunalıoğlu ve Taşkaya 2003**).

2017 yılı FAO verilerine göre dünyada en çok antepfıstığı üreten ülkeler sıralamasında İran 574.987 ton ile birinci, ABD 272.328 ton ile ikinci, Çin 95.294

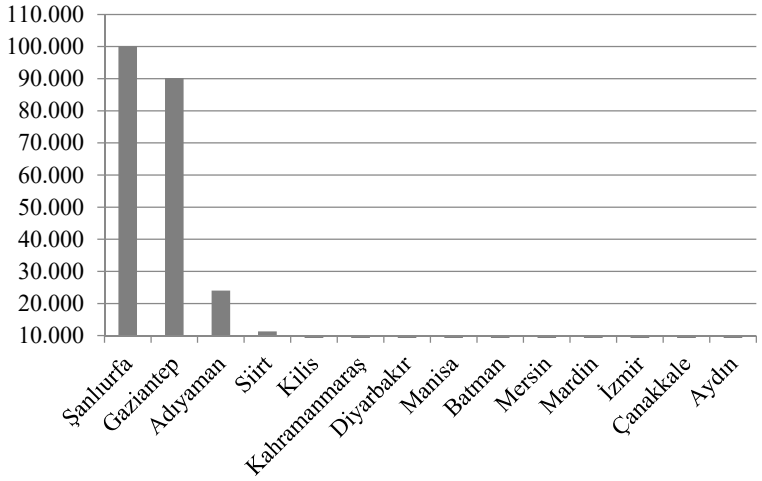
ton ile üçüncü, Türkiye 78.000 ton ile dördüncü, ve beşinci olarak ise Suriye 56.508 ton üretimle ana üretici ülkeler arasında yer almıştır. Diğer ülkeler toplamda 133.280 ton üretim yaparken, 2017 yılında dünyadaki toplam antepfıstığı üretimi 1.115.066 ton olmuştur. (**Faostat 2019**). FAO'nun son beş yıllık verilerine göre dünyada antepfıstığı üretim miktarları (ton) Şekil 1.1'de verilmiştir



Şekil 1.1. Son beş yıllık verilere göre dünyada antepfıstığı üretim miktarları (ton) (FAO, 2019).

Türkiye'de yaygın olarak 6 adet yabani *Pistacia* türü (*Pistacia khinjuk* Stocks, *Pistacia eurycarpa* Yalt., *Pistacia atlantica* Desf., *Pistacia terebinthus* L., *Pistacia palaestina* Boiss. ve *Pistacia lentiscus* L.) daha bulunmaktadır (**Zohary 1952; Kafkas ve ark, 2006a**). *Pistacia chinensis* Bunge, *Pistacia integerrima* Stewart, *Pistacia texana* Swingle, *Pistacia mexicana* HBK ve *Pistacia weinmannifolia* Poisson, *Pistacia* cinsine ait diğer yabani türlerdir. Genellikle anaç olarak kullanılan bu türlerin bazıları aynı zamanda orman bitkisi olarak da kullanılır ve daha küçük olan meyveleri çıtlama özelliği göstermez (**Parfitt ve Badenes 1997; Kafkas ve ark, 2006b**). Türkiye 56 ilinde antepfıstığı yetiştiriciliği ile dünyada en fazla antepfıstığı üreten ülkelerden biridir. *Pistacia* türlerinin yabani ağaçları Anadolu'nun hemen hemen her yerinde yetişir. Şekil 1.2'de görüldüğü gibi

TUİK 2019 verilerine göre antepfıstığının Türkiye'deki asıl üretim alanı olan iller özellikle Şanlıurfa, Gaziantep, Siirt, Adıyaman, Kilis ve Kahramanmaraş'dır.



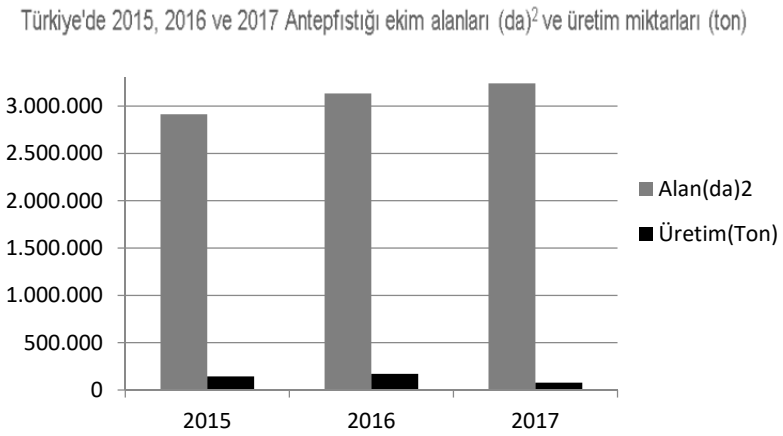
Şekil 1.2. Antepfıstığının Türkiye'deki üretim alanları (TUİK, 2019)

FAO verilerine göre dünyada en çok antepfıstığı üretimi yapan ülkelerden biri olan ABD, ıslah programlarında dişi çeşitlerden 'Kerman' ve erkek çeşitlerden 'Peters' en çok kullanılan çeşitler arasında yer almaktadır (**Kafkas 2019**).

Dünyanın en çok üretim yapan diğer bir ülke olan İran, 70'den fazla dişi antepfıstığı çeşidi ile dünyadaki en önemli antepfıstığı genetik kaynaklarına sahip ülkeekrden biridir. En iyi bilinen İran antepfıstığı çeşitleri, "Kalleghouchi", "Akbari", "Momtaz", "Badami Zarand", "Beyaz Fıstık Nogh", "Ahmad Aghaei", "Ohadi", "Khanjari Damghan", "Shapesand Damghan" ve "Qazvini" çeşitleridir (**IPA 2019**).

Antepfıstığı yetiştiriciliğinde ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen dişi antepfıstığı çeşitleri Uzun, Kırmızı, Halebi, Ohadi ve Siirt olup bunların tozlayıcısı da Uygur, Kaşka ve Atlı erkek çeşitleridir (**Kafkas 2019**). Bu çeşitlerden Uzun, Kırmızı ve Halebi çeşitleri uzun daneli, iç renginin koyu yeşil olması ve olağanüstü tat ve aromasından dolayı özellikle tatlı ve pasta yapımı ile çikolata ve şekerleme

sanayisinde tercih edilmektedir. Siirt ve Ohadi çeşitlerinin meyveleri ise çıtlama oranları yüksek, yuvarlak daneli ve iri olmaları nedeniyle, özellikle çerezlik olarak tercih edilmektedir (**Anonim 2001**). Türkiye'de üretimin yaklaşık olarak %90-95'ini Güneydoğu Anadolu bölgesi karşılamaktadır. Türkiye'de antepfıstığı yetiştirilen bölgelerin Şekil 1.3.'te 2015, 2016 ve 2017'de ekim alanları (da) ve üretim miktarları (ton) verilmiştir (**TUİK 2019**).



Şekil 1.3. Türkiye'de 2015, 2016 ve 2017 Antepfıstığı ekim alanları (da) ve üretim miktarları (ton). (TUİK 2019).

Antepfıstığının kansere karşı koruyucu bir işlevi olan polifenolik antioksidan bileşikleri (örn. resveratrol) içerdiği (**Martínez ve ark, 2007; Dudley ve ark, 2008**) viral ve fungal enfeksiyonların yanısıra hipertansiyon gelişme riskini (**Djoussé ve ark, 2009**), kardiyovasküler bozuklukları (**Kris-Etherton ve ark, 2008**), dejeneratif sinir ve Alzheimer gibi hastalıkları azalttığı belirtilmiştir (**Tokusoglu ve ark, 2005; Ballard ve ark, 2009**). Bununla birlikte, antepfıstığı meyvesi insan sağlığı üzerinde birçok yararlı etkiye sahip olan kateşin, epikateşin ve kuersetin gibi mükemmel bir flavonoid kaynağıdır (**Kris-Etherton ve ark, 2002**).

P. vera genomunun 17-mer K-mer analizleri ile yaklaşık 600 Mb büyüklüğünde (**Motalebipour ve ark, 2016**) olduğu ve n = 15 kromozoma sahip (**Ila ve ark, 2003**) olduğu bilinmektedir. Antepfıstığı bahçelerinde tam verim elde etmek için bitkilerin %5-10'unun erkek bitki olması gereklidir (**Kafkas ve ark. 2006b**).

Dioik bir bitki türü olan antepfıstığının çiçek tomurcukları bir önceki yıl meydana gelir ve hem erkek hem de dişi çiçek salkımları birkaç yüz çiçek içerir (**Crane ve Iwakiri 1981**). Antepfıstığında stamen ve karpel primordiyumlarının hem erkek hem de dişi çiçek tomurcuklarının ilk gelişme aşamalarında oluştuğu ancak karşı cinsin organlarının gelişimlerinin erken aşamada baskılandığı daha önce yapılan bir çalışmada belirlenmiştir (**Hormaza ve Polito 1996**).

120.000 bitki türünün olduğu kapsamlı bir cinsiyet kataloğunda hermafroditlerin yaygın olduğu görülmektedir. Bu da incelenen türlerin yaklaşık olarak %72'sini temsil etmektedir. Bu sonuca göre bütün angiospermlerin (kapalı tohumlular) 1/10'unun monoik (%4) ve dioikleri (%6) içerdikleri tespit edilmiştir Türlerin %10'u hem uniseksüel (tek cinsiyetli) hemde biseksüel (çift cinsiyetli) çiçekleri içermektedir. Cinsiyet dimorfizminin (erkek ve dişi bireylerin morfolojik olarak farklı olması) ara formları, incelenen türlerin %7'sini temsil etmekte ve androik (erkek) ve ginoik (dişi) gibi cinsiyetleri içermektedir (**Dellaporta ve ark, 1993**). *Pistacia* (Anacardiaceae) türlerinin hepsinin dioik özelliğe sahip olmasına karşın, literatürde istisnai olarak farklı çiçek tiplerine sahip *Pistacia* ağaçlarının bulunduğu belirtilmiştir (**Özbek ve Ayfer 1958; Crane 1974; Kafkas ve ark, 2000**),

Cinsiyet kromozomlarının eski bir çift otozomdan türediği ve sınırlı sayıda dioik angiospermlerden geliştiği düşünülmektedir (**Charlesworth 1991; Charlesworth 2002**). Dioikliğin kendine verimli olmayan uzak akraba türleri ile çaprazlanması sonucu ortaya çıkmış olabileceği ve birçok bitki familyasında ve cinsinde hermafroditliğin atalarından bağımsız olarak ortaya çıktığı iddia edilmiştir (**Sun ve ark, 2002; Charlesworth 2016**). Antepfıstığında yapılan metafaz

aşamasındaki kromozom sayımları sonucunda, diğerlerine göre büyük bir kromozom çiftine sahip olduğu belirlenmiştir (**Ghaffari and Harandi 2002; Ila ve ark, 2003**). Son yıllarda **Sola-Campoy ve ark (2015)** antepfıstığı kromozomlarının moleküler sitogenetik özelliklerini tanımlamış ve bir çift büyük kromozomun olduğu tekrardan ortaya konulmuş ve araştırıcılar bunun cinsiyet kromozomu olduğunu hipotez etmiştir. Cinsiyet kromozomlarının incelenmesi bu özel kromozomların keşfedildiği 1800'lerin sonunda ve 1900'lerin başında başlamış ve günümüzde cinsiyet kromozomu evriminde yer alan genel adımlar belirlenmiştir. Bitkilerin çoğu ortak özellikleri ve evrimsel yakınlıklarından dolayı cinsiyet kromozomlarının belirlenmesinde etkileyeci bir örneği temsil etmektedirler. Cinsiyet kromozomlarının evrimleşme süreci yıllar boyunca büyük ilgi görmüştür (**Abbott ve ark, 2017)**.

1970'li yıllara kadar modern kromozom evrimi ile ilgili teoriler devam etmiştir. Bu dönemde cinsiyet kromozomlarının otozomlardan geliştiği bilinmektedir. Rekombinasyonun baskılanması yoluyla, morfolojik olarak benzer olmayan (heteromorfik) cinsiyet kromozomlarının gelişimine, dozaj telafisine ve Y'nin (veya W) nihai dejenerasyonuna yol açtığı savunulmuştur. Bunu, 1960'ların sonlarından 1980'lerin sonlarına doğru, esas olarak Y kromozom dejenerasyonunun ve rekombinasyon baskılanmasını tercih eden seçici ajan olarak cinsiyet antagonistinin (bir cinsiyette faydalı olan, diğerinde olmayan lokuslar) nedenlerine odaklanan bir teori izlemiştir. Cinsiyet antagonistik lokusların geniş anlamda varlığı Fisher tarafından önceden tahmin edilmiştir (**Fisher 1931**). Cinsiyet kromozomlarının evrimi hakkındaki teoriler rekombinasyona ve dolaylı olarak da cinsiyete özgü avantajlar sağladığı belirtilmiştir (**Abbott ve ark, 2017**).

Bitkiler çoğu zaman biseksüel (çift cinsiyetli) atalardan üniseksel (bir cinsiyete sahip) çiçeklerin ortaya çıkmasından dolayı, cinsiyet belirlemenin evrimini çalışmak için eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Üniseksüel çiçek evriminin süreci en az iki bağımsız olay gerektirdiği varsayılmaktadır. İlk değişim dioik dişi bir populasyonda sonuçlanan erkek kısırlığa sebep olan bir mutasyondur (gynocy)

(**Lloyd 1975**). Özellikle türlerin kendine verimliliğinden dolayı, erkek kısırlığın dişi kısırlıktan fazla olması daha muhtemeldir. Erkek fonksyonunun genetik olarak dişi fonksyonundan daha az olduğu (polenlerin ovüle ulaşma eksikliği) anlamına gelmektedir (**Charlesworth 1978**). Bazı çalışmalarda da dioik bitkilerin ginodioik atalardan evrimleştiği belirtilmiştir. Nükleer faktörlerin sebep olduğu kısır erkek olan gynodioik türler en tipik olanıdır (**Darwin 1877; Lewis 1942; Westergoard 1958; Ross 1970; Lloyd 1974**).

Bitkilerde bütün cinsiyet mekanizmasının ortak bir kökene sahip olduğu ifade edilmiştir. Belirlenen mekanizmanın temelinin bitkiden bitkiye değiştiği vurgulanmıştır. Morfolojik ve fizyolojik çalışmalarda uygun olmayan cinsiyet gelişiminin baskılanması cinsiyet organ gelişimlerinin bazı safhalarında belirlenmiştir. Bu safhalar uygun olmayan organ gelişiminin daha sonraki aşamalarını baskılamak için farklı moleküler mekanizmalar tarafından kontrol edildikleri belirlenmiştir (**Dellaporta ve ark, 1993**).

Günümüzde yeni nesil sekanslama teknolojisinin (NGS) geliştirilmesi genom ve transkriptomların daha derinden anlaşılmasına olanak sağlanmıştır. Cinsiyet kromozomu ve cinsiyet belirleme çalışmaları birçok türde hızla devam ederken, birçok bitkide cinsiyet belirleme çalışmaları yapılabilir duruma gelmiştir. (**Blaser ve ark, 2014**). Bununla birlikte, en devrim yaratan teknolojik gelişmeler uzun okuma dizileme teknikleridir. Bu yöntemler, genel olarak ve yapısal olarak zor bölgelerde (örneğin Y ve W) (**Tomaszkiewicz ve ark, 2017**), özellikle genom düzeneklerini iyileştirecek, hareket edilebilir elemanların rolü ve cinsiyet kromozomundaki evrimsel ve yapısal değişiklikler dâhil birkaç hipotezin test edilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca, tam uzunluktaki transkriptlerin izoform (farklı genler tarafından kodlanan, genel aktiviteleri aynı olan) sekansları cinsiyete özgü ekzon kullanımına ve dozaj telafisi ve gen susturma ile ilgili tahminlere ışık tutabilecektir (**Kim ve ark, 2017**). Son olarak, kromozom düzenlenmesinde yakalama gibi teknikler (ör. Hi-C teknolojisi), cinsiyetle bağlantılı genlerin otozomlardaki ekspiresyonlarını ve gen etkileşimlerini anlamamıza yardımcı

olacaktır (**Mifsud ve ark, 2015; Ezaz ve ark, 2017**). Bu yeni teknolojiler tarafından üretilen verilerin, bu zamana kadar ileri sürülen hipotezlerin test edilmesine olanak sağlayacağına ve yeni teorilerin geliştirilmesine yol açacağına inanılmaktadır (**Abbott ve ark, 2017**).

Bu yeni teknikler kullanılarak birçok bitkide cinsiyet belirleme çalışmaları yapılmıştır. Model bitkiler ve model olmayan bitkileri içeren *Silene latifolia* (**Scutt ve ark, 1997; Kim ve ark, 2010**), *Actinidia chinensis* (**Saito ve ark, 2007**), papaya (**Urasaki ve ark, 2012; Aryal ve ark, 2014; Tang ve ark, 2017; Lee ve ark, 2018**), *C. permisson* (A**kagi ve ark, 2014**), *Vitis* (**Ramos ve ark, 2014**), *Quercus suber* (**Rocheta ve ark, 2014; Sobral ve ark, 2017**), *Salix* (*willow*) ve *Populus* (*poplar*) (**Hou ve ark, 2015; Chen ve ark, 2015**), *Asparagus officinalis* (**Tsugama ve ark, 2016**), koniferler (**Duan ve ark, 2017**), African oil palm (**Ho ve ark, 2017**), *Vitis vinifera* ssp. (**Jesus ve ark, 2017**), *Jatropha curcas* (**Gangwar ve ark, 2016; Hui ve ark, 2017**), *P. vera* (**Kafkas ve ark, 2015; Sola-Campoy ve ark, 2015; Khodaeiaminjan ve ark, 2017**), *Castanea henryi* (**Jia ve ark, 2018**), hıyar ve kavun (**Tao ve ark, 2018**), *Actinidia arguta* (**Chunli ve ark, 2018**) ve *Populus balsamifera* (**Sanderson ve ark, 2019**) gibi birçok bitkide farklı moleküler metotlar kullanılarak cinsiyet belirleme ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bitkilerin cinsiyetlerinin belirlenmesi bitkilerde hem yetiştiricilik hem de ıslah programları için gereklidir. Bununla birlikte, morfolojik olarak genç bitkilerin cinsiyetini belirlemek zordur, çünkü dişi ve erkek bitkiler oldukça benzerdirler. Antepfıstığı ağaçlarının çok uzun bir gençlik kısırlık dönemi olduğundan; ıslah programlarında ilk çiçeklenmenin görülmesi yaklaşık 5-15 yıl sürmekte ve bu nedenle çeşit ıslah programlarının süresi uzun ve maliyetli olmaktadır. Bu durum da yeni çeşitlerin geliştirilmesinde sınırlayıcı bir faktör olmaktadır (**Khodaeiaminjan ve ark, 2017**).

Genellikle tek cinsiyete sahip türlerin farklı evrimsel süreçler boyunca ve farklı evrimsel zorlukları takiben hermafrodit atalardan evrimleşmiş olabileceği düşünülmektedir (**Bawa 1980; Thomson ve Brunet 1990; Hormaza ve Polito**

1996). Yapılan çalışmalarda da gözlemlendiği gibi birçok dioik bitkide, cinsiyet ifadesini içeren genetik faktörler, özellikle erken safhada hem dişi hem de erkek çiçeklerin gelişiminin gözlemlendiği belirlenmiştir. Yani çiçek gelişiminin başlangıcında çiçekte mevcut her iki cinsiyete ait izler bulunurken gelişimin tamamlanması ile karşı cinsiyete ait izlerin yok olduğu görülmektedir. Çiçek gelişiminin devamı ve tamamlanması sonucu dişi bitkilerde erkek organları oluşturan yapıların bazı genler tarafından baskılandığı ya da ifadesinin engellediği, tam tersi olarak da erkek bitkilerde dişi organları oluşturan yapıların bazı genler tarafından baskılandığı ya da ifadesinin engellediği düşünülmektedir (**Dellaporta ve Calderon-Urea 1993; Grant ve ark, 1994**).

Canlılarda gerçekleşen DNA'daki bilgiyi RNA'ya aktaran (transkripsyon) ve bu bilgilerin proteinlere çevrilmesinde (translasyon) görev alan mRNA ve kodlanmayan uzun ve kısa RNA'lar bulunmaktadır. Küçük RNA'lar ise gelişme ve çevresel adaptasyon sırasında gen ekspiresyonunun kontrolüne katılan, 21-24 nükleotit (nt) uzunluğundaki kısa RNA molekülleridir (**Deng ve ark, 2018**).

Büyüklüklerine göre uzun kodlanmayan RNA'lar (200 nükleotitten fazla) ve kısa kodlanmayan RNA'lar (200 nükleottiten kısa) olmak üzere ikiye ayrılırlar. RNA'ların yaklaşık olarak %98'i kodlanmayan RNA olarak adlandırılan; tRNA (taşıyıcı RNA), rRNA (ribozomal RNA), snRNA (küçük nükleer RNA), snoRNA (küçük nükleolar RNA), miRNA (mikroRNA**)** ve siRNA'ları (küçük müdahale eden RNA) oluştururken, %4 kadarı ise proteine çevrilen mRNA'yı (mesajcı RNA) oluşturmakta (**Ataç ve Verdi, 2013**) ve bu kodlanmayan RNA'ların %70'i intronlardan oluşmaktadır (**Wang ve ark, 2018**).

Transkripsyon ve translasyon esnasındaki düzenlemelerde kodlanmayan RNA'lar hedef mRNA'ya bağlanarak gen susturulmasında rol oynarlar. mRNA'ya komplementer bir antisense (hedef genin RNA ipliğine (sense) spesifik olarak bağlanabilen zincir) iplik mRNA ile birleşerek bu oluşan hibrit zincir hücrede yabancı olarak algılanır ve hatalı mRNA zinciri, translasyona girmeden yok edilir. Böylece gen ifadesinin moleküler düzenlenmesi engellenmektedir. Bütün bu

düzenlemeler RNA interferans (müdahale eden RNA=RNAi) mekanizması ile sağlanmaktadır (**Chen ve ark, 2014**).

RNA interferans, çift iplikli RNA'nın transkripsiyon sonrasında gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alırlar. Hücreye giren çift iplikli RNA, homolog mRNA zincirini degrede eder ve transkripsyon sonrası gen susturma böylece gerçekleşmiş olur (**Aras ve ark, 2015**). Gen susturma mekanizması hücrede, çekirdekte ve sitoplazmada gerçekleşmektedir. Çekirdekte transkripsyon esnasında transkripsyonun engellenmesiyle gen susturulması gerçekleşirken, sitoplazmada transkripsyon esnasında mRNA'ların kesilmesiyle, translasyon esnasında ise translasyonun engellenmesi ile gen susturma gerçekleştirilir (**Güzelgül ve Aksoy 2009**).

Yüksek yapılı bitkilerde kodlanmayan gen susturma işleminde (RNAi) görev alan küçük RNA'ların iki önemli sınıfı; endojen temelli tek iplikli miRNA ve ekzojen tabanlı çift iplikli siRNA'lar yer almaktadır (**Deng ve ark, 2018**).

siRNA'lar uygun mRNA degredasyonu için rehber zincir olarak kalıp görevi görürler. Çift zincirli RNA'lar RNAse III ailesi üyesi DICER enzimi tarafından 5' fosfat ucundan ve 3' hidroksil ucundan 2-3 nükleotitlik çıkıntı bulunacak şekilde kesilerek siRNA'ları meydana getirirler (**Zamore 2004; Elbashir ve ark, 2001**). Meydana gelen çift iplikli siRNA'lar endonükleaz aktivitesine sahip multi protein kompleksi olan RISC ile birleşirler. RISC kompleksi yapısında endonükleazlar, ekzonükleazlar ve helikaz enzimlerini barındırmaktadır. RISC kompleksinin protein bileşenlerinden biri Argonaute ailesidir. Argonaute proteinleri PAZ ve PIWI domainlerini içermektedir. PAZ domaini rehber zincirdeki 3' ucuna bağlanmada görevliyken, PIWI domaini hedef mRNA'nın kesilmesinden sorumludur (**Agrawal ve ark, 2003; Karagüzel ve ark, 2007; Khanna ve ark, 2007; Filipowicz 2005**).

Gen susturulması işleminde görev alan bir diğer küçük RNA ise mikroRNA'lardır. MikroRNA'lar transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenlenmesinden sorumludurlar. MikroRNA'lar tamamlayıcı mRNA hedeflerinin

ifadesini ve kararlılığını önleyen, endojen kodlanmayan küçük RNA'lardır (**Ketting 2011**). Standart olarak miRNA'lar uzun primer transkriptlerden bir dizi nükleotik bölünme ile işlenir ve sonuçta fonksiyonel RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) oluşturmak için Argonaute proteinlerine bağlanırlar (**Ha ve Kim 2014**).

Tipik olarak saç tokası yapısından kaynaklanan miRNA öncüleri 60-70 bazlık transkriptler şeklinde sentezlenirler. Bu uzun pre-miRNA bir ya da daha fazla miRNA kodlayabilirler. Pri-miRNA'lar RNase III enzimi Drosha tarafından 20 ila 24 nt parçalara ayrılarak pre-miRNA'ları oluştururlar. Pre-miRNA'lar nükleustan nüklear transport ile taşınarak sitoplazmaya aktarılırlar. Oluşturulan pre-miRNA'lar bir RNase olan DICER enzimi tarafından miRNA duplekslerine dönüştürülür. DICER enzimi ile kesilerek oluşturulan kısa çift zincirli RNA, hedef mRNA'ya bağlanmak için RISC faktörü ile etkileşime geçerler. Oluşan bu miRNA'lar bitkilerde transkripsiyon faktörlerini, strese cevap proteinlerini ve bitkilerin büyümesi, gelişmesi ve fizyolojisi için gerekli diğer proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenlerler (**Rogers ve Chen 2013**). Bitkilerde çiçek gelişimi ile ilgili olarak miRNA'ların vejetatif fazdan generatif faza geçişi (**Aukerman ve Sakai 2003; Achard ve ark, 2004; Spanudakis ve Jackson 2014**), cinsiyet belirleme (**Chuck ve ark, 2007**) ve çiçek organlarının gelişimini (**Aukerman ve Sakai 2003; Zhu ve ark, 2009; Liu ve ark, 2010**), hedef haberci RNA'ların (mRNA'lar) ayrılması (**Guo ve ark, 2005; Li ve ark, 2014**) ve translasyonun baskılanmasını (**Chen 2004; Li ve ark, 2013**) etkiledikleri belirtilmiştir.

Bütün bu olaylar transkripsiyon veya translasyon sonucunda genlerin ifadelerinin baskılanması veya aktifleştirilmesi ile canlılardaki gen ifadelerini düzenlemektedir. Gen ekspresyonunu aktifleştiren veya baskılayan indüklenebilir sistemler gen fonksiyonunun belirlenmesinde ve bitki biyoteknolojisinde birçok potansiyel uygulamaya sahiptir (**Padidam 2003**).

Bu çalışmanın amacı, antepfıstığında erkek ve dişi çiçek tomurcukları içerisindeki cinsiyet organlarının gelişim sürecini taramalı elektron mikroskobu ile incelemek ve küçük RNA sekanslaması ile çiçek organlarının gelişmesinden sorumlu miRNA'ları ve bunların hedef aldığı genleri belirlemektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Cinsiyet Belirlemede ve Cinsiyet Gelişimlerinin İzlenmesinde Taramalı Elektron Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar

Dioik özelliği taşıyan *Pistacia vera* L.`nin stamen ve pistil gelişimi, çiçek organlarının farklılaşmasının fenolojisi ve organ şekillenmesinin belirlenmesini SEM kullanarak incelemeler yapan **Hormaza ve Polito (1996)** karşı cinsin organlarının gelişimlerinin engellenmesiyle tek cinsiyetli çiçeklerin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Dişi ve erkek tomurcuklarında çiçeklere ait meristemlerin ilk gelişim safhalarının benzer olduğu belirtilmiş fakat daha sonra ayrımın çok net olduğu gözlenmiştir.

Gemlik zeytin çeşidine ait ağaçlardaki çiçek tomurcuğu farklılaşması (morfolojik ayrım) ve gelişimini saptamak için SEM kullanan **Barut ve Ertürk (2002)**, tomurcuk örneklerini ekim ayının sonundan çiçeklenme periyoduna kadar 10 günlük aralıklarla alarak, FAA (Formalin/Glasiyal Asetik Asit/Alkol-5/5/90) eriyiğinde sabitlemişlerdir. Daha sonra örnekler parafine gömülerek, kesit alınmış ve mikroskop altında incelenmiştir. İncelemelerin sonucunda çiçek tomurcuklarının morfolojik ayrım dönemi ve çiçek tomurcuğunun çanak yaprak taslaklarının oluşumunun şubat ayının 3. haftasında, taç yaprak ve erkek organ taslaklarının oluşumunun Mart ayı ortalarında ve tohum taslaklarının görüldüğü dönemin de Nisan ayının ikinci haftasında olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak tomurcuklardaki morfolojik ayrımın şubat ayının ilk haftasında, tohum taslaklarının görülmesinin de Nisan ayının ortalarında olduğunu saptamışlar.

0900 Ziraat Kiraz (*Prunus avium* L.) ve şeftali çeşidi Glohaven (*Prunus persica* L.) çiçek tomurcuklarındaki çiçek organ taslaklarının oluşumu ve gelişimi **Engin ve Ünal (2007)** tarafından SEM ile incelenmiştir. Çalışmada kiraz ve şeftali çiçek tomurcuklarındaki çiçek organ taslaklarının gelişim dönemlerini belirlemek ve büyüme konisindeki şekilsel değişimlerin ayrıntılarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Kiraz çiçek tomurcukları, 26 Haziran'dan 24 Ağustos tarihine kadar

10’ar gün arayla alınarak, FAA (formalin, etil alkol, asetik asit) (10:50:5) ortamında fikse edilmiştir. Şeftali tomurcukları da 28 Haziran’dan itibaren 16 Eylül tarihine kadar alınarak aynı ortamda muhafaza edilmiştir. 0900 Ziraat kiraz çeşidinin çiçek tomurcuklarında morfolojik ayrım, 5 Temmuz tarihinde anthesisden 85 gün sonra meydana gelmiştir. Çiçek primordiyumu 15 temmuz tarihinde şekillenmiştir. Çanak yaprak taslakları 25 Temmuz’da anthesisten 15 hafta sonra, taç yaprak taslakları da 4 ağustosta oluşmuştur. Erkek organ taslakları 4-24 Ağustos tarihleri arasında farklılaşmıştır. Bütün organ taslakları, ağustos ayı sonunda şekillenmiştir. Glohaven şeftali çeşidinin çiçek tomurcuklarında morfolojik ayrım 8 Temmuz tarihinde anthesisten 109 gün sonra olmuştur. Morfolojik ayrımdan sonra sırasıyla çanak yaprak, taç yaprak, erkek ve dişi organ taslakları oluşmuştur. Çanak yaprak taslakları 17 Ağustos’ta anthesisden 149 gün sonra, taç yaprak taslakları 27 Ağustos’ta anthesisten 159 gün sonra ve erkek ve dişi organ taslakları 16 Eylül’e kadar oluşmuştur. Çiçek organ taslaklarının tamamı eylül sonunda normal şekillerini almışlardır.

Dendrocalamus latiflorus (Bambusease, Bambusoideae, Poaceae), tropikal ve subtropikal bölgelerde ekonomik ve ekolojik olarak önemli bir bambu türüdür. **Zhang ve ark (2014)** *D. latiflorus'*ta çiçek başlangıcı ve erken çiçek gelişimini incelemek için morfolojik özellikleri ve gen ekspiresyon profillerini değerlendirmişlerdir. Bitki tomurcukları ve çiçek organ oluşumu ile ilgili ayrıntılı morfolojik çalışmalar parafin kesit ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Stamen ve pistil primordiyumlarının gelişimi çiçek tomurcuklarının 3 mm iken başladığı belirlenmiştir. Ayrıca sırasıyla, AP1, TFL1, RFL, PpMADS1, PpMADS2, SPL9, FT, ID1, FCA ve EMF2 dahil olmak üzere çiçek geçişi ile ilişkili genlerin homologları, bitki ve çiçek tomurcuklarında RT-PCR ile tespit edilmiş ve ölçülmüştür. Araştırmacılar, bu kombine analizlerin, bitkide üreme fazına geçişi izlemek için anahtar aday belirteçlerin bulunmasını sağladığını ifade etmişlerdir.

Narda aynı bitki üzerinde iki çeşit çiçek olduğu belirtilmiştir. Bunlar fonksiyonel erkek çiçekler (FMF) ve meyveleri belirleyen dişi verimli biseksüel (BF) çiçeklerdir. FMF meyveleri belirleyemeyen ve sonunda düşecek dişi steril çiçeklerdir. Narın FMF dişi sterilitesinin varsayılan nedeninin anormal ovül gelişimi olduğunu belirten **Chen ve ark (2017)** ovül gelişiminin sonlandırıldığı temel aşamayı araştırmak için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak FMF ve BF'de ovül gelişimi incelenmiş ve daha sonra narda dişi kısırlıktan sorumlu mekanizmayı araştırmak için FMF ve BF arasında farklı olarak ekspirese edilen genler (DEG'ler) analiz edilmiştir. FMF'de ovül gelişiminin, iç kabuk primordium oluşumunun sonlanmasını takip ettiği belirlenmiştir. FMF ovül gelişiminin sonlandırılması için temel safhanın, tomurcuk dikey çapının 5.0-13.0 mm olduğu safha olarak belirlenmiştir. **Mao ve ark (2017)** taramalı elektron mikroskobu ve histolojik analiz sonuçlarına göre *V. fordii*'nin çiçek gelişimini 12 aşamaya ayırmış ve erkek ve dişi çiçekler arasındaki ilk morfolojik sapmanın evre 7'de meydana geldiği belirtilmiştir. Erkek çiçeklerin her zaman unisexüel olduğu, fakat dişi çiçeklerin, ana sporojen hücrelerin mayoz öncesi ve daha sonraki gelişim aşamalarında meydana gelen hücre ölümleri sınırlanarak steril stamen ile biseksüel özellikler gösterdikleri belirtilmiştir. Araştırmacılar, erkek ve dişi çiçekler için farklılaşma aşamasında cinsiyet tayininin altında yatan moleküler mekanizmayı daha iyi aydınlatmak için karşılaştırmalı transkriptom analizi yapmışlardır. Toplamda 56.065 unigen oluşturulmuş ve 608 gen farklı şekilde ifade edilmiştir. Erkek ve dişi çiçekler arasında sırasıyla 310 ve 298 DEG'in yüksek ekspiresyon seviyeleri gösterdikleri bulunmuştur. 10 adet aday genin, qRT-PCR validasyonu ile DEG verilerinin tutarlı bir ekspiresyon gösterdiği ifade edilmiştir.

2.2. Antepfıstığında Cinsiyet Belirleme ve Gen Ekspiresyonu ile İlgili Çalışmalar

P. vera'da 14 çeşit ve 94 adet açık tozlanan bitki kullanarak DNA amplifikasyonu için 700 farklı primer kullanan **Hormaza ve ark (1994)** cinsiyetle

ilgili markörlerin bulunması için RAPD tekniğini ve bulk segregant analizlerini (BSA) kullanmışlardır. Bu primerlerden biri (OP008), dişi örnek havuzundan elde edilen DNA'larda amplifiye olurken, erkek örneklerin havuzundan elde edilen DNA'larda amplifiye olmamıştır. Bu primer 945 bp uzunluğunda bant üretmiştir. Sözkonusu markör 14 çeşitte 94 adet açılım gösteren bitkide test edilmiş ve elde edilen sonuçlar erkek:dişi oranının 1:1 ile tutarlı olduğunu göstermiştir.

P. atlantica, P. terebinthus ve *P. eurycarpa*'nın cinsiyetle bağlantılı RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA=rastgele amplifiye olmuş polimorfik DNA) markörleri kullanan **Kafkas ve ark (2000)** cinsiyetle ilgili RAPD bantlarını görüntülemek için DNA örneklerinden 10 erkek, 10 dişi bireyin DNA'larını ayrı ayrı karıştırarak cinsiyet havuzu oluşturmuş ve her bir türün dişi ve erkek ağaçlarından cinsiyet havuzu elde etmişlerdir. *P. eurycarpa'*da cinsiyetle ilgili olabilecek 2 primer tespit edilmiş ve bunlar 30 erkek, 37 dişi bireyde test edilmiştir. Sonuç olarak, bu markörlerin cinsiyet belirleme lokusları olabileceği düşünülmüştür.

Melezlemeyle *Pistacia*'nın kalıtımı, cinsiyet belirleme mekanizmasının saptanması ve monoik *P. vera* geliştirmeyi hedefleyen **Kafkas (2001)** dişi genotip olarak dioik *P. atlantica* ağaçları ile monoik *P. atlantica* genotipleri ve 2 dişi *P. vera* (Siirt, Ohadi) çeşidi kullanmıştır. Monoik *P. atlantica* genotipleri ve dioik erkek *P. vera* ve *P. atlantica* ağaçları tozlayıcı olarak kullanılmıştır. Toplamda 20 farklı melezleme kombinasyonu oluşturulmuştur. Bunların 4'ü monoik *P. vera* popülasyonunu geliştirmek için kullanılmış ve geri kalanları *Pistacia*'da cinsiyet kalıtımı için ve cinsiyet belirme mekanizmasının anlaşılmasında kullanılmıştır.

SCAR primerleri ve touch-down PCR metodunun bir kombinasyonunu *Pistacia vera* L.'da dişi DNA markörleri geliştirmek için kullanan **Yakubov ve ark (2005)** OPO-08 primerinin bütün dişi ağaçlarda 905 bp uzunluğunda bir bant ürettiğini gözlemlemişler, ancak birkaç erkek ağaçta da amplifikasyon gözlemlediklerini belirtmişlerdir. RAPD markörüne dayalı SCAR markörü dizayn edilmiş ve bu markör dişide 905 bp, erkekte 909 bp'de bant üretmiştir. Yeniden

SCAR primerleri dizayn edilerek touch-down PCR tekniği ile kombine edilmiş ve dişiye spesifik 297 bp'de bir bant amplifiye olmuştur. Bu yeni dişiye özgü markörün güvenilirliğini belirlemek için primerler 54 farklı genotipte denenerek valide edilmiştir. **Esfandiyari ve ark (2012)** bu markörün *P. atlantica* Desf. subsp. *mutica* ve *P. khinjuk*'da da çalıştığını bildirmişlerdir.

Pistacia vera L.'da cinsiyet belirleme sistemini aydınlatmak için RADseq (Restriction Site-Associated DNA Sequencing=restriksiyon alanıyla ilişkili DNA sekanslaması) tekniği kullanarak cinsiyet bağlantılı SNP (Single Nucleotide Polymorphisms = Tek nükleotit polimorfizmi) markörlerinin belirlenmesini amaçlayan **Kafkas ve ark (2015)** 38 RAD okumasında kültür antepfıstığında cinsiyet bağlantılı lokusları belirlemişlerdir. Bu okumaların 13 tanesinden primer dizayn edilmiş ve bu primerler 124 çeşit-genotip ve 42 F1 bitkisinde SNaPshot analizleri ile test edilmiştir. SNaPshot analizleriyle 8 SNP lokusun *Pistacia vera*'da cinsiyeti ayırdığı belirlenmiştir. Bu markörler 4 yabani *Pistacia* türünün (*P. atlantica* Desf., *P. terebinthus* L., *P. eurycarpa* Yalt. ve *P.integerrima* Stewart.) 10 dişi ve 10 erkek bireyinde de test edilmiş ancak bu türlerde cinsiyeti ayırmadıkları belirlenmişlerdir. Bunların ötesinde, *P. vera*'da cinsiyeti belirleyen lokusların dişilerde heterozigot erkeklerde ise homozigot olmasından dolayı araştırıcılar antepfıstığında cinsiyet belirleme sistemini ZZ/ZW olarak hipotez etmişlerdir.

Khodaeiaminjan ve ark (2017), daha önce **Kafkas ve ark (2015)** tarafından validasyonu yapılmayan 25 SNP markörünün SNaPshot ve HRM analizleri ile 309 *P. vera* çeşidi ve genotipinde validasyonunu yapmışlardır. Araştırıcılar analizi yapılan 25 markörden 9 tanesinin *P. vera*'da cinsiyeti ayırdığını bildirmişlerdir. Araştırıcılar aynı zamanda bu markörleri *P. atlantica, P. eurycarpa, P. terebinthus* ve *P. integerrima* türlerinde de test etmişler, ancak *P. vera*'da cinsiyeti ayıran markörlerin hiçbirinin test edilen yabani *Pistacia* türlerinde cinsiyeti ayırmadığını bildirmişlerdir. Araştırıcılar aynı zamanda 105 adet SSR markörünü ve cinsiyet ile ilişkili SNP markörlerini Siirt x Bağyolu F1 populasyonunda haritalayarak antepfıstığında ilk defa cinsiyet kromozomunu ve

kromozom üzrindeki cinsiyet lokusunun pozisyonunu belirlemişlerdir. Elde edilen genetik haritada cinsiyet kromozomunun uzunluğu 65.19 cM bulunmuş ve cinsiyet lokusu ile cinsiyete bağlı SNP markörleri, sırasıyla 31.86 ve 31.92 cM'lik bir mesafede kromozomun merkezinde yer almıştır.

Dioik *Pistacia vera*'nın ilk moleküler sitogenetik karakterizasyonu **Sola-Campoy ve ark (2015)** tarafından yapılmıştır. FISH probları karyotip 45SrDNA ve 5S (Flourecant in situ hibridizasyon) ile *Pistacia vera'*ya özel satellit DNA PIVE-40 ve PIVE-180, DAP1 boyama ile karakterize edilmiştir. PIVE-180'nin 176-178 bp monomerik ünitelere sahip olduğu ve familya üyeleri arasında yüksek sekans homolojisine sahip olduğu belirtilmiştir. PIVE-40'ın 43 bp monomerik ünitelere sahip olduğu ve yüksek sıralı tekrarların düzenlenmesine çok uygun olduğu belirtilmiştir. Bu tekrarların en büyük çifti olan HC1 dizayn edilmiştir. PIVE-40'ta hibridizasyon farklılığından dolayı HC1'in 2 tipi olduğu belirlenmiştir. TipI/II heterozigatları ve TipI'in homozigot bireyleri belirlediği saptanmıştır. Fakat Tip II'nin homozigot erkekte PIVE-40 ile birlikte bulunmadığı belirlenmiştir. Sonuçta, *Pistacia vera*'nın HC1 çiftinin yapısı açıklanmaya çalışılmış, 5S, 45S rDNA, PIVE-40 ve PIVE-180 satellit DNA, FISH kullanılarak fiziksel olarak tespit edilmiştir. Satellite–DNA ailesi, PIVE-40 ve PIVE-180, *Pistacia vera*'da dişiden çok erkeğin genomunu temsil etmiş ve bunların kromozomal dağılımının farklıklarını da ortaya çıkarmıştır. Bu bilgi *Pistacia vera*'da daha önceden de Kafkas ve ark, (2015) tarafından belirlenmiş ZZ/ZW sistemini desteklemektedir.

P. vera ağaç türlerinin, tuz toleransı yüksek, dioik ve uzun ömürlü bir bitki olmasından dolayı önemli bir ticari ürün olduğu belirtilmiştir. Gen ekspiresyon analizlerinin, bu özelliklerin altında yatan olası düzenleyici mekanizmaları araştırmak için etkili bir yöntem olduğunu ifade eden **Jazi ve ark (2016)** yaygın olarak kullanılan sekiz referans genin (ACT, α-TUB, β-TUB, 18S rRNA, CYP2, EF1α, GAPDH ve UBQ10) abiyotik koşullar altındaki üç antepfıstığı anacının (*P. vera* L. Sarakhs, Badami ve Ghazvini) kök ve yapraklarındaki ekspiresyon seviyelerine bakarak en iyi referans geni

belirlemişlerdir. Örnekler üç farklı zamanda çeşitli abiyotik koşullar altında (soğuk, kuraklık ve tuz) farklı organlardan toplanmıştır. Aday referans genlerin ekspiresyon stabilitesini tahmin etmek için farklı istatistiksel programlar (geNorm, NormFinder ve BestKeeper) uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi ile, EF1α'nın tüm abiyotik koşullar altında tüm örneklerde üstün referans gen olduğu bulunmuştur. EF1α'ya ek olarak, ACT ve β-TUB, yaprak ve kökteki gen ekspiresyon analizi sonuçlarına göre ikinci en iyi referans gen olduğu belirlenmiştir. Soğuk ve kuraklık koşulları altındaki örnekler için β-TUB'ı ikinci en kararlı gen olarak seçerken, ACT tuz koşulları altında analiz edilen örneklerde ikinci en kararlı gen olarak seçilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmanın, *P. vera*'nın ve *Anacardiaceae* familyasının diğer üyelerinin ekspiresyon profili hakkında gelecek araştırmalara fayda sağlayacağını ifade etmişlerdir.

2.3. Diğer Türlerde Yapılan Cinsiyet Belirleme ve Gen Ekspiresyonu ile İlgili Çalışmalar

Bitkilerde genetik cinsiyet sistemleri, erkek heterogameti (XX dişi, XY erkek) ve dişi heterogameti (ZW dişi, ZZ erkek) olarak gözlemlenir. Genomik teknolojilerdeki son gelişmeler sayesinde, cinsiyet kromozom sistemleri şimdi model olmayan organizmalarda da geniş oranda tanımlanmakta ve birçoğunun aynı atadan köken aldığına ve sık sık cinsiyet kromozomu farklılıkları yaşadığını ortaya koymaktadır. Yeni genomik teknolojilerindeki son gelişmeler cinsiyet kromozomlarının karakterizasyonuna ve tanımlanmasına olanak sağlar **(Saunders ve ark, 2018)**.

Etilenin hıyar çiçeklerinin cinsiyetlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı ileri süren **Saito ve ark (2007)** ginoik hıyar sürgünlerinin monoik sürgünlerden daha fazla etilen ürettiğini bildirmişlerdir. Çünkü monoik hıyarlarda hem dişi hem erkek sürgün tepelerindeki çiçek tomurcuklarının etilen ürettiği belirlenmiştir. Çiçeklerin cinsiyetlerinin belirlenmesinde her bir çiçek tomurcuğunda etilen biyosentezinin düzenlenip düzenlenmediği araştırılmıştır.

Bundan dolayı, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit sentaz (CS-ACS2) geninin ekspiresyonunun gerçekleşmesi, sadece pistil primordiyumlarının oluşumundan önce belirlenmemiştir. Hıyar bitkilerinden ACC sentaz geni izole edilmiş, dişi çiçeklerde ve sürgünlerde ekspirese olduğu görülmüştür. Monoik ve dioik hıyar bitkilerinin farklı organlarında CS-ACS2 ekspiresyonunu analiz etmek için RT-PCR yapılmıştır. Tomurcukların dişi çiçek olarak gelişmesini belirleyen CS-ACS2, ovül ve plasenta formunda gelişen ovaryumun merkezinde birikmeye devam ettiği gözlemlenmiştir. CS-ACS2 birikimi sonucunda, sadece dişi çiçeklerin üretildiği, dişiye ait hıyar bitkilerinde biseksüel safhadaki bütün çiçek tomurcuklarında ve gelişimin son safhasında gerçekleştiği belirlenmiştir. Monoik hıyarlarda bazı yumrularda bulunan çiçek tomurcukları CS-ACS2 biriktirmiş fakat diğerlerinde biriktirmemiştir. Bu sonuçlar, dişi çiçeklerin gelişimi ve farklılaşması ile ilgili çiçek tomurcuklarındaki etilen sentezine CS-ACS2'nin sebep olduğunu göstermiştir.

Kim ve ark (2010) kivide cinsiyet farklılaşması ve cinsiyet belirlemenin moleküler mekanizmasının anlaşılmasını hedeflemişlerdir. Cinsiyet kromozomuyla bağlantılı genler, dioik *S. latifolia*'dan izole edilmiştir. Dişi ve erkek tohumlardan gen yakalama metodu kullanılarak DEG taraması yapılmıştır. Sonuçta, 15 DEG izole edilerek sekanslanmıştır. Erkek veya dişi tomurcuklarda farklı şekilde ekspiresyon gösteren genlerin bazılarına qRT-PCR analizi uygulanmıştır. KiviDEG1'in, hücre duvarını modifiye eden bir enzim olarak polen gelişiminde önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Bunların ekspiresyon seviyelerinin erkek çiçek tohumlarında dişiden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuçta, izole edilen KiviDEG'ler kivide cinsiyet farklılıklarının moleküler seviyesinin daha iyi anlaşılmasında, gelecekteki araştırmalarda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bitkilerde cinsiyet tayini ve cinsiyet farklılaşmasının moleküler ve genetik mekanizmalarını anlamak özellikle tarımsal uygulamalar için oldukça önemlidir. Genomik bilgi eksikliğinden dolayı birçok türde cinsiyet ile ilgili birçok moleküler mekanizma henüz bilinmemektedir. **Urasaki ve ark (2012)** papayada cinsiyet

belirlemede aday genleri tanımlamak amacıyla, dijital gen ekspiresyon analizleri (DGE) için High-throughput (yüksek verimli) superSAGE metodu kullanarak (Ht-superSAGE; 26 bp uzunluğunda etiketli fragmentleri içeren dijital gen ekspiresyon profilinin bir metodudur) hermafrodit, dişi ve erkek çiçek örneklerinden transkriptom analizi gerçekleştirmişlerdir. Papayada genetik bilginin bir kombinasyonunu (haritalama ve Y kromozomundaki erkeğe özgü bölge (MSY), genomik sekansları ve transkriptom verilerini kullanarak, cinsiyet belirlemek için aday genleri tanımlamışlardır. Gen bankasından X ve Y kromozomlarının MSY bölgeleri için BAC (yapay bakteri kromozomu) klonlarının sekansları seçilmiş ve cinsiyet kromozom sekansları olarak dizayn edilmiştir. Sonuçta papaya cinsiyet belirleme mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için cinsiyet kromozomunda haritalanabilir 47 adet ekspirese olabilen aday gen belirlenmiştir.

Yakın zamanda hermafroditlikten evrimleştiği iddia edilen dioik bitkiler ile yapılan çalışmalardan biri **Ramos ve ark (2014)** tarafından asmada dişi, erkek ve hermafrodit çiçeklerin oluşumunu içeren genleri belirlemek için üç cinsiyetin, 4 gelişim aşamasının transkriptom profillerini karşılaştırmış ve analiz etmişlerdir. *Vitis* cinsiyet evrimiyle ilgili, dioik populasyonun oluşumundan sorumlu iki yakın bağlantılı genin olduğu bir model ileri sürülmüştür. Çalışmada ilk çiçek gelişimi esnasında ifade edilen genlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Dişi, erkek ve hermafrodit çiçek transkriptomları sekanslanmış ve gen ekspiresyon analizleri yapılmıştır. Cinsiyet belirleme, cinsiyet farklılığının oluşumuyla direk ilişkisi olmayan ABCDE model genlerin ekspiresyonu ve çiçek gelişimi esnasında cinsiyet farklılaşmasının geç bir olay olduğu görülmüştür. Çalışmada aynı bireyler farklı çiçek gelişim aşamalarındayken, ilk kez tam olarak transkriptomik analiz uygulanmıştır. Üç *Vitis* cinsiyetinin 4 gelişim aşamasına ait tomurcuklardan RNAseq sonuçları analiz edilmiştir. Asmada RNAseq sonuçları, erkek bitkilerde eksik bir pistilin varlığı ile ayırt edilebilir olduğu ve dişilerde de etkisiz stamenlerin ayırt edilebilir olduğunu göstermiştir. Çalışmada elde edilen verilerin cinsiyet belirleme ve çiçek gelişimiyle ilgili olabileceği iddia edilmiştir.

Monoik türlerin, tek cinsiyetli çiçeklerinin dişi ve erkek oluşum aşamalarının gelişimlerini incelemek için, kapsamlı bir sistem sağladığı belirten **Rocheta ve ark (2014)** monoik *Quercus suber* türlerinin dişi ve erkek çiçeklerinin gelişimi esnasında farklı genlerin ifadelerini tanımlamayı amaçlamışlardır. *Q. suber* çiçeklerinin farklı gelişim aşamalarındaki dişi ve erkek çiçeklerinden cDNA kütüphaneleri oluşturulmuş ve transkriptom analizleri karşılaştırılmıştır. Erkek ve dişi çiçeklerin gelişimlerinin ilk ve son safhasında farklı genlerin ekspirese olduğu ortaya çıkmıştır. Bunların bazılarının polen gelişiminde ve yumurta hücresi oluşumda görev aldığı belirlenmiştir. Bunların monoik, dioik ve hermafrodit cinsiyet sistemini belirleyen, çiçek gelişimini içeren genler olduğu iddia edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda önceden tanımlanmamış, çiçek gelişiminden sorumlu genler bulunmuştur.

Cinsiyet belirleme çalışmalarında model bir tür olan kavunu (*Cucumis melo* L.) kullanarak, kavunun cinsiyet ekspiresyon sürecinin karmaşık olduğu belirtilmiş ve RNA sekanları için monoik (AAGG), dişi (AAgg), hermafrodit (aagg) ve andromonoik (aaGG) olmak üzere 4 farklı cinsiyete ait kavun bitkilerinden havuz oluşturan **Gao ve ark (2014)** G (dişi organ için) ve A (erkek organ için) olmak üzere iki gen klonlamışlardır. Yaklaşık 105 milyon okuma ile kavun transkriptomu oluşturulmuştur. 76,260 unigen üretilmiş ve 11,805'i haritalanmıştır. Oluşturulan havuzda eşleştirilmeler yapılmış ve bu eşleştirilmeler karşılaştırıldığında farklı gen ekspiresyon profilleri ortaya çıkmıştır. En çok temsil edilen ekspiresyon profillerinin ise serin/thereonin protein kinaz yolu olduğu belirlenmiştir. Bu yolda etilen, oksin/indol-3asetik asit ve aminosiklopropan karboksilat oksidazın farklı cinsiyet tipinin ekspersyolarını içerdiği belirlenmiştir. Bunların kavunda cinsiyet belirlemede önemli rol oynadığı iddia edilmiştir. Seçilen 15 genin RT-PCR'ı yapılarak valide edilmiştir. Kavun transkriptom sekansları, yeni gen ekspiresyon profilleriyle ortaya çıkarılmış ve gelecekte cinsiyet farklılaşmasının moleküler mekanizmalarının çalışılması için önemli ipuçları verdiği belirtilmiştir.

Ökaryotların çoğunun aynı kökenden evrimleşmiş farklı cinsiyet belirleme mekanizmaları ile meydana geldikleri ifade eden ve çiçekli bitkilerde dioik bitkilerin nadir olarak görüldüğü, fakat erkek veya dişi steril mutasyonlarını içeren hermafrodit atalardan sürekli olarak evrimleşerek meydana geldiklerini iddia eden **Pucholt ve ark (2015)** poplar'da yapılan tüm çalışmalarda cinsiyet belirleme lokusunun 19. kromozomda olduğunu ancak, türler arasında farklılık gösterdiğini ve hem erkek hem de dişi heterogameti sistemine sahip oldukları ifade edilmiştir. Polplar'daki durumun tersine, willow'larda cinsiyet belirleme mekanizmaları ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Bu çalışmada *S. viminalis*'in ilk kez cinsiyet belirleme lokusunun QTL (quantitative trait locus mapping= kantitatif özellik lokusu) analizleri ile haritalama yapılarak 15. kromozomda olduğu belirlenmiştir. Bütün dişi yavrulara anne tarafından taşınan haploid kalıtım ile, dişinin heterogametik bir sisteme (ZW) sahip olduğu iddia edilmiştir. Bu sonuçlar, *Salicaceae* familyasındaki cinsiyet belirleme mekanizmalarının evrimsel olarak yüksek bir hıza sahip oldukları ve bu nedenle cinsiyet kromozomu döngüsünde yer alan evrimsel süreçlerin çalışmaları için mükemmel kanıtlar sunduğu iddia edilmiştir.

İki kardeş cins olan *Salix* (willow) ve *Populus*'un (poplar) cinsiyet kromozomları ile farklı otozomların evrimleşme mekanizması çalışılmıştır. Poplar'ın cinsiyet kromozomlarının 19. kromozomla ilgili olduğunu raporlayan **Hou ve ark (2015)** daha önceki bir çalışmada Poplar'ın aksine, *Salix*'in cinsiyet kromozomunun 15. kromozomda olduğunu belirtmişlerdir **(Pucholt ve ark, 2015)**. Poplar'ın bazı türlerinde hem ZZ/ZW hemde XX/XY cinsiyet belirleme sistemi olduğu ortaya konmuştur. *S. suchowensis'*in heterogametik cinsiyet özelliği ile dişi ZW sistemine sahip olduğu bulunmuştur. Aynı kromozomdaki genlerin karşılaştırılmasıyla, bu iki cins arasındaki otozomlar ve cinsiyet kromozomları arasında büyük oranda paralellik ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın dioik bitkilerin cinsiyet kromozomlarının evrimi ve genetiğini daha iyi anlamak için önemli bilgi sağlayacağı ifade edilmiştir.

Bitkilerde cinsiyet tayininin evrimini anlamak için dişi ve erkek çiçeklerin bir arada bulunduğu monoik bitkilerden, dioik türlerde bulunan uniseksüel bireylere geçişin altında yatan mekanizmaların belirlenmesi gerektiği vurgulayan **Boualem ve ark (2015)** çalışmalarında monoik Oman ve dioik Erez hatlar arasında melezlemeyi içeren bir klonlama stratejisi kullanarak hıyarda androcy genini klonlamışlardır. Erez ebeveyn hattında, androcy alleli ACS11'in kodlanmayan bir formudur. ACS11, kavun bitkileri ve monoik hıyarlardan sadece dişi çiçek tomurcuklarında belirlenmiştir. Andromonoik bitkilerde, ACS11'in hermafrodit çiçek tomurcuklarının floemlerinde büyük ölçüde ekspirese olduğu, fakat erkek çiçek tomurcuklarında bulunmadığı ifade edilmiştir. ACS11 vasıtasıyla etilen üretiminin monoik ve andromonoik hıyar türlerinde karpel gelişimi için gerekli olduğu vurgulanmıştır. CmW1P1 ekspiresyonunun karpel gelişimini engellediği belirlenmiştir. Ekspirese olmayan veya CmW1P1 fonksiyonlarının kaybında bu engellemelerin olmadığı görülmüştür. CmW1P1 erkek çiçek tomurcuklarında büyük ölçüde ekspirese olduğu fakat dişi çiçek tomurcuklarında bulunmadığı ifade edilmiştir. Etilenin, CmACS-7'nin ekspiresyonu aracılığı ile hem stamen gelişiminin engellenmesini kontrol ettiğini, hem de CmACS11'nin ekspiresyonu aracılığı ile karpel gelişimini kontrol ettiği belirtilmiştir. Etilenin angiospermlerin cinsiyet belirlenmesinde önemli bir hormon olduğu, monoik bitkilerde ve diğer bitki türlerinin cinsiyet belirleme çalışmalarında bu sonuçların bir model olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Gao ve ark (2015) moleküler markörleri monoik, gynoik, andromonoik ve hermafrodit bitkilerin homozigotluklarını tanımlamak için kullanmış ve dört fenotipteki kavun materyalinin hepsinde A (a) genini tanımlamak için CAPS markörü kullanılmış ve RIL kavunun G (g) lokusunu belirlemek için bir dupleks PCR sistemi uygulanmıştır. Genotip ve fenotip verilerine dayanarak, RIL populasyonundan RNAseq için bireyler seçilmiştir. RNA sekansları, monoik (AAGG), gynoik (AAgg), hermafrodit (aagg) ve andromonoik (aaGG) olarak isimlendirilen dört adet kavun cinsiyetine ait bitkilerin, bulk analizleri

gerçekleştirilmiştir. Kavun transkriptomundan yaklaşık 105 milyon okuma üretilmiştir. Bazı genlerin, fitohormon geçişinde tespit edilen erkek kısırlık genleri ve püsküllerideiçeren çiçek gelişimi ile ilgili genler olduğu tespit edilmiştir. Ayrı ayrı eşleştirilen ekspiresyon profillerinin karşılaştırılması ile (AAGG: AAgg, AAGG: aaGG, aagg: AAgg ve aaGG: aagg) farklı gen ekspiresyon profilleri (sırasıyla 745, 1342, 858 ve 571 gen) ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılar Serin/treonin protein kinaz yolunun en yüksek oranda temsil edildiğini belirlemişlerdir. Bu yolda, etilen, abzisik asit (ABA), oksin/indol-3-asetik asit (IAA) ve aminosiklopropankarboksilat (ACC) oksidaz, farklı cinsiyet tiplerindeki ekspiresyonunları içerdiğini ve bunun da kavun cinsiyetinin belirlenmesinde önemli rollere sahip olabileceği ifade edilmiştir. 15 adet seçilmiş gen, qRT-PCR ile doğrulanmış ve bunların ekspiresyonlarının RNAseq sonuçları ile benzer olduğu ifade edilmiştir.

Harkess ve ark (2015) *Garden asparagus* bitkilerinin cinsiyet kromozom evrimini incelemek için bir model olarak kullanılabileceğini iddia etmiş ve bu bitkinin XX/XY cinsiyet kromozom sistemine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Cinsiyet belirleme ve cinsiyet farklılaşmasının moleküler temelini açıklamak için dişi (XX), erkek (XY) ve sùper erkek (YY) bitkiler arasında farklı şekilde ekspiresyon gösteren genleri tanımlamak için RNAseq yapılmıştır. Araştırmacılar 570 adet farklı şekilde ekspiresyon gösteren gen belirlemiş ve *Garden asparagus*'ta dişiye bağlı ekspiresyondan çok erkeğe bağlı ekspiresyonun var olduğunu gözlemlemişlerdir. Anter gelişiminin kaynağı, erkek ve süper erkekte spesifik olarak ekspiresyon gösteren, tapetum gelişimini ve polen mikrosporlarının gelişimini içeren genler belirlenmiştir. Hatlar arasındaki farklılıkları vurgulamak ve erkek:dişi, süper erkek:dişi ve süper erkek:erkek çiftlerinin farklı gen ekspiresyonları karşılaştırılarak 570 DEG belirlenmiştir. Bu DEG'ler dişi ile kıyaslandığında, yaklaşık %91'i erkek ve süper erkeklerde yüksek oranda düzenlenmiştir. DEG'lerin %34'ü hem erkek hem de süper erkeklerin transkripsiyon havuzlarında bulunmuştur. De novo RNAseq transkriptom

birleştirme ve ekspiresyon analizlerinin dioik türlerde cinsiyet belirlemede yararlı olabileceği belirtilmiştir.

Çok yıllık ve dioik bir bitki olan *Asparagus officinalis* (kuşkonmaz) ile çalışan **Tsugama ve ark (2016)** *A. officinalis*'in tarımsal üretimi için, erkek bitkilerin dişi bitkilere göre avantajları olduğunu ifade etmişlerdir. *A. officinalis*'in baskın erkeklerin fizyolojik özelliklerini uyaran stamenlerde, tapetum hücre gelişiminde rol oynayan M lokusu tarafından belirlendiğini, ancak şu ana kadar spesifik M lokusu genlerinin tanımlanmamış olduğunu belirtmişlerdir. *A. officinalis* transkriptomu için daha önce yayınlanmış olan RNAseq verileri yeniden analiz edilmiş, bazı genleri klonlamış ve *Arabidopsis thaliana*'da tapetum hücre gelişimi için vazgeçilmez olan MYB35'in varsayılan bir ortoloğu olduğu keşfedilmiştir. MYB35'in ortoloğunun *A. officinalis*'te dişi bitkilerin genomunda olmadığı belirlenmiştir. RT-PCR analizlerinde, bu genin (AoMYB35) erkek çiçek gelişiminde, erken gelişim aşamasında stamenlerde güçlü bir ekspiresyon sergilediği belirtilmiştir. Bu sonuçların, AoMYB35'in *A. officinalis'*de çiçek gelişiminin erken bir aşamasında, tapetum hücrelerinde bir transkripsiyon faktörünü kodlayan erkeğe özgü bir gen olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, bu çalışmadaki sonuçlar AoMYB35'in *A. officinalis*'deki M lokus genlerinden birinin adayı olduğu fikrini desteklediğini ifade etmişlerdir.

Boualem ve ark (2016) karpuzda (watermelon), dişi ve erkek cinsiyet formu arasındaki geçişin, A lokusundaki allellerin tanımlanması ile kontrol edildiğini bildirmişlerdir. Daha önce, iki *Cucumis* türü olan, kavun ve hıyarda monoiklikten andromonoikliğe geçişin, ACS-7/ACS2'deki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir. ACS-7/ACS2 fonksiyonunun, kabakgiller içerisinde korunup korunmadığını test etmek için, karpuzda ClACS7'yi klonlayıp karakterize etmişlerdir. A lokusu ile CmACS-7/CsACS2'nin homoloğu ClACS7'nin birlikte ayrıldığını gözlemlemişlerdir. Kavun ve hıyarlarda olduğu gibi, andromonoik hatlardan kaynaklanan izoformların, enzimatik aktiviteye indirgenmediği gözlemlenmiş ve monoik hatlardan gelen izoformun aktif olduğu görülmüştür.

Aktif ClACS7 enziminin monoik hatlarda dişi çiçeklerin gelişimine yol açtığı, enzimatik aktivitede azalmanın ise hermafrodit çiçek ürettiği ifade edilmiştir. Kavun ve hıyarlardaki CmACS-7/CsACS2 gibi ClACS7, erkek çiçeklerde değil, melezlerin gelişmesi için belirlenen tomurcukların karpel primordiyumlarında yüksek oranda ifade edilmiştir. Bu bulgulara ve önceki incelemelere dayanarak, monoik geninin (ACS7), *Cucumis* ve *Citrullus* cinslerinin ayrılmasında rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

Du ve ark (2016) erkek ve dişi tomurcukların (FB ve MB) yanı sıra bu türlerde cinsiyet tayini ile ilgili genler hakkında bilgi edinmek için *Ginkgo biloba*'nın dişi kozalak ve erkek kozalak (OS ve SS) RNA sekanslamalarını gerçekleştirmişlerdir. Sekiz cDNA kütüphanesinden yaklaşık 60 Gb temiz okuma elde edilmiştir Sırasıyla MB-FB ve SS-OS'de toplam 4,709 ve 9,802 DEG tanımlanmıştır. Bitki hormonu sinyaline ve transdüksyonuna dahil olan genlerin yanı sıra DNA metiltransferazı kodlayan genlerin farklı cinsiyet tipleri arasında farklı ifade edildiği bulunmuştur. *G. biloba*'nın cinsiyet tayininde bu genlerin rolleri araştırılmıştır. Pistil ile ilişkili genler erkek tomurcuklarda ekspire olurken, dişi tomurcuklarda anter spesifik genler tanımlanmış ve bu durum *G. biloba*'da dioikliğin üreme primordumlarının seçici olarak durdurulmasından kaynaklandığını düşündürmüştür. RNAseq ve qRT-PCR sonuçları arasında ekspiresyonun yüksek seviyede ilişkili olduğu bulunmuştur.

Gangwar ve ark (2016) *Jatropha curcas*'ın yüksek tohum yağı içeriği (% 42) nedeniyle önemli bir biyodizel kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. *Jatropha* temelli biyodizelin ticarileşmesini engelleyen en önemli sebebin, düşük dişi:erkek çiçek oranından (1: 25-30) etkilenen, çiçeklenme başına düşük verim elde edildiği belirtilmiştir. Bu nedenle, farklı evrelerdeki ve çiçek organı gelişimine katılan genleri analiz ederek dişi çiçek gelişiminin moleküler incelemeleri, tohum verimini arttırmada çok önemli bir yol olduğu ifade edilmiştir. Farklı bitki türlerinden alınan çiçek genlerin ortologlarından *J. curcas* için kısa genler oluşturmuşlardır. Daha yüksek dişi:erkek çiçek (1:8–10) oranına sahip olmasıyla, *J. curcas*'ın (IC561235)

çiçek gelişiminin 6 safhasındaki cinsiyet belirleme ve çiçek organ gelişimindeki 42 adet genin ekspiresyon analizi qRT-PCR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bazı genlerin (TFL1, SUP, AP1, CRY2, CUC2, CKX1, TAA1 ve PIN1) üretken aşamaya geçiş ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Dahası, dişi çiçek oluşumundaki genler SUP ve CRY2 iken, CUC2, TAA1, CKX1 ve PIN1 genlerinin de dişi çiçekle ilgili olduğu saptanmıştır.

Tan ve ark (2016) Kastor bitkisinde (*Ricinus communis* L.) dişi (JXBM0705P) ve monoik (JXBM0705M) hatlardan tepe tomurcukları ve çiçek salkımlarının transkriptomları arasındaki farklılıkları araştırmak için DEG analizi gerçekleştirmişlerdir. İki farklı cinsiyet tipi arasındaki üç gelişim aşamasında *Ricinus* tepe tomurcuklarında 3000'den fazla DEG tespit edilmiştir. Oksin cevabı ve taşınması, transkripsiyon faktörleri, sinyal transdüksiyonu, histon demetilasyonu/metilasyonu, programlanmış hücre ölümü ve tozlanma gibi periyodik olarak cinsiyet ifadesi ve üretimi ile ilişkili hormon yanıtı ve biyosentezinde yer alan bir dizi DEG keşfedilmiş ve seçilen DEG'lerin, qRT-PCR validasyonu ve DGE modelleri arasında tutarlı bir ekspiresyon gösterdiği belirlenmiştir.

Çiçek cinsiyet belirlenmesinden sorumlu moleküler mekanizmaların çoğu bitki türü için belirsizliğini koruduğu ifade eden **Ramos ve ark (2017)** *V. vinifera* ssp. *vinifera*'da, kültüre alınmış alt türlerde ve yabani akrabalarında (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) erkek ya da dişi çiçeklerdeki hermafroditizmi neyin belirlediğini tam olarak açıklayamamışlardır. Araştırmacılar, bir de novo birleştirilmesini üç *Vitis vinifera* çiçek tipinin üç çiçek gelişim evresindeki transkriptomlarını tanımlamışlardır. Bu çalışmanın temel amacının, *V. v. sylvestris* özel transkriptlerinin tanımlanması ve çiçek gelişimi sırasında farklı şekilde ekspirese olan genlerin karakterizasyonunun belirlenmesi olduğunu ifade etmişlerdir. Sıralı de novo birleştirme stratejisi ile 95,516'dan oluşan kapsamlı bir transkriptom datası oluşturulmuştur. Bu veri setinden 81.064 transkript, *V. v. Vinifera* referans transkriptoma eklenmiş ve *V. v. vinifera* referans genomuna karşı 11.084 tanesi

açıklanmıştır. Toplanan tüm transkriptlerden biyoinformatik analizler ile *V. v. sylvestris*'e özgü 133'ü tanımlanmış ve üç çiçek tipi arasında farklı şekilde ifade edilen 516 adet transkript bulunmuştur. Araştırmacılar bir çiçeğin gelişiminin gen aktiviteleri, çevresel koşullar ve hormonların senkronizasyonu tarafından belirlendiğini ifade etmişlerdir.

Kivide erkek ve dişi çiçekler arasında farklı ifade edilen genleri belirlemek için **Tang ve ark (2017)** RNAseq analizlerini kullanarak erkek ve dişi bitkilerin çiçeklerinde gen ekspiresyon analizleri yapmışlardır. Toplam 53,5 milyon okumadan, ortalama uzunluğu 200 bp olan toplam 49.069.919 temiz okuma elde edilmiştir. Dişi çiçekler arasında farklı ekspre olan 2.503 unigen belirlenmiştir. RNAseq ile ortaya çıkan erkek ve dişi çiçekler arasında farklı şekilde ifade edilen 19 unigenden 17'sinin gen ekspiresyon profilleri, qRT-PCR ile doğrulamışlardır. Burada, kivi dişi ve erkek çiçeklerinden çok sayıda EST dizisi elde edilmiştir. Bu karşılaştırmalı transkriptom analizlerinin *A. chinensis* ve ilgili türlerde gen ekspiresyonu, genomik ve fonksiyonel çalışmalar için paha biçilmez bir kaynak sağladığı ifade edilmiştir. Bu çalışmanın aynı zamanda kivinin cinsiyet tayininde yer alan genlerin araştırılmasına yönelik bir adımı temsil ettiği belirtilmiştir.

Gibberellinler (GAs) ve etilen gibi bitki hormonlarının, erkek ve dişi çiçeklerin gelişimini destekleyebildiğini ancak GA'nın erkek çiçek formasyonuna neden olan düzenleyici mekanizmaları ve bu işlemde etilenin potansiyel olarak görevinin hala bilinmediğini öne süren **Zhang ve ark (2017)** GA ile muamele edilmiş hıyarların cinsiyet gelişiminde yer alan gen ve gen ağlarını açığa çıkarmak için, GA_3 ile muamele edilmiş dişi çiçeklere sahip hıyar bitkileri arasında, sürgün uçlarının transkriptomlarını karşılaştıran RNAseq analizleri uygulamışlardır. Sonuçlar GA_3 uygulamasının belirgin biçimde erkek çiçeklere neden olduğunu, ancak sürgün uçlarında etilen üretiminin azaldığını göstermiştir. Ayrıca, GA_3 muamelesinden sonra M (CsACS2) geni, etilen reseptörü CsETR1 ve bazı etilene cevap transkripsiyon faktörlerinin transkript seviyelerinin önemli ölçüde değiştiği ve bu durumda, hıyarın GA ile düzenlenmiş cinsiyet ifadesinde etilenin potansiyel

olarak rol oynadığı düşünülmüştür. Araştırmacılar sonuç olarak, GA'nın etilene bağımsız bir süreçte hıyar cinsiyet tayinini etkileyebileceğini ifade etmişlerdir. Bu sonuçların, hormon aracılı cinsiyet farklılaşması için yeni bir model önerdiğini ve hıyardaki erkek çiçek oluşumunun düzenleyici mekanizmasının daha iyi tanımlanması için teorik bir temel sunduğunu belirtmişlerdir.

Bitki hormonu olan etilenin dutta dişi çiçek oluşumunu arttırdığı belirten **Shang ve ark (2017)** dut çiçeklerinin altı adet tomurcuklarını erken evrede, Illumina RNAseq teknolojisi ile gen ekspiresyon profillerini karşılaştırmak için de novo transkriptom birleştirmelerinde kullanmışlardır. Çiçek tomurcuk gelişimlerinin 6 farklı safhasında 87.719 unigen oluşturulmuştur. Farklı genlerin ekspiresyon analizlerinde, iki erken safhanın (FB2 ve FB3) çiçek tomurcuk transkriptomlarının, geriye kalanlardan çok farklı olduğu ortaya çıkarılmıştır. FB2'den FB1'e kadar 317 DEG belirlenmiştir. FB3 ve FB4 (iki geç safha) için ise 450 DEG belirlenmiştir. AP2/ERF geninin hem FB2 hem de FB3'te daha yüksek ekspiresyon gösterdiği belirlenmiştir. MADS genlerinin çoğunun giderek artan bir ekspiresyon profili sergilediğini belirlemişlerdir. Genlerin birlikte ekspiresyon modelleri, ayrıca daha önce çiçek başlangıcı ve gelişmesinde önemli olduğu belirlenen ilişkili genlerle birlikte analiz edilmiştir ve bu verilerin, dutun erken çiçek gelişiminin analizi için zengin bir kaynak oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Koniferlerde (kozalaklar) cinsiyet tanınmının belirlenmesinde, moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için, **Duan ve ark (2017)** Çin endemik kozalaklı türlerlerinden *Pinus bungeanada* Zucc. ex Endl. türünden erkek ve dişi transkriptomlar karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar üç erkek ve üç dişi, toplam 39.62 Gb yüksek verimli sekans elde etmişlerdir. Elde edilen okumaların de novo birleştirilmeleri yapıldıktan sonra 85,305 unigen tespit edilmiştir. *P. bungeana*'daki iki cinsiyet arasında toplam 12.073 farklı ekspre olan gen saptanmış ve bunların 5.766'sının (%47.76) dişilerde up-regüle olduğu belirtilmiştir. KEGG ile zenginleştirilmiş analizlerin sonucunda, bazı genlerin, triptofan metabolizması, zeatin biyosentezi, fenilpropanoid biyosentez yolları, sistein ve metionin

metabolizmasında rol oynaydıklarını ve *P. bungeana*'nın cinsiyet belirleme süreci ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı zamanda, *P. bungeana*'da bazı önemli bitki hormon yolaklarının (örn. Gibberellin (GA), karotenoid biyosentez ve brassinosteroid biyosentezi (BR)) cinsiyet belirlemeyi etkilediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın *P. bungeana*'nın üreme organlarındaki cinsiyet tanımlanmasındaki moleküler mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sunduğunu belirtmişlerdir. Sonuçta, tanımlanan moleküler genetik kaynakların, *Pinus* türlerindeki fonksiyonel genomik ve popülasyon genetiği çalışmalarını da kolaylaştıracağını bildirmişlerdir.

Monoik türlerin birçoğunun ekonomik ve ekolojik önemine rağmen, erkek ve dişi çiçek gelişimini kontrol eden genetik mekanizmaları hakkında çok az şey bilindiğini vurgulayan **Sobral ve ark (2017)** *Q. suber* çiçeklerinin üremelerinin tanımlanmasında MADS-box genlerinin önemini ele almak için, homolog genleri tanımlamış ve bunların çiçek gelişimi sırasındaki ifadelerini karakterize etmişlerdir. Çalışmada *Arabidopsis* PISTILLATA'nın yüksek ölçüde korunmuş MADS domaini protein sekansından, 39 gen tanımlanarak kullanılmıştır. *Q. suber*'in ABCDE MADS-box gen ailesinin üyeleri belirlenmiştir. Bu genlerin zamana bağlı ekspiresyonlarının cinsiyete dayalı olduğunu ifade etmişlerdir. B-sınıfı genlerin, özellikle, baskın olarak ya da sadece erkek çiçeklerde (QsPISTILLATA durumunda) ekspirese olduğu bulunmuştur. Araştırıcılar bu çalışmanın, benzer cinsiyet özelliklerine sahip diğer türlerde, korunmuş gelişimsel mekanizmaların bilinmesine yönelik potansiyel bir katkı sağlayacağını ve monoik bir ağaçta üreme organlarının tanımlanmasını içeren mekanizmaların belirlenmesine yönelik önemli bir adım olduğunu ifade etmişlerdir.

Arabidopsis thaliana genomunun yayınlanmasından bu yana, diğer bitkilerin de birçok genomik sekans ve RNAseq verileri yayımlanmıştır. Ardından, araştırmacılar bu veri setlerini bitki büyüme ve gelişiminin yanı sıra diğer biyolojik süreçler hakkında bilgi edinmek için kullanmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, dişi ve erkeğe dayalı genler de dahil olmak üzere cinsiyet

dokularında daha yüksek oranda ifade edilen cinsiyete dayalı genler, araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Cinsiyete dayalı gen ifadelerinin, gen regülasyonu, epigenetik, gelişimsel biyoloji ve cinsiyet antagonizmi ile temelde bağlantılı olduğunu vurgulayan **Song ve ark (2017)** bugüne kadar yerfıstığında RNAseq veri kümeleri hem cinsiyet hem de somatik dokular dahil olmak üzere, 22 farklı dokuda incelemiş ve 3.191 dokuya özgü gen ve 38.745 ortak gen tespit etmişlerdir. Cinsiyete özgü genlerin ekspiresyon seviyeleri, somatik dokuya özgü genlerden önemli ölçüde daha fazla bulunmuştur. Cinsiyete özgü genler arasında dişiye özgü genlerin ekspiresyon seviyelerinin, erkeğe özgü genlerden anlamlı olarak daha yüksek çıktığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, somatik dokuya özgü genlerin, cinsiyete özgü genlerden daha hızlı geliştiği ifade edilmiştir. Somatik dokuya özgü genlerin temel olarak rahat bir seleksiyon yaşadığını, cinsiyete özgü genlerin ise daha güçlü selektif bir baskı altında olduğunu göstermiştir. Somatik dokuya özgü genlerin, cinsiyete özgü genlere göre daha yüksek kodon kullanım eğilimine sahip olduğu iddia edilmiştir. Araştırmacılar çalışmada bu RNAseq verilerinin temelinde cinsiyete özgü ve somatik dokuya özgü genler arasında farklı evrimsel kalıpların ve gen ekspiresyon düzeylerinin gözlendiğini bulmuşlardır.

*Jatropha curcas'*ın dişi çiçek verimini arttırmak için yapılan diğer çalışmada, *Jatropha curcas*'ta çiçek cinsiyet farklılıklarını düzenleyen genleri bulmayı hedefleyen **Hui ve ark (2017)** çalışmada kullanılan çiçek tomurcuklarını primordiyum safhalarından başlayarak olgun erkek ve dişi çiçek tomurcuklarını 9 safhaya ayırmışlardır. Ek olarak çiçek iç yapısı ve dış yapısı arasındaki bağlantıyı onaylamak için farklı safhalardaki 30 adet çiçek tomurcuğu toplanmıştır. Bu toplanan 30 tomurcuktan çiçek farklılaşmasının 5 safhası belirlenmiş ve tanımlanmıştır. Bu 5 safha sırasıyla stereoskop, parafin bölümü ve Illumina Hiseq 4000 cihazı kullanılarak RNAseq ile sekanslanarak belirlenmiştir. Transkriptom sonuçlarının validasyonunda qPCR analizleri için 74 DEG seçilmiştir. Bu genlerin çiçek cinsiyet farklılaşmasında önemli fonksiyonlara sahip olduğundan dolayı seçildiği ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçların, çiçek cinsiyet başlangıç

döneminde yüzlerce farklı DEG tespit edildiğini, ancak binlerce DEG'in stamen ve ovül gelişim sürecine dahil olduğu görülmüştür. ABCD model genlerin *J. curcas*'ın çiçek farklılaşması esnasında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu çalışmanın *J. curcas*'ın düzenleyici mekanizmasının ve çiçek cinsiyet farklılaşması esnasında işlev yapan genler ile ilgili yapılan kapsamlı bir çalışma olduğunu vurgulamışlardır.

Güney ve Orta Çin'de endemik olan *Eucommia ulmoides Oliver*, *Eucommiaceae* familyasına ait dioik bir ağaç türüdür. Çin'de 2000 yıldır bilinen soyu tükenmekte olan tıbbi bir bitki türüdür. *E. ulmoides* başlangıçta, cinsiyet farklılaşmasına sahip olan dioik bitkilerin model bir temsilcisi olmuştur. Yine de, *E. ulmoides*'teki cinsiyet dimorfizmi ve cinsiyet tayininin genetik mekanizmaları yeterince anlaşılmamıştır. **Wang ve ark (2017)** *E. ulmoides*'in altı erkek ve dişi bireyden alınan taze yapraklarından Illumina platformunda de novo transkriptom dizilimi ile 45 milyardan fazla yüksek kalitede baz elde etmişlerdir. Ortalama 801 bp'e sahip toplam 148.595 unigen oluşturulmuştur. Karşılaştırmalı transkriptom analizleri ile erkeğe özgü 73 ve dişiye özgü 43 gen içeren erkek ve dişiler arasında 116 adet DEG tespit edilmiştir. Bu DEG'lerden dişiye özgü üç genin *E. ulmoides*'te cinsiyet dimorfizm içeriğiyle ilişkili olduğu açıklanmıştır. Erkeğe özgü bir DEG, çiçekli bitkilerde B sınıfı bir çiçek organ tanımlama geni olan, MADS-box geni APETALA3 olarak tanımlanmıştır. SNP analizleriyle, APETALA3-benzeri genin *E. ulmoides*'te cinsiyet tayininde yer aldığı doğrulamıştır.

Farklı cinsiyetteki *Morella rubra* (çin koca yemişi) çiçeklerinde transkriptom ve gen ekspiresyonundaki arklılıkları tanımlamayı hedefleyen **Zhang ve ark (2017)** dişi 'Fugong-1' (WT) ve monoik mutantı (MT) materyal olarak kullanmışlardır. 'Fugong-1' ve onun monoik mutantında çiçek gelişimi esnasında morfolojik gözlemler yapılmıştır. 'Fugong-1'de erkek ve dişi çiçek gelişimleri gözlenmiş, ancak MT'de geleneksel Çin kocayemişinden farklı olarak hem dişi hem de erkek çiçekler gözlenmiştir. Illumina HiSeq 2500 teknolojisini kullanarak, çiçeklenme gelişimi, çiçeklenme devamı ve ilk çiçeklenme aşamalarında çiçekler

RNAseq teknolojisi ile sekanslanmış ve 6 kütüphane elde edilmiştir. "Fugong-1" monoik mutantlannda, 11 önemli DEG'in ekspiresyon profillemesinin sonuçlarını doğrulamak için qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR sonuçları "Fugong-1" monoik mutantındaki dört genin, üç gelişme fazında ifade edildiğini göstermiştir. C19312.graph_c0 (poligalakturonaz QRT3), c35395.graph_c0 (ABC taşıyıcı G ailesi üyesi 26) ve c51035.graph_c0 (Sitokrom P450) unigenlerinin ifadeleri, çiçek gelişimi ile pozitif yönde artmıştır. Başlangıçtaki çiçeklenme döneminde c30377.graph_c0 (tetraketid alfa-pirone redüktaz 1) ekspiresyonları azalmış ve tam çiçeklenme aşamasında hızla artmıştır. Bu dört genin ifadelerinin tam çiçeklenme aşamasında en yüksek seviyelere ulaştığı belirlenmiştir. Bu ilgili genlerin yüksek ekspiresyon seviyesinin çiçek oluşumunun başlangıç safhası esnasında MT'nin erkek çiçek özellikleri ile yakından ilgili olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmanın, Çin kocayemişinde çiçeklerin cinsiyet farklılaşmasını kontrol eden faktörleri düzenleyen genlerin belirlendiğinin ve cinsiyetle ilgili önemli bir temel oluşturulduğunu ifade etmişlerdir.

Taihangia rupestris, andromonoik yani aynı bireyde hem erkek hem de hermafrodit çiçek taşıyan bir bitki türüdür. Bununla birlikte, sınırlı genetik ve sekans bilgileri nedeniyle andromonoik *Taihangia*'daki erkek ve hermafrodit çiçeklerin oluşumu ve gelişmesinin hala yeterince anlaşılmadığını belirten **Li ve ark (2017b)** *Taihangia* çiçek formasyonunun düzenlenmesinin potansiyel moleküler mekanizmasını araştırmak için RNAseq yapmışlardır. Toplam 84.596.426 kaliteli Illumina okuması elde edilmiş ve daha sonra 59.643 unigen birleştirilmiştir. Bunlardan 24,753 unigenin, NCBI protein veri tabanında bulunduğu açıklanmıştır. Erkek ve hermafrodit çiçekler arasındaki, 176 transkripsiyon faktörü (TF) dahil olmak üzere, 1.668 DEG tanımlanmıştır. Çalışmada tanımlanan DEG'leri doğrulamak için qRT-PCR yapılmıştır. Erken gelişim aşamasında toplam 699 ve geç gelişim aşamasında ise 1158 DEG tespit edilmiştir.

Harkess ve ark (2017) anter kültürü aracılığıyla double haploid YY bireyler oluşturularak, *Asparagus officinalis* L.'te yüksek kaliteli bir referans oluşturmak için, 1.3 Gb sekanslanlama yapılmış ve diziler birleştirilmiştir. Bir çift haploid YY erkek *Asparagus officinalis* L. için bir referans genom düzeneğinin karşılaştırmalı ve deneysel analizinde bireylerin farklı, fakat cinsiyet tayininden sorumlu genlerinin bağlantılı olduğu vurgulanmıştır. *Asparagus*'u da içeren dioiklerin son yıllarda evrimleştiği, cinsiyet kromozomlarının sitogenetik olarak Y kromozomu ile aynı olduğu ve X kromozomundan yoksun olan 1 megabazlık segment barındırdığı belirtilmiştir. Araştırmacılar bu bölgenin tamamının silinmesinin erkekten dişiye dönüşümle sonuçlandığını, dişi gelişiminin tek bir baskılayıcı kaybının da erkekten hermafrodite dönüşümünü tetiklediğini gözlemlemişlerdir.

Idesia polycarpa Maxim. var. *vestita Diels* dioik bir bitkidir ve meyvelerinin yüksek yağ içeriğinden dolayı yaygın olarak biyodizel amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, sadece dişi ağaçlarda meyve üretildiği gibi üreme ve üretimi sorunlu hale getiren fide aşamasında cinsiyeti ayırt etmek oldukça zordur ve mevcut genomik ve transkriptomik bilgi eksikliği nedeniyle cinsiyet tayini ve farklılaşmasının altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir. **Mei ve ark (2017)** materyal olarak *I. polikarpa* çiçeği tomurcuklarını, aynı yaşta ve aynı boydaki dişi ve erkek *Idesia polycarpa Maxim* var. *vestida Diels'*in ağaçlarından almışlardır. Bu çiçek tomurcuklarının kaliksi çıkarıldıktan ve bir stereo mikroskop altında gözlemlendiklerinde, erkek çiçek tomurcuklarında ve erkek çiçek tomurcuklarında baskılanan dişi organlarda verimsiz stamenler açıkça gözlenmiştir. Araştırmacılar dişi ve erkek çiçeklerde transkriptom analizi yaparak, dişi ve erkek cDNA kütüphanelerinden, sırasıyla 28,668,977 ve 22,227,992 temiz okumalar elde edilmiş ve 65.972 unigen (%78.34) eşleştirilmiştir. Unigenlerin işlevsel incelemeleri sonucunda, cinsiyet belirleme ve farklılaşmasında rol oynayabilen, çoğalma ve gelişim süreci dahil, çeşitli biyolojik işlevler ve süreçler ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada, *I. polycarpa*'nın dişi ve erkek çiçeğinin

ilk detaylı transkriptom analizlerinin yapıldığının ve bu çalışmanın *I. polycarpa*'nın çiçek tomurcuğu gelişimindeki moleküler mekanizmalar üzerine yapılacak çalışmaların temellerini oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Mohanty ve ark (2017) *C. grandis*'te cinsiyet tayininin moleküler temelini anlayabilmek amacıyla erkek (MB) ve dişi (FB) tomurcuklarında RNAseq ve DEG analizleri gerçekleştirmişlerdir. Karşılaştırmalı transkriptom analizleri MB ve FB örnekleri arasındaki DEG'lerden 1.410 ünigen belirlenmiştir. DEG'lerin ekspiresyon seviyeleri arasında qRT-PCR validasyonu ve RNAseq örnekleri için tutarlı bir korelasyon gözlenmiştir. ARF6, ACC synthase1, SNRK2 ve BRI1 ile ilişkili reseptör kinaz 1 (BAK1) gibi hormona duyarlı genlerin yüksek oranda tetiklenmesi, bu türdeki cinsiyet tayininde çok sayıda fitohormonun uyarılmasında önemli rol oynadıkları görülmüştür. Ayrıca, çinko parmaklar (zinc fingers), homeodomain lösin fermuarları ve MYB proteinleri gibi transkripsiyon faktörleri, erkeğe özgü ekspiresyonunun başlıca belirleyicileri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, miRNA hedef bölgesi olarak çoklu DEG'lerin saptanması, gen susturmada görev alan bir küçük RNA'nın *C. grandis*'te cinsiyet farklılaşmasını düzenleyebileceğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, bu transkripsiyon kaynaklarının, cinsiyet ifadesinde yer alan çok sayıda DEG sağladığını ve *C. grandis*'te cinsiyet tayininin moleküler mekanizmasını çözmek için temel oluşturabileceğini belirtmişlerdir.

A. arguta'da cinsiyet tayininin moleküler temelinin anlaşılması ve bitki cinsiyetinin erken evrede tanımlanmasının önemini vurgulayan **Chunli ve ark (2018)** cinsiyet tayini ile ilgili genleri taramak için PCR temelli baskılayıcı eksiltici melezleme (SSH= suppressive subtractive hybridization) yöntemi kullanmışlardır. Mavi-beyaz koloni tarama yöntemine dayanarak, sırasıyla, ileri ve geri şeklinde oluşturulmuş cDNA kütüphanelerinden 550 klon rastgele seçilmiştir. Bu pozitif klonlardan 508 tanesi sırasıyla ileri ve geri kütüphanelerden, sekanslama için seçilmiştir. Temiz EST'ler, 309 (forward) ve 369 (reverse) unigenle birleştirilmiş ve bunların 228 (forward) ve 299'u (reverse), NCBI veri tabanının bilinen homolog dizileri ile karşılaştırılmıştır. Cinsiyet tayininde yer alabilecek dört adet unigen

qRT-PCR ile validasyon için seçilmiştir. Belirlenen pektin metilesteraz geninin (PME) ekspiresyon seviyesi, evre 1'den evre 3'e kadar erkek ve dişi çiçekler arasında benzer olmuştur. PME her ne kadar erkek ve dişi çiçeklerde up-regüle olsa da gelişimin geç aşamasında, ekspiresyonun erkek çiçekte çok kuvvetli ve dişi çiçeklerin 4. safhasından 72 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır. Aksine, erkek çiçek, dişi çiçek ile karşılaştırıldığında geç gelişme aşamasında ACO (ACC oxidase gene), MAN1 (endobeta-mannanase gene) ve MYC2 (Myelocytomatosis protein gene) genleri çok düşük ekspiresyon seviyesi sergilemiştir. Bu genlerin erkek ve dişi çiçekler arasındaki değişken ekspiresyon seviyelerinin, cinsiyet ifadesinin kontrol edilmesinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Bu sonuçlar, *A. arguta*'da cinsiyet tayininin moleküler mekanizmasının anlaşılmasını sağlamıştır.

Lee ve ark (2018) papayada farklı çiçek cinsiyet tiplerini incelemek için, erkek, dişi ve hermafroditlerden, bir transkriptom veri tabanı olan alternatif ekleme sekanslarını (AS-sekansları) kullanarak cinsiyetle ilişkili genler taranmış ve *C. papaya* L.'da 15 BAC kullanılarak çiçeklenmeden 28 gün önceki genler belirlenmiştir. Taramadan sonra, kısa vejetatif faz benzeri (CpSVPL), kromatin birleştirme faktör 1 alt-birim A-benzeri (CpCAF1AL) ve somatik embriyogenesis reseptör kinazı (CpSERK) dahil olmak üzere, cinsiyetle ilişkili üç lokusun cDNA bölgeleri, *C. papaya* L.'nin farklı cinsiyet tiplerinden, 8 adet cinsiyetle bağlantılı SNP içeren HRM kullanılarak genotiplendirilmiştir. SNP-HRM analizine dayanarak, cinsiyetle ilgili SNP'ler, CpSVPL lokusundaki CpSVPL_HRM_88 primerinin aracılığı ile üç cinsiyet tipinin bitkilerini ve CpSERK_HRM_34072, CpSERK_HRM_30704, CpSERK_HRM_34760 primerlerinin aracılığı ile dişi bitkileri tanımlamak için kullanılabileceği ifade edilmiştir. Üç cinsiyet genotipiyle ilişkili bir SNP'e sahip olan CpSVPL, dördüncü halka yapısına sahip olmayan erkek ve dişi steril çiçeklerde (anormal hermafrodit çiçekler) yüksek oranda ekspirese olmuştur. Normal hermafroditlerin üçüncü halkalarının fonksiyonel olarak haritalanması, CpSERK'te AS-seq ekspiresyonunun olmadığı, CpSVPL'de

ekspiresyonun düşük olduğu ve CpCAF1AL için ekspiresyonun yüksek olduğu, XYh-tip kromozomda AS-seq ekspiresyonunun olmadığı görülmüştür.

Hıyar ve kavunda etilenin cinsiyet belirleme ile ilgili önemli bir rol oynadığını ifade eden **Tao ve ark (2018)** bu bitkilerde cinsiyet tayininde en çok bilinen genlerin, *CsACS1G*, *CsACS11*/*CmACS11*, *CsACS2*, *CmACS7* ve *CsACO2,* etilen biyosentezinde yer alan genleri de kodladığı bildirilmiştir. Çiçek gelişim sürecinde etilenin önemli biyokimyasal rolü göz önüne alındığında şaşırtıcı olmadığı ifade edilmiştir. Bu genlerden CsACS2 ve CmACS7'deki mutasyonlar iki eşeyli çiçeklerle sonuçlanırken, CsACS11 / CmACS11 ve CsACO2 mutasyonları monoiklikten androikliğe geçişe yol açtığı iddia edilmiştir. Bu çalışmada, etilene duyarlı kavun ve hıyarda, cinsiyet tayini ile ilişkili genlerin ekspiresyonunu doğrulamak için qPCR uygulanmış ve hormon tedavisi testleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, CsACS1, CsACS11 ve CsACS2 down-regülasyon, CsWIP up-regüle ekspiresyon göstermiştir. Daha sonra etilen tarafından uyarılan CsACS11'in ekspirese olup olmadığı analiz edilmiştir. CsACS11, f mutantında transkripsiyon seviyesinde düzenlendiğinden, f-mutantları ve WT ile RNAseq gerçekleştirilmiştir. İlk elde edilen sonuçlara göre, 300 DEG ortaya çıkmıştır. Bu DEG'lerde etilen sinyalleme ile ilgili genler analiz edilmiş ve beş aday genin f mutant bitkilerde down-regülasyon gösterdiği bulunmuştur. Bunlardan üçünün ERF'yi kodladığı ve ikisinin de potansiyel olarak EIN3-bağlayıcı F-box proteinlerini kodladığı belirlenmiştir.

Henry kestanesi (*Castanea henryi*) tohumlarının beslenme ve yem olarak zengin bir nişasta ve besin kaynağı sağladığını, ancak dişi çiçeklerin veriminin erkek çiçeklere oranla düşük olduğunu belirten **Jia ve ark (2018)** çiçeklerin cinsiyet farklılaşmasının altında yatan gelişim programları hakkında çok az şey bilindiğini vurgulamışlardır. Çalışmada cinsiyet farklılaşması sırasında fitohormonların rolünü araştırmak için, erkek ve dişi çiçek organlarının morfolojisini ve çiçek cinsiyet farklılaşmasının sitolojisini, indol-3-asetik asit (IAA), gibberellinler (GAs) ve sitokininlerin (CKs) endojen düzeylerini analiz

etmişlerdir. RNAseq kullanılarak bu hormonların biyosentez ve sinyal yolakları ile ilgili genlerin ekspiresyon profilleri değerlendirilmiştir. Morfolojik sonuçlar, çiçeklerin ünisexüel ve biseksüel kediciklerden oluştuğunu ve dört gelişim evresine bölünebildiğini göstermiştir. qPCR analizleri ile kombine edilen RNAseq sonuçları, bazı genlerin hormon biyosentezinde ve cinsiyet farklılaşmasında anahtar rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. GA biyosentezinde yer alan 7 gen, CK biyosentezinde yer alan 7 gen ve ABA biyosentezinde yer alan 4 genin ekspiresyon profillerini değerlendirmek için unigen sekansları kullanılarak dizayn edilen primerler ile qPCR yapılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın, *Castanea Miller* türleri ve diğer model olmayan bitkilerde cinsiyet farklılaşması ve daha ileri çalışmalar için bir temel oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Çiçeklenme sürecinin bitki gelişimi için esas olduğunu belirten **Wang ve ark (2018)** *Rhododendron pulchrum* Sweet'in moleküler mekanizmalarını genomik veri eksikliğinden dolayı açıklığa kavuşturmanın zor olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, üç ana aşamada toplanan *R. pulchrum* çiçeklerinin çiçek tomurcuk aşaması, erken çiçeklenme aşaması ve tam çiçeklenme aşamasında yüksek verimli dizileme ve karşılaştırmalı transkriptom analizleri, büyük ölçüde çiçeklenmeyi kontrol eden genler ve *Rhododendron* türlerindeki çiçek özelliklerinin genetik gelişimine karşılık gelen çiçeklenme mekanizmasının da açıklandığı belirtilmiştir. Ayrıca, çiçek gelişimine katılan genlerin ekspiresyonunu, qRT-PCR ile da doğruladıklarını belirtmişlerdir. Belirlenen çoğu DEG'in çiçek tomurcuk aşaması ve erken çiçeklenme aşaması arasında bulunduğu ifade edilmiştir. Erken çiçeklenme döneminde MYC2, EIN3 ve ARR-B ekspiresyon seviyelerinin tümü düşükken, çiçek tomurcuk aşamasında MYC2, TIR1, CYCD3, COL-1 ve EIN3'ün transkriptlerinin tümünün ekspiresyonunun çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada sunulan transkriptom profilinin, *R. pulchrum* çiçeklenme sürecinin altında yatan moleküler mekanizmalar ile ilgili geniş bilgiler sunduğunu belirtmişlerdir.

2.4. MicroRNA'nın Cinsiyet Belirleme Mekanizmasındaki Yeri ve MicroRNA ile İlgili Çalışmalar

MikroRNA'ların (miRNA) kimyasal özellikleri ve işlevleri, küçük engelleyici RNA'ların (siRNA) aracılığıyla gerçekleşen transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) ve transkripsiyonel gen susturma (TGS) işlemleri ile benzerdir (**Jones-Rhoades 2006**). siRNA'lar da miRNA'lar gibi, Dicer RNaseIII enzim ailesi tarafından işlenir, ancak hairpin (saç tokası) yapılarından oluşmazlar. siRNA'lar uzun, çift sarmallı öncülerden oluşurlar. Hem miRNA'lar hem de siRNA'lar argonaute proteinleri içeren susturma kompleksleri ile ilişkilidirler. Bu proteinler, hedef genlerin baskılanmasına rehberlik edebilirler. Bir hücrede miRNA seviyeleri transkripsiyon ve RISC faktörü ile birlikte belirlenir. miRNA'lar gelişim, çiçeklenme, cinsiyetin belirlenmesi ve stres yanıtları gibi çeşitli süreçlerde kilit düzenleyiciler olarak görev yaparlar. Sonuç olarak, bazı miRNA'lar büyük ölçüde ifade edilirken, diğerleri sadece belirli organlarda veya gelişim aşamalarında en güçlü şekilde ifade edilirler (**Pulido ve Laufs 2010**). Bitkilerde kodlanmayan miRNA'ların farklı ekspiresyon seviyeleri ile ilgili çok farklı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları ise, çiçek gelişimi ve farklılaşması, stamen ve karpel gelişiminde farklı şekilde ekspiresyon seviyeleri ile cinsiyeti belirleyen miRNA'lardır. Çiçek gelişimi ve cinsiyet farklılaşması ile ilgili yapılan çalışmalardan biri de MADS proteinlerinin gen regülasyonuna odaklanarak çiçek gelişimi araştırmalarında son dönemdeki gelişmelerin gözlemlenmesi olmuştur.

MiRNA'ların filogenetik olarak aşırı derecede korunduğu ve miRNA'ların düzenleyici fonksiyonları olduğunu belirtilen **Cartolana ve ark (2007**) homeotik genlerin, fenotipleri birbirine benzeyen *Petunia hybrida*'nın blind (bl) mutantları ve *Antirrhinum majus*'un fistulata (fis) mutantlarının iki homolog olduğunu ve kodlanmayan miRNA genlerinin resessif allelerinin mutasyonları sonucu oluştuğunu belirtmişlerdir. Bl ve fis genleri iç çiçek kıvrımları için, homeotik C sınıfı genlerin alan sınırlamayı kontrol ettiği belirlenmiştir. Çalışmada çiçeklerin merkezindeki MIRFIS ve MIRBL genlerinin fonksiyonu için genetik bir kanıt

sağlanmış ve bu genlerin düzenleyici rollerini vurgulamak için dinamik bir mekanizma önerilmiştir. Özellikle çok uzak akraba türlerden, *Arabidopsis thaliana*'nın bu miRNA'ları içerdiği, fakat çiçek merkezindeki C sınıfı genlerin, ekspiresyonunu sınırlamak için kullanılmadığı belirtilmiştir.

Mısırda cinsiyetin belirlenmesinin başakta erkek organların baskılanması veya püskülde dişi başarısızlığı aracılığıyla oluştuğunu belirten **Chuck ve ark (2007)** meristem dallanması artarken Tasselseed 6 (Ts6) ve tasselseed 4 (Ts4) mutasyonları püskülde karpel gelişimine izin veren cinsiyet belirleme ve meristemin son şeklini kazanması için kullanılan yaygın bir yol olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmada, kodlama yapmayan Ts4 APETALA 2 mutasyonları çiçek kısımlarının nasıl şekilleneceğini belirleyen genlerin (homeotik gen) transkripsyon faktörlerinin bir miR172 miRNA'yı hedeflediklerini belirlemişlerdir. Başakçık 1 (IDS1) belirsizliğinde, başakçık meristem oluşumu için bir APETALA2 geni gereklidir. Başakçık meristem oluşumu için TS4 mutasyonlarının temel mutasyonlardan biri olduğu belirtilmiştir. Bütün bu bulgulardan 3 mutasyon bölgesi belirlenmiştir. Birincisi, TS4 cinsiyet belirleme ve dallanma bozukluklarında OFIDS1 geninin baskılanmasıyla gerçekleşen kayıplar, ikincisi, TS6 mutasyonlarının çevre etkisi altında kalıtsal olmayan değişimiyle TS4 ve IDS1'in miRNA bağlayıcı bölgelerinin sahip olduğu mutasyonlar ve üçüncüsü yabani tiplerle karşılaştırınca IDS1 proteinin TS4 mutasyonlarının çok geniş ifade edildiği ortaya konmuştur. Bütün bu sonuçlar, mısırda cinsiyet belirlenmesinin, çiçekte homeotik genlerin negatif düzenlenmesiyle ve çiçek büyümesinin sınırlanmasıyla gerçekleştiğini açığa çıkarmışlardır.

miRNA'ların farklı biyolojik süreçleri düzenlemesiyle bitki gelişiminde önemli rol oynadıklarını belirten **Fang ve ark (2014)** 2 ponkan mandarin hattından (tohumlu ve verimli erkek birey olan 'Egan No. 1' ve verimsiz ve tohumsuz mutant erkek birey olan 'Qianyang seedless') sRNA kütüphanelerinin sekansları oluşturulmuştur. Toplam 32 aileden 156 adet bilinen miRNA ve 24 adet yeni miRNA belirlenmiştir. Tohumlu ve tohumsuz türler arasında farklı şekilde ifade

edilen 11 yeni miRNA ve 71 adet önceden bilinen miRNA sekans datalarının ekspiresyon profilleri analiz edilmiştir. RT-PCR ile ekspiresyon profil analizleri, anter gelişimi esnasında daha önceden bilinen 8 adet miRNA kullanılarak, onların hedefleri arasında negatif düzenlenme olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu 8 adet miRNA'nın ekspiresyon profilleri ve hedef genleri RT-PCR ile 4 safhada analiz edilmiştir. Bilinen miRNA'lara ek olarak yeni miRNA'ların ekspiresyonu da değerlendirilmiştir. Çoğu miRNA'nın RT-PCR sonuçları, sekans dataları ile uyumlu çıkmıştır. Bu çalışma, kısır olan erkek mandarin mekanizması hakkında ve anter gelişimi esnasındaki düzenleyici miRNA'lar hakkında yeni bilgiler saglamıştır.

miRNA'nın bitkilerde cinsiyet farklılaştırmada önemli bir rol oynadığını belirten **Aryal ve ark (2014)** papayada sRNA'ların cinsiyete özgü ekspiresyonunu ve dağılımını incelemişlerdir. Papayanın hermafrodit, dişi ve erkek bitkileri kullanılarak oluşturulan kütüphanelerden yüksek veriye sahip RNA kütüphaneleri analiz edilmiştir. RNA okumalarını kullanarak papayada önceden raporlanmamış 29 adet miRNA belirlemişlerdir. Papayada her bir cinsiyet tipinden elde edilen, miRNA'ların ekspiresyon analizleri yapılmıştır. Papayada cinsiyet sisteminin 3 farklı şekilde ifade edildiği belirlenmiştir. Dişi genotip XX ile, erkek genotip XY, hermafroditlerin ise XY^h kromozom çiftlerini taşıdığı tespit edilmiştir. Üç cinsiyet tipinden geniş skalada RNA sekansları analiz edilmiştir. Papayanın dişi, erkek ve hermafrodit çiçeklerinden 14 adet ekspire edilmiş miRNA tanımlanmıştır. Bu çalışmanın, papayada cinsiyet belirlemenin anlaşılmasında ve cinsiyet kromozomlarının tanımlanmasında değerli bilgi sağlayacağı sonucuna varılmıştır.

Cinsiyet belirleyici kromozomal bölgenin altında yatan genlerdeki polimorfizmlerin karakterizasyonu ve bitkilerde cinsiyet kromozomlarının evriminin netleştirilmesi için, **Picq ve ark (2014)** kültüre alınmış *Vitis vinifera* L.'nın çiçek morfolojisinde çarpıcı bir değişim olduğunu, kültüre alınmış *V. v. vinifera* alt türlerinde hermafroditizmin büyük ölçüde baskın olduğu halde, yabani *sylvestris* alt türlerinin dioik olduğu belirlenmiştir. *Vitis* cinsinde cinsiyeti

belirleyen, üç allel, erkek M, hermafrodit H ve dişi F, bir majör lokus tarafından kontrol edildiği varsayılmaktadır. Allel baskınlığının M> H> F olduğu belirtilmiştir. Bitki materyali olarak 73 yabani (39 dişi ve 34 erkek) ve 39 hermafrodit yerli üzüm çeşidi kullanılmıştır. Sonuç olarak *V. v. sylvestris*'de, diğer *Vitis* türlerinde de bulunan 154,8 kb'lık cinsiyet belirleyici bir bölgenin, 2. kromozomun %1'inden daha azını kapsadığı bulunmuştur. Erkek allellerde, uzak coğrafi bölgeler arasında çarpıcı oranda düşük polimorfizm seviyelerine sahip olan bir trehaloz fosfataz, bir eksostosin ve bir WRKY transkripsiyon faktörü için ipuçları bulunmuştur. Hem çeşitlilik hem de biyoinformatik analizier ile, H allellerinin F alellerine göre M ile daha yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Hermafrodit allellerin yabani asmaların erkek allellerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. X kromozomundan Y kromozomal bölgesine çeşitliliğin aktarımını sağlayan ard arda rekombinasyon olaylarının bütün heteromorfik kromozomdaki bölgenin genişlemesini yavaşlattığını bildirmişlerdir.

Bazı bitkilerde farklı cinsiyetlerin oluşumunun birkaç spesifik gen tarafından kontrol edildiğini belirten **Akagi ve ark (2014)** *C. permisson'*da cinsiyet belirleme mekanizmasını incelemişlerdir. Heterogametik dişilerde, dioik bir bitki olan *D. lotus*'ta, dişiye özel kısa nükleotit sekansları, dişiyi belirleyen bölgeyi tanımlamak için kullanılmıştır. OG1 otozomal MeG1 genini hedefleyen kodlama yapmayan miRNA, anter fertilitesini düzenleyen homeodamain dizilerinin (Bir homeotik gen proteini ile diğeri arasında bulunan, hemen hemen birbirinin aynı olan dizi) transkripsyon faktörü olduğu belirtilmiştir. Gelişmiş bitkilerde dişi oluşumunu sağlayan genin Y-kromomzom kodlama yapmayan miRNA ile baskılanmasının tanımlanması, cinsiyet kromozom sisteminin evriminin anlaşılmasına katkı sağlayacağı belirtilmiştir.

Çiçeğin kusursuz organizasyonunun, içerdiği organların kimliği ve sayısı ile tanımlandığını ve çok sayıda transkripsiyonel düzenleyici içeren çok katmanlı bir ağ tarafından kontrol edildiği belirten **Engelhorn ve ark (2014)** AGAMOUS (AG) MADS domain içeren transkripsiyon faktörünün üreme organlarının

belirlenmesine ek olarak *Arabidopsis thaliana*'da çiçek tayininin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada, AG düzenlemesine odaklanarak çiçek morfogenezisi sırasında ULTRAPETALA1 (ULT1) ve LEAFY (LFY) transkripsiyonel düzenleyiciler arasındaki genetik etkileşimleri karakterize etmeyi amaçlamışlardır. ULT1 ve LFY fonksiyonlarının kaybının etkilerini, ikili bitkilerin çiçek gelişim fenotiplerini analiz ederek belirlemişlerdir. Sonuçta ULT1 ve LFY yolaklarının, her ikisi de çiçek meristeminin merkezinde AG ifadesini aktive ederken, bağımsız olarak da çiçek meristeminin belirlenmesinde işlev gördükleri belirlenmiştir. Araştırmacılar sonuçta, ULT1 ve LFY yollarının, çiçek meristeminin kimliğinin düzenlenmesinde ve belirlenmesinde ayrı ayrı hareket ettiklerini göstermişlerdir. Özellikle, meristem aktivitesini sonlandırmak için çiçeğin merkezinde bağımsız olarak AG ifadesini uyardıklarını belirtmişlerdir. Çalışmanın sonunda bu bağımsız katkıların, AG lokusunda çiçek gelişimi sırasında doğru zamanda ve yerde aktif transkripsiyonel durumdan aktif olmayan bir duruma geçişi sağladığı bir model önerilmiştir.

Nie ve ark (2015) miRNA'ların bitki büyümesinde ve gelişiminde hayati düzenleyici rol oynadıklarını belirtmişlerdir. Vejetatif fazdan çiçeklenmeye geçiş fazının, bitkilerin yaşam döngüsünde çok önemli olduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar turpta bugüne kadar, miRNA aracılı çiçek düzenleme ağlarının büyük ölçüde keşfedilmemiş olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, vejetatif ve üreme aşamalarında turp yapraklarından iki miRNA kütüphanesi dizilenmiştir. İki kütüphaneden korunmuş 21, korunmamış 13 miRNA ailesi, 44 potansiyel yeni miRNA ve toplamda 94 bilinen miRNA tanımlanmıştır. Ek olarak, 42 tane bilinen ve 17 tane yeni miRNA, belirgin bir şekilde farklı ifade edilmiş ve çiçeklenme fazına geçişle ilgili miRNA'lar olarak tanımlanmıştır. qRT-PCR analizi bazı miRNA'ların doku veya gelişim evresine özgü ekspiresyon şekilleri gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, çoğunlukla bitki gelişimi, sinyal iletimi ve transkripsiyonel düzenleme ile ilgili olan çiçeklenme fazına geçişle ilgili 50 tane miRNA için 154 hedef transkript tanımlanmıştır. Araştırmacılar çiçeklenme fazına

geçiş ile ilişkili miRNA'ların ve bunların hedef genlerinin karakterizasyonuna dayanarak, miRNA aracılı çiçeklenme fazına geçiş ve çiçeklenmede düzenleyici ağın varsayılan şematik bir modelini önermişlerdir. Bu sonuçların turpta ve diğer sebzelerde çiçeklenme fazına geçiş ve çiçeklenme zamanının düzenlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaların ayrılmasını kolaylaştırabileceği belirtilmiştir.

Transkripsiyon faktörlerinin hedeflerinin belirlenmesinde, hücre farklılaşması sırasında birçok bitki miRNA'larının işlev gördüğünü belirten **Chen ve ark (2015)** APETALA1 geninin bazı bitkilerin vejetatif fazdan üreme fazına geçişlerinde ve çiçek gelişiminde önemli rol oynadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmada, Poplar'da AP1 homoloğunun kapsamlı bir analizi, kromozom bölgeleri ve gen yapısının tanımlanması hedeflenmiştir. Poplar AP1 homologları ve *Arabidopsis* AP1'in, amino asit sekanslarının filogenetik ilişkileri ve diğer AP1 benzeri proteinler analiz edilmiştir. PtAP1-1 ve PtAP1-2 dişi ve erkek çiçek tomurcuklarının ekspiresyonu qRT-PCR ile incelenmiştir. Her iki gen için, ekspiresyon profillerinin, üretken fazda yüksek bir ekspiresyon seviyesi göstererek benzer olduğu belirlenmiştir. Çiçek tomurcuklarının mevsimsel ekspiresyon seviyelerinin ise dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında farklı olduğu görülmüştür. İki cinsiyetin ekspiresyonunun en yoğun olduğu durumda, erkek tomurcukların dişi tomurcuklardan daha erken ekspiresyon sergilediği saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda, Poplar'da AP1 homologlarının fonksiyonel analizler için gelecekteki çalışmalarda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Yan ve ark (2016) çiçek gelişiminin bitkilerde organ özelliklerini anlamak için örnek bir sistem olduğunu belirtmişlerdir. Farklı çiçek organlarının kimliklerinin, birleşerek etkileşime giren homeotik MADS transkripsiyon faktörleriyle belirlendiği ifade edilmiştir. MADS proteinleri, gen ekspiresyonunu, onların hedef gen promotörlerine erişilebilirliğini ve kromatin yapısını modüle etmek için alternatif mekanizmalarla düzenlerler. Organ tanımlanmasının kombinasyonel kontrolü bu homeotik genler tarafından, daha sonra ABC (E)

modeline genişletilen klasik ABC modeli ile özetlenebilir. Dört temel homeotik gen sınıfı, A, B, C ve E, MADS-box TF ailesinin üyelerini kodlar. Petal ve stamen kimliğinden sorumlu olan B geninin fonksyonu APETALA3 (AP3) ve PISTILLATA (PI) tarafından kontrol edilir ve C geninin işlevi AGAMOUS (AG) stamen ve karpel kimliğini kontrol eder. Büyük ölçüde yedekli hareket eden E fonksiyon genleri SEPALLATA1 (SEP1), SEP2, SEP3 ve SEP4, dört çiçek organının da oluşumu için gereklidir. Bu nedenle bu model, bitkisel homeotik faktörler arasındaki kombinasyonel genetik etkileşimler için moleküler bir açıklama sağlar.

Çiçek organlarının gelişimini düzenleyen miRNA'ların angiospermlerin üremesinde önemli bir yere sahip olduklarını, ancak, kısır ve verimli çiçeklerin farklılaşması ve gelişmesini etkileyen miRNA'ların düzenlemesinde rol oynayan mekanizmaların belirsiz olduğunu belirten **Li ve ark (2017a)** kısır ve verimli çiçeklerin, angiospermlerde evrimsel olarak önemli fenotipler oluşturduğunu belirtmişlerdir. Verimli ve kısır çiçeklerden iki sRNA kütüphanesi oluşturulmuş ve dizilenmiştir. Sekansların elde edilmesiyle farklı metotlar kullanılarak haritalanmış sRNA'lar, hedefleri bilinen ve yeni miRNA'ları aramak için kullanılmıştır. Verimli ve kısır çiçekler arasındaki morfolojik farklılıkların araştırılmasına dayanarak, *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*'nin farklı çiçek organlarındaki miRNA'ları karakterize etmek için yüksek verimli dizilim kullanılmıştır. sRNA dizilimi ve biyoinformatik analiz ile bilinen 49 miRNA ve 67 yeni miRNA tanımlanmış ve bu bilinen ve yeni miRNA öncüllerinin 17'si PCR ve Sanger dizilimi ile doğrulanmıştır. Ayrıca, iki sRNA kütüphanesinin dizilim sonuçlarını karşılaştırarak, 30 adet bilinen ve 39 adet yeni miRNA dizisinin farklı şekilde ekspire olduğunu, kısır ve verimli çiçeklerin karşılaştırılması ile 35'inin down-regüle ve 34 'ünün up-regüle olduğunu tespit etlmişlerdir. *V. macrocephalum* f. deki miRNA'ların potansiyel rollerinin, çiçek organlarının oluşumları, hücre çoğalması, hormonal yolaklar ve stres tepkilerine katıldıkları belirlenmiştir. miRNA öncülleri ve hedefleri, qRT-PCR ile de doğrulanmıştır. Spesifik olarak,

miR156a-5p, miR156g ve miR156j ekspiresyon seviyelerinin, verimli çiçeklerde kısır çiçeklerden anlamlı olarak daha yüksek bulunurken, SPL genlerinin zıt ifade gösterdikleri belirtilmiştir. miR156'nın hedeflerinin SPL genleri olduğu düşünülerek, miR156'nın *V. macrocephalum* f. *keteleeri'*deki erkek organ gelişiminin düzenlemesinde rol oynayabileceği belirtilmiştir.

Bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler karşısında farklı ve çok sayıda miRNA'nın görev yaptığını ifade eden **Drabkova ve ark (2017)** kallozun angiospermlerin birçok gelişimsel sürecinde önemli bir rol oynadığını, biyotik ve abiyotik strese cevap veren bitkiye özel bir polisakkarit (β-1,3-glukan) olduğunu bildirmişlerdir. Kallozun bitki hücrelerinin plazma zarında kalloz sentaz (CalS) sentezlendiğini, gelişmekte olan mikrosporların tetratlarını çevreleyen kalloz duvarında ve büyüyen polen tüpü duvarında ana polisakariti temsil ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada, bitkiler aleminin evrimsel tarihlerini belirlemek için önemli bitki soylarından, CalS ailesi proteinlerinin karşılaştırmalı analizlerini yapmışlardır. Toplam 1.211 aday CalS sekansı tanımlanmış ve kara yosunlarından angiospermlere kadar çeşitli taksonomik bitki grupları arasında karşılaştırılmıştır. Filogenetik analizler ile altı ana CalS proteini tanımlamış ve özel fonksiyonların evrimi sırasında duplikasyonlara sahip olduğu öne sürülmüştür. Araştırmacılar polen fonksiyonuyla doğrudan bağlantılı beş CalS alt ailesine odaklanmışlar ve polenle ifade edilen proteinlerin iki kez geliştiğini tespit etmişlerdir. CalS9/10 ve CalS11/12 iyi tanımlanmış bir grubu oluştururken, polen spesifik CalS5 erkek üreme hücrelerinde bulunmasına rağmen, çoğunlukla olgun polen vejetatif hücresinde ifade edilmeyen alt gruplarda bulunmuştur. Sonuçta polen içinde bol miktarda ekspirese edilen üç CalS, polen gelişimi sırasında önemli ölçüde farklı şekilde dağıldığı belirtilmiştir.

Çiçek organlarının oluşumunda ve formasyonunda görev alan farklı miRNA çeşitleri ve bunların hedeflerinin bulunduğunu belirten **Wei ve ark (2017)** yaptıkları çalışmada, miRNA'ları ve hedeflerini *S. suchowensis*'in erkek ve dişi çiçeklerinden elde edilen transkriptom dizilerinden belirlediklerini ifade

etmişlerdir. Çalışmanın amacının, willow'un cinsiyeti belirleyen aday miRNA'larını tespit etmek olduğunu belirtmişlerdir. Referans miRNA'lar, 73 bitki türünden türetilen 8,496 bilinen olgun miRNA'yı içeren miRBase veritabanından indirilmiştir. Sonuç olarak, dişilerde sekiz miRNA ailesini temsil eden 11 miRNA tanımlanmıştır. Erkek çiçek tomurcuklarında, 11 miRNA ailesinden 23 miRNA tanımlamışlardır. Sonuç olarak bu çalışmada, willow cinsiyetlerinin belirlenmesini sağlayan miRNA'lar araştırılmış ve çiçek gelişimi ve cinsiyet farklılaşması ile ilgili bariz bir aday tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Ho ve ark (2017) Afrika yağ palmiyelerinde (African oil palm) çiçeklerin ortaya çıkışına ve çiçek organlarının oluşumuna karşılık gelen, çiçek gelişiminin iki aşamasında dişi çiçek salkımlarında miRNA ekspiresyonunu araştırmışlardır. Dişi salkımdan, bir referans transkriptom datası oluşturulmuş ve bu datalar miRNA öncü dizilerini ve palmiyede varsayılan mRNA hedeflerinin tanımlanmaları sağlanmıştır. Bu çalışmada, 18 ortolog miRNA ailesine ait farklı gen ekspiresyon şekilleri ve bunların palmiyede dişi çiçek salkımlarındaki hedeflerin bildirilmiştir. Bunlardan, palmiyede dişi çiçeklenmesinde ters ekspiresyon şekilleri gösteren iki farklı ortolog miRNA alt kümesi tanımlanmıştır. 15 tane palmiyeye özel miRNA tahmin edilmiş ve bunlardan üçü qRT-PCR kullanılarak doğrulanmıştır. Palmiyede çiçek meristemleri oluştuğunda ve çiçek organlarının ortaya çıktığı aşamada, farklı miRNA alt kümelerinin farklı şekilde ifade edildiğini belirlemişlerdir. Bu miRNA'ların, çiçek organlarının oluşumunun erken evresini düzenlemek için mRNA hedefleriyle uyumlu hareket ettikleri ifade edilmiştir.

Bir steroid hormonu olan brassinosteroidlerlerle yapılan çalışmada **Li ve ark (2018)** brassinosteroid'in (BR), bitki büyümesinde ve gelişiminde geniş bir rol oynadığı belirtilmiştir. BR sinyalinin, Arabidopsis'te çiçek geçişini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. BR sinyalinin, çiçeklenmeyi engelleyen FLOWERING LOCUS C (FLC) ve üç FLC homologunun ifadesini teşvik ettiği bulunmuştur. BR varlığında BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) transkripsiyon faktörü, BES1-INTERACTINGMYC benzeri proteinlerle (BIM) birlikte, özellikle FLC'nin ilk

intronundaki bir BR-duyarlı elementi spesifik olarak bağladığı ifade edilmiştir. Bunların sonucunda BR sinyalinin, *Arabidopsis*'te çiçek geçişini, BR sinyallerinin FLC aktivasyonuna ve bunun sonucu olarak ta çiçek baskılanmasına dönüştürdüğü yeni bir moleküler mekanizma tarafından inhibe edildiği iddia edilmiştir.

Zhang ve ark (2018) çiçek gelişimi ve organ kimliği tespitinde rol oynayan karanfildeki (DcaMADS) MADS-box genlerinin tanımının ve teşhisinin yapılmasını amaçlamışlardır. Çalışmada, sırasıyla *Arabidopsis*'de 101 MADS-Box ailesi genini ve pirinç genomundaki 71 MADS-Box ailesi genleri farklı veri tabanlarından indirilmiştir. MADS-Box ailesi genlerinin indirilen tüm protein dizileri, karanfil MADS-Box ailesi genlerini tahmin etmek için karanfilin protein dizilerine dayanarak blastp ile araştırılarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, karanfil genomundan ve transkriptomundan 39 MADS-box geni filogenetik analiz ile belirlenmiştir. Bu genler dört alt gruba ayrılmıştır: 30 $MIKC^c$, iki MIKC*, iki Mα ve beş Mγ. MADS-box domaini, gen yapısı ve karanfil MADS genlerinin korunmuş motif kompozisyonları analiz edilmiştir. DcaMADS genlerinin ekspiresyonunun, gövde, yaprak ve çiçek tomurcukları bakımından önemli ölçüde farklı olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, karanfil çiçek organlarında DcaMADS genlerinin yeni bir ekspiresyon şekli: sepal (üç E sınıfı gen ve iki A sınıfı gen), petal (iki B sınıfı gen, iki E sınıfı gen ve bir Short Vegetatıve Phase (SVP)), stamen (iki B sınıfı gen, iki E sınıfı gen ve iki C sınıfı gen), stiller (iki E sınıfı gen ve iki C sınıfı gen), ve ovaryum (iki E sınıfı gen, iki C sınıfı, bir AGAMOUS-LIKE 6 (AGL6), bir SEEDSTICK (STK), bir B sister bir SVP ve bir Mα) şeklinde belirlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuçların, karanfilin çiçek organlarının teşhisinde bir model önermiş ve karanfildeki çiçek organlarının belirlenmesinin moleküler mekanizmalarının daha iyi araştırılmasının faydalı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Chen ve ark (2018) son zamanlarda küçük RNA'ların (sRNA'lar) DNA ve histon metilasyonlarının modifikasyonundan kodlama yapan veya kodlanmayan RNA'ların çok fazla olmasından dolayı çeşitli organizmalarda anahtar genetik ve epigenetik düzenleyiciler olarak kabul edildiği belirtilmiştir. Bitkilerde ana

düzenleyici sRNA'lar miRNA ve siRNA türleri olarak sınıflandırılır. Son zamanlarda, sRNA'ların aracılık ettiği düzenlemeler bahçe bitkilerinde de incelenmiştir. Model türlerde çalışılanlara kıyasla, çok daha fazla karmaşıklık ve benzersiz düzenleyici özellikler sergileyen birçok yeni mekanizmanın ortaya çıkarılması sağlanmıştır. sRNA çalışmalarının son zamanlarda bahçe bitkilerinde kaydedilen ilerlemeleri gözden geçirilmiş, nasıl çalıştıkları ve bunların düzenleyici özelliklerinin uygunluğu araştırılmıştır. miRNA'lar ve faz siRNA'lar (phasiRNA'lar) en çok çalışılan sRNA düzenleyicileri olduğundan, bahçe ürünleri ile ilgili gelecekteki sRNA araştırmaları için yararlı bilgi sağlayan kapsamlı bir şekilde biyolojik oluşumları, korunmaları, işlevleri ve hedeflenen gen ve özelliklerinin yanı sıra aralarındaki mekanik ilişki üzerine odaklanılmıştır.

Belirli bir cinsiyet morfolojisini üretmek için çiçek primordiumunun hedefi, çiçek gelişiminin doğru aşamasında ve hormonların doğru zamanda uygulanması ile değiştirilebilir (**Papadopoulou ve ark, 2005**). Gibberelinler temelde genel olarak erkek çiçek gelişimi ile ilgili iken (**Jayaram ve ark, 2000**), sitokininlerin dişi çiçeklerin lehine çiçek cinsiyetini değiştirebildiği raporlanmıştır (Chailakhyan ve ark, 1978). Etilen, oksin ve abzisik asitin bitkilerde cinsiyet farklılaşmasını etkilediği bulunmuştur (**Banks ve ark, 1993; Goswami ve ark, 2013; Zhang ve ark, 2017).**

miRNA'lar mRNA parçalanması ve translasyonel baskılama şeklinde iki moleküler mekanizma yoluyla etki ederler. miRNA'lar hem bulundukları bölgede şekilsel hem de hedef mRNA'ların ekspiresyon seviyesini düzenleyerek işlev görürler. mir172 vejetatif üremeye geçiş sırasında, bir miR172 bağlama bölgesi içeren dört hedef AP2 transkripsiyon faktörü genini düzenleyerek çalışır (EAT1 HEDEF (TOE1), TOE2, SCHNARCHZAP-FEN ve SCHLAFMÜTZE) **(Aukerman ve Sakai 2003**; **Schmid ve ark, 2003**). Bitkilerde vejetatif gelişme ilerledikçe, miR172'nin seviyesi artar. miR172 ayrıca bitkinin organ kimliğinin tanımlanmasında kritik bir rol oynar. Hem miR172 hem miR156 gençlik fazından yetişkin faza geçişte ve vejetatif fazdan üreme fazına geçişte birbiriyle ilişkilidir ve

ikisi de ciddi öneme sahiptir. miR156'nın ana hedefleri, bir miR156 bağlama bölgesi içeren SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL) ailesinin yedi üyesidir. MiR172'nin miR156 tarafından düzenlenmesinin dolaylı olduğu gösterilmiş ve SPL genleri aracılığıyla gerçekleştiği görülmüştür. miR156 bitki gelişimin erken aşamalarında yüksek seviyelerde ifade edilir ve bitki gelişimi ilerledikçe seviyesi düşer. *Arabidopsis*'te, 10 SPL geni bir miR156 bağlanma bölgesi içerir. miR156'nın aşırı ekspiresyonu, uzamış bir gençlik fazına ve geç çiçeklenen fenotiplere yol açar. miR156 ve miR172 zıt ekspiresyon profilleri sergiler; miR156 gençlik evrelerinde yüksek seviyelerde ifade edilir ve bitki yaşlandıkça azalırken, miR172 ise vejetatif gelişme boyunca artar. Mısır ve *Arabidopsis*'ten elde edilen kanıtlar, miR156 ve miR172 ve hedef genlerinin hem faz değişimini hem de çiçek indüksiyonunu etkileyen grubun üyeleri olduğunu göstermiştir **(Nag ve Jack 2010)**.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma kapsamında kullanılan antepfıstığı çiçek tomurcuğu örnekleri SEM ve küçük RNA sekanslaması (sRNAseq) ile gen ekspiresyon analizleri için alınmıştır. Dişi çeşit olarak Siirt ve erkek çeşit olarak Kaşka çeşidi çiçek tomurcuk örnekleri kullanılmıştır. Gen ekspiresyon analizleri için ise bu çeşitlere ilaveten dişi olarak Uzun ve erkek olarak Uygur çeşitlerinden de çiçek tomurcuk örnekleri alınmıştır. Tüm örnekler Gaziantep Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nden alınmıştır.

Çiçek tomurcuğu örnekleri 2016-2017 ile 2017-2018 tomurcuk gelişimi dönemlerinde alınmıştır. Çiçek tomurcuğu örneklerinin alınmasında **Hormaza ve Polito**'nun **(1996)** yapmış oldukları çalışma esas alınmıştır. SEM Şubat-Mart-Nisan-Mayıs-Haziran ve Temmuz aylarında haftada bir veya 15 günde bir, ağustos-Eylül, Ekim ve Kasım aylarında ayda bir olarak alınmıştır. SEM analizlerinde 2016-2017 yılı örnekleri kullanılmıştır. Örnek alma zamanları tam çiçeklenmeden sonra ve bir sonraki yıl tam çiçeklenmeden önce geçen gün olarak ifade edilmiştir. 2016 yılında tam çiçeklenme 11 Nisan tarihinde ve 2017 yılında ise 14 Nisan tarihinde gerçekleşmiştir.

SEM için alınan örnekler glukoaldehit-fosfat ile hazırlanan tampon çözeltisi içerisinde laboratuvara getirilmiştir. SEM için alınan çiçek tomurcukları laboratuvarda ön işlemden geçirilerek mikroskop ile incelenene kadar +4 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

Küçük RNA sekanslaması ve gen ekspiresyon analizleri için örnekler arazide alınır alınmaz doğrudan sıvı azot içerisine konulmuş ve örnekler laboratuvara gelene kadar sıvı azot içerisinde taşınmış ve laboratuvarda RNA izolasyonuna kadar -80 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. SEM Analizleri

SEM analizleri için örnekler **Hormaza ve Polito**'ya **(1996)** göre ve özellikle kurutma aşamasında bazı modifikasyonlar (Prof.Dr. Sinan Eti'nin önerdiği ama yayımlanmamış yöntem) yapılarak hazırlanmıştır.

3.2.1.1. Örneklerin Kurutulması

Toplanan tomurcuk örnekleri alınır alınmaz sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

1- %5'lik glukoaldehit ve 100 milimolar sodyumfosfat, pH'ı 7.2'ye ayarlanmış tampon çözeltisi içine alınarak ve 24 saat süresince $+4^0$C sıcaklıkta bekletilmiştir.
2- Daha sonra aynı tampon çözeltisi ile örnekler 10 dakikada bir 60 dk süresince çalkalanmıştır.
3- Bu aşamadan sonra kurutma işlemleri için; sırasıyla %25, %50, %75, %95 ve %100'lük etanol kullanılarak 1'er saat bekletilmiş ve örnekler en son %100 etanolde kritik kurutma noktasında alınarak mikroskobik incelemeler yapılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.
4- Mikroskobik incelemeler için önce tomurcuk örnekleri tersiyer bütil alkol-%76 alkol ve saf suyun %25, %50, %75, %90 olmak üzere sırasıyla farklı tersiyer bütil alkol konsantrasyonları ile 2'şer saat ara ile kurutulmuştur.
5- Son olarak 3 defa 2 saat ara ile saf tersiyer bütil alkolde kurutulmuştur. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi örnekler tomurcuk pulları açılana kadar tersiyer bütil alkolde bekletilmiştir



Şekil 3.1. Mikroskopik incelemeler için farklı tersiyer bütil alkol konsantrasyonlarından geçirilmiş, tomurcuk pulları açılana kadar tersiyer bütil alkolde bekletilen örnekler**.**

3.2.1.2. Örneklerin Taramalı Elektron Mikrokobunda (SEM) İncelenmesi

Kurutulan tomurcuk örneklerinin erkek/dişi organlarını görüntüleyebilmek amacıyla, tomurcukların pulları açılmadan hemen önce etüvde 40ºC'de tersiyer bütil alkolü uzaklaştırmak amacıyla 20 dakika kurutmaya alınmıştır. Tomurcukların Şekil 3.2'de görüldüğü gibi ışık mikroskobu yardımı ile pullarının temizlenmesi sağlanmıştır.



Şekil.3.2. Etüvde tersiyer bütil alkolü uzaklaştırılan tomurcuk örneklerinin ışık mikroskobu ile pullarının temizlenmesi.

Pulları açılan örneklerin, daha sonra gümüş yapışkanlı alüminyum diske yerleştirilip basınçlı ortamda altın paladyum ile kaplanması sağlanmıştır. Ardından örnekler SEM ile görüntülenmek üzere SEM'e (EDAX Octane Super 60 mm^2 SDD and TEAM EDS Analysis System and iXRF XBeam XRF) yerleştirilmiş (Şekil 3.3) ve 10 kv'da uygun boyutlardaki görüntüleri alınmıştır. Taramalı elektron mikroskobu olarak Çukurova Üniveritesi Merkez laboratuvarındaki cihaz kullanılmıştır.



Şekil.3.3. Işık mikroskobu ile pulları temizlenen örneklerin görüntüsünün alındığı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).

3.2.2. Küçük RNA sekanslaması ve gen ekspresyon analizleri

Küçük RNA sekanslaması için örneklerin sekanslaması BGI (Beijing Genomic Institute, China) firmasına yaptırılmıştır. BGI firmasına izole edilen RNA örnekleri gönderilmiştir.

3.2.2.1. RNA izolasyonu

Küçük RNA sekanslaması ve ekspiresyonunda kullanılan örneklerden RNA izolasyonu **Carvalho ve ark, (2015)**'na göre yapılmıştır. **Carvalho ve ark**

(2015)'na göre CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisinin içeriği Çizelge 3.1'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. RNA izolasyonunda kullanılan CTAB ekstraksyon tampon çözeltisinin içeriği

Kimyasal	Konsantrasyon
PVP	%2
EDTA	30 mM
NaCl	2 M
CTAB	%2
TRİS	100 mM
Spermidine	%0.05

RNA izolasyon işlemleri kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için steril kabin içerisinde yapılmıştır.

RNA izolasyon aşamaları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1- 10 adet çiçek tomurcuğu örneği havan ve havaneli yardımı ile sıvı azotta çok iyi şekilde ezilerek içerisinden 100 mg örnek 2 ml'lik tüplere alınmıştır.
2- Örneklerin üzerine, %2 β-merkaptoethanol eklenmiş ve önceden 65^0C'de ısıtılmış CTAB çözeltisinden 1 ml eklenmiştir.
3- Daha önceden 65^0C'ye ayarlanmış su banyosuna konan örnekler her 5 dakikada bir çalkalanmak üzere toplam 20 dakika bekletilmiştir.
4- Su banyosundan çıkarılan örnekler 5 dakika buzda bekletilmiştir.
5- Daha sonra örneklerin üzerine 1 ml kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve tüpün içerisindeki karışım beyaz bir hal alana kadar karıştırılmıştır.
6- Daha sonra örnekler 4^0C'ye ayarlı santrifüjde 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz temiz 2 ml'lik tüplere alınmıştır.
7- Kloroform:izoamilalkol ve ardından santrifüj aşaması toplam 3 kez tekrar edilmiştir.

8- Üçüncü kloroform:izoamilalkol aşamasından sonra üst faz temiz 1.5 ml'lik tüplere alınarak üzerine üst fazın 0.1'i kadar 3M sodyum asetat (pH 5.2), ve üst fazın 2.5-3 katı kadar soğuk %100 etanol eklenmiştir.

9- Üst faz, sodyum asetat ve etanolü içeren 1.5 ml'lik tüpler nazik bir şekilde çalkalanarak ardından -20^0C de 1 saat bekletilmiştir.

10- -20^0C'den çıkarılan örnekler 4^0C'de 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.

11- Üst fazı uzaklaştırılan, 1.5 ml'lik tüp içerisinde çöken RNA'nın üzerine, ilk olarak soğuk %100 etanolden 250 µl eklenerek hafifçe çalkalanmış ve 4^0C'de 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

12- Daha sonra tüpteki %100 etanol uzaklaştırılarak tüpe 250 µl %75 etanol eklenmiş, hafifçe çalkalanmış ve 4^0C'de 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

13- Daha sonra tüpteki %75 etanol uzaklaştırılarak tüpe 250 µl %100 etanol eklenmiş, hafifçe çalkalanmış ve 4^0C'de 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

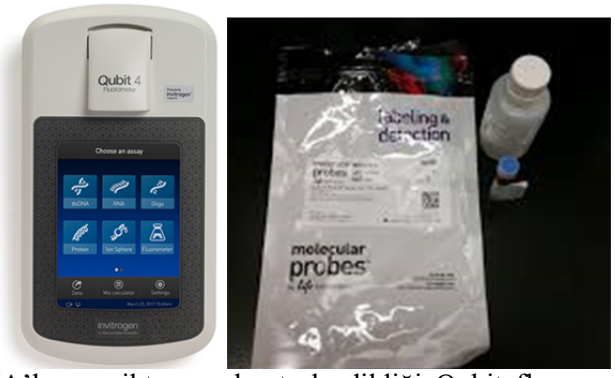
14- Tüpteki %100 etanol uzaklaştırılarak izole edilen RNA'lar oda koşullarında kurutulmuş ve üzerlerine 50 µl DEPC (dietilprokarbonat) sudan eklenmiş, miktar ve kaliteleri bakılana kadar -80^0C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. RNA izolasyon aşamasından bir görüntü.

İzole edilen toplam RNA'ların miktarları Qubit flourometre cihazı ile Qubit RNA BR assay kiti ve microRNA BR assay kiti (invitrogen) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.5).

miRNA ekspiresyon analizleri için RNA miktarları tüm örneklerde 200 ng'a ayarlanmıştır. Miktarları 200 ng'a ayarlanan örneklerden cDNA sentezi miScript® II RT kiti (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra cDNA'lar 20 kat seyreltilerek qPCR reaksiyonları yapılmıştır. qPCR reaksyonları miScript® miRNA PCR kit (Qiagen) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil.3.5. miRNA'ların miktarının kontrol edildiği Qubit flourometre cihazı ile Qubit RNA BR assay kit (invitrogen).

3.2.2.2. Biyoinformatik analizler

Sekanslama Illumina Hiseq 2500 cihazında tek yönlü olarak (SE50) yapılmıştır. Ham dizilerden adaptörler, düşük kalitedeki diziler, polyA içeren sekanslar, çok kısa sekanslar çıkarıldıktan sonra temiz diziler elde edilmiştir. Temiz sekanslar AASRA (**Tang ve ark, 2017**) programı kullanılarak referans genom ve küçük RNA veri bankaları ile haritalama yapılmıştır. Küçük RNA ekspiresyonu TPM (Transcripts Per Kilobase Million) $Cx10^6/N$ formülü ile hesaplanmıştır. Küçük RNA'ların hedeflediği genler ise psRNAtarget (**Dai ve ark, 2018**) programı ile belirlenmiştir. Örnekler arasında farklı ekspirese olan küçük RNA'lar (DES) PossionDis (Fold Change $\geq$ 2.0 ve FDR $\leq$ 0.001) (**Audic ve Claverie 1997**) ile belirlenmiştir. Farklı ekspirese olan küçük RNA'ların hedeflediği genlerin fonksiyonel anotasyonları Blast2GO (**Conesa ve ark, 2005**) (yeni ismi ile OmicsBox) yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2.3. Farklı ekspirese olan miRNA'ların qRT-PCR ile validasyonu

Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspiresyona sahip aday mikro RNA'ların validasyonu qRT-PCR ile ekspiresyon analizleri ile yapılmıştır. Dişi ve erkek bireyler arasında farklı ekspirese olan miRNA'lardan primerler miRprimer programı (**Busk 2014**) kullanılarak dizayn edilmiştir.

Miktarları 200 ng'a ayarlanan RNA'lar miScript® II RT Kit (Qiagen) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için reaksyonda 5 µl 200 ng RNA kullanılmıştır. Reaksyonda 5X miScript HiSpec buffer 2 µl, 10X miScript nucleic mix 1.2 µl, miScript reverse trancriptase mix 1.2 µl kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 12 µl olarak ayarlanmış ve geri kalan miktar RNase-free su ile tamamlanmıştır. MiScript® II RT Kit ile oluşturulan cDNA PCR döngü koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. miScript® II RT Kit ile oluşturulan cDNA PCR döngü koşulları.

	Sıcaklık (^{0}C)	Zaman
1. Adım	25	10 dk
2. Adım	37	60 dk
3. Adım	95	5 dk
4. Adım	4	-

Daha sonra cDNA'lar 20 kat seyreltilerek qPCR reaksyonları yapılmıştır. qPCR reaksyonları miScript® miRNA PCR kit (Qiagen) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. miRNA qPCR analizleri Roche Lıghtcycler® 96 (Roche Life Science) cihazı kullanılarak yapılmıştır. qRT-PCR reaksyonlarında, oluşturulmuş olan cDNA'dan 3.3 µl kullanılmıştır. 2X Quanti test SYBR green PCR miksinden 5.5 µl, 10X Script universal geri primerden 1.1 µl, dizayn edilen ileri primerden 1.1 µl (stok 5 pmol/ µl) kullanarak son hacim 11 µl olacak şekilde yapılmıştır. miScript® miRNA PCR kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilen miRNA qPCR analizleri için kullanılan döngü koşulları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. miScript® miRNA PCR kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilen miRNA qPCR analizleri döngü koşulları

	Sıcaklık (^{0}C)	Zaman	
1.Adım	95	10 dk	1 döngü
2. Adım	95	10 dk	40 döngü
3. Adım	55	1 dk	
4. Adım	37	30 s	1 döngü

Ekspiresyon sonucu her bir döngüden elde edilen ekspiresyon değerleri LinRegPCR versiyon 2017.1 programı kullanılarak ekspresyonda kullanılan RNA'ların kalitesi (efficiency) hesaplanmıştır. RNA kalitesi 1.95'ten düşük veya 2'den yüksek olan RNA'lar tekrar izole edilip cDNA ve ekspresyon analizleri tekrarlanarak kalitesi kontrol edilmiştir.

LinRegPCR programı ile RNA kalitesi belirlenen örnekler, 3 farklı referans gen (miRn46, miRn224, miRn285) kullanılarak ekspresyon analizleri yapılmıştır. Referans genlerin ekspiresyon analizleri sonucunda en iyi referans gen seçimi için RefFinder web tabanlı yazılımda bulunan delta-Ct (**Silver ve ark, 2006**), BestKeeper (**Pfaff ve ark, 2004**), geNorm (**Vandesompele ve ark, 2002**) ve NormFinder (**Andersen ve ark, 2004**) yazılımları kullanılarak en iyi referans gen seçimi gerçekleştirilmiştir.

Ekspiresyon analizleri sonucu elde edilen Ct değerleri kullanılarak ve seçilecek referans gen ile veriler normalize edilerek her bir örnekteki herbir gen için ekspresyon değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (**Livak ve Schmittgen 2001; Goni ve ark, 2009**).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında öncelikle çiçek tomurcuklarında taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çiçek cinsiyet organlarının büyüme ve gelişme durumları incelenmiştir. SEM analizlerinden elde edilen bulgulara göre de küçük RNA sekanslaması ve ardından qRT-PCR ile validasyon çalışması yapılmıştır.

4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Bulguları

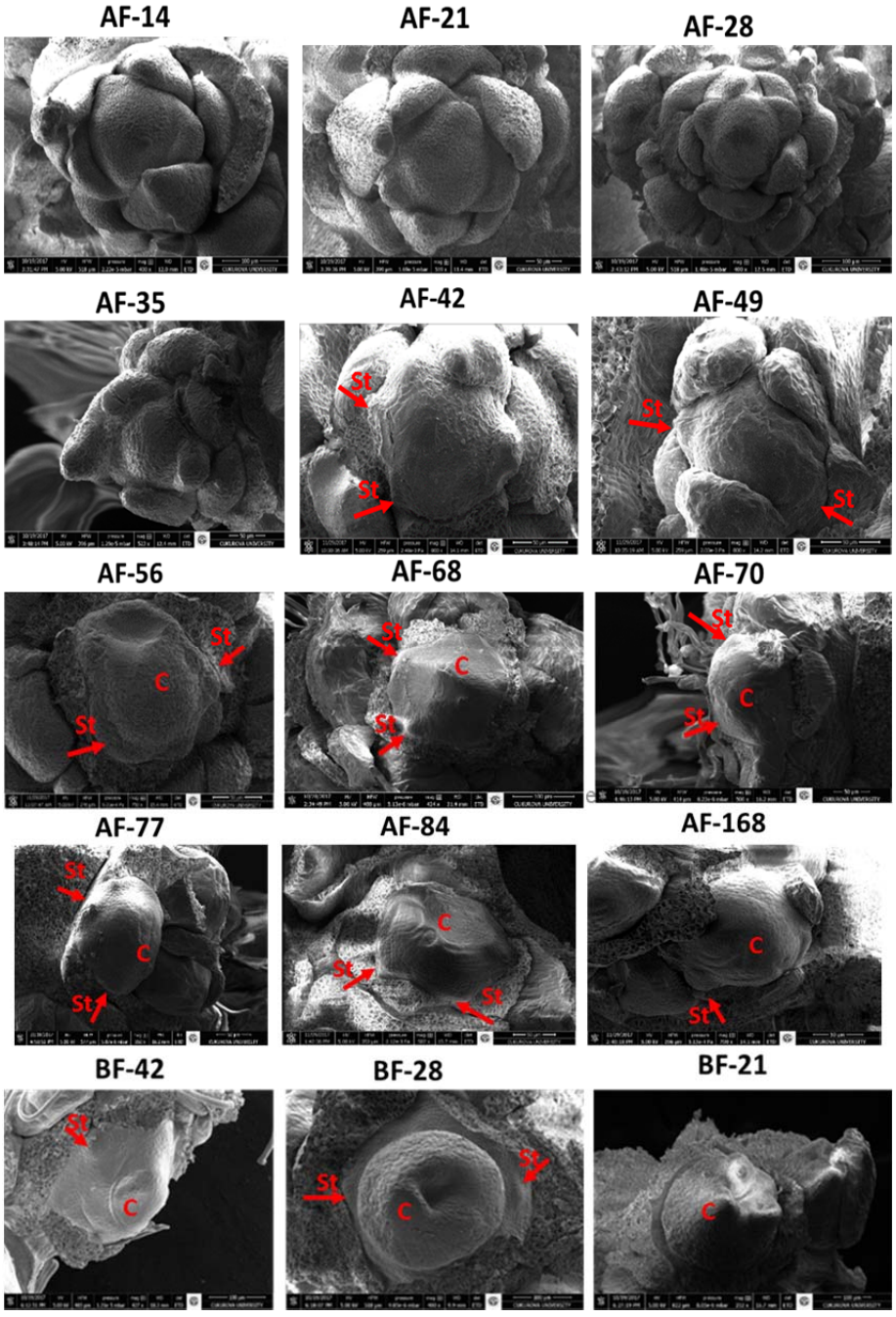
Taramalı elektron çalışması kapsamında dişi Siirt ile erkek Kaşka çeşitlerinin farklı dönemlerde alınan tomurcuk örneklerinde her iki cinsiyet organının büyüme ve gelişme durumları incelenmiş ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.1.1. Dişi Siirt Antepfıstığı Çeşidinin Çiçek Tomurcuklarında Cinsiyet Organlarının Gelişimi

Dişi bitkilerde, erkek bitkilerde olduğu gibi, o yılki çiçeklenme tamamlanması ile birlikte oluşan sürgünlerin yaprak koltuklarında oluşmaya başlayan çiçek tomurcuklarında (karagöz) çiçek primordiyumları gelişmeye başlamış ve Nisan ayının sonunda (AF-14) üç ile beş adet sepal primordiyumunun oluşum başlangıcı gözlemlenmiştir. Mayıs ayının ortalarında (AF-42) erkek organların ilkel andrekiyumuna karşılık gelen lateral primordiyumun tamamının meristemin çevresinde oluşmaya başladığı görülmüştür. Bu organ primordiyumlarının yarısından çoğunun haziran ayının başlarında (AF-49) oluştuğu ve bu sırada çiçek tepesinde bir karpel oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Ortaya çıkan stamen primordiyumları bu ilk aşamadan sonra çok az gelişme göstermiştir. Haziran ayının başlarında (AF-49) karpel primordiyumu çiçek tepesinin merkezine doğru küçük bir çıkıntı yaparak ortaya çıkmıştır. Temmuz ayının ortalarından itibaren karpel primordiyumları çiçeğin merkezinde hafif iç bükey haline gelmiştir (AF-84). Karpel primordiyumun boyutunda küçük

bir artışla, karpel ve stamenlerin büyümesi ve farklılaşmasının baskılandığı ve Ekim ayına kadar bu şekilde kaldığı belirlenmiştir (AF-168). Sonuç olarak, dişi çiçek tomurcuklarında ilkbahar ve erken yaz döneminde gelişmeye başlayan stamen primordiyumları daha fazla gelişmeden büyüme ve gelişmeleri haziran ayı ortalarından itibaren gelişimleri alıkonulmuştur.

Dişi organların gelişimi çiçeklenme öncesi dönemde büyümenin yeniden başlaması ile birlikte hızla ilerlemiştir. Karpel meristemini genişletip çiçek tablasında büyük bir yer kapladığından dolayı aynı boyutta değişmeden kalan stamenleri görmek zorlaşmıştır (BF-42- BF-28). Birincil karpel farklılaştıkça ovaryumunun kendi şeklini aldığı gözlemlenmiştir (BF-28). Bunu iki küçük karpel daha takip etmiş ve bu ikincil karpel, birincil karpelin kenar boşluklarının temelinde başlatılmıştır (BF-28) Sonunda her bir çiçek primordiyumu fonksiyonel bir birincil karpel ve iki küçük steril olan ikincil karpel ile üç karpelli dişi organı meydana getirmiştir (BF-21) (Şekil 4.1).

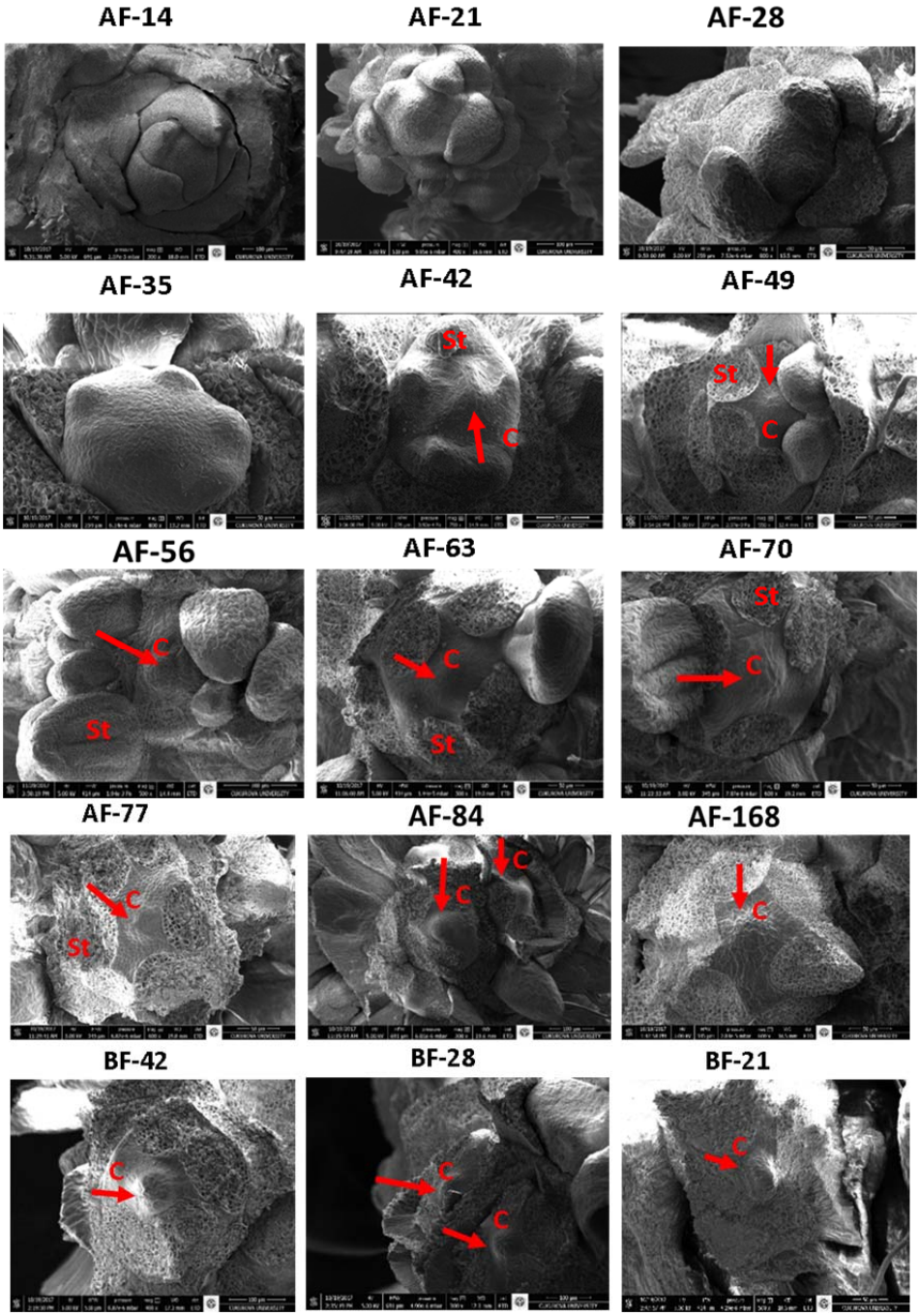


Şekil 4.1. Antepfıstığı dişi çiçeklerin iki döneme ait örneklerin gelişiminin SEM'de incelenmesi ile elde edilen görüntüler. Ölçek = 50 urn.

4.1.2. Erkek Kaşka Antepfıstığı Çeşidinin Çiçek Tomurcuklarında Cinsiyet Organlarının Gelişimi

Tam çiçeklenmeden 14 gün sonra (AF-14) ilk olarak sepal primordiyumlarının oluşumları gözlemlenmiştir. Tam çiçeklenmeden 35 gün sonra (AF-35) meristemin genişlediği ve genellikle beş veya altı adet erkek organ primordiyumunun meristemin dış kenarı boyunca spiral olarak gelişmeye başladığı gözlemlenmiştir. Tam çiçeklenmeden 42 gün sonra alınan örneklerde ise meristemin merkezinde bir çıkıntı oluşumu gözlemlenmiştir. Bu yapının morfolojisi ve konumunun dişi çiçeklerdeki en erken karpel başlangıcı aşamasına benzediği görülmüştür. Haziran ayının başında (AF-49) çiçekteki tüm stamenleri oluşturan andrekiumun oluşumu tamamlanmış ve anterlerin içeriye doğru uzadığı ve çiçek tepesini örtecek kadar büyüdükleri gözlemlenmiştir. Erkek çiçekteki dişi organ büyüme ve gelişimi Haziran ortasına kadar devam etmiş (AF-63) ve bu dönemden sonra büyüme durmuş ve erken ilkbaharda çiçek öncesi döneme kadar dişi organda bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Çiçek tablasında oluşan karpel primordiyumu haziran ayı ortasına kadar değişiklik göstermiş ve bu oluşumun ilerleyen dönemlerde büyüyerek çiçek tablasında daha çok yer kaplayan stamenler nedeniyle daha küçük yapıda görüldüğü belirlenmiştir (AF-84 ve AF-168).

İlkbaharda çiçek tomurcuklarının patlaması öncesi dönemlerde (BF-42 ve BF-28) stamen primordyumları çiçek tablasının dış kenarı boyunca genişleyip büyümeye devam ederken, karpel primordiyumu mart ayına kadar gelişip farklılaşmasa da çiçek tablasında gözlemlenmeye devam etmiştir (Şekil 4.2). Sonuç olarak, erkek çiçek tomurcuğu içerisindeki dişi organ, büyüme dönemi başlangıcında biraz gelişme göstermiş ancak haziran ayından sonra herhangi bir büyüme ve gelişme olmamıştır.



Şekil 4.2. Antepfıstığı erkek çiçeklerin iki döneme ait örneklerin gelişiminin SEM'de incelenmesi ile elde edilen görüntüler. Ölçek = 50 urn.

4.1.3. SEM İle İlgili Bulguların Genel Değerlendirilmesi

Genel olarak tek cinsiyete sahip türlerin birçok bağımsız yolla hermafrodit atalarından farklı evrimsel süreçlerle geliştiği varsayılmaktadır (**Pannell 2017**). Dünyadaki bitkilerinin büyük çoğunluğu hermafrodit olup yaklaşık %6'sı erkek ve dişi bireylere sahip olan dioiklerdir (**Ming ve ark, 2011**). Dioik bitkilerinin erken dönemdeki cinsiyet tespiti avantaj sağlayabilmektedir (**Xiong 2016**). Bugüne kadar yalnızca sınırlı sayıda dioik bitkinin, *Silene latifolia*'daki XY sistemi ve *P. vera*'daki ZW sistemi gibi (**Negrutiu ve ark, 2001; Kafkas ve ark, 2015**), cinsiyet kromozom mekanizmaları tanımlanmıştır. Cinsiyet belirleme mekanizmaları bitkiler arasında çok fazla değişkenlik göstermektedir. Bazı bitkilerde cinsiyet kromozomları bulunurken, bazı bitki türlerinde ise cinsiyeti bir veya birkaç gen belirlemektedir (**Pannell 2017**).

Dioik bitkilerin tek cinsiyete sahip çiçekleri genellikle gelişimin ilk başlangıcında hem androik hem de ginoik primordiyumlara sahip olduğu bir aşamadan geçerek oluştuğu iddia edilmektedir (**Pannell 2017**). Dioik türlerin çiçeklerinin cinsiyete bağlı olarak farklı gelişim aşamalarında gerçekleşen karşı cinsiyetteki organların gelişimsel baskılanmasıyla tek cinsiyetli çiçekleri oluşturduğu ifade edilmiştir **(Dellaporta ve ark, 1993; Grant ve ark, 1994).**

Antepfıstığında çiçek organlarının gelişimi üzerine yapılan daha önceki çalışmalarda **Jones (1950**) ve **Takeda ve ark (1979)** her iki cinsiyete ait çiçek tomurcukları ile taramalı elektron mikroskobunda çalışarak dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında karşı cinsiyete ait herhangi bir izin bulunmadığını bildirmişlerdir. Ancak daha sonra **Hormaza ve Polito**'nun **(1996)** yaptıkları çalışmada hem erkek hem de dişi çiçeklerin gelişmesinde karşı cinsiyetin primordiyal organları çiçek gelişimlerinin erken dönemlerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, çiçek organlarının gelişmeye başlama fenolojilerinin her iki cinsiyette de aynı olduğu belirtilmiştir. Dişi ve erkek çiçek tomurcuklarının erken gelişme döneminde her iki cinsiyete ait organlar başlangıçta birlikte gelişme gösterirken belirli bir aşamadan sonra karşı cinsiyet organının gelişimi durmuştur. İlkel karpel primordiyumunun kalıntıları

tamamen büyüyerek andrekiuma dahil edildiği, benzer şekilde ilkel stamen primordiyumlarının genişleyen ginokiuma dahil edildiği **Hormaza ve Polito (1996)** tarafından ifade edilmiştir. Bu çalışmada da taramalı elektron mikroskobu kullanılarak her iki cinsiyete ait çiçek tomurcukları incelendi ve sonuçta **Hormaza ve Polito**'nun **(1996)** yaptıkları çalışmaya benzer şekilde hem erkek hem de dişi bitkide gelişimin ilk safhalarında karşı cinsiyete ait cinsiyet organlarının oluştuğu belirlenmiştir. Her iki cinsiyette de her iki cinsiyet organının neredeyse birlikte gelişmeye başladığı ancak ileriki safhalarda, bitkinin kendi cinsiyet organı gelişmeye devam ederken aynı bitkideki karşı cinsiyete ait organın gelişmesinin durduğu ve bir daha karşı cinsiyet organında herhangi bir gelişmenin olmadığı belirlenmiştir. **Jones'un (1950)** yaptığı çalışma sonucunda, dişi çiçek gelişiminin erkek çiçek gelişimine göre daha geç olduğu belirtilirken, bu çalışmada zamansal olarak erkek çiçek gelişiminin dişi çiçek gelişiminden daha önce olduğu tespit edilmiştir. **Hormaza ve Polito (1996)** ise dişi ve erkek çiçeklerin neredeyse aynı dönemde (erkek organlar Mayıs ortasında ve daha sonra da dişi organlar) gelişmeye başladıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada taramalı elektron mikroskobu ile dioik bir tür olan *P. vera* erkek ve dişi çiçek tomurcuklarında yapılan analizler sonucunda, karşı cinsiyete ait organ taslaklarının başlangıçta oluştuğu ancak belirli bir aşamadan sonra erken yaz döneminde gelişmenin durduğu belirlenmiştir.

4.2. Antepfıstığında Cinsiyet Organlarının Gelişimi İle İlgili Küçük RNA'ların Belirlenmesi

SEM analiz sonuçlarına göre, ilkbaharda çiçek tomurcukları oluşmaya başladığı dönemden itibaren temmuz ayı başına kadar ve bir sonraki yılda tomurcuk patlamasından önceki dinlenme döneminde alınan çiçek tomurcuklarında küçük RNA sekanslaması yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyonu qRT-PCR ile yapılmıştır.

4.2.1. Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcuklarında Küçük RNA Sekanslaması

Bu çalışmada dişi Siirt ve erkek Kaşka antepfıstığı çeşitlerinden farklı dönemlerde alınan çiçek tomurcuklarından elde edilen RNA'larda küçük RNA sekanslaması yapılmıştır. Filtreleme işleminden sonra toplam 624.388,887 ham sekans verisinden 587.438,703 temiz okuma elde edilmiştir. Küçük RNA (sRNA) sekanslaması sonucunda dişi çiçek tomurcuklarından 159 ile 181 arası bilinen ve 289 ile 360 arasında değişen sayılarda yeni miRNA belirlenmiştir. Farklı dönemlerde alınan dişi çiçek tomurcuklarında ekspirese olan toplam miRNA sayısı ise 484 ile 539 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1). Farklı dönemlerde alınan erkek çiçek tomurcuklarında ise 134 ile 174 arası bilinen ve 224 ile 335 arasında değişen sayılarda yeni miRNA belirlenmiştir. Farklı dönemlerde alınan erkek çiçek tomurcuklarında ekspirese olan toplam miRNA sayısı ise 393 ile 503 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1).

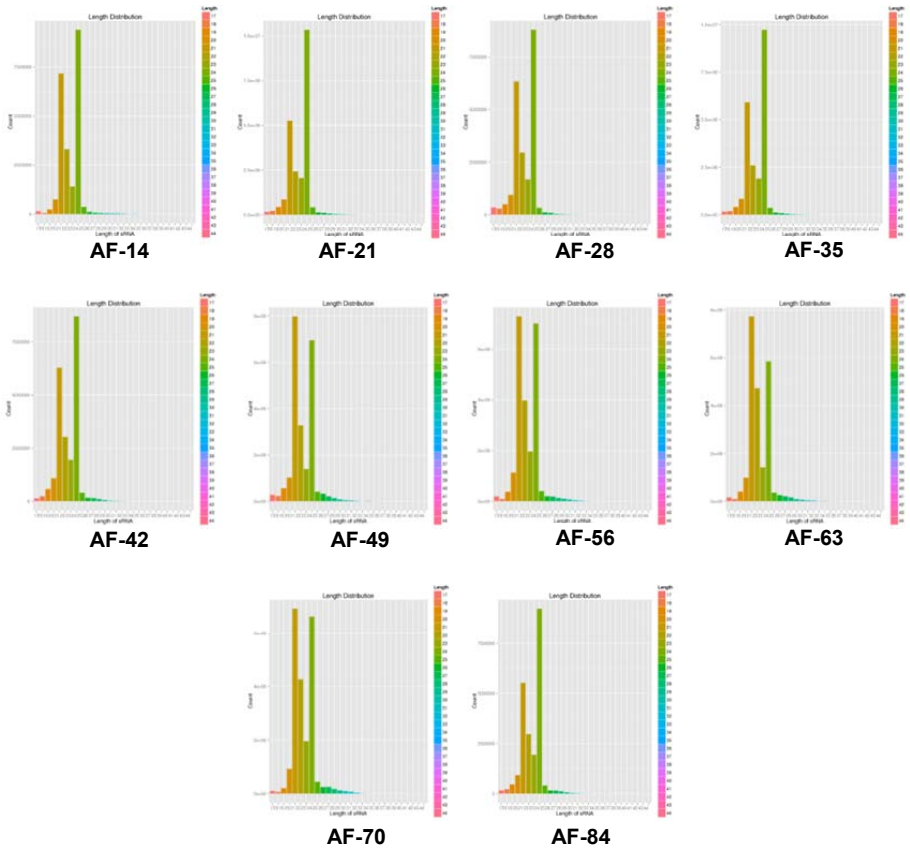
Çizelge 4.1. Dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında örnek alma tarihlerine göre belirlenen bilinen, yeni ve toplam miRNA sayıları.

Örnek alma zamanı	Dişi			Erkek		
	Bilinen miRNA	Yeni miRNA	Toplam miRNA	Bilinen miRNA	Yeni miRNA	Toplam miRNA
*AF-14	167	335	502	134	300	434
AF-21	172	360	532	172	326	498
AF-28	165	356	521	171	322	493
AF-35	181	358	539	171	323	494
AF-42	169	355	524	162	323	485
AF-49	163	335	498	163	328	491
AF-56	171	338	509	166	332	498
AF-63	165	347	512	169	322	491
AF-70	172	342	514	168	335	503
AF-84	169	358	527	165	309	474
**BF-42	159	325	484	174	286	460
BF-28	168	341	509	169	224	393
BF-21	169	289	458	170	273	443

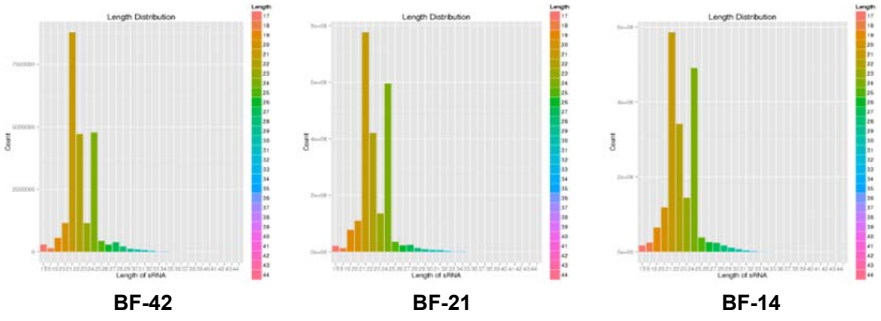
*AF: Tam çiçeklenme sonrası, **BF: Bir sonraki yıl tam çiçeklenme öncesi,

Erkek ve dişi çiçek tomurcuklarından elde edilen küçük RNA'ların uzunlukları 18-30 nükleotit arasında değişmiştir. Dişi çiçek tomurcuklarında tam çiçeklenmeden 42 gün sonraya kadar 24 baz uzunluğundaki küçük RNA'ların sayısı diğerlerine oranla fazla iken, bu dönemden sonra AF-70 dönemine kadar ise 21 baz uzunluğundaki küçük RNA'ların sayısı daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.3). Tomurcuk patlamasından önceki dinlenme döneminde ise 21 baz uzunluğundaki ekspirese olan küçük RNA'ların sayısı diğerlerine göre fazla olmuştur (Şekil 4.4).

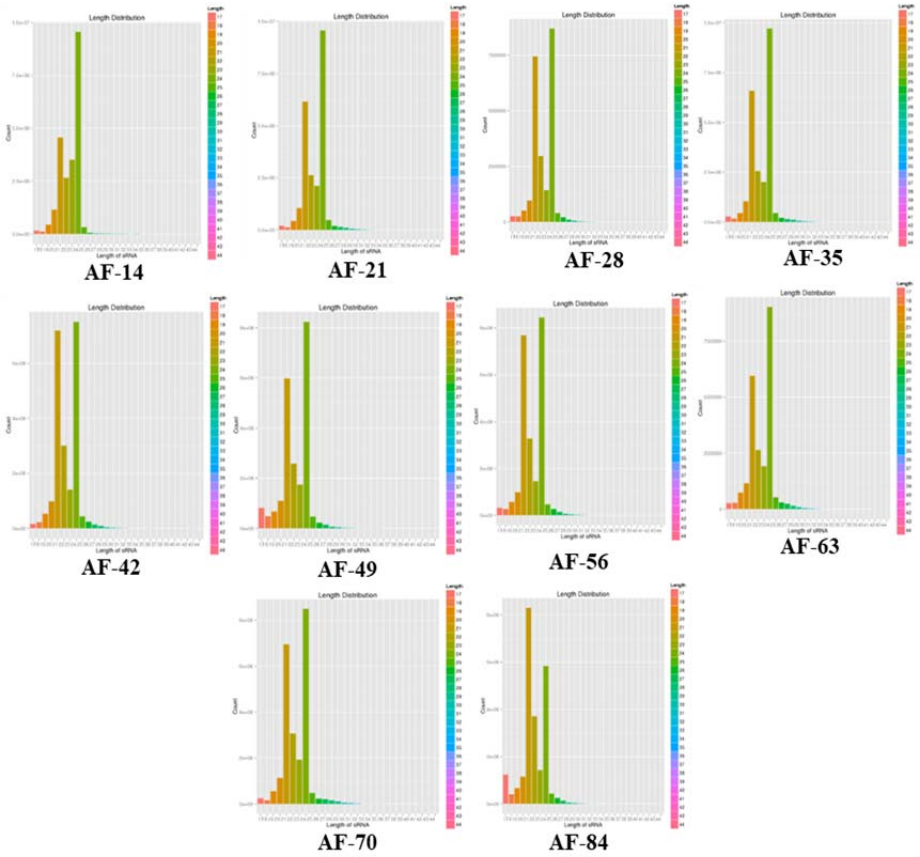
Erkek çiçek tomurcuklarında ise tam çiçeklenmeden 70 gün sonraya kadar 21 baz uzunluğundaki ekspirese olan küçük RNA'ların sayısı diğerlerine göre fazla olmuştur (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



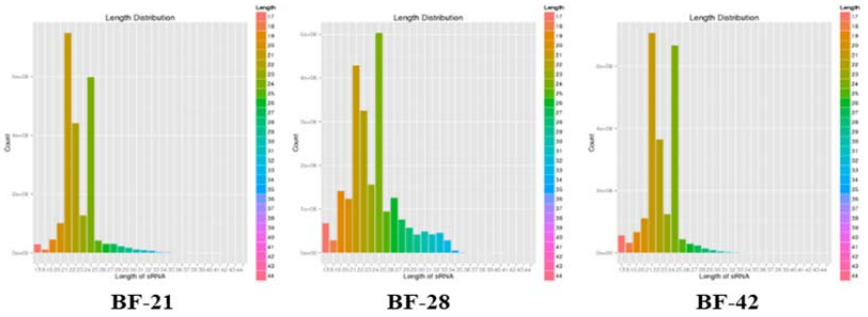
Şekil 4.3. Aktif büyüme döneminde alınan dişi çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları.



Şekil 4.4. Çiçeklenme öncesi dinlenme döneminde alınan dişi çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları.



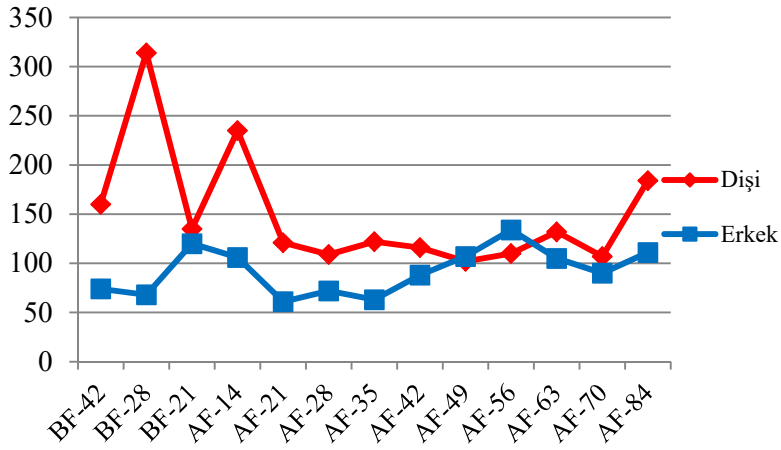
Şekil 4.5. Aktif büyüme döneminde alınan erkek çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları.



Şekil 4.6. Çiçeklenme öncesi dinlenme döneminde alınan erkek çiçek tomurcuğu örneklerinde sRNA uzunluk dağılımları.

4.2.2. Dişi ve Erkek Çiçek Tomurcukları Arasında Farklı Ekspirese Olan Küçük RNA'ların Belirlenmesi

Bu çalışmada antepfıstığının dişi ve erkek çiçek tomurcukları arasında farklı şekilde ekspirese olan miRNA'lar belirlenmiştir. Şekil 4.7'de dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında farklı dönemlerde ekspirese olan toplam miRNA'ların sayısı gösterilmiştir.

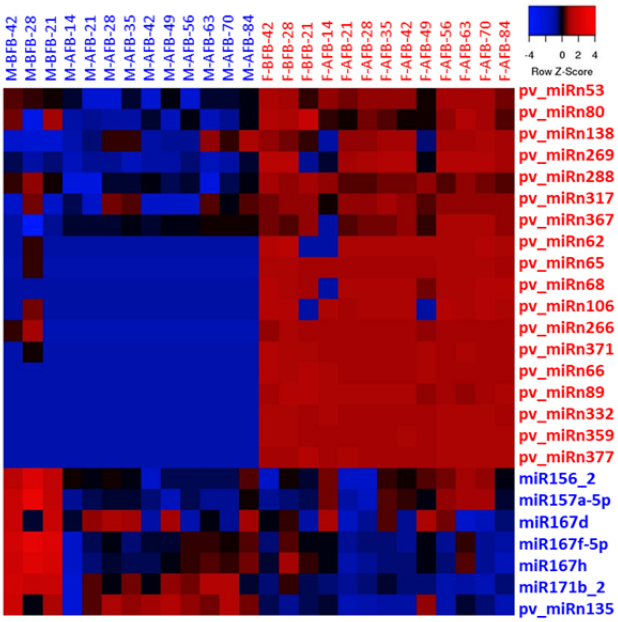


Şekil 4.7. Dişi ve erkek çiçek tomurcuklarında çiçeklenme öncesi dinlenme döneminde ve çiçeklenme sonrası dönemlerde farklı şekilde ekspirese olan toplam miRNA'ların sayısı.

Şekil 4.7'de verilen dönemlere göre toplam miRNA saylarına bakıldığında, dişilerden elde edilen toplam miRNA sayısının en fazla olduğu dönem BF-28 iken, en az miRNA sayısı AF-49 döneminde belirlenmiştir. Erkeklerden elde edilen toplam miRNA sayısının en fazla olduğu dönem AF-56 iken, en az miRNA sayısı AF-21 döneminde olduğu belirlenmiştir.

Dişi örneklerde tam çiçeklenmeden 35 gün sonra alınan örneklerde (AF-35) farklı ekspire olan miRNA sayısı en yüksek iken, tam çiçeklenmeden 42 gün önce (BF-42) alınan örneklerde en düşük olduğu belirlenmiştir. Erkek örneklerde AF-70'de farklı ekspirese olan miRNA'ların sayısı en yüksek iken, AF-49'da dişi ve

erkek örneklerdeki farklı ekspirese olan miRNA sayılarının benzer sayıda olduğu belirlenmiştir. Heatmap ile farklı ekspirese olan bazı miRNA'lar için de hiyerarşik kümeleme analizi uygulanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Heatmap ile farklı şekilde ekspire olmuş miRNA'ların hiyerarşik kümeleme analizleri.

Dişi ve erkekler arasında farklı ekspirese olan 25 adet miRNA'nın hiyerarşik kümeleme analizleri Şekil 4.8'de verilmiştir. Bunlardan 18 tanesi dişilerde 7 tanesi ise erkeklerde farklı ekspirese olan miRNA'lardır. Dişiler lehine farklı espirese olan miRNA'ların tamamı yeni bulunan miRNA'lar iken, erkekler lehine farklı ekspirese olan miRNA'ların altı tanesinin bilinen ve sadece bir tanesinin yeni bulunan miRNA olduğu belirlenmiştir.

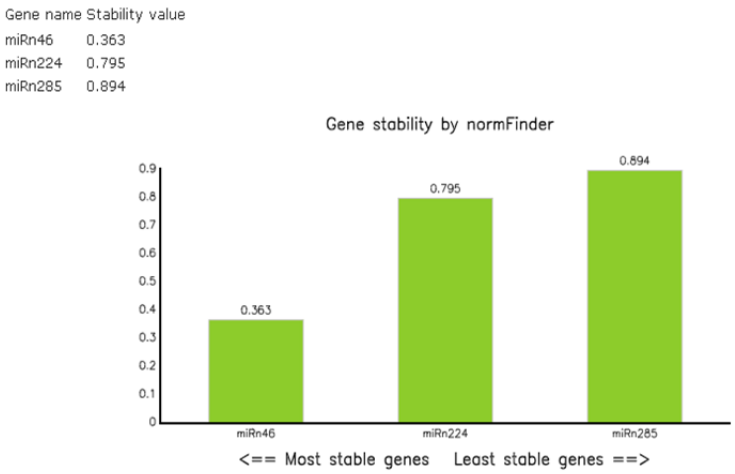
4.2.3. Farklı Ekspirese Olan miRNA'ların qRT-PCR İle Validasyonu

Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'lardan 8 adedinden (pv_miRn377, pv_miRn53, pv_miRn266, pv_miRn89, pv_miRn65,

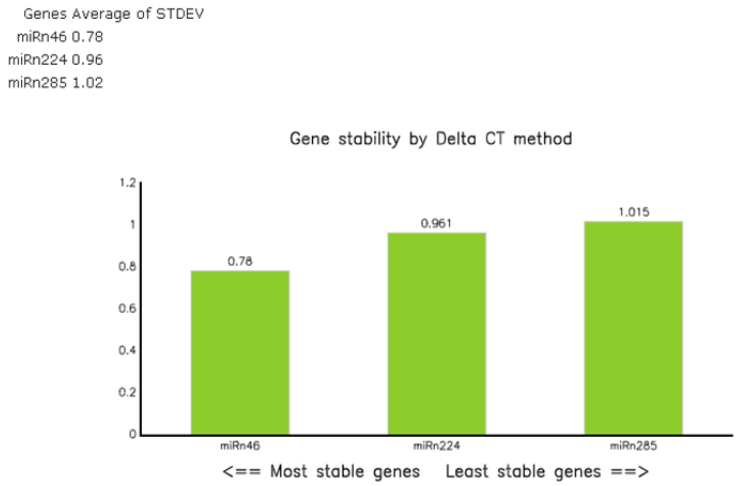
pv_miRn66, miR157a-5p ve miR156_2) primer dizaynları yapılarak qPCR analizleri ile validasyon çalışmasında kullanılmıştır.

Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyonu analizlerinde referans gen belirlenmesinde miRNA'ların sekanslama sonucu ortaya çıkan ekspiresyon değerlerine göre 3 farklı miRNA (miRn46, miRn224, miRn285) referans olarak seçilmiştir. Seçimde her örnekleme döneminde her iki cinsiyette de benzer ekspiresyon değerleri veren miRNA'lar seçilmiştir. RefFinder kullanılarak yapılan analizler sonucunda Referans gen olarak miRn46 seçilmiştir. Üç referans geninin stabilite analizi sonuçları NormFinder ve Delta Ct metoduna göre Şekil 4.9 ve 4.10'de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, qRT-PCR sonuçlarının doğrulanması için miRn46 en iyi referans primer seçilmiştir.

Farklı ekspirese olan miRNA'lardan 8 adedi rastgele seçilerek validasyon için qRT-PCR'da kullanılmıştır. LinRegPCR ile qRT-PCR reaksiyonunun kalitesinin belirlenmesi sonucunda örneklerde PCR verimliliğinin ortalama 1.95 civarında olduğu saptanmıştır. Ayrıca, LinRegPCR: R^2 katsayısı faktörü 0.995'ten yüksek çıkmıştır.

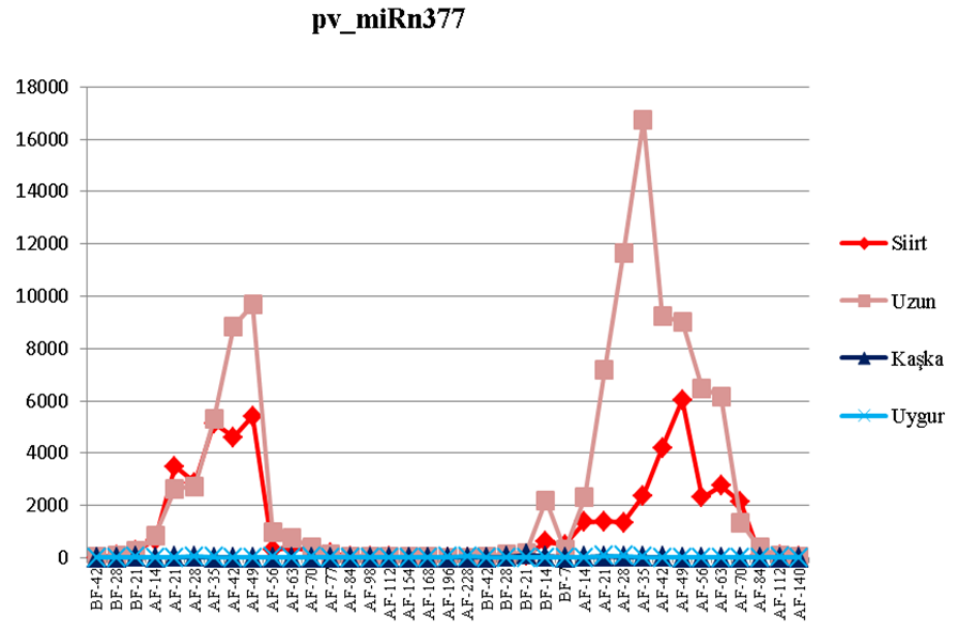


Şekil 4.9. NormFinder ile gen stabilitesinin sonuçları.

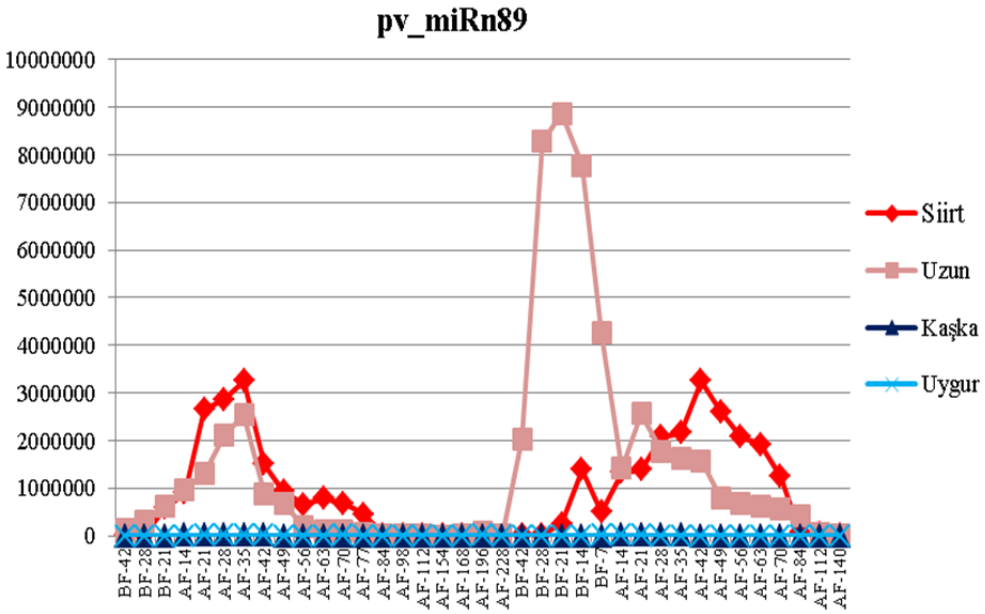


Şekil 4.10. Delta Ct metodu ile gen stabilitesinin sonuçları.

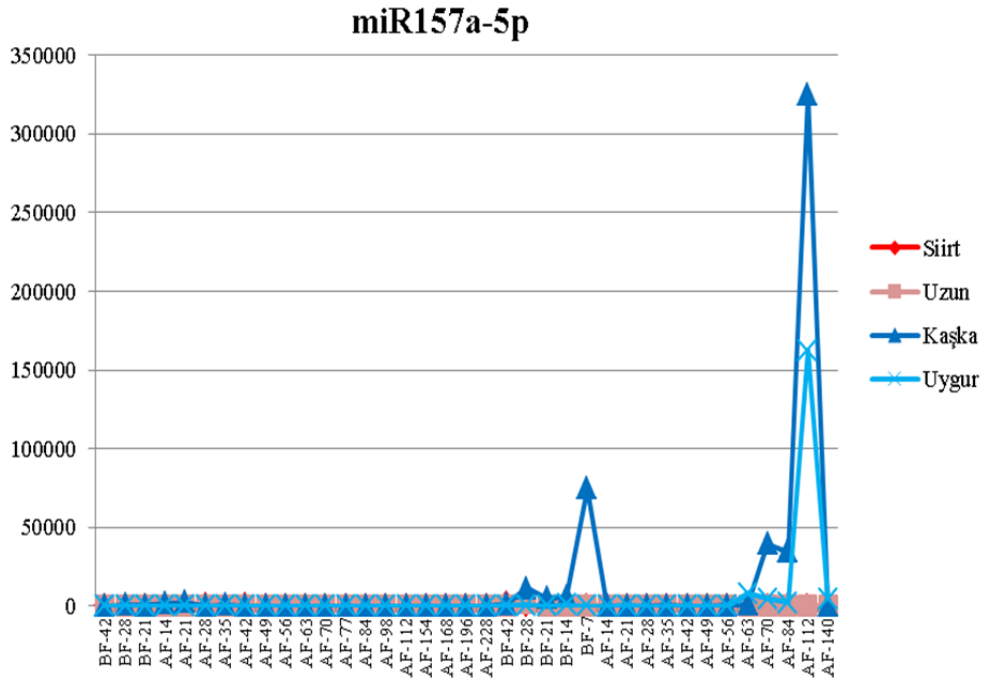
qRT-PCR sonuçlarına göre dişi ve erkek örnekler arasındaki farklı şekilde ekspirese olan miRNA'ların validasyonu gerçekleştirilmiştir. Herbir miRNA'dan elde edilen qPCR sonuçları grafikler halinde Şekil 4.11'den Şekil 14'e kadar verilmiştir. Elde edilen sonuçların sekanslama sonuçları ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. Örneğin pv-miRn377 ve pv-miRn89 dişilerde ekspire olurken erkeklerde ekspire olmamıştır. Benzer şekilde miR157a-5p ve miR156_2 erkeklerde ekspire olurken dişilerde ekspire olmamıştır.



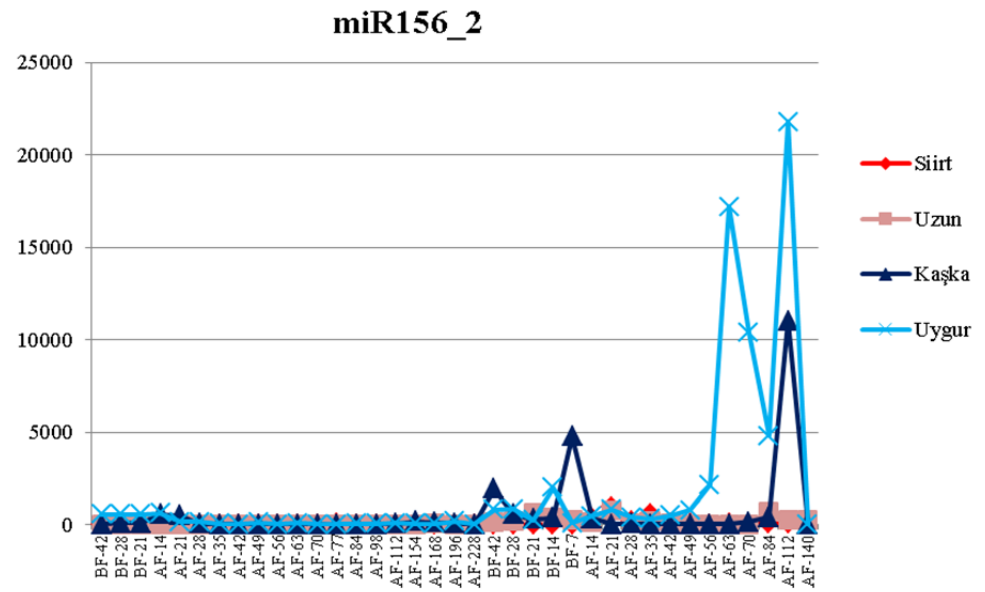
Şekil 4.11. pv_miRn377 miRNA'nın farklı dönemlerdeki qRT-PCR analiz sonucu



Şekil 4.12. pv_miRn89 miRNA'nın farklı dönemlerdeki qRT-PCR analiz sonucu



Şekil 4.13. miR157a-5p miRNA'nın farklı dönemlerdeki qRT-PCR analiz sonucu.



Şekil 4.14. miR156_2 miRNA'nın farklı dönemlerdeki qPCR analiz sonucu.

4.2.4. Farklı Ekspirese olan miRNA'ların Hedeflediği Genlerin ve İşlevlerinin Belirlenmesi

Dişi ve erkek çiçek tomurcukları arasında farklı ekspirese olmuş miRNA'ların hedef genleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Hedef genleri bulmada kullanılan yazılım sadece 25 baza kadar olan miRNA'ların hedeflediği genleri bulduğu için 25 bazın üzerinde baz sayısına sahip miRNA'ların hedeflediği genler belirlenememiştir. Hedef genlerin belirlenmesinde dişi Siirt ve erkek Bağyolu genom dizileri kullanılmıştır. Dişi ve erkek çiçek tomurcukları arasında farklı ekspirese olan 25 adet miRNA'dan 11 tanesinin hedeflediği genler dişi Siirt (78 adet) ve erkek Bağyolu (157 adet) genomlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Buna göre dişi tomurcuklarında erkek tomurcuklardan daha yüksek ekspirese olan 18 miRNA'dan 5 tanesinin Siirt genomunda 29 adet geni ve Bağyolu genomunda ise 43 adet geni hedeflediği belirlenmiştir. Bunlardan pv_miRn317 Siirt genomunda 1 adet ve Bağyolu genomunda 3 adet geni hedeflemiştir. Pv_miRn371 Siirt ve Bağyolu genomlarında birer adet geni hedeflemiştir. Pv_miRn68 Siirt'te 1 adet ve Bağyolu'nda 3 adet geni hedeflemiştir. Pv_miRn80 Siirt genomunda 13 adet geni ve Bağyolu genomunda ise 18 adet geni hedeflemiştir. Pv_miRn89 Siirt genomunda 13 adet geni ve Bağyolu genomunda 18 adet geni hedeflemiştir.

Erkek çiçek tomurcuklarında dişi çiçek tomurcuklarına göre daha yüksek ekspirese olan 6 miRNA'nın Siirt genomunda 49 adet geni ve Bağyolu genomunda ise 114 adet geni hedeflemiştir. miR156_2 Siirt genomunda 17 adet geni ve Bağyolu genomunda 27 adet geni hedeflemiştir. miR157a-5p Siirt genomunda 16 adet geni ve Bağyolu genomunda 27 adet geni hedeflemiştir. miR167d Siirt'te 5 adet geni ve Bağyolu'nda 18 adet geni hedeflemiştir. miR167f-5p Siirt genomunda 5 ve Bağyolu genomunda 18 adet geni hedeflemiştir. miR167h Siirt genomunda 5 ve Bağyolu genomunda 20 adet geni hedeflemiştir. miR171b-2 Siirt genomunda 1 adet geni ve Bağyolu genomunda ise 4 adet geni hedeflediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Siirt ve Bağyolu genomlarında toplam hedeflenen gen sayısı 235 olmuştur. Farklı ekspirese olan 11 adet miRNA'nın kromozom 1'de 54 geni, kromozom 2'de 5 geni, kromozom 3'te 13 geni, kromozom 4'te 15 geni, kromozom 5'te 11 geni, kromozom 6'da 25 geni, kromozom 7'de 12 geni, kromozom 8'de 9 geni, kromozom 9'da 4 geni, kromozom 10'da 5 geni, kromozom 11'de 28 geni, kromozom 12'de 19 geni, kromozom 13'te 14 geni, cinsiyet kromozomu olan kromozom 14'te 1 geni ve kromozomlar dışında kalan scaffoldlarda ise 20 geni hedeflemiştir (Çizelge 4.2). Dişiler lehine farklı ekspirese olan 5 adet miRNA'nın Siirt genomunda hedeflediği ortalama gen sayısı 5.8 iken, Bağyolu genomunda hedeflenen ortalama gen sayısı 9.8 olarak hesaplanmıştır. Erkekler lehine farklı ekspirese olan 6 adet miRNA'nın Siirt genomunda hedeflediği ortalama gen sayısı 8.1 iken, Bağyolu genomunda hedeflenen ortalama gen sayısı 19.0 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Dişi ve erkek örneklerde yeni ve bilinen miRNA'ların hedef genleri, bulundukları kromozom, genlerin görevleri, ve GO sınıflandırmaları.

miRNA	Genom	Hedef Gen	Kromozom	Görev	GO sınıflandırması
pv_miRn317	Siirt	pistachio.v30003460	chr1	agamous-like MADS-box protein AGL6	F:GO:0046983 F:GO:0000977 F:GO:0000981 F:GO:0032440 F:GO:0008134 C:GO:0005634 C:GO:0016021 P:GO:0045944 P:GO:0048481 P:GO:0055114
	Bagyolu	pistachio_male0003130	chr1	agamous-like MADS-box protein AGL6	F:GO:0000977 F:GO:0000981 C:GO:0005634 F:GO:0008134 F:GO:0032440 P:GO:0045944 F:GO:0046983 P:GO:0048481 P:GO:0055114

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0003790	chr1	agamous-like MADS-box protein AGL6	F:GO:0000977 F:GO:0008134 F:GO:0032440 F:GO:0000981 F:GO:0046983 C:GO:0005634 P:GO:0045944 P:GO:0048481 P:GO:0055114
	Bagyolu	pistachio_male 0042050	chr10	5'-3' exonuclease	F:GO:0003887 F:GO:0008409 C:GO:0005737 P:GO:0006261
pv_miRn371	Siirt	pistachio.v300 14770	chr1	probable pectate lyase 8	F:GO:0030570 F:GO:0046872 P:GO:0045490
	Bagyolu	pistachio_male 0017160	chr1	probable pectate lyase 8	F:GO:0030570 F:GO:0046872 P:GO:0045490
pv_miRn68	Siirt	pistachio.v301 60550	chr3	structural constituent of cell wall, putative	
	Bagyolu	pistachio_male 0115000	chr13		
	Bagyolu	pistachio_male 0184170	chr3	structural constituent of cell wall, putative	
	Bagyolu	pistachio_male 0006490	chr1	syntaxin-71-like	F:GO:0005484 C:GO:0005623 C:GO:0016021 P:GO:0006886 P:GO:0061025
pv_miRn80	Siirt	pistachio.v302 52430	chr8	DDB1- and CUL4-associated factor homolog 1	C:GO:0005634 P:GO:0009793 P:GO:0009908 P:GO:0016567 P:GO:0048366 C:GO:0080008
	Siirt	pistachio.v300 71370	chr12	putative reverse transcriptase domain-containing protein	F:GO:0005488 P:GO:0006259 F:GO:0016779 F:GO:0016787
	Siirt	pistachio.v300 71420	chr12	putative reverse transcriptase domain-containing protein	F:GO:0005488 P:GO:0006259 F:GO:0016779 F:GO:0016787
	Siirt	pistachio.v302 21820	chr6	histone-lysine N-methyltransferase	
	Siirt	pistachio.v302 63840	chr8	flavonoid 3-O-glucosyltransferase-like	C:GO:0043231 F:GO:0080043 F:GO:0080044

Çizelge 4.2. devamı

	Siirt	pistachio.v300 00620	chr1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	P:GO:0000413 F:GO:0003755
	Siirt	pistachio.v300 54520	chr11	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37-like	F:GO:0003676 F:GO:0004386 F:GO:0005524
	Siirt	pistachio.v301 90930	chr4	protein PIN-LIKES 2	C:GO:0016021 P:GO:0055085
	Siirt	pistachio.v301 73900	chr3	ABC transporter B family member 15-like	F:GO:0005524 P:GO:0006855 F:GO:0008559 C:GO:0016021 P:GO:0042908
	Siirt	pistachio.v302 19320	chr6	trihelix transcription factor ASR3-like	F:GO:0003677
	Siirt	pistachio.v301 75530	chr3	glucan endo-1,3-beta-glucosidase	F:GO:0016798 C:GO:0031224
	Siirt	pistachio.v300 54460	chr11	uncharacterized protein	C:GO:0005773
	Siirt	pistachio.v300 01840	chr1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	P:GO:0000413 F:GO:0003755
	Bagyolu	pistachio_male 0007370	chr1	pentatricopeptide repeat-containing protein	F:GO:0008270
	Bagyolu	pistachio_male 0300620	chr8	DDB1- and CUL4-associated factor homolog 1	P:GO:0009791 P:GO:0010154 P:GO:0048827
	Bagyolu	pistachio_male 0253940	chr6	histone-lysine N-methyltransferase SETD1B-A	
	Bagyolu	pistachio_male 0258280	chr6	histone-lysine N-methyltransferase SETD1B-A	
	Bagyolu	pistachio_male 0288780	chr8	flavonoid 3-O-glucosyltransferase-like	C:GO:0043231 F:GO:0080043 F:GO:0080044
	Bagyolu	pistachio_male 0001470	chr1	putative dual specificity protein phosphatase DSP8	F:GO:0004439 F:GO:0004721 P:GO:0006470 C:GO:0016020
	Bagyolu	pistachio_male 0070090	chr11	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37-like	F:GO:0003676 F:GO:0004386 F:GO:0005524
	Bagyolu	pistachio_male 0206140	chr4	protein PIN-LIKES 2	C:GO:0016021 P:GO:0055085
	Bagyolu	pistachio_male 0214250	chr4	ABC transporter B family member 15-like	F:GO:0000166 F:GO:0016887 C:GO:0016020
	Bagyolu	pistachio_male 0112420	chr13	UPF0481 protein At3g47200-like	C:GO:0016020 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0254340	chr6	trihelix transcription factor ASR3-like	F:GO:0003677

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0103440	chr13	UPF0481 protein	C:GO:0016020 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0103470	chr13	UPF0481 protein	C:GO:0016020 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0103460	chr13	UPF0481 protein	C:GO:0016020 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0112410	chr13	UPF0481 protein	C:GO:0016020 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0236210	chr5	dehydrodolichyl diphosphate synthase 6	F:GO:0016765
	Bagyolu	pistachio_male 0349020	ScfZf2 F_29% 3BHRS CAF% 3D75-1	zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 2-like	
	Bagyolu	pistachio_male 0333530	ScfZf2 F_119 %3BH RSCA F%3D2 78-1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103941309	F:GO:0003676 P:GO:0015074
pv_miRn89	Siirt	pistachio.v302 47890	chr7	integrin-linked protein kinase 1-like	F:GO:0004672 F:GO:0005524 P:GO:0006468
	Siirt	pistachio.v300 19820	chr1	callose synthase 12	
	Siirt	pistachio.v302 08350	chr5	protein DGS1	C:GO:0016021
	Siirt	pistachio.v302 36400	chr7	protein tesmin/TSO1-like CXC 2	
	Siirt	pistachio.v300 60330	chr11	probable serine/threonine-protein kinase PBL19	
	Siirt	pistachio.v300 05240	chr1	F-box/kelch-repeat protein At3g61590	C:GO:0016021
	Siirt	pistachio.v301 04390	chr14	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like 1	F:GO:0051213
	Siirt	pistachio.v302 29720	chr6	agamous-like MADS-box protein AGL15	F:GO:0000977 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0045944 F:GO:0046983
	Siirt	pistachio.v302 09260	chr5	floral homeotic protein DEFICIENS-like	F:GO:0000977 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0045944 F:GO:0046983

Çizelge 4.2. devamı

	Siirt	pistachio.v30052300	chr11	putative F-box protein	
	Siirt	pistachio.v30228800	chr6	agamous-like MADS-box protein AGL9	F:GO:0000977 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0045944 F:GO:0046983
	Siirt	pistachio.v30011980	chr1	truncated transcription factor CAULIFLOWER A-like	F:GO:0000977 F:GO:0000981 C:GO:0005634 P:GO:0007275 F:GO:0008134 P:GO:0045944 F:GO:0046983
	Siirt	pistachio.v30047240	chr10	floral homeotic protein DEFICIENS-like	F:GO:0000977 F:GO:0046983 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0007275 P:GO:0045944
	Bagyolu	pistachio_male0232380	chr5	floral homeotic protein DEFICIENS-like	F:GO:0000977 F:GO:0046983 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0045944
	Bagyolu	pistachio_male0054140	chr10	floral homeotic protein DEFICIENS-like	F:GO:0005488
	Bagyolu	pistachio_male0264840	chr7	dual specificity protein kinase shkC-like	F:GO:0004672 F:GO:0005524 P:GO:0006468 P:GO:0007229
	Bagyolu	pistachio_male0045770	chr10	floral homeotic protein PMADS 2	F:GO:0000977 F:GO:0003700 F:GO:0046983 C:GO:0005634 P:GO:0045944
	Bagyolu	pistachio_male0058510	chr11	protein DGS1	C:GO:0005739 C:GO:0016021 P:GO:0044249
	Bagyolu	pistachio_male0275840	chr7	protein tesmin/TSO1-like CXC 2	
	Bagyolu	pistachio_male0006990	chr1	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male0063430	chr11	probable serine/threonine-protein kinase PBL19	F:GO:0004672 F:GO:0005524 P:GO:0006468
	Bagyolu	pistachio_male0278440	chr7	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	F:GO:0051213

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0278460	chr7	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like 1	F:GO:0016491
	Bagyolu	pistachio_male 0240960	chr6	agamous-like MADS-box protein AGL15	F:GO:0000977 F:GO:0003700 F:GO:0046983 C:GO:0005634 P:GO:0045944
	Bagyolu	pistachio_male 0238970	chr6	agamous-like MADS-box protein AGL15	F:GO:0000977 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0045944 F:GO:0046983
	Bagyolu	pistachio_male 0242050	chr6	agamous-like MADS-box protein AGL9	F:GO:0000977 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0045944 F:GO:0046983
	Bagyolu	pistachio_male 0195720	chr4	truncated transcription factor CAULIFLOWER A-like	
	Bagyolu	pistachio_male 0089890	chr12	floral homeotic protein AGAMOUS	F:GO:0000977 F:GO:0000981 F:GO:0008134 F:GO:0046983 C:GO:0005634 P:GO:0045944 P:GO:0048481
	Bagyolu	pistachio_male 0248340	chr6	SEPALLATA1-like protein	F:GO:0003677
	Bagyolu	pistachio_male 0045760	chr10	floral homeotic protein PMADS 2	F:GO:0005515
	Bagyolu	pistachio_male 0341120	ScfZf2F_215%3BHRSCAF%3D498-1	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase LECRK1	F:GO:0000166 F:GO:0004672 F:GO:0004674 F:GO:0005524 F:GO:0016301 F:GO:0030246 F:GO:0016740 P:GO:0006468 C:GO:0016020 C:GO:0016021 P:GO:0016310 P:GO:0048544
miR156_2	Siirt	pistachio.v302 79130	chr9	squamosa promoter-binding-like protein 3	F:GO:0003677 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908 F:GO:0046872

Çizelge 4.2. devamı

	Siirt	pistachio.v302 62380	chr8	squamosa promoter-binding-like protein 9	F:GO:0003677 C:GO:0005634 F:GO:0046872
	Siirt	pistachio.v302 28730	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 12	F:GO:0003677 C:GO:0005634 F:GO:0046872
	Siirt	pistachio.v300 20080	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 2	F:GO:0003677 C:GO:0005634 F:GO:0046872
	Siirt	pistachio.v302 26600	chr6	squamosa promoter-binding protein 1-like	F:GO:0003677 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908 F:GO:0046872
	Siirt	pistachio.v300 12010	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 6	F:GO:0005488
	Siirt	pistachio.v301 74010	chr3	squamosa promoter-binding-like protein 13A	
	Siirt	pistachio.v300 02280	chr1	hypothetical protein	
	Siirt	pistachio.v302 28810	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 7	F:GO:0005488
	Siirt	pistachio.v301 45300	chr2	squamosa promoter-binding protein 16	F:GO:0003677 C:GO:0005634 F:GO:0046872
	Siirt	pistachio.v300 76150	chr12	squamosa promoter-binding-like protein 6	F:GO:0003677 C:GO:0005634 F:GO:0046872
	Siirt	pistachio.v300 17560	chr1	cationic amino acid transporter 1	F:GO:0005313 C:GO:0005886 F:GO:0015189 P:GO:0015813 C:GO:0016021 P:GO:0051938 P:GO:1903401
	Siirt	pistachio.v300 04640	chr1	BTB/POZ domain-containing protein	
	Siirt	pistachio.v300 95130	chr13	uncharacterized protein	F:GO:0000149 P:GO:0035493
	Siirt	pistachio.v300 95120	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824
	Siirt	pistachio.v302 54300	chr8	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116 C:GO:0016021
	Siirt	pistachio.v300 72940	chr12	EARLY FLOWERING 3	

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0090170	chr12	protein SRG1-like	F:GO:0008168 F:GO:0046872 F:GO:0102803 F:GO:0102805 P:GO:0055114 P:GO:0032259
	Bagyolu	pistachio_male 0087240	chr12	squamosa promoter-binding-like protein 3	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Bagyolu	pistachio_male 0086540	chr12	squamosa promoter-binding-like protein 3	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Bagyolu	pistachio_male 0320630	chr9	squamosa promoter-binding-like protein 9	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0290200	chr8	squamosa promoter-binding-like protein 12	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0243810	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 2	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0242160	chr6	4-coumarate--CoA ligase-like 1	F:GO:0003824
	Bagyolu	pistachio_male 0023410	chr1	squamosa promoter-binding protein 1-like	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Bagyolu	pistachio_male 0013420	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 13A	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0013180	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 13A	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0214750	chr4	hypothetical protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0001830	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 7	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0242040	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 16	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0158840	chr2	squamosa promoter-binding-like protein 6	F:GO:0005488
	Bagyolu	pistachio_male 0243690	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 16	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0173840	chr3	amino acid transporter AVT1C-like	P:GO:0003333 F:GO:0015171 C:GO:0016021 C:GO:0005774
	Bagyolu	pistachio_male 0020370	chr1	BTB/POZ domain-containing protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0095550	chr12	cationic amino acid transporter 1-like	
	Bagyolu	pistachio_male 0006360	chr1	HAD-like domain containing protein	F:GO:0000149 P:GO:0035493
	Bagyolu	pistachio_male 0005790	chr1	hypothetical protein	F:GO:0000149 P:GO:0035493
	Bagyolu	pistachio_male 0105630	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0105690	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0183000	chr3	squamosa promoter-binding protein 20	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Bagyolu	pistachio_male 0365030	ScfZf2F_503%3BHRSCAF%3D1240-1	squamosa promoter-binding-like protein 6 isoform X2	F:GO:0003677 C:GO:0005634 F:GO:0046872
	Bagyolu	pistachio_male 0345370	ScfZf2F_264%3BHRSCAF%3D635-1	BTB/POZ domain-containing protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0327370	ScfZf2F_1054%3BHRSCAF%3D2276-1	bark storage protein A-like	F:GO:0003824

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0327320	ScfZf2 F_1054 %3BH RSCA F%3D2 276-1	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116
miR157a-5p	Siirt	pistachio.v302 79130	chr9	squamosa promoter-binding-like protein 9	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Siirt	pistachio.v302 62380	chr8	squamosa promoter-binding-like protein 12	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Siirt	pistachio.v302 28730	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 2	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Siirt	pistachio.v300 72940	chr12	squamosa promoter-binding-like protein 3	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Siirt	pistachio.v302 26600	chr6	squamosa promoter-binding protein 9	F:GO:0005488
	Siirt	pistachio.v300 12010	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 13A	
	Siirt	pistachio.v300 20080	chr1	squamosa promoter-binding protein 1-like	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Siirt	pistachio.v301 74010	chr3	hypothetical protein	
	Siirt	pistachio.v300 02280	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 7	F:GO:0005488
	Siirt	pistachio.v302 28810	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 16	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Siirt	pistachio.v301 45300	chr2	squamosa promoter-binding-like protein 6	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Siirt	pistachio.v300 76150	chr12	cationic amino acid transporter 1	F:GO:0005313 F:GO:0015189 C:GO:0005886 C:GO:0016021 P:GO:0015813 P:GO:0051938 P:GO:1903401

Çizelge 4.2. devamı

	Siirt	pistachio.v30004640	chr1	uncharacterized protein	F:GO:0000149 P:GO:0035493
	Siirt	pistachio.v30017560	chr1	BTB/POZ domain-containing protein	
	Siirt	pistachio.v30095130	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824
	Siirt	pistachio.v30095120	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male0320630	chr9	squamosa promoter-binding-like protein 9	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male0290200	chr8	squamosa promoter-binding-like protein 12	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male0243810	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 2 isoform X1	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male0242160	chr6	4-coumarate--CoA ligase-like 1	F:GO:0003824
	Bagyolu	pistachio_male0087240	chr12	squamosa promoter-binding protein 1-like	F:GO:0003677 F:GO:0003700 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908 F:GO:0046872
	Bagyolu	pistachio_male0086540	chr12	squamosa promoter-binding-like protein 3	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Bagyolu	pistachio_male0090170	chr12	protein SRG1-like	F:GO:0008168 F:GO:0046872 F:GO:0102803 F:GO:0102805 P:GO:0032259 P:GO:0055114
	Bagyolu	pistachio_male0013420	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 13A	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male0013180	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 13A	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male0023410	chr1	squamosa promoter-binding protein 1-like	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0214750	chr4	hypothetical protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0001830	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 7	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0242040	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 16	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0158840	chr2	squamosa promoter-binding-like protein 6	F:GO:0005488
	Bagyolu	pistachio_male 0243690	chr6	squamosa promoter-binding-like protein 16	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0095550	chr12	cationic amino acid transporter 1	
	Bagyolu	pistachio_male 0020370	chr1	BTB/POZ domain-containing protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0006360	chr1	HAD-like domain containing protein	F:GO:0000149 P:GO:0035493
	Bagyolu	pistachio_male 0005790	chr1	hypothetical protein	F:GO:0000149 P:GO:0035493
	Bagyolu	pistachio_male 0173840	chr3	amino acid transporter AVT1C-like	P:GO:0003333 F:GO:0015171 C:GO:0005774 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0105630	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0105690	chr13	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0183000	chr3	squamosa promoter-binding protein 20	F:GO:0003677 F:GO:0003700 F:GO:0046872 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009908
	Bagyolu	pistachio_male 0365030	ScfZf2F_503%3BHRSCAF%3D1240-1	squamosa promoter-binding-like protein 6 isoform X2	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0345370	ScfZf2F_264%3BHRSCAF%3D635-1	BTB/POZ domain-containing protein	

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0327370	ScfZf2 F_1054 %3BH RSCA F%3D2 276-1	bark storage protein A-like	F:GO:0003824
	Bagyolu	pistachio_male 0327320	ScfZf2 F_1054 %3BH RSCA F%3D2 276-1	bark storage protein A-like	F:GO:0003824 P:GO:0009116
miR167d	Siirt	pistachio.v300 51230	chr11	DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH12-like	F:GO:0003676 F:GO:0004386 F:GO:0005524
	Siirt	pistachio.v302 02830	chr5	WD repeat-containing protein 91 homolog	C:GO:0005829 P:GO:0043551 P:GO:0045022
	Siirt	pistachio.v300 57650	chr11	KH domain-containing protein	F:GO:0003723 F:GO:0016740
	Siirt	pistachio.v302 34000	chr7	exopolygalacturonase-like	F:GO:0004650 C:GO:0005576 P:GO:0005975 P:GO:0071555
	Siirt	pistachio.v300 07450	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0166600	chr3	RING-H2 finger protein	C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0197960	chr4	WD repeat-containing protein 91 homolog	C:GO:0005829 P:GO:0043551 P:GO:0045022
	Bagyolu	pistachio_male 0072180	chr11	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0072740	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0072620	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0072060	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0279950	chr7	Glycoside hydrolase, family 28	F:GO:0016798 C:GO:0005739 P:GO:0016554 P:GO:0080156
	Bagyolu	pistachio_male 0009680	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634 C:GO:0016021

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0009620	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0073190	chr11	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0203340	chr4	auxin response factor 8	
	Bagyolu	pistachio_male 0085530	chr12	auxin response factor 6	F:GO:0003677 F:GO:0016787 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009734
	Bagyolu	pistachio_male 0024050	chr1	auxin response factor 6	F:GO:0003677 F:GO:0008289 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009734 P:GO:0006869
	Bagyolu	pistachio_male 0195700	chr4	gibberellin 20 oxidase 1	F:GO:0051213 P:GO:0008152 P:GO:0009987 P:GO:0048856
	Bagyolu	pistachio_male 0219020	chr5	protein WUSCHEL	F:GO:0003677 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0362680	ScfZf2F_464%3BHRSCAF%3D1138-1	origin of replication complex subunit 2	F:GO:0003688 C:GO:0000808 C:GO:0005634 C:GO:0005664 P:GO:0006260
	Bagyolu	pistachio_male 0359340	ScfZf2F_420%3BHRSCAF%3D1013-1	KH domain-containing protein	F:GO:0003723
	Bagyolu	pistachio_male 0401150	ScfZf2F_983%3BHRSCAF%3D2205-1	KH domain-containing protein	F:GO:0003723
miR167f-5p	Siirt	pistachio.v30057650	chr11	KH domain-containing protein	F:GO:0003723 F:GO:0016740
	Siirt	pistachio.v30202830	chr5	WD repeat-containing protein 91 homolog	C:GO:0005829 P:GO:0043551 P:GO:0045022

Çizelge 4.2. devamı

	Siirt	pistachio.v30051230	chr11	DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH12-like	F:GO:0003676 F:GO:0004386 F:GO:0005524
	Siirt	pistachio.v30007450	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Siirt	pistachio.v30234000	chr7	exopolygalacturonase-like	F:GO:0004650 C:GO:0005576 P:GO:0005975 P:GO:0071555
	Bagyolu	pistachio_male0166600	chr3	RING-H2 finger protein	C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male0197960	chr4	WD repeat-containing protein 91 homolog	C:GO:0005829 P:GO:0043551 P:GO:0045022
	Bagyolu	pistachio_male0009680	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	C:GO:0005634 C:GO:0016021 F:GO:0003677 F:GO:0046872
	Bagyolu	pistachio_male0009620	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0003677 F:GO:0046872 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male0279950	chr7	Glycoside hydrolase, family 28	C:GO:0005739 F:GO:0016798 P:GO:0016554 P:GO:0080156
	Bagyolu	pistachio_male0072180	chr11	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male0072740	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male0072620	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male0072060	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male0073190	chr11	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male0085530	chr12	auxin response factor 6	C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009734 F:GO:0003677 F:GO:0016787
	Bagyolu	pistachio_male0024050	chr1	Auxin response factor 6	F:GO:0003677 F:GO:0008289 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0006869 P:GO:0009734

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0203340	chr4	auxin response factor 8	
	Bagyolu	pistachio_male 0195700	chr4	gibberellin 20 oxidase 1	P:GO:0008152 P:GO:0009987 P:GO:0048856 F:GO:0051213
	Bagyolu	pistachio_male 0219020	chr5	protein WUSCHEL	F:GO:0003677 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0359340	ScfZf2 F_420 %3BH RSCA F%3D1 013-1	KH domain-containing protein	F:GO:0003723
	Bagyolu	pistachio_male 0401150	ScfZf2 F_983 %3BH RSCA F%3D2 205-1	KH domain-containing protein	F:GO:0003723
	Bagyolu	pistachio_male 0362680	ScfZf2 F_464 %3BH RSCA F%3D1 138-1	origin of replication complex subunit 2	F:GO:0003688 C:GO:0000808 C:GO:0005634 C:GO:0005664 P:GO:0006260
miR167h	Siirt	pistachio.v300 57650	chr11	KH domain-containing protein	F:GO:0003723 F:GO:0016740
	Siirt	pistachio.v302 02830	chr5	WD repeat-containing protein 91 homolog	C:GO:0005829 P:GO:0043551 P:GO:0045022
	Siirt	pistachio.v302 34000	chr7	exopolygalacturonase-like	F:GO:0004650 C:GO:0005576 P:GO:0005975 P:GO:0071555
	Siirt	pistachio.v300 51230	chr11	DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH12-like	F:GO:0003676 F:GO:0004386 F:GO:0005524
	Siirt	pistachio.v300 07450	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0046872 F:GO:0003677 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0166600	chr3	RING-H2 finger protein	C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0197960	chr4	WD repeat-containing protein 91 homolog	C:GO:0005829 P:GO:0043551 P:GO:0045022
	Bagyolu	pistachio_male 0279950	chr7	Glycoside hydrolase, family 28	C:GO:0005739 F:GO:0016798 P:GO:0016554 P:GO:0080156

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0009680	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0046872 F:GO:0003677 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0009620	chr1	squamosa promoter-binding-like protein 1	F:GO:0046872 F:GO:0003677 C:GO:0005634 C:GO:0016021
	Bagyolu	pistachio_male 0072180	chr11	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0072740	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0072620	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0072060	chr11	putative F-box protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0073190	chr11	F-box/kelch-repeat protein	
	Bagyolu	pistachio_male 0085530	chr12	auxin response factor 6	F:GO:0016787 F:GO:0003677 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0009734
	Bagyolu	pistachio_male 0024050	chr1	auxin response factor 6	F:GO:0003677 F:GO:0008289 C:GO:0005634 P:GO:0006355 P:GO:0006869 P:GO:0009734
	Bagyolu	pistachio_male 0203340	chr4	auxin response factor 8	
	Bagyolu	pistachio_male 0195700	chr4	gibberellin 20 oxidase 1	P:GO:0008152 P:GO:0009987 P:GO:0048856 F:GO:0051213
	Bagyolu	pistachio_male 0219020	chr5	protein WUSCHEL	F:GO:0003677 C:GO:0005634
	Bagyolu	pistachio_male 0003090	chr1	gibberellin 20 oxidase 2-like	P:GO:0009686 P:GO:0009826 P:GO:0009908 F:GO:0045544
	Bagyolu	pistachio_male 0003750	chr1	gibberellin 20 oxidase 1-D-like	P:GO:0055114 P:GO:0009686 P:GO:0009826 P:GO:0009908 F:GO:0016707 F:GO:0045544 F:GO:0046872

Çizelge 4.2. devamı

	Bagyolu	pistachio_male 0359340	ScfZf2 F_420 %3BH RSCA F%3D1 013-1	KH domain-containing protein	F:GO:0003723
	Bagyolu	pistachio_male 0401150	ScfZf2 F_983 %3BH RSCA F%3D2 205-1	KH domain-containing protein	F:GO:0003723
	Bagyolu	pistachio_male 0362680	ScfZf2 F_464 %3BH RSCA F%3D1 138-1	origin of replication complex subunit 2	F:GO:0003688 C:GO:0000808 C:GO:0005634 C:GO:0005664 P:GO:0006260
miR171b_2	Siirt	pistachio.v300 02550	chr1	scarecrow-like protein 6	
	Bagyolu	pistachio_male 0002230	chr1	scarecrow-like protein 6	
	Bagyolu	pistachio_male 0157630	chr2	scarecrow-like protein 22	
	Bagyolu	pistachio_male 0231260	chr5	scarecrow-like protein 15	P:GO:0030154 P:GO:0048831
	Bagyolu	pistachio_male 0094330	chr12	putative calcium-transporting ATPase 13	F:GO:0000166 F:GO:0005388 F:GO:0005524 F:GO:0016787 C:GO:0016020 C:GO:0016021 P:GO:0070588 P:GO:0006811 P:GO:0006816 P:GO:0099132

Uluslararası bir standart olan gen fonksiyonel sınıflandırma sistemi Gen Ontology (GO) genlerin ve ürünlerinin herhangi bir organizmadaki özelliklerini ve işlevlerini kapsamlı bir şekilde tanımlamak için kullanılmaktadır. GO kategorizasyonu temel biyolojik işlemleri içeren hedef genlerin tanımlanmasında, gelişim sürecinin ve biyolojik işlemlerin düzenlenmesinde ve hücresel işlemlerle (hücre ve hücre kısmı) zenginleştirilmesini içermektedir. GO üç ontolojiye sahiptir: moleküler fonksiyon (F), hücresel bileşen (C) ve biyolojik işlemlerdir (P).

Bu çalışmada miRNA'ların hedeflediği genler için GO zenginleştirme analizi yapılmıştır (Çizelge 4.2). Aşağıda ayrıca Çizelge 4.3'de GO zenginleştirme analizleri sonucunda *P. vera*'da bazı yeni ve bilinen miRNA'ların domainleri, TF'leri ve görevleri verilmiştir.

Çeşitli transkripsiyon faktörleri (TF'ler), hücresel ve metabolik yollarda yer alan genlerin ekspresyonunu modüle ederek cinsiyet farklılaşmasında önemli rol oynarlar (**Du ve ark, 2016**). Transkripsiyon faktörleri bitkilerde organ gelişimini yönlendiren düzenleyici kademelerin ana anahtarları olarak işlev görürler (**Hennig ve ark, 2004**). Bu çalışmada TF'leri kodlayan genlerin bir bölümü *P. vera*'da erkek ve dişi tomurcuklarda farklı şekilde ekspirese olmuştur. Herbir miRNA'ya ait hedefledikleri TF'nin özellikle cinsiyet organlarının gelişimi ile ilgili farklı görevleri olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *P. vera*'da bazı yeni ve bilinen miRNA'ların kodladıkları genlerin TF'lerinin Domainleri, TF'ler, görevleri.

miRNA	**Domain**	**TF**	**Görev**
pv_miRn317	MADS box	agamous-like MADS-box protein AGL6	Ovül oluşumunda ve erken çiçeklenme
pv_miRn371	WRKY	pectate lyase activity	Polen tüpü büyümesi ve polen olgunlaşması
pv_miRn68	GOSR2 family.	SNAP receptor activity	Golgi ağına proteinlerin taşınmasında rol oynar
pv_miRn80	WD	DDB1- and CUL4-associated factor homolog 1	Bitki embriyogenezisi ve çiçek gelişimi için gerekli
	PILS	protein PIN-LIKES 2	Oksin metabolismasını düzenler
	PPR	pentatricopeptide repeat-containing protein	Sitoplazmik erkek steril bitkilere verimlilk kazandırma
pv_miRn89	MADS box	floral homeotic protein DEFICIENS-like	Sepal ve petal farklılaşma mekanizması

Çizelge 4.3. devamı

	GRD	callose synthase 12	Polen, gelişim süreci
	MADS box	agamous-like MADS-box protein AGL15	Embryo gelişimi
	MADS box	agamous-like MADS-box protein AGL9	Çiçek organ gelişimi ve çiçeklenme
	MADS box	truncated transcription factor CAULIFLOWER A-like	Çiçek meristem oluşumu
	MADS box	floral homeotic protein PMADS 2	Ovül gelişimini içeren çiçeklenme gelişimi ve çiçek organ başlangıcı
	CRC	protein tesmin/TSO1-like CXC 2	Polen ve ovül gelişimi
	kelch	F-box/kelch-repeat protein	Çiçeklenme zamanını kontrol eder
	MADS box	AGAMOUS	Karpel ve stamen oluşumu
	MADS box	SEPALLATA1-like protein	Stamen ve Karpelin normal gelişimi
miR156_2	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 3	Çeçieklenmeye geçiş
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 9	Geçlikten yetişkinliğe vejetatif geçiş ve vejetatif fazdan üreme fazına geçişte
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 12	Bileşik çiçek salkımı gelişimi
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 2	Çiçek meristem tanımlanması
	SBP	squamosa promoter-binding protein 1-like	Vejetatif fazdan üreme fazına geçişte çiçek gelişimi
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 6	Bazı fizyolojik işlemler
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 13A	Çimlenme sonrası gelişimde ve ilk çiçek verimliliği
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 7	Postembriyonik gelişme
	SBP	squamosa promoter-binding protein 16	Bileşik salkım oluşumu

Çizelge 4.3. devamı

	ELF3	EARLY FLOWERING 3	Çiçeklenme zamanı
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 16	Bileşik salkım oluşumuna teşvik
	SBP	squamosa promoter-binding protein 20	Spikelet ve çiçek gelişiminde fonksiyonel rol.
miR157a-5p	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 2	Çiçek meristem tanımlanmasında
	SBP	squamosa promoter-binding protein 9	Üreme evresine geçiş, Fazla sagılanmasıkısırlığa sebep olur
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 9	Geçlikten yetişkinliğe vejetatif geçiş ve vejetatif fazdan üreme fazına geçişte
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 12	Bileşik çiçek salkımı gelişimi
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 2 isoform X1	Üreme fazına geçiş
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 3	Çiçeklenmeye geçiş
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 13A	Çimlenme sonrası gelişimde ve ilk çiçek verimliliği
	SBP	squamosa promoter-binding protein 1-like	Vejetatif fazdan üreme fazına geçişte çiçek gelişimi
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 7	Postembriyonik gelişme
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 6	Fizyolojik işlemler
	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 16	Bileşik salkım oluşumuna teşvik
	SBP	squamosa promoter-binding protein 20	Spikelet ve çiçek gelişiminde fonksiyonel rol.

Çizelge 4.3. devamı

miR167d	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 1	Çiçek gelişimi
	ARF	auxin response factor 8	Erkek ve dişi organ olgunlaşmasını düzenler
	ARF	auxin response factor 6	Erkek ve dişi organ olgunlaşmasını düzenler
	ARF	gibberellin 20 oxidase 1	Çiçek geçişi ve verimlilik
	ARF	protein WUSCHEL	Ovül gelişiminin düzenlenmesi ile ilgili protein
miR167f-5p	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 1	Çiçek gelişimi
	ARF	auxin response factor 6	Sinyal iletimi ve oksin aracılı gelişimi teşvik etme
	ARF	auxin response factor 8	Sinyal iletimi ve oksin aracılı gelişimi teşvik etme
	DIOX_N	gibberellin 20 oxidase 1	Çiçek geçişi ve verimlilik
	ARF	WUSCHEL	Embriyo kök hücre kimliğinin belirlenmesi
miR167h	SBP	squamosa promoter-binding-like protein 1	Çiçek gelişimi
	ARF	auxin response factor 6	Erkek ve dişi organ olgunlaşmasını düzenler
	ARF	auxin response factor 8	Erkek ve dişi organ olgunlaşmasını düzenler
	ARF	gibberellin 20 oxidase 1	Çiçek geçişi ve verimlilik
	ARF	WUSCHEL	Ovül gelişiminin düzenlenmesi ile ilgili protein
	DIOX_N	gibberellin 20 oxidase 2-like	Stamen gelişimi
	DIOX_N	gibberellin 20 oxidase 1-D-like	Gibberellinin biyosentezinde anahtar oksidaz enzimi
miR171b_2	GRAS gene	scarecrow-like protein 6	Çiçeklerde hücre farklılaşması ve devamı
	GRAS gene	scarecrow-like protein 22	Bitki gelişimi ve hücre farklılaşması
	GRAS gene	scarecrow-like protein 15	Bitki gelişimi ve hücre farklılaşması

Herbir miRNA'nın hedefledikleri protein yolakları ise pv_miRn317'de 1, pv_miRn371'de 1, pv_miRn68'de 1, pv_miRn80'de 3, pv_miRn89'da 10, miR156_2'de 12, miR157a-5p'de 12, miR167d'de 5, miR167f-5p'de 5, miR167h'de 7 ve miR171b_2'de 3 adet bulunmuştur. Belirlenen miRNA'ların hedef genlerinin protein yolakları arasında cinsiyet oluşumunu etkileyebilecek karpel ve stamen oluşumundan sorumlu MADS-box domainine bağlı B ve C sınıfı homeotik gen sınıfına ait AGAMOUS, bitki embriyogenezisi ve çiçek gelişiminde görev alan DDB1- and CUL4-associated factor homolog 1, vejetatif evreden üreme evresine geçişte görev alan SBP domainine ait squamosa promoter-binding-like protein 9 gibi birçok TF protein yolağı ve bunların görevleri belirlenmiştir.

P. vera'da dişi ve erkek genomlarında belirlenen bazı yeni ve bilinen miRNA'ların hedefledikleri bazı genlerin *A. thaliana'*daki homolog genleri belirlenerek görevleri ve TF domainleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. *P. vera*'da bulunan bu miRNA'ların hedefledikleri genlerin görevleri ve *A. thaliana*'da hedeflenen genlerin görevlerinin büyük çoğunlukla çiçek organ gelişimi ve çiçeklenme ile ilgili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. *P. vera*'daki miRNA'ların hedeflediği bazı genlerin *A. thaliana*'daki homologları, görevleri ve ait oldukları TF domainleri.

miRNA	***P.vera*'da hedeflenen gen**	***A.thaliana*'daki homolog geni**	**Görevi**	**TF domain**
pv_miRn317	v30003460	At2G45650	Ovül oluşumunda	MADS box
pv_miRn371	v30014770	*A. thaliana*'da tanımlanmamış	Polen tüpü büyümesi ve polen olgunlaşması	WRKY
pv_miRn68	0006490	*A. thaliana*'da tanımlanmamış	Golgi ağına proteinlerin taşınmasında rol oynar	GOSR2 family
pv_miRn80	v30190930	At1G71090	Oksin metabolisması	PILS
pv_miRn80	7370	At1G62590	Sitoplazmik erkek steril bitkilere verimlilk kazandırma	DYW
pv_miRn89	v30019820	At2G13680	Polen, ovaryum gelişimi	WRKY
pv_miRn89	v30229720	At5G13790	Embryo gelişimi	MADS box
pv_miRn89	v30228800	At1G24260	Çiçek gelişimi ve çiçeklenme	MADS box
pv_miRn89	v30011980	At1G26310	Erken çiçek meristemi oluşturma	MADS-box
pv_miRn89	275840	At4G14770	Polen ve ovüllerin gelişmesinde	CXC
pv_miRn89	6990	At3g24610	Çiçeklenme zamanı kontrolü	Kelch
pv_miRn89	240960	At5G13790	Embryo gelişimi	MADS box
pv_miRn89	242050	At1G26310	Erken çiçek meristemi oluşumu	MADS-box
pv_miRn89	195720	At1G24260	Çiçek gelişimi ve çiçeklenme	MADS-box
pv_miRn89	89890	At1G26310	Erken çiçek meristem oluşumu	MADS-box
pv_miRn89	248340	At5G15800	Stamenlerin ve Karpel normal gelişimi	MADS-box
miR156_2	183000	At1G66785	Çiçek gelişimi	SBP
miR157a-5p	v30072940	At3G18217	Üreme fazına geçiş	SBP
miR157a-5p	v30226600	At1G66795	Çiçek meristem gelişimi	SBP
miR167d	v30007450	At1g31173	Erkek ve dişi organ olgunlaşması	ARF
miR167f-5p	v30007450	At3G22886	Ovül ve anter üretkenliği	ARF
miR167f-5p	9680	At3G63375	Ovül ve anter üretkenliği	ARF
miR171b_2	v30002550	At3G51375	Geç embriyogenezis	DNA-binding domains

4.2.5. miRNA İle İlgili Bulguların Genel Değerlendirilmesi

Bu çalışma kapsamında antepfıstığında 221 adet bilinen ve 377 adet yeni miRNA belirlenmiştir. Dişi ve erkek örnekleri arasında farklı ekspirese olan 25 adet miRNA tanımlanmış ve bunlardan 18 tanesi dişilerde, 7 tanesi ise erkeklerde daha fazla ekspirese olmuştur. Farklı ekspirese olan miRNA'ların uzunluğu 21 ile 30 baz arasında değişmiştir. Dişi ve erkekler arasında farklı ekspiresyona sahip miRNA'ların qPCR ile yapılan validasyon çalışması sonucunda qPCR ile sekanslama sonucu uyumlu bulunmuştur. **Wei ve ark (2017)** yaptıkları çalışmada *Salix suchowensis'*in dişi ve erkek tomurcuk örneklerinde cinsiyetle ilgili olduğunu vurguladıkları 34 adet potansiyel miRNA belirlemişlerdir. Bunlardan 11 tanesinin dişilerde, 23 tanesinin erkeklerde olduğunu belirtmişlerdir. Dişi ve erkek çiçek tomurcuğu örneklerinden elde ettikleri 34 miRNA'nın dişilerde 124, erkeklerde 55 geni hedeflediklerini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan dişiye özgü dizilerden elde edilen pv_miRn377, pv_miRn53, pv_miRn266, pv_miRn89, pv_miRn65, pv_miRn66 ile yapılan qPCR analizleri sonucunda bunların dişilerde ekspirese olduğu ve erkeklerde hiç ekspirese olmadıkları belirlenmiştir. Bu miRNA'lar genel olarak çiçeklenme dönemlerinden hemen sonra dişi çeşitlerde yüksek oranda ekspiresyon gösterirken, erkeklerde ekspiresyon göstermemiştir. pv_miRn317 gen bölgesinin MADS-box domainine ait 3 geni hedeflediği belirlenmiştir. MADS box TF'leri A, B, C, D ve E sınıfı genleri içerirler. Bu genler çiçek organ tanımlanmasını genetik olarak kontrol eden genlerdir (**Sobral ve ark, 2017**). Bu çalışmada pv_miRn317'nin hedeflediği genlerin (pistachio.v30003460, pistachio_male0003790, pistachio_male0003130, pistachio_male0042050) üçünün MADS box TF'ne ait agamous-like MADS-box protein AGL6'nın ovül oluşumunda görev aldığı birinin 5'-3' exonuclease aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. **Schauer ve ark (2009)**'da *A. thaliana* ile yaptıkları çalışmada bu proteinin ovül oluşumunda önemli rol oynadığını belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada ise **Hui ve ark (2017)** *J. curcas*'ta

Arabidopsis'in homolog bir geni olan JC14484'ün agamous-like MADS-box protein AGL6'nın karpel olgunlaşmasında etkili olduğunu belirtmişlerdir.

P. vera'da yeni bulunan bir diğer miRNA pv_miRn317'nin hedeflediği 2 gen de peptate lyase 8 aktivitesinde bir TF'dir. Bu genin görevinin polen tüpü büyümesi ve polen olgunlaşması olduğu belirlenmiştir. **Turcich ve ark (1993)** yaptıkları çalışmada peptate lyase 8'in mısırda polen tüpü büyümesi, polen olgunlaşması ve polenin ovaryuma doğru uzaması ile ilgili olduğu bulunmuştur. pv_miRn68 antepfıstığında yeni belirlenen bir miRNA'dır ve hedeflediği genlerin fonksiyonel anotasyonlarında cinsiyet ile ilgili bilgi olmasa da *P. vera'*da dişilerde yüksek ekspiresyon gösterirken, erkeklerde hiç ekspiresyon göstermediği göz önünde bulundurulduğunda cinsiyet organlarının gelişimleri ile ilgili bir miRNA olma ihtimali bulunmaktadır.

miRNA pv_miRn80'nin hedeflediği genlerden (pistachio.v30252430, pistachio.v30190930, pistachio_male0007370, pistachito_male0300620, pistachio_male0206140) 2 genin WD TF'ne ait DDB1-CUL4-associated factor homolog 1 ve 2 genin PILS TF'ne ait protein PIN-LIKES 2 ve 1 genin PPR TF'ne ait pentatricopeptide repeat-containing proteini kodladığı belirlenmiştir. **Zhang ve ark (2008)** *A. thaliana* ile yaptıkları bir çalışmada DDB1-CUL4-associated factor homolog 1'in özellikle cinsiyet belirleme faktörü SRY-box 9 (cinsiyet belirleme bölgesi Y) ile işlem yaptığı belirtilmiştir. *P. vera*'da 2 hedef genin ürünü DDB1-CUL4-associated factor homolog 1 proteininin ise bitki embriyogenezisi ve çiçek gelişimi için gerekli olduğu belirlenmiştir. **Barbez ve ark (2012)** *A. thaliana* ile yaptıkları çalışmada protein PIN-LIKES 2'nin oksin metabolizmasını düzenlediğinin ve fazla ekspresyonunda çiçek organlarının yeni çiçek tomurcuklarına homeotik transformasyonu, gyneciumun üçlü hale getirilmesi veya kaynaşmamış karpel gibi ciddi kusurların oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Daha önceki çalışmalarda oksinlerin bitkilerde cinsiyet farklılaşmasını etkilediği belirlenmiştir **(Chailakhyan ve ark, 1978). Bentolila ve ark (2002)** yaptıkları

çalışmada *P. hybrida*'da pentatricopeptide repeat-containing proteininin sitoplazmik erkek steril bitkilere verimlilik kazandırdığını ifade etmişlerdir.

Yeni belirlenen diğer bir miRNA ise pv_miRn89'un hedeflediği genlerden 7 tanesinin (pistachio.v30229720, pistachio.v30228800, pistachio.v30011980, pistachio_male0240960, pistachio_male0242050, pistachio_male0195720, pistachio_male0248340) MADS-box gen ailesinden olduğu ve embriyo gelişimi, stamen ve karpelin normal gelişimi, çiçek gelişimi gibi çiçeklenme ve çiçek organ oluşumundan sorumlu olduğu belirlenmiştir. **Zhang ve ark (2018)** çiçek gelişimi ve organ kimliği tespitinde rol oynayan karanfildeki (DcaMADS) MADS-box genlerinin tanımını ve teşhisini yapmışlardır. Sonuç olarak, ABCD-E sınıfı genlerin çiçek organ gelişiminde görev aldıklarını belirlemişlerdir. pv_miRn89'un hedeflediği 1 adet genin (pistachio.v30019820) GRD (glutamine-rich domain) domainine ait callose synthase 12'nin polen gelişim sürecinden sorumlu bir protein olduğu belirlenmiştir. **Enns ve ark (2005)** *A. thaliana'*da callose sentaz'ın polen gelişiminde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Pv_miRn89'un hedeflediği genlerden biri de CRC domainine ait protein tesmin/TSO1-like CXC 2'dir. Bu protein polen ve ovül gelişiminde görev almaktadır. **Andersan ve ark (2007)** *A. Thaliana*'da yaptıkları çalışmada TSO1 geninin üreme dokularının gelişimi ve hücre farklılaşmasında rol oynadığı ve hem erkek hem de dişi üreme dokusunun gelişimine neden olduğu belirtilmiştir. **Riechmann (2002)** ise yaptıkları çalışmada bu proteinin *A. thaliana'*da dişi ve erkek üreme organlarının gelişiminde rol oynadığını belirtmişlerdir.

Erkeklerde fazla ekspirese olan miRNA'lardan miR156-2, miR157a-5p, miR167d, miR167f-5p ve miR167h'ın çok sayıda geni hedefledikleri ve bu hedeflediği genlerin birkaçının SQUAMOSA promoter-binding proteins (SBP) domainine ait olduğu belirlenmiştir. miR157a-5p'nin hedef genlerinin çoğunun TF domainlerinin SBP olduğu belirlenmiştir. SBP domaini esas olarak çiçek gelişimi ile ilgili bitkiye özgü transkripsiyon faktörleri ailesini oluştururlar. SBP domainleri genel olarak vejetatif fazdan üreme fazına geçişte, çimlenme sonrası gelişim ve ilk

çiçek verimliliği, çiçek meristemlerinin tanımlanmasında ve üreme evresine geçiş gibi çiçeklenmeyi ve üremeyi teşvik edici rollere sahiptirler **(Yamasaki ve ark, 2004; Yu ve ark, .2015; Yu ve ark, .2016; Xu ve ark, 2016; Zhang ve ark, 2014).**

miR156_2 geninin hedeflediği bir diğer genin domaini ELF3 (EARLY FLOWERING) bitkilerde çiçeklenme zamanını belirlemektedir. **Kim ve ark (2005)** *A. thaliana* ile yaptıkları çalışmada ELF3'ün bazı TF'ler ile zıt çalışarak çiçeklenme zamanını etkilediğini belirlemişlerdir. miR167d, miR167f-5p ve miR167h'in hedeflediği bazı genlerin domainlerinden biriside ARF'dir (Auxin Response Factor). ARF bitkilerde stamen ve karpel olgunlaşması, erkek ve dişi organ olgunlaşması, çiçeklenmeye geçişi, ovül gelişiminin düzenlenmesi ile ilgili proteinler ve oksin ile gelişimi teşvik etmeyi düzenlemektedir. **Hagen ve ark (2002)** yaptıkları bir çalışmada oksin düzenleyici proteinlerin oksin cevap genlerinin düzenlemesinde önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir. Oksinin transkripsiyonu düzenleyebildiğini ve jasmonik asit üretimini teşvik ettiği belirtilmiştir **(Nagpal ve ark, 2005)**. Bitkilerde oksinlerin cinsiyet farklılaşmasını etkilediği farklı araştırıcılar tarafından vurgulanmıştır **(Banks ve ark, 1993; Goswami ve ark, 2013; Zhang ve ark, 2017).** Jasmonik asitin ise etilen sentezini ve dolayısıyla meyve olgunlaşmasını artırdığı ve ayrıca dişi çiçek olgunlaşmasını teşvik ettiği belirtilmiştir **(Fan ve ark, 1997; Mao ve ark, 2017)**

MiR167d, miR167f-5p ve miR167h'ın hedeflediği genlerin bir diğer domaini ise DIOX_N'dir. DIOX_N bitkilerde çiçek geçişi ve verimlilik, stamen gelişimi ve gibberellinin (GA) biyosentezinde anahtar oksidaz enzimi olarak işlev görmektedirler. **Baurle ve Dean (2006)** GA'ların vegetatif ve generatif evreleri arasında **(Telfer ve ark, 1997)** veya vejetatif ve üreme fazları arasında gelişimsel anahtar rol oynayabileceğini belirtmiştir (**Wilson ve ark, 1992**). Tohum çimlenmesinde de GA'ların önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir **(Kucera ve ark, 2005; Peng ve Harberd 2002)**. Sonuç olarak, DIOX_N domainine ait TF'ler

dolaylıda olsa bitkilerde vejetatif fazdan üreme fazına geçiş ve tohum çimlenmesi gibi önemli görevlere sahiptirler.

MiR171b_2'nin hedeflediği genlerden bir diğerinin TF domaini GRAS genleri ve kalsiyum taşıyan ATPase 1dir. Bu genler bitkilerde ve çiçeklerde hücre farklılaşması ve devamında rol oynarlar. **Zhang ve ark, (2011)** yaptıkları çalışmada bazı GRAS proteinlerinin *Arabidopsis*'te tohum çimlenmesinin yanı sıra hipokotil ve kök uzamasının modüle edilmesinde GA sinyalinin pozitif bir regülatörü olarak hareket ettiğini ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada ise gibberelinlerin temelde genel olarak erkek çiçek gelişimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir **(Jayaram ve ark, 2000).**

P. vera dioik bir bitkü türü olup dişinin heterogametik olduğu ZW cinsiyet belirleme sistemine sahiptir **(Kafkas ve ark, 2015)**. ZW cinsiyet belirleme sistemine sahip türler XY sistemine sahip olanlara göre daha az yaygın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle *Pistacia* ZW cinsiyet tayininin altında yatan genetik mekanizmayı öğrenmek ileriki yıllarda dioik bitkiler için önemli bilgiler elde etmemizi sağlayacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antepfıstığında yapılan bu çalışmada ilkbaharda çiçek tomurcuklarının gelişmeye başlamasından itibaren bir sonraki yıl çiçek açıncaya kadar olan dönemi kapsayacak şekilde çiçeklenme sonrası 10 dönemi ve çiçeklenme öncesi 3 dönemi kapsayan çiçek tomurcuğu örnekleri alınmıştır. Antepfıstığı tomurcuk örnekleri SEM, küçük RNA sekanslaması (sRNAseq) ve gen ekspiresyon analizlerinde kullanılmıştır. SEM analizleri ve küçük RNA sekanslaması için dişi çeşit olarak Siirt ve erkek çeşit olarak Kaşka çeşidinin çiçek tomurcukları alınmıştır. Gen ekspiresyon analizleri için ise bu çeşitlere ilaveten dişi olarak Uzun ve erkek olarak Uygur çeşitlerinden de çiçek tomurcuk örnekleri alınmıştır.

SEM ile incelenecek tomurcuk örnekleri ilk olarak farklı alkol konsantrasyonlarından geçirilerek kurutulmuş ve ışık mikroskobu yardımı ile tomurcuk pulları temizlenerek cinsiyet organlarının görülür hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra dişi ve erkek çiçek tomurcuklarındaki cinsiyet organlarının gelişimleri SEM ile gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz SEM görüntüleri ve sonuçlarına göre, antepfıstığında hem dişi hem de erkek bitkilerin erken gelişim dönemlerinde karşı cinsiyete ait organ taslakları gözlemlenmiştir. Bu organ taslakları gelişimin sonraki dönemlerinde bir süre çiçeğin kendi normal organları ile birlikte gelişmiş ve tam çiçeklenmeden yaklaşık 2 ay sonra karşı cinsiyete ait olan organların baskılandığı SEM analizleri ile belirlenmiştir.

SEM sonuçlarına göre dişi çiçek tomurcuklarında;

1. İlk olarak Mayıs ayının ortalarında (AF-42), erkek organların ilkel andrekiyumuna karşılık gelen lateral primordiyumun meristemin çevresinde oluşmaya başladığı görülmüştür.
2. Haziran ayının başlarında (AF-49) bu organ primordiyumlarının yarısından çoğunun oluştuğu ve bu sırada çiçek tepesinde bir karpel oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Ortaya çıkan stamen primordiyumları, bu ilk

aşamadan sonra çok az gelişme göstermiştir. Aynı dönemdeki örneklerde karpel primordiyumu çiçek tepesinin merkezine doğru küçük bir çıkıntı yaparak ortaya çıkmıştır.

3. Dişi çiçek tomurcuklarında haziran ayının ortalarından itibaren stamen primordiyumlarının gelişmesinin baskılandığı ve durduğu görülmüştür. Bu dönemde karpel primordiyumları çiçeğin merkezinde hafif iç bükey haline gelmiştir
4. Karpel primordiyumun boyutunda küçük bir artışla karpel ve stamenlerin büyümesi ve farklılaşmasının baskılandığı ve ekim ayına kadar (AF-168) bu şekilde kaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, dişi çiçek tomurcuklarında ilkbahar döneminde gelişmeye başlayan stamen primordiyumları daha fazla gelişmeden büyüme ve gelişmeleri alıkonulmuştur.
5. Mart ayının başlarında ve ortalarında karpel meristemini genişletip çiçek tablasında büyük bir yer kapladığından dolayı aynı boyutta değişmeden kalan stamenleri görmek zorlaşmıştır.
6. Mart ayının ortalarında birincil karpel farklılaştıkça ovaryumun kendi şeklini aldığı gözlemlenmiştir. Bunu iki küçük karpel daha takip etmiş ve bu ikincil karpel, birincil karpelin kenar boşluklarının temelinde başlatılmıştır. Sonunda, her bir çiçek primordiyumu, mart ayının sonunda (BF-21) fonksiyonel bir birincil karpel ve iki küçük steril olan ikincil karpel ile üç karpelli dişi organı meydana getirmiştir

SEM sonuçlarına göre erkek çiçek tomurcuklarında;

1. Mayıs ayının başında meristemin genişlediği ve genellikle beş veya altı adet erkek organ primordiyumun meristemin dış kenarı boyunca spiral olarak gelişmeye başladığı gözlemlenmiştir.

2. Mayıs ayının ortalarında ise meristemin merkezinde bir çıkıntı oluşumu gözlemlenmiştir. Bu yapının morfolojisi ve konumunun dişi çiçeklerdeki en erken karpel başlangıcı aşamasına benzediği görülmüştür.
3. Haziran ayının ortalarından sonuna doğru erkek çiçek tomurcuğunda görülen karpel gelişimi baskılanarak durmuştur. Aynı dönemde tüm stamenleri oluşturan andrekiumun oluşumu tamamlanmış ve anterlerin içeriye doğru uzadığı ve çiçek tepesini örtecek kadar büyüdükleri gözlemlenmiştir.
4. Temmuz ayından Ekim ayı dönemine kadar büyüyerek çiçek tablasında daha çok yer kaplayan stamenler nedeniyle erkek çiçekteki dişi organ daha küçük yapıda görülmüştür.
5. İlkbaharda çiçek tomurcuklarının patlaması öncesi dönemlerde stamen primordyumları çiçek tablasının dış kenarı boyunca genişleyip büyümeye devam ederken, karpel primordiyumu Mart ayına kadar gelişip farklılaşmasa da çiçek tablasında gözlemlenmeye devam etmiştir.
6. Sonuç olarak, erkek çiçek tomurcuğu içerisindeki dişi organ taslakları büyüme dönemi başlangıcında biraz gelişme göstermiş ancak Haziran ayı sonlarından sonra herhangi bir büyüme ve gelişme göstermemiştir.

Elde edilen SEM sonuçlarına göre erkek ve dişi çiçek tomurcuklarında karşı cinsiyet organlarının gelişiminde etkili olan miRNA'ları ve bunların hedefledikleri genlerini belirlemek için küçük RNA sekanslaması yapılmıştır. Dişi ve erkek çiçek tomurcukları arasında farklı ekspirese olan miRNA'lar belirlenmiş ve validasyonları yapılmıştır. Ayrıca 25 bazdan küçük RNA'ların hedeflediği genler ve bu genlerin fonsiyonları da belirlenmiştir.

Küçük RNA sekanslama sonuçlarına göre;

1- Farklı dönemlerde alınan dişi çiçek tomurcuklarında ekspirese olan toplam miRNA sayısı 484 ile 539 arasında değişmiştir.

2- Farklı dönemlerde alınan erkek çiçek tomurcuklarında ekspirese olan toplam miRNA sayısı 393 ile 503 arasında değişmiştir.
3- Dişi ve erkekler arasında farklı ekspirese olan 25 adet miRNA belirlenmiştir. Bunlardan 18 tanesi dişilerde ve 7 tanesi ise erkeklerde daha yüksek ekspirese olmuştur.
4- Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyonu analizleri için referans gen belirleme çalışması yapılmış ve en iyi referans olarak miRn46 belirlenmiştir.
5- Dişi ve erkek örnekler arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların validasyonu qRT-PCR ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar sekanslama sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.
6- Dişi ve erkek çiçek tomurcukları arasında farklı ekspirese olan miRNA'ların hedefledikleri genler dişi Siirt ve erkek Bagyolu genomlarında belirlenmiştir. 11 adet miRNA'nın hedeflediği genlerin Siirt genomunda 78 ve Bağyolu genomunda 157 adet olduğu bulunmuştur.
7- Farklı ekspirese olan miRNA'ların hedeflediği genlerin fonksiyonel analizleri sonucunda birçoğunun çiçek organlarının gelişmesinden sorumlu oldukları belirlenmiştir.

Antepfıstığının elde edilen genom dizisi sonuçlarıyla birlikte, bu çalışma cinsiyet organlarının gelişiminde rol oynayan miRNA'ları belirlememize olanak tanımıştır. Elde ettiğimiz bulguları doğrulamak için bir dizi deneysel çalışma yapılmış olsa da cinsiyet belirlemeye dair ayrıntılı mekanizma büyük oranda bilinmemektedir. Bu çalışma ZW cinsiyet belirleme sistemine sahip antepfıstığının cinsiyet tayininin altında yatan genetik mekanizmayı ortaya çıkarmak için ileriki araştırmalarda hem moleküler hemde biyoinformatiğe yönelik önemli ipuçları sağlamaktadır. Transkriptom sekanslaması ile benzer bir çalışmanın yapılması erkek ve dişi çiçek tomurcukları arasında farklı ekspirese olan genlerin belirlenmesini sağlayacaktır. Ayrıca benzer bir yaklaşımla yabani *Pistacia* türlerinde de ileride böyle bir çalışmanın yapılması bilime önemli katkı sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

Abbott, J.K., Nordén, A.K. and Hansson, B., 2017. Sex Chromosome Evolution: Historical Insights and Future Perspectives. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, 284(1854).

Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. and Harberd, N.P., 2004. Modulation of Floral Development by a Gibberellin-Regulated microRNA. Development, 131:3357–3365.

Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. and Mukherjee, S.K., 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism and Applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(4):657–685.

Akagi, T., Henry, I.M., Tao, R. and Comai, L., 2014. A Y-Chromosome–Encoded Small RNA Acts as a Sex Determinant in Persimmons. Science, 346(6209):646–650.

Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Orntoft, T.F., 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: a Model-Based Variance Estimation Approachto Identify Genes Suited Fornormalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. Cancer Research, 64:5245–5250.

Andersen, S.U., Algreen-Petersen, R.G., Hoed, M., Jurkiewicz. A, Cvitanich, C., Braunschweig, U., Schauser, L., Oh, S.A., Twell, D. and Jensen, E.Ø., 2007. The Conserved Cysteine-Rich Domain of A Tesmin/TSO1-Like Protein Binds Zinc In Vitro And TSO1 Is Required For Both Male And Female Fertility in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 58:3657–3670.

Anonim, 2001. Antepfıstığı yetiştiriciliği. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Yayınları, Gaziantep, 13:1–132.

Aras, S., Soydam-Aydin, S., Fazlioğlu, A., Cansaran-Duman, D., Büyük, İ. ve Derici, K., 2015. Bitkilerde RNA İnterferans. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72(3):255–62.

Aryal, R., Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Yu, Q., Sunkar, R. and Ming, R., 2014. Sex Specific Expression and Distribution of Small RNAs in *Papaya*. BMC Genomics, 15(1):20.

Aukerman, M.J. and Sakai, H., 2003. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a microRNA and its APETALA2-Like Target Genes. The Plant Cell, 15(11):2730–2741.

Audic, S. and Claverie, J.M., 1997. The Significance of Digital Gene Expression Profiles. Genome Research, 7:986–995.

Banks, J.A., Hickok, L. and Webb, M.A., 1993. The Programming of Sexual Phenotype in the Homosporous Fern *Ceratopteris richardii*. International Journal of Plant Sciences, 154(4):522–534.

Barut, E. and Ertürk, Ü., 2002. Gemlik Zeytin Çeşidinde Çiçek Tomurcuğu Farklılaşması ve Gelişimi Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16.

Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K. and O'Keefe, S.F., 2009. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from *Peanut* skins Using Response Surface Methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(8):3064–3072.

Baurle, I. and Dean, C., 2006. The Timing of Developmental Transitions in Plants. Cell, 125(4):655–64.

Bawa, K.S., 1980. Evolution of Dioecy in Flowering Plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 11(1):15–39.

Barbez, E., Kubes, M., Rolcik, J., Beziat, C., Pencik, A., Wang, B., Rosquete, M.R., Zhu. J., Dobrev, P.I., Lee, Y., Zažímalovà, E., Petrášek, J., Geisler, M., Friml, J. and Kleine-Vehn, J., 2012. A Novel Putative Auxin Carrier

Family Regulates Intracellular Auxin Homeostasis in Plants. Nature, 485:119–122.

Bentolila, S., Alfonso, A. and Hanson, M., 2002. A Pentatricopeptide Repeat-Containing Gene Restores Fertility to Male-Sterile Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 99:10887–10892.

Boualem, A., Troadec, C., Camps, C., Lemhemdi, A., Morin, H., Sari, M.-A., Fraenkel-Zagouri, R., Kovalski, I., Dogimont, C. and Perl-Treves, R., 2015. A Cucurbit Androecy Gene Reveals How Unisexual Flowers Develop and Dioecy Emerges. Science, 350(6261):688–691.

Boualem, A., Lemhemdi, A., Sari, M.-A., Pignoly, S., Troadec, C., Choucha, F. A., Solmaz, I., Sari, N., Dogimont, C. and Bendahmane, A., 2016. The Andromonoecious Sex Determination Gene Predates the Separation of *Cucumis* and *Citrullus* genera. PloS One, 11(5):e0155444.

Busk, P.K., 2014. A tool for Design of Primers for microRNA-Specific Quantitative RT-qPCR. BMC Bioinformatics, 15:29.

Blaser, O., Neuenschwander, S. and Perrin, N., 2014. Sex Chromosome Turnovers:the Hot-Potato Model. American Naturalist, 183:140–146.

Cartolano, M., Castillo, R., Efremova, N., Kuckenberg, M., Zethof, J., Gerats, T., Schwarz-Sommer, Z. and Vandenbussche, M., 2007. A Conserved microRNA Module Exerts Homeotic Control over *Petunia Hybrida* and *Antirrhinum majus* Floral Organ İdentity. Nature Genetics, 39(7):901–905.

Carvalho, A., Grac¸ A.C., Carocha, V., Pera, S., Lui´S Lousada, J., Lima-Brito, J. and Paiva, J.A.P., 2015. An Improved Total RNA Isolation from Secondary Tissues of Woody Species for Coding and Non-Coding Gene Expression Analyses. Wood Science and Technology, 49:647–658.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M., 2005. Blast2GO: A Universal Tool for Annotation, Visualization and Analysis in Functional Genomics Research. Bioinformatics, 21(18):3674–3676.

Chailakhyan, M.K. and Khryanin, V.N., 1978. Effect of Growth Regulators and Role of Roots in Sex Expression in *Spinach*. Planta, 142:207–210.

Charlesworth, B. and Charlesworth, D., 1978. A Model for the Evolution of Dioecy and Gynodioecy. American Naturalist, 112:975–997.

Charlesworth, B., 1991. The Evolution of Sex Chromosomes. Science, 251:1030–1032.

Charlesworth, B., 2002. Plant Sex Determination and Sex Chromosomes. Heredity, 88:94–101

Charlesworth, D., 2016. Plant Sex Chromosomes. Annual Review of Plant Biology, 67:397–420.

Chen, X., 2004. A MicroRNA as A Translational Repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* Flower Development. Science, 303(5666):2022–2025.

Chen, L.L. and Zhao, J.C., 2014. Functional Analysis of Long Noncoding RNAs in Development and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology, 129–158.

Chen, Z., Yang, X., Su, X., Rao, P., Gao, K., Lei, B. and Xinmin, A., 2015. Identification and Expression Analysis of APETALA1 Homologues in *Poplar*. Acta Physiologiae Plantarum, 37:50.

Chen, L., Zhang, J., Li, H., Niu, J., Xue, H., Liu, B., Wang, Q., Luo, X., Zhang, F., Zhao, D. and Cao, S., 2017. Transcriptomic Analysis Reveals Candidate Genes for Female Sterility in Pomegranate Flowers. Frontiers in Plant Science, 8:1430.

Chen, C., Zeng, Z., Liu, Z. and Xia, R., 2018. Small RNAs, Emerging Regulators Critical for the Development of Horticultural Traits. Horticulture Research, 5:63.

Chuck, G., Meeley, R., Irish, E., Sakai, H. and Hake, S., 2007. The Maize Tasselseed4 microRNA Controls Sex Determination and Meristem Cell Fate by Targeting Tasselseed6/Indeterminate Spikelet. Nature Genetics, 39:1517–1521.

Chunli, Z., Ying, W., Jingying, L., Ziping, L., Hansheng, L., Siyang, Y. and Yueying, R., 2018. Identification and Characterization of Sex Related Genes in *Actinidia arguta* by Suppression Subtractive Hybridization. Scientia Horticulturae, 233:256–263.

Crane, J.C., 1974. Hermaphroditism in *Pistacia*. California Agriculture, 28(2):3–4.

Crane, J.C. and Iwakiri, B.T., 1981. Morphology and Reproduction of Pistachio. Horticultural Reviews, 3:376–393.

Darwin, C.R., 1877. The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species. John Murray: London.

Dai, X., Zhuang, Z. and Zhao, P.X., 2018. psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server (2017 release). Nucleic Acids Research, 46:49–54.

Deng, P., Muhammad, S. and Cao, M., 2018. Biogenesis and Regulatory Hierarchy of Phased Small Interfering RNAs in Plants. Plant Biotechnology Journal, 16:965–975.

Dudley, J., Das, S., Mukherjee, S. and Das, D.K., 2008. Resveratrol, A Unique Phytoalexin Present in Red Wine, Delivers Either Survival Signal or Death Signal to the Ischemic Myocardium Depending on Dose. Journal of Nutritional Biochemistry, 20(6):443–452.

Dellaporta, S.L. and Calderon-Urrea, A., 1993. Sex Determination in Flowering Plants. Plant Cell, 5:1241–1251.

Djoussé, L., Rudicha, T. and Gaziano, J.M., 2009. Nut Consumption and Risk of Hypertension in US Male Physicians. Clinical Nutrition, 28:10–14.

Drabkova, L.Z. and Honys, D., 2017. Evolutionary History of Callose Synthases in Terrestrial Plants with Emphasis on Proteins Involved in Male Gametophyte Development. Plos One, 12(11):e0187331.

Du, S., Sang, Y., Liu, X., Xing, S., Li, J., Tang, H. and Sun, L., 2016. Transcriptome Profile Analysis from Different Sex Types of *Ginkgo biloba* L. Frontiers in Plant Science, 7:871.

Duan, D., Jia, Y., Yang, J. and Li, Z-H., 2017. Comparative Transcriptome Analysis of Male and Female Conelets and Development of Microsatellite Markers in *Pinus bungeana*, an Endemic Conifer in China. Genes, 8:393.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tusch, T., 2001. RNA Interference is Mediated by 21- and 22-Nucleotide RNAs. Genes and Development, 15:188-200.

Engelhorn, J., Moreau, F., Fletcher, J.C. and Carles, C.C., 2014. ULTRAPETALA1 and LEAFY Pathways Function Independently in Specifying Identity and Determinacy at the *Arabidopsis* Floral Meristem. Annals of Botany, 114:1497–1505.

Engin, H. and Ünal, A., 2007. Examination of Flower Bud Initiation and Differentiation in *Sweet Cherry* and *Peach* by Scanning Electron Microscope. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31:373–379.

Enns, L.C., Kanaoka, M.M., Torii, K.U., Comai, L., Okada, K. and Cleland, R.E., 2005. Two Callose Synthases, GSL1 and GSL5, Play an Essential and Redundant Role in Plant and Pollen Development and in Fertility. Plant Molecular Biology, 58(3):333–349.

Esfandiyari, B., Davarynejad, G.H., Shahriari, F., Kiani, M. and Mathe, A., 2012. Data to the Sex Determination in *Pistacia* Species Using Molecular Markers. Euphytica, 185:227–231.

Ezaz, T., Srikulnath, K. and Graves, J.A.M., 2017. Origin of Amniote Sex Chromosomes: An Ancestral Super-Sex Chromosome or Common Requirements? Journal of Heredity, 108:94–105.

Fan, L., Zheng, S. and Wang, X., 1997. Antisense Suppression of Phospholipase D Alpha Retards Abscisic Acid- and Ethylene-Promoted Senescence of Postharvest *Arabidopsis* Leaves. Plant Cell, 9:2183–2196.

Fang, Y.N., Qiu, W.M., Wang, Y., Wu, X.M., Xu, Q. and Guo, W.W., 2014. Identification of Differentially Expressed microRNAs from a Male Sterile Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and its Fertile Wild Type by small RNA and Degradome Sequencing. Tree Genetics and Genomes, 10:1567–1581.

FAOSTAT, 2017. Erişim Tarihi: 20 Haziran 2019. FAO web page.(http://www.fao.org).

Filipowicz, W., 2005. RNAi: the Nuts and Bolts of the RISC Machine. Cell, 122(1):17–20.

Fisher, R.A., 1931. The Evolution of Dominance. Biological Reviews, 6:345–368.

Gangwar, M., Sood, H. and Chauhan, R.S., 2016. Genomics and Relative Expression Analysis İdentifies Key Genes Associated with High Female to Male Flower Ratio in *Jatropha curcas* L. Molecular Biology Reports, 3:305–322.

Gao, P., Sheng, Y., Iluan, F., Ma, H. and Liu, S., 2014. RNA-Seq Transcriptome Profiling Reveals Differentially Expressed Genes Involved in Sex Expression in *Melon*. American Society of Agronomy, 55(4):1686–1695.

Gao, P., Sheng, Y., Luan, F., Ma, H. and Liu, S., 2015. RNA-Seq Transcriptome Profiling Reveals Differentially Expressed Genes Involved in Sex Expression in *Melon*. Crop Science, 55:1686–1695.

Goni, R., Garcia, P. and Foissac, S., 2009. The qPCR Data Statistical Analysis. Integromics White Paper, 1–9.

Goswami, J.D., Patel, N.M., Bhadauria, H.S. and Wankhade, V.R., 2013. Effect of Plant Growth Substances on Growth, Fruit Setting and Yield of Pomegranate cv. *Sinduri*. International Journal of Agricultural Sciences, 9(1):332–334.

Guo, H-S., Xie, Q., Fei, J-F. and Chua, N-H., 2005. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for *Arabidopsis* Lateral Root Development. The Plant Cell, 17:1376–1386.

Güzelgül, F. ve Aksoy, K., 2009. Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpda Kullanım Alanları. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Arşiv,141–155.

Ghaffari, S. and Harandi, O.F., 2002. Chromosome Counts and Assessment of Two Heterochromatic Chromosomes in Some Species of *Pistacia* L. from Iran. Acta Horticulturae, 591:389–393.

Grant, S., Houben, A., Vyskot, B., Siroky, J., Pan, W., Macas, J. and Saedler, H., 1994. Genetics of Sex Determination in Flowering Plants. Developmental Genetics, 15: 214–230.

Ha, M. and Kim, N., 2014. Regulation of microRNA Biogenesis. Molecular Cell Biology, 15:509–524.

Hagen, G. and Guilfoyle, T.J., 2002. Auxin-Responsive Gene Expression: Genes, Promoters, and Regulatory Factors. Plant Molecular Biology, 49(3–4):373–385.

Harkess, A., Mercati, F., Shan, H.Y., Sunseri, F., Falavigna, A. and Leebens-Mack, J., 2015. Sex-Biased Gene Expression in Dioecious *Garden asparagus* (*Asparagus officinalis*). New Phytologist, 207:883–892.

Harkess, A., Zhou, J., Xu, C., Bowers, J.E., Van der Hulst, R., Ayyampalayam, S., Mercati, F., Riccardi, P., McKain, M.R, Kakrana, A., Tang, H., Ray, J., Groenendijk, J., Arikit, S., Mathioni, S.M., Nakano, M., Shan, H., Telgmann-Rauber, A., Kanno, A., Yue, Z., Chen, H., Li, W., Chen, Y., Xu, X., Zhang, Y., Luo, S., Chen, H., Gao, J., Mao, Z., Pires, J.C., Luo, M., Kudrna, D., Wing , R.A., Meyers, B.C., Yi, K., Kong, H., Lavrijsen, P., Sunseri, F., Falavigna, A., Ye, Y., Leebens-Mack, J.H. and Chen, G., 2017. The Asparagus Genome Sheds Light on The Origin and Evolution of A Young Y Chromosome. Nature Communications, 8:1279.

Ho, H., Gudimella, R., Ong-Abdullah, M. and Harikrishna, J.A., 2017. Expression of microRNAs During Female Inflorescence Development in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tree Genetics and Genomes, 13:35.

Hormaza, J.I., Dollo, L. and Polito, V.S., 1994. Identification of a RAPD Marker Linked to Sex Determination in *Pistacia vera* using Bulked Segregant Analysis. Springer-Verlag, 89(1):9–13.

Hormaza, J.I. and Polito, V.S., 1996. Pistillate and Staminate Flower Development in Dioecious *Pistacia vera* (Anacardıaceae). American Journal of Botany, 83(6):759–766.

Hormaza, J.I. and Wünsch, A., 2007. Pistachio. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, 243–251.

Hou, J., Ye, N., Zhang, D., Chen, Y., Fang, L., Dai, X. and Yin, T., 2015. Different Autosomes Evolved into Sex Chromosomes in the Sister Genera of *Salix* and *Populus*. Scientific Reports, 5:9076.

Hui, W., Yang, Y., Wu, G., Peng, C., Chen, X. and Zayed, M.Z,. 2017. Transcriptome Profile Analysis Reveals the Regulation Mechanism of Floral Sex Differentiation in *Jatropha curcas* L. Scientific Reports, 7:16421.

Ila, H.B., Kafkas, S. and Topaktaş, M., 2003. Chromosome Numbers of Four *Pistacia* (Anacardiaceae) Species. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78(1):35–38.

IPA (Iran Pistachio Association), 2016. Erişim Tarihi: 20 Haziran 2019 web page.

Jayaram, K.M. and Neelakandan, M., 2000. Effect of Plant Growth Regulators on Sex Determination in *Solanum melongena* Linn. Indian Journal of Plant Physiology, 5(3):44–51.

Jazi, M.M., Khorzoghi, E.G., Botanga, C. and Seyedi, S.M., 2016. Identification of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in a Non-Model Tree Pistachio (*Pistacia vera* L.). Plos One, 11:6.

Jesus, M., Ramos, N., Coito, J.L., Fino, J., Cunha, J., Silva, H., de Almeida P.G., Costa, M.M.R., Amâncio, S., Paulo, O.S. and Rocheta, M., 2017. Deep Analysis of Wild *Vitis* Flower Transcriptome Reveals Explored Genome Regions Associated With Sex Specification. Plant Molecular Biology, 93:151–170.

Jia, Z., Wang, G., Xuan, J., Zhang, J., Zhai, M., Jia, X., Guo, Z. and Li, M., 2018. Comparative Transcriptome Analysis of Pecan Female and Male Inflorescences. Russian Journal of Plant Physiology, 65(2):186–196.

Jones, L.P., 1950. Fruit Bud Development and Gametogenesis in *Pistacia vera* L. Ph.D. Dissertation, Oregon State College, Corvallis, OR.

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B., 2006. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. Annual Review of Plant Biology, 57:19–53.

Kafkas, S., Perl-Treves, R. and Kaska, N., 2000. Unusual *Pistacia atlantica* Desf. Monoecious Sex Types in the Yunt Mountains of the Manisa Province of Turkey. Israel Journal of Plant Sciences, 48 (4):277–280.

Kafkas, S., 2001. Developing of Monoecious Pistachio (*P.vera* L.) Populations and the Sex Determination Mechanism in *Pistacia* by Crossbreeding. Acta Horticulturae, 591:285–289.

Kafkas, S., Cetiner, S., and Perl-Treves, R., 2001. Development of Sex-associated RAPD Markers in Wild *Pistacia* Species. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 76:2.

Kafkas, S. and Perl-Treves R., 2002. Interspecific Relationships in *Pistacia* Based on RAPD Fingerprinting. Hortscience, 37:168–171.

Kafkas, S., Kafkas, N., Wassimi, A.N. and Padulosi, S., 2006a. Molecular Characterisation of Afghan pistachio accessions by Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81:864–868.

Kafkas, S., Özkan, H., Ak, B.E., Açar, I., Atlı, H.S. and Koyuncu, S., 2006b. Detecting DNA Polymorphism and Genetic Diversity in a Wide Pistachio Germplasm: Comparison of AFLP, ISSR and RAPD Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131(4):522–529.

Kafkas, S., Khodaeıamınjan, M., Güney, M. and Kafkas, E., 2015. Identification of Sex-linked SNP Markers using RAD Sequencing Suggests ZW/ZZ Sex Determination in *Pistacia vera* L. BMC Genomics, 16(1):98.

Kafkas, S., 2019. Advances in Breeding of Pistachio (Ü. Serdar, D. Fullbright editors). Achieving Sustainable Cultivation of Tree Nuts. Burleigh Dodds Science Publishing Limited, Cambridge UK, 42p.

Karagüzel, A., Kalay, E. ve Celep, F., 2007. RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 33(1):41–44.

Ketting, R.F., 2011. The Many Faces of RNAi. Developmental Cell, 20(2):148–161.

Kim, V.N., 2005. MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6:376–385

Kim, H.B., Jun, S.S., Choe, S., Cho, J.Y., Choi, S.B. and Kim, S.C., 2010. Identification of Differentially Expressed Genes from Male and Female Flowers of Kiwifruit. African Journal of Biotechnology, 9(40):6684–6694.

Kim, A.M., Rhee, J-S., Kim, T.H., Lee, J.S., Choi, A-Y., Choi, B.S., Choi, I-Y. and Sohn, Y.C., 2017. Alternative Splicing Profile and Sex-Preferential Gene Expression in the Female and Male Pacific Abalone *Haliotis Discus* hannai. Genes, 8:99.

Kucera, B., Cohn, A.M. and Leubner-Metzger, G., 2005. Plant Hormone Interactions During Seed Dormancy Release and Germination. Seed Science Research, 15:281–307.

Khanna, D., Balgir, P. and Gurlovleen, K., 2007. RNA Interference: An Ancient Mechanism for Novel Therapeutics. Internet Journal of Genomics and Proteomics, 2:2.

Khodaeiaminjan, M., Kafkas, E., Güney, M. and Kafkas, S., 2017. Development and Linkage Mapping of Novel Sex-Linked Markers for Marker-Assisted Cultivar Breeding in Pistachio (*Pistacia vera* L.). Molecular Breeding, 37:98.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D., 2002. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease And Cancer. American Journal of Medicine, 113:71–88.

Kris-Etherton, P.M., Hu, F.B. and Ros, E., 2008. The Role of Tree Nuts and Peanuts in the Prevention of Coronary Heart Disease: Multiple Potential Mechanisms. Nutrition, 138:1746–1751.

Lee, C-Y., Lin, H-J., Viswanath, K.K., Lin, C-P.B., Chang, C-H., Chiu, P-H., Chiu, C-T., Wang, R-H., Chin, S-W. and Chen, F- C., 2018. The Development of Functional Mapping by Three Sex-Related Loci on the Third Whorl of Different Sex Types of *Carica papaya* L. Plos One, 13(3):e0194605.

Lewis, D., 1942. The Evolution of Sex in Flowering Plants. Biolog Reviews, 17:46–67.

Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X. and Mo, B., 2013. MicroRNAs Inhibit the Translation of Target mRNAs on the Endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis*. Cell, 153:562–574.

Li, J., Kim, T.H., Nutiu, R., Ray, D., Hughes, T.R. and Zhang, Z., 2014. Identifying mRNA Sequence Elements for Target Recognition by Human Argonaute Proteins. Genome Research, 24(5):775–785.

Li, W., He, Z., Zhang, L., Lu, Z., Xu, J., Cui, J., Wang L., and Jin, B., 2017a. miRNAs Involved in the Development and Differentiation of Fertile and Sterile Flowers in *Viburnum macrocephalum* f. keteleeri. BMC Genomics, 18:783.

Li, W., Zhang, L., Ding, Z., Wang, G., Zhang, Y., Gong, H., Chang, T. and Zhang, Y., 2017b. De Novo Sequencing and Comparative Transcriptome Analysis of the Male and Hermaphroditic Flowers Provide Insights into the Regulation of Flower Formation in Andromonoecious *Taihangia rupestris*. BMC Plant Biology, 17:54.

Li, Z., Ou, Y., Zhang, Z., Li, J. and He, Y., 2018. Brassinosteroid Signaling Recruits Histone 3 Lysine-27 Demethylation Activity to FLOWERING LOCUSC Chromatin to Inhibit the Floral Transition in *Arabidopsis*. Molecular Plant, 1–12.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods, 25:402–408.

Lloyd, D.G., 1974. Female-Predominant Sex Ratios in Angiosperms. Heredity, 32:35–44.

Lloyd, D.G., 1975. The Transmission of Genes Via Pollen and Ovules in Gynodioecy Angiosperms. Theoretical Population Biology, 9:299–316.

Mao, Y., Liu, W., Chen, X., Xu, Y., Lu, W., Hou, J., Ni, J., Wang, Y. and Wu, L., 2017. Flower Development and Sex Determination Between Male and Female Flowers in *Vernicia fordii*. Frontiers in Plant Science, 8:1291.

Mei, L., Dong, N., Li, F., Li, N., Yao, M., Chen, F. and Tang, L., 2017. Transcriptome Analysis of Female and Male Flower Buds of *Idesia polycarpa* Maxim. var. vestita Diels. Electronic Journal of Biotechnology, 29:39–46.

Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A.N., Sugar, R., Schoenfelder, S., Ferreira, L., Wingett, S.W., Andrews, S., Grey, W., Ewels, P.A., Herman, B., Happe, S., Higgs, A., LeProust, E., Follows, G.A., Fraser, P., Luscombe, N.M. and Osborne, C.S., 2015. Mapping Long-Range Promoter Contacts in Human Cells With High-Resolution Capture Hi-C. Nature Genetics, 47:598–606.

Ming, R., Wang, J., Moore, P.H. and Paterson, A.H., 2011. Sex Chromosomes in flowering Plants. American Journal of Botany, 94:2141–2150.

Mohanty, J.N., Nayak, S., Jha, S. and Joshi, R.K., 2017. Transcriptome Profiling of the Floral Buds and Discovery of Genes Related to Sex-Differentiation in the Dioecious Cucurbit *Coccinia grandis* (L.) Voigt. Gene, 626:395–406.

Motalebipour, E.Z., Kafkas, S., Khodaeiaminjan, M., Çoban, N. and Gözel, H., 2016. Genome Survey of Pistachio (*Pistacia vera* L.) by Next Generation Sequencing: Development of Novel SSR Markers and Genetic Diversity in *Pistacia* species. BMC Genomics, 17:998.

Moyo, M. and Staden, J.V., 2013. Micropropagation of Anacardiaceae Species of Economic İmportance: Advances and Future Prospects. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 49(2):85–96.

Nag, A. and Jack, T., 2010. Sculpting the Flower; the Role of microRNAs in Flower Development. Current Topics in Developmental Biology, 91.

Negrutiu, I., Vyskot, B., Barbacar, N., Georgiev, S. and Moneger, F., 2001. Dioecious Plants: A Key to the Early Events of Sex Chromosome Evolution. Plant Physiology, 127:1418–1424.

Nie, S., Xu, L., Wang, Y., Huang, D., Muleke, E.M., Sun, X., Wang, R., Xie, Y., Gong, Y. and Liu, L., 2015. Identification of Bolting-Related microRNAs and Their Targets Reveals Complex miRNA-Mediated Flowering-Time Regulatory Networks in Radish (*Raphanus sativus* L.). Scientific Reports, 5:14034.

Özbek, S. and Ayfer, M., 1958. A Hermaphrodite *Pistacia* Found in the Vicinity of Gaziantep, Turkey. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 72:240–241.

Padidam, M., 2003. Chemically Regulated Gene Expression in Plants. Current Opinion in Plant Biology, 6:169–177.

Pannell, J.R., 2017. Plant Sex Determination. Current Biology, 191–197.

Papadopoulou, E. and Grumet, R., 2005. Brassinosteroid-Induced Femaleness in Cucumber and Relationship to Ethylene Production. HortScience, 40(6):1763–1767.

Parfitt, D.E. and Badenes, M.L., 1997. Phylogeny of the Genus *Pistacia* as Determined from Analysis of the Chloroplast Genome. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 94:7987–7992.

Peng, J. and Harberd, N.P., 2002. The Role of GA-Mediated Signalling in the Control of Seed Germination. Current Opinion in Plant Biology, 5(5):376–81.

Picq, S., Santoni, S., Lacombe, T., Latreille, M., Weber A., Ardisson, M., Ivorra, S., Maghradze, D., Arroyo-Garcia, R., Chatelet, P., This, P., Terral J-F. and Bacilieri, R., 2014. A Small XY Chromosomal Region Explains Sex Determination in Wild Dioecious *V. vinifera* and the Reversal to Hermaphroditism in Domesticated Grapevines. BMC Plant Biology, 14:229.

Pucholt, P., Rönnberg-Wästljung, A-C. and Berlin, S., 2015. Single Locus Sex Determination and Female Heterogamety in the Basket *Willow* (*Salix viminalis* L.). Heredity, 114:575–583.

Pulido, A. and Laufs, P., 2010. Coordination of Developmental Processes by small RNAs during Leaf Development. Journal of Experimental Botany, 397.

Pfaff, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P., 2004. Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity, Bestkeeper-Excel-Based Toolusing Pair-Wise Correlations. Biotechnology Letters, 26:509–515.

Ramos, M.J.N., Coito, J.L., Silva, H.G., Cunha, J., Costa, M.M.R. and Rocheta, M., 2014. Flower Development and Sex Specification in Wild Grapevine. BMC Genomics, 15:1095.

Ramos, M.J.N., Coito, J.L., Fino, J., Cunha, J., Silva, H., de Almeida, P.G., Costa, M.M., Amâncio, S., Paulo, O.S. and Rocheta, M., 2017. Deep Analysis of Wild *Vitis* Flower Transcriptome Reveals Unexplored Genome Regions Associated with Sex Specification. Plant Molecular Biology, 93(1–2):151–170.

Riechmann, J.L., 2002. Transcriptional Regulation: A Genomic Overview. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, e0085.

Rocheta, M., Sobral, R., Magalhães, J., Amorım, M., Ribeiro, T., Pinheiro, M., Egas, C., Morais-Cecílio, L. and Costa, M.R., 2014. Comparative Transcriptomic Analysis of Male and Female Flowers of Monoecious *Quercus suber*. Frontiers in Plant Science, 5(599):1–16.

Rogers, K. and Chen, X., 2013. Biogenesis, Turnover and Mode of Action of Plant microRNAs. The Plant cell, 25(7):2383–99.

Ross, M.D., 1970. Evolution of Dioecy from Gynodioecy. Evolution, 24:827-828.

Saito, S., Fuji, N., Miyazawa, Y., Yamasaki, S., Matsuura, S., Mizusawa, H., Fujita, Y. and Takahashi, H., 2007. Correlation Between Development of Female Flower Buds and Expression of the CS-ACS2 Gene in *Cucumber* Plants. Journal of Experimental Botany, 58(11):2897–2907.

Saunders, P.A., Neuenschwander, S. and Perrin, N., 2018. Sex Chromosome Turnovers and Genetic Drift: A Simulation Study. Journal of Evolutionary Biology, 31:1413–1419.

Sanderson, B.J., Wang, L., Tiffin, P., Wu, Z. and Olson, M.S., 2019. Sex-Biased Gene Expression in Flowers, But Not Leaves, Reveals Secondary Sexual Dimorphism in *Populus balsamifera*. New Phytologist, 221:527–539.

Silver, N., Best, S., Jiang, J. and Thein, S.L., 2006. Selection of Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Human Reticulocytes Using Real-Time PCR. BMC Molecular Biology, 7:33.

Schmid, M., Uhlenhaut, N.H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D. and Lohmann, J.U., 2003. Dissection of Floral Induction Pathways Using Global Expression Analysis. Development, 130:6001–6012.

Schauer, S.E., Schluter, P.M., Baskar, R., Gheyselinck, J., Bolanos A., Curtis, M.D. and Grossniklaus, U., 2009. Intronic Regulatory Elements Determine the Divergent Expression Patterns of AGAMOUS-LIKE6 Subfamily Members in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 59:987–1000.

Spanudakis, E. and Jackson, S., 2014. The Role of microRNAs in the Control of Flowering Time. Journal of Experimental Botany, 65(2):365–380.

Scutt, C.P., Li. T., Robertson, S.E., Willis, M.E. and Gilmartin, P.M., 1997. Sex Determination in Dioecious *Silene latifolia* Effects of the Y chromosome and the Parasitic Smut Fungus (*Ustilago violacea*) on Gene Expression during Flower Development. Plant Physiology, 114(3):969–79.

Shang, J., Liang, J., Xiang, Z. and He, N., 2017. Anatomical and Transcriptional Dynamics of Early Floral Development of Mulberry (*Morus alba*). Tree Genetics and Genomes, 13:40.

Sobral, R., Manuela, M. and Costa, R., 2017. Role of Floral Organ İdentity Genes in the Development of Unisexual Flowers of *Quercus suber* L. Scientific Reports, 7:10368.

Sola-Campoy, P.J., Robles, F., Schwarzacher, T., Rejón, C.R., Herrán, R. and Navajas-Pérez. R., 2015. The Molecular Cytogenetic Characterization of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Suggests the Arrest of Recombination in the Largest Heteropycnotic Pair HC1. Plos One, 10(12):e0143861.

Song, H., Zhang, Q., Tian, P. and Nan, Z., 2017. Differential Evolutionary Patternsn and Expression Levels Between Sex Specific and Somatic Tissue-Specific Genes in *Peanut*. Scientific Reports, 7:9016.

Sun, G., Ji, Q., Dilcher, D.L., Zheng, S., Nixon, K.C. and Wang, X., 2002. Archaefructaceae, a New Basal Angiosperm Family. Science, 296:899–903.

Takeda, F.J., Crane, C. and Lin. J., 1979. Pistillate Flower Development in Pistachio. Journal of the American Society for Horticultural Science, 104(2):229–232.

Tan, M., Xue, J., Wang, L.H.J., Fu, C. and Yan, X., 2016. Transcriptomic Analysis for Different Sex Types of *Ricinus communis* L. During Development from Apical Bud Stoin Florescences by Digital Gene Expression Profiling. Frontiers in Plant Science, 6:1208.

Tang, P., Zhang, Q. and Yao, X., 2017. Comparative Transcript Profiling Explores Differentially Expressed Genes Associated with Sexual Phenotype in Kiwifruit. Plos One, 12(7):e0180542.

Tao, Q., Niu, H., Wang, Z., Zhang, W., Wang, H., Wang, S., Zhang, X. and Li, Z., 2018. Ethylene Responsive Factor ERF110 Mediates Ethyleneregulated Transcription of a Sex Determination-Related Orthologous Gene in Two *Cucumis* species. Journal of Experimental Botany, 69(12):2953–2965.

Telfer, A., Bollman, K.M. and Poethig, R.S., 1997. Phase Change and the Regulation of Trichome Distribution in *Arabidopsis thaliana*. Development, 124:645–654.

Turcich, M.P., Hamilton, D.A. and Mascarenhas, J.P., 1993. Isolation and Characterization of Pollen-Specific Maize Genes with Sequence Homology to Ragweed Allergens and Pectate Lyases. Plant Molecular Biology, 23:1061–1065.

Tokusoglu, O., Unal, M.K. and Yemis, F., 2005. Determination of the Phytoalexin Resveratrol (3,5,4′-Trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:5003–5009.

Thomson, J.D. and Brunet, J., 1990. Hypotheses for the Evolution of Dioecy in Seed Plants. Trends in Ecology and Evolution, 5(1):11–16.

Tomaszkiewicz, M., Medvedev, P. and Makova, K., 2017. Y and W chromosome Assemblies: Approaches and Discoveries. Trends in Genetics, 33:266–282.

Tsugama, D., Matsuyama, K., Ide, M., Hayashi, M., Fujino, K. and Masuda, K., 2016. A Putative MYB35 Ortholog is a Candidate for the Sex-Determining Genes in *Asparagus officinalis*. Scientific Reports, 7:41497.

Tunalıoğlu, R. and Taşkaya, B., 2003. Antepfıstığı. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü (T.E.A.E), 5(2):1–4.

Türkiye İstatistik Kurumu, 2017. Erişim Tarihi: 20 Haziran 2019. TUİK web page(www.tuik.gov.tr).

Urasaki, N., Tarora, K., Shudo, A., Ueno, H., Tamaki, M., Miyagi, N., Adaniya, S. and Matsumura, H., 2012. Digital Transcriptome Analysis of Putative Sex-Determination Genes in Papaya (*Carica papaya*). Plos One, 7(7):e40904.

Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D. and Speleman, F., 2002. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. Genome Biology, 3:research0034.1.

Wang, S., Lia, Z., Jina, W., Fanga, Y., Yangb, Q. and Xiang, J., 2018. Transcriptome Analysis and Identification of Genes Associated with Flower Development in *Rhododendron pulchrum* Sweet (Ericaceae). Gene, 679:108–118.

Wang, W. and Zhang, X., 2017. Identification of the Sex-Biased Gene Expression and Putative Sex-Associated Genes in *Eucommia ulmoides* Oliver Using Comparative Transcriptome Analyses. Molecules, 22:2255.

Wei, S., Ye, N. and Yin, T., 2017. Detecting the Candidate Gender Determinants by Bioinformatic Prediction of miRNAs and Their Targets from Transcriptome Sequences of the Male and Female Flowers in *Salix suchowensis*. Hindawi BioMed Research International, 9.

Westergaard, M., 1958. The Mechanism of Sex Determination in Dioecious Plants. Advances in Genetics, 9:217–281.

Wilson, R.N., Heckman, J.W. and Somerville, C.R., 1992. Gibberellin is Required for Flowering But Not for Senescence in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. Plant Physiology, 100:403–408.

Yakubov, B., Barazani, O. and Golan-Goldhirsh, A., 2005. Combination of SCAR Primers and Touchdown-PCR for Sex Identification in *Pistacia vera* L. Scientia Horticulturae, 103:473–478.

Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Nunokawa, E., Ishizuka, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K. and Yokoyama, S., 2004. A novel Zinc-Binding Motif Revealed By Solution Structures of DNA-Binding Domains of *Arabidopsis* SBP-Family Transcription Factors. Journal of Molecular Biology, 337:49–63.

Yan, W., Chen, D. and Kaufmann, K., 2016. Molecular Mechanisms of Floral Organ Specification by MADS Domain Proteins. Current Opinion in Plant Biology, 29:154–162.

Yu, Z-X., Wang, L-J., Zhao, B., Shan, C-M., Zhang, Y-H., Chen, D-F. and Chen, X-Y., 2015. Progressive Regulation of Sesquiterpene Biosynthesis in *Arabidopsis* and *Patchouli* (*Pogostemon cablin*) by the miR156-Targeted SPL Transcription Factors. Molecular Plant, 8(1):98–110.

Yu, D., Hu, Y., Wang, H., Pan, J., Li, Y. and Lou, D., 2016. The DELLA-CONSTANS Transcription Factor Cascade Integrates Gibberelic Acid and Photoperiod Signaling to Regulate Flowering. Plant Physiology, 172:479–488.

Zamore, P.D., 2004. Plant RNAi: How a Viral Silencing Suppressor Inactivates siRNA. Current Biology,14:198–200.

Zhang, J., Zeng, R., Chen, i., Liu, X. and Liao, Q., 2008. Identification of Conserved microRNAs and Their Targets from *Solanum lycopersicum* Mill. Gene, 423,1(15):1–7.

Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Sun, T-P., 2011. Scarecrow-Like 3 Promotes Gibberellin Signaling by Antagonizing Master Growth Repressor DELLA in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A, 108:2160–2165.

Zhang, X.W.X., Zhao, L. and Guo, Z., 2014 Morphology and Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns during Floral Induction and Early Flower Development in *Dendrocalamus latiflorus.* International Journal of Molecular Sciences, 15:12074–12093.

Zhang, Y., Zhao, G., Li, Y., Mo, N., Zhang, J. and Liang, Y., 2017. Transcriptomic Analysis Implies that GA Regulates Sex Expression Via Ethylene-Dependent and Ethylene-Independent Pathways in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Frontiers in Plant Science, 8:10.

Zhang, Z., Lin, Q. and Zhong, Q., 2017. Monoecious Mutant Reveals New Insights into Male and Female Inflorescence Development in the *Chinese Bayberry* (*Morella rubra*). Horticultural Science, 52(3):343–348.

Zhang, J., Shi, J., Ji, G., Zhang, H., Gong, G., Guo, S., Yi, R., Jianguang, F., Shouwei, T. and Yong, X., 2017. Modulation of Sex Expression in Four Forms of Watermelon by Gibberellin, Ethephone and Silver Nitrate. Horticultural Plant Journal, 3(3):91–100.

Zhang, X., Wang, Q., Yang, S., Lin, S., Bao, M., Bendahmane, M., Wu, Q., Wang, C. and Fu, X., 2018. Identification and Characterization of the MADS-Box Genes and Their Contribution to Flower Organ in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Genes, 9:193.

Zhu, Q.H., Upadhyaya, N.M., Gubler, F. and Helliwell, C.A., 2009. Overexpression of miR172 Causes Loss of Spikelet Determinacy and Floral Organ Abnormalities in Rice (*Oryza sativa*). BMC Plant Biology, 9(1):149.

Zohary, M., 1952. A Monographical Study of the Genus *Pistacia*. Palestine Journal of Botany (Jerusalem Series), 5(3):187–228.

Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M-Y., Earley, K.W., Wu, G., Yang, L. and Poethig, R.S., 2016. Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. Plos Genetics, 12(8):e1006263.

ÖZGEÇMİŞ

Hayat TOPÇU 1981 yılında İSTANBUL/Eyüp'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini tamamladıktan sonra 2004 yılında eğitime başladığı Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültes, Biyoloji bölümünü, 2008 yılında tamamladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalın'da Doktora öğrenimine başladı ve 2019 yılında mezun oldu.