



Eucalyptus grandis YABBY Transkripsiyon Faktörlerinin Genom Bazında Analizi

Emre İLHAN*

Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 22.03.2018

Kabul Tarihi/Accepted: 02.05.2018

ORCID ID

orcid.org/0000-0002-8404-7900

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: emre.ilhan@erzurum.edu.tr

Özet: YABBY gen ailesi bitki transkripsiyon faktörlerinden biridir. Bu çalışmanın amacı *Eucalyptus grandis* bitkisinde in silico olarak YABBY gen ailesinin üyelerini genom çapında belirlemek ve karakterize etmektir. Bu çalışmada çeşitli in silico yöntemler kullanılmıştır. Ökalyptus genomunda 6 Egra-YABBY proteini tespit edilmiştir. Bu proteinler 18.39 ile 32.38 kDa ağırlığına sahip olup, 168-290 arasında değişen amino asitten oluşmuştur. İzoelektrik noktaları 5.54 (Egra-YABBY- 2) ile 9.92 (Egra-YABBY- 6) arasındadır. Egra-YABBY genleri arasında tahmini belirlenen ekzonların sayısı en düşük 6, en yüksek 7 olarak elde edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda Egra- YABBY proteinleri ile *Arabidopsis thaliana* ve *Vitis vinifera* türlerinin proteinleri 5 ana grupta (FIL, INO, CRC, YAB2 ve YAB5) kümelendi. Egra-YABBY-4/Egra-YABBY-5 genleri arasında segmental duplikasyon tespit edilmiştir. Egra-YABBY genlerinin ifade profilleri bu genlerin farklı dokularda ifade edildiğini ortaya çıkarmış ve bitkinin gelişim süresince çeşitli fizyolojik işlevlerde görev alabildiklerini de göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, ökalyptus bitkisinde YABBY gen ailesinin moleküler temellerinin daha fazla anlaşılması için potansiyel biyoteknolojik kaynak ve ilave bilgiler sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Domain, in silico analiz, ökalyptus, transkripsiyon faktörü, YABBY

Genome-Wide Analysis of *Eucalyptus grandis* YABBY Transcription Factors

Abstract: YABBY gene family is one of the plant transcription factors. The aim of this study was to characterize and define the YABBY gene family members in silico, in *Eucalyptus grandis* genome. In this study, various in silico methods was used. A total of 6 Egra-YABBY proteins were discovered in *Eucalyptus grandis* genome. The molecular weight and length of these proteins ranged from 18.39 kDa to 32.38 kDa and based from 168 to 290 amino acids. Isoelectric points (pI) of YABBY proteins were between 5.54 (Egra-YABBY- 2) and 9.92 (Egra-YABBY- 6). The estimated number of exons found among the Egra-YABBY genes was the lowest of 6 and the highest of 7. The results of the phylogenetic analysis showed that YABBY proteins of *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, and *Vitis vinifera* were clustered into 5 main groups (FIL, INO, CRC, YAB2 ve YAB5). Segmental duplication was detected between the Egra-YABBY-4/Egra-YABBY-5 genes. Expression profiles of Egra-YABBY genes have revealed that these genes are expressed in different tissues and can function in a variety of physiological processes during plant development. The results of this study will provide potential biotechnological resources and additional information for further understanding of the molecular bases of the YABBY gene family in the eucalyptus plant.

Keywords: Domain, in silico analysis, eucalyptus, transcription factor, YABBY

1. Giriş

Mersingiller (Myrtaceae) ailesine ait olan ökaliptus Avustralya florasındaki en baskın cinstir. Bu cins yaklaşık 700 tür içerir ve Avustralya orijinelidir. Ökaliptus ağaç dikimleri dünya çapındaki dikili ormanların yaklaşık % 10'unu oluşturur (Andrade ve ark., 2018). Hızlı büyümeleri ve üstün ağaç özellikleri ile ökaliptus 6 kıtada 100'den fazla ülkede ağaç dikimi için kullanılmaktadır. Subtropikal *Eucalyptus grandis* ve ılıman *E. globulus* dünya çapında ıslah programlarında tercih edilen ökaliptus türlerindedir. Ökaliptuslar, kâğıt sanayi, biyomateryal ve biyoenerji üretimi için yenilenebilir kaynaklar sunmaktadır. Ökaliptuslar tıbbi ve sanayi kullanımlarıyla olduğu kadar, ekolojik işlevleri olan esansiyel yağların (mono- ve sesqui- terpenler) yüksek konsantrasyonlarını da içerirler (Myburg ve ark., 2014).

Transkripsiyon faktörleri doğadaki tüm organizmalarda olduğu gibi bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde de önemli roller oynamaktadırlar. Günümüzde yaklaşık otuz transkripsiyon faktörü ailesi tespit edilmiş ve DNA bağlama domainlerini kodlayan korunmuş motiflere göre sınıflandırılmışlardır (İnal ve ark., 2017). *YABBY* gen ailesi de bitki transkripsiyon faktörlerinden birisi olup tohumlu bitkilere özel transkripsiyon faktörleri olarak bilinmektedir. *YABBY* ailesi; yaprak, sürgün, çiçek ve meyve gelişimine katkıda bulunmakta olup, *YABBY* genleri apikal ve çiçek meristemleriyle üretilen tüm lateral organlarda ifade edilmektedir (Bowman ve Smyth, 1999; Siegfried ve ark., 1999; Bartholmes ve ark., 2012). *YABBY* ailesi *Arabidopsis*'te altı üyeden oluşur. Proteinin amino ucuna doğru C₂C₂ çinko parmak benzeri bir domain ve proteinin karboksil ucuna doğru *YABBY* domaini olarak adlandırılan sarmal-ilmek-sarmal olan iki korunmuş domain ile karakterize edilmektedirler. Korunmuş *YABBY* ve çinko parmak domainlerine ek olarak, *YAB1*, *YAB2*, *YAB3* ve *YAB5*, *YABBY* domaininin karboksil ucunda bir dizi benzerliği göstermektedir (Siegfried ve ark., 1999). Bu bölgeler aynı zamanda Filamentous Flower (FIL), Crabs Claw (CRC), Inner no Outer (INO), *YABBY2*, *YABBY3* ve *YABBY5* olarak da isimlendirilmektedirler (Bowman ve Smyth, 1999). Çeltikte *YABBY* gen ailesinin 8, domates genomunda 9 ve fasulye genomunda ise 8 *YABBY* gen ailesi bulunmuştur. Bunun yanında bu bitkilerde *YABBY* genlerinin dağılım ve ifade seviyeleri de araştırılmıştır (Huang ve ark., 2013; İnal ve ark., 2017). FIL ya da *YAB1* geni çiçek oluşumunda istenilen bir transkripsiyon düzenleyicisidir (Chen ve ark., 1999; Sawa ve ark., 1999). *OsYABBY4*, FIL alt ailesinde bulunur ve damarlanmanın gelişiminde

bir düzenleyici olarak davranır (Liu ve ark., 2007). *YAB2*'nin homoloğu olan *OsYAB1* geninin normal olmayan (ektopik) ifadesi çeltikte ekstra karpel ve stamenlerle sonuçlanmıştır. CRC, *Arabidopsis*'te karpel ve nektarin gelişimini düzenler (Bowman ve Smyth, 1999; Alvarez ve Smyth, 2002) ve aynı zamanda haşhaşa ovül oluşumu, oral meristem sonlanması ve ginezyum farklılaşmasına karışmaktadır (Orashakova ve ark., 2009). INO geni *Arabidopsis*'te ovülün dış integümentinin oluşumu ve asimetric büyümesinde önemli bir rol oynamaktadır (Villanueva ve ark., 1999). Upland tipi pamuk türlerinde yapılan çalışma, *YABBY* genlerinin ifade seviyeleri ovüllerde daha fazla oldukları için *YABBY* proteinlerinin ovül gelişiminde önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Ayrıca soğuk, sıcak, tuz ve kuraklık gibi abiyotik stres şartlarında *YABBY* genlerinin yarısına yakınında düşük bir ifade seviyesi tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2018). Yine fasulye bitkisinde tuz stresi şartları altında yaprak ve kök dokularındaki transkriptom analizi sonucunda iki *YABBY* geni dışında kalan altı genin tümü düşük ve yüksek ifade seviyelerine sahip olurken, qRT-PCR ile yapılan gen ifade analizlerinde ise sekiz genin altısı yaprak, dördü ise sadece kök dokusunda ifade olmuştur (İnal ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı *YABBY* gen ailesi üyelerinin ökaliptus genomunda ilk kez in siliko yöntemler kullanarak genom çaplı olarak belirlenmesidir. Ökaliptus genomunda biyotik ve abiyotik streslere toleransın genetik mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamak için hem filogenetik hem de yapısal düzeyde *YABBY* kodlayan diziler belirlenerek, karakterize edilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Ökaliptus genomunda *YABBY* proteinlerinin belirlenmesi

Ökaliptus genomundaki *YABBY* gen ailesinin protein dizileri Pfam veritabanından elde edilen Pfam Erişim Numarası (PF04690) kullanılarak Phytozome veritabanı v12.1 (Anonymous, 2018a)'den elde edilmiştir. Ökaliptus genomundaki (Myburg ve ark., 2014) tüm muhtemel *YABBY* proteinlerini belirlemek için, hem Phytozome veritabanının v12.1'deki blastp hem de gizli Markov model (HMM) (Anonymous, 2018b) araması varsayılan parametrelerle *E. grandis* genomunda taranmıştır. İlişkili olmayan diziler "decrease redundancy aracı" (Anonymous, 2018c) kullanılarak elde edilmiştir. İlişkili dizilerdeki *YABBY* domaininin varlığı HMMER (Anonymous, 2018d) veritabanı kullanılarak

araştırılmıştır. Elde edilen *YABBY* proteinlerinin moleküler ağırlığı ve teorik izoelektrik noktası (pI) “ProtParam aracı” (Anonymous, 2018e) kullanılarak belirlenmiştir.

2.2. *Egra-YABBY* genlerinin yapısı, fiziksel yerleri, gen ikileşmesi ve korunmuş motiflerinin belirlenmesi

Egra-YABBY proteinlerinin ekzon-intron bölgeleri hakkında bilgi edinmek için, Gene Structure Display Server v2.0 kullanılmıştır (Guo ve ark., 2007). Hem genom dizileri hem de kodlanan DNA (CDS) dizileri *Egra-YABBY* genlerinin pozisyon bilgisini tahmin etmede kullanılmıştır. Phytozome veritabanı v12.1 kullanılarak, *Egra-YABBY* genlerinin kromozomal yerleri ve büyüklükleri belirlenmiştir.

Egra-YABBY genleri tüm *E. grandis* kromozomlarına işaretlenmiş ve MapChart programı ile çizilmiştir (Voorrips, 2002). Gen duplikasyon olayları “Bitki Genom Katlanma Veritabanı, BGKV” sağlayıcısı (Anonymous, 2018f) kullanılarak belirlenmiştir. *Egra-YABBY* genlerinin ikili çiftleri arasındaki Non-sinonim oranları (Ka), sinonim oranları (Ks) ve evrimsel zorlamalar (Ka/Ks) PAL2NAL (Suyama ve ark., 2006) programı kullanılarak PAML arayüz aracında (Yang, 2007) hesaplanmıştır.

Egra-YABBY proteinlerinin ilave korunmuş motiflerini belirlemek için, “Multiple EM for Motif Elicitation (MEME) Aracı” kullanılmıştır (Bailey ve ark., 2006). Minimum/maksimum genişlik ve Motiflerin maksimum sayısı için sınırlar sırasıyla 2, 50 ve 20 olarak ayarlanmıştır. Motif bölgeleri 2 ile 300 arasındadır. Bölge dağılımı tekrarların herhangi bir sayısı olarak ayarlanmıştır. Belirlenen motifler InterPro veritabanının varsayılan ayarları kullanılarak taranmıştır (Quevillon ve ark., 2005). Ayrıca korunmuş bölge dizi analizleri için, çinko parmak ve *YABBY* domainlerinin dizi logo analizleri WEBLOGO online web aracı kullanılarak çizilmiştir (Crooks ve ark., 2004).

2.3. Filogenetik analizler ve dizi hizalama

Filogenetik analizler, 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile Neighbor-joining (NJ) metoduna göre yapılmıştır. *Egra-YABBY* protein dizileri ClustalW kullanılarak hizalanmıştır (Thompson ve ark., 1997). MEGA v7 programı kullanılarak filogenetik ağaç elde edilmiştir (Tamura ve ark., 2011). Ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) arayüzü kullanılarak şekillendirilmiştir (Letunic ve Bork, 2011).

2.4. Sinteni analizi

E. grandis ile *A. thaliana* ve *Vitis vinifera* *YABBY* genlerinin ortologları Plant Genome Duplication Veritabanı (Anonymous, 2018f) kullanılarak belirlenmiştir (Lee ve ark., 2013). Ortolog genlerin protein dizileri phytozome (v12.1) veritabanından elde edilmiştir. Sinteni haritası “iTAK - Plant Transcription factor & Protein Kinase Identifier and Classifier” kullanılarak çizilmiştir (Zheng ve ark., 2016).

2.5. İn siliko gen ifade analizi

İllimuna RNAseq veri setleri Phytozome Veritabanı v12.1 kullanılarak elde edilmiştir. *Egra-YABBY* genlerinin ifade profilleri bitkinin 6 farklı (Floem, olgunlaşmamış ksilem, ksilem, olgun yaprak, sürgün uçları ve genç yaprak) dokusundan elde edilen özel doku kütüphanelerinde analiz edilmiştir. İn siliko ifade profilleri FPKM (Dizilenmiş her milyon baz çifti transkript dizisinin her kilobaz fragmanlarının beklenen sayısı) birimlerinde Cufflinks ile hesaplanmıştır (Trapnell ve ark., 2013). FPKM değerleri log₂'ye dönüştürülerek CIMMiner (Anonymous, 2018g) algoritması ile heatmap elde edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. *E. grandis* genomundaki *YABBY* gen ailesinin belirlenmesi

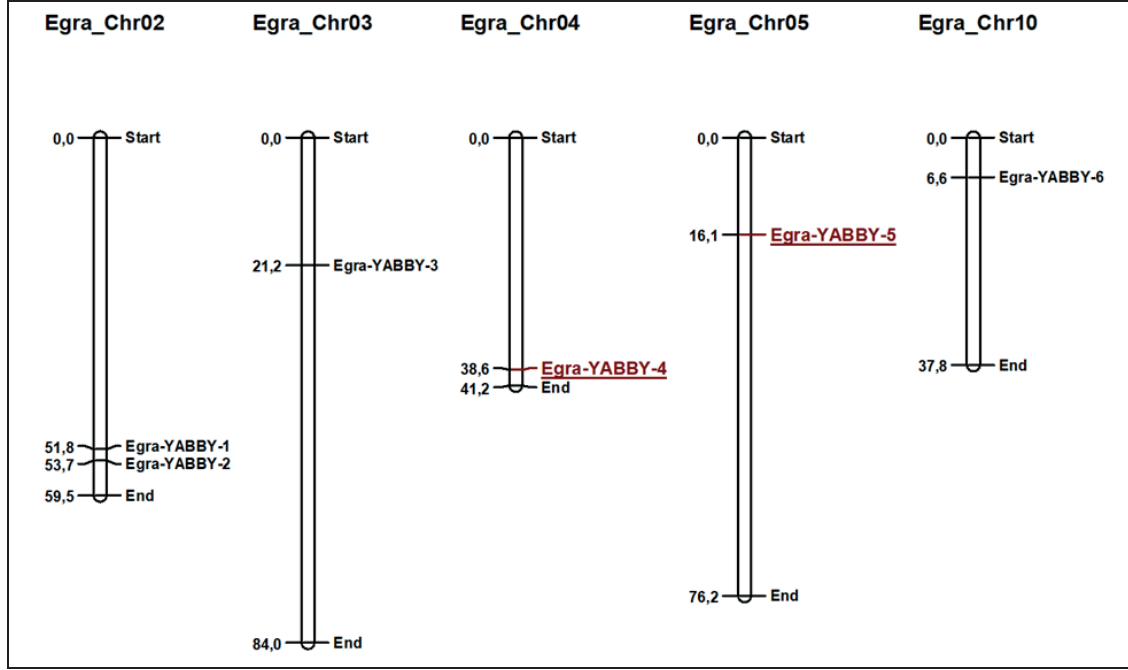
Phytozome veritabanı v12.1'de bulunan ökaliptus genomunda, Pfam veritabanından elde edilen Pfam erişim numarası kullanılarak anahtar kelime taraması (keyword search) yapılmıştır. Bu tarama sonucunda *YABBY* protein homologisine sahip altı gen bulunmuştur. *YABBY* domainlerinin varlığı HMMER veritabanı kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca varsayılan *YABBY* domaini içeren genlerden ilişkili olmayan diziler uzaklaştırıldıktan sonra tekrar HMMER veritabanı ile doğrulama yapılmıştır. Ökaliptus genomundan elde edilen altı aday *YABBY* geni Tablo 1'de listelenmiştir. Ayrıca bu genlerin teorik izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, aminoasit ve CDS dizi uzunlukları da verilmiştir. *Egra-YABBY* genleri ökaliptusun 2, 3, 4, 5 ve 10 numaralı kromozomlarında dağılmıştır. En fazla gen kromozom 2 üzerinde *Egra-YABBY-1* ve -2 genleri bulunmuştur (Şekil 1).

Egra-YABBY proteinleri 168–290 amino asit dizisi aralığına sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlar içerisinde en uzun aminoasit dizisine sahip olan 290 aminoasit ile *Egra-YABBY-5* olmuştur. Buna karşılık olarak en kısa aminoasit dizisi 168 aminoasit ile *Egra-YABBY-1*'de elde edilmiştir.

Tablo 1. Ökalyptus genomunda bulunan *YABBY* proteinleri hakkında bilgi

Gen no	Phytosome adı	Kromozom lokasyonu	CDS uzunluğu	aa uzunluğu	Moleküler ağırlığı (kDa)	pI
Egra-YABBY-1	Eucgr.B03140	Chr02:51837963..51840420	507	168	18.38	9.05
Egra-YABBY-2	Eucgr.B03310	Chr02:53727927..53729292	564	188	21.23	5.54
Egra-YABBY-3	Eucgr.C01515	Chr03:21165968..21170529	555	184	20.76	8.83
Egra-YABBY-4	Eucgr.D02474	Chr04:38559228..38563698	669	222	24.57	8.49
Egra-YABBY-5	Eucgr.E01474	Chr05:16109352..16112844	873	290	32.38	8.92
Egra-YABBY-6	Eucgr.J00587	Chr10:6581220..6588184	576	191	20.96	9.2

pI: Teorik İzoelektrik Noktası

**Şekil 1.** *Egra-YABBY* genlerinin ökalyptus kromozomlarındaki dağılışı¹¹: Kırmızı renkler segmental duplike genleri göstermektedir.

Yine asidikten alkaliye değişen teorik izoelektrik noktası 5.54 ile 9.2 arasındadır. En yüksek değer *Egra-YABBY-6*'dan (9.2) elde edilirken, en düşük değer 5.54 olmuştur. Moleküler ağırlık ise *Egra-YABBY-1*'de 18.39 kDa olurken, *Egra-YABBY-5*'te ise 32.38 kDa olmuştur. *A. thaliana* (Bowman ve Smyth, 1999), çeltik (Toriba ve ark., 2007), fasulye (İnal ve ark., 2017), soya fasulyesinde, *Arabidopsis lyrata*, muz, *Aegilops tauschii* (Han ve ark., 2015), domates (Huang ve ark., 2013) genomlarında *YABBY* gen ailesi ile yapılan çalışmalarda sırasıyla 6, 8, 6, 17, 6, 25, 5, ve 9 *YABBY* üyesi tespit edilmiştir. Benzer şekilde *Gossypium arboreum*, *G. raimondii* ve *G. hirsutum* gibi upland pamuk türlerinde sırasıyla 12, 12 ve 23 *YABBY* üyesi bulunmuştur (Yang ve ark., 2018). Ayrıca kurtayağı, kara yosunları ve kırmızı algler üzerinde yapılan çalışmalarda *YABBY* gen ailesinin üyeleri tespit edilememiş (Han ve ark., 2015) dolayısıyla *YABBY* gen ailesi üyelerinin sadece tohumlu bitkilerden elde edildiği sonucuna varılmıştır (Bowman ve Smyth, 1999; Yang ve ark., 2018). *Arabidopsis* genomunda bulunan

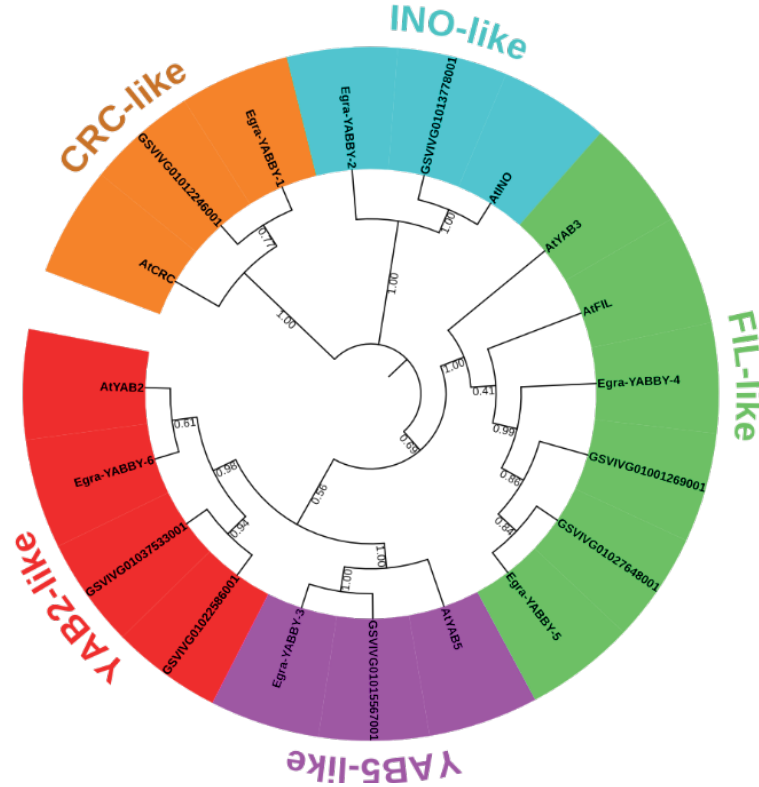
6 *YABBY* gen ailesinin 4 üyesi (FIL, YAB2, YAB3 ve YAB5) vejetatif dokularda yüksek ifade seviyesine sahiptir. Buna karşın CRC ve INA genleri floral organlarda ifade edilmektedir (Eckardt, 2010). Gen duplikasyon analizleri sonucunda *Egra-YABBY-4/Egra-YABBY-5* genlerinin segmental duplike genler olduğu görülmüştür. Segmental duplike genler *Egra-YABBY-4/Egra-YABBY-5*'in Ks değeri 0.8755 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu genler arasındaki Ka/Ks oranı 0.1664 olarak belirlenmiştir. Ka/Ks oranı 1'den büyükse gen dizisinin evrimi süresince pozitif seleksiyon olduğu, 1'den küçük olması arındırıcı seleksiyon ve 1'e eşit olması ikileşme olaylarında doğal seleksiyonu göstermektedir (Juretic ve ark., 2005).

3.2. *Egra-YABBY*'lerin filogenetik analizler, korunmuş motifler ve gen yapısı

Egra-YABBY proteinleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için *E. grandis*, *A. thaliana* ve *V. vinifera* bitkilerinin *YABBY* genleri kullanılarak filogenetik ağaç ortaya çıkarılmıştır. Filogenetik

ağaç *YABBY* proteinlerinin aminoasit dizisine bağlı olarak 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile neighbor-joining metodu kullanılarak çizilmiştir (Şekil 2). *YABBY* proteinleri FIL, CRC, INO, YAB2 ve YAB5 olan 5 grupta oluşmuştur. Egra-*YABBY*-1 proteini AtCRC (AT1G69180) ve GSVIVT01012246001 proteinleriyle, Egra-*YABBY*-2 proteini AtINO (AT1G23420) ve GSVIVT01013778001 proteinleri, Egra-*YABBY*-3

proteini AtYAB5 (AT2G26580) ve GSVIVT01015567001 proteinleriyle, Egra-*YABBY*-4 ve -5 proteinleri AtFIL (AT2G45190), AtYAB3 (AT4G00180), GSVIVT01027648001 ve GSVIVT01001269001 proteinleriyle, Egra-*YABBY*-6 proteini AtYAB2 (AT1G08465) ve GSVIVT01037533001, GSVIVT01022586001 proteinleri ile ortoloji göstermiştir.



Şekil 2. *E. grandis*, *A. thaliana* ve *V. vinifera* bitkilerinin *YABBY* proteinleri ile çizilen filogenetik ağaç

MEME (v4.12.1) (Bailey ve ark., 2006) programı kullanılarak Egra-*YABBY* proteinlerinde yapılan korunmuş motif analizlerinde 15 korunmuş motif tespit edilmiştir. Belirlenen motiflerin uzunluğu 2 – 50 aminoasit aralığında olmuştur. En fazla motif Egra-*YABBY*-4’te (7 motif), en az motif

ise Egra-*YABBY*-1’de (2 motif) elde edilmiştir. Tüm Egra-*YABBY* proteinlerinin Motif 1 ve Motif 2’yi içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 3, Tablo 2). Ayrıca Motif 1 ve Motif 2 ile yapılan interproscan analizleri sonucunda bu motiflerin *YABBY* domaini oldukları tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar İnal ve

Gen No	E-value	Motif Lokasyon															
Egra-YABBY-1	7.40E-62	2	1													1	8
Egra-YABBY-2	7.10E-80	2	11	5	1	11										2	9
Egra-YABBY-3	5.40E-104	2	8	5	1	7										3	10
Egra-YABBY-4	2.30E-186	8	2	3	5	1	4	6								4	11
Egra-YABBY-5	3.00E-184	2	3	5	1	4	6									5	12
Egra-YABBY-6	3.50E-98	2	1	7												6	13
																7	14
																	15

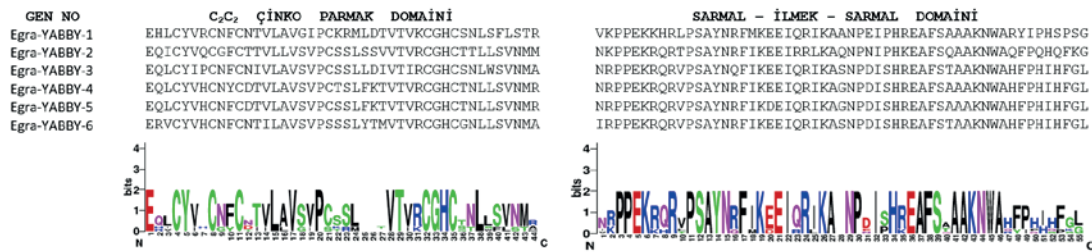
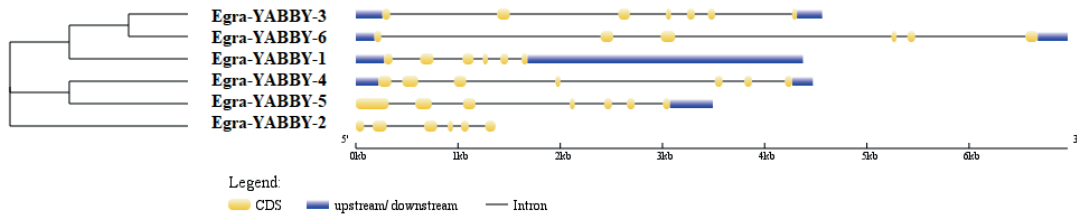
Şekil 3. Egra-*YABBY* genlerinde tahmin edilen motiflerin dağılımı

Tablo 2. Egra-YABBY genlerinde tahmin edilen motiflerin dizi bilgileri

Motif no	Genişlik	En iyi muhtemel eşleşme	Domain
MOTİF-1	50	EKRQRVPSAYNRFIKEEIQRKAGNPDISHREAFSAAAKNWAHFPPIHFG	YABBY
MOTİF-2	44	EQLCYVHCNFCDTVLA VSVPCSSLYDVTVRCGHCTNLLSVNMR	YABBY
MOTİF-3	50	ANQLQLGHNYFTPQNLL EIRNVPPNMLMNQTIPNDPMMQLRGGIEDIPK	Bilinmeyen
MOTİF-4	23	DQPVKKTNICQQEGEDVLRKDDG	Bilinmeyen
MOTİF-5	6	VVNRPP	N/A
MOTİF-6	7	NVGVSPY	N/A
MOTİF-7	12	LKLDGKNKQGKMD	Bilinmeyen
MOTİF-8	4	MDMG	N/A
MOTİF-9	2	DH	N/A
MOTİF-10	3	TIK	N/A
MOTİF-11	5	EVEDE	N/A
MOTİF-12	2	ME	N/A
MOTİF-13	2	WQ	N/A
MOTİF-14	2	FY	N/A
MOTİF-15	2	MA	N/A

ark., (2017) tarafından elde edilmiştir. Önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre C-X2-C-X9-P-X11-C-X2-C motifi C₂C₂ çinko parmak oluşturan bir elementtir. Benzer sonuç ökaliptusta da bulunmuştur (Leister, 2004; Toriba ve ark., 2007). C₂C₂ çinko parmak farklı türler arasında korunmuş bir domaindir. Aynı şekilde sarmal-ilmek-sarmal (YABBY) domaini hareket yeteneği yüksek grup (high mobility group; HMG) kutusunun ilk iki helikası ile dizi benzerliği taşımaktadır (Leister, 2004). Ayrıca Egra-YABBY proteinleri içerisinde amino terminal ucuna yakın bölgede C₂C₂ çinko parmak ve karboksil ucuna yakın bölgede ise sarmal ilmek sarmal domainleri

(Şekil 4) tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Yang ve ark. (2018) tarafından da elde edilmiştir. Gene Structure Display Server v2.0 ile Egra-YABBY genlerinde yapılan yapısal analiz sonucunda ekzon ve intron sayıları belirlemiştir. Bu analiz sonucunda Egra-YABBY genleri arasında ekzon sayıları 6 ve 7 olmuştur. İtron sayıları ise beş ve altı olmuştur. En yüksek ekzon sayıları Egra-YABBY-3, -4 ve -5'te 7 olarak elde edilirken, Egra-YABBY-1, -2 ve -6 genlerinde ise 6 olarak belirlenmiştir (Şekil 5). İnal ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada PhvulYABBY genlerinin ekzon sayılarının altı ve sekiz arasında değiştiği bildirilmiştir.

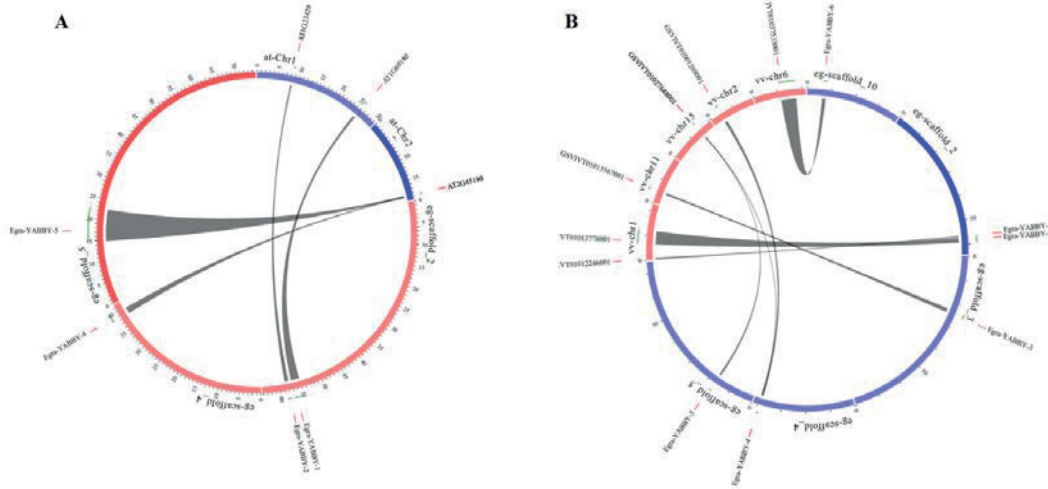
**Şekil 4.** Egra-YABBY gen ailesindeki korunmuş domainler**Şekil 5.** Egra-YABBY genlerindeki ekzon ve intronların sayısı, uzunluğu ve pozisyonu

3.2.1. *E. grandis*, *A. thaliana* ve *V. vinifera* bitkilerindeki *YABBY* genlerinin karşılaştırmalı ve sinteni analizleri

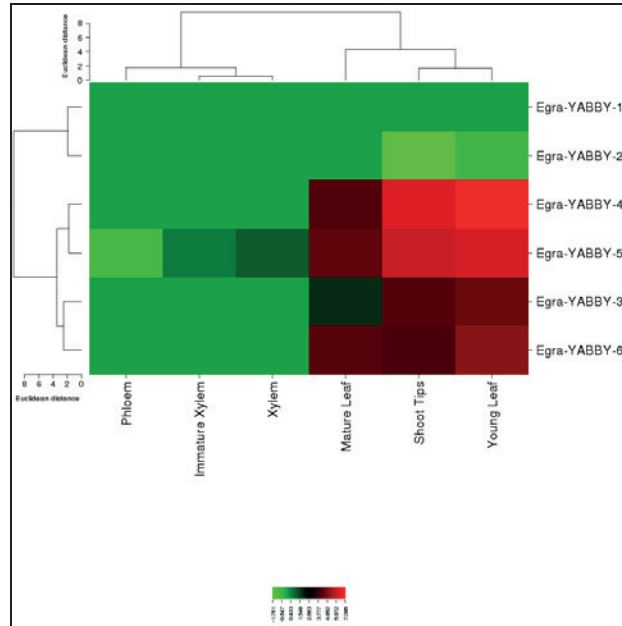
E. grandis, *A. thaliana* ve *V. vinifera* bitkilerine ait *YABBY* proteinleri arasında sinteni haritası çizilmiştir (Şekil 6a ve b). Sinteni analizlerinde *E. grandis* ile *V. vinifera* bitkileri arasında tüm *YABBY* proteinleri arasında sinteni ilişkisi belirlenmiştir. Diğer taraftan *E. grandis* ile *A. thaliana* bitkilerindeki *Egra-YABBY-1*, -2, -4 ve -5 genleri ile AT1G69180, AT1G23420, AT2G45190 ve AT2G45190 genleri arasında sinteni ilişkisi belirlenmiştir. *E. grandis* ile *A. thaliana* bitkileri arasındaki *YABBY* gen ortolojisi fasulye ve *Arabidopsis* arasında da sağlanmıştır (İnal ve ark., 2017).

3.2.2. *Egra-YABBY* genlerinin genom çaplı ifadeleri

Egra-YABBY genlerinin ifade profilleri bitkinin altı farklı (Floem, Olgunlaşmamış Ksilem, Ksilem, Olgun yaprak, Sürgün uçları ve Genç yaprak) dokusundan elde edilen özel doku kütüphanelerinde analiz edilmiştir (Şekil 7). İfade düzeyleri incelendiğinde en fazla *Egra-YABBY-3*, -4, -5 ve -6 genleri ifade olurken, en az ifade seviyesi *Egra-YABBY-1* ve -2 genlerinde olmuştur. En fazla ifade olan genler bitkinin olgun yaprak, sürgün ucu ve genç yapraklarında ifade oldukları belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi *YABBY* gen ailesi genellikle çiçek ve çiçek organlarının oluşumunda ifade olmaktadır (Bowman ve Smyth, 1999; Chen ve ark., 1999;



Şekil 6. *Egra-YABBY* genlerinin genom çaplı sinteni analizi. A) *E. grandis* ve *A. thaliana* arasındaki karşılaştırmalı harita. B) *E. grandis* ve *V. vinifera* arasındaki karşılaştırmalı harita



Şekil 7. Ökalyptus bitkisinin farklı dokularında yapılan ifade analizi (Heatmap)

Sawa ve ark., 1999; Villanueva ve ark., 1999; Alvarez ve Smyth, 2002; Liu ve ark., 2007; Orashakova ve ark., 2009). *Arabidopsis* genomunda bulunan 6 *YABBY* gen ailesinin 4 üyesi (FIL, YAB2, YAB3 ve YAB5) vejetatif dokularda yüksek ifade seviyesine sahipken, CRC ve INO genleri floral organlarda ifade edilmektedir (Eckardt, 2010). Yapılan bu çalışmada gen ifade analizinde kullanılan bitki dokuları vejetatif dokulardır. Bu nedenle *FIL*, *YAB2* ve *YAB5* genlerinin ifade seviyelerinde artışlar apikal meristemleri içeren bazı dokularda daha fazla olmuştur. Ancak CRC (*Egra-YABBY-1*) ve INO (*Egra-YABBY-2*) genleri generatif organlarda ifade seviyelerine sahip olduklarından bu çalışmada düşük bir ifade seviyesine sahip oldukları belirlenmiştir.

4. Sonuçlar

Ökalyptus genomunda bulunan *YABBY* gen ailesi ile in siliko olarak yapılan bu çalışmada 6 *Egra-YABBY* üyesi tespit edilmiştir. Bulunan genler beş farklı ökalyptus kromozomuna dağılmıştır. Ökalyptus bitkisinin altı farklı dokusunda in siliko olarak gerçekleştirilen gen ifadesi analizlerinde ise *Egra-YABBY* genlerinin ifade farklılıkları belirlenmiştir. *Egra-YABBY* genlerinin ifade profilleri bu genlerin farklı dokularda ifade olduğunu ortaya çıkarmış ve bitkinin gelişim süresince çeşitli fizyolojik işlevlerde görev alabildiklerini de göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları gelecekte ökalyptus bitkisi ile yapılacak olan ıslah çalışmalarında kullanılabilir.

Kaynaklar

- Alvarez, J., Smyth, D.R., 2002. Crabs claw and spatula genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences*, 163(1): 17-41.
- Andrade, M.C., Perek, M., Pereira, F.B., Moro, M., Tambarussi, E.V., 2018. Quantity, organization, and distribution of chloroplast microsatellites in all species of *Eucalyptus* with available plastome sequence. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18(1): 97-102.
- Anonymous, 2018a. Phytozome Database. <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> (Erişim tarihi: 20.02.2018).
- Anonymous, 2018b. Hidden Markov Model (HMM). <http://www.ebi.ac.uk> (Erişim tarihi: 20.02.2018).
- Anonymous, 2018c. Decrease Redundancy Tool. http://web.expasy.org/decrease_redundancy/ (Erişim tarihi: 20.02.2018).
- Anonymous, 2018d. HMMER. <http://www.ebi.ac.uk> (Erişim tarihi: 20.02.2018).
- Anonymous, 2018e. ProtParam. <http://web.expasy.org/protparam> (Erişim tarihi: 20.02.2018).
- Anonymous, 2018f. Plant Genome Duplication Database. <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/index/locus> (Erişim Tarihi: 26.02.2018).
- Anonymous, 2018g. CIMMiner <http://discover.nci.nih.gov/cimminer> (Erişim tarihi: 01.03.2018).
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., Li, W.W., 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34: W369-W373.
- Bartholmes, C., Hidalgo, O., Gleissberg, S., 2012. Evolution of the *YABBY* gene family with emphasis on the basal eudicot *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Plant Biology*, 14(1): 11-23.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., 1999. CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development*, 126(11): 2387-2396.
- Chen, Q.Y., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L., Drews, G.N., 1999. The *Arabidopsis* filamentous flower gene is required for flower formation. *Development*, 126(12): 2715-2726.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6): 1188-1190.
- Eckardt, N.A., 2010. *YABBY* genes and the development and origin of seed plant leaves. *Plant Cell*, 22(7): 2103-2103.
- Guo, A., Zhu, Q., Chen, X., Luo, J., 2007. GSDS: a gene structure display server. *Yi Chuan= Hereditas*, 29(8): 1023-1026.
- Han, H.Q., Liu, Y., Jiang, M.M., Ge, H.Y., Chen, H.Y., 2015. Identification and expression analysis of *YABBY* family genes associated with fruit shape in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 14(2): 7079-7091.
- Huang, Z.J., Van Houten, J., Gonzalez, G., Xiao, H., Van der Knaap, E., 2013. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *SUN*, *OFP* and *YABBY* gene family in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 288(3-4): 111-129.
- İnal, B., Büyük, I., İlhan, E., Aras, S., 2017. Genome-wide analysis of *Phaseolus vulgaris* C2C2-*YABBY* transcription factors under salt stress conditions. *3 Biotech*, 7(5): 302.
- Juretic, N., Hoen, D.R., Huynh, M.L., Harrison, P.M., Bureau, T.E., 2005. The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. *Genome Research*, 15(9): 1292-1297.
- Lee, T.H., Tang, H.B., Wang, X.Y., Paterson, A.H., 2013. PGDD: A database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): 1152-1158.
- Leister, D., 2004. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of

- plant disease resistance genes. *Trends in Genetics*, 20(3): 116-122.
- Letunic, I., Bork, P., 2011. Interactive tree of life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, 39: W475-W478.
- Liu, H.L., Xu, Y.Y., Xu, Z.H., Chong, K., 2007. A rice *YABBY* gene, *OsYABBY4*, preferentially expresses in developing vascular tissue. *Development Genes and Evolution*, 217(9): 629-637.
- Myburg, A.A., Grattapaglia, D., Tuskan, G.A., Hellsten, U., Hayes, R.D., Grimwood, J., Jenkins, J., Lindquist, E., Tice, H., Bauer, D., Goodstein, D.M., Dubchak, I., Poliakov, A., Mizrahi, E., Kullam, A.R.K., Hussey, S.G., Pinard, D., Van der Merwe, K., Singh, P., Van Jaarsveld, I., Silva, O.B., Togawa, R.C., Pappas, M.R., Faria, D.A., Sansaloni, C.P., Petrosi, C.D., Yang, X.H., Ranjan, P., Tschaplinski, T.J., Ye, C.Y., Li, T., Sterck, L., Vanneste, K., Murat, F., Soler, M., Clemente, H.S., Saidi, N., Cassan-Wang, H., Dunand, C., Hefer, C.A., Bornberg-Bauer, E., Kersting, A.R., Vining, K., Amarasinghe, V., Ranik, M., Naithani, S., Elser, J., Boyd, A.E., Liston, A., Spatafora, J.W., Dharmawardhana, P., Raja, R., Sullivan, C., Romanel, E., Alves-Ferreira, M., Lheim, C.K., Foley, W., Carocha, V., Paiva, J., Kudrna, D., Brommonschenkel, S.H., Pasquali, G., Byrne, M., Rigault, P., Tibbits, J., Spokevicius, A., Jones, R.C., Steane, D.A., Vaillancourt, R.E., Potts, B.M., Joubert, F., Barry, K., Pappas, G.J., Strauss, S.H., Jaiswal, P., Grima-Pettenati, J., Salse, J., Van de Peer, Y., Rokhsar, D.S., Schmutz, J., 2014. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, 510(7505): 356-362.
- Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S., Becker, A., 2009. The CRABS CLAW ortholog from California poppy (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae), EcCRC, is involved in floral meristem termination, gynoeceum differentiation and ovule initiation. *Plant Journal*, 58(4): 682-693.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R., 2005. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_2): W116-W120.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E.H., Okada, K., 1999. Filamentous flower, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes and Development*, 13(9): 1079-1088.
- Siegfried, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N., Bowman, J.L., 1999. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development*, 126(18): 4117-4128.
- Suyama, M., Torrents, D., Bork, P., 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Research*, 34: W609-W612.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876-4882.
- Toriba, T., Harada, K., Takamura, A., Nakamura, H., Ichikawa, H., Suzuki, T., Hirano, H.Y., 2007. Molecular characterization the *YABBY* gene family in *Oryza sativa* and expression analysis of *OsYABBY1*. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(5): 457-468.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goffl, O., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L., 2013. Differential gene and transcript expression analysis of RNAseq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3): 562-578.
- Villanueva, J.M., Broadhurst, J., Hauser, B.A., Meister, R.J., Schneitz, K., Gasser, C.S., 1999. Inner no outer regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes and Development*, 13(23): 3160-3169.
- Voorrips, R.E., 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1): 77-78.
- Yang, Z.H., 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586-1591.
- Yang, Z.E., Gong, Q., Wang, L.L., Jin, Y.Y., Xi, J.P., Li, Z., Qin, W.Q., Yang, Z.R., Lu, L.L., Chen, Q.J., Li, F.G., 2018. Genome-wide study of *YABBY* genes in upland Cotton and their expression patterns under different stresses. *Frontiers in Genetics*, 9: 33.
- Zheng, Y., Jiao, C., Sun, H.H., Rosli, H.G., Pombo, M.A., Zhang, P.F., Banf, M., Dai, X.B., Martin, G.B., Giovannoni, J.J., Zhao, P.X., Rhee, S.Y., Fei, Z.J., 2016. iTAK: A program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Molecular Plant*, 9(12): 1667-1670.