

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

**APOMİKT VE SEKSÜEL BOECHERA TÜRLERİNDE**  
**SWI1/DYAD GENİ VEİFADESİNİN MOLEKÜLER**  
**KARAKTERİZASYONU**

**Gözde NİŞLİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

Tezin Sunulduğu Tarih: 15/07/2011

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**GÖZDE NİŞLİ** tarafından **DOÇ. DR. KEMAL MELİK TAŞKIN** yönetiminde hazırlanan “**APOMİKT VE SEKSÜEL BOECHERA TÜRLERİNDE SWI1/DYAD GENİ VE İFADESİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Kemal Melik Taşkın

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Murat ŞEKER

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 15/07/2011

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

## **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.**

**Gözde NİŞLİ**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen çok değerli danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN' a bana rehberliğinde çalışma olanağı sağladığı ve her zaman destek olduğu için teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana inanan, her zaman maddi, manevi desteğini eksik etmeyen ailem Şükran NİŞLİ, Sabahattin NİŞLİ ve Aydın NİŞLİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, desteğini, yardımını, bilgisini esirgemeyen birlikte çalıştığım kıymetli ekip arkadaşım Fatih SEZER'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında tecrübesini ve bilgisini benimle paylaşan ve bana her konuda destek olan arkadaşım Yasemin DEMİRGAN'a çok teşekkür ederim.

Bana eğitimim sırasında her zaman her konuda destek olan arkadaşlarım Erkan YÜZBAŐIOĐLU, Damla ERDEN ve İlknur Nezahat ÇILDIR'a teşekkür ederim.

Ayrıca Dr. Rod J. Scott ve Dr. Eric Schranz' atohum temini konusundaki destekleri için teşekkür ederim.

Gözde NİŞLİ

## SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
bç	Baz çifti
cDNA	KomplementerDNA
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	DeoksiriboNükleik 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
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	RiboNükleikAsit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Rotation perminute (Devir/dakika)
RT-PCR	ReverseTranscriptionPCR
TAE	TrisEDTAAsetat
U.V	Ultra Viyole
Swi1	Switch1

## ÖZET

### APOMİKT VE SEKSÜEL BOECHERA TÜRLERİNDE SWI1/DYAD GENİ VE İFADESİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Gözde NİŞLİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

15/07/2011, 76

Bu çalışmada, apomikt (*Boechea gunnisoniana*, *B. holboellii*) ve seksüel (*B. stricta*) bitkilerinde *SWI1/DYAD* geni ortoloğu yapısı ve ifadesinin moleküler karakterizasyonu ortaya çıkarılmıştır. *Boechea* türlerine ait çiçek tomurcuklarından *SWI1/DYAD* cDNA'sı RT-PCR aracılığı ile elde edilmiştir. Ayrıca *B. gunnisoniana*, *B. stricta* ve *B. divaricarpa* türlerinde *SWITCH1/DYAD* geni genomik DNA'dan da çoğaltılmıştır. *SWITCH1/DYAD* geni ilk olarak bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana* türünden izole edilmiş ve kardeş kromatid kohezyonu, mayotik kromozom organizasyonundan sorumlu bir gen olarak tanımlanmıştır. Ayrıca diploid gametlerin oluşumuna yol açması sebebi ile apomiksi sürecinde etkili bir gen olduğu düşünülmektedir. Apomiksi, bazı Angiosperm bitki türlerinde genetik olarak birbirinin aynı, anasal kopyalardan oluşan nesillerin oluşumuna yol açan eşeysiz üreme biçimidir. Apomiksinin kültürbitkilerine aktarılması bitki yetiştiriciliğinde heterozigotluğun sabitlenmesi, hibrit özelliklerinin korunması ve hibritlerin nesiller boyunca çoğaltılabilmemesine olanak tanıyacak olması nedeni ile gelecek vaat eden bir konudur. Apomiksi; yumurta hücresinin partenogenetik bir gelişimle embriyoyu oluşturması ve bunu takiben fonksiyonel bir endosperm gelişimi ile ana bitkinin genotipini taşıyan diploid bireylerin oluşumudur. Apomiksinin altında yatan moleküler süreçler tam olarak bilinmiyor olsa da *DYAD* geni üzerinde yapılan çalışmalar bu gendeki mutasyonların apomiksinin önemli bir aşaması olan apomayozu yol açabildiğini göstermiştir. Bu çalışma ile doğal apomikt bir tür olan *B. gunnisoniana* türünde elde edilen 1243 b.ç, *B. holboellii* türünde elde edilen 650 bp. ve *B. stricta* türünden elde edilen 684 bp. transkript *Arabidopsis SWITCH1/DYAD* geni ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Apomiksi, Apomayoz, *SWITCH1*, *DYAD*

**ABSTRACT**  
**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EXPRESSION PATTERNS OF  
SWI1/DYAD GENE IN APOMICTIC AND SEXUAL BOECHERA SPECIES**

Gözde NİŞLİ

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

15/07/2011, 76

In this research, the molecular structure and expression patterns of *SWI1/DYAD* ortholog gene is characterized in apomictic (*B. gunnisoniana*, *B. holboellii*) and sexual (*B. stricta*) *Boechera* speices. The *SWI1/DYAD* (*AT5G51330*) cDNAs were obtained from flower buds of *Boechera spp.* by RT-PCR. and also *SWITCH1/DYAD* gene is amplified from genomic DNA in *B. gunnisoniana*, *B. stricta* and *B. divaricarpa* speices. *SWITCH1/DYAD* gene was first isolated from a model organism; *Arabidopsis thaliana* determined as to be in charge of sister chromatid cohesion and chromosom organisation in meiosis and also gave rise to diploid gamet formation. Thus, *AT5G51330* thought to be effective gene in apomixis process. Apomixis is a reproduction way of some species of Angiosperm which creates genetically identical seeds with the maternal plant and it will enable the clonal reproduction of hybrids when it is achieved in culture plants. Apomixis is formaiton of diploid individulas having same genotype with maternal plant and embriyo formation with parthenogenic development of egg cell followed by functional endosperm development. Although molecular base of apomixis has not found out yet, it is set out that *DYAD* gene mutation led to apomeiosis; an impotant level of apomixis. In this work, we isolated a partial cDNA from *Boechera* species (apomictic *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* and sexual *B. stricta*) that are shows high similarity with *AT5G511330*. Furthermore, *AT5G51330* homolog gene regions were characterized from genomic DNA templates of *B. gunnisoniana*, *B. stricta* and *B. divaricarpa* speices for the first time.

**Keywords:** Apomixis, apomeiosis, *DYAD*, *SWITCH*.

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
<b>BÖLÜM 1 - GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Bitkilerde Eşyili Üreme.....	1
1.2. Mayoz .....	3
1.3. Apomiksi .....	4
1.4. <i>AT5G51330</i> Geni.....	7
<b>BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>9</b>
<b>BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>14</b>
3.1.Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....	14
3.2. Genomik DNA İzolasyonu .....	14
3.2.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan Tamponların Hazırlanması .....	15
3.2.1.1. Ekstraksiyon tamponu(100ml) .....	15
3.3. RNA İzolasyonu.....	15
3.3.1 RNA Miktarının Belirlenmesi .....	15
3.4. cDNA Sentezi .....	16
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	17
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....	19
3.6.1. Elektrofrezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması.....	19
3.6.1.1 10XTAE Tamponu.....	19
3.6.1.2 Ethidium Bromide Stok Çözeltisi .....	19
3.6.1.3 1XTAE Tamponu.....	19
3.7. RACE .....	22
3.7.1 cDNA Purifikasyonu.....	23
3.8.1 Jelden DNA Saflaştırılması .....	26



3.8.2 Tüpte DNA Saflaştırılması.....	27
3.9. DNA Dizi Analizi.....	28
<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. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....	30
4.4. PCR Optimizasyonu.....	31
4.4.1 AT5G51330 geninin <i>Arabidopsis</i> Genomik DNA Kalıbından Çoğaltılması .	31
4.4.2. AT5G51330 Geni <i>Boechera</i> Ortologlarının Genomik DNA Kalıplarından Çoğaltılması.....	32
4.5. AT5G51330 <i>Boechera gunnisoniana</i> OrtologunaAit Transkriptin RT- PCR ile Çoğaltılması .....	36
4.6. AT5G51330 Geninin <i>Boechera holboellii</i> Türünde RT- PCR ile Çoğaltılması..	39
4.7. AT5G51330 Geni Ortologunun <i>Boechera stricta</i> Türünde RACE- PCR ile Çoğaltılması .....	40
4.8. AT5G51330 Geninin <i>B.stricta</i> , <i>B. gunnisoniana</i> ve <i>B. holboellii</i> türlerine ait farklı dokulardaki anlatımı .....	43
4.9. AT5G51330 <i>Boechera</i> Transkriptlerinin Dizi Analizleri .....	43
4.10. AT5G51330 <i>Boechera</i> Genomik DNA Dizi Analizleri.....	54
<b>BÖLÜM 5 - SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>71</b>
<b>ÇİZELGELER.....</b>	<b>I</b>
<b>ŞEKİLLER.....</b>	<b>III</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>IV</b>

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Canlıların, soylarını devam ettirmek amacıyla kendilerine benzer yeni bireyler meydana getirmesine üreme denir. Üreme işlevi canlının evrimsel açıdan gelişmişliğine bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Genel olarak bütün canlılarda seksüel ve aseksüel üreme olmak üzere iki tip üreme görülür.

Aseksüel üremede bir canlı kendi başına yeni bir birey meydana getirir. Oluşan bireyler ata bireyin tıpatıp aynısı, klonudur. Çünkü yavru bir gametten köken almadan oluştuğu için ata bireyin genetik özelliklerinin kopyasınasahiptir. Bu süreçlerde bölünme, tomurcuklanma, sporlanma ve vejetatif üreme gibi çeşitler vardır.

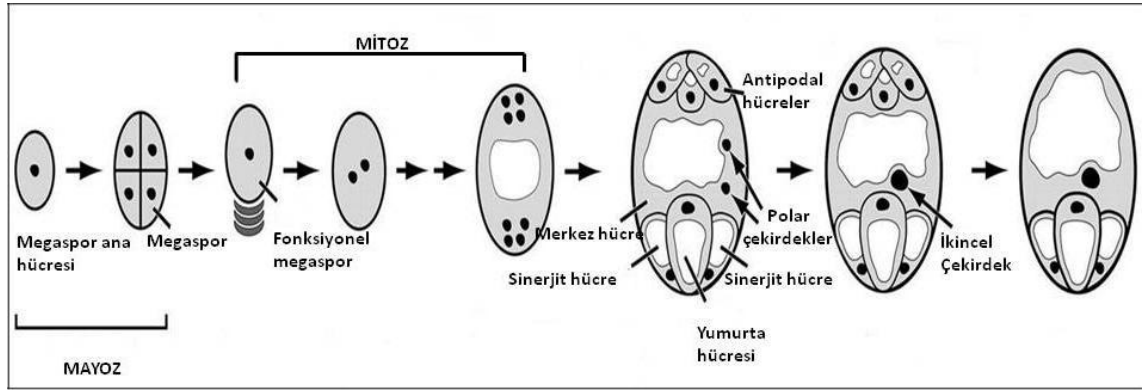
#### 1.1. Bitkilerde Eşeyli Üreme

Seksüel üreme ise yavrular kalıtsal olarak farklı iki hücre yada çekirdeğin birleşmesi ile meydana gelir. Çoğunlukla gelişmiş canlılara özgü olan bu üreme şeklinde, ana ve baba diye tanımlanan iki farklı ata vardır. Bu üreme şeklinde atalar öncelikle mayoz ile gametleri oluştururlar. Bunugametlerin birleşmesi (döllenme) takip eder ve oluşan yavrular genetik açıdan ana veya babaya tam olarak benzemez. Çünkü gamet üretim sırasında meydana gelen mutasyonlar ve gen dizilimi farklı iki hücrenin birleşmesinden oluşan yeni varyasyon yavrularda çeşitliliğe yol açar.

Angiospermlerde seksüel üreme süreçleri ile ilgili moleküler düzeydeki çalışmalarda genellikle *Arabidopsis thaliana* kullanılmaktadır. *Arabidopsis thaliana*, *Brassicaceae* familyasında, ticari önemi olmayan bir bitkidir, fakat genetik çalışmaları için model bitki olarak seçilmiştir.

Dişi gametler embriyo kesesi veya megametofit olarak da bilinen ovaryum (dişi gametofit) içerisinde ovüllerde gelişir (Drews ve ark., 1998; Yadegari ve Drews; 2004). *A. thaliana* türünde, dişi gametofit (embriyo kesesi) angiospermler arasında yaygın olarak görülen polygonum tiptedir (Reiser ve Fischer, 1993; Schneitz ve ark., 1997). Polygonum tipte, bir embriyo kesesi dişi üreme organı (pistil) içerisinde nusellar dokulardan köken alan bir megaspor hücresinden mayoz sonucunda gelişir. Mayoz tamamlandığında megaspor denilen dört hücreden ibaret tetrad oluşturur. Her megaspor haploiddir (n). Kural olarak ovul içerisinde mikropile en yakın üç hücre dejenere olurken geride kalan hücre genişler ve birçok evre geçirerek olgun polygonum tip embriyo kesesini oluşturur (Yadegari ve Drews, 2004; Drews ve ark., 1998; Russell, 1993). Bu evreler üç mitotik bölünme sonunda 8 hücreli embriyo kesesi oluşumu, nukleusların göçü ve bunların

etrafında hücre duvarı oluşumunu kapsar. Bu sürecin sonunda yumurta hücresi ( $n:1\text{maternal}:1\text{m}$ ) ve iki sinerjit hücre, embriyo kesesinin mikropiler ucunda konumlanır. Merkeze doğru göç eden hücrelerden ikisi, merkezi hücre ( $2n:1\text{m} + 1\text{m}:2\text{m}$ ), embriyo kesesinin mikropiler ucunun zıt yönünde konumlanan üç hücre de antipodal hücreler olarak adlandırılır (Robinson-Beers ve ark., 1992; Baker ve ark., 1996; Drews ve ark., 1998; Schneitz, 1999; Yadegari ve Drews, 2004).



Şekil 1.1. Dişi Gametofit Gelişimi(Yadegari ve Drews, 2004' ten uyarlanmıştır).

Erkek gametofit ise anter adı verilen organlarda bir vejetatif hücre ve iki sperm taşıyan polen tanesinden( $n:1\text{paternal}: 1\text{p}$ ) ibarettir (McCormick, 1993). Anter genellikle polen kesesi denilen 4 uzamış lobtan oluşur. Anterin erken gelişim evresinde her polen, mikrosporosit denilen hücrelerden meydana gelir. Her mikrosporosit, 4 haploid ( $n$ ) mikrospora oluşturmak üzere mayoz geçirir. Her mikrospora ait nucleus da iki hücreli polen tanesi oluşturmak için mitoz geçirir (Mascarenhas, 1989; Bedinger, 1992). Bunlardan biri vejetatif, diğeri ise daha küçük olan generatif hücreyi oluşturur.

Polen tanesinin çimlenmesiyle stigma ve stilüse doğru ilerleyen ve ovaryuma ulaşan polen tüpü meydana gelir (Mascarenhas, 1989). Bu sayede sperm (n:1p) embriyo kesesine taşınmaktadır. Polen tüpü geliştiğinde, iki hücreli sperm hücresi oluşturmak üzere generatif hücre mitoz geçirir.

Bu süreçlerin sonunda polen tüpü ile embriyo kesesine ulaşan sperm hücrelerinden biri yumurta hücresini diğeri ise merkezi hücrelerle birleşir (Drews ve ark., 1998). Sonuçta bir diploid zigot ( $2n:1\text{m} + 1\text{p}$ ) ve triploid endosperm dokusu ( $3n:2\text{m} + 1\text{p}$ ) oluşur (Schneitz ve ark., 1995). Hem sperm hem yumurta hücresinin taşıdığı farklı genomlar, rekombinasyonlar sayesinde yeni fenotip ve genotipe sahip bitki döllerinin oluşmasını sağlar (Grimanelli ve ark., 2003). Çift döllenme olarak isimlendirilen bu mekanizma ilk kez birbirinden bağımsız olarak 1898' de Sergius Nawashin ve 1899' da Lion Quinard

tarafından keşfedilmiştir (Dumas, 1984). Endospermde görülen 2m:1p oranı tohum gelişimi için son derece önemlidir. Bu oranın her iki yönde de bozulması embriyoların gelişimini engellemekte ve tohum kayıplarına sebep olmaktadır (Nowack ve ark., 2006).

### **1.2. Mayoz**

Mitozda, herhangi bir homolog kromozom çiftinin anadan ya da babadan gelen her üyesinin, bölünme sırasında bağımsız olarak davrandığı görülür. Bunun tersine, mayozda eşleşmiş olan homolog kromozomlar sinaps olarak adlandırılan yapılar oluştururlar. Her bir sinaps oluşturan yapı bivalent olarak bilinir ve dört kromatitten oluşan bir birim oluşturur. Dört kromatitin varlığı, her iki kromozomun da kendini eşlediğini gösterir. Haploid duruma gelmek için iki bölünme gereklidir. İndirgeyici bölünme (her biri bir kromozomu temsil eden sentromerlerin sayısı, bu bölünmeden sonra yarıya inmektedir) olarak tanımlanan mayoz I' de, iki homologtan oluşan her tetratin bileşenleri ayrılarak iki adet diyat oluştururlar. Her diyat ise, ortak bir sentromer ile bağlanmış iki kardeş kromatitten meydana gelmiştir. Eşitleyici olarak tanımlanan mayoz II sırasında (çünkü bu bölünmeden sonra sentromer sayısı aynı kalır), her diyat, her birinde bir kromozom olan iki monada ayrılır. Böylece iki bölünme, dört haploid hücre oluşturur

Mayozun başlangıç evresi profaz I' i üç olay belirler. Birincisi; mitozda olduğu gibi, interfazdaki kromatin, görülebilen kromozomlar halinden kalınlaşır. İkincisi, mitozdan farklı olarak her bir homolog kromozom çiftinin üyeleri, snapsa giderler. Üçüncüsü; snaps halindeki kromozomlar arasında gerçekleşen bir değiş – tokuş olayı olan krossoverın olmasıdır. Mayozun bu aşaması beş evreye bölünmüştür: leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez. Leptoten evresinde, interfaz kromatin materyali yoğunlaşmaya başlar ve kromozomlar görünür hale gelirler. Her bir kromozom boyunca yer alan kronomerler, bir ip üzerine dizilmiş boncuklara benzeyen yoğunlaşmış bölgelerdir. Zigoten evresinde, kromozomlar kısalmaya ve kalınlaşmaya devam eder. Homoloji araması olayı sırasında homolog kromozomlar birbirleri karşısında dizilmeye başlarlar. Kaba eşleşme adı verilen bu durum zigotenin sonunda kadar devam eder. Eşleşmenin sonuna doğru lateral elementler olarak biline yapılar eşleşmiş homologlar arasında görülebilir. Mayoz ilerledikçe lateral elementlerin uzunluğu artar ve sinaptonemal kompleks adı verilen ve hücrenin ince yapısına ait yapısal bir bileşen, homologlar arasında oluşmaya başlar. Zigoten biterken, eşleşmiş homologlar bivalent şeklini alırlar. Pakiten aşamasında, kromozomların katlanması ve kısalması devam eder ve her bivalentin iki üyesi arasında, sinaptonemal kompleksin daha ileri gelişimi gerçekleşir. Bu, snaps olarak bilinen daha yakın bir eşleşmeye yol açar. Her bivalent dört üyeli kromatit içerir ve bunlara kardeş

kromatit denir. Bu yapıya tetrat denir ve iki çift kardeş kromatit içerir. Bu süreçlerde dört alt üiteden oluşan kohezin protein kompleksi homologların bir arada tutulmasında rol almaktadır. Bunu izleyen diploten evresinde, her tetratin içindeki kardeş kromatit çiftleri ayrılmaya başlar. Bununla birlikte kromatitlerin arasında birbirine temas eden bir ya da daha fazla bölge kalmıştır. Kiyazma adı verilen bu bölgelerin, krossover yoluyla, kardeş olmayan kromatitler arasındaki genetik değiş – tokuş noktalarını temsil ettiği düşünülür. Genetik materyalin yeni kombinasyonları bu olay sayesinde gerçekleşir. Diyakinez aşamasında, kromozomlar birbirinden ayrılır fakat kardeş olmayan kromatitler, kiyazmalar aracılığı ile birbirlerine gevşek olarak bağlı kalır. Ayrılma ilerledikçe kiyazmalar tetratin uçlarına doğru hareket eder. Sonlanma (terminalizasyon) olarak bilinen bu olay, diyakinez sonunda tamamlanır. Profaz I'ın bu son döneminde, çekirdekçik ve çekirdek zarı bozulur ve her tetrattaki iki sentromer, yeni oluşmuş iğ ipliklerine tutunur. Profaz I'ın bitimine kadar, her tetratin yapısında bulunan sentromerler, hücrenin ekvatorial düzleminden yer alır. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, metafaz I aşamasında beş bivalent halinde organize olmuş homologlar metafaz tablasında dizilir. Anafaz I aşamasında kiyazmalar açılır ve homolog kromozomlar birbirinden ayrılır.

İkinci mayotik bölünme kromozomları kardeş kromatitler halinde ayırır ve haploid gametleri oluşturur. Dişi gametlerin sonrasında erkek gametlerle döllenmesi ile diploid durum geri kazanılmış olur (Hamant ve ark., 2006).

Bunun yanında angiospermelerin bir kısmının da ise aseksüel bir üreme şekli olan apomiksi görülmektedir.

### **1.3. Apomiksi**

Apomikside diğer aseksüel üreme şekillerinden farklı olarak bitki tohum oluşturabilmektedir. Buna karşın tohumlar döllenme olmaksızın meydana geldiği için oluşan yeni bireyler ana bitki ile genetik olarak özdeştir. Apomiksi, ilk kez 1841 yılında J. Smith tarafından *Alchornea* (*Euphorbiaceae*) bitkisinde tanımlanmıştır (Asker ve Jerling, 1992). Günümüze kadar 400'den fazla angiosperm türü ve 40'dan fazla familyanın apomikt olarak ürediği bildirilmiştir (Carman, 1997). Bunlardan en yaygın olanları *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae* familyalarıdır (Luo ve ark., 1999; Koltunow ve ark., 1995). Apomiksi ya da aseksüel tohum üretimi maternal klon döllerin oluşumu ile sonuçlanır (Koltunow ve ark., 2003, Bicknell ve ark., 2004). Bu güne kadar çalışılan apomikt bitkilerde sporofitik (adventif embriyonu) ve gametofitik apomiksi olmak üzere iki farklı mekanizma tanımlanmıştır (Asker ve Jerling, 1992; Koltunow ve ark., 1995). Sporofitik apomikside adventif embriyolar, ovül gelişiminin geç safhalarındaki olgun

ovüllerin nusellar ya da integüment dokularından farklılaşırlar. Adventif embriyoni, *Citrus* türleri başta olmak üzere *Buxaceae*, *Cactaceae*, *Euphorbiceae*, *Myrtaceae* ve *Ochidaceae* familyalarında da görülmektedir (Gustafson, 1946-47). Gametofitik apomiksi ise ovül gelişiminin erken safhalarında başlar. Diplospori ve apospori olmak üzere iki tip gametofitik apomiksi tanımlanmıştır. Her iki tipte de embriyolar mayoz geçirmemiş bir megagametofitten meydana gelmesine karşın, diplosporide embriyolar megaspor ana hücresi (MAH) farklılaştığı anda meydana gelirken, aposporide MAH farklılaştıktan sonra oluşurlar (Koltunow, 1993; Savidan, 2000; Grimaneli, 2001). Apomikt bitkilerde meydana gelen embriyo kesesi, mayoz olmaksızın meydana geldiği için kromozom sayısı yarıya indirgenmez. Sonuçta diploid ( $2n: 2m$ ) bir yumurta hücresi ve tetraploid ( $2n+2n: 4n: 4m$ ) bir merkezi hücre içeren embriyo kesesi meydana gelir. Tohum gelişimi başladığında, yumurta hücresi döllenme olmaksızın mitotik bölünmeler geçirmeye başlar ve seksüel yollarla meydana gelen embriyoların gelişim aşamalarını geçirerek bir embriyo meydana getirir. Partenogenetik olarak gelişen bu embriyolara, polenden bir gen aktarımı söz konusu olmadığı için tohumlar ana bitki ile genetik olarak özdeştir (Koltunow, 1993). Endosperm ise otonom apomikt türlerde (*Taraxacum officinale*, *Hieracium piloselloides*) döllenme olmaksızın merkezi hücrelerden gelişir. Buna karşın pseudogamik apomikt olarak adlandırılan türlerde (*Rubus armeniacus* ve *Tripsacum dactyloides*) endosperm için döllenme şarttır. Bu bitkilerde merkezi hücre  $4m$  olduğu için döllenme sonucunda eğer sperm hücresi haploid ise ebeveyn genom oranları  $4m:1p$  olacaktır. Buna karşın genomlar arasındaki  $2m:1p$  oranından sapmalar tohum ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği için kayıplara sebep olurken pseudogamik apomikt türler bu endosperm problemini çözmek için farklı mekanizmalar geliştirmişlerdir (Taskin ve ark., 2009).

Ticari öneme sahip tarım bitkileri ve tohum üretimi alanlarında bu yönüyle apomiksiye olan ilgi son yıllarda oldukça artmıştır. Seksüel bitkilere apomiksi özelliklerinin kazandırılması ile istenilen herhangi bir genotip ne kadar karmaşık olursa olsun tohumlarda nesiller boyunca sabitlenebilir (Spillane ve ark., 2001, 2004). Apomiksinin bu türlere kazandırılmasını amaçlayan çalışmalar başarısız olmuştur (Spillane ve ark., 2001, Savidan ve ark., 2001, Ozias-Akins ve ark., 2007). Bu özellik ticari öneme sahip bitkilerle apomikt akrabaların melezlenmesi ile kazandırılmaya çalışılmıştır. Bu girişimler apomiksi kalıtımı ile ilgili bilgiler sağlamış olmasına rağmen arzu edilen sonuca ulaşamamıştır (Savidan ve ark., 2001). *Poa pratensis* bitkisinde genetik lokusların sayısı belirlenmiştir (Matzk ve ark., 2005). *Hieracium caespitosum* türünde yapılan delesyon mutasyon analiz çalışmalarına bağlı olarak apomiksinin birbirine

bağlı olmayan iki lokus tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu lokuslardan biri apospor oluşumunu diğeri ise partenogenezi kontrol etmektedir (Catanch ve ark., 2006). Çok sayıda türde yapılan apomiksi haritalama çalışmaları, apomiksiyi kontrol eden bölgelerin rekombinasyon için baskılandığı konusunda birleşmiştir (Ozias-Akins ve ark., 2007). Apomikside gerekli olan genlerin birlikte ve bağlı olarak kalıtılması gerekmektedir. Apomiksi kontrol eden özel genlerin tanımlanmasına yönelik girişimlerde kullanılan standart rekombinasyona dayalı haritalama yaklaşımları bu engelle yüz yüze gelmiş ve tek bir bölgedeki bir çok gen tarafından apomiksiyi kontrol edildiği düşünülmüştür (Ozias-Akins ve ark., 2007). Apomiksinin moleküler seviyesinin anlaşılmasında kullanılan marker gen ifadelerine göre apomiksi seksüel programın ifadesinin yeniden düzenlenmesi ile ortaya çıkmıştır (Tucker ve ark., 2003). Bu mekanizmanın genetik olarak kontrol edildiği bilinmektedir (Ozias-Akins ve ark., 2007). Buna karşın, doğal apomiktlerde apomiksi ile ilgili hiçbir gen şimdiye kadar izole edilmemiştir. Apomiksinin seksüel bitkilerde uygulanması için apomiksiyi oluşturan elementleri sağlayan genler karakterize edilmelidir.

Apomiksi, mayozun geçirmemiş (rekombine olmamış ve kromozom sayısı yarıya inmemiş ( $2n$ ) yumurta hücresi oluşumunu (apomayoz) takiben döllenme olmaksızın embriyo gelişimini ifade eder. Apomikt tohum için daha sonraki gereksinim ise doğal bazı apomiktlerde olduğu gibi döllenme sonrası ya da otonom endosperm gelişimidir. Apomiksiyi kontrol eden genlerin normal seksüel gelişimde rol alan genlerin farklı alleleri olduğu düşünülmektedir (Tucker ve ark., 2003). Mayoz, gametogenezis ve tohum gelişiminde rol alan genlere yönelik birçok mutasyon çalışması yapılmıştır. *Fertilization-independent seed* mutasyonları ile otonom endosperm gelişimi keşfedilmiştir (Chaudhury ve ark., 1997). Daha sonra partenogenezin ilk safhalarını mimikri eden mutasyonlar da rapor edilmemiştir (Guitton ve Berger, 2005). Daha sonraki yapılan çalışmalarda ise *Arabidopsis* bitkisinde üçlü mutant bir hatta apomayoz benzer şekilde dişi ve erkek mayositlerin mayoz bölünme yerine mitoz bölünme geçirdiklerini ve sonuçta fonksiyonel diploid gametlerin oluştuğunu rapor edilmiştir (Mercier ve ark., 2009). Bu çalışmada *Osd1-1*, *Atspo11-1* ve *Atrec8* mutantlarından oluşan üçlü mutant genotipe “mayoz yerine mitoz” anlamına gelecek şekilde MiMe adını verilmiştir böylece bu çalışmayla birlikte ilk kez karakterize edilen *OSD1* geninin mayoz I'den Mayoz II'ye geçişi düzenlediği gösterilmiştir. Mutant hatlarda kendisi ve yabanıl tipte yapılan çaprazlama deneyleri *osd1* mutantlarının %100 oranında erkek, yaklaşık %85 oranında dişi indirgenmemiş diploid gametleri oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu hatlarda mayoz I süreci yabanıl tipten farksızken, çalışmada mayoz II sürecinde mayositler gözlemlenmemiştir. Dolayısı ile

mayoz bölünmenin mayoz I sonrası mayoz II ile devam etmediği ve diploid iki gametin meydana geldiği gösterilmiştir. Mayoz I sürecinin normal gelişmesi sonucu olarak *osdl* mutantlarında rekombinasyon yabancı tip bitkilerde görüldüğü haliyle meydana gelmektedir. Bu anlamda oluşan gametler ana bitki genotipi ile birebir özdeş değildir. Aynı grubun daha önceden tanımladığı *atspo11-1/atrec8* çifte mutantları mitoz benzeri bir mayoz I göstermiş olmasına rağmen, ikinci mayoz bölünme sürecinde eşit olmayan kromozom dağılımları sebebi ile sterildir. *Atspo11-1* mutantları mayotik profaz I aşamasında homolog kromozomların bir araya gelmesini engellemekte ve dolayısı ile rekombinasyonun gerçekleşmesini önlemektedir. *ATREC8* geni ise anafazda mayotik homolog kromozomların kutuplara ayrılmasını düzenlemektedir ve bu sebeple *atrec8* mutantları mayotik anafaz yerine mitotik anafaza benzer şekilde eş bir biçimde homolog kromozomlar yerine kromatidlerin ayrılarak kutuplara çekilmesini sağlamaktadır. Araştırmacılar bu özelliklerden faydalanarak *atspo11-1/atrec8* çifte mutantının mitoz benzeri mayoz I fenotipini mayoz II'nin gerçekleşmediği *osdl* mutantıyla bir araya getirmiş ve sonuç olarak mayoz yerine tek bir mitoz bölünme geçiren üçlü mutant *Arabidopsis* hattı elde etmişlerdir.

#### **1.4. AT5G51330 Geni**

Seksüel süreçlerle tohum veren bir model organizma *A. thaliana* türünde *DYAD/SWITCH1* (*AT5G51330*) geninin mayozda kromozom organizasyonu düzenlediği bildirilmiştir (Motamayor ve ark., 2000; Siddiqi ve ark., 2000; Cai ve ark., 2001). Bununla birlikte, *AT5G51330* geninde başka bir mutasyonun ise apomayoza benzer şekilde diploid (2n) gamet oluşumuna yol açtığı bulunmuştur (Ravi ve ark., 2008). Bu buluş bilinen tek bir genin değiştirilmesiyle seksüel bir bitkide apomiksi elemanlarının başarılabilceğini göstermiştir. Bu çalışmada ilgili mutasyon sadece dişi mayozda etkilidir. Bu mutantlar az sayıda da olsa triploid tohum oluşturmaktadır. Çalışmada, triploid tohumların mayoz geçirmemiş (2n) dişi ve haploid (n) erkek gametlerin birleşmesi aracılığı ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu güne kadar, *AT5G51330* genine ait dört farklı *Arabidopsis* mutant hat (*swi1.1*, *swi1.2*, *dyad* ve *dsy10*) incelenmiş ve karakterize edilmiştir (Motamayor ve ark., 2000; Siddiqi ve ark., 2000; Cai ve ark., 2001; Mercier ve ark., 2001). İlginç olarak *swi* allelerinin çoğunda (*swi1.2*, *swi1.1*) farklı fenotip gözlenmiştir.

Bunlar arasında daha önceden tanımlanmış *swi1.2* mutantında dişi ve erkek gametler kısırdır (Mercier ve ark., 2001). Bu mutantlarda dişi mayositlerde apomayoza benzer bir şekilde 5 bivalent yerine 10 univalent meydana getirdiği için tetrad yerine dyad oluşturur.



*Swi1.1* mutant *Arabidopsis* hatlarında ise erkek mayoz normal iken dişi mayozda metafaz I aşamasında sinaps ve bivalentler gözlenmez (Motamayor ve ark., 2000).

*Dyad* mutantlarında ise dişi mayositlerde sinaps oluşmamış dolayısı ile metafaz I aşamasında beklenen 5 bivalent yerine 10 univalent gözlendiği bildirilmiştir (Siddiqi ve ark., 2000; Agashe ve ark., 2002; Ravi ve ark., 2008). Bu mutantlarda erkek mayoz süreci ise normaldir.

*Dsy10* mutant hatlarında ise dişi ve erkek mayozda profaz ve metafaz I aşamalarında bivalentler gözlenmemiştir (Cai ve ark., 2001; Boateng ve ark., 2008). Yukarıda tanımlanan mutant hatlar çoğunlukla mayoz II sonucunda kromozomları eşit dağılım göstermeyen hücreler oluştuğu için kısırır. Buna rağmen *AT5G51330* mutantlarında az sayıda da olsa triploid tohum oluşması bu mutantların fonksiyonel gametler üretebildiğini işaret etmiştir. *AT5G51330* mutantlarında gözlenen bu durum apomiksinin bir parçası olan apomayoza benzerlik göstermektedir. Tek bir gende meydana gelen bir mutasyonla apomayoza benzer bir fenotipin ortaya çıkmış olması apomiksinin seksüel türlere aktarılmasında gelecek vaat eden bir gelişmedir.

*AT5G51330* geni 8 ekzon ve yaklaşık 1997 bç. uzunluğundadır transkripte sahiptir. Bu gen, mayozda kardeş kromatid kohezyonu, mayotik kromozom organizasyonu ve rekombinasyonda gerekli, benzerleri daha önce tanımlanmamış, nukleusta lokalize olan, 639 aminoasitten oluşan Fosfolipaz C aktivitesine sahip bir protein kodlamaktadır (TAIR). Buna rağmen doğal apomikt türlerde bu genin yapısı ve fonksiyonu incelenmemiştir.

Bu çalışmada, seksüel yollarla tohum oluşturan *A. thaliana* bitkisinden karakterize edilen *AT5G51330* geninin doğal apomikt *Boecheira* türlerindeki ortoloğu karakterize edilmiştir. *Boecheira* türleri *Brassicaceae* familyasında yer alır ve birçok moleküler genetik uygulamasının mümkün olduğu *A. thaliana* ile yakın akrabadır (Koch ve ark., 2003; Dobs ve ark., 2004). Buna karşın iki türün üreme mekanizmaları son derece farklıdır. Bu sebeple *Boecheira* türleri apomiksinin moleküler mekanizmasının ve seksüel üreme ile apomiksi arasındaki moleküler farklılıkların belirlenebilmesi için model bitki olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada apomikt ve seksüel *Boecheira* türlerinde *AT5G51330* ile homolog genomik DNA ve cDNA dizileri ile elde edilmiştir. *AT5G51330* geni ile homolog *Boecheira* türlerine ait bu diziler biyoinformatik araçlarla incelenmiştir. *AT5G51330* geninin apomikt bitkilerdeki fonksiyonu henüz belirlenmemiştir. Bu nedenle, doğal apomikt türlerde bu genin ortoloğunun tanımlanması, bu genin apomiktik üreme süreçlerindeki rollerini aydınlatmada yararlı olacaktır.

## **BÖLÜM 2**

### **ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Motamayor ve ark. (2000) çalışmalarlarıyla *AT5G51330* genine ait ilk mutant alel olan *swi1-1* alelini tanımlamışlardır. Bu mutasyonun etkilerinin megasporogenez sürecinde etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu mutant hatlarda megaspor ana hücreleri fazladan mitoz bölünmeler geçirerek mayoz bölünmeyi geciktirmektedirler. Ayrıca bu hücrelerde hücre kutuplaşmasında anormallikler gözlenmiştir. *Swi1-1* mutant *Arabidopsis* bireylerinde erkek mayoz normal iken dişi mayotik süreçte metafaz I aşamasında sinaps oluşumu görülmemiş ve metafaz tablasında bivalentler yerine univalentler gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak *SWI1* geninin hücre kutuplaşmasında, mitoz ve mayoz bölünme arasında geçişte rol aldığı düşünülmüştür.

Siddiqi ve ark. (2000) yılında *AT5G51330* geninin *dyad* mutantını rapor etmişlerdir. Bu mutantlarda ovüller embriyo kesesi yerine iki büyük hücre içermektedir. Bu iki hücre megaspor ana hücresinin daha sonraki gelişiminin gerçekleşmediği tek bir bölünmenin ürünleridir. Araştırmacılar bu bölünmenin mitoz veya mayoz bölünme sürecini geçirdiğini ortaya koymak için megaspor ana hücrelerinde normal koşullarda mayoz sürecinde ifade olan iki mayotik marker gen incelemiştir. Sonuç olarak megaspor ana hücrelerinin mayoz bölünmeye başladığı ancak tamamlamayı başaramadığı ortaya konmuştur. Bu hücrelerin çoğunluğunda mayoz I sonunda süreç kesilmektedir. Kromozomlar doğrudan incelendiğinde metafaz aşamasında ayrışmanın eşit bir şekilde gerçekleşmediğini ortaya koymuştur. Bunun yanında polen oluşumu ve erkek fertilitesi normaldir. Bu sebeple *AT5G51330* geninin dişi mayotik süreçte gerekli bir gen olduğu rapor edilmiştir.

Mercier ve ark. (2001), *A. thaliana* bitkisinde mayoz bölünmede kardeş kromatid kohezyonu ve bivalent oluşumu için gerekli bir geni (*AT5G51330*) karakterize etmişlerdir. Bunun için *AT5G51330* geninin mutant bir aleli olan *swi1.2* genini mutagenез yaklaşımı ile elde edip karakterize etmişlerdir. Bu mutantlar hem erkek hem de dişi sporogenez ve gametogenez aşamalarında defektli ve sonuçta sterildir. Dişi mayositlerin mayoz yerine mayoz benzer bir bölünme geçirdiği ve sonuçta 4 haploid gamet yerine 2 diploid hücrenin oluştuğu bildirilmiştir.

Cai ve ark. (2001) yılında grubun daha önceden elde ettiği erkek steril *Arabidopsis* hatları içerisinde 7219 numaralı mutant hattın ayrıntılı sitolojik bir analizi yapılmıştır. Bu mutasyon çoğunlukla sinaps oluşmamasına sebep olmaktadır. Bu hücrelerde metafaz I aşamasında on kardeş kromatid gözlenmektedir. Homolog kromozomlar diploten aşamasına kadar normal gözlenirken bu evreden sonra ayrılmaya başlamakta ve diakinez

aşamasında on univalent gözlenmektedir. Kromozomlar bu aşamalarda sentromer bölgelerinden normal olarak bağlanmış durumdadırlar.

Agashe ve ark. (2002), *Arabidopsis thaliana* bitkisinde mayotik kromozom organizasyonu ve dişi mayotik süreçte gerekli olan *AT5G51330* genini karakterize etmişlerdir. *AT5G51330* geninin mutant bir aleli olan *AT5G51330* geninin mayotik profaz aşamasında kromozom kohezyonunun bozulmasına dolayısıyla metafaz I aşamasında 5 bivalent yerine 10 univalentin görülmesine neden olduğu bildirilmiştir. *AT5G51330* RNA'sının mayoz öncesi interfaz ve mayotik profaz sırasında ovul ve anterlerdeki mayositlerde var olduğu gösterilmiştir.

Mercier ve ark. (2003) *AT5G51330* geninin kardeş kromatid kohezyonunun oluşumunda rol aldığını rapor etmişlerdir. Mayotik kromozomla ilişkili proteinlerin immünolokalizasyonunu da içeren sitolojik yöntemlerle SWI1 proteininin aksial elementlerin oluşumu için gerekli olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *swi1-2* mutasyonu mayotik profazda RAD51 proteini fonksiyonu gibi bazı mayotik mekanizmaların etkilendiği gözlenmiştir. Bu bilgilere dayanılarak *AT5G51330* proteininin mayotik rekombinasyonun başlatılmasından sorumlu olabileceği rapor edilmiştir. İmmünolokalizasyon çalışması bu genin mayotik S ve G1 süreçlerinde ifade olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak SWI1 geni kardeş kromatid kohezyonu, rekombinasyon ve aksial element oluşumunda rol alan bir gen olarak tanımlanmıştır.

Albertini ve ark. (2004) *Poa pratensis* türünde cDNA-AFLP metodu ile bu türün seksüel ve apomiktik genotiplerinde apomiksinin ilk aşamalarında ifade olan 2248 transkript elde edilmiştir. Bu transkriptlerden seksüel ve apomikt bitkilerde farklı ifade olan 179 sekans elde edilmiştir. Üç EST ifade özellikleri ve blast sonuçlarına göre daha ileri moleküler karakterizasyon çalışmaları için seçilmiştir. Bu diziler RAB1-benzeri, b-catenin-benzeri ve Ankyrin protein kinaz benzeri genlere karşılık gelmektedir. Bu transkriptlerin dizileri RACE yöntemi ile elde edilmiştir ve daha ileri çalışmalar için hedef olarak gösterilmişlerdir.

Albertini ve ark. (2005) yılındaki çalışmalarında *Poa pratensis* türünde apomiksi ile alakalı olduğunu önerdikleri SERK ve APOSTART genlerini tanımlamışlardır. Bu genlerin ifadelerinin seksüel ve apomikt bitkilerde farklı olduğunu ve hücre sinyal iletiminde muhtemel rollerini ortaya koymuşlardır. *SERK* geninin bu türde nusellar hücrelerde embriyo kesesinin oluşmaya başlamasında bir anahtar görevi gördüğünü rapor etmişlerdir. *Poa* türünde Catanach ve ark. (2006) yılında yapılan bir çalışmada *Hieracium* türünde delesyon haritalama metodu benimsenmiş ve bu türde apomayoz ve partegogenezle ilişkili

olduğu görülen iki locus tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi apomayozun engellenmesi, diğeri ise döllenme (partenogenez) ile ilgili süreçlerle alakalıdır. Bu çalışmada elde edilen *Loa1* mutanı daha sonra daha ayrıntılı olarak incelenmiştir (Catanach ve ark., 2006).

Okada ve ark. (2007) çalışmasında apomayozla alakalı olduğunu gösterdikleri “loss of apomeiosis 1” mutanını araştırmışlardır. Bu mutant somaklonal varyasyon sonucu oluşmuş ve apomikt tohum üretme özelliğini kaybetmiş bir hat olarak elde edilmiştir. Çalışmaya konu olan *Hieracium* türü aposporik bir apomiksi süreci göstermektedir. *Loa1* mutantlarında bu süreçte aposporik öncül hücrelerin oluşmadığı ve oluşan az sayıda tohumun normal mayoz süreciyle oluştuğu gösterilmiştir. Bu apomiksi türünde indirgenmemiş embriyo kesesi ovül içerisindeki somatik hücrelerden mitoz bölünmelerle oluşmaktadır. Bu bitkilerde indirgenmemiş sporların meydana gelmesi apomayoz olarak adlandırılmasına rağmen diplosporik apomiksidede görülen apomayoz sürecinden farklıdır.

Ravi ve ark. (2008), *A. thaliana* bitkisinde mayotik kromozom organizasyonunun bir düzenleyicisi olan *AT5G51330* geninde bir mutasyonun apomayozu yani mayoz bölünme olmadan gamet oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Seksüel bir bitki olan *A. thaliana* bitkisinde bu mutasyonun polen oluşumunu etkilemediği ancak dişi mayositlerde mayoz normal gerçekleşmediğinden dişi steril bir mutant olduğu gösterilmiştir. Buna karşın az da olsa tohum oluşumunun gerçekleştiği ve bu tohumların neredeyse tamamının triploid olduğu bildirilmiştir. Bu tohumların diploid dişi gametle haploid erkek gametin birleşmesi ile oluşmuş olması gerektiği öne sürülmüştür. Ayrıca bitkilerde tohum ve çiçek büyüklükleri açısından poliploidi derecesine göre değişen farklılıkların olduğu gösterilmiştir. Bu farklılıklar genetik etiketlenme denilen maternal (anasal) ya da paternal (babasal) etkiden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Çalışmada tek bir gendeki bir değişimle seksüel bir bitkide doğal apomikt bir bitkideki benzer şekilde apomiksinin önemli bir adımı olan fonksiyonel bir apomayozun ortaya çıkabileceği bildirilmiştir.

Boateng ve ark. (2008) daha önceden dişi ve erkek steril ve sinaps oluşumunun anormal olduğu bir mutant olarak tanımlanmış *dsy10* mutantının moleküler analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu mutant hatlar *AT5G51330* geninin üçüncü ekzonunda bir t-dna insersiyonu içermektedir. Bu mutasyon *swi1-1* ve *dyad* mutantlarının aksine erkek ve dişi mayoz sürecini etkilemektedir. Mayoz sürecinde *swi1-2* alelinin kesilmiş bir formu mayositlerde ifade olmaktadır. Bunun aksine *dsy10* mutanı tam bir fonksiyon kaybına sebep olmaktadır. Bu sebeple iki mutant arasında erkek mayozda kardeş kromatid kohezyonunun erken kaybı ve aksial elementlerin oluşumunda farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca *dsy10* mutant bitkilerde dişi ve erkek mayozda diploten ve diakinez aşamalarında

10 univalent gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre *dsy10* mayotik kromozomların bir araya gelip çiftleşmesi gerçekleşmemektedir. Buna rağmen sentromer bölgelerinde birleşme gerçekleşmektedir. Ayrıca kardeş kromatid kohezyonu bu mutantlarda mayoz II sürecine kadar korunmaktadır. Diğer çalışmalarla birlikte elde ettikleri sonuçlara göre *AT5G51330* genini mayotik kromatin organizasyonu kardeş kromatid kohezyonu, çiftleşme, sinaps ve rekombinasyon süreçlerinde etkili bir gen olarak tanımlamışlardır.

Mercier ve ark. (2008) yılında *AtPSI* geninde meydana gelen mutasyonların *Arabidopsis* bitkisinde diploid polen tanelerinin oluşmasına sebep olduğunu rapor etmiştir. Bu mutantlarda erkek gametofitlerde canlı polen tanelerini oluşturabilen diploid erkek sporlar meydana gelmekte ve bir sonraki nesilde kendiliğinden triploid bitkiler oluşmaktadır. Erkek mayoz incelendiğinde mutant *AtPSI* hatlarında mayoz II’de anormal iplikçiklerin oluştuğu ve sonuçta 4 takım yerine 2 takım kromozom grubunun oluştuğu anafaz II evresi gözlenir. Bunun yanında metafaz II evresine kadar mayoz yabanıl tipten farksızdır. Dişi mayotik süreç bu mutasyondan etkilenmemiş dolayısı ile dişi gametler yabanıl tipte olduğu şekliyle üretilmektedir.

Taskin ve ark. (2009) doğal apomikt ve seksüel *Boechera* türlerinde polen ana hücrelerinin gelişim aşamaları ortaya koymuştur. Triploid apomikt *B. holboellii* türünde polen ana hücresi mayoz süreci incelenmiştir. Profaz I aşamasında, nükleus ve nükleus zarı halen kaybolmamış iken, nükleus içerisinde kromozomlar uzun iplikler şeklinde kalınlaşmaya başlar. Sonrasında bivalent ve trivalentlerin oluşumundan anlaşıldığı üzere homolog kromozomlar ortaya çıkar ve tam olarak eşleşmelerini gerçekleştirirler. Nükleolus ve nüklear membran hemen ardından kaybolmaya başlar. Takip eden metafaz I aşamasında, homolog kromozomlar ekvatoryal düzlemde organize olmaya başlar. Bu aşamada her bir polen ana hücresi yoğunlaşmış kromozomların anafaz ve telofazda iki eş grup olarak ayrılamamış ve sonuçta yarılanmamış bir nükleus oluşturur. Bu durum ayrıca diğer apomikt bitkilerde mayozun atlanması yani apomayoz olarak bilinmektedir. Ardından yarılanmamış nükleus, kalloz duvarı ile çevrili dyadları oluşturmuş ve tek bir sitokinez aşaması ile takip edilen tek bir mitoz geçirir.

Pawlowski ve ark. (2009) *AMEIOTIC1* geni mısır bitkisinde klonlanmış mayoz bölünmenin başlatılmasından sorumlu bir gen olarak tanımlanmıştır. Bu gene ait *ameiotic1-1 (am1-1)* mutant hatlarda erkek ve dişi mayositler mayoz bölünme yerine mitoz bölünmeler geçirmektedir. Bu mutantlarda homolog kromozomlar bir araya gelmemekte ve kardeş kromatid kohezyonu gerçekleşmemektedir. Yapılan çalışma *AMI* geni aktivitesinin mayoz spesifik genlerin ifadesinin düzenlenmesi, mayotik kromozom yapısının

oluşturulması, mayoz spesifik telomer yapısının meydana gelmesi, mayotik rekombinasyon, homologların çiftleşmesi, sinaps oluşumu gibi mayotik olayların gerçekleşmesinde gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Mısır bitkisine ait bu gen sonuç olarak *AT5G51330* geni mutantlarında görülen mayoz yerine mitoz benzeri bölünme ile benzer fenotipler göstermektedir. Bunun yanında *AMEIOTIC1* proteini *AT5G51330* geni ile %30 oranında bölgesel bir benzerlik göstermektedir. Bu bilgiler bu genlerin yüksek ihtimalle fonksiyonel homolog genler olduklarını göstermektedir.

Mercier ve ark. (2009) yılında *Arabidopsis* bitkisinde üçlü mutant bir hatta apomayoza benzer şekilde dişi ve erkek mayositlerin mayoz bölünme yerine mitoz bölünme geçirdiklerini ve sonuçta fonksiyonel diploid gametlerin oluştuğunu rapor etmişlerdir. *Osd1-1*, *Atspo11-1* ve *Atrec8* mutantlarından oluşan üçlü mutant bu genotipe “mayoz yerine mitoz” anlamına gelecek şekilde MiMe adını vermişlerdir. Bu çalışmayla birlikte ilk kez karakterize edilen *OSD1* geninin mayoz I'den Mayoz II'ye geçişi düzenlediği gösterilmiştir. Mutant hatlarda kendisi ve yabancı tipte yapılan çaprazlama deneyleri *osd1* mutantlarının %100 oranında erkek, yaklaşık %85 oranında dişi indirgenmemiş diploid gametleri oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu hatlarda mayoz I süreci yabancı tipten farksızken, çalışmada mayoz II sürecinde mayositler gözlemlenmemiştir. Dolayısı ile mayoz bölünmenin mayoz I sonrası mayoz II ile devam etmediği ve diploid iki gametin meydana geldiği gösterilmiştir. Mayoz I sürecinin normal gelişmesi sonucu olarak *osd1* mutantlarında rekombinasyon yabancı tipte bitkilerde görüldüğü haliyle meydana gelmektedir. Bu anlamda oluşan gametler ana bitki genotipi ile birebir özdeş değildir. Aynı grubun daha önceden tanımladığı *atspo11-1/atrec8* çifte mutantları mitoz benzeri bir mayoz I göstermiş olmasına rağmen, ikinci mayoz bölünme sürecinde eşit olmayan kromozom dağılımları sebebi ile sterildir. *Atspo11-1* mutantları mayotik profaz I aşamasında homolog kromozomların bir araya gelmesini engellemekte ve dolayısı ile rekombinasyonun gerçekleşmesini önlemektedir. *ATREC8* geni ise anafazda mayotik homolog kromozomların kutuplara ayrılmasını düzenlemektedir ve bu sebeple *atrec8* mutantları mayotik anafaz yerine Mitotik anafaza benzer şekilde eş bir biçimde homolog kromozomlar yerine kromatidlerin ayrılarak kutuplara çekilmesini sağlamaktadır. Araştırmacılar bu özelliklerden faydalanarak *atspo11-1/atrec8* çifte mutantının mitoz benzeri mayoz I fenotipini mayoz II'nin gerçekleşmediği *osd1* mutantıyla bir araya getirmiş ve sonuç olarak mayoz yerine tek bir mitoz bölünme geçiren üçlü mutant *Arabidopsis* hattı elde etmişlerdir.

### BÖLÜM 3

#### MATERYAL VE YÖNTEM

##### 3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışmada bitki materyali olarak, *Brassicaceae* familyasına ait triploid apomikt *B. gunnisoniana* ve *B. holboellii*, ve diploid *B. divaricarpa* ve seksüel *B. stricta* türleri kullanılmıştır. *B. holboellii*, *B. gunnisoniana* ve *B. divaricarpa* türlerine ait tohumlar Prof. Dr. Rod J. Scott (Bath Üniversitesi, İngiltere)'dan, *B. stricta* türüne ait tohumlar ise Dr. Eric Schranz (Amsterdam Üniversitesi, Hollanda)' dan temin edilmiştir ve Schranz ve ark. (2005), tarafından önerilen yönteme göre yetiştirilmiştir.

Tohumlar nemli filtre kağıdı içeren petri kaplarında +4°C'de karanlıkta 21 gün vernalize edilmiştir. Ardından tohumların çimlenmesi için petriler 21°C sıcaklıktaki, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabinine alınmıştır. Çimlenen fideler, 121°C'de 20 dk. sürede otoklavlanmış torf:perlit (4:1) içeren viyollere alınmış ve 21°C sıcaklıktaki, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabininde 3 hafta süre ile yetiştirilmiştir. Ardından fideler daha büyük saksılara aktarılmış ve aynı yetiştirilme koşullarında 1 hafta daha yetiştirilmiştir. Daha sonra bitkiler eş zamanlı çiçeklenmeyi uyarmak amacı ile fotoperiyodu 16 saat karanlık/8 saat aydınlık, sıcaklığı +5°C/+10°C olan iklim kabininde 6 hafta süre ile ikinci kez vernalize edilmiştir. Vernalizasyonun bitiminde bitkiler tekrar 21°C sıcaklıktaki, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabininde yetiştirilmiştir.

##### 3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Yaprak, çiçek ve süluk gibi üç farklı dokudan (100 mg) DNA izolasyonu (Edwards ve ark., 1991) önerildiği yönteme göre yapılmıştır. Bitki dokusu porselen havan içinde sıvı azot ile ezilerek homojenize edilmiştir. Ardından bir spatül yardımı ile 1,5 ml lik eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 400 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Homojenat vortekslenip, oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiş ve 13.000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı temiz bir tüpe alınmış, süpernatanı içeren eppendorf tüpü üzerine eşit miktarda Phenol:chloroform:izoamylalcohol (25:24:1) eklenip, tüp birkaç defa alt üst edilmiş ve 13.000 rpm. de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz (süpernatant) yeni bir tüpe alınıp, 500 µl %96 lık soğuk ethanol eklenmiş ve tüp altüst edilerek 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnek 13.000 rpm. de 5 dk. santrifüj edilmiş ve alkol dökülerek uzaklaştırılmıştır. Pellet %70'lik alkolde yıkanmış, tüpler kapağı açık şekilde oda sıcaklığında alkol uzaklaşmaya kadar bekletildikten sonra 50 µl steril dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülmüştür. DNA örnekleri kullanıma kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

**3.2.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan Tamponların Hazırlanması****3.2.1.1. Ekstraksiyon tamponu (100ml)**

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.

**3.3. RNA İzolasyonu**

Çalışmada RNA izolasyonu, gelişimlerinin erken aşamalarındaki henüz çiçek açmamış tomurcuklardan yapılmıştır. Öncelikle sterio 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 mikrosantrifüj tüpü içerisinde pestil yardımıyla iyice ezilmiştir. Daha sonra Purelink RNA Mini Kit (İnvitrogen – 12183-018A) kullanılarak dokulardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA miktarı florometrik yöntemle (Invitrogen Qubit Fluorometer) belirlenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri - 80°C'de muhafaza edilmiştir.

**3.3.1 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 çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
  - a. Her örnek için 200 µL tamponu kullanılmıştır.
  - b. Her örnek için 1 µL dye kullanılmıştır.
  - c. Karışım vortekslenmiştir.



2. Standartlar için 2 assay tüpüne 190 µL çalışma solüsyonukullanılmıştır.
3. Assay tüpüne her standarttan 10 µL eklenip vortekslenmiştir.
4. Örnekler için 180 – 199 µL çalışma solüsyonuassay 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 sonra ise örnekler olmak üzere gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. 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 3.1’ de gösterilmiştir. Reaksiyon (RNaz-DNaz free) pipet uçları ve ince cidarlı 200 µl’ lik PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kalıp RNA, oligo(dT)18 primer ve DEPC-uygulanmış su tüplere konularak 65°C’ de 5 dk. İnkübedilmiştir. 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 cycler’ cihazında (BIO-RAD) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)
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</b>	<b>20 µl</b>

### 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

*AT5G51330* geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler, Primer3 (Rozen ve Skaletsky., 2000) ve NCBI primer blast (primer desinging tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) programı kullanılarak *A.thalianaAT5G51330* geni referans alınarak dizaynedilmiştir (Çizelge 3.2). PCR, proofreading aktivitesine sahip High Fidelity PCR Enzyme Mix (#Fermentas K0192) ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon kurulurken tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir ve filtreli pipet uçları (RNase-DNase-free), ince cidarlı (200µl) PCR tüpleri kullanılmıştır.

*AT5G51330* geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmeden önce PCR koşulları (TM ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu) optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında primerlerin bağlanma sıcaklığı 50-65°C aralığında Gradient PCR ile test edilmiş ve farklı reaksiyonlarda MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 1 – 4 mM denenmiştir. Ayrıca farklı cDNA kalıp miktarları ile reaksiyonlar kurulmuş ve PCR için kullanılacak cDNA miktarı optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda Çizelge 3.2’de verilen parametreler optimum koşullar olarak belirlenmiştir.

Kalıp olarak kullanılan cDNA’ların kalitesini kontrol etmek amacı ile bitkinin tüm dokularında sürekli ifade olduğu bilinen *ACTIN2* genine ait primerler ile birer reaksiyon kurulmuştur ve bu primerden 250 bç’lik DNA bandı beklenmiştir. *ACTIN2* (At3g18780) geni için kurulan reaksiyonda çizelgede verilen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu kontrol reaksiyonu kurulduktan sonra Çizelge 3.3’te verilen PCR programı uygulanmıştır. Optimizasyon sağlandıktan sonra *AT5G51330* geninin çoğaltımına geçilmiştir. *AT5G51330* geni PCR reaksiyonu Çizelge 3.4’de verilen oranlara göre kurulmuştur. Ayrıca

kontaminasyon olup olmadığını göstermek için kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu da kurulmuştur.

Çizelge 3. 2. PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final konsantrasyon
10 mM dNTP mix	2,5	0,2 mM
Nuclease- free H <sub>2</sub> O	12,75	
High Fidelity PCR Enzyme Mix	0,25	2,5 u
10X High Fidelity PCR Buffer ( Tampon )	2,5	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub> solüsyonu	2,5	2 mM
Kalıp cDNA	2,5	
10 pmol/µl reverse primer	1	0,4 pmol
10 pmol/µl forward primer	1	0,4 pmol
Toplam hacim	25 µl	

Çizelge 3. 3. AT5G51330 geni için kullanılan PCR segmentleri ve döngü sayısı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	
Annealing (Primerlerin bağlanması)	60	30 sn.	35
Extension (uzama)	72	2,5 dk.	
Final extension	72	10	1

Çizelge 3. 4. *ACTIN2* geni için kullanılan PCR programı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	
Annealing (Primerlerin bağlanması)	60	30 sn.	35
Extension (uzama)	72	2,5 dk.	
Final extension	72	10	1

### **3.6. Agaroz Jel Elektroforezi**

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Agaroz (sigma A5093) hassas terazide 0,5 g tartılmış ve 50ml 1XTAE tampon içinde 120°C'de eritilip 55°C ısıya ulaşınca kadar soğutulmuştur. Daha sonra içerisine 5 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml) eklenmiş ve homojen olarak karışması sağlanmıştır. Ardından, içerisine tarak yerleştirilmiş olan jel tepsisine dökülmüştür. Jelin katılaşması için 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra tarak çıkartılmış ve jel 1XTAE tampon bulunan elektforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin 1cm üzerinde olacak şekilde tanka 1XTAE tamponu eklenmiştir. Örnekler ve marker (Fermentas DNA ladder SM0311, SM0633) 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektrofrezde kullanılan markerların haritası gösterilmiştir (Şekil 3.1). Jel 6,5V/cm'de 80 dakika yürütülmüştür. Ayrılan PCR ürünlerinin resimleri ultra violet transilluminator (UV) tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

#### **3.6.1. Elektrofrezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması**

##### **3.6.1.1 10XTAE Tamponu**

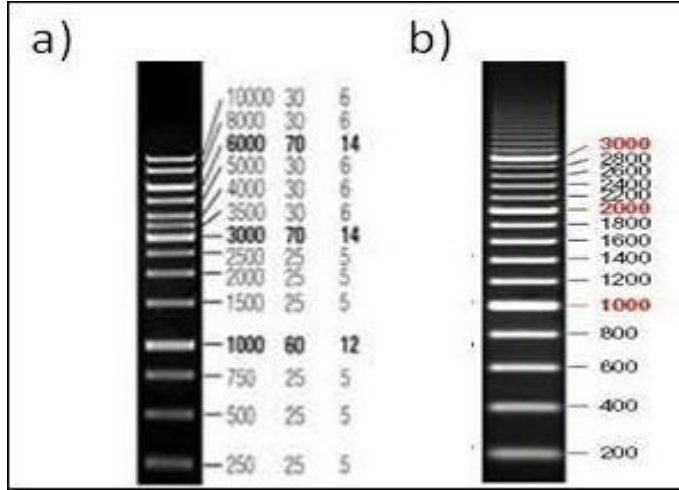
48,44 g Tris base, 3,72 g EDTA 900ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülmüş ve tamponun pH'ı asetik asit (12 ml) ile 8,0'e ayarlanmıştır. Tamponun son hacmi dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

##### **3.6.1.2 Ethidium Bromide Stok Çözeltisi**

0,1 g ethidium bromide 10 ml dH<sub>2</sub>O içinde karıştırılarak çözdürülmüştür. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kaplanıp karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

##### **3.6.1.3 1XTAE Tamponu**

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



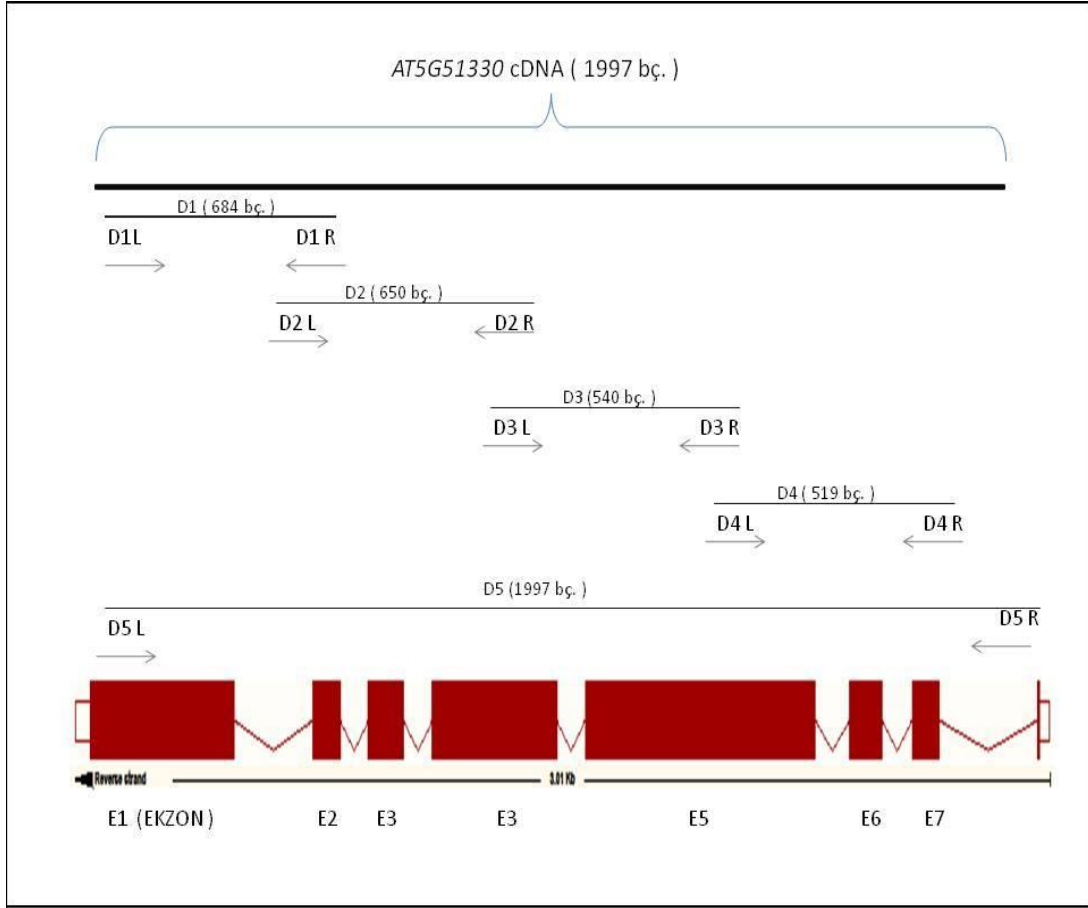
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritaları a) 1 KB DNA ladder (SM0311). b) 200 bp DNA Ladder (SM0633-FERMENTAS).

Çizelge 3. 5. PCR’ da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

Primer	Baz dizilişi
D1 Right	5'-TCATCCTTCACTCTAGAACTCTCCTC-3'
D1 Left	5'-GGAACGAAGATTATCGAGAGCA-3'
D2 Right	5'-GTCACCAAGCTTCCAACCAG-3'
D2 Left	5'-TCAAGTGGGGAAGGAGATTG-3'
D3 Right	5'-TGTCTCTGTTGAGTCTGGCTTT-3'
D3 Left	5'-AGGCCAGAGTTGAGGTCAGA-3'
D4 Right	5'-TGCATCAGTTTCCAGTGACAA-3'
D4 Left	5'-CAA AATTGAGGACCAGCTAGTGA-3'
D5 Right	5'-CTTGTAGGGAAAGTAAGATCTGATGC-3'
D5 Left	5'-GGAGGAACGAAGATTATCGAG-3'
Actin 2 Left	5' -TGGTGAAGGCTGGATTTGC -3'
Actin 2 Right	5' -TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC- 3'

Çizelge 3. 6. Primerlerden Beklenen PCR Ürünü

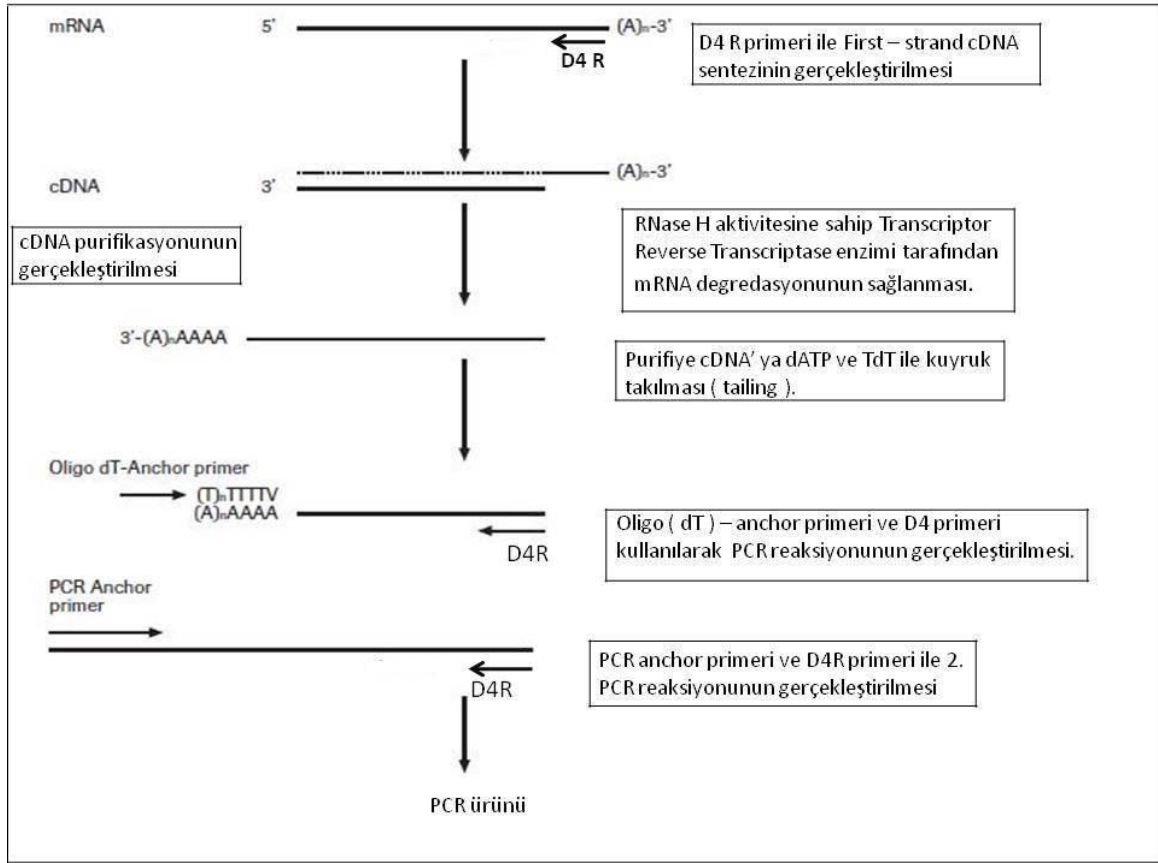
Primer Çifti Uzunluğu	Kullanılan Primerler		Beklenen Bant
D1	D1 Left	D1 Right	684 baz çifti
D2	D2 Left	D2 Right	650 baz çifti
D3	D3 Left	D3 Right	540 baz çifti
D4	D4 Left	D4 Right	519 baz çifti
D5	D5 Left	D5 Right	1997 baz çifti
D6	D1 Left	D2 Right	1243 baz çifti
D7	D1 Left	D2 Right	1830 baz çifti
D8	D2 Left	D3 Right	1489 baz çifti
D9	D4 Left	D5 Right	784 baz çifti
D10	D2 Left	D5 Right	1910 baz çifti
D11	D3 Left	D5 Right	1413 baz çifti
D12	D1 Left	D1 Right	1190 baz çifti
Actin2	Actin2 Left	Actin2Right	270 baz çifti



Şekil 3. 2. AT5G51330 geni ve dizayn edilen primerler.

### 3.7. RACE

AT5G51330 genine ait tam uzunlukta (full-length) cDNA elde etmek üzere 5' RACE yöntemi kullanılmıştır. Bunun için *Boechera stricta* genç tomurcuk dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonunun ardından 5'/3'RACE Kit (Roche - 03353621001) kullanılarak protokolün önerdiği şekilde (Şekil 3.3) özel bir primer (D4 Right) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA Gene Jet PCR purification Kit (Fermantas-K0701) kullanılarak saflaştırılmıştır. Daha sonraki aşamada ise cDNA 3' ucuna rekombinant Terminal Transferaz enzimi ve dATP kullanılarak homopolimerik kuyruk (tailing) eklenmiştir. PCR aşamasında ise 3' uçtaki bu bölgeye bağlanabilen Oligo dT-anchor primer ve D4 Right primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler (Çizelge 3.7) ve PCR programı (Çizelge 3.8) çizelgede verilmiştir. Ayrıca her aşamada reaksiyonun doğruluğunun kontrolü için pozitif kontroller kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları (Çizelge 3.10), kontrol primerleri ve baz dizileri gösterilmiştir (Çizelge 3.9).



Şekil 3.3. 5'/3'RACE Kit (Roche - 03353621001) protokolünün önerdiği 3' RACE yöntemi.

### 3.7.1. cDNA Purifikasyonu

cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra reaksiyon artıklarının, gereksiz olan nükleotid ve primerlerin uzaklaştırılması 5' uca poli- A kuyruğunun doğru ve uygun bir şekilde takılması için önem taşımaktadır. Purifikasyon için Gene Jet PCR purification Kit (Fermantas-K0701) kullanılmıştır.

- PCR karışımıyla aynı hacimdeki Binding Buffer vortekslenmiştir. Karışımın rengi kontrol edilmiştir. Karışımın renginin sarı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Sarı renk DNA bağlanmasının optimum pH' da gerçekleştirildiğinin göstergesidir (Karışımın renginin mor ya da turuncu olması durumunda 10µL 3 M Sodyum Asetat eklendiğinde karışımın rengi tekrar sarıya döner.)
- GeneJET purification column' a 800 µL' ye kadar ilk adımdaki solusyon yüklenip 30-60 saniye 13.000 rpm.' de santrifüj edilip pellet uzaklaştırılmıştır.
- 700 µL Wash Buffer eklenip 60 saniye 13.000 rpm.' de santrifüj edilip pellet uzaklaştırılmıştır. Daha sonra GeneJet Purification column collection tube' a tekrar geri koyulmuştur.



- d. Daha sonra GeneJet Purification column 1 dakika boş olarak santrifüj (13.000 rpm.) edilmiştir.
- e. Gene Jet Purification column 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine alınıp merkezine gelecek şekilde 50 µL Elition Buffer yüklenmiştir ve 1 dakika santrifüj edilmiştir (13.000 rpm.).
- f. GeneJET purification column daha sonra atılıp 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerindeki örnek -20 ° C' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3. 7. Optimum RACE - PCR bileşenleri ve Konsantrasyonları

Bileşen	Miktar(µl)
dA-tailed cDNA	5
Oligo dT-anchor primer	1
Primer (12.5 µM)	1
Deoxynucleotide mixture	1
High Fidelity PCR Enzyme Mix, 5 U/ µl	0,5
10X High Fidelity PCR Buffer	5
Nuclease-freewater	36.5
<b>Toplam</b>	<b>50</b>

Çizelge 3. 8. *AT5G51330* geni RACE - PCR segmentleri ve döngü sayısı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	15 sn.	
Annealing (Primerlerin bağlanması)	60	30 sn.	10
Extension (uzama)	72	40 sn.	
Denaturasyon	94	15 sn.	
Annealing	60	30 sn.	25
Extension	72	40+20 sn./cycle	
Final Extension	72	7 dk.	1

Çizelge 3. 9. RACE PCR için kullanılan kontrol primerleri ve beklenen baz uzunluğu

Reaksiyon	Kullanılan Primerler	Beklenen Baz Uzunluğu
cDNA sentezi	neo3/for neo2/rev	157 baz çifti
dA- tailed c DNA sentezi	neo2/rev oligo (dT)-anchor	293 baz çifti

Çizelge 3. 10. RACE – PCR kontrol bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)
dA tailed DNA/cDNA	1
Kontrol primeri/rev.	1
Kontrol primeri/for.	1
Deoxynucleotide mixture	1
High Fidelity PCR Enzyme Mix, 5 U/ µl	0,5
10X High Fidelity PCR Buffer	5
Nuclease-freewater	40.5
Toplam	50

### 3.8.1 Jelden DNA Saflaştırılması

PCR ürünleri UV tablasında görüntülenmiş ve beklenen DNA bantları steril bir bisturi ile UV'yle uzun süreli etkileşiminden sakınılarak kesilip jelden alınmıştır. Daha sonra ilgili PCR ürünleri DNaz-RNaz free eppendorf tüplerine alınmıştır. Ardından Purelink PCR Purification kit (Invitrogen – K3100-01) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yönteme göre DNA bantları jelden izole edilmiştir:

- Su banyosu 50 ° C sıcaklığa ayarlanmıştır.
- İzole edilmesi istenen DNA parçası agaroz jelde bulunduğu bölgeden mümkün olduğunca az jel parçası ile steril bisturi ile kesilmiştir.
- DNA' yı içeren parçası 0,001 g' a duyarlı olan hassas terazide tartılmıştır.
- Jel parçası steril polipropilen mikrosentrifüj tübe alınmış ve hacminin üç katı kadar Gel Solution Buffer ( L3 ) ilave edilmiştir.
- Jel parçasını ve jel solüsyon tamponunu içeren tüp 50 ° C sıcaklıktaki su banyosuna en az 10 dakika bekletilmek üzere konulup jelin çözünmesini hızlandırmak için 3 dakikada bir ters – düz edilmiştir.
- Jel parçası çözüldükten sonra ek 5 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- DNA parçası, çözülmüş jel ve Gel Solution Buffer' ı içeren karışım Wash Tube' ın içindeki Quick Gel Extraction Column'a yüklenmiştir.
- 12000 rpm.' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Önceden alkol ilave edilmiş olan 500–700 µL Wash Buffer (W1) eklenmiştir.
- 1200 rpm.' de 1 dakika santrifüj edilip pellet uzaklaştırılmıştır.

- k. Kalan Wash Buffer ve etanolün uzaklaştırılması için 2 – 3 dakika en yüksek hızda santrifüj edilmiştir. Daha sonra Wash Tube atılıp Column Recovery Tube içine yerleştirilmiştir.
- l. Column merkezine 50 µL Elution Buffer (E5 ) eklenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- m. 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve purifiye edilen DNA böylece elüt edilmiştir.

İzole edilen DNA’ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve yoğunlukları Gelpro3 programı (<http://helpdesk.agri.huji.ac.il/news/gppage.htm>) ile belirlenmiştir.

### **3.8.2 Tüpte DNA Saflaştırılması**

Özgül olmayan PCR ürünlerinin yer almadığı örneklerde, reaksiyon artıklarından ürünü arındırmak üzere Purelink PCR Purification kit (İnvitrogen – K3100-01) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle göre ürünler tüpten izole edilmiştir:

- a. İzopropanol eklenmiş olan Binding Buffer 1:4 oranında PCR örneğine eklenip karıştırılmıştır.
- b. Karışım Collection Tüp içinde olan Spin Column’ a yüklenmiştir.
- c. Karışım 10.000 rpm.’ De 1 dakika boyunca santrifüj edilip DNA’ nın Column’ a bağlanması sağlanmış daha sonra pelletin uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- d. Column’ nun 650 µL yıkanması için Wash Buffer (etanol eklenmiş) eklenip 10.000 rpm.’ De bir dakika boyunca santrifüj edilmiş ve pellet uzaklaştırılmıştır.
- e. Örnek kalmış olabilecek Wash Buffer’ ın uzaklaştırılması için 2 – 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
- f. Columun daha sonra 1.7-mL’ lik Elution tüpe alınmış ve merkezine 50 µL Elution Buffer eklenip 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
- g. Daha sonra Column uzaklaştırılmış ve purifiye edilmiş olan PCR örneği – 20 ° C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

İzole edilen DNA’ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve yoğunlukları Gelpro3 programı (<http://helpdesk.agri.huji.ac.il/news/gppage.htm>) ile belirlenmiştir.

### **3.9. DNA Dizi Analizi**

Jelden saflaştırılan cDNA kalıplarından elde edilen *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait PCR ürünü ile *B. divaricarpa*, *B. gunnisonian*, *B. stricta* türlerine ait genomik DNA kalıbından elde edilen PCR ürünlerine ait dizi analizleri hizmet alımı yoluyla (Refgen) Sanger tekniği tabanlı Double Strand Primer Walking Analiz yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, art arda gelen iki yönlü (“sense” ve “antisense”) primerler kullanılarak adım adım ilgili bölgenin dizisinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu yöntem ile DNA'nın her iki iplikçığının dizi analizi yapıldığından doğruluk oranı %99.99'dur. Dizi analizi Applied Biosystems ABI 310 DNA Sequencer (BC-ABI310) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

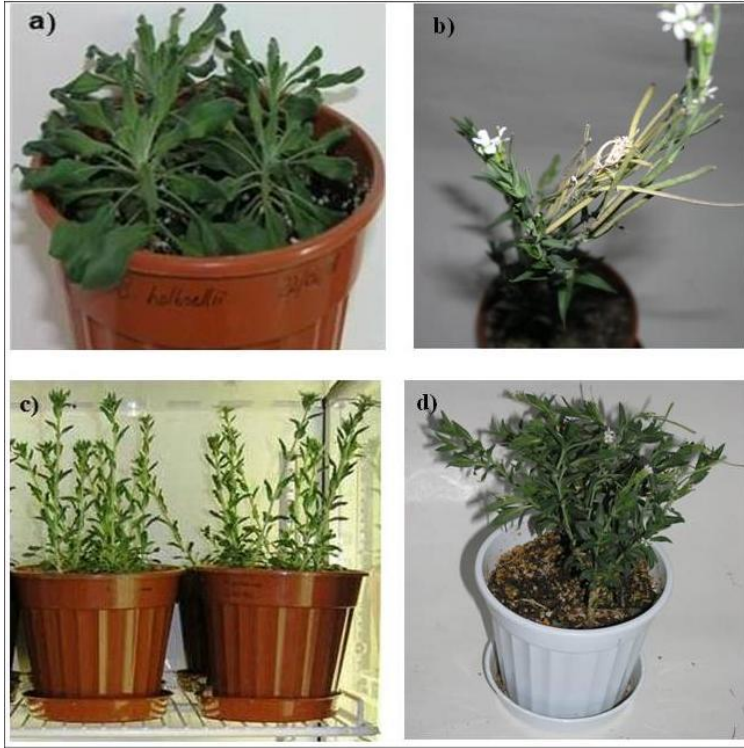
*Boechera* türlerine genomik DNA ve cDNA kalıplarından elde edilen PCR ürünlerine ait dizi analizi sonuçları Bio-Edit programı ile birleştirilmiştir. Elde edilen bu dizi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile araştırılmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *Boechera* türlerinde ait *DYAD* homoloğu genomik DNA dizileri FGENESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) programı ile incelenmiştir. Program *Arabidopsis* türüne ait parametreler kullanılarak çalıştırılmıştır. FGENESH programı ile elde edilen muhtemel ekzon sekansları CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) programı ile hizalanıp incelenmiştir. Bu diziler kullanılarak muhtemel peptid dizileri ise TRANSEQ programından sağlanmıştır. Elde edilen peptid dizileri Myhits Motif SCAN programı ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) ile incelenmiş ve bilinen protein domain bölgelerinin varlığı araştırılmıştır.

## BÖLÜM 4

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan *B. gunnisoniana*, *B. holboellii*, *B. divaricarpa* ve *B. stricta* türleri (Şekil 4.1) Schranz ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntemle yetiştirilmiştir. Tohumlar, ilk vernalizasyonun ardından iklim kabinine alınmış ve 3 gün içerisinde çimlenme başlamıştır. Çimlenen tohumlar 9 gün sonra viyollere aktarılmıştır. 3 hafta sonra bitkiler daha büyük saksılara aktarılmış ve eş zamanlı çiçeklenmeyi teşvik etmek için ikinci kez vernalizasyona alınmıştır. Vernalizasyonun bitiminde bitkiler tekrar uzun gün koşullarında yetiştirilmeye alınmıştır. Bu şartlar altında bitkilerde 1 hafta içinde çiçeklenme başlamıştır ve çiçeklenme 3 ay boyunca devam etmiştir.



Şekil 4. 1. Çalışmada kullanılan *Boechera* türleri. a) *B. holboellii*. b) *B. stricta*. d) *B. gunnisoniana*. d) *B. divaricarpa*.

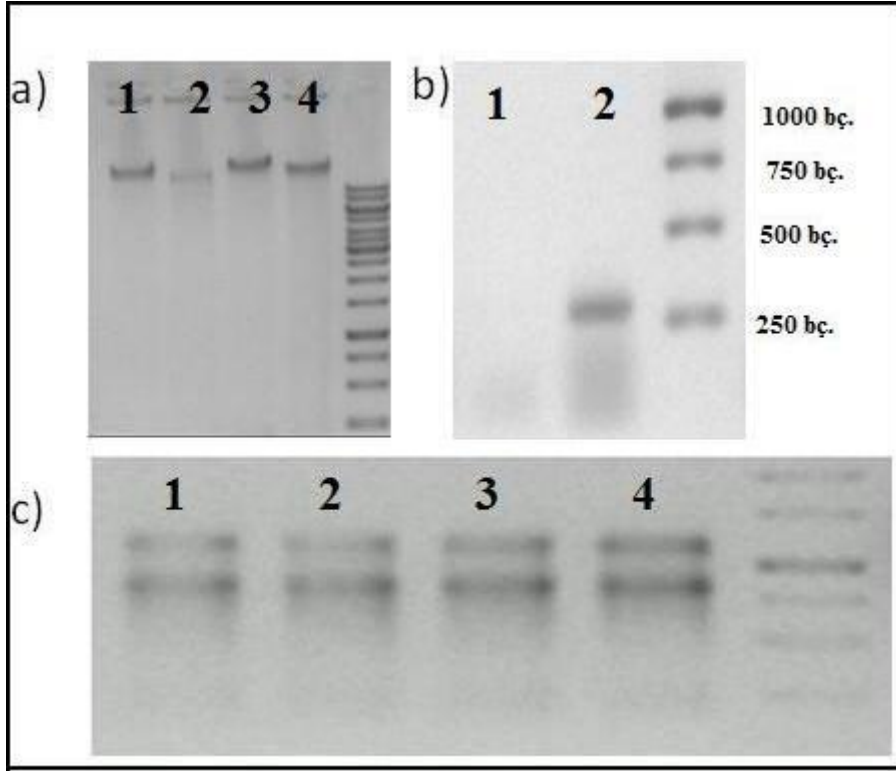
#### **4.2. Genomik DNA İzolasyonu**

Yaprak, sülük ve çiçek dokularından (100 mg) DNA izolasyonu (Edwards ve ark., 1991) önerildiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen *B. gunnisoniana*, *B. divaricarpa* ve *B. stricta* türlerine ait genomik DNA'nın saflığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Parlak ve temiz bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.2.a).

#### **4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi**

Çalışmada RNA izolasyonu, genç çiçek tomurcuklarından 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 4.2.a ) ve yoğunluğu florometrik yöntemle belirlenmiştir. Sonuç olarak RNA örneklerinin cDNA sentezi için uygun olduğu belirlenmiş ve örneklerin 2µg/µl total RNA içerdiği hesaplanmıştır.

İzole edilen total RNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve oligodT primerleri ile cDNA sentezi yapılmıştır. Ayrıca tüm cDNA'ların kalitesi *ACTIN2* (AT3G18780) genine ait primerler ile test edilmiştir (Şekil 4.2.b). Bu reaksiyonlardan 270 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü beklenmiştir. *ACTIN2* primerleri ile kurulan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir (Şekil 4.2.b). cDNA sentezi için 5 µg (2.5 µl) total RNA kullanılmasının PCR ürünlerinin elde edilebilmesi için uygun olduğu görülmüştür.



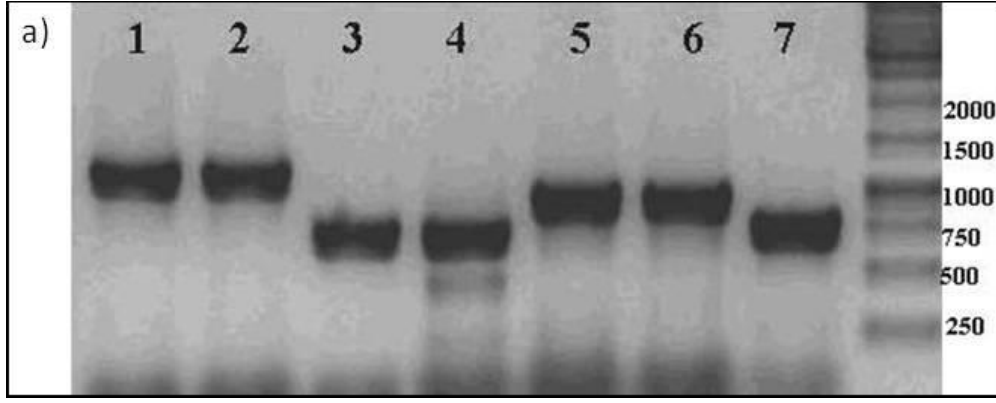
Şekil 4. 2. İzole edilen DNA, RNA ve *ACTIN2* genine ait PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri. Örnekler kuyucuklara 5 µl yüklenmiştir. 1 KB DNA Ladder (SM0311) marker olarak kullanılmıştır. a) *Boechera* türlerine ait genomik DNA: Hat 1, *B. gunnisoniana*, Hat 2,3 *B. stricta*, Hat 4, *B. divaricarpa* b) Pozitif kontrol olarak kullanılan *ACTIN2* genine ait PCR ürününün agaroz jel görüntüsü. c) *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait total RNA agaroz jel elektroforezi görüntüleri. Hat 1, *B. gunnisoniana*, Hat 2, *B. holboellii*, Hat 3, *B. stricta*.

#### 4.4. PCR Optimizasyonu

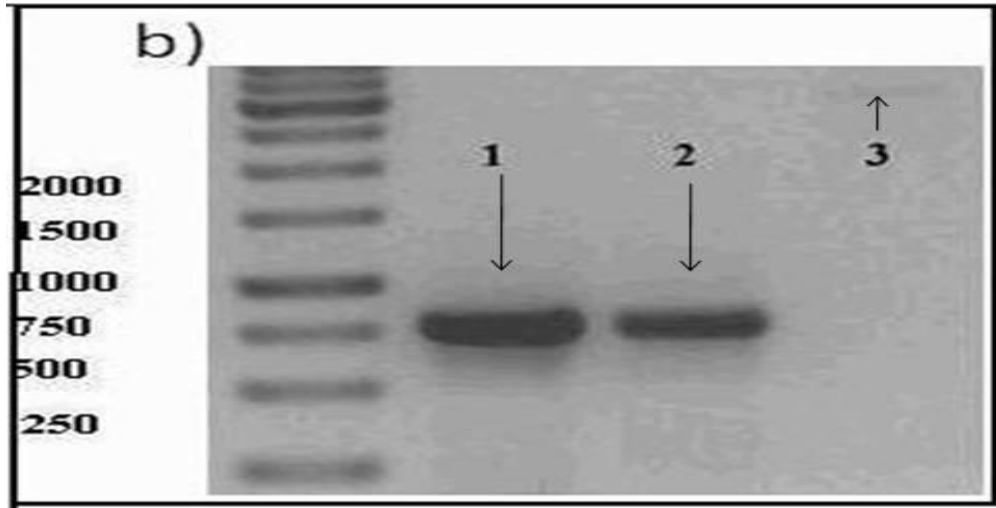
##### 4.4.1 *AT5G51330* geninin *Arabidopsis* Genomik DNA Kalıbından Çoğaltılması

*AT5G51330* geni *A. thaliana* 5 no'lu kromozomunda bulunmaktadır ve uzunluğu 3006 baz çiftidir. Çalışmada, *AT5G51330* *Boechera* ortologlarının dizi analizini kolaylaştırmak için her biri yaklaşık 600 bp. olan ürünler oluşturacak beş primer çifti dizayn edilmiştir (Çizelge 3.11.). Bu primerlerin doğruluğu *A. thaliana* genomik DNA kalıpları kullanılarak kurulan PCR reaksiyonlarıyla kanıtlanmıştır. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.3.).





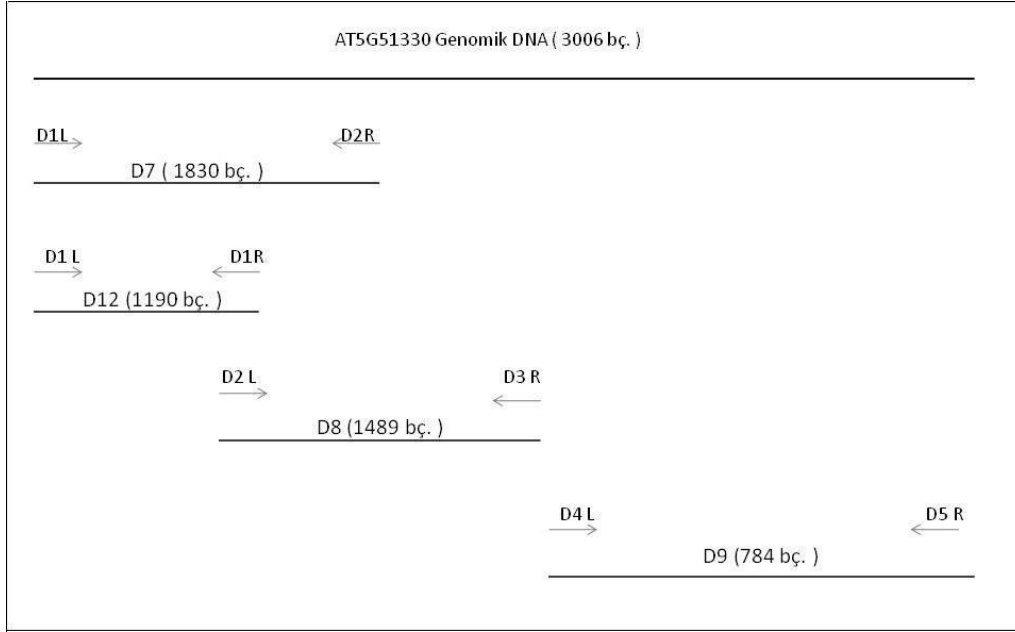
Şekil 4. 3. *Arabidopsis thaliana* bitkisine ait genomik DNAdan çoğaltılan PCR ürünleri. 1 KB DNA ladder marker olarak kullanılmıştır. a) Hat 1, 2, D1 (1990 bç.), Hat 3, 4, D2 (737 bç.), Hat 5, 6, D3 (992 bç.) b) Hat 1, 2 D4 (763 bç. ), Hat 3, D5 (3006 bç.).



#### 4.4.2. *AT5G51330* Geni *Boechera* Ortologlarının Genomik DNA Kalıplarından Çoğaltılması

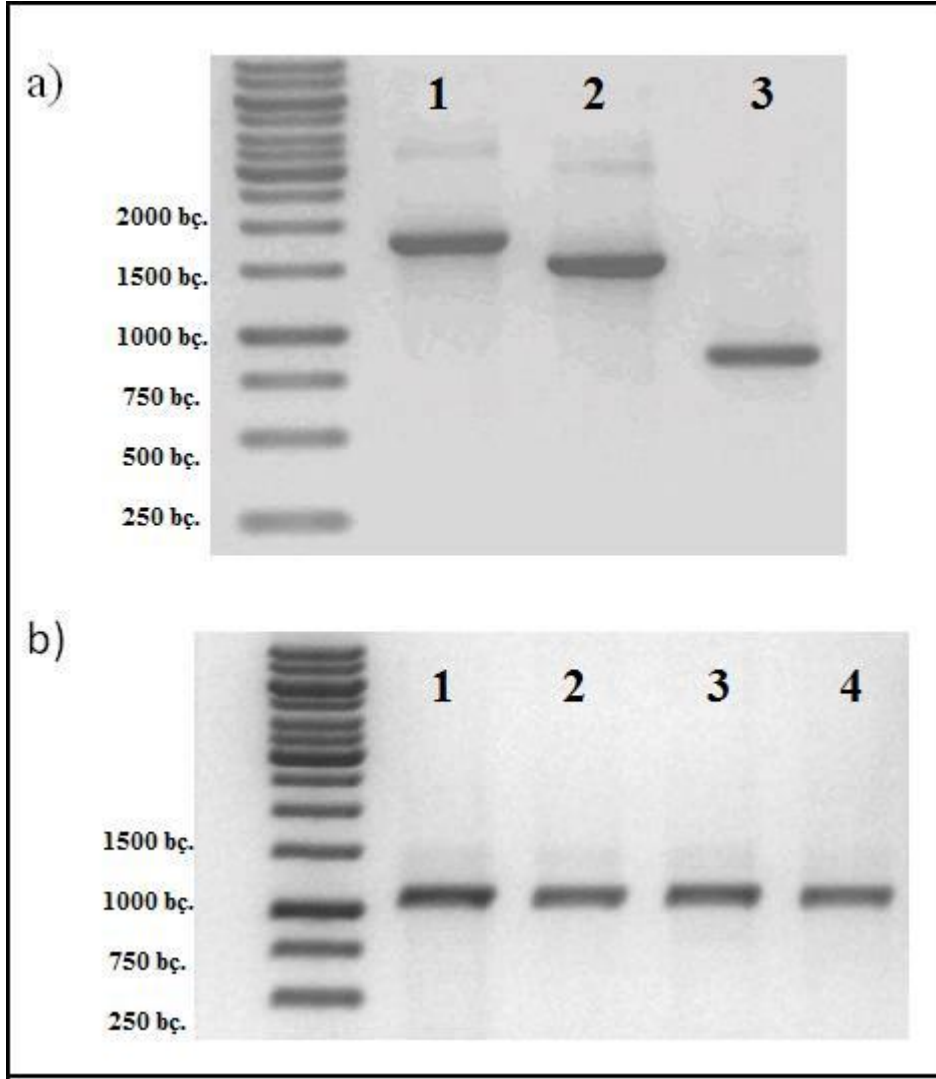
*Arabidopsis thaliana* *AT5G51330* genine göre dizayn edilen D1, D2, D3, D4, D5 primer çiftleriyle ( Şekil 3.2 ) *Arabidopsis* genomik DNA kalıbından istenilen boyuttaki PCR ürünlerinin elde edilmesine ( Şekil 4.3 ) karşın *Boechera* türlerinde 50<sup>0</sup>C– 60 <sup>0</sup>C sıcaklıkları ve 1 – 4 mM MgCl<sub>2</sub> ve DNA kalıbıkonsantrasyonları ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda istenilen ürünler elde edilememiştir. Buna karşın, farklı primer kombinasyonları ile kurulan PCR reaksiyonları olumlu sonuç vermiştir.

*B. gunnisoniana* (Şekil 4.4), *B. divaricarpa* (şekil 4.6) ve *B. stricta* (Şekil 4.8) türlerine ait genomik DNA kalıplarından D7, D8, D9, D10, D11 VE D12 primer çiftleri ile beklenen boyuttaki PCR ürünü elde edilmiştir.



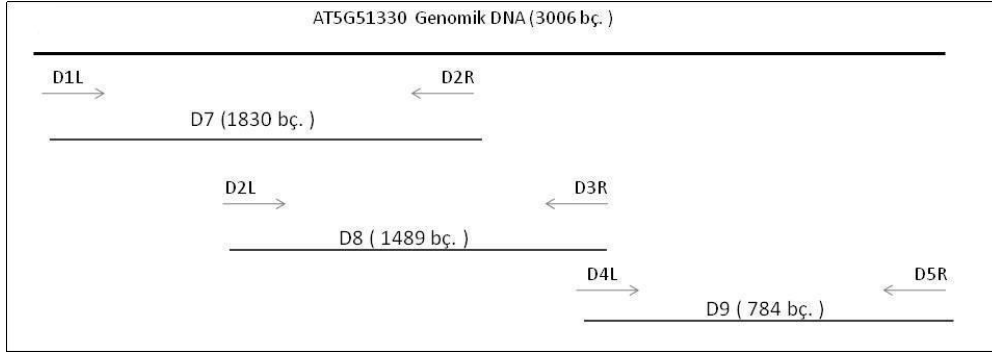
Şekil 4.4. *B.gunnisoniana* genomik DNA kalıbından AT5G51330 ortoloğunun çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri (D7, D12, D8, D9).

*B. gunnisonian* türüne ait genomik DNA kalıbından D7, D12, D8, D9 primer çiftleri (Şekil 4.4) kullanılarak PCR gerçekleştirilmiş ve bu primer çiftlerinden sırası ile bu primer çiftlerinden 1830 b.ç., 1190 b.ç., 1489 b.ç., 784 b.ç. ürün beklenmiştir. PCR ürünleri %1' lik agaroz jelde yürütülmüş (Şekil 4.5.) ve beklenen büyüklükte oldukları anlaşılmıştır.

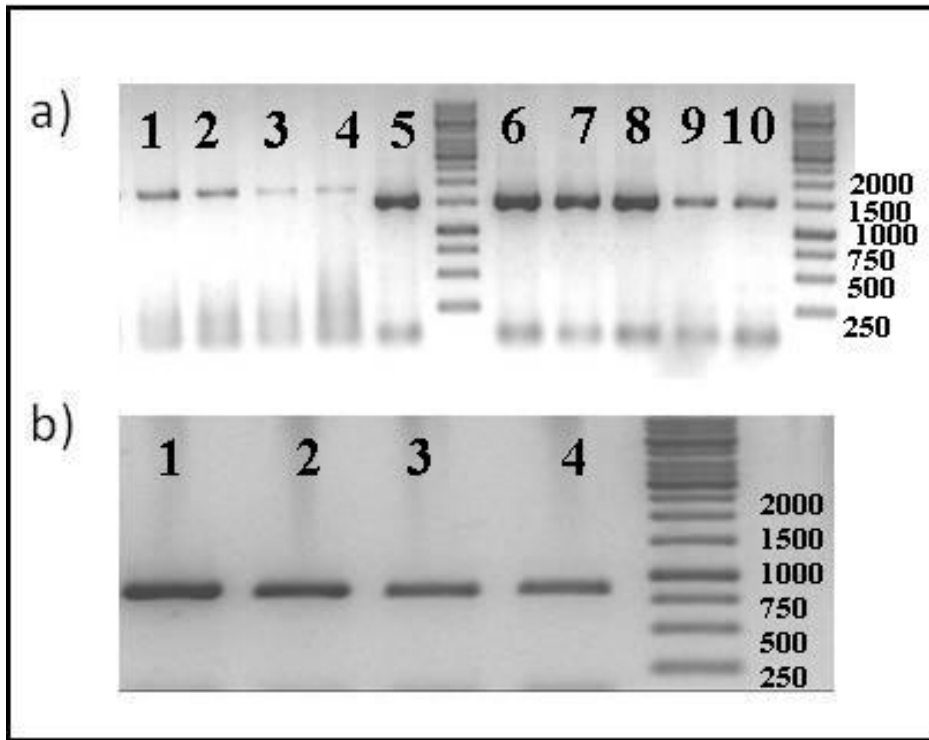


Şekil 4. 5. *B. gunnisoniana* türüne ait genomik DNA kalıbından elde edilen PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü. PCR ürünleri kuyucuklara 20 µl yüklenmiştir. Marker olarak 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. a) Hat 1, D7 (1830 bç.), Hat 2, D8 (1489 bç.), Hat 3, D9 (784 bç.) b) Hat 1, 2, 3, 4, D12 (1190 bç. ).

*Boechera divaricarpa* türüne ait genomik DNA kalıbından farklı primer kombinasyonları kullanılarak (D1L-D2R, D1L-D1R ve D4L-D5R) D7, D8, D9 olarak adlandırdığımız primer çiftleri (Çizelge 3.6. ) ile PCR gerçekleştirmiş ve sırası ile bu primerlerden 1830 bç. , 1489 bç. ve 784 bç. ürünler beklenmiştir. PCR ürünleri % 1' lik agaroz jelde yürütülmüş ve beklenen büyüklükte oldukları anlaşılmıştır (Şekil 4.7).

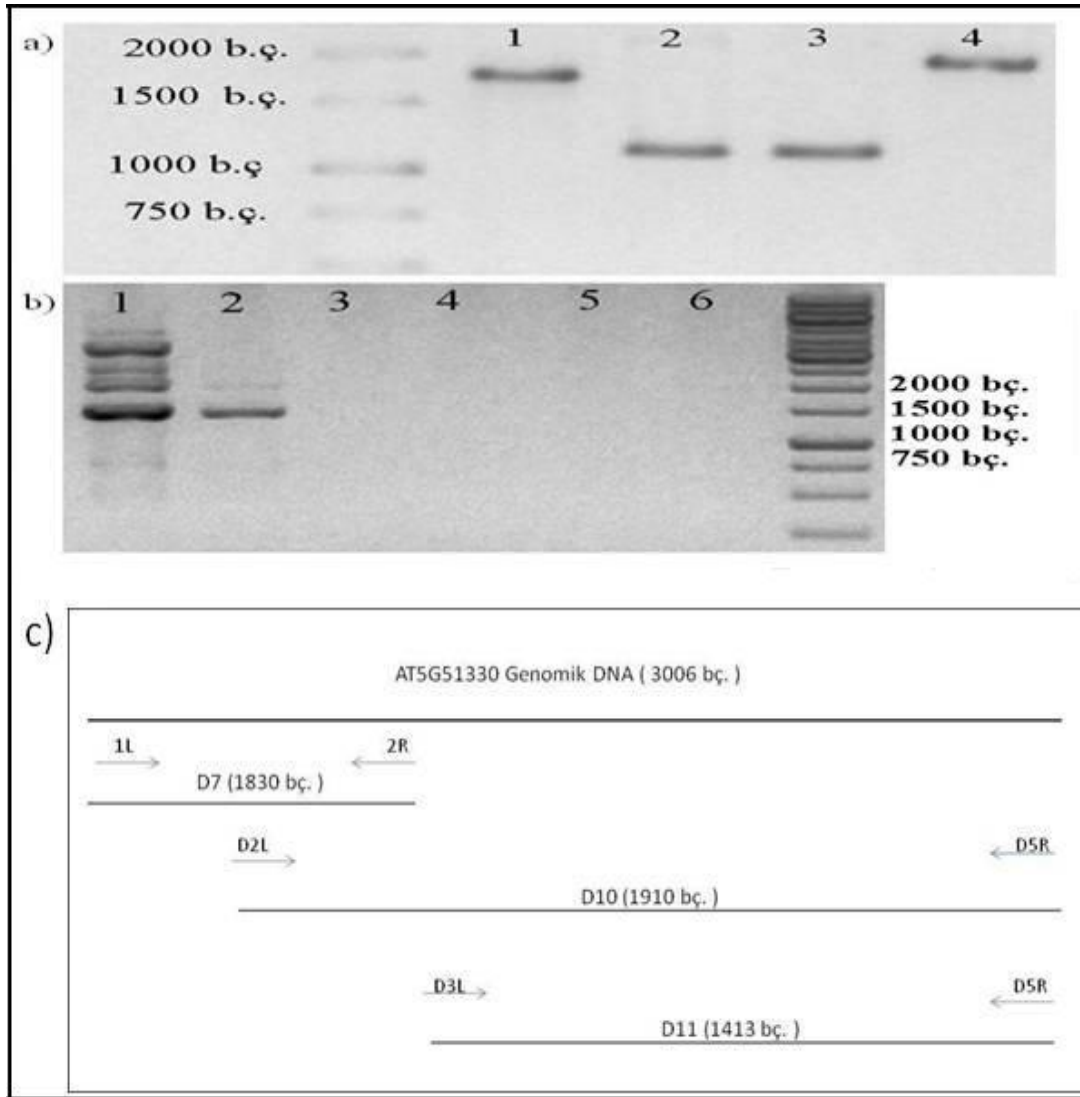


Şekil 4.6. *B. divaricarpa* genomik DNA kalıbından AT5G51330 geninin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri ( D7, D8, D9 ).



Şekil 4. 7. *B. divaricarpa* türüne ait genomik DNA kalıbından elde edilen PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü. PCR ürünleri kuyucuklara 20 µl yüklenmiştir. Marker olarak 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. a) Hat 1, 2, 3, 4, D7 (1830 bç.), Hat 5, 6, 7, 8, 9, 10, D8 (1489 bç.) b) Hat 1, 2, 3, 4, D9 (784 bç.).

*B. stricta* türüne ait genomik DNA kalıbından D7, D10 ve D11 primer çiftleri (Şekil 4.8.c) ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu 60 °C primere bağlanma sıcaklığı ve 4 Mm Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> koşulları altında optimize edilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinden sırasıyla 1830 b.ç., 1910 b.ç, 1413 b.ç, büyüklüğünde ürün beklenmiştir. PCR ürünleri %1' lik agaroz jelde yürütüldüğünde beklenen ürünlerin elde edildiği anlaşılmıştır.(Şekil 4. 8.a,b).

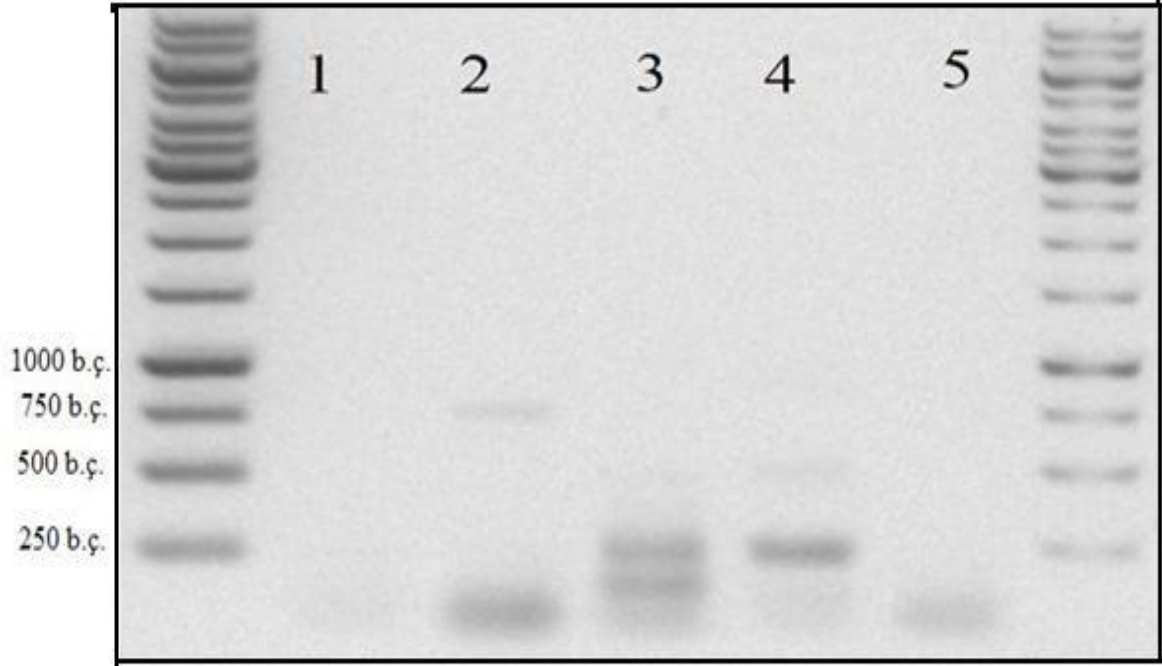


Şekil 4. 8. *B. stricta* türüne ait genomik DNA kalıbından D7, D10 ve D11 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü. a) Hat 1, D7 (1830 bç. ), Hat 4, D10 (1910 bç. ). b) Hat 1- 2, D11 (1413 bç. ). c) *B.stricta* genomik DNA kalıbından AT5G51330 geninin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri ( D7, D10, D11 ).

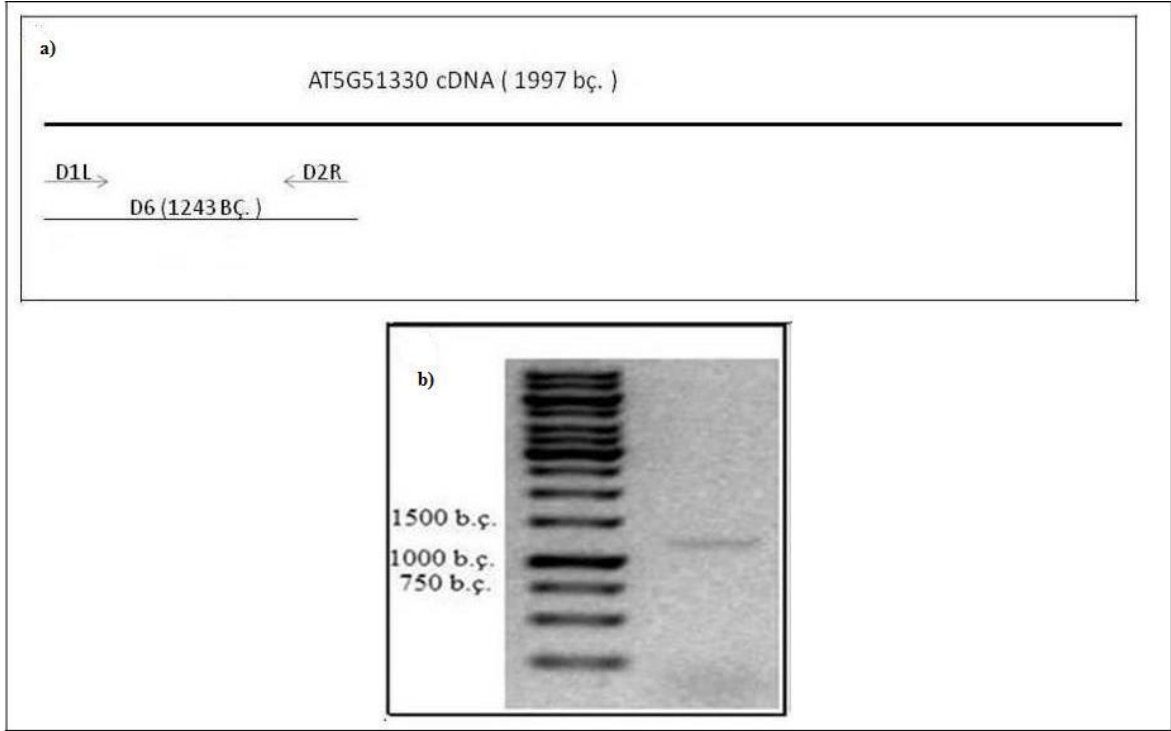
#### 4.5. AT5G51330 *B. gunnisoniana* Ortoloğuna Ait Transkriptin RT- PCR ile Çoğaltılması

*B. gunnisoniana* türüne ait genç tomurcuk dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jelde kontrol edilmiştir ( Şekil 4.2.c ). RNA miktarı 2 ug/ul olarak belirlenmiştir ( RNA Quant-iT RNA assay Kit ). RNA izolasyonu DNA sentezi takip etmiştir. Bu kalıplardan AT5G51330 cDNA dizileri referans alınarak dizayn edilen primerler (Çizelge 3.5.) kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Bu PCR reaksiyonlarında kullanılan D1 primer çiftinden 684 baz çifti, D2 primer çiftinden 650 baz çifti, D3 primer çiftinden 540 baz çifti, D4 primer çiftinden 519 baz çifti, D5 primer çiftinden ise 1997 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü beklenmektedir (Çizelge 3.6.). Bu primerler kullanılarak *B. gunnisoniana* türüne ait genomik DNA kalıplarından beklenen PCR ürünlerin elde edilmesine karşın cDNA kalıplarından bu primerler kullanılarak transkript çoğaltılamamıştır (şekil 4.9).



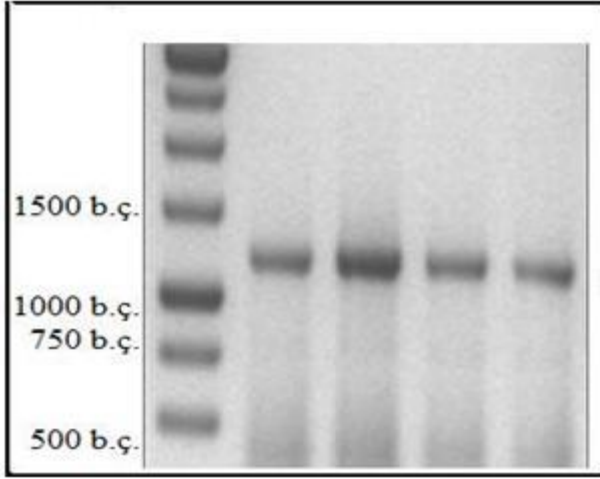
Şekil 4.9. *AT5G51330* geni için beş primer çifti ile yapılan PCR sonuçları. (Hat1, D1, Hat 2, D2, Hat 3, D3, Hat 4, D4, Hat 5, D5.) 1 KB DNA ladder kullanılmış ve 5 µl PCR ürünü kuyucuklara yüklenmiştir.



Şekil 4.10. a) *B. gunnisoniana* AT5G51330 geni transkriptinin çoğaltılmasında için gerçekleştirilen PCR reaksiyonları ve kullanılan primer çiftleri. b) D 6 primer çifti kullanılarak elde edilen 1243 b.ç PCR ürününü gösteren agaroz jel görüntüsü.

Daha sonra, çalışmada farklı primer kombinasyonları ( D1L – D2R ) denenmiştir.(Şekil 4.10.a). D6 (D1 left-D2 right)olarak adlandırılan primer çiftinden 1243 bç. PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.10.b). Buna karşın, AT5G51330 gen anlatımı sadece mayozun erken safhalarında olmaktadır( Agashe ve ark., 2002 ) dolayısıyla PCR ürün miktarı az olmuştur.ürün miktarının artırılması için bu PCR ürünü 0, 25 µl, 0,50 µl, 1 µl ve 2 µl miktarlarında kalıp olarak nested PCR için kullanılmıştır ve 0, 50µl kalıp kullanılarak daha belirgin bantlar elde edilmiştir ( Şekil 4.11.).

Nested PCR ekspresyon miktarı düşük mRNA'nın özgül çoğaltılmasında kullanılan bir PCR çeşididir. Bu PCR'da iki çift primer kullanılır ve iki PCR yapılır. İlk PCR ürünü ikinci PCR 'da kalıp olarak kullanılır (Park ve ark., 2004). Yapılan bu çalışmalar sonucunda yeterli miktarda ürün elde edilmiştir (Şekil 4. 10. a).

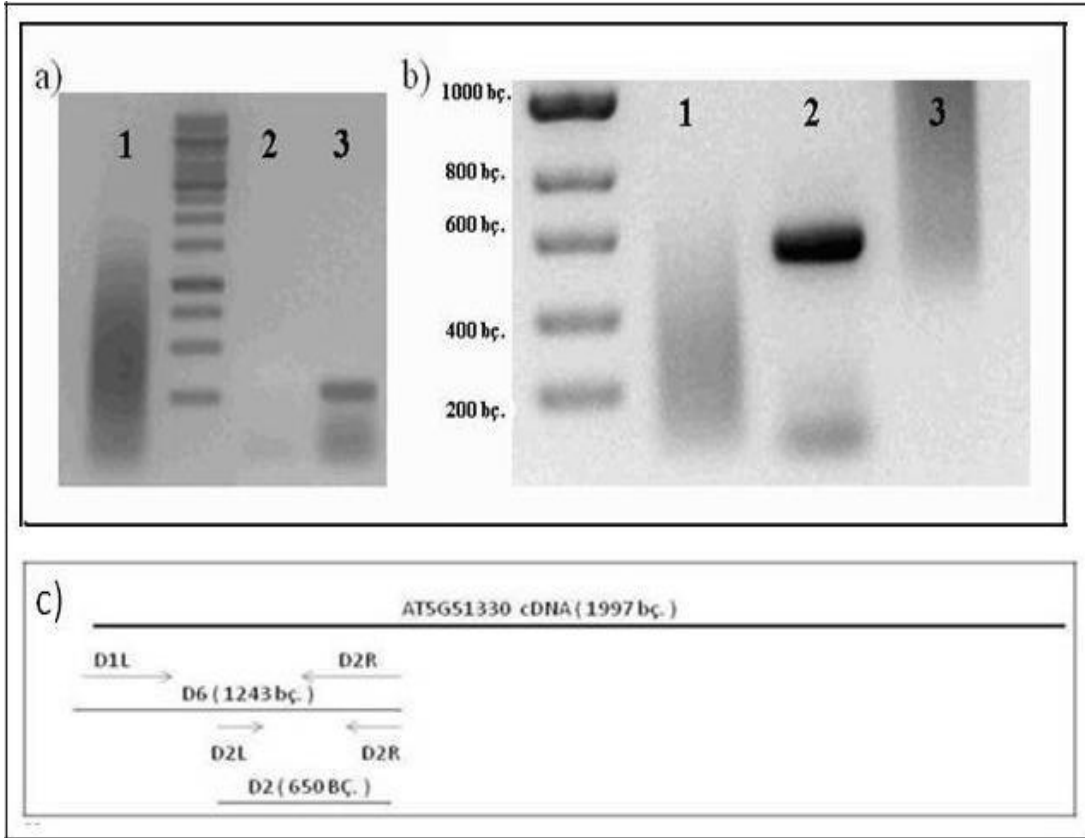


Şekil 4.11. *B. gunnisoniana* türünde D6 primer çiftiyle elde edilen PCR ürününe (1243 b.ç.) ait agaroz jel görüntüsü. Kuyucuklara 20 µl PCR ürünü yüklenmiştir. 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. *B. gunnisoniana* türüne ait farklı DNA konsantrasyonlarının kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü. Hat 1, 0,25 µl, Hat 2, 0,5 µl, Hat 3, 1 µl, Hat 4, 2 µl PCR ürününün kalıp olarak nested PCR reaksiyonunda kullanılmıştır.

#### 4.6. AT5G51330 *B. holboellii* Ortoloğuna Ait Transkriptin RT-PCR ile Çoğaltılması

AT5G51330 geni *Arabidopsis* bitkisinde mayoz öncesi S ve G1 süreçlerinde dışı ve içi mayositlerde ifade olmaktadır (Agashe ve ark., 2002; Mercier ve ark., 2003). *Boechera* türleri ile yapılan bu çalışma ile elde edilen RT-PCR sonuçları *Arabidopsis* bitkisine benzer şekilde mayoz öncesi çiçek tomurcuklarında ifade olduğunu göstermektedir. Bu sebepten *B. holboellii* türüne ait genç tomurcuk dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA kalıbı kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda bu cDNA kalıplarından transkriptin çoğaltılması için aynı cinse mensup olan *B. gunnisoniana* türünde de kullanılan D6 primer çifti tercih edilmiştir (Şekil 4.12.c.). Elde edilen PCR ürünleri birleştirilip jelde tekrar yürütülmüştür ve tüpten saflaştırılmıştır (Purelink PCR Purification Kit-K3100-01). Nested PCR reaksiyonu kurulmuş ve jelden izole edilen PCR ürünü kalıp (0,25 µl) olarak kullanılmıştır. Bu PCR reaksiyonunda D1, D6 ve D2 primer çiftleri kullanılmıştır. Elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. D2 primer çiftleri beklenen 650 bp. PCR ürününü çoğaltmıştır (Şekil 4.12.b.).





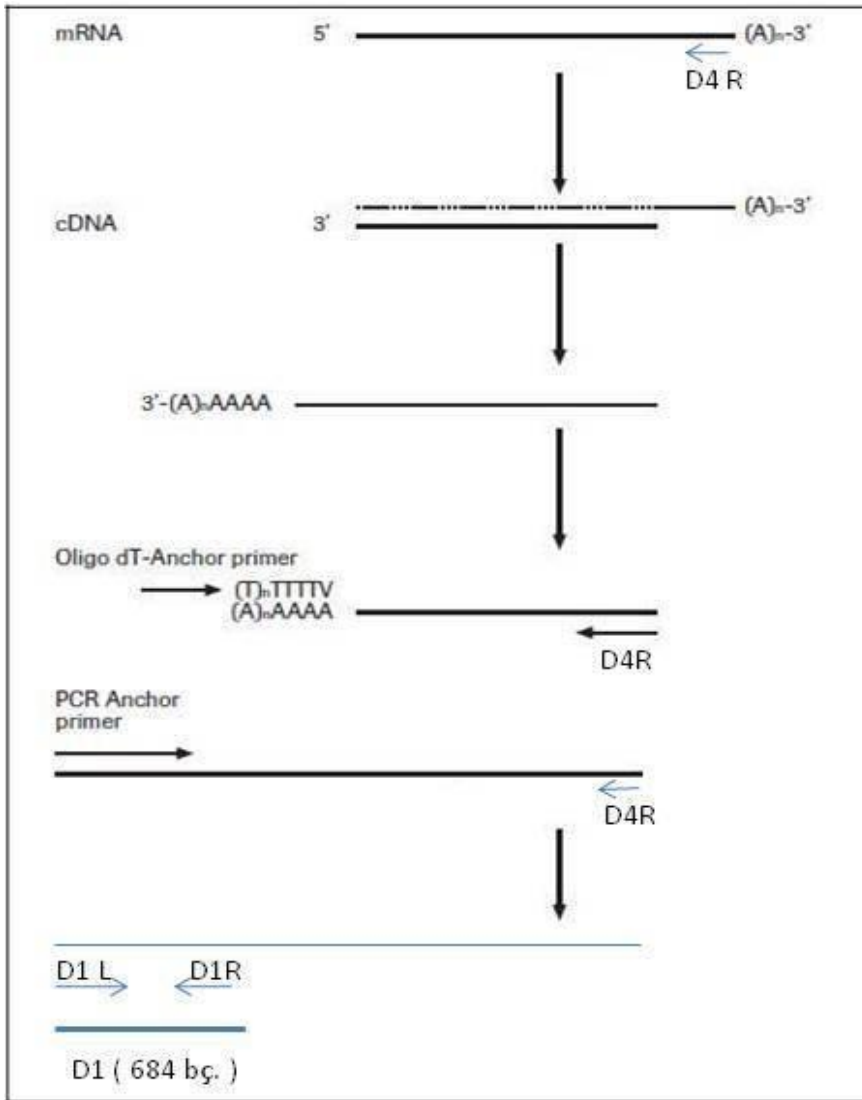
Şekil 4.12. *B. holboellii* türünde ait *AT5G51330* geni PCR ürünlerini gösteren agaroz jel görüntüleri. a) *B. holboellii* türünden D6 primeriyle elde edilen PCR ürününe ait agaroz jel görüntüsü (1KB DNA Ladder kullanılmıştır.) Hat 1, D6, Hat 2 negatif kontrol, Hat 3 pozitif kontrol (ACTIN2) b) *B. holboellii* türünde D6 primeriyle elde edilen 1243 bp. PCR ürününe ait kalıptan D2 Left ve D2 Right primeri ile elde edilen 650 bç. boyutundaki PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görünütüsü. Hat 1 D1, Hat 2 D2, Hat 3 D6. (SM0633 marker kullanılmıştır.). c) *B. holboellii* türünde gerçekleştirilen PCR reaksiyonları ve kullanılan primer çiftleri. (I. PCR’da D6 primer çifti, II. PCR’ da D2 primer çifti kullanılmıştır.

#### 4.7. *AT5G51330* Geni Ortoloğunun *Boechera stricta* Türünde RACE- PCR ile Çoğaltılması

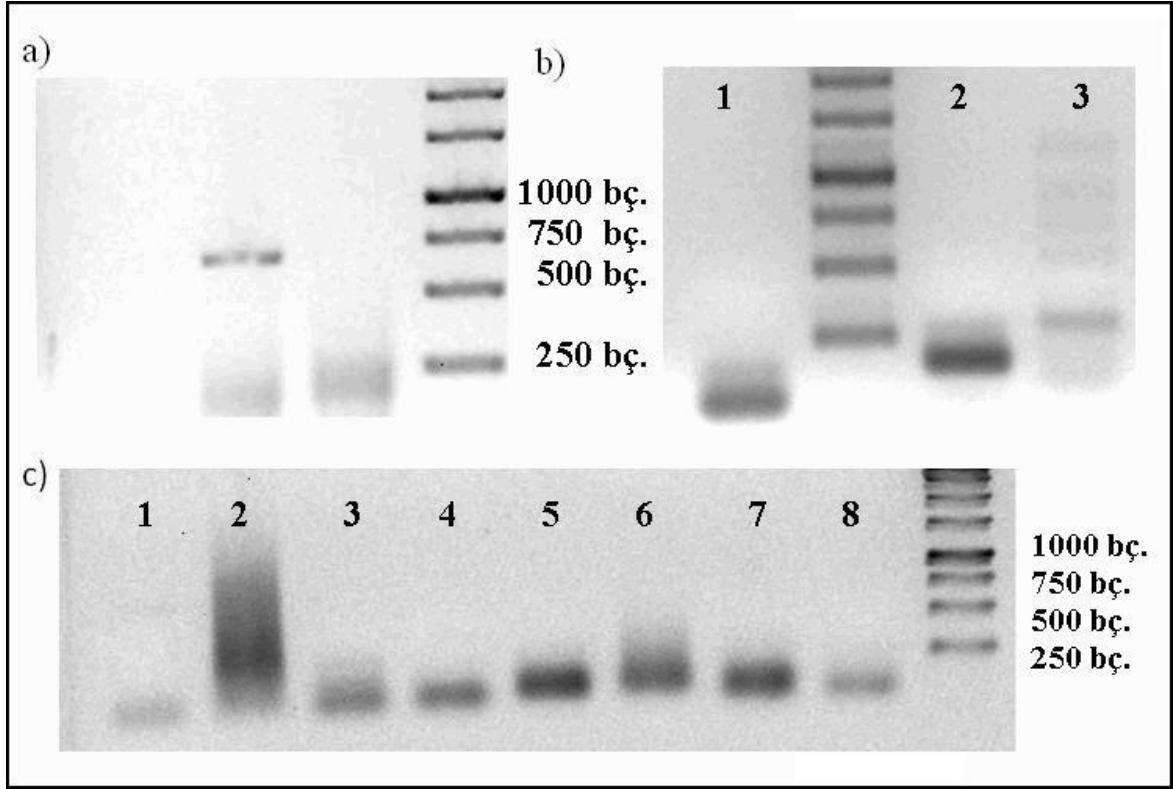
*B. stricta* türüne ait genç tomurcuk dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.2.a). 5’RACE için yapılan cDNA sentezinde kalıp olarak izole edilen RNA kullanılmıştır. cDNA sentezi için spesifik D4 right primeri kullanılmıştır. Protokolde önerildiği gibi (Şekil 4.13) cDNA saflaştırılmıştır. Daha sonra cDNA 3’ ucuna recombinant Terminal Transferaz ve dATP kullanılarak homopolimerik A- kuyruğu

bağlanmıştır. PCR reaksiyonunda cDNA 3' ucuna bağlanmış olan A- kuyruğuna özgü primer (PCR anchor primer) ve spesifik D4 right primeri kullanılmıştır.

PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir fakat beklenen 1403 bp. ürün elde edilememiştir. Bu ürün kullanılarak nested PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonunda çeşitli primerler (D1, D2, D3, D4, D5, D6) transkriptin çoğaltılması için denenmiştir. D1 primer çifti ile 684 bç. PCR ürünü elde edilmiştir. Buna karşın PCR ürün miktarı düşük olduğundan bu ürünü jelden izole edilip aynı primer (D1) çiftinin kullanıldığı PCR reaksiyonunda tekrar çoğaltılmıştır(Şekil 4.16).



Şekil 4.13. *B. stricta* türünde AT5G51330 geni transkriptinin çoğaltılması için gerçekleştirilen 3' RACE reaksiyonu ve kullanılan primerler (D4, D1).



Şekil 4.14. *B. stricta* türüne ait RACE ürünlerini gösteren agaroz jel görüntüleri. Her üç deneyde de 1 KB DNA Ladder kullanılmıştır. a) *B. stricata* türünde nested PCRdan D1 primer çiftiyle elde edilen 650. bp. PCR ürünü jelden izole edilip D1 primer çiftinin kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucuna ait agaroz jel görüntüsü. b) *B. stricta* türünde D4 right ve PCR anchor primerlerinin kullanıldığı 5' RACE – PCR ürünü ve pozitif kontroller. Hat 1, Beklenen 1974 bp. PCR ürünü elde edilememiştir, Hat 2, cDNA purifikasyonu kontrol PCR ürünü (157 b.ç.), Hat 3, Tailing kontrol PCR ürünü (293 b.ç.). c) *B. stricta* türünde RACE – PCR reaksiyonunda PCR anchor primer ve D4 right primer ile elde edilen PCR ürünün (1974 b.ç) kullanıldığı nested PCR. Hat 1, D1, Hat 2, D6, Hat 3, D3, Hat 4, D1 Left, D3 Right, Hat 5, D1 Left, D4 Right, Hat 6, D2 Left, D4 Right, Hat 7, D3 Left, D4 Right, Hat 8, anchor primer, D4 Right (beklenen ürünler sırasıyla 687 b.ç., 1243 b.ç., 573 b.ç., 1576 b.ç., 1974 b.ç., 1384 b.ç., 970 b.ç., 1974 b.ç. uzunluğundadır.).

#### 4.8. AT5G51330 Geninin *B. stricta*, *B. gunnisoniana* ve *B. holboellii* türlerine ait farklı dokulardaki anlatımı

*B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait yaprak, sülük ve çiçek dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA kalıplarından cDNA sentezi yapılmıştır. Bu farklı tür ve dokulara ait cDNA kalıpları kullanılarak D4 primeri kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Sonuç olarak bu üç türe ait yaprak, sülük ve çiçek dokularından AT5G51330 genine ait transkript çoğaltılamamıştır. *Boechea* türlerine ait genomik DNA kalıplarından ürün elde edilmesine karşın gen anlatımında edilememiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yapılan çalışmalar DYAD geninin mayozun erken safhalarında ifade olduğunu göstermiştir (Agashe ve ark., 2002, Boateng ve ark., 2008. ). Beklenildiği gibi *Boechea* türlerine ait genç tomurcuk dokularında DYAD ifade olurken olgun aşamadaki çiçek dokusunda ve sülük, yaprak gibi vejetatif dokularda ifade olmamıştır.

#### 4.9. AT5G51330 *Boechea* Transkriptlerinin Dizi Analizleri

*B. holboellii*, *B. gunnisoniana* ve *B. stricta* türlerindeki AT5G51330 ortoloğunun anlatımı bu türlere ait genç tomurcuk dokularından elde edilen cDNA kalıpları kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri tüpte saflaştırılmıştır (Purelink PCR Purification kit-K3100-01). Bu çalışmalarda elde edilen PCR ürünleri dizi analizi hizmeti alımı yolu (Refgen firması, Ankara ) ile sağlanmıştır.

cDNA'sı yaklaşık 1997 b.ç. uzunluğunda olan AT5G51330 geni 8 ekzona sahiptir (Çizelge 4.1, Şekil 3.2 ). Buna karşın, bu çalışmada *Boechea* türlerinde tam uzunlukta AT5G51330 anlatımı elde edilememiştir fakat AT5G51330 ortoloğuna ait kısmi cDNA elde edilmiştir.

Çalışmada, *B. holboellii* türünden D2 primer çifti ile 650 bç. PCR ürünü elde edilmiştir. *B. gunnisoniana* türünden ise D7 primer çiftleri ile 1243 bç. elde edilmiştir. Bu PCR ürünlerinin dizi analizi D1 Left ve D2 Right primer çiftleri ile gerçekleştirilmiştir. *B. stricta* türünden ise D1 primer çifti ile 684 b.ç. uzunluğunda bir ürün elde edilmiştir (dizi analizi D1 Left ve D1 right primerleri ile yapılmıştır).

Apomiktik ve seksüel *Boechea* türlerine ait bu diziler Bio-Edit programı ile incelenmiş ve karşılıklı okumalar birleştirilerek diziler elde edilmiştir ( Çizelge 4.2, 4.3, 4.4. ).

Çizelge 4. 1. *AT5G51330* cDNA Dizisi ve Ekzon Dizileri (<http://plants.ensembl.org>)

<b><i>AT5G51330</i> geni cDNA dizisi</b>	
GGAGGAACGAAGATTATCGAGAGCAAAAATCATGAGTAGTACGATGTTCTGTAACCGAATCCGATTAGAGAAAACCACC GCCGGGAAAATCTCTTCGCCGTCACCGACTTTGAATGTTGCAGTCGCGCATATAAGAGCTGGATCTTATTACGAAAT CGATGCTTCGATTCCTCCTCAGAGATCGCCGGAAAATCTTAAATCGATTAGAGTCGTCATGGTGAGCAAAAATCACGGCGA GTGACGTGTCTCCGGTACCCAAGCATGTTTTCACTCCGATCGCATTTTCGATTACAGTAGGATGAACCGGAATAAACCG ATGAAGAAGAGGAGTGGTGGTCTTCTCTGTTTTCGACGAGAGTCATGTGATGGCTTCGGAGTAGCTGGAGACTT GCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAACCTTTCTATGAATAGAAAATTCCTGGGGTTTCTGGGTTTCTAGTTCTTCTCGCAG GAACAAATTTCCAAGAAGGAGGTGGTTTCTCAACCGGCGTACAATACTCGTCTCTGTCGCGCTGCTTACC GGAGGGAA AGTGCTCGTCTGAGCTGAAATCGGGAGGGATGATCAAGTGGGGAAAGGAGATTGCGTGTGCAGTATCAGAGTCGGCATAT TGATACTAGGAAGAATAAGGAAGGTGAGGAGAGTCTAGAGTGAAGGATGAAGTTTACAAGAAGAAGAGATGGAGAA AGAAGAGGATGATGATGATGGGAATGAAATAGGAGGCACTAAAACAAGAGGCAAGGAGATAACTAATGGAAATCGTAA GAGAAAGCTGATTGAATCAAGTACTGAGAGACTCGCTCAGAAAGCTAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAACTCAAATT GTGGTTTATAAGAGGAAATCAGAGAGGAAGTTCATTGATAGATGGTCTGTTGAGAGGTACAACTAGCTGAGAGGAACA TGTTAAAAGTGATGAAGGAGAAGAATGCAGTGTGGCAACTCCATACTCAGGCCAGAGTTGAGGTCAGAAGCAAGGAA GCTGATTGGTGACACAGGTCTATTGGATCATCTGCTTAAGCACATGGCTGGTAAGGTGGCTCCTGGAGGTC AAGATAGGT TTATGAGAAAGCACAATGCAGATGGGGCAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTCTGATTTGATTACATAAGGAAAGAAGC AGGAGTTAAAGATCCTTACTGGACTCCTCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACCCCTTCTCAAGATCCTGTCTGCGCTGG AGAAATCCGTGACATCAGAGAAGAATTAGCTAGCCTGAAAAGAGAATTGAAGAAAATTGCGTCAAAAAGGAAGAGGA GGAGCTTGTATCATGACTACGCCTAATTCTTGTGTTACTAGTCAAGAATGATAAATCTGATGACTCCAGCAAAAGGAAATCTA CGCTGATCTGCTGAAAAAGAAATACAAAATTGAGGACCAGCTAGTGATTATTGGAGAAACCTTGGCTAAAATGGAGGAA GACATGGGATGGCTTAAGAAAACAGTGGACGAGAACTATCCTAAAAAGCCAGACTCAACAGAGACACCTTTGCTACTAG AGGATTCACCACCAATACAGACACTAGAAGGAGAAGTGAAGGTGGTGAACAAGGGTAACCAATCAGAGAGTACCTCA AAACAGAGAAAAGGAAGGAAGCATGATCAACAAGAAAAGTCAACACTTTTCACTAATAAGCAACACTGGTTTCAAGAAATC TGCAGGCCTGTGGGGATGTTTCGATGCCCCAATTGCTGCTTGTGCTGCTACTGATACTAATGCTTCTTCGCCAAGT CACAGACAAGCCTACCCATCCCTTTCCAGTCAAGCCACTGTCAGCTAAGCGTCTCTTGGCTTGACGTTTCCCTTCACC ATCATACCCGAAGAAGCTCCCAAGAATCTTCAACGTTTGAAGTTGTCAGTGGAACTGATGCATCAGATCTTACTTTCC CTACAAG	
<b>1 ekzon (1 – 37 )</b>	GGAGGAACGAAGATTATCGAGAGCAAAAATCATGAGT
<b>2 ekzon (37 – 120 )</b>	AGTACGATGTTCTGTAACCGAATCCGATTAGAGAAACCACCGCCGGAAAATCTCTTCGCCGTCGTCACCGACTTTGAATG
<b>3 ekzon (119- 220 )</b>	TTGCACTCGGCATATAAGAGCTGGATCTTATTACGAAATCGATGCTTCGATTCTTCTCAGAGATCGCCGGAAAATCTTAAATCGATTAGA GTCGTCATG
<b>4 ekzon (220 – 930 )</b>	GTGAGCAAAAATCACGGCGAGTGACGTGTCTCTCCGGTACCCAAGCATGTTTTCACTCCGATCGCATTTTCGATTACAGTAGGATGAACCGGAG ATGAAGAAGAGGAGTGGTGGTCTTCTCTGTTTTCGACGAGAGTCATGTGATGGCTTCGGAGCTAGCTGGAGACTTGTCTTACAGAAG AATCGCACCTCATGAACCTTTCTATGAATAGAAAATTCCTGGGGTTTCTGGGTTTCTAGTTCTTCTCGCAGGAACAAATTTCCAAGAAGGAGG TGGTTTCTCAACCGCGTACAATACTCGTCTCTGTCGCGCTGCTTACCCGGAGGAAAGTGGCTGCTGAGCTGAAATCGGGAGGGATGATC AAGTGGGAAGGAGATTGCGTGTGCAGTATCAGAGTCCGATATTGATACTAGGAAGAATAAGGAAGGTGAGGAGAGTTCTAGAGTGAAG GATGAAGTTTACAAGAAGAAGAGATGGAGAAGAAGAGGATGATGATGGAATGAATAGGAGGCACTAAACAAGAGGCAAAAGGA GATAACTAATGGAAATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCAAGTACTGAGAGACTCGCTCAGAAAGCTAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGA AACTCAAATTGTTGTTATAAGAGGAAATCAGAGAGGAAGTTCATTGATAGATGGTCTGTTGAGAG
<b>5 ekzon ( 930 – 1314 )</b>	GTACAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAAAAGTGATGAAGGAGAAGAATGCAGTGTGGCAACTCCATACTCAGGCCAGAGTTGAGGTC AGAAGCAAGGAAGCTGATTGGTGACACAGGTCTATTGGATCATCTGCTTAAGCACATGGCTGGTAAGGTGGCTCCTGGAGGTCAAGATAGG TTTATGAGAAAGCACAATGCAGATGGGCAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTCTGATTGATTACATAAGGAAGAAGCAGGAGTTAAAG ATCCTTACTGGACTCCTCCACTGGTTGGAAAGCTTGGTGACAACCCCTTCTCAAGATCCTGTCTGCGCTGGAGAAATCCGTGACATCAGAGAA GAATTAGCTAGCCTGAAAAAG
<b>6 ekzon ( 1324 – 1423 )</b>	AGAATTGAAGAACTTGCCTCAAGAAGGAAGAGGAGGAGCTTGTATCATGACTACGCCTAATCTTGTGTTACTAGTCAGAATGATAAT CTGATGACTCCAGCAAAG
<b>7 ekzon (1423 – 1507 )</b>	GAAATCTACGCTGATCTGCTGAAAAAGAAATACAAAATTGAGGACCAGCTAGTGATTATTGGAGAAACCTTGGCTAAAATGGAG
<b>8 ekzon (1508 – 1951 )</b>	GAAGACATGGGATGGCTTAAGAAAACAGTGGACGAGAACTATCCTAAAAAGCCAGACTCAACAGAGACACCTTTGCTACTAGAGGATTCA CCACCAATACAGACTAGAAAGGAGAAGTGAAGGTGGTGAACAAGGGTAACCAAAATCAGAGTCACTCAAACAGAGAAAAAGGAAG GAAGCATGATCAACAAGAAGATCAACACTTCACTAATAAGCAACACTGGTTTCAAGAAATCTGAGGCTGTGGGGATGTTCCGATGGCCC CAATTGCTGCTTGTGCTGCTACTGATACTAATGCTTCTTCGCCAAGTCAAGACAAGCCTACCCATCCCTTTCCAGTCAAGCCACTT GCAGTAAAGCGTCTCTTGGCTTGACGTTTCCCTTACCATCATACCCGAAAGAAGCTCCCAAGAATCTTCAACGTTTGAAGTTGTCAGTGG AAACTGATGCATCAGATCTTACTTTCCCTACAAG

Çizelge 4. 2. *B. holboellii* AT5G51330 genine ait kısmi cDNA dizisi

```

ATACGGAAGGTAAGGAGAGTTCTGGAGTGAAGGAGGGAGGGGTTTGCAAGAAGAGATTGAGAAAGAAGATGATGATGA
TGATGGGAATGAAACAGAAAGACTAAACAGATTGCAAACGAGATGACTGATGGAAATCGTAAGAGAAAAGCTGATTGAA
TCCAGTACTGAGAGACTCGCTCAGAGGGCTAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAA
GAGCAGAGAAGAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAAGGTACAAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAAAAGTGATGAAG
GAGAAAAATGCAGTGTITGGCAACTCCATACTCAGGTCACAGTTAAGGTCAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTG
GTCTTTTAGACCATATGCTTAAGCACATGCCAGGTAAGGTGGCTCCTGGAGGTCAGATAGGTTTATGAGAAAGCACAAT
GCAGATGGGGCAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTCTGATTGATTCACATAAGGAAAGAAGCAGGAGTTGAAGATCCTT
ACTGGACGCCTCCACCTGGTGAG

```

Çizelge 4. 3. *B. stricta* AT5G51330 genine ait kısmi cDNA dizisi

```

NNNNGGGGGTCGCATACAGGTCGAAGATATCGAGAGCAGGACGAAGAGTATCGAGAGCAGTGATAAAGTGGACAGAGA
AGAGTTCTAGAGTGAAGGAAGAAGAGTTATATAGTGAATGATGAAAAGTCGATTCTTCGATTCTTCTCAGAGATCGCCG
GAGATCTTAAATCGATTAGAGTCGTCATGGTGAGCAAAAACACGGCGAGCGACGTGTCTCTCCGATACCCAAGCATGTAC
TCACTCCGATCGCATTTTCGATTGCAGCAGGATGAACCGGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGGTGGTGGTCTTCTTCC
TCTTTTTGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGATTGCTCTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTC
TATGAACAGAAATTCGTGGAGTTTCTGGGTTTCTTCTGCTTCTTCTCGCAGGAACAAGATGATTCTCAACCCGGCGTACAA
TACTAGGCTCGGTCCGCGGGCTTACCAGGAGGTAATGTTGGTCTGAGCTGCGATCTGGAGAATGACT

```

Çizelge 4. 4. *B. gunnisoniana* AT5G51330 ortoloğuna ait kısmi cDNA dizisi

```

TTTGTACCCAAAGGTTCCAACCAAGGTCGAGGGCGTCCAGTAAGGATCTTCAACTCCTGCTTCTTCTTATGTGAATCAAAT
CAGAACTCTCCAACCAATACTCCATTGCCCCATCTGCATTGTGCTTTCTCATAAACCTATCTTGACCTCCAGGAGCCACCT
TACCTGCCATGTGCTTAAGCATATGGTCTAAAAGACCAGTGTACCCGATCAGCTTCTTGTCTTGACCTTAACTGTGACC
TGAGTATGGAGTTGCCAAACACTGCATTTTCTCCTTCATCACTTTTAAACATGTTCCCTCAGCTAGTTTGTACCTATCAAC
AGACCATCTGTCAATGAATTTCTTCTGCTTCTTCTTATAGACCACGATTTGATTTTCTTCTGATCATAAACCTTAGCC
CTCTGAGCGAGTCTCAGTACTGGATTCAATCAGCTTCTTACGATTCCATCAGTATCTCGTTTGCAATCTGTTTAG
TCTTCTGTTTCAATCCCATCATCATCATCTTCTTCTCAATCTTCTTTTGAACCCCTCCCTCCTTCACTCCAGAA
CTTCCTTACCTCCGATTTCTTACAATCAATATGCCGACTTGTACTGCACACGCAATCTCCCTCCCACTTAATCA
TTTCTCCAGATCGCAGCTCAGACCAACATTTTCCCTCCGGTGAAGCCGCGGACCGAGCCTAGTATTGTACGCCGGTTGA
GAAATCATCTTGTCTCGGAGAAAGAAGCAGAAGAAACCCAGAACTCCACGAATTTCTGTTTCATAGAACTTCATGAGG
TGCGATTCTTGTAGAGCAAATCTCCAGTACTCCGAAACCATCACATGGCTCTCGTCAAAAAGAGGAAGAAGACCAC
CACCCTCTTCTTCAAAGGTTTATTCGGTTTCACTCTGCTGCAATCGAAATGCGATCGGAGTGAGTACATGCTTGGGT
ATCGGAGAGACAGCTCGCTCGCCGTGATTTTGCTCACCATGACGACTCTAATCGATTAAAGGTTCTCCGGCGATCTGAG
GAAGAATCGAAGAATCGACTTCGTAATACGATCCAATCTTATATGCGCGACTGCAACATTCACAGTCGATGACGATGGC
GAAGAGTTTTTCCGGCGGAGATTCTCTAATCGGATTCCGTTTACGAACATCGTCCGCTCATGATTTTTGCTCTCGATA
TCTTTCTGTTCCA

```

BLAST sonuçlarına göre, *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait cDNA dizilerinin AT5G51330 genine ait mRNA dizisi ile sırasıyla % 89, %91 ve %88 oranlarında benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5.). Ayrıca BLAST sonuçlarına göre AT5G51330 genine ait diziler karşılaştırıldığında *B. gunnisoniana* türünde 36 baz, *B. holboellii* türünde 12 baz, *B. stricta* türünde ise 22 bazlık boşluk gözlenmiştir (Çizelge 4.6). Bununla birlikte E-value parametreleri bu türlerde 0'a yakındır (*B. gunnisoniana*: 0.0, *B. holboellii*: 0.0, *B. stricta*: 1e-139). Bu sonuçlar da *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait AT5G51330 dizilerinin yüksek oranda benzer olduklarını göstermektedir. Bu yüzden *Boechera* türlerinden elde edilen kısmi AT5G51330 cDNA dizileri *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türleri için sırasıyla BgSWI, BhSWI, BsSWI olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte, *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ve *A. thaliana* türüne ait AT5G51330 cDNA dizileri CLUSTALW2 programında hizalanmış ve benzer bölgeler ortaya çıkarılmıştır.

Çizelge 4. 5. *B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait *AT5G51330* geni BLAST sonuçlarını gösteren çizelge a) *B. gunnisoniana* türüne ait BLAST sonucu b) *B. holboellii* türüne ait BLAST sonucu c) *B. stricta* türüne ait BLAST sonucu

a)

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	1576	1576	99%	0.0	89%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	1568	1568	99%	0.0	89%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	1533	1533	96%	0.0	89%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	1280	1280	82%	0.0	89%	<a href="#">U</a>
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	1057	1418	85%	0.0	93%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AB025621.1</a>	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	787	1563	96%	0.0	95%	<a href="#">E</a>
<a href="#">AC232576.1</a>	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	399	399	26%	2e-107	89%	

b)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	785	785	99%	0.0	91%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	785	785	99%	0.0	91%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	785	785	99%	0.0	91%	<a href="#">U</a>
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	785	785	99%	0.0	91%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AB025621.1</a>	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	484	798	99%	2e-133	95%	<a href="#">E</a>
<a href="#">AC232576.1</a>	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	388	388	53%	2e-104	89%	
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	346	600	72%	1e-91	94%	<a href="#">G</a>

c)

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	505	505	76%	1e-139	88%	<a href="#">G</a>
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	494	494	76%	3e-136	87%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	494	494	76%	3e-136	87%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	494	494	76%	3e-136	87%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	398	398	64%	2e-107	86%	<a href="#">U</a>
<a href="#">AB025621.1</a>	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	398	500	76%	2e-107	94%	<a href="#">E</a>



Çizelge 4. 6. *Boechera* türleri ile *AT5G51330* geni benzerliğini gösteren blast analizi sonucu a) *B. gunnisoniana* b) *B. holboellii* c) *B. stricta*

a)		<p>GENE ID: 835207 SW11   SW11 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)</p> <p>Score = 1576 bits (853), Expect = 0.0 Identities = 1127/1255 (90%), Gaps = 36/1255 (2%) Strand=Plus/Minus</p>	
Query	2	TTGTCACCCAAAGGTTCCAACCAGGTGGAGGCGTCCAGTAAGGATCTTCAACTCCTGCTTC	61
Sbjct	1245	TTGTCA-CCAAGCTTCCAACCAGGTGGAGGAGTCCAGTAAGGATCTTTAACTCCTGCTTC	1187
Query	62	TTTCCTTATGTGAATCAAATCAGAACTCTCCAACCAATACTCCATTGCCCCATCTGCATT	121
Sbjct	1186	TTTCCTTATGTGAATCAAATCAGAACTCTCCAACCAATACTCCATTGCCCCATCTGCATT	1127
Query	122	GTGCTTCTCATAAACCTATCTTGACCTCCAGGAGCCACCTTACCTGCCATGTGCTTAAG	181
Sbjct	1126	GTGCTTCTCATAAACCTATCTTGACCTCCAGGAGCCACCTTACCAGCCATGTGCTTAAG	1067
Query	182	CATATGGTCTARAAGACCAGTGTCCACCGATCAGCTTCCTTGCTTCTGACCTTAACTGTGA	241
Sbjct	1066	CAGATGATCCAATAGACCTGTGTCAACCAATCAGCTTCCTTGCTTCTGACCTCAACTCTGG	1007
Query	242	CCTGAGTATGGAGTTGCCAAACACTGCATTTTTCTCCTTCATCACTTTTAAACATGTTCT	301
Sbjct	1006	CCTGAGTATGGAGTTGCCAAACACTGCATTTTTCTCCTTCATCACTTTTAAACATGTTCT	947
Query	302	CTCAGCTAGTTTGTACCTATCAACAGACCATCTGTCAATGAATTTCTTCTCTGCTCTTC-	360
Sbjct	946	CTCAGCTAGTTTGTACCTCTCAACAGACCATCTATCAATGAACTTCCTCTCTGAT-TTCC	888
Query	361	TCTTATAGACCACGATTTGATTTTCCTTCTTCTGATCATAAACCTTAGCCCTCTGAGCGA	420
Sbjct	887	TCTTATAAACACAATTTGAGTTTCCTTCTTCTGATCATAAACCTTAGCTTCTGAGCGA	828
Query	421	GTCTCTCAGTACTGGATTCAATCAGCTTTCTCTTACGATTTCCATCAGTCATCTCGTTG	480
Sbjct	827	GTCTCTCAGTACTTGATTCAATCAGCTTTCTCTTACGATTTCCATTAGTTATCTCCTTTG	768
Query	481	CAATCT-GTTTAGt-ctctctctgtttccattccocatcatcatcatctctctctctcaat	538
Sbjct	767	CC-TCTTGTAGTGC-CTCCTATTTCATCCCATCATCATCTCTCTCTCTCTCCAT	710
b)		<p>GENE ID: 835207 SW11   SW11 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)</p> <p>Score = 785 bits (425), Expect = 0.0 Identities = 531/581 (92%), Gaps = 12/581 (2%) Strand=Plus/Plus</p>	
Query	1	ATACGGAAGGTAAAGGAGAGTCTGGAGTGAAGGAGGGAGGGGTTGCT--A-aagaaagaga	57
Sbjct	654	ATAAGGAAGGTGAGGAGAGTCTAGAGTGAAGGA-TGA--AGTTTACAAAGAAAGAGAGA	710
Query	58	ttgagaagaaagatgatgatgatgatgggaatgaacagaaagag-aCTAAC-AGATTGC	115
Sbjct	711	TGGAGAAAGAGAGGATGATGATGATGGGAATGAAATAGGAG-GCACTAAACAAGA-GGC	768
Query	116	AAACGAGATGACTGATGGAATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCCAGTACTGAGAGACT	175
Sbjct	769	AAAGGAGATAACTAATGGAAATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCAAGTACTGAGAGACT	828
Query	176	CGCTCAGAGGGCTAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAATCAAATCGTGGTCTATAAGA-	234
Sbjct	829	CGCTCAGAAAGCTAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAACTCAAATTGTGGTTTATAAGAG	888
Query	235	GAAGAGCAGAGAAGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGA	294
Sbjct	889	GAA-ATCAGAGAGGAAGTTCATTGATAGATGGTCTGTTGAGAGGTACAAACTAGCTGAGA	947
Query	295	GGACATGTTAAAAGTGTGAAGGAGAAAATGCAGTGTTTGGCAACTCCATACTCAGGT	354
Sbjct	948	GGACATGTTAAAAGTGTGAAGGAGAAAATGCAGTGTTTGGCAACTCCATACTCAGGC	1007
Query	355	CACAGTTAAGGTCAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTGGTCTTTTAGACCATATGC	414
Sbjct	1008	CAGAGTTGAGGTCAGAAGCAAGGAAGCTGATTGGTGCACAGGCTTATTGGATCATCTGC	1067
Query	415	TTAAGCACATGGCAGGTAAGGTGGCTCCTGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACA	474
Sbjct	1068	TTAAGCACATGGCTGGTAAGGTGGCTCCTGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACA	1127
Query	475	ATGCAGATGGGGCAATGGAGTATGGTTGGAGAGTTCTGATTTGATTACATAAGGAAG	534
Sbjct	1128	ATGCAGATGGGGCAATGGAGTATGGTTGGAGAGTTCTGATTTGATTACATAAGGAAG	1187



c) GENE ID: 835207 SWI1 | SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)

Score = 494 bits (267), Expect = 3e-136  
Identities = 384/437 (88%), Gaps = 22/437 (5%)  
Strand=Plus/Plus

Query	123	AAAGTCGATCTCTCGATTCTTCCTCAGAGATCGCCGG-AGATCTTAAATCGATTAGAGTC	181
Sbjct	156	AAA-TCGATGCTTCGATTCTTCCTCAGAGATCGCCGAAAATCTTAAATCGATTAGAGTC	214
Query	182	GTCATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGCGACGTGTCTCTCCGATACCCAAGCATGTACTCA	241
Sbjct	215	GTCATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGTGACGTGTCTCTCCGATACCCAAGCATGTTTCA	274
Query	242	CTCCGATCGCATTTTCGATTGACGAGGATGAACCGGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGT	301
Sbjct	275	CTCCGATCGCATTTTCGATTACAGTAGGATGAACCGGAATAAACCGATGAAGAAGAGGAGT	334
Query	302	GGTGGTGGTCTTCTTCTCTTTTTCGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGA	361
Sbjct	335	GGTGGTGGTCTTCTTCTCTTTTTCGACGAGAGTCATGTGATGGCTTCGGAGCTAGCTGGA	394
Query	362	GATTTGCTCTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCTATGAACAGAAATTCGTGGAGT	421
Sbjct	395	GACTTGCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCTATGAATAGAAATTCCTGGGGT	454
Query	422	TTCTGGGTTTCTTCTGCTTCTTCTCGCAGGAACAA-----GATG--A--T--TT-CT	466
Sbjct	455	TTCTGGGTTTCTA--G-TTCTTCTCGCAGGAACAAATTTCCAAGAAGGGAGGTGGTTTCT	511
Query	467	CAACCGGCGTACAATACTAGGCTCGGTCGGCGCGGCTTCACCGGAGGGTAAA-TGTTGGTC	525
Sbjct	512	CAACCGGCGTACAATACTCGTCTCTGTCGGCTGCTTCACCGGAGGG-AAAGTGCTCGTC	570
Query	526	TGAGCTGCGATCTGGAG	542
Sbjct	571	TGAGCTGAAATCGGGAG	587

CLUSTALW2 sonuçlarına göre *BgSWI*, *BsSWI* ve *BhSWI* kısmi cDNA dizileri *AT5G51330* genine ait dizilerle sırasıyla 995 – 1579, 1 - 597, 650 – 1247 bazları arasında hizalanma göstermiştir.

Çizelge 4.7. *Boechera* türleri ile *Arabidopsis AT5G51330* geni benzerliğini gösteren *B. holboellii* CLUSTALW2 sonucu

arab_cdna	AGAATAAGGAAGGTGAGGAGAGTTCTAGAGTGAAGGATGAAG---TTTAC	697
holboellii_partialtrnsript	---ATACGGAAGGTAAGGAGAGTTCTGGAGTGAAGGAGGGGGGTTTGC	47
	*****	
arab_cdna	AAAGAAGAAGAGATGGAGAAGAAGAGGATGATGATGATGGGAATGAAAT	747
holboellii_partialtrnsript	AAAGAAGA---GATTGAGAAAGAGATGATGATGATGATGGGAATGAAAC	94
	*****	
arab_cdna	AGGAGGCACTAAACAAGAGGCAAAAGGAGATAACTAATGGAAATCGTAAGA	797
holboellii_partialtrnsript	AGAAGAGACTAAACAGATTGCAAACGAGATGACTGATGGAAATCGTAAGA	144
	*****	
arab_cdna	GAAAGCTGATTGAATCAAGTACTGAGAGACTCGCTCAGAAAGCTAAGGTT	847
holboellii_partialtrnsript	GAAAGCTGATTGAATCCAGTACTGAGAGACTCGCTCAGAGGGCTAAGGTT	194
	*****	
arab_cdna	TATGATCAGAAGAAGGAAACTCAAATTGGTTTATAAGAGGAAATCAGA	897
holboellii_partialtrnsript	TATGATCAGAAGAAGGAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAAGAGCAGA	244
	*****	
arab_cdna	GAGGAAGTTCATTGATAGATGGTCTGTTGAGAGGTACAAACTAGCTGAGA	947
holboellii_partialtrnsript	GAAGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGA	294
	*****	
arab_cdna	GGAACATGTTAAAAGTGATGAAGGAGAAGAATGCAGTGTGGCAACTCC	997
holboellii_partialtrnsript	GGAAACATGTTAAAAGTGATGAAGGAGAAGAAATGCAGTGTGGCAACTCC	344
	*****	
arab_cdna	ATACTCAGGCCAGAGTTGAGGTCAGAAGCAAGGAAGCTGATTGGTGACAC	1047
holboellii_partialtrnsript	ATACTCAGGTCACAGTTAAGGTCAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACAC	394
	*****	
arab_cdna	AGGTCATTGGATCATCTGCTTAAAGCACATGGCTGGTAAGGTGGCTCCTG	1097
holboellii_partialtrnsript	TGGTCTTTTAGACCATATGCTTAAAGCACATGGCAGGTAAGGTGGCTCCTG	444
	*****	
arab_cdna	GAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAGCAATGCAGATGGGGCAATGGAG	1147
holboellii_partialtrnsript	GAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAGCAATGCAGATGGGGCAATGGAG	494
	*****	
arab_cdna	TATTGGTTGGAGAGTTCGATTTGATTCACATAAGGAAAGAAGCAGGAGT	1197
holboellii_partialtrnsript	TATTGGTTGGAGAGTTCGATTTGATTCACATAAGGAAAGAAGCAGGAGT	544
	*****	
arab_cdna	TAAAGATCCTTACTGGACTCCTCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACC	1247
holboellii_partialtrnsript	TGAAGATCCTTACTGGAGCCTCCACCTGGTGAG-----	578
	*****	

Çizelge 4. 8. *Boecheera* türleri ile *Arabidopsis AT5G51330* geni benzerliğini gösteren *B. stricta* CLUSTALW2 sonucu

arab_cdna	GGAGGAACGAAGATTATCGAGAGCAAAAATCATGAGTAGTACGATGTTCCG	50
stricta_partial_trnscrpt	NNNNGGGGGTGCATACAGGTCGAAGATATCGAGAGCAGGACGAAGAGTA	50
	* * * * *	
arab_cdna	TGAAACGGAATCCGATTAGAGAAACCACCGCCGGGAAAATCTCTTCGCCG	100
stricta_partial_trnscrpt	TCGAGAGCAGT--GAT-AAAGTGGACA-----GAGAAGATTCT-----	86
	* * * * *	
arab_cdna	TCGTCACCGACTTTGAAATGTTGCAGTCGCGCATATAAGAGCTGGATCTTA	150
stricta_partial_trnscrpt	-----AGAGTGAAGGAAGAAG--AGTTATATAG----TGAAT---G	118
	* * * * *	
arab_cdna	TTACGAAATCGATGCTTCGATTCTTCTCAGAGATCGCCGGAAAATCTTA	200
stricta_partial_trnscrpt	ATGAAAAGTCGATTCTTCGATTCTTCTCAGAGATCGCCGGAGA-TCTTA	167
	* * * * *	
arab_cdna	AATCGATTAGAGTCGTCATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGTGACGTGTCT	250
stricta_partial_trnscrpt	AATCGATTAGAGTCGTCATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGTGACGTGTCT	217
	* * * * *	
arab_cdna	CTCCGGTACCCAAGCATGTTTTCTCACCATCGCATTTCGATTACAGTAG	300
stricta_partial_trnscrpt	CTCCGATACCCAAGCATGTACTCAC TCCGATCGCATTTCGATTGACAGCAG	267
	* * * * *	
arab_cdna	GATGAACCGAATAAACCGATGAAGAAGAGGAGTGTTGGTGGTCTTCTTC	350
stricta_partial_trnscrpt	GATGAACCGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGTTGGTGGTCTTCTTC	317
	* * * * *	
arab_cdna	CTGTTTTCGACGAGAGTCATGTGATGGCTTCGGAGCTAGCTGGAGACTTG	400
stricta_partial_trnscrpt	CTCTTTTTGACGAGACCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGATTG	367
	* * * * *	
arab_cdna	CTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAACCTTTCATGAATAGAAATTCCTG	450
stricta_partial_trnscrpt	CTCTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCATGAACAGAAATTCCTG	417
	* * * * *	
arab_cdna	GGGTTTCTGGGTTTCT--AGTTCTTCTCGCAGGAACAATTTCCAAGAA	497
stricta_partial_trnscrpt	GAGTTTCTGGGTTTCTCTGCTTCTTCTCGCAGGAACA-----	456
	* * * * *	
arab_cdna	GGGAGGTGGTTTCTCAACCGGCGTACAATACTCGTCTCTGTGCGCTGCT	547
stricta_partial_trnscrpt	----GATGATTTCTCAACCGGCGTACAATACTAGGCTCGGTCGCGCGGCT	502
	* * * * *	
arab_cdna	TCACCGGAGGGAAAGTGCTCGTCTGAGCTGAAATCGGGAGGGATGATCAA	597
stricta_partial_trnscrpt	TCACCGGAGGGTAAATGTTGGTCTGAGCTGCGATCTGGAGA-ATGACT--	549
	* * * * *	

CLUSTALW2 sonuçlarına göre *BgSWI*, *BsSWI* ve *BhSWI* kısmi cDNA dizileri *AT5G51330* genine ait dizilerle sırasıyla 995 – 1579, 1 - 597, 650 – 1247 bazları arasında hizalanma göstermiştir.

*B. stricta*, *B. gunnisoniana* ve *B. holboellii* türlerine ait cDNA dizilerinden TRANSEQ programında (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>) 6 frame kullanılarak muhtemel protein dizileri elde edilmiştir (Çizelge 4.10., Çizelge 4.11., Çizelge 4.12.). Bu dizilerin *AT5G51330* protein dizileriyle benzerliği BLASTP programı ile incelenmiştir.(Şekil). BLAST sonuçlarına göre *BgSWI*, *BsSWI* ve *BhSWI* muhtemel kısmi peptid dizileri *AT5G51330* dizisi ile sırasıyla % 96, % 70 ve % 98 oranında benzerdir.



Çizelge 4.9. *Boechera* türleri ile *Arabidopsis AT5G51330* geni benzerliğini gösteren *B. gunnisonia* CLUSTALW2 sonucu

gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	ATTC-----TTC---TTACAATCAAT-ATGCCGACTCTTGTA	629
	ACTCAGGCCAGAGTTGAGGTCAGAAGCAAGGAAGCTGATTGGTG	1045
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	ACACG-CAATCTCCTCCCCACTTAATCATTTC	676
	ACAGGTCATTGGATCATCTGCTTAAGCACATGGCTGGTAAGGTGGCTCC	1095
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	---AGACCAACAT---TTTCCCTCCGGTGAAGCCGCGGAC	719
	TGGAGGTCAAGATAGGTTT-----ATGAGAAAGCACAAATGCAGATGGG	1138
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	GTATTGTA-CGCCGGTTGAGAAATC---ATCTTGTTCTCGGAG	763
	GCAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTCTGATTTGATTACATAAGGAAAGA	1188
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	AGCAGAAG---AAACCCAGA---AATCCACGAATTTCTGTT	806
	AGCAGGAGTTAAAGATCCTTACTGGAC	1233
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	ACTTCATGAGGTGC-----GATTCT-TCTG---TAGAGCAAATCT	842
	GCTTGGTGACAACCCTTCTCAAGATCCTGCTGCGCTGGAG-AAATCCGT	1282
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	-----CCAGCTAGCTCCGAAACCA---TCACATGGCTCT	873
	GACATCAGAGAAGAATTAGCTAGC-CTGAAAAGAGAATTGAAGAACTTG	1331
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	CGTCAAAAA--GAGGAAGAAGA-----CCACCACCCTCTC	912
	CGTCAAGAAGAAGGAGGAGGAGCTTGTATCATGACTACGCCATAATCT	1381
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	T-----CAAGGTTTATCCGGT---TC-----ATC--	935
	TGTTACTAGTCAGAATGATAATCTGATGACTCCAGCAAAGGAAATCTA	1431
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	-----CTGCTGCAATCGAAATGC-----GATCGG--AGTGAGTA	967
	CGCTGATCTGCTGAAAAGAAATACAAAATTGAGGACCAGCTAGTGATTA	1481
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	CATG-----CTTGGGTAT--CGGAG--AGACACG---TCGCTCG	999
	TTGGAGAAACCTTGC	1531
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	-CCGTG-----ATTTG-----CTCACCAT-GACGACTCT	1027
	ACAGTGGACGAGAATCTCCTAAAAAGCCAGACTCAACAGAGACACCTTT	1581
gunnisoniana_partial_trncrpt arb_cdna	AATCGATTTAAGG-TTCTCCGGCGAT-----CTCT-GAGGAAGAATCGAA	1070
	GCT--ACTAGAGGATCCACCACCAATACAGACACTAGAAGGAGAAGTCAA	1629

Çizelge 4.10. *BsSWI* muhtemel kısmi protein dizisi

XGGRIQVEDIESRTKSISSDKVDREEFSEGRRVIMMKSRFFDSSSEIAGDLKSIRVV  
MVSKITASDVSLRYPMSYLSRSHFDCSRMNRNKPLKKRSGGLLPLFDESHVMVS  
ELAGDLLYRRIAPHEVSMNRNSWSFWVSSASSRRNKMISQPAYNTRLGRAASPEG  
KCWSELRSSEL

Çizelge 4.11. *BhSWI* muhtemel kısmi protein dizisi

TEGKESSGVKEGGVCKEEIEKEDDDDDGNETEETKQIANEMTDGNRKRKLIESTE  
RLAQRQAKVYDQKQENQIVVYKRRAEKFKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNA  
VFGNSILRSQRLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAPGGQDRFMRKHNADGA  
MEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGE

Çizelge 4.12. *BgSWI* muhtemel kısmi protein dizisi

---

WNERISRAKIMSGTMFVKRNPIREISAGKNSSPSSSTVNVAVAHIRVGSYYEVDSSL  
PQRSPENLKSIRVVMVSKITASDVSLRYPSMYSLRSHFDCSRMNRNKPLKKRSGGG  
LLPLFDESHVMVSELAGDLLYRRIAPHEVSMNRNSWSFWVSSASSRRNKMISQPA  
YNTRLGRAASPEGKWCSELRS GEMIKWGRRLRVQYKSRHIDCKKNTEGKESGV  
KEGGVCKEEIEKEDDDDDGNETEETKQIANEMTDGNRKRKLIESTERLAQRAKV  
YDQKKENQIVVYKRRAEKKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRS  
QLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAPGGQDRFMRKHNADGAMEYWLESSD  
LIHIRKEAGVEDPYWTPPPGWNLGQX

---

*B. gunnisoniana*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerine ait muhtemel kısmi protein dizileri daha sonra *AT5G51330* protein dizileri CLUSTALW2 programı ile hizalanmıştır. CLUSTALW2 sonuçlarına göre *BgSWI*, *BhSWI* ve *BsSWI* dizileri ile *AT5G51330* dizileri sırasıyla 50 – 405, 215 – 400, 60 – 187 amino asit aralığında hizalanmıştır (Çizelge 4.14.).

Sonuç olarak *AT5G51330* geni *Arabidopsis* bitkisinde mayoz öncesi S ve G1 süreçlerinde dişi ve erkek mayositlerde ifade olmaktadır (Agashe ve ark., 2002; Mercier ve ark., 2003). *Boechera* bitkisi ile yapılan bu çalışma ile elde edilen RT-PCR sonuçları *Arabidopsis* bitkisine benzer şekilde mayoz öncesi çiçek tomurcuklarında ifade olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre ( BLAST, CLUSALW2 ) *B. stricta*, *B. holboellii* ve *B. gunnisoniana* türlerine ait genç tomurcuk dokularında *AT5G51330* geni ifadesi doğrulanmıştır.

Çizelge 4.13. *Boechera* ortologlarına ait kısmi muhtemel protein dizilerine ait BLASTP sonucu a) *BgSWI* b) *BhSWI* c) *BsSWI*

	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Links
a)	NP_568757.2	protein SWITCH1 (protein DYAD) [Arabidopsis thaliana] >sp Q9FGN8	682	682	96%	0.0	UGM
	AAL73988.1	DYAD [Arabidopsis thaliana] >dbj BAB09744.1  unnamed protein pro	676	676	95%	0.0	
	AAL13233.1	SWITCH1 splice variant 5 [Arabidopsis thaliana]	573	573	82%	2e-163	
	XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	546	546	96%	3e-155	G
	NP_001031931.2	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >qb AED93191.1  unc	141	141	29%	2e-33	UGM
	NP_192751.3	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >qb AED93190.1  unc	141	141	29%	2e-33	G
	BAA97239.1	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	141	141	29%	3e-33	
	XP_002874141.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_489223 [Arabidopsis lyrata subsp.	137	137	29%	3e-32	G
	XP_002865854.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >qb EFH65813.1	132	132	18%	1e-30	G
	AAW80879.1	At5q23610 [Arabidopsis thaliana]	122	122	21%	1e-27	
	AAT70435.1	At5q23610 [Arabidopsis thaliana]	122	122	21%	1e-27	
	AAG51303.1	PHD-finger protein, putative [Arabidopsis thaliana]	47.8	47.8	25%	3e-05	
	NP_176791.2	male meiotic MMD1 PHD-finger protein [Arabidopsis thaliana] >sp Q7	47.8	47.8	25%	3e-05	UG
	XP_002868484.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_894251 [Arabidopsis lyrata subsp.	47.4	47.4	14%	4e-05	G
	NP_178290.1	RING/FYVE/PHD zinc finger-containing protein [Arabidopsis thaliana]	47.4	47.4	15%	4e-05	UGM
	XP_002875094.1	PHD finger family protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >qb EFH5	46.6	46.6	15%	9e-05	G
	XP_002874056.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_489076 [Arabidopsis lyrata subsp.	38.5	38.5	19%	0.022	G
	NP_192748.1	RING/FYVE/PHD zinc finger-containing protein [Arabidopsis thaliana]	38.1	38.1	14%	0.025	UGM
	CAC69664.1	male sterility 1 protein [Arabidopsis thaliana] >emb CAC69664.1  ma	38.1	38.1	14%	0.026	
	XP_002875177.1	kelch repeat-containing F-box family protein [Arabidopsis lyrata sub	31.2	31.2	21%	3.4	G
b)	NP_568757.2	protein SWITCH1 (protein DYAD) [Arabidopsis thaliana] >sp Q9FGN8	316	316	99%	2e-86	UGM
	AAL73988.1	DYAD [Arabidopsis thaliana] >dbj BAB09744.1  unnamed protein pro	316	316	99%	2e-86	
	AAL13233.1	SWITCH1 splice variant 5 [Arabidopsis thaliana]	315	315	98%	3e-86	
	XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	172	172	98%	2e-43	G
	NP_001031931.2	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >qb AED93191.1  unc	139	139	60%	2e-33	UGM
	BAA97239.1	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	139	139	60%	2e-33	
	NP_192751.3	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >qb AED93190.1  unc	139	139	60%	2e-33	G
	XP_002874141.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_489223 [Arabidopsis lyrata subsp.	136	136	60%	2e-32	G
	AAW80879.1	At5q23610 [Arabidopsis thaliana]	121	121	44%	9e-28	
	AAT70435.1	At5q23610 [Arabidopsis thaliana]	121	121	44%	9e-28	
	AAG51303.1	PHD-finger protein, putative [Arabidopsis thaliana]	50.1	50.1	52%	2e-06	
	NP_176791.2	male meiotic MMD1 PHD-finger protein [Arabidopsis thaliana] >sp Q7	49.7	49.7	52%	3e-06	UG
	XP_002868484.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_894251 [Arabidopsis lyrata subsp.	48.5	48.5	53%	6e-06	G
	NP_178290.1	RING/FYVE/PHD zinc finger-containing protein [Arabidopsis thaliana]	47.0	47.0	39%	2e-05	UGM
	XP_002875094.1	PHD finger family protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >qb EFH5	45.4	45.4	33%	5e-05	G
	NP_192748.1	RING/FYVE/PHD zinc finger-containing protein [Arabidopsis thaliana]	40.4	40.4	30%	0.002	UGM
	CAC69664.1	male sterility 1 protein [Arabidopsis thaliana] >emb CAC69664.1  ma	40.4	40.4	30%	0.002	
	XP_002874056.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_489076 [Arabidopsis lyrata subsp.	40.4	40.4	30%	0.002	G
	XP_002875177.1	kelch repeat-containing F-box family protein [Arabidopsis lyrata sub	32.3	32.3	46%	0.45	G
	XP_002892456.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_472912 [Arabidopsis lyrata subsp.	28.9	28.9	33%	4.5	G
c)	XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	228	228	70%	5e-60	G
	NP_568757.2	protein SWITCH1 (protein DYAD) [Arabidopsis thaliana] >sp Q9FGN8	227	227	70%	6e-60	UGM
	AAL73988.1	DYAD [Arabidopsis thaliana] >dbj BAB09744.1  unnamed protein prot	227	227	70%	7e-60	
	AAL13233.1	SWITCH1 splice variant 5 [Arabidopsis thaliana]	213	213	67%	2e-55	
	XP_002865854.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >qb EFH65813.1	130	130	41%	9e-31	G
	NP_001190002.1	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >qb AEE77635.1  unc	29.6	29.6	15%	3.0	G
	AAK62631.1	AT5g62190/mmi9_10 [Arabidopsis thaliana]	28.5	28.5	84%	6.8	
	CA668194.1	RNA helicase [Arabidopsis thaliana]	28.1	28.1	84%	6.9	
	NP_201025.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7 [Arabidopsis thaliana] >sp	28.1	28.1	84%	6.9	UGM
	BA4556	hypothetical protein At2g17760 [imported] - Arabidopsis thaliana	27.7	27.7	28%	9.9	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Links
XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	228	228	70%	5e-60	G
NP_568757.2	protein SWITCH1 (protein DYAD) [Arabidopsis thaliana] >sp Q9FGN8	227	227	70%	6e-60	UGM
AAL73988.1	DYAD [Arabidopsis thaliana] >dbj BAB09744.1  unnamed protein prot	227	227	70%	7e-60	
AAL13233.1	SWITCH1 splice variant 5 [Arabidopsis thaliana]	213	213	67%	2e-55	
XP_002865854.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >qb EFH65813.1	130	130	41%	9e-31	G
NP_001190002.1	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >qb AEE77635.1  unc	29.6	29.6	15%	3.0	G
AAK62631.1	AT5g62190/mmi9_10 [Arabidopsis thaliana]	28.5	28.5	84%	6.8	
CA668194.1	RNA helicase [Arabidopsis thaliana]	28.1	28.1	84%	6.9	
NP_201025.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7 [Arabidopsis thaliana] >sp	28.1	28.1	84%	6.9	UGM
BA4556	hypothetical protein At2g17760 [imported] - Arabidopsis thaliana	27.7	27.7	28%	9.9	



Çizelge 4.14. *BgSWI*, *BhSWI* ve *BsSWI* muhtemel kısmi protein dizisi ve AT5G51330 protein dizisinin CLUSTALW2 sonucu a) *BgSWI* b) *BhSWI* c) *BsSWI*

a)	arab	-----MSSTMFVKRNPIRETTAGKISSPSSPTLNVAVAHIRAGSYEIDASILPQ	50
	pgunnisoniana_5	WNERISRAKIMSGTMFVKRNPIREISAGKNSSPSSSTVNVAVAHIRVGSYVEVDSILPQ	60
		**.....*:*	
	arab	RSPENLKSIRVVMVSKITASDVSLRYPMSFSLRSHFDYSRMNRNPKMKRSGGGLLVFVD	110
	pgunnisoniana_5	RSPENLKSIRVVMVSKITASDVSLRYPMSYSLRSHFDCSRMNRNPKLKKRSGGGLLPLFD	120
		*****:*	
	arab	ESHVMASELAGDLLYRRIAPHELMSNRNSWGFVWSSSRNPKFPREVVSQPAYNTRLGR	170
	pgunnisoniana_5	ESHVMVSELAGDLLYRRIAPHEVSMNRNSWGFVWSSASSR----RNKMISQPAYNTRLGR	176
		*****.....*:*	
	arab	AASPEGKCSSELKSGGMIKWGRRLRVQYQSRHIDTRKNKEGEESRVKDEVYKEEEMEKE	230
	pgunnisoniana_5	AASPEGKCWSELRSSEMIGWGRRLRVQYKSRHIDCKKNTGKESGKGVKGVCKEEIEKE	236
		*****:*	
	arab	EDDDDGNEIGGKQEAKEITNGNRKRKLIESTERLAQKAKVYDQKKETQIVVYKRKSER	290
	pgunnisoniana_5	DDDDDGNETEETKQIANEMTDGNRKRKLIESTERLAQRAKAVYDQKKENQIVVYKRAEK	296
		:*****:*	
	arab	KFIDRWSVERYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRPELRSEARKLIGDTGLLDHLLKHMA	350
	pgunnisoniana_5	KFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMA	356
		*****:*	
	arab	GKVAPGGQDRFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVKDPYWI PPPGWKLGDNPSQDP	410
	pgunnisoniana_5	GKVAPGGQDRFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWI PPPGWNLGQX-----	411
		*****:*	
b)	arab	ELKSGGMIKWGRRLRVQYQSRHIDTRKNKEGEESRVKDEVYKEEEMEKEEDDDDGNEIG	240
	pholb_3	-----TEGKESGKGVKGVCKEEIEKEDDDDGNETE	32
		*:*	
	arab	GTKQEAKEITNGNRKRKLIESTERLAQKAKVYDQKKETQIVVYKRKSERKFIDRWSVER	300
	pholb_3	ETKQIANEMTDGNRKRKLIESTERLAQRAKAVYDQKKENQIVVYKRAEKKFIDRWSVDR	92
		***:*	
	arab	YKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRPELRSEARKLIGDTGLLDHLLKHMAKVPAGGQDR	360
	pholb_3	YKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAKVPAGGQDR	152
		*****:*	
	arab	FMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVKDPYWI PPPGWKLGDNPSQDPVCAGEIRDIR	420
	pholb_3	FMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWI PPPGE-----	192
		*****:*	
c)	arab	VVMVSKITASDVSLRYPMSFSLRSHFDYSRMNRNPKMKRSGGGLLVFVDESHVMASELA	120
	strictapartial_2	VVMVSKITASDVSLRYPMSYSLRSHFDCSRMNRNPKLKKRSGGGLLPLFDESHVMVSELA	116
		*****:*	
	arab	GDLLYRRIAPHELMSNRNSWGFVWSSSRNPKFPREVVSQPAYNTRLCRAASPEGKCSS	180
	strictapartial_2	GDLLYRRIAPHEVSMNRNSWGFVWSSASSR----RNKMISQPAYNTRLCRAASPEGKCSS	172
		*****:*	
	arab	ELKSGGMIKWGRRLRVQYQSRHIDTRKNKEGEESRVKDEVYKEEEMEKEEDDDDGNEIG	240
	strictapartial_2	ELRSGEL-----	179
		**:*:*:	

**4.10. AT5G51330 *Boecheera* Genomik DNA Dizi Analizleri**

*AT5G51330* geni ortoloğunun *Boecheera* türlerinde (*B. divaricarpa*, *B. stricta* ve *B. gunnisoniana*) karakterize edilmesi amacıyla *A. thaliana* referans alınarak dizayn edilen primer çiftleri (Çizelge 3.6.) ile PCR yapılmıştır. Buna göre, *B. gunnisoniana* türü genomik DNA kalıplarından 2338 bç., *B. stricta* türü genomik DNA kalıplarından 2998 b.ç. , ve *B. divaricarpa* türü genomik DNA kalıplarından 2424 b.ç. PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.7., Şekil 4.8.). Sonrasında, PCR ürünleri jelden izole edilerek dizi analizine gönderilmiştir. Buradan elde edilen DNA dizileri Bio-Edit programıyla birleştirilmiştir. Bu dizilerin *AT5G51330* geni genomik DNA dizisiyle benzerliği Basic Local Search Alignment Tool (BLAST) programı ile kanıtlanmıştır (Çizelge 4.8). Blast sonuçlarına göre, elde edilen diziler *AT5G51330* geni genomik dizisi ile *B. stricta* türü %92, *B. gunnisoniana* % 87 ve *B. divaricarpa* türü ise %86 oranında benzerlik göstermekte ve *AT5G51330* geni genomik dizisinin sırası ile %75, %91, %91' ini kapsamaktadır ( Çizelge 4.9 ). Bununla birlikte *BsSWI*, *BgSWI* ve *BdSWI* dizileri ile *AT5G51330* genine ait diziler arasında sırasıyla 58, 131 ve 156 bazlık boşluklar gözlenmiştir. Bu türlere ait dizilerin hepsi 0.0 E – value değeri vermiştir. Bu parametreler *Arabidopsis* ve *Boecheera* türleri *AT5G51330* dizileri arasındaki benzerliğin oldukça yüksek oranda olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4. 15. *Boechera* DYAD geni genomik DNA dizisi blast analizi sonuçları. a) *B. divaricarpa* b) *B. gunnisoniana* c) *B. stricta*

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AB025621.1</a>	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	2368	2368	91%	0.0	86%	<a href="#">E</a>
<a href="#">AC232576.1</a>	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	869	1093	57%	0.0	82%	
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	719	2075	65%	0.0	95%	<a href="#">U</a>
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRN	712	2068	64%	0.0	95%	<a href="#">UEG</a>
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	712	2068	64%	0.0	95%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	712	2068	64%	0.0	95%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	676	1966	65%	0.0	96%	<a href="#">G</a>

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AB025621.1</a>	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	2364	2364	91%	0.0	87%	
<a href="#">AC232576.1</a>	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	843	1067	59%	0.0	82%	
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	782	2114	67%	0.0	95%	
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRN	774	2107	67%	0.0	95%	
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	774	2107	67%	0.0	95%	
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	774	2107	67%	0.0	95%	
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	739	1970	66%	0.0	95%	
<a href="#">XM_002722892.1</a>	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus myelin transcription factor 1-like	58.4	58.4	1%	2e-04	100%	
<a href="#">XM_002874185.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	54.7	54.7	1%	0.003	100%	
<a href="#">NM_114459.4</a>	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT3G45900) mRNA, complete	54.7	54.7	1%	0.003	96%	
<a href="#">AK228121.1</a>	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein, clone: RAFL14-5'	54.7	54.7	1%	0.003	96%	
<a href="#">BT014753.1</a>	Arabidopsis thaliana At3q45900 mRNA, complete cds	54.7	54.7	1%	0.003	96%	
<a href="#">BX824066.1</a>	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	54.7	54.7	1%	0.003	96%	
<a href="#">AL162459.2</a>	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 3, BAC clone F16L2	54.7	54.7	1%	0.003	96%	
<a href="#">NM_123398.3</a>	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT5G24890) mRNA, complete	52.8	52.8	1%	0.010	100%	
<a href="#">BT020475.1</a>	Arabidopsis thaliana At5q24890 gene, complete cds	52.8	52.8	1%	0.010	100%	
<a href="#">BT023742.1</a>	Arabidopsis thaliana At5q24890 gene, complete cds	52.8	52.8	1%	0.010	100%	
<a href="#">BT003969.1</a>	Arabidopsis thaliana clone RAFL15-46-E08 (R20871) unknown proteir	52.8	52.8	1%	0.010	100%	
<a href="#">AY088175.1</a>	Arabidopsis thaliana clone 42528 mRNA, complete sequence	52.8	52.8	1%	0.010	100%	
<a href="#">AF069716.1</a>	Arabidopsis Thaliana BAC F6A4, Chromosome IV, near 60.5 cM, comp	52.8	52.8	1%	0.010	100%	

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AB025621.1</a>	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	1448	2690	75%	0.0	92%	<a href="#">E</a>
<a href="#">AC232576.1</a>	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	872	872	35%	0.0	82%	
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRN	627	2122	52%	2e-175	95%	<a href="#">UEG</a>
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	627	2122	52%	2e-175	95%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	627	1970	49%	2e-175	95%	<a href="#">U</a>
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	627	2122	52%	2e-175	95%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	494	1997	46%	2e-135	96%	<a href="#">G</a>
<a href="#">NM_114459.4</a>	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT3G45900) mRNA, complete	56.5	56.5	1%	0.001	97%	<a href="#">UEG</a>
<a href="#">AK228121.1</a>	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein, clone: RAFL14-5'	56.5	56.5	1%	0.001	97%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">BT014753.1</a>	Arabidopsis thaliana At3q45900 mRNA, complete cds	56.5	56.5	1%	0.001	97%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">BX824066.1</a>	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	56.5	56.5	1%	0.001	97%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">AL162459.2</a>	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 3, BAC clone F16L2	56.5	56.5	1%	0.001	97%	<a href="#">E</a>
<a href="#">XM_002722892.1</a>	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus myelin transcription factor 1-like	52.8	52.8	0%	0.013	100%	<a href="#">GM</a>



Çizelge 4.16. *Boechera* DYAD geni genomik DNA dizisi blast analizi sonuçları a) *B.divaricarpa* b) *B. gunnisoniana* c) *B. stricta*

a)			
>  dbj AB025621.1  Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone			
Length=48008			
Score = 2368 bits (1282), Expect = 0.0			
Identities = 1978/2287 (87%), Gaps = 156/2287 (6%)			
Strand=Plus/Plus			
Query	196	AGTATCAGTAGCAGCAGCAAGAGCTGGCAATTTGGGCCATGCGAAAATCCCCACAGGTCT	255
Sbjct	5476		5535
Query	256	GCAGATTCTGAAACCAGTGTGCTTATAAGTGAAAGTGGTGATCGTTCCTGTTGATCATG	315
Sbjct	5536		5595
Query	316	CTT-CCTGCATTTTCTCTGTTTTGAGGTGACTCTGTGATTTGGTTCCCTTGTTCACCT	374
Sbjct	5596		5654
Query	375	CCTTCACCTTCTCCTTCTAGTGTCTCCATTGTTGGCGAATCCTCTAGTACCAAAGGTGCT	434
Sbjct	5655		5714
Query	435	CTGATGAGTCTGGCTTTTCGAGGAAAGTCTCGTCCACTGTTTTCTTAAGCCATCCCATGT	494
Sbjct	5715		5774
Query	495	CTTCCTGCAATATTGCAATTCATAAAAACAAAATGTTTCATC---ATC-ATTACGAC	550
Sbjct	5775		5834
Query	551	AAAGTGG-CATCTAATAGACAGCGGAAAT-GTTTGATCACACAGCTAAATGGACCCA	608
Sbjct	5835		5892
Query	609	TTTTACATGGCATTGAGTGCCTT-T-CTCCAAGGGAGTTTCCTAGTACTCTTGTATGAT	666
Sbjct	5893		5944
Query	667	TACTAAATCATAGC-AAATTTAGAAGATTTTACATTTTAAAGTAAATGGTTCAGCTAGAAC	725
Sbjct	5945		5983
b)			
Query	163	AGTATCAGTAGCAGCAGCAAGAGCAGGCAATTTGGGCCATGCGAAAATCCCCGAGGCGCT	222
Sbjct	5476		5535
Query	223	GCAGATTCTGAAACCAGTGTGCTTATAAGTGAAAGTGGTGATCGTTCCTGTTGATCATG	282
Sbjct	5536		5595
Query	283	CTT-CCTGCATTTTCTCTGTTTTGAGGTGACTCTGTGATTTGGTTCCCTTGTTCACCT	341
Sbjct	5596		5654
Query	342	CCTTCACCTTCTCCTTCTAGTGTCTCCATTGTTGGCGAATCCTCTAGTACCAAAGGTGCTG	401
Sbjct	5655		5714
Query	402	CTGATGAGTCTGGCTTTTCGAGGAAAGTCTCGTCCCTGTTTTCTTAAGCCATCCCATGT	461
Sbjct	5715		5774
Query	462	CTTCCTGCAATATTGCAATTCATAAAAACAAAATGTTTCATC---ATC-ATTA-CGAG	516
Sbjct	5775		5833
Query	517	CAAAGTGG-CATCTAATAGACAGCGGAAAT-GTTTGATCACACAGCTAAATGGACCC	574
Sbjct	5834		5891
Query	575	ATTTACATGGCATTGAGTGCCTT-T-CTCCAAGGGAGTTTCCTAGTACTCTGATATAA	632
Sbjct	5892		5945
Query	633	TACTAAATCATAGCAAATTTAGAAGATTTTACATTTTAAAGTAAATGGTTCAGCTAGAAC	692
Sbjct	5946		5983
Query	693	TAGTAAGAAGAGTGTCAAGTGTGTTAGAAACTCAATCT-GGGATATATATTACCTCCATTT	751
Sbjct	5984		6031
Query	752	ACACAAGGGTTTCTCCAATTCACCTAGTCTGCTCAATTTTGTATTTCTTT-AGC	810
Sbjct	6032		6089
c)			
Query	742	GAACCTCAATCT-GGGATATATATACCTCCATTTTACACAAGGTTTCTCCAATTATCACT	800
Sbjct	5997		6056
Query	801	AGCTGGTCTCAATTTGTATTCTTCTT-AGCAGATCAGCGTAGATTTCTGAGATGA	859
Sbjct	6057		6114
Query	860	AA-TAGCAGAGATGTTCA-AAACGTAGCATAAACAGTATCACAAGATAGAGAG-ATCTG	916
Sbjct	6115		6172
Query	917	TTACTGTTTCAAGCTCTTACCTTTGCTGGAGTCTCAAATTATCATGGTCCAGTCTTGA	976
Sbjct	6173		6223
Query	977	CTAGTAACACAAGAATTTGGGTAGTCAAGATAAAGCTCCTCCTCTTCTCTTTGAC	1036
Sbjct	6224		6283
Query	1037	GCCAGTTTCTCCAATTTCTTCTCAAGACCAAGACAAAATGAAATACAAAATTTGCTATA	1096
Sbjct	6284		6341
Query	1097	AGATAAC-AAA-AGAG-TGATCATATAACCAATTCATAAAGTTAGTCTTCTACCTTTTCA	1153
Sbjct	6342		6397
Query	1154	GGCTAGCTAATTTCTTCTGATCTCACGGATTTCTCCGGCGCAGACAGGATCTTGAGTAG	1213
Sbjct	6398		6457
Query	1214	GGTTGTCACCAAGCTTCCAACCAGGTGGAGGCGTCCAGTAAGGATCTTCACTCCTGCTT	1273
Sbjct	6458		6517
Query	1274	CTTTCTTATGTGAATCAAATCAGAATCTCCAACCAATACTCCATTGCCCCATCTGCAT	1333
Sbjct	6518		6577
Query	1334	TGTGCTTCTCATAAACCTATCTTCACTTCCAGGAGCCACCTTACCTGCCATGTGCTTAA	1393
Sbjct	6578		6637

Boechera ortologlarına ait genomik DNA dizilerinde açık okuma çerçeveleri (ORF) *Arabidopsis thaliana* AT5G51330 geni (<http://www.arabidopsis.org/>) referans alınarak algoritmaları farklı programlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, AT5G51330 genine ait referans genomik DNA dizileri FGENESH, Eukaryotic GeneMark (<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi>), AUGUSTUS (<http://augustus.gobics.de/>) programlarına yüklenmiş ve buradan elde edilen sonuçlar TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) verileri ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.17.). TAIR web sayfasında AT5G51330geni (NM\_124512 ) için uzunlukları sırası ile 37 b.ç., 82 b.ç., 101 b.ç., 760 b.ç., 374 b.ç., 109 b.ç., 84 b.ç ve 444 b.ç. olan 7 ORF bildirilmiştir.

Bu sonuçlara göre, TAIR bilgileri ile en yakın bilgileri veren programın FGENESH olduğu tespit edilmiştir ( Çizelge 4.17.).

*B. gunnisoniana*, *B. divaricarpa*, *B. holboellii* ve *B. stricta* türlerigenomik DNA dizileri FGENESH programı kullanılarak incelenmiştir.

Elde edilen ekzon dizileri ve *DYAD* mRNA dizilerinin benzer olduğu BLAST programında tespit edilmiştir (Çizelge 4.18) AT5G51330 genine ve *Boechera* ortologlarına ait ekzon dizileri CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ) programı kullanılarak sıralanmış (Çizelge 4.19.) ve dizilerin benzer olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. AT5G51330 geni ekzon bölgelerine ait bilgilerin farklı programlardaki sonuçları

	TAIR	FGENESH	AUGUSTUS	GENEMARKT
1	1 – 37	157 – 216	350 – 425	350 - 425
2	344 - 425	344 - 425	518 – 618	518 - 618
3	518 - 618	518 – 618	724 – 1433	724 - 1433
4	724 - 1433	724 – 1433	1521 - 1904	1521 - 1904
5	1521 - 1904	1521 – 1904	1994 – 2102	1991 - 2102
6	1994 - 2102	1994 -2102	2189 – 2272	2189 - 2272
7	2189 - 2272	2189- 2272	2517 – 2960	2517 -2960
8	2517 - 2960	2517 - 2960		

Çizelge 4.18. FGENESH programından elde edilen *Boechera* türlerine ait DYAD ekzon sekanslarına ait BLAST sonuçları. a) *B. divaricarapa* b) *B. stricta* c) *B. gunnisoniana*

a) Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NM_124512.2	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	1467	1952	88%	0.0	93%	U E G
AF466153.1	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	1467	1952	88%	0.0	93%	U G
AF362002.1	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	1467	1952	88%	0.0	93%	U
AF362001.1	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	1467	1952	88%	0.0	93%	U G
XM_002865808.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	1249	1749	87%	0.0	90%	G
CP002688.1	Arabidopsis thaliana chromosome 5, complete sequence	632	1991	86%	2e-177	95%	
AB025621.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	632	1991	86%	2e-177	95%	E
AC232576.1	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	503	828	51%	2e-138	89%	

b) Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NM_124512.2	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	1738	1738	89%	0.0	89%	U E G
AF466153.1	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	1738	1738	89%	0.0	89%	U G
AF362001.1	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	1738	1738	89%	0.0	89%	U G
AF362002.1	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	1585	1585	83%	0.0	89%	U
XM_002865808.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	843	1597	79%	0.0	93%	G
CP002688.1	Arabidopsis thaliana chromosome 5, complete sequence	721	1699	85%	0.0	95%	
AB025621.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	721	1699	85%	0.0	95%	E
AC232576.1	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	497	648	33%	7e-137	89%	
CP002686.1	Arabidopsis thaliana chromosome 3, complete sequence	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	
HP698308.1	Arabidopsis thaliana ecotype Landsberg erecta chromosome 3 genom	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	
NM_114459.4	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT3G45900) mRNA, complete	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	U E G
AF228121.1	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein, clone: RAFL14-5'	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	U G
BT014753.1	Arabidopsis thaliana AT3q45900 mRNA, complete cds	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	U G
BX824066.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	U G
AL162459.2	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 3, BAC clone F16L2	56.5	56.5	2%	5e-04	97%	E
XM_002222892.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus myelin transcription factor 1-like	52.8	52.8	1%	0.007	100%	G M

c) Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_002865808.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	534	1659	78%	5e-148	97%	G
NM_124512.2	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	529	1871	92%	2e-146	96%	U E G
AF466153.1	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	529	1871	92%	2e-146	96%	U G
AF362002.1	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, comple	529	1871	92%	2e-146	96%	U
AF362001.1	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial	529	1871	92%	2e-146	96%	U G
CP002688.1	Arabidopsis thaliana chromosome 5, complete sequence	448	1943	92%	7e-122	100%	
AB025621.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFG13	448	1890	92%	7e-122	97%	E
AC232576.1	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrS010113, complete sequenc	296	616	43%	3e-76	90%	
XM_002222892.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus myelin transcription factor 1-like	58.4	58.4	2%	1e-04	100%	G M
CP002686.1	Arabidopsis thaliana chromosome 3, complete sequence	54.7	54.7	2%	0.002	96%	
HP698308.1	Arabidopsis thaliana ecotype Landsberg erecta chromosome 3 genom	54.7	54.7	2%	0.002	96%	
XM_002874185.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	54.7	54.7	1%	0.002	100%	G
NM_114459.4	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT3G45900) mRNA, complete	54.7	54.7	2%	0.002	96%	U E G
AF228121.1	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein, clone: RAFL14-5'	54.7	54.7	2%	0.002	96%	U G
BT014753.1	Arabidopsis thaliana AT3q45900 mRNA, complete cds	54.7	54.7	2%	0.002	96%	U G
BX824066.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	54.7	54.7	2%	0.002	96%	U G
AL162459.2	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 3, BAC clone F16L2	54.7	54.7	2%	0.002	96%	E
NM_122398.3	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT5G24890) mRNA, complete	52.8	52.8	1%	0.006	100%	U E G
BT020475.1	Arabidopsis thaliana AT5q24890 gene, complete cds	52.8	52.8	1%	0.006	100%	U G
BT023742.1	Arabidopsis thaliana AT5q24890 gene, complete cds	52.8	52.8	1%	0.006	100%	U G
BT003969.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL15-46-E08 (R20871) unknown protei	52.8	52.8	1%	0.006	100%	U G
AY088175.1	Arabidopsis thaliana clone 42528 mRNA, complete sequence	52.8	52.8	1%	0.006	100%	U G
AF089716.1	Arabidopsis Thaliana BAC F6A4, Chromosome IV, near 60.5 cM, comp	52.8	52.8	1%	0.006	100%	

Bu çalışmalara göre *BdSWI* 1596 b.ç büyüklüğünde 6 (28 - 2325), *BsSWI* 1560 b.ç. büyüklüğünde 7 (707 – 2756), *BgSWI* 1488 b.ç büyüklüğünde 6 (88 - 2295) ve *BhSWI* 1941 b.ç. büyüklüğündeki 7 ekzona (31 - 2719 ) sahiptir (Çizelge 4.20.).

Blast sonuçlarına göre *BdSWI*, *BsSWI* ve *BgSWI* ekzon dizilerinin *AT5G51330* mRNA dizisiyle sırasıyla % 93, %89, % 96 oranlarında benzer olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.18.).

Ayrıca benzer sonuçlar *AT5G51330* ve *BgSWI*, *BhSWI*, *BdSWI*, *BsSWI* dizilerine ait ekzon sekansları CLUSTALW2 programıyla hizalandığında da elde edilmiştir.



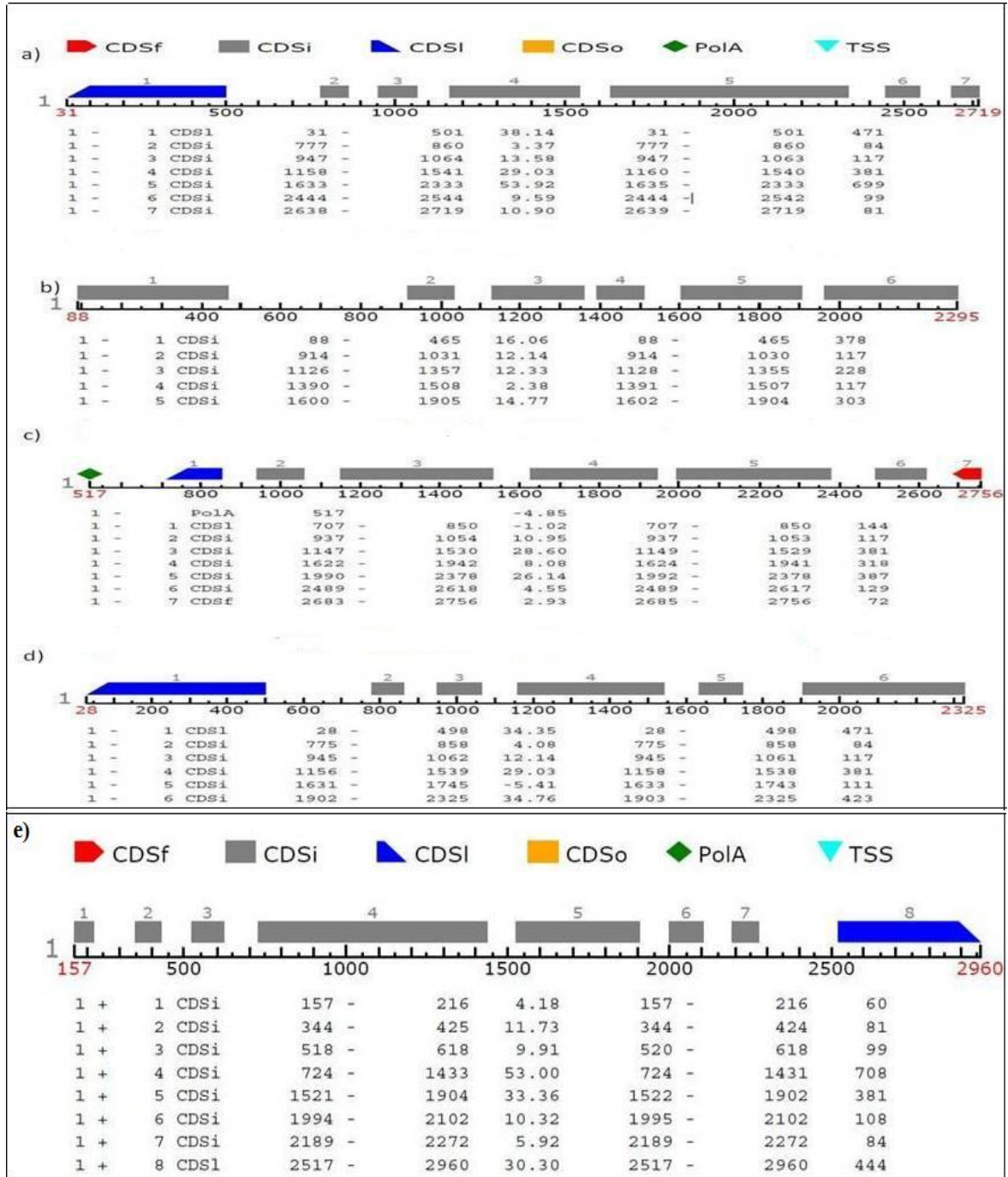
Çizelge 4.19. *BdSWI*, *BhSWI*, *BgSWI*, *BsSWI* ve *AT5G51330* ekzon sekanslarına ait CLUSTALW2 sonuçları

<i>divaricarpa</i>	---GTGAGCAAAATCACGGCGAGCGACGTGTCCTCCGATACCCAAAGCATGTACTCACTC	57
<i>holboellii</i>	ATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGCGACGTGTCCTCCGATACCCAAAGCATGTACTCACTC	240
<i>gunnisoniana</i>	---GTGAGCAAAATCACGGCGAGCGACGTGTCCTCCGATACCCAAAGCATGTACTCACTC	57
<i>arabidopsis</i>	ATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGCGACGTGTCCTCCGATACCCAAAGCATGTACTCACTC	300
<i>stricta</i>	ATGGTGAGCAAAATCACGGCGAGCGACGTGTCCTCCGATACCCAAAGCATGTACTCACTC	261
*****		
<i>divaricarpa</i>	CGATCGCATTTCGATTGACAGCAGGATGAACC GGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGGT	117
<i>holboellii</i>	CGATCGCATTTCGATTGACAGCAGGATGAACC GGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGGT	300
<i>gunnisoniana</i>	CGATCGCATTTCGATTGACAGCAGGATGAACC GGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGGT	117
<i>arabidopsis</i>	CGATCGCATTTCGATTGACAGCAGGATGAACC GGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGGT	360
<i>stricta</i>	CGATCGCATTTCGATTGACAGCAGGATGAACC GGAATAAACCTTTGAAGAAGAGGAGTGGT	321
*****		
<i>divaricarpa</i>	GGTGGTCTTC TTCTCTTTTTGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGAT	177
<i>holboellii</i>	GGTGGTCTTC TTCTCTTTTTGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGAT	360
<i>gunnisoniana</i>	GGTGGTCTTC TTCTCTTTTTGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGAT	177
<i>arabidopsis</i>	GGTGGTCTTC TTCTCTTTTTGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGAT	420
<i>stricta</i>	GGTGGTCTTC TTCTCTTTTTGACGAGAGCCATGTGATGGTTTCGGAGCTAGCTGGAGAT	381
*****		
<i>divaricarpa</i>	TTGCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCATGAACAGAAATTCGTGGAGTTTC	237
<i>holboellii</i>	TTGCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCATGAACAGAAATTCGTGGAGTTTC	420
<i>gunnisoniana</i>	TTGCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCATGAACAGAAATTCGTGGAGTTTC	237
<i>arabidopsis</i>	TTGCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCATGAACAGAAATTCGTGGAGTTTC	480
<i>stricta</i>	TTGCTTTACAGAAGAATCGCACCTCATGAAGTTTCATGAACAGAAATTCGTGGAGTTTC	441
*****		
<i>divaricarpa</i>	TGGGTTTCTTCGCTTCTTCCTCGCAGGAACA---GATGATTTCTCAA	282
<i>holboellii</i>	TGGGTTTCTTCGCTTCTTCCTCGCAGGAACA---GATGATTTCTCAA	465
<i>gunnisoniana</i>	TGGGTTTCTTCGCTTCTTCCTCGCAGGAACA---GATGATTTCTCAA	282
<i>arabidopsis</i>	TGGGTTTCTTCGCTTCTTCCTCGCAGGAACA---GATGATTTCTCAA	537
<i>stricta</i>	TGGGTTTCTTCGCTTCTTCCTCGCAGGAACA---GATGATTTCTCAA	486
*****		
<i>divaricarpa</i>	CCGGCGTACAATACTAGGCTCTGTGCGCGGGTTCACC GGAGGGGAAAATGTT-----	334
<i>holboellii</i>	CCGGCGTACAATACTAGGCTCTGTGCGCGGGTTCACC GGAGGGGAAAATGTT-----	517
<i>gunnisoniana</i>	CCGGCGTACAATACTAGGCTCTGTGCGCGGGTTCACC GGAGGGGAAAATGTT-----	334
<i>arabidopsis</i>	CCGGCGTACAATACTAGGCTCTGTGCGCGGGTTCACC GGAGGGGAAAATGTT-----	597
<i>stricta</i>	CCGGCGTACAATACTAGGCTCTGTGCGCGGGTTCACC GGAGGGGAAAATGTTGGTCTGAG	546
*****		
<i>divaricarpa</i>	-----GTACTGAGAGACTCCTCAGAGGGC	448
<i>holboellii</i>	TGATGGAAATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCCAGTACTGAGAGACTCCTCAGAGGGC	794
<i>gunnisoniana</i>	-----ATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCCAGTACTGAGAGACTCCTCAGAGGGC	551
<i>arabidopsis</i>	-----ATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCCAGTACTGAGAGACTCCTCAGAGGGC	863
<i>stricta</i>	-----ATCGTAAGAGAAAGCTGATTGAATCCAGTACTGAGAGACTCCTCAGAGGGC	824
*****		
<i>divaricarpa</i>	TAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAAGAGCAGAGA	508
<i>holboellii</i>	TAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAAGAGCAGAGA	853
<i>gunnisoniana</i>	TAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAAGAGCAGAGA	610
<i>arabidopsis</i>	TAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAAGAGCAGAGA	922
<i>stricta</i>	TAAGGTTTATGATCAGAAGAAGGAAAATCAAATCGTGGTCTATAAGAGAAGAGCAGAGA	883
*****		
<i>divaricarpa</i>	AGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAA	568
<i>holboellii</i>	AGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAA	913
<i>gunnisoniana</i>	AGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAA	670
<i>arabidopsis</i>	AGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAA	982
<i>stricta</i>	AGAAATTCATTGACAGATGGTCTGTTGATAGGTACAAACTAGCTGAGAGGAACATGTTAA	943
*****		
<i>divaricarpa</i>	AAGTGATGAAGGAGAAAAATGCAGTGTGTTGGCAACTCCATACACAGGTCACAGTTAAGGT	628
<i>holboellii</i>	AAGTGATGAAGGAGAAAAATGCAGTGTGTTGGCAACTCCATACACAGGTCACAGTTAAGGT	973
<i>gunnisoniana</i>	AAGTGATGAAGGAGAAAAATGCAGTGTGTTGGCAACTCCATACACAGGTCACAGTTAAGGT	730
<i>arabidopsis</i>	AAGTGATGAAGGAGAAAAATGCAGTGTGTTGGCAACTCCATACACAGGTCACAGTTAAGGT	1042
<i>stricta</i>	AAGTGATGAAGGAGAAAAATGCAGTGTGTTGGCAACTCCATACACAGGTCACAGTTAAGGT	1003
*****		
<i>divaricarpa</i>	CAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTGGTCTTTTAGATCATATGCTTAAGCACATGG	688
<i>holboellii</i>	CAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTGGTCTTTTAGATCATATGCTTAAGCACATGG	1033
<i>gunnisoniana</i>	CAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTGGTCTTTTAGATCATATGCTTAAGCACATGG	762
<i>arabidopsis</i>	CAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTGGTCTTTTAGATCATATGCTTAAGCACATGG	1102
<i>stricta</i>	CAGAAGCAAGGAAGCTGATCGGTGACACTGGTCTTTTAGATCATATGCTTAAGCACATGG	1063
*****		
<i>divaricarpa</i>	CAGGTAAGGTGGCTCC TGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACAAATGCAGATGGGG	748
<i>holboellii</i>	CAGGTAAGGTGGCTCC TGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACAAATGCAGATGGGG	1093
<i>gunnisoniana</i>	----AAGGTGGCTCC TGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACAAATGCAGATGGGG	817
<i>arabidopsis</i>	CTGGTAAGGTGGCTCC TGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACAAATGCAGATGGGG	1162
<i>stricta</i>	CAGGTAAGGTGGCTCC TGGAGGTCAAGATAGGTTTATGAGAAAAGCACAAATGCAGATGGGG	1123
*****		
<i>divaricarpa</i>	CAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTC TGATTTGATTCACATAAGGAAAAGAGCAGGAGTTG	808
<i>holboellii</i>	CAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTC TGATTTGATTCACATAAGGAAAAGAGCAGGAGTTG	1153
<i>gunnisoniana</i>	CAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTC TGATTTGATTCACATAAGGAAAAGAGCAGGAGTTG	877
<i>arabidopsis</i>	CAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTC TGATTTGATTCACATAAGGAAAAGAGCAGGAGTTG	1222
<i>stricta</i>	CAATGGAGTATTGGTTGGAGAGTTC TGATTTGATTCACATAAGGAAAAGAGCAGGAGTTG	1183
*****		

divaricarpa	AAGATCCTTACTGGACGCC	TCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACCC	TACTCAAGATC	868			
holboellii	AAGATCCTTACTGGACGCC	TCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACCC	TACTCAAGATC	1213			
gunnisoniana	AAGATCCTTACTGGACGCC	TCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACCC	TACTCAAGATC	937			
arabidopsis	AAGATCCTTACTGGACGCC	TCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACCC	TACTCAAGATC	1282			
stricta	AAGATCCTTACTGGACGCC	TCCACCTGGTTGGAAGCTTGGTGACAACCC	TACTCAAGATC	1243			
*****							
divaricarpa	CTGTCTGCGCCGGAGAAATCC	GTGAGATCAGAGAAGAATTAGCTAGCCTGAAAAGAGAAT	928				
holboellii	CTGTCTGCGCCGGAGAAATCC	GTGAGATCAGAGAAGAATTAGCTAGCCTGAAAAGAGAAT	1273				
gunnisoniana	CTGTCTGCGCCGGAGAAATCC	GTGAGATCAGAGAAGAATTAGCTAGCCTGAAAATAGAAT	997				
arabidopsis	CTGTCTGCGCTGGAGAAATCC	GTGACATCAGAGAAGAATTAGCTAGCCTGAAAAGAGAAT	1342				
stricta	CTGTCTGCGCCGGAGAAATCC	GTGAGATCAGAGAAGAATTAGCTAGCCTGAAAAGAGAAT	1303				
*****							
divaricarpa	TGGAGAAAC	TGGC	GTC	AAAGAAGGAAGAGGAGGAGCTTGT	TATC	GTGACTACACCAATT	988
holboellii	TGGAGAAAC	TGGC	GTC	AAAGAAGGAAGAGGAGGAGCTTGT	TATC	GTGACTACACCAATT	1333
gunnisoniana	TGGAGAAAC	TGGC	GTC	AAAGAAGGAAGAGGAGGAGCTTGT	TATC	GTGACTACACCAATT	1057
arabidopsis	TGAAGAAAC	TTGC	GTC	AAAGAAGGAAGAGGAGGAGCTTGT	TATC	ATGACTACGCCAATT	1402
stricta	TGGAGAAAC	TGGC	GTC	AAAGAAGGAAGAGGAGGAGCTTATT	TATC	GTGACTACACCAATT	1363
** ***** **							
divaricarpa	CTTGTGTTACTAGTCAGAAC	GTGGACCATGATAATTTGACGACTCCAGCAAAGGAAATCT	1048				
holboellii	CTTGTGTTACTAGTCAGAAC	GTGGACAATGATAATTTGACGACTCCAGCAAAGGAAATCT	1393				
gunnisoniana	CTTGTGTTACTAGTCAGAAC	GTGGACCATGATAATTTGACGACTCCAGCAAAGGAAATCT	1113				
arabidopsis	CTTGTGTTACTAGTCAGAA	-----TGATAATCTGATGACTCCAGCAAAGGAAATCT	1453				
stricta	CTTGTGTTACTAGTCAGAAC	GTGGACCATGATAATTTGACGACTCCAGCAAAGGAAATCT	1423				
*****				*****	***	*****	*****



Çizelge 4.20. FGENESH programından *Boechera* ve *Arabidopsis thaliana* türlerine ait *DYAD* genine ait ekzon bilgileri a) *B. holboelii* b) *B. gunnisoniana* c) *B. stricta* d) *B. divaricarpa* e) *Arabidopsis thaliana*



Çalışmada daha sonra, FGENESH programından elde edilen ORF dizileri TRANSEQ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>) programında *Boechera* türlerine ait muhtemel *DYAD* protein dizi bilgilerine ulaşmak için kullanılmıştır.

TRANSEQ sonuçları *B. stricta* türünde 519 amino asid (a.a), *B. gunnisoniana* türünde 496 a.a ve *B. divaricarpa* türünde ise 531 a.a uzunluğunda AT5G51330 protein dizisi oluşturmuştur (Çizelge 4.21.). Elde edilen protein bilgileri BLASTP programı ile incelenmiştir (Çizelge 4.22.).

BLASTP programından edilen sonuçlara göre *BdSWI* ve *BgSWI* protein sekanslarıyla AT5G51330 protein sekansları arasında % 100 oranında benzerlik tespit edilirken *BsSWI* dizisinde bu oranın % 96 olduğu görülmüştür.

Bunun yanında BLAST sonuçlarına göre *BdSWI*, *BgSWI* ve *BsSWI* protein dizilerinin *Arabidopsis lyrata*, *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* gibi türlere ait protein dizileriyle de benzer bölgelere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte *BdSWI*, *BsSWI* ve *BgSWI* protein dizileri *Zea mays* türünde AT5G51330 homologu olarak tanımlanan (Pawlowski ve ark., 2008 ) *AMI* ve *At5g23610* protein sekanslarıyla da benzerlik göstermiştir. Ayrıca *Boechea* ortologları ve AT5G51330 protein dizileri CLUSTALW2 programında sıralanmış ve blast sonuçları teyid edilmiştir ( Çizelge 4.23.).

AT5G51330 proteini dişi ve erkek mayozu sırasında kardeş kromatid kohezyonu ve mayotik kromozom organizasyonu ve mayotik rekombinasyonda gerekli olan daha önce tanımlanmamış bir protein kodlar. 639 amino asit olup nukleusta konumlanmıştır. Fosfolipaz C aktivitesine sahiptir. Fosfolipaz C domaini 400 – 471 a.a bölgesinde, coiled – coiled ( Ncoiled ) domain motif bölgesi ise 400 – 471 pozisyonunda yer almaktadır. Bu bölgeye ait sekansların *Boechea* ortologlarında da bulunduğu CLUSTALW2 sonucunda da gözlenmiştir (Çizelge 4.24). Ayrıca *Boechea* türlerine ait muhtemel peptid dizileri Myhits Motif SCAN programında ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) incelenmiş ve hizalama (alignment ) sonuçları teyid edilmiştir (Çizelge 4.25.).

Çizelge 4.21. TRANSEQ *BdSWI*, *BgSWI* ve *BgSWI* protein dizileri

<p>&gt;B. stricta  MFVKRNRIREISAGKTLRHVIDCECFVFLPVAVAHIRVGSYYEVDSSILPQRSPEN  LKSIRVVMVSKITASDVSLRYPMSYSLRSHFDCSRMNQNKPLKKRSGGGLLPLFDESHVM  VSELAGDLLYRRIAPHEVSMNRNSWSFWSSASSRRNKMISQPAYNTRLCRAASPEGKWCW  SELRSGEMIKWGRRLRVQRLRVQYKSRHIDCKNTEGKESSGVKEGGVCKEEIEEEDDDD  GNETEETKQIANEMTDGNRKRKLISSSTERLAQRAKVYDQKKENQIVVYKRRAEKKFIDR  WSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAP  GGEDRFMRKHADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGWKLGDNPTQDPVCAGE  IREIREELASLKRELEKLASKKEEEELIIVTTPNSCVTSQNVVDHNLTPAKEIYADLLK  KKYKIEDQLVIIGETLCKMEVYISQIEVLNTDILLTSSS</p>
<p>&gt;B. gunnisoniana  VSKITASDVSLRYPMSYSLRSHFDCSRMNRNKPLKKRSGGGLLPLFDESHVMVSELAGDL  LYRRIAPHEVSMNRNSWSFWSSASSRRNKMISQPAYNTRLCRAASPEGKCCTRVGILIV  RDEGKESSEGGVEEGVCKEEIEEEDDDDDGNETEETKQIANEMTDGNRKRKLISSSTERL  AQRAKVYDQKKENQIVVYKRRAEKKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVYGNSILRS  QLRSEARKLIGDTGKVAPGGQDRFMRKHADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPP  PGWKLGDNPQDPVCAGEIREIREELASLKIELEKLASKKEEEELVIVTTPNSCVTSQNV  DHDNLTPAKEDMGWLKKTGDENFPRKPDSSATPLVLEDSPMETLEGEVKEVNKGNQIT  ESPQNREKCKKHQDQERSPLSLISNTGFRICRPAGIFAWPKLPALAAATDTVLSNSNAKE  LASSPSHGPIYPSLCP</p>
<p>&gt;B. divaricarpa  VSKITASDVSLRYPMSYSLRSHFDCSRMNRNKPLKKRSGGGLLPLFDESHVMVSELAGDL  LYRRIAPHEVSMNRNSWSFWSSASSRRNKMISQPAYNTRLCRAASPEGKWCWSELRSGEM  IKWGRRLRVQYKSRHIVERYGLRDSL RGLRFMIRRRKIKSSVYKRRAEKKFIDRWSVDR  YKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAPGGQDR  FMRKHADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGWKLGDNPTQDPVCAGEIREIR  EELASLKRELEKLASKKEEEELVIVTTPNSCVTSQNVVDHNLTPAKEIYADLLKKYKI  EDQLVIIGETLCKMEEDMGWLKKTVDENFPRKPDSSATPLVLEDSPMETLEGEVKEVNK  GNQITESPQNREKCKKHQDQERSPLSLISNTGFRICRPVGI FAWPKLPALAAATDTVLSN  SNAKELASSPSHGPIYPSLCPVKPLAAKRPLGLPFPFTDTPEEAPTNL FNI</p>



Çizelge 4.22. *BdSWI*, *BsSWI* ve *BgSWI* ile AT5G51330 protein sekanslarının benzerliğini gösteren BLASTP sonucu a) *BgSWI* b) *BsSWI* c) *BdSWI*

Sequences producing significant alignments:					
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
a)					
Q9FGN8.1	RecName: Full=Protein DYAD; AltName: Full=Protein SWITCH 1 >qb SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] >qb AED96	879	879	100%	0.0
NP_568757.2	SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] >qb AED96	879	879	100%	0.0
AAL13233.1	SWI1 splice variant S [Arabidopsis thaliana]	878	878	100%	0.0
XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	783	783	100%	0.0
XP_002302485.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEE78464.1  predicted	337	423	93%	3e-90
XP_002510286.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >qb EEF51588.1	334	427	91%	2e-89
CAN69655.1	hypothetical protein VITISV_013005 [Vitis vinifera]	323	323	88%	4e-86
XP_002272589.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	319	319	88%	6e-85
CB118711.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	283	283	58%	4e-74
CB123546.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	222	222	25%	1e-55
XP_002326607.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEE72406.1  predicted	215	215	23%	1e-53
AAX95531.1	Expressed protein [Oryza sativa Japonica Group] >qb ABF97915.1  n	197	197	69%	3e-48
NP_001050785.1	Os03q0650400 [Oryza sativa Japonica Group] >qb AAX95530.1  Exp	196	196	69%	6e-48
EEC75837.1	hypothetical protein OsI_12821 [Oryza sativa Indica Group] >qb EEE	196	196	69%	7e-48
ABF97916.1	meiosis protein, putative, expressed [Oryza sativa Japonica Group]	196	196	69%	7e-48
NP_001139538.1	ameiotic1 [Zea mays] >qb ABG57250.1  ameiotic 1 [Zea mays]	195	195	96%	1e-47
CAN80782.1	hypothetical protein VITISV_000769 [Vitis vinifera]	189	236	38%	9e-46
CB127693.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	188	239	38%	2e-45
XP_002268155.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	188	234	38%	2e-45
XP_002466738.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_01q013215 [Sorghum bicolor] >qb	187	229	77%	4e-45
XP_002518005.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >qb EEF44523.1	187	256	38%	1e-43
ACU24617.1	unknown [Glycine max]	178	216	38%	2e-42
XP_002330461.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF09004.1  predicted	177	258	43%	3e-42
XP_002962607.1	hypothetical protein SELMODRAFT_404503 [Selaginella moellendorffii]	168	168	59%	2e-39
XP_002980479.1	hypothetical protein SELMODRAFT_420056 [Selaginella moellendorffii]	168	168	59%	3e-39
XP_002325728.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF00110.1  predicted	166	215	28%	7e-39
ABA99419.1	hypothetical protein LOC_Os12q42830 [Oryza sativa Japonica Group]	159	159	30%	1e-36
EAZ21269.1	hypothetical protein OsI_36921 [Oryza sativa Japonica Group]	158	158	30%	2e-36
ABA99418.1	hypothetical protein LOC_Os12q42820 [Oryza sativa Japonica Group]	156	156	27%	8e-36
EEC69705.1	hypothetical protein OsI_39173 [Oryza sativa Indica Group]	155	155	27%	1e-35
b)					
NP_568757.2	SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] >qb AED96	806	806	96%	0.0
Q9FGN8.1	RecName: Full=Protein DYAD; AltName: Full=Protein SWITCH 1 >qb SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] >qb AED96	806	806	96%	0.0
AAL13233.1	SWI1 splice variant S [Arabidopsis thaliana]	728	728	83%	0.0
XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	663	663	96%	0.0
XP_002302485.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEE78464.1  predicted	413	413	89%	4e-113
XP_002510286.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >qb EEF51588.1	411	411	90%	1e-112
XP_002272589.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	329	329	80%	7e-88
CAN69655.1	hypothetical protein VITISV_013005 [Vitis vinifera]	325	325	89%	8e-87
CB118711.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	315	315	75%	1e-83
EEC75837.1	hypothetical protein OsI_12821 [Oryza sativa Indica Group] >qb EEE	230	230	86%	3e-58
AAX95531.1	Expressed protein [Oryza sativa Japonica Group] >qb ABF97915.1  n	230	230	86%	3e-58
NP_001050785.1	Os03q0650400 [Oryza sativa Japonica Group] >qb AAX95530.1  Exp	230	230	86%	4e-58
CB123546.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	224	224	26%	2e-56
NP_001139538.1	ameiotic1 [Zea mays] >qb ABG57250.1  ameiotic 1 [Zea mays]	222	222	78%	1e-55
XP_002326607.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEE72406.1  predicted	219	219	24%	7e-55
ABF97916.1	meiosis protein, putative, expressed [Oryza sativa Japonica Group]	190	190	71%	5e-46
CB127693.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	189	241	39%	8e-46
XP_002518005.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >qb EEF44523.1	189	262	51%	9e-46
CAN80782.1	hypothetical protein VITISV_000769 [Vitis vinifera]	188	236	39%	4e-46
XP_002268155.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	187	234	39%	3e-45
ACU24617.1	unknown [Glycine max]	178	217	39%	2e-42
XP_002330461.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF09004.1  predicted	178	258	63%	2e-42
XP_002466738.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_01q013215 [Sorghum bicolor] >qb	177	250	59%	3e-42
XP_002325728.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF00110.1  predicted	171	219	42%	3e-40
ABA99419.1	hypothetical protein LOC_Os12q42830 [Oryza sativa Japonica Group]	162	162	27%	3e-37
EAZ21269.1	hypothetical protein OsI_36921 [Oryza sativa Japonica Group]	160	160	27%	4e-37
ABA99418.1	hypothetical protein LOC_Os12q42820 [Oryza sativa Japonica Group]	159	159	27%	8e-37
EEC69705.1	hypothetical protein OsI_39173 [Oryza sativa Indica Group]	159	159	27%	1e-36
NP_002980479.1	hypothetical protein SELMODRAFT_420056 [Selaginella moellendorffii]	155	196	53%	2e-35
XP_002962607.1	hypothetical protein SELMODRAFT_404503 [Selaginella moellendorffii]	154	196	53%	2e-35
c)					
NP_568757.2	SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] >qb AED96	768	768	100%	0.0
Q9FGN8.1	RecName: Full=Protein DYAD; AltName: Full=Protein SWITCH 1 >qb SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana] >qb AED96	768	768	100%	0.0
AAL13233.1	SWI1 splice variant S [Arabidopsis thaliana]	767	767	100%	0.0
XP_002865854.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_495204 [Arabidopsis lyrata subsp.	619	619	100%	3e-175
XP_002302485.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEE78464.1  predicted	305	305	97%	1e-80
XP_002272589.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	256	256	93%	6e-66
XP_002510286.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >qb EEF51588.1	252	252	54%	1e-64
CAN69655.1	hypothetical protein VITISV_013005 [Vitis vinifera]	227	227	93%	3e-57
CB118711.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	224	224	66%	2e-56
CB123546.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	189	189	24%	1e-45
XP_002326607.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEE72406.1  predicted	182	182	22%	1e-43
XP_002518005.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >qb EEF44523.1	156	211	45%	6e-36
CAN80782.1	hypothetical protein VITISV_000769 [Vitis vinifera]	155	155	27%	1e-35
XP_002268155.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	154	154	27%	4e-35
CB127693.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	154	191	29%	4e-35
AAX95531.1	Expressed protein [Oryza sativa Japonica Group] >qb ABF97915.1  n	150	150	67%	4e-34
NP_001050785.1	Os03q0650400 [Oryza sativa Japonica Group] >qb AAX95530.1  Exp	149	149	35%	9e-34
EEC75837.1	hypothetical protein OsI_12821 [Oryza sativa Indica Group] >qb EEE	149	149	35%	9e-34
ABF97916.1	meiosis protein, putative, expressed [Oryza sativa Japonica Group]	149	149	35%	1e-33
XP_002330461.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF09004.1  predicted	147	211	35%	4e-33
ACU24617.1	unknown [Glycine max]	143	143	27%	7e-32
NP_001139538.1	ameiotic1 [Zea mays] >qb ABG57250.1  ameiotic 1 [Zea mays]	142	182	72%	2e-31
XP_002325728.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >qb EEF00110.1  predicted	140	166	40%	7e-31
XP_002466738.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_01q013215 [Sorghum bicolor] >qb	137	215	74%	5e-30
ABA99419.1	hypothetical protein LOC_Os12q42830 [Oryza sativa Japonica Group]	135	135	25%	1e-29
EAZ21269.1	hypothetical protein OsI_36921 [Oryza sativa Japonica Group]	135	135	25%	2e-29
ABA99418.1	hypothetical protein LOC_Os12q42820 [Oryza sativa Japonica Group]	134	134	25%	4e-29
XP_002889554.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >qb EFH65813.1	134	134	14%	5e-29
EEC69705.1	hypothetical protein OsI_39173 [Oryza sativa Indica Group]	134	134	25%	5e-29
XP_002980479.1	hypothetical protein SELMODRAFT_420056 [Selaginella moellendorffii]	128	128	28%	2e-27
XP_002962607.1	hypothetical protein SELMODRAFT_404503 [Selaginella moellendorffii]	127	127	27%	3e-27

Çizelge 4. 23. *Arabidopsis* ve *Boechera* türlerine ait DYAD protein sekanslarının benzerliğini gösteren CLUSTALW2 sonucu (Fosfolipaz C Domaini ve Domain motifine ait bölgeler belirgindir.)

B.gunnisoniana	IVVYKRRAEKKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVYGNLSILRSQLRSEARKLIGDT-	253
B.divaricarpa	--VYKRRAEKKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTG	220
arabidopsis	IVVYKRKSERKFIDRWSVERYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRPELRSEARKLIGDTG	340
B.stricta	IVVYKRRAEKKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTG	345
	*****:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
B.gunnisoniana	-----GKVAPGGQDRFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGW	303
B.divaricarpa	LLDHMLKHMAGKVAPGGQDRFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGW	280
arabidopsis	LLDHLLKHMAGKVAPGGQDRFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVKDPYWTPPPGW	400
B.stricta	LLDHMLKHMAGKVAPGGEDRFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGW	405
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
B.gunnisoniana	KLGDNPTQDPVCAGEIREIREELASLKIELEKLASKKEEEELVIVTTPNSCVTSQNVDHD	363
B.divaricarpa	KLGDNPTQDPVCAGFIREIREELASLKRELEKLASKKEEEELVIVTTPNSCVTSQNVDHD	340
arabidopsis	KLGDNPSQDPVCAGEIRDIREELASLKRELEKLASKKEEEELVIMTTPNSCVTSQ---ND	457
B.stricta	KLGDNPTQDPVCAGEIREIREELASLKRELEKLASKKEEEELIIVITTPNSCVTSQNVDHD	465
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*	
B.gunnisoniana	NLITPAK-----EDMGWLKKTGDENFPRKPDSSATPL	395
B.divaricarpa	NLITPAKEIYADLLKKYKIEDQLVIGETLCKMEEDMGWLKKTVDENFPRKPDSSATPL	400
arabidopsis	NLMTPAKEIYADLIKKYKIEDQLVIGETLRKMEEDMGWLKKTVDENYPKKPDSTETPL	517
B.stricta	NLITPAKEIY-----ADLLKKYKIEDQL-----VI	491
	** **** * : * * : : *	

Çizelge 4.24 *BdSWI*, *BsSWI* ve *BgSWI* protein sekanslarına ait domain bölgelerini gösteren MOTIF SCAN verileri

<p>a)</p>	<p>Status: ? pos.: 281-295 raw-score = 3 N-score = 3.000 E-value = 2.1e+04</p>	<p>prf:NLS_BP Bipartite nuclear localization signal profile. [ entry ] [ graphics ]</p>
	<p>Status: ? pos.: 394-479 raw-score = 386 N-score = 7.267 E-value = 1.1</p>	<p>prf:PIPLC_X_DOMAIN Phosphatidylinositol- specific phospholipase X-box domain profile. [ entry ] [ graphics ]</p>
<p>b)</p>	<p>Status: ? pos.: 155-169 raw-score = 3 N-score = 3.000 E-value = 2.1e+04</p>	<p>prf:NLS_BP Bipartite nuclear localization signal profile. [ entry ] [ graphics ]</p>
	<p>Status: ? pos.: 269-354 raw-score = 390 N-score = 7.330 E-value = 0.99</p>	<p>prf:PIPLC_X_DOMAIN Phosphatidylinositol- specific phospholipase X-box domain profile. [ entry ] [ graphics ]</p>
<p>c)</p>	<p>Status: ? pos.: 190-204 raw-score = 3 N-score = 3.000 E-value = 2.1e+04</p>	<p>prf:NLS_BP Bipartite nuclear localization signal profile. [ entry ] [ graphics ]</p>
<p>match detail</p>	<p>match score</p>	<p>motif information</p>

MOTİF SCAN programından elde edilen verilere göre *BdSWI*, *BsSWI* ortologlarına ait protein sekanslarının iki muhtemel fonksiyonel bölge içerdiği ortaya çıkarılmıştır. Bu bölgeler bir nükleer lokalizasyon sinyali ve Phosphatidylinositol-specific phospholipase X-box domain bölgesidir. *BgSWI* proteininin ise nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi içerdiği ortaya çıkmıştır.

## BÖLÜM 5

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Apomiksinin moleküler biyolojisi hakkında yeterli bilgi mevcut olmamasına rağmen son çalışmalar apomiksi ile seksüel üremenin benzer moleküler süreçlerle kontrol edildiğini işaret etmektedir (Tucker and Koltunow, 2009). Bu çalışmalar, apomiksi süreçlerini kontrol eden genlerin belirlenmesi sayesinde apomiksinin kültür bitkilerine aktarılabilirliğini göstermiştir (d'Erfurth ve ark., 2009; Koltunow ve Tucker, 2008; Ravi ve ark., 2008). Seksüel türlerde mutant hatlarla yapılan çalışmalarla apomayoza benzer şekilde diploid gametlerin oluşumuna yol açan bazı genler tanımlanmıştır (d'Erfurth ve ark., 2008; Ravi ve ark., 2008; d'Erfurth ve ark., 2009; Pawlowski ve ark., 2009). Bu genler; apomayoza benzer şekilde indirgenmemiş diploid gametlerin oluşumuna yol açtığı bildirilen *AT5G51330* geni (Ravi ve ark., 2008), mısır bitkisinde mayoz bölünmenin başlatılmasından sorumlu bir gen olan *AMEIOTIC1* geni (Pawlowski ve ark., 2009), apomayoza benzer şekilde dişi ve erkek mayositlerin mayoz bölünme yerine mitoz bölünme geçirdikleri ve sonuçta fonksiyonel diploid gametleri oluşturan *OSD1*, *AtSPO11* ve *AtREC8* genleridir (d'Erfurth ve ark., 2009). *A. thaliana* türünde *DYAD/SWITCH1(SW11)* geni dişi ve erkek mayotik hücrelerde ifade olur ve kardeş kromatidlerin bir araya gelmesi ve sentromer organizasyonundan sorumludur (d'Erfurth ve ark., 2009). Benzer şekilde *OSD1* geni mayoz II geçişini kontrol ederken, *ATSP011* rekombinasyon ve eşleşmede, *ATREC8* geni ise kromatid segregasyonunda rol almaktadır (Chelysheva ve ark., 2005; d'Erfurth ve ark., 2009).

*Brassicaceae* ailesine dahil edilen, apomikt *Boechea* türleri birçok moleküler aracın uygulanabildiği *Arabidopsis* bitkisiyle yakın akraba olması nedeniyle apomiksi araştırmalarında model organizma olarak tercih edilmektedir (Schranz ve ark., 2005; Schranz ve ark., 2006). Bununla birlikte doğal apomikt türlerde apomiksi ile genlerin ortaya çıkarılmasında genetik haritalamaya dayalı teknikler bu türlerde ilgili lokusların etrafında rekombinasyonun baskılanması nedeniyle verimli olmamıştır (Spillane ve ark., 2004; Spillane ve ark., 2001). Doğal apomikt *Hieracium* türlerinde delesyon haritalama metodu ile apomayoz ve partenogenez ile ilişkili lokus tanımlanmıştır (Catanach ve ark., 2006). Benzer şekilde, bir *Hieracium* mutant hattında apomayozun ortadan kalktığı gösterilmiş ama ilgili gen ya da genler henüz belirlenmemiştir (Okada ve ark., 2007). Fakat *Hieracium* türlerinde gametofitik apomiksinin bir türü olan apospori gözlenmektedir. Apospori, *Boechea* türlerinde görülen ve tarımsal önemli bitkilerde ifadesi arzulanan diplospori ile farklılık göstermektedir. Ayrıca, doğal apomikt yakın akrabalar ile



melezleme çalışmaları da beklenen sonucu vermemiştir. Mısırın yakın akrabası apomikt *Tripsacum* ile melezlemelerden elde edilen hibritlere ait tohumlarda embriyo ve endosperm dokularının yeterince gelişmediği ortaya çıkmıştır (Leblanc ve ark., 2009).

Apomayoz süreci ile ilgili araştırmalar seksüel türlerde apomayozabenz fenotiplere yol açan mutant hatlarla yürütülmektedir. *SWITCH1* (*SWI1*) ilk kez *A. thaliana* bitkisinde izole edilmiştir ve bu genin mayoz sırasında kardeş kromatidlerin bir araya gelmesinden sorumlu olduğu (Mercier ve ark., 2001) ve mayotik S ve G1 süreçlerinde ifade olduğu bildirilmiştir (Mercier ve ark., 2003). Bu çalışmada seksüel *B. stricta*, apomiktik *B. gunnisoniana* ve *B. holboellii* türlerine ait genç tomurcuklarda da *AT5G51330* gen ifadesi tespit edilmiştir. Fakat *AT5G51330* geni sadece mayozun erken aşamasındaki hücrelerde anlatım yaptığından anlatım oldukça düşük seviyededir. Bu bakımdan tam uzunluktaki *AT5G51330* cDNA dizisi elde edilememiştir. Bu türlerde RT – PCR ile elde edilen *AT5G51330* genine ait diziler BLAST programından elde edilen verilere göre *Arabidopsis AT5G51330* genine ait mRNA dizisi ile yüksek benzerlik göstermiştir (*B.holboellii* %91, *B.stricta* %88, *B.gunnisoniana* %89). Bununla birlikte bu türlere ait çiçek, yaprak, süluk gibi vejetatif dokularda *AT5G51330* gen ifadesi gözlenmemiştir. *Arabidopsis thaliana* türünde çiçek dokularında *AT5G51330* geni ifade olurken yaprak dokularındaki ifadesi bazal seviyede gözlenmiştir (Agashe ve ark., 2002). Bu çalışma ile ilk kez apomikt türlerde *AT5G51330* geni ifadesi araştırılmıştır.

*Arabidopsis thaliana* türünde tanımlanan *AT5G51330* proteininin kardeş kromatid kohezyonunda rol aldığı gösterilmiştir fakat bilinen proteinlerle çok az veya hiç benzerlik göstermemektedir (Agashe ve ark., 2002). Kohezin proteinleri, SC proteinleri ile birlikte çalışarak homolog kromozomlar arasında lokalize olmakta ve kromozomların bir arada tutulmasını ve sonrasında salınmasını sağlamaktadır. *AT5G51330* geni genomik DNA üzerinde 5. kromozomda 3006 baz çiftlik bir bölgeden oluşmakta ve biri diğerinden 57 aminoasit daha kısa protein oluşturan iki transkripti vardır. Uzun transkript 1997 baz çifti uzunluğundadır ve 639 amino asit uzunluğunda protein dizisini kodlamaktadır. Bu dizi 639 aminoasitlik tam protein dizisinin 412 aminoasit uzunluğunda bir bölgesini kapsamaktadır. *BgSWI*, *BhSWI*, *BsSWI* ve *BdSWI* protein dizileri elde edilmiştir. Bu protein dizileri nükleer lokalizasyon sinyal bölgeleri içermektedir. Proteinlerin nükleusta ulaştırılması oldukça seçici bir işlemdir ve proteinler son yapılarında nükleusta birikmelerini sağlayacak sinyal bölgeleri içermelidir (Dingwall ve ark., 1986). MotifSCAN programı ile ortaya konulan “bipartite nuclear localization signal” nükleer hedefleme sekansı, model olarak gösterilen SV40 large T antigen proteininden elde edilen nükleer lokalizasyon sinyali

modelininden farklı olarak bir konsensus motif olarak tanımlanmıştır (Dingwall ve ark., 1991). AT5G51330 proteini mayozun erken basamaklarında nükleusta lokalize olmaktadır. Seksüel ve apomikt *Boecheira* türlerinde bu bölgelerin varlığı bu türlerde AT5G51330 ortologlarının AT5G51330 genine benzer şekilde nükleusta bulunduğunu ortaya koymaktadır. Nüklear lokalizasyon sinyalinin yanı sıra *Boecheira* türlerine ait AT5G51330 ve AT5G51330 proteini ile benzer şekilde Phosphatidylinositol-specific phospholipase X-box (PI-PLC) domain bölgesi içermektedir. Bu bölgeler sinyal iletimi süreçlerinde rol almakta ve düzenleyici bazı proteinlerce kontrol edilmektedir (Rhee ve ark., 1992). Bu sonuçlar AT5G51330 geninin mayoz sürecinde sinyal iletimi yolu ile diğer mayoz sürecinde rol alan proteinleri etkileyerek fonksiyonunu gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Buna rağmen AT5G51330 geninin diğer mayotik genler üzerine olası etkileri incelenmemiştir.

*Dyad* genine benzer şekilde mısır bitkisinde klonlanan *AMEIOTIC 1* geni mayoz bölünmenin başlatılmasından sorumlu bir gen olarak tanımlanmıştır (Pawlowski ve ark., 2009). Bu gene ait *ameiotic1-1 (am1-1)* mutant hatlarda erkek ve dişi mayositler mayoz bölünme yerine mitoz bölünmeler geçirmektedir. Bu mutantlarda homolog kromozomlar bir araya gelmemekte ve kardeş kromatid kohezyonu gerçekleşmemektedir. *AMI* geninin mayoz spesifik genlerin ifadesinin düzenlenmesi, mayotik kromozom yapısının oluşturulması, mayoz spesifik telomer yapısının meydana gelmesi, mayotik rekombinasyon, homologların çiftleşmesi, sinaps oluşumu gibi mayotik olayların gerçekleşmesinde gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Mısır bitkisine ait bu gen sonuç olarak *DYAD/SWITCH1* geni mutantlarında görülen mayoz yerine mitoz benzeri bölünme ile benzer fenotipler göstermektedir. Ayrıca, *AMEIOTIC1* proteini *DYAD/SWITCH1* ile %30 oranında bölgesel bir benzerlik göstermektedir (Pawlowski ve ark., 2009). *Boecheira* türlerinden elde edilen AT5G51330 protein dizileri de *AMEIOTIC* proteini ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışma ile ilk kez seksüel bir tür olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde mutasyonu apamayoza benzer fenotip gösterdiği tespit edilen *dyad* geninin doğal apomikt *B. gunnisonaia*, *B. divaricarpa* ve seksüel *B. stricta* türlerindeki karakterizasyonu yapılmış ve *B. gunnisoniana*, *B. stricta* ve *B. holboellii* türlerindeki generatif ve vejetatif dokulardaki ifadesi incelenmiştir. AT5G51330 geniyle alakalı apomikt türlerde daha ileri tekniklerle yapılacak çalışmalar apomiksi sürecinin anlaşılmasında faydalı olacaktır. AT5G51330 geni gibi mayoz süresince etkin rol oynayan diğer genlerin apomikt türlerdeki işlevinin ve bu

genlerin birbirleri ile etkileşiminin belirlenmesi apomiksinin anlaşılması açısından önem teşkil etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Agashe B., Prasad C. K. ve Siddiqi I., 2002. Identification And Analysis Of *DYAD*: A Gene Required For Meiotic Chromosome Organisation And Female Meiotic Progression In *Arabidopsis*. *Development.*, 129 (16): 3935-3943.
- Albertini E., Marconi G., Barcaccia G., Raggi L. ve Falcinelli M., 2004. Isolation Of Candidate Genes For Apomixis In *Poa pratensis* L. *Plant Molecular Biology*, 56 (6): 879-894.
- Albertini E., Marconi G., Reale L., Barcaccia G., Porceddu A., Ferranti F. ve Falcinelli M., 2005. *SERK* And *APOSTART*, Candidate Genes For Apomixis In *Poa pratensis*. *Plant Physiology*, 138 (4): 2185-2199.
- Anna M. ve Koltunow A., 1993. Understanding Apomixis: Recent Advances And Remaining Conundrums. *Plant Cell*, 16: S228–S245.
- Armstrong S. J. ve Jones G. H., 2001. Female Meiosis In Wild-type *Arabidopsis thaliana* And In Two Meiotic Mutants. *Sexual Plant Reproduction*, 13 (4): 177-183.
- Armstrong S. J. ve Jones G. H., 2003. Meiotic Cytology And Chromosome Behaviour In Wild-type *Arabidopsis thaliana*. *Journal Experimental Botany*, 54 (380): 1-10.
- Asker S. E. ve Jerling L., 1992. Apomixis In Plants. *Boca Raton FLA: CRC Press*, 298 p.
- Baker S. C., Robinson-Beers K., Villanueva J. M., Gaiser J. C. ve Gasser, C. S., 1997. Interactions Among Genes Regulating Ovule Development In *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 145: 1109-1124.
- Bedinger P., 1992. The Remarkable Biology Of Pollen. *Plant Cell*, 4 (8): 879-887.
- Bicknell R. A. ve Koltunow A. M., 2004. Understanding Apomixis: Recent Advances And Remaining Conundrums. *Plant Cell*, 16: 228-245.
- Boateng K. A., Yang X., Dong F., Owen H. A. ve Makaroff C. A., 2008. *SWI1* Is Required For Meiotic Chromosome Remodeling Events. *Molecular Plants*, 1 (4): 620-633.
- Cai X. ve Makaroff C. A., 2001. The *dsy10* Mutation of *Arabidopsis* Results In Desynapsis And A General Breakdown In Meiosis. *Sexual Plant Reproduction*, 14 (1): 63-67.
- Carman J. G., 1997. Asynchronous Expression Of Duplicate Genes In Angiosperms May Cause Apomixis, Bispory, Tetraspory, And Polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1): 51-94.
- Catanach A. S., Erasmuson S. K., Podivinsky E., Jordan B. R. ve Bicknell R., 2006. Deletion Mapping Of Genetic Regions Associated With Apomixis In *Hieracium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (49): 18650-18655.



- Chaudhury A. M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E. S. ve Peacock W. J., 1997. Fertilization-Independent Seed Development In *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 94: 4223–4228.
- Chelysheva L., Diallo S., Vezon D., Ghislaine G., Vrielynck N., Belcram K., Rocques N., Márquez-Lema A., Anuj M., Bhatt A. M., Horlow C., Mercier R., Mézard C. ve Grelon M., 2005. *AtREC8* And *AtSCC3* Are Essential To The Monopolar Orientation Of the Kinetochores During Meiosis. *Journal of Cell Sciences*, 118: 4621-4632.
- d'Erfurth I., Jolivet S., Froger N., Catrice O., Novatchkova M., Simon M., Jenczewski E. ve Mercier R., 2008. Mutations In *AtPS1* (*Arabidopsis thaliana* Parallel Spindle Lead To The Production Of Diploid Pollen Grains. *Plos Genetics*, 4(11): 274-371.
- d'Erfurth I., Jolivet S., Froger N., Catrice O., Novatchkova M. ve Mercier R., 2009. Turning Meiosis Into Mitosis. *Plos Biology*, 7(6): 1124-1371.
- Dingwall C. ve Laskey R. A., 1986. Protein Import Into The Cell Nucleus. *Annual Review of Cell Biology*, 2: 367-390.
- Dobes C., Mitchell-Olds T. ve Koch M. A. 2004., Intraspecific Diversification In North American *Boechera stricta* (= *Arabis drummondii*), *Boechera x divaricarpa* , And *Boechera holboellii* (*Brassicaceae*) Inferred From Nuclear And Chloroplast Molecular Markers - An Integrative Approach. *American Journal of Botany*, 91: 2087-2101.
- Drews G. N., Lee D. ve Christensen C. A., 1998. Genetic Analysis Of Female Gametophyte Development Aand Function. *Plant Cell*, 10 (1): 5-18.
- Dumas C., Knox R. B., McConchie C. A. ve Russell S. D., 1984. Emerginga Physiological Concepts In Fertilization. *What's New Iin Plant Physiology*, 15:17–20.
- Edwards K., Johnstone C. ve Thompson C., 1991. A Simple And Rapid Method For The Preparation Of Plant Genomic DNA For PCR Analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6):1349.
- Grimanelli D. ve Leblanc O., 2001. Developmental Genetics Of Gametophytic Apomixis. *Trends in Genetics*, 17(10): 597-604
- Grimanelli D., García M., Kaszas E., Perotti E. ve Leblanc O., 2003. Heterochronic Expression Of Sexual Reproductive Programs During Apomictic Development In *Tripsacum*. *Genetics*, 165(3):1521-31.
- Guitton A. E. ve Berger F., 2005. Control Of Reproduction By Polycomb Group Complex In Animals And Plants. *Developmental Biology*, 49: 707- 716.

- Hamant O., Ma H. ve Cande W. Z., 2006. Genetics Of Meiotic Prophase I In Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57 (1): 267-302.
- Koch M. A., Dobes C. ve Mitchell-Olds T., 2003. Multiple Hybrid Formation In Natural Populations: Concerted Evolution Of The Internal Transcribed Spacer Of Nuclear Ribosomal DNA (ITS) In North American *Arabis divaricarpa* (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, 20: 338-350
- Koltunow A. M. ve Grossniklaus U., 2003. Apomixis: A Developmental Perspective. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 547-574
- Koltunow A. M., Bicknell R. A. ve Chaudhury A. M., 1995. Apomixis – Molecular Strategies For The Generation Of Genetically Identical Seeds Without Fertilization. *Plant Physiology*, 108 (4): 1345-1352.
- Leblanc O., Grimanelli D., Hernandez-Rodriguez M., Galindo P. A., Soriano-Martinez A. M. ve Perotti E., 2009. Seed Development And Inheritance Studies In Apomictic *maize-Tripsacum* Hybrids Reveal Barriers For The Transfer Of Apomixis Into Sexual Crops. *International Journal of Developmental Biology*, 53(4):559-68.
- Luo M., Bilodeau P., Koltunow A., Dennis E. S., Peacock W. J. ve Chaudhury A. M., 1999. Genes Controlling Fertilization-Independent Seed Development In *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 96: 296–301.
- Mascarenhas J. P., 1989. The Male Gametophyte Of Flowering Plants. *The Plant Cell*, 1: 657-664.
- Matthew R. T., Ana-Claudia G., Araujo., Nicholas A., Paech V. H., Schmidt D. L., Rossell J. B., Sacco C. V. ve Koltunow A., 2003. Sexual And Apomictic Reproduction In *Hieracium* subgenus *Pilosella* Are Closely Interrelated Developmental Pathways. *The Plant Cell*, 15: 1524
- Matthew R., Tucker M. R., Ana-Claudia G., Araujo A. G., Nicholas A., Paech N. A., Hecht V., Ed D. L., Schmidt E. D. L., Jan-Bart R. J., Sacco C. D., Anna M. G. ve Koltunow A., 2003. Sexual And Apomictic Reproduction In *Hieracium* subgenus *Pilosella* Are Closely Interrelated Developmental Pathways. *The Plant Cell*, (15), 1524–1537.
- Matzk F. ve S. Prodanovic S., 2005. The Inheritance Of Apomixis In *Poa pratensis* Confirms A Five Locus Model With Differences In Gene Expressivity And Penetrance. *Plant Cell*, 17(1): 13-24.
- McCormick S., 1993. Male Gametophyte Development. *Plant Cell*, 5 (10): 1265-1275.

- Mercier R., Vezon D., Bullier E., Motamayor J. C., Sellier A., Lefevre F., Pelletier G. ve Horlow C., 2001. SWITCH1 (SWI1): A Novel Protein Required For The Establishment Of Sister Chromatid Cohesion And For Bivalent Formation At Meiosis. *Genes & Development*, 15 (14): 1859-1871.
- Mercier R., Armstrong S. J., Horlow C., Jackson N. P., Makaroff C. A., Vezon D., Pelletier G., Jones G. H. ve Franklin F. C. H., 2003. The Meiotic Protein SWI1 Is Required For Axial Element Formation And Recombination Initiation In *Arabidopsis*. *Development*, 130 (14): 3309-3318.
- Motamayor J. C. ve D. Vezon., 2000. *Switch ( swi1 )*, An *Arabidopsis thaliana* Mutant Affected In The Female Meiotic Switch. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4): 209-218.
- Nasmyth K., 2001. Disseminating The Genome: Joining, Resolving, And Separating Sister Chromatids During Mitosis Aand Meiosis. *Annual Review of Genetics*, 35 (1): 673-745.
- Nowack M. K., Grini P. E., Jakoby M. J., Lafos M., Koncz C. ve Schnittger., 2006. A Positive Signal From The Fertilization Of The Egg Cell Sets Of Endosperm Proliferation In Angiosperm Embryogenesis. *Nature Genetics*, 38: 63–67.
- Okada, T. ve Catanach A. S., 2007. An *Hieracium* Mutant, Loss Of Apomeiosis 1 (*loa1*) Is Defective In The Initiation Of Apomixis. *Sexual Plant Reproduction*, 20(4): 199-211.
- Ozias-Akins P. ve Dik P. J., 2007. Mendelian Genetics Of Apomixis In Plants. *Annual Review of Genetics*, 41: 509-537.
- Park D. J., 2004. 3' RACE Lane: A Simple And Rapid Fully Nested PCR Method To Determine 3'-terminal cDNA Sequence. *Biotechniques*, 36(4):586-8, 590.
- Pawlowski W. P., Wang C. J., Golubovskaya I. N., Szymaniak J. M., Shi L., Hamant O., Zhu T., Harper L., Sheridan W. F. ve Cande W. Z., 2009. Maize *AMEIOTIC1* Is Essential For Multiple Early Meiotic Processes And Likely Required For The Initiation Of Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 106 (9): 3603-8.
- Ravi M., Marimuthu M. P. A. ve Siddiqi I., 2008. Gamete Formation Without Meiosis In *Arabidopsis*. *Nature*, 451 (7182): 1121-U10.
- Reiser L. ve Fischer, R. L. 1993. The Ovule And The Embryo Sac. *The Plant Cell*, 5: 1291-1301.

- Rhee S. G. ve Choi K. D., 1992. Regulation Of Inositol Phospholipid-Specific Phospholipase C Isozymes. *The Journal Of Biological Chemistry*, 12393-12396.
- Robbinsa J., M. Dilwortht S. M., Ronald A., Laskeya R. A . ve Dingwallc C., 1991. Two Interdependent Basic Domains In Nucleoplasmin Nuclear Targeting Sequence: Identification Of A class Of Bipartite Nuclear Targeting Sequence. *Science Direct*, 615-623.
- Robinson-Beers K., Pruitt, R. E. ve Gasser, C. S. 1992. Ovule Development In Wild-Type *Arabidopsis* And Two Female-Sterile Mutants. *The Plant Cell*, 4: 1237-1249.
- Rozen S. ve Skaletsky H. J., 2000. Primer3 On The WWW For General Users And For Biologist Programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*, 365-386.
- Russell S. D., 1993. The Egg Cell: Development And Role In Fertilization And Early Embryogenesis. *Plant Cell*, 5 (10): 1349-1359.
- Savidan Y., 2000., Apomixis, The Way Of Cloning Seeds. *Biofutur*, 2000(198): 38-43.
- Savidan Y., 2001. Transfer Of Apomixis Through Wide Crosses In The Flowering Of Apomixis: From Mechanisms To Genetic Engineering. *Mexico:CIMMYT/EU/IRD*, 153-167.
- Schneitz K., Hülkamp M. ve Pruitt R. E., 1995. Wild-Type Ovule Development In *Arabidopsis-Thaliana* - a Light-Microscope Study Of Cleared Whole-Mount Tissue. *Plant Journal*, 7 (5): 731-749.
- Schneitz K., Hülkamp M., Kopczak, S. D. ve Pruitt , R. E. 1997. Dissection Of Sexual Organ Ontogenesis: A Genetic Analysis Of Ovule Development In *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124: 1367-1376.
- Schneitz K., 1999. The Molecular and Genetic Control Of Ovule Development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 13-17.
- Schranz M. E., Dobes C., Marcus A. Koch. ve Mitchell-Olds T., 2005. Sexual Reproduction, Hybridization, Apomixis, And Polyploidization In The Genus *Boechera* (*Brassicaceae*). *Developmental Biology and Genetics*. 92: 1797-1810.
- Siddiqi I. ve Ganesh G., 2000. The *dyad* Gene Is Required For Progression Through Female Meiosis In *Arabidopsis*. *Development*, 127(1): 197-207.
- Spillance C., Steimer A. ve Grossniklaus U., 2001. Apomixis In Agriculture: The Quest For Clonal Seeds. *Springerlink*, 14: 179-187.
- Spillane C. ve Curtis M. D., 2004. Apomixis Technology Development - Virgin Births In Farmers' Fields?. *Nature Biotechnology*, 22(6): 687-691.

- Taşkın K. M., Turgut K. ve Scott R. J., 2009. Apomeiotic Pollen Mother Cell Development In The Apomictic *Boechera* Species. *Biologia Plantarum*, 53 (3): 468-474.
- Yadegari R. ve Drews G. N., 2004. Female Gametophyte Development. *Plant Cell*, 16 (suppl\_1):133-141S.

## ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	17
Çizelge 3.2. PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	18
Çizelge 3.3. <i>AT5G51330</i> geni için kullanılan PCR segmentleri ve döngü sayısı.....	18
Çizelge 3.4. <i>ACTIN2</i> geni için kullanılan PCR programı.....	18
Çizelge 3.5. PCR’ da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	20
Çizelge 3.6. Primerlerden Beklenen PCR Ürünü.....	21
Çizelge 3.7. Optimum RACE - PCR bileşenleri ve Konsantrasyonları.....	24
Çizelge 3. 8. <i>AT5G51330</i> geni RACE - PCR segmentleri ve döngü sayısı.....	25
Çizelge 3. 9. RACE PCR için kullanılan kontrol primerleri ve beklenen baz uzunluğu.....	25
Çizelge 3. 10. RACE – PCR kontrol bileşenleri ve konsantrasyonları.....	26
Çizelge 4. 1. <i>AT5G51330</i> cDNA Dizisi ve Ekzon Dizileri.....	44
Çizelge 4. 2. <i>B. holboellii</i> <i>AT5G51330</i> genine ait kısmi cDNA dizisi.....	45
Çizelge 4. 3. <i>B. stricta</i> <i>AT5G51330</i> genine ait kısmi cDNA dizisi.....	45
Çizelge 4. 4. <i>B. gunnisoniana</i> <i>AT5G51330</i> ortoloğuna ait kısmi cDNA dizisi.....	45
Çizelge 4.5. <i>B. gunnisoniana</i> , <i>B. holboellii</i> ve <i>B. stricta</i> türlerine ait <i>AT5G51330</i> geni BLAST sonuçlarını gösteren çizelge a) <i>B.gunnisoniana</i> türüne ait BLAST sonucu. b) <i>B. holboellii</i> türüne ait BLAST sonucu. c) <i>B. stricta</i> türüne ait BLAST sonucu.....	46
Çizelge 4. 6. <i>Boechera</i> türleri ile <i>AT5G51330</i> geni benzerliğini gösteren blast analizi sonucu. a) <i>B. gunnisoniana</i> b) <i>B. holboellii</i> c) <i>B. stricta</i> .....	47
Çizelge 4. 7. <i>Boechera</i> türleri ile <i>Arabidopsis AT5G51330</i> geni benzerliğini gösteren <i>B. holboellii</i> CLUSTALW2 sonucu.....	48
Çizelge 4. 8. <i>Boechera</i> türleri ile <i>Arabidopsis AT5G51330</i> geni benzerliğini gösteren <i>B. stricta</i> CLUSTALW2 sonucu.....	49
Çizelge 4.9. <i>Boechera</i> türleri ile <i>Arabidopsis AT5G51330</i> geni benzerliğini gösteren <i>B. gunnisonia</i> CLUSTALW2 sonucu.....	50
Çizelge 4.10. BsSWI muhtemel kısmi protein dizisi.....	50
Çizelge 4.11. BhSWI muhtemel kısmi protein dizisi.....	50
Çizelge 4.12. BgSWI muhtemel kısmi protein dizisi.....	51

Çizelge 4.13. <i>Boechera</i> ortologlarına ait kısmi muhtemel protein dizilerine ait BLASTP sonucu. a) BgSWI b) BhSWI c) BsSWI.....	52
Çizelge 4.14. BgSWI, BhSWI ve BsSWI muhtemel kısmi protein dizisi ve AT5G51330 protein dizisinin CLUSTALW2 sonucu.....	53
Çizelge 4. 15. <i>Boechera</i> <i>DYAD</i> geni genomik DNA dizisi blast analizi sonuçları. a) <i>B. divaricarpa</i> b) <i>B. gunnisoniana</i> c) <i>B. stricta</i> .....	55
Çizelge 4.16. <i>Boechera</i> <i>DYAD</i> geni genomik DNA dizisi blast analizi sonuçları a) <i>B. divaricarpa</i> b) <i>B. gunnisoniana</i> c) <i>B. stricta</i> .....	56
Çizelge 4.17. <i>AT5G51330</i> geni ekzon bölgelerine ait bilgilerin farklı programlardaki sonuçları.....	57
Çizelge 4.18. FGENESH programından elde edilen <i>Boechera</i> türlerine ait <i>DYAD</i> ekzon sekanslarına ait BLAST sonuçları a) <i>B. divaricarpa</i> b) <i>B. stricta</i> c) <i>B. gunnisoniana</i> .....	58
Çizelge 4.19. <i>BdSWI</i> , <i>BhSWI</i> , <i>BgSWI</i> , <i>BsSWI</i> ve <i>AT5G51330</i> ekzon sekanslarına ait CLUSTALW2 sonuçları.....	59
Çizelge 4.20. FGENESH programından <i>Boechera</i> ve <i>Arabidopsis thaliana</i> türlerine ait <i>DYAD</i> genine ait ekzon bilgileri a) <i>B. holboelii</i> b) <i>B. gunnisoniana</i> c) <i>B. stricta</i> d) <i>B. divaricarpa</i> e) <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	61
Çizelge 4.21. TRANSEQ <i>BdSWI</i> , <i>BgSWI</i> ve <i>BgSWI</i> protein dizileri.....	63
Çizelge 4.22. <i>BdSWI</i> , <i>BsSWI</i> ve <i>BgSWI</i> ile <i>AT5G51330</i> protein sekanslarının benzerliğini gösteren BLASTP sonucu a) <i>BgSWI</i> b) <i>BsSWI</i> c) <i>BdSWI</i> .....	64
Çizelge 4.23. <i>Arabidopsis</i> ve <i>Boechera</i> türlerine ait <i>DYAD</i> protein sekanslarının benzerliğini gösteren CLUSTALW2 sonucu.....	65
Çizelge 4.24 <i>BdSWI</i> , <i>BsSWI</i> ve <i>BgSWI</i> protein sekanslarına ait domain bölgelerini gösteren MOTIF SCAN verileri.....	65

## ŞEKİLLER

Şekil 4.1. Dişi Gametofit Gelişimi.....	2
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritaları.....	20
Şekil 3. 5. <i>AT5G51330</i> geni ve dizayn edilen primerler.....	22
Şekil 3. 6. 3' RACE yöntemi.....	23
Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan <i>Boechera</i> türleri. a) <i>B. holboellii</i> b) <i>B. stricta</i> d) <i>B. gunnisoniana</i> d) <i>B. divaricarpa</i> .....	29
Şekil 4.7. İzole edilen DNA, RNA, elde edilen cDNA ve <i>ACTIN2</i> genine ait PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri.....	31
Şekil 4.8. <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisine ait genomik DNAdan çoğaltılan PCR ürünleri.....	32
Şekil 4.9. <i>B.gunnisoniana</i> genomik DNA kalıbından <i>AT5G51330</i> ortoloğunun çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri (D7, D12, D8, D9).....	33
Şekil 4.10. <i>B. gunnisoniana</i> türüne ait genomik DNA kalıbından elde edilen PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü.....	34
Şekil 4.6. <i>B. divaricarpa</i> genomik DNA kalıbından <i>AT5G51330</i> geninin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri ( D7, D8, D9 ).....	35
Şekil 4.7. <i>B. divaricarpa</i> türüne ait genomik DNA kalıbından elde edilen PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.8. <i>B. stricta</i> türüne ait genomik DNA kalıbından D7, D10 ve D11 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü.....	36
Şekil 4.11. <i>AT5G51330</i> geni için beş primer çifti ile yapılan PCR sonuçları.....	37
Şekil 4.10. a) <i>B. gunnisoniana</i> <i>AT5G51330</i> geni transkriptinin çoğaltılmasında için gerçekleştirilen PCR reaksiyonları ve kullanılan primer çiftleri. b) D 6 primer çifti kullanılarak elde edilen 1243 b.ç PCR ürününü gösteren agaroz jel görüntüsü.....	38
Şekil 4. 11. <i>B. gunnisoniana</i> türünde D6 primer çiftiyle elde edilen PCR ürününe (1243 b.ç.) ait agaroz jel görüntüsü.....	39
Şekil 4. 12. <i>B. holboellii</i> türünde ait <i>AT5G51330</i> geni PCR ürünlerini gösteren agaroz jel görüntüleri.....	40
Şekil 4.13. <i>B. stricta</i> türünde <i>AT5G51330</i> geni transkriptinin çoğaltılması için gerçekleştirilen 3'RACE reaksiyonu ve kullanılan primerler (D4, D1 ).....	41
Şekil 4. 14. <i>B. stricta</i> türüne ait RACE ürünlerini gösteren agaroz jel görüntüleri.....	42



## **ÖZGEÇMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı: Gözde NIŞLI

Doğum Yeri: Yıldırım / BURSA

Doğum Tarihi: 06.01.1985

### **EĞİTİM DURUMU**

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi,

Biyoloji Bölümü, Biyoloji A.B.D

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,

Biyoloji Bölümü, Biyoloji A.B.D

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (İyi)

### **BİLİMSEL FAALİYETLER**

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası – Ulusal

**Ulusal Bildiriler:**

c) Katıldığı Projeler

### **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: -

### **İLETİŞİM**

E-posta Adresi:gozde.nisli@yahoo.com