

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI



İNCİRDE (*Ficus carica* L.) CİNSİYET GELİŞİMİNDE
PLEİOTROPİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ DUO1
(MYB125)'İN DOĞRUDAN DÜZENLEDİĞİ GENLERİN
TANILANMASI

BAHÇE BİTKİLERİ DOKTORA TEZİ

ESMA AKKUŞ ARSLAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Turan KARADENİZ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Murat Kemal AVCI

BOLU, ARALIK 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Esma AKKUŞ ARSLAN tarafından hazırlanan “**İNCİRDE (*Ficus carica* L.) CİNSİYET GELİŞİMİNDE PLEİOTROPİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ DUO1 (MYB125)’İN DOĞRUDAN DÜZENLEDİĞİ GENLERİN TANILANMASI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı Bahçe Bitkileri Doktora Programında Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir. 15/12/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Turan KARADENİZ

Pamukkale Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Çukurova Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Ferhad MURADOĞLU

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Hatice İKTEN

Akdeniz Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Emrah GÜLER

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....
ESMA AKKUŞ ARSLAN

ÖZET

İNCİRDE (*Ficus carica* L.) CİNSİYET GELİŞİMİNDE PLEİOTROPİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ DUO1 (MYB125)'İN DOĞRUDAN DÜZENLEDİĞİ GENLERİN TANILANMASI

DOKTORA TEZİ

ESMA AKKUŞ ARSLAN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

BAHÇE BİTKİLERİ DOKTORA PROGRAMI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. TURAN KARADENİZ)

(İKİNCİ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MURAT KEMAL AVCI)

BOLU, ARALIK - 2025

XV + 135 sayfa

Bitkilerde cinsiyet oluşumunu yönlendiren moleküler mekanizmaların aydınlatılması, üreme biyolojisi ve tarımsal verimlilik açısından stratejik önemdedir. Dioik yapısı nedeniyle incir (*Ficus carica* L.), cinsiyet gelişiminin moleküler düzeyde incelenmesi için uygun bir model türdür. Bu çalışmada, erkek gamet gelişiminde merkezi bir düzenleyici olan MYB domain protein 125 (DUO POLLEN1; DUO1) transkripsiyon faktörü analiz edilmiş ve DUO1'in genom çapındaki DNA bağlanma bölgeleri tanımlanarak cinsiyet oluşumunun transkripsiyonel kontrolüne ilişkin yeni bulgular elde edilmiştir. Antikorsuz *in vitro* kromatin immünopresipitasyon dizilemesi (*in vitro* ChIP-seq) uygulanarak DUO1 bağlanma bölgeleri belirlenmiş, yüksek derinlikte yeni nesil DNA dizilemesi ile elde edilen veriler biyoinformatik araçlarla kapsamlı biçimde analiz edilmiştir. DUO1 ortoloğu, BLAST, R2R3-MYB alan mimarisi ve filogenetik değerlendirmelerle tanımlanmıştır. Erkek ve dişi incir çeşitlerinde gerçekleştirilen *in vitro* ChIP-seq analizleri sonucunda, genom çapında çok sayıda DUO1 bağlanma bölgesi saptanmıştır. Fonksiyonel açıklama çalışmaları kapsamında yapılan Gene Ontology (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analizleri, özellikle “anter ve polen gelişimi” ile ilişkili süreçlerin anlamlı düzeyde temsil edildiğini göstermiştir. Bu fonksiyonel profil doğrultusunda, on adet erkek marker adayı gen belirlenmiş ve bu genlerin promotörlerinde DUO1–DNA etkileşimleri Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ile doğrulanmıştır. Bu çalışma, incirde DUO1'in erkek gamet gelişimiyle ilişkili hedef genlerden oluşan özgün bir transkripsiyonel ağ kurduğunu gösteren güçlü genomik ve regülomik kanıtlar sunmakta; bulgular, erken cinsiyet tayini ve erkek üreme kalitesine yönelik moleküler marker'ların geliştirilmesine olanak sağlayarak modern ıslah programlarına doğrudan entegre edilebilir bir metodolojik altyapı sunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELE: DUO1; EMSA; *Ficus carica*; *in vitro* ChIP-seq; MYB125; Transkripsiyon faktörü; Transkripsiyonel düzenleme.

**IDENTIFICATION OF GENES DIRECTLY REGULATED BY THE
PLEIOTROPIC TRANSCRIPTION FACTOR DUO1 (MYB125) IN SEX
DEVELOPMENT IN FIG (*Ficus carica* L.)**

PHD THESIS

ESMA AKKUŞ ARSLAN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

(SUPERVISOR: PROF. DR. TURAN KARADENİZ)

(CO-SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. MURAT KEMAL AVCI)

BOLU, DECEMBER 2025

XV + 135 pages

Elucidating the molecular mechanisms underlying sex determination in plants is of strategic importance for both reproductive biology and agricultural productivity. Owing to its dioecious reproductive system, the fig (*Ficus carica* L.) constitutes an appropriate model species for investigating the molecular basis of sex development. In the present study, the transcription factor MYB domain protein 125 (DUO POLLEN1; DUO1), a central regulator of male gametophyte development, was characterized, and novel insights into the transcriptional regulation of sex determination were obtained by mapping DUO1 DNA-binding sites genome-wide. DUO1 binding regions were identified using antibody-free *in vitro* chromatin immunoprecipitation sequencing (*in vitro* ChIP-seq), and high-depth next-generation sequencing data were subjected to comprehensive bioinformatic analyses. The DUO1 ortholog was identified through BLAST searches, R2R3-MYB domain architecture analysis, and phylogenetic inference. *In vitro* ChIP-seq analyses conducted in male and female fig cultivars revealed numerous DUO1 binding sites across the genome. Functional annotation based on Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses indicated significant enrichment of biological processes associated particularly with anther and pollen development. In accordance with this functional profile, ten candidate male marker genes were selected, and DUO1–DNA interactions within the promoters of these genes were validated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Collectively, this study provides strong genomic and regulomic evidence that DUO1 establishes a distinctive transcriptional network comprising target genes involved in male gametophyte development in fig. These findings offer a methodological framework that can be directly integrated into modern breeding programs by enabling the development of molecular markers for early sex identification and for the assessment of male reproductive quality.

KEYWORDS: DUO1; EMSA; *Ficus carica*; *in vitro* ChIP-seq; MYB125; Transcription factor; Transcriptional regulation.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 İncirin Morfolojik Özellikleri	3
1.2 İncirde Döllenme Biyolojisi	6
1.3 Bitkilerde Transkripsiyon Faktörleri	8
1.4 MYB Transkripsiyon Faktörlerinin Genel Özellikleri	9
1.4.1 DUO1 (MYB125) Transkripsiyon Faktörü	11
1.5 DNA-Protein Etkileşimlerini İncelemeye Yönelik Moleküler Yöntemler: ChIP ve EMSA	14
1.5.1 ChIP (Kromatin İmmünopresipitasyon Yöntemi)	14
1.5.2 EMSA (Elektroforetik Hareketlilik Kayması Testi).....	16
1.6 Tezin Amacı, Önemi ve Özgün Katkısı.....	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1 Materyal	19
2.1.1 Bitkisel Materyal	19
2.1.2 Kimyasal Materyal	23
2.2 Yöntem	24
2.2.1 MYB125 Genine Ait Homolog Protein Dizilerinin Tanımlanması ...	24
2.2.2 Gen Sentezi, Vektör Tasarımı ve Klonlama	25
2.2.3 Transformasyon	26
2.2.4 Klon tarama; Transformasyon Sonrası Klon Seçimi ve PCR ile Doğrulama	28
2.2.5 pET-28a(+)- <i>FcMYB125</i> Rekombinant Proteininin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	28
2.2.6 Genomik DNA İzolasyonu	31
2.2.7 <i>In vitro</i> ChIP Analizi	32
2.2.8 EMSA Analizi	36
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
3.1 <i>FcMYB125</i> Genine Ait Homolog Protein Dizilerinin Belirlenmesi	39
3.2 Pet-28a(+)- <i>FcMYB125</i> Rekombinant Plazmidinin Sanger Dizileme İle Doğrulanması	42

3.3 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Suşunda Transformasyon ve Koloni Seçimi	45
3.4 Rekombinant Proteinin Ekspresyonunun İndüklenmesi ve Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	47
3.5 Genomik DNA izolasyonu	49
3.6 <i>In vitro</i> ChIP-seq Analizleri.....	51
3.6.1 Veri Kalite Kontrolü.....	52
3.6.2 Pik Belirleme Sonuçları.....	60
3.6.3 Ortak ve Özgül Piklerin Karşılaştırılması	61
3.6.4 Erkek bireylere Özgü Bağlanma Bölgelerinin Fonksiyonel Analizi ..	62
3.6.5 Marker Adayı Genlerin Seçimi.....	86
3.7 EMSA Analizi	89
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
4.1 Sonuçlar	95
4.2 Sınırlılıklar.....	96
4.3 Öneriler	96
KAYNAKLAR	98
EKLER.....	111

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1.** Bitki transkripsiyon faktörü (TF) ailelerinin sınıflandırılması. Şemada TF aileleri (yeşil), DNA bağlanma bölgeleri (turuncu), yardımcı alanlar (mavi) ve yasaklanmış alanlar (mor) ile gösterilmiştir. Oklar, TF'lerin sahip oldukları alan sayısını belirtmektedir (1: tek alan, 2: iki veya daha fazla alan), (PlantTFDB 5.0), <https://planttfdb.gao-lab.org/> 9
- Şekil 1.2.** Bitki MYB transkripsiyon faktörü sınıfları. Bitişik MYB tekrarlarının (R) sayısına bağlı olarak tanımlanan farklı MYB protein sınıfları gösterilmiştir. Tipik bir R2R3-MYB proteininde yer alan birincil yapı (amino asit dizisi) ve ikincil yapı (heliks-dönüş-heliks düzeni) şematik olarak sunulmuştur. H: heliks, T: dönüş (turn), W: triptofan, X: diğer amino asitler (Dubos vd., 2010) 10
- Şekil 1.3.** *Arabidopsis thaliana*'da erkek gametofit gelişimi sırasında DUO1'in çoklu rollerini gösteren şematik diyagram. 13
- Şekil 1.4.** ChIP yöntemi (Collas ve Dahl, 2008). 15
- Şekil 1.5.** EMSA yönteminin genel prensibi (Song vd., 2015). 16
- Şekil 2.1.** Sarılop incir meyvesi 20
- Şekil 2.2.** Sarı Zeybek incir meyvesi 21
- Şekil 2.3.** Kaba İlek incir meyvesi 22
- Şekil 2.4.** Hamza ilek (Caprifig) incir meyvesi 23
- Şekil 2.5.** pET-28a(+)-FcMYB125 klonlama stratejisi ve vektör haritası. 26
- Şekil 3.1.** MYB125 *Ficus carica*'da blastp analiz sonucu. 39
- Şekil 3.2.** *Arabidopsis thaliana*, *Ficus carica* ve *Cucurbita argyrosperma* DUO1 proteinleri ile *A. thaliana* MYB105 proteininin çoklu dizi hizalaması. 40
- Şekil 3.3.** *Arabidopsis thaliana*, *Ficus carica* ve *Cucurbita argyrosperma* erkek gameta türlerine ait DUO1 proteinleri ile *A. thaliana* MYB105 proteininin filogenetik ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. 41
- Şekil 3.4.** pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidinin Sanger doğrulaması: F primeri ile elde edilen kromatogram. Sarı alan: C-uç 6×His etiketini kodlayan ardışık CAC tekrarlarını göstermektedir. Mavi alan: ATG başlangıç kodonu ve MYB125 ORF'nin başlangıcı (in-frame). 43
- Şekil 3.5.** pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidinin Sanger doğrulaması: R primeri (geri okuma) ile elde edilen 3' uç kromatogramı. Mavi alan FcMYB125 ORF'nin son kesimini, sarı alan ise C-uç 6×His etiketini kodlayan ardışık CAC tekrarlarını göstermektedir. Okuma çerçevesi korunmuştur (in-frame). 43
- Şekil 3.6.** pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidinin 5' birleşme bölgesinin Sanger doğrulaması. Üst panelde lac operatörü, RBS ve MYB125 ORF başlangıcı (ATG) gösterilmiştir. Alt panelde ileri ve geri okumalar referansla örtüşmekte; RBS→ATG geçişi ve ORF'nin in-frame başladığı doğrulanmaktadır. 44
- Şekil 3.7.** Konsensus MYB125 nükleotid dizisinin BLASTx sonuç ekranı (NCBI; ClusteredNR). 44
- Şekil 3.8.** *E. coli* BL21 (DE3)'ün transformasyon sonrası LB + kanamisin (50 µg/mL) plakasında koloni oluşumu (37 °C, ~16 s, 100 µL yayma ekim). 45

Şekil 3.9. Koloni PCR jeli — <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-28a(+)- <i>FcMYB125</i> . T7 promotör (F) / T7 terminatör (R) primerleriyle amplifikasyon. Ok ile gösterilen hedef bant ≈1091 bp'dir; +: rastgele seçilen koloniler. M: DNA merdiveni (GLPBIO GF55001, 0.1–10 kb, 21 bant). (%1 agaroz, RedSafe; 100 V, ~40 dk).....	46
Şekil 3.10. Pozitif transformantların yeniden çizgi ekimle saflaştırılması.	46
Şekil 3.11. Rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi. C: 35 kDa kontrol proteini; 1: İndüklenme öncesi hücre lizatı; 2: 2×YT ortamında 18 °C'de indüklenen örnek; 3: 2×YT ortamında 24 °C'de indüklenen örnek; 4: LB ortamında 18 °C'de indüklenen örnek; 5: LB ortamında 24 °C'de indüklenen örnek. Analiz sonucunda hedef proteine karşılık gelen ~35 kDa'lık bant, özellikle 2×YT ortamında ve 24 °C'de indüklenen örnekte yoğun olarak gözlenmiştir.	47
Şekil 3.12. Protein örneklerinin SDS-PAGE analizi. 1: LB pellet, 2: LB lizat, 3: 2×YT pellet, 4: 2×YT lizat, kDa: Protein markırı. Hedef proteine (~35 kDa) karşılık gelen bant özellikle 2×YT lizat fraksiyonunda belirgin olarak görülmektedir.	48
Şekil 3.13. Saflaştırma ve diyaliz sonrası protein örneklerinin SDS-PAGE analizi. M: Marker, 1: İlk protein lizat, 2: 1. elüsyon, 3: Bağlanmayan/yıkama fraksiyonu, 4: 2. elüsyon, 5: Diyaliz sonrası protein.....	48
Şekil 3.14. Sarılop ve Kaba ilek incir çeşitlerine ait DNA saflık ve yoğunluk değerlerinin <i>Nano-300 MicroDigital</i> cihazı ile ölçüm çıktıları.	50
Şekil 3.15. Sarı Zeybek ve Hamza ilek incir çeşitlerine ait DNA saflık ve yoğunluk değerlerinin <i>Nano-300 MicroDigital</i> cihazı ile ölçüm çıktıları.	50
Şekil 3.16. <i>Ficus carica</i> gDNA'nın agaroz jel görüntüsü: 1–4 sırasıyla Sarılop, Sarı Zeybek, Kaba İlek, Hamza İlek.....	51
Şekil 3.17. İncir çeşitlerinde ham okuma (Raw Reads) ve temiz okuma (Clean Reads) sayılarının karşılaştırılması.	53
Şekil 3.18. İncir çeşitlerinde temiz okuma oranları (Effective %).	53
Şekil 3.19. İncir çeşitlerinde DNA dizileme kalite değerleri.....	54
Şekil 3.20. İncir çeşitlerinde GC içerikleri (%).	54
Şekil 3.21. Sarılop Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (a) ve fragman uzunluk dağılımı (b) grafikleri.	56
Şekil 3.22. Sarı Zeybek Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (c) ve fragman uzunluk dağılımı (d) grafikleri.	57
Şekil 3.23. Kaba ilek Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (e) ve fragman uzunluk dağılımı (f) grafikleri.....	58
Şekil 3.24. Hamza ilek Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (g) ve fragman uzunluk dağılımı (h) grafikleri.	59
Şekil 3.25. İncir çeşitlerinde pik belirleme analizi ile belirlenen toplam pik sayıları.	61
Şekil 3.26. İncir çeşitlerinde <i>FcMYB125</i> bağlanma bölgelerinin Venn diyagramı	61
Şekil 3.27. Erkek bireylere özgü piklerin Biological Process dağılımı	63
Şekil 3.28. Erkek bireylere özgü piklerin Cellular Component dağılımı.	64
Şekil 3.29. Erkek bireylere özgü piklerin Molecular Function dağılımı.	65
Şekil 3.30. Erkek bireylere özgü GO–BP Score Distribution grafiği.	66
Şekil 3.31. Erkek bireylere özgü GO–CC Score Distribution grafiği	66
Şekil 3.32. Erkek bireylere özgü GO–MF Score Distribution grafiği	67

- Şekil 3.33.** Sarılop (a), Sarı Zeybek (b), Kaba İlek (c) ve Hamza İlek (d) çeşitlerine ait EMSA aday gen promotör bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görselleştirilmesi. M: 1 kb DNA belirteci; Mavi ok: 500 bp, kuyular 1–10: Tablo 1'de listelenen EMSA aday genleri. 89
- Şekil 3.34.** Farklı protein derişimlerinin DNA–protein kompleksleşmesi üzerindeki etkisinin EMSA ile değerlendirilmesi. (a–b) Primer-1, (c–d) Primer-2, (e–f) Primer-3 panellerine aittir. Her panel, Sarılop (SL), Sarı Zeybek (SZ), Kaba İlek (K) ve Hamza İlek (H) çeşitlerine ait aday gen promotör bölgelerinin DUO1 proteini ile farklı konsantrasyonlarda (0, 2, 4 ve 6 μ M) bağlanma etkileşimlerini göstermektedir. M: DNA merdiveni (100 bp). Mobilite kaymasına karşılık gelen kompleks bantları, görsel yönlendirme amacıyla yalnızca ilk iki panelde (a–b) oklarla belirtilmiştir. 90
- Şekil 3.35.** Farklı protein derişimlerinin DNA–protein kompleksleşmesi üzerindeki etkisinin elektroforetik mobilite kayması (EMSA) ile değerlendirilmesi. (g–h) Primer-4, (ı–i) Primer-5 ve (j–k) Primer-6 panellerine aittir. Her panel, Sarılop (SL), Sarı Zeybek (SZ), Kaba İlek (K) ve Hamza İlek (H) çeşitlerine ait aday gen promotör bölgelerinin DUO1 proteini ile farklı konsantrasyonlarda (0, 2, 4 ve 6 μ M) bağlanma etkileşimlerini göstermektedir. M: DNA merdiveni (100 bp). Mobilite kaymasına karşılık gelen kompleks bantları, yalnızca ilk iki panelde (a–b) oklarla belirtilmiş olup sonraki panellerde aynı örüntü korunmuştur. 91
- Şekil 3.36.** Farklı protein derişimlerinin DNA–protein kompleksleşmesi üzerindeki etkisinin elektroforetik mobilite kayması (EMSA) ile değerlendirilmesi. (m–n) Primer-7, (o–ö) Primer-8, (p–r) Primer-9 ve (s–t) Primer-10 panellerine aittir. Her panel, Sarılop (SL), Sarı Zeybek (SZ), Kaba İlek (K) ve Hamza İlek (H) çeşitlerine ait aday gen promotör bölgelerinin FcMYB125 proteini ile farklı konsantrasyonlarda (0, 2, 4 ve 6 μ M) bağlanma etkileşimlerini göstermektedir. M: DNA merdiveni (100 bp). Mobilite kaymasına karşılık gelen kompleks bantları, yalnızca ilk iki panelde (a–b) oklarla belirtilmiş olup sonraki panellerde aynı örüntü korunmuştur. 92

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. EMSA analizleri için tasarlanan ileri ve ters primerleri.....	37
Tablo 2.2. EMSA bağlanma karışımı ve FcMYB125 titrasyonu.	38
Tablo 3.1. Genomik DNA örneklerine ait NanoDrop ölçüm sonuçları.	49
Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları.....	71
Tablo 3.3. EMSA doğrulamasına alınan erkek-özgü marker aday genler ve olası biyolojik işlevleri.....	88



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

ATAC-seq	: Transpozaz-erişilebilir kromatin dizilemesi (açık kromatin profillemesi)
BP	: Biological Process (Biyolojik süreç)
bp	: Baz çifti (uzunluk birimi)
ChIP-seq	: Kromatin immünopresipitasyonu ve yeni nesil dizileme
DAP-seq	: DNA afinite saflaştırması ve dizileme
DNase-seq	: DNase I hipersensitif bölge dizilemesi (açık kromatin profillemesi)
DPBB	: Double-psi β -barrel (çift-psi β -varil yapısı)
DUO1	: DUO POLLEN1
EMSA	: Elektroforetik hareketlilik değişim analizi
GO	: Gene Ontology (Gen Ontolojisi)
HRM	: Yüksek çözünürlüklü erime analizi
indel	: Ekleme/silme tipinde varyant
InterPro	: Protein aile/alan veritabanı entegrasyonu
KASP	: Kompetitif allel-spesifik PCR
K_D	: Ayrışım sabiti
kb	: Kilobaz çifti (10^3 bp)
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LecRK	: Lectin receptor-like kinase (lektin reseptör-benzeri kinaz)
Mb	: Megabaz çifti (10^6 bp)
mg	: Miligram (10^{-3} g)
MF	: Molecular Function (Moleküler işlev)
mL	: Mililitre (10^{-3} L)
mM	: Milimolar (10^{-3} M)
MOSPD	: Motile erkek gamet domain (hareketli erkek gamet alanı)
MYB125	: Arabidopsis'te DUO1 olarak da bilinen R2R3-MYB transkripsiyon faktörü
n	: Örneklem sayısı
NGS	: Yeni nesil dizileme
nM	: Nanomolar (10^{-9} M)
NSC	: Normalized Strand Cross-correlation; ChIP kalite metriği
OD_{260/280}	: 260/280 nm absorbans oranı

Q	: FDR-düzeltilmiş p-değeri
qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
R2R3-MYB	: Bitki özgül MYB transkripsiyon faktörü alt ailesi
RSC	: Relative Strand Cross-correlation; ChIP kalite metriği
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TF	: Transkripsiyon faktörü
UniProt	: Universal Protein Resource (protein veritabanı)
µg	: Mikrogram (10^{-6} g)
µL	: Mikrolitre (10^{-6} L)
µM	: Mikromolar (10^{-6} M)
5mC	: 5-metilsitozin (DNA metilasyonu işareti)

TEŞEKKÜR

Akademik ve kişisel gelişimimde bir dönüm noktası niteliği taşıyan bu çalışma, kariyerimin yalnızca bilimsel bir basamağı değil, aynı zamanda yaşamımda kalıcı izler bırakan bir öğrenme ve dönüşüm süreci olmuştur.

Bu süreçte, tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve raporlanması aşamalarında sağladıkları bilimsel rehberlik, yönlendirme ve sürekli destekleri için danışmanlarım Prof. Dr. Turan KARADENİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Murat Kemal AVCI'ya; ayrıca çalışmanın başından sonuna kadar kurgu, deneysel tasarım ve uygulama aşamalarında kesintisiz katkı ve desteğini esirgemeyen değerli eşim Dr. Öğr. Üyesi Muharrem ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi (TİK) sürecinde eleştirel değerlendirmeleri, yapıcı geri bildirimleri ve yol gösterici önerileriyle çalışmanın gelişimine değerli katkılar sağlayan Doç. Dr. Hatice İKTEN ve Doç. Dr. Emrah GÜLER'e teşekkür ederim.

Deneyleerin yürütülmesi, analizlerin gerçekleştirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi aşamalarındaki katkıları için Prof. Dr. Turgay ÜNVER'e; deneysel altyapı olanaklarının paylaşımı ve teknik destekleri için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN ile Öğr. Gör. Hatice PİLEVNELİ'ye teşekkür ederim. Ayrıca, yapıcı değerlendirmeleri ve laboratuvar desteği için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi ve REDPROM Müdürü Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN ile Dr. Zeynep Erdem AYNUR'a da şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından İncir Araştırma Enstitüsü bünyesinde yürütülen [Proje No: 5823] kapsamında desteklenmiştir. Sağladıkları mali ve kurumsal katkılar için TAGEM'e; ayrıca Kardelen Biyoteknoloji İth. İhr. San. ve Tic. Ltd. Şti., EXİM İç ve Dış Tic. Ltd. Şti. ve Sugenomik Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne teşekkür ederim.

Son olarak, bu tez süreci boyunca maddi ve manevi varlıklarını daima yanımda hissettiğim sevgili babam Yavuz AKKUŞ, annem Dilek AKKUŞ ve kardeşlerim Durmuş AKKUŞ ile Musa AKKUŞ'a; en büyük motivasyon kaynağım, yaşam sevincim ve ilhamım olan oğlum Turan Alp ARSLAN'a gönülden teşekkür ederim.

Eşim **Muharrem ARSLAN** ve oğlum **Turan Alp ARSLAN**'a..

1. GİRİŞ

İncir (*F. carica* L.), *Moraceae* familyasına ait, *Ficus* cinsinin yaklaşık 600 ila 2000 türünden biridir (Crisosto vd., 2011). Latince adı *carica*, incirin ana vatanı olduğu düşünülen Türkiye'nin güneybatısında yer alan eski Karya bölgesinden gelmektedir (Starr vd., 2003). *F carica*, *Ficus* cinsi içinde yenilebilir meyve veren sınırlı sayıdaki türlerden biridir. Bu türler arasında ilk kültüre alınan bitki olarak kabul edilir. Kaynaklara göre, tahıl tarımından yaklaşık bin yıl önce kültüre alındığı bildirilmektedir (Falistocco, 2020; Flaishman vd., 2008; Hssaini vd., 2024). Fosil kayıtları, *F carica*'nın tarih öncesi dönemde Güney Avrupa'ya kadar geniş bir yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır (Crisosto vd., 2011; De Candolle, 1886).

İncirin ilk kez kültüre alınmasının Doğu Akdeniz'de gerçekleştiği ve buradan seçilmiş türlerin diğer bölgelere, özellikle Batı Akdeniz'e yayıldığı düşünülmektedir. Bu sürecin yaklaşık olarak MÖ 5000–6000 yıllarına dayandığı tahmin edilmektedir. Ancak, son arkeolojik bulgular kültüre almanın 11.000 yıl öncesine kadar uzanabileceğini göstermektedir. Bu bulguların doğruluğu kabul edildiğinde, incirin tarımın başlangıcıyla aynı döneme denk geldiği ve insanlık tarihindeki en erken bitkisel üretim faaliyetlerinden biri olduğu ifade edilmektedir (Falistocco, 2020).

İncir, yalnızca geniş coğrafi yayılımı nedeniyle değil, aynı zamanda tarih boyunca Akdeniz bölgesinde yaşayan toplumlar bakımından taşıdığı kültürel ve ekonomik önem sebebiyle bu bölgenin en karakteristik türlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Falistocco, 2020). 16. yüzyılda Akdeniz bölgesi dışında Avrupa ve Asya'nın farklı bölgelerine de tanıtıldığı bilinmektedir. İngiltere'ye 1525 ile 1548 yılları arasında ulaştığı belirtilirken, Çin bahçelerinde 1550 yılında kaydedilmiştir (Bakewell Stone, 2022; Morton, 1987). Bunun yanında, Tang Hanedanlığı (MS 618–906) döneminde Çin'e getirildiğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır ve günümüzde özellikle Xinjiang bölgesinde yenilebilir meyvesi için yetiştirilmektedir (*Flora of China*, 2025).

Avrupa'daki yayılımını takiben incir, Amerika kıtasına da tanıtılmıştır. 1560 yılında İspanyol kâşifler tarafından Meksika'ya getirildikten sonra, 1769'da İspanyol Fransisken misyonerleri tarafından Kaliforniya'daki San Diego Misyonu'nda yetiştirilmeye başlanmıştır (Anderson ve Crocker, 2009; Morton, 1987).

İncir, günümüzde başta Akdeniz havzası olmak üzere ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen ve küresel ölçekte ticari değeri yüksek bir meyvedir (Crisosto vd., 2011; Obenauf vd., 1978). FAO'nun 2023 yılı verilerine göre, dünya genelinde yaklaşık 1,3 milyon ton incir üretilmiştir. İncir üretimi dünya genelinde önemli bir seviyeye ulaşırken, Türkiye bu alanda öne çıkan ülkeler arasında yer almakta ve üretim ile ihracatta lider konumdadır. 2022 yılında FAO verilerine göre 350 bin ton, 2023 yılında ise TÜİK verilerine göre 356 bin ton incir üretilmiştir (FAO, 2024; TÜİK, 2024). Üretim ve ihracat verileri incelendiğinde, incirin ticari öneminin giderek arttığı ve küresel ekonomi ile ülke ekonomisine olan katkısının sürdürülebilir bir şekilde yükseldiği görülmektedir.

İncir, yüksek besin değeri ve sağlık üzerindeki çok yönlü faydalarıyla dikkat çeken, temel ve ikincil biyoaktif bileşenler açısından zengin bir türdür. Bitkinin kabuk, meyve eti, yaprak, tohum ve lateks gibi tüm bölümleri; yağ asitleri, karbonhidratlar, vitaminler ve mineraller gibi birincil besin maddelerinin yanı sıra flavonoidler, furanokumarinler, antosiyaninler, pektin ve fitosteroller gibi biyoaktif bileşikler içermektedir (Alzahrani vd., 2024). İncirin sağlık üzerindeki olumlu etkileri arasında antioksidan, antidiyabetik, antitümör, antienflamatuvar ve antiosteoporotik özellikler bulunmaktadır. Özellikle kuru incirin fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler ve saponinler açısından zengin olduğu ve yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Soni vd., 2014). İncir ve türevleri, hipoglisemik, hipolipidemik ve antikanserojenik etkiler sergilemekte; aynı zamanda antimikrobiyal, anti-anjiyogenik, antiinflamatuvar ve depresyon karşıtı özellikleriyle de dikkat çekmektedir. Özellikle incir yaprakları ve meyveleri, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde destekleyici bir rol oynarken, lateksi antibakteriyel ve antikanser özellikler taşımaktadır (Pal, 2020). Bunun yanı sıra, incir hafif müshil, balgam söktürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılabilen; özellikle kuru incir, diyabet hastaları için besin takviyesi olarak önerilmektedir (Soni vd., 2014).

Hem taze hem de kuru incir, yüksek lif ve polifenol içeriğiyle besleyici bir gıda kaynağıdır (Alzahrani vd., 2024). Ayrıca, yağ ve kolesterol içermemesi nedeniyle sağlıklı bir beslenme için önemli avantajlar sunmaktadır (Pal, 2020). Bitkinin meyvesi, kökü ve yaprakları birçok terapötik fayda sağlamak ve geleneksel tıpta gastrointestinal rahatsızlıklar (karın ağrısı, hazımsızlık, iştah kaybı, ishal), solunum yolu hastalıkları (boğaz ağrısı, öksürük, bronşiyal problemler) ve

kardiyovasküler bozuklukların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Shahrajabian vd., 2021). Ayrıca, iltihap önleyici ve spazm çözücü etkileriyle de bilinmektedir (Pal, 2020). Fitokimyasal analizler, incirin flavonoidler ve polifenoller açısından güçlü bir kaynak olduğunu, ayrıca arabinoz, β -amyrinler, β -karotenler, glikozitler, β -sitosteroller ve ksantotoksol gibi bileşikler içerdiğini ortaya koymuştur (Rodríguez-Solana ve Romano, 2019). Olgun kuru meyvenin sulu ekstraktında alkaloidler, kumarinler, saponinler ve terpenlerin varlığı da rapor edilmiştir (Barolo vd., 2014).

Gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan incir, taze ve kurutulmuş olarak tüketilmenin yanı sıra reçel, pekmez ve şurup gibi işlenmiş ürünlerde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Rodríguez-Solana ve Romano, 2019). Farmakolojik etkileri sayesinde ilaç ve kozmetik sektöründe de değerlendirilen incir, fonksiyonel gıda ve doğal ilaç üretiminde önemli bir bileşen olarak öne çıkmaktadır (Barolo vd., 2014). Yapılan bilimsel çalışmalar, incirin besin değeri, sağlık üzerindeki olumlu etkileri ve ekonomik potansiyelini vurgulamakta; hem geleneksel hem de modern tıpta kıymetli bir doğal kaynak olarak değerlendirildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, incirin yalnızca günümüzde değil, tarih boyunca da önemli bir besin kaynağı ve tıbbi bitki olarak kabul edildiğini göstermektedir.

1.1 İncirin Morfolojik Özellikleri

İncir bitkisi; kök, gövde, dallar, yapraklar, çiçekler ve meyvelerden oluşan, kendine özgü bir morfolojiye sahiptir.

Kök yapısı, taç genişliğinin üç katına kadar yayılan, genellikle kazık kök bulundurmeyen sığ ve lifli bir sistemden oluşmaktadır (Condit, 1947; Flaishman vd., 2008). Kökler genellikle toprağın yüzeyine yakın katmanlarda yoğunlaşmıştır. Bu özellik, ağacın çevresel koşullara hızlı bir şekilde adapte olmasını sağlarken aynı zamanda kuraklık ve su baskını gibi stres koşullarına karşı daha hassas hale getirmektedir. İncir kökleri, büyüme ortamına bağlı olarak toprak tipine uyum sağlamaktadır. Nitekim kumlu topraklarda kök sistemi daha geniş bir alana yayılırken killi topraklarda daha sınırlı bir yayılım göstermektedir. Ayrıca, mikoriza mantarları ile simbiyotik ilişkiler kurarak fosfor gibi besin maddelerini topraktan daha etkili bir şekilde aldığı ifade edilmektedir (Flaishman vd., 2008).

İncir ağacı, genellikle kısa bir gövdeye ve geniş bir dallanma yapısına sahiptir. Gövde düzgün bir şekilde odunlaşmış ve dayanıklı bir yapıdadır. Dallar, çeşide bağlı olarak sarkık veya dik gelişim gösterebilir ve ağacın geniş bir taç oluşturmalarını sağlar. Gövde ve dallar üzerinde düzenli aralıklarla yer alan tomurcuklar, gelecek yılın sürgün ve meyvelerini taşıyan önemli yapılardır. Bu tomurcuklar genellikle vejetatif ve generatif olmak üzere iki türe ayrılır; vejetatif tomurcuklar yaprak ve sürgün büyümesini sağlarken generatif tomurcuklar meyve gelişimine destek olmaktadır (Chessa ve Nieddu, 1997; Crane, 1986).

İncir ağacının büyüme ve gelişimi çevresel koşullara duyarlıdır. Özellikle ışık yoğunluğu, toprak yapısı ve su durumu, sürgün büyümesi ve dallanma üzerinde doğrudan etkili faktörlerdir. Kurak iklimlerde yetişen incir ağaçları genellikle daha dayanıklı bir gövdeye ve kısa dallara sahipken, nemli iklimlerde daha uzun sürgünler ve geniş taç yapıları gözlemlenebilir (Condit, 1947). Bu özellikler, incir ağacının farklı ekolojik koşullara adapte olabilen esnek bir tür olduğunu göstermektedir.

İncir ağacının yaprakları dallar üzerinde spiral bir düzenle yer alır ve genellikle geniş, düzensiz, tek parçalı bir yapıya sahiptir. Yaprakların üst yüzeyi koyu yeşil ve pürüzsüz, alt yüzeyi ise açık yeşil ve tüylüdür. Kenarları genellikle derin loblara ayrılan yaprakların şekli, aynı ağaç üzerinde bile farklılık gösterebilir. Yaprakların büyüklüğü ve biçimi, ağacın genetik özelliklerine, çevresel koşullara ve çeşidine bağlı olarak değişir. İlkbaharın başında gelişmeye başlayan yapraklar, büyüme dönemi boyunca yenilerini oluşturarak ağacın fotosentez kapasitesini artırır. Ancak bu süreç, sonbaharda hava sıcaklıklarının düşmesi, günlerin kısılması, rüzgâr ve yağmur gibi çevresel faktörlerle kesintiye uğrar. Bu faktörler, yaprak dökümünü tetikleyerek ağacın kışa hazırlık yapmasına olanak tanır. Yaprak dökümü, ağacın su kaybını en aza indirirken enerji depolamasına da katkı sağlar. Bu döngünün süresi ve yoğunluğu, ekolojik koşullara bağlı olarak farklılık gösterebilir (Flaishman vd., 2008; Özen, 2007).

İncir, farklı ağaç morfolojileri ve çiçek formları ile dikkat çeken özgün bir gelişim sürecine sahiptir. Eşeyssel dimorfizm gösteren bu meyve türü, erkek (*F. carica subsp. carica* var. “caprificus”, baba incir) ve dişi (*F. carica subsp. carica* var. “domestica”, yenilebilir incir) olmak üzere iki gruba ayrılır. Çiçek yapıları, erkek çiçek, kısa stiluslu dişi çiçek (gal çiçeği) ve uzun stiluslu dişi çiçek olmak üzere üç formda görülmektedir (Armstrong, 2006; Aytürk, 2016).

İncirde çiçekler, “sikonyum” adı verilen kapalı, armut biçiminde bir yapı içinde farklılaşıp gelişmektedir. Bu yapı, iç yüzeyinde yüzlerce küçük çiçek barındırır ve tepesinde “ostiol” adı verilen küçük bir açıklık bulunmaktadır (Cook ve Rasplus, 2003). Hem erkek hem de dişi ağaçlarda ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde yılda üç kez sikonyum oluşumu gerçekleşmektedir. Dişi ağaçların sikonyumlarında uzun stiluslu dişi çiçekler bulunurken, erkek ağaçların sikonyumlarında hem erkek çiçekler hem de kısa stiluslu dişi çiçekler (gal çiçekleri) yer almaktadır (Aytürk, 2016; Özen, 2007). Bu özellik, incirin ginodioik bir üreme sistemine sahip olmasını sağlamaktadır.

Meyve oluşumu, genişlemiş ve içi boş bir yapı olan sikonyumların içinde gerçekleşmektedir. Botanik açıdan yalancı meyve kategorisinde yer alan incirin yenilebilir kısmı, çiçek tablasının genişleyip etlenmesiyle oluşmaktadır. İçindeki tohumlar ise sikonyumun iç yüzeyindeki gerçek meyvelerdir. İncir meyvesi, tozlaşma yoluyla veya partenokarpi mekanizmasıyla oluşabilmektedir. Bu özellik, inciri botanik açıdan oldukça özel ve ilgi çekici bir meyve yapmaktadır (Bronstein, 1992; Crane, 1986; Kjellberg vd., 1987).

Meyve şekli, genetik çeşitlilik ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. İncir meyveleri genellikle yuvarlak, oval, armudumsu, yassı ve silindirik formlarda olup sap kısımlarında “ostiol” adı verilen küçük bir delik bulunur. Yuvarlak ve oval şekilli meyveler genellikle sofralık incir çeşitlerinde tercih edilirken, armudumsu ve yassı formlar kurutmalık incirlerde yaygındır. Alt kısmı geniş, üst kısmı dar olan armut şeklindeki armudumsu form, özellikle ‘Sarılöp’ gibi geleneksel kurutmalık çeşitlerde öne çıkmaktadır. Yassı form ise meyvenin basık bir yapıya sahip olduğu ve özellikle Ege Bölgesi’nde yetiştirilen kurutmalık incir çeşitlerinde yaygın olarak görüldüğü bir şekildir. Meyve şekli, pazarlama stratejileri ve kullanım amacı açısından önemli bir kriterdir (Bronstein, 1992; Crane, 1986; Özen, 2007).

İncir meyvesinin rengi, genetik çeşitliliğe, olgunlaşma sürecine ve çevresel koşullara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Meyvenin hem dış kabuk hem de iç et kısmındaki renk tonları, antosiyaninler ve diğer ikincil metabolitlerin birikimiyle şekillenmektedir. Dış kabuk rengi genellikle yeşil, sarı, kahverengi, mor veya siyah tonlarında görülürken, iç kısımda beyaz, sarı, pembe ve kırmızı tonlar hâkimdir (Crane, 1986). Meyve kabuğundaki pigment değişiklikleri olgunlaşma süreciyle birlikte belirginleşmektedir. Olgunlaşma sırasında klorofilin azalması ve

antosiyeninlerin artması, meyvenin renginin yeşilden sarıya, mora veya siyaha dönüşmesine neden olmaktadır (Chessa, 1997). İç renk genellikle genetik olarak belirlenirken, beyaz veya sarı renkten pembe ve kırmızı tonlara kadar değişebilmektedir. Renk, sadece estetik açıdan değil, aynı zamanda meyvenin şekeri birikimi, olgunlaşma seviyesi ve genel kalitesinin de bir göstergesidir (Bronstein, 1992; Crane, 1986; Ercişli vd., 2012).

1.2 İncirde Döllenme Biyolojisi

F. carica'nın döllenme biyolojisi, diğer meyve türlerinden oldukça farklı ve karmaşık bir sistemdir (Cook ve Rasplus, 2003; Stover vd., 2007).

Erkek ve dişi incirlerde her bir ürün dönemi içerisindeki meyve oluşum süreci, karşılıklı bir ilişki ve biyolojik uyum içerisindedir (Kjellberg vd., 1987; Stover vd., 2007). Bu uyum, sadece bitkinin jenerasyon döngüsünü devam ettirmekle kalmaz, aynı zamanda incir ile özel bir simbiyotik ilişki içinde olan ilek arıcığının (*Blastophaga psenes*) yaşam döngüsünü de desteklemektedir (Cook ve Rasplus, 2003; Kjellberg vd., 1987).

İncirde, erkek ve dişi bireyler yıl boyunca üç farklı ürün oluşturarak hem bitkinin yaşam döngüsünü hem de simbiyotik ilişkileri sürdüren özel bir biyolojik sistem sergilemektedir (Aytürk, 2019; Stover vd., 2007). Erkek incirler, yıl boyunca farklı dönemlerde “boğa meyvesi”, “ilek meyvesi” ve “ebe meyvesi” adı verilen ürünler üreterek İlek arıcığının yaşam döngüsünü desteklemektedir (Aytürk, 2019; Özen, 2007). Dişi incirler ise yıl içerisinde “breba” (ilkbahar ürünü), “ana ürün” (yaz ürünü) ve “geç ürün” (sonbahar ürünü) olmak üzere üç farklı dönemde meyve vermektedir (Aytürk, 2019; Stover vd., 2007).

Erkek incirlerde polen üreten erkek çiçekler ve böceğin yumurtalarını bırakabileceği dişi çiçekler bir arada bulunmaktadır. Bu çiçekler böceğin üremesi için ortam oluştururken erkek çiçekler polen kaynağı görevi görmektedir (Cook ve Rasplus, 2003; Stover vd., 2007).

Dişi incirlerde oluşan ilk ürünler (brebalar) genellikle partenokarpi yoluyla gelişirken, yaz dönemindeki ana ürünler döllenme ile oluşur ve ticari açıdan en değerli ürünlerdir (Flaishman vd., 2008; Stover vd., 2007).

Döllenme, meyve gelişimini teşvik eden süreçleri ve tohum/druplet dolgunluğunu artırarak hem ürün kalitesini yükseltir hem de ilek arıcığının yaşam döngüsü için gerekli ortamı sağlamaktadır (Marcotuli vd., 2020; Stover vd., 2007).

Buna rağmen, bazı incir çeşitlerinde döllenme olmadan da partenokarpi yoluyla meyve üretimi mümkündür ve bu özellik ticari yetiştiricilikte sıklıkla tercih edilmektedir (Flaishman vd., 2008; Stover vd., 2007).

İncirde döllenme, yalnızca incir ağaçlarıyla ilişkilendirilen ilek arıcığının erkek incir çiçeklerinden aldığı poleni dişi çiçeklere taşımasıyla gerçekleşmektedir (Cook ve Rasplus, 2003; Kjellberg vd., 1987). Bu süreçte erkek ve dişi incir çiçeklerinin olgunlaşma zamanlarının uyumlu olması, hem döllenmenin başarıyla gerçekleşmesi hem de ekolojik sürdürülebilirlik açısından kritik öneme sahiptir (Kjellberg vd., 1987; Stover vd., 2007).

Erkek incirlerin polen üretimi ve böceğin üremesi için sağladığı ortam, dişi incirlerin tohum oluşturmaları ve meyve kalitesinin artmasıyla birleşerek incir ağaçlarının ve ilek arısının karşılıklı bağımlılık içinde süregelen yaşam döngüsünü açıklamaktadır (Cook ve Rasplus, 2003; Stover vd., 2007).

Tarımsal uygulamalarda bu döllenme sürecinin dikkatle yönetilmesi, yüksek kaliteli ve verimli meyve üretimi için hayati bir önem taşımaktadır (Marcotuli vd., 2020; Stover vd., 2007).

Bitkilerde döllenme süreçleri, bitki sağlığı, üreme kapasitesi ve meyve kalitesi üzerinde doğrudan etkili olup, tarımsal verim ve ticari kazanç açısından kritik bir belirleyicidir. Tek eşeyli çiçekli türlerde büyüme, gelişme ve meyve oluşumu ile ilişkili pek çok metabolik yolak, bireyin cinsiyetine bağlı olarak farklı şekilde düzenlenmektedir. İncirde erkek ve dişi bireyler arasındaki bu fizyolojik ve gelişimsel farklılıkların, özellikle döllenme başarısı ve pazar değeri yüksek meyve üretimi bakımından belirleyici olması, cinsiyet oluşumunu kontrol eden moleküler mekanizmaların aydınlatılmasını önemli bir gereksinim hâline getirmiştir. Güncel genomik çalışmalar, incirde cinsiyet belirlenmesinin belirli lokuslara (özellikle RAN1 ve AGAMOUS-benzeri genler) haritalandığını ve bu süreçte birbirleriyle etkileşim hâlinde çalışan gen ve protein ağlarının rol aldığını ortaya koymaktadır. Transkripsiyon faktörleri bu ağların merkezinde yer almakta; hedef gen promotörlerindeki bağlanma bölgelerini tanıyarak ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive etmekte veya baskılamakta ve böylece cinsiyete özgü gelişim programlarının zaman ve dokuya özgü biçimde yürütülmesini sağlamaktadır (Mori vd., 2017; Wang vd., 2021; İkten vd., 2019; Zhang vd., 2022; Murase vd., 2017).

1.3 Bitkilerde Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), gen ekspresyonunun temel düzenleyicileri olarak belirli DNA dizilerine (operatör bölgelerine) bağlanarak transkripsiyonu kontrol eden proteinlerdir (Lambert vd., 2018; Vaquerizas vd., 2009). Genellikle bir DNA bağlanma bölgesi ile transkripsiyonu aktive eden veya baskılayan bir düzenleyici bölge içermektedir (Boija vd., 2018; Soto vd., 2022).

TF'ler, özgül DNA dizilerini tanımada homeodomain (HD), helix-turn-helix (HTH) ve high-mobility group box (HMG) gibi çeşitli DNA-bağlayıcı yapısal motifleri içeren DNA bağlanma bölgelerini (DBD) kullanırlar (Lambert vd., 2018; Mitsis vd., 2020). İşlevlerine göre aktivatör ya da baskılayıcı; yapılarına göre ise çinko parmak (zinc-finger), homeodomain, bHLH (basic Helix-Loop-Helix) ve bZIP (basic Leucine Zipper) gibi çeşitli protein aileleri altında sınıflandırılmaktadır (Vaquerizas vd., 2009; Weirauch vd., 2014; Khan vd., 2018).

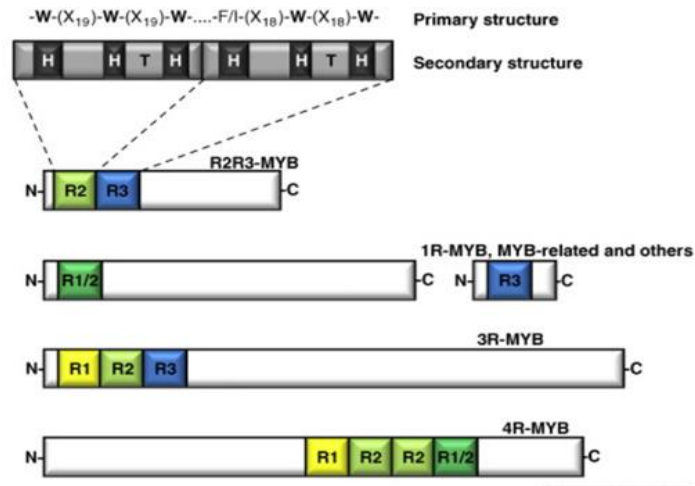
Transkripsiyon faktörleri, çok hücreli ökaryotların gelişiminde merkezi bir rol oynamakta ve embriyofitler (karasal bitkiler) ile metazoa (çok hücreli hayvanlar) gibi organizmalarda embriyonik gelişimin temel düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır (de Mendoza vd., 2013; Lambert vd., 2018).

Bitkisel transkripsiyon faktörlerinin sistematik olarak sınıflandırıldığı en kapsamlı kaynaklardan biri olan Plant Transcription Factor Database (PlantTFDB), 165 farklı bitki türünden elde edilen toplam 320.370 transkripsiyon faktörünü tanımlamıştır (Jin vd., 2017; Tian vd., 2020). Bu aileler arasında AP2/ERF, bHLH, WRKY, NAC, bZIP ve MYB gibi, bitki fizyolojisinde yaygın olarak incelenen gruplar yer almaktadır (Jin vd., 2017; Tian vd., 2020).

TF'ler; çevresel uyarılara yanıt vermek, gelişim süreçlerini koordine etmek ve savunma tepkilerini düzenlemek gibi yaşamsal işlevlerde önemli roller üstlenmektedir (Javed vd., 2020; Baillo vd., 2019). Bu proteinler, taşıdıkları DNA bağlanma motiflerinin yapısal özelliklerine göre farklı aileler altında sınıflandırılmakta ve toplamda 58 farklı aileye ayrılmaktadır (Şekil 1.1) (Jin vd., 2017; PlantTFDB v5 About).

Bitki biyoteknolojisi ve tarımsal verimlilik açısından büyük öneme sahip olan bu faktörlerin, genetik mühendislik teknikleriyle modifiye edilmesi; stres toleransı yüksek bitki türlerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Wei vd., 2022).

MYB protein ailesine ait transkripsiyon faktörleri (TF), içerdiği MYB tekrarlarının sayısına göre dört ana gruba ayrılır (Şekil 1.2): 2R-MYB (R2R3-MYB), 3R-MYB (R1R2R3-MYB), 4R-MYB (R1R2R2R1/2-MYB) ve MYB ilişkili (MYBR/1R-MYB) (Cao vd., 2020; Stracke vd., 2001). Her bir grup, kendine özgü işlevlere sahiptir (Dubos vd., 2010; Roy, 2016). Bu gruplar arasında, MYBR ve 2R-MYB proteinleri yüksek bitkilerde genellikle onlarca ya da yüzlerce üyeye sahip olup en geniş aileleri oluşturur; buna karşılık 3R-MYB ve 4R-MYB grupları oldukça küçüktür ve bazı türlerde yalnızca birkaç üyeye temsil edilir (Jiang ve Rao, 2020; Wu vd., 2022).



Şekil 1.2. Bitki MYB transkripsiyon faktörü sınıfları. Bitişik MYB tekrarlarının (R) sayısına bağlı olarak tanımlanan farklı MYB protein sınıfları gösterilmiştir. Tipik bir R2R3-MYB proteininde yer alan birincil yapı (amino asit dizisi) ve ikincil yapı (heliks-dönüş-heliks düzeni) şematik olarak sunulmuştur. H: heliks, T: dönüş (turn), W: triptofan, X: diğer amino asitler (Dubos vd., 2010)

İlk olarak mısırdaki keşfedilen ve antosiyanin biyosenteziyle ilişkilendirilen 2R-MYB grubu, zamanla birçok farklı bitki türünde tanımlanmış ve bitki genomlarında en geniş transkripsiyon faktörü gruplarından biri olarak kabul edilmiştir (Martin ve Paz-Ares, 1997; Paz-Ares vd., 1987). 2R-MYB proteinleri ayrıntılı olarak araştırılmış olsa da 4R-MYB genlerinin işlevleri hâlâ büyük ölçüde bilinmemektedir (Cao vd., 2020; Dubos vd., 2010).

MYB proteinleri arasında, R2R3-MYB transkripsiyon faktörleri bitkilerde en yaygın olanlardır. Bu proteinler, hedef DNA dizilerine bağlanmak üzere birlikte

işlev gören iki homolog bölgeden, R2 ve R3'ten oluşan bir DNA bağlanma bölgesine sahiptir (Dubos vd., 2010; Ogata vd., 1994).

MYB transkripsiyon faktörleri, promotör bölgelerdeki cis-regülatör elementlere bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler (Prouse ve Campbell, 2013; Roy, 2016). Özellikle AC-I/AC elementleri (ör. ACCTAC, ACCAAC) ve TCA elementlerine bağlandıkları gösterilmiştir (Prouse ve Campbell, 2013; Rahantamalala vd., 2010). Bu bağlanma, antosiyanin üretimi, lignin sentezi ve fotosentezle ilgili genlerin promotör bölgelerinde gerçekleşir ve bu sayede söz konusu metabolik süreçlerin kontrolünde önemli bir rol oynarlar (Cao vd., 2020; Legay vd., 2010). Ayrıca çoğu R2R3-MYB proteini, C-terminalinde yer alan transkripsiyonel aktivasyon/baskılama bölgeleri sayesinde hücre farklılaşması, ikincil metabolizma, hormon tepkileri ve biyotik ve abiyotik streslere karşı bitkinin yanıtlarını düzenlemede kritik işlevler üstlenir (Chen vd., 2022; Dubos vd., 2010).

MYB transkripsiyon faktörlerinin bu geniş ve çok katmanlı düzenleyici rolleri göz önüne alındığında, R2R3-MYB ailesi üyeleri arasında erkek gamet gelişimi ve cinsiyete özgü üreme programlarının düzenlenmesiyle doğrudan ilişkilendirilen en kritik üyelerden biri DUO1 (*Arabidopsis* MYB125 ortoloğu) olarak öne çıkmaktadır. DUO1, erkek gamet hattının oluşumunu başlatan ve erkek eşey hücrelerinin farklılaşmasını düzenleyen temel bir faktördür. Bu özelliğiyle, incirde cinsiyet oluşumunun genetik düzeyde anlaşılması açısından stratejik bir hedef olarak değerlendirilmektedir (Rotman vd., 2005; Brownfield vd., 2009; Borg vd., 2011; Higo vd., 2018).

1.4.1 DUO1 (MYB125) Transkripsiyon Faktörü

DUO1, çiçekli bitkilerde (özellikle *Arabidopsis thaliana*'da) erkek gamet hattına özgü bir R2R3-MYB transkripsiyon faktörüdür ve erkek gametogenezde kritik bir anahtar regülatör olarak tanımlanmıştır (Rotman vd., 2005; Brownfield vd., 2009). DUO1'in yapısal ve fonksiyonel özellikleri, onu erkek gamet gelişiminde merkezî bir belirleyici hâline getirmektedir. DUO1, tipik R2R3-MYB protein mimarisine sahiptir ve N-terminal bölgesinde DNA'ya bağlanmayı sağlayan iki MYB tekrarı (R2 ve R3) bulunur. Bu tekrarlar, heliks–turn–heliks yapısıyla klasik MYB DNA-bağlanma motiflerine bağlanarak DUO1'in hedef promotör bölgelerini tanımasına olanak tanır (Borg vd., 2011; Higo vd., 2018). Evrimsel analizler, DUO1'in atasal MYB proteinlerinden türediğini ve DNA-

bağlanma domeninde erkek gamet hattına özgü cis-regülatör elementleri tanımayı mümkün kılan özgün aminoasit değişimleri geçirdiğini göstermektedir. Bu neofonksiyonelleşme, erkek gamet gelişiminin evrimsel temellerine ışık tutmaktadır (Higo vd., 2018). DUO POLLEN1 (DUO1) transkripsiyon faktörü, çiçekli bitkilerde erkek eşey hattına özgü gen ekspresyonunun düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenmektedir (Brownfield vd., 2009; Zhang vd., 2025). Özellikle erkek gamet hücresi farklılaşmasını başlatan ve yönlendiren moleküler programların aktivasyonu, büyük ölçüde DUO1'in hedef genler üzerindeki düzenleyici etkisiyle gerçekleşmektedir (Borg vd., 2011; Brownfield vd., 2009; Higo vd., 2018).

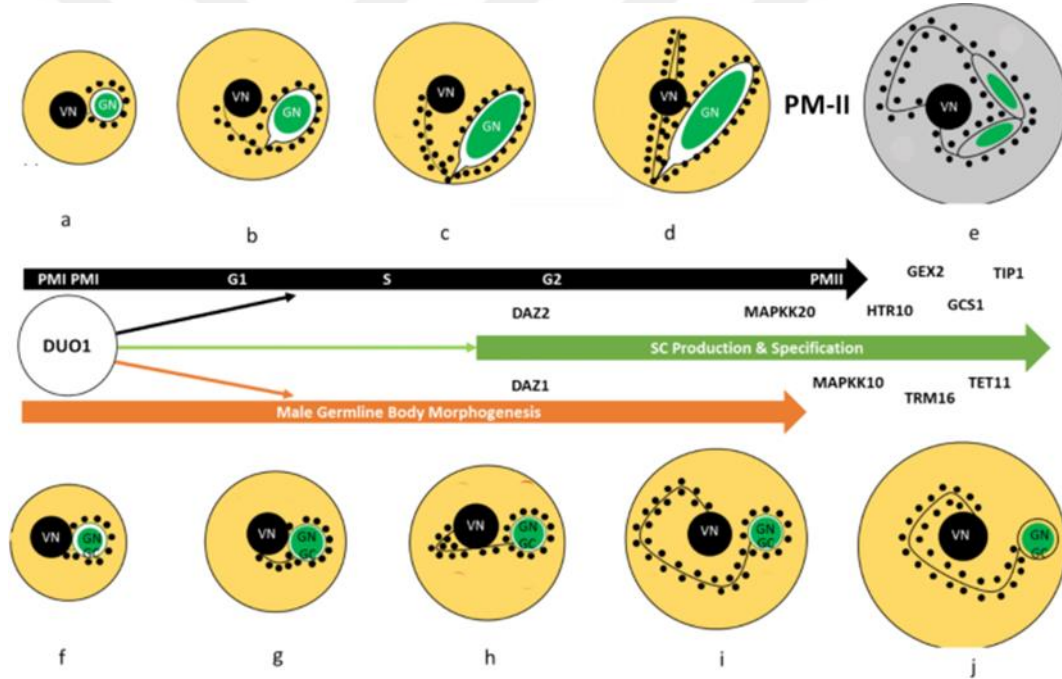
DUO1, gametik hücre kimliğinin kazanılmasını sağlarken aynı zamanda hücre döngüsünün ilerleyişini koordine ederek işlevsel erkek gamet hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Brownfield vd., 2009). Erkek erkek gametofitik hattında gözlemlenen genetik aktivitenin büyük ölçüde DUO1'in transkripsiyonel kontrolüne bağlı olduğu ortaya konmuştur (Peters vd., 2017).

DUO1'in C-terminal bölgesi daha az korunmuş olmakla birlikte transkripsiyonel aktivasyon için gerekli motifleri taşır ve erkek gamet hücresine özgü gen düzenleyici ağlarının kurulmasında işlev görür (Borg vd., 2011). DUO1 ekspresyonu mikrosporum asimetric bölünmesinin ardından oluşan generatif hücrede aktif hâle gelir; vejetatif hücre ve somatik dokularda belirgin ekspresyon göstermez (Rotman vd., 2005). Bu özellikleri, DUO1'in erkek gamet hattına özgü DNA-bağlanma ve gen aktivasyonu için özelleşmiş bir protein olduğunu göstermektedir.

DUO1, erkek üreme hattının kurulmasında çok yönlü ve entegre roller üstlenir. Mikrosporum asimetric bölünmesiyle oluşan generatif hücrede DUO1'in aktifleşmesi, erkek gamet hücresine özgü farklılaşma programının başlatılması için zorunludur. *duo1* mutantları, generatif hücrenin erkek gamet hücresine dönüştürülemediği ve erkek kısırlığa yol açan bir fenotip sergiler (Rotman vd., 2005; Brownfield vd., 2009). DUO1 ayrıca erkek gamet hücrelerinde ifade edilen çok sayıda hedef genin ekspresyonunu doğrudan düzenler; bu genlerin arasında fertilizasyon için gerekli olan GCS1/HAP2, GEX2, erkek gamet-spesifik histon varyantı H3.10 (HTR10) ve DUO1 tarafından aktive edilen çinko parmak transkripsiyon faktörleri DAZ1 ve DAZ2 yer alır (Borg vd., 2011; Higo vd., 2018). Bu hedef gen ağı, DUO1 düzenleyici grubu olarak tanımlanan, erkek üreme hattına özgü bir gen düzenleme sistemini oluşturmaktadır.

DUO1, hücre döngüsü kontrolünde de kritik bir rol oynar. Generatif hücrenin mitotik bölünmesi için gerekli olan G2/M döngü regülatörü CYCB1;1'in ekspresyonu DUO1 tarafından desteklenir. duo1 mutantlarında generatif hücrenin bölünememesi bu nedenle meydana gelir; ancak CYCB1;1'in ektopik ekspresyonu bu kusuru kısmen telafi edebilir. Bu durum, DUO1'in hem hücre döngüsü hem de hücrel farklılaşma üzerinde eşzamanlı bir kontrol yürüttüğünü göstermektedir (Brownfield vd., 2009; Borg vd., 2014).

DUO1, morfolojik süreçlerin düzenlenmesine de katkıda bulunur. DUO1 mutantlarında generatif hücrenin gövdesi uzamazken sitoplazmik projeksiyonun (CP) DUO1'den bağımsız yollarla oluşabilmesi, GC gövde uzaması ile CP oluşumunun genetik olarak ayrılmış mekanizmalarla yönetildiğine işaret etmektedir (Şekil 1.3; Rauf vd., 2023).



Şekil 1.3. *Arabidopsis thaliana*'da erkek gametofit gelişimi sırasında DUO1'in çoklu rollerini gösteren şematik diyagram.¹

¹ Polen mitozu II (PMII) öncesinde generatif hücre (GC), yuvarlak formdan yarı uzamış ve tam uzamış morfolojiye doğru ardışık bir şekillenme sürecinden geçer (a–d) ve vahşi tipte iki erkek gamet hücresine bölünerek tamamlanır (a–e). DUO1, GC morfogenezinin ve bölünmesinin ana düzenleyicisidir; DUO1 kaybında GC yuvarlak formda kalır ve bölünemez (f–j). Polen gelişimi boyunca DUO1 tarafından kontrol edilen özgül hedef genlerin ekspresyonu, DUO1'in erkek gamet programındaki merkezi düzenleyici işlevini yansıtır. Siyah noktalar, GC gövdesi ve sitoplazmik izdüşümü etrafında konumlanan lipit damlacıklarını temsil eder ve diferansiyel girişim kontrast (DIC) mikroskopisinde hücrel morfolojinin belirteci olarak kullanılır. Kısaltmalar: GC, generatif hücre; GN, generatif çekirdek; VN, vejetatif hücre (Rauf vd.,2025).

DUO1 erkek gametofitik hattının kurulmasında transkripsiyonel programı, hücre döngüsü ilerleyişini ve morfogenezi bütüncül biçimde düzenleyen merkezî bir regülatördür. Erkek gamet oluşumunun birçok kritik basamağını koordineli şekilde kontrol eden bu işlevsel bütünlük, DUO1'i çiçekli bitkilerde erkek üreme hattı biyolojisinin temel belirleyicilerinden biri hâline getirmektedir (Borg vd., 2011; Higo vd., 2018; Rauf vd., 2023).

1.5 DNA-Protein Etkileşimlerini İncelemeye Yönelik Moleküler Yöntemler: ChIP ve EMSA

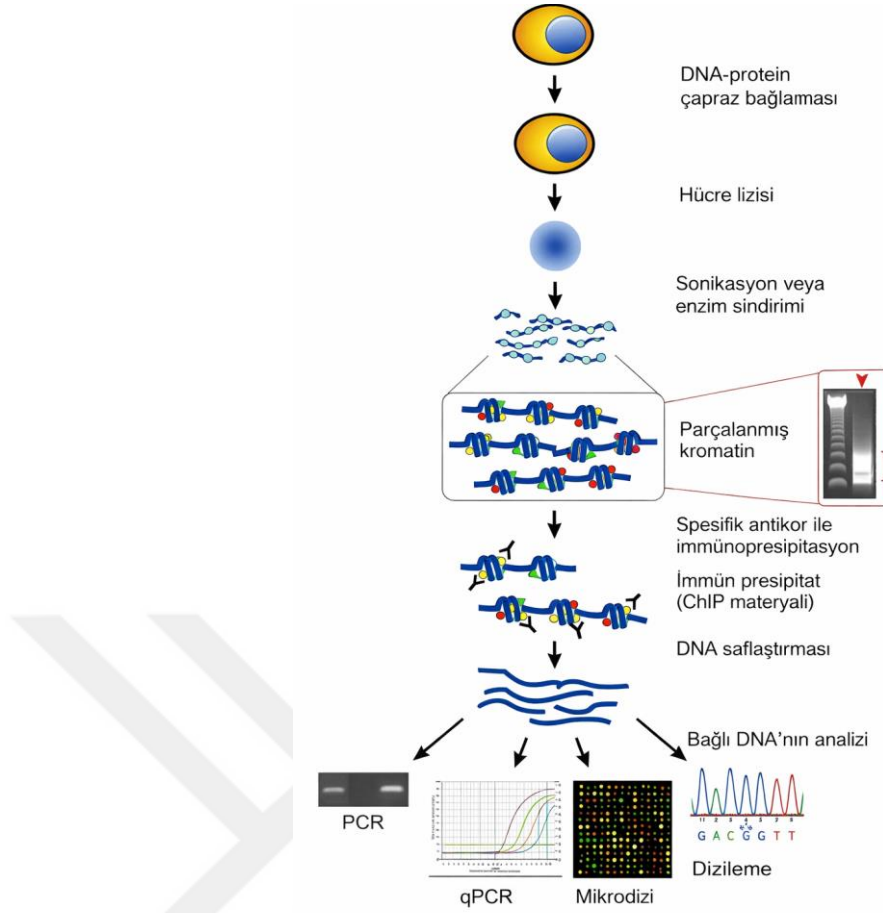
1.5.1 ChIP (Kromatin İmmünopresipitasyon Yöntemi)

ChIP, hem transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerini belirlemek hem de histon modifikasyonlarını incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan, DNA-protein etkileşimini ortaya koyan güçlü bir yöntemdir (Furey, 2012; Weinmann ve Farnham, 2002).

Yöntem (Şekil 1.4) , *in vivo* DNA-protein etkileşimlerinin formaldehit gibi ajanlarla kimyasal olarak çapraz bağlanmasıyla başlar; çapraz bağlama, hücre içindeki etkileşimleri kovalent olarak sabitler (Kuo ve Allis, 1999). Ardından hücreler parçalanır, kromatin elde edilir ve sonikasyon ya da enzimatik kesimle küçük fragmanlara ayrılır. İlgili duyulan proteine özgü antikorlarla kaplı manyetik boncuklarla immünopresipitasyon yapılarak yalnızca hedef proteine bağlı DNA fragmanları izole edilir; DNA saflaştırılır ve aşağı akış analizlerine hazırlanır (Jarillo vd., 2018; Nelson vd., 2006; Ricardi vd., 2010).

Çapraz bağlamaya dayalı X-ChIP'e ek olarak, özellikle histon işaretleri için native ChIP (NChIP) yaklaşımları da kullanılmaktadır (Thorne vd., 2004).

ChIP ürünlerini analiz etmenin temelde iki yolu vardır: Birincisi, immünopürifiye edilen DNA, belirli ilgi bölgelerine yönelik primerler kullanılarak kantitatif PCR (qPCR) aracılığıyla detaylı haritalama için şablon olarak kullanılabilir. İkincisi ise, immünopürifiye edilen materyal yüksek verimli analizlerde değerlendirilebilir. Bu yaklaşımda, model organizmanın genomunun tamamını ya da bir alt kümesini kapsayan DNA mikroyarray'lerine hibridizasyon yapılması (ChIP-on-chip) veya doğrudan DNA'nın dizilenmesi (ChIP-seq) gibi yöntemler kullanılmaktadır (Wiehle ve Breiling, 2016).



Şekil 1.4. ChIP yöntemi (Collas ve Dahl, 2008).

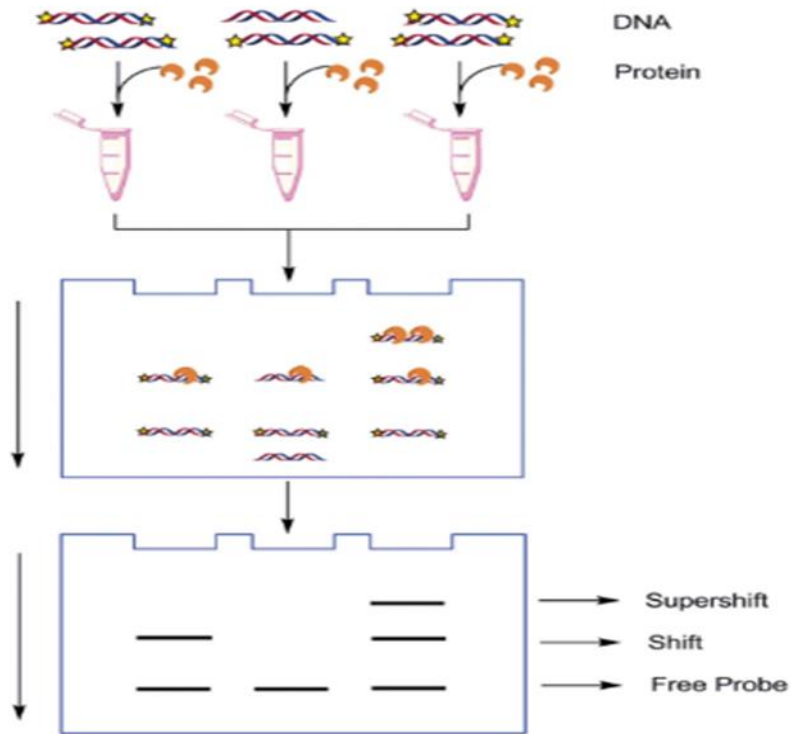
Özellikle ChIP'in yüksek verimli dizileme teknolojileriyle birleştirilmesiyle geliştirilen ChIP-seq yöntemi, transkripsiyonel düzenleyicilerin yanı sıra histon modifikasyonları ve histon varyantlarının epigenomik düzeyde, tüm genom çapında profillenmesine olanak sağlamıştır (Johnson vd., 2007; Muhammad vd., 2019).

Bu tez çalışmasında, klasik ChIP yöntemine dayalı olarak Avcı (2015) tarafından geliştirilen *in vitro* ChIP protokolünden yararlanılmıştır. Bu yöntem, hedef proteine özgü antikor kullanılmaksızın, rekombinant protein ile genomik DNA'nın *in vitro* koşullarda etkileşimini mümkün kılmaktadır. Yöntemin temelinde, rekombinant proteinin genomik DNA ile *in vitro* ortamda etkileşmesinin ardından formaldehitte çaprazlanması yer almaktadır. Çaprazlama işlemi takiben, hedef proteine özgü bir etiket aracılığıyla ilgili protein kompleks hâlinde çekilmekte ve bu sayede proteine bağlı DNA parçaları izole edilmektedir. İzolasyonun ardından DNA saflaştırılmakta ve ChIP-seq, ChIP-qPCR gibi ileri düzey analizlerde kullanılmak üzere hazır hâle getirilmektedir (Avcı, 2015).

1.5.2 EMSA (Elektroforetik Hareketlilik Kayması Testi)

EMSA, protein–nükleik asit etkileşimlerini analiz etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan hızlı ve hassas yöntemdir. Bu teknik, belirli bir DNA parçasının hedeflenen bir protein ile bağlanıp bağlanmadığını tespit etmek için geliştirilmiştir (Hellman ve Fried, 2007). EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) yöntemi, aynı zamanda “gel shift”, “gel retardation”, “mobility assay” veya “elektro hareket kayma analizi” olarak da adlandırılmaktadır (Avcı, 2015).

Analiz süreci, hedef proteinin nükleik asit çözeltisi ile uygun koşullar altında bir araya getirilmesiyle başlar. Elde edilen karışım, genellikle poliakrilamid veya agaroz jellerde doğal (denatüre etmeyen) koşullarda elektroforeze tabi tutulur. Bu aşamada, protein ile etkileşime giren DNA molekülleri, serbest DNA’ya kıyasla daha yavaş hareket eder. Bunun sonucunda DNA–protein kompleksi, elektroforez jelinde serbest DNA bandına göre daha az mesafe kat eder ve bu durum “kayma” (shift) olarak adlandırılır (Şekil 1.5; Fried, 1989; Garner ve Revzin, 1981; Gaudreault, 2009; Hellman ve Fried, 2007; Lane, 1992).



Şekil 1.5. EMSA yönteminin genel prensibi (Song vd., 2015).

Klasik EMSA protokolünde, protein ve nükleik asit çözeltileri uygun bir bağlanma tamponu içerisinde belirli bir süre inkübe edilir. Daha sonra karışım

elektroforez işlemine alınır ve jel, özel boyalar yardımıyla analiz edilir. Bu yöntem, hem radyoaktif hem de radyoaktif olmayan işaretleme prosedürleriyle uygulanabilmektedir (Berger ve Kimmel, 1987; Solomon ve Varshavsky, 1985). Marker olarak genellikle serbest (proteinsiz) DNA kullanılır. Protein bağlanması sonucu oluşan DNA–protein komplekslerinin serbest DNA’dan daha yavaş hareket etmesi, jel üzerinde daha yukarıda konumlanan bantlar şeklinde gözlemlenir (Avcı, 2015). Elde edilen bu kayma profilleri, DNA ile protein arasındaki etkileşimlerin varlığını ve gücünü hem kalitatif hem de kantitatif olarak analiz etme olanağı sunar (Ausubel vd., 1994; Avcı, 2015; Fried ve Crothers, 1981; Fried ve Liu, 1994).

1.6 Tezin Amacı, Önemi ve Özgün Katkısı

Bu tez çalışmasının amacı, incir bitkisinde cinsiyet oluşumu ve gelişimine etki eden moleküler mekanizmaları, DNA–protein etkileşimleri ve gen düzeyindeki düzenleyici süreçler bağlamında aydınlatmaktır. Bu kapsamda, bitkisel gelişimin farklı evrelerinde görev alan ve çok sayıda fenotipin kontrolünde rol oynayan MYB protein ailesine ait DUO1 (MYB125) transkripsiyon faktörünün genom üzerindeki doğrudan hedef genlerinin belirlenmesi ve bu hedeflerin cinsiyet oluşumu/belirlenmesindeki olası işlevlerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, MYB125’in DNA’ya bağlandığı bölgeler *in vitro* ChIP-seq yöntemi ile tanımlanmış; elde edilen bulguların doğruluğu, seçilmiş aday bölgelerde EMSA ile deneysel olarak doğrulanmıştır.

Tezin önemi, incir gibi ekonomik değeri yüksek ve dioik yapısı nedeniyle ıslah programlarında stratejik öneme sahip bir türde cinsiyet oluşumunu yönlendiren düzenleyici ağların moleküler düzeyde sınırlı ölçüde aydınlatılmış olmasına karşın, bu çalışmanın transkripsiyonel kontrol katmanına doğrudan odaklanmasından kaynaklanmaktadır. Erkek gamet gelişiminde merkezî düzenleyici olduğu gösterilmiş DUO1/MYB125 faktörünün farklı bitki türlerinde tanımlanan rolleri dikkate alındığında (Brownfield vd., 2009; Borg vd., 2011; Higo vd., 2018), incirde DUO1 odaklı bağlanma olaylarının ve hedef gen repertuarının ortaya konması, cinsiyet oluşumunun transkripsiyonel temeline ilişkin kritik bir bilgi boşluğunu doldurmaktadır.

Tezin özgün katkısı; incirde DUO1 ortoloğunun ilk kez tanımlanması, DUO1’in DNA–protein etkileşimlerinin deneysel olarak doğrulanması ve DUO1’in genom çapındaki doğrudan bağlanma bölgeleri ile hedef gen setlerinin sistematik

biçimde belirlenerek kapsamlı bir bağlanma haritasının oluşturulmasıdır. *In vitro* ChIP-seq ve EMSA gibi yüksek duyarlılıklı yaklaşımların birlikte kullanılması, elde edilen bulguların güvenilirliğini artırmış; böylece incirde cinsiyet oluşumu bağlamında belirli bir transkripsiyon faktörü (DUO1/MYB125) için genom ölçeğinde ilk kapsamlı bağlanma profili üretilmiştir. Bu yönüyle çalışma, hem temel bilimsel bilgi üretimine hem de cinsiyetle ilişkili süreçlerin anlaşılmasına dayalı uygulamalı tarımsal biyoteknoloji yaklaşımlarına altyapı sağlayan özgün, öncü ve metodolojik açıdan yenilikçi bir nitelik taşımaktadır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Bitkisel Materyal

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak, İncir Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü genetik kaynak koleksiyonu içerisinde yer alan ‘Sarılöp’ ve ‘Sarı Zeybek’ (dişi incir çeşitleri) ile ‘Kaba İlek’ ve ‘Hamza İlek’ (erkek/ilek incir çeşitleri) çeşitlerine ait, çelikle çoğaltılmış bir yaşındaki fidanların yaprak dokuları kullanılmıştır. Bu çeşitlerin seçimi, incirin dioik üreme biyolojisi nedeniyle cinsiyetin vejetatif dönemde morfolojik olarak güvenilir biçimde ayırt edilememesi ve cinsiyete bağlı moleküler süreçlerin karşılaştırmalı olarak incelenebilmesi gerekliliğine dayanmaktadır. Dişi ve erkek bireylerin aynı deneysel tasarımda yer alması, cinsiyete bağlı düzenleyici süreçlerin ve aday genlerin cinsiyetler arası karşılaştırmalı değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca, materyalin genetik kaynak koleksiyonundan seçilmesi genotip kimliğinin doğrulanabilirliğini ve örneklerin izlenebilirliğini güvence altına almış; çelikle çoğaltılmış aynı yaş grubundaki fidanların kullanılması ise biyolojik varyasyonu azaltarak analizlerde örnekler arası karşılaştırılabilirliği artırmıştır. İlgili fidanlardan temin edilen yaprak örnekleri, DNA izolasyonlarında biyolojik materyal kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.1.1.1 Bitkisel Materyalin Genel Özellikleri

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan Sarılöp incir çeşidi (Şekil 2.1) , ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve ticari öneme sahip kurutmalık bir çeşittir. Sarılöp, özellikle Ege Bölgesi başta olmak üzere sıcak iklim koşullarına sahip alanlarda başarıyla yetiştirilebilmektedir. Bu çeşit, döllemeye ihtiyaç duyan bir yapıya sahiptir. Olgunlaşma dönemi, genellikle 25 Temmuz – 25 Eylül tarihleri arasına denk gelmektedir. Ağaçları orta kuvvette gelişme gösterir, yayvan taç yapısına ve açık yeşil renkli yapraklara sahiptir. Yapraklar genellikle 3–5 lopludur.



Şekil 2.1. Sarılop incir meyvesi

Sarılop çeşidinin meyvesi uzun oval formda olup (Şekil 2.1), ortalama meyve ağırlığı 65–70 g, kuru meyve ağırlığı 17–18 g, ortalama meyve hacmi ise 64–70 cm³ arasındadır. Meyve indeksi 0,85'tir. Meyve boyun uzunluğu 2–3 mm, ağız açıklığı (ostiol) 6,03–6,09 mm, tabla kalınlığı ise 1,17–1,34 mm arasında değişmektedir. Meyve iç boşluğu bulunmamaktadır. Meyve kabuk rengi sarı, iç rengi ise açık pembedir. Kurutulmuş meyvenin rengi koyu krem tonlarındadır. Meyve kabuğu kolay soyulabilir özelliktedir. Hasat sırasında, meyve sapı dal üzerinde kalmaktadır. Çekirdeklilik durumu orta düzeydedir. Meyveler oldukça tatlı ve hoş kokuludur. Kimyasal özellikler açısından, titre edilebilir asitlik değeri %0,134–0,138 aralığında ölçülmüş; suda çözünür kuru madde (TSEM) oranı %20–27, kuru meyvede ise bu oran %62–65 arasında değişmektedir. Sarılop çeşidi, kurutmaya elverişli yapısı, üstün lezzet özellikleri ve ticari değeri nedeniyle incir üretiminde stratejik öneme sahiptir (Ayar, 2020).



Şekil 2.2. Sarı Zeybek incir meyvesi

Sarı Zeybek incir çeşidi, Sarılop ile benzer şekilde kurutmalık olarak değerlendirilen bir çeşittir (Şekil 2.2). Meyve kalite özellikleri ve morfolojik parametreler bakımından Sarılop'a yüksek düzeyde benzerlik göstermektedir. Sarı Zeybek Yellop çeşidinin meyvesi bulunmamaktadır. Bu çeşidin dölleme isteği vardır. Olgunlaşma dönemi 25 Temmuz ile 10 Eylül tarihleri arasındadır. Taze meyve ağırlığı ortalama 60-65 gramdır. Kuru meyve ağırlığı ise 20-22 gram arasında değişmektedir. Meyve şekli küreseldir. Meyve boyun uzunluğu ya bulunmaz ya da çok kısadır. Ostiol (ağız açıklığı) 4,3 mm'dir. Meyve iç boşluğu yoktur veya oldukça küçüktür. Kabuk rengi sarı-yeşildir; üst kabuk rengi sarı, iç rengi ise turuncu-kırmızıdır. Kuru meyve rengi beyaza yakın sarıdır. Meyve kabuğu kolayca soyulabilir. Çekirdeklilik durumu orta düzeydedir. Meyve tatlıdır. Suda çözünabilir kuru madde oranı %50-55 arasında, toplam şeker oranı ise %64'tür (Ayar, 2020).



Şekil 2.3. Kaba İlek incir meyvesi

Kaba ilek incir meyvesi (Şekil 2.3), 17-24 Mart tarihleri arasında oluşmakta, bu meyveler 30 Mayıs ile 11 Haziran arasında olgunlaşmaktadır. Ebe meyvesi doğuşu 30 Mayıs - 5 Haziran tarihleri arasında gerçekleşmektedir. Boğa meyvesinin olgunlaşma dönemi ise 3-24 Nisan olarak belirlenmiştir. Ortalama meyve ağırlığı 42,1 gramdır. Meyve eni 49,1 mm, boyu ise 59,7 mm ölçülmüştür. Bu değerlere göre meyve indeksi 0,8 olarak hesaplanmıştır. Polen çimlenme gücü oldukça yüksek olup %91 seviyesindedir. İlek Arıcığı (*Blastophaga psenes* L.) sayısı 451 adet olarak tespit edilmiş ve bu arıcıkların çıkış süresi ortalama 3 gün olarak kaydedilmiştir. Ostiol genişliği 2,4 mm'dir. Bir sürgünde ortalama 5,7 adet meyve bulunmakta, erkek çiçek sayısı 179 ve gal çiçek sayısı 1193 olarak ölçülmektedir. Erkek çiçeklerin gal çiçeklere oranı %15'tir. Hasat süresi 10 gün olup, Kaba İlek çeşidi erkenci karakter göstermektedir (Ayar, 2020).



Şekil 2.4. Hamza ilek (Caprifig) incir meyvesi

Hamza ilek (Şekil 2.4) incir çeşidinde ise yapraklanma 9-14 Mart tarihleri arasında gerçekleşmektedir. İlek meyvesi 6-10 Mart tarihleri arasında oluşmakta, ileklerin olgunlaşması ise 12-19 Haziran döneminde tamamlanmaktadır. Ebe meyvesi doğuşu 8-15 Haziran tarihleri arasında gözlemlenirken, boğa meyvesinin olgunlaşma dönemi 9-21 Nisan olarak belirlenmiştir. Ortalama meyve ağırlığı 24,6 gramdır. Meyve eni 40,9 mm, boyu 53,3 mm olup bu değerlere göre meyve indeksi 0,8 olarak hesaplanmıştır. Polen çimlenme gücü %92 gibi yüksek bir değere sahiptir. Sarıca miktarı 0,83 adet olarak belirlenmiştir. Arıcık (*Blastophaga psenes* L.) sayısı 309 adet olup arıcık çıkış süresi ortalama 3 gün olarak tespit edilmiştir. Ostiol genişliği 3,5 mm'dir. Bir sürgünde ortalama 6 adet meyve bulunmakta, erkek çiçek sayısı 158 ve gal çiçek sayısı 921 olarak belirlenmiştir. Erkek çiçeklerin gal çiçeklere oranı %17 olup, hasat süresi 9 gün olarak kaydedilmiştir (Ayar, 2020).

2.1.2 Kimyasal Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasal reaktifler ve çözeltiler Ek 1 ve Ek 2'de sunulmuştur.

2.2 Yöntem

2.2.1 MYB125 Genine Ait Homolog Protein Dizilerinin Tanımlanması

Arabidopsis thaliana'da DUO1 transkripsiyon faktörünü kodlayan MYB125 genine ait referans protein dizisi, UniProtKB/Swiss-Prot veritabanından (erişim numarası: A0A178VEK7.1) FASTA formatında temin edilmiştir. Yüksek doğruluklu bu DUO1 protein dizisi, *F. carica* genomunda yer alan protein dizileri üzerinde homoloji temelli benzerlik taramalarında sorgu dizisi olarak kullanılmıştır.

Benzerlik analizleri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) tarafından sunulan BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool for Proteins) çevrim içi aracı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada varsayılan BLASTp parametreleri korunmuş, anlamlı hizalamaların güvenilir biçimde tespit edilebilmesi amacıyla E-değeri $\leq 1e-5$ eşik değeri olarak belirlenmiştir.

Elde edilen hizalamalar; kimlik oranı, hizalama skoru, hizalama uzunluğu ve E-değeri gibi biyoinformatik ölçütler temel alınarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, yüksek benzerlik gösteren diziler *F. carica* genomunda MYB125 homolog adayları olarak sınıflandırılmış; bu adaylar arasından seçilen dizi çalışmada *F. carica* DUO1 (*FcMYB125*) olarak adlandırılmıştır.

Aday DUO1 proteinlerinin belirlenmesinin ardından MEGA 11 yazılımı kullanılarak çoklu dizi hizalaması ve filogenetik ağaç analizleri gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalı analizlerde *A. thaliana* ve *Cucurbita argyrosperma* türlerine ait DUO1 proteinleri referans olarak kullanılırken, *A. thaliana*'ya ait MYB105 proteini negatif kontrol olarak dâhil edilmiştir.

A. thaliana DUO1 proteininin referans olarak seçilmesinin temel nedeni, DUO1 (MYB125) transkripsiyon faktörünün erkek gamet soyuna özgü işlevinin bu türde genetik, moleküler ve fonksiyonel düzeyde ayrıntılı biçimde tanımlanmış olmasıdır (Rotman vd., 2005; Borg vd., 2011). Bu kapsamlı bilgi birikimi, aday DUO1 proteinlerinde doğru ortolog–paralog ayrımının yapılabilmesi için güvenilir bir filogenetik referans noktası sağlamaktadır.

Cucurbita argyrosperma'ya ait DUO1 proteininin analizlere dâhil edilmesi ise evrimsel olarak daha uzak, ancak işlevsel açıdan korunmuş bir erkek gamet

düzenleyicisinin karşılaştırmalı değerlendirmeye katılmasını amaçlamaktadır. Bu yaklaşım, DUO1'in yalnızca *Brassicaceae* familyasına özgü bir faktör olmadığını, erkek gamet gelişimindeki düzenleyici rolünün angiospermiler genelinde korunmuş olabileceğini test etmeye olanak tanımaktadır. Buna karşılık, R2R3-MYB ailesinin bir üyesi olan *A. thaliana* MYB105 proteini, erkek gamet gelişimiyle ilişkilendirilmiş bir fonksiyona sahip olmaması nedeniyle negatif kontrol olarak seçilmiştir. MYB105'in DUO1 kladının dışında konumlanması, oluşturulan filogenetik ağacın ayırt ediciliğini ve özgüllüğünü destekleyen bir iç kontrol niteliği taşımaktadır.

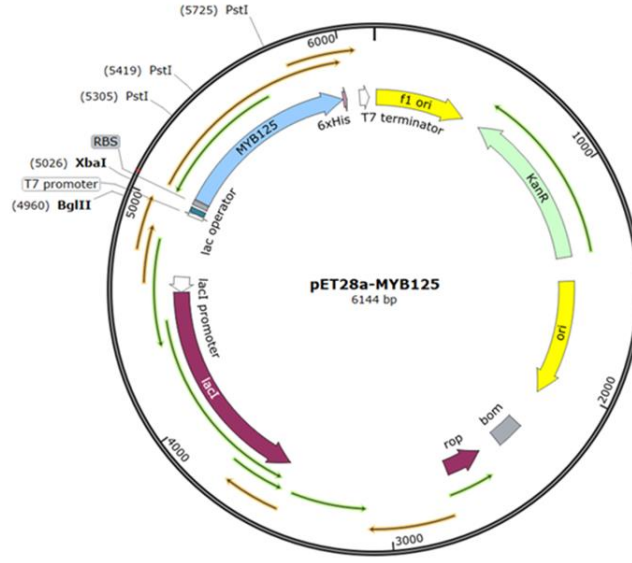
Bu çalışmada kapsamında oluşturulan referans ve kontrol seti; aday DUO1 proteinlerinin ortologluk ilişkilerinin doğru biçimde belirlenmesini, erkek gamet soyuna özgü evrimsel bağlamın ortaya konmasını ve MYB ailesi içindeki fonksiyonel ayrışmanın literatürle uyumlu ve metodolojik açıdan tutarlı şekilde değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır.

2.2.2 Gen Sentezi, Vektör Tasarımı ve Klonlama

Çalışmada kullanılacak *FcMYB125* genine ait kodlayıcı dizi, SUGENOMICS Biotechnology tarafından kodon optimizasyonu uygulanarak sentezlenmiş, pET-28a(+) vektör omurgasına okuma çerçevesi korunacak biçimde (in-frame) klonlanmış ve rekombinant plazmid (pET-28a(+)-FcMYB125) hazır formda tarafımıza teslim edilmiştir. Konstrüksiyonda vektörün standart mimarisindeki N-uç 6×His etiketi kullanılmamış; FcMYB125 ORF, C-uç 6×His etiketiyle kesintisiz füzyon hâlinde konumlandırılmıştır (Şekil 2.5).

His etiketinin C-uçta konumlandırılmasına dayalı bu tasarımın gerekçesi, hedef konakçı *Escherichia coli* için gerçekleştirilen kodon optimizasyonu ve FcMYB125 transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanma bölgesinin N-uçta yer almasıdır. Böylece, ilerleyen ChIP ve EMSA gibi DNA–protein etkileşimine dayalı

deneylerde 6×His etiketinin bağlanma aktivitesi üzerindeki olası olumsuz etkilerin en aza indirilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 2.5. pET-28a(+)-FcMYB125 klonlama stratejisi ve vektör haritası.

2.2.3 Transformasyon

2.2.3.1 *Escherichia coli* Hücrelerinde Kalsiyum Klorür Tabanlı Kompetent Hücre Hazırlama Yöntemi

Transformasyon deneylerinde kullanılacak kompetent hücrelerin hazırlanmasına geçmeden önce, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gliserol içinde saklanan *E. coli* stokları, antibiyotik içermeyen (selektif olmayan) LB agar üzerine çizgi ekimi yapılarak reaktifte edilmiştir. Plaklar $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 12–16 saat inkübe edilmiş; steril koşullarda, morfolojik olarak tipik ve kontaminasyon belirtisi taşımayan izole tek bir koloni seçilmiştir.

Kompetent hücre hazırlığında, Sambrook vd. (1989) tarafından tanımlanan kalsiyum klorür temelli klasik protokol izlenmiştir. Seçilen koloni 5 mL LB broth içine inoküle edilerek $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 rpm'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün bu kültürden 500 μL alınarak 50 mL taze LB broth'a aktarılmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin optik yoğunluğu $\text{OD}_{600} = 0.4\text{--}0.6$ aralığına ulaşıncaya kadar izlenmiştir (yaklaşık 2–3 saat).

Kültür buz banyosuna alınarak hızla $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulmuştur. Ardından $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş; süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre peleti buz üzerinde tutulmuştur.

İlk yıkama: Pelet, 10 mL soğuk (4 °C) 100 mM CaCl₂ + 10 mM MgCl₂ ile yeniden süspanse edilmiştir. Tüpler buz banyosunda 10–15 dakika bekletildikten sonra 4 °C’de 5000 rpm’de 5–10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

İkinci yıkama: Pelet 5 mL soğuk 100 mM CaCl₂ içinde süspanse edilerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. Takiben 4 °C’de 4000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son olarak pelet 2 mL soğuk 100 mM CaCl₂ ile süspanse edilerek 10 dakika buzda bekletilmiştir. Saklama koşulları;

- Kısa süreli: Hücreler 100 mM CaCl₂ içinde 4 °C’de birkaç gün saklanmıştır.
- Uzun süreli: Pelet, %10 gliserol içeren 100 mM CaCl₂ içinde süspanse edilerek 50–100 µL alikvotlar hâlinde tüplere bölünmüş ve –80 °C’de saklanmıştır

2.2.3.2 Isı Şoku Yöntemi ile *Escherichia coli* Hücrelerinin Transformasyonu

Kimyasal yöntemle kompetent hâle getirilen *E. coli* BL21 (DE3) ve SIG10 suşlarına, plazmid DNA alımını sağlamak üzere ısı şoku temelli bir protokol uygulanmıştır. Bu işlemde, Inoue vd. tarafından geliştirilen SEM (Simple and Efficient Method) protokolü esas alınmıştır (Inoue vd., 1990).

Transformasyon kapsamında, her bir tüpte bulunan 100 µL kompetent *E. coli* hücresi buz banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir. Ardından her tüpe 10 ng plazmid DNA eklenmiş ve tüpler yeniden buzda 15 dk bekletilmiştir. Bunu takiben tüpler 42 °C’deki ısı bloğunda (thermomixer) 2 dk ısı şokuna tabi tutulmuş, hemen ardından buz banyosuna alınarak 2 dk soğutulmuştur.

Soğutma sonrasında, her tüpe 890 µL önceden 37 °C’ye dengelenmiş LB broth eklenmiş ve hücre süspanسیونları 37 °C, 300 rpm’de 1 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Bu adım, ısı şoku sonrası toparlanma ve plazmidde yer alan antibiyotik direnç geninin ekspresyonu için gereklidir.

Plaklama ve seçim: İnkübasyonun sonunda, her tüpten 100 µL transformasyon süspanسیونu 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar plaklarına, Bunzen beki yanında aseptik koşullarda yayma ekim (spread plating) yöntemiyle inoküle edilmiştir. Steril tek kullanımlık yayma çubuğu ile süspanسیون plaka yüzeyine homojen dağıtılmış; sıvı agar yüzeyine adsorbe olduktan sonra plakalar ters çevrilerek 37 °C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen kanamisin dirençli koloniler transformant olarak değerlendirilmiştir.

2.2.4 Klon tarama; Transformasyon Sonrası Klon Seçimi ve PCR ile Doğrulama

Transformasyonun ardından 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar üzerinde gelişen koloniler arasından rastgele izole koloniler seçilmiştir. Her koloni, steril pipet ucu (veya alevle sterilize edilmiş kürdan) ile ikiye bölünerek eşzamanlı olarak koloni PCR ile doğrulama ve ileride kullanım için stoklama amacıyla değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, seçilen kolonilerin bir kısmı antibiyotikli katı LB agar besiyerine yeniden ekilerek inkübasyona bırakılmış; diğer kısmı doğrudan PCR tüplerine aktarılmıştır.

Koloni PCR: Hücresel lizis için alınan koloni materyali steril su içeren tüplere aktarılmış ve 95 °C’de 10 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen lizat şablon DNA olarak kullanılmış; amplifikasyon TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (Takara Bio) üretici protokolüne göre, T7 promotör (F) ve T7 terminatör (R) primerleri ile yürütülmüştür.

- T7 promotör (F): 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
- T7 terminatör (R): 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Termal döngü koşulları:

- Başlangıç denatürasyonu: 94 °C, 5 dk
- 34 döngü:
 - Denatürasyon: 94 °C, 1 dk
 - Bağlanma: 55 °C, 30 sn
 - Uzama: 72 °C, 1 dk
- Son uzama: 72 °C, 5 dk

PCR ürünleri %1 agaroz jelde elektroforez ile ayrılmış ve RedSafe ile boyanarak UV/mavi ışık altında görselleştirilmiştir. Beklenen boyda hedef banda sahip koloniler pozitif transformant olarak kabul edilmiş; bu kolonilerin önceden katı besiyerine ekilmiş kopyaları sonraki analizler için saklanmıştır.

2.2.5 pET-28a(+)-FcMYB125 Rekombinant Proteininin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

2.2.5.1 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu

Koloni PCR ile doğrulanan pozitif klonlar, rekombinant protein ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla farklı besiyeri ve indüksiyon koşulları

altında test edilmiştir. Bu amaçla seçilen koloniler, LB ve 2×YT sıvı besiyerlerine inoküle edilerek gece kültürleri hazırlanmıştır. Ertesi gün ön kültürlerden 1:100 oranında aktarım yapılarak taze besiyerlerinde çalkalamalı koşullarda 37 °C’de büyütülmüş; hücre gelişimi $OD_{600} \approx 0.7$ düzeyine ulaşınca indüksiyon başlatılmıştır.

İndüksiyon için ortama 0.1 mM IPTG (*izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid*) ilave edilmiştir. Çözünür protein üretimini optimize etmek amacıyla farklı besi yerleri (LB vs. 2×YT) ile sıcaklık/süre kombinasyonları sistematik olarak denenmiştir. İndüksiyon sonrasında önceden belirlenmiş zaman noktalarında alınan örnekler, hücre peleti ile çözünür/çözünmeyen fraksiyonlara ayrılarak % 12’ lik SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) üzerinde karşılaştırılmış; en yüksek çözünür bant yoğunluğu ve minimum inklüzyon cisimi oluşumu sağlayan koşullar optimal kabul edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar, ölçek büyütme ve izleyen saflaştırma basamaklarında kullanılmıştır.

2.2.5.2 Protein Ekspresyonu

Pozitif klonlar, daha önce belirlenen optimum ekspresyon koşullarına göre büyük ölçekli kültürlerde ekspresyona tabi tutulmuştur. Bu kapsamda, uygun hacimde hazırlanan ön kültürler, 1:100 oranında taze 2×YT sıvı besiyerine aktarılmış ve kültürler 37 °C’de çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu $OD_{600} \approx 0.7$ seviyesine ulaştığında ortama son konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde IPTG (*izopropil-β-D-tiogalaktopiranozit*) ilave edilerek indüksiyon başlatılmıştır. Ekspresyon, çözünür protein üretimini maksimize etmek amacıyla 24 °C’de, çalkalamalı koşullarda 16 saat süreyle sürdürülmüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 4 °C’de, $7000 \times g$ ’de 15 dakika santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri, fosfat tamponu içeren lizis tamponu (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, pH 7.4) ile süspanse edilmiştir. Hücreler ultrasonik homojenizatör (sonikatör) yardımıyla parçalanmış ve lizat 4 °C’de, $15.000 \times g$ ’de 30 dakika santrifüjlenerek çözünmeyen fraksiyonlardan ayrılmıştır. Üst fazda kalan süpernatant, çözünür rekombinant protein fraksiyonlarını içermektedir.

2.2.5.3 Protein Saflaştırması

Çözünür fraksiyonda bulunan His etiketli rekombinant protein, doğal (native) koşullar altında ve batch saflaştırma yöntemi kullanılarak, HisPur™ Ni-NTA reçinesi (Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 88221) aracılığıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi, üretici firma tarafından sağlanan *HisPur™ Ni-NTA Resin User Guide* protokolü temel alınarak gerçekleştirilmiştir. İşleme ilişkin adımlar aşağıda detaylı şekilde özetlenmiştir:

- Ni-NTA reçinesi, kullanım öncesinde iki reçine hacmi kadar dengeleme tamponu [20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol (pH 7,4)] ile yıkanarak denge durumuna getirilmiştir.
- Protein içeren süpernatant, eşit hacimde hazırlanmış dengeleme tamponu ile birleştirilerek homojen bir karışım elde edilmiş; bu karışım, 4 °C sıcaklıkta, end-over-end rotatörde 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından karışım santrifüjlenmiş; bağlanmayan fraksiyon uzaklaştırılarak yalnızca reçineye özgül olarak bağlanan proteinler elde tutulmuştur.
- Reçine, 25 mM imidazol içeren yıkama tamponu (Ek 2) ile iki kez yıkanarak, özgül olmayan (nonspesifik) proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Ardından, bağlı durumda bulunan His etiketli rekombinant protein, 250 mM imidazol içeren elüsyon tamponu (Ek 2) kullanılarak elüe edilmiştir.

Saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlar, SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu analiz ile, hedef proteinin moleküler ağırlığına karşılık gelen özgül bantların varlığı doğrulanarak saflaştırmanın etkinliği değerlendirilmiştir.

2.2.5.4 Tampon Değişimi (Diyaliz)

Saflaştırılmış protein fraksiyonları, ilerleyen CHIP bağlama analizlerinde kullanılmak üzere CHIP bağlama tamponuna (Ek 2) aktarılmıştır. Bu işlem için, imidazol içeren elüsyon tamponu, diyaliz yöntemi kullanılarak CHIP bağlama tamponu ile değiştirilmiştir.

Diyaliz, 4 °C sıcaklıkta ve 10.000 kDa moleküler ağırlık kesim değerine (MWCO) sahip selüloz esaslı diyaliz membranları (Sigma-Aldrich) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tampon değişimi sırasında diyaliz ortamı en az üç kez taze tampon ile yenilenmiş, böylece imidazol etkin şekilde uzaklaştırılmıştır. Uygulanan

bu işlem sonucunda, protein örnekleri takip eden uygulamalara (*downstream* analizlere) uygun koşullara başarıyla adapte edilmiştir.

2.2.5.5 Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein örneklerinin toplam miktarı, bicinchoninic asit (BCA) yöntemi kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir. Analiz, Thermo Scientific™ tarafından sağlanan *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*'in üretici protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Ölçümler öncesinde, bilinen konsantrasyonlara sahip albümin standartları kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Örneklerin absorbans değerleri, bu standart eğri doğrultusunda değerlendirilmiş ve protein konsantrasyonları hesaplanmıştır. Tüm absorbans ölçümleri, uygun dalga boyunda (562 nm) gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 Genomik DNA İzolasyonu

In vitro ChIP analizi için kullanılmak üzere, Sarılop, Sarı Zeybek, Kaba İlek ve Hamza İlek incir çeşitlerine ait yaprak dokularından genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitkisel örneklerden yüksek saflıkta DNA elde etmek amacıyla, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde innuPREP Plant DNA Kit (IST Innuscreen GmbH, Almanya) kullanılmıştır.

Çalışmada, ChIP analizlerinde yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması nedeniyle, her incir çeşidi için birden fazla izolasyon yapılmıştır. Aynı çeşide ait örneklerden elde edilen DNA'lar birleştirilerek, her çeşit için homojen ve temsili bir DNA örneği oluşturulmuştur.

İzolasyon işlemleri sırasında, SLS bazlı Lysis Solution protokolü tercih edilmiştir. Yaklaşık 100 mg taze bitki materyali, sıvı azot eşliğinde havan ve tokmak kullanılarak ince toz hâline getirilmiştir. Bu ön işleme adımının ardından, homojenize edilen örnekler 1,5 mL'lik mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her bir tüpe 400 µL SLS Lysis Solution ve 20 µL Proteinase K eklenmiştir. Karışımlar, 65 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmış; bu süre boyunca birkaç kez vortexlenerek homojenizasyon artırılmıştır. Lizis sonrasında karışımlar, Prefilter içeren alıcı tüplere aktarılmış ve $11.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilerek hücresel kalıntılar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatana 200 µL SBS Binding Solution eklenmiş, karışım iyice homojenize edilerek Spin Filter içeren yeni bir tüpe aktarılmıştır. DNA'nın membrana bağlanmasını sağlamak amacıyla $11.000 \times g$ 'de

2 dakika santrifüj uygulanmıştır. Ardından Spin Filter, iki kez 650 µL MS Washing Solution ile yıkanmış ve filtrede kalan etanol kalıntılarının uzaklaştırılması için $\geq 13.000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. DNA elüsyonu için Spin Filter üzerine 100 µL Elution Buffer eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra $11.000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüjlenerek DNA elüe edilmiştir. Gerektiğinde ikinci bir elüsyon adımı uygulanmıştır. Elde edilen genomik DNA örneklerinin bir kısmı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş, jel görüntüleri DNA'nın bütünlüğü ve olası bozulmaları değerlendirmek amacıyla incelenmiştir. Ayrıca, DNA konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Konsantrasyon değerleri ng/µL cinsinden belirlenmiş; saflık oranları ise A260/A280 ve A260/A230 absorbans oranlarına göre değerlendirilmiştir. Tüm genomik DNA örnekleri, ileri moleküler analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.7 *In vitro* ChIP Analizi

Bitki örneklerinde ChIP analizleri, Molle vd. (2003), Fawcett vd. (2000) ile Avcı (2015) tarafından tanımlanan protokoller temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada uygulanan ChIP protokolü, klasik yöntemle kıyasla bazı yapısal farklılıklar içermektedir.

İlk olarak, bağlanma ve fiksasyon işlemleri *in vivo* koşullarda değil, *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre ekstraktı yerine, saflaştırılmış DNA ve rekombinant proteinin kontrollü koşullarda birleştirilmesiyle oluşturulan sentetik bağlanma ortamı (EK 2) kullanılmıştır.

Ayrıca, klasik ChIP analizlerinde yaygın olarak kullanılan proteine özgü antikorlar ile bu antikorların bağlandığı agaroz veya manyetik boncuk temelli matrisler bu çalışmada tercih edilmemiştir. Bunun yerine, hedef proteinlerin yapısında bulunan 6xHis etiketi kullanılarak DNA-protein komplekslerinin saflaştırılması sağlanmıştır. Bu işlem için histidin kalıntılarına yüksek afinite gösteren Ni-NTA agaroz reçinesi kullanılmış ve klasik antikor-bağlantılı sistemler kullanılmadan, hedef proteinlere bağlı DNA parçaları ortamdaki ayrıştırılmıştır. Tüm ChIP analizleri, iki farklı erkek ve iki farklı dişi bireyden alınan örneklerle, biyolojik tekrarlar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.1 Sonikasyon Koşullarının Optimizasyonu

ChIP analizine uygun DNA fragmanlarının elde edilmesi amacıyla, izole edilen genomik DNA örnekleri sonikasyon yöntemi ile fiziksel olarak kırılmıştır. Hedeflenen fragman uzunluğu 200–700 bp aralığı olarak belirlenmiştir. Bu işlem için İnfitek marka sonikatör cihazı kullanılmış, sonikasyon koşullarının belirlenmesine yönelik farklı süre ve döngü kombinasyonları denenmiştir.

Sonikasyon, aşağıdaki parametrelerle gerçekleştirilmiştir:

- Güç seviyesi: %10
- Toplam süre: 6 dakika 10 saniye
- Döngü tipi: 10 saniye “on” / 20 saniye “off” (pulse mod)
- Ortam: Buz üzerinde, 4 °C

Sonikasyon sonrası DNA fragmanlarının boy dağılımı, %1.5 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri, ChIP analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

2.2.7.2 Lineer Poliakrilamid (LPA) Çözeltisinin Hazırlanması

ChIP analizlerinin belirli bir aşamasında, DNA-protein komplekslerinden küçük DNA parçalarının çöktürülerek saflaştırılmasını desteklemek amacıyla taşıyıcı polimer olarak lineer poliakrilamid (LPA) çözeltisi kullanılmıştır. LPA, Gaillard ve Strauss (1990) tarafından tanımlanan protokole uygun şekilde hazırlanmıştır.

Taşıyıcı tampon olarak 40 mM Tris-HCl, 20 mM sodyum asetat ve 1 mM EDTA içeren bir çözelti hazırlanmış ve pH değeri 7.8’e ayarlanmıştır. Bu çözeltiye %5 akrilamid eklenmiştir. Polimerizasyonu başlatmak üzere, karışıma %10 amonyum persülfat çözeltisinden 1/100 oranında ve TEMED’den 1/1000 oranında ekleme yapılmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek polimerizasyon tamamlanmıştır.

Polimer kıvamına ulaştıktan sonra, çöktürme işlemi için karışıma 2.5 hacim mutlak etanol eklenmiş ve santrifüjleme yapılmıştır. Elde edilen LPA peleti, bir gece boyunca 20 hacim distile su (dH₂O) içinde çalkalanarak süspanse edilmiştir. Böylece %0.25 (w/v) oranında LPA içeren çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan çözelti, +4 °C’de saklanmış ve ChIP-DNA izolasyon protokolünde taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

2.2.7.3 *In vitro* ChIP Analizi Uygulanması

Rekombinant His-tag'li proteinlerin bitki genomu üzerinde bağlandıkları bölgelerin belirlenmesine yönelik olarak *in vitro* kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yöntemi uygulanmıştır (Avcı, 2015). Kullanılan protokol, literatürde tanımlanan klasik ChIP yöntemlerine dayanmakla birlikte, deneysel sistemin özgün koşulları doğrultusunda çeşitli adımlar optimize edilmiştir.

Deneyde kullanılacak DNA ve protein miktarları, önceden yapılan konsantrasyon ölçümleri temel alınarak belirlenmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 500 μ L olacak şekilde ayarlanmış; her bir tüpe 200 μ g rekombinant protein ve 50 μ g DNA eklenmiştir. Bu oranlar, Avcı (2015) tarafından bildirilen protokol esas alınarak hesaplanmış; ancak deneysel sistemdeki farklılıklar nedeniyle optimize edilmiştir.

Bağlanma aşamasında hazırlanan 500 μ L'lik reaksiyon karışımı, 37 °C'de, 300 rpm hızında, 1 saat boyunca Eppendorf ThermoMixer cihazında inkübe edilmiştir. Ardından, DNA-protein etkileşimlerini stabilize etmek amacıyla karışıma %1 formaldehit eklenmiş ve inkübasyona 15 dakika daha devam edilmiştir. Reaksiyon, 125 mM glisin ilavesiyle sonlandırılmış; ardından karışım 25 °C'de, 300 rpm'de, 10 dakika süreyle Eppendorf ThermoMixer cihazında inkübe edilerek çapraz bağlama işlemi tamamlanmıştır.

Saflaştırma aşamasında, hedef proteinin C-terminalinde bulunan 6xHis etiketi ile afinite gösteren HisPur™ Ni-NTA reçinesi (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Reçine, iki kez distile su ve ardından iki kez 1× bağlanma tamponu ile yıkanarak hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı reçine ile birleştirilmiş ve +4 °C'de, 1 saat süreyle rotatörde inkübe edilerek bağlanma gerçekleştirilmiştir. Bağlanan DNA-protein kompleksleri, imidazol içeren elüsyon tamponu ile üç aşamada elüe edilmiştir (ilk elüsyonda 100 μ L, ikinci ve üçüncü elüsyonlarda 50'şer μ L). Tüm elüsyonlar birleştirilerek saflaştırma aşamasına geçilmiştir.

Elde edilen elüsyonlara 250 mM NaCl eklenmiş ve karışım 65 °C'de, 16 saat süreyle inkübe edilmiştir. DNA-protein bağlarının tamamen çözülmesi amacıyla, her tüpe 20 μ L Proteinase K eklenmiş; karışım sırasıyla 37 °C'de 1 saat, ardından 65 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, DNA'nın çöktürülmesini kolaylaştırmak amacıyla her tüpe 10 μ L %0.25 oranında hazırlanmış Lineer Poliakrilamid (LPA) çözeltisi ilave edilmiştir. DNA, %80 izopropanol varlığında, -20 °C'de 1 saat süreyle çöktürülmüştür. Oluşan peletler

%70 etanol ile üç kez yıkanmış, son olarak 20 µL nükleaz içermeyen su (nuclease-free water) içinde çözündürülerek -20 °C’de saklanmıştır.

Elde edilen ChIP-DNA kütüphaneleri, sekanslama için yetkin bir firmaya iletilmiştir.

2.2.7.4 Kütüphane Hazırlığı, Kalite Kontrolü ve Dizileme

ChIP-Seq Kütüphanesi, Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır. İlk olarak DNA parçaları uç düzeltme (end-repair) işlemine tabi tutulmuş ve A-tailing uygulanmıştır. A-tailing taşıyan DNA parçalarına dizileme adaptörleri ligate edilmiştir. Boyut seçimi (size selection) ve PCR amplifikasyonu sonrasında, son DNA kütüphanesi elde edilmiştir. Kütüphanelerin boyut dağılımları Agilent 5400 sisteminde (Agilent, ABD) belirlenmiş, kütüphane konsantrasyonları ise kantitatif PCR (qPCR) yöntemiyle ölçülmüştür (1,5 nM). Uygun kaliteye sahip kütüphaneler havuzlanarak, hedeflenen veri miktarına ve kütüphane etkinliğine göre Illumina NovaSeq X platformunda çift yönlü (paired-end, PE) 2 × 150 baz uzunluğunda dizilenmiştir.

Dizileme işlemi sonrasında elde edilen ham veriler, Illumina platformunda gerçekleştirilen base calling ile kısa okumalara dönüştürülmüş ve her okumaya ait dizi ile kalite bilgilerini içeren FASTQ biçiminde kaydedilmiştir (Cock vd., 2010). Bunu izleyen kalite kontrol aşamasında, fastp (v0.23.1) aracı (Chen vd., 2018) kullanılarak, okuma çiftlerinden herhangi birinde adaptör kontaminasyonunun saptanması, herhangi bir okumada belirsiz baz (N) oranının %10’u aşması ya da düşük kaliteli bazların (Phred < 5) oranının %50’yi geçmesi durumlarında ilgili okuma çiftleri sistematik olarak analiz dışı bırakılmıştır. Ayrıca demultipleksleme ve düşük kaliteli verilerin ilave filtrelenmesi CLC Genomics Workbench (Qiagen, ABD) yazılımı aracılığıyla yürütülmüştür.

Filtrelenmiş ve kaliteli veriler kullanılarak ChIP-seq analizi, CLC Genomics Workbench yazılımının ChIP-seq modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle “Map Reads to Reference” aracıyla ChIP ve kontrol (Input) örneklerine ait temizlenmiş okuma verileri referans genomu hizalanmıştır. Referans genomu olarak NCBI erişim numarası ASM3324228v1 olan *F. carica* genomu kullanılmıştır. Haritalama parametreleri, dizileme kalitesi ve bağlanma bölgelerinin özellikleri dikkate alınarak şu şekilde ayarlanmıştır: mismatch cost = 2,

insertion/deletion cost = 3, length fraction = 0,5 ve similarity fraction = 0,8. Bu işlem sonucunda her örnek için referans genoma hizalanmış okuma verilerini içeren BAM formatındaki hizalama dosyaları elde edilmiştir.

Protein–DNA etkileşim bölgelerini belirlemek amacıyla pik analizi gerçekleştirilmiştir. “ChIP-seq Analysis” aracı kullanılarak ChIP örneklerine ait hizalanmış veriler analiz edilmiş, kontrol (Input DNA) verisi ise arka planın modellenmesi için kullanılmıştır. Pik noktalarının belirlenmesinde maksimum p-değeri 1×10^{-5} olarak ayarlanmış, transkripsiyon faktörlerine özgü tipik pik şekillerini modelleyen “Peak Shape Filter” etkinleştirilmiş ve DNA fragman uzunluğu deneysel olarak belirlenen ya da yazılım tarafından tahmin edilen değere göre girilmiştir. Bu analiz sonucunda pik listeleri, kalite kontrol raporları ve pik şekli skorlarını içeren dosyalar elde edilmiştir.

Biyolojik yorumlama kapsamında, pik (bağlanma) bölgeleri genom tarayıcı üzerinde görselleştirilmiş ve okuma yoğunluğu kontrol örneğiyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Ardından “Annotate Peaks” aracıyla pik bölgelerinin genom üzerindeki konumları belirlenmiş; promotör, ekson, intron ve intergenik bölgelerle örtüşmeleri değerlendirilmiştir. Bu aşamada pik bölgelerine yakın genler potansiyel hedef genler olarak tanımlanmıştır. Analiz edilen protein bir transkripsiyon faktörü ise “Find Binding Site Motifs” aracıyla bağlanma motifleri belirlenmiştir. Farklı örnek grupları arasında bağlanma bölgeleri karşılaştırılarak diferansiyel pik bölgeleri saptandıktan sonra, Venn analizi ile örneğe özgü pik bölgeleri tanımlanmış ve bu bölgeler işlevsel anotasyon analizleri için referans olarak kullanılmıştır.

Son aşamada, hedef genler kullanılarak biyolojik süreçlerin ve sinyal yollarının belirlenmesi amacıyla yolak (pathway) analizi yapılmıştır. Bu kapsamda, hedef genler OmicsBox (Biobam, İspanya) yazılımı üzerinden BlastX ile *Plantae* (RefSeq) veritabanında taranmış ve Gen Ontolojisi (GO) analizi gerçekleştirilmiştir. Ardından, aynı yazılımın KEGG modülü kullanılarak genlerin yer aldığı biyolojik yollar ve sinyal iletim mekanizmaları belirlenmiştir.

2.2.8 EMSA Analizi

Erkek bireylere özgü bağlanım gösteren bölgeler arasından, polen ve üreme süreçleriyle ilişkili olduğu düşünülen on gen marker adayı seçilmiştir. Bu aday genlerin düzenleyici bölgeleri ile rekombinant proteinler arasındaki etkileşimleri

değerlendirmek amacıyla EMSA analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz kapsamında, aday genlerin promotör bölgeleri hedef alınarak özgül primer çiftleri tasarlanmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. EMSA analizleri için tasarlanan ileri ve ters primerleri

Primer No	İleri Primer (5'→3')	Ters Primer (5'→3')	Ampikon Boyutu (Bp)
EMSA-000911	TCGGTACTGTTTTGAGGGCT	TTGACTCGCCCATGACTCAG	237
EMSA-007346	TGCTCGACTATCTTGATGCCA	AGCAGTCAGTCATGTTCCCA	221
EMSA-030278	TAAACCACCGCCAATTCCGA	GTGGGTGTGTGTCGTTTTGT	205
EMSA-011106	TTGTAACCTGCAACGGTGTGT	CCCGGCGAGACCCATTTT	295
EMSA-010700	CATCCCCTGCTTCTGTCCTC	ACTCATTGGTCAGATTTTGT	310
EMSA-005034	GCATTGGTTTTTGCAGCAGC	GCCCATATTTAAGAAGTTTAAGCATCA	145
EMSA-026056	AATTAAGTGAAGCTAATGGGACCC	AGCAACAAGTGTCAAACCCA	324
EMSA-053360	CAAGAACCGCTACGTTGGA	CTCTGTTTGATTGCCGACGA	190
EMSA-020112	ACGACCAAATTATTAAATCGGCA	TTAAGTTCCAGTGGCTGTCC	153
EMSA-053729	CTCTCAATTTACACCCTCTAGAGCA	CAAAATGAAAAGCAAGAAAGGCATAT	208

Primer tasarımı, Primer3Plus çevrim içi yazılımı (<https://primer3plus.com>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tasarım sürecinde genlerin 5' UTR bölgeleri, olası MYB bağlanma motifleri ve transkripsiyon başlangıç noktalarına yakın sekanslar dikkate alınmıştır. Tasarlanan primerler aracılığıyla, genomik DNA'dan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çift sarmallı DNA problemleri amplifiye edilmiştir. Elde edilen ampiklonlar saflaştırılarak, EMSA deneylerinde bağlanma analizleri için kullanıma uygun hâle getirilmiştir.

DNA–protein bağlanma reaksiyonları, daha önce rekombinant olarak üretilen His-tag’li *FcMYB125* proteini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir bağlanma karışımında (Tablo 2.2), belirli konsantrasyonlarda DNA ve protein içeren örnekler 26 °C’de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu yöntemle, proteinlerin hedef DNA bölgeleriyle bağlanma yetenekleri değerlendirilmiştir.

EMSA, her bir aday gen için Avcı (2015) tarafından kullanılan protokol esas alınarak, gerekli modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Bu analizler Sarılop, Kaba İlek, Sarı Zeybek ve Hamza İlek çeşitlerinde gerçekleştirilerek genotipler arası bağlanma farklılıkları da incelenmiştir. Böylece genetik çeşitliliğin DNA–protein etkileşimlerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2.2. EMSA bağlanma karışımı ve *FcMYB125* titrasyonu.

Bileşenler	Tüp 1 (0 μ L Protein)	Tüp 2 (2 μ M Protein)	Tüp 3 (4 μ M μ L Protein)	Tüp 4 (6 μ M Protein)
5× Bağlanma tamponu	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
polid(I-dC)	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
BSA (1 mg/mL)	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L
Protein (<i>FcMYB125</i>)	0 μ L	1 μ L	2 μ L	3 μ L
DNA (500 ng)	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
dH ₂ O	12 μ L	11 μ L	10 μ L	9 μ L
TOPLAM	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL

Bağlanma tepkimeleri sonrasında kompleks oluşumunu gözlemlemek amacıyla örnekler, %4,5’luk non-denatüran (native) poliakrilamid jel (EK 2) elektroforezi (PAGE) ile ayrıştırılmıştır. Jel elektroforezi sonucunda DNA-protein komplekslerinin mobilite değişimleri analiz edilmiş ve bağlanma olayları, bant kaymaları (shift) üzerinden değerlendirilmiştir. Jeller uygun boyama ve görüntüleme teknikleri ile görselleştirilmiş; pozitif bağlanma sinyalleri belirlenmiştir.

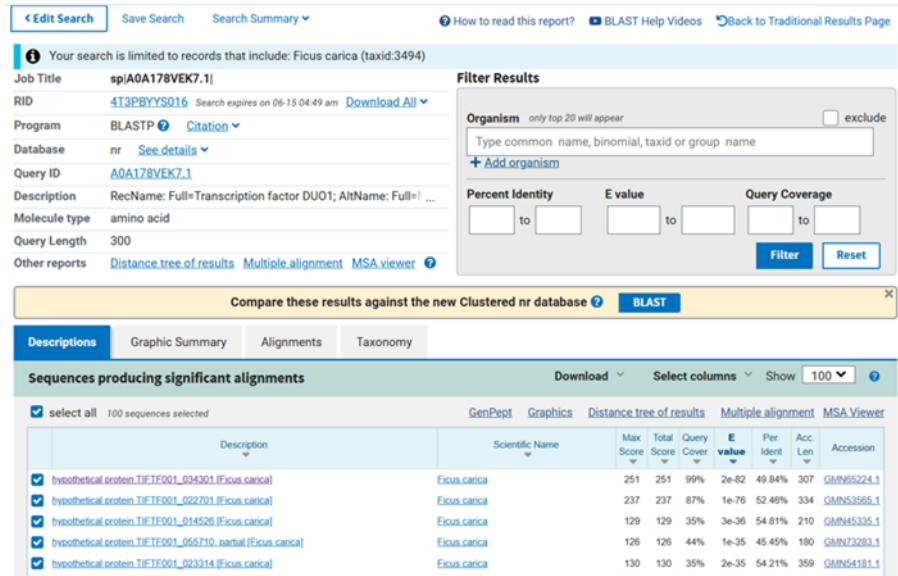
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 FcMYB125 Genine Ait Homolog Protein Dizilerinin Belirlenmesi

FcMYB125 transkripsiyon faktörünün tanımlanmasına yönelik olarak, *Arabidopsis thaliana*'da DUO1 transkripsiyon faktörünü kodlayan MYB125 genine ait anotasyonlu referans protein dizisi, NCBI Protein Veritabanı'ndan FASTA formatında temin edilmiş ve *Ficus carica* genomu üzerinde BLASTp tabanlı homoloji taramalarında sorgu dizisi olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).

Bu tarama sonucunda, en anlamlı hizalamalardan biri olarak, *Ficus carica* genomunda yer alan hypothetical protein TIFTF001_034301 (Accession: GMN65224.1) tanımlanmıştır. Bu dizinin maksimum skoru 251, kimlik oranı %84, sorgu örtüşmesi %99 ve E-değeri 2e-82 olarak hesaplanmıştır.

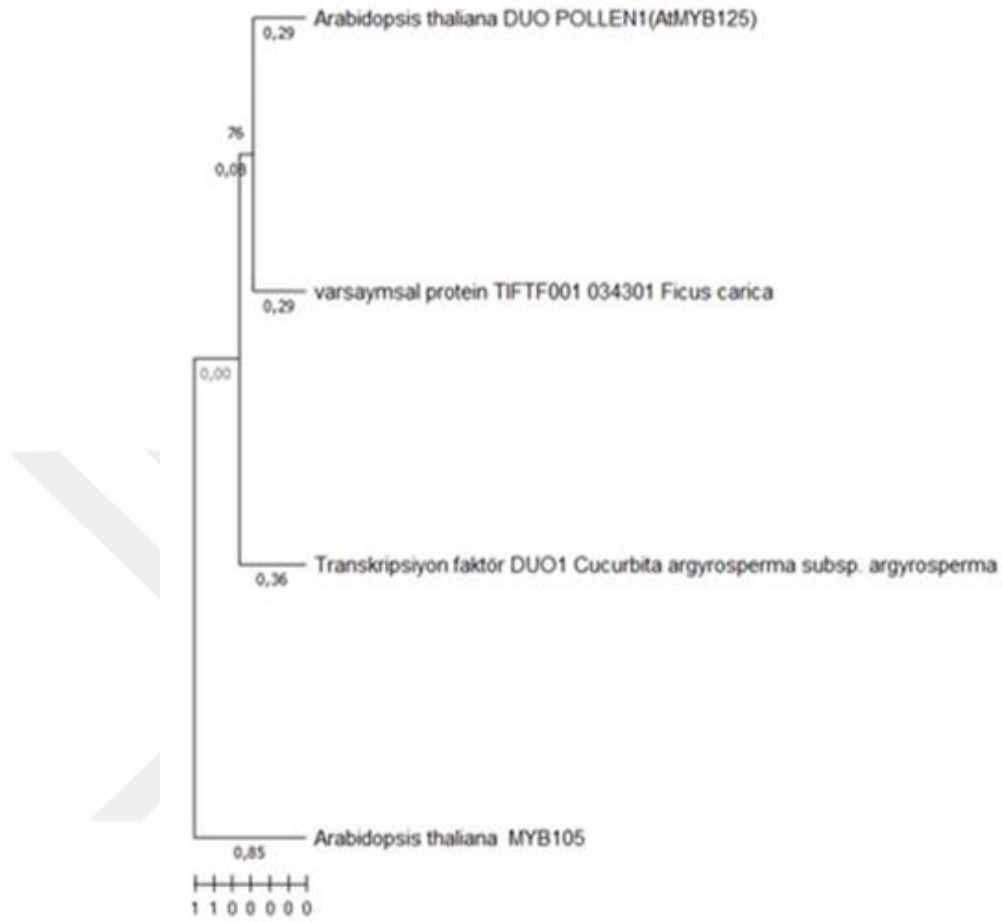
Değerlendirmede E-değeri, bit skoru ve kimlik oranı gibi temel biyoinformatik parametreler esas alınmış; bu kriterler doğrultusunda en yüksek skora sahip hizalama, biyolojik olarak en anlamlı eşleşme olarak kabul edilerek *F. carica* genomunda MYB125 homologu olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.1. MYB125 *Ficus carica*'da blastp analiz sonucu

Belirlenen *Ficus carica* aday protein dizisi, *Arabidopsis thaliana* ve *Cucurbita argyrosperma* DUO1 proteinleri ile birlikte MEGA11 yazılımı kullanılarak çoklu dizi hizalamasına tabi tutulmuştur (Şekil 3.2). Yapılan analizler sonucunda, R2R3-MYB DNA-bağlanma domenlerinde yer alan ve DUO1 için

yakın evrimsel ilişki, FcMYB125'in DUO1 protein ailesine ait, yüksek düzeyde korunmuş bir homolog olduğunu desteklemektedir.



Şekil 3.3. *Arabidopsis thaliana*, *Ficus carica* ve *Cucurbita argyrosperma* erkek gameta türlerine ait DUO1 proteinleri ile *A. thaliana* MYB105 proteininin filogenetik ilişkisini gösteren filogenetik ağaç.

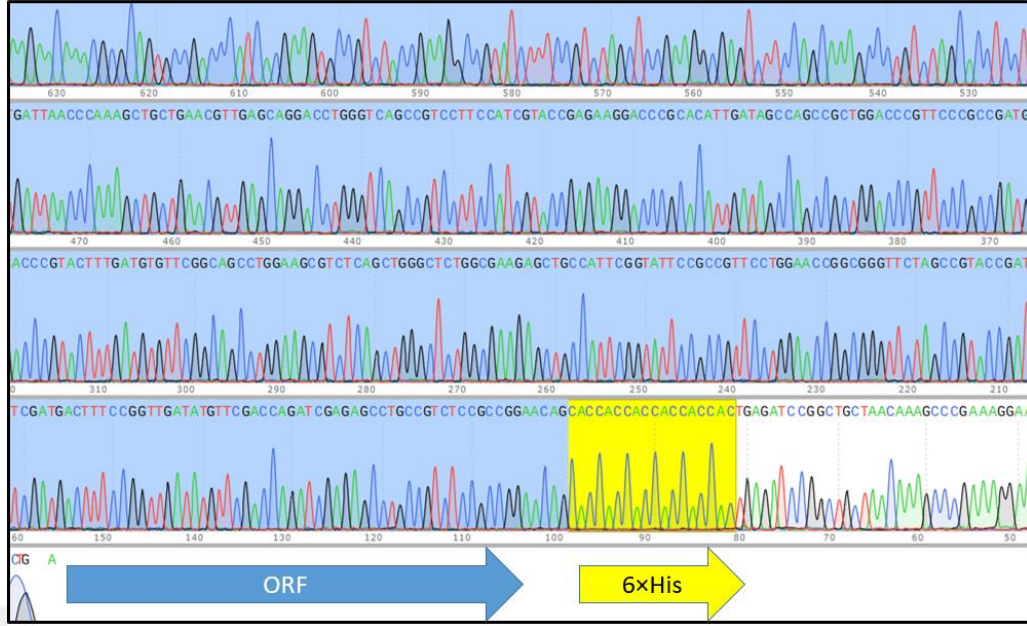
Literatürde DUO POLLEN1 (DUO1), çiçekli bitkilerde erkek eşey hattına özgü gen ekspresyonunun düzenlenmesinde merkezi bir düzenleyici olarak tanımlanmış; erkek gamet hücresi farklılaşmasını başlatan moleküler programların aktivasyonu büyük ölçüde DUO1'in hedef genler üzerindeki transkripsiyonel kontrolüne bağlanmıştır (Brownfield vd., 2009; Borg vd., 2011; Higo vd., 2018; Peters vd., 2017; Zhang vd., 2025). DUO1'in gametik hücre kimliğinin kazanılması ve hücre döngüsünün koordinasyonu üzerindeki belirleyici rolü, bu faktörü erkek gamet gelişiminin anahtar düzenleyicilerinden biri hâline getirmektedir.

Bu bağlamda, cinsiyet belirlenme mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamış bir tür olan *F. carica*'da, DUO1 ile ortolog özellikler gösteren

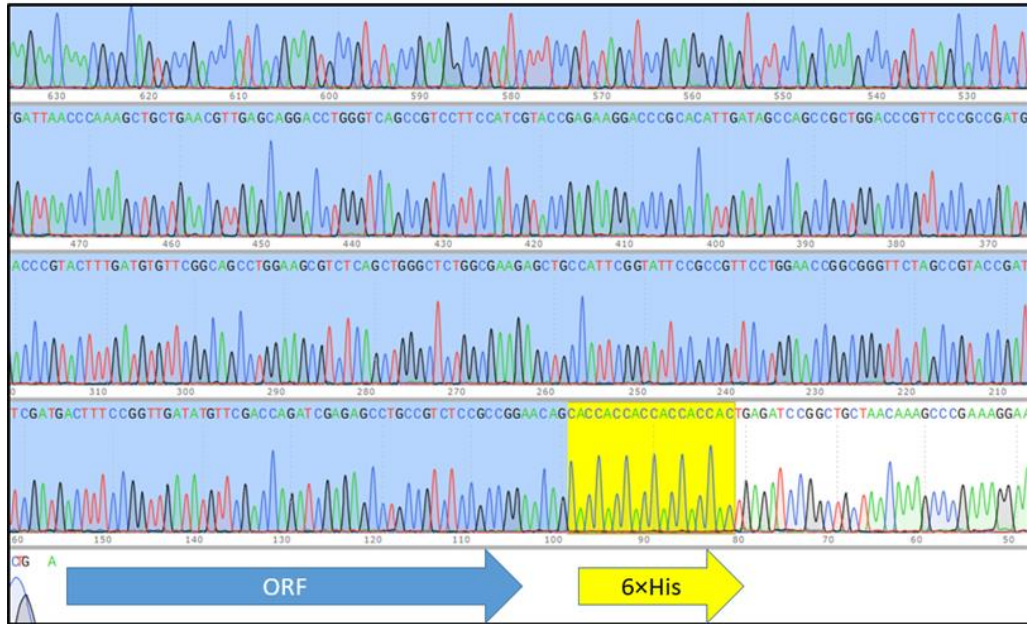
FcMYB125'in tanımlanması, erkek gametofitik hatta özgü transkripsiyonel düzenleme ağlarının çözümlemesi açısından kritik bir başlangıç noktası sunmaktadır. Elde edilen dizisel, yapısal ve filogenetik kanıtlar birlikte değerlendirildiğinde, FcMYB125'in *A. thaliana* MYB125 (DUO1) ile ortolog bir transkripsiyon faktörü olduğu ve erkek gametofitik hatta özgü gen düzenleme mekanizmalarında benzer işlevsel roller üstlenebileceği güçlü biçimde desteklenmektedir (Durberry vd., 2005; Borg vd., 2011).

3.2 Pet-28a(+)-FcMYB125 Rekombinant Plazmidinin Sanger Dizileme İle Doğrulanması

pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidi, çoklu primerlerle çift yönlü Sanger dizileme ile doğrulanmıştır (Şekil 3.4, Şekil 3.5). F primeriyle elde edilen ileri okuma referans plazmide 11–714 nt aralığında, R primeriyle elde edilen geri okuma ise 55–754 nt aralığında hizalanmıştır (Şekil 3.6). Her iki hizalamada da uyuşmazlık saptanmamış (0 mismatch) ve ekleme/silme görülmemiştir (0 gap). 5' uçta RBS (Shine–Dalgarno) ile ATG başlangıç kodonu arasındaki bölge ve ORF başlangıcı; 3' uçta ORF'nin sonu, C-uç 6×His etiketi ve T7 terminatörü tasarımıyla tam uyum göstermiştir. Okumaların çakışan segmentlerinde referansla ve kendi aralarında tam tutarlılık gözlenmiştir. Elde edilen konsensus dizisinin *in silico* çevirisi, beklenen uzunlukta bir polipeptit ve C-uçta HHHHHH kuyruğunu vermiş, erken durdurma kodonu saptanmamıştır.



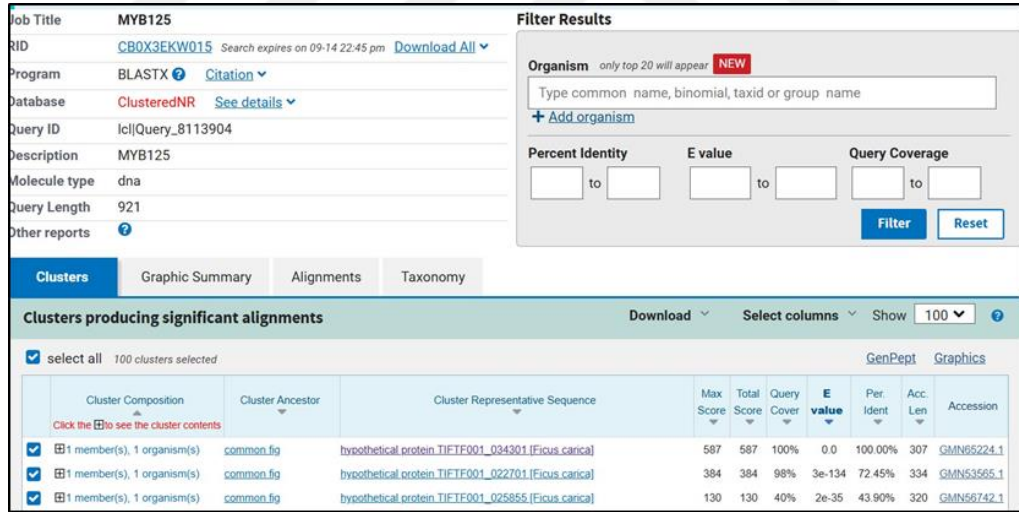
Şekil 3.4. pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidinin Sanger doğrulaması: F primeri ile elde edilen kromatogram. Sarı alan: C-uç 6×His etiketini kodlayan ardışık CAC tekrarlarını göstermektedir. Mavi alan: ATG başlangıç kodonu ve MYB125 ORF'nin başlangıcı (in-frame).



Şekil 3.5. pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidinin Sanger doğrulaması: R primeri (geri okuma) ile elde edilen 3' uç kromatogramı. Mavi alan FcMYB125 ORF'nin son kesimini, sarı alan ise C-uç 6×His etiketini kodlayan ardışık CAC tekrarlarını göstermektedir. Okuma çerçevesi korunmuştur (in-frame).



Şekil 3.6. pET-28a(+)-FcMYB125 rekombinant plazmidinin 5' birleşme bölgesinin Sanger doğrulaması. Üst panelde lac operatörü, RBS ve MYB125 ORF başlangıcı (ATG) gösterilmiştir. Alt panelde ileri ve geri okumalar referansla örtüşmekte; RBS→ATG geçişi ve ORF'nin in-frame başladığı doğrulanmaktadır.



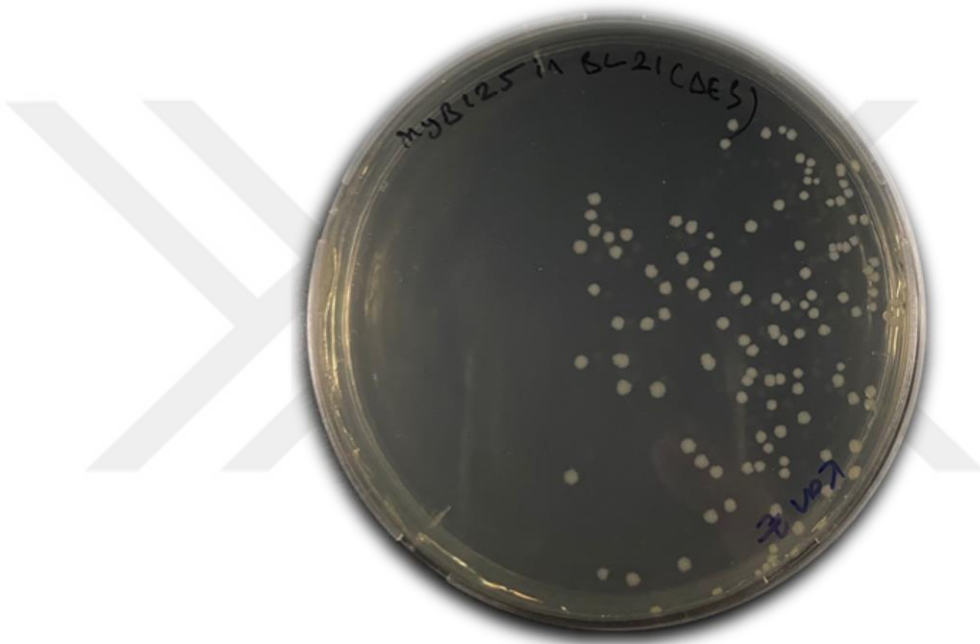
Şekil 3.7. Konsensus MYB125 nükleotid dizisinin BLASTx sonuç ekranı (NCBI; ClusteredNR).

Sanger dizileme verilerinden oluşturulan konsensus nükleotid dizisi, bağımsız doğrulama amacıyla NCBI BLASTx aracı kullanılarak ClusteredNR veritabanında taranmıştır. Sorgu, *F. carica*'ya ait hypothetical protein TIFTF001_034301 ile %100 sorgu kapsamı ve E-değeri 0.0 ile en yüksek skoru vermiştir (Accession: GNM65224.1). Diğer eşleşmeler daha düşük benzerlik

ölçütleri ve skorlar sergilemiştir. Bu sonuçlar, dizinin beklenen MYB125 homologunu kodladığını bağımsız olarak doğrulamaktadır (Şekil 3.7).

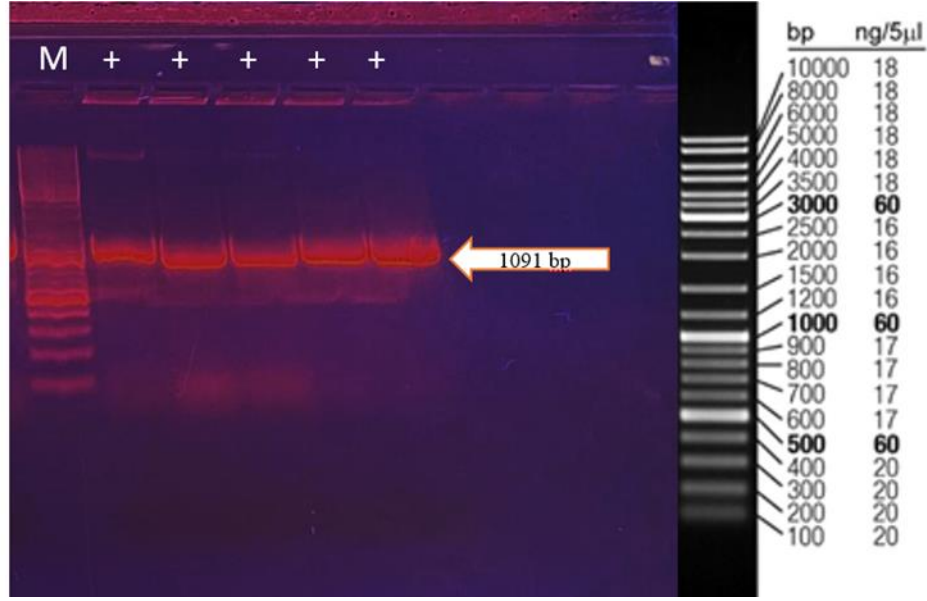
3.3 *Escherichia coli* BL21 (DE3) Suşunda Transformasyon ve Koloni Seçimi

Transformasyon sonrası, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar üzerinde kanamisin dirençli koloniler elde edilmiştir. Koloniler morfolojik olarak homojen görünüm sergilemiş; seçici ortamda beklenen büyüme paterni gözlenmiştir (Şekil 3.8).



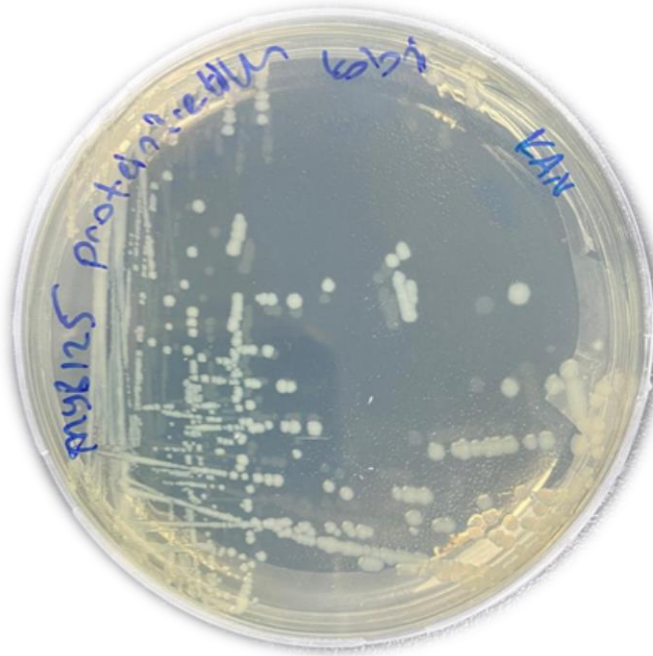
Şekil 3.8. *E. coli* BL21 (DE3)'ün transformasyon sonrası LB + kanamisin (50 µg/mL) plakasında koloni oluşumu (37 °C, ~16 s, 100 µL yayma ekim).

Rastgele seçilen izole koloniler, T7 promotör (F) / T7 terminatör (R) primer çifti kullanılarak koloni PCR ile taranmıştır. %1 agaroz jel elektroforezi sonucunda (Şekil 3.9), bazı kolonilerde beklenen uzunlukta tekil ampikon tespit edilmiş ve bu koloniler pozitif transformant olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 3.9. Koloni PCR jeli — *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-FcMYB125. T7 promotör (F) / T7 terminatör (R) primerleriyle amplifikasyon. Ok ile gösterilen hedef bant ≈ 1091 bp'dir; +: rastgele seçilen koloniler. M: DNA merdiveni (GLPBIO GF55001, 0.1–10 kb, 21 bant). (%1 agaroz, RedSafe; 100 V, ~ 40 dk)

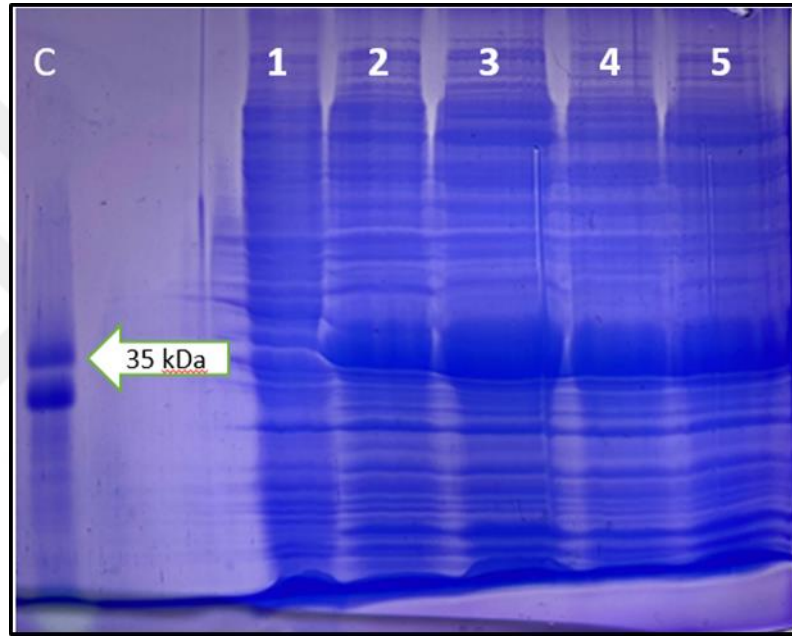
Pozitif olarak belirlenen koloniler yeniden çizgi ekimle saflaştırılmış ve stok kültürleri hazırlanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Pozitif transformantların yeniden çizgi ekimle saflaştırılması.

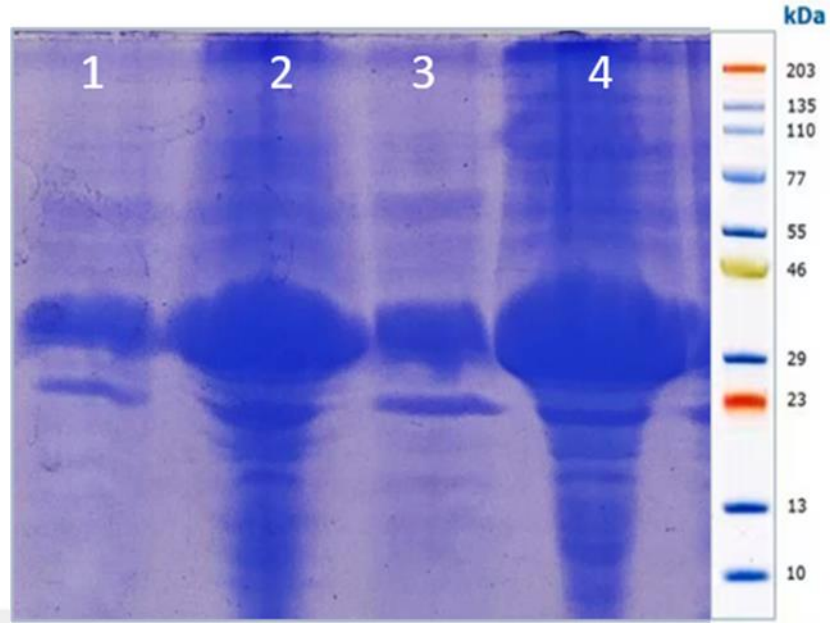
3.4 Rekombinant Proteinin Ekspresyonunun İndüklenmesi ve Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Pozitif klonların rekombinant protein üretim düzeyleri, farklı besiyeri ve sıcaklık koşulları altında incelenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, en yüksek ekspresyon veriminin 2×YT besiyerinde ve 24 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen indüksiyon koşullarında elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 3.11). Bu bulgu, hem besiyeri bileşiminin zenginliğinin hem de düşük sıcaklık koşullarının, hedef proteinin doğru katlanmasını ve çözünür formda birikimini desteklediğini göstermektedir.



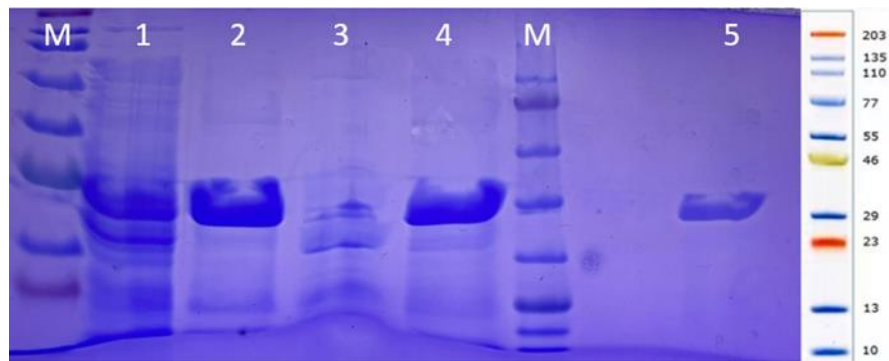
Şekil 3.11. Rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi. C: 35 kDa kontrol proteini; 1: İndüklenme öncesi hücre lizati; 2: 2×YT ortamında 18 °C’de indüklenen örnek; 3: 2×YT ortamında 24 °C’de indüklenen örnek; 4: LB ortamında 18 °C’de indüklenen örnek; 5: LB ortamında 24 °C’de indüklenen örnek. Analiz sonucunda hedef proteine karşılık gelen ~35 kDa’lık bant, özellikle 2×YT ortamında ve 24 °C’de indüklenen örnekte yoğun olarak gözlenmiştir.

İndüksiyon sonrasında elde edilen hücre lizati, çözünür ve çözünmeyen (pellet) fraksiyonlara ayrılarak SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmiştir. Elektroforez sonuçları, hedef proteinin büyük ölçüde çözünür fraksiyonda bulunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Protein örneklerinin SDS-PAGE analizi. 1: LB pellet, 2: LB lizat, 3: 2×YT pellet, 4: 2×YT lizat, kDa: Protein markırı. Hedef proteine (~35 kDa) karşılık gelen bant özellikle 2×YT lizat fraksiyonunda belirgin olarak görülmektedir.

Ni-NTA affinite reçinesi kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma sonrası elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile incelenmiştir. Analizler, hedef proteine karşılık gelen ~35 kDa'lık özgül bandın özellikle elüsyon fraksiyonlarında belirgin şekilde bulunduğunu ortaya koymuştur. Buna karşın bağlanmayan/yıkama fraksiyonunda hedef proteine ait bant gözlenmemiştir (Şekil 3.13). Bu bulgu, saflaştırmanın etkin biçimde gerçekleştiğini ve rekombinant proteinin yüksek saflıkta izole edilebildiğini göstermektedir.



Şekil 3.13. Saflaştırma ve diyaliz sonrası protein örneklerinin SDS-PAGE analizi. M: Marker, 1: İlk protein lizat, 2: 1. elüsyon, 3: Bağlanmayan/yıkama fraksiyonu, 4: 2. elüsyon, 5: Diyaliz sonrası protein.

Elde edilen saflaştırılmış protein daha sonra diyaliz işlemine alınmış ve imidazol içeren elüsyon tamponu ChIP bağlama tamponu ile değiştirilmiştir. Diyaliz sonrasında gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi, ~35 kDa büyüklüğündeki hedef proteine ait bandın korunduğunu ve proteinin yeni tampon koşullarına kayda değer bir kayıp olmaksızın aktarıldığını göstermiştir (Şekil 3.13). BCA analizi ise saflaştırılmış proteinin konsantrasyonunun yaklaşık 2 mg/mL olduğunu ortaya koymuştur.

3.5 Genomik DNA izolasyonu

Çalışmada, Sarılop, Sarı Zeybek, Kaba İlek ve Hamza İlek incir çeşitlerine ait yaprak dokularından gerçekleştirilen genomik DNA izolasyonları başarılı sonuçlar vermiştir. *In vitro* ChIP analizlerinde kullanılmak üzere yüksek miktarda DNA elde edilmesi hedeflenmiş; bu doğrultuda her çeşit için çok sayıda izolasyon yapılmış ve aynı çeşide ait örneklerden elde edilen DNA'lar birleştirilerek homojen temsili örnekler oluşturulmuştur.

NanoDrop UV spektrofotometresi ile yapılan analizlerde, tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının moleküler çalışmalar için yeterli düzeyde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, A260/A280 ve A260/A230 absorbans oranlarının büyük ölçüde istenen aralıkta yer alması, DNA'ların protein, fenolik bileşikler ve diğer olası kirleticilerden arındırıldığını göstermektedir. Her bir incir çeşidine ait NanoDrop spektrumları Tablo 3.1'de, NanoDrop ölçüm görüntüleri ise Şekil 3.14 ve 3.15'te sunulmuştur.

Tablo 3.1. Genomik DNA örneklerine ait NanoDrop ölçüm sonuçları.

Numune Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	A230 (Abs)	A260/A280	A260/A230
Sarılop	154.1	3.082	1.682	1.408	1.832	2.189
Kaba İlek	228.8	4.577	2.483	2.150	1.843	2.129
Sarı Zeybek	209.6	4.193	2.228	2.022	1.882	2.074
Hamza İlek	328.6	6.572	3.506	3.013	1.875	2.182

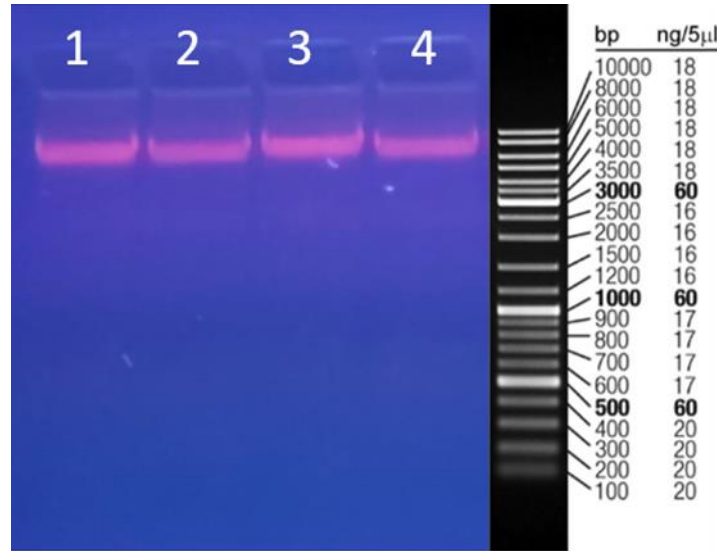


Şekil 3.14. Sarılop ve Kaba ilek incir çeşitlerine ait DNA saflık ve yoğunluk değerlerinin Nano-300 MicroDigital cihazı ile ölçüm çıktıları.



Şekil 3.15. Sarı Zeybek ve Hamza ilek incir çeşitlerine ait DNA saflık ve yoğunluk değerlerinin Nano-300 MicroDigital cihazı ile ölçüm çıktıları.

Kalite kontrol amacıyla gerçekleştirilen %1'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda ise tüm örneklerde yüksek moleküler ağırlıklı, net ve kesintisiz DNA bantları gözlemlenmiştir. Dört incir çeşidine ait jel görüntüleri Şekil 3.16'da sunulmuştur.



Şekil 3.16. *Ficus carica* gDNA'nın agaroz jel görüntüsü: 1–4 sırasıyla Sarılop, Sarı Zeybek, Kaba İlek, Hamza İlek

3.6 *In vitro* ChIP-seq Analizleri

Klasik hücre içi ChIP protokollerinden farklı olarak, bu çalışmada, *in vitro* koşullarda saflaştırılmış DNA ile rekombinant His etiketli proteinin etkileşimleri incelenmiş ve oluşan DNA–protein kompleksleri, Ni-NTA reçinesi kullanılarak başarıyla saflaştırılmıştır. Seçilen homolog proteini kodlayan dizi, uygun bir ekspresyon vektörüne klonlanmış ve plazmid aracılığıyla C-terminal His etiketi füzyonu oluşturularak rekombinant protein üretimi gerçekleştirilmiştir. C-terminal His etiketinin kullanımı, saflaştırma sürecini kolaylaştırmakta ve protein–DNA komplekslerinin antikör bağımlılığı olmaksızın yakalanmasına olanak tanımaktadır. Bu yöntemsel yaklaşım, çalışmada bitkiye özgü olarak geliştirilen hibrit *in vitro* ChIP iş akışının kavramsal temelini oluşturmaktadır. Ayrıca, tasarımın bu özgün yönü, yöntemin uygulanabilirliğini artırmakta ve klasik protokollere kıyasla belirgin bir avantaj sunmaktadır.

Geliştirilen antikorsuz, çaprazlamalı *in vitro* ChIP platformu, klasik antikör bağımlı ChIP paradigması ile etiket yönlendirmeli kromatin afinite saflaştırma (ChTAP/TChAP) ve antikorsuz DNA-afinite temelli yaklaşımlar (DAP-seq, seq-DAP-seq, dDAP-seq) arasında konumlanan hibrit bir sistem olarak tasarlanmıştır. ChTAP/TChAP yöntemleri *in vivo* çaprazlanmış kromatinde etiket temelli zenginleştirme sağlarken, DAP-seq ailesi antikorsuz fakat çaprazlamasız çalışmaktadır (Bartlett vd., 2017; Lai vd., 2020; Li vd., 2023; Soleimani vd., 2013; Verkest vd., 2014). Geliştirilen akış, bu iki hattın güçlü yönlerini bir araya getirerek

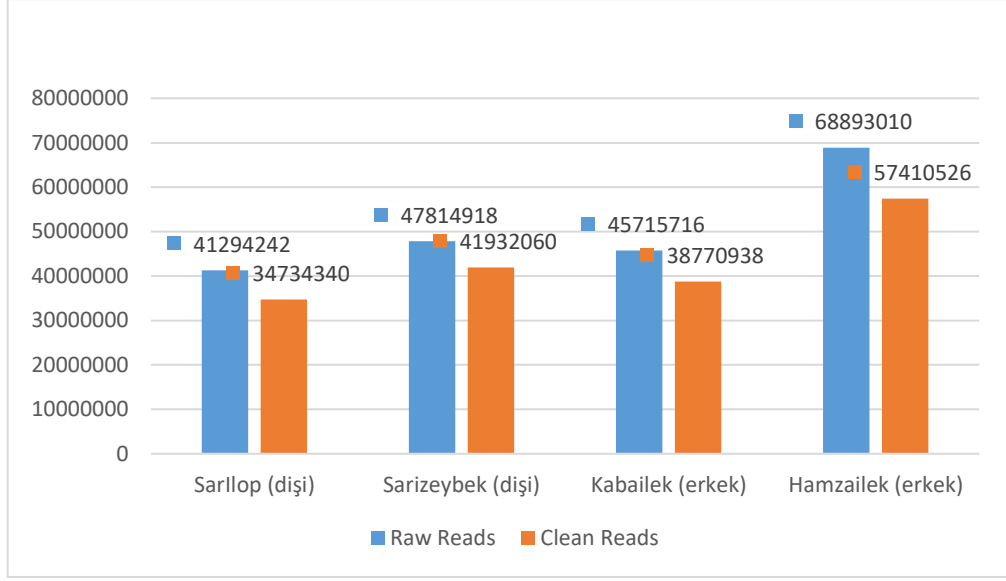
antikor bağımlılığını ortadan kaldırmakta ve protein–DNA etkileşimlerinin doğal bağlamını koruyan çaprazlama aşamasını içermektedir (Bartlett vd., 2017; Lai vd., 2020; Li vd., 2023; Soleimani vd., 2013; Verkest vd., 2014). Ayrıca DNA kütüphanelerinin, herhangi bir ilgi kaynağından elde edilen doğal genomik DNA kullanılarak oluşturulması, transkripsiyon faktörü bağlanmasını etkilediği bilinen hücre ve dokuya özgü kimyasal modifikasyonların (ör. DNA metilasyonu) korunmasına imkân tanımaktadır (Bartlett vd., 2017).

Türkiye literatüründe antikorsuz yakalama yaklaşımının öncül örneklerinden biri, Avcı (2015) tarafından yürütülen doktora çalışması olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* GntR ailesinden LutR transkripsiyon faktörünün doğrudan hedefleri ChIP ve EMSA kombinasyonu ile incelenmiş; antikor bağımlılığı rekombinant/etiketli protein stratejisiyle aşılmıştır (Avcı, 2015). 2013–2025 yıllarını kapsayan literatür taraması, bitkisel sistemlerde His–Ni–NTA temelli, antikorsuz ve aynı zamanda çaprazlamalı bir *in vitro* ChIP protokolüne dair hakemli bir rapor bulunmadığını göstermektedir; bitkilerde daha ziyade etiketli *in vivo* ChTAP/TChAP ve antikorsuz, çaprazlamasız DAP-seq/seq-DAP-seq/dDAP-seq uygulamaları bildirilmektedir (Bartlett vd., 2017; Lai vd., 2020; Li vd., 2023; Soleimani vd., 2013; Verkest vd., 2014; Zhai vd., 2024). Bu nedenle, sunulan düzenin *Ficus carica* üzerinde gerçekleştirilen ilk doğrulanmış örneklerden biri olduğu değerlendirilmektedir.

Deneyler, her koşul için iki biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiş; böylece antikor bağımlı sistemlere alternatif olarak, hedef proteine bağlı DNA bölgeleri yüksek özgüllük ve düşük arka plan gürültüsüyle elde edilmiştir. Elde edilen ChIP-seq verileri, incelenen transkripsiyon faktörünün genom üzerindeki bağlanma bölgelerinin güvenilir şekilde belirlenebildiğini göstermektedir.

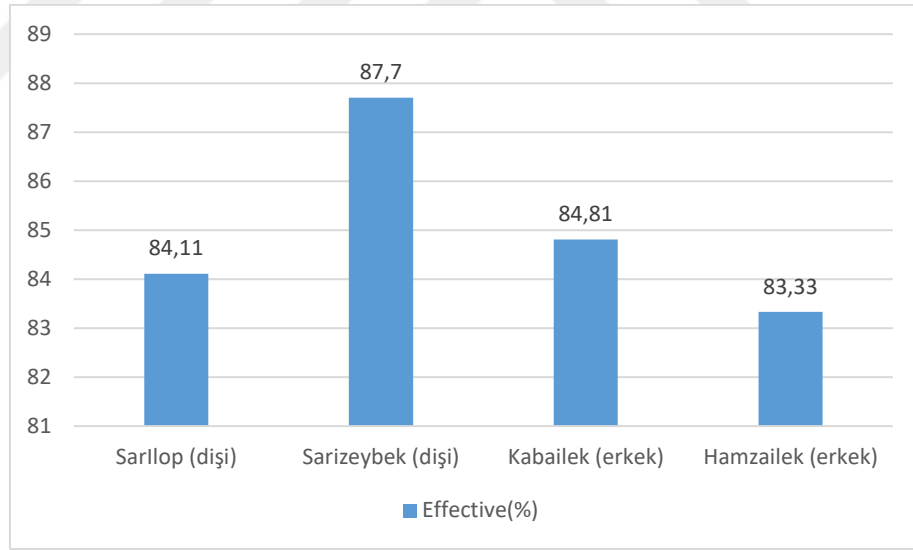
3.6.1 Veri Kalite Kontrolü

Her örnek için yapılan DNA dizileme sonrası ham okumalar (Raw Reads) filtrelenerek adaptör dizileri, düşük kaliteli bazlar ve olası kontaminasyonlar temizlenmiştir. Ham okuma sayıları 41.294.242 ile 68.893.010 arasında değişmiştir (Şekil 3.17). Filtreleme sonucunda elde edilen temiz okumalar (Clean Reads) 34.734.340 ile 57.410.526 arasında değişmiştir (Şekil 3.17).



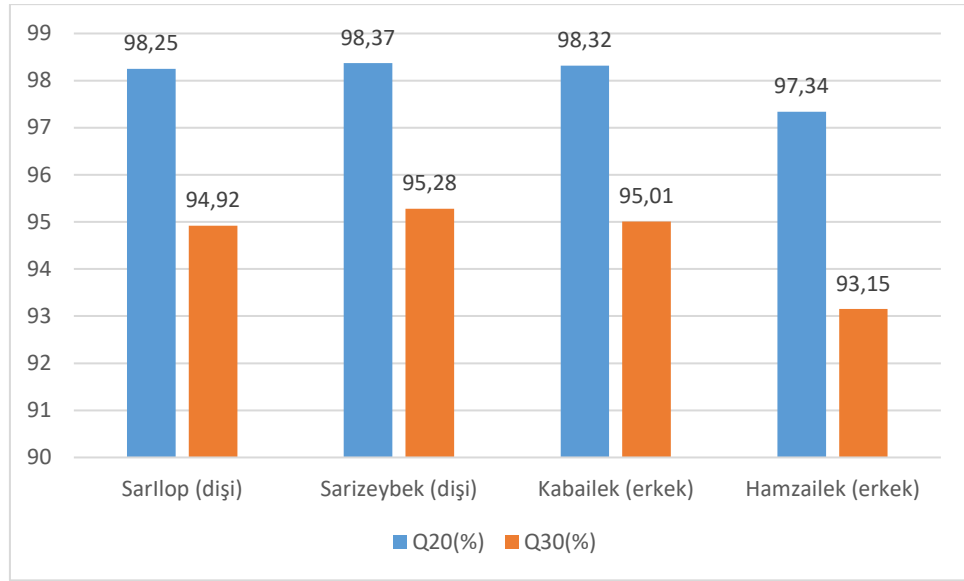
Şekil 3.17. İncir çeşitlerinde ham okuma (Raw Reads) ve temiz okuma (Clean Reads) sayılarının karşılaştırılması.

Etkinlik oranı (Effective %) %83,3 ile %87,7 aralığında bulunmuştur (Şekil 3.18). Tüm örneklerde hata oranı %0,01 düzeyinde kalmıştır.



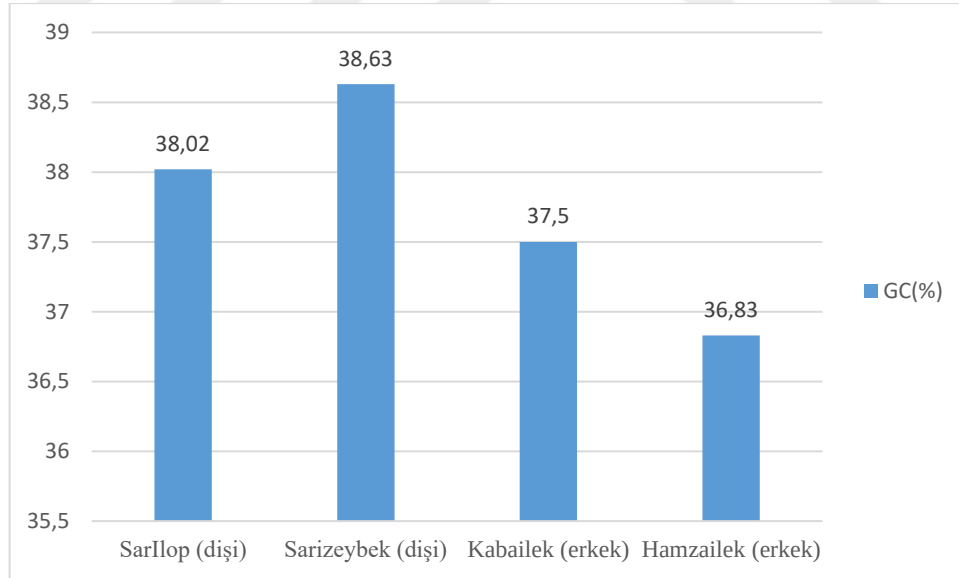
Şekil 3.18. İncir çeşitlerinde temiz okuma oranları (Effective %).

Q20 ve Q30 değerleri sırasıyla %97'nin ve %93'ün üzerinde saptanmıştır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. İncir çeşitlerinde DNA dizileme kalite değerleri

GC içerikleri %36,8 ile %38,6 arasında değişmiştir. Bu oranların incir genomunun özellikleriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Biyolojik tekrarlar arasında veri kalitesinin benzer düzeyde bulunması, sonraki analizler için karşılaştırılabilirlik sağlamaktadır (Şekil 3.20).



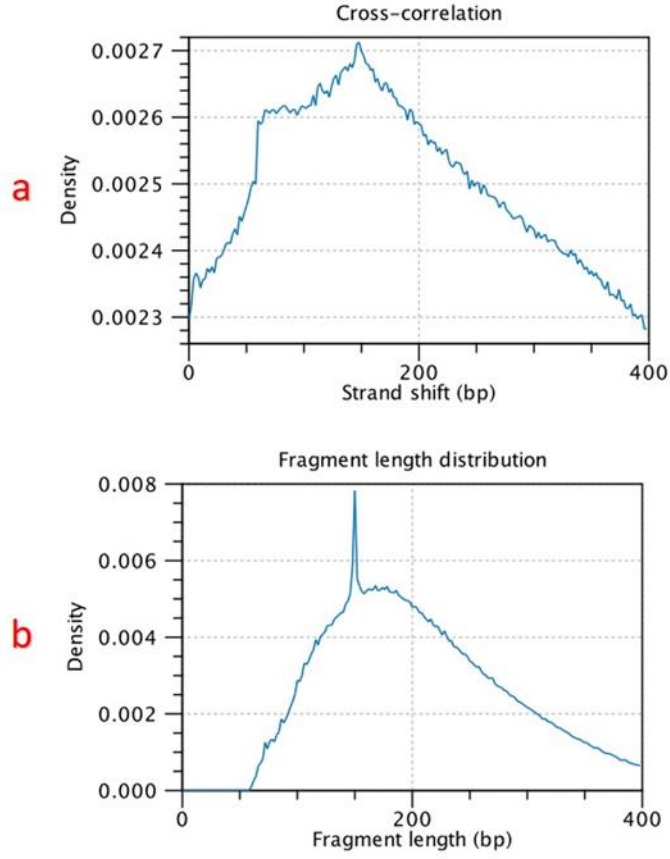
Şekil 3.20. İncir çeşitlerinde GC içerikleri (%).

Elde edilen ChIP-seq çıktıları, ENCODE TF–ChIP-seq kalite standartlarıyla tam uyum göstermektedir. Her örnekte ham okuma derinliği 41,2–68,9 milyon, temiz (clean) okuma sayısı 34,7–57,4 milyon aralığındadır. Bu değerler, ENCODE tarafından tanımlanan her replikatta ≥ 20 milyon “usable fragments” eşliğini

fazlasıyla karşılamaktadır (ENCODE Project Consortium, 2017, 2025; Hitz vd., 2023; Landt vd., 2012). Filtreleme sonrası etkinlik oranı %83,3–87,7 aralığında seyretmekte ve düşük gürültüyle yüksek veri verimliliğine işaret etmektedir. Hata oranı yaklaşık %0,01 düzeyinde ($\approx$ Q40) kalmıştır; Q20/Q30 değerleri sırasıyla $\geq$ %97 ve $\geq$ %93 olarak saptanmıştır. Q-skorlarının Phred tanımı gereği Q30 $\approx$ %99,9 doğruluk anlamına geldiği dikkate alındığında, baz kalitesinin pik belirleme (peak calling) ve motif analizi için yeterli olduğu sonucuna varılmaktadır (Bailey vd., 2013; Illumina, 2012).

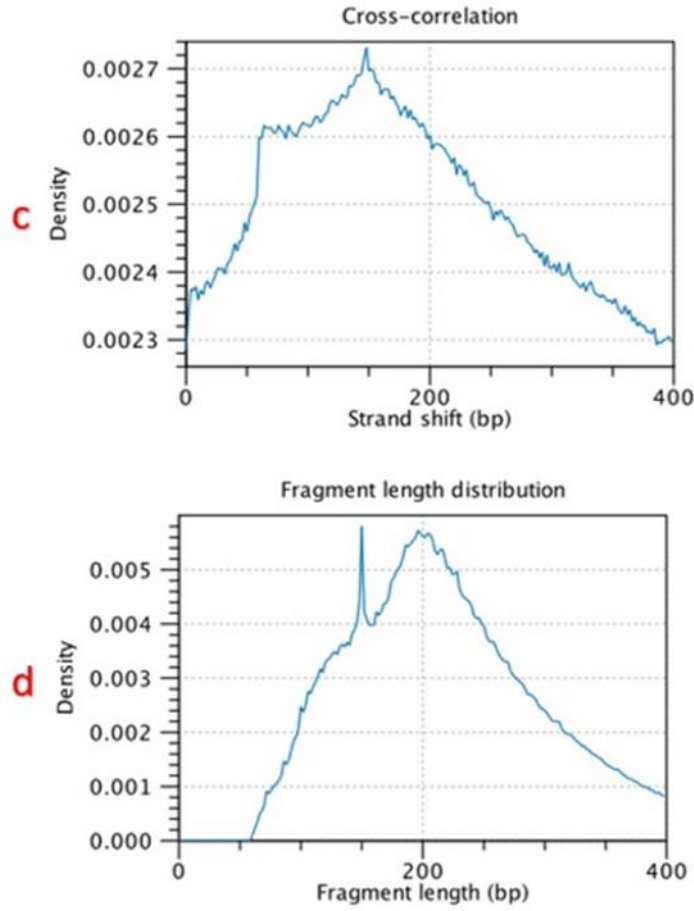
Verilerin GC içeriği %36,8–38,6 aralığındadır. Bu dağılım, *F. carica* çekirdek genomunun bildirilen GC oranı ($\sim$ %33–35) ve plastom dizilerinin ($\sim$ %36) aralıklarıyla uyum göstermektedir. GC içeriğinde gözlenen sınırlı sapma, dizileme teknolojilerinde bilinen bir sistematik yanlılık türü olarak kabul edilmekte ve uygun normalizasyon işlemleriyle etkisi azaltılabilmektedir (Bao vd., 2023; Benjamini ve Speed, 2012; Ross vd., 2013).

Sarılop örneğinde hizalanmış ve duplikasyonlardan arındırılmış benzersiz fragman sayısı 23.608.361'dir. Çapraz korelasyon (cross-correlation) eğrisinden türetilen kalite metrikleri RSC = 1,00 ve NSC = 2,28'dir; bu değerler TF ChIP-seq için literatürde raporlanan eşiklerin (RSC > 0,8; NSC > 1,05) üzerindedir (Landt vd., 2012). Okuma uzunluğu 150 bp, tahmini fragman uzunluğu 150 bp ve pik belirleme için tahmini pencere boyutu 742 bp'dir. Şekil 3.21'de çapraz korelasyon eğrisi (a) ve fragman uzunluğu dağılımı (b) gösterilmektedir. Fragman pikinin a panelinde 150–180 bp aralığında, baskın modun ise b panelinde 150 bp'de gözlendiği görülmektedir.



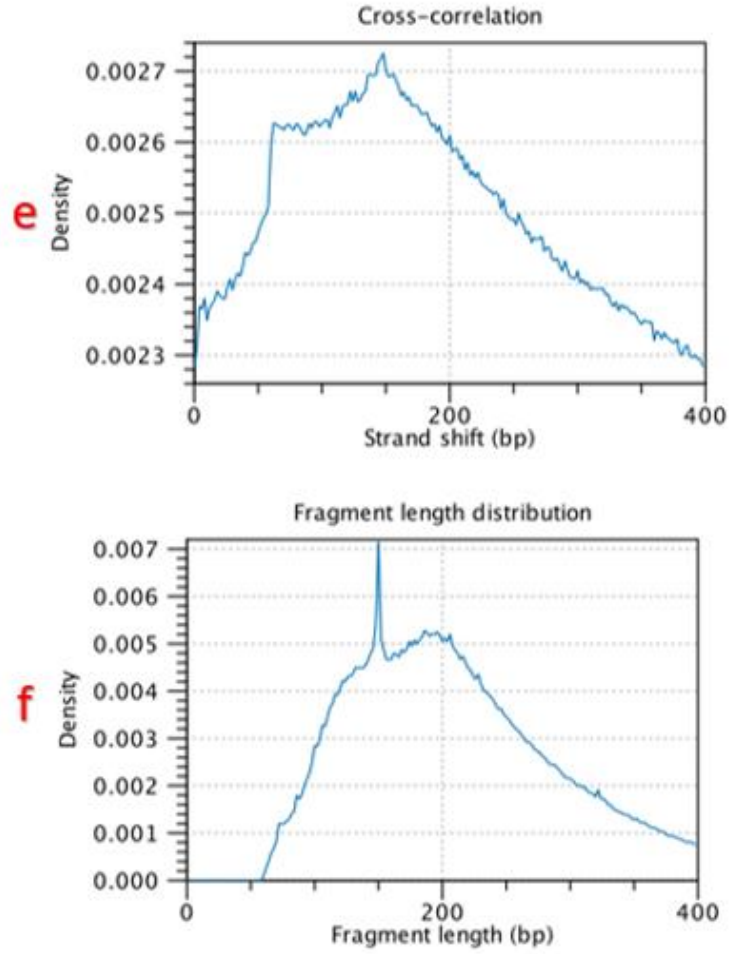
Şekil 3.21. Sarılop Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (a) ve fragman uzunluk dağılımı (b) grafikleri.

Sarı Zeybek örneğinde hizalanmış ve duplikasyonlardan arındırılmış benzersiz fragman sayısı 27.601.432’dir. Strand çapraz-korelasyonuna dayalı kalite metrikleri $RSC = 1,00$ ve $NSC = 2,213$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, TF-ChIP-seq analizleri için önerilen eşiklerin ($RSC > 0,8$; $NSC > 1,05$) üzerindedir (Landt vd., 2012; ENCODE PhantomPeakQualTools). Okuma uzunluğu 150 bp, tahmini fragman uzunluğu 197 bp ve pik belirleme için tahmini pencere boyutu 789 bp’dir. Şekil 3.22c–d’de çapraz korelasyon eğrisi (c) ve fragman uzunluğu dağılımı (d) gösterilmektedir. Fragman pikinin, c panelinde 160–170 bp aralığında; d panelinde ise ~150 bp’de dar, sivri bir pik ve ~200 bp civarında geniş bir mod şeklinde gözlemlendiği görülmektedir.



Şekil 3.22. Sarı Zeybek Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (c) ve fragman uzunluk dağılımı (d) grafikleri.

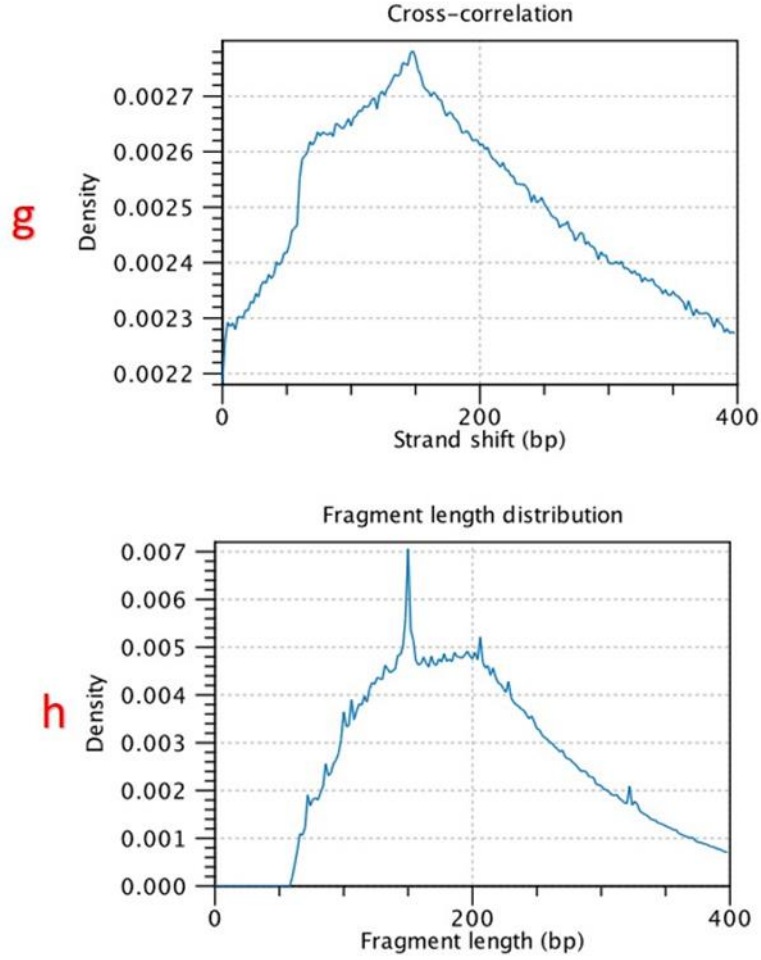
Kaba İlek örneğinde hizalanmış ve duplikasyonlardan arındırılmış benzersiz fragman sayısı 25.981.535'tir. Strand çapraz-korelasyon metrikleri $RSC = 0,982$ ve $NSC = 2,215$ 'tir; bu değerler TF-ChIP-seq için önerilen eşiklerin ($RSC > 0,8$; $NSC > 1,05$) üzerindedir (Landt vd., 2012; ENCODE PhantomPeakQualTools). Okuma uzunluğu 150 bp, tahmini fragman uzunluğu 150 bp ve pik belirleme için tahmini pencere boyutu 738 bp'dir. Şekil 3.23e-f'de, çapraz korelasyon eğrisi (e) ~160–180 bp aralığında belirgin bir fragman pikini göstermektedir. Fragman uzunluğu dağılımı (f) ise ~150 bp'de dar, sivri bir pik ve ~190–200 bp civarında geniş bir mod içermektedir.



Şekil 3.23. Kaba ilek Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (e) ve fragman uzunluk dağılımı (f) grafikleri.

Hamza İlek örneğinde hizalanmış ve duplikasyonlardan arındırılmış benzersiz fragman sayısı 40.669.464 olarak hesaplanmıştır. Strand çapraz korelasyon metrikleri $RSC = 0,997$ ve $NSC = 2,43$ olup, TF-ChIP-seq için önerilen eşiklerin ($RSC > 0,8$; $NSC > 1,05$) üzerindedir (Landtvd., 2012; ENCODE PhantomPeakQualTools). Okuma uzunluğu 150 bp, tahmini fragman uzunluğu 150 bp ve pik belirleme için tahmini pencere boyutu 738 bp'dir. Şekil 3.24g-h'de çapraz korelasyon eğrisi (g), ~160–180 bp aralığında belirgin bir fragman pikine

işaret etmektedir. Fragman uzunluğu dağılımında (**h**), ~150 bp’de dar, sivri bir pik ve ~190–200 bp civarında daha geniş bir omuz (mod) gözlenmiştir.



Şekil 3.24. Hamza ilek Strand-kaydırma çapraz-korelasyon (g) ve fragman uzunluk dağılımı (h) grafikleri.

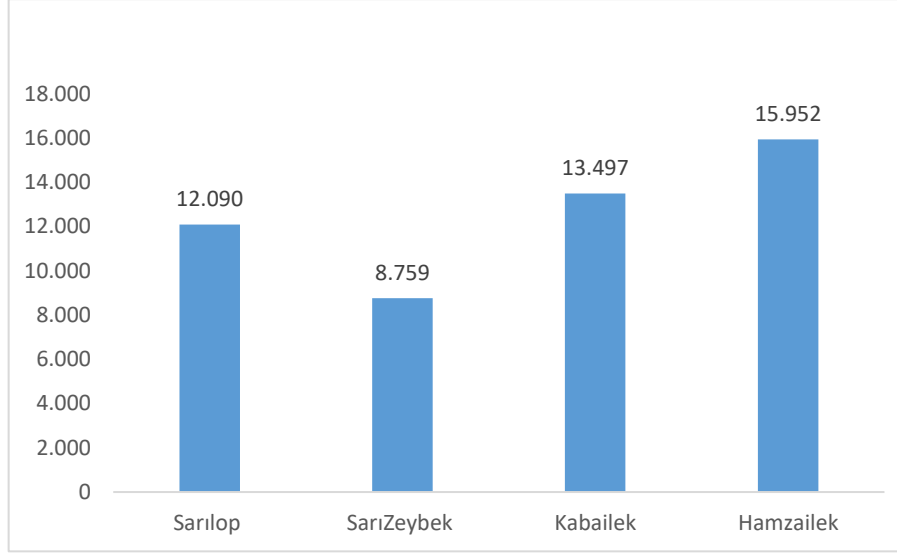
Sarılop örneğinde benzersiz fragman 23.608.361, RSC = 1,00, NSC = 2,28, okuma 150 bp, fragman 150 bp ve pencere 742 bp; Sarı Zeybek örneğinde benzersiz fragman 27.601.432, RSC = 1,00, NSC = 2,213, okuma 150 bp, fragman 197 bp ve pencere 789 bp; Kaba İlek örneğinde benzersiz fragman 25.981.535, RSC = 0,982, NSC = 2,215, okuma 150 bp, fragman 150 bp ve pencere 738 bp; Hamza İlek örneğinde ise benzersiz fragman 40.669.464, RSC = 0,997, NSC = 2,43, okuma 150 bp, fragman 150 bp ve pencere 738 bp kaydedilmiştir. Tüm örneklerde NSC > 1,05 ve RSC > 0,8 sınırlarının aşılması, gerçek fragman bağlanma bölgesinin arka plan ve “phantom peak”e üstün geldiğini ve TF–ChIP-seq için sinyal–gürültü oranının yeterli düzeyde seyrettiğini gösterir (ENCODE Project, 2025; Landt vd., 2012).

Çapraz korelasyon profillerinde ~150–180/200 bp bandındaki belirgin bağlanma bölgesi ile fragman uzunluğu dağılımlarında ~150 bp’de dar bağlanma bölgesi ve ~190–200 bp civarında omuz/mod gözlemleri, mono-nükleozomal boyut hâkimiyetini ve özgül bağlanma zenginleşmesini destekler (Landt vd., 2012). Pencere değerlerinin (742–789–738 bp) tahmini fragman uzunluklarıyla orantılı olması dar-pik TF çağrısı için beklenen parametrelerle uyumludur; metriklerin bütünlüğü, veri setinin pik belirleme ve motif zenginleştirme gibi aşağı akış analizleri için yayın standardında yeterlik taşıdığını gösterir (ENCODE Project, 2025; Hitz vd., 2023; Landt vd., 2012).

Geliştirilen antikor-bağımsız, çaprazlamalı *in vitro* ChIP-seq iş akışı, ürettiği sekans verilerinin kalite profiliyle yöntemsel geçerliliğini kanıtlamaktadır: okuma derinlikleri hedef aralıkların üzerinde; baz kalitesi (Q20/Q30) ve GC profilleri dengeli; NSC ve RSC değerleri ise TF-ChIP-seq için önerilen eşikleri sistematik biçimde aşmaktadır (NSC > 1.05; RSC > 0.8). Bu göstergeler, özgül bağlanma sinyallerinin arka plana üstün geldiğini ve kütüphane bütünlüğünün yüksek olduğunu teyit eder; pik belirleme ile motif zenginleştirme adımlarında biyolojik olarak anlamlı çıktılar elde edilmesini sağlar. Sonuç olarak, akış şeması ölçülebilir, tekrarlanabilir ve yayın standardında veri üretmekte; yöntemin işlevsel olarak çalıştığını ve güvenilir sekans verisi sağladığını göstermektedir (ENCODE Project, 2025; Landt vd., 2012).

3.6.2 Pik Belirleme Sonuçları

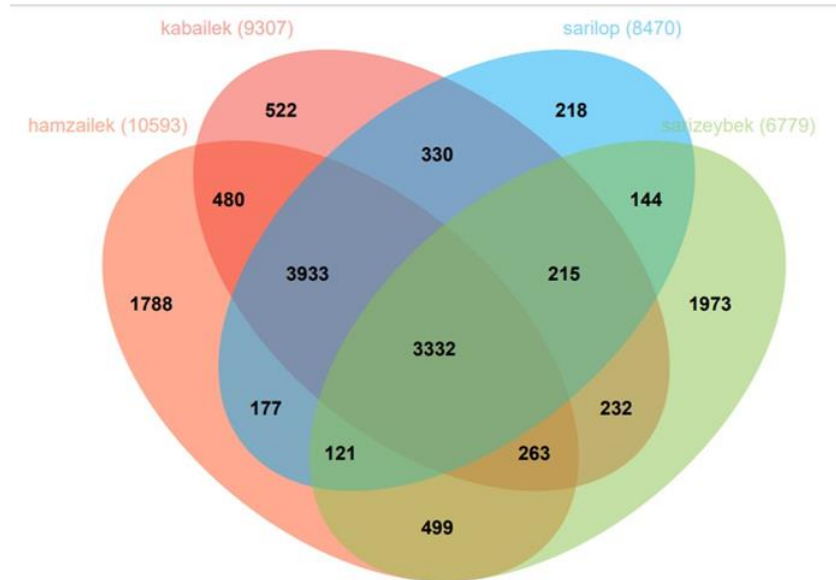
Pik belirleme analizi sonucunda her bir örneğe ait bağlanma bölgeleri (pik) belirlenmiştir. Hamza ilek örneğinde 15.952, Kaba ilek örneğinde 13.497, Sarılop örneğinde 12.090 ve Sarı Zeybek örneğinde 8.759 pik tespit edilmiştir (Şekil 3.25). Örnekler arasında saptanan pik sayılarının bu aralıkta seyretmesi, incelenen R2R3-MYB transkripsiyon faktörünün genom genelinde kapsamlı bir bağlanma repertuarı sergilediğini göstermektedir. Bu bulgu, MYB ailesinin bitkilerde gelişim, sekonder metabolizma ve stres yanıtları gibi çoklu biyolojik süreçlerde tanımlanan yaygın düzenleyici rolleriyle tutarlıdır (Dubos vd., 2010; Ma vd., 2025; Wu vd., 2024).



Şekil 3.25. İncir çeşitlerinde pık belirleme analizi ile belirlenen toplam pık sayıları.

3.6.3 Ortak ve Özgül Pıkların Karşılaştırılması

Çeşitler arası karşılaştırma, transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgelerinin hem korunmuş hem de çeşit-özl özellikler taşıdığını ortaya koymuştur. Venn diyagramı analizine göre Hamza İlek'e özl 1.788, Kaba İlek'e özl 522, Sarılop'a özl 218 ve Sarı Zeybek 'e özl 1.973 pık tanımlanmıştır (Şekil 3.26). Bunun yanında dört çeşidin tümünde ortak olarak bulunan bağlanma bölgeleri de belirlenmiştir.



Şekil 3.26. İncir çeşitlerinde *FcMYB125* bağlanma bölgelerinin Venn diyagramı

Dört çeşitte ortak olarak saptanan pik kümeleri, muhtemelen korunmuş bir “çekirdek bağlanma programı”na işaret etmektedir. Çeşitlere özgü pik varlığı ise genotipe özgü cis-düzenleyici mimari ve kromatin bağlamındaki farklılıklarla uyumludur (Engelhorn vd., 2025; O’Malley vd., 2016).

Venn diyagramında raporlanan değerlerin, önceki bölümde verilen toplam pik sayılarından daha düşük görünmesi beklenen bir durumdur; çünkü bu temsiller yalnızca kesişim ve özgüllük sınıflarını yansıtır ve çoğu zaman ek eşikleme/filtreleme adımları uygulanır. Dolayısıyla toplam pik sayıları, filtreleme kriterleri ve analiz parametrelerine bağlı olarak Venn diyagramında farklı şekilde yansıtılabilmektedir. Bu tür sayısal karşılaştırmaların aynı pik belirleme parametreleri ve normalizasyon yaklaşımları altında standardize edilmesi gereklidir; çünkü pik sayıları kullanılan yöntem ve varsayım kümelerine duyarlıdır (Colando vd., 2025; Feng vd., 2012; Zhang vd., 2008).

Cinsiyetler arası karşılaştırmada erkek çeşitlerde ortak bulunan 480 pik, dişi çeşitlerde ise 144 ortak pik belirlenmiştir (Şekil 3.26). İncirin ginodioik yapısı gereği erkek bireylerde hem erkek hem de gal (dişi tip) çiçekleri bulunurken, dişi bireylerde yalnızca dişi çiçekler bulunmaktadır. Bu nedenle sonraki karşılaştırmaların net bir şekilde yapılabilmesi için analizler erkek bireyler üzerinden yürütülmüştür. Erkek bireylerde daha yüksek doku çeşitliliğinin bulunması, ortak bağlanma kümesinin görece genişliğini açıklayabilir (Dubos vd., 2010; Ma vd., 2025).

Çeşitler ve cinsiyetler arasında saptanan ortak/özgül pik kümeleri ile Venn kesişimlerine dayalı desen birlikte değerlendirildiğinde, MYB temelli düzenlemenin hem korunmuş (ortak) hem de çeşide özgü katmanlarını açığa çıkardığı ve saptanan pik yoğunluklarının genom çapında biyolojik olarak anlamlı bir düzenleyici bağlanma mimarisini yansıttığı anlaşılmaktadır.

3.6.4 Erkek bireylere Özgü Bağlanma Bölgelerinin Fonksiyonel Analizi

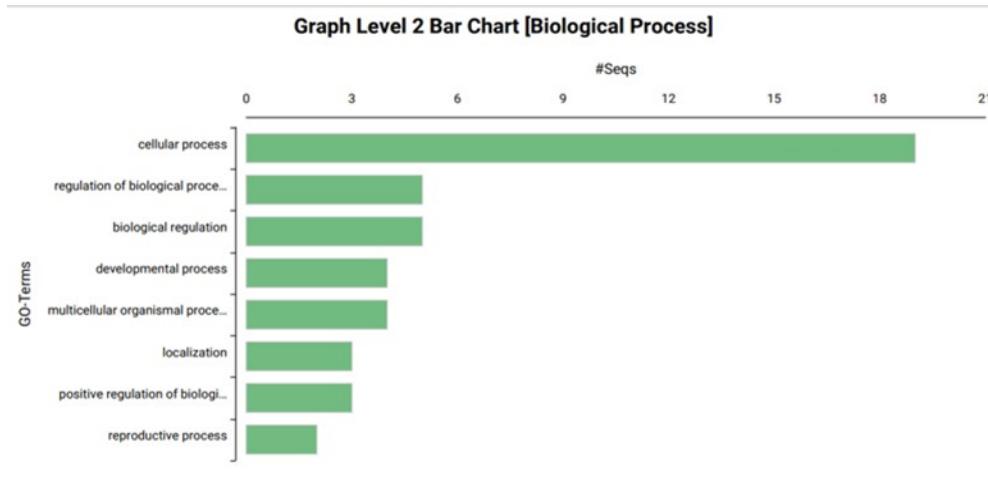
Erkek bireylerde belirlenen özgül bağlanma bölgelerinin fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi, transkripsiyon faktörünün düzenleyici rolünün kapsamını anlamak açısından önemlidir. Erkek incirlerde hem erkek hem de gal (dişi tip) çiçeklerinin bulunması, bu bireylerde transkripsiyonel düzenlemenin daha bütüncül bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Venn diyagramı analizi sonucunda erkek çeşitlerde ortak olup dişi çeşitlerde bulunmayan 480 bağlanma bölgesi tanımlanmıştır (EK 6). Bu bölgeler üzerinden gerçekleştirilen GO ve KEGG analizleri, erkeklere özgü bağlanma bölgelerinin yalnızca erkek çiçek gelişimi ve polen biyolojisi ile değil, aynı zamanda bu süreçleri destekleyen çeşitli hücrel ve metabolik işlevlerle de ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

3.6.4.1 Gen Ontolojisi (GO) Analiz Sonuçları

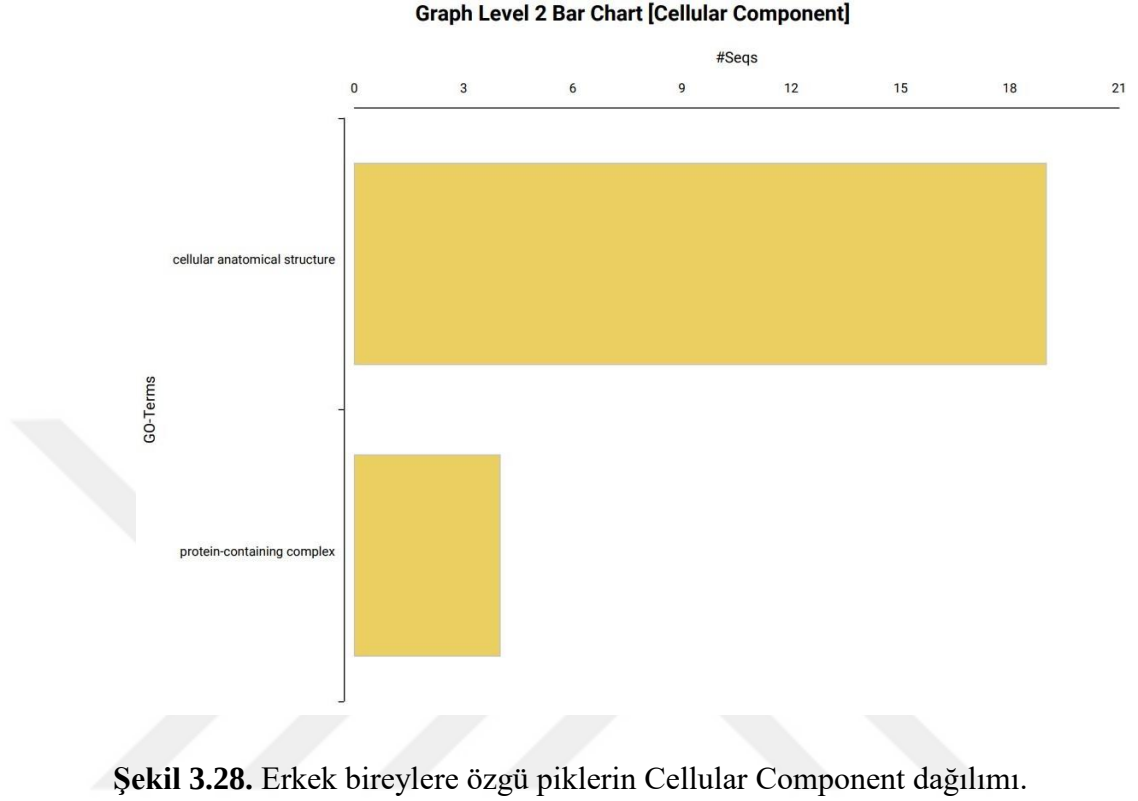
Erkek bireylerde ortak olup dişi bireylerde bulunmayan 480 bağlanma bölgesi üzerinden gerçekleştirilen Gen Ontolojisi (GO) analizi sonucunda, ilişkili genler Biyolojik Süreç (BP), Hücrel Bileşen (CC) ve Moleküler İşlev(MF) olmak üzere üç ana kategori altında sınıflandırılmıştır.

GO üst kategori dağılımları incelendiğinde, erkek bireylere özgü bağlanma bölgelerinin Biyolojik Süreç düzeyinde ağırlıklı olarak hücrel süreç terimi altında toplandığı görülmüştür. Bunun yanı sıra biyolojik süreçlerin düzenlenmesi, biyolojik düzenleme, gelişimsel süreç, çok hücreli organizma düzeyinde süreç, lokalizasyon, biyolojik süreçlerin pozitif düzenlenmesi ve üreme süreci terimlerinde de anlamlı temsil saptanmıştır (Şekil 3.27).

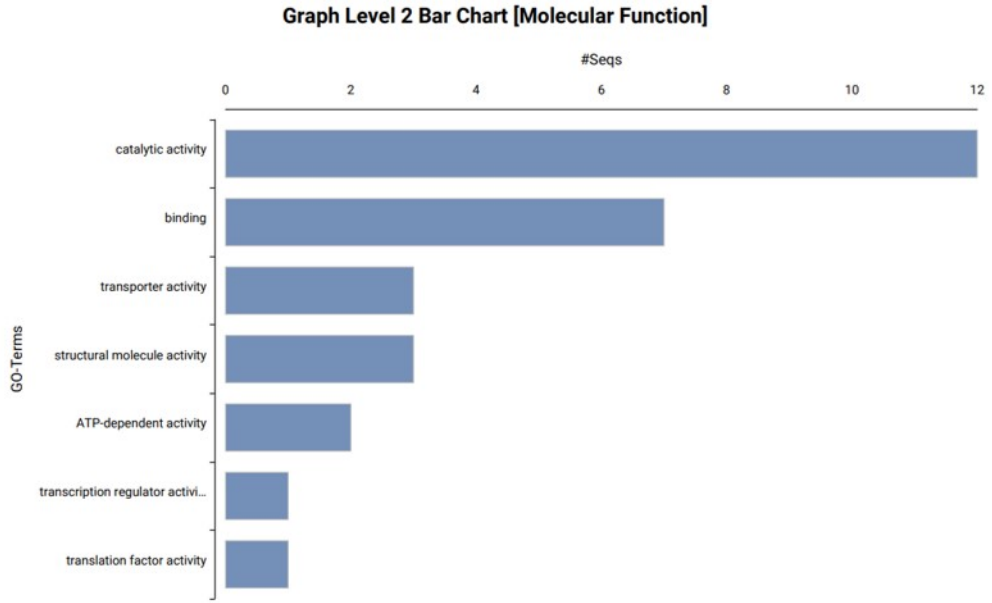


Şekil 3.27. Erkek bireylere özgü piklerin Biological Process dağılımı

Hücresel Bileşen analizinde, erkek bireylere özgü bağlanma bölgelerinin başlıca hücresel anatomik yapı ve protein içeren kompleks terimleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.28).



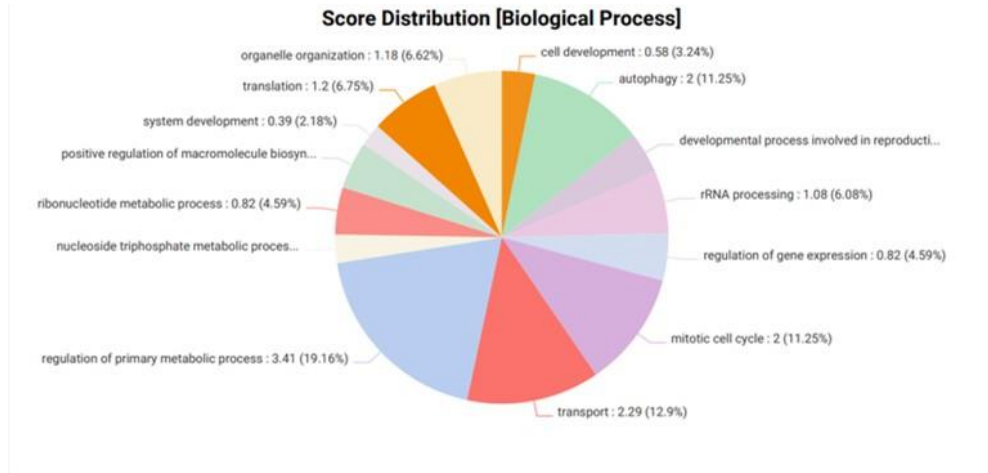
Moleküler İşlev kategorisinde ise erkek bireylere özgü bağlanma bölgeleri en yüksek oranda katalitik aktivite altında sınıflandırılmış; bunun yanı sıra bağlanma, taşıyıcı aktivitesi, yapısal molekül aktivitesi, ATP'ye bağımlı aktivite, transkripsiyon düzenleyici aktivite ve translasyon faktörü aktivitesi terimlerinde de anlamlı zenginleşme gözlenmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Erkek bireylere özgü piklerin Molecular Function dağılımı.

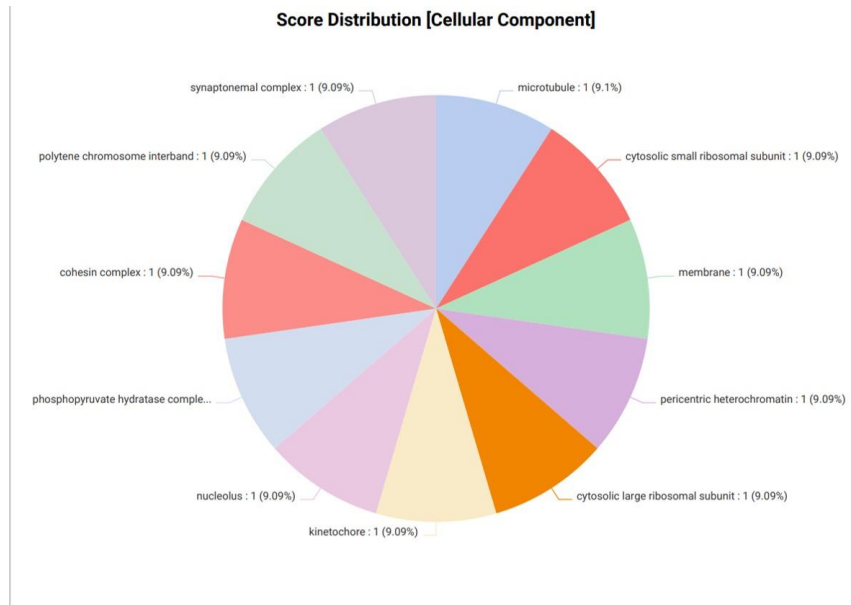
Biyolojik Süreç, Hücresel Bileşen ve Moleküler İşlev kategorileri arasındaki hiyerarşik ilişkilerin ayrıntılı görselleştirmeleri Ek 3–5’te sunulmuştur.

Üst kategori dağılımlarının ardından gerçekleştirilen GO düzey-2 skor dağılımı analizleri, erkek bireylere özgü düzenleyici imzanın daha ayrıntılı bir işlevsel çerçevesini ortaya koymuştur. Erkek incirlerde ortak bağlanma bölgeleriyle ilişkili genlerin Biyolojik Süreç düzey-2 sınıflandırmasında, birincil metabolik süreç (%19,16) ve taşıma (%12,9) en yüksek paya sahip terimler olarak öne çıkmıştır. Bunları mitotik hücre döngüsü (%11,25) ve otofaji (%11,25) izlemiştir. Daha düşük oranlarda translasyon (protein sentezi), organel organizasyonu, ribonükleotid metabolizması ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi temel biyolojik süreçler temsil edilmiştir (Şekil 3.30). Bu dağılım, erkek-özü genlerin özellikle hücre döngüsü, metabolik düzenleme ve hücresel taşıma süreçleriyle ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.30. Erkek bireylere özgü GO–BP Score Distribution grafiği.

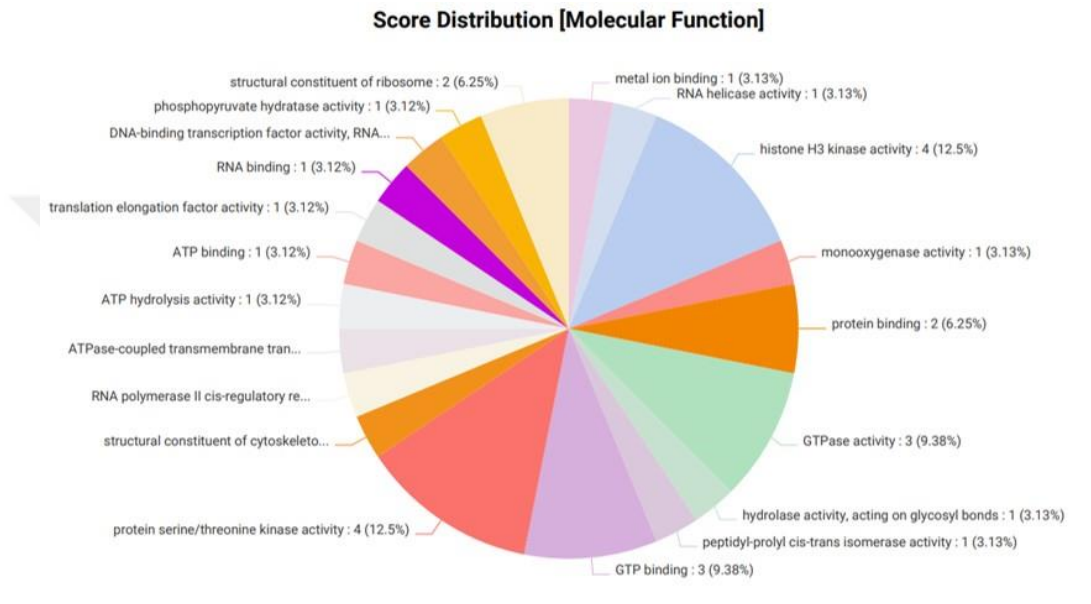
Hücresel Bileşen düzey-2 analizinde, sinaptonemal kompleks, sitozolik küçük ribozomal altbirim, membran, kohezin kompleksi, çekirdekçik, kinetokor, perisentromerik heterokromatin, mikrotübül ve politene kromozom interband bölgesi gibi bileşenlerin her birinin benzer oranlarda temsil edildiği görülmüştür (Şekil 3.31). Bu durum, erkek-özgü genlerin tek bir hücresel yapıda yoğunlaşmadığını; kromatin organizasyonu, ribozomal yapı ve hücre iskeleti ile ilişkili çok katmanlı bir düzenleyici ağ içerisinde yer aldığını göstermektedir.



Şekil 3.31. Erkek bireylere özgü GO–CC Score Distribution grafiği

Moleküler İşlev düzey-2 analizinde fonksiyonel çeşitlilik dikkat çekmiştir. Protein serin/treonin kinaz aktivitesi ve histon H3 kinaz aktivitesi (%12,5'er) en

yüksek temsil edilen terimler olurken, GTP bağlanması ve GTPaz aktivitesi (%9,38'er) bunları izlemiştir. Ayrıca DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörü aktivitesi, RNA bağlanması, ATP bağlanması, ATP hidrolizi aktivitesi, metal iyonu bağlanması ve mono-oksijenaz aktivitesi gibi temel moleküler işlevler de daha düşük oranlarda tanımlanmıştır (Şekil 3.32). Bu sonuçlar, erkek-özgü genlerin özellikle kinaz temelli sinyal iletimi, nükleotid bağlanması ve transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarıyla ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.32. Erkek bireylere özgü GO–MF Score Distribution grafiği

Erkek incirlerde ortak bağlanma bölgeleriyle ilişkili genlerin GO profili genel olarak değerlendirildiğinde, Biyolojik Süreç, Hücresel Bileşen ve Moleküler İşlev üst terimlerinin (örn. hücresel süreç, katalitik aktivite, bağlanma, ATP'ye bağımlı aktivite, protein içeren kompleks) baskınlığı, transkripsiyon faktörü hedeflerinden türetilen gen listelerinde ontolojinin hiyerarşik yapısı gereği üst düzeyde yoğunlaşma beklenmesinin doğal bir yansımasıdır; bu durum özgül biyolojik hipotezleri dışlamaz, aksine yolak düzeyindeki bulguların bağlamını güçlendirir (Chicco ve Jurman, 2022; Gene Ontology Consortium, 2023).

Bu çerçevede saptanan Biyolojik Süreç ağırlıkları, DUO1'un erkek gamet soyunu başlatan düzenleyici rolü ve tapetal transkripsiyonel kaskadla uyumlu çekirdek bir erkek gametofitik programa işaret etmektedir (Borg vd., 2011; Brownfield vd., 2009; Lu vd., 2020; Sprunck vd., 2012; Wang vd., 2018; Xiong

vd., 2016). Bu programın aşağı akımında, sporopollenin biyogenezi için zorunlu olan ACOS5, CYP703A2, CYP704B1, PKSA/LAP6, PKSB/LAP5 ve TKPR1/2 gibi enzimlerin aktivasyonu beklenmekte ve literatürde doğrulanmış bulunmaktadır (de Azevedo Souza vd., 2009; Dobritsa vd., 2009; Grienemberger vd., 2010; Kim vd., 2010; Morant vd., 2007).

Hücrel Bileşen ve Moleküler İşlev düzeylerinde gözlenen zenginleşmeler; polen tüpü apikal eksositozunda görev alan EXOCYST kompleksinin kutupsal hedeflenmesi, ROP–GTPaz sinyaliyle bağlantılı Ca^{2+} gradyenti ve RBOHH/J kaynaklı reaktif oksijen türleri üretimiyle düzenlenen büyüme mekanizmaları ve erkek gametofitte 26S proteazom altbirimlerinin zorunlu rolü ile tutarlıdır (Gallois vd., 2009; Kaya vd., 2014; Lassig vd., 2014; Li vd., 2017; Marković vd., 2020; Zhang vd., 2013). Ayrıca taşıyıcı aktivitesi ve translasyon faktörü temsilleri, polen ve polen tüpünde karbon akışı, hızlı protein sentezi ve translatomun yeniden programlanması gerekliliğini vurgulamaktadır (Hafidh vd., 2018; Poidevin vd., 2021; Wu vd., 2024).

Sonuç olarak, incirde DUO1 ChIP-seq analizi ile tanımlanan erkek-özgü GO imzası, DUO1 tarafından kontrol edilen erkek gametofite özgü transkripsiyonel programın ve buna eşlik eden hücrel lojistik modüllerinin (taşıma ağıları, EXOCYST ve ubiquitin–proteazom sistemi) bütüncül bir çıktısını yansıtmaktadır (Borg vd., 2011).

3.6.4.2 KEGG, Reactome ve Plant Reactome Analizleri

Erkek bireylere özgü 480 bağlanma bölgesi üzerinden gerçekleştirilen KEGG, Reactome ve Plant Reactome analizlerinde sırasıyla 132, 147 ve 99 yolak tanımlanmıştır (Tablo 3.2). Bununla birlikte, tüm veritabanlarında çoklu test düzeltmeleri sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir zenginleşme saptanmamıştır. Bu durumun; *F. carica* genom anotasyonunun görece sınırlı olması, erkek-özgü gen setinin küçük yapısı, çok sayıda yolakta yalnızca 1–2 genle temsil edilmesi ve çoklu karşılaştırmalara bağlı olarak istatistiksel gücün azalması ile ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Bu gözlem, ortolojiye dayalı yolak haritalamalarında küçük hedef listelerle çalışıldığında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur ve düzenleyici bölge-gen kümesi temelli istatistiklerin doğasıyla uyumludur (Kanehisa ve Goto, 2000; McLean vd., 2010; Welch vd., 2014; Naithani vd., 2020; Kanehisa vd., 2023).

İstatistiksel anlamlılık eşiğinin aşılmamış olmasına karşın, yolak içeriklerinin biyolojik tutarlılık sergilediği görülmüştür. Özellikle Trikarboksilik Asit (TCA/Krebs) Döngüsünün yaklaşık 40 genle temsil edilmesi, erkek üreme dokularında yüksek enerji üretimi ve solunum gereksiniminin belirginliğine işaret etmektedir. Bu durum, polen olgunlaşması ve polen tüpü büyümesinin yoğun metabolik talep gerektirdiğini ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur (Selinski ve Scheibe, 2014).

Yolak analizlerinde ayrıca anter ve polen gelişimi, çiçek gelişimi, vejetatif sürgün apikal meristeminden (SAM) generatif SAM'e geçiş ve uzun gün koşullarıyla düzenlenen florijen ekspresyonu ile ilişkili süreçler dikkat çekmiştir. Bu yolaklar, fotoperiyodik çiçeklenme kararının FT/TSF aracılığıyla SAM'a iletilmesini temel alan çekirdek düzenleyici çerçeveye uyumludur (Andrés ve Coupland, 2012; Golembeski ve Imaizumi, 2015).

Erkek bireylerde üreme süreçlerini dolaylı olarak destekleyen hormon sinyal iletim yolları da belirgin biçimde temsil edilmiştir. Bu kapsamda oksin sinyal iletimi, absisik asit (ABA) aracılı sinyal iletimi, jasmonik asit biyosentezi ve sinyal iletimi (özellikle beş gen üzerinden), brassinosteroid sinyal iletimi, salisilik asit sinyal iletimi ve zeatin biyosentezi, erkek çiçek gelişimini düzenleyici potansiyele sahip süreçler olarak öne çıkmıştır. Literatürle karşılaştırıldığında; oksinin endoteksyum lignifikasyonu ve anter açılma zamanlamasını düzenlediği (Cecchetti vd., 2008; Cecchetti vd., 2013), ABA'nın stres koşullarında anter gelişimi ve polen fertilitasını modüle ettiği (Dong vd., 2017), jasmonatın erkek fertilitate için zorunlu olduğu (Jewell ve Browse, 2016; Wasternack ve Song, 2017), brassinosteroidlerin anter ve polen genlerini doğrudan hedefleyerek fertilitateyi belirlediği (Ye vd., 2010) ve sitokinin-TSF ekseninin çiçeklenme geçişini uyardığı bilinmektedir (D'Aloia vd., 2011). Salisilik asit düzeylerindeki azalmaların ise ılımlı sıcaklıklarda polen performansını artırabildiği rapor edilmiştir (Jansma vd., 2022).

Anter ve polen gelişimiyle ilişkili bu yolaklar, tapetal hücrelerde tanımlanan DYT1 → TDF1 → AMS → MS188 (MYB80) → MS1 transkripsiyonel kaskadı ve bunun aşağı akımında yer alan ACOS5, CYP703A2, CYP704B1, PKSA/LAP6, PKSB/LAP5 ve TKPR1/2 gibi sporopollenin biyogenezi için zorunlu enzimlerle mekanistik açıdan uyum göstermektedir (de Azevedo Souza vd., 2009; Dobritsa

vd., 2009; Grienberger vd., 2010; Kim vd., 2010; Morant vd., 2007; Wang vd., 2018; Xiong vd., 2016).

Polen tüpünün kutupsal büyümesiyle ilişkili olarak, ROP-Ca²⁺-reaktif oksijen türleri (ROS) geri besleme  evrimi, NADPH oksidaz RBOHH/J eksenini ve EXOCYST kompleksinin (SEC3A, EXO70A1, EXO70A2, SEC8) apikale hedeflenmesi, hem yolak analizlerinde hem de  nceki GO sonuçlarında gözlenen biyolojik düzenleme, lokalizasyon ve protein içeren kompleks temsilleriyle örtüşmektedir (Kaya vd., 2014; Fendrych vd., 2010; Li vd., 2017).

Moleküler işlev düzeyinde gözlenen katalitik aktivite, bağlanma ve ATP'ye bağımlı aktivite ağırlığı; P450/PKS/TKPR basamakları ile proteazom ve kinaz katkılarını yansıtırken, taşıyıcı aktivitesi sinyali anterden polene karbon taşınması ve polen tüpünde şeker alımını sağlayan SWEET/RPG ve STP taşıyıcılarıyla uyumludur (Dobritsa vd., 2009; Isoda vd., 2022; Rottmann vd., 2018, Sun vd., 2013).

Son olarak, *F. carica*'da iki erkek bireyde ortak olarak saptanan DUO1 ChIP-seq bağlanma profili, *Arabidopsis thaliana*'da DUO1'un jeneratif hücrede erkek gamet farklılaşmasını başlatan transkripsiyonel rolü ve HTR10/MGH3, DAZ1/DAZ2, GEX2 ve HAP2/GCS1 gibi hedeflerle tanımlanmış düzenleyici ağ ile uyum göstermektedir (Brownfield vd., 2009; Borg vd., 2011).

Bu çerçevede, burada listelenen genler istatistiksel zenginleşme eşiklerini aşmamış olsa da, erkek örneklerde gözlenen  zg l DUO1 bağlanması ve literatürde polen/anter gelişimi ile polen t p hücre duvarı dinamikleriyle ilişkilendirilen işlevsel rolleri nedeniyle, erkek üreme biyolojisi bağlamında ileri doğrulamalar için önceliklendirilen aday genler olarak raporlanmıştır (Cosgrove, 2024; Zhang vd., 2024; Wiese vd., 2024; Micol-Ponce vd., 2023; UniProt Consortium, 2025; UniProtKB, 2025).

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolakları

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Plant Reactome	HSFA7/ HSFA6B-regulatory network-induced by drought and ABA.	R-ZJA-9623703	<i>Zoysia japonica</i>	1
Plant Reactome	Intracellular auxin transport	R-PVE-8868949	<i>Pistacia vera</i>	1
Plant Reactome	Secologanin and strictosidine biosynthesis	R-PPE-1119438	<i>Prunus persica</i>	1
Plant Reactome	Cholesterol biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	R-BNA-1119286	<i>Brassica napus</i>	1
Plant Reactome	Salicylic acid signaling	R-OME-6788019	<i>Oryza meridionalis</i>	1
Plant Reactome	Abscisic acid (ABA) mediated signaling	R-PAV-3899351	<i>Prunus avium</i>	1
Plant Reactome	Jasmonic acid biosynthesis	R-FVE-1119332	<i>Fragaria vesca</i>	5
Plant Reactome	Brassinosteroid signaling	R-OBA-5632095	<i>Oryza barthii</i>	1
Plant Reactome	Arsenic uptake and detoxification	R-HAN-9618218	<i>Helianthus annuus</i>	1
Plant Reactome	Xyloglucan biosynthesis	R-CAN-5655101	<i>Capsicum annuum</i>	1
Plant Reactome	SNAC1 transcription network involved in drought and salinity tolerance	R-OSA-9627499	<i>Oryza sativa</i>	1
Plant Reactome	Root elongation	R-GSU-9675508	<i>Galdieria sulphuraria</i>	1
Plant Reactome	Activation of pre-replication complex	R-BNA-9645850	<i>Brassica napus</i>	1
Plant Reactome	Galactosylcyclitol biosynthesis	R-FVE-1119341	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Isoleucine biosynthesis from threonine	R-FVE-1119460	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Development of root hair	R-PAV-9639861	<i>Prunus avium</i>	1
Plant Reactome	Hydroxycinnamic acid serotonin amides biosynthesis	R-FVE-1119344	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	TCA cycle (plant)	R-TUR-1119533	<i>Triticum urartu</i>	1
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-BOL-9611432	<i>Brassica oleracea</i>	1
Plant Reactome	Anther and pollen development	R-PAB-8986768	<i>Picea abies</i>	1
Plant Reactome	Proline biosynthesis V (from arginine)	R-JCU-1119318	<i>Jatropha curcas</i>	1
Plant Reactome	Carotenoid biosynthesis	R-OME-1119449	<i>Oryza meridionalis</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Plant Reactome	Secologanin and strictosidine biosynthesis	R-VVN-1119438	<i>Vitis vinifera</i>	1
Plant Reactome	Response to cold temperature	R-ZJA-8879007	<i>Zoysia japonica</i>	1
Plant Reactome	Choline biosynthesis I	R-VVN-1119556	<i>Vitis vinifera</i>	1
Plant Reactome	Arsenic uptake and detoxification	R-GSU-9618218	<i>Galdieria sulphuraria</i>	1
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-FVE-9611432	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Absciscic acid (ABA) mediated signaling	R-ZJA-3899351	<i>Zoysia japonica</i>	1
Plant Reactome	Auxin signalling	R-VVN-5608118	<i>Vitis vinifera</i>	1
Plant Reactome	HSFA7/ HSFA6B-regulatory network-induced by drought and ABA.	R-PAV-9623703	<i>Prunus avium</i>	1
Plant Reactome	Oryzalide A biosynthesis	R-FVE-9610720	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Brassinosteroid signaling	R-HAN-5632095	<i>Helianthus annuus</i>	1
Plant Reactome	Primary root development	R-JCU-9030654	<i>Jatropha curcas</i>	1
Plant Reactome	Regulation of seed size	R-ATA-9035605	<i>Aegilops tauschii</i>	1
Plant Reactome	Sucrose biosynthesis	R-CCP-1119465	<i>Corchorus capsularis</i>	1
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-TTU-9611432	<i>Triticum turgidum</i>	1
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-BRA-9611432	<i>Brassica rapa</i>	1
Plant Reactome	Carotenoid biosynthesis	R-ONI-1119449	<i>Oryza nivara</i>	1
Plant Reactome	CMP-KDO biosynthesis II (from D-arabinose 5-phosphate)	R-BNA-1119532	<i>Brassica napus</i>	1
Plant Reactome	Tetrahydrofolate biosynthesis I	R-FVE-1119265	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Arginine biosynthesis	R-FVE-1119263	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Response to phosphate deficiency	R-CSI-9031225	<i>Citrus sinensis</i>	1
Plant Reactome	Suberin biosynthesis	R-OSA-1119418	<i>Oryza sativa</i>	1
Plant Reactome	Ammonia assimilation cycle	R-CCP-1119443	<i>Corchorus capsularis</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Plant Reactome	Response to cold temperature	R-PAB-8879007	<i>Picea abies</i>	2
Plant Reactome	Starch biosynthesis	R-SLY-1119477	<i>Solanum lycopersicum</i>	1
Plant Reactome	Tricin biosynthesis	R-CSI-9609573	<i>Citrus sinensis</i>	1
Plant Reactome	GDP-L-fucose biosynthesis I (from GDP-D-mannose)	R-DCA-1119620	<i>Daucus carota</i>	1
Plant Reactome	Pantothenate and coenzyme A biosynthesis III	R-FVE-1119394	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Phenylpropanoid biosynthesis	R-CSI-1119316	<i>Citrus sinensis</i>	1
Plant Reactome	Salicylic acid signaling	R-GSU-6788019	<i>Galdieria sulphuraria</i>	1
Plant Reactome	G1/S-specific transcription	R-OSA-9646031	<i>Oryza sativa</i>	1
Plant Reactome	Galactose degradation II	R-CCP-1119452	<i>Corchorus capsularis</i>	1
Plant Reactome	Cholesterol biosynthesis I	R-BNA-1119559	<i>Brassica napus</i>	1
Plant Reactome	Cholesterol biosynthesis III (via desmosterol)	R-BNA-1119439	<i>Brassica napus</i>	1
Plant Reactome	Sucrose biosynthesis	R-SLY-1119465	<i>Solanum lycopersicum</i>	1
Plant Reactome	Valine biosynthesis	R-FVE-1119600	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Arginine degradation	R-FVE-1119289	<i>Fragaria vesca</i>	2
Plant Reactome	Regulation of seed size	R-OSA-9035605	<i>Oryza sativa</i>	1
Plant Reactome	Tricin biosynthesis	R-ATR-9609573	<i>Amborella trichopoda</i>	1
Plant Reactome	Response to Drought	R-OSA-9623744	<i>Oryza sativa</i>	1
Plant Reactome	Jasmonic acid signaling	R-TCA-6787011	<i>Theobroma cacao</i>	1
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-AHA-9611432	<i>Arabidopsis halleri</i>	2
Plant Reactome	Response to cold temperature	R-FVE-8879007	<i>Fragaria vesca</i>	2
Plant Reactome	TCA cycle (plant)	R-TPR-1119533	<i>Trifolium pratense</i>	40
Plant Reactome	Arginine biosynthesis II (acetyl cycle)	R-FVE-1119622	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	13-LOX and 13-HPL pathway	R-FVE-1119618	<i>Fragaria vesca</i>	5
Plant Reactome	Anther and pollen development	R-CRU-8986768	<i>Capsella rubella</i>	1
Plant Reactome	Phenylpropanoid biosynthesis	R-OEU-1119316	<i>Olea europaea</i> var. <i>syvestris</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Plant Reactome	GDP-D-rhamnose biosynthesis	R-DCA-1119428	<i>Daucus carota</i>	1
Plant Reactome	Glycolipid desaturation	R-TPR-1119300	<i>Trifolium pratense</i>	1
Plant Reactome	TCA cycle (plant)	R-OLO-1119533	<i>Oryza longistaminata</i>	1
Plant Reactome	Proline biosynthesis I	R-FVE-1119631	<i>Fragaria vesca</i>	2
Plant Reactome	Sphingolipid metabolism	R-BRA-1119325	<i>Brassica rapa</i>	1
Plant Reactome	Maternal tissue PCD	R-OSA-9623513	<i>Oryza sativa</i>	2
Plant Reactome	Methionine salvage pathway	R-OEU-1119624	<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	1
Plant Reactome	Beta-alanine biosynthesis II	R-OLO-1119445	<i>Oryza longistaminata</i>	3
Plant Reactome	Tetrahydrofolate biosynthesis II	R-FVE-1119523	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Flower development	R-FVE-9609102	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Capsidiol biosynthesis	R-CSI-1119499	<i>Citrus sinensis</i>	1
Plant Reactome	Response to cold temperature	R-JCU-8879007	<i>Jatropha curcas</i>	1
Plant Reactome	Transition from vegetative to reproductive shoot apical meristem	R-FVE-8934257	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Methylerythritol phosphate pathway	R-OME-1119464	<i>Oryza meridionalis</i>	1
Plant Reactome	Intracellular auxin transport	R-ACH-8868949	<i>Actinidia chinensis</i>	1
Plant Reactome	Regulation of seed size	R-CCN-9035605	<i>Coffea canephora</i>	1
Plant Reactome	Arsenic uptake and detoxification	R-CSI-9618218	<i>Citrus sinensis</i>	1
Plant Reactome	Jasmonic acid signaling	R-MGU-6787011	<i>Erythranthe guttata</i>	1
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-ATH-9611432	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2
Plant Reactome	Valine degradation	R-DCA-1119479	<i>Daucus carota</i>	1
Plant Reactome	Lateral root initiation	R-TPR-9030557	<i>Trifolium pratense</i>	1
Plant Reactome	Long day regulated expression of florigens	R-FVE-8934036	<i>Fragaria vesca</i>	1
Plant Reactome	Glycine betaine biosynthesis III	R-OLO-1119579	<i>Oryza longistaminata</i>	1
Plant Reactome	Proline biosynthesis V (from arginine)	R-FVE-1119318	<i>Fragaria vesca</i>	2
Plant Reactome	Glutamine biosynthesis I	R-CCP-1119293	<i>Corchorus capsularis</i>	1
Plant Reactome	Maturation	R-CAN-9675782	<i>Capsicum annuum</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Plant Reactome	Recognition of fungal and bacterial pathogens and immunity response	R-DCA-9611432	<i>Daucus carota</i>	1
Plant Reactome	Nitrate assimilation	R-CCP-1119291	<i>Corchorus capsularis</i>	1
Plant Reactome	Salicylic acid signaling	R-ECU-6788019	<i>Eragrostis curvula</i>	1
Plant Reactome	Momilactone biosynthesis	R-FVE-1119308	<i>Fragaria vesca</i>	1
KEGG	Cysteine and methionine metabolism	ko00270	-	1
KEGG	Plant-pathogen interaction	ko04626	-	4
KEGG	Lysine degradation	ko00310	-	1
KEGG	RNA degradation	ko03018	-	2
KEGG	Toll and Imd signaling pathway	ko04624	-	3
KEGG	Retinol metabolism	ko00830	-	1
KEGG	Toll-like receptor signaling pathway	ko04620	-	3
KEGG	mRNA surveillance pathway	ko03015	-	1
KEGG	NOD-like receptor signaling pathway	ko04621	-	4
KEGG	Nucleocytoplasmic transport	ko03013	-	3
KEGG	HIF-1 signaling pathway	ko04066	-	2
KEGG	Ribosome	ko03010	-	3
KEGG	NF-kappa B signaling pathway	ko04064	-	3
KEGG	Tuberculosis	ko05152	-	3
KEGG	Tryptophan metabolism	ko00380	-	2
KEGG	Glycine, serine and threonine metabolism	ko00260	-	1
KEGG	Monobactam biosynthesis	ko00261	-	1
KEGG	Prolactin signaling pathway	ko04917	-	2
KEGG	Steroid hormone biosynthesis	ko00140	-	2
KEGG	Citrate cycle (TCA cycle)	ko00020	-	1
KEGG	Biotin metabolism	ko00780	-	1
KEGG	Ovarian steroidogenesis	ko04913	-	2
KEGG	Chemical carcinogenesis - receptor activation	ko05207	-	1
KEGG	Insulin signaling pathway	ko04910	-	2

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
KEGG	Lysine biosynthesis	ko00300	-	1
KEGG	Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	ko05208	-	2
KEGG	Proteoglycans in cancer	ko05205	-	1
KEGG	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	ko01521	-	1
KEGG	Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	-	2
KEGG	Flavonoid biosynthesis	ko00941	-	1
KEGG	Chemical carcinogenesis - DNA adducts	ko05204	-	1
KEGG	Herpes simplex virus 1 infection	ko05168	-	3
KEGG	Epstein-Barr virus infection	ko05169	-	3
KEGG	Cell cycle	ko04110	-	2
KEGG	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	ko00945	-	1
KEGG	Biosynthesis of cofactors	ko01240	-	3
KEGG	Human T-cell leukemia virus 1 infection	ko05166	-	1
KEGG	Cell cycle - yeast	ko04111	-	1
KEGG	Influenza A	ko05164	-	4
KEGG	Plant hormone signal transduction	ko04075	-	5
KEGG	Measles	ko05162	-	3
KEGG	Hepatitis B	ko05161	-	3
KEGG	Cortisol synthesis and secretion	ko04927	-	2
KEGG	Galactose metabolism	ko00052	-	1
KEGG	Arginine and proline metabolism	ko00330	-	2
KEGG	Prodigiosin biosynthesis	ko00333	-	1
KEGG	Ubiquitin mediated proteolysis	ko04120	-	1
KEGG	Coronavirus disease - COVID-19	ko05171	-	6
KEGG	Human immunodeficiency virus 1 infection	ko05170	-	4
KEGG	Valine, leucine and isoleucine degradation	ko00280	-	1
KEGG	Methane metabolism	ko00680	-	1
KEGG	Alcoholic liver disease	ko04936	-	3
KEGG	Glycerolipid metabolism	ko00561	-	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
KEGG	Cushing syndrome	ko04934	-	2
KEGG	Non-alcoholic fatty liver disease	ko04932	-	1
KEGG	Glycerophospholipid metabolism	ko00564	-	2
KEGG	Autophagy - yeast	ko04138	-	2
KEGG	Carbon fixation pathways in prokaryotes	ko00720	-	1
KEGG	Mitophagy - yeast	ko04139	-	1
KEGG	Regulation of actin cytoskeleton	ko04810	-	1
KEGG	Sphingolipid metabolism	ko00600	-	1
KEGG	Hepatocellular carcinoma	ko05225	-	1
KEGG	Autophagy - other	ko04136	-	2
KEGG	MAPK signaling pathway - plant	ko04016	-	2
KEGG	Tight junction	ko04530	-	1
KEGG	Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	ko00603	-	1
KEGG	Ras signaling pathway	ko04014	-	2
KEGG	Homologous recombination	ko03440	-	1
KEGG	MAPK signaling pathway	ko04010	-	3
KEGG	Apelin signaling pathway	ko04371	-	1
KEGG	Oxidative phosphorylation	ko00190	-	1
KEGG	Arachidonic acid metabolism	ko00590	-	1
KEGG	Cutin, suberine and wax biosynthesis	ko00073	-	3
KEGG	alpha-Linolenic acid metabolism	ko00592	-	1
KEGG	Purine metabolism	ko00230	-	1
KEGG	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	-	1
KEGG	Phagosome	ko04145	-	1
KEGG	Peroxisome	ko04146	-	2
KEGG	Endocytosis	ko04144	-	1
KEGG	Gap junction	ko04540	-	1
KEGG	Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141	-	2
KEGG	Autophagy - animal	ko04140	-	1
KEGG	Fatty acid biosynthesis	ko00061	-	2

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
KEGG	Cyanoamino acid metabolism	ko00460	-	2
KEGG	Thermogenesis	ko04714	-	3
KEGG	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	ko00980	-	1
KEGG	Drug metabolism - cytochrome P450	ko00982	-	2
KEGG	Drug metabolism - other enzymes	ko00983	-	1
KEGG	Terpenoid backbone biosynthesis	ko00900	-	1
KEGG	Indole alkaloid biosynthesis	ko00901	-	1
KEGG	Monoterpenoid biosynthesis	ko00902	-	1
KEGG	AMPK signaling pathway	ko04152	-	1
KEGG	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	ko01040	-	1
KEGG	Fanconi anemia pathway	ko03460	-	1
KEGG	Diterpenoid biosynthesis	ko00904	-	1
KEGG	mTOR signaling pathway	ko04150	-	1
KEGG	PI3K-Akt signaling pathway	ko04151	-	1
KEGG	Zeatin biosynthesis	ko00908	-	1
KEGG	Vascular smooth muscle contraction	ko04270	-	1
KEGG	Protein export	ko03060	-	1
KEGG	Ubiqui- and other terpenoid-qui-biosynthesis	ko00130	-	1
KEGG	Glycolysis / Gluconeogenesis	ko00010	-	1
KEGG	Fluid shear stress and atherosclerosis	ko05418	-	1
KEGG	Retrograde endocannabinoid signaling	ko04723	-	1
KEGG	Lipid and atherosclerosis	ko05417	-	4
KEGG	Diabetic cardiomyopathy	ko05415	-	1
KEGG	Neurotrophin signaling pathway	ko04722	-	3
KEGG	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	ko04961	-	1
KEGG	Huntington disease	ko05016	-	2

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
KEGG	Vasopressin-regulated water reabsorption	ko04962	-	1
KEGG	Yersinia infection	ko05135	-	3
KEGG	Amyotrophic lateral sclerosis	ko05014	-	2
KEGG	Pertussis	ko05133	-	3
KEGG	Parkinson disease	ko05012	-	3
KEGG	Legionellosis	ko05134	-	1
KEGG	Alzheimer disease	ko05010	-	2
KEGG	Salmonella infection	ko05132	-	6
KEGG	Pathogenic Escherichia coli infection	ko0513	-	6
KEGG	Pyrimidine metabolism	ko002400	-	1
KEGG	Propanoate metabolism	ko00640	-	1
KEGG	Vitamin digestion and absorption	ko04977	-	1
KEGG	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	-	1
KEGG	Ribosome biogenesis in eukaryotes	ko03008	-	2
KEGG	Protein digestion and absorption	ko04974	-	1
KEGG	Pancreatic secretion	ko04972	-	1
KEGG	Amoebiasis	ko05146	-	1
KEGG	Longevity regulating pathway - worm	ko04212	-	2
KEGG	Toxoplasmosis	ko05145	-	4
KEGG	Chagas disease	ko05142	-	3
KEGG	Pathways of neurodegeneration - multiple diseases	ko05022	-	2
KEGG	Leishmaniasis	ko05140	-	4
KEGG	Prion disease	ko05020	-	2
Reactome	Ion homeostasis	R-CFA-5578775	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	R-DDI-69601	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	mRNA 3'-end processing	R-GGA-72187	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Ub-specific processing proteases	R-XTR-5689880	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Processing of DNA double-strand break ends	R-DDI-5693607	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Cohesin Loading onto Chromatin	R-DME-2470946	<i>Drosophila melanogaster</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Interaction With Cumulus Cells And The Zona Pellucida	R-DRE-2534343	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Glyoxylate metabolism and glycine degradation	R-DDI-389661	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	R-DDI-72695	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	Biosynthesis of maresins	R-CFA-9018682	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Separation of Sister Chromatids	R-DRE-2467813	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Carnitine metabolism	R-DDI-200425	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Coenzyme A biosynthesis	R-DDI-196783	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-RNO-6798695	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Reactome	HSF1 activation	R-DRE-3371511	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Activation of ATR in response to replication stress	R-DDI-176187	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	DDX58/IFIH1-mediated induction of interferon-alpha/beta	R-XTR-168928	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-DRE-6798695	<i>Danio rerio</i>	5
Reactome	Energy dependent regulation of mTOR by LKB1-AMPK	R-DDI-380972	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Estrogen biosynthesis	R-DME-193144	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Macroautophagy	R-DDI-1632852	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Antigen processing: Ubiquitination ve Proteasome degradation	R-HSA-983168	<i>Homo sapiens</i>	2
Reactome	CYP2E1 reactions	R-DRE-211999	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Regulation of cytoskeletal remodeling and cell spreading by IPP complex components	R-SSC-446388	<i>Sus scrofa</i>	1
Reactome	MAPK6/MAPK4 signaling	R-PFA-5687128	<i>Plasmodium falciparum</i>	1
Reactome	Antigen processing: Ubiquitination ve Proteasome degradation	R-XTR-983168	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Glycosphingolipid metabolism	R-DDI-1660662	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	R-RNO-6791226	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Reactome	Fatty acids	R-MMU-211935	<i>Mus musculus</i>	1
Reactome	Protein methylation	R-DRE-8876725	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Respiratory electron transport	R-GGA-611105	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	RNA Polymerase II Transcription Termination	R-GGA-73856	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	R-DDI-975957	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	NMD independent of the EJC	R-DDI-975956	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	NOTCH1 Intracellular Domain Regulates Transcription	R-HSA-2122947	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Regulation of the apoptosome activity	R-RNO-9627069	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Reactome	Iron uptake and transport	R-DRE-917937	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Formation of a pool of free 40S subunits	R-DDI-72689	<i>Dictyostelium discoideum</i>	3
Reactome	Activation of Ca-permeable Kainate Receptor	R-BTA-451308	<i>Bos taurus</i>	1
Reactome	Macroautophagy	R-MMU-1632852	<i>Mus musculus</i>	1
Reactome	Gluconeogenesis	R-DDI-70263	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Interleukin-1 signaling	R-SSC-9020702	<i>Sus scrofa</i>	1
Reactome	TP53 Regulates Metabolic Genes	R-GGA-5628897	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Negative regulation of NOTCH4 signaling	R-HSA-9604323	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Hydrolysis of LPC	R-BTA-1483115	<i>Bos taurus</i>	1
Reactome	PI5P, PP2A and IER3 Regulate PI3K/AKT Signaling	R-CFA-6811558	<i>Canis familiaris</i>	2
Reactome	TP53 Regulates Metabolic Genes	R-DDI-5628897	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	Polo-like kinase mediated events	R-DRE-156711	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Transport of bile salts and organic acids, metal ions and amine compounds	R-CFA-425366	<i>Canis familiaris</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Transcriptional Regulation by E2F6	R-DDI-8953750	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Platelet degranulation	R-HSA-114608	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Cholesterol biosynthesis via lathosterol	R-XTR-6807062	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-GGA-6798695	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Cytoprotection by HMOX1	R-GGA-9707564	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Ribosomal scanning and start codon recognition	R-DDI-72702	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	Interconversion of nucleotide di- and triphosphates	R-DME-499943	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Endogenous sterols	R-DME-211976	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	ABC transporters in lipid homeostasis	R-DME-1369062	<i>Drosophila melanogaster</i>	2
Reactome	Collagen biosynthesis and modifying enzymes	R-DRE-1650814	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition	R-DRE-69273	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	R-DME-2500257	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Anchoring of the basal body to the plasma membrane	R-CFA-5620912	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Postmitotic nuclear pore complex (NPC) reformation	R-SCE-9615933	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
Reactome	VxPx cargo-targeting to cilium	R-CFA-5620916	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Activation of caspases through apoptosome-mediated cleavage	R-RNO-111459	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Reactome	Neddylation	R-HSA-8951664	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-PFA-6798695	<i>Plasmodium falciparum</i>	1
Reactome	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	R-XTR-381426	<i>Xenopus tropicalis</i>	2
Reactome	Glycolysis	R-DDI-70171	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Interleukin-1 signaling	R-CFA-9020702	<i>Canis familiaris</i>	2
Reactome	RHOBTB1 GTPase cycle	R-MMU-9013422	<i>Mus musculus</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Constitutive Signaling by NOTCH1 PEST Domain Mutants	R-HSA-2644606	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Loss of Function of FBXW7 in Cancer and NOTCH1 Signaling	R-HSA-2644607	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Presynaptic phase of homologous DNA pairing and strand exchange	R-DDI-5693616	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	Interleukin-1 signaling	R-BTA-9020702	<i>Bos taurus</i>	2
Reactome	Digestion of dietary carbohydrate	R-DRE-189085	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Synthesis, secretion, and inactivation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1)	R-XTR-381771	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Chk1/Chk2 of Cyclin B:Cdk1 complex	R-DRE-75035	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-DDI-6798695	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Eukaryotic Translation Elongation	R-DRE-156842	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Striated Muscle Contraction	R-HSA-390522	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	R-DRE-2500257	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-DME-6798695	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Cell redox homeostasis	R-HSA-1222541	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	SUMOylation of DNA damage response and repair proteins	R-DDI-3108214	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	PLL kinase binds to TUB in the TL receptor 'signalling complex'	R-DME-214874	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Processing of Intronless Pre-mRNAs	R-GGA-77595	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Neutrophil degranulation	R-CEL-6798695	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1
Reactome	RAF activation	R-DRE-5673000	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	CD163 mediating an anti-inflammatory response	R-HSA-9662834	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Cyclin E associated events during G1/S transition	R-DRE-69202	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Tolerance by Mtb to nitric oxide produced by macrophages	R-HSA-1222538	<i>Homo sapiens</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Synthesis of Prostaglandins (PG) and Thromboxanes (TX)	R-DRE-2162123	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	R-DDI-1799339	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	Cohesin Loading onto Chromatin	R-DRE-2470946	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Organic anion transport	R-CFA-561048	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Negative regulation of the PI3K/AKT network	R-DDI-199418	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane	R-HSA-1445148	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	FMO oxidises nucleophiles	R-GGA-217271	<i>Gallus gallus</i>	2
Reactome	HDL remodeling	R-DME-8964058	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Cytosolic sulfonation of small molecules	R-DRE-156584	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	EET and dihydroxyeicosatrienoic acids (DHET)	R-MMU-2142670	<i>Mus musculus</i>	1
Reactome	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	R-DDI-72706	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Reactome	Glutamate and glutamine metabolism	R-HSA-8964539	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	PI5P, PP2A and IER3 Regulate PI3K/AKT Signaling	R-RNO-6811558	<i>Rattus norvegicus</i>	2
Reactome	Glutamate and glutamine metabolism	R-CEL-8964539	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1
Reactome	Branched-chain amino acid catabolism	R-DDI-70895	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Cholesterol biosynthesis via desmosterol	R-XTR-6807047	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	PI5P, PP2A and IER3 Regulate PI3K/AKT Signaling	R-SSC-6811558	<i>Sus scrofa</i>	1
Reactome	RAB geranylgeranylation	R-CFA-8873719	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	RMTs methylate histone arginines	R-SCE-3214858	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
Reactome	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	R-DDI-156827	<i>Dictyostelium discoideum</i>	3
Reactome	Regulation of RUNX2 expression and activity	R-HSA-8939902	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Reduction of cytosolic Ca++ levels	R-CFA-418359	<i>Canis familiaris</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	R-DDI-6791226	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Biosynthesis of maresin-like SPMs	R-DRE-9027307	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Transport of bile salts and organic acids, metal ions and amine compounds	R-SPO-425366	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
Reactome	mRNA Splicing - Major Pathway	R-DDI-72163	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	G2/M DNA replication checkpoint	R-DRE-69478	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Fatty acids	R-DRE-211935	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Synthesis of PC	R-CFA-1483191	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Detoxification of ROS	R-DDI-3299685	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	Proton/oligopeptide cotransporters	R-DRE-427975	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis	R-HSA-390471	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	RND1 GTPase cycle	R-XTR-9696273	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Ion transport by P-type ATPases	R-XTR-936837	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Cysteine synthesis from O-acetylserine	R-MTU-936721	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
Reactome	DL and DIF homodimers complexed with CACT are all phosphorylated in the TL receptor 'signalling complex'	R-DME-214844	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	DL and DIF homodimers bind to TUB and phosphorylated PLL in the TL receptor 'signalling complex'	R-DME-214842	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Ion transport by P-type ATPases	R-CFA-936837	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Synthesis, secretion, and inactivation of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP)	R-XTR-400511	<i>Xenopus tropicalis</i>	1
Reactome	Xenobiotics	R-MMU-211981	<i>Mus musculus</i>	1

Tablo 3.2. Erkek bireylere özgü 480 pik üzerinden tanımlanan KEGG, Reactome ve Plant Reactome yolları (Devam)

Veritabanı	Biyolojik Yolak	Kimlik (ID)	Tür	Diziler
Reactome	Constitutive Signaling by NOTCH1 HD+PEST Domain Mutants	R-HSA-2894862	<i>Homo sapiens</i>	1
Reactome	Synthesis of epoxy (EET) and dihydroxyeicosatrienoic acids (DHET)	R-CFA-2142670	<i>Canis familiaris</i>	1
Reactome	Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry	R-DRE-69656	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Establishment of Sister Chromatid Cohesion	R-DRE-2468052	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Choline catabolism	R-DDI-6798163	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	mRNA Splicing - Major Pathway	R-GGA-72163	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	AMPK inhibits chREBP transcriptional activation activity	R-DDI-163680	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1
Reactome	mRNA Splicing - Minor Pathway	R-GGA-72165	<i>Gallus gallus</i>	1
Reactome	Miscellaneous substrates	R-DRE-211958	<i>Danio rerio</i>	1
Reactome	Establishment of Sister Chromatid Cohesion	R-DME-2468052	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Cholesterol biosynthesis	R-SSC-191273	<i>Sus scrofa</i>	1
Reactome	Activated PLL kinase is autophosphorylated in the TL receptor 'signalling complex'	R-DME-214862	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Phosphorylated CACT, DL and DIF homodimers dissociate from the TL receptor 'signalling complex'	R-DME-214869	<i>Drosophila melanogaster</i>	1
Reactome	Interleukin-1 signaling	R-RNO-9020702	<i>Rattus norvegicus</i>	2

3.6.5 Marker Adayı Genlerin Seçimi

Erkek incirlere özgü 480 bağlanma bölgesi üzerinden yürütülen ChIP-seq analizleri, doğrudan ya da dolaylı biçimde erkek çiçek ve üreme gelişimiyle ilişkili genleri işaret etmiştir. Marker adayı genlerin belirlenmesinde, polene özgü ifade, erkek gamet gelişimi ve üreme süreçleriyle (polen tanınması, polen tüpü büyümesi vb.) ilişkilendirilebilecek işlevsel ipuçları sunan genlere odaklanılmıştır. Teknik kaynaklı varyasyon olasılığını azaltmak amacıyla, yalnızca Hamza İlek ve/veya Kaba İlek çeşitlerinde saptanan ve dişi çeşitlerde bulunmayan bağlanma bölgeleri değerlendirilmeye alınmıştır.

Bu ölçütler doğrultusunda, GO anotasyonları ile protein alan/domain mimarileri birlikte değerlendirilerek erkek üreme süreçleriyle ilişkilendirilebilecek toplam 10 gen marker adayları olarak seçilmiştir (Tablo 3.3). Seçilen adaylar; polen-özgü proteinler, polen alerjeni/expansin mimarisiyle uyumlu proteinler, erkek gametogenezle ilişkili proteinler, motil erkek gamet (MSP) alanı içeren proteinler ve polen tanınması (recognition of pollen, GO:0048544) süreciyle ilişkili lektin-tip reseptör benzeri kinazları (RLK) kapsamaktadır.

Bu adaylar arasında yer alan TIFTF001_000911 kodlu *pollen-specific protein SF21-benzeri* gen, UniProt ve InterPro sınıflandırmalarına göre SF21/NDRG protein ailesi içerisinde yer almakta olup, bu ailenin polen-spesifik ekspresyon profili önceki transkriptom çalışmalarında gösterilmiştir (Allen vd., 2010; Lazarescu vd., 2006; Paysan-Lafosse vd., 2023). Bu özellikler, söz konusu genin erkek üreme biyolojisiyle doğrudan ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

TIFTF001_011106, TIFTF001_010700 ve TIFTF001_053729 genlerinde tanımlanan expansin/polen alerjeni mimarisi (DPBB/EG45 ve selüloz bağlayıcı üst-aile motifleri), hücre duvarı gevşemesi ve polen tüpü uç büyümesi süreçleriyle uyumludur. Bu yapısal özellikler, polen tüpünün yönlü ve hızlı uzamasında görev alan mekanizmalarla örtüşmektedir (Li vd., 2003; Cosgrove, 2015; Yennawar vd., 2006).

TIFTF001_005034, TIFTF001_026056, TIFTF001_053360 ve TIFTF001_020112 genleri, lektin-tip reseptör benzeri kinaz / serin-treonin kinaz kümesi içerisinde yer almakta olup, polen–pistil etkileşimlerinde tanıma ve sinyal iletimi süreçlerine işaret etmektedir. Bu durum, söz konusu genlerin GO’nun Moleküler İşlev ve Biyolojik Süreç terimleriyle uyumlu anotasyonlar sergilemesiyle desteklenmektedir (Blum vd., 2025; Boisson-Dernier vd., 2013; Escobar-Restrepo vd., 2007; Ge vd., 2017; Samuel vd., 2009; The Gene Ontology Consortium, 2025; The UniProt Consortium, 2025).

TIFTF001_007346 kodlu SPATA20-benzeri aday genin, InterPro veritabanında *six-hairpin glycosidase-like* üst ailesi (IPR012341) kapsamında sınıflandırılması, bu proteinin karbonhidrat-aktif enzimlerde sık rastlanan bir yapısal çerçeveye ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, TIFTF001_007346 geninin erkek gametofitte yüksek düzeyde ifade edilmesi durumunda, erkek gamet gelişiminde işlevsel olabileceği olası görünmektedir.

(Honys ve Twell, 2003; Honys ve Twell, 2004; Paysan-Lafosse vd., 2023; Wang vd., 2008).

TIFTF001_030278 geninin ise Major Erkek Gamet Protein (MSP) alanı taşıyan VAP/VAP27-benzeri bir proteinle eşleştiği belirlenmiştir. InterPro ve PANTHER analizleri, bu adayın MSP/Motil erkek gamet alanlarına ek olarak VAP/VAP27 protein ailesi içerisinde konumlandığını göstermektedir. VAP-benzeri proteinlerin, endoplazmik retikulum-plazma zarı (ER-PM) temas bölgelerinin yapısal organizasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bu çerçevede, başlangıçta “MOSPD-2-like” olarak otomatik anotasyon alan bu genin, zara bağlı VAP-benzeri bir bağlayıcı (tether) olarak yeniden değerlendirilmesi; polen tüpü uç büyümesinde veziküler trafik, ER organizasyonu ve membran temas noktaları açısından biyolojik olarak tutarlı bir işlevsel çerçeve sunmaktadır (Di Mattia vd., 2018; Wang vd., 2014; Wang vd., 2016; Wang ve Hussey, 2019).

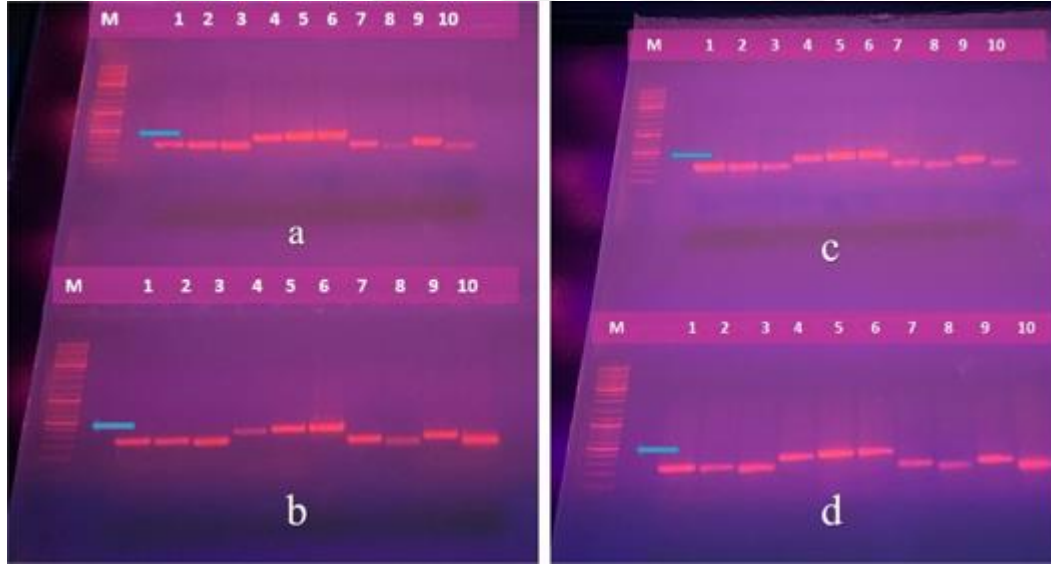
Tablo 3.3. EMSA doğrulamasına alınan erkek-özü marker aday genler ve olası biyolojik işlevleri

Gen/Transkript Kimliği	Protein tanımı	İşlevsel İpuçları / Alanlar (GO/alan)
TIFTF001_000911	Protein SF21-benzeri	Polen-özü protein
TIFTF001_007346	Erkek gametogenesis-associated protein 20 isoform X2-benzeri	(Belirsiz; erkek gametogenez ilişkili anotasyon)
TIFTF001_030278	VAP/VAP27-benzeri	-
TIFTF001_011106	Uncharacterized protein	Expansin/polen alerjeni; DPBB/EG45; selüloz-bağlayıcı benzeri alan; rlpA-benzeri üst ailesi
TIFTF001_010700	Uncharacterized protein	Expansin/polen alerjeni; DPBB/EG45; selüloz-bağlayıcı benzeri alan; rlpA-benzeri üst ailesi
TIFTF001_053729	Uncharacterized protein	Expansin/polen alerjeni; DPBB; rlpA-benzeri; selüloz-bağlayıcı benzeri üst ailesi
TIFTF001_005034	İnterleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X2	Protein kinase-like; bulb-type lektin alanı (G-lecrk/RLK)
TIFTF001_026056	Uncharacterized protein	BP: protein fosforilasyonu; BP: recognition of pollen; MF: protein kinaz etkinliği; Ser/Thr kinaz etkinliği; ATP bağlanması
TIFTF001_053360	İnterleukin-1 receptor-associated kinase 4-like	BP: protein fosforilasyonu; BP: recognition of pollen; MF: protein kinaz etkinliği; ATP bağlanması
TIFTF001_020112	Uncharacterized protein	BP: protein fosforilasyonu; BP: recognition of pollen; MF: protein kinaz etkinliği; Ser/Thr kinaz etkinliği; ATP bağlanması

Genel olarak değerlendirildiğinde, ChIP-seq analiziyle erkek bireylere özgü bağlanma gösteren bu 10 marker aday gen, polen gelişimi, polen tüpü büyümesi, hücre duvarı dinamiği, sinyal iletimi ve hücrel organizasyon gibi erkek üreme biyolojisinin temel bileşenleriyle uyumlu bir bütünlük sergilemektedir.

3.7 EMSA Analizi

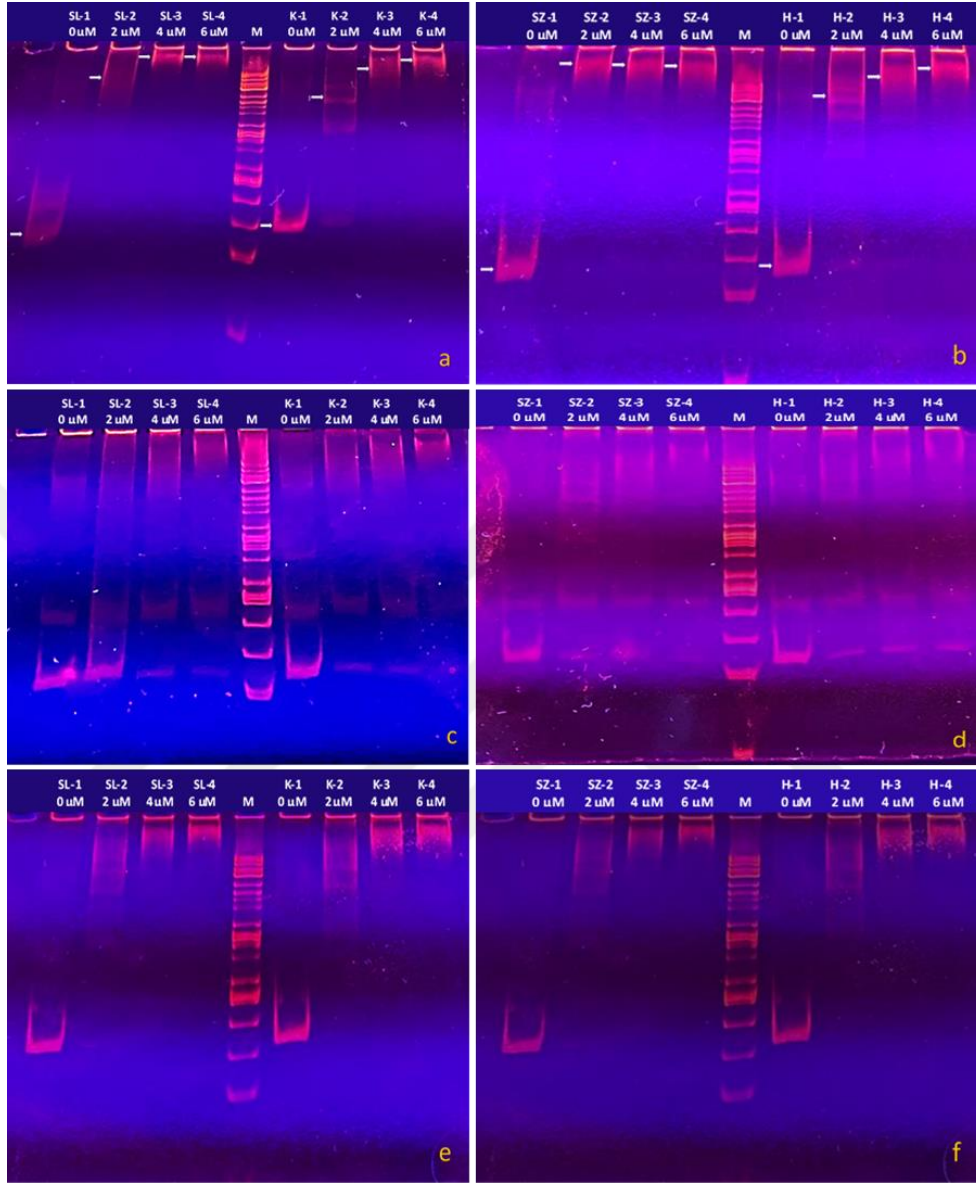
ChIP-seq analizleriyle tanımlanan aday genlerin bağlanma bölgelerinin doğrulanması amacıyla Elektroforetik Mobilite Kayma Analizi (EMSA) uygulanmıştır. Bu kapsamda Sarılop, Sarı Zeybek, Kaba İlek ve Hamza İlek çeşitlerinden elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak seçilen aday genlerin promotör bölgeleri, EMSA primer setleriyle başarıyla amplifiye edilmiş ve elde edilen ampliconlar %1 agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (Şekil 3.33).



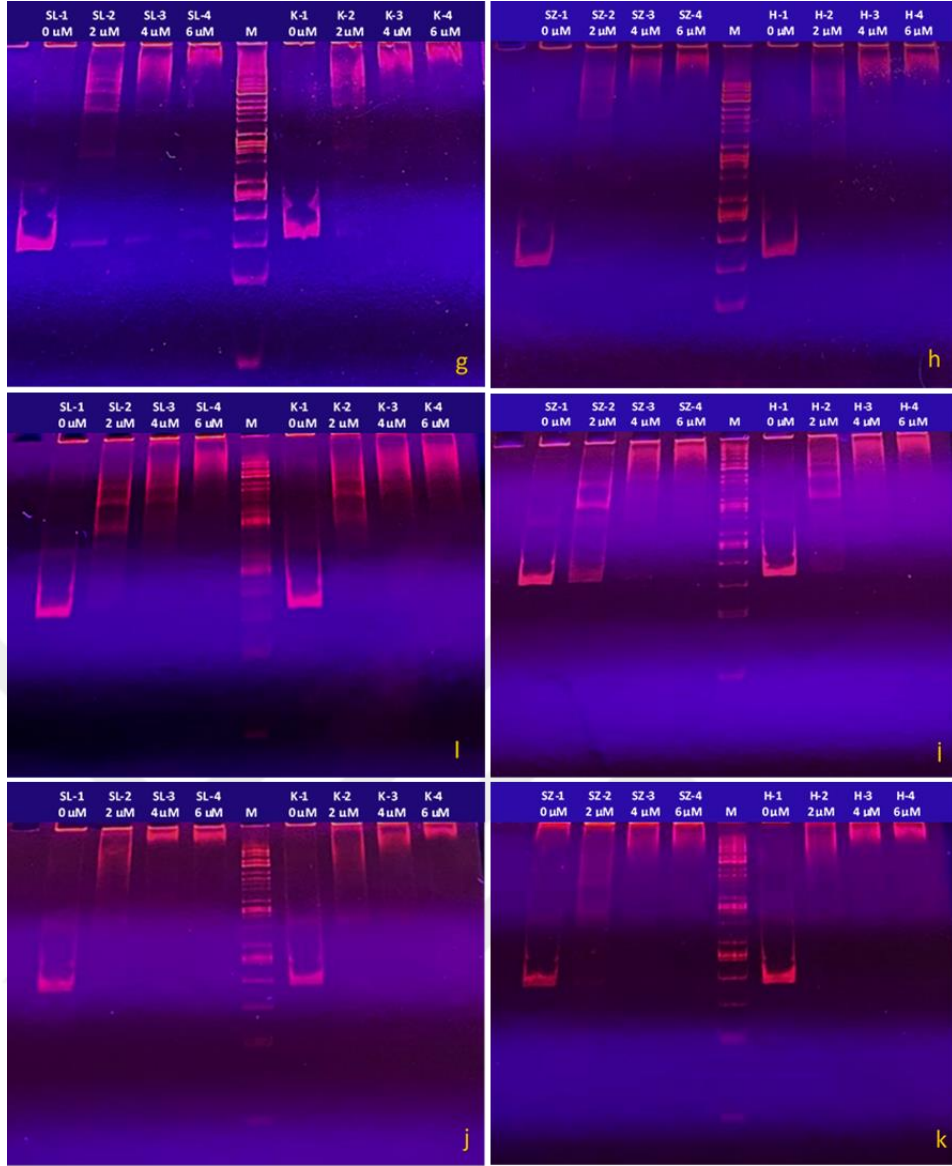
Şekil 3.33. Sarılop (a), Sarı Zeybek (b), Kaba İlek (c) ve Hamza İlek (d) çeşitlerine ait EMSA aday gen promotör bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görselleştirilmesi. M: 1 kb DNA belirteci; Mavi ok: 500 bp, kuyular 1–10: Tablo 1’de listelenen EMSA aday genleri.

EMSA deneylerinde, erkek ve dişi bireylerden elde edilen promotör ampliconları 0, 2, 4 ve 6 μ M rekombinant DUO1 ile inkübe edilip %4,5 native PAGE’de analiz edilmiş; serbest probe göre protein içeren reaksiyonlarda mobilitesi azalmış DNA–protein kompleks bantları gözlenmiştir. Protein derişimi arttıkça kompleks bant yoğunluğu artarken serbest prob sinyali azalmış (Şekil 3.34–3.36), 0 μ M negatif kontrolde kompleks bantı izlenmemiş ve doz-bağımlı bant

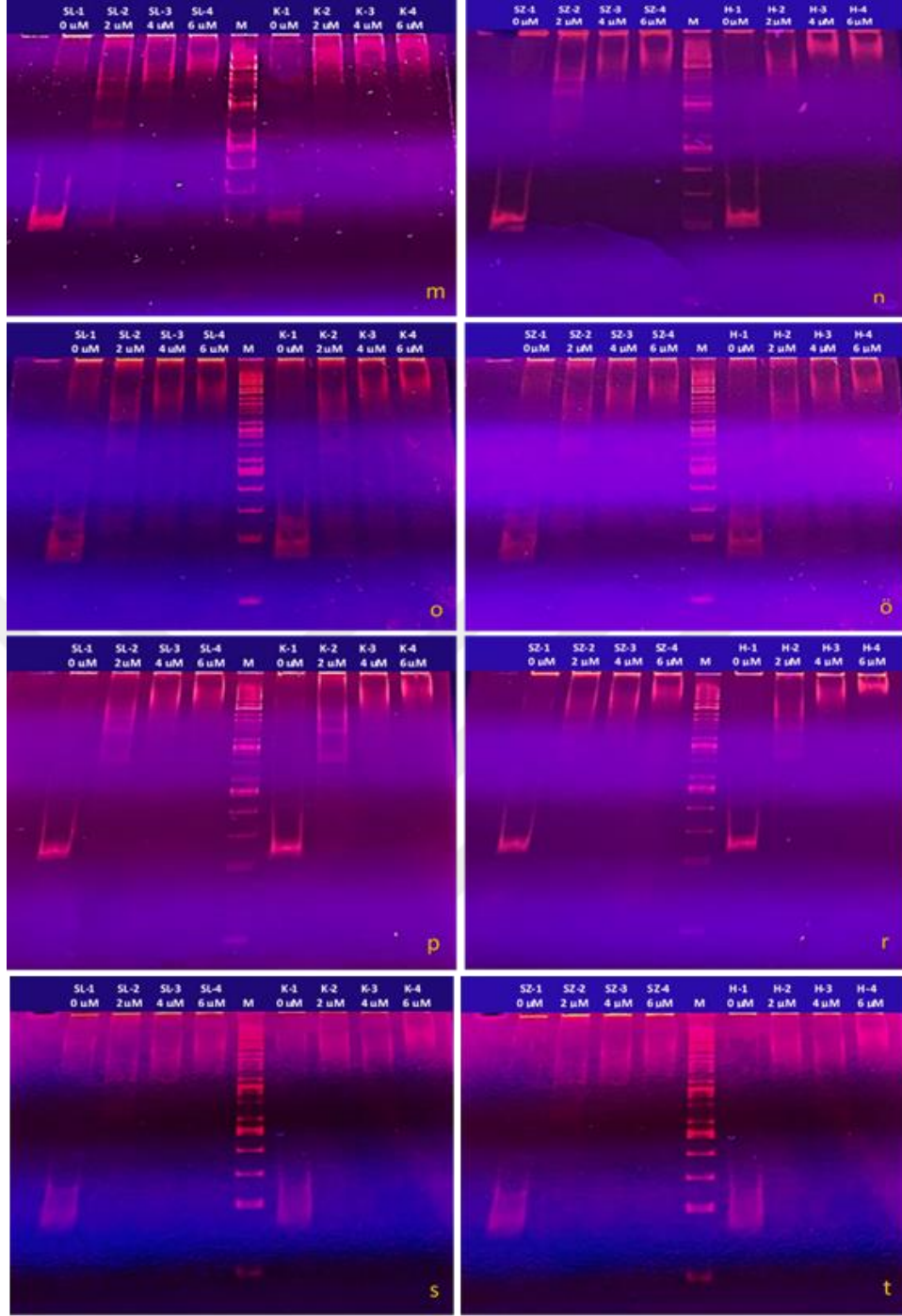
kaymasının tüm örneklerde tekrarlanabilir şekilde gözlenmesi DUO1'in seçilen promotör dizilerine özgül ve doğrudan bağlanabildiğini göstermiştir.



Şekil 3.34. Farklı protein derişimlerinin DNA–protein kompleksleşmesi üzerindeki etkisinin EMSA ile değerlendirilmesi. (a–b) Primer-1, (c–d) Primer-2, (e–f) Primer-3 panellerine aittir. Her panel, Sarılop (SL), Sarı Zeybek (SZ), Kaba İlek (K) ve Hamza İlek (H) çeşitlerine ait aday gen promotör bölgelerinin DUO1 proteini ile farklı konsantrasyonlarda (0, 2, 4 ve 6 μ M) bağlanma etkileşimlerini göstermektedir. M: DNA merdiveni (100 bp). Mobilite kaymasına karşılık gelen kompleks bantları, görsel yönlendirme amacıyla yalnızca ilk iki panelde (a–b) oklarla belirtilmiştir.



Şekil 3.35. Farklı protein derişimlerinin DNA–protein kompleksleşmesi üzerindeki etkisinin elektroforetik mobilite kayması (EMSA) ile değeriendirilmesi. (g–h) Primer-4, (ı–i) Primer-5 ve (j–k) Primer-6 panellerine aittir. Her panel, Sarılop (SL), Sarı Zeybek (SZ), Kaba İlek (K) ve Hamza İlek (H) çeşitlerine ait aday gen promotör bölgelerinin DUO1 proteini ile farklı konsantrasyonlarda (0, 2, 4 ve 6 μ M) bağlanma etkileşimlerini göstermektedir. M: DNA merdiveni (100 bp). Mobilite kaymasına karşılık gelen kompleks bantları, yalnızca ilk iki panelde (a–b) oklarla belirtilmiş olup sonraki panellerde aynı örüntü korunmuştur.



Şekil 3.36. Farklı protein derişimlerinin DNA–protein kompleksleşmesi üzerindeki etkisinin elektroforetik mobilite kayması (EMSA) ile değeriendirilmesi. (m–n) Primer-7, (o–ö) Primer-8, (p–r) Primer-9 ve (s–t) Primer-10 panellerine aittir. Her panel, Sarılop (SL), Sarı Zeybek (SZ), Kaba İlek (K) ve Hamza İlek (H) çeşitlerine ait aday gen promotör bölgelerinin FcMYB125 proteini ile farklı konsantrasyonlarda (0, 2, 4 ve 6 μ M) bağlanma etkileşimlerini göstermektedir. M: DNA merdiveni (100 bp). Mobilite kaymasına karşılık gelen kompleks bantları, yalnızca ilk iki panelde (a–b) oklarla belirtilmiş olup sonraki panellerde aynı örüntü korunmuştur.

EMSA sonuçları, seçilen aday genlerin promotör dizilerine hem erkek hem de dişi bireylerden elde edilen ampliconlarda DUO1 proteininin bağlandığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, EMSA'nın nükleozomsuz, PCR ile çoğaltılmış çıplak DNA üzerinde gerçekleştirilen ve doğrudan sekans düzeyindeki bağlanma yeterliliğini yansıtan bir yöntem olmasıyla uyumludur. Nitekim EMSA'da protein–DNA etkileşimleri, kromatin yapısı ve epigenetik modifikasyonlardan bağımsız olarak değerlendirilmektedir (Hellman ve Fried, 2007).

Buna karşılık, bu çalışmada kullanılan çaprazlamalı *in vitro* ChIP-seq iş akışı (izole genomik DNA → fragmentasyon → DUO1 ile *in vitro* bağlanma → formaldehit ile çaprazlama), bağlanmanın PCR uygulanmamış doğal genomik DNA üzerinde gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu yaklaşım, DAP-seq yöntemiyle benzer şekilde, DNA metilasyonu başta olmak üzere ikincil DNA modifikasyonlarını korur ve transkripsiyon faktörü bağlanmalarının sekans + epigenetik bağlamda değerlendirilmesine olanak tanır (Bartlett vd., 2017; O'Malley vd., 2016). EMSA'da kullanılan PCR ampliconları metilasyon bilgisini içermediğinden, gözlenen bağlanma yalnızca sekans düzeyindeki yeterliliği yansıtmaktadır (Bartlett vd., 2017; Yin vd., 2017).

Bu nedenle, *in vitro* ChIP-seq analizlerinde yalnızca erkek bireylere ait DNA'larda DUO1 bağlanma bölgeleri tespit edilirken, EMSA'da hem erkek hem de dişi bireylere ait promotör ampliconlarında bağlanma gözlenmesi çelişkili bir durum olarak değerlendirilmemelidir. Erkek ve dişi bireyler arasında lokus-özü 5-metilsitozin (5mC) farklılıklarının, metilasyonun korunduğu ChIP-seq platformunda DUO1 işgalini farklılaştırması; buna karşılık PCR ile çoğaltılmış EMSA problemlerinde bu farkın maskelenmesi, literatürde iyi tanımlanmış bir olgudur (O'Malley vd., 2016; Yin vd., 2017; Zuo vd., 2017).

Ayrıca, *in vivo* koşullarda nükleozom konumu, kromatin erişilebilirliği ve kromatin yeniden düzenleyici proteinlerin (chromatin remodeler) etkinliği, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma desenlerini dokuya ve cinsiyete özgü şekilde şekillendirebilmektedir (Brahma ve Henikoff, 2020; Grand vd., 2024). Bu bağlamda EMSA, sekans düzeyindeki bağlanma yeterliliğini; *in vitro* ChIP-seq ise epigenetik ve bağlamsal işgali yansıtan tamamlayıcı yöntemler olarak değerlendirilmelidir.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, *F. carica*'da DUO1 (MYB125) transkripsiyon faktörünün erkek gamet gelişimiyle ilişkili genlerin promotör bölgelerine doğrudan bağlanabildiği; ancak bu bağlanmanın epigenetik bağlam ve kromatin organizasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Dizisel ve filogenetik olarak tanımlanan incir DUO1 ortoloğu ile geliştirilen His-etiketli rekombinant DUO1 temelli *in vitro* ChIP-seq yaklaşımı, bitkilerde DNA–protein etkileşimlerinin bağlam duyarlı biçimde haritalanmasına olanak tanımış; EMSA ile doğrulanan promotör bağlanmaları ise bu düzenleyici ilişkinin moleküler düzeyde doğrudan bağlanma kanıtını deneysel olarak desteklemiştir. Elde edilen sonuçlar, DUO1'un incirde erkek gamet programına özgü bir regülunun merkezî düzenleyicisi olduğunu güçlü bir biçimde ortaya koymaktadır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

Bu tez çalışması, erkek gamet gelişiminde merkezi bir düzenleyici olarak görev yapan MYB125/DUO1 transkripsiyon faktörünün incirde (*F. carica* L.) genom çapındaki hedef ağını tanımlayarak, cinsiyet oluşumunun transkripsiyonel mimarisine yönelik kapsamlı bir çerçeve sunmuştur. Tez kapsamında disiplinler arası yaklaşımlarla yürütülen deneysel ve hesaplamalı analizler sonucunda, DUO1'e özgü bir düzenleyici harita oluşturulmuş; genomik, moleküler ve biyoinformatik verilerin entegrasyonu ile erkek eşey hattının transkripsiyonel kontrolüne ilişkin özgün bulgular ortaya konmuştur. Bu doğrultuda;

- ✓ *Ficus carica*'da DUO1 (MYB125) transkripsiyon faktörünün ortoloğu; dizisel benzerlik (BLAST), R2R3-MYB alan mimarisi ve filogenetik konumlandırma analizleriyle tanımlanmış ve biyolojik bağlamı doğrulanmıştır.
- ✓ Antikor kullanımını ortadan kaldıran ve bitki sistemlerine özgü olarak geliştirilen antikorsuz *in vitro* ChIP-seq yaklaşımı (*in vitro* bağlanma → formaldehit ile çapraz bağlama → His-etiketli yakalama → NGS) başarıyla uygulanmış; elde edilen okuma derinliği, NSC/RSC değerleri ve pik kalitesi, veri setlerinin güvenilirliğini desteklemiştir.
- ✓ İki erkek ve iki dişi çeşitte gerçekleştirilen karşılaştırmalı analizler sonucunda, yalnızca erkek bireylerde ortak olarak saptanan 480 adet bağlanma bölgesi (EK 6) tanımlanmış; bu durum erkek cinsiyetin özgül bir transkripsiyonel program tarafından kontrol edildiğini ortaya koymuştur.
- ✓ Fonksiyonel zenginleştirme analizleri (GO/KEGG), DUO1 hedeflerinin polen gelişimi, gamet farklılaşması, hücre duvarı yeniden yapılanması ve sinyal iletimi gibi erkek üreme süreçleriyle doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda 10 adet erkek cinsiyet belirteci aday gen (Tablo 3.3) tanımlanmıştır.
- ✓ EMSA sonuçları, seçilen 10 aday genin promotör ampikonlarının DUO1 ile doz bağımlı biçimde kompleks oluşturduğunu doğrulamış; hem erkek hem de dişi örneklerde DUO1 bağlanmasının gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Buna karşın, *in vitro* ChIP-seq analizinde erkek örneklerde belirgin şekilde gözlenen, dişi örneklerde ise gözlemlenmeyen bağlanma

sinyalinin; DNA dizisinden çok, kromatin erişilebilirliği ve/veya epigenetik işaretler gibi bağlanmaya özgü düzenleyici katmanlar tarafından belirlendiği düşünülmektedir.

- ✓ Elde edilen bulgular, DUO1'in yalnızca erkek gametogenezini başlatan bir düzenleyici olmadığını; aynı zamanda erkek bireylerde özgül bağlanma gösterdiği hedef genler aracılığıyla erkek üreme biyolojisine özgü süreçlerle tutarlı bir hedef ağı tanımladığını ve DUO1 tarafından yönlendirilen bir düzenleyici programı desteklediğini göstermektedir. Bu çerçevede, tanımlanan gen setine ait ekspresyon profilleri, erkek bireylerin üreme potansiyelinin öngörülmesine yönelik aday moleküler belirteç panellerinin geliştirilmesi için bilimsel bir temel sunmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma, incirde ilk kez DUO1-temelli bir regülasyon ağını ortaya koymuş; erken cinsiyet tayini ile birlikte erkek kalite tahminine olanak sağlayan moleküler belirteçlerin geliştirilmesi için güçlü bir altyapı sunmuştur.

4.2 Sınırlılıklar

- Mevcut referans genom kısıtları (erkek genom anotasyonunun olmaması, hizalamanın dışı referansa yapılması) nedeniyle erkek bireye özgü genlerin bir bölümünün kaçırılmış olma olasılığı bulunmaktadır.
- Dışi genom kalitesindeki eksikler, lokus düzeyi yorum gücünü sınırlamaktadır.
- Önerilen marker paneli putatiftir; bağlanma–ifade eşleşmesi ve performans metrikleri henüz tamamlanmamıştır.

4.3 Öneriler

Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular, DUO1 transkripsiyon faktörünün düzenleyici ağının daha derinlemesine anlaşılması ve genetik temellerinin ıslah süreçlerine aktarılabilmesi için çeşitli ileri araştırma alanlarına işaret etmektedir. Bu doğrultuda aşağıdaki öneriler sunulmaktadır:

- **Genomik altyapının güçlendirilmesi:** Erkek genomunun yüksek kapsama derinliğiyle dizilenmesi ve ayrıntılı anotasyonunun yapılması, ayrıca yerel dışi genomlarının yüksek kaliteli montaj ve anotasyonlarının tamamlanması önerilmektedir. Bu çalışmalar, DUO1 hedef ağının çözünürlüğünü artırarak

cinsiyetler arası karşılaştırmalarda olası allelik önyargıların azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

- **Hedef doğrulama ve kinetik analizlerin derinleştirilmesi:** Spesifik kompetitör veya motif-bozucu oligonükleotidlerin kullanımıyla EMSA özgüllüğünün güçlendirilmesi ve görünür KDK_DKD kestirimleri üzerinden bağlanma parametrelerinin nicel olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. Seçilmiş lokuslarda gerçekleştirilecek CHIP-qPCR ve dual-luciferase raporlayıcı analizleriyle transkripsiyonel çıktının doğrulanması da önerilen çalışmalardandır.
- **Aday gen panelinin işlevsel değerlendirilmesi:** EMSA ile doğrulanan 10 gen için çoklu genotiplerde ifade profillerinin (erkek çiçek/polen ve dişi doku örneklerinde) karşılaştırılması; bağlanma-ifade ilişkilerinin ortaya konulması ve elde edilen performans metrikleri (duyarlılık, özgüllük, AUC) temelinde marker değerinin sınanması önerilmektedir.
- **Varyasyon taraması ve ıslah uygulamalarına geçiş:** DUO1 motif bölgelerinde SNP/indel düzeyinde varyasyon taramalarının yapılması; geniş germplazm panellerinde segregasyon testlerinin yürütülmesi ve KASP/HRM temelli hızlı genotipleme setlerinin ıslah programlarına uyarlanması önerilmektedir. Bu yaklaşım, temel genomik bulguların uygulamalı ıslah çalışmalarına aktarılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Allen, A. M., Lexer, C., & Hiscock, S. J. (2010). Characterisation of sunflower-21 (SF21) genes expressed in pollen and pistil of *Senecio squalidus* (Asteraceae) and their relationship with other members of the SF21 gene family. *Sexual Plant Reproduction*, 23(3), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s00497-010-0137-9>
- Alzahrani, M. Y., Alshaikhi, A. I., Hazzazi, J. S., Kurdi, J. R., ve Ramadan, M. F. (2024). Recent insight on nutritional value, active phytochemicals, and health-enhancing characteristics of fig (*Ficus carica*). *Food Science ve Nutrition*, 12(2), 12034. <https://doi.org/10.1002/fsh3.12034>
- Andrés, F., ve Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>
- Armstrong, W. P. (2006). Sex determination ve life cycle of *Ficus carica*. *Wayne's Word, Palomar College*.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., ve Struhl, K. (1994). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley ve Sons.
- Avcı, M. K. (2015). *Bacillus subtilis GntR ailesine ait LutR transkripsiyon faktörünün doğrudan kontrolü altındaki genlerin ChIP ve EMSA yöntemleriyle belirlenmesi* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ayar A. (2020). İncir Çeşit Kataloğu (Başılmamış)
- Aytürk, Ö. (2016). *Dioik Ficus carica L. (incir)'de dişi, gal ve erkek çiçek gelişiminin mikroskopik ve moleküler yöntem ile karşılaştırılması* (Doktora tezi). Marmara Üniversitesi.
- Aytürk, Ö. (2019). Structural and seasonal differences of syconia in dioecious *F. carica* L. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 31(2), 179–187. <https://doi.org/10.7240/jeps.516022>
- Bailey, T., Krajewski, P., Ladunga, I., Lefebvre, C., Li, Q., Liu, T., Madrigal, P., Taslim, C., ve Zhang, J. (2013). Practical guidelines for the comprehensive analysis of ChIP-seq data. *PLOS Computational Biology*, 9(11), e1003326. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003326>
- Baillo, E. H., Kimotho, R. N., Zhang, Z., ve Xu, P. (2019). Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes*, 10(10), 771. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>
- Bakewell-Stone, P. (2022). *Ficus carica* (common fig). *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.24078>
- Bao, Y., He, M., Zhang, C., Jiang, S., Zhao, L., Ye, Z., Sun, Q., Xia, Z., & Zou, M. (2023). Advancing understanding of *Ficus carica*: A comprehensive genomic analysis reveals evolutionary patterns and metabolic pathway insights. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1298417. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1298417>
- Barolo, M. I., Ruiz Mostacero, N., ve López, S. N. (2014). *Ficus carica* L. (Moraceae): An ancient source of food and health. *Food Chemistry*, 164, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.112>
- Barski, A., & Frenkel, B. (2004). ChIP Display: novel method for identification of genomic targets of transcription factors. *Nucleic acids research*, 32(12), e104. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh097>

- Bartlett, A., O'Malley, R. C., Huang, S.-S. C., Galli, M., Nery, J. R., Gallavotti, A., ve Ecker, J. R. (2017). Mapping genome-wide transcription factor binding sites using DAP-seq. *Nature Protocols*, 12(8), 1659–1672. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.055>
- Benjamini, Y., & Speed, T. P. (2012). Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, 40(10), e72. <https://doi.org/10.1093/nar/gks001>
- Berger, S. L., ve Kimmel, A. R. (Eds.). (1987). *Guide to molecular cloning techniques* (Methods in Enzymology, Vol. 152). Academic Press.
- Blum, M., Andreeva, A., Florentino, L. C., Chuguransky, S. R., Grego, T., Hobbs, E., Pinto, B. L., Orr, A., Paysan-Lafosse, T., Ponamareva, I., Salazar, G. A., Bordin, N., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Llinares-López, F., Marchler-Bauer, A., ... Bateman, A. (2025). InterPro: the protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic acids research*, 53(D1), D444–D456. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1082>
- Boija, A., Klein, I. A., Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Coffey, E. L., Zamudio, A. V., Li, C. H., Shrinivas, K., Manteiga, J. C., Hannett, N. M., Abraham, B. J., Afeyan, L. K., Guo, Y. E., Rimel, J. K., Fant, C. B., Schuijers, J., Lee, T. I., Taatjes, D. J., & Young, R. A. (2018). Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Domains. *Cell*, 175(7), 1842–1855.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.042>
- Borg, M., Brownfield, L., Khatab, H., Sidorova, A., Lingaya, M., & Twell, D. (2011). The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in Arabidopsis. *The Plant cell*, 23(2), 534–549. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081059>
- Boisson-Dernier, A., Lituiev, D. S., Nestorova, A., Franck, C. M., Thirugnanarajah, S., & Grossniklaus, U. (2013). ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS biology*, 11(11), e1001719. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001719>
- Brahma, S., & Henikoff, S. (2020). Epigenome regulation by dynamic nucleosome unwrapping. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.09.003>
- Bronstein, J. L. (1992). Seed predators as mutualists: Ecology and evolution of the fig/pollinator interaction. In E. A. Bernays (Ed.), *Insect–plant interactions* (Vol. 4, pp. 1–44). CRC Press.
- Brownfield, L., Hafidh, S., Borg, M., Sidorova, A., Mori, T., ve Twell, D. (2009). A plant germline-specific integrator of erkek gamet specification and cell cycle progression. *PLOS Genetics*, 5(3), e1000430. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000430>
- Cao, Y., Li, S., Wang, Y., Zhang, R., ve Chen, Z. (2020). MYB transcription factors as regulators of secondary metabolism in plants. *Biology*, 9(3), 61. <https://doi.org/10.3390/biology9030061>
- Cecchetti, V., Altamura, M. M., Falasca, G., Costantino, P., & Cardarelli, M. (2008). Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *The Plant cell*, 20(7), 1760–1774. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057570>
- Cecchetti, V., Celebrin, D., Napoli, N., Ghelli, R., Brunetti, P., Costantino, P., ve Cardarelli, M. (2013). Auxin controls Arabidopsis anther dehiscence by regulating endothecium lignification timing. *The Plant Journal*, 74(3), 371–382. <https://doi.org/10.1111/tpj.12130>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

- Chen, Z., Wu, Z., Dong, W., Liu, S., Tian, L., Li, J., & Du, H. (2022). MYB Transcription Factors Becoming Mainstream in Plant Roots. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9262. <https://doi.org/10.3390/ijms23169262>
- Chessa, I. (1997). Fig. In S. N. Mitra (Ed.), *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits* (pp. 245–268). CAB International.
- Chicco, D., ve Jurman, G. (2022). Nine quick tips for pathway enrichment analysis. *PLOS Computational Biology*, 18(9), e1010348. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010348>
- Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic acids research*, 38(6), 1767–1771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>
- Colando, S., Schulz, D., & Hardin, J. (2025). Selecting ChIP-seq normalization methods from the perspective of their technical conditions. *Briefings in bioinformatics*, 26(4), bbaf431. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaf431>
- Condit, I. J. (1947). *The fig*. Chronica Botanica Company.
- Cook, J. M., ve Rasplus, J.-Y. (2003). Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology ve Evolution*, 18(5), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00062-4)
- Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014>
- Cosgrove, D. J. (2024). Plant cell wall loosening by expansins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 40(1), 329–352. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111822-115334>
- Crane, J. C. (1986). Fig. In S. P. Monselise (Ed.), *Handbook of fruit set and development* (pp. 153–165). CRC Press.
- Crisosto, H., Ferguson, L., Bremer, V., Stover, E., & Colelli, G. (2011). Fig (*Ficus carica* L.). In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 134–160). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857092885.134>
- Cui, R., ve An, X. (2024). Research progress of MYB transcription factor family in plant stress resistance. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 52(1), 13491. <https://doi.org/10.15835/nbha52113491>
- Cui, Y., Lu, X., ve Gou, X. (2022). Receptor-like protein kinases in plant reproduction: Current understanding and future perspectives. *Plant Communications*, 3(1), 100273. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100273>
- D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., Coupland, G., & Périlleux, C. (2011). Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The Plant Journal*, 65, 972–979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04482.x>
- De Candolle, A. (1967). *Origin of cultivated plants* (Reprint of 2nd ed. 1886). Hafner.
- de Mendoza, A., Sebé-Pedrós, A., ve Ruiz-Trillo, I. (2013). Transcription factor evolution in eukaryotes and the origin of multicellularity. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14, 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153423>
- Di Mattia, T., Wilhelm, L. P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spehner, D., Nominé, Y., Giordano, F., Mathelin, C., Drin, G., Tomasetto, C., & Alpy, F. (2018). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Reports*, 19(7), e45453. <https://doi.org/10.15252/embr.201745453>

- Dobritsa, A. A., Shrestha, J., Morant, M., Pinot, F., Matsuno, M., Swanson, R., Møller, B. L., & Preuss, D. (2009). CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 151(2), 574–589. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144469>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., ve Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Durbarry, A., Vizir, I., & Twell, D. (2005). Male germ line development in *Arabidopsis*. duo pollen mutants reveal gametophytic regulators of generative cell cycle progression. *Plant physiology*, 137(1), 297–307. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053165>
- ENCODE Project Consortium. (2017). ENCODE guidelines for experiments generating ChIP-seq data (v3.0). (Çevrimiçi kılavuz).
- ENCODE Project. (2025). Transcription factor ChIP-seq: Data standards and processing pipeline. https://www.encodeproject.org/chip-seq/transcription_factor/
- Engelhorn, J., Snodgrass, S. J., Kok, A., Seetharam, A. S., Schneider, M., Kiwit, T., Singh, A., Banf, M., Doan, D. T. H., Khaipho-Burch, M., Runcie, D. E., Sánchez-Camargo, V. A., Bader, R., Torres-Rodriguez, J. V., Sun, G., Stam, M., Fiorani, F., Beier, S., Schnable, J. C., Bass, H. W., Hufford, M. B., Stich, B., Frommer, W. B., Ross-Ibarra, J., & Hartwig, T. (2025). Genetic variation at transcription factor binding sites largely explains phenotypic heritability in maize. *Nature Genetics*, 57, 2313–2322. <https://doi.org/10.1038/s41588-025-02246-7>
- Ercişli, S., Tosun, M., Karlıdağ, H., Dzubur, A., Hadziabulic, S., ve Aliman, Y. (2012). Color and antioxidant characteristics of some fresh fig (*Ficus carica* L.) genotypes from northeastern Turkey. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(3), 271–276. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0292-2>
- Escobar-Restrepo, J. M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C., & Grossniklaus, U. (2007). The FERONIA receptor-like kinase mediates male–female interactions during pollen tube reception. *Science*, 317(5838), 656–660. <https://doi.org/10.1126/science.1143562>
- Falistocco, E. (2020). The millenary history of the fig tree (*Ficus carica* L.). *Advances in Agriculture, Horticulture and Entomology*, 2020(05). <https://doi.org/10.37722/AAHAE.202051>
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., ve Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8063–8068. <https://doi.org/10.1073/pnas.140209597>
- Fendrych, M., Synek, L., Pecenkova, T., Toupalova, H., Cole, R., Drdova, E., Nebesárova, J., Sedínová, M., Hála, M., Fowler, J. E., & Zársky, V. (2010). The *Arabidopsis* exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *The Plant cell*, 22(9), 3053–3065. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074351>
- Feng, J., Liu, T., Qin, B., Zhang, Y., ve Liu, X. S. (2012). Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nature Protocols*, 7(9), 1728–1740. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.101>
- Flaishman, M. A., Rodov, V., ve Stover, E. (2008). The fig: Botany, horticulture, and breeding. *Horticultural Reviews*, 34, 113–196. <https://doi.org/10.1002/9780470380147.ch2>
- Flora of China. (2025). *Ficus carica*. https://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2vetaxon_id=200006351 (Erişim tarihi: 22 Ekim 2025)
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2024). *FAOSTAT – Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/OCL> (Erişim tarihi: 03 Aralık 2024)

- Fried, M. G. (1989). Measurement of protein–DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis*, 10(5–6), 366–376. <https://doi.org/10.1002/elps.1150100515>
- Fried, M. G., ve Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor–operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 9(23), 6505–6525. <https://doi.org/10.1093/nar/9.23.6505>
- Fried, M. G., ve Liu, G. (1994). Molecular sequestration stabilizes CAP–DNA complexes during polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 22(23), 5054–5059. <https://doi.org/10.1093/nar/22.23.5054>
- Furey, T. S. (2012). ChIP-seq and beyond: New and improved methodologies to detect and characterize protein–DNA interactions. *Nature Reviews Genetics*, 13(12), 840–852. <https://doi.org/10.1038/nrg3306>
- Gaillard, C., ve Strauss, F. (1990). Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Research*, 18(2), 378. <https://doi.org/10.1093/nar/18.2.378>
- Garner, M. M., ve Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: Application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Research*, 9(13), 3047–3060. <https://doi.org/10.1093/nar/9.13.3047>
- Gaudreault, M., Gingras, M.-E., Lessard, M., Leclerc, S., ve Guérin, S. L. (2009). Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA–protein interactions. *Methods in Molecular Biology*, 543, 15–35. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-015-1_2
- Ge, Z., Bergonci, T., Zhao, Y., Zou, Y., Du, S., Liu, M.-C., Luo, L., Ruan, H., García-Valencia, L. E., Zhong, S., Hou, S., Huang, Q., Lai, L., Moura, D. S., Gu, H., Dong, J., & Li, H. (2017). RALF-mediated signaling controls pollen tube integrity and sperm release via receptor kinase modules. *Science*, 358(6370), 1596–1600. <https://doi.org/10.1126/science.aao3642>
- Gene Ontology Consortium. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224(1), iyad031. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- Golembeski, G. S., ve Imaizumi, T. (2015). Photoperiodic regulation of florigen function in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 13, e0178. <https://doi.org/10.1199/tab.0178>
- Grand, R. S., Pregolato, M., Baumgartner, L., Hoerner, L., Burger, L., & Schübeler, D. (2024). Genome access is transcription factor-specific and defined by nucleosome position. *Molecular Cell*, 84(18), 3455–3468.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.08.009>
- Hafidh, S., Potěšil, D., Müller, K., Fíla, J., Michailidis, C., Herrmannová, A., Feciková, J., Ischebeck, T., Valášek, L. S., Zdráhal, Z., & Honys, D. (2018). Dynamics of the Pollen Sequestrome Defined by Subcellular Coupled Omics. *Plant physiology*, 178(1), 258–282. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00648>
- Hellman, L. M., ve Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2(8), 1849–1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
- Higo, A., Kawashima, T., Borg, M., Zhao, M., López-Vidriero, I., Sakayama, H., ... Araki, T. (2018). Transcription factor DUO1 generated by neo-functionalization is associated with evolution of erkek gamet differentiation in plants. *Nature Communications*, 9, 5283. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07728-3>
- Hitz, B. C., Jin-Wook, L., Jolanki, O., Kagda, M. S., Graham, K., Sud, P., Gabdank, I., Strattan, J. S., Sloan, C. A., Dreszer, T., Rowe, L. D., Podduturi, N. R., Malladi, V. S., Chan, E. T., Davidson, J. M., Ho, M., Miyasato, S., Simison, M., Tanaka, F., Luo, Y., ... Cherry, J. M. (2023). The ENCODE Uniform Analysis Pipelines. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2023.04.04.535623. <https://doi.org/10.1101/2023.04.04.535623>

- Hrmova, M. (2021). Plant transcription factors involved in drought and osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5662. <https://doi.org/10.3390/ijms22115662>
- Hssaini, L., Razouk, R., ve Haoudi, N. (2024). Canonical correlation model for understanding fig (*Ficus carica* L.) mislabeling using biochemical and morphometric markers. *Applied Fruit Science*, 66(4), 1515–1528. <https://doi.org/10.1007/s10341-024-01121-9>
- Honys, D., & Twell, D. (2003). Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 132(2), 640–652. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020925>
- Honys, D., & Twell, D. (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome Biology*, 5(11), R85. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-r85>
- İkten, H. ve Yılmaz, Y. (2019). Validation of gender specific CAPS marker in Turkish fig (*Ficus carica* L.) collection and F1 progenies. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), 867–871. <https://doi.org/10.15835/nbha47311499>
- Illumina. (2012). *Quality scores for next-generation sequencing* (Technical Note). https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
- Inoue, H., Nojima, H., ve Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
- Isoda, R., Palmai, Z., Yoshinari, A., Chen, L. Q., Tama, F., Frommer, W. B., & Nakamura, M. (2022). SWEET13 transport of sucrose, but not gibberellin, restores male fertility in *Arabidopsis sweet13;14*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(42), e2207558119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207558119>
- Jarillo, J. A., Komar, D. N., ve Piñeiro, M. (2018). The use of the chromatin immunoprecipitation technique for *in vivo* identification of plant protein–DNA interactions. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1794, pp. 323–334). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7871-7_23
- Javed, T., Shabbir, R., Ali, A., Afzal, I., Zaheer, U., & Gao, S. J. (2020). Transcription Factors in Plant Stress Responses: Challenges and Potential for Sugarcane Improvement. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(4), 491. <https://doi.org/10.3390/plants9040491>
- Jiang, C.-K., ve Rao, G.-Y. (2020). Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Plant Physiology*, 183(2), 637–655. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01082>
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G., ve Luo, J. (2017). PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D1040–D1045. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw982>
- Kanehisa, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
- Kanehisa, M., ve Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kaya, H., Nakajima, R., Iwano, M., Kanaoka, M. M., Kimura, S., Takeda, S., Kawarazaki, T., Senzaki, E., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Takayama, S., Abe, M., & Kuchitsu, K. (2014). Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by Arabidopsis RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *The Plant cell*, 26(3), 1069–1080. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120642>
- Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., van der Lee, R., ... Mathelier, A. (2018). JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D260–D266. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1126>

- Kim, S. S., Grienemberger, E., Lallemand, B., Colpitts, C. C., Kim, S. Y., Souza, C.deA., Geoffroy, P., Heintz, D., Krahn, D., Kaiser, M., Kombrink, E., Heitz, T., Suh, D. Y., Legrand, M., & Douglas, C. J. (2010). LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl α -pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 22(12), 4045–4066. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080028>
- Kjellberg, F., Gouyon, P.-H., Ibrahim, M., Raymond, M., ve Valdeyron, G. (1987). The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators: A study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. *Evolution*, 41(4), 693–704. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1987.tb05846.x>
- Kuo, M. H., & Allis, C. D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods (San Diego, Calif.)*, 19(3), 425–433. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0879>
- Lai, X., Stigliani, A., Lucas, J., Hugouvieux, V., Parcy, F., ve Zubieta, C. (2020). Genome-wide binding of SEPALLATA3 and AGAMOUS complexes determined by sequential DAP-seq. *Nucleic Acids Research*, 48(17), 9637–9645. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa729>
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., ... Hughes, T. R. (2018). The human transcription factors. *Cell*, 172(4), 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
- Landt, S. G., Marinov, G. K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B. E., Bickel, P., Brown, J. B., Cayting, P., Chen, Y., DeSalvo, G., Epstein, C., Fisher-Aylor, K. I., Euskirchen, G., Gerstein, M., Gertz, J., Hartemink, A. J., Hoffman, M. M., Iyer, V. R., ... Snyder, M. (2012). ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome research*, 22(9), 1813–1831. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>
- Lane, D., Prentki, P., ve Chandler, M. (1992). Use of gel retardation to analyze protein–nucleic acid interactions. *Microbiological Reviews*, 56(4), 509–528. <https://doi.org/10.1128/mr.56.4.509-528.1992>
- Lazarescu, E., Friedt, W., Horn, R., & Steinmetz, A. (2006). Expression analysis of the sunflower SF21 gene family reveals multiple alternative and organ-specific splicing of transcripts. *Gene*, 374, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.01.025>
- Lassig, R., Gutermuth, T., Bey, T. D., Konrad, K. R., & Romeis, T. (2014). Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 78(1), 94–106. <https://doi.org/10.1111/tpj.12452>
- Legay, S., Lacombe, E., Goicoechea, M., Bogeat-Triboulot, M.-B., Salin, F., Schläppi, M., ... Grima-Pettenati, J. (2010). EgMYB1, an R2R3-MYB transcription factor from *Eucalyptus*, negatively regulates lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 189(4), 1096–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03432.x>
- Li, L. C., Bedinger, P. A., Volk, C., Jones, A. D., & Cosgrove, D. J. (2003). Purification and characterization of four beta-expansins (Zea m 1 isoforms) from maize pollen. *Plant Physiology*, 132(4), 2073–2085. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020024>
- Li, M., Yao, T., Lin, W., Hinckley, W. E., Galli, M., Muchero, W., Gallavotti, A., Chen, J.-G., & Huang, S.-s. C. (2023). Double DAP-seq uncovered synergistic DNA binding of interacting bZIP transcription factors. *Nature Communications*, 14, 2600. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38096-2>
- Li, Y., Tan, X., Wang, M., Li, B., Zhao, Y., Wu, C., Rui, Q., Wang, J., Liu, Z., & Bao, Y. (2017). Exocyst subunit SEC3A marks the germination site and is essential for pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 7, Article 40279. <https://doi.org/10.1038/srep40279>

- Lu, J. Y., Xiong, S. X., Yin, W., Teng, X. D., Lou, Y., Zhu, J., Zhang, C., Gu, J. N., Wilson, Z. A., & Yang, Z. N. (2020). MS1, a direct target of MS188, regulates the expression of key sporophytic pollen coat protein genes in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 71(16), 4877–4889. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa219>
- Ma, Z., Liu, Y., ve Zhang, H. (2025). Structure, evolution, and roles of MYB transcription factors in plants. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1626844. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1626844>
- Marcotuli, I., Mandrone, M., Chiocchio, I., Poli, F., Gadaleta, A., ve Ferrara, G. (2023). Metabolomics and genetics of reproductive bud development in *Ficus carica* var. *sativa* (edible fig) and in *Ficus carica* var. *caprificus* (caprifig): Similarities and differences. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1192350. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1192350>
- Marcotuli, I., Miazzi, M. M., Fanelli, V., Ruggieri, V., Tagliente, A., ve Montemurro, C. (2020). Fruit development in *Ficus carica* L.: Reproductive biology, caprification and implications for production. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1208. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01208>
- Marković, V., Cvrčková, F., Potocký, M., Kulich, I., Pejchar, P., Kollárová, E., Synek, L., & Žárský, V. (2020). EXO70A2 Is Critical for Exocyst Complex Function in Pollen Development. *Plant physiology*, 184(4), 1823–1839. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01340>
- Martin, C., ve Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 13(2), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(96\)10049-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(96)10049-4)
- McLean, C. Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S. L., Schaar, B. T., Lowe, C. B., Wenger, A. M., & Bejerano, G. (2010). GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature biotechnology*, 28(5), 495–501. <https://doi.org/10.1038/nbt.1630>
- Micol-Ponce, R., García-Alcázar, M., Lebrón, R., Capel, C., Pineda, B., García-Sogo, B., Alché, J. de D., Ortiz-Atienza, A., Bretones, S., Yuste-Lisbona, F. J., Moreno, V., Capel, J., & Lozano, R. (2023). Tomato *POLLEN DEFICIENT 2* encodes a G-type lectin receptor kinase required for viable pollen grain formation. *Journal of Experimental Botany*, 74(1), 178–193. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac419>
- Mitsis, T., Efthimiadou, A., Mouzakitis, S., Triikka, F. A., ve Templalexis, C. (2020). Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 2(6), 6. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.32>
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., ve Sonenshein, A. L. (2003). Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1911–1922. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1911-1922.2003>
- Morant, M., Jørgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Møller, B. L., Werck-Reichhart, D., & Bak, S. (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *The Plant cell*, 19(5), 1473–1487. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045948>
- Mori, K., Shirasawa, K., Nogata, H., Hirata, C., Tashiro, K., Habu, T., Kim, S., Himeno, S., Kuhara, S. ve Ikegami, H. (2017). Identification of RAN1 orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.). *Scientific Reports*, 7, 41124. <https://doi.org/10.1038/srep41124>
- Morton, J. F. (1987). Fig. In *Fruits of warm climates* (pp. 47–50).
- Murase, K., Shigenobu, S., Fujii, S., Ueda, K., Murata, T., Sakamoto, A., Wada, Y., Yamaguchi, K., Osakabe, Y., Osakabe, K., Kanno, A., Ozaki, Y., & Takayama, S. (2017). MYB transcription factor gene involved in sex determination in *Asparagus officinalis*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 22(1), 115–123. <https://doi.org/10.1111/gtc.12453>

- Naithani, S., Gupta, P., Preece, J., D'Eustachio, P., Elser, J. L., Garg, P., Dikeman, D. A., Kiff, J., Cook, J., Olson, A., Wei, S., Tello-Ruiz, M. K., Fabregat Mundo, A., Muñoz-Pomer, A., Mohammed, S., Cheng, T., Bolton, E., Papatheodorou, I., Stein, L., Ware, D., & Jaiswal, P. (2020). *Plant Reactome: A knowledgebase and resource for comparative pathway analysis*. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D1093–D1103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz996>
- Nelson, J. D., Denisenko, O., ve Bomsztyk, K. (2006). Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature Protocols*, 1(1), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.27>
- O'Malley, R. C., Huang, S. C., Song, L., Lewsey, M. G., Bartlett, A., Nery, J. R., Galli, M., Gallavotti, A., & Ecker, J. R. (2016). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell*, 165(5), 1280–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.038>
- Obenauf, G., Gerdts, M., Leavitt, G., ve Crane, J. (1978). *Commercial dried fig production in California* (Leaflet 21051). University of California, Division of Agricultural Sciences.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., ... Nishimura, Y. (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, 79(4), 639–648. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90549-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90549-5)
- Özen, M. (Ed.). (2007). *İncir yetiştiriciliği*. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, TAGEM, Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü.
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Lázaro Pinto, B., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A., ve Saedler, H. (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products. *EMBO Journal*, 6(12), 3553–3558. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02684.x>
- Paz-Ares, J., Wienand, U., Peterson, P. A., & Saedler, H. (1986). Molecular cloning of the *c* locus of *Zea mays*: a locus regulating the anthocyanin pathway. *The EMBO journal*, 5(5), 829–833. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04291.x>
- Peters, B., Casey, J., Aidley, J., Zohrab, S., Borg, M., Twell, D., & Brownfield, L. (2017). A Conserved cis-Regulatory Module Determines Germline Fate through Activation of the Transcription Factor DUO1 Promoter. *Plant physiology*, 173(1), 280–293. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01192>
- Poidevin, L., Forment, J., Unal, D., & Ferrando, A. (2021). Transcriptome and translatome changes in germinated pollen under heat stress uncover roles of transporter genes involved in pollen tube growth. *Plant, cell & environment*, 44(7), 2167–2184. <https://doi.org/10.1111/pce.13972>
- Prouse, M. B., ve Campbell, M. M. (2013). Interactions between the R2R3-MYB transcription factor, AtMYB61, and target DNA: Identification of influential nucleotides in the AC-element. *PLOS ONE*, 8(6), e65132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065132>
- QuickGO. GO:0048544 – Recognition of pollen. <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0048544>
- Rahantamalala, A., Rech, P., Martinez, Y., Chaubet-Gigot, N., ve Grima-Pettenati, J. (2010). Coordinated transcriptional regulation of *EgCAD2* and *EgCCR*, two key genes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology*, 10, 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-130>

- Rauf, A., Khatab, H., Borg, M., & Twell, D. (2023). Genetic control of generative cell shape by DUO1 in *Arabidopsis*. *Plant Reproduction*, 36(3), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s00497-023-00462-x>
- Renna, L., Stefano, G., Puggioni, M. P., Kim, S. J., Lavell, A., Froehlich, J. E., Burkart, G., Mancuso, S., Benning, C., & Brandizzi, F. (2024). ER-associated VAP27-1 and VAP27-3 proteins functionally link the lipid-binding ORP2A at the ER-chloroplast contact sites. *Nature communications*, 15(1), 6008. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50425-7>
- Ricardi, M. M., González, R. M., ve Iusem, N. D. (2010). Protocol: Fine-tuning of a chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato. *Plant Methods*, 6, 11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-11>
- Ross, M. G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N. J., Hegarty, R., Nusbaum, C., ve Jaffe, D. B. (2013). Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome biology*, 14(5), R51. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r51>
- Rotman, N., Durberry, A., Wardle, A., Yang, W. C., Chaboud, A., Faure, J. E., Berger, F., ve Twell, D. (2005). A novel class of MYB factors controls erkek gamet-cell formation in plants. *Current Biology*, 15(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.013>
- Rottmann, T., Fritz, C., Sauer, N., & Stadler, R. (2018). Glucose Uptake via STP Transporters Inhibits In Vitro Pollen Tube Growth in a HEXOKINASE1-Dependent Manner in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 30(9), 2057–2081. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00356>
- Saheki, Y., ve De Camilli, P. (2017). Endoplasmic reticulum–plasma membrane contact sites. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 659–684. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044932>
- Samuel, M. A., Chong, Y. T., Haasen, K. E., Aldea-Brydges, M. G., Stone, S. L., & Goring, D. R. (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *The Plant Cell*, 21(9), 2655–2671. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069740>
- Soleimani, V. D., Palidwor, G. A., Ramachandran, P., Perkins, T. J., ve Rudnicki, M. A. (2013). Chromatin tandem affinity purification sequencing (ChTAP-seq). *Nature Protocols*, 8(8), 1525–1534. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.088>
- Solomon, M. J., ve Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA–protein crosslinking: A probe for *in vivo* chromatin structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(19), 6470–6474. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6470>
- Song, C., Zhang, S., ve Huang, H. (2015). Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1049. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01049>
- Soni, N., Mehta, S., ve Satpathy, G. (2014). Estimation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of dried fig (*Ficus carica*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2), 158–165.
- Soto, L. F., Ramírez, C. L., ve Reyes, J. C. (2022). Effector domains of eukaryotic transcription factors. *Molecular Cell*, 82(3), 514–526. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.007>
- Starr, F., Starr, K., ve Loope, L. (2003). *Ficus carica*. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Haleakalā Field Station. http://www.hear.org/starr/hiplants/reports/pdf/ficus_carica.pdf (Erişim tarihi: 22 Ekim 2025)

- Stefan, C. J. (2020). Endoplasmic reticulum–plasma membrane contacts: Principles of phosphoinositide and calcium signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.010>
- Stover, E., Aradhya, M., Ferguson, L., ve Crisosto, C. H. (2007). The fig: Overview of an ancient fruit. *HortScience*, 42(5), 1083–1087. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1083>
- Stracke, R., Werber, M., ve Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 447–456. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
- Sun, M. X., Huang, X. Y., Yang, J., Guan, Y. F., & Yang, Z. N. (2013). Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant reproduction*, 26(2), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00497-012-0208-1>
- The Gene Ontology Consortium. (2025). The Gene Ontology knowledgebase in 2026. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1292>
- The UniProt Consortium. (2025). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Thorne, A. W., Myers, F. A., ve Hebbes, T. R. (2004). Native chromatin immunoprecipitation. In T. Tollefsbol (Ed.), *Epigenetics protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 287, pp. 21–44). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-828-5:021>
- Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Jin, J., ve Gao, G. (2020). PlantRegMap: Charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D1104–D1113. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1020>
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu). (2024). *Tarımsal üretim istatistikleri*. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111vedil=1> (Erişim tarihi: 03 Aralık 2024)
- UNIPROT (2025). <https://www.uniprot.org/help/publications>
- Vaquerezas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., ve Luscombe, N. M. (2009). A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics*, 10(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrg2538>
- Verkest, A., Abeel, T., Heyndrickx, K. S., Van Leene, J., Lanz, C., Van De Slijke, E., De Winne, N., Eeckhout, D., Persiau, G., Van Breusegem, F., Inzé, D., Vandepoele, K., & De Jaeger, G. (2014). A generic tool for transcription factor target gene discovery in Arabidopsis cell suspension cultures based on tandem chromatin affinity purification. *Plant physiology*, 164(3), 1122–1133. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229617>
- Wang, K., Guo, Z.-L., Zhou, W.-T., Zhang, C., Zhang, Z.-Y., Lou, Y., Xiong, S.-X., Yao, X.-Z., Fan, J.-J., Zhu, J., ve Yang, Z.-N. (2018). The regulation of sporopollenin biosynthesis genes for rapid pollen wall formation. *Plant Physiology*, 178(1), 283–294. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00219>
- Wang, P., Hawkins, T. J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M. J., Sparkes, I., Hawes, C., & Hussey, P. J. (2014). The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Current Biology*, 24(12), 1397–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.003>
- Wang, P., & Hussey, P. J. (2019). Plant ER–PM contact sites in endocytosis and autophagy: Does the local composition of membrane phospholipid play a role? *Frontiers in Plant Science*, 10, 23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00023>

- Wang, P., Richardson, C., Hawkins, T. J., Sparkes, I., Hawes, C., & Hussey, P. J. (2016). Plant VAP27 proteins: Domain characterization, intracellular localization and role in plant development. *New Phytologist*, 210(4), 1311–1326. <https://doi.org/10.1111/nph.13857>
- Wang, P., Hawkins, T. J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M. J., Sparkes, I., Hawes, C., & Hussey, P. J. (2014). The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Current biology: CB*, 24(12), 1397–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.003>
- Wang, X., Song, Q., Flaishman, M. A., Chen, S. ve Ma, H. (2021). AGAMOUS gene as a new sex-identification marker in fig (*Ficus carica* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 755358. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755358>
- Wang, Y., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Zou, J.-J., Su, Z., & Wu, W.-H. (2008). Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148(3), 1201–1211. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126375>
- Wasternack, C., ve Song, S. (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and COI1–JAZ signaling. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303–1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Wei, S., Wang, L., Wang, J., Shi, D., Zhang, S., ve Lin, H. (2022). A transcriptional regulator that boosts grain yields and shortens growth duration in rice. *Science*, 376(6591), 605–611. <https://doi.org/10.1126/science.abi8455>
- Weinmann, A. S., ve Farnham, P. J. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*, 26(1), 37–47. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00006-3)
- Weirauch, M. T., Yang, A., Albu, M., Cote, A. G., Montenegro-Montero, A., Drewe, P., Najafabadi, H. S., Lambert, S. A., Mann, I., Cook, K., Zheng, H., Goity, A., van Bakel, H., Lozano, J. C., Galli, M., Lewsey, M. G., Huang, E., Mukherjee, T., Chen, X., Reece-Hoyes, J. S., ... Hughes, T. R. (2014). Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell*, 158(6), 1431–1443. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.009>
- Welch, R. P., Lee, C., Imbriano, P. M., ve Patil, S. (2014). ChIP-Enrich: Gene set enrichment testing for ChIP-seq data. *Nucleic Acids Research*, 42(13), e105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku463>
- Wu, X., Xia, M., Su, P., Zhang, Y., Tu, L., Zhao, H., Gao, W., Huang, L., & Hu, Y. (2024). MYB transcription factors in plants: A comprehensive review of their discovery, structure, classification, functional diversity and regulatory mechanism. *International journal of biological macromolecules*, 282(Pt 2), 136652. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136652>
- Wu, Y., Wen, Y., Zhang, B., ve Wu, W. (2022). Evolution and functional diversification of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Horticulture Research*, 9, uhac058. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac058>
- Xiong, S. X., Lu, J. Y., Lou, Y., Teng, X. D., Gu, J. N., Zhang, C., Shi, Q. S., Yang, Z. N., & Zhu, J. (2016). The transcription factors MS188 and AMS form a complex to activate the expression of CYP703A2 for sporopollenin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 88(6), 936–946. <https://doi.org/10.1111/tpj.13284>
- Yang, C., Xu, Z., Song, J., Conner, K., Vizcay Barrena, G., & Wilson, Z. A. (2007). Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *The Plant cell*, 19(2), 534–548. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046391>
- Yang, C., Song, J., Ferguson, A. C., Klisch, D., Simpson, K., Mo, R., Taylor, B., Mitsuda, N., & Wilson, Z. A. (2017). Transcription Factor MYB26 Is Key to Spatial Specificity in Anther

- Secondary Thickening Formation. *Plant physiology*, 175(1), 333–350. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00719>
- Ye, Q., Zhu, W., Li, L., Zhang, S., Yin, Y., Ma, H., & Wang, X. (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 6100–6105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912333107>
- Yennawar, N. H., Li, L.-C., Dudzinski, D. M., Tabuchi, A., & Cosgrove, D. J. (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14664–14671. doi:10.1073/pnas.0605979103.
- Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., Das, P. K., Kivioja, T., Dave, K., Zhong, F., Nitta, K. R., Taipale, M., Popov, A., Ginno, P. A., Domcke, S., Yan, J., Schübeler, D., Vinson, C., & Taipale, J. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6337), eaaj2239. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>
- Zhai, Y., Cui, Y., Fan, Z., Huang, H., Wang, Z., Chen, S., ve Ma, H. (2024). *Ficus carica* ERF12 improves fruit firmness at ripening. *Horticultural Plant Journal*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.03.002>
- Zhang, D., Zhou, H., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., Feng, X., ve Lin, H. (2025). Diverse roles of MYB transcription factors in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 67(3), 539–562. <https://doi.org/10.1111/jipb.13869>
- Zhang, Y., Immink, R., Liu, C. M., Emons, A. M., & Ketelaar, T. (2013). The Arabidopsis exocyst subunit SEC3A is essential for embryo development and accumulates in transient puncta at the plasma membrane. *The New phytologist*, 199(1), 74–88. <https://doi.org/10.1111/nph.12236>
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoutte, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., & Liu, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology*, 9(9), R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
- Zhang, X., Pan, L., Guo, W., Li, Y. ve Wang, W. (2022). A convergent mechanism of sex determination in dioecious plants: Distinct sex-determining genes display converged regulation on floral B-class genes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 953445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.953445>
- Zhong, S., Li, L., Wang, Z., Ge, Z., Li, Q., Bleckmann, A., Wang, J., Song, Z., Shi, Y., Liu, T., Li, L., Zhou, H., Wang, Y., Zhang, L., Wu, H. M., Lai, L., Gu, H., Dong, J., Cheung, A. Y., Dresselhaus, T., ... Qu, L. J. (2022). RALF peptide signaling controls the polytubey block in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6578), 290–296. <https://doi.org/10.1126/science.abl4683>
- Zuo, Z., Roy, B., Chang, Y. K., Granas, D., & Stormo, G. D. (2017). Measuring quantitative effects of methylation on transcription factor-DNA binding affinity. *Science advances*, 3(11), eaao1799. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao1799>

EKLER

EK 1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Kimyasal	Firma
Acrylamide	Merck
Agar	Merck
Agarose	Prona
Ammonium persulfate (APS)	Merck
Bis-acrylamide	Merck
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich
BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich
DTT (dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Merck
Glycine ($\geq 99\%$)	Merck
G Safe plus DNA jel boyası	GLPBIO
G Safe DNA jel boyası	Sigma-Aldrich
HCl (hydrochloric acid)	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
İmidazol ($\geq 99\%$)	Merck
IPTG	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol (2-propanol)	Merck
KCl	Merck
Methanol	Merck
MgCl ₂ ·6H ₂ O (magnesium chloride hexahydrate)	Merck
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄ (sodium phosphate monobasic)	Merck
NaOH	Sigma-Aldrich
poly(dI·dC)	Roche
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Merck
TEMED	Sigma-Aldrich
Triton X-100 (noniyonik deterjan)	Sigma-Aldrich
Tris base	Merck
Tryptone	Merck
Yeast extract	Merck
Formaldehit (%37, metanol stabilize)	Merck
Glisin ($\geq 99\%$)	Merck
Kanamisin sülfat	
HisPur™ Ni-NTA Reçinesi	Thermo Fisher Scientific
LB Broth (toz ortam)	Merck

EK 2. Hazırlanan Çözeltiler ve Tamponlar

LB Broth Ortamı (1 L, toz formdan hazırlanmıştır): LB Broth ortamı, 25 g LB Broth tozu deiyonize su (dH_2O) ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. pH değeri yaklaşık olarak 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ortam, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kısa süreli saklama koşullarında $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de tutulması önerilmektedir.

LB Agar Ortamı: LB Agar, %1,5 oranında agar ilavesiyle LB Broth ortamı esas alınarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım $121\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Sterilizasyon sonrası ortam yaklaşık $50\text{--}55\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş, gerekmesi hâlinde uygun antibiyotik eklenmiş ve steril petri kaplarına dökülerek katılaştırılmıştır.

2×YT Broth Ortamı (1 L): Aşağıdaki bileşenler kullanılarak hazırlanmıştır:

16 g tripton, 10 g maya özütü, 5 g NaCl Karışım, deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmış ve $121\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Kanamisin Stok Çözeltisi (50 mg/mL): Kanamisin sülfat, deiyonize suda çözülerek 50 mg/mL stok çözelti hâline getirilmiştir. Sterilizasyon amacıyla 0,22 μm por çapına sahip membran filtreden geçirilmiş ve $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

IPTG Stok Çözeltisi (1 M): IPTG, deiyonize suda çözülerek 1 M derişiminde hazırlanmış ve 0,22 μm membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Çözelti, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Kompetent Hücre Hazırlığında Kullanılan Çözeltiler

100 mM CaCl_2 + 10 mM MgCl_2 ($4\text{ }^\circ\text{C}$): Kalsiyum klorür ve magnezyum klorür, deiyonize suda çözülerek soğuk ortamda hazırlanmıştır.

100 mM CaCl_2 ($4\text{ }^\circ\text{C}$): Kalsiyum klorür çözeltisi, deiyonize suda çözülerek hazırlanmış ve $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Kısa süreli saklama işlemleri $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Uzun süreli saklama için ise %10 gliserol içeren 100 mM CaCl_2 çözeltisi hazırlanarak $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de depolanmıştır.

Fosfat Bazlı Lizis Tamponu (Protein Saflaştırma Amaçlı)

- 20 mM sodyum fosfat
- 300 mM NaCl

➤pH 7,4

Lizis tamponu, protein saflaştırma protokolleri çerçevesinde kullanılmıştır.

Ni-NTA Affinite Kromatografisi İçin Kullanılan Tamponlar (Native Koşullar)

➤**Dengeleme tamponu:** 20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4

➤**Yıkama tamponu:** 20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 25 mM imidazol, pH 7,4

➤**Elüsyon tamponu:** 20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4

Bu tamponlar, rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

ChIP ve EMSA Deneylerinde Kullanılan Bağlama Tamponu (5×)

➤100 mM HEPES (pH 7,5)

➤250 mM KCl

➤10 mM MgCl₂

➤5 mM DTT

➤0,5 mg/ml BSA

➤%25 gliserol

➤%0,1 Triton X-100

EMSA Deneylerinde Kullanılan Bağlama Tamponu (5×)

➤100 mM HEPES (pH 7,5)

➤250 mM KCl

➤10 mM MgCl₂

➤5 mM DTT

➤%25 gliserol

➤%0,1 Triton X-100

10× TAE Tamponu (1 L)

Tampon bileşimi aşağıdaki gibidir:

➤48,4 g Tris baz

➤11,4 mL glacial asetik asit

➤20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Bileşenler çözülerek deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. EDTA, Tris çözeltisine eklendikten sonra pH ayarlaması yapılmıştır.

10× TBE Tamponu (1 L)

➤108 g Tris baz

➤55 g borik asit

➤40 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Native PAGE uygulamalarında 1:20 oranında seyreltilerek 0,5× TBE olarak kullanılmıştır.

Not: EDTA çözeltisinin hazırlanması sırasında çözünürlük sorunu yaşanması durumunda pH değeri sodyum hidroksit (NaOH) ile yaklaşık 8,0'a ayarlanarak çözünme kolaylaştırılmıştır.

%4,5 Native PAGE Jel Hazırlığı

Jel, %30 akrilamid/bis (29:1) stok çözeltisinden hazırlanmış ve aşağıdaki bileşim kullanılmıştır (toplam hacim: 10 mL):

➤1,5 mL %30 akrilamid/bis (29:1) → (%4,5 son derişim)

➤1,0 mL 10× TBE tamponu

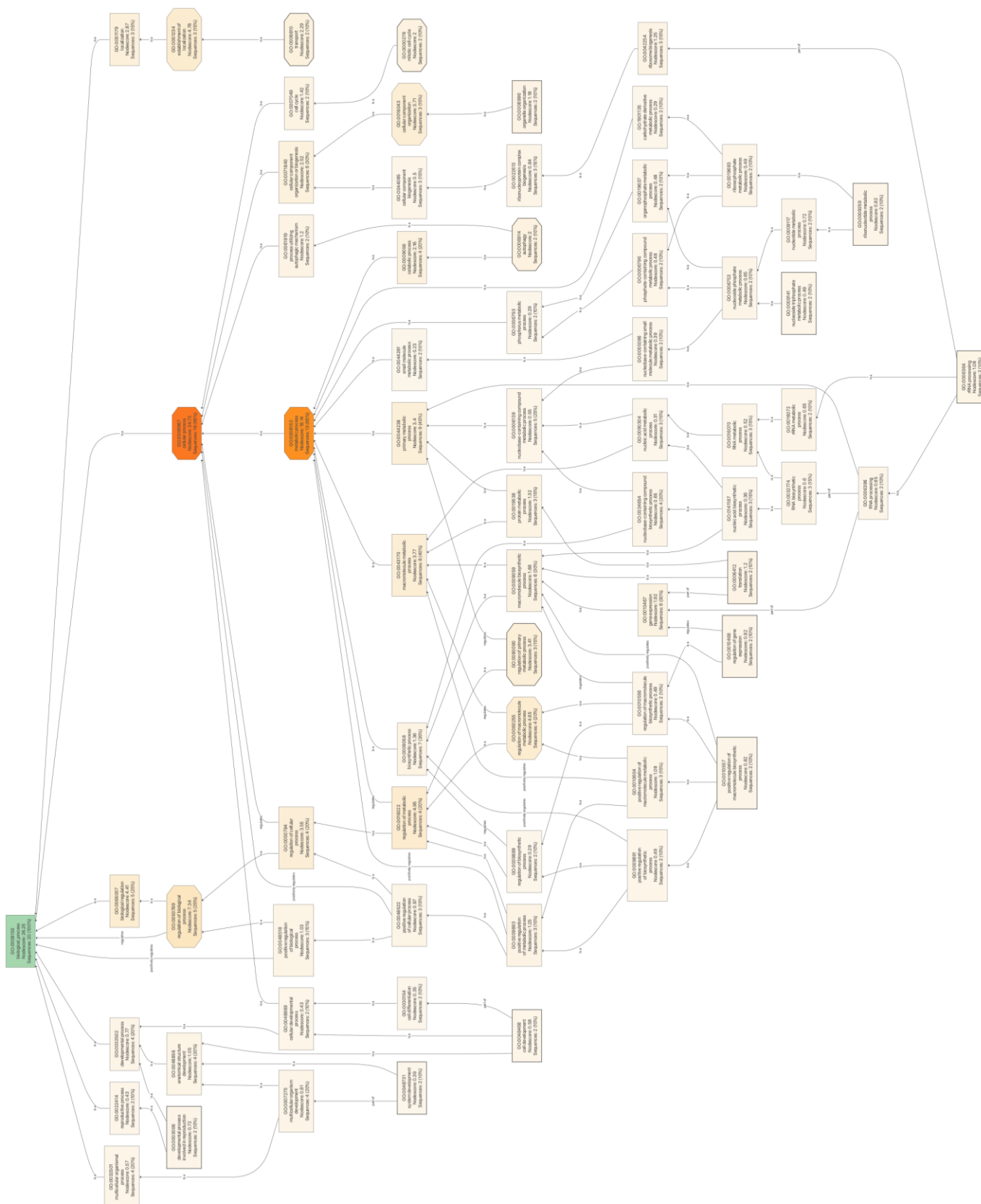
➤7,35 mL deiyonize su

➤100 µL %10 APS (taze hazırlanmış)

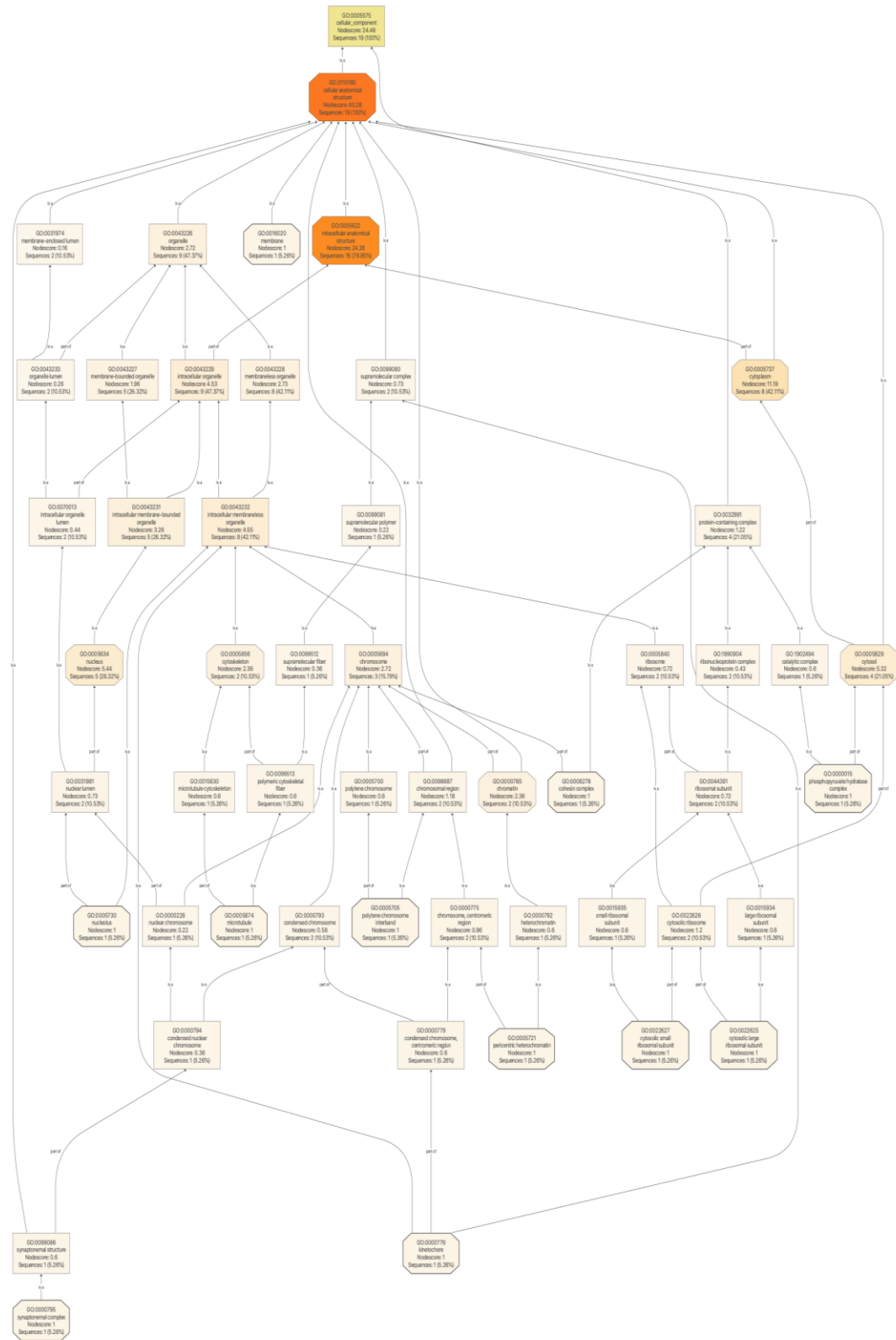
➤10 µL TEMED

Koşma tamponu olarak: 0,5× TBE tamponu kullanılmıştı.

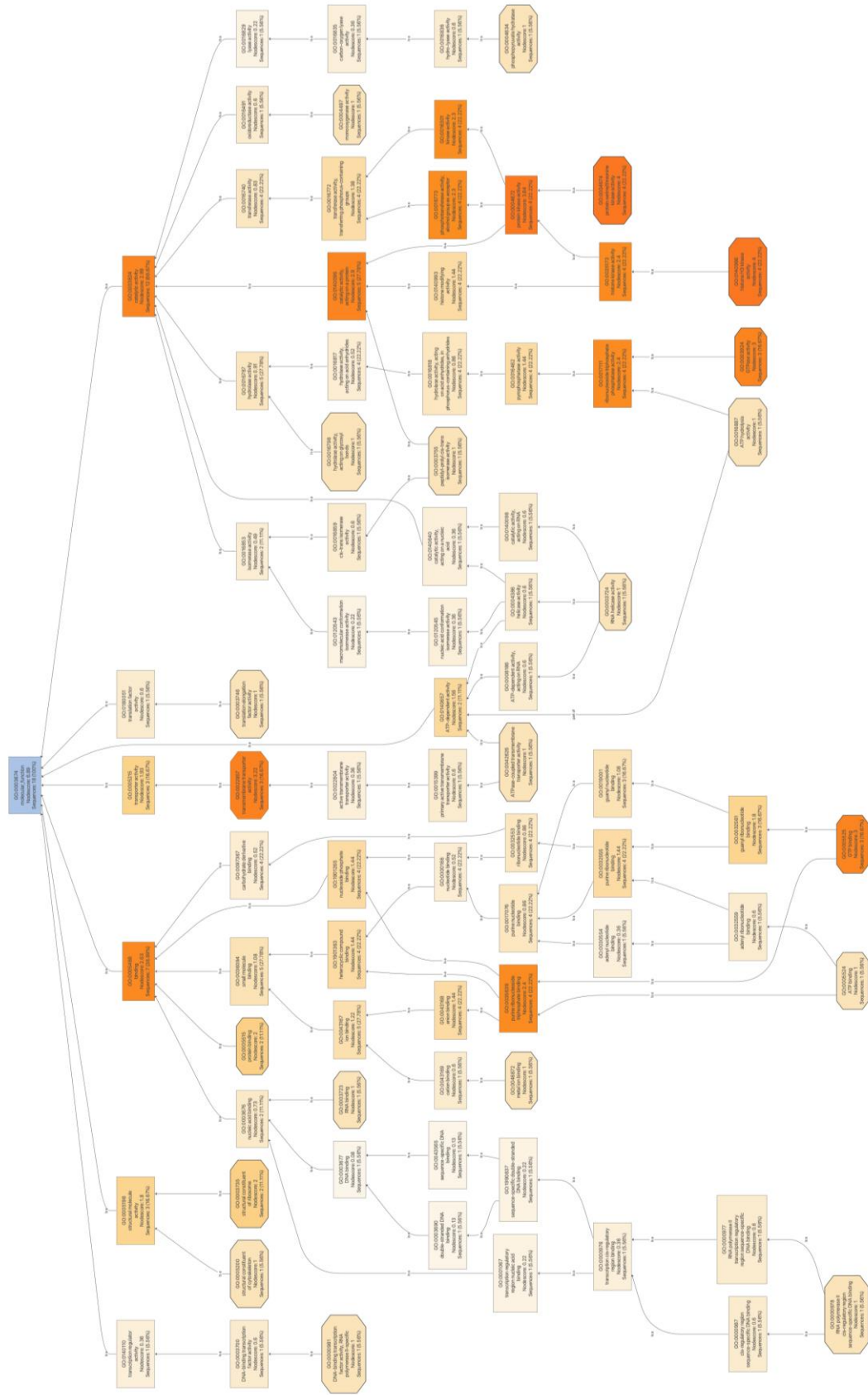
EK 3. Erkek bireylere özgü bağlanma bölgeleri için GO-Biological Process hiyerarşik süreç ağı diyagramı



EK 4. Erkek bireylere özgü bağlanma bölgeleri için GO–Cellular Component (CC) hiyerarşik terim ağı diyagramı



Ek 5. Erkek bireylere özgü bağlanma bölgeleri için GO–Molecular Function (MF) hiyerarşik terim ağı diyagramı



**Ek 6. Erkek bireylere özgü 480 pik ile ilişkili genlere ait GO (Gene Ontology)
fonksiyonel anotasyonları**

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_049595	-	-
TIFTF001_049110	-	-
TIFTF001_014365	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_048140	-	-
TIFTF001_054939	-	-
TIFTF001_054938	-	-
TIFTF001_020936	-	-
TIFTF001_043934	-	-
TIFTF001_041636	-	-
TIFTF001_007717	UBX domain-containing protein 6 isoform X2	-
TIFTF001_025148	-	P:defense response to fungus; F:protein binding
TIFTF001_040669	-	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity; F:deNEDDylase activity
TIFTF001_028417	-	-
TIFTF001_004566	-	-
TIFTF001_001164	-	-
TIFTF001_025153	-	-
TIFTF001_026123	40S ribosomal protein S21-like	-
TIFTF001_029630	-	P:endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA from 5.8S rRNA and LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA); P:endonucleolytic cleavage to generate mature 3'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA); P:translation; F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; C:cytosolic small ribosomal subunit
TIFTF001_048252	Ribonuclease T2	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_050216	İnterleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X2	P:RNA catabolic process; F:RNA binding; F:RNA endonuclease activity; F:ribonuclease T2 activity; C:extracellular region
TIFTF001_054936	-	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_015448	-	-
TIFTF001_038461	-	-
TIFTF001_048139	-	-
TIFTF001_014352	-	-
TIFTF001_049468	-	-
TIFTF001_049587	-	-
TIFTF001_020705	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_040775	-	-
TIFTF001_028787	-	-
TIFTF001_041989	-	-
TIFTF001_004311	Tetratricopeptide repeat protein 1	-
TIFTF001_007944	Protein white-like	F:protein binding
TIFTF001_007941	-	F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity; F:ABC-type transporter activity; C:membrane
TIFTF001_042711	-	-
TIFTF001_006521	İnterleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X2	-
TIFTF001_001191	Phospholipase A2 group XV-like	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:protein binding; F:ATP binding
TIFTF001_027420	-	P:lipid metabolic process; F:O-acyltransferase activity
TIFTF001_026573	Probable nitronate monooxygenase	-
TIFTF001_026572	-	F:nitronate monooxygenase activity
TIFTF001_052864	-	P:monoatomic cation transport; P:regulation of pH; P:transmembrane transport; P:proton transmembrane transport; F:antiporter activity; C:endomembrane system; C:membrane
TIFTF001_048365	-	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_051411	-	-
TIFTF001_016686	-	-
TIFTF001_052747	Flavin-containing monooxygenase 5-like	-
TIFTF001_016324	Tubulin beta-4B chain-like isoform X1	F:N,N-dimethylaniline monooxygenase activity; F:flavin adenine dinucleotide binding; F:NADP binding
TIFTF001_017414	-	P:microtubule cytoskeleton organization; P:mitotic cell cycle; P:microtubule-based process; F:GTPase activity; F:structural constituent of cytoskeleton; F:GTP binding; C:cytoplasm; C:microtubule
TIFTF001_054803	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_052746	Flavin-containing monooxygenase 5-like	P:fatty acid metabolic process; P:defense response; F:stearoyl-CoA 9-desaturase activity; F:oxidoreductase activity; F:stearoyl-[ACP] desaturase activity; C:chloroplast stroma
TIFTF001_017530	Thioredoxin 1-like isoform X1	F:N,N-dimethylaniline monooxygenase activity; F:flavin adenine dinucleotide binding; F:NADP binding
TIFTF001_042702	-	F:protein-disulfide reductase activity; F:oxidoreductase activity; F:oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor; C:cytoplasm
TIFTF001_027543	-	-
TIFTF001_027669	Ufm1-specific protease 2-like	-
TIFTF001_002153	-	-
TIFTF001_050551	-	-
TIFTF001_018737	Cysteine protease ATG4D isoform X1	-
TIFTF001_037357	Pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial-like	F:protein-phosphatidylethanolamide deconjugating activity
TIFTF001_017529	-	F:protein binding
TIFTF001_014376	GTP-binding nuclear protein Ran	-
TIFTF001_048591	-	P:ribosomal subunit export from nucleus; P:protein import into nucleus; P:nucleocytoplasmic transport; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:nucleus; C:cytoplasm
TIFTF001_036263	-	-
TIFTF001_028523	-	-
TIFTF001_027796	-	-
TIFTF001_035053	-	-
TIFTF001_027797	-	-
TIFTF001_040630	-	-
TIFTF001_004336	Calcium-binding mitochondrial carrier protein scamc-1	-
TIFTF001_004761	-	P:transmembrane transport
TIFTF001_036354	-	-
TIFTF001_014563	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 isoform X8	-
TIFTF001_039623	-	P:protein phosphorylation; P:intracellular signal transduction; F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_013475	-	F:nucleic acid binding; F:RNA-DNA hybrid ribonuclease activity
TIFTF001_015538	Poly(A) polymerase type 3 isoform X1	-
TIFTF001_027529	RNA-binding region-containing protein 3-like	P:obsolete mRNA polyadenylation; P:RNA 3'-end processing; F:RNA binding; F:obsolete polynucleotide adenylyltransferase activity; F:nucleotidyltransferase activity; F:poly(A) RNA polymerase activity; C:nucleus
TIFTF001_014320	-	P:mRNA splicing, via spliceosome; F:nucleic acid binding; F:RNA binding; F:U12 snRNA binding; F:pre-mRNA intronic binding; C:U12-type spliceosomal complex
TIFTF001_010085	-	-
TIFTF001_027401	-	-
TIFTF001_028615	-	-
TIFTF001_050770	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial-like	-
TIFTF001_015402	Phosphoethanolamine methyltransferase isoform X1	P:response to nutrient; P:branched-chain amino acid catabolic process; C:obsolete mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex
TIFTF001_017702	-	P:phosphatidylcholine biosynthetic process; F:phosphoethanolamine N-methyltransferase activity
TIFTF001_037454	-	-
TIFTF001_038786	-	-
TIFTF001_037213	-	-
TIFTF001_013587	Dipeptidyl peptidase 9 isoform X2	-
TIFTF001_050778	Leucine-rich repeat-containing protein 2	P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity; F:dipeptidyl-peptidase activity
TIFTF001_031910	Small ribosomal subunit protein ms39	P:defense response; P:defense response to other organism
TIFTF001_013467	-	F:protein binding
TIFTF001_050536	-	P:regulation of DNA-templated transcription; F:DNA binding
TIFTF001_046390	-	-
TIFTF001_044092	-	-
TIFTF001_050409	-	-
TIFTF001_045187	-	-
TIFTF001_011282	-	-
TIFTF001_001245	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_026771	-	P:protein transport; P:post-translational protein targeting to membrane, translocation; C:endoplasmic reticulum; C:endoplasmic reticulum membrane; C:membrane
TIFTF001_021083	-	-
TIFTF001_053910	-	-
TIFTF001_018945	İnterleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X4	-
TIFTF001_015434	Ras-related protein Rab-11A	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_036577	-	F:GTPase activity; F:GTP binding; C:endosome
TIFTF001_038999	-	-
TIFTF001_035126	Extensin-2-like	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_015557	-	-
TIFTF001_039605	-	F:protein binding
TIFTF001_048569	-	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_036570	-	-
TIFTF001_048566	-	-
TIFTF001_036572	-	-
TIFTF001_023023	-	-
TIFTF001_049897	-	-
TIFTF001_056064	-	-
TIFTF001_001383	-	-
TIFTF001_048673	-	-
TIFTF001_046373	-	-
TIFTF001_048551	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_046374	-	-
TIFTF001_017605	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_035135	-	P:obsolete intracellular sequestering of iron ion; P:intracellular manganese ion homeostasis; F:iron ion transmembrane transporter activity; F:manganese ion transmembrane transporter activity; C:membrane
TIFTF001_046371	-	-
TIFTF001_046372	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_035258	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_048439	-	-
TIFTF001_048558	-	-
TIFTF001_035130	-	-
TIFTF001_046257	-	-
TIFTF001_048555	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_047586	-	-
TIFTF001_048311	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_025454	-	-
TIFTF001_006953	-	-
TIFTF001_004655	Queuosine salvage protein	F:DNA binding
TIFTF001_016708	-	P:tRNA modification; P:obsolete tRNA-guanine transglycosylation
TIFTF001_047452	-	-
TIFTF001_035464	-	-
TIFTF001_047451	-	-
TIFTF001_010044	Apoptotic protease-activating factor 1 isoform X1	-
TIFTF001_052916	-	P:defense response; P:defense response to other organism; F:ADP binding
TIFTF001_048668	-	-
TIFTF001_002429	İnterleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X2	-
TIFTF001_024211	-	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_025663	-	P:carbohydrate metabolic process; P:sucrose catabolic process; F:sucrose alpha-glucosidase activity; F:endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase activity; C:mitochondrion
TIFTF001_002301	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D-like isoform X3	-
TIFTF001_017904	-	P:protein phosphorylation; P:peptidyl-serine phosphorylation; P:intracellular signal transduction; P:protein autophosphorylation; F:protein kinase activity; F:calcium/calmodulin-dependent protein kinase activity; F:calcium ion binding; F:calmodulin binding; F:ATP binding; F:calcium-dependent protein serine/threonine kinase activity; C:nucleus; C:cytoplasm
TIFTF001_016816	-	P:regulation of phenylpropanoid metabolic process; C:mediator complex
TIFTF001_035474	-	-
TIFTF001_048415	-	-
TIFTF001_034116	-	P:translation; F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; C:cytosolic large ribosomal subunit
TIFTF001_048414	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_050726	-	-
TIFTF001_044055	-	-
TIFTF001_024100	60S ribosomal protein l18a	-
TIFTF001_034358	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_011277	Protease 2-like	-
TIFTF001_050838	-	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity; F:serine-type peptidase activity
TIFTF001_045378	-	-
TIFTF001_011030	-	F:DNA binding; C:nucleus
TIFTF001_051929	-	-
TIFTF001_050719	-	-
TIFTF001_040801	-	-
TIFTF001_003531	-	-
TIFTF001_027946	Pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial	-
TIFTF001_004501	-	P:RNA modification; F:RNA binding; F:protein binding
TIFTF001_027701	-	-
TIFTF001_040921	-	-
TIFTF001_001478	-	-
TIFTF001_034127	-	-
TIFTF001_032065	-	F:protein binding
TIFTF001_012232	Cytochrome P450 4C1-like	-
TIFTF001_037998	-	F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding
TIFTF001_048514	-	-
TIFTF001_024683	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	-
TIFTF001_049843	-	P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:membrane
TIFTF001_038815	-	-
TIFTF001_054186	-	P:lipid biosynthetic process; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity
TIFTF001_016906	-	F:acyltransferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups
TIFTF001_037963	-	-
TIFTF001_048989	Acidic mammalian chitinase-like	-
TIFTF001_048742	-	P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process; F:chitinase activity; F:chitin binding; C:extracellular region

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_032151	-	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_022232	Palmitoyl-protein thioesterase ABHD10, mitochondrial-like isoform X1	-
TIFTF001_025985	-	C:cytosol
TIFTF001_015806	Peroxiredoxin-5, mitochondrial-like	-
TIFTF001_034226	-	P:cellular response to oxidative stress; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:cell redox homeostasis; F:thioredoxin peroxidase activity; F:oxidoreductase activity; C:cytoplasm; C:mitochondrion
TIFTF001_038829	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like isoform X1	-
TIFTF001_014956	Transportin-3-like	F:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors
TIFTF001_056117	-	P:protein import into nucleus; P:intracellular protein transport; F:small GTPase binding; C:cytoplasm; C:nuclear membrane
TIFTF001_033375	TBCC domain-containing protein 1-like	-
TIFTF001_039914	-	-
TIFTF001_037735	-	-
TIFTF001_042079	Serine/threonine-protein kinase pelle	-
TIFTF001_046314	-	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_024541	-	-
TIFTF001_027810	-	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; C:cell wall; C:obsolete anchored component of plasma membrane
TIFTF001_002612	-	-
TIFTF001_023456	-	-
TIFTF001_024424	-	P:cellulose microfibril organization; P:plant-type cell wall cellulose biosynthetic process; C:membrane; C:obsolete anchored component of plasma membrane
TIFTF001_001522	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1-like	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_030078	-	P:defense response; P:defense response to other organism; F:protein binding; F:ADP binding
TIFTF001_033588	Toll-like receptor 4	-
TIFTF001_033343	-	P:signal transduction
TIFTF001_034552	-	-
TIFTF001_007097	-	-
TIFTF001_036977	-	-
TIFTF001_048603	-	-
TIFTF001_046665	-	-
TIFTF001_050913	-	-
TIFTF001_046543	-	-
TIFTF001_044244	Serine-rich 25 kda antigen protein-like	-
TIFTF001_034204	SWI/SNF complex subunit SMARCC2-like	-
TIFTF001_033599	Leucine-rich repeat-containing protein 30	F:protein binding
TIFTF001_033353	-	P:defense response
TIFTF001_033352	Apoptotic protease-activating factor 1	-
TIFTF001_012431	-	F:ADP binding
TIFTF001_036861	-	-
TIFTF001_047625	-	-
TIFTF001_045444	-	-
TIFTF001_044231	-	-
TIFTF001_045563	-	-
TIFTF001_003964	-	-
TIFTF001_004813	Cinnamoyl-coa reductase 1-like isoform X1	P:defense response; C:membrane
TIFTF001_024520	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase-like isoform X1	F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor
TIFTF001_019184	-	P:defense response to other organism; F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding
TIFTF001_026822	-	F:protein binding
TIFTF001_025613	-	-
TIFTF001_034656	-	-
TIFTF001_014924	Solute carrier family 15 member 4-like	-
TIFTF001_056567	-	P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:plasma membrane; C:membrane
TIFTF001_041072	-	-
TIFTF001_035743	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_013831	Inactive rhomboid protein 1	-
TIFTF001_036834	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	P:proteolysis; P:lipid transport; F:serine-type endopeptidase activity; F:lipid binding; C:membrane
TIFTF001_044582	-	P:cytoplasmic translational initiation; F:translation initiation factor activity; C:cytoplasm; C:eukaryotic translation initiation factor 3 complex
TIFTF001_007024	-	-
TIFTF001_032123	-	-
TIFTF001_033453	Nucleoside diphosphate kinase	-
TIFTF001_007140	-	P:GTP biosynthetic process; P:UTP biosynthetic process; P:CTP biosynthetic process; F:nucleoside diphosphate kinase activity
TIFTF001_044578	-	-
TIFTF001_042274	-	-
TIFTF001_020020	Alpha-N-acetylgalactosaminidase-like isoform X1	-
TIFTF001_002811	Protein SREK1IP1-like	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
TIFTF001_024740	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_034753	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase-like	-
TIFTF001_012405	-	F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding
TIFTF001_031362	-	-
TIFTF001_037906	-	-
TIFTF001_008021	Choline transporter-like protein 5 isoform X1	-
TIFTF001_010463	Double-strand-break repair protein rad21 homolog	P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:membrane
TIFTF001_002609	-	P:sister chromatid cohesion; P:mitotic sister chromatid cohesion; P:synaptonemal complex assembly; P:replication-born double-strand break repair via sister chromatid exchange; F:chromatin binding

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_044688	-	P:jasmonic acid metabolic process; P:salicylic acid metabolic process; F:methyl indole-3-acetate esterase activity; F:methyl salicylate esterase activity; F:methyl jasmonate esterase activity
TIFTF001_019038	Multidrug and toxin extrusion protein 1-like isoform X2	-
TIFTF001_046505	-	-
TIFTF001_029177	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_031135	-	-
TIFTF001_006195	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B-like	-
TIFTF001_033791	Nucleolysin TIAR isoform X1	P:DNA repair; P:mitotic sister chromatid cohesion; C:chromatin; C:nucleus
TIFTF001_041160	-	F:nucleic acid binding; F:RNA binding
TIFTF001_010696	E3 ubiquitin-protein ligase RNF126 isoform X1	-
TIFTF001_030049	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2-like	P:protein ubiquitination; F:ubiquitin protein ligase activity; C:cytoplasm
TIFTF001_042133	-	P:obsolete proline biosynthetic process; P:L-proline biosynthetic process; F:pyrroline-5-carboxylate reductase activity
TIFTF001_001509	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase-like	-
TIFTF001_042011	Elongation factor 1-alpha 1	P:intracellular calcium ion homeostasis; F:nucleotide binding; F:transporter activity; F:ATP binding; F:P-type ion transporter activity; F:ATP hydrolysis activity; F:P-type transmembrane transporter activity; C:membrane; C:obsolete integral component of endoplasmic reticulum membrane
TIFTF001_047704	-	F:GTP binding
TIFTF001_046978	-	-
TIFTF001_009532	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_030492	Transcriptional activator Myb-like isoform X2	-
TIFTF001_032551	-	P:response to auxin

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_010521	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	-
TIFTF001_034613	-	P:protein peptidyl-prolyl isomerization; F:peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; C:intracellular membrane-bounded organelle
TIFTF001_032557	-	-
TIFTF001_019455	interleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X4	-
TIFTF001_023605	-	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_023960	-	-
TIFTF001_020579	-	-
TIFTF001_021664	-	-
TIFTF001_045877	-	-
TIFTF001_033655	-	-
TIFTF001_009401	-	-
TIFTF001_033895	-	F:protein binding
TIFTF001_010870	-	-
TIFTF001_011840	cold-inducible RNA-binding protein B-like	-
TIFTF001_000835	-	F:nucleic acid binding; F:RNA binding; F:mRNA binding; C:cytosol
TIFTF001_040292	-	P:endomembrane system organization
TIFTF001_045984	-	-
TIFTF001_042473	-	-
TIFTF001_015082	-	-
TIFTF001_050090	-	-
TIFTF001_006139	plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 isoform X2	-
TIFTF001_045866	-	F:nucleotide binding; F:transporter activity; F:P-type calcium transporter activity; F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity; F:ATPase-coupled monoatomic cation transmembrane transporter activity; C:membrane; C:intracellular membrane-bounded organelle
TIFTF001_024942	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_046835	-	-
TIFTF001_043327	-	-
TIFTF001_052266	-	-
TIFTF001_032415	-	-
TIFTF001_034712	-	P:response to auxin
TIFTF001_032414	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_019113	-	-
TIFTF001_017057	-	P:regulation of DNA-templated transcription; F:transcription coregulator activity; F:transcription coactivator activity; F:chromatin DNA binding
TIFTF001_000866	-	-
TIFTF001_017294	exocyst complex component 7-like	-
TIFTF001_002925	-	P:exocytosis; F:phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding; C:exocyst
TIFTF001_016081	-	-
TIFTF001_001710	pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial-like	-
TIFTF001_007139	-	F:protein binding
TIFTF001_027075	adipocyte plasma membrane-associated protein	-
TIFTF001_027197	traB domain-containing protein	P:biosynthetic process; F:strictosidine synthase activity
TIFTF001_030000	adipocyte plasma membrane-associated protein	-
TIFTF001_027074	enolase-like	P:biosynthetic process; F:strictosidine synthase activity
TIFTF001_010418	ribosome biogenesis protein NOP53	P:glycolytic process; F:magnesium ion binding; F:phosphopyruvate hydratase activity; C:phosphopyruvate hydratase complex
TIFTF001_019469	-	P:ribosomal large subunit assembly; P:rRNA processing; F:5S rRNA binding; C:nucleolus
TIFTF001_020443	prostaglandin E synthase 2 isoform X2	-
TIFTF001_001702	-	F:prostaglandin-E synthase activity; C:mitochondrion
TIFTF001_044998	-	-
TIFTF001_042698	-	-
TIFTF001_043666	-	-
TIFTF001_027285	-	-
TIFTF001_012906	-	P:regulation of DNA-templated transcription; F:DNA binding; F:DNA-binding transcription factor activity
TIFTF001_051274	-	P:phospholipid metabolic process; P:arachidonate secretion; F:phospholipase A2 activity
TIFTF001_052127	-	-
TIFTF001_030217	-	-
TIFTF001_052007	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_050068	-	-
TIFTF001_043539	-	-
TIFTF001_040389	-	-
TIFTF001_027048	-	-
TIFTF001_007318	wee1-like protein kinase isoform X2	-
TIFTF001_005258	katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_027054	ATP-dependent RNA helicase DDX18	F:protein binding
TIFTF001_032761	-	P:maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA); F:nucleic acid binding; F:RNA helicase activity; F:ATP binding; C:nucleolus
TIFTF001_052476	-	-
TIFTF001_032649	-	-
TIFTF001_017584	-	-
TIFTF001_043882	-	-
TIFTF001_018675	Bloom syndrome protein homolog isoform X2	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_021636	-	P:double-strand break repair via homologous recombination; P:DNA replication; P:obsolete DNA unwinding involved in DNA replication; P:DNA repair; P:DNA recombination; P:obsolete DNA duplex unwinding; P:obsolete cellular metabolic process; F:nucleotide binding; F:nucleic acid binding; F:four-way junction helicase activity; F:3'-5' DNA helicase activity; C:nucleus; C:chromosome; C:cytoplasm
TIFTF001_040131	-	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_044619	-	-
TIFTF001_043768	-	-
TIFTF001_041589	-	-
TIFTF001_044615	-	-
TIFTF001_009602	metacaspase-2-like	-
TIFTF001_005034	interleukin-1 receptor-associated kinase 4 isoform X2	F:protein binding
TIFTF001_030550	-	P:protein phosphorylation; P:recognition of pollen; F:protein kinase activity; F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_030674	RB1-inducible coiled-coil protein 1 isoform X1	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_029566	bromodomain and WD repeat-containing protein 3-like isoform X2	P:autophagosome assembly; P:autophagy of mitochondrion; P:positive regulation of protein phosphorylation; P:autophagy of peroxisome; P:piecemeal microautophagy of the nucleus; P:reticulophagy; F:protein kinase binding; F:molecular adaptor activity; C:extrinsic component of membrane; C:phagophore assembly site membrane; C:Atg1/ULK1 kinase complex
TIFTF001_026056	-	P:regulation of DNA-templated transcription; P:response to hormone; F:DNA binding; F:protein binding; C:nucleus
TIFTF001_027024	-	P:protein phosphorylation; P:recognition of pollen; F:protein kinase activity; F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding
TIFTF001_029564	-	-
TIFTF001_011957	-	-
TIFTF001_052345	-	P:obsolete aromatic compound biosynthetic process; P:methylation; F:methyltransferase activity; F:O-methyltransferase activity; F:S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity
TIFTF001_031405	-	-
TIFTF001_055614	-	-
TIFTF001_033943	-	-
TIFTF001_020630	-	F:nucleic acid binding; F:RNA-DNA hybrid ribonuclease activity
TIFTF001_039001	-	-
TIFTF001_038154	-	-
TIFTF001_038035	-	-
TIFTF001_038156	-	-
TIFTF001_045817	-	-
TIFTF001_045818	-	-
TIFTF001_020757	-	-
TIFTF001_043634	-	-
TIFTF001_043635	-	-
TIFTF001_004057	-	-
TIFTF001_004298	probable glucan 1,3-beta-glucosidase A	-
TIFTF001_050273	-	P:actin filament organization; P:establishment or maintenance of cell polarity; P:cell migration; P:actin filament bundle assembly; P:obsolete organic substance metabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; F:actin filament binding; C:cytoplasm; C:actin cytoskeleton

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_020641	-	P:maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA); C:nucleolus
TIFTF001_039255	-	P:cell differentiation; F:transcription cis-regulatory region binding; C:nucleus
TIFTF001_033709	-	-
TIFTF001_021739	-	-
TIFTF001_044837	-	-
TIFTF001_028008	ABC transporter G family member 14	-
TIFTF001_043749	-	F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity
TIFTF001_042533	F-box/WD repeat-containing protein 7	-
TIFTF001_020524	-	F:protein binding; F:metal ion binding
TIFTF001_001094	-	-
TIFTF001_003033	-	F:manganese ion binding; C:cell wall
TIFTF001_006541	-	-
TIFTF001_002061	myb-related protein A isoform X1	F:hydrolase activity, acting on ester bonds; C:apoplast
TIFTF001_015014	-	-
TIFTF001_018402	-	C:obsolete mitochondrial respiratory chain complex II, succinate dehydrogenase complex (ubiquinone)
TIFTF001_040460	-	P:protein insertion into mitochondrial outer membrane; F:protein binding; C:mitochondrial outer membrane translocase complex
TIFTF001_014045	deubiquitinase DESI2-like	F:nucleic acid binding; F:zinc ion binding
TIFTF001_015134	-	P:protein deubiquitination; P:protein modification by small protein removal; F:peptidase activity; F:deubiquitinase activity
TIFTF001_042523	-	-
TIFTF001_004366	-	-
TIFTF001_038148	-	-
TIFTF001_039592	-	-
TIFTF001_016690	-	-
TIFTF001_014273	-	-
TIFTF001_041666	-	-
TIFTF001_040459	-	F:DNA binding
TIFTF001_041787	sulfotransferase 1A2-like	-
TIFTF001_044812	-	P:sulfation; F:sulfotransferase activity; C:cytoplasm
TIFTF001_026370	uncharacterized 29.1 kDa protein in cryB1 5'region-like	-
TIFTF001_029883	-	-
TIFTF001_026252	GH3 domain-containing protein	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_038477	-	F:acid-amino acid ligase activity; C:cytoplasm
TIFTF001_039329	-	-
TIFTF001_017337	-	-
TIFTF001_038590	-	-
TIFTF001_017696	-	-
TIFTF001_014182	-	-
TIFTF001_014065	-	-
TIFTF001_039444	-	-
TIFTF001_040204	-	P:defense response; P:defense response to other organism; F:ADP binding
TIFTF001_040685	-	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_005115	glutamate receptor ionotropic, delta-1-like	-
TIFTF001_026141	transmembrane ascorbate-dependent reductase CYB561-like	F:ligand-gated monoatomic ion channel activity; F:signaling receptor activity; C:plasma membrane; C:membrane
TIFTF001_027590	-	F:oxidoreductase activity
TIFTF001_027352	-	-
TIFTF001_027110	-	P:proteolysis; F:cysteine-type peptidase activity
TIFTF001_049486	-	-
TIFTF001_049485	-	-
TIFTF001_050236	-	-
TIFTF001_018656	-	-
TIFTF001_016595	-	-
TIFTF001_039330	-	-
TIFTF001_053618	-	F:magnesium ion binding; F:terpene synthase activity; F:lyase activity
TIFTF001_038001	-	-
TIFTF001_033909	-	-
TIFTF001_037396	-	-
TIFTF001_027598	-	F:protein binding
TIFTF001_040554	-	P:regulation of protein complex stability; C:chloroplast thylakoid membrane
TIFTF001_040553	-	-
TIFTF001_039664	-	-
TIFTF001_004792	-	-
TIFTF001_026124	-	-
TIFTF001_019955	-	-
TIFTF001_026342	-	-
TIFTF001_053944	-	-
TIFTF001_050661	-	-
TIFTF001_047010	-	-
TIFTF001_051757	-	-
TIFTF001_051758	-	-
TIFTF001_047013	-	-

Gen/Transkript kimliği	Protein tanımı	İşlevsel ipuçları / alanlar (GO/alan)
TIFTF001_027768	-	-
TIFTF001_034296	-	-
TIFTF001_052710	-	-
TIFTF001_050657	-	-
TIFTF001_052947	-	-
TIFTF001_046399	-	-
TIFTF001_037670	-	-
TIFTF001_004899	-	-
TIFTF001_043316	-	-
TIFTF001_043675	-	-
TIFTF001_000606	-	-
TIFTF001_047752	-	-
TIFTF001_001564	-	-
TIFTF001_049759	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2a	-
TIFTF001_042680	-	-
TIFTF001_009002	-	-
TIFTF001_018888	-	-
TIFTF001_022661	-	-
TIFTF001_023154	-	-
TIFTF001_027281	-	-
TIFTF001_028057	-	-
TIFTF001_028704	-	-
TIFTF001_030026	pyrroline-5-carboxylate reductase 3	-
TIFTF001_031358	-	P:L-proline biosynthetic process; F:pyrroline-5-carboxylate reductase activity
TIFTF001_031498	-	-
TIFTF001_031615	-	-
TIFTF001_032078	-	-
TIFTF001_032756	-	-
TIFTF001_032799	-	-
TIFTF001_032815	-	-
TIFTF001_032828	-	-
TIFTF001_033044	-	-
TIFTF001_034815	-	-
TIFTF001_035528	-	-
TIFTF001_035608	-	-
TIFTF001_055166	-	-
TIFTF001_054650	-	-
TIFTF001_054683	-	-
TIFTF001_054284	-	-
TIFTF001_052183	-	-
TIFTF001_052190	-	-
TIFTF001_052349	-	-