

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*ARABİDOPSIS THALIANA* (L) HEYNH. TÜRÜNDE  
β-1,3-GLUKANAZ KODLAYAN BAZI GENLERİN  
FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ

**Elif POLAT**

**BİYOLOJİ ANABİLİMDALİ**

Tezin Sunulduğu Tarih: 17/02/2012

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**ELİF POLAT**, tarafından **DOÇ. DR. KEMAL MELİK TAŞKIN** yönetiminde hazırlanan “**ARABİDOPSIS THALIANA (L) HEYNH. TÜRÜNDE  $\beta$ -1,3-GLUKANAZ KODLAYAN BAZI GENLERİN FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Danışman

Doç. Dr. Figen TÜRK

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 17/02/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2010/ 185 no' lu projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Elif POLAT

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana yol göstererek bu konuda çalışma fırsatı sağlayan, değerli fikirleriyle beni aydınlatan, kendisiyle çalışma fırsatı tanıyan ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam **Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca her zaman fikirleriyle ve deneyimleriyle bana her aşamada yardımcı olan bilgilerini benimle paylaşan değerli arkadaşım **Fatih SEZER**'e çok teşekkür ederim.

Çalışmam da kullandığım tohumların temininde yardımcı olan Bath Üniversitesi değerli hocalarından **Dr. Rod J. Scott**'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmam süresince bana destek olan arkadaşlarım **Hande TOK, Didem TÜRE, Merve BALLI ve Ergün SAVRAN**'a teşekkür ederim.

Projeyi destekleyen üniversitemiz BAP birimine teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan bana inan ve maddi manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen sevgili ailem **Yahya POLAT, Sehernaz POLAT, Neslihan POLAT ve Tuğba POLAT**'a sonsuz teşekkürler.

**Elif POLAT**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| $\mu$ l           | Mikrolitre                         |
| bç                | Baz çifti                          |
| cDNA              | Komplementer DNA                   |
| dH <sub>2</sub> O | Distile su                         |
| DNA               | Deoksiribo Nükleik Asit            |
| EDTA              | Etilendiamin tetraasetikasit       |
| g                 | Gram                               |
| m                 | Maternal                           |
| M                 | Molar                              |
| MAH               | Megaspor Ana Hücresi               |
| ml                | Mililitre                          |
| ng                | Nanogram                           |
| °C                | Santigrat derece                   |
| p                 | Paternal                           |
| PAH               | Polen Ana Hücresi                  |
| PCR               | Polimeraz Zincir Reaksiyonu        |
| RNA               | Ribo Nükleik Asit                  |
| RNaz              | Ribonükleaz                        |
| rpm               | Rotation per minute (Devir/dakika) |
| RT-PCR            | Reverse Transcription PCR          |
| TAE               | Tris EDTA Asetat                   |
| U.V               | Ultra Viyole                       |
| LB                | Left Border                        |
| $\mu$ m           | Mikrometre                         |

## ÖZET

### ***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. TÜRÜNDE $\beta$ -1,3-GLUKANAZ KODLAYAN BAZI GENLERİN FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ**

Elif POLAT

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

17 Şubat 2012, 70

Bu çalışmada *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. anterlerinde  $\beta$ -1,3 glukanaaz (kallaz) kodlayan *AT3G23770* ve *AT4G14080* genlerinin kalloz yıkımındaki fonksiyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, bu genlerin T-DNA nakavt mutantlarına ait tohumlar ABRC Stok Center (Columbus)'dan Prof. Dr. Rod J. Scott (Bath üniversitesi, İngiltere) aracılığı ile temin edilmiştir. Çalışmada, *AT3G23770* geni için N859965 stok numaralı hat, *AT4G14080* geni için ise CS850174 stok numaralı hat kullanılmıştır. Tohumlar laboratuvar ortamında çimlendirilmiş ve her iki mutant hata ait bitkiler fenotipik olarak incelenmiştir. Buna göre bitkiler 3-4 hafta sonrasında çiçeklenmeye başlamış ve baklalar gelişmiştir. Bu bitkilerin genotipleri gen spesifik PCR ile belirlenmiştir. PCR sonuçlarına göre N859965 mutant hattı için homozigot (aa), CS850174 hattı içinse heterozigot (Bb) bireyler belirlenmiştir. Ayrıca, bu bitkilerde erkek kısırlık ve bakla gelişimi incelenmiştir. Daha sonra, çalışmada her iki mutasyonu bir arada taşıyan hatlar (double mutant) elde etmek için melezlemeler yapılmıştır. Buradan elde edilen tohumlardan çimlenen melezlerin genotipleri özgün PCR aracılığı ile belirlenip homozigot genotipe sahip (aabb) bitkiler seçilmiştir. Double mutant bitkilerde çiçek, polen ve bakla gelişimleri hem sitolojik hem de fenotipik olarak incelenmiş, bakla başına düşen tohum miktarı belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, ilgili genlerin anlatımları RT-PCR ile araştırılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Kalloz, Polen, Kallaz, Anter, PCR1,PCR2

## ABSTRACT

### FUNCTIONAL INVESTIGATIONS OF SOME GENES ENCODING $\beta$ -1,3-GLUCANASE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L) HEYNH.

Elif POLAT

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

17.02.2012, 70

The aim of this study was to determine the functions of the *AT3G23770* and *AT4G14080* genes encoding  $\beta$ -1,3 glucanase (callase) during callose degradation in the anthers of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. The seeds of T – DNA knock-out mutants deficient in these genes were obtained from the ABRC Stock Center (Columbus) through Prof. Dr. Rod J. Scott (University of Bath) . In this study, the stock number N859965 and CS850174 lines were used for *AT3G23770* and *AT4G14080*. The seeds were germinated under laboratory conditions and mutant lines were analyzed phenotypically. These plants started to have flowers and siliques after 3-4 weeks of germination. The genotypes of these plants were determined using gen specific PCR. Based on the PCR results, homozygote (aa) mutant line for the N859965 and heterozygote (Bb) individuals for the CS850174 line were found. Also, male sterility and silique growth were analyzed on these plants. Afterwards, double mutants were obtained by crossing. Then, the genotypes of the hybrids were defined using PCR and homozygote plants (aabb) were selected. Flower, pollen and silique growth of the double mutant lines were analyzed both cytologically and phenotypically, and the frequency of seeds per siliques was determined. Also, the expression profiles of the genes used in this project were investigated using RT-PCR.

**Keywords:** Callase, Callose, Pollen, Anther, PCR1, PCR2

| <b>İÇERİK</b>   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....   | ii           |
| İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....   | ii           |
| TEŞEKKÜRLER.....  | iv           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....  | v            |
| ÖZET.....   | vi           |
| ABSTRACT.....   | vii          |
| <b>BÖLÜM 1-GİRİŞ.....</b>   | <b>1</b>     |
| <b>1.1 Dişi ve Erkek Gamet Oluşumu ile Üreme.....</b>                               | <b>4</b>     |
| <b>1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisinde Anter Gelişimi.....</b>              | <b>7</b>     |
| <b>1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisinde Çiçek Gelişimi ve Aşamaları.....</b> | <b>8</b>     |
| <b>1.4. Model Organizma Olarak <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>                 | <b>9</b>     |
| <b>BÖLÜM 2-ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>   | <b>10</b>    |
| <b>BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>   | <b>16</b>    |
| <b>3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi.....</b>                                  | <b>16</b>    |
| <b>3.2. Sitolojik Araştırmalar.....</b>   | <b>17</b>    |
| <b>3.3. Genomik DNA İzolasyonu.....</b>   | <b>17</b>    |
| <b>3.3.1. Ekstraksiyon Tamponunun (100ml) Hazırlanması.....</b>                     | <b>18</b>    |
| <b>3.4. Mutant Bitkilerin Genotiplerinin Belirlenmesi.....</b>                      | <b>18</b>    |
| <b>3.4.1 Primerlerin Belirlenmesi.....</b>  | <b>18</b>    |
| <b>3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....</b>                                | <b>19</b>    |
| <b>3.5. Melezleme Çalışmaları.....</b>  | <b>22</b>    |
| <b>3.6. Çift Mutant Bitkilerin Belirlenmesi.....</b>                                | <b>23</b>    |
| <b>3.7. RNA İzolasyonu.....</b>   | <b>23</b>    |
| <b>3.7.1. RNA Miktarının Belirlenmesi.....</b>                                      | <b>24</b>    |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.8. cDNA sentezi .....   | 24        |
| 3.9. cDNA ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....  | 25        |
| 3.10. Agaroz Jel Elektroforezi .....  | 27        |
| 3.10.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması.....   | 27        |
| <b>BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>   | <b>29</b> |
| 4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi.....   | 29        |
| 4.2. Genomik DNA İzolasyonu.....  | 30        |
| 4.3. Mutant Bitkilerin Doğrulanması .....   | 31        |
| 4.3.1 Primerlerin Belirlenmesi.....   | 31        |
| 4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....   | 35        |
| 4.3.2.1 Genotiplerin Belirlenmesi .....   | 35        |
| 4.3.2.2 <i>AT3G23770</i> Geninde Mutasyon Taşıyan Hatların Belirlenmesi .....                           | 36        |
| 4.3.2.3 <i>AT4G14080</i> geninde mutasyon Taşıyan Hatların Belirlenmesi.....                            | 37        |
| 4.4. Melezleme Çalışmaları .....  | 38        |
| 4.5. Melezlenen Mutant Bitkilerin Genotiplerin Belirlenmesi ve Seçilmesi .....                          | 39        |
| 4.6 Çift Homozigot Mutant Bitkilerin Doğrulanması.....  | 46        |
| 4.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....   | 50        |
| 4.8. Homozigot Çift Mutant Bitkilerde <i>AT4G14080</i> ve <i>AT3G23770</i> Genlerinin Anlatımları ..... | 51        |
| 4.9. Sitolojik Araştırmalar .....   | 53        |
| 4.9.1. Mutant Hatların Sitolojik Olarak İncelenmesi.....  | 53        |
| 4.9.2. Melezlenen Bitkilerin Sitolojik Olarak İncelenmesi.....  | 55        |
| 4.9.3. Çift Mutant Homozigot Bitkilerin Sitolojik Olarak İncelenmesi.....                               | 55        |
| 4.10. Çift Mutant Bitkilerde Tohum Oluşumu.....   | 57        |
| <b>BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>EKLER .....</b>  | <b>I</b>  |

|                               |             |
|-------------------------------|-------------|
| <b>ÇİZELGE LİSTESİ.....</b>   | <b>XVI</b>  |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ .....</b> | <b>XIXI</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>         | <b>XIX</b>  |

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

$\beta$ -1,3-glukanazlar (glukan endo-1,3 glukozidazlar,  $\beta$ -1,3 Gs, E.C.3.2.1.39)  $\beta$ -1,3-glukanların (kallos) 1,3- $\beta$ -D-glukozidik bağlarının kesimini katalizleyen ayrıca bakterilerde, funguslarda, metazoa ve virüslerde bulunan hidrolitik enzimler sınıfıdır (Bachman ve McClay, 1996; Sun ve ark., 2000).

$\beta$ -1,3-glukanazlar bitkilerde hem fizyolojik hem de gelişimsel süreçlerde görevlerini yerine getirirler (Jin ve ark., 1999; Leubner-Metzger ve Meins, 1999). Bununla birlikte, çoğu  $\beta$ -1,3-glukanaz, bitki patojen savunmasında rol alır. Bunlar patogenezele ilgili (PR) proteinler olarak bilinirler ve fungal enfeksiyonlarda fungusun hücre duvarında  $\beta$ -1,3-glukan yapılarını hidroliz etmek üzere uyarılarak antifungal aktivite gösterirler (Leubner-Metzger ve Meins, 1999). Antifungal aktivite hem *in vitro* hemde *in vivo* olarak yapılan genetik transformasyon çalışmaları ile doğrulanmıştır (Sela-Buurlage ve ark., 1993; Jach ve ark., 1995).  $\beta$ -1,3-glukanazların PR fonksiyonu dışında diğer bir şaşırtıcı rolü de soğuğa karşı olan tepkisidir (Griffith ve Yaish, 2004; Yaish ve ark., 2006).  $\beta$ -1,3-glukanazlardaki araştırmalar temelde PR fonksiyonu üzerine yoğunlaşmış olmasına rağmen,  $\beta$ -1,3-glukanazlar bitkilerin normal gelişim süreçlerinde de kritik öneme sahiptir. Polen çimlenmesi, tüp büyümesi, dölleme, mikrospor oluşumu, embriyo oluşumu, meyve olgunlaşması ve tohum çimlenmesi süreçlerinde görev alır (Roggen ve Stanley, 1969; Ori ve ark., 1990; Bucciaglia ve Smith, 1994; Hinton ve Pressey, 1980; Morohashi ve Matsushima, 2000; Buchner ve ark., 2002). Özellikle mikrospor oluşumunda mikrosporların etraflarında sentezlenen kallos duvar da,  $\beta$ -1,3-glukanazlar (kallaz) tarafından yıkılır ve mikrosporlar loküler boşlukta salınır (Frankel ve ark., 1969; Steiglitz ve Stern, 1973).

Kallos (bitki  $\beta$ -1,3 glukan) hücre bölünmesi sırasında hücre plağında ayrıca polen ana hücresi duvarı, polen tüpü, plazmadezmat kanallar ve çeşitli dikotil türlerin tohum kabuklarında geçici materyal olarak depolanan  $\beta$ -1,6 yapısından dallanan  $\beta$ -1,3-glukan bağlarla bir araya gelmiş glukoz birimlerinden oluşan bir polimerdir (Fulcher ve ark., 1976; Longly ve Waterkeyn, 1977; Samuels ve ark., 1995; Stone ve Clarke, 1992; Leubner-Metzger, 2003). Bitkilerde kallos tohumda, yaprak ve kök uzantıları ve ikincil yapılar, ksilem gelişimi, plazmadezmata kanallar, makrosporogenik ve mikrosporogenik

dokular, polen ve polen tüpünde bulunur (Fink ve ark., 1987; Gregory ve ark., 2002; Verma ve Hong, 2001; Østergaard ve ark., 2002).

$\beta$ -1,3-glukanaz genlerinin kodladığı proteinler hücresel yerleşim, büyüklük, izoelektrik nokta, öncül yapı ve düzenlenmelerindeki farklılıklara göre yapısal izoformlara sahiptir. Bu farklılıklara göre  $\beta$ -1,3-glukanazlar *Nicotiana* cinsinde dört sınıfa ayrılmıştır (Payne ve ark., 1990; Ward ve ark., 1991; Leubner-Metzger ve Meins, 1999). Bu sınıflandırmalar *Arabidopsis thaliana* dahil olmak üzere diğer bitki türlerine ait  $\beta$ -1,3-glukanazları da kapsamaktadır (Van Kan ve ark., 1992; Beerhues ve Kombrink, 1994; Domingo ve ark., 1994; Oh ve ark., 1995). Sınıf I proteinlerinin birçoğu baziktir ve hücre vakuolünde yer alır. Sınıf II, III ve IV'e ait proteinlerin çoğu ise asidiktir ve hücrelerarası boşluklara salgılanır. Olgunlaşmamış Sınıf I proteinleri bir sinyal peptid içerir ve bu sınıfa ait enzimlerin çoğu da bir C- terminal uzantı içerir. Ayrıca Sınıf II, III ve IV içerisinde yer alan  $\beta$ -1,3-glukanazlar C- terminal uzantı içermez ancak bazı Sınıf II üyeleri ise Sınıf I üyeleri gibi sinyal peptid içerirler.

Anter gelişimi sırasında profaz I safhasında polen ana hücreleri birincil hücre duvarı ve plazma membranı arasında geçici hücre duvarı olarak kallozdan ( $\beta$ -1,3-glukan) oluşan özel bir hücre çeperi sentezler. Sonra arka arkaya gelen iki mayoz bölünmeyle mikrospor tetradları kalloz duvar ile örtülür. Mikrospor ekzin sentezinin başlaması ile birlikte  $\beta$ -1,3-glukanaz tapetum hücreleri tarafından salgılanır ve loküler boşluğa salınır. Kallaz aktivitesi birinci mayotik bölünme sırasında anterlerde düşüktür, ancak ikinci mayotik bölünmenin sonunda hızla artar. Geçici kalloz duvarı kallaz tarafından yıkılır ve mikrosporlar loküler boşlukta salınır (Frankel ve ark., 1969; Steiglitz ve Stern, 1973; Steiglitz, 1977). Kalloz sentez süreci ve yıkımı polen gelişimi sırasında son derece düzenlidir. Kalloz duvar oluşumu ve yıkım zamanının petunyada yapılan çalışmalarda mikrosporogenez ve polen gelişimi için önemli olduğu saptanmıştır (Izhar ve Frankel, 1971; Warmke ve Overman, 1972). Ayrıca transgenik tütün tapetum hücrelerinde  $\beta$ -1,3-glukanazın erken anlatımı mikrospor kalloz duvarının ortadan kaldırılması erkek kısırlığa yol açmıştır (Worrall ve ark., 1992).

Kallaz komponenti  $\beta$ -1,3-glukanaz enzimini kodlayan genler glikozid hidrolaz gen ailesinin 17. aile üyesidir. Glikozid hidrolaz gen ailesi 31 aile ve 379 üyeden oluşmaktadır (<http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp>.) Bu aile ise 50 adet gen içermektedir (<http://www.arabidopsis.org/>). Buna karşın henüz kallaz enzimini kodlayan gen veya genler bulunamamıştır.

Bu çalışmada öncesinde Demirgan (2009)'ın tez çalışmasında belirlediği kallaz enzim kompleksi bileşeni  $\beta$ -1,3-glukanaz kodlayan aday genler incelenmiştir. Demirgan çalışmasında öncelikle,  $\beta$ -1,3-glukanaz gen ailesine dahil 50 geni biyoinformatik araçlar kullanılarak incelemiş, üye genlerin ifade profillerini mikrodizin veritabanları kullanılarak ortaya çıkarmıştır (2009). Bu genlerden anterde ifade olmayanları çeşitli elekler kullanılarak listeden çıkarılmıştır. Geriye kalan genler arasından kallaz bileşeni kodladığı varsayılan altı aday gen seçilmiş ve bu genlerin anterlerde anlatımları incelenmiştir. *A. thaliana* bitkisinden total kallaz enziminin aktif olduğu tetrat safhasındaki anterlerden RNA izolasyonu gerçekleştirmiştir. Aday genlerin anterdeki ifadelerini gene özgün primerler kullanarak RT-PCR ve semi-quantitative RT-PCR aracılığı ile belirlemiştir. Bu sayede, biyoinformatik analizler sonucu aday olarak belirlenen genlerin anter ve somatik dokulardaki ifadelerini de açığa çıkarmıştır. Buna göre somatik dokularda *AT3G55780* ve *AT3G61810* genlerinin ifadelerinin yüksek olduğunu anterde ise kalloz degradasyonu sırasında *AT4G14080*, *AT3G23770* ve *AT3G55780* genlerinin anlatımlarının yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlara göre çalışmada *Arabidopsis thaliana* bitkisinde  $\beta$ -1,3-glukanaz kodlayan *At4g14080*, *At3g23770* ve *At3g55780* genlerinin kallaz enzim kompleksi bileşeni olabileceği önerilmiştir (Demirgan, 2009).

Bu çalışmada yukarıda özeti verilen çalışmada belirlenen aday genlerin fonksiyonları nakavt mutantlar aracılığı ile incelenmiştir. Çalışmada, anterde kalloz degradasyonu sırasında ifade olduğu bildirilen *AT3g23770* ve *AT4G14080* genlerine ait T-DNA mutant hatları kullanılmıştır. *AT3G23770* geni 3. kromozomda yer alır ve 2003 bç uzunluğuna sahiptir. Gen 3 ekzon ve yaklaşık 1793 bç. uzunluğunda transkript içerir. Bilinen diğer adı MYM9.12' dir. Glikozid hidrolaz gen ailesinin 17. aile üyesidir ve X8 domaini içerir. Katyon bağlayıcı, hidrolaz aktiviteye sahip, hidrolaz glikozid bileşenleri içeren ve katalitik etki gibi fonksiyonlara sahiptir. Sepal ve çiçekte ifade olmaktadır. *AT4G14080* geni ise aynı zamanda MEE48 (maternal effect embryo arrest 48) olarak bilinir. Gen 4. kromozomda yer alır ve 1822 bç uzunluğundadır. 3 ekzon ve yaklaşık 1663 bç. uzunluğunda transkriptte sahiptir. Glikozid hidrolaz gen ailesinin 17. aile üyesidir ve X8 domaini içerir. Polen ekzin oluşumu, tohum dormansisinde embriyo gelişim sonlanması katyon bağlayıcı ve katalitik etki gibi görevleri vardır.

X8 domaini glikozid hidrolaz aile 17' nin C terminal ucunda bulunmaktadır ve bu domain  $\beta$ -1,3-glukan bağlamadan sorumlu karbohidrat bağlayıcı modüller için yeni bir sınıf olarak tanımlanmıştır (Barral ve ark., 2005).

Çalışmada kullanılan genlere ait T-DNA nakavt mutant hatlar ABRC Stok Center (Colombus/Amerika) aracılığı ile elde edilmiştir. *AT3G23770* için CS859965 (N859965) stok numaralı tohumlar, *AT4G14080* için ise CS850174 stok numaralı tohumlar kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle homozigot mutant bireyler PCR aracılığı ile belirlenmiş ardından fenotipleri incelenmiştir. Daha sonra, bu hatlardan melezleme aracılığı ile çift double (çift) mutant hatlar elde edilmiştir. Bu genlerin yokluğunda kalloz çeperin geç degrede olması ya da hiç parçalanmaması ve bu bitkilerde erkek kısırlık oluşabileceği düşünülmüştür.

Erkek kısırlık, erkek organların işlevsel olmaması sonucunda canlı polenlerin oluşmamasıdır. Kalıtsal olan erkek kısırlık, kromozomlar üzerindeki bazı genler ya da sitoplazmanın kalıtsal mekanizması tarafından kontrol edilmektedir (Budar ve Pelletier, 2001). Hibrit tohum üretimi yapan firmalar, erkek kısır hatların elde edilmesi için önemli miktarlarda yatırımlar yapmaktadırlar (Mackenzie, 2004). Geniş alanlarda hibrit tohum üretiminde kendine döllenmeyi engellemek için dişi hatlarda erkek organların emaskulasyonu ile bu çiçeklerin melezlenmesi gerekmektedir. Bu işlem maliyetli olduğu gibi yoğun bir iş gücüne de ihtiyaç duyulmaktadır. Melezleme işlemlerinde zorluklar olmasa da, erkek kısırlığı sistemi geliştirilmesine yönelik araştırmalar hala devam etmektedir.

Bu çalışmada  $\beta$ -1,3-glukanazı kodlayan *AT4G14080* ve *AT3G23770* genlerinin kallaz bileşeni olarak görev alıp almadıkları nakavt mutantlar aracılığı ile melezleme, PCR ve sitolojik incelemelerle araştırılmıştır.

### **1.1 Dişi ve Erkek Gamet Oluşumu ile Üreme**

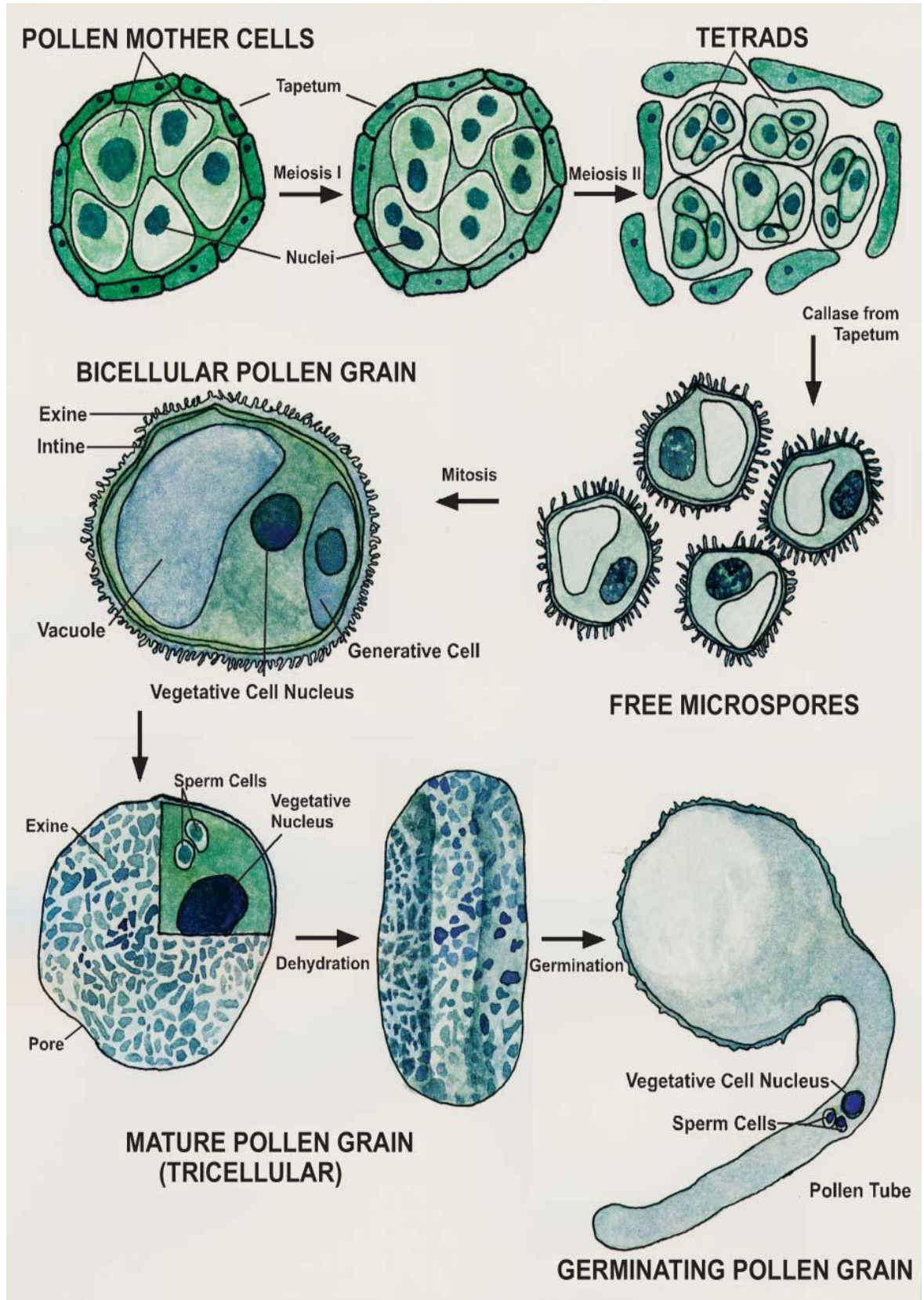
Angiospermlerde türlerin genetik çeşitliliği eşeyssel üreme yoluyla gerçekleştirilir. Bu sürecin başında haploid gametofitlerin özelleşmesi ile oluşan dişi ve erkek gametlerin birleşerek nesil oluşturması gelmektedir. Diploit sporofitlerden haploit gametlerin oluşumu sporogenez ve gametogenez olarak bilinen ardı ardına gelen iki süreçten oluşur. Sporogenez arkesporiyal hücrelerden oluşan anter ve ovullerin hipodermal hücrelerinin farklılaşması ile başlarken gametogenez olgun gametofitler içerisinde haploid sporların gelişmesiyle karakterize edilir. Genetik çalışmalar sporosit ve sporofitik dokular arasındaki etkileşimin spor oluşumunda önemli olduğunu göstermiştir (Yang ve Sundaresan, 2000).

Erkek gametogenez anterlerde diploit sporofitik hücrelerin bölünmesiyle başlar. Bunun sonucunda tapetal ve sporojen hücrelerden oluşan polen ana hücrelerini oluşturur. Polen ana hücreler (PAH) mayoz sayesinde haploit hücrelerden meydana gelen tetradları

oluşturur (McCormick, 2004). PAH tarafından mayoz bölünme süresince tetradlar arasında kallos birikmeye devam eder. Böylelikle tetradı oluşturan her bir mikrospor da kalın bir kallos çeper ile sarılmış olur (Stone ve Clarke, 1992). Mayoz bitiminde anterin tapetumu tarafından üretilen kallaz enziminin etkisiyle serbest kalan mikrosporlar tetratlardan anter lokülüne salınır (Stieglitz, 1977; Rhee ve Somerville, 1998). Sonrasında mikrosporlar asimetrik mitoz bölünmeye uğrar, generatif ve vejetatif hücre olarak bilinen polen taneleri oluşur (McCormick, 2004; Scott ve ark., 2004). Generatif hücre yoğun bir çekirdeğe sahiptir ve vejetatif hücreye kıyasla sitoplazma miktarı düşüktür. Generatif hücrenin ikinci mitotik bölünmesi iki sperm hücresi verir (Şekil 1.1).

Dişi gamet oluşumu ise pistillerde ovullerin içerisinde gerçekleşir (Schneitz ve ark., 1998, Yang ve Sundaresan, 2000; Skinner ve ark., 2004). Çiçekli bitkilerin %70'inde embriyo kesesi sekiz çekirdekli Poligonyum tip gelişim gözlenir (Drews ve Yadegari, 2002; Yadegari ve Drews, 2004). *Arabidopsis* bitkisinde dişi organ yaklaşık 50 ovulden oluşur. Ovuller nusellus adı verilen dokulardan köken alır (Schneitz ve ark., 1998; Skinner ve ark., 2004). Megaspor ana hücresi dört haploid megasporu oluşturmak için mayoz geçirir. Bunlardan üçü programlanmış hücre ölümüyle yok edilir ve bir tane fonksiyonel megaspor kalır (Willemsse ve Van Went, 1984; Mansfield ve ark., 1990; Reiser ve Fischer, 1993). Peşpeşe geçirilen üç mitoz bölünme ile embriyo kesesinde 8 çekirdek oluşur. Embriyo kesesinin mikropiler ucuna iki sinerjit ve yumurta hücresi göç eder. Bu çekirdeklerin ikisi merkeze gelerek polar hücreleri oluşturur. Antipod olarak bilinen üç hücre ise diğer kutupta konumlanır (Yadegari ve Drews, 2004; Schneitz, 1999; Drews ve ark., 1998).

Çiçekli bitkilerde çifte döllenme meydana gelir. Stigmaya ulaşan vejetatif polen çekirdeği, stilüs (dişicik borusu) içinde polen tüpünü oluşturur ve oluşan polen tüpü ovaryuma ulaşır. Generatif çekirdek polen tüpü içerisine girer. Burada mitoz bölünme geçirerek iki tane sperm çekirdeğini (n) oluşturur. Polen tüpü, yumurtalığa ulaştıktan sonra içindeki sperm çekirdekleri de embriyo kesesine girer. Spermlerden biri embriyo kesesindeki yumurtayı dölleyerek 2n kromozoma sahip zigot oluşturur. Zigot sonrasında mitoz bölünmeler geçirir ve embriyo gelişir. Polen kesesindeki diğer sperm, embriyo kesesinin ortasındaki polar çekirdeklerle birleşir. Bunun sonucu 3n kromozomlu triploit çekirdek oluşur. Triploit çekirdeğin mitoz bölünmeleri sonucu endosperm (besi doku) oluşur. Bu arada embriyo kesesindeki diğer çekirdekler eriyerek kaybolur (Schneitz ve ark., 1998; Skinner ve ark., 2004).



Şekil 1.1 Angiospermlerde mikrosporogenezin şematik görünümü (McCormick, 2004'den izin alınmıştır).



### **1.2. *Arabidopsis thaliana* Bitkisinde Anter Gelişimi**

*Arabidopsis thaliana* bitkisinde anter bilateral simetriye sahip dört lobdan oluşmaktadır. Her bir lob dıştan içe doğru dört farklı tabaka içerir. Bu tabakalar epidermis, endotesyum, orta tabaka ve tapetumdur (Kim ve ark., 2010).

Anter çiçek meristemi üçüncü halkasının ortaya çıkması ile gelişmeye başlar. Polenler ise anterin çatlaması ile dışarı salınır (Goldberg ve ark., 1993). Stamen primordiyum (öncül hücreler) içerisinde hücre özelleşmesi ve farklılaşması ile olgun anter hücrelerinin oluşumu sağlanır. Böylece anter ve filament yapıları gelişir. Sporojen hücreler haploid mikrospor üretmek için mayoza girdiği zaman mikrosporogenez her lobun üretici keselerinde görülür. Doku özelleşmesi, organ oluşumu ve mayotik olaylar anter gelişiminin birinci fazını oluşturur (Koltunow ve ark., 1990; Goldberg ve ark., 1993). Anter gelişiminin ikinci fazı farklılaşmış anter hücrelerinin içinde görünen fonksiyonel programları içerir ve sonrasında tetradlar anter keselerinde şekillenir (Koltunow ve ark., 1990; Goldberg ve ark., 1993). Polen tanelerinde farklılaşan mikrosporlarda; filament uzaması, anter büyümesi ve hücre dejenerasyonu görülür ve anter, çiçeğin açması ile sonlanan parçalanma sürecine girer (Goldberg ve ark., 1993). Anter duvarının parçalanması sonucu polen taneleri sonraki polunasyon ve üreme için salınır.

*Arabidopsis thaliana* türünde anter gelişimi 14 aşamada incelenir. 1'den 8'e kadar olan aşamalar Faz 1 de incelenirken, 9-14 arasındaki aşamalar Faz 2'de gözlenir. 1. ve 4. aşamalar sırasında hücre bölünmesi olayları olgun anterin karakteristik bölgeleri olan; lokül, anter duvarı, bağ doku ve iletim demetleri ile bilateral yapıyı oluşturan -gelişmiş anter primordia- içinde görülür. Arkeasporal hücreler anter primordiyumun dört köşesi içinde pariyetal ve sporojen hücre yapılarına farklılaşarak düzenli olarak bölünür ve endotesyum içinde, orta tabakanın tapetuma ve loküllerin ise mikrospor ana hücrelerine farklılaştığı bilinir (Regan ve Moffatt, 1990; Smyth ve ark., 1990; Bowman ve ark., 1991; Sanders ve ark., 1999). Mikrospor ana hücreleri 5. ve 7. aşamalar arasında dört lokülün her birinde mayoz aracılığı ile haploid mikrosporlar tetradları üretir. Mikrosporlar 8. aşama da tetradlardan anter lokülüne salınır. 9. ve 12. aşamalar arasında mikrosporlar üç çekirdekli polen tanelerine dönüşür. Anter büyümesi, bazı tabakaların dejenerasyonu ve antere özgü hücrelerde ki farklılıklar polen gelişimi sırasında düzenlenmektedir. Bu yapılar anterlerin çatlayarak polenlerin salınmasına kadar sürekli artış halindedir. Polen gelişimi tapetum ve orta tabakanın gözden kaybolmasını, endotesyum ve bağ doku hücrelerinde lifli bantların birikmesini ve endotesyum tabakasının hacimce artışı içerir. Sonuçta 11. ve 12. aşamalar sırasında iki lokülün orta kısmını oluşturan septum gözden kaybolarak iki anter

lokülü tek bir bölmede birleşir ve anter dört bölmeden iki bölmeye düşer. 12. ve 13. aşamalar sırasında polen taneleri anterden serbest kalarak salınmaya başlar. En son aşama olan 14. aşamada anterin çatlamasını takiben stamenler ve çiçeğin geri kalan kısımları tek tek kopar ve bitkiden düşerek ayrılır (Regan ve Moffatt, 1990; Smyth ve ark., 1990; Bowman ve ark., 1991; Sanders ve diğ., 1999).

Tapetum anter içindeki mikrosporların etrafını çevreleyen aktif sporofitik bir hücre tabakasıdır (Sanders ve ark., 1999). Tapetum polen duvarı biyosentezi için materyal ve enzim sağlar ve polen olgunlaşması için besin sağlayarak polen gelişiminde önemli rol oynar (Wilson ve Yang, 2004). Polen olgunlaşması sırasında tapetum programlı hücre ölümü süreçleriyle düzenlenerek dejenere olur.

Tapetal hücreler anter gelişiminin 8. aşamasında kallaz olarak bilinen endo- $\beta$ -1,3-glukanaz (kallaz) enzimlerini salgılar (Wilson ve Yang, 2004; Frankel ve ark., 1969).  $\beta$ -1,3-glukanaz kallos çeperi parçalayarak mikrosporların anter lokülüne salınmasını sağlar ve mikrosporlar gelişimlerine burada devam ederler. Tapetum dejenerasyonunun iyi bir şekilde oluşabilmesi, polen gelişimi ile yakından bağlantılıdır. Tapetal hücreler degrade olduğunda vakuoller ipliksi ekzin öncüsü olan sporopolenin salar. Ekzin oluşumu polen olgunlaşmasında önemlidir. Çünkü anormal ekzin oluşumu mikrosporların degradasyonu ile sonuçlanır.

Polen gelişimi ve tapetum oluşumu ile ilgili bilinen EMS1 (excess microsporosytes 1), EXS (extra sporogenous cells) ve TPD1 (tapetum determinant 1) genleri anter gelişimi sırasında tapetal hücrelerin farklılaşmasını gerektirir (Canales ve ark., 2002; Zhao ve ark., 2002; Yang ve ark., 2003). Bundan dolayı mutantlarda ekstra mikrosporlar üretilir ancak tapetum ve orta lamel oluşumunun ise bozulduğu görülür.

### **1.3. *Arabidopsis thaliana* Bitkisinde Çiçek Gelişimi ve Aşamaları**

*Arabidopsis thaliana* bitkisinde çiçek (floral) gelişimi, organların şekil, boyut ve yüzey özelliklerine göre 12 aşamaya ayrılmıştır (Smyth ve ark., 1990). Smyth ve arkadaşlarına göre çiçekler apikal meristemin dış yanından oluşmaya başlar. Aşama 1 çiçek tomurcuğu en uç noktada dış yanlara doğru büyüme ile boyutunu artırır. Uç noktanın yarıktan ayrılması ile aşama 2 başlar. Burada çiçek primordiyumu (organ taslağı) enine ve boyuna büyümesi ana ucun sağ köşesinde neredeyse sürekli olarak gerçekleşir. Aşama 3 sepal primordiyumun görülmesi ile başlar. Pedisel başlangıcı ile sap oluşmaya başlar. Aşama 4 de sepal primordiyum eksen dışına doğru uzamaya başlar. Pedisel uzaması tomurcuk

gelişimi ile eş zamanlı sürdürülür. Aşama 5 stamen ve petal öncüllerinin meydana çıkması ile başlar. Dört uzun stamenin başlangıcı ilk olarak gözüktür. Kısa olan iki stamen 5. aşamanın sonunda gelişir. Aşama 6 da sepallerler tomurcuğu tamamiyle çevrelemiştir. Petal taslağı da gelişir fakat yine de küçüktür. Aşama 7 uzun stamenlerin saplarının oluşmasıyla başlar. Petaller iki yarım küre oluşturmasına rağmen hala oldukça küçük görünür (yaklaşık 25 µm). Aşama 8 de anter lokülleri uzun stamenlerin iç yüzeylerinde konveks çıkıntılar olarak görür. Bu stamenlerin uzunlukları 55-65 µm'dir. Kısa stamenlerin lokülleride akabinde oluşur. Aşama 9 da petal büyümesi hızlanır. Bu aşama bütün organların özellikle de dil şeklindeki petallerin hızlı uzamasını kapsar. Bu artış 4-5 kat uzunluğundadır. Stamenlerdeki büyümede hızlıdır ve bu aşamanın sonunda yaklaşık 300 µm ye ulaşırlar. Aşama 10 kısa stamenlerin hızla büyüyen petallere ulaşmasıyla başlar. Aşama 11 ginekeumun üst yüzeyinde stigmatik çıkıntılar görülür. Aşama 12 de petaller uzun stamenlere ulaşır. Bu aşamanın sonunda tomurcuk 1 mm uzunluğunda çiçek açar.

#### **1.4. Model Organizma Olarak *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Brassicaceae* familyasına ait, ekonomik bir önemi bulunmayan ve bitkiler aleminde tanımlanamamış bir çok soruyu cevaplandırabilecek bir potansiyele sahip yaygın olarak kullanılan model bir organizmadır (Dangl, 1993; Davis ve Hammerschmidt, 1993). *Arabidopsis* 5 kromozom sayısına sahiptir ( $2n=10$ ). Angiospermler arasında en küçük genoma sahip olan bitkidir (Leutwiler ve ark., 1984). Çok yüksek miktarlarda tohum üretir, bu bitki başına yaklaşık 10 bin adettir (Davis, 1992). Yaşam döngüsünü bitkinin içinde bulunduğu koşullara bağlı olarak 5-8 hafta gibi çok kısa bir sürede tamamlar. Küçük alanlarda (hatta bir petri kabında bile) çok kolay yetiştirilebilir. Çok fazla sayıda ekotip koleksiyonu vardır. Ekotipler arası melezleme kolaydır ve elde edilen F1 genotipler tam üretkendir. Biyolojik, fiziksel ve kimyasal mutajenler kullanılarak, kolayca mutant genotipler elde edilebilir. Genetik ve fiziksel olarak haritalarının mevcut olması gibi bazı avantajları nedeniyle moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları için model bir organizma olarak seçilmiştir.

## BÖLÜM 2

## ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Van den Bulcke ve ark. (1989), tütün bitkilerinin yapraklarını kontrol ve salisilik asitle muamele edilmiş ya da *P. syringae* ile enfekte edilmiş bulunan farklı 5  $\beta$ -1,3-glukanaz izole etmişler ve farklı izoformların lokalizasyonunu ayrıntılı olarak çalışmışlardır. Bu izoformlardan ikisinin bitki hücresinin merkezi vakuolünde bulunduğunu ve salisilik asit uygulaması veya *P. syringae* enfeksiyonuna karşı salgılanmadığını bildirmişlerdir. Diğer 3 izoformun ise salisilik asit muamelesi veya *P. syringae* enfeksiyonu üzerine indüklendiğini ve bitkinin hücre dışı boşluklarında biriktiğini belirtmişlerdir. Bu patojen-ilişkili  $\beta$ -1,3-glukanazların üçünün de hem birbirinden hem de diğer vakuolar formlardan farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Mariani ve ark. (1990), tütün bitkisinden izole ettikleri tapetum-spesifik TA29 promotörü ile *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinden elde edilen *barnase* genini birleştirerek bir kimerik ribonükleaz geni elde etmişlerdir. Kimerik ribonükleaz geni *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile kolza bitkisine aktarılmıştır. *Barnase* geninin ürünü sitotoksiktir ve polen kesesini çevreleyen tapetumun parçalanmasına sebep olarak polen gelişimini önlemektedir. Sonuç olarak bu genin ifadesinin polen gelişimini önleyerek erkek kısırlığa yol açtığını bildirmişlerdir. Erkek kısırlığa yol açan TA29- RNaz gen yapısının diğer ürün bitkilerine de uygulanabileceğini önermişlerdir.

Turgut ve ark. (1994), mikrosporogenezde çok fazla ifade olan ve tapetuma özgü A9 transkriptinin fonksiyonunu belirlemek için bir antisens girişiminde bulunmuşlardır. Bir *B. napus* A9 cDNA klonu, sens ve antisens yönelimlerinde *A. thaliana* A9 promotörüne bağlanmış ve oluşan kimerik genleri *B.napus* içerisine aktarmışlardır. *B.napus* antisens A9 bitki döllerinin büyük bir kısmının çok düşük veya saptanamayan A9 mRNA seviyesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu bitkilerin tohum oluşturduğunu ve normal veya normale yakın polen canlılığı gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bununla birlikte A9 proteininin *B.napus* bitkisinde erkek fertilitate için gerekli olmadığını belirtmişlerdir.

Sanders ve ark. (1999), *Arabidopsis thaliana* kısır mutantları, T-DNA ve EMS mutant hatları yoluyla tanımlanmıştır. Farklı anter süreçleri için belirli eksiklikler (defekt)

ile çeşitli erkek kısır mutantları karakterize etmişlerdir. Yaklaşık olarak 44-855 kısır mutant EMS (etilmetansülfanat) takibi ve T-DNA'dan açığa çıkarmışlardır. Çeşitli mutantlar anter morfolojisi, mikrospor üretimi, polen farklılaşması, anterler yarılmasının tespit edilmesini içeren defektleri ayrıntılı olarak çalıştıklarını belirtmişlerdir. Anterleri hem yarılmayan hem de geç yarılan mutantlar ya açığa çıkan mayotik bozukluklar ya da loküllerin etrafındaki hücre tabakalarındaki anormallikler ile gözlemlemişlerdir. *POLLENLESS3* lokülü için iki mutant alel tanımlamışlardır. Bunlarda anter loküllerinin içinde hücrelerin dejenerasyonuna yol açan fonksiyonel mikrospor üretimindeki defektlere sahip olduğunu belirtmişlerdir. *Pollenless3-1*, mutant fenotipi ile ayrılan T-DNA insersiyonu içerir. *Pollenless3-2*, *POLLENLESS3* de geniş bir delesyona sahiptir. *POLLENLESS3* geninin GenBankasında benzerine rastlanmamıştır ancak protein-protein etkileşim motifleri ve nükleer bölgenin protein içeriği kodladığı belirtilmiştir.

Fei ve Sawhney (1999), *Arabidopsis thaliana* bitkisinin de polen gelişiminde *ms32* (male sterile32) mutantları polen ana hücrelerinin (PMC) mayoz sırasında etkilendiğini belirtmişlerdir. Normal yabanıl tip (WT) anterlerde kalloz, mayoz sırasında öncelikle polen ana hücrelerinin etrafında birikir ve mayoz sonrasında tetradlar tamamen kalloz duvar ile çevrilir. *ms32* de polen ana hücreleri başlangıçta mayoz öncesi bir miktar kalloz birikimi göstermiştir ancak sonrasında polen ana hücreleri etrafındaki selulozik duvar yıkılmıştır. *ms32* de kallozun erken yıkımı tapetal hücreler de yoğun granüllü endoplazmik retikulum (RER) kümelerinin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. RER kümeleri yabanıl tip tapetumunda da gözlenmiştir ancak sonraki aşamada yani tetradlar oluşuktan sonra kalloz mikrosporların salınımı için normal zamanda yıkılmıştır. Bu gözlemlerden hareketle bazı çıkarımlar desteklenmektedir. Gelişen mikrosporun çevresindeki kalloz yıkımı tapetal hücrelerde RER'in oluşumuna bağlıdır ve *MS32* mutasyonlarında bu olayın zamanlamasının aksadığı görülmüştür.

Dong ve ark. (2005), *CalS5* (Gls2) geni ile yaptıkları çalışmalarında bu genin mikrosporların geçici olan kalloz duvarında, kallozun sentezinden sorumlu olduğunu ve *Arabidopsis* bitkisinde mikrosporogenez sırasında ekzin oluşumunu sağladığını göstermişlerdir. Ekzin oluşumunda kallozun rolünü belirlemek için *CalS5* genin T-DNA insersiyon mutantlarını izole ve karakterize etmişlerdir. *CalS5* mutantları erkek kısırılık göstermiştir bunun nedeni olarakta mikrosporların kalloz duvarlarında ekzin yapılarının eksik olduğu belirtilmiştir. Tripin sentezinin gerçekleştiği ancak mikrosporların yüzeyinde kümelenmiş olarak rastgele biriktiği gösterilmiştir. Tedrattan erken salınan mikrosporların

canlılığını koruyamadığı ve polen duvarlarında yıkım meydana geldiği bildirilmiştir. Bu çalışmayla kallos yapının polen duvarının ekzin sentezinde ve polenin canlılığının sağlanmasında anahtar rol oynadığını göstermişlerdir.

Nishikawa ve ark. (2005), *Arabidopsis* bitkisine ait *CALS5* geninin 3 allelini karakterize ederek polinasyonda kallos sentezinin rolünü belirlemişlerdir. *CALS5* geni erken polen gelişiminde polen ana hücrelerini çevreleyen ve gelişmiş mikrosporları ayıran kallosu oluşturmasıyla sporofitik bir işleve sahiptir. Üç ayrı ekotipe ait *CALS5* geninin mutantıyla yapılan çalışmada mutant polen tanelerinde ekzin bozukluklarına rastlanmıştır. Kallos birikiminin ekzin yapıları ile belirlendiği gösterilmiştir. Ws ekotipindeki mutantlarda polen tüplerinde kallos duvarı ve tıkaçlarında eksiklikler görülürken diğer iki ekotipte (Colombiya ve Landsberg) polen gelişiminin normal olduğu belirlenmiştir. Çalışmada *CALS5* genin polen gelişiminde üç farklı rolü belirlenmiştir. i) ekzin tabakasının oluşumu ii) polen tüplerinde kallos yapı oluşturma iii) erken gelişim aşamasında polen dejenerasyonunun önlenmesi. *cals5* mutantları kallos sentezinin nasıl çeşitlendiğine önemli ışık tutarak ekzin yapılarında taksonomik çeşitliliğe katkı sağlamıştır.

Luo ve ark. (2006), çeltikten tapetum spesifik gen *RTS* yi izole etmişlerdir. *RTS*'nin çeltik genomunda benzersiz bir gen olduğunu bildirmişlerdir. RNA blot analizleri ve *in situ* hibridizasyonla bu genin mayoz sırasında anter tapetumunda ifade olduğunu belirtmişlerdir. *RTS* de intronların bulunmadığını ve hidrofobik N-terminal bölgesinde 94 amino asitlik polipeptit kodladığı tespit edilmiştir. Genin nukleotit ve amino asit dizilerinin bilinen herhangi bir diziyle homoloji göstermediği ancak promoter bölgesinde ki dizilerin (GAATTTGTTA) sadece bir ve ya iki nukleotit fark ile domatesin promoter bölgesinde polen-spesifik genlerinde korunmuş motiflerden ayrıldığı bilinir. Diğer anter-spesifik promoterlerde bulunan çeşitli dizi motifleri *RTS* genlerinin promoterlerinde tanımlanmıştır. Transgenik ve antisens RNA yaklaşımları çeltikte erkek üretkenlik için *RTS* geninin gerekli olduğunu açığa çıkarmışlardır. *RTS*'nin promoter bölgesi, *Bacillus amyloliquefaciens* de ribonukleaz geni, *barnaze* ve ya *RTS* genin antisensi birleştiği zaman çeltik genlerinde doku-spesifik ifade sürdürülür. Erkek kısır transgeniklerin gelişen çiçeklerinden alınan enine kesitlerin ışık ve yakın eşodaklı kızılötesi mikroskoplarda *barnazenin* doku-spesifik ifadesinin veya antisens *RTS* geninin, polenleri deforme etmesi sonucu tapetal gelişimin sekteye uğradığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar çeltikte polen gelişimi sırasında *RTS* genlerinin kritik rol oynadığını göstermiştir.

Yang ve ark. (2007), *Arabidopsis thaliana* MS1 (MALE STERILITY1) geni canlı polen oluşumu için önemli olduğu ve transkripsiyon faktörlerinin PHD finger sınıfı homolojiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak onun polen gelişimindeki rolü tamamen tanımlanamamıştır. Çalışmada MS1 transkripsiyonunun yabancı tip MS1 transkripti veya protein yoluyla otodüzenlemenin olduğu gösterilmiştir. Kullanılan foksiyonel yeşil florasan protein (GFP) MS1' in ifadesi zamansal ve makansal analizlerle birleştirilmiştir. MS1:GFP protein tapetum içinde çekirdeksel bölgede olduğu ve geç tetraspor ve mikrospor salınımı arasında gelişimsel olarak düzenlenmiş bir şekilde ifade edildiği kanıtlanmıştır. MS1 ifadesinin eksikliği ekzin yapısı ve tapetal salgılanmadaki değişimlerle sonuçlanır. Mikroarray analizleri 260 genin genç ms1 tomurcuklarında ifadesinin değiştiğini göstermiştir. Bu genler temelde polen duvarı ve kabuk oluşu ile bağlantılıdır, ancak transkripsiyon faktörlerinin sayısı ve Cys proteaz MS1'in varsayılan temel düzenleyici hedefleri tanımlanmıştır. MS1'in ektopik ifadesi vejetatif gen ifadesinin transkripsiyonel düzenlemeyi değiştirir. Bodur bitkilerde dallanma seviyesindeki artış, kısmen verimli çiçekler ve olgun polende duvar materyalinde gözükten artış ile sonuçlanır. MS1 böylece tapetumda polen kabuk materyalinin ve polen duvarının harekete geçirilmesinde ve sonuçta canlı polen üretiminde kritik bir rol oynar.

Zang ve ark. (2007), transgenik teknoloji kullanılarak transkripsiyon faktörü *AtMYB103*'ün baskılanması *Arabidopsis thaliana* bitkisinde anter gelişimi sırasında polen anormallikleri ve erken tapetal bozulmalarıyla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bu çalışma ile *AtMYB103* genin üç knock-out mutantının fonksiyonel analizlerini tanımlamışlardır. İki erkek kısır mutant *ms188-1* ve *ms188-2* EMS (Etil metan sülfanat) mutanlığı yoluyla üretmişlerdir. Haritalama tabanlı klonlama yaklaşımı kullanılmıştır ve *ms188* *AtMYB103* transkripsiyon faktörü içeren kromozom 5 de 95.8-kb bölgede haritalanmıştır. Dizi analizi açığa çıkarmıştır ki *ms188-1* *AtMYB103* kodlayan bölgede olgunlaşma öncesinde durdurucu kodona sahipken, *ms188-2* *AtMYB103* birinci ekzonunda CCT → CTT bir baz çifti değişimine sahiptir ve R2R3 domaininde lösin kalıntılarıyla prolinin yer değiştirmesiyle sonuçlanır. Üçüncü mutant *AtMYB103* transpozan-etiketleme hattı erkek kısır fenotip göstermiştir. Alelizm testleri *MS188* ve *AtMYB103* genlerinin benzer lokuslara bağlı olduğunu belirlemiştir. Sitolojik gözlemler *ms188* bitkilerinde tapetum gelişim defektleri ve kallos bozulmalarını açığa çıkarmıştır. Ayrıca olgun anterlerde birçok mikrosporum bozulduğunu ve sağlam olan mikrosporların ekzinden yoksun olduğu belirtilmiştir. *AtMYB103* çekirdekte ağırlıklı olarak R2R3 MYB proteinlerini kodlar. Real-

time RT-PCR analizleri kallaz kaynaklı gen A6'nın *AtMYB103* tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. MS2 geni ekzin formasyonunun ifadesi mutant anterlerde saptanmamıştır. Bu sonuçlar *A. thaliana* anterlerinde *AtMYB103*'ün ekzin oluşumu, kallos bozulması ve tapetum gelişiminde rol aldığını belirtmişlerdir.

Zhu ve ark. (2008), *Arabidopsis thaliana* tapetumunda ki fonksiyon bozukluğu ve düzensiz bölünmede sergilenen *tdfl* (defective in tapetal development and function 1) ile erkek steril mutantların karakterizasyonu ve tanımlanmasını çalışmışlardır. *TDF1* genleri harita-tabanlı klonlama stratejileri kullanarak karakterize edilmiş ve genetik tamamlama yoluyla doğrulanmıştır. *TDF1* genleri bilinen R2R3 MYB transkripsiyon faktörünü kodlar ve anter gelişimi sırasında mikrosporlar ve mayositler tapetum da yüksek olarak ifade edilir. Kallos boyama ve gen ifade analizleri *TDF1*'in kallos parçalanması kontrolünde anahtar bileşen olabileceği önerilmiştir. Sonuç olarak *TDF1*'in tapetal farklılaşma ve fonksiyonlarda hayati bir rol oynadığını göstermişlerdir.

Wan ve ark. (2010), çeltikte (*Oryza sativa*)  $\beta$ -1,3-glukanaz kodlayan genlerden olan *Osg1*'in fonksiyonel karakterizasyonunu ayrıntıları ile göstermişlerdir. *Osg1*'in bitkinin tamamında ifade edildiğini ancak yaprak ve çiçek dokularında diğer bölgelere kıyasla çok daha fazla sentezlendiğini belirtilmişlerdir. Araştırma sırasında yapılan analizlerle *Osg1*'in mayoz bölünmenin son aşamaları ile çiçeklenme esnasında gerçekleşen mikrospor gelişiminin başlangıç ve orta aşamalarında başlıca ifade olduğu belirlenmiştir. Transgenik çeltikte *Osg1* geninin ifadesi RNA İnterferans (RI) tarafından baskılanmıştır. *Osg1* geninin baskılanması erkek kısırlıkla sonuçlanmıştır. *Osg1*-RI bitkilerinde polen ana hücrelerinin normal olarak görünmesine rağmen erken mikrospor aşamasında bu bitkilerin anter loküllerindeki mikrosporlarda kallosun parçalanmalar halinde olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak genç mikrosporların anter lokülüne salınmalarının gecikmesi sonrasında mikrosporların bozulmalar gösterdiği belirtilmiştir.

Hu ve ark. (2011), çeltikte (*Oryza sativa*) çiçek homeotik C sınıfı geni *MADS3*, geç anter gelişimi ve polen oluşumunun düzenlenmesindeki rolünü tanımlamışlardır. *MADS3*'ün bu rolü geç anter gelişimi sırasında tapetum ve mikrosporda aşırı ifade edilir. *MADS3* mutant alelinde yeni tanımlanan, *mads3-4* anter duvarlarında bozukluklar, mikrosporların gelişmemesi veya tamamen erkek kısırlık görüldüğünü belirtmişlerdir. Geç anter gelişimi sırasında *mads3-4* oksidatif stres kaynaklı fenotip sergilemiştir. Mikroarray analizleri *mads3-4* anterlerinin bazı genlerinde ifade seviyelerinde değişiklikler



açığa çıkarmıştır. Protein kodlayan bu genlerin bazıları reaktif oksijen türleride (ROS) içermektedir. Onların arasında MT-1-4b metal bağlayıcı proteinler kodlar. İn vivo ve in vitro çalışmaları göstermiştir ki MT-1-4b nin promoteri *MADS3* ile bağlantılıdır ve rekombinant MT-1-4b süperoksit anyon ve hidroksil radikal temizleyen aktiviteye sahiptir. MT-1-4b'nin ifadesindeki düşüş polen üretkenliğinin azalması ve transgenik bitkilerde süperoksit anyonun seviyesinde artışa neden olduğu açıklanmıştır.

## BÖLÜM 3

## MATERYAL VE YÖNTEM

**3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi**

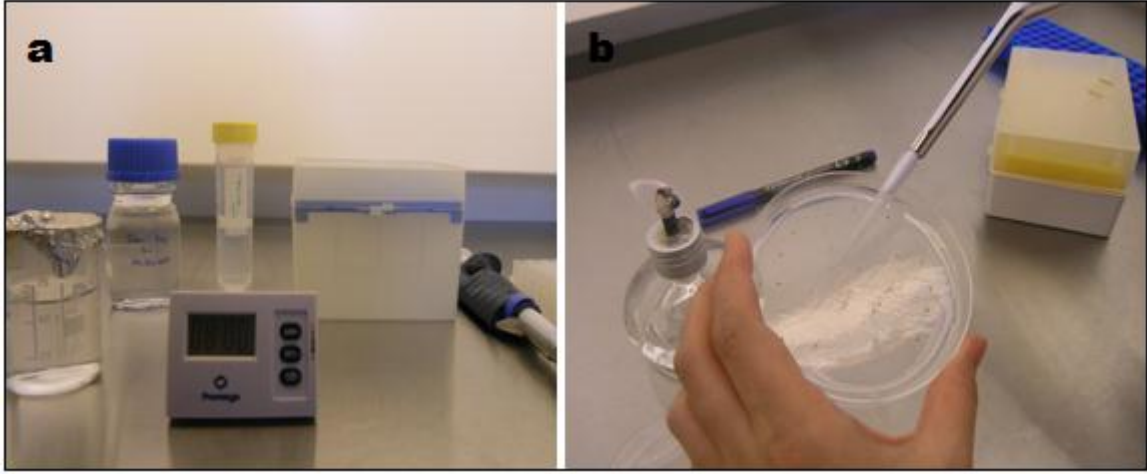
Çalışmada bitki materyali olarak *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipine ait T-DNA katılımlı mutant hatlar kullanılmıştır. Mutant hatlar The Ohio State Üniversitesi Seed Stock Center (ABRC)'dan satın alınmıştır. *AT4G14080* genine ait (Ek 1.1) CS850174 stok numaralı tohumlar (Ek 1.2), *AT3G23770* geni (Ek 2.1) içinde CS859965 (N859965) stok numaralı tohumlar (Ek 2.2) seçilmiştir. Tohumlar, Prof. Dr. Rod J. Scott (Bath Üniversitesi, İngiltere) tarafından temin etmiştir.

Bitkiler, Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir ([http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrc\\_handling\\_mw2004.pdf](http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrc_handling_mw2004.pdf)). Bu yöntemde tohumlar, % 1 BactoAgar<sup>TM</sup> içeren 0.5x Murashige ve Skoog (Murashige ve Skoog, 1962) agar besisi ortamı içerisinde çimlendirilmiştir. Çalışmada hazır MS besisi ortamı (Sigma M-5519) kullanılmıştır. Tüm işlemler steril kabin içerisinde yürütülmüştür. MS besisi ortamı için 4,31 g MS tuzu ve 10 gr sükröz 1,8 L distile su içerisinde çözülmüş ve 1M NaOH kullanılarak pH 5.7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra hacim 2 L'ye tamamlanarak agar (10 g/ L) ilave edilmiştir. Son olarak MS agar besisi ortamı 121°C' de 15 dk. süre ile otoklavlanmış ve 55°C'ye kadar soğutulmuş yaklaşık 0,5 cm kalınlığında petri kaplarına dökülmüştür.

Tohumlar, % 6'lık sodyum hipoklorit içerisinde 8 dk. vorteks ile karıştırılarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Ardından tohumlar steril distile su ile durulanmıştır (Şekil 3.1 a). Daha sonra tohumlar steril kabin içerisinde bir miktar steril distile su ile karıştırılmış ve MS besisi ortamı içeren petrilere dökülmüştür. Petriler yavaşça çalkalanarak tohumların yayılması sağlanmış ve yüzeydeki fazla su steril pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1 b).

Tohumlar agarlı petrilere 4'er adet yerleştirildikten sonra petriler kapatılmış ve kenarları kurumayı önlemek amacıyla streç film ile sıkıca sarılmıştır. Bu işlemden sonra petriler dormansiyi kırmak amacıyla 2 gün süreyle buzdolabında (+4 °C) bekletilmiştir. Daha sonra petriler doğrudan 25°C de 7-8 gün boyunca büyüme kabininde bırakılmıştır. 8 gün içinde kök sistemleri gelişen fideler sonra 121°C' de 15 dk. sürede steril edilmiş toprak: perlit (4:1) karışımı içeren saksılara aktarılmış, 21°C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/

8 saat karanlık olan büyüme kabininde yetiştirilmiştir. Yaklaşık 3-4 hafta içerisinde bitkiler çiçeklenmiştir.



**Şekil 3.1.** Steril kabin içerisindeki tohum a) Sterilizasyon araç-gereçleri ve b) Tohum ekimi.

### 3.2. Sitolojik Araştırmalar

*A. thaliana* mutant hatlarından pens yardımı ile toplanan farklı büyüklükteki çiçek tomurcukları FAA (Formaldehit % 40: Etanol %70: Asetik asit %98) içerisinde 48 saat boyunca karanlıkta fikse edilmiş ardından %70' lik etanol içerisinde 4°C sıcaklıkta saklanmıştır. Fikse edilmiş tomurcukların anterleri stereo mikroskop altında diseksiyon iğnesi ve bisturi yardımıyla çıkarılmıştır. Bu çalışmalar lam üzerinde %70' lik alkol içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tomurcukların ve tomurcuklardan çıkarılan anterlerin boyları mm cinsinden ölçülmüş ve anterler diseksiyon iğnesi yardımıyla açılarak içeriği ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra içerik karmin boyası ile boyanmış ve lamel kapatılarak polen gelişimi incelenmiştir (Demirgan, 2009).

### 3.3. Genomik DNA İzolasyonu

Bitkilere ait yaprak ve gövde dokuları (100 mg) steril bir bisturi ile kesilerek eppendorf tüplerine alınmış, tüpler izolasyona başlayana kadar sıvı azot içerisinde bekletilmiştir. Ardından, bitki dokuları steril porselen havanda toz haline gelene kadar sıvı azot içerisinde ezilmiş ve 1,5 ml' lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. DNA izolasyonunda Edward izolasyon (Edwards ve ark., 1991) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde göre, homojenize edilerek eppendorf içerisine alınan bitki dokusu üzerine 400 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Homojenat vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dk.

bekletilerek 13.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni bir tüpe alınarak tüp içerisine eşit miktarda Phenol:chloroform:izoamylalcohol (25:24:1) eklenmiştir. Eppendorflar birkaç kez alt üst edilmiş ve 13.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe alınarak üzerine 500 µl % 96' lık soğuk ethanol eklenmiş ve tüp yavaş bir şekilde altüst edildikten sonra 13.000 rpm' de 5 dk süre ile santrifüj edilmiş alkol dökülerek uzaklaştırılmıştır. Pellet % 70'lik alkolde yıkanmış ve santrifüj sonrası alkol uzaklaştırılmıştır. Tüpler kapağı açık şekilde oda sıcaklığında kurutma kağıdı üzerine alınarak 5 dk bekletilmiş ve 50 µl dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülmüştür. DNA örnekleri kullanıma kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir

### **3.3.1. Ekstraksiyon Tamponunun (100ml) Hazırlanması**

2,4228 g (200 mM) TrisHCl (pH:7.5) 90 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülüp ve 1N HCl ile pH:7.5 e ayarlanmıştır. 1,461 g NaCl (250 mM) eklenmiş ve çözdürüldükten sonra 0,9306 g EDTA (32 mM) eklenmiş ve çözdürülmüştür. 0,25 g SDS (9 mM) eklenip ve çözdürüldükten sonra son hacim dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **3.4. Mutant Bitkilerin Genotiplerinin Belirlenmesi**

Mutant bitkilerin genotipleri PCR aracılığıyla belirlenmiştir. Bu amaçla büyümekte olan her bir mutant bitkinin taze yaprak dokularından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile kaliteleri belirlenmiştir. Mutant bitkilerin belirlenmesinde kullanılacak olan primerler seçilerek istenilen bölgeler PCR1 ve PCR2 olarak çoğaltılmıştır.

#### **3.4.1. Primerlerin Belirlenmesi**

Çalışmada kullanılan CS850174 (*AT4G14080* geni için stock number CS850174 ) ve N859965 (*AT3G23770* geni için stock number CS859965(N859965)) mutant genlerine ait primer seçimi yapılırken TAIR web sayfasından ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) ilgili genler ve T-DNA komşu dizileri (flanking sequence) belirlenmiştir. Primerler, NCBI primer blast (primer desinging tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) programı ve iSct primer programı (<http://signal.salk.edu>) kullanılarak dizayn edilmiştir.

**3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

PCR uygulamaları BİO-RAD thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR, *Taq* DNA Polymerase (recombinant) (Fermentas #EP0402) enzimi ile kurulmuştur. Reaksiyon kurulurken tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir ve filtreli pipet uçları (RNase-DNase-free), ince cidarlı (200µl) PCR tüpleri kullanılmıştır.

Reaksiyonlar sırasında pozitif kontrol olarak bitkinin tüm dokularında sürekli ifade olduğu bilinen *ACTIN2* genine ait primerler kullanılmıştır ve bu primerlerden 270 bç'lik DNA bandı beklenmiştir. Ayrıca kontaminasyon olup olmadığını göstermek için kalıp DNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu da kurulmuştur. Çizelge 3.1 de verilen miktarlara göre PCR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon kurulduktan sonra Çizelge 3.2' de verilen PCR programı uygulanmıştır. PCR da kullanılan primerlerin baz dizilimleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Primer çiftlerinin kullanımı sonucu beklenen bant büyüklükleri Çizelge 3.4' de verilmiştir.

**Çizelge 3.1. PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları**

| <b>Bileşen</b>                    | <b>Miktar (µl)</b> | <b>Final konsantrasyon</b> |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------------|
| 10X <i>Taq</i> buffer             | 2,5                | 1X                         |
| 10 mM dNTP mix                    | 2,5                | 1X                         |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> solüsyonu | 2,5                | 2 mM                       |
| Kalıp DNA                         | 2                  |                            |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase         | 0,25               | 2,5 unit                   |
| 10 pmol/µl reverse primer         | 1                  | 0,4 pmol                   |
| 10 pmol/µl forward primer         | 1                  | 0,4 pmol                   |
| Nuclease- free H <sub>2</sub> O   | 13,25              |                            |
| <b>Toplam hacim</b>               | <b>25 µl</b>       |                            |

**Çizelge 3.2.** *AT3G23770* ve *AT4G14080* genleri için kullanılan PCR segmentleri ve döngü sayısı

| Segment                | Sıcaklık (°C) | Süre   | Döngü sayısı |
|------------------------|---------------|--------|--------------|
| İlk denatürasyon       | 95            | 2 dk   | 1            |
| Denatürasyon           | 95            | 30 sn  |              |
| Primerlerin bağlanması | 55            | 30 sn  | 34           |
| Uzama                  | 72            | 3 dk   |              |
| Final Uzama            | 72            | 10 dk. | 1            |

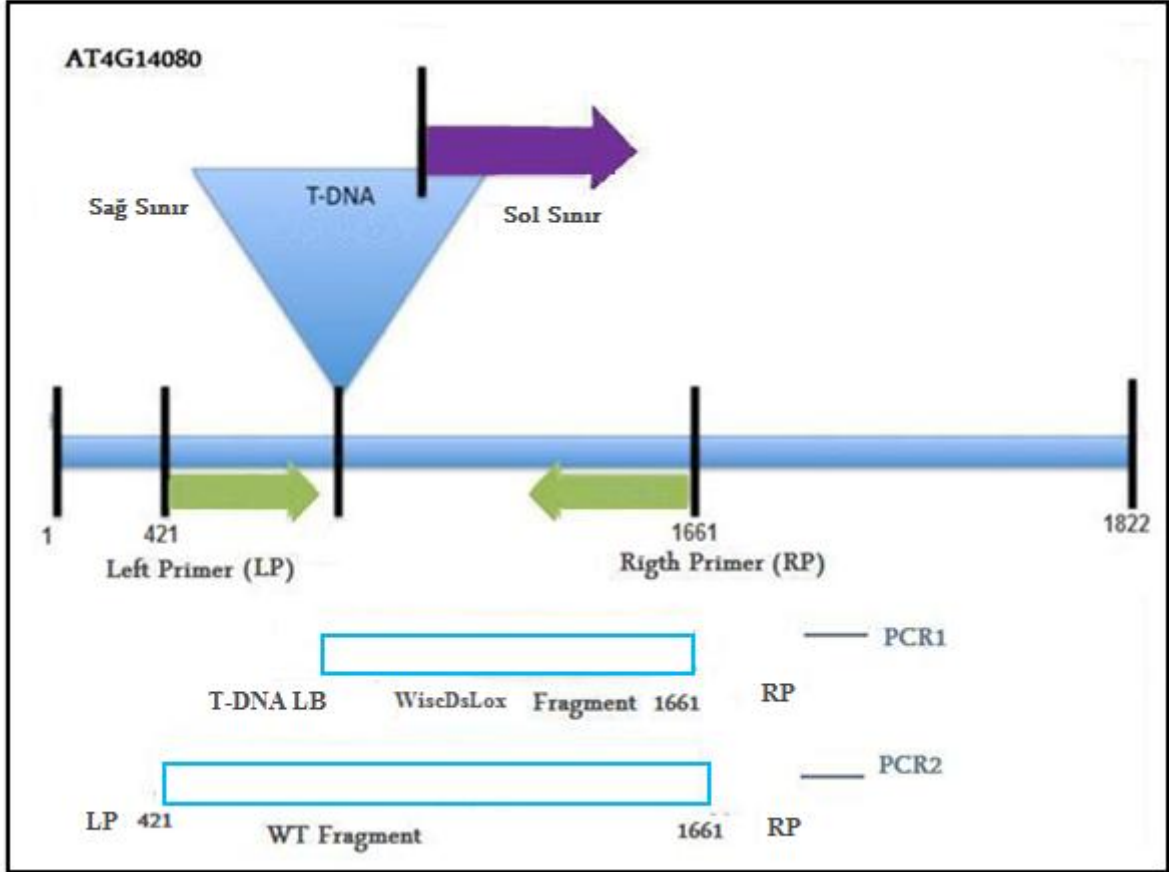
**Çizelge 3.3.** PCR' da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

| Primer                                  | Baz Dizilişi                        |
|---|-------------------------------------|
| <i>At4g14080</i> Right (RP)             | 5'- CACAGAGTAACGCTCGGAAAC-3'        |
| <i>At4g14080</i> Left (LP)              | 5'- ACCATAACCGTCCCTAACCCAC-3'       |
| <i>At4g14080</i> T-DNA Left Border (LB) | 5'- AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3' |
| <i>At3g23770</i> Right (RP)             | 5'- AAAACCATTAAAGCAGGCCAC-3'        |
| <i>At3g23770</i> Left (LP)              | 5'- ACATGTTGCATTGCTTCTTCC-3'        |
| <i>At3g23770</i> T-DNA Left Border (LB) | 5'- TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'       |
| Actin2 Right                            | 5'- TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC-3'        |
| Actin2 Left                             | 5'- TGGTGAAGGCTGGATTTGC-3'          |

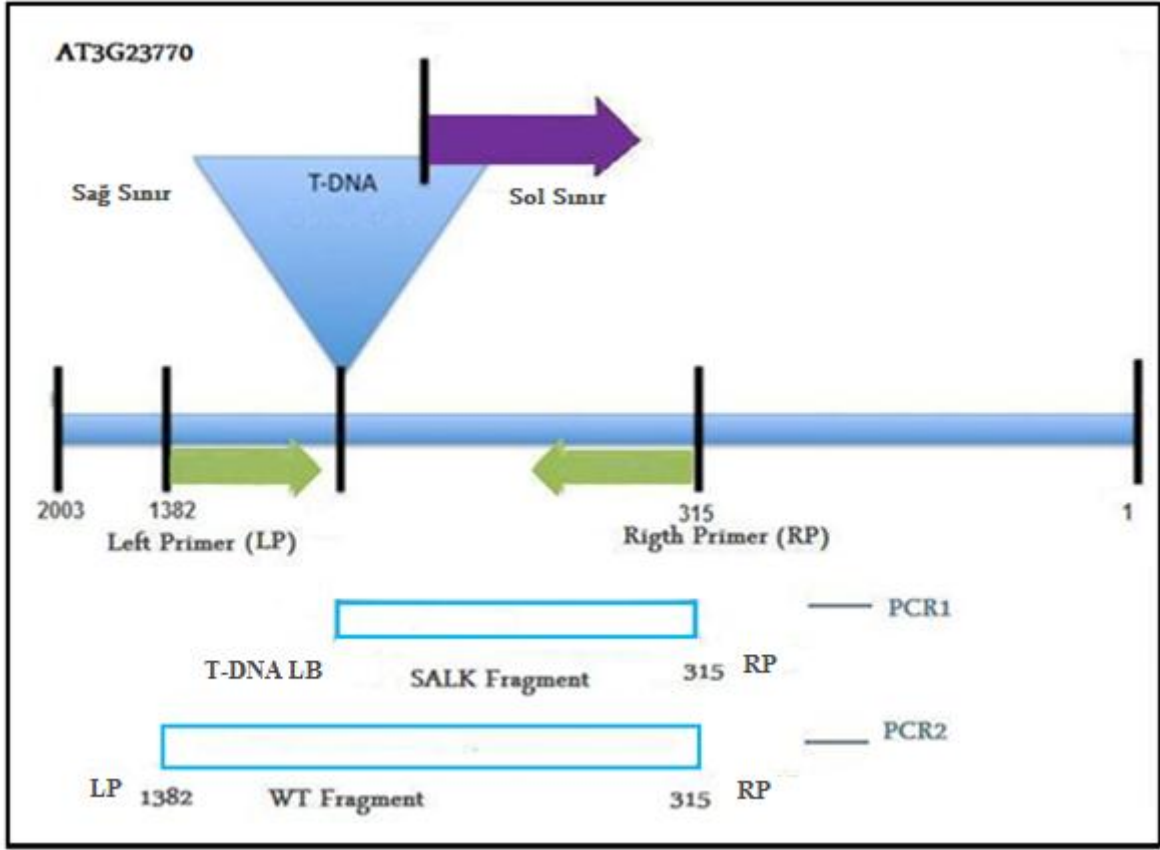
**Çizelge 3.4.** Primerlerden beklenen PCR ürünü

| Primer Çifti  | Kullanılan Primerler        | Beklenen Bant |
|---------------|-----------------------------|---------------|
| N859965-PCR1  | Right ve T-DNA Left Border  | 700 bç        |
| N859965-PCR2  | Right ve Left               | 1068 bç       |
| CS850174-PCR1 | Right ve T-DNA Left Border  | 600 bç        |
| CS850174-PCR2 | Right ve Left               | 1240 bç       |
| Actin2        | Actin2 Right ve Actin2 Left | 270 bç        |

Her bir örnek için iki farklı PCR reaksiyonu kurulmuştur. Bir numaralı PCR reaksiyonunda (PCR 1); Right primer (RP) ve T-DNA Left Border (LB), T-DNA ya bağlanırken, iki numaralı PCR'da (PCR 2) Left Primer (LP) ve RP aralığındaki ürün gen dizilerini vermektedir (Şekil 3.2 – 3.3). T-DNA -Left Border T-DNA' nın sol sınırını belirtmektedir. Her iki mutant içinde T-DNA' nın sol sınırı net olarak bilinmemektedir. Bu nedenle 400-710 bp arasında bir ürün beklenmektedir.



**Şekil 3.2.** *AT4G14080* geninde T-DNA insersiyonu ve primerlerin gen üzerindeki konumları. 421 LP'in bağlanma noktasını, 1661 RP'in bağlanma bölgesini belirtmektedir. PCR2'den 1240 bp ürün beklenirken, PCR1'in oluşturduğu ürün yaklaşık değerlerle belirlenir.



**Şekil 3.3.** *AT3G23770* geninde T-DNA insersiyonu ve primerlerin gen üzerindeki konumları. 1383 LP'in bağlanma noktasını, 315 RP bağlanma bölgesini belirtmektedir. PCR2'den 1068 bp ürün beklenirken, PCR1'in oluşturduğu ürün yaklaşık değerlerle belirlenir.

### 3.5. Melezleme Çalışmaları

Mutant bitkiler çiçeklendikten sonra, binoküler ya da büyüteç altında ince uçlu pens ve diseksiyon iğnesi yardımıyla melezlenmiştir (McCormick ve Boavida, 2004). Büyütme altında çiçek ya da tomurcuk kümelerine bakılmış ve açmış herhangi bir çiçek ya da tomurcuk varsa uzaklaştırılmıştır. Çiçekler, zarar görmeden bir kağıt bantla sabitlenmiştir. Melezleme yapılacak çiçeğin özellikle polenlerinin dışarı çıkmamış olması ve bunun aksine stilüsün ucundaki stigmanın ise olgunlaşarak üzerindeki papillaların oluşmuş olmasına dikkat edilmiştir (Çiçek Gelişim Aşaması 11). Ardından sepal ve petaller dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Stigma ve stile dokunmadan anterler dikkatlice alınmıştır. Olgun anterler çiçek stigması üzerine değdirilmiştir. Sonrasında melezleme, baklaların oluşup oluşmaması ile kontrol edilmiştir.



### 3.6. Çift Mutant Bitkilerin Belirlenmesi

Çalışmada, melezleme aracılığı ile elde edilen bitkilerden çift mutant olanlar PCR aracılığı ile onaylanmıştır. Bu nedenle, mezlemlere ait taze yaprak dokularından DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerine her mutant gen için PCR1 ve PCR2 olmak üzere dört reaksiyon kurulmuştur. Örnekler için 10 µl'lik PCR reaksiyonları hazırlanmıştır. Çizelge 3.5' de verilen oranlara göre PCR reaksiyonları kurulmuştur.

**Çizelge 3.5** Çift mutantların belirlenmesinde kullanılan PCR miktarları

| <b>Bileşen</b>                    | <b>Miktar (µl)</b> | <b>Final konsantrasyon</b> |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------------|
| 10X <i>Taq</i> buffer             | 1                  | 1X                         |
| 10 mM dNTP mix                    | 1                  | 1X                         |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> solüsyonu | 1                  | 2 mM                       |
| Kalıp DNA                         | 1                  |                            |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase         | 0,1                | 2,5 unit                   |
| 10 pmol/µl reverse primer         | 0,4                | 0,4 pmol                   |
| 10 pmol/µl forward primer         | 0,4                | 0,4 pmol                   |
| Nuclease- free H <sub>2</sub> O   | 5,1                |                            |
| <b>Toplam hacim</b>               | <b>10 µl</b>       |                            |

### 3.7. RNA İzolasyonu

Çalışmada RNA izolasyonu için erken gelişim safhasındaki açmamış çiçek tomurcukları kullanılmıştır. Öncelikle stereo mikroskop altında diseksiyon iğneleri kullanılarak çiçek tomurcukları steril bir bistüri ile kesilerek ayrılmış ve boyutları ölçülerek 15 mm'den küçük tomurcuklar eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerine alınmıştır. RNA degradasyonunu önlemek için tüplere RNAlater (Ambion - #AM7020) eklenmiş ve tüm dokuların RNAlater ile kaplanmasına dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler bir gece +4°C'de bekletilmiş ve ardından uzun süreli saklama için örnekler -80°C'de depolanmıştır. Dokuların diseksiyonu için çiçek dokuları toplu olarak alkol ile steril edilmiş lam üzerine alınıp tomurcuklar tek tek ayrılmıştır. Uygun boyuttaki tomurcuklar stereo mikroskop altında RNAlater solüsyonu içerisinde steril iğnelerle disekte edilmiştir. Diğer dokular ve uygun boyutta olmayan tomurcuklar uzaklaştırıldıktan sonra tomurcukların boyları mikrometrik oküler kullanılarak ölçülmüştür. RNA izolasyonundan önce, tüplerdeki RNAlater mikropipet ile uzaklaştırılmış ve tüpler dokuların donması için

sıvı azotta bekletilmiştir. Ardından, çiçek tomurcukları eppendorf içerisinde pestil yardımıyla iyice ezilmiştir. Daha sonra Purelink RNA Mini Kit (İnvitrogen – 12183-018A) kullanılarak dokulardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. Her bir örneğe ait RNA lar agaroz jelde yürütülmüş ve miktarları florometrik yöntemle (Invitrogen Qubit Fluorometer) belirlenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### **3.7.1. RNA Miktarının Belirlenmesi**

RNA Quant-iT RNA assay Kit’ in önerdiği yöntemle RNA örneğinin içinde bulunduğu karışım hazırlanmış ve Qubit Fluorometer cihazında okumalar gerçekleştirilmiştir.

1. Ependorf tüpüne dye Working Solusyonu hazırlanmıştır.
  - a. Her örnek için 199 µL Buffer kullanılmıştır.
  - b. Her örnek için 1 µL dye reagent kullanılmıştır.
  - c. Karışım vortekslenmiştir.
2. Standartlar için 2 assay tüpüne 190 µL Working Solusyonu kullanılmıştır.
3. Assay tüpüne her standarttan 10 µL eklenip vortekslenmiştir.
4. Örnekler için 180 – 199 µL Working Solusyonu assay tüplerine alınmıştır.
  - a. Her tüpe 1 – 20 µL’ ye kadar örnek koyulabilir.
  - b. Her tüpün final hacmi 200 µL olmalıdır.
5. Assay tüpüne her örnekten 1 – 20 µL eklenip karışım vortekslenmiştir.
6. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletilip the Qubit® 2.0 Fluorometer cihazında okumalar önce standartlar kullanılarak kalibrasyon sağlanmış sonrasında örneklerin okuması gerçekleştirilmiştir.

### **3.8. cDNA sentezi**

cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ( Fermentas - #K1622 ) ile gerçekleştirilmiştir. Bu kite ait üretici firma tarafından sağlanan reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar Çizelge 3.6’da gösterilmiştir. Reaksiyon (RNaz-DNaz free) pipet uçları ve ince cidarlı 200 µl’ lik PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kalıp RNA, oligo (dT)<sub>18</sub> primer ve DEPC-uygulanmış su tüplere konularak 65°C’ de 5 dk. inkübe edilmiştir. Ardından, 5x reaksiyon tamponu, RiboLock RNase Inhibitor ve 10mM dNTP mix son olarak da M-MuLV Reverse Transcriptase eklenerek 42°C’ de 60 dk. İnkübe edilmiştir. Reaksiyon 70°C’ de 5 dk. sıcaklık uygulamasıyla sonlandırılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri yukarıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle ayarlanmış bir Thermal cyler cihazında (BIO-RAD) gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.6.** cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

| <b>Bileşen</b>                             | <b>Miktar (µl)</b> |
|--|--------------------|
| Total RNA (6 ug/ul)                        | 5                  |
| Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (0,5µg/µl) | 1                  |
| DEPC-treated water                         | 6                  |
| 5x Reaksiyon Buffer                        | 4                  |
| RiboLock™ RNase Inhibitor (20u/ µl)        | 1                  |
| dNTP mix (10 mM )                          | 2                  |
| M-MuLV Reverse Transcriptase (20u/ µl)     | 1                  |
| <b>Toplam hacim</b>                        | <b>20 µl</b>       |

### **3.9. cDNA ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)**

PCR uygulamaları BİO-RAD thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri çizelge 3.7’de gösterilmiştir. PCR, *Taq* DNA Polymerase (recombinant) (Fermentas #EP0402) enzimi ile kurulmuştur. Kalıp cDNA miktarının, reaksiyon hacminin %10’ unu geçmemesine dikkat edilmiştir. PCR segmentleri ve döngü sayısı çizelge 3.8’de gösterilmiştir. Reaksiyonda her çift mutant için iki farklı reaksiyon kurulmuştur. Öncelikle TAIR web sayfasından ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) *AT4G14080*, *AT3G23770* genlerine ait diziler elde edilmiş, ardından Primer 3 programı kullanılarak bu dizilere uygun primerler elde edilmiştir (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Bu primerlerden sırasıyla 767 ve 609 bp’lik DNA bandı beklenmiştir. Dokularda sürekli ifade olduğu bilinen *Actin2* geni çoğaltılarak cDNA’ ların kalitesi belirlenmiştir (pozitif kontrol). *AT3G23770*, *AT3G23770* ve *Actin2* genlerine ait primerlerin baz dizilişleri Çizelge 3.9’da gösterilmiştir. Ayrıca reaksiyonda kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu kurulmuştur.

**Çizelge 3.7.** PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

| <b>Bileşen</b>                    | <b>Miktar (µl)</b> | <b>Final konsantrasyon</b> |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------------|
| 10X <i>Taq</i> buffer             | 2,5                | 1X                         |
| 10 mM dNTP mix                    | 2,5                | 1X                         |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> solüsyonu | 2,5                | 2 mM                       |
| Kalıp cDNA                        | 2                  |                            |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase         | 0,25               | 2,5 unit                   |
| 10 pmol/µl reverse primer         | 1                  | 0,4 pmol                   |
| 10 pmol/µl forward primer         | 1                  | 0,4 pmol                   |
| Nuclease- free H <sub>2</sub> O   | 13,25              |                            |
| <b>Toplam hacim</b>               | <b>25 µl</b>       |                            |

**Çizelge 3.8.** PCR segmentleri ve döngü sayıları

| <b>Segment</b>         | <b>Sıcaklık (°C)</b> | <b>Süre (dk)</b> | <b>Döngü sayısı</b> |
|------------------------|----------------------|------------------|---------------------|
| İlk denatürasyon       | 95                   | 2,5              | 1                   |
| Denatürasyon           | 95                   | 1                |                     |
| Primerlerin bağlanması | 55                   | 1                | 31                  |
| Uzama                  | 72                   | 1                |                     |
| Final Uzama            | 72                   | 10.              | 1                   |

**Çizelge 3.9.** PCR reaksiyonunda kullanılan primer ve baz dizilimi

| <b>Primer</b>          | <b>Baz dizilişi</b>         |
|------------------------|-----------------------------|
| <i>At4g14080</i> left  | 5' AATCCGTTTTGTCCTTGTCG 3'  |
| <i>At4g14080</i> right | 5' CGTTGTTCGTCGGTTTAGGT 3'  |
| <i>At3g23770</i> left  | 5'GGTGACCTATAACCGACGTT 3'   |
| <i>At3g23770</i> right | 5'CTTGACAACAATGGGACAC 3'    |
| Actin2 left            | 5' TGGTGAAGGCTGGATTTGC 3'   |
| Actin2 right           | 5' TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC 3' |

### **3.10. Agaroz Jel Elektroforezi**

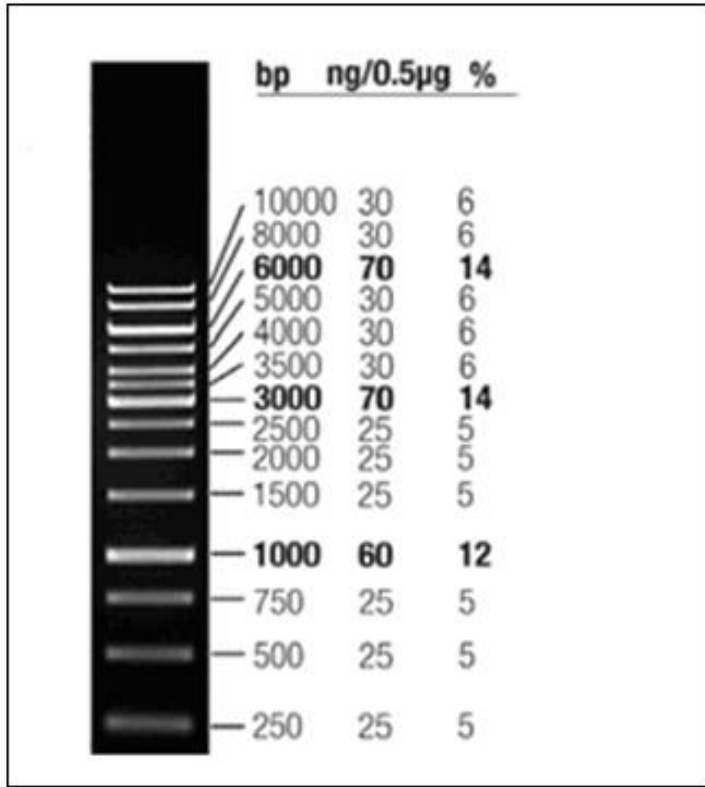
PCR ürünleri %1' lik agaroz jel (Sigma A5093) elektroforezi ile ayrılmış ve ultra violet transilluminator (U.V.) tablasında görüntülenmiştir. 2 g agaroz 200 ml 1XTAE tampon içerisinde 120°C' de eritilmiştir. Jel oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra içerisine 10 µl ethidium bromür (10mg/ml) eklenmiş ve katılaşmadan önce içerisinde tarak bulunan jel tepsisine dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank, 1XTAE tamponu ile doldurulmuştur. Ardından örnekler marker ile birlikte alınan 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforezde marker olarak 1 kb DNA ladder (Fermentas #SM0311), kullanılmıştır (Şekil 3.4 ). Jel 5V/cm' de yaklaşık 90 dakika yürütülmüş ve U.V. tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir.

#### **3.10.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması**

**10XTAE tamponu:** 48,44 g tris base, 3,72 g EDTA 900 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülmüş ve tamponun pH' ı asetik asit (12 ml) ile 8,0' a ayarlanmıştır. Son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L' ye tamamlanmış ve tampon oda sıcaklığında saklanmıştır.

**1XTAE tamponu:** 100 ml 10XTAE tamponu 900 ml dH<sub>2</sub>O ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

**Ethidium bromür stok çözeltisi:** 0,1 g ethidium bromür 10 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde karıştırılarak çözdürülmüş ve 10 mg/ml' lik stok çözelti elde edilmiştir. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta saklanmıştır.



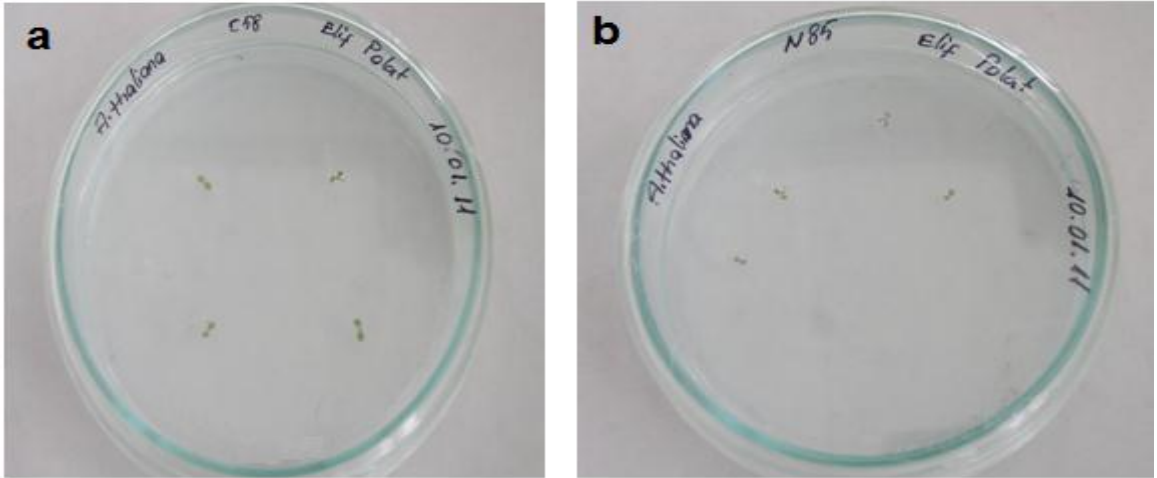
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan marker haritası

## BÖLÜM 4

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipinde iki farklı gene ait nakavt mutant hatlara ait tohumlar Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir. Besi ortamında petri kaplarına yerleştirilen tüm tohumlar (Şekil 4.1) wild type bitkiler (yabanıl) ile aynı zamanda çimlenerek rozet ve kök yapıları geliştirmiştir. Daha sonra, fideler yeşil klorofil içeriğinden dolayı yeşil renkte gerçek yapraklar vermiş ve normal gelişim göstermiştir. Çiçek tomurcukları ilk kez, yabanıl tip bitkilerde olduğu gibi vernalizasyonu takiben 3. haftadan sonra görülmüştür (Şekil 4.2, Şekil 4.3). Çiçekler bir pistil, altı stamen, beyaz renkte dört petal ve yeşil renkte dört sepalden oluşmuştur.



Şekil 4.1. Her iki mutant gene ait *A. thaliana* bitkilerinin MS besisi ortamındaki kök sistemlerinin oluşumu. a) At4g14080 b) AT3G23770.



**Şekil 4.2.** *AT4G14080* (CS850174 stok nolu) mutant *Arabidopsis thaliana* çiçek tomurcukları.

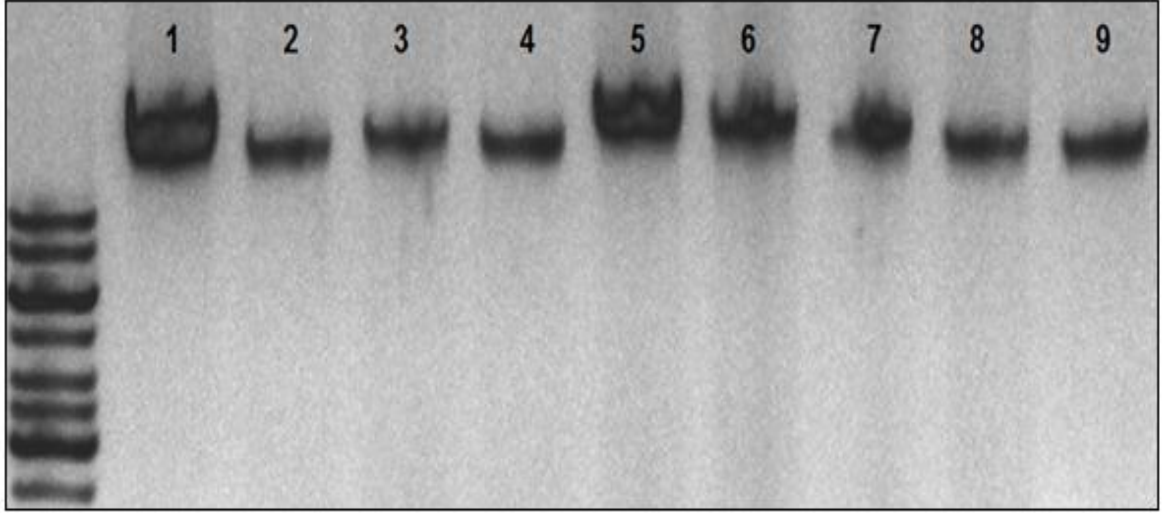


**Şekil 4.3.** *AT3G23770* (N859965 stok nolu) mutant *Arabidopsis thaliana* çiçek tomurcukları.

#### **4.2. Genomik DNA İzolasyonu**

Yaprak dokularından (100 mg) DNA izolasyonu Edwards ve ark. ( 1991) önerildiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen DNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. DNA örneklerinde sürüntü ile karşılaşılmamış ve PCR reaksiyonları için uygun oldukları görülmüştür (Şekil 4.4).





**Şekil 4.4.** *A. thaliana* mutant ve yabanıl tip genomik DNA'larına ait jel elektroforezi görüntüleri. Kuyucuklara 5 µl örnek yüklenmiştir. Marker: Fermantas 1 KB DNA Ladder. Hat 1, 2, 3, 4: *At4g14080* mutant hattı, Hat 5, 6, 7, 8: *At3g23770* mutant hattı, Hat 9: Yabanıl tip.

### 4.3. Mutant Bitkilerin Doğrulanması

#### 4.3.1 Primerlerin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *A.thaliana* CS850174 ve N859965 mutantları Colombia ekotipidir. Primerler belirlenmeden önce aşağıda aşamalar gerçekleştirilmiştir.

- 1) [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) sayfasından arama motoruna AT4G14080 yazılır ve arama yapılır (Ek 3.1).
- 2) Arama sonuçlarının bulunduğu sayfaya ulaşılarak ilgili gen başlığı seçilmiştir (Şekil Ek 3.2).
- 3) Stok isimlerinin yazılı olduğu bölümden kullandığımız mutant hat seçilmiştir (Şekil Ek 3.3).
- 4) Açılan sayfadan örneğin çalışmayı yürüteceğimiz CS850174 isimli mutant stok seçilmiştir. CS850174 mutantı WiscDsLox285F04 polimorfizm olarak TAIR web sayfasında tanımlanmıştır. Bu sayfadan T-DNA komşu dizisi (flanking dizi) belirlenmiştir (Ek 3.4).

Flanking diziler mutasyonun bulunduğu yerin belirlenmesini sağlamıştır. Bu diziler T-DNA' ya komşu dizilerdir. Mutant genlerde T-DNA' nın varlığı LB (Left border) olarak bilinen T-DNA'nın sol sınırına bağlanan primerlerin kullanıldığı PCR ile belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan primerler, iSct primer programı (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) kullanılarak aşağıdaki adımlarda seçilmiştir.

1) WiscDsLox285F04 adı ilgi kutucuğa yazılarak onay verilmiştir (Şekil 4.5).

Primer size - 21 Min: 18 Max: 28  
Opt:  
Primer TM - 61 Min: 53 Max: 71  
Opt:  
GC Content 20.0 Max: 80.0 Clamp: 1  
- Min:  
Max N: 300 Ext5: 300 Ext3: 300  
Primer Zone: 200 BPos: 110  
Data Type: Insertion Format:

**1. PrimerL :** Please paste your list: like

Salk\_000002  
SAIL\_155\_D07  
GABI\_756F01  
FLAG\_270B05  
RATM15-1976-1\_G  
WiscDsLox289\_292P9  
SM\_3\_19088

WiscDsLox285F04

Şekil 4.5. T-DNA mutant genleri için kullanılan primer dizayn programı.

2) Böylece PCR sırasında kullanılacak uygun left (LP) ve right (RP) primerler (Şekil 4.6.), bu primerlere ait uzunluk, TM ve GC özellikleri ve PCR sonrası oluşacak ürün boyutu program tarafından sağlanmıştır (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> ).

```
WiscDsLox285F04 PRODUCT_SIZE 1240 PAIR_ANY_COMPL 0.00
PAIR_3'_COMPL 0.00 DIFF_TM 0.06

LP ACCATAACCGTCCCTAACCCAC Len 21 TM 59.99 GC 52.38 SELF_ANY_COMPL 0.06
3'_COMPL 0.00

RP CACAGAGTAACGCTCGGAAAC Len 21 TM 59.93 GC 52.38 SELF_ANY_COMPL 0.06
3'_COMPL 0.00

Insertion chr4 8119186 BP+RP_PRODUCT_SIZE 598- 898
```

**Şekil 4.6.** Primer dizayn programı ile oluşturulan CS850174 mutant hattı için geliştirilen primerler.

CS850174 mutant hattı için pDs Lox T-DNA vektörü kullanılmıştır (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=polyallele&id=500412528> ). PCR ürünlerini elde edebilmek için TAIR web sayfasında bulunan p745 primeri LB primer olarak seçilmiştir (Şekil 4.7).

|                 |   |
|-----------------|---|
| Associated Loci | AT4G14080   |
| Mutagen         | T-DNA insertion   |
| Mutation Site   | gene  |
| Description     | Sequence generated in the course of an Arabidopsis T-DNA tagging program. TAIL-PCR was used to generate sequencing templates that represent A.t. genomic DNA flanking the left border of the pDs-Lox T-DNA insert. PCR products were sequenced directly by using the p745 primer 5' AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC 3' |

**Şekil 4.7.** Left Border (LB) primer olarak kullanılan p745 primeri

CS859965 mutant hattı için uygun left (LP) ve right (RP) primerler (Şekil 4.8.), bu primerlere ait uzunluk, TM ve GC özellikleri ve PCR sonrası oluşacak ürün boyutu program tarafından sağlanmıştır (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> )

```

SALK_033100.20.30.x PRODUCT_SIZE 1068 PAIR_ANY_COMPL 0.00
PAIR_3'_COMPL 0.00 DIFF_TM 0.23

LP ACATGTTGCATTGCTTCTTCC Len 21 TM 60.13 GC 42.86 SELF_ANY_COMPL 0.23
3'_COMPL 0.00

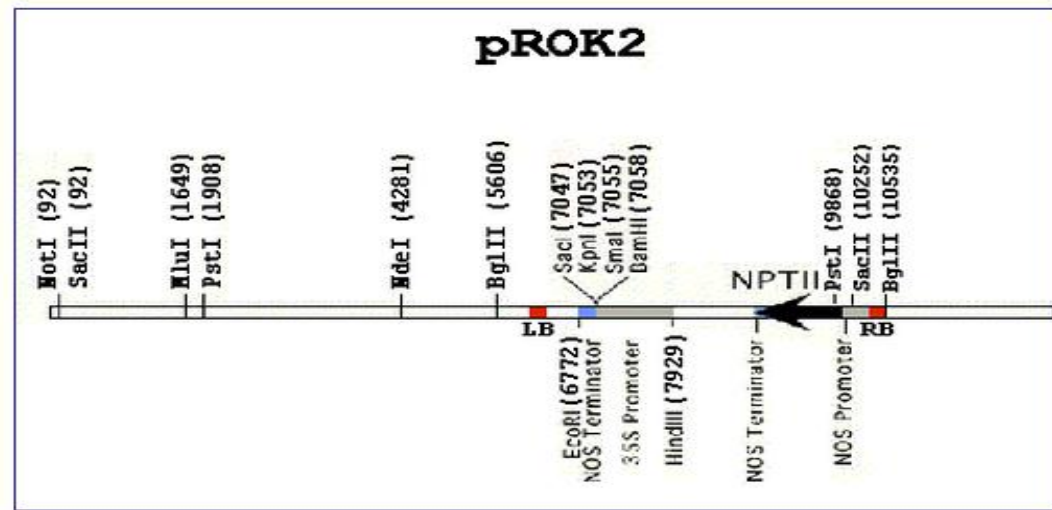
RP AAAACCATTAAAGCAGGCCAC Len 21 TM 60.36 GC 42.86 SELF_ANY_COMPL 0.23
3'_COMPL 0.00

Insertion chr3 8566226 BP+RP_PRODUCT_SIZE 528- 828

```

Şekil 4.8. Primer dizayn programı ile oluşturulan CS859965 mutant hattı için geliştirilen primerler.

T-DNA mutanı olan CS859965 pROK2 vektörü kullanılarak mutant hale getirilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. T-DNA insersiyonu pROK2 vektör

Uygun T-DNA primerini seçebilmek amacıyla Signal Salk Institute ([http://signal.salk.edu/tdna\\_protocols.html](http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html)) web sayfasından yararlanılmıştır. Buradan Salk mutant hatları için verilen T-DNA LB primerlerin içerisinde uygun olan primer seçilmiştir (Şekil 4.10) (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

```
LB - Left border primer of the T-DNA insertion:  
>Lb1 of pBIN-pROK2 for SALK lines  
GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT  
>Lb1.3 NEW (Newly used by Salk Genotyping Project and with better results)  
ATTTTGCCGATTTTCGGAAC  
>Lba1 of pBIN-pROK2 for SALK lines  
TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG  
>LB_6313R for SALK lines  
TCAAACAGGATTTTCGCCTGCT
```

**Şekil 4.10.** Salk hatlarında kullanılan Lba1 Left Border primer.

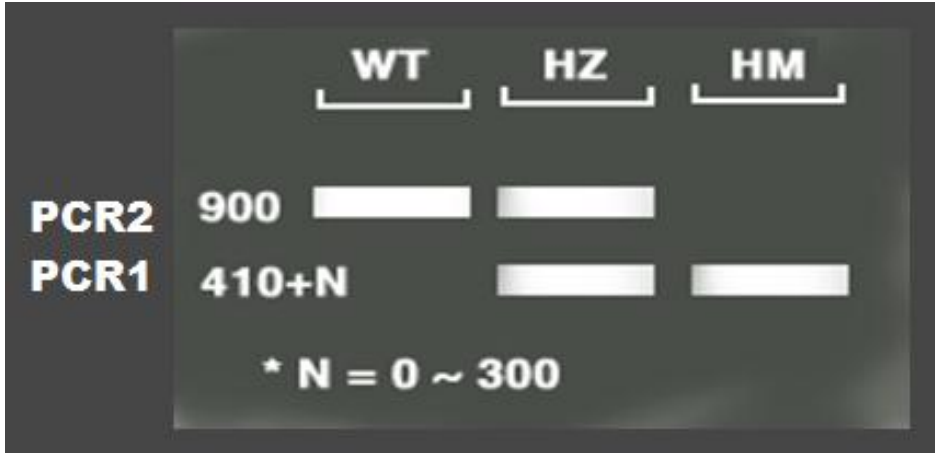
### **4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

#### **4.3.2.1. Genotiplerin Belirlenmesi**

Bu çalışmada *AT4G14080* ve *AT3G23770* genlerinin anter gelişiminde fonksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, N859965 (CS859965) ve CS850174 stok numaralı T-DNA nakavt mutantlarına ait tohumlardan yetiştirilen bitkilerin genotipleri PCR1 ve PCR2 olarak bilinen reaksiyonlar ile belirlenmiştir. Bu amaçla, N859965 numaralı nakavt mutant hat için seçilen primerler ile PCR1 ve PCR2 kurulmuş ve *AT3G23770* için seçilen primerler ile PCR2’de 1068 bç. uzunluğunda, PCR1’de ise 700 bç. uzunluğunda olan ürünler beklenmiştir (Çizelge 3.3). CS850174 stok numaralı nakavt mutant hat için yine PCR2 ve PCR1 kurulmuş ve bu reaksiyonlardan sırası ile 1240 bç ve 600 bç uzunluğunda ürünler beklenmiştir.

PCR1’de LB olarak bilinen primer sadece T-DNA üzerine bağlanırken, RB primeri bitkinin genomunda ilgili gen bölgesine bağlanır. Dolayısı ile bu reaksiyonda oluşan ürünler ilgili gen içerisinde T-DNA varlığını ispat eder. Buna karşın, PCR2 reaksiyonunda kullanılan primer çifti sadece ilgili gene bağlanır ve beklenen boyutta bir ürün oluşturur. Eğer ilgili gen bölgesinde T-DNA var ise bu durumda ürün oluşmaz. Mutant hatların genotipleri belirlenirken tek bir bitkiye ait genomik DNA’ların kalıp olarak kullanıldığı iki farklı PCR reaksiyonu (PCR1 ve PCR2) kurulur. Eğer mutant hat homozigot (HM) ise PCR1 sonucunda beklenen boyutta bant oluşması gerekirken, PCR2 herhangi bir ürün oluşturmaz. Bu durumda T-DNA’nın kromozomdaki her iki alel içerisinde de katıldığı anlaşılır. HM bireyler aa olarak gösterilir. Bu bitkilerde, PCR1 sonucunda yaklaşık olarak 410+N bç (N: ~300 bç) ürün meydana gelir. Bitkinin yabanıl tip (WT) olduğu durumda, yani T-DNA katılımının olmadığı durumlarda ise PCR1 herhangi bir ürün oluşmazken sadece PCR2 de ürün gözlenir. PCR2’de gene özgü primerler ile beklenen boyutta ürün

elde edilir. Ancak PCR2’de oluşan bant 900 baz çiftinin üzerinde ise bu şartlarda gene özgü ürün oluşturduğu düşünülür. Mutant bireylerin heterozigot (HZ) olduğu durumda ise hem PCR1 hem de PCR2 de ürün meydana gelir (Şekil 4.11- <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Bu durumda T-DNA sadece bir alel içerisinde yer alır ve bu bitkilerin fenotipleri Aa olarak bilinir (C O’Malley ve ark., 2007).

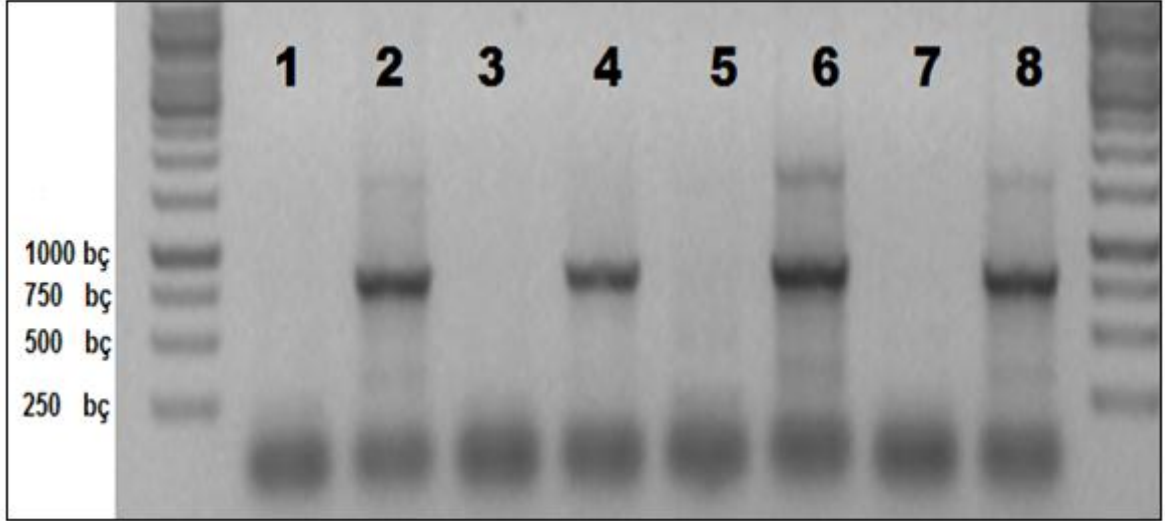


**Şekil 4.11.** Mutant bitkilerin fenotiplerinin belirlenmesi için kullanılan örnek bir şekil. PCR1 ile belirtilen baz çifti maksimum 710 olabilir. Ancak PCR2 kullanılan gene bağlı olarak her reaksiyon için farklılık göstermektedir. Bu şekilden yola çıkarak fenotipler belirlenmiştir. WT: Wild type (Yabanıl tip) HZ: Heterozigot, HM: Homozigot.

Mutant bitkilerin genotipleri bu bitkilere ait genomik DNA kalıpları kullanılarak kurulan PCR reaksiyonları ile kanıtlanmıştır. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

#### 4.3.2.2. AT3G23770 Geninde Mutasyon Taşıyan Hatların Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan mutant bitkilere ait PCR sonuçları (her bitki için PCR2 ve PCR1) agaroz jelde görüntülenmiştir. *AT3G23770* geninde mutasyon taşıyan homozigot (AA $\text{bb}$ ) bitkiler PCR1 reaksiyonunda yaklaşık 700 baz çifti büyüklükte ürün oluştururken, PCR2’de bant vermemiştir. Kullanılan 4 bitkinde genotiplerinin homozigot mutant olduğu yalnızca PCR1 bantlarının oluşmasıyla anlaşılmıştır (Şekil 4.12). Bu bitkilerin fenotipleri incelendiğinde erkek kısırlık görülmemiştir.



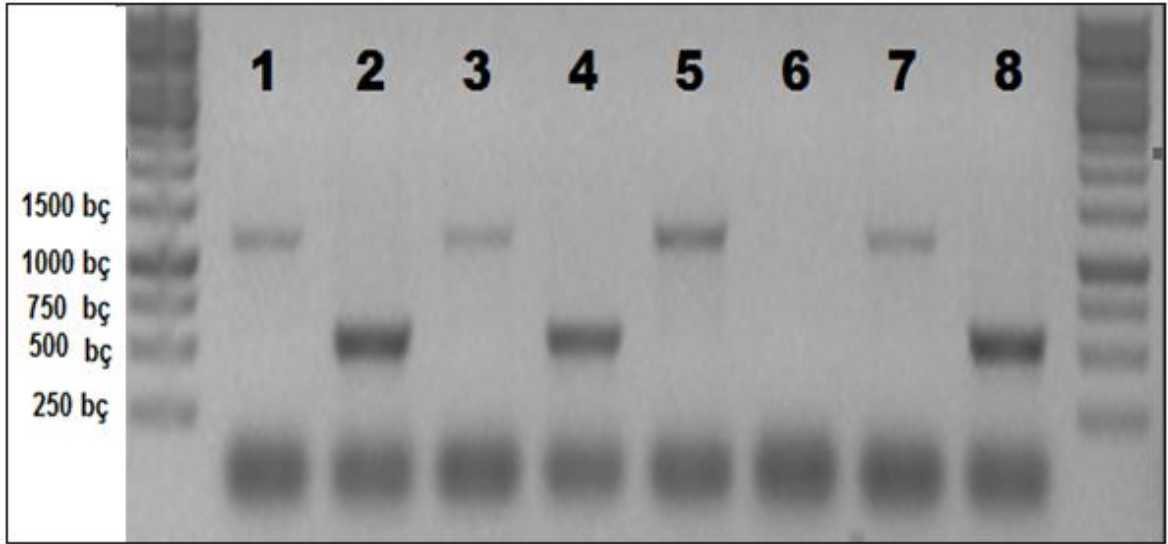
**Şekil 4.12.** *AT3G23770* mutant bitkilerine ait dört bitkinin PCR2 ve PCR1 sonuçları. PCR ürünleri kuyucuklara 20 µl yüklenmiştir. 1 nolu bitki Hat 1: PCR2, Hat 2: PCR1; 2 nolu bitki Hat 3: PCR2, Hat 4: PCR1; 3 nolu bitki Hat 5: PCR2, Hat 6: PCR1; 4 nolu bitki Hat 7: PCR2, Hat 8: PCR1. 1, 2, 3 ve 4 nolu bitkilerin genotipi homozigot.

#### 4.3.2.3. *AT4G14080* Geninde Mutasyon Taşıyan Hatların Belirlenmesi

*AT4G14080* geninde mutasyon taşıyan bitkilerinden üç tanesinin heterozigot mutant olduğu bir tanesinin ise yabanıl tip olduğu görülmüştür. Bu bitkilerin PCR sonuçlarının jel üzerindeki görüntülerinde üç bitkide de hem PCR1 hem de PCR2 ürünlerinin bant oluşturduğu bu bitkilerin heterozigot (AaBB) oldukları anlaşılmıştır. Yabanıl tip bitkinin ise PCR2’de ürün verdiği PCR1’de ürün vermediği görülmüştür (Şekil 4.13). PCR1 reaksiyonu yaklaşık 600 baz çifti büyüklükte ürün oluştururken, PCR2’de yaklaşık 1240 bç. uzunluğunda ürün oluşmuştur.

Çalışmamız süresince yetiştirilen diğer *AT4G14080* mutant bitkilerde de homozigot bireylere rastlanmamıştır. Tohumların sınırlı sayıda oluşundan dolayı bu mutasyonu taşıyan bitkilerden toplamda 12 adet yetiştirmiştir. Elde edilen heterozigot bitkilerle melezlemeler devam etmiştir.

Ancak çalışmamız sonrasında araştırma laboratuvarına alınan yeni tohumlarda homozigot (aa) bireylere rastlanmıştır. Fenotipleri incelendiğinde bu bitkilerde erkek kısırlık görülmemiştir.



**Şekil 4.13.** *AT4G14080* mutant bitkilerine ait dört bitkinin PCR2 ve PCR1 sonuçları. PCR ürünleri kuyucuklara 20 µl yüklenmiştir. 1 nolu bitki Hat 1: PCR2, Hat 2: PCR1 ; 2 nolu bitki Hat 3: PCR2, Hat 4: PCR1; 3 nolu bitki Hat 5: PCR2, Hat 6: PCR1; 4 nolu bitki Hat 7: PCR2, Hat 8: PCR1. 1,2, ve 4 nolu bitkilerin genotipi heterozigot. 3 nolu bitkinin genotipi yabanıl tiptir.

#### 4.4. Melezleme Çalışmaları

Mutant bitki genotipleri belirlendikten sonra iki farklı mutant hata ait bitkiler ebeveyn olarak seçilmiş ve binoküler altında pens ve diseksiyon iğnesi yardımıyla melezleme yapılmıştır. Melezlemede N859965 hattından elde edilen homozigot (AA $bb$ ) ve CS850174 (AaBB) hattından elde edilen heterozigot bireyler ikişerli gruplar halinde çalışılmıştır. Mezlenen bitkiler ebeveyelerinin ve melezleme tarihlerinin yazılı olduğu küçük etiketler kullanılarak diğer çiçeklerden ayrılmıştır (Şekil 4.14).





Şekil 4.14. Melezlenen bir bitkinin etiketle belirlenmesi.

Baklalar oluşana kadar sürekli gözlem altında tutulmuştur. Baklaların oluşumuyla melezlemede başarı sağlanmıştır. Melezleme sırasında dişi organı zarar gören tomurcuklar büyüme gösteremeyerek zamanla canlılığını yitirmiştir. Baklalar melezlemeyi takip eden 1-2 gün içinde uzamaya başlamıştır. Baklaların tamamıyla kurummasının ardından oluşan çok sayıdaki tohum toplanmış ve kullanılıncaya kadar +4°C de saklanmıştır. Tohumlar materyal–metotda belirtilen şartlarda yetiştirildikten sonra oluşan bitkilerin genotipleri PCR1 ve PCR2 ile kontrol edilmiştir.

Homozigot (AAbb) N859965 hattı ile heterozigot (AaBB) CS850174 hattın melezlenmesi sonrasında elde edilen tohumların genotipleri mendel oranlarına göre % 50 oranında AaBb, %50 oranında AABb olarak oluşması beklenmiştir.

#### 4.5. Melezlenen Mutant Bitkilerin Genotiplerin Belirlenmesi ve Seçilmesi

Homozigot (AAbb) N859965 hattı ile heterozigot (AaBB) CS850174 hattın melezlenmesi sonrasında elde edilen tohumların genotipleri mendel oranlarına göre % 50 oranında AaBb, %50 oranında AABb olarak oluşması beklenmiştir.

Melezleme sonrasında toplanan tohumların iki farklı genotipe sahip olduğu bilinmektedir. Melezleme yaptığımız bitki ebeveynleri AaBB (heterozigot) ve AAbb (homozigot) şeklindedir.

Çalışmanın ilk aşamasında kullanılan bitkiler yalnızca tek bir gen bakımından mutasyona uğratılmıştır. Bir bitkide mutant durumda olan gen diğer bitkide yabancı

şekildedir. Kullanılan mutant genlerden N859965 hattı, *AT3G23770* geninin her iki alelinde de mutasyon taşımasıyla homozigot mutant (bb) olarak belirlenmiştir. Fakat aynı bitki *AT4G14080* geni bakımından bir mutasyon taşımadığı için yabancı tip (AA) durumundadır. Bu durumda N859965 hattının genotipi AAbb olmaktadır. Bir diğer mutasyona uğratılan CS850174 hattı da *AT4G14080* geninde mutasyonu tek bir allelde taşıdığı için heterozigot mutant (Aa) olarak belirlenmiştir. Bu bitki ise *AT3G23770* bakımından yabancı durumdadır. CS850174 hattının genotipi AaBB olmaktadır.

Bitkiler dihibrit olarak melezlenmiştir (Şekil 4.15). CS850174 heterozigot mutant geni Aa olarak belirtilmiştir. N859965 geni homozigot olduğu için bb ile belirtilmiştir. Aşağıda Şekil 4.15 de dihibrit olarak melezlenen ebeveynler, bunlardan oluşan gametler ve mendel açılımlarına göre F1 döllerinin oranları verilmiştir.

|                      |               |               |
|----------------------|---------------|---------------|
| <b>P</b>             | <b>AaBB</b>   | <b>AAbb</b>   |
|                      | <b>X</b>      |               |
| <b>Gametler</b>      | <b>AB</b>     | <b>Ab</b>     |
|                      | <b>aB</b>     |               |
| <b>F<sub>1</sub></b> | <b>½ AABb</b> | <b>½ AaBb</b> |

**Şekil 4.15.** *At4g14080* heterozigot mutant bitkisi ile *At3g23770* homozigot mutant bitkisinin dihibrit melezlenmesi. AaBB genotipi *At4g14080* bitkisini belirtmekte, AAbb genotipi ise *At3g23770* bitkisini belirtmektedir. Melezleme sonunda ½ oranında AABb genotipi ve ½ oranında AaBb genotipi oluşmuştur. P: Ebeveyn (parent), F<sub>1</sub>: İlk nesil.

Elde edilen tohumlar materyal metod da açıklandığı şekilde çimlendirme ve büyüme ortamlarında yetiştirilmiştir (Şekil 4.16). Çalışmada yaklaşık 60 adet bitki kullanılmıştır. Tablo 4.1 de belirtildiği üzere oluşan bitkilerin ancak %50 si AaBb genotipi taşıyacaktır. Bu nedenle fazla sayıda bitki analiz ederek bu sayının artması sağlanmıştır. Ancak melezlemenin yapıldığı bitkilerden *AT4G14080*' nin heterozigot (Aa) olması bu analizlerin çok sayıda bitki ile yapılmasına neden olmuştur. Her iki bitkide de homozigot mutant (aa yada bb) görülmesi durumunda, melezleme sonrasında elde edilen tüm bitkilerde AaBb

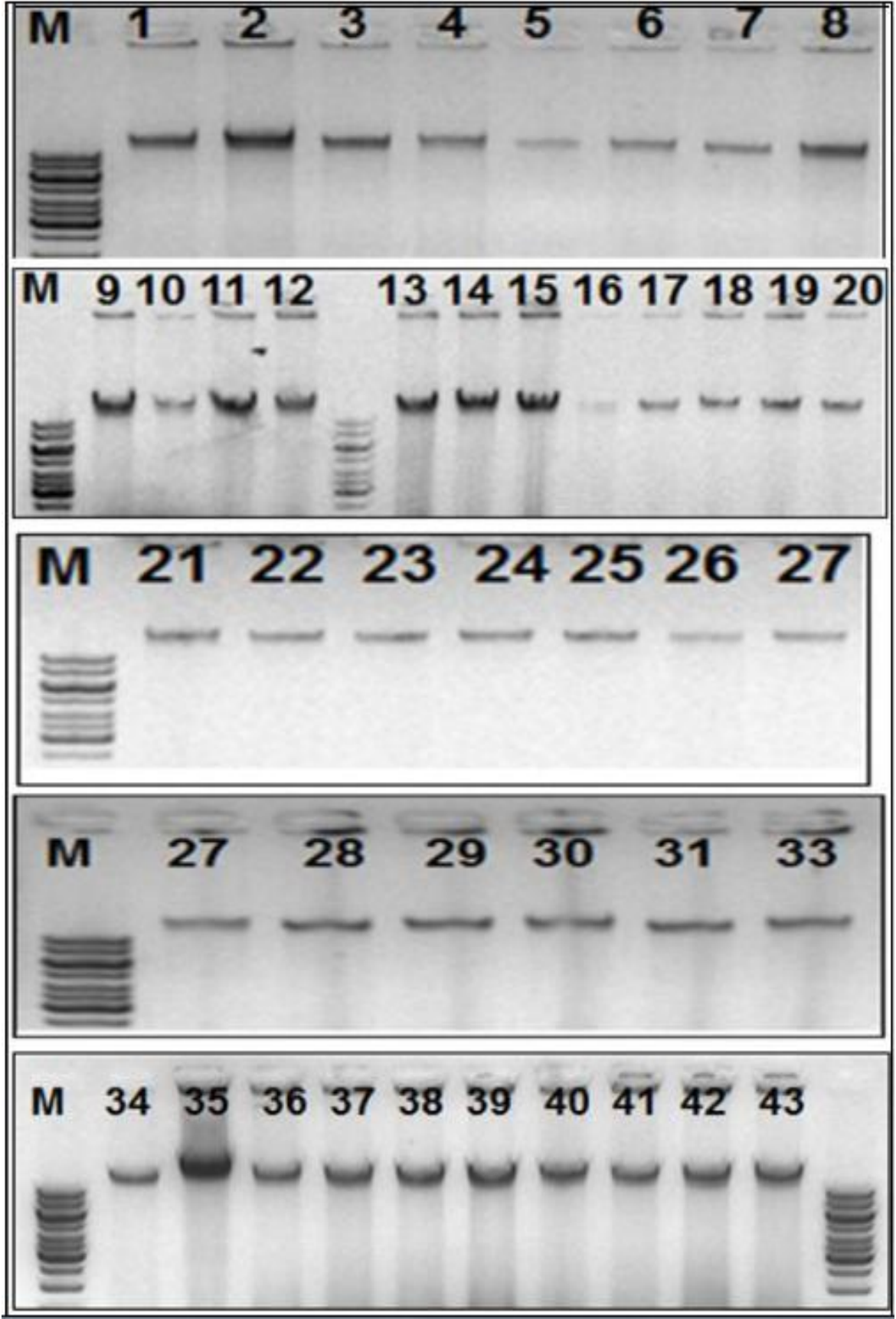
genotipini taşıyacaktı. Böylece bu bitkilerin PCR ile analizlerinin yapılması da gerekli olmayacaktı.



**Şekil 4.16.** Melezlenen bitkiye ait çeşitli büyüme aşamaları. a) Filizlenme aşaması b)Bitkilerin etiketlenek ayrılması ve DNA izolasyonu için doku alınması.

Bitkilerin genotiplerinin saptanabilmesi için yetiştirilen her bir bitki yaprağından DNA izole (Şekil 4.17) edilerek PCR ile doğrulanmıştır. Genotiplerin PCR1 ve PCR2 ile belirlenmesinin ardından AaBb heterozigot genotipi seçilmiştir. AaBb genotipinin seçilmesinin sebebi bu bitkilerin kendilenmeye bırakılmasının ardından çift mutant bitkiler oluşturacak olmasıdır. Bu genotip her iki mutasyon bakımından da heterozigotluk gösterirken, diğer genotip yani AABb sadece tek bir gen açısından heterozigot mutant durumdadır. Bu durum çalışmanın devam ettirilebilmesine engel oluşturacaktır.

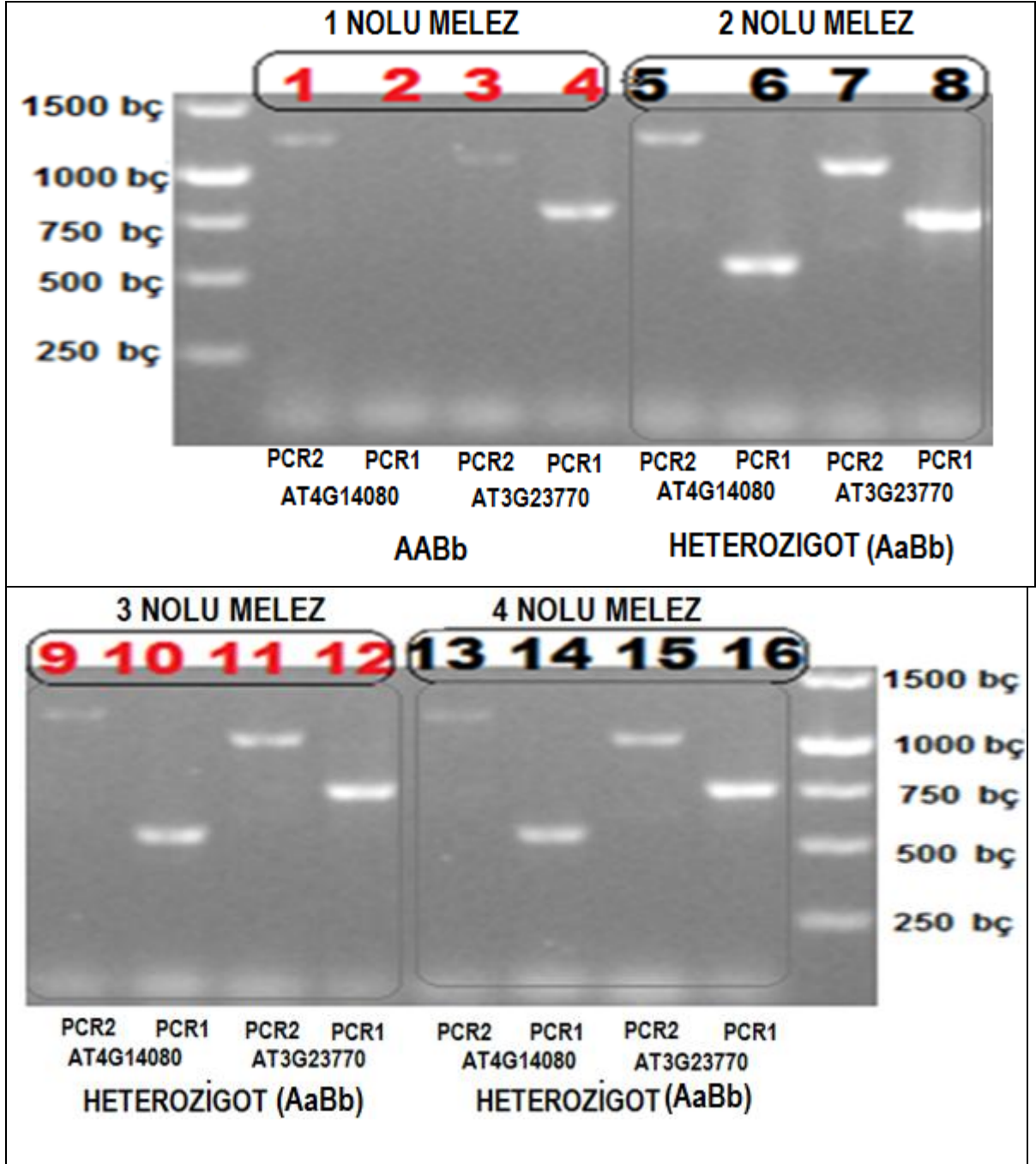
Genotiplerin belirlenmesi sırasında her bitki için 4 PCR reaksiyonu kurulmuştur. *AT3G23770* için yapılan PCR1 ve PCR2 çalışmalarının tamamı ürün oluşturmuştur. Her iki PCR’ında ürün oluşturması durumunda bitki heterozigot (Bb) olarak belirtilmiştir. Bu nedenle *AT3G23770* mutant hattı olan N859965 ile yapılan PCR çalışmalarının sonuçları için tek bir durum mevcuttur. Ancak *AT4G14080* geninin saptanması için yapılan PCR reaksiyonlarında iki farklı durum oluşacaktır. PCR2 ve PCR1’in her ikisi de ürün oluşturacak (Aa) ya da PCR2 ürün oluştururken PCR1 de ürün olmayacaktır (AA). AABb durumunda bitki tek bir gen mutasyonu oluşturduğu için çalışmada kullanılmamıştır. Bu durumda her bitki için yapılan dört PCR da, istenilen genotipteki bitkiye ulaşmayı sağlayan reaksiyon *AT4G14080* geni için yapılan PCR1 reaksiyonudur. Yani RP ve LB primerleri ile kurulan PCR1 reaksiyonudur. Bu reaksiyon bant oluşturmuş ise o bitki istenilen genotipe sahip olduğu için diğer bitkilerden ayrılmıştır.

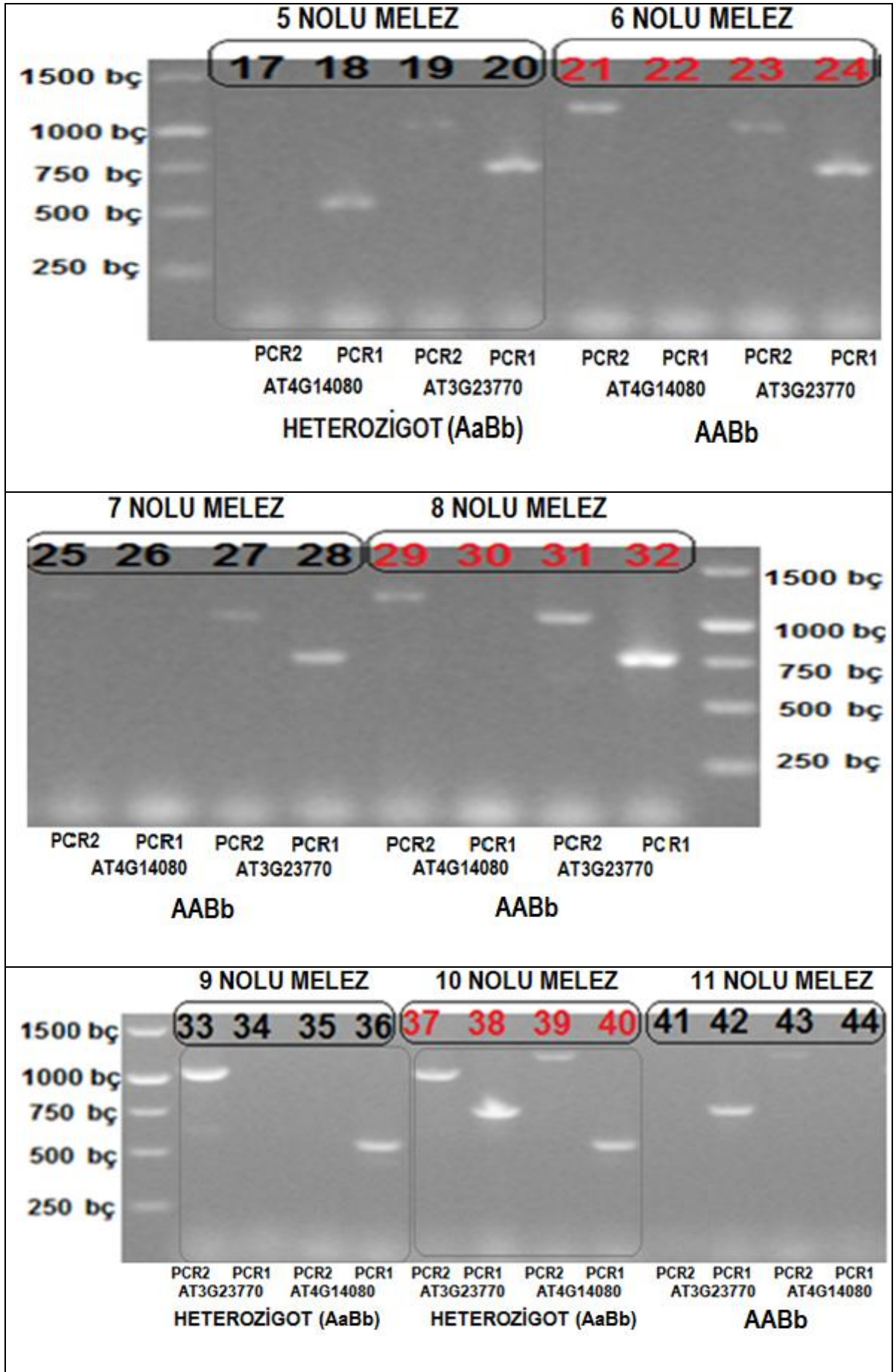


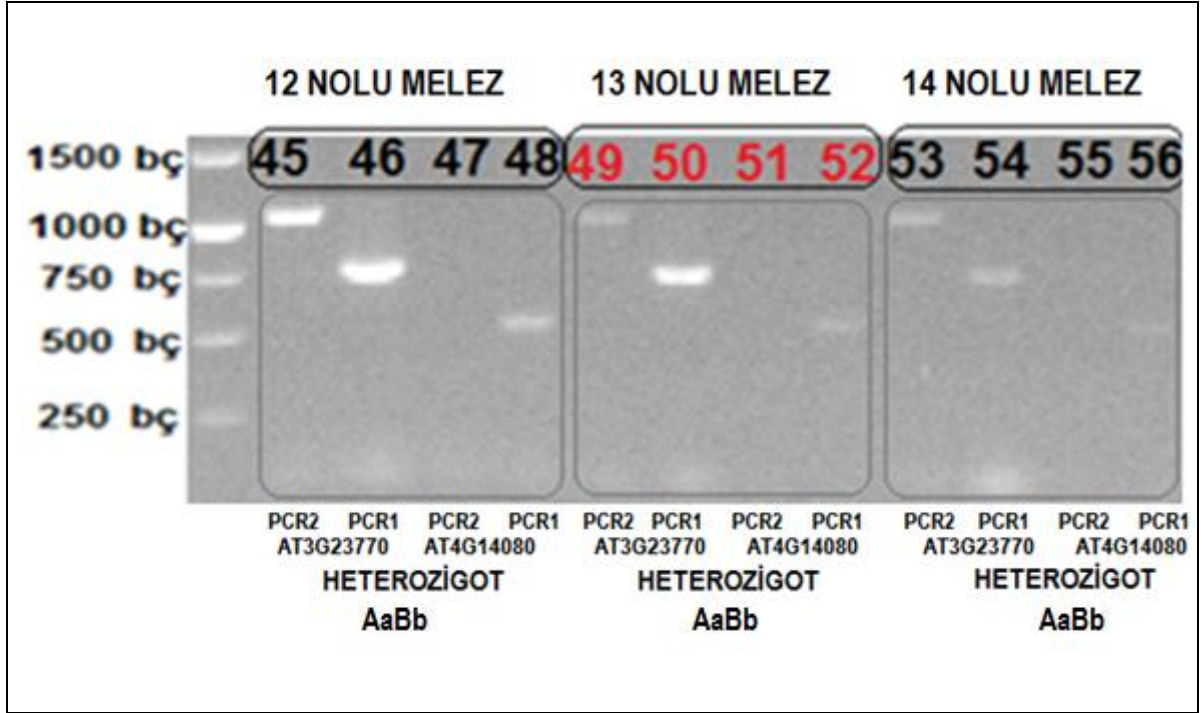
Şekil 4.17. Melez bitkilere ait izole edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri. 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır.

Her iki gen içinde mutasyon taşıyan hatların (Double mutant) belirlenebilmesi için melezleme sonucu elde edilen bireyler dört ayrı PCR reaksiyonu ile incelenmiştir.

PCR sonrası ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Tüm reaksiyonlar da bant oluşturan bitkiler heterozigot olarak diğerlerinden ayrılmıştır (Şekil 4.18).







**Şekil 4.18.** İlk melezleme sonrasındaki tohumlardan elde edilen bitkilerin PCR sonrası agaroz jel görüntüleri. PCR reaksiyonları 10 µl' lik hazırlanmıştır. PCR ürünleri kuyucuklara 10 µl yüklenmiştir. Marker olarak Fermantas 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. Her bitki için 4 er reaksiyon oluşturulmuştur. Kutu içerisine alınan bölümler heterozigot mutant bitkileri göstermektedir. Burada özellikle *AT4G14080* için yapılan CS850174-PCR1 reaksiyonlarının görülmesi mutant seçimini sağlamıştır. *AT3G23770* için: PCR2 (1068 bç), PCR1 (700 bç), *AT4G14080* için: PCR2 (1240 bç), PCR1 (600 bç).

Melezlenen bitkilere ait agaroz jel görüntüleri incelendiğinde AaBb ve AABb olmak üzere iki farklı genotip olduğu görülür. 1, 6, 7, 8 ve 11 nolu melez bitkilerin yabancı tip (AABb) olduğu görülmektedir. Bu beş bitkinin ortak özellikleri *AT4G14080* için yapılan PCR1 reaksiyonlarının ürün oluşturmamış olmasıdır. Jel görüntüsünde görülen diğer bitkilerin genotipleri heterozigot (AaBb) olarak belirlenmiştir. Burada 4 PCR reaksiyonu da ürün oluşturmaktadır. Bazı jel görüntülerinde *AT3G23770* için yapılan PCR1 reaksiyonları net gözükmemektedir. Ancak biliniyor ki bitkilerin melezlenmesi sırasında homozigot olan bu hat için oluşan tüm bireylerde Bb genotipinin sağlandığı görülür (Şekil 4.15). *AT4G14080* de ise melezleme sonucu oluşan bireylerde AA ve Aa olmak üzere iki ayrı genotip ihtimali bulunmaktadır. PCR1 in ürün oluşturduğu reaksiyonlar heterozigot, ürün vermediği reaksiyonlar ise yabancı tip olarak belirlenmiştir.

Elektroforez sonrasında yapılan agaroz jel görüntüleri ile seçilen heterozigot çift mutant bitkiler kendilenmeye bırakılmıştır. Kendilenme de bitki kendi polen ve yumurta hücrelerini kullanarak üremeyi gerçekleştirir. Kendilenme sonrasında bitkilerden tohumlar toplanmıştır. Bu tohumların çimlendirme ve toprağa ekilme aşamaları tekrar gerçekleştirilmiştir.

#### 4.6. Çift Homozigot Mutant Bitkilerin Doğrulanması

Kendilenme sonrasında oluşan bireyler ikinci nesil olan F<sub>2</sub> bitkilerini oluşturmuştur. AaBbxAaBb üremesinin sonucunda fenotipik olarak 9:3:3:1 oranı elde edilmiştir (Şekil 4.19). Genotipik olarak 9 ayrı bitki oluşmuştur. aabb çift homozigot genotipinin meydana gelme olasılığı ise 1/16 olarak hesaplanmıştır. Oran düşük olduğu için çalışmada çok sayıda (110 adet bitki) bitki analiz edilmiştir. Yapılan tekrarlı PCR analizleri sonucunda uygun homozigot çift mutant sayısı 4 bitki olarak saptanmıştır. Diğer genotipler istenilen homozigot mutant durumunu sağlamadığı için çalışmada kullanılmamıştır.

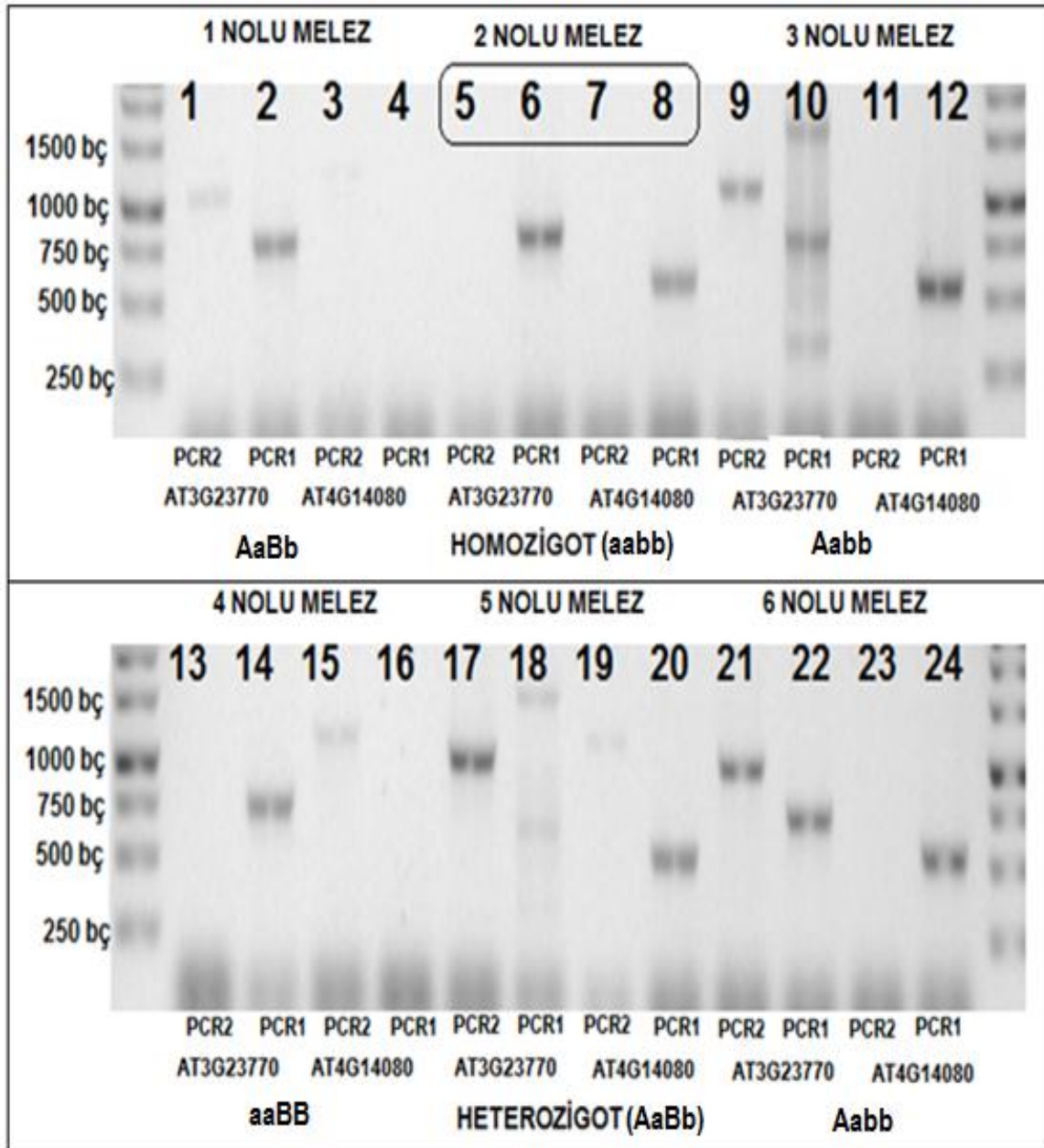
|   |   | AaBb  |      |      |      | F <sub>1</sub> |      |
|---|---|-------|------|------|------|----------------|------|
|   |   | polen |      |      |      |                |      |
| ♀ | ♂ | AB    | Ab   | aB   | ab   | F <sub>2</sub> |      |
|   |   | AB    | AABB | AABb | AaBB |                | AaBb |
|   |   | Ab    | AABb | Aabb | AaBb |                | Aabb |
|   |   | aB    | AaBB | AaBb | aaBB |                | aaBb |
|   |   | ab    | AaBb | Aabb | aaBb |                | aabb |

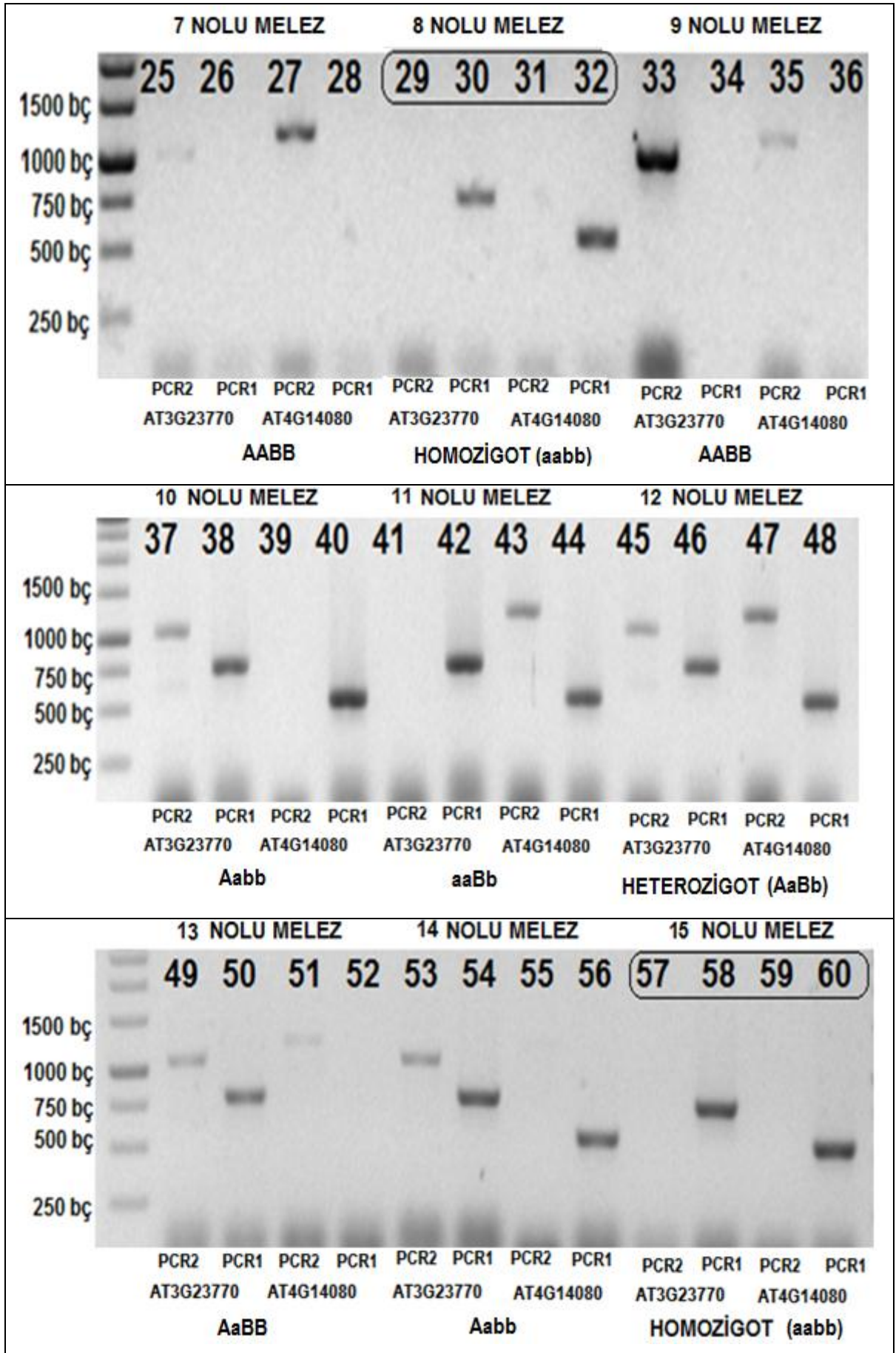
Şekil 4.19. Dihibrit melezleme.

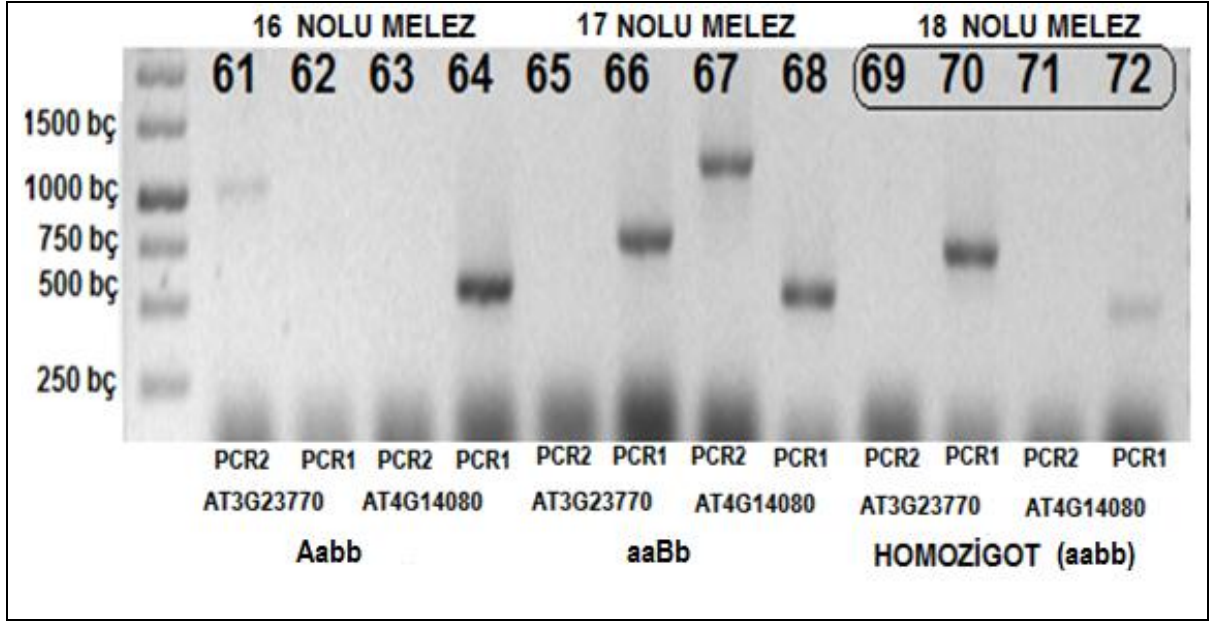


İstenilen çift homozigot mutant bitkilerin elde edilebilmesi için yine PCR yolu ile genlerin çoğaltımı sağlanmıştır. PCR her bir bitki için 4'er reaksiyondan oluşmuştur. Her gen için ayrı ayrı PCR1 ve PCR2 reaksiyonları kurulmuştur.

Bu reaksiyonlar da CS850174-PCR1 ve N859965-PCR1' in çoğalması ve PCR2 reaksiyonlarının ürün vermemesi bitki seçiminde belirleyici rol oynamıştır. Bu reaksiyonlar çift homozigot mutant bitkiler olarak belirlenmiştir. PCR sonrası ürünler agaroz jel ile görüntülenmiştir (Şekil 4.20). Bu reaksiyonlar da bant oluşturan bitkiler diğerlerinden ayrılmıştır.



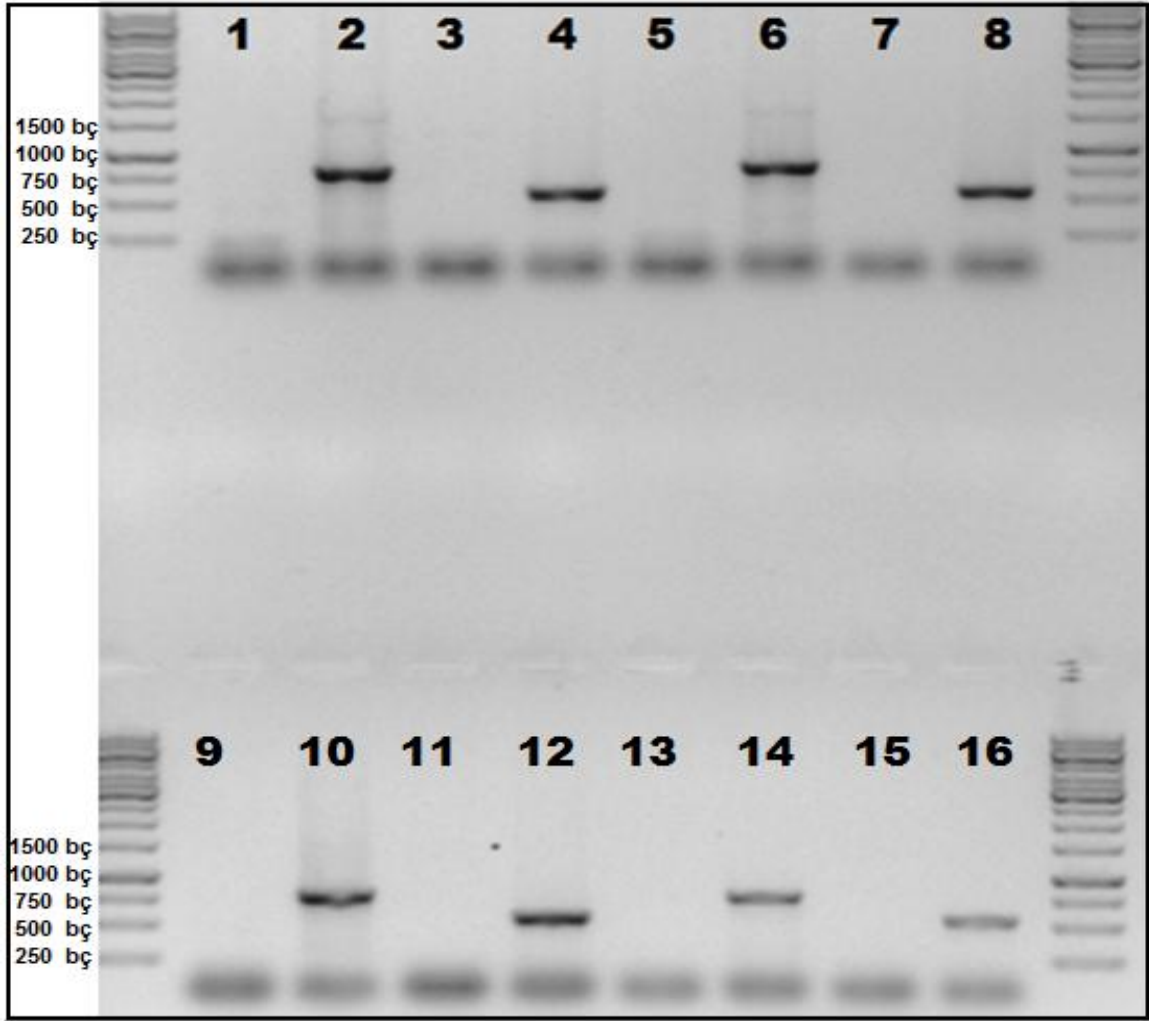




**Şekil 4.20.** Kendilenme sonrasında PCR ile belirlenen çift mutant bitkilerin agaroz jel görüntüleri. PCR reaksiyonları 10 µl' lik hazırlanmıştır. PCR ürünleri kuyucuklara 10 µl yüklenmiştir. Marker olarak Fermantas 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. Her bitki için 4'er reaksiyon oluşturulmuştur. Kutu içerisine alınan bölümler homozigot mutant bitkileri göstermektedir. *AT3G23770* için: PCR2 (1068 bç), PCR1 (700 bç), *AT4G14080* için: PCR2 (1240 bç), PCR1 (600 bç).

Şekil 4.20'de agaroz jel üzerinde PCR reaksiyonlarına göre oluşan ürünler ve bunların genotipleri belirtilmiştir. 1 nolu bitkinin genotipinin AaBB olduğu görülmektedir. Bu bitki çift mutant oluşturamamış ve fenotipik olarak yabancı tip bitkidir. 2 nolu melez ise homozigot double mutant bitkidir. Genotipi aabb'dir ve her iki gen bakımında mutant haldedir. Yalnızca PCR1 reaksiyonları ürün vermiştir. 5 nolu melez heterozigot durumdadır. AaBb genotipine sahiptir. Tüm reaksiyonlar da ürün oluşmuştur. Diğer örnekler de benzer şekillerdedir. 18 örnekten 12'si yabancı tip, 4'ü homozigot ve 2'si heterozigotluk göstermektedir.

Analiz edilen bitkilerin PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen homozigot çift mutant (aabb) 4 bitki elde edilmiştir. Bu bitkiler için tekrar PCR reaksiyonları kurulmuş ve agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 4.21 da gösterilmiştir.



**Şekil 4.21.** Çift mutant homozigot bitkilere ait agaroz jel elektroforez görüntüleri. PCR reaksiyonları 25 µl' lik hazırlanmıştır. PCR ürünleri kuyucuklara 10 µl yüklenmiştir. Marker olarak Fermantas 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. Bir bitki için 4 reaksiyon oluşturulmuştur. Hat 1, 5, 9, 13 N859965-PCR2 (1068 bç), Hat 2, 6, 10, 14 N859965-PCR1 (700 bç), Hat3, 7, 11, 15 CS850174-PCR2 (1240 bç), Hat 4, 8, 12, 16 CS850174-PCR1 (600 bç).

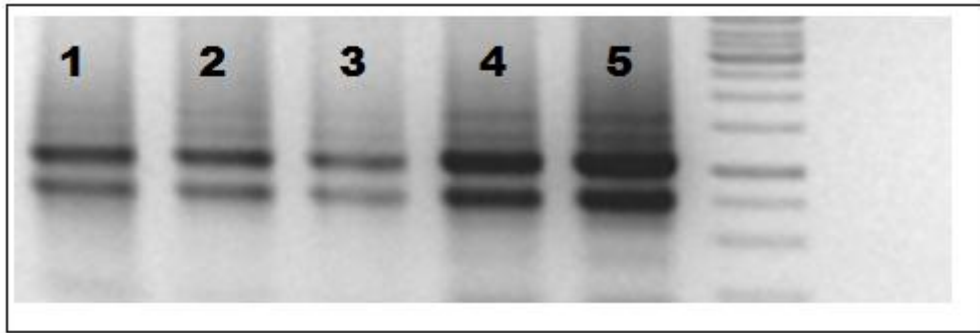
#### 4.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Double mutant homozigot bitkilerin PCR reaksiyonları ile saptanmasının ardından bu bitkilerin RT-PCR ile gen anlatımlarına bakılmıştır. Bu nedenle mutant bitkilerden RNA izolasyonu gerçekleştirilerek cDNA sentezlenmiştir.

Çalışmada 9 ayrı genotipe sahip Double mutant olduğu mendel oranlarına göre gösterilmiştir. Bu bitkilerden RNA izolasyonu, genç çiçek tomurcukları kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle stereo mikroskop altında çiçek tomurcukları steril bir bistüri ile

kesilerek RNAlater solusyonu içerisinde ayrılmış ve disekte edilen genç tomurcuklar eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerine alınmıştır. RNA degradasyonunu önlemek için tüm dokuların RNAlater ile kaplanmasına dikkat edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile RNA örneklerinin kalitesi kontrol edilmiş (Şekil 4.22) ve yoğunluğu florometrik yöntemle belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Sonuç olarak RNA örneklerinin cDNA sentezi için uygun olduğu belirlenmiş ve örneklerin 2 µg/µl total RNA içerdiği hesaplanmıştır.

İzole edilen total RNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve oligodT primerleri ile cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için 5 µl total RNA kullanılmasının PCR ürünlerinin elde edilebilmesi için uygun olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.22.** İzole edilen RNA örneklerine ait agaroz jel görüntüleri. Örnekler kuyucuklara 10 µl yüklenmiştir. 1 KB DNA Ladder (Fermantas) marker olarak kullanılmıştır. Hat 1 yabanıl tip *A.thaliana*, Hat 2, 3, 4, 5 Çift mutant homozigot *A.thaliana*.

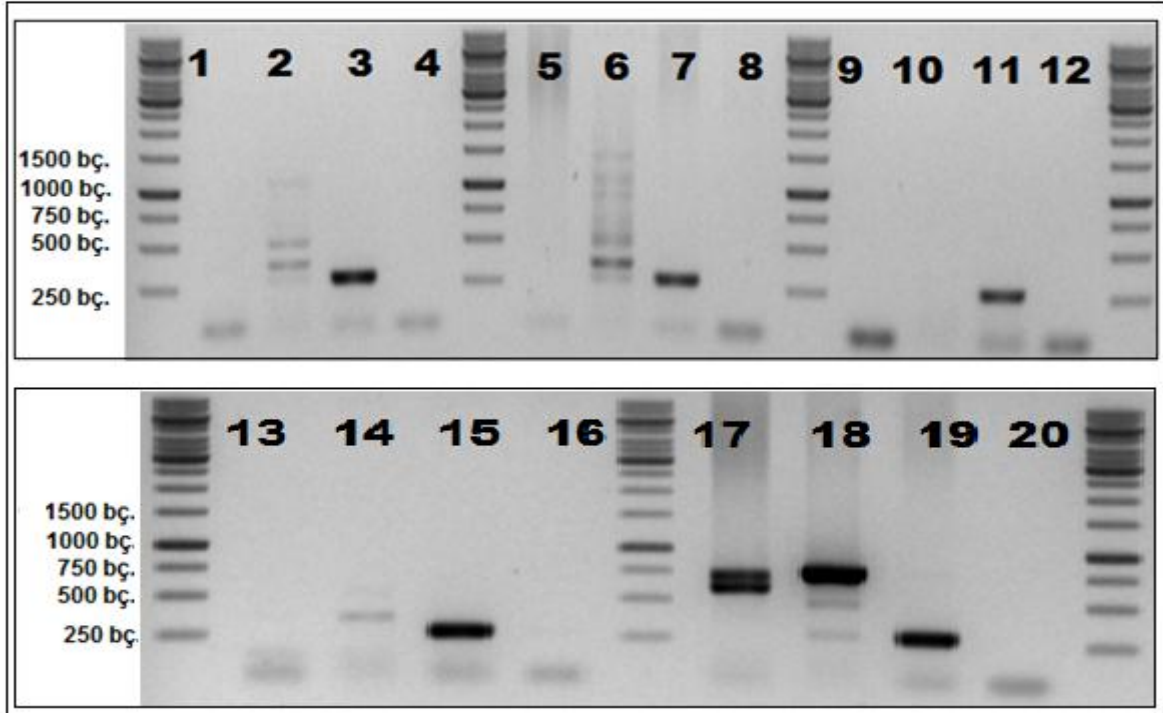
**Çizelge 4.1.** Total RNA' ların Qubit ile florometrik yoğunlukları

| <b>HAT 1</b> | <b>HAT 2</b> | <b>HAT3</b> | <b>HAT4</b> | <b>HAT 5</b> |
|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| 140 µg/ml    | 190 µg/ml    | 130 µg/ml   | 180 µg/ml   | 190 µg/ml    |

#### **4.8. Homozigot Çift Mutant Bitkilerde AT4G14080 ve AT3G23770 Genlerinin Anlatımları**

RNA izalasyonu sonrasında sentezlenen cDNA ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında AT3g23770 ve AT4G14080 genlerine ait Çizelge 3.9 de belirtilen primerler kullanılmıştır. Bu primer çiftlerinden sırası ile 609 bç ve 767 bç ürün beklenmiştir. PCR kurulurken bir örnek için 4 ayrı reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Örneklerimiz çift mutant olduğundan dolayı her iki gene ait primerler ile kurulan reaksiyonlar, Actin2 ile oluşturulan pozitif kontrol ve kontaminasyon oluşup

oluşmadığını gösteren negatif kontrol yapılmıştır. Bu reaksiyonlar sonucunda kullanılan bitkiler homozigot çift mutant olduğundan dolayı agaroz jel elektroforezinde beklenen boyutta bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.23). Ancak bazı örneklerde farklı boyutlarda özgün olmayan bantlara rastlanmıştır.



**Şekil 4.23.** Homozigot çift mutant örnekleri ile yapılan RT-PCR sonuçları. 1 KB DNA ladder kullanılmıştır. PCR reaksiyonları 25 µl' lik hazırlanmış ve 10 µl PCR ürünü kuyucuklara yüklenmiştir. Hat 1, 5, 9, 13, 17 *At3g23770* genine ait primer çifti (609 bç) kullanılmıştır. Hat 2, 6, 10, 14, 18 *At4g14080* genine ait primer çifti (767 bç) kullanılmıştır. Hat 3, 7, 11, 15, 19 *Actin2* genine ait primer çifti kullanılmıştır. Hat 4, 8, 12, 16, 20 negatif kontrol grubu. Kontrol grubu olarak kullanılan yabancı tip *A.thalina* ile yapılan PCR da tüm genlere ait beklenen bantlar görülmektedir (Hat 17, 18, 19, 20 ).

Agaroz jel elektroforezinde görüldüğü üzere *AT4G14080* geni için yapılan PCR reaksiyonlarında çeşitli büyüklükte bantlar görülmüştür. Ancak 767 bç'lik bir bant görülmemiştir. *AT3G23770* geni için yapılan PCR reaksiyonlarında yabancı tip *A.thaliana* dışında bant görülmemiştir. *Actin2* primerleri tüm reaksiyonlarda bant oluşturmuştur. Negatif kontrollerde beklenildiği üzere bant çıkmayıp herhangi bir kontaminasyon olmadığını belirtmiştir.

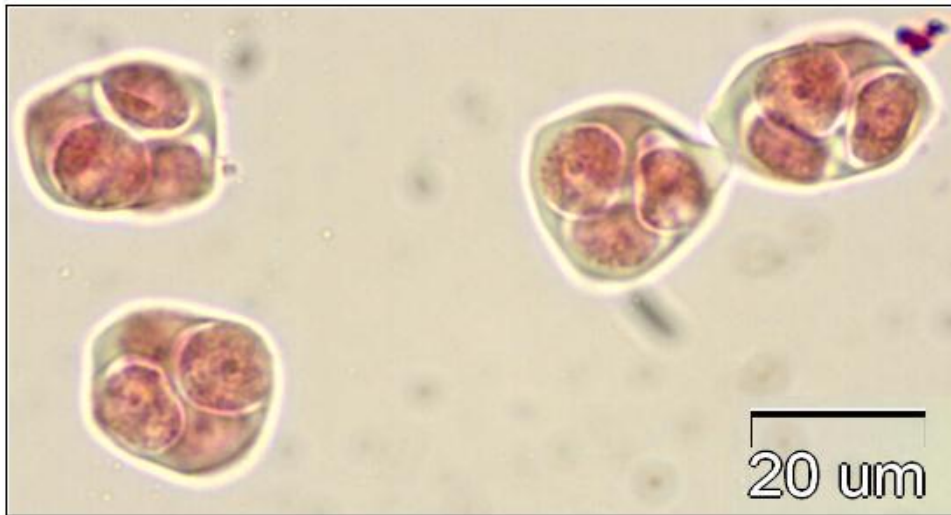
*AT4G14080* geni kallazın salgılandığı safhada etkilidir. Hird ve ark. (1993), çalışmalarında *AT4G14080* (A6) geninin tapetum spesifik olduğunu ve bitkide özellikle

kallazın aktive olduğu safhada ifadesinin arttığını ve bu ifadenin geçici olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. *AT3G23770* geni de kallazın ifadesi sırasında aktiftir. Doxey ve ark. (2007), ise çalışmalarında *AT3G23770* geninin MS2 geni ile birlikte tetradların salınımı sırasında ifade olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise beklenen boyutta bantların görülmeyişi oluşturulan bitkilerde bu genlerin ifade olmadığını ve bitkilerin çift mutant homozigot olduğunu göstermiştir.

#### **4.9. Sitolojik Araştırmalar**

##### **4.9.1. Mutant Hatların Sitolojik Olarak İncelenmesi**

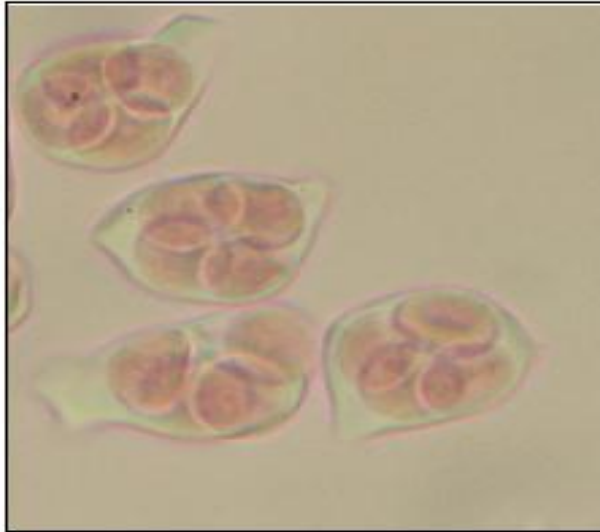
PCR ile genotipleri belirlenen mutant bitki tomurcukları %70 lik alkol içerisinde fikse edilmiştir. Sonrasında stereo mikroskop altında boyutlarına göre ayrılmıştır. Tomurcuklar içerisindeki anterler diseksiyon iğnesi ile çıkarılarak anterlerin boyutları ölçülmüştür. Anterler diseksiyon iğnesi ile parçalanırken bir damla %70'lik alkol damlatılarak anter içeriğinin kuruması engellenmiştir. Karminle boyanmıştır. Anterlerde kalloz yapının bulunduğu tetrad safhası saptanmıştır (Şekil 4.24, 4.25) . En uygun tomurcuk boyutu 0,58- 0,64 mm olarak saptanmıştır. Bu boyutlarda ki tomurcuklardan elde edilen anterlerin ise 0,197- 0,225 mm uzunluğunda olduğu görülmüştür. Kalloz doku yabanıl tip bitkiler ile karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.26).



**Şekil 4.24.** *At4g14080* mutantına ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapıları.



Şekil 4.25. *At3g23770* mutantına ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapıları.



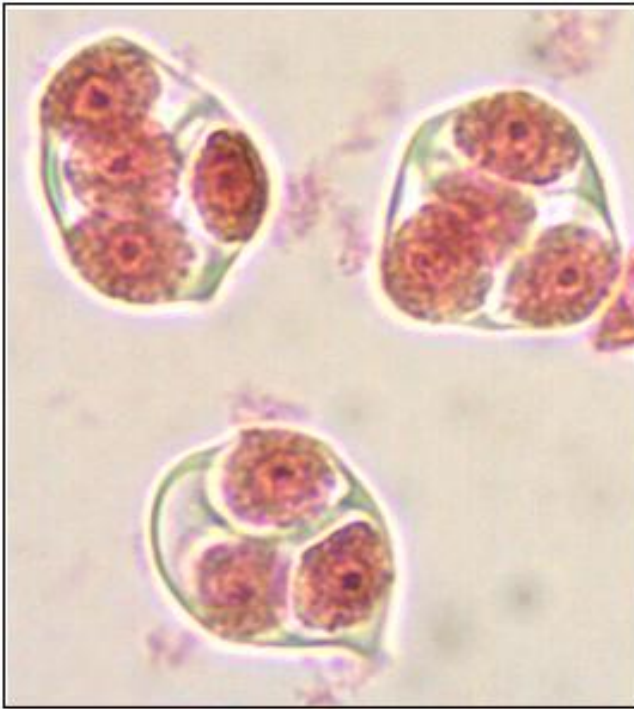
Şekil 4.26. Yabani tip *Arabidopsis thaliana* da kalloz çeper ile çevrili tetrad yapıları.

Çalışmada PCR analizleri ile *AT4G14080* mutantının heterozigot olduğu, *AT3G23770* mutantının ise homozigot olduğu belirlenmiştir. Kalloz çeper mikrosporogenez ve megasporogenez gelişimi sırasında önemlidir (Stone ve Clarke, 1992; Tucker ve ark., 2001; Worrall ve ark., 1992). Bu nedenle kalloz çeperin mutant bitki gelişiminin hangi aşamasına kadar devam ettiği saptanmıştır. Büyüklüğü 0,197-0,225 mm boyutundaki anterlerden alınan örnekler aynı boyuttaki yabani tip ile karşılaştırıldığında kalloz çeperde bir farklılık görülmemiştir. Dong ve ark. (2005), *Cals5* (*Gls2*) geni ile yaptıkları çalışmalarında bu genin mikrosporların geçici olan kalloz duvarında, kallozun sentezinden sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu durum bizim çalışmamız ile benzerlikler göstermektedir.



#### **4.9.2. Melezlenen Bitkilerin Sitolojik Olarak İncelenmesi**

PCR ile heterozigot çift mutant olduğu belirlenen bitkilerde polen ana hücresi gelişimi 0,2–0,4 mm boyutlarında fikse edilmiş anterlerde karmin ile boyama ardından mikroskop altında incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda kallaz enzim kompleksinin salgılanma sürecinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.27). Kallaz dokunun mutant hatlarda olduğu gibi melezlenen bitkilerde de aynı boyutlarda görüldüğü belirlenmiştir.



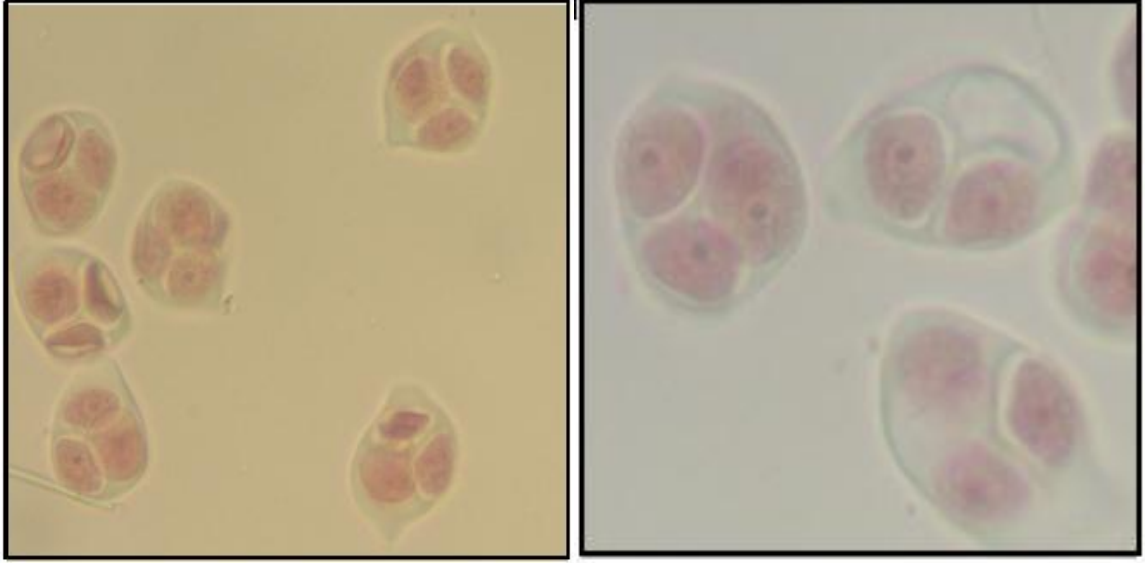
**4.27.** Melez bitkiye ait kallaz çeper ile çevrili tetrad yapısı.

#### **4.9.3. Çift Mutant Homozigot Bitkilerin Sitolojik Olarak İncelenmesi**

PCR ile çift mutant homozigot olduğu belirlenen bitkilerde polen ana hücresi gelişimi 0,2-0,4 mm boyutlarında fikse edilmiş anterlerde karmin ile boyama ardından mikroskop altında incelenmiştir. Bu bitkilerdeki kallaz dokunun yabancı tip bitkiler de olduğu gibi anterin 0,197-0,225 mm olduğu aşamada tetradları çevrelediği görülmüştür (Şekil 4.28). 0,2 mm'den büyük anterlerde ise kallaz duvarın degrede olduğu ve polenlerin anter lokülüne salındığı görülmüştür.

Çift mutant bitkilerde görülen bu durum kallaz enziminin işlevinde herhangi bir geçikme oluşmadığını kallaz dokuyu anterin 0,225 mm lik boyutundan sonra degrede

ettiğini göstermiştir. Wan ve ark. (2010), çeltikte (*Oryza sativa*) ile yaptıkları çalışmada OSG1 geni RNAi ile mutant hale getirilmiştir. OSG1 mutantlarında ise anterlerde kalloz duvarın degrede olmadığı bildirilmiştir. Sonuç olarak genç mikrosporların anter lokülüne salınmalarının gecikmesi sonrasında mikrosporların bozulmalar gösterdiği ve bitkide erkek kısırlık oluştuğu belirtilmiştir (Wan ve ark., 2010).



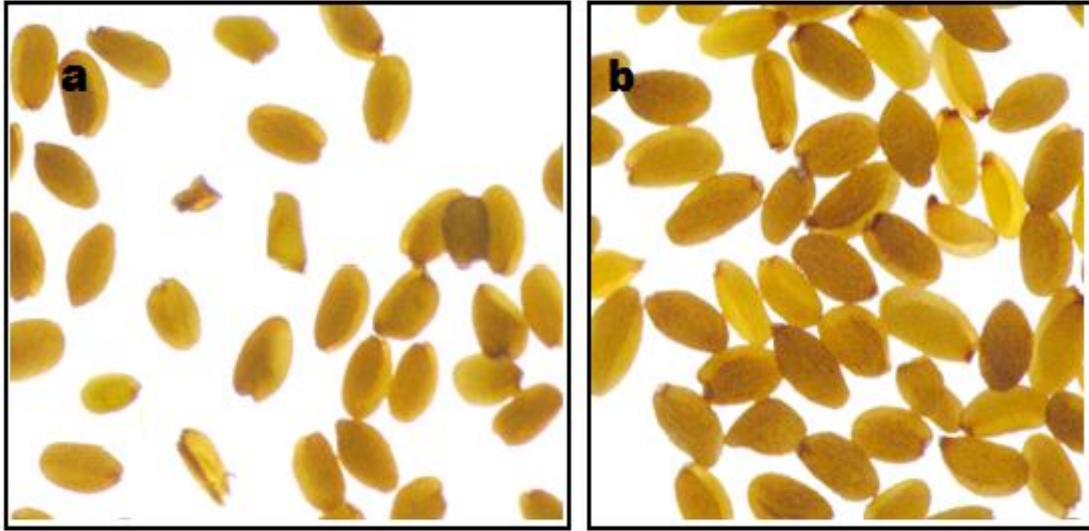
**Şekil 4.28.** Çift mutant homozigot bitkilere ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapısı.

Bu çalışmada kalloz doku erken ya da geç parçalanmamıştır. Yapılan mikroskopik ölçümlerle bu durum gösterilmiştir. Waterkeyn, (1962) çalışmasında kallozun geçici bir duvar görevi üstlenerek mayoz ürünlerini izole ederek hücrelerin birbirlerine yapışmasını ve birleşmesini önlerken aynı zamanda parçalanarak bu hücrelerin serbest kalmasını sağladığı için önemli bir biyolojik rol üstlendiğini bildirmiştir. Izhar ve Frankel, (1971) erkek kısır petunya hatlarında kalloz çeperin yanlış zamanda parçalanmasının erkek kısırlığın ana nedeni olduğunu göstermiştir. Daha sonraları Worrall ve ark. (1992), transgenik tütünde erkek kısırlığa erken kalloz parçalanmasının neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada mutant bitkilerdeki kalloz dokunun zamanında parçalanmasıyla verimli polenler oluştuğu belirlenmiştir.

#### 4.10. Çift Mutant Bitkilerde Tohum Oluşumu

*Arabidopsis thaliana* bitkisi yaşam döngüsünde çok sayıda tohum meydana getirmektedir. Tek bir dölleme sonucu bir bakla içerisinde yaklaşık 50 tohum oluşturmaktadır. Çift mutant homozigot bitkilerin oluşturmuş olduğu 20 adet bakla içeriği (635 tohum) sayılmıştır. Yabanıl tip bitkilere göre daha az sayıda ortalama 32 tohum olduğu görülmüştür. Buradan oluşan olgun polen sayısında azalma olduğunu daha az sayıda ovule ulaşıldığını anlamaktayız. Ayrıca bu bitkilerin bakla boyutlarında normalden kısa olduğu gözlemlenmiştir. Az sayıda ovül taşıyan baklalar da normal ovül sayısına sahip baklalara oranla daha küçük boyutlarda oluşmuştur.

Mikroskop altında incelenen mutant ve yabanıl tip bitkilere ait tohumlar karşılaştırılmıştır. Mutant bitki tohumları arasında yabanıl tip bitkilere göre daha fazla buruşuk ve cansız tohuma rastlanmıştır (Şekil 4.29).



**Şekil 4.29.** *Arabidopsis thaliana* bitki tohumları a) Mutant bitkilerden alınan tohumlar; b) Yabanıl tip bitki tohumu.

Bu çalışma da mutant bitkilerden elde edilen baklaların yabanıl tip bitkilere göre daha kısa olduğu görülmüştür. Dong ve ark. (2005) *Arabidopsis thaliana* bitkisinde CalS5 mutantları ile yaptıkları çalışmada, mutant bitkilerde körelmiş anterlere sahip anormal çiçekler geliştiği ve kısmi ya da tamamiyle kısır oldukları belirtilmiştir. Bakla yapıları homozigot *cal5* mutantlarında çok kısadır ve yabanıl-tip bitkilerle karşılaştırıldığı zaman birkaç tane ya da hiç tohum içermedikleri görülmüştür. Bu durum bizim çalışmamızla kısmen uyumludur. Mutant bitkilerin bakla boyutlarında yabanıl bitkilere oranla bir kısalık

görülmüştür ancak tohum sayısında azalma olsa da yine de çok sayıda üretken tohum elde edilmiş ve bitkinin verimli olduğu anlaşılmıştır.

**BÖLÜM 5****SONUÇLAR ve ÖNERİLER**

Bu çalışmada *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkisinde  $\beta$ -1,3 glukanaz (kallaz) kodlayan *AT3G23770* ve *AT4G14080* genlerinin anterlerdeki fonksiyonları T-DNA mutantları aracılığı ile incelenmiştir.

Mutant hatlara ait tohumlar laboratuvar ortamında yetiştirilmiş ve bitkilerin çiçeklenmesi beklenmiştir. Daha sonra bu bitkilerin genotipleri PCR1 ve PCR2 ile belirlenmiştir. Aralarında HM olan bireylerin çiçeklenmesi sağlanmış ve bu bitkilerde anter gelişimi hem sitolojik olarak hem de fenotipik olarak incelenmiştir. Fenotip olarak mutant bireylerde polen oluşumu ve baklaların uzamasına bakılmıştır. *AT3G23770* geni için yetiştirilen N859965 stok numaralı HM mutant bitkiler 4. haftadan itibaren çiçeklenerek polen oluşumunu sağlamışlardır. *AT4G14080* geni için yetiştirilen heterozigot mutant bitkilerde yine 4 hafta içinde çiçeklenmiş ve olgun polenler üretmişlerdir. Aynı ayrı yetiştirilen her iki bitkide normal boyutlarda baklalar oluşturmuştur. Baklalarda oluşan tohumlar sayılmıştır ve ortalama 47 tohum oluşmuştur. Bu değerler yabanıl tip bitkiler ile karşılaştırıldığında beklenen değerler de olduğu görülmüştür. Mutant hatların öncelikle genotipleri PCR kullanılarak belirlenmiştir. *AT3G23770* mutant tohumlarından yetiştirilen bitkilerin homozigot olduğu ve bu genin 1068 baz çifti uzunluğunda ürün oluşturduğu gösterilmiştir. *AT4G14080* mutantında ise heterozigot bireyler elde edilmiş ve bu genin 1240 bç uzunluğuna sahip ürün oluşturduğu görülmüştür.

Homozigot ve heterozigot bitkiler (T-DNA taşıyan) melezlenmiş ve bunlar arasından PCR kullanılarak her iki gen açısından da  $\frac{1}{2}$  oranında çift mutant heterozigot (AaBb) olan bitkiler ayrılmıştır.  $\frac{1}{2}$  oranında ise AABb genotipli bitkiler oluşmuştur ancak bu bitkiler tek bir gen açısından heterozigot mutantlık taşımaktadır. Bu nedenle çalışmadan elenmiştir. Heterozigot mutant (AaBb) bitkiler kendilenmeye bırakılarak bunlardan tohum eldesi sağlanmıştır. Büyüyen F2 bitkileri arasından PCR yöntemi ile çift mutant homozigot (aabb) bitkiler seçilmiştir. Seçim yapılırken her bitkiye dört PCR uygulanmıştır. Bunlardan ikisi gene özgü primerler kullanılarak yapılmış, diğer iki PCR ise T-DNA dizilerini saptama amacıyla yapılmıştır. Gene özgü PCR, N859965-PCR2 ve CS850174-PCR2 olarak isimlendirilmiştir ve homozigot mutant bitkileri olduğu için ürün oluşmamıştır. T-DNA dizileri için ise kurulan PCR, N859965-PCR1 ve CS850174-PCR1 olarak isimlendirilmiş ve sırası ile T-DNA içeren 700 ve 600 bç ürün oluşmuştur. Sonuç olarak

bu genotipi sağlayan 4 bitki elde edilmiştir. Bu bitkilerin anter dokularından elde edilen cDNA'lar ile RT-PCR yöntemi ile ifadeleri araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan anter RNA örnekleri kallaz enzim kompleksinin aktif olduğu tetrat aşamasındaki anterlerden izole edilmiştir. *AT3G23770* ve *AT4G14080* genleri için kullanılan primerler ile bu genlerin ifade olma durumlarında 609 bç ve 767 bç büyüklüğünde bir ürün oluşması beklenmektedir. Ancak RT-PCR sonuçlarına göre her iki mutant gende ifade olmamıştır. Bu sonuçlar yapılan çift mutant homozigot melezlemenin başarılı olduğunu göstermiştir.

Elde edilen double mutant homozigot bitkilerde de anter gelişimi fenotipik olarak incelenmiştir. Baklaların normalden daha kısa olduğu görülmüştür. Baklalarda oluşan tohum sayılarında incelenen 20 bitkide ortalama 32 tane olduğu ve bu değerlerinde yabancı bitkilere göre % 30 daha az üretildiği görülmüştür. Anterlerde yapılan sitolojik araştırmalar da ise çift mutant homozigot *A.thaliana* bitkilerinde benzer boyutlardaki yabancı tip bitkilerde olduğu gibi kallos dokunun degradasyonunun aynı zamanlarda olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak kallaz enziminin salınımı gerçekleşmiş ve kallos doku normal süresi içinde parçalanarak mikrosporlar anter lokülüne salınmıştır. Bu bitkilerde dölleme gerçekleşmiş ve erkek kısırlık görülmemiştir. Ancak normalden az sayıda tohum üretildiği için fertilitede bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum çalıştığımız genlerin polen gelişiminde ve dölleme esnasında rol alarak tohum oluşumunu etkilemiş olabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlardan kallazın oluşumunda, yalnızca bu iki genin değil aynı zamanda başka mekanizmalarında yer aldığı anlaşılmıştır.

Homozigot mutant hale getirilen bitkiler sitolojik olarak incelenmiştir. *AT3G23770* ve *AT4G14080* genlerinin eksikliğinde, kallos dokudaki değişimler saptanarak bu genlerin kallaz enzimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

$\beta$ -1,3-glukanazların rolü çiçekli bitkilerde tamamiyle açıklanamamış (Delp ve Palva, 1999) yalnızca çeşitli fonksiyonları aydınlatılmıştır. Polen gelişiminde mikrosporların olgun polen olarak anter lokülüne salındığı, tetradların etrafındaki ince kallos duvarın parçalandığı bilinmektedir. *Arabidopsis* bitkisinde bu fonksiyon  $\beta$ -1,3- Glukanazlar karakterize edilen *AT3G23770* ve *AT4G14080* genlerin anter spesifik olmasına bağlanmıştır (Hird ve ark., 1993). *AT3G23770* geninin MS2 geni ile beraber tetradların salınımı sırasında ifade olduğu saptanmıştır (Doxey ve ark., 2007).

Çift mutant bitkilere ait baklalarda yabancı tip bitkilere kıyasla daha kısa olup az sayıda tohum oluşturduğu görülmüştür. Bitki de endospermilerin gelişiminde bir aksama olmadığı oluşan tohumların tek tip olduğu görülmüştür. Tohum sayısında ki azalma ise

endospermilerin tamamının döllenenmemesinden kaynaklanmıştır. Bu durum genlerin polen gelişimi ve döllenenme esnasında etkili olabileceğini göstermiştir.

Bu sonuçlara göre  $\beta$ -1,3 glukanazın (kallaz) yalnızca *AT3G23770* ve *AT4G14080* ile kontrol edilmediği yanı sıra başka genler ve mekanizmalarında bu yapıya katıldığı anlaşılmıştır. İleride bu genlerin yanı sıra anterde ifade olgu bilinen diğer genlerin mutantlarının yer aldığı çalışmalarla kallaz enziminin oluşumu hakkında daha aydınlatıcı bilgiler elde edilebilecektir.

## KAYNAKLAR

- Ariizumi T., Hatakeyama K., Hinata K., Sato S., Kato T., Tabata S. ve Toriyama K., 2003. A Novel Male-Sterile Mutant of *Arabidopsis thaliana*, Faceless Pollen-1, Produces Pollen with A Smooth Surface and An Acetolysis-Sensitive Exine. *Plant Mol. Biol.*, 53 (1-2): 107-116.
- Aarts M., Hodge R., Kalantidis K., Florack D., Wilson Z., Mulligan B., Stiekema W., Scott R. ve Pereira A., 1997. The Arabidopsis MALE STERILITY 2 Protein Shares Similarity with Reductases in Elongation/Condensation Complexes. *The Plant Journal.*, 12 (3): 615-623.
- Barral P., Suarez C., Batanero E., Alfonso C., Alche Jde D., Rodriguez-Garcia M.I., Villalba M., Rivas G. ve Rodriguez R., 2005. An Olive Pollen Protein with Allergenic Activity, Ole e 10, Defines A Novel Family of Carbohydrate-Binding Modules and is Potentially Implicated in Pollen Germination. *Biochem J.*, 390: 77-84.
- Bachman E.S. ve McClay D.R., 1996. Molecular Cloning of The First Metazoan Beta-1,3 Gucanase from Eggs of The Sea Urchin *Strongylocentrotus Purpuratus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 6808–6813.
- Beerhues L. ve Kombrink E., 1994. Primary Structure and Expression of mRNAs Encoding Basic Chitinase and 1,3- $\beta$ - Glucanase in Potato. *Plant Mol. Biol.*, 24: 353- 367.
- Budar F., Pelletier G., 2001. Male sterility in plants: Occurrence, Determinism, Significance and Use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences G Series III G Sciences de la Vie*, 324 (6): 543-550.
- Bowman J.L., Smyth D.R. ve Meyerowitz E.M., 1991. Genetic Interactions Among Floral Homeotic Genes of *Arabidopsis*. *Development*, 112: 1–20



- Bucciaglia P.A. ve Smith A.G., 1994. Cloning and Characterization of Tag 1, a Tobacco Anther  $\beta$ -1,3- Glucanase Expressed at Tetrad Dissolution. *Plant Mol. Biol.*, 24: 903- 914
- Buchner P., Rochat C., Wulleme S. ve Boutin J.P., 2002. Characterization of a Tissue-Specific and Developmentally Regulated  $\beta$ -1,3-Glucanase Gene in Pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol. Biol.*, 49: 171- 186.
- Canales C., Bhatt A.M., Scott R. ve Dickinson H., 2002. EXS, A Putative LRR Receptor Kinase, Regulates Male Germline Cell Number and Tapetal Identity and Promotes Seed Development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 12 (20): 1718-1727.
- Davis K.R., 1992. *Arabidopsis thaliana* as A Model Host for Studying Plant-Pathogen Interactions. In: Molecular Signals in Plant-Microbe Communication. Eds. DPS Verma. CRC Pres, Boca Raton. 393-406.
- Dangl J.L. 1993. The Emergence of *Arabidopsis thaliana* As A Model for Plant-Pathogen Interactions. *Adv. Plant Pathol.*, 10: 127-156.
- Davis K., ve Hammerschmidt R., 1993. *Arabidopsis thaliana* as A Model for Plant Pathogen Interactions. *American Phytopathological Society Pres*, St Paul, MN. USA
- Demirgan Y., 2009. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Kallaz Komponenti  $\beta$ -1,3-Glucanase'ın Tanımlanması. Y.lisans Tezi. ÇÖMÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD.
- Drews G.N., Lee D. ve Christensen C. A., 1998. Genetic Analysis of Female Gametophyte Development and Function. *Plant Cell*, 10 (1): 5-18.
- Drews G.N. ve Yadegari R., 2002. Development and Function of the Angiosperm Female Gametophyte. *Annual Review of Genetics*, 36: 99–124

- Dong X., Hong Z., Sivaramakrishnan M., Mahfouz M. ve Verma D.P., 2005. Callose Synthase (CalS5) is Required for Exine Formation During Microgametogenesis and for Pollen Viability in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42: 315–328.
- Domínguez E., Mercado J.A., Quesada M.A. ve Heredia A., 1999. Pollen Sporopollenin: Degradation and Structural Elucidation. *Sexual Plant Reprod.*, 12 (3): 171-178.
- Domingo C., Conejero V. ve Vera P., 1994. Genes Encoding Asidic and Basis Class III  $\beta$ -1,3-Glucanases are Expressed in Tomato Plants upon Viroid Infection. *Plant Mol. Biol.*, 24: 725- 732.
- Fulcher R., McCully M., Setterfield G. ve Sutherland J., 1976.  $\beta$ -1,3- Glucans may be Associated with Cell-Plate Formation during Cytokinesis. *Can J. Bot.*, 54: 539-542.
- Fei H. ve Sawhney V.K., 1999. MS32-Regulated Timing of Callose Degradation during Microsporogenesis in *Arabidopsis* is Associated with the Accumulation of Stacked Rough ER in Tapetal Cells. *Sex Plant Reprod.*, 12: 188–193.
- Frankel R., Izhar S. ve Nitsan J., 1969. Timing of Callase Activity and Cytoplasmic Male Sterility in Petunia. *Biochem. Genet.*, 3: 451- 455.
- Fink J., Jeblick, W., Blaschek W. ve Kauss H., 1987. Calcium Ions and Polyamines Activate the Plasma Membrane-Located  $\beta$ -1,3-Glucan Synthase. *Planta*, 171: 131-135.
- Gregory A., Smith C., Kerry M., Wheatley E. ve Bolwell G., 2002. Comparative Subcellular Immunolocation of Polypeptides Associated with Xylan and Callose Synthases in French Bean (*Phaseolus vulgaris*) during Secondary Wall Formation. *Phytochem*, 59: 249-259.
- Griffith M. ve Yaish M.W., 2004. Antifreeze Proteins in Overwintering Plants: A Tale of Two Activities. *Trends Plant Sci.*, 9: 399–405.

- Hinton D.M. ve Pressey R., 1980. Glucanase in Fruits and Vegetables. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105: 499- 502.
- Hird D.L., Worrall D., Hodge R., Smartt S., Paul W. ve Scott R., 1993. The Anther-Specific Protein Encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 Gene Displays Similarity to Beta-1,3-Glucanases. *Plant J.*, 4: 1023–1033.
- Hu L., Liang W., Yin C., Cui X., Zong J., Wang X., Hu J., ve Zhang D., 2011. Rice MADS3 Regulates ROS Homeostasis during Late Anther Development. *American Society of Plant Biologists*, 4: 1- 19
- Izhar S. ve Frankel R., 1971. Mechanism of Male Sterility in Petunia: The Relationship between pH, Callase Activity in The Anthers, and The Breakdown of The Microsporogenesis. *Theor. Appl. Genet.*, 41: 104- 108
- Jin W., Horner H.T., Palmer R.G. ve Shoemaker, R.C., 1999. Analysis and Mapping of Gene Families Encoding Beta-1,3-Glucanases of Soybean. *Genetics.*, 153: 445–452.
- Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J., Maas C., 1995. Enhanced Quantitative Resistance against Fungal Disease by Combinatorial Expression of Different Barley Antifungal Proteins in Transgenic Tobacco. *Plant J.*, 8: 97–109.
- Leubner-Metzger G., Meins F. Jr., 1999. Functions and Regulation of Plant Beta-1,3 Glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S, editors. Pathogenesis-related proteins in plants. *Boca Raton (FL): CRC Press LLC*. p. 49–76
- Longly B. ve Waterkeyn L., 1977. Les Stades Callosiques de la Plaque Cellulaire Somatique. *Cellule*, 72: 195–224.
- Leubner-Metzger G., 2003. Functions and Regulation of Beta-1,3- Glucanases during Seed Germination, Dormancy Release and After-Ripening. *Seed Sci. Res.*, 13: 17-34.

- Leutwiler L.S., Hough-Evans B.R., Mayerowitz E.M., 1984. *Mol. Gen. Genet.*, 194: 15-23.
- Luo H., Lee J.Y., Hu Q., Nelson-Vasilchik K., Eitas K.T., P. Kausch A., Lickwar C., Chandlee J.M. ve Hodges T.K., 2006. RTS, A Rice Anther-Specific Gene is Required for Male Fertility and its Promoter Sequence Directs Tissue-Specific Gene Expression in Different Plant Species. *Plant Mol. Biol.*, 62: 397-408.
- Mansfield S.G., Briarty L.G., ve Erni S., 1990. Early Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*: The Mature Embryo Sac. *Can. J. Bot.*, 69: 447-460.
- McCormick S., 2004. Control of Male Gametophyte Development. *Plant Cell*, 16: 142–153.
- C O'Malley R., Alonso M.J., Kim C.J., Leisse T.J. ve Ecker J.R., 2007. An Adapter Ligation-Mediated PCR Method for High-Throughput Mapping of T-DNA Inserts in the *Arabidopsis* Genome. *Nature*, 2: 2910-2911.
- Mackenzie S., 2004. The Influence of Mitochondrial Genetics in Crop Breeding Strategies. *Plant Breeding.*, 25: 115–138.
- Morohashi Y. ve Matsushima H., 2000. Development of  $\beta$ -1,3-Glucanase Activity in Germinated Tomato Seeds. *J. Exp. Bot.*, 51: 1381- 1387.
- Nishikawa S.İ., Zinkl G.M., Swanson R.J., Maruyama D. ve Preuss D., 2005. Callose ( $\beta$ -1,3-Glucan) is Essential for Arabidopsis Pollen Wall Patterning, but not Tube Growth. *BMC Plant Biology.*, 5 (22): 10.1186/1471-2229.
- Østergaard L., Petersen M., Mattsson O., ve Mundy J., 2002. An Arabidopsis Callose Synthase. *Plant Mol. Biol.*, 49: 559–566.
- Oh H.Y. ve Yang M.S., 1995. Nucleotid Sequence of Genomic DNA Encoding the Potato  $\beta$ -1,3-Glucanase. *Plant Physiol.*, 107: 0032- 0889.

- Ori N., Sessa G., Lotan T., Himmelhoch S. ve Fluhr R., 1990. A Major Styler Matrix Polypeptide (Sp41) is a Member of the Pathogenesis- Related Proteins Superclass. *EMBO J.*, 9: 3429- 3436.
- Paxson-Sowders D.M., Dodrill C.H., Owen H.A. ve Makaroff C.A., 2001. DEX1, A Novel Plant Protein, is Required for Exine Pattern Formation during Pollen Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127 (4): 1739-1749.
- Payne G., Ward E., Gaffney T., Goy P.A., Moyer M., Harper A., Meins F. Jr. ve Ryals J., 1990. Evidence for A Third Structural Class of  $\beta$ -1,3-Glucanase in Tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 15: 797- 808.
- Regan S.M. ve Moffatt B.A., 1990. Cytochemical Analysis of Polen Development in Wild-Type *Arabidopsis* and A Male-Sterile Mutant. *Plant Cell*, 2: 877–889.
- Rhee S.Y. ve Somerville C.R., 1998. Tetrad Pollen Formation in Quartet Mutants of *Arabidopsis thaliana* is Associated with Persistence of Pectic Polysaccharides of the Polen Mother Cell Wall. *Plant J.*, 15: 79-88.
- Reiser L. ve Fischer R.L., 1993. The Ovule and the Embryo Sac. *Plant Cell*, 5: 1291-1301.
- Roggen H.P. ve Stanley R.G., 1969. Cell-Wall-Hydrolyzing Enzymes in Wall Formation as Measured by Pollen- Tube Extension. *Planta.*, 84: 295-303.
- Sela-Buurlage M.B., Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Melchers L.S., Van Den Elzen P., ve Cornelissen, B., 1993. Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and [beta]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiol.*, 101: 857–863.
- Skinner D.J., Hill T.A. ve Gasser C.S., 2004. Regulation of Ovule Development. *The Plant Cell*, 16: 32–45.

- Schneitz K., Balasubramanian S. ve Schiefthaler U., 1998. Organogenesis in Plants: The Molecular and Genetic Control of Ovule Development. *Trends in Plant Science*, 3: 468-472.
- Samuels A.L., Giddings T.H. Jr. ve Staehelin L.A., 1995. Cytokinesis in Tobacco BY-2 and Root Tip Cells: A New Model of Cell Plate Formation in Higher Plants. *J. Cell Biol.*, 130: 1345-1357.
- Schneitz K., 1999. The Molecular and Genetic Control of Ovule Development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 13-17.
- Stieglitz H., 1977. Role of  $\beta$ -1,3-Glucanase in Post-Meiotic Microspore Release. *Dev. Biol.*, 57: 87-97.
- Steiglitz H., ve Stern H., 1973. Regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase Activity in Developing Anthers of Liliium. *Dev. Biol.*, 34: 169-173.
- Sanders P.M., Bui A.Q., Weterings K., McIntire K.N., Hsu Y.C., Lee P.Y., Truong M.T., Beals T.P. ve Goldberg R.B., 1999. Anther Developmental Defects in *Arabidopsis thaliana* Male- Sterile Mutants. *Sex Plant Reprod.*, 11: 297- 322.
- Smyth D.R., Bowman J.L. ve Meyerowitz E.M., 1990. Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2: 755-767.
- Sun L., Gurnon J.R., Adams B.J., Graves M.V., Van Etten L.J., 2000. Characterization of a Beta- 1,3-Glucanase Encoded by Chlorella Virus PBCV-1. *Virology*, 276: 27-36.
- Stone B.A. ve Clarke A.E., 1992. Chemistry and Physiology of Higher Plant 1, 3-b-Glucans (callose). In *Chemistry and Biology of (1, 3)- $\beta$ -Glucans*. Bundoora, Australia: *La Trobe University Press*, p. 365-429.
- Scott J.R., Spielman M., ve Dickinson H.G., 2004. Stamen Structure and Function. *Plant Cell*, 16: 46-60.

- Tucker M.R., Paech N.A., Willemse M.T. ve Koltunow A.M., 2001. Dynamics of Callose Deposition and  $\beta$ -1,3-Glucanase Expression during Reproductive Events in Sexual and Apomictic. *Hieracium. Planta*, 212, 487–498.
- Van Kan J.A.L., Joosten M.H.A.J. ve Wagemakers C.A.M., 1992. Differential Accumulation of mRNAs Encoding Extracellular and Intracellular PR Proteins in Tomato Induced by Virulent and AVirulent Races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol. Biol.*, 20: 513- 527.
- Verma D.P.S. ve Hong Z., 2001. Plant Callose Synthase Complexes. *Plant Mol. Biol.*, 47: 693-701.
- Ward E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F.Jr. ve Ryals J.A., 1991. Differential Regulation of  $\beta$ -1,3- Glucanase Messenger RNAs in Response to Pathogen Infection. *Plant Physiol.*, 96: 390- 397.
- Warmke H.E. ve Overman M.A., 1972. Cytoplasmic Male Sterility in Sorghum. 1. Callose Behaviour in Fertile and Sterile Anthers. *J. Hered.*, 63: 103- 108.
- Waterkeyn L., 1962. Les Parois Microsporocytaires de Nature Callosique Chez Helleborus et Tradescantia. *Cellule*, 62: 225- 255.
- Wilson Z.A. ve Yang C., 2004. Plant Gametogenesis: Conservation and Contrasts in Development. *Reproduction*, 128: 483- 492.
- Willemse M.T.M., ve Van Went J.L. 1984. The Female Gameto- Phyte. In: Johri B.M., *Embryology of Angiosperms.*, New York, Springer-Verlag, p. 159-196.
- Worrall D., Hird D.L., Hodge R., Paul W., Draper J. ve Scott R., 1992. Premature Dissolution of the Microsporocyte Callose Wall Causes Male Sterility in Transgenic Tobacco. *Plant Cell*, 4: 759–771.

- Yadegari R. ve Drews G.N., 2004. Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*, 16: 133–141.
- Yaish M.W.F., Doxey A.C., McConkey B.J., Moffatt B.A. ve Griffith M., 2006. Cold Active Winter Rye Glucanases with Ice-Binding Capacity. *Plant Physiol.*, 141: 1459–1472
- Yang W.C. ve Sundaresan V., 2000. Genetics of Gametophyte Biogenesis in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 53–57.
- Yang C., Barrena G.V., Conner K. ve Wilson Z.A., 2007. MALE STERILITY1 Is Required for Tapetal Development and Pollen Wall Biosynthesis. *The Plant Cell*, 19: 3530–3548.
- Yang S. L., Xie L. F., Mao H. Z., Puah C. S., Yang W. C., Jiang L., Sundaresan V. ve Ye D., 2003. Tapetum Determinant1 is Required for Cell Specialization in The Arabidopsis Anther. *Plant Cell*, 15 (12): 2792-2804.
- Zhang Z.B., Zhu J., Gao J.F., Wang C., Li H., Li H., Zhang H.Q., Zhang S., Wang D.M., Wang Q.X., Huang H., Xia H.J. ve Yang Z.N., 2007. Transcription factor AtMYB103 is Required for Anther Development by Regulating Tapetum Development, Callose Dissolution and Exine Formation in Arabidopsis. *The Plant Journal.*, 52: 528–538
- Zhao D.Z., Wang G.F., Speal B., ve Ma H., 2002. The EXCESS MICROSPOROCTES1 Gene Encodes A Putative and Reproductive Cell Fates in the Arabidopsis Anther Leucine-Rich Repeat Receptor Protein Kinase That Controls Somatic. *Genes Dev.*, 16: 2021-2031



## EKLER

### Ek 1. AT4G14080 Geni Web Sayfaları

#### Ek 1.1 AT4G14080 Gen Bilgisi ve Mutant Hatları

**Locus: AT4G14080**

Date last modified: 2012-01-17

TAIR Accession: Locus:2129378

Representative Gene Model: [AT4G14080.1](#)

Gene Model Type: protein\_coding

Other names: DL3080C, FCAALL.82, MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 48, MEE48

**Description** maternal effect embryo arrest 48 (MEE48); FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, catalytic activity; INVOLVED IN: pollen exine formation, embryo development ending in seed dormancy; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: leaf whorl, sepal, flower, seed; EXPRESSED DURING: petal differentiation and expansion stage, E expanded cotyledon stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: X8 (InterPro:IPR012948), Glycoside hydrolase, catalytic core (InterPro:IPR017853), Glycoside hydrolase, family 17 (InterPro:IPR000490), Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core (InterPro:IPR013781); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: O-Glycosyl hydrolases family 17 protein (TAIR:AT3G23770.1); Has 2783 Blast hits to 2708 proteins in 127 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 3; Fungi - 0; Plants - 2773; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 7 (source: NCBI BLink).

**Map Detail Image**



**Annotations**

| category                        | relationship type | keyword   |
|---------------------------------|-------------------|---|
| GO Biological Process           | involved in       | embryo development ending in seed dormancy, metabolic process, pollen exine formation |
| GO Cellular Component           | located in        | endomembrane system   |
| GO Molecular Function           | functions in      | cation binding  |
| GO Molecular Function           | has               | catalytic activity, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds              |
| Growth and Developmental Stages | expressed during  | E expanded cotyledon stage, petal differentiation and expansion stage                 |
| Plant structure                 | expressed in      | collective leaf structure, flower, seed, sepal  |

[Annotation Detail](#)


| RNA Data               |                                    |                                    |                             |                                     |   |         |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---|---------|
| Two-channel Arrays     | array element name                 | avg. log ratio (std. error)        | avg. intensity (std. error) | expression viewer                   | spot history (SMD)  |         |
|                        | GBGA404                            | (0.029)                            | 7624.018 (306.17)           | Viewer                              | 190126  |         |
| One-channel Arrays     | array element name                 | avg. signal intensity (std. error) |                             | avg. signal percentile (std. error) |   |         |
|                        | 12667_S_AT                         | 5.008 (2.84)                       |                             | 15.035 (1.124)                      |   |         |
|                        | 245622_AT                          | 23.248 (5.614)                     |                             | 6.998 (0.393)                       |   |         |
| Associated Transcripts | type                               | number associated                  |                             |                                     |   |         |
|                        | EST                                | ( 11 )                             |                             |                                     |   |         |
|                        | cDNA                               | ( 2 )                              |                             |                                     |   |         |
| Chromosome             | 4                                  |                                    |                             |                                     |   |         |
| Nucleotide Sequence    | full length CDS                    | full length genomic                | full length cDNA            |                                     |   |         |
|                        | Protein Data                       |                                    |                             |                                     |   |         |
|                        | name                               | length (aa)                        | molecular weight            | isoelectric point                   | domains( # of domains)  |         |
|                        | AT4G14080.1                        | 478                                | 53471.5                     | 8.6611                              | Glycoside hydrolase, family 17:IPR000490(2)<br>Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core:IPR013781(1)<br>Glycoside hydrolase, superfamily:IPR017853(1)<br>X8:IPR012946(2) |         |
| Map Locations          | chrom                              | map                                | map type                    | coordinates                         | orientation   | attrib  |
|                        | 4                                  | AGI                                | nuc_sequence                | 8118537 - 8120358 bp                | reverse   | details |
|                        | 4                                  | FCAALL                             | assembly_unit               | 76429 - 78250 bp                    | reverse   |         |
| Map Links              | Map Viewer                         | Sequence Viewer                    | GBrowse                     |                                     |   |         |
| Polymorphism           | name                               | type                               | polymorphism site           | allele type                         |   |         |
|                        | Showing 15 of 62 entries (see all) | FLAG_382D04                        | insertion                   | promoter                            | unknown   |         |
|                        | GK-808H01-021122                   | insertion                          | exon                        | unknown                             |   |         |
|                        | GK-808H01-021192                   | insertion                          | exon                        | unknown                             |   |         |
|                        | GK-808H01-021194                   | insertion                          | exon                        | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_1161680                   | insertion                          | promoter                    | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_1161681                   | insertion                          | promoter                    | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_1161682                   | insertion                          | promoter                    | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_1161684                   | insertion                          | promoter                    | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753057                    | substitution                       | 5'UTR                       | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753059                    | substitution                       | 5'UTR                       | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753065                    | substitution                       | coding_region               | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753076                    | substitution                       | coding_region               | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753077                    | substitution                       | coding_region               | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753078                    | substitution                       | coding_region               | unknown                             |   |         |
|                        | ossowski_753079                    | substitution                       | coding_region               | unknown                             |   |         |

| Germplasm              | name                | polymorphisms                    | background   | stock name               | select                   |
|------------------------|---------------------|----------------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| Showing 7 of 7 entries | SAIL_744_E01        | SAIL_744_E01.v1; SAIL_744_E01.v2 |              | CS833298                 | <input type="checkbox"/> |
|                        | <b>images</b>       |                                  |              |                          |                          |
|                        | None available      |                                  |              |                          |                          |
|                        | <b>phenotypes</b>   |                                  |              |                          |                          |
|                        | None available      |                                  |              |                          |                          |
|                        | SALK_022440         | SALK_022440.17.70.x              |              | SALK_022440              | not available            |
|                        | <b>images</b>       |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| <b>phenotypes</b>      |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| SAIL_1167_A10          | SAIL_1167_A10.v1    |                                  | CS843110     | <input type="checkbox"/> |                          |
| <b>images</b>          |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| <b>phenotypes</b>      |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| SAIL_209_D03           | SAIL_209_D03.v1     |                                  | CS809772     | <input type="checkbox"/> |                          |
| <b>images</b>          |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| <b>phenotypes</b>      |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| WiscDsLox285F04        | WiscDsLox285F04     |                                  | CS850174     | not available            |                          |
| <b>images</b>          |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| <b>phenotypes</b>      |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| SALK_022440C           | SALK_022440.17.70.x |                                  | SALK_022440C | <input type="checkbox"/> |                          |
| <b>images</b>          |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| <b>phenotypes</b>      |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| CS458165               | GK-606H01-021122    |                                  | CS458165     | <input type="checkbox"/> |                          |
| <b>images</b>          |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |
| <b>phenotypes</b>      |                     |                                  |              |                          |                          |
| None available         |                     |                                  |              |                          |                          |

Order from ABRC

Reset

## Ek 1.1 CS850174 Stok Nolu Mutant Hattına Ait Web Sayfaları



Gene
▼
Search

[Home](#)
[Help](#)
[Contact](#)
[About Us](#)
[Login/Register](#)

Search
Browse
Tools
Portals
Download
Submit
News
ABRC Stocks

### Polymorphism: WiscDsLox285F04

**Name** [?](#) WiscDsLox285F04

**Date last modified** [?](#) 2010-11-19

**Tair Accession** Polymorphism:1008511326

**Type** [?](#) insertion **Insertion Type** [?](#) T-DNA

**Chromosome** [?](#) 4

| Associated Genes | Gene Model                  | Locus                     | Polymorphism site | Association Type |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
|                  | <a href="#">AT4G14080.1</a> | <a href="#">AT4G14080</a> | exon              | is an allele of  |

**Description** [?](#) maternal effect embryo arrest 48 (MEE48); FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, catalytic activity; INVOLVED IN: pollen exine formation, embryo development ending in seed dormancy; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: leaf whorl, sepal, flower, seed; EXPRESSED DURING: petal differentiation and expansion stage, E expanded cotyledon stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: X8 (InterPro:IPR012946), Glycoside hydrolase, catalytic core (InterPro:IPR017853), Glycoside hydrolase, family 17 (InterPro:IPR000490), Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core (InterPro:IPR013781); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: O-Glycosyl hydrolases family 17 protein (TAIR:AT3G23770.1); Has 2783 Blast hits to 2708 proteins in 127 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 3; Fungi - 0; Plants - 2773; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 7 (source: NCBI BLink).

**Associated Loci** [?](#) [AT4G14080](#)

**Mutagen** [?](#) T-DNA insertion

**Mutation Site** [?](#) gene

**Description** [?](#) Sequence generated in the course of an Arabidopsis T-DNA tagging program. TAIL-PCR was used to generate sequencing templates that represent A.t. genomic DNA flanking the left border of the pDs-Lox T-DNA insert. PCR products were sequenced directly by using the p745 primer 5' AACGTCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC 3'

**Associated Polymorphisms** [?](#)

| Insertion | Species Variant (attribution) | Length  | Polymorphic Sequence | Polymorphism Verified |
|-----------|-------------------------------|---------|----------------------|-----------------------|
|           | Col                           | unknown |                      | unknown               |

Associated Nucleotide Sequences ⓘ

Insertion

Flanking Sequence

```

GNNTCCCACAATATATCCGGCGGGGACACAGAGACATTGGGGAATCTTGCATCCCGACGG
TTCACCAATCTACGACGTAGATTTACCCGGTCAAACACCCTTAACCGGTTTCAACCCGTT
ACCTAAACCGGACGAACAACGTTTCCTTACAAAGGTCAAGTGTGGTGCCTACCAGTCGAAGG
AGCCAACGAGACTGAGCTTGAAGAAACATTGAGGATGGCTTGTGCCCAAAGCANCACCAC
TTGTGCAGCTTTAGCTCCTGGGAGAGAAATGTTACGAACCAGTCTCCATTATTGGCATGC
AAGCTACGCGCTTAATTCGTAAGTGGGCTCAGTTTCGTAACCAAAGCATTCAATGTTTCTT
CAATGGATTGGCTCATGAGACAACAACCAACCCTGGTGAGCCATTCTTTGTAGTTTCCAA
ATTTAGACCAAAAATAACCTTTTCGTATAGTCACTAACAAAGATTTTTTACAGGAAATGAT
CGTTGCAAGTTTCCGAGCGTTACTCTGTGAGGAGGACTTGAGGAAGAAGACACATGATTA
AAGCTGGATTATTTCGTATAACTCAATATTGTTCCCTTATCTTTTTTTTATTATACCTTTTC
TGCTTCAAGTTTCCCTNATGNTNGANAAAAAANTCCAAATAATTAATAAATAGTANTTT
TTTTCCCTTACAAAGCTGATTATTATTACATTCTCTAATCAACAACAAAATTATCTATCA
CAAAGTGAACAGCTACAAAAACGTAATGGGNGGANATTTACTTTGCCCTAAAGCTGC
AAAAAATCAAGAACTTAAATAATTTAAGAATTTTATAGATTTTCTGACATAAACACNA
CCC (Length: 843)
    
```

GenBank Accession [CW800290](#)

| Map Locations ⓘ | chrom | map    | map type ⓘ    | coordinates          | orientation | attrib                  |
|-----------------|-------|--------|---------------|----------------------|-------------|-------------------------|
|                 | 4     | AGI    | nuc_sequence  | 8118366 - 8119208 bp | reverse     | <a href="#">details</a> |
|                 | 4     | FCAALL | assembly_unit | 76258 - 77100 bp     | reverse     |                         |

Map Links ⓘ [Sequence Viewer](#) [GBrowse](#)

| Germplasm ⓘ            | Name/Image                       | Polymorphisms         | Background                                       | Stock Name ⓘ | Select        |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------|--|--------------|---------------|
| Showing 1 of 1 entries | <a href="#">WISCDXSLOX285F04</a> | WiscDsLox285F04       |  | CS850174     | not available |
|                        | Phenotype ⓘ                      |                       |  |              |               |
|                        | None available                   |                       |  |              |               |
|                        | <a href="#">Order from ABRC</a>  | <a href="#">Reset</a> | <a href="#">Order from NASC</a> (European Users) |              |               |

Comments ⓘ  
(shows only the most recent comments by default)

[Add My Comment](#) [Hide Comments](#) [Show All Comments](#)

| Attribution ⓘ | type         | name    | date       |
|---------------|--------------|---------|------------|
|               | submitted_by | GenBank | 04/14/2005 |

| Search   | Browse   | Tools  | Portals  | Download  | Submit                                   | News | ABRC Stocks |
|--|--|--|--|---|--|------|-------------|
| <b>Germplasm: WISCDLSLOX285F04 / Stock: CS850174</b> |  |  |  |   |  |      |             |
| <b>Stock Information</b>                             | <a href="#">View Order History</a>   | <b>Availability</b><br>no_longer_distributed | <b>Availability Comment</b><br>available by special request, since confirmed line has been isolated from this stock; please order confirmed progeny line(s) listed in Pedigree band below. | <b>Donor</b><br>Michael Sussman<br><br>Rick Amasino<br>Patrick Krysan | <b>Donor Stock #</b><br>WiscDsLox285F04  |      |             |
| <b>Other Names</b>                                   | N850174<br>WiscDsLox285F04   |  | NASC stock number<br>Wisconsin number  |   |  |      |             |
| <b>Taxon</b>   | Arabidopsis thaliana   |  |  |   |  |      |             |
| <b>Pedigree</b>                                      | <b>Parent Line</b><br>COL(COLUMBIA)  | <b>Background</b><br>Col                     | <b>Generative Method</b>   |   |  |      |             |
|  | <b>Progeny Line(s)</b><br>CS863924   | <b>Background</b><br>Col                     | <b>Generative Method</b><br>purification   |   |  |      |             |
| <b>Chromosomal Constitution</b>                      | 2  | <b>Ploidy</b>                                | no   | <b>Is Aneuploid</b>   |  |      |             |
| <b>Associated Polymorphisms</b>                      | <b>Name</b><br>WISCDLSLOX285F04  | <b>Locus</b><br>AT4G14080                    | <b>Gene Name(s) and/or Equivalents</b><br>AT4G14080.1/MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 48   | <b>Genotype</b><br>heterozygous                                       | <b>Allele Mutagen</b><br>T-DNA insertion |      |             |
| <b>Mutagen Applied to Strain</b>                     | T-DNA insertion  |  |  |   |  |      |             |
| <b>Associated Constructs</b>                         | <b>Clone Name</b><br>pDs-Lox   | <b>Vector Name</b><br>pDs-Lox                |  |   |  |      |             |
| <b>Phenotype</b>                                     | no phenotype information available at this time  |  |  |   |  |      |             |
| <b>Additional Information</b>                        | Sequence-indexed T-DNA insertion line; the T-DNA includes a Ds transposon and a LoxP recombination site. A Basta resistance marker is used to select for the T-DNA and for the Ds transposon following any transposition. However, be aware that lines from this set might not be able to launch their Ds element. Be sure to test any line for the ability to transpose before using it in experiments. Hygromycin resistance can be used for selection of lines where the Ds element has been excised by transposition. WiscDsLox lines do not contain Ac transposase, and the lines should be crossed to a line expressing Ac transposase in order to mobilize the Ds transposon. May be segregating for phenotypes that are not linked to the insertion. May have additional insertions potentially segregating. |  |  |   |  |      |             |

ABRC

Comments ⓘ

Associated URLs [Wisconsin DsLox Project](#)

Special Growth Conditions ⓘ none

Date Released 2004-12-01

Fees Academic ⓘ / Commercial ⓘ  
\$7 / \$56

Restrictions MTA signature required before shipping?  
No

Format Shipped # Seeds per vial  
60

Type ⓘ individual\_line

TAIR Accessions Germplasm:1008037983  
Stock:1008032753

| Attribution ⓘ | Type         | Name   | Date       |
|---------------|--------------|--|------------|
|               | submitted_by | <a href="#">Arabidopsis Biological Resource Center</a> | 2004-12-03 |

Date Last Modified ⓘ 2011-01-26

Comments ⓘ  
(shows only the most recent comments by default)

[Add My Comment](#) [Hide Comments](#) [Show All Comments](#)

## Ek 2. AT3G23770 Geni Web Sayfaları

### Ek 2.1. AT3G23770 Gen Bilgisi ve Mutant Hatları

Search Browse Tools Portals Download Submit News ABRC Stocks

## Locus: AT3G23770

Date last modified: 2003-05-02

TAIR Accession: Locus:2095228


Representative Gene Model: AT3G23770.1

Gene Model Type: protein\_coding

Other names: MYM9.12

Description: O-Glycosyl hydrolases family 17 protein; FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, catalytic activity; INVOLVED IN: carbohydrate metabolic process; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: leaf whorl, sepal, flower; EXPRESSED DURING: petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: X8 (InterPro:IPR012948), Glycoside hydrolase, catalytic core (InterPro:IPR017853), Glycoside hydrolase, family 17 (InterPro:IPR000490), Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core (InterPro:IPR013781); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: O-Glycosyl hydrolases family 17 protein (TAIR:AT4G14080.1); Has 2823 Blast hits to 2749 proteins in 147 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 3; Fungi - 32; Plants - 2780; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 8 (source: NCBI BLINK).

Map Detail Image



Annotations

| category                        | relationship type | keyword  |
|---------------------------------|-------------------|--|
| GO Biological Process           | involved in       | carbohydrate metabolic process, metabolic process                        |
| GO Cellular Component           | located in        | endomembrane system  |
| GO Molecular Function           | functions in      | cation binding   |
| GO Molecular Function           | has               | catalytic activity, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds |
| Growth and Developmental Stages | expressed during  | petal differentiation and expansion stage                                |
| Plant structure                 | expressed in      | collective leaf structure, flower, sepal                                 |

Annotation Detail



| RNA Data               |                                    |                                    |                   |                                     |   |         |  |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|---|---------|--|
| One-channel Arrays     | array element name                 | avg. signal intensity (std. error) |                   | avg. signal percentile (std. error) |   |         |  |
|                        | 257170_AT                          | 25.345 (2.644)                     |                   | 21.983 (0.317)                      |   |         |  |
| Associated Transcripts | type                               | number associated                  |                   |                                     |   |         |  |
|                        | EST                                | ( 5 )                              |                   |                                     |   |         |  |
|                        | cDNA                               | ( 4 )                              |                   |                                     |   |         |  |
| Chromosome             | 3                                  |                                    |                   |                                     |   |         |  |
| Nucleotide Sequence    | full length CDS                    | full length genomic                | full length cDNA  |                                     |   |         |  |
|                        |                                    |                                    |                   |                                     |   |         |  |
| Protein Data           | name                               | length (aa)                        | molecular weight  | isoelectric point                   | domains( # of domains)  |         |  |
|                        | AT3G23770.1                        | 476                                | 52169.7           | 7.4353                              | Glycoside hydrolase, superfamily:IPR017853(1)<br>Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core:IPR013781(1)<br>X8:IPR012946(2)<br>Glycoside hydrolase, family 17:IPR000490(2) |         |  |
| Map Locations          | chrom                              | map                                | map type          | coordinates                         | orientation   | attrib  |  |
|                        | 3                                  | AGI                                | nuc_sequence      | 8565494 - 8567496 bp                | forward   | details |  |
|                        | 3                                  | MYM9                               | assembly_unit     | 39898 - 41900 bp                    | forward   |         |  |
| Map Links              | Map Viewer                         | Sequence Viewer                    | GBrowse           |                                     |   |         |  |
| Polymorphism           | name                               | type                               | polymorphism site | allele type                         |   |         |  |
|                        | Showing 15 of 26 entries (see all) | FLAG_205C06                        | insertion         | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_1151680                   | insertion         | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_1200638                   | deletion          | intron                              | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_494827                    | substitution      | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_494828                    | substitution      | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_494833                    | substitution      | coding_region                       | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_494839                    | substitution      | coding_region                       | unknown   |         |  |
|                        |                                    | ossowski_494842                    | substitution      | coding_region                       | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484660                        | substitution      | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484662                        | substitution      | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484664                        | substitution      | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484666                        | substitution      | promoter                            | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484667                        | substitution      | coding_region                       | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484670                        | substitution      | coding_region                       | unknown   |         |  |
|                        |                                    | PERL0484671                        | substitution      | coding_region                       | unknown   |         |  |


Germplasm  
 Showing 9 of 9  
 entries

| name   | polymorphisms       | background | stock name   | select                   |
|--|---------------------|------------|--------------|--------------------------|
| SALK_033100<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available  | SALK_033100.20.30.x |            | SALK_033100  | not available            |
| SALK_101514C<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available | SALK_101514.50.05.x |            | SALK_101514C | <input type="checkbox"/> |
| SALK_033100C<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available | SALK_033100.20.30.x |            | SALK_033100C | <input type="checkbox"/> |
| SALK_138003C<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available | SALK_138003.16.55.x |            | SALK_138003C | <input type="checkbox"/> |
| CS859965<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available     | SALK_033100.20.30.x |            | CS859965     | <input type="checkbox"/> |
| SAIL_883_D01<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available | SAIL_883_D01.v1     |            | CS839780     | <input type="checkbox"/> |
| SAIL_885_D07<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available | SAIL_885_D07.v1     |            | CS839833     | <input type="checkbox"/> |
| SALK_138003<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available  | SALK_138003.16.55.x |            | SALK_138003  | not available            |
| SALK_101514<br>images<br>None available<br>phenotypes ⓘ<br>None available  | SALK_101514.50.05.x |            | SALK_101514  | not available            |

[Order from ABRC](#)

[Reset](#)

## Ek 2.2 CS859965 (N859965) Stok Nolu Mutant Hattına Ait Web Sayfaları



[Home](#) [Help](#) [Contact](#) [About Us](#) [Login/Reglater](#)

Search Browse Tools Portals Download Submit News ABRC Stocks

### Polymorphism: SALK\_033100.20.30.x

**Name** SALK\_033100.20.30.x

**Date last modified** 2010-11-19

**Tair Accession** Polymorphism:3855180

**Type** insertion **Insertion Type** T-DNA

**Chromosome** 3

**Construct Type** simple\_insert

| Associated Genes | Gene Model  | Locus     | Polymorphism site | Association Type |
|------------------|-------------|-----------|-------------------|------------------|
|                  | AT3G23770.1 | AT3G23770 | exon              | is an allele of  |

**Description** O-Glycosyl hydrolases family 17 protein; FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, catalytic activity; INVOLVED IN: carbohydrate metabolic process; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: leaf whorl, sepal, flower; EXPRESSED DURING: petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: X8 (InterPro:IPR012946), Glycoside hydrolase, catalytic core (InterPro:IPR017853), Glycoside hydrolase, family 17 (InterPro:IPR000490), Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core (InterPro:IPR013781); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: O-Glycosyl hydrolases family 17 protein (TAIR:AT4G14080.1); Has 2823 Blast hits to 2749 proteins in 147 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 3; Fungi - 32; Plants - 2780; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 8 (source: NCBI BLINK).

**Associated Loci** AT3G23770

**Mutagen** T-DNA insertion

**Mutation Site** gene

**Description** PCR was performed on Arabidopsis thaliana lines each of which contains one or more TDNA insertion elements. The resultant fragment for each line was directly sequenced to determine the genomic sequence at the site of insertion. Details of the protocols used can be found at [http://signal.salk.edu/tdna\\_protocols.html](http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html)

**Associated Polymorphisms**

| Insertion | Species Variant (attribution) | Length  | Polymorphic Sequence | Polymorphism Verified |
|-----------|-------------------------------|---------|----------------------|-----------------------|
|           | Col                           | unknown |                      | unknown               |

**Associated Nucleotide Sequences**

**Insertion**

**Flanking Sequence**

```

ACCGCAAAGGTAACATCACTCGGAACAGCCATATCGTTCCCGGAATGTACCTAGCTCGAA
TGAGGAAAACCTACGAACCTAAGAGCGGCCATGGCAAGATGTGTCCCACTTTGATGCTGTG
AATTGACGAGTCGTAACCCCTTCTTCTCGGCTTCGGTTGGCGCCCGCCTTCTTCGACCCA
GGGCCCGCGTCGCGTGATGGTTCCCGGGCGGCCATTATGGCCCTTGTGGTGACAGCCGG
TGGTGCGCCGCCCTTCTGTCCACGGGGTGTCCATGCCAGGCGAGTGGACCGGGCGGCCG
CGCCGTTTGCCCTCCGTGCCGGCGAGGGTATCGGACACGTGTCCCGCGGTCTGTGATGA
CGCTAGCGTCTGGGGTGAGTGACAGCGTGAGGTCGGTGC CGCGTATCCGCGGTC (Length: 414)

```

**GenBank Accession** BH753934

| Map Locations |       |      |               |                      |             |                         |  |
|---------------|-------|------|---------------|----------------------|-------------|-------------------------|--|
|               | chrom | map  | map type      | coordinates          | orientation | attrib                  |  |
|               | 3     | AGI  | nuc_sequence  | 8565825 - 8566234 bp | reverse     | <a href="#">details</a> |  |
|               | 3     | MYM9 | assembly_unit | 40229 - 40638 bp     | reverse     |                         |  |

| Map Links              |                                 |                         |            |             |               |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------|------------|-------------|---------------|
|                        | <a href="#">Sequence Viewer</a> | <a href="#">GBrowse</a> |            |             |               |
| Germplasm              |                                 |                         |            |             |               |
|                        | Name/Image                      | Polymorphisms           | Background | Stock Name  | Select        |
| Showing 3 of 3 entries | SALK_033100                     | SALK_033100.20.30.x     |            | SALK_033100 | not available |
|                        | Phenotype                       |                         |            |             |               |
|                        | None available                  |                         |            |             |               |

---

|  | Name/Image     | Polymorphisms       | Background | Stock Name   | Select                   |
|--|----------------|---------------------|------------|--------------|--------------------------|
|  | SALK_033100C   | SALK_033100.20.30.x |            | SALK_033100C | <input type="checkbox"/> |
|  | Phenotype      |                     |            |              |                          |
|  | None available |                     |            |              |                          |

---

|  | Name/Image     | Polymorphisms       | Background | Stock Name | Select                   |
|--|----------------|---------------------|------------|------------|--------------------------|
|  | CS859965       | SALK_033100.20.30.x |            | CS859965   | <input type="checkbox"/> |
|  | Phenotype      |                     |            |            |                          |
|  | None available |                     |            |            |                          |

[Order from ABRC](#)
[Reset](#)
[Order from NASC](#) (European Users)

| Search                             | Browse   | Tools                                  | Portals                                     | Download                      | Submit           | News                              | ABRC Stocks |
|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------|
| <b>Germplasm / Stock: CS859965</b> |  |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Stock Information ⓘ                |  |  |   |                               |                  |                                   |             |
|                                    |  | <a href="#">Order from ABRC</a>        |   | Availability ⓘ                | Donor            | Donor Stock #                     |             |
|                                    |  | <a href="#">View Order History</a>     |   | available                     | Sara Patterson   | Salk_033100                       |             |
| Other Names                        | N859965<br>At3g23770   |  | NASC stock number<br>stock donor other name |                               |                  |                                   |             |
| Taxon ⓘ                            | Arabidopsis thaliana   |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Pedigree ⓘ                         | Parent Line ⓘ  | Background                             | Generative Method                           | Parent Locus Associations     |                  |                                   |             |
|                                    | CS80000  | Col-0                                  |   |                               |                  |                                   |             |
|                                    | SALK_033100  | Col-0                                  | purification                                | AT3G23770                     |                  |                                   |             |
| Chromosomal Constitution           | Ploidy ⓘ   |  | Is Aneuploid ⓘ                              |                               |                  |                                   |             |
|                                    | 2  |  | no  |                               |                  |                                   |             |
| Associated Polymorphisms ⓘ         | Name ⓘ   | Locus ⓘ                                | Gene Name(s) and/or Equivalents             | Genotype                      | Allele Mutagen ⓘ |                                   |             |
|                                    | SALK_033100.20.30.X  | AT3G23770                              | AT3G23770.1                                 | homozygous                    | T-DNA insertion  |                                   |             |
| Mutagen Applied to Strain ⓘ        | T-DNA insertion  |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Associated Constructs              | Clone Name ⓘ   | Construct Type ⓘ                       | Vector Name ⓘ                               |                               |                  |                                   |             |
|                                    | pROK2  | simple_insert                          | pROK2                                       |                               |                  |                                   |             |
| Phenotype ⓘ                        | no phenotype information available at this time                                |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Additional Information ⓘ           | confirmed line isolated from original SALK line; homozygous for the insertion. |  |   |                               |                  |                                   |             |
| ABRC Comments ⓘ                    |  |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Special Growth Conditions ⓘ        | none   |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Date Released                      | 2007-01-03   |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Fees                               | Academic ⓘ / Commercial ⓘ<br>\$7 / \$58  |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Restrictions                       | MTA signature required before shipping?<br>No                                  |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Format Shipped                     | # Seeds per vial<br>30   |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Type ⓘ                             | individual_line  |  |   |                               |                  |                                   |             |
| TAIR Accessions                    | Germplasm:3510598734<br>Stock:3510567167                                       |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Attribution ⓘ                      | Type   | Name                                   | Date  |                               |                  |                                   |             |
|                                    | submitted_by   | Arabidopsis Biological Resource Center | 2007-01-10                                  |                               |                  |                                   |             |
| Date Last Modified ⓘ               | 2007-10-03   |  |   |                               |                  |                                   |             |
| Comments ⓘ                         | (shows only the most recent comments by default)                               |  |   |                               |                  |                                   |             |
|                                    |  | <a href="#">Add My Comment</a>         |   | <a href="#">Hide Comments</a> |                  | <a href="#">Show All Comments</a> |             |

## Ek 3. Primerlerin Seçimi Öncesinde İzlenen Aşamalar

### Ek 3.1 Genlerin Bulunması İçin Kullanılan TAIR Web Sayfası.

The Arabidopsis Information Resource (TAIR) maintains a database of genetic and molecular biology data for the model higher plant *Arabidopsis thaliana*. Data available from TAIR includes the complete genome sequence along with gene structure, gene product information, metabolism, gene expression, DNA and seed stocks, genome maps, genetic and physical markers, publications, and information about the Arabidopsis research community. Gene product function data is updated every two weeks from the latest published research literature and community data submissions. Gene structures are updated 1-2 times per year using computational and manual methods as well as community submissions of new and updated genes. TAIR also provides extensive linkouts from our data pages to other Arabidopsis resources.

The Arabidopsis Biological Resource Center at The Ohio State University collects, reproduces, preserves and distributes seed and DNA resources of *Arabidopsis thaliana* and related species. Stock information and ordering for the ABRC are fully integrated into TAIR.

**Breaking News**  
Subscribe to news feed  
Follow our Twitter feed  
Join our Facebook group

**Elsevier/TAIR partnership [January 11, 2012]**  
Elsevier's electronic platform SciVerse ScienceDirect links AGI codes in papers to the corresponding pages at TAIR.

**ABRC Outreach Initiative**  
Funded by ASPB [January 11, 2012]

### Ek 3.2 TAIR Gen Arama Sonuçları

TAIR Gene Search Results

new search (new gene search) | download all (download all results) | download checked (check the boxes below and download results) | get all sequences | get checked sequences

Your query for genes where gene name, description, phenotype, locus name, uniprot id or GenBank accession contains the term **AT3G23770** resulted in **4** loci matches with **4** distinct gene models.

Displaying 1 - 4.

To see ESTs associated with your gene of interest, click on the Locus link.

Check All | Uncheck All

| Locus       | Description  | Gene Model(s) | Other Names | Keywords   |
|-------------|--|---------------|-------------|--|
| 1 AT3G23770 | O-Glycosyl hydrolases family 17 protein; FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, ... | AT3G23770.1   | MYM9.12     | carbohydrate metabolic process, catalytic activity, cation binding, endomembrane system, hydrolase activity, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, |

### Ek 3.3 AT4G14080 Geni İçin Oluşturulan T-DNA Mutasyonları.

|                     |                     |              |                          |
|---------------------|---------------------|--------------|--------------------------|
| WiscDsLox285F04     | WiscDsLox285F04     | CS850174     | not available            |
| <b>images</b>       |                     |              |                          |
| None available      |                     |              |                          |
| <b>phenotypes</b> ⓘ |                     |              |                          |
| None available      |                     |              |                          |
| CS458165            | GK-606H01-021122    | CS458165     | <input type="checkbox"/> |
| <b>images</b>       |                     |              |                          |
| None available      |                     |              |                          |
| <b>phenotypes</b> ⓘ |                     |              |                          |
| None available      |                     |              |                          |
| SALK_022440C        | SALK_022440.17.70.x | SALK_022440C | <input type="checkbox"/> |
| <b>images</b>       |                     |              |                          |
| None available      |                     |              |                          |
| <b>phenotypes</b> ⓘ |                     |              |                          |
| None available      |                     |              |                          |

### Ek 3.4 Mutant Genine Ait Flanking Dizi

| <b>Associated Loci</b> ⓘ                 | AT4G14080  |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
|--|--|---------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----|---------|--|---------|
| <b>Mutagen</b> ⓘ                         | T-DNA insertion  |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>Mutation Site</b> ⓘ                   | gene   |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>Description</b> ⓘ                     | Sequence generated in the course of an Arabidopsis T-DNA tagging program. TAIL-PCR was used to generate sequencing templates that represent A.t. genomic DNA flanking the left border of the pDs-Lox T-DNA insert. PCR products were sequenced directly by using the p745 primer 5' AAGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC 3'   |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>Associated Polymorphisms</b> ⓘ        |  |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>Insertion</b> ⓘ                       | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Species Variant (attribution) ⓘ</th> <th>Length</th> <th>Polymorphic Sequence</th> <th>Polymorphism Verified</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Col</td> <td>unknown</td> <td></td> <td>unknown</td> </tr> </tbody> </table>   | Species Variant (attribution) ⓘ | Length                | Polymorphic Sequence | Polymorphism Verified | Col | unknown |  | unknown |
| Species Variant (attribution) ⓘ          | Length   | Polymorphic Sequence            | Polymorphism Verified |                      |                       |     |         |  |         |
| Col                                      | unknown  |                                 | unknown               |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>Associated Nucleotide Sequences</b> ⓘ |  |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>Insertion Flanking Sequence</b>       | <pre> GNNTCCACAAATATATCCGGCGGGACACAGAGACATTGGGGAATCTTGCAITCCCGACGG TTCACCAATCTACGACGTAGATTTCACCGGTCAAACACCCTTAACCGGTTTCAACCCGTT ACCTAAACCGACGAACAACGTTCCCTTACAAAGGTCAAGTGTGGTCCGTACCAGTCGAAGG AGCCAACGAGACTGAGCTTGAAGAAACATTGAGGATGGCTTGTGCCAAGCANCACCAC TTGTGCAGCTTTAGCTCCTGGGAGAGAATGTTACGAACCAGTCTCCATTTATTGGCATGC AAGCTACGCGCTTAATTTCGTACTGGGCTCAGTTTCGTAAACCAAGCATTCAATGTTTCTT CAATGGATTGGCTCATGAGACAACAACCAACCCCTGGTGGCCATCTTTGTAGTTTCCAA ATTTAGACCAAAATAACCTTTTCGTATAGTCACTAACAAAGATTTTTTACAGGAAATGAT CGTTGCAAGTTTCCGAGCGTTACTCTGTGAGGAGGACTTGAGGAAGAAGACACATGATTA AAGCTGGATTATTCGTATAACTCAATATTGTTCCCTTATCTTTTTTTTATTATACCTTTTC TGCTTCAAGTTTCTNATGNTNGANAAAAAANTCCAAATAAATTAATAAATAGTANTTT TTTTCCCTTACAAAGCTGATTATTATTACATTCTTAATCAACAACAAAATTATCTATCA CAAACGTAAACAGCTACAAAAACGTAATGGGNGGANATTTACTTTGCCCTAAAGCTGC AAAAAATCAAGAACTTTAATAATTTTAAAGAAATTTTAGATTTTCTGCATAAACACNAA CCC (Length: 843) </pre> |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |
| <b>GenBank Accession</b>                 | CW800290   |                                 |                       |                      |                       |     |         |  |         |

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 3.1.</b> PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....                                | 19 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> AT3G23770 ve AT4G14080 genleri için kullanılan PCR segmentleri ve döngü sayısı..... | 20 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> PCR’ da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....                                 | 20 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> Primerlerden beklenen PCR ürünü.....  | 20 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> Çift mutantların belirlenmesinde kullanılan PCR miktarları.....                     | 23 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....                               | 25 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....  | 26 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> PCR segmentleri ve döngü sayıları.....  | 26 |
| <b>Çizelge 3.9.</b> PCR reaksiyonunda kullanılan primer ve baz dizilimi.....                            | 26 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Total RNA’ ların Qubit ile florometrik yoğunlukları.....                            | 51 |



|   |    |
|---|----|
| Şekil 1.1. Angiospermlerde mikrosporogenezin şematik görünümü.....  | 6  |
| Şekil 3.1. Steril kabin içerisindeki tohum a) sterilizasyon araç-gereçleri ve b) tohum ekimi.....                                   | 17 |
| Şekil 3.2. <i>AT4G14080</i> geninde T-DNA insersiyonu ve primerlerin gen üzerindeki konumları.....                                  | 21 |
| Şekil 3.3. <i>AT3G23770</i> geninde T-DNA insersiyonu ve primerlerin gen üzerindeki konumları.....                                  | 22 |
| Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan marker haritası.....  | 28 |
| Şekil 4.1. Her iki mutant gene ait <i>A. thaliana</i> bitkilerinin MS besi ortamındaki kök sistemlerinin oluşumu.....               | 29 |
| Şekil 4.2. <i>AT4G14080</i> (CS850174 stok nolu) mutant <i>Arabidopsis thaliana</i> çiçek tomurcukları.....                         | 30 |
| Şekil 4.3. <i>AT3G23770</i> (N859965 stok nolu) mutant <i>Arabidopsis thaliana</i> çiçek tomurcukları.....                          | 30 |
| Şekil 4.4. <i>A. thaliana</i> mutant ve yabancıl tip genomik DNA'larına ait jel elektroforezi görüntüleri.....                      | 31 |
| Şekil 4.5. T-DNA mutant genleri için kullanılan primer dizayn programı.....   | 32 |
| Şekil 4.6. Primer dizayn programı ile oluşturulan CS850174 mutant hattı için geliştirilen primerler.....                            | 33 |
| Şekil 4.7. Left Border (LB) primer olarak kullanılan p745 primeri.....  | 33 |
| Şekil 4.8. Primer dizayn programı ile oluşturulan CS859965 mutant hattı için geliştirilen primerler.....                            | 34 |
| Şekil 4.9. T-DNA insersiyonu pROK2 vektörü.....   | 34 |
| Şekil 4.10. Salk hatlarında kullanılan LBa1 Left Border primer.....   | 35 |
| Şekil 4.11. Mutant bitkilerin fenotiplerinin belirlenmesi için kullanılan örnek bir şekil....                                       | 36 |
| Şekil 4.12. <i>AT3G23770</i> mutant bitkilerine ait dört bitkinin PCR2 ve PCR1 sonuçları.....                                       | 37 |
| Şekil 4.13. <i>AT4G14080</i> mutant bitkilerine ait dört bitkinin PCR2 ve PCR1 sonuçları.....                                       | 38 |
| Şekil 4.14. Melezlenen bir bitkinin etiketle belirlenmesi.....  | 39 |
| Şekil 4.15. <i>At4g14080</i> heterozigot mutant bitkisi ile <i>At3g23770</i> homozigot mutant bitkisinin dihibrit melezlenmesi..... | 40 |
| Şekil 4.16. Melezlenen bitkiye ait çeşitli büyüme aşamaları.....  | 41 |
| Şekil 4.17. Melez bitkilere ait izole edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri.....   | 42 |

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| Şekil 4.18. İlk melezleme sonrasındaki tohumlardan elde edilen bitkilerin PCR sonrası agaroz jel görüntüleri..... | 45 |
| Şekil 4.19. Dihibrit melezleme.....   | 46 |
| Şekil 4.20. Kendilenme sonrasında PCR ile belirlenen çift mutant bitkilerin agaroz jel görüntüleri.....           | 49 |
| Şekil 4.21. Çift mutant homozigot bitkilere ait agaroz jel elektroforez görüntüleri.....                          | 50 |
| Şekil 4.22. İzole edilen RNA örneklerine ait agaroz jel görüntüleri.....  | 51 |
| Şekil 4.23. Homozigot çift mutant örnekleri ile yapılan RT-PCR sonuçları.....                                     | 52 |
| Şekil 4.24. <i>At4g14080</i> mutantına ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapıları.....                          | 53 |
| Şekil 4.25. <i>At3g23770</i> mutantına ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapıları.....                          | 54 |
| Şekil 4.26. Yabanıl tip <i>Arabidopsis thaliana</i> da kalloz çeper ile çevrili tetrad yapıları.....              | 54 |
| Şekil 4.27. Melez bitkiye ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapı.....   | 55 |
| Şekil 4.28. Çift mutant homozigot bitkilere ait kalloz çeper ile çevrili tetrad yapı.....                         | 56 |
| Şekil 4.29. <i>Arabidopsis thaliana</i> bitki tohumları.....  | 57 |

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Elif POLAT

**Doğum Yeri** : İstanbul

**Doğum Tarihi:** 01/01/1984

### EĞİTİM DURUMU

**Lise öğrenimi** : Avcılar 50. Yıl İnsa Lisesi

**Lisans Öğrenimi** : 2003-2008 Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

**Yabancı Diller** : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLER

#### a) Yayınlar

#### b) Bildiriler- Uluslar arası- Ulusal

Elif POLAT, Nihan AKINCI, Müge ÇETİN, Cüneyt AKI (2010). *Lycopersicon esculentum* Mill. ve *Capsicum annuum* L. Türlerinde Amino Quelant-Ca

Uygulamasının Total Protein ve Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri. Denizli 2010. 20.Ulusal Biyoloji Kongresi (Poster bildiri)

Nihan AKINCI, Elif POLAT, Müge ÇETİN, Cüneyt AKI (2010). *Lycopersicon esculentum* Mill. ve *Capsicum annuum* L. Türlerinde Hüyük Asitin Total Protein ve Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri. Denizli 2010. 20.Ulusal Biyoloji Kongresi (Poster bildiri)

### İŞ DENEYİMİ

Avcılar Ticaret Meslek Lisesi – Biyoloji Öğretmenliği (Ücretli öğr.) – 1 yıl (2008- 2009)

#### Stajlar:

Eurofertil Tüpbebek Merkezi – 1 Ay - (2007)

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarı. - 5 Ay (2007)

Zonguldak Devlet Hastanesi – Mikrobiyoloji laboratuvarı – 5 Ay (2007)

### İLETİŞİM

**E-posta adresi:** [elifpolat21@hotmail.com](mailto:elifpolat21@hotmail.com)