

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

**APOMİKT BOECHERA HOLBOELLİ (HORNEM.)**  
**Á.LÖVE & D.LÖVE TÜRÜNDE *DYAD* GEN**  
**ORTOLOĞUNUN KAREKTERİZASYONU**

**Fatih SEZER**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 15.07.2010**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

FATİH SEZER, tarafından YRD. DOÇ. DR. KEMAL MELİK TAŞKIN yönetiminde hazırlanan “APOMİKT BOECHERA HOLBOELLİ (HORNEM.) Á.LÖVE & D.LÖVE TÜRÜNDE DYAD GEN ORTOLOĞUNUN KAREKTERİZASYONU” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik Taşkın

---

Danışman

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Doç. Dr. Fatma SILAN

---

Jüri Üyesi

---

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 05/07/2010

Prof. Dr. İsmail TARHAN

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.**

Fatih SEZER

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesi ile eğitimim ve çalışmamın her aşamasında desteği bulunan danışmanım Sayın Hocam **Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**' a bana bu konuda çalışma fırsatı tanıdığı, çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemediği için teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, tüm araştırmalarımnda beraber çalıştığım, her türlü desteğini benden esirgemeyen çalışma ortağım ve çok değerli arkadaşım **Gözde NİŐLİ**'ye teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca çalışmalarımın yürütülmesi esnasında manevi desteğinin yanı sıra çalışmalarımnda yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan arkadaşım **Yasemin DEMİRGAN**'a teşekkür ederim.

Ayrıca manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım **Damla ERDEN** ve **İlknur Nezahat ÇILDIR**'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana inanan ve her zaman yanımda olan gerek manevi gerek maddi desteğini esirgemeyen annem **Ayşe SEZER**, babam **Engin SEZER**'e ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatih SEZER

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$\mu$ l	Mikrolitre
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
<i>CLF</i>	
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
g	Gram
<i>GADPH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
m	Maternal
M	Molar
MAH	Megaspor Ana Hücresi
<i>MEO</i>	<i>MEIDOS</i>
<i>MET1a/s</i>	<i>Antisense Methyltransferase</i>
ml	Mililitre
ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
p	Paternal
PAH	Polen Ana Hücresi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Rotation per minute (Devir/dakika)

RT-PCR	Reverse Transcription PCR
TAE	Tris EDTA Asetat
U.V.	ultra violet
Swi1	Switch1

## ÖZET

APOMİKT BOECHERA HOLBOELLII (HORNEM.) Á.LÖVE & D.LÖVE  
TÜRÜNDE *DYAD* GEN ORTOLOĞUNUN KAREKTERİZASYONU

Fatih SEZER

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

05.07.2009, 48

Bu çalışmada, apomikt ve seksüel *Boechea* türlerinde *DYAD* gen ortoloğunun yapısı ve ifadesi ortaya çıkarılmıştır. *Boechea* çiçek tomurcuklarından *DYAD* cDNA'sı RT-PCR aracılığı ile elde edilmiştir. *SWITCH1/DYAD* geni 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. Bitkilerde eşeysiz tohum oluşumu anlamına gelen apomiksi, genetik olarak birbirinin aynı, anasal kopyalardan oluşan nesillerin oluşumuna yol açar. Apomiksinin zirai bitkilere aktarılması bitki yetiştiriciliğinde heterozigotluğun sabitlenmesi, hibrit özelliklerinin korunması ve hibritlerin nesiller boyunca çoğaltılabilmesine olanak tanıyacak olması nedeni ile gelecek vaat eden bir konudur. Apomiksinin altında yatan moleküler etmenler tam olarak bilinmiyor olsa da *DYAD* geni üzerinde yapılan çalışmalar bu gendeki mutasyonların apomiksinin önemli bir aşaması olan apomayozu yol açabildiğini göstermiştir. *DYAD* geni seksüel bir tür olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde tanımlanmış ve bu gene ait mutant *Arabidopsis* hatlarında yapısı ve fonksiyonu ortaya konmuştur. Bu çalışma ile doğal apomikt ve seksüel *Boechea* türlerine ait protein dizileri *Arabidopsis SWITCH1/DYAD* geni ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Filogenetik analizler *Boechea SWITCH1/DYAD* geni ortoloğuna ait muhtemel protein dizisinin 6 farklı türe ait proteine benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. *Boechea* muhtemel proteinleri bir fosfolipaz C domaini ve nükleer lokalizasyon sinyali içermektedir.

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

**ABSTRACT****CHARACTERIZATION OF DYAD ORTHOLOGS IN APOMICT BOECHERA  
HOLBOELLIİ**

Fatih SEZER

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Assistant Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

05.07.2010, 48

Here we report the structure and expression patterns of orthologs for DYAD gene in the apomict *Boechera*. The DYAD cDNAs were obtained by RT-PCR from *Boechera* flower buds. Dyad is a mutant allele of SWI1 gene characterized as a required gene for meiotic chromosome organization and female meiotic progression in *Arabidopsis*. DYAD gene causes formation of two diploid cells instead of expected 4 haploid gametes. It is reported that this function of DYAD gene leads to functional apomeiosis in *Arabidopsis thaliana*. Apomixis is a reproduction way 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. Sexual reproduction is a process involves gametes formed by meiosis and double fertilization. However in apomictic process, many of these steps are either bypassed or modified. In apomict species; chromosome number in male and female gametes are not reduced (apomeiosis), nevertheless embryo sac and pollen formation continues. Furthermore, the apomeiotic egg cell spontaneously forms the embryo (parthenogenesis). Therefore, apomixis leads to clonal reproduction by seeds. Although, introduction of apomixis from natural apomicts to culture plants haven't been achieved by hybridization methods. In this work, structure of DYAD gene which leads *A. thaliana* plants to apomeiosis is investigated with RT-PCR method in apomict plants for the first time. We have isolated a 1243 bp long transcript of DYAD gene in *Boechera* showed high similarity with *Arabidopsis thaliana* DYAD. Phylogenetic analysis revealed six similar protein sequences from various species.

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



<b>İÇERİK</b>	<b>Sayfa</b>
TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	viii
<b>BÖLÜM 1 - GİRİŞ .....</b>	<b>2</b>
<b>BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>6</b>
<b>BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Genomik DNA İzolasyonu .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan Tamponların Hazırlanması .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3. RNA İzolasyonu.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4. cDNA Sentezi.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....</b>	<b>14</b>
<b>3.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....</b>	<b>17</b>
<b>3.6.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması .....</b>	<b>18</b>
<b>3.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi .....</b>	<b>18</b>
<b>3.8. DNA Dizi Analizi .....</b>	<b>19</b>
<b>3.9. Bioinformatik Çalışmaları (Filogenetik Analizler) .....</b>	<b>19</b>
<b>BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Genomik DNA İzolasyonu .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....</b>	<b>22</b>
<b>4.4. PCR Optimizasyonu.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.1 AT5G51330 Geni <i>Boechera</i> Homoloğunun Genomik DNA'dan çoğaltılması .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.2 AT5G51330 Geni <i>Boechera</i> Homoloğunun RT-PCR ile çoğaltılması .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5. <i>BgDYAD</i> Geninin Sekans Analizleri.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6. AT5G51330 Geninin Biyoinformatik Analizleri.....</b>	<b>29</b>
<b>4.7. <i>BsDYAD</i> Geninin Sekans Analizleri .....</b>	<b>39</b>

<b>BÖLÜM 5 - SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>45</b>
<b>Çizelgeler .....</b>	<b>I</b>
<b>Şekiller .....</b>	<b>II</b>
<b>Özgeçmiş.....</b>	<b>IV</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Bitkilerin yaşam döngülerinde haploid (gametofit) ve diploid (sporofit) nesiller birbirini takip eder. Bu döngüde kromozom sayısı haploid (n) sporlar mayoz sonrasında oluşur. Gametofitler sporlardan mitoz ve farklılaşma ile meydana gelir. Angiospermlerde gametofit çiçek dokuları (üreme organı) ile örtülmüş az sayıda hücreden oluşmaktadır. Dış gametofit Embriyo kesesi veya megagametofit olarak da bilinir ve ovaryum içerisinde ovüllerde gelişir (Drews ve ark., 1998; Yadegari ve Drews, 2004). Erkek gametofit ise anter adı verilen organlarda bir vejetatif hücre ve iki sperm taşıyan polen tanesinden ibarettir (McCormick, 1993).

Anterlerde mayoz ile meydana gelen sporlar ( $n:1\text{paternal}:1\text{p}$ ) asimetrik mitoz bölünme ile “vejetatif” ve “generatif” hücreleri oluşturur. Mısır bitkisinde bu sürecin hemen ardından generatif hücre ikinci bir mitoz geçirek sperm hücrelerini oluşturur. Ancak bunun aksine birçok angiosperm türünde generatif çekirdek bölünme sürecini polen tüpünün stigma içerisinde uzamaya başladığı dönemde tamamlar.

Angiospermlerde seksüel üreme polen tanesinin anterlerden stigmaya taşınması ile başlar. Stigmaya ulaşan polen içerisindeki vejetatif çekirdek çimlenerek polen tüpünü oluşturur. Polen tüpü stilus boyunca ovüllere ve dolayısı ile embriyo kesesine doğru gelişir (Mascarenhas, 1989). Bu sayede spermler ( $n:1\text{p}$ ) embriyo kesesine taşınmaktadır.

Embriyo kesesi ise megaspor ana hücresinden mayoz ile oluşmaktadır. Bu süreçte mayoz bölünmenin ürünü olan dört haploid megaspordan üç tanesi dejenerer olurken sadece bir tanesi fonksiyoneldir. Fonksiyonel megaspor ana hücresi arka arkaya üç mitoz ile 8 nükleuslu embriyo kesesini meydana getirir. Angiospermlerin çoğunda üç antipod hücresi, iki sinerjit hücre, bir merkezi hücre ( $2n:1\text{maternal}+1\text{maternal}:2\text{m}$ ) ve bir yumurta hücresi ( $n:1\text{m}$ ) içeren polygonum tip embriyo kesesi görülür (Yadegari ve Drews, 2004; Drews ve ark., 1998; Russell, 1993). Bu süreçlerin sonunda polen tüpü ile embriyo kesesine ulaşan sperm hücrelerinden biri yumurta hücresini diğeri ise merkezi hücrelerle birleşerek çifte döllenmeyi gerçekleştirir (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).

Angiospermlerde olduğu gibi diğer ökaryotlarda da mayoz üremede merkezi rolü olan bir süreçtir. Mayoz tek bir replikasyon sonrasında birbirini takip eden iki sitokinez (hücre bölünmesi) sonucunda oluşan dört haploid hücrenin meydana gelmesi ile mitozdan ayrılmaktadır (Hamant ve ark., 2006).

Mayoz, mayoz I ve mayoz II olmak üzere birbirini takip eden sitokinez aşamaları ile tamamlanan iki süreçten oluşur. Mayoz I; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarından oluşur. Mayoz I profaz safhası ise, leptoten, zigoten, Pakiten ve diakinez aşamalarından oluşur. Sitolojik olarak mayoz leptoten aşamasında kromozomların yoğunlaşmış etraflarında axial elemanların birikmeye başladıkları dönemde ilk olarak belirlenebilmektedir. Zigoten evresinde homolog kromozomlar bir araya gelmeye başlar. Bu evreden pakiten evresine kadar homolog kromozomlar birleşip sinaps yapılarını oluştururlar. Pakiten sinaps ve rekombinasyon süreçlerinin son hallerine ulaştığı evredir. Bu süreçlerde dört alt üiteden oluşan kohezin protein kompleksi homologların bir arada tutulmasında rol almaktadır. Diploten evresinde, zigoten evresinde kromozomlar arasında oluşturulan sinoptonemal kompleks dağılır ve homologlar ayrılmaya başlar. Buna rağmen homologlar metafaz I evresine kadar kiazmalar sayesinde bir arada tutulmaktadır. Kiazmalar parça değişimi (krossing over) yolu ile homologlar arası rekombinasyonun meydana geldiği bölgelerdir. Geç diploten ve diakinez aşamalarında hücrelerde kromozomlar bivalentler halinde organize olmuşlardır. Diakinez aşamasında kromozomlar daha da yoğunlaşarak kısalıp kalınlaşır ve nükleus zarı kaybolmaya başlar. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, metafaz I aşamasında beş bivalent halinde organize olmuş homologlar metafaz tablasında dizilir. Anafaz I aşamasında kiazmalar açılır ve homolog kromozomlar birbirinden ayrılır (Hamant ve ark., 2006; Armstrong ve Jones, 2001, 2002; Nasmyth, 2001; Hirano, 2000).

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

Yukarıda açıklanan süreçlere karşılık bazı angiosperm türleri aseksüel yollarla üremektedirler. Tohumların döllenmeye ihtiyaç duymadan geliştiği bu tip üreme apomiksi olarak bilinmektedir. Bu terim de -miski “karıştırma eylemi” ve apo “olmaksızın” anlamındadır. Günümüzde apomiksi daha çok angiosperm türlerde görülen eşeysiz tohum oluşumu ifade edecek şekilde kullanılmaktadır. Dolayısı ile apomiksi tohum oluşumu yoluyla gerçekleşmesi bakımından diğer eşeysiz üreme yollarından ayrılmaktadır. Ayrıca

tohumların döllenme olmaksızın meydana gelmesi ve ana bitkiyle aynı genotipe sahip bireylerin oluşumuna yol açmasıyla ise eşeyli üremeden ayrılmaktadır. Bu anlamıyla ilk kez 1841 yılında J. Smith *Alchornea* (*Euphorbiaceae*) bitkisinde apomiktik gelişimi rapor etmiştir (Asker ve Jerling, 1992).

Apomiksi ile bitkiler mayoz ve döllenme gerçekleşmeden ana bitki ile genetik olarak eş tohumlar üretir (Bicknell ve Koltunow, 2004). Apomiktik üreme 400'den fazla angiosperm türü ve 40'dan fazla familyada bildirilmiştir (Carman, 1997).

Günümüzde sporofitik apomiksi (adventif embriyonu), ve gametofitik apomiksi olmak üzere iki farklı apomiksi mekanizması tanımlanmıştır (Koltunow, 1993). Adventif embriyonide embriyo ovül gelişiminin geç aşamalarında doğrudan embriyo kesesi dışarısındaki sporofitik hücrelerden gelişmektedir. Bunun aksine gametofitik apomikside embriyo kesesi mayoz geçirmemiş öncül hücrelerden oluşmakta ve yumurta hücreleri partenogenetik olarak gelişmektedir. Gametofitik apomiksinin embriyo kesesini oluşturan hücre tipine göre iki farklı tipi görülmektedir. Diplosporik tiplerde embriyo kesesi mayozun yarıda kesilmesiyle megaspor ana hücrelerinden gelişirken, aposporik tiplerde mayoz geçirmemiş embriyo kesesi ovül içerisindeki somatik hücrelerden köken alır (Asker ve Jerling, 1992; Bicknell ve Koltunow, 2004; Spielman ve ark., 2003; Koltunow, 1993).

Apomiktik embriyolar erkek gamet olmaksızın yumurta hücresinden (partenogenez) üretilirken, merkezi hücreler kendiliğinden (otonom) ya da döllenme (pseudogami) ile endospermi geliştirirler (Asker ve Jerling, 1992; Koltunow, 1993).

Gametofitik apomiksinin iki tipi de genel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada mayoz geçirmemiş gamet ( $2n$ ) oluşumuna yol açan apomayoz, ikinci aşamada ise diploid gametlerden embriyo oluşturan partenogenez görülmektedir. Üçüncü aşamada ise fonksiyonel endosperm ya kendiliğinden ya da döllenme ile oluşmaktadır.

Gametofitik apomiksi mekanizmaları arasında kuşkusuz en ilgi çekici olan süreç apomayozdur. Buna karşın, doğal apomikt türlerde apomayozu sebep olan genetik mekanizmalar henüz açıklanamamıştır. Buna rağmen mutasyon çalışmaları ile seksüel türlerde apomayozu benzer şekilde diploid gametlerin oluşumuna yol açan bazı genler tanımlanmıştır (Ravi ve ark., 2008; Pawlowski ve ark., 2008).

Bir model organizma olan ve seksüel süreçlerle tohum oluşturan *Arabidopsis thaliana* türünde mayoz süreçlerini kontrol eden genler üzerine yürütülen bir çalışmada

*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 2 diploid (2n) gametin oluşumuna yol açtığını bildirilmiştir (Ravi ve ark., 2008). Bu çalışmada ilgili mutasyonun sadece dişi mayozda etkili olduğu gösterilmiştir. 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). Bunlar arasında daha önceden tanımlanmış *swi1.2* mutantında dişi ve erkek gametler kısır (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 olduğu için kısır. 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. Buna rağmen doğal apomikt türlerde bu genin yapısı ve fonksiyonu incelenmemiştir.

Doğal apomikt ve seksüel türleri barındıran *Boechera* türleri ile yapılan çalışmalarla polen ana hücrelerinin gelişim aşamaları ortaya konmuştur. Apomikt ve seksüel *Boechera* türlerinde polen ana hücresi mayoz süreci incelenmiştir (Taskin ve ark., 2009). Profaz I aşamasında 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. Anafaz ve telofazda yoğunlaşmış kromozomlar normal mayoz sürecinde gözlenenin aksine iki eş grup olarak ayrılmamakta ve sonuç olarak kromozom sayısı yarılanmamış bir nükleus oluşur. Bu durum ayrıca diğer apomikt bitkilerde mayozun atlanması yani apomayoz olarak bilinmektedir (Grimanelli ve ark., 2001; Noyes, 2005). Ardından yarılanmamış nükleus, kallos duvarı ile çevrili dyadları oluşturmuş ve tek bir sitokinez aşaması ile takip edilen tek bir mitoz geçirir (Taşkın ve ark., 2009).

Bu çalışmada, seksüel yollarla tohum oluşturan *A. thaliana* bitkisinden karakterize edilen *AT5G51330* geninin doğal apomikt *Boechea* türlerindeki ortoloğu karakterize edilmiştir. *Boechea* 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 *Boechea* 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 *Boechea* türlerinde *AT5G51330* homolog geni genomik DNA ve cDNA dizileri ile elde edilmiştir. *Boechea* *AT5G51330* genine ait bu diziler, diğer türlerde tanımlanmış *AT5G51330* geni homologları ve benzer protein dizileri ile biyoinformatik araçlarla karşılaştırılmıştır.

*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**

Doğal apomikt ve seksüel türleri barındıran *Boechera* türleri ile yapılan çalışmalarla polen ana hücrelerinin gelişim aşamaları ortaya koymuştur (Taşkın ve ark., 2009). 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, kallos duvarı ile çevrili dyadları oluşturmuş ve tek bir sitokinez aşaması ile takip edilen tek bir mitoz geçirir.

*Hieracium* türünde delesyon haritalama metodu ile bu türde apomayoz ve partenogenezle ilişkili olduğu görülen iki locus tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi apomayozun engellenmesi, diğeri ise döllenme (partenogenez) ile ilgili süreçlerle alakalıdır. Bu çalışmada elde edilen *loal* 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. *Loal* 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 apomikside görülen apomayoz sürecinden farklıdır.

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 aposporik apomiksi görülmektedir ve *Boechera* türlerinde görülen diplosporik apomiksinin aksine embriyo kesesi ovüllerdeki somatik hücrelerden kaynaklanmaktadır.

Motamayor ve ark. (2000), çalışmalarıyla *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), *Arabidopsis 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 mayoza 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), yılında *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

swil-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. İmmüno lokalizasyon 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.

Ravi ve ark. (2008), *Arabidopsis thaliana* bitkisinde mayotik kromozom organizasyonunun bir düzenleyicisi olan *AT5G51330* geninde bir mutasyonun apomayoz 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 rağmen 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* mutantı 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.

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 tip bitkilerde görüldüğü haliyle meydana gelmektedir. Bu anlamda oluşan gametler ana bitki genotipi ile birbir 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.

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 yabancı tipten farksızdır. Dişi mayotik süreç bu mutasyondan etkilenmemiş dolayısı ile dişi gametler yabancı tipte olduğu şekliyle üretilmektedir.

**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 E.Schranz'dan temin edilmiştir ve Schranz ve ark. (2005), tarafından önerilen yöntemine 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 teşvik etmek 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 dokularından (100 mg) DNA izolasyonu (Edwards ve ark., 1991) önerildiği yöntemine göre yapılmıştır. Bitki dokusu porselen havan içinde sıvı azot ile ezilerek homojenize edilmiştir. Ardından bir spatül yardımı ile 1,5 ml lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Örneği içeren eppendorf tüpüne 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 uzaklaşınca 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 Ekstraksiyon tamponu (100ml)**

2,4228 g 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 eklenmiş ve çözdürüldükten sonra 0,9306 g EDTA eklenmiş ve çözdürülmüştür. 0,25 g SDS eklenip ve çözdürüldükten sonra son hacim dH<sub>2</sub>O ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

### **3.3. RNA İzolasyonu**

Çalışmada RNA izolasyonu, gelişimlerinin erken aşamalarındaki tomurculardan yapılmıştır. Öncelikle sterio mikroskop altında diseksiyon iğneleri kullanılarak çiçek tomurcuları steril bir bistüri ile kesilerek ayrılmış ve boyutları ölçülerek 15 mm'den küçük tomurcuklar eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerine alınmıştır. RNA degradesyonunu 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 tomurcuları eppendorf içerisinde pestil yardımıyla iyice ezilmiştir. Daha sonra Purelink RNA Mini Kit (Invitrogen – 12183-018A) kullanılarak dokulardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonun ardından RNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş

içerdiği RNA miktarı florometrik yöntemle ( İnvitrogen Qubit Fluorometer ) belirlenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ( Fermentas - #K1621 ) ile gerçekleştirilmiştir. Bu kite ait üretici firma tarafından sağlanan reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar Tablo 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. İnkübe edilmiştir. Ardından, 5x reaksiyon tamponu, RiboLock RNase Inhibitor ve 10mM dNTP mix son olarak da M-MuLV Reverse Transcriptase eklenerek 42°C’ de 60 dk. inkübe edilmiştir. Reaksiyon 70°C’ de 10 dk. sıcaklık uygulamasıyla sonlandırılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri yukarıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle ayarlanmış bir Thermal cycler cihazında (BİO-RAD) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
5X Reaction buffer	4 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
100 µM Oligo-dT primer	1 µl
20 unit/µl RNase inhibitor	1 µl
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 200u/ µl	1 µl
DEPC-treated water	6 µl
Kalıp RNA	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

### 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

*AT5G51330* geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler, Primer3 (Baren 2004) ve NCBI primer blast (primer desinging tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) programı kullanılarak *A.thaliana AT5G51330* geni referans alınarak dizayn edilmiştir. 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, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4 mM denenmiştir. Ayrıca 3µg ve 5µg aralığında farklı cDNA miktarları ile reaksiyonlar kurulmuş ve PCR için kullanılacak cDNA miktarı optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.5'te verilen parametreler optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Ayrıca kalıp olarak kullanılan cDNA'ların kalitesini kontrol etmek amacı ile bitkinin tüm dokularında sürekli ifade olduğu bilinen *ACTIN2* ve *GAPDH* genine ait primerler ile birer reaksiyon kurulmuştur ve bu primerlerden sırasıyla 270 ve 250 bç'lik DNA bandı beklenmiştir. *ACTIN2* ve *GAPDH* geni için kurulan reaksiyonda Çizelge 3,2'de verilen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu kontrol reaksiyonu kurulduktan sonra Çizelge 3,6'te verilen PCR programı uygulanmıştır. Optimizasyon sağlandıktan sonra *AT5G51330* geninin çoğaltımına geçilmiştir. *AT5G51330* geni PCR reaksiyonu Çizelge 3,2'de verilen oranlara göre kurulmuştur. Ayrıca kontaminasyon olup olmadığını göstermek için kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu da kurulmuştur. PCR için kullanılan primerlerin dizileri ve beklenen DNA bantları büyüklükleri Çizelge 3,3 ve Çizelge 3,4'te verilmiştir. Reaksiyon kurulduktan sonra Çizelge 3,5'te verilen döngülerde PCR gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Optimum PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X High Fidelity PCR Buffer	2,5	1X
25mM MgCl <sub>2</sub> solüsyonu	2.5	2 mM
2mM dNTP mix	2,5	0,2 mM
10pmol/µl reverse primer	1	0,4 pmol
10pmol/µl forward primer	1	0,4 pmol
Kalıp cDNA	2,5	
Nuclease-freewater	12,75	
High Fidelity PCR Enzyme Mix	0,25	2,5 unit
Toplam hacim	25µl	

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

<b>Primer</b>	<b>Baz dizilişi</b>
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’
GAPDH Left	5’ TGTCCACTCTATCACTGCTACTC 3’
GAPDH Right	5’ TTTGCCTTCAGATTCCTCC 3’

**Çizelge 3.4** Kullanılan Primer çiftlerinden beklenen per ürünü uzunlukları

Primer çifti	Kullanılan primerler		Per ürünü uzunluğu
	Left primer	Right primer	
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	D2 Left	D5 Right	1910 baz çifti
D8	D3 Left	D5 Right	1413 baz çifti
D9	D2 Left	D3 Right	1489 baz çifti
Actin2	Actin2 left	Actin2 Right	270 baz çifti
GAPDH	GAPDH Left	GAPDH Right	270 baz çifti

**Çizelge 3.5.** *AT5G51330* için kullanılan optimum PCR programı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	
Primerlerin	60	30 sn.	
Bağlanması			35
Uzama	72	2.50 dk.	
Final Uzama	72	10 dk.	1

**Çizelge 3.6.** *ACTIN2* ve GAPDH için kullanılan PCR programı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	
Primerlerin	60	30 sn.	
Bağlanması			35
Uzama	72	2.50 dk.	
Final Uzama	72	10 dk.	1

### 3.6. Agaroz Jel Elektrofrez

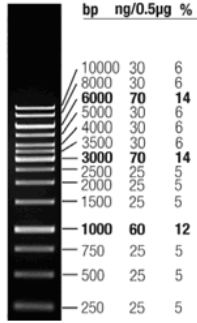
PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektrofrez ile ayrılmıştır. 0,5 g agaroz (sigma A5093) 50ml 1XTAE tampon içinde 120°C'de eritilmiş ve 55°C'ye ulaşmaya kadar soğutulmuştur. Daha sonra içerisine 10 mg/ml Ethidium bromide stok çözeltisinden 5 µl eklenmiş ve homojen olarak karışması sağlanmıştır. Ardından, içerisine tarak yerleştirilmiş olan jel tepsinine dökülmüştür. 30 dakika jelin katılaşması beklenmiştir. Daha sonra tarak çıkartılmış ve jel 1XTAE tampon bulunan elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Jelin 1cm üzerinde olacak şekilde tanka 1XTAE tamponu eklenmiştir. Örnekler ve marker (Fermentas 1kb DNA ladder #SM0311) 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektrofrezde kullanılan markerin haritası Şekil 3.2'de verilmiştir. 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

**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.

**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.

**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 haritası.

### 3.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

PCR ürünleri UV tablasında görüntülenmiş ve beklenen DNA bantları steril bir bisturi ile kesilerek jelden alınmıştır. Daha sonra ilgili PCR ürünleri DNaz-RNaz free eppendorf tüplerine alınmıştır. Ardından Purelink PCR Purification kit (İnvitrogen – K3100-01) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yönteme göre DNA bantları jelden izole edilmiştir. İzole edilen DNA'ların kalitesi agaroz jel elektrofrezisi ile görüntülenmiş ve yoğunlukları Gelpro3 programı (<http://helpdesk.agri.huji.ac.il/news/gppage.htm>) ile belirlenmiştir.

### 3.8. DNA Dizi Analizi

Jelden saflaştırılan D6 primer çifti ile elde edilmiş 1243 baz çifti büyüklüğündeki PCR ürünü için D1 Left, D1 Right, D2 Left, D2 Right primerleri ile ayrıca *Boecheera stricta* türü genomik DNA'sı üzerinden D1 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü D1 Left, D1 Right, D7 çifti ile elde edilen PCR ürünü D2 Left, D2 Right, D3 Left, D3 Right ve D8 ise D4 Left, D4 Right, D5 Left, D5 Right primer çiftleri ile dizi analizleri İontek firmasından hizmet alımı yoluyla yapılmıştır.

### 3.9. Bioinformatik Çalışmaları (Filogenetik Analizler)

Filogenetik analizler için elde edilen *Boecheera AT5G51330* geninin mRNA dizisi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile doğrulanmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Elde edilen mRNA dizisine ait muhtemel Protein aminoasit dizileri Transeq DNA sequence translation tool kullanılarak elde edilmiştir (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>). Bu diziler NCBI protein blast programı kullanılarak *B. gunnisoniana AT5G51330* genine ait protein dizisi doğrulanarak elde edilmiştir. Ayrıca *B. gunnisoniana AT5G51330* genine ait protein blast sonuçlarına göre bu gene benzer proteinler ortaya çıkarılmış ve sekiz protein dizisi sonraki filogenetik çalışma için seçilmiştir. Filogenetik analizler PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) kullanılarak yapılmıştır. Sekans verilerinin birbirleri ile olan benzerliklerinin analizi, 1000 değerlendirme sonuçlarına göre yapılmış ve bunun için SEQBOOT programı kullanılmıştır. Ağacı elde etmek için PRODIST ve NEIGHBOUR ile hesaplanan mesafe matrisi kullanılmıştır. Dizilerin birbirleri ile olan yakınlıkları CONSENSUS programı ile hesaplanmış ve ağaçlar Treeview programı ile çizilmiştir.

*B. stricta* türünde DYAD homologuna ait genomik DNA dizi analizi sonucu Bio-Edit programı ile birleştirilmiştir. Elde edilen bu dizinin *AT5G51330* geni genomik DNA dizisi ile benzerliği Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile doğrulanmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *B. stricta* DYAD homologuna Genomik DNA dizisi GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) programı ile incelenmiştir. Program *Arabidopsis* türüne ait parametreler kullanılarak çalıştırılmış ve muhtemel transkript ve protein dizisi elde edilmiştir. GENSCAN programı ile elde edilen *B. stricta*

muhtemel protein dizisi 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

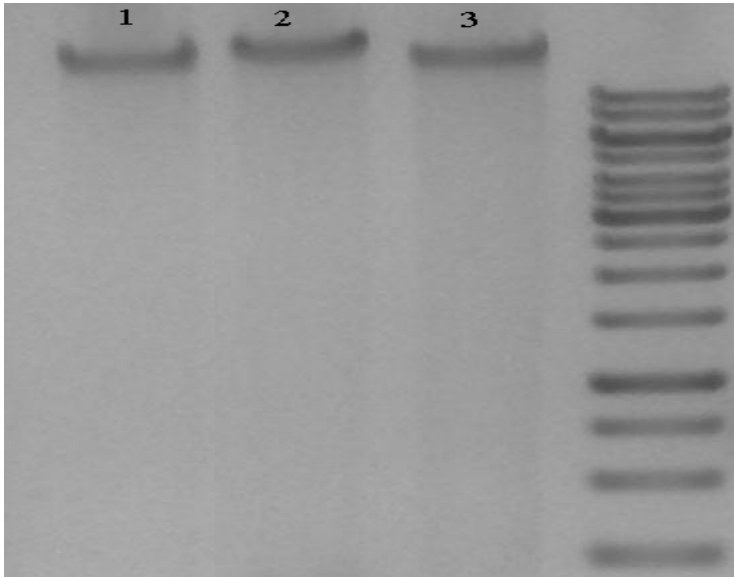
## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan *Boechea gunnisoniana* ve *B. stricta* türleri Schranz ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntemle göre 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.

## 4.2. Genomik DNA İzolasyonu

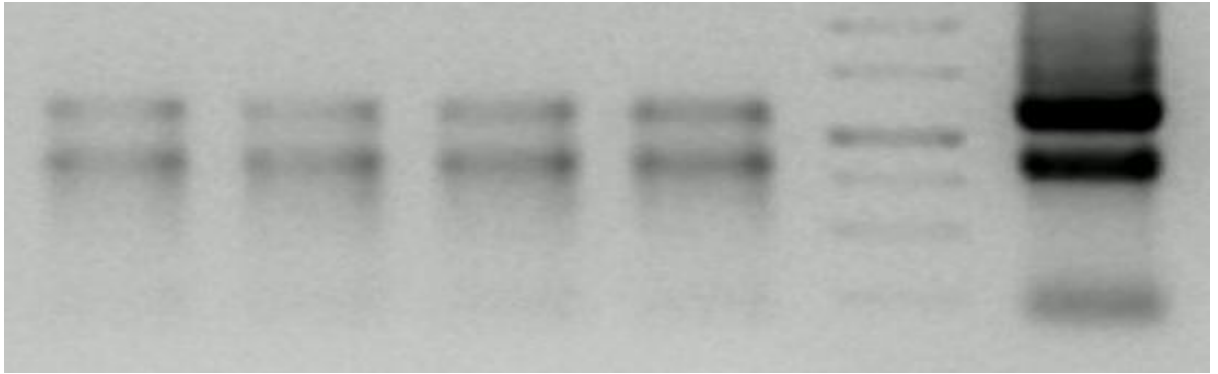
Yaprak dokularından (100 mg) DNA izolasyonu (Edwards ve ark., 1991) önerildiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen DNA'nın saflığı Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (şekil 4.1). Sonuç olarak genomik DNA'ların miktar ve saflığının PCR reaksiyonları için uygun olduğu görülmüştür.



**Şekil 4. 1** *B. gunnisoniana* ve *B. stricta* genomik DNAlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri. Hat 1 *B. stricta*, Hat 2,3 *B. gunnisoniana* (örnekler her kuyucuğa 5'er mikrolitre yüklenmiştir).

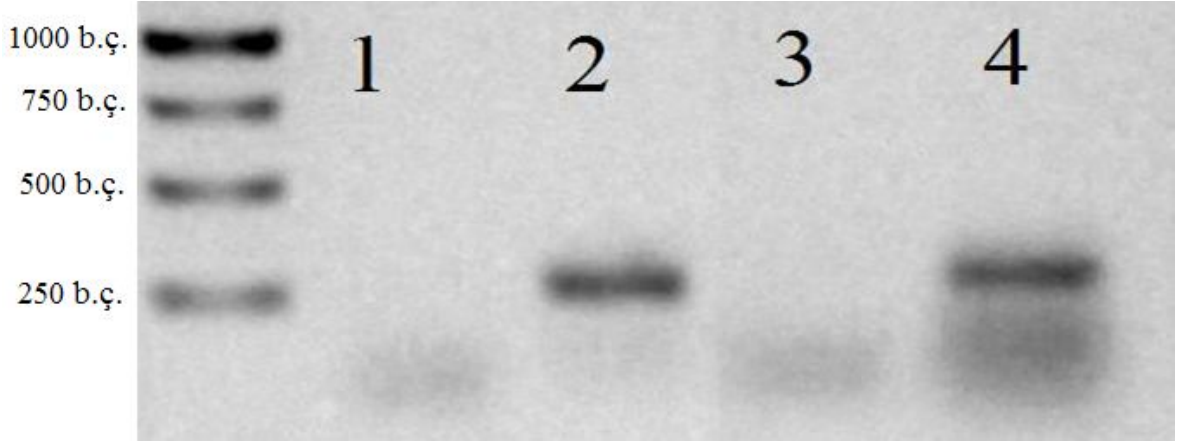
### 4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Çalışmada RNA izolasyonu, 15 mm'den küçük çiçek tomurcuklarından yapılmıştır. Öncelikle stereo mikroskop altında diseksiyon iğneleri kullanılarak çiçek tomurcukları steril bir bistüri ile kesilerek ayrılmış ve boyutları ölçülerek 15 mm'den küçük tomurcuklar eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerine alınmıştır. RNA degradasyonunu önlemek için tüm dokuların RNAlater ile kaplanmasına dikkat edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile RNA örneklerinin kalitesi kontrol edilmiş ve yoğunluğu florometrik yöntemle belirlenmiştir. Sonuç olarak RNA örneklerinin cDNA sentezi için uygun olduğu belirlenmiş (Şekil 4.2) ve örneklerin 2µg/µl total RNA içerdiği hesaplanmıştır. İzole edilen total RNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve oligodT primerleri ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezin başarısı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.2). Ayrıca *AT5G51330* geninin çoğaltımında kullanılacak olan tüm cDNA'ların kalitesi *ACTIN2* (*At3g18780*) ve *GAPDH* (*At1g13440*) genlerine ait primerler ile test edilmiştir. Bu reaksiyonlardan 270 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü beklenmiştir. *ACTIN2* ve *GAPDH* primerleri ile kurulan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir (Şekil 4.3). cDNA sentezi için 5 µg (2.5 µl) total RNA kullanılmasının PCR ürünlerinin elde edilebilmesi için uygun olduğu görülmüştür.



**Şekil 4. 2** *B. gunnisoniana* bitkisine ait total RNA ve cDNA agaroz jel elektroforezi gel görüntüleri. Hat 1-4 cDNA, Hat 5 1kb marker, Hat 6 RNA. (Her kuyucuğa 5 µl örnek yüklenmiştir).





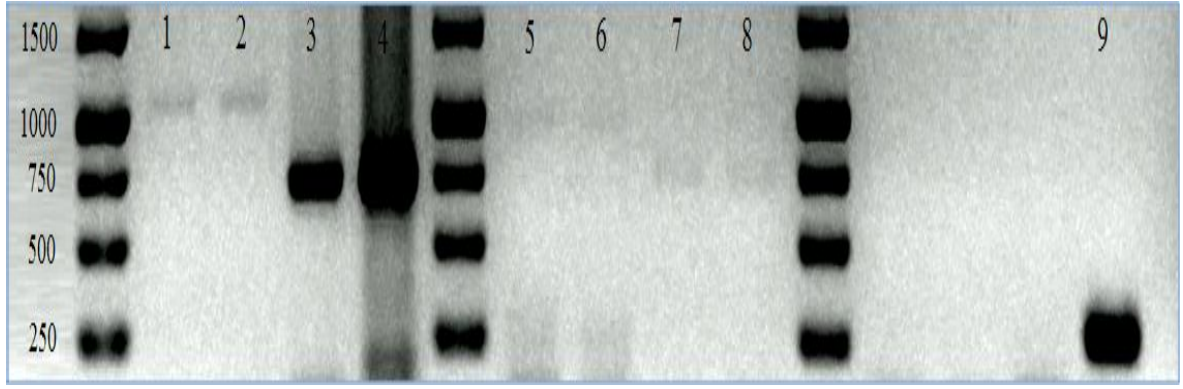
**Şekil 4. 3** Pozitif kontrol olarak kullanılan *ACTIN2*, *GAPDH* genlerine ve Negatif kontrol reaksiyonlarına ait PCR ürünlerinin jel görüntüleri. Hat1-3 negatif kontrol, Hat2 *ACTIN2*, Hat4 *GAPDH*

#### 4.4. PCR Optimizasyonu

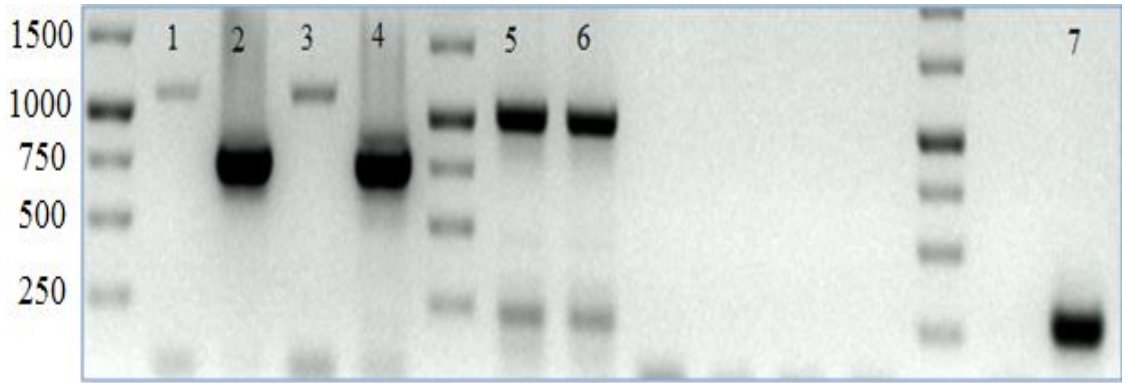
##### 4.4.1 *AT5G51330* Geni *Boecheera* Homoloğunun Genomik DNA'dan çoğaltılması

Çalışmada, apomikt *B. gunnisoniana* ile seksüel *B. stricta* türlerine ait genomik DNA izole edilmiştir. Bu türlere ait genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonlarında *Boecheera* türlerinde *AT5G51330* geni homoloğunun çoğaltılması amaçlanmıştır. Bir model organizma olan *A. thaliana* türü genomunda *AT5G51330* geni 3006 baz çiftlik bir alanı kapsamaktadır. Bu nedenle *AT5G51330* geni *Boecheera* homologları sonrasında dizi analizi yapılacağı için 5 farklı primer çifti (Çizelge 3.4) kullanılarak çoğaltılmıştır.

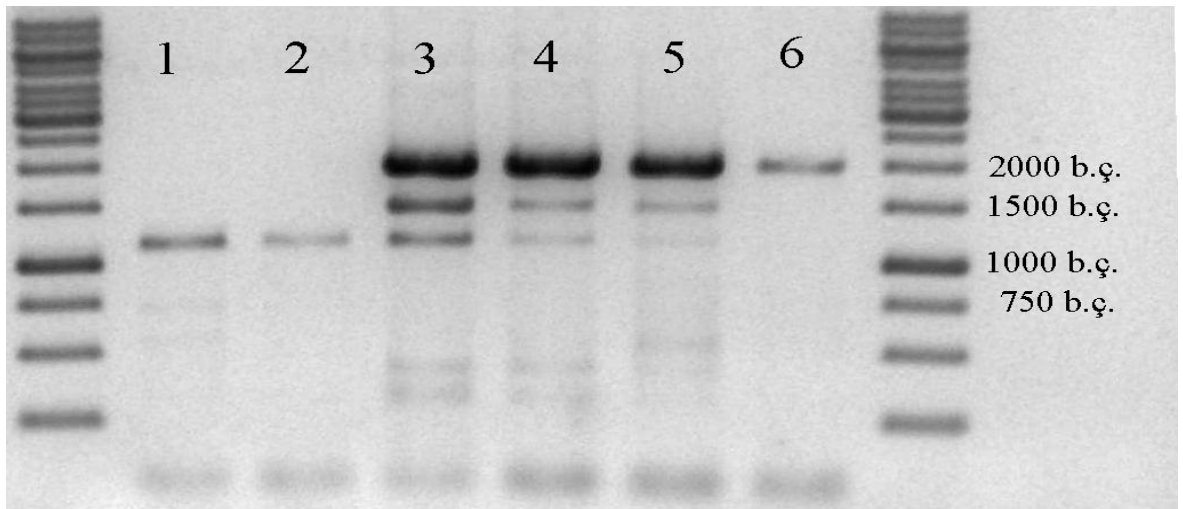
*B. gunnisoniana* ve *B. stricta* genomik DNA'sı üzerinden yapılan PCR reaksiyonlarında Çizelge 3.2'te belirtilen reaksiyon bileşenleri ve çizelge 3.4'te belirtilen koşullar kullanılmıştır. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş *AT5G51330* geninin *Boecheera* türlerinde varlığı ve primerlerin bağlanma verimi kontrol edilmiştir (Şekil 4.4, 4.5).



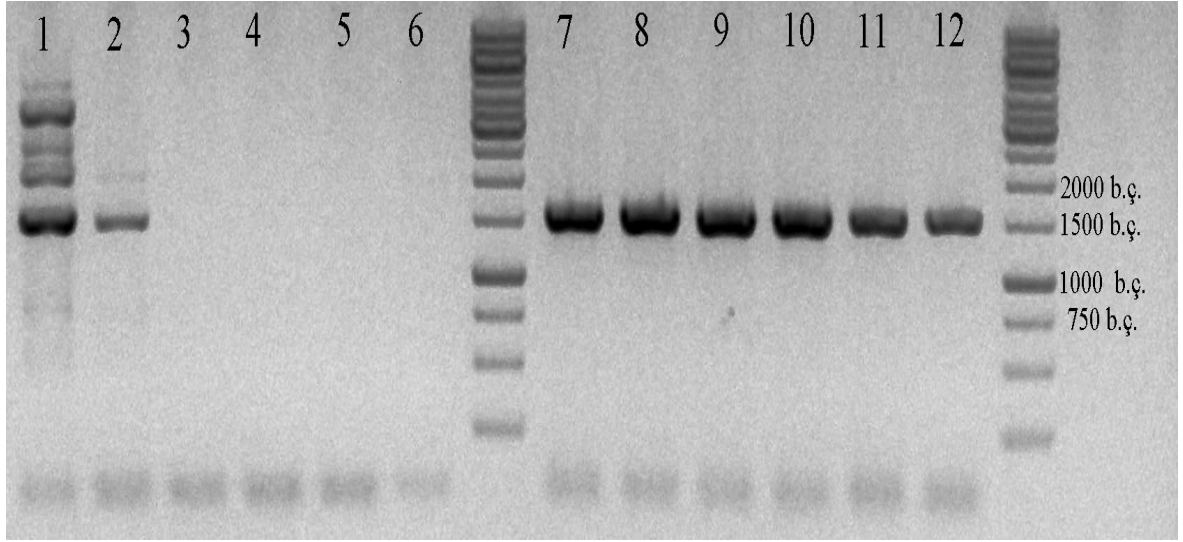
**Şekil 4. 4** *Boechera gunnisoniana* Genomik DNA PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Hat 1-2 D1, Hat 3-4 D2, Hat 5-6 D4, Hat9 *ACTIN2* (Her kuyucuğa 15 mikrolitre örnek yüklenmiştir)



**Şekil 4. 5** *B. stricta* Genomik DNA PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (Hat 1-3 D1, Hat 2-4 D2, Hat5-6 D3, Hat 7 *ACTIN2*). (örnekler 5 mikrolitre yüklenmiştir)



**Şekil 4. 6** *B. stricta* genomik DNA D7 primer çifti ile farklı annealing sıcaklıklarında gerçekleştirilen gradient PCR reaksiyonlarına ait Agaroz Jel elektroforezi görüntüsü. ( Hat 1: 50.0 °C, Hat 2: 51.7 °C, Hat 3: 54.3 °C, Hat 4: 56.0 °C, Hat 5: 57.4, Hat 6: 60.0 °C) (örnekler 5 mikrolitre yüklenmiştir)



**Şekil 4.7** *B. stricta* genomik DNA D8 ve D9 primer çiftleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait Agaroz Jel elektroforezi görüntüsü. (Hat 1-6: D8, Hat 7-12: D9) (Hat 1, 7: 50.0 °C, Hat 2, 8: 51.7 °C, Hat 3, 9: 54.3 °C, Hat 4, 10: 56.0 °C, Hat 5, 11: 57.4, Hat 6, 12: 60.0 °C) (örnekler 5 mikrolitre yüklenmiştir)

*B. gunnisoniana* PCR sonuçlarına göre D1, D2, D3, D4 ve D5'ten sırası ile beklenen 1190 baz çifti, 737 baz çifti, 992 baz çifti, 762 baz çifti uzunluğunda ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.4). *B. stricta* türüne ait sonuçlarda ise aynı şekilde D1, D2, D3 ve D4 primer çiftlerinden beklenen ürünler elde edilmiş, buna rağmen D5 primer çiftinden beklenen 762 baz çifti uzunluğundaki ürün elde edilememiştir (Şekil 4.5).

*B. stricta* türüne ait PCR sonuçları D7 primer çiftine aittir ve reaksiyondan 1910 baz çifti uzunluğunda ürün beklenmiştir. Sıcaklığın 50 °C ve 51.7 °C olduğu 1 ve 2. hatlarda beklenmeyen boyutta nonspesifik ürünlerin oluştuğu görülmüştür. Bunun yanında 54-57.4 °C annealing sıcaklıkları aralığında beklenen boyutta ürünler oluşmuş, buna rağmen aynı zamanda beklenmeyen ürünlerde oluşmuştur. 6. hatta görülen 60 °C sıcaklığında gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda ise beklenen 1910 baz çifti uzunluğunda ürün oluşmuş ve herhangi bir nonspesifik ürün oluşmamıştır. Bu sebeple bu reaksiyon koşulları bu primer çifti için uygun görülmüştür (Şekil 4.6).

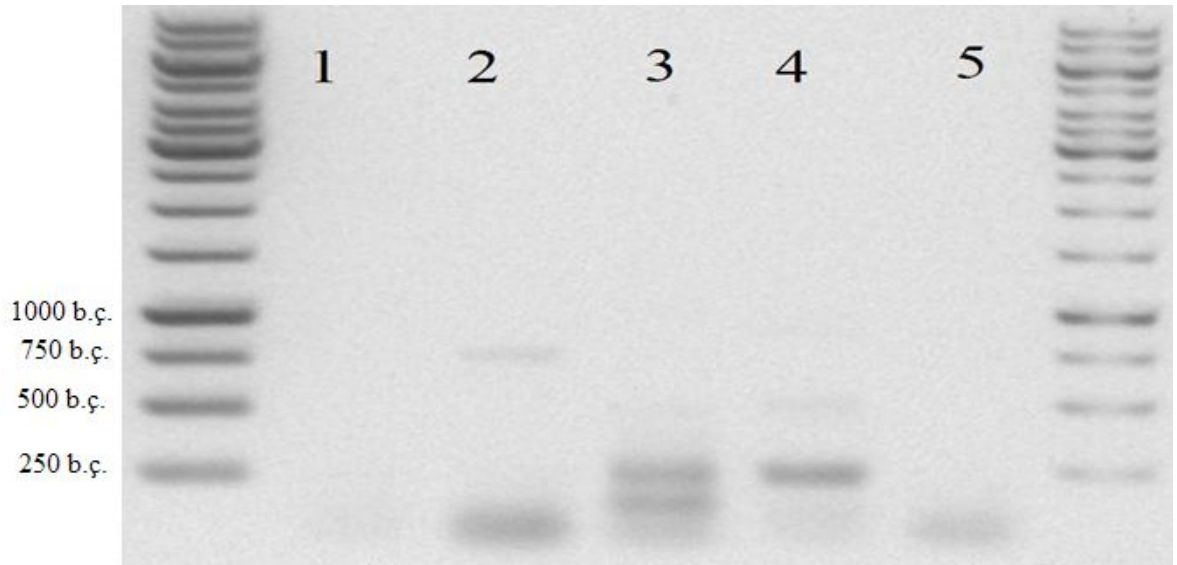
*B. stricta* türünde gradient PCR reaksiyonlarında D8 primer çiftinden beklenen 1413 baz çifti uzunluğunda ürün ancak 50 °C ve 51.7 °C sıcaklıklarında elde edilebilmiştir. Buna

rağmen her iki reaksiyonda da beklenmeyen boyutta PCR ürünleri oluşmuştur. D9 primer çifti ise tüm sıcaklıklarda beklenen boyutta ürünleri oluşturmuş ve beklenmeyen nonspesifik ürünler gözlenmemiştir (Şekil 4.7).

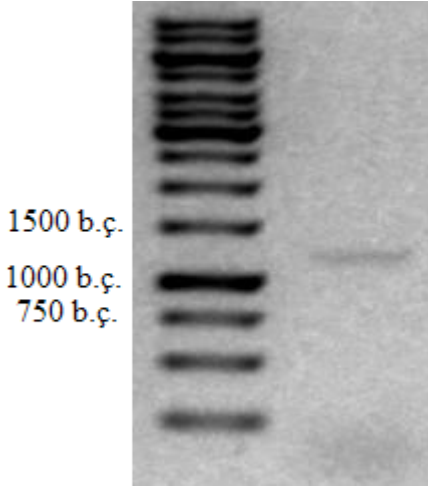
#### 4.4.2 *AT5G51330* Geni *Boechera* Homoloğunun RT-PCR ile çoğaltılması

Çalışmada apomikt *B. gunnisoniana* türüne ait çiçek tomurcuklarından total RNA izole edilmiştir (Şekil 4.2). *B. gunnisoniana* RNA'sı kalıp olarak kullanılarak cDNA reaksiyonu kurulmuştur. cDNA kalıplarından PCR reaksiyonları ile *AT5G51330* geni homoloğuna ait transkriptin çoğaltılması hedeflenmiştir.

*AT5G51330* transkriptinin çoğaltılması için ilk aşamada *Arabidopsis AT5G51330* genine ait referans dizilere göre dizayn edilmiş primer çiftlerinden *B.gunnisoniana AT5G51330* cDNA kalıbına bağlanıp PCR ürünleri oluşturabilecek primer çiftleri belirlendi.



**Şekil 4. 8** *AT5G51330* geni için beş primer çifti ile yapılan PCR sonuçları. (Hat1 D1, Hat2 D2, Hat3 D3, Hat4 D4, Hat5 D5.)



**Şekil 4. 9** D6 primer çifti ile elde edilen 1243 baz çifti uzunluğunda pcr ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüleri.

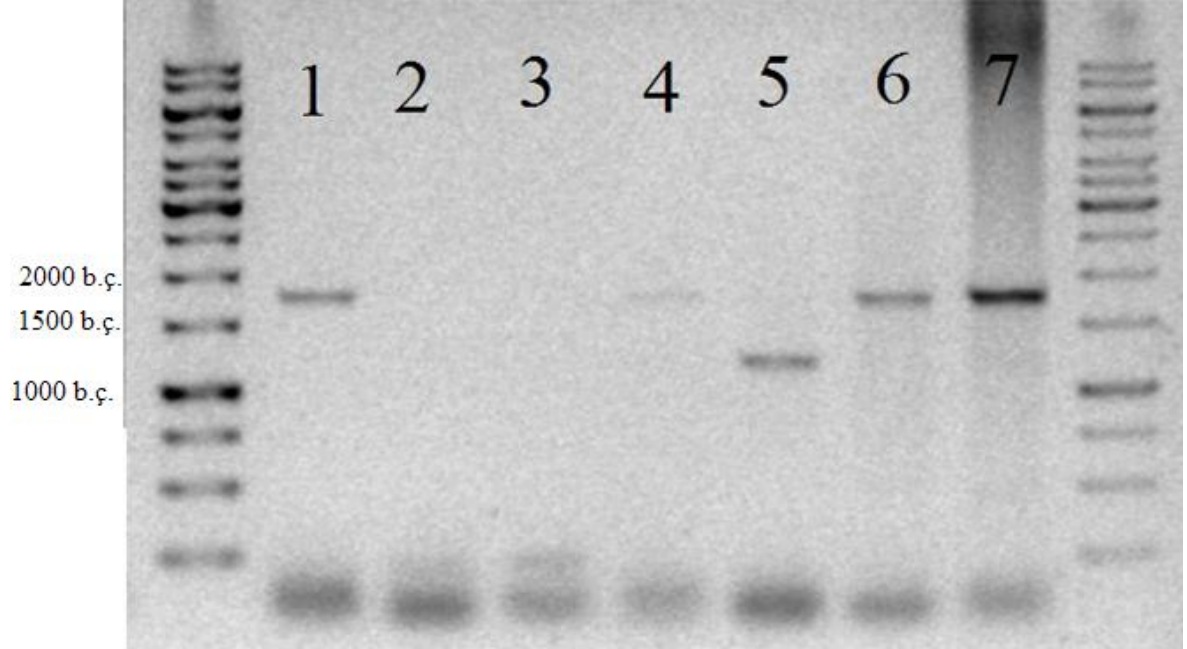
Şekil 4.8’de sonuçları görülen PCR reaksiyonlarında kullanılan D1 primer çiftinden 684 baz çifti, D2’den 650 baz çifti, D3’ten 540 baz çifti, D4’dan 519 baz çifti, D5 primer çiftinden ise 1997 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü beklenmektedir. Buna rağmen beklenen PCR ürünleri denemelerin hiçbirinde elde edilememiş, bunun yanında beklenmeyen boyutlarda PCR ürünleri oluşmuştur.

D6 primer çifti ile Çizelge 3.2’te belirtilen reaksiyon bileşenleri ve çizelge 3.4’te belirtilen PCR koşullarında gerçekleştirilen PCR sonucunda beklenen 1243 baz çifti büyüklüğünde bant elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre D6 primer çifti daha sonraki optimizasyon ve gen dizisinin çoğaltılma çalışmalarında kullanılmıştır.

*AT5G51330* genini PCR ile çoğaltmak için D6 primer çiftinin bağlanma sıcaklıkları optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında 60°C primer bağlanma sıcaklığı, elde edilen ürün kalitesi nedeni ile uygun bir değer olarak belirlenmiştir ve daha sonraki PCR çalışmalarında bu sıcaklık tercih edilmiştir.

*AT5G51330* geninin PCR ile çoğaltımı için ikinci kriter olarak MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu optimize edilmiştir. PCR bileşenleri Çizelge 3.2’de verildiği gibidir. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları için 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5 ve 3 mM olmak üzere yedi farklı değer test edilmiştir. PCR programı Çizelge 3.5’te verilen değerlere göre kurulmuştur. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve UV tablasında görüntülenmiştir (Şekil 4.5). Elde edilen sonuçlara göre; 1.25 ve 1.5 mM olarak kullanılan MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında beklenen büyüklükte ürün elde edilememiştir (Şekil 4.7, Hat: 2 ve 3). Ayrıca 1.0, 1.75, 2.5 ve 3mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında ise beklenmeyen PCR

ürünleri görülmemiştir. (Şekil 4.7, Hat: 1, 4, 6 ve 7). 2mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda beklenen boyutta ürün elde edilmesi nedeni ile daha sonraki analizler için bu konsantrasyon uygun görülmüştür.



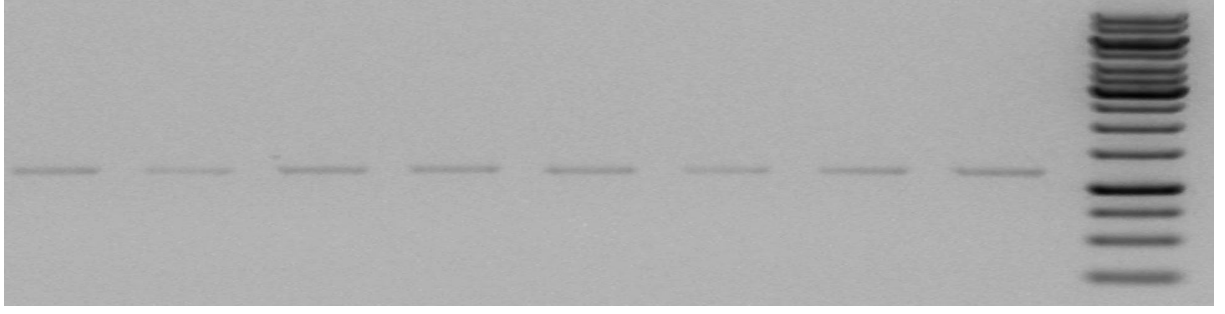
**Şekil 4. 10** D6 primer çifti için yapılan optimizasyon çalışması agaroz jel elektroforezi görüntüleri.

Optimizasyon çalışması sonrasında *AT5G51330* geni *Boecheera* homologunun çoğaltımı için 60°C primer bağlanma sıcaklığı ve 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu kullanılmasına karar verilmiştir.

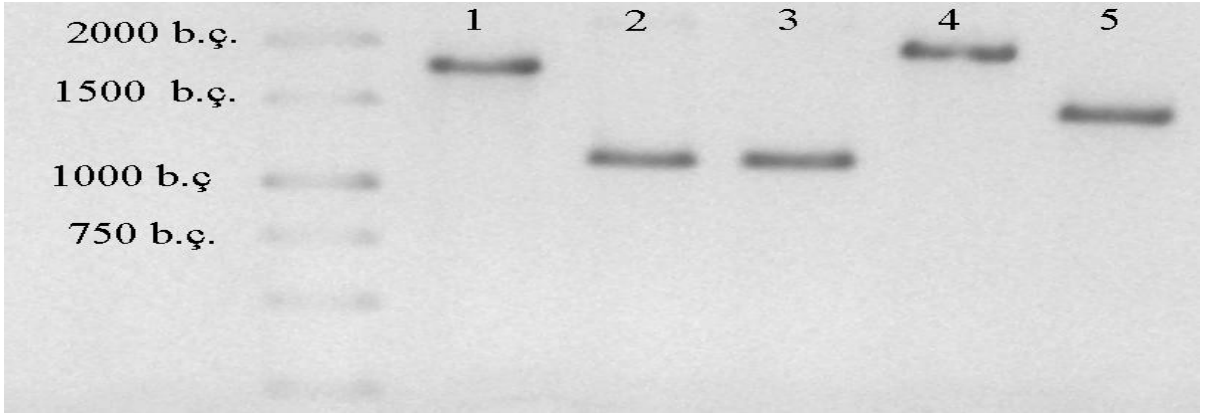
*AT5G51330* geni *Arabidopsis* bitkisinde mayoz öncesi S ve G1 süreçlerinde dişi ve erkek mayositlerde ifade olmaktadır (Agashe ve ark., 2002; Mercier ve ark., 2003). *Boecheera* türleri ile yapılan bu çalışma ile elde edilen RT-PCR sonuçları *Arabidopsis* bitkisine benzer şekilde mayoz öncesi çiçek tomurcuklarında ifade olduğunu göstermektedir.

#### **4.5. *BgDYAD* Geninin Sekans Analizleri**

Çalışmada elde edilen PCR ürünlerine ait diziler hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Çalışmada, PCR ürünleri Purelink PCR Purification kit kullanılarak agaroz jelden izole edilmiştir. İzole edilen ürünün kalitesi ve konsantrasyonu agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.11** D6 PCR ürününün jelden izole edilmiş sonuçlarını gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (kuyucuklarda 5'er ml örnek yüklenmiştir.)



**Şekil 4. 12** *B. stricta* genomik DNA PCR ürünlerinin jelden izole edilmiş sonuçlarını gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. ( Hat 1: D6, Hat 2-3: D1, Hat 4 D7, Hat 5: D9, kuyucuklara 5'er ml örnek yüklenmiştir.)

#### 4.6. *AT5G51330* Geninin Biyoinformatik Analizleri

Çalışmada, mayoz aşamasındaki çiçek dokularından elde edilen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı RT-PCR çalışmalarında, *Boechea* türlerinde *AT5G51330* gen homologlarının çoğaltılması amaçlanmıştır. RT-PCR reaksiyonları *AT5G51330* genine ait dizilerine göre seçilmiş 5 farklı primer çifti ile kurulmuştur. Buna karşın, sadece *B. gunnisoniana* türüne ait cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonlarında D6 primer çifti beklenen büyüklükte ürün (1243 bç) oluşmuştur. Aynı kalıpların kullanıldığı diğer primer çiftlerinde ise herhangi bir ürün elde edilememiştir.

D6 primer çifti agaroz jelde beklenen büyüklükte 1243 bç uzunluğunda bir PCR ürünü oluşturmuştur. Bu ürün jelden izole edilmiş ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi 1L, 2R, 1R ve 2L primerleri ile gerçekleştirilmiş bu sayede 1243 baz çifti uzunluğundaki PCR ürününün tamamının dizisi 4 parça halinde elde edilmiş ve birleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 *B. gunnisoniana AT5G51330* genine ait kısmi cDNA dizisi

---

```
TTTGTACACCAAGGTTCCAACCAGGTGGAGGCGTCCAGTAAGGATCTTCAACT
CCTGCTTCTTTCCTTATGTGAATCAAATCAGAACTCTCCAACCAATACTCCATT
GCCCCATCTGCATTGTGCTTTCTCATAAACCTATCTTGACCTCCAGGAGCCACC
TTACCTGCCATGTGCTTAAGCATATGGTCTAAAAGACCAGTGTACCCGATCAG
CTTCCTTGCTTCTGACCTTAACTGTGACCTGAGTATGGAGTTGCCAAACACTGC
ATTTTCTCCTTCATCACTTTTAAACATGTTCTCTCAGCTAGTTTGTACCTATCA
ACAGACCATCTGTCAATGAATTTCTTCTCTGCTCTTCTCTTATAGACCACGATTT
GATTTTCCTTCTTCTGATCATAAACCTTAGCCCTCTGAGCGAGTCTCTCAGTACT
GGATTCAATCAGCTTTCTCTTACGATTTCCATCAGTCATCTCGTTTGCAATCTGT
TTAGTCTCTTCTGTTTCATTCCCATCATCATCATCTTCTTTCTCAATCTCTTC
TTTGCAAACCCCTCCCTCCTTCACTCCAGAACTCTCCTTACCTCCGTATTCTTC
TTACAATCAATATGCCGACTCTTGTACTGCACACGCAATCTCCTCCCCCACTTA
ATCATTCTCCAGATCGCAGCTCAGACCAACATTTTCCCTCCGGTGAAGCCGCG
CGACCGAGCCTAGTATTGTACGCCGGTTGAGAAATCATCTTGTTCCTGCGAGA
AGAAGCAGAAGAAACCCAGAACTCCACGAATTTCTGTTCATAGAACTTCAT
GAGGTGCGATTCTTCTGTAGAGCAAATCTCCAGCTAGCTCCGAAACCATCACA
TGGCTCTCGTCAAAAAGAGGAAGAAGACCACCACCCTCTTCTTCAAAGG
TTTATTCCGGTTCATCCTGCTGCAATCGAAATGCGATCGGAGTGAGTACATGCT
TGGGTATCGGAGAGACACGTCGCTCGCCGTGATTTTGCTCACCATGACGACTCT
AATCGATTTAAGGTTCTCCGGCGATCTCTGAGGAAGAATCGAAGAATCGACTT
CGTAATACGATCCAACCTTATATGCGCGACTGCAACATTCACAGTCGATGAC
GATGGCGAAGAGTTTTTTCCGGCGGAGATTTCTCTAATCGGATTCCGTTTCACG
AACATCGTTCCGCTCATGATTTTTGCTCTCGATATCCTTTCGTTCCA
```

---

Dizi analizi sonucunda elde edilen dört dizi Bio-edit programı ile birleştirilmiştir. Elde edilen konsensus dizi Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı ile incelenmiştir (Şekil 4.12). BLAST sonucuna göre, bu DNA dizisinin *AT5G51330* genine ait mRNA dizisi ile yüksek benzerlik (%89) gösterdiği ortaya çıkmıştır (Şekil 4.7). Bu nedenle, elde edilen kısmi (partial) cDNA dizisine *BgDYAD* adı verilmiştir (Şekil 4.8).

*BgDYAD* genine ait kısmi cDNA dizisine karşılık gelen muhtemel polipeptid dizisi Transeq programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>) kullanılarak elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Transeq programı 6 çerçeve okuyacak şekilde düzenlenmiştir. Elde edilen muhtemel polipeptid dizileri PROTEIN BLAST programı



(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile protein veri tabanında taranmıştır. PROTEIN BLAST programı 6 farklı olasılıkla elde edilen muhtemel polipeptid dizileri arasında anlamlı olanın seçilmesini sağlamıştır. Buna göre, içlerinden 411 amino asit uzunluğundaki BgDYAD\_2 (Çizelge 4.2) Mycobacterium türüne ait 4 protein ile benzerlik gösterirken, sadece 412 amino asit uzunluğundaki BgDYAD\_5 (Çizelge 4.2) polipeptid zinciri AT5G51330 proteini ile yüksek oranda benzerlik (%85) göstermiştir. Protein blast sonucunda BgDYAD kısmi protein dizisi Arabidopsis türünde 21, Populus trichocarpa türünde 14, Vitis vinifera türünde 13, Oryza sativa türünde 15 ve Zea mays türünde ise 2 protein dizisi ile benzerlik göstermektedir. BgDYAD proteini ile yüksek oranda benzerlik gösteren proteinler çizelge 4.3'te listelenmiştir.

Çizelge 4.2 Transeq programı ile elde edilen BgDYAD genine ait muhtemel protein dizileri

---

```
>BgDYAD_1 1234 bases, 8539 checksum.
FVTQGSNQVEASSKDLQLLLLLSLCESNQNSPTNTPLPHLHCAFS*TYLDLQEPYPYLP*AYGLKDQCHRSAS
LLLLTLTVT*VWSCQTLHFSPSSLLTCCSSQLVCTYQQTICQ*ISSLLFSYRPRDFPSSDHPK*PSERVSQYWI
QSAFSYDFHQSSRLQSV*SLLFHSHHHHHLLSQSLCKPLPPSLQNSPYLPYSSYNQYADSCATAHAISSPT*S
FLQIAAQTNIFPPVKPRDRA*YCTPVEKSSCSCEKKQKKPRNSTNFCS*KLHEVRFVFCRANLQAPKPSHGSR
QKEEDHHHSSSSKVYSGSSCCNRNAIGVSTCLGIGETRSP*FCSP*RL*SI*GSPAISEEESKNRLRNTIQ
LLYARLQHSQSMTMAKSFRRRFL*SDSVSRTSFRS*FLLSISFRSX
```

---

```
>BgDYAD_2 1234 bases, 8539 checksum.
LSPKVPTRWRRPVRIFNSCFFPYVNQIRTLQPIILHCPIVLSHKPILTSRSHLTCHVLKHMV*KTSVTDQLP
CF*P*L*PEYGVAKHCIFLLHHF*HVPLS*FVPINRPSVNEFLCSSLIDHDLI*FLLLIINLSPLSESLSTGF
NQLSLTISISHLVCNLFSLFCFIPIIIIIFFLNLFFANPSLLHSRTLLTFRILLTINMPTLVLHTQSPPLNH
FSRSQLRPTFSLR*SRATEPSIVRRLRNHLVPARRSRNPETPRISVHRNFMRCDSSEVEQISS*LRNHMALV
KKRKKTTTTPLLRQRFIPVHPAAIEMRSE*VHAWVSEHRVARRDFAHHDDSNRFKVLRRSLRKNRRIDFVIRSN
SYMRDCNIHSR*RWRRVFSGGDFSNRIPFHEHRSAHDFCSRYPFVP
```

---

```
>BgDYAD_3 1234 bases, 8539 checksum.
CHPRFQPGGGVQ*GSSTPASFLM*IKSELSNQYSIAPSALCFLINLS*PPGATLPAMCLSIWKRVPVSPISFL
ASDLNCDLSMELPNTAFFSFITFNMFLSASLYLSTDHLSMNFFSALLL*TTI*FSFF*S*TLAL*ASLSVLDS
ISFLLRFPSVISFAICLVSSVSFPSSSSSSSFSISSLQTPPSFTPELSLPSVFFLQSI*CRLLYCTRNLPHLII
SPDRSSDQHFPSGEAARPSLVLYAG*EIIILFLEEAETQKLHEFLFIETS*GAILL*SKSPASSETITWLSS
KRGRPPPLFFKGLFRFILLQSKCDRSEYMLGYRRDTS*LAVILLTMTTLIDLRFSGDL*GRIEESTS*YDPT
LICATATFTVDDDDGEEFFPAEISLIGFRFTNIVPLMIFALDILSFX
```

---

```
>BgDYAD_4 1234 bases, 8539 checksum.
GTKGYREQKS*AERCS*NGIRLEKSPPEKTLRHRHRL*MLQSRI*ELDRITKSILRFFLRDRRRTLNRLESSW
*AKSRRATCLSDTQACTHSDRISIAAG*TGINL*RRGVVVVFFLFLTRAM*WFRS*LEICSTEESHLMKFL*T
EIRGVSGFLLLLLAGTR*FLNRRITILGSVARLHRENVGLSCDLEK*LSGGDCVCSTRVGILIVRRIRKVR
VLE*RRREGFAKKRLRKKMMMMGMKQKRLNRLQTR*LMEIVRES*LNPVLRDLSRGLRFMIRRRKIKSWSIRE
EQRRNSLTDGLLIGTN*LRGTC*K**RRKMQCLATPYSGHS*GQKQGS*SVTLVF*TI*CLSTWQVRWLLVVKI
GL*ESTMQMGQWSIGWRVLI*FT*GKKQELKILTRGLHLVGTLDGK
```

---

```
>BgDYAD_5 1234 bases, 8539 checksum.
WNERISRÄKIMSGTMFVKRNPIREISAGKNSSPSSSTVNVAVAHIRVGSYYEVDSSILPQRSPENLKSIRVVM
VSKITASDVSLRYPMSYLSRSHFDCSRMNRNKPLKKRSGGGLLPLFDESHVMVSELAGDLLYRRIAPHEVSMN
RNSWSFWVSSASSRRNKMISQPAYNTRLGRAASPEGKCWSELRS*GEMIKWGRRLRVQYKSRHIDCKKNT*EGKE
SSGVKEGGVCKEEIEKEDDDDDGNETEETKQIANEMTDGNRKRKLI*ESSTERLAQRAKVYDQKKNQIVVYKR
RAEKKFIDRWSVDRYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAPGGQD
RFMRKHNDGAM*EYWLESSDLIHIRKEAGVEDPYWTPPPGWNLG*QX
```

---

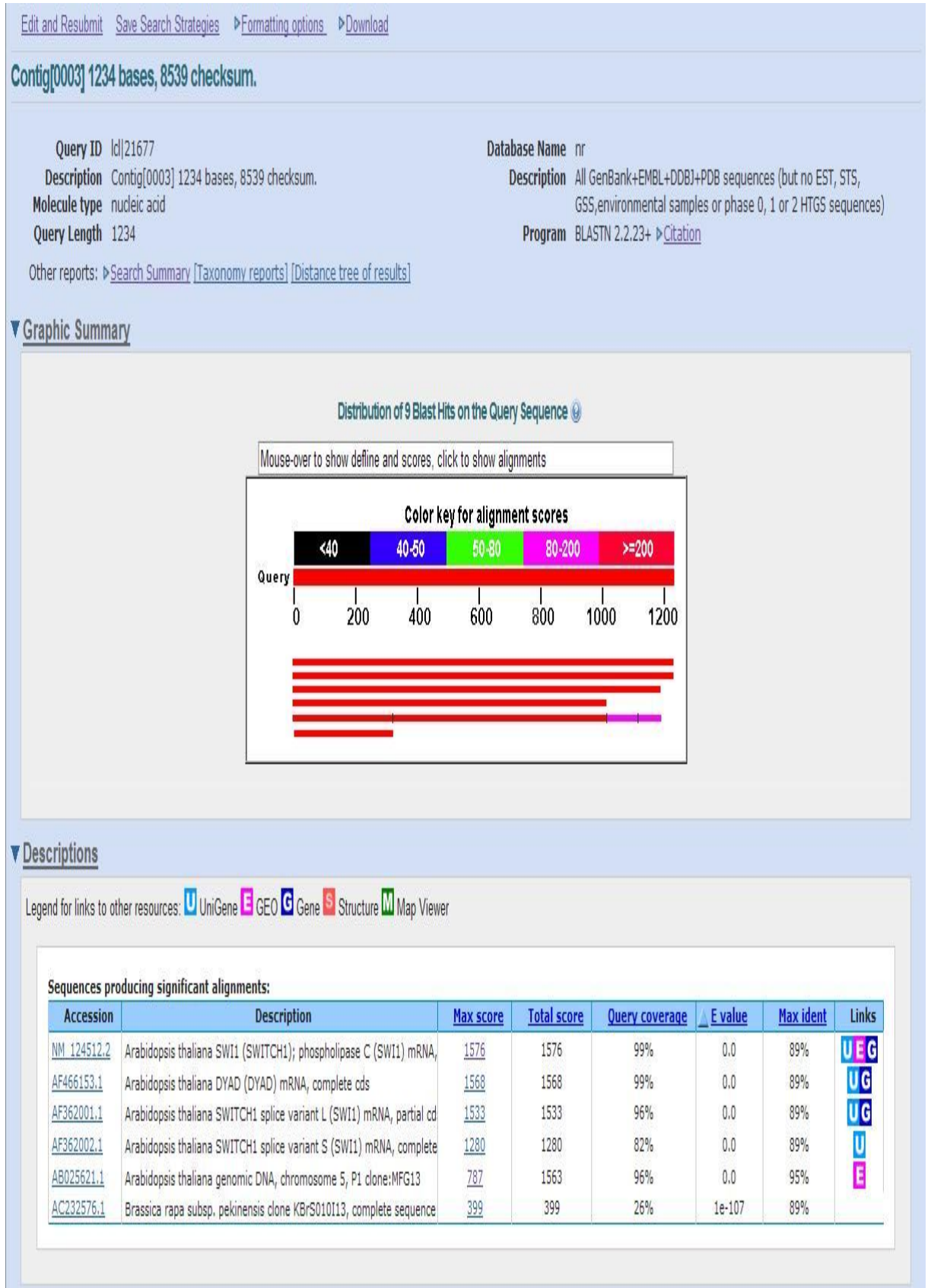
```
>BgDYAD_6 1234 bases, 8539 checksum.
ERKDIESKNHERNDVRETESD*RNLRRKKLFAIVIDCECCSRAYKSWIVLRSRFFDSSSEIAGEP*ID*SRHG
EQNHGERRVSP*PKHVLTPIAFRLQQDEPE*TFEEEEWWSSSSSF*REPCDGF*GASWR*FALQKNRTS*SFYEQ
KFVEFLGFFCFFSQEQQDFSTGVQY*ARSRGFTGGKMLV*AAIWRND*VGEEIACAVQESAY*L*EEYGR*GE
```

---


---

FWSEGGRGLQRRD\*ERR\*\*\*WE\*NRRD\*TDCKRDD\*WKS\*EKAD\*IQY\*ETRSEG\*GL\*SEEGKSNRGL\*EK  
SREEIH\*QMVC\*\*VQTS\*EEHVKSDEGEKCSVWQLHTQVTVKVRSKEADR\*HWSFRPYA\*AHGR\*GGSWRSR\*  
VYEKAQCRWNGVNLVGEF\*FDSHKERSRS\*RSLLDASTWLEPWVTX

---



Şekil 4. 13 Boechera DYAD kısmi cDNA dizisinin blast analizi sonuçları.

>ref|NP\_568757.2|  SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana]  
Length=639

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

Score = 682 bits (1761), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 344/404 (85%), Positives = 372/404 (92%), Gaps = 6/404 (1%)

```

Query 11  MSGTMFVKRNPIREISAGKNSSPSSSTVNVAVAHIRVGSYYEVDSSILPQRSPENLKSIR 70
          MS TMFVKRNPIRE +AGK SSPSS T+NVAVAHIR GSYYE+D+SILPQRSPENLKSIR
Sbjct 1   MSSTMFVKRNPIRETTAGKISSPSSPTLNVAVAHIRAGSYYEIDASILPQRSPENLKSIR 60

Query 71  VVMVSKITASDVSLRYPMSYLSRSHFDCSRMNRNKPLKKRSGGGLLPFDESHVMVSELA 130
          VVMVSKITASDVSLRYPMS+SLRSHFD SRMNRNKP+KKRSGGGLLP+FDESHVM SELA
Sbjct 61  VVMVSKITASDVSLRYPMSFSLRSHFDYSRMNRNKPMKKRSGGGLLPVFDESHVMASELA 120

Query 131  GDLLYRRIAPHEVSMNRNSWSFWSSASSRRNK-----MISQPAYNTRLGRAASPEGKCW 185
          GDLLYRRIAPHE+SMNRNSW FWSS SSRNK ++SQPAYNTRL RAASPEGKC
Sbjct 121  GDLLYRRIAPHELSMNRNSWGFWS--SSRNKFPREVVSQPAYNTRLCRAASPEGKCS 179

Query 186  SELRSGEMIKWGRRLRVQYKSRHIDCKKNTGKESGKVEGGVCKEEIEKEDDDDDGNET 245
          SEL+SG MIKWGRRLRVQY+SRHID +KN EG+ESS VK+ +EE+EKE+DDDDGNE
Sbjct 180  SELKSGMIKWGRRLRVQYQSRHIDTRKNKEGEESRVKDEVYKEEMEKEEDDDDDGNEI 239

Query 246  EETKQIANEMTDGNRKRKLISSSTERLAQRAKVYDQKKENQIVVYKRRAEKKFIDRWSVD 305
          TKQ A E+T+GNRKRKLISSSTERLAQ+AKVYDQKKE QIVVYKR++E+KFIDRWSV+
Sbjct 240  GGTKQEAKEITNGNRKRKLISSSTERLAQAKVYDQKKEQIVVYKRKSERKFIDRWSVE 299

Query 306  RYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRSQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAPGGQD 365
          RYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILR +LRSEARKLIGDTGLLDH+LKH MAGKVAPGGQD
Sbjct 300  RYKLAERNMLKVMKEKNAVFGNSILRPELRSEARKLIGDTGLLDHLLKHMAGKVAPGGQD 359

Query 366  RFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVEDPYWTPPPGWNLG 409
          RFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGV+DPYWTPPPGW LG
Sbjct 360  RFMRKHNADGAMEYWLESSDLHIRKEAGVKDPYWTPPPGWKLG 403

```

**Şekil 4. 54** *BgDYAD* geninin Arabidopsis *AT5G51330* geni ile benzerliğini gösteren blast analizi sonucu

Sequences producing significant alignments:

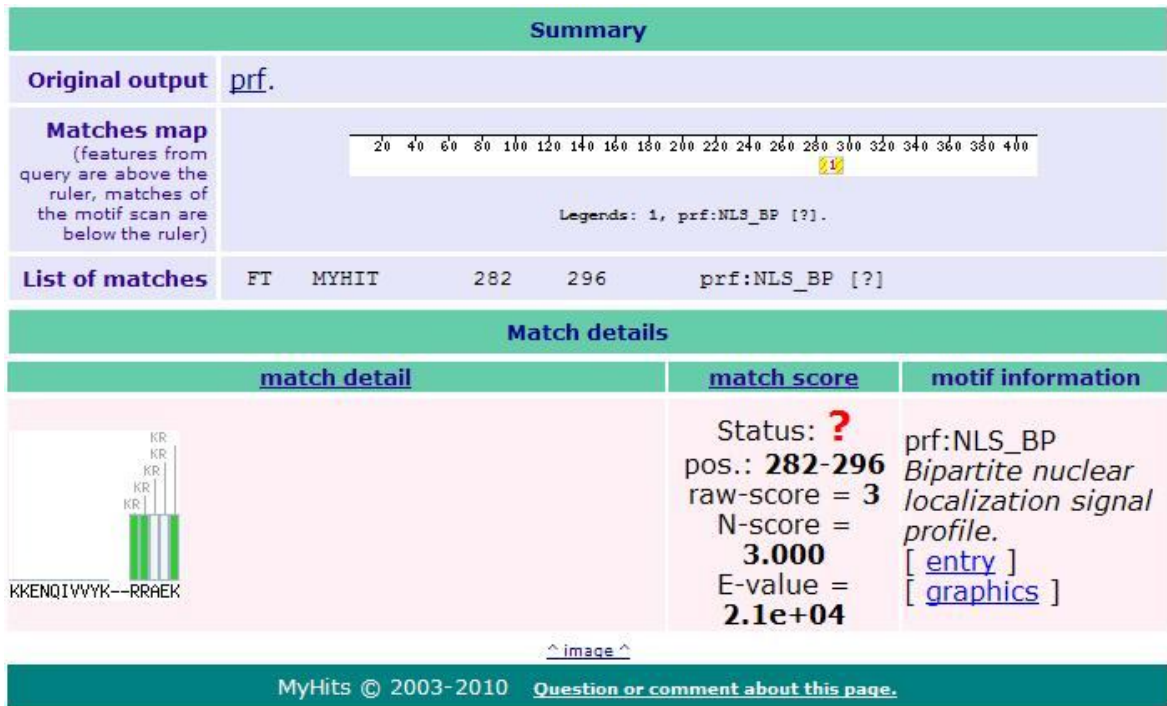
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
<a href="#">NP_568757.2</a>	SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">682</a>	682	96%	0.0
<a href="#">Q9FGN8.1</a>	RecName: Full=Protein DYAD; AltName: Full=Protein SWITCH 1 >gb AAL7396	<a href="#">676</a>	676	95%	0.0
<a href="#">AAL13233.1</a>	SWITCH1 splice variant S [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">573</a>	573	82%	2e-161
<a href="#">XP_002510986.1</a>	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >gb EEF51588.1  conserv	<a href="#">318</a>	318	88%	7e-85
<a href="#">XP_002303485.1</a>	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEE78464.1  predicted protein [P	<a href="#">315</a>	315	88%	6e-84
<a href="#">XP_002272589.1</a>	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	<a href="#">288</a>	288	88%	7e-76
<a href="#">CBI18711.1</a>	unnamed protein product [Vitis vinifera]	<a href="#">287</a>	287	88%	2e-75
<a href="#">CAN69656.1</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]	<a href="#">285</a>	285	88%	6e-75
<a href="#">EEC75837.1</a>	hypothetical protein OsI_12821 [Oryza sativa Indica Group] >gb EEE59603.1	<a href="#">220</a>	220	92%	2e-55
<a href="#">AAX95531.1</a>	Expressed protein [Oryza sativa Japonica Group] >gb ABF97915.1  meiosis p	<a href="#">220</a>	220	92%	2e-55
<a href="#">NP_001050785.1</a>	Os03g0650400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] >gb AAX95530.1  Ex	<a href="#">220</a>	220	92%	2e-55
<a href="#">NP_001139538.1</a>	ameiotic 1 [Zea mays] >gb ABG57250.1  ameiotic 1 [Zea mays]	<a href="#">213</a>	213	89%	2e-53
<a href="#">XP_002466738.1</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g013215 [Sorghum bicolor] >gb EER937	<a href="#">210</a>	210	89%	2e-52
<a href="#">CBI23546.3</a>	unnamed protein product [Vitis vinifera]	<a href="#">187</a>	187	26%	2e-45
<a href="#">XP_002326607.1</a>	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEE72406.1  predicted protein [P	<a href="#">179</a>	179	24%	7e-43
<a href="#">ABF97916.1</a>	meiosis protein, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	<a href="#">177</a>	177	69%	2e-42
<a href="#">XP_002518005.1</a>	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >gb EEF44523.1  conserv	<a href="#">170</a>	170	52%	3e-40
<a href="#">XP_002268155.1</a>	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	<a href="#">160</a>	160	25%	3e-37
<a href="#">CAN80782.1</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]	<a href="#">160</a>	160	26%	4e-37
<a href="#">CBI27693.3</a>	unnamed protein product [Vitis vinifera]	<a href="#">159</a>	159	25%	4e-37
<a href="#">XP_002330461.1</a>	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEF09004.1  predicted protein [P	<a href="#">155</a>	155	29%	8e-36
<a href="#">XP_002325728.1</a>	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEF00110.1  predicted protein [P	<a href="#">151</a>	151	42%	2e-34
<a href="#">ABA99419.1</a>	hypothetical protein LOC_Os12g42830 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)	<a href="#">150</a>	150	27%	3e-34
<a href="#">EAZ21269.1</a>	hypothetical protein OsJ_36921 [Oryza sativa Japonica Group]	<a href="#">150</a>	150	27%	4e-34
<a href="#">ACU24617.1</a>	unknown [Glycine max]	<a href="#">149</a>	149	25%	6e-34
<a href="#">ABA99418.1</a>	hypothetical protein LOC_Os12g42820 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)	<a href="#">149</a>	149	27%	7e-34
<a href="#">EEC69705.1</a>	hypothetical protein OsI_39173 [Oryza sativa Indica Group]	<a href="#">149</a>	149	27%	8e-34
<a href="#">NP_001031931.2</a>	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">141</a>	141	29%	2e-31
<a href="#">NP_197751.3</a>	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">141</a>	141	29%	2e-31
<a href="#">BAA97239.1</a>	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">141</a>	141	29%	2e-31
<a href="#">XP_001779918.1</a>	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens] >gb EDQ55235.1  pr	<a href="#">140</a>	140	31%	4e-31
<a href="#">XP_001772852.1</a>	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens] >gb EDQ62254.1  pr	<a href="#">139</a>	139	27%	5e-31
<a href="#">XP_002442569.1</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g022080 [Sorghum bicolor] >gb EES164	<a href="#">139</a>	139	44%	6e-31
<a href="#">XP_001784005.1</a>	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens] >gb EDQ51173.1  pr	<a href="#">135</a>	135	26%	6e-30
<a href="#">AAW80879.1</a>	At5g23610 [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">122</a>	122	21%	7e-26
<a href="#">AAT70435.1</a>	At5g23610 [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">122</a>	122	21%	7e-26
<a href="#">CAN64013.1</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]	<a href="#">69.3</a>	69.3	10%	8e-10
<a href="#">AAG51303.1</a>	PHD-finger protein, putative [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">47.8</a>	47.8	25%	0.002
<a href="#">NP_176791.2</a>	MMD1 (MALE MEIOCYTE DEATH 1); DNA binding / protein binding / zinc ion bi	<a href="#">47.8</a>	47.8	25%	0.002
<a href="#">NP_178290.1</a>	PHD finger family protein [Arabidopsis thaliana] >gb AAD12714.1  hypothetic	<a href="#">47.4</a>	47.4	15%	0.003

Şekil 4. 15 BgDYAD proteine Benzer protein dizilerini içeren blast analizi sonucu

Çizelge 4.3 Protein blast sonuçlarına göre *BgDYAD* geni ile benzer diziler

Organizma	Protein dizisi
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SW11 (SWITCH1); phospholipase C
<i>Ricinus communis</i>	conserved hypothetical protein
<i>Populus trichocarpa</i>	predicted protein
<i>Vitis vinifera</i>	PREDICTED: hypothetical protein
<i>Oryza sativa</i>	Os03g0650400
<i>Zea mays</i>	AMEİOTİC 1
<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g013215
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g23610

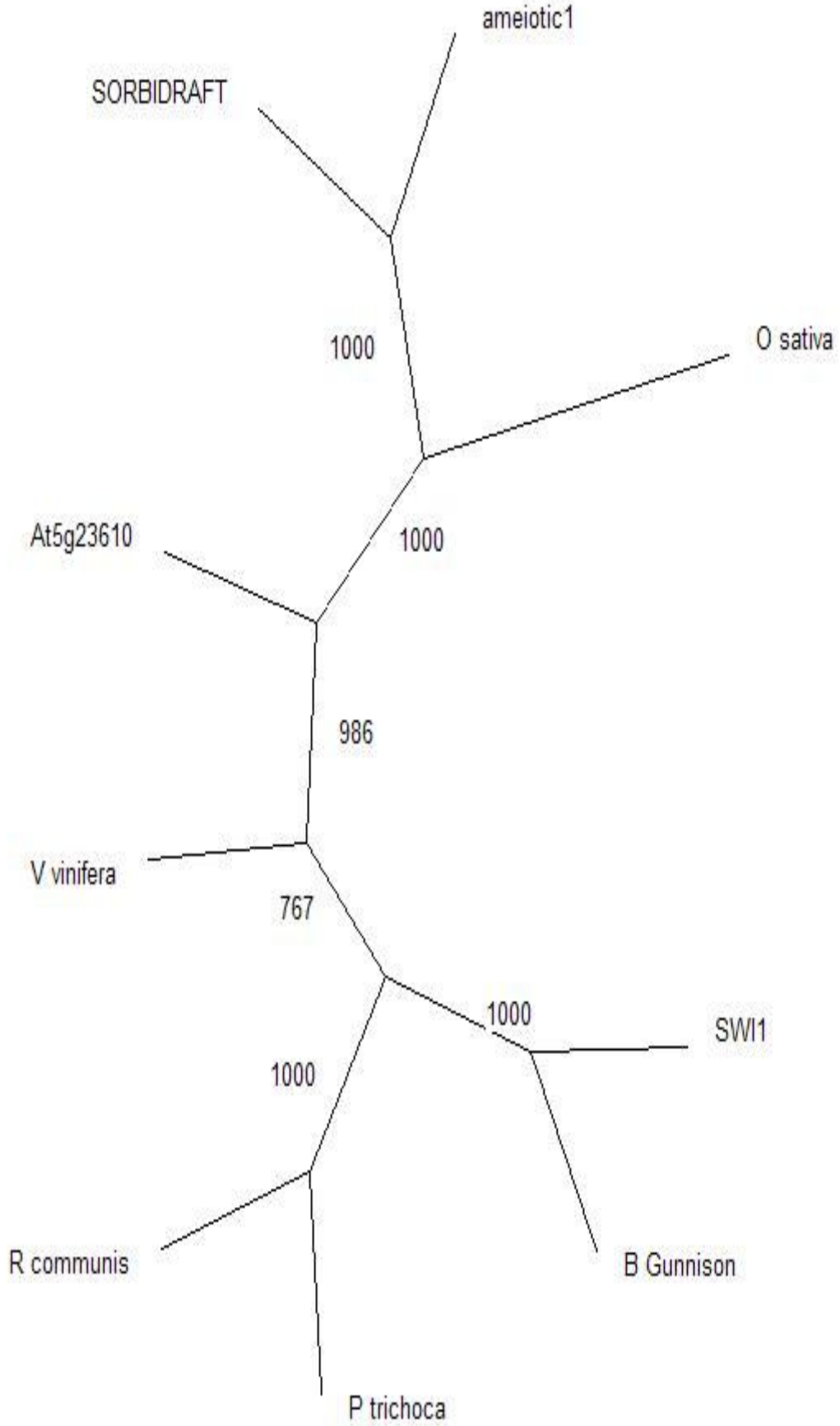
BgDYAD proteinin muhtemel bir nükleer lokalizasyon sinyali içeren bölge içerdiği Myhits Motif SCAN programı ile ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4. 16 BGDYAD Proteini fonksiyonel bölgelerinin ortaya çıkarılması amacıyla Motif SCAN programı ile gerçekleştirilen analiz sonuçları

BgDYAD protein dizisine benzer çok fazla bilinen protein olmamasına karşın bu çalışma ile BgDYAD ile benzerlik gösteren protein dizileri ile bir filogenetik ağaç kurulmuştur. Bu dizilere ayrıca AM1 geninin *AT5G51330* geni dışında ikinci bir homoloğu olduğu rapor edilmiş *At5g23610* geni de eklenmiştir. Çalışmada öncelikle, ClustalW programı orijinal parametreleri kullanılarak aminoasit dizileri sıralanmıştır. Diziler elde edilen kısmi protein dizisine göre hizalanmış ve elde edilen protein dizileri filogenetik ağacın elde edilmesinde kullanılmıştır. Bu diziler phylip programı yardımı ile bir filogenetik ağaç şeklinde düzenlenmiştir (şekil 4.15). Elde edilen sonuçlara göre *BgDYAD*

dizisi Arabidopsis *AT5G51330* genine yüksek oranda benzemektedir. Bunun yanında *Ricinus communis* ve *Populus trichocarpa* bitkilerine ait diziler diğer dizilere göre daha yüksek oranda benzerdir. Elde edilen bilgiler benzer diğer genlerin kendi aralarında sınıflandırılmasına ya da fonksiyonları hakkında yorum yapılmasına imkan tanımamaktadır.



Şekil 4. 17BgDYAD geni için filogenetik analizler sonucu oluşturulan filogenetik ağaç



#### 4.7. BsDYAD Geninin Sekans Analizleri

Çalışmada *B. Stricta* yaprak dokularından izole edilen genomik DNA'lar ile gerçekleştirilen PCR çalışmaları ile *B. stricta* türünde *AT5G51330* geni homoloğunun çoğaltılması amaçlanmıştır. Yapılan biyoinformatik çalışmalarla genomik *AT5G51330* geni homoloğu dizisi kullanılarak muhtemel transkript ve protein dizileri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen Genomik DNA ve protein dizileri blast analizleri sonuçları bu dizilerin *AT5G51330* geni ile benzer olduğu göstermiştir (Şekil 4.15, 4.16). Blast sonuçlarına göre elde edilen dizi *AT5G51330* geni genomik dizisinin %77'sini kapsamakta ve %88 benzerlik göstermektedir. Bu sebeple bu gen BsDYAD olarak adlandırılmıştır.

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	<a href="#">1829</a>	2476	77%	0.0	88%	<a href="#">E</a>
<a href="#">AC232576.1</a>	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBR5010113, complete sequence	<a href="#">1016</a>	1541	57%	0.0	85%	
<a href="#">NM_124512.2</a>	Arabidopsis thaliana SWI1 (SWITCH1); phospholipase C (SWI1) mRNA	<a href="#">625</a>	1954	56%	6e-175	95%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF466153.1</a>	Arabidopsis thaliana DYAD (DYAD) mRNA, complete cds	<a href="#">625</a>	1954	56%	6e-175	95%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AF362002.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant S (SWI1) mRNA, complete cds	<a href="#">625</a>	1952	56%	6e-175	95%	<a href="#">U</a>
<a href="#">AF362001.1</a>	Arabidopsis thaliana SWITCH1 splice variant L (SWI1) mRNA, partial cds	<a href="#">625</a>	1952	56%	6e-175	95%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002865808.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	<a href="#">563</a>	1853	50%	2e-156	96%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002326571.1</a>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	<a href="#">284</a>	284	12%	2e-72	77%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002303449.1</a>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	<a href="#">268</a>	268	12%	2e-67	75%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002510940.1</a>	Ricinus communis conserved hypothetical protein, mRNA	<a href="#">260</a>	260	11%	3e-65	76%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002889508.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata predicted protein, mRNA	<a href="#">199</a>	199	4%	7e-47	89%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AM445786.1</a>	Vitis vinifera contig VV78X220028.10, whole genome shotgun sequence	<a href="#">181</a>	181	11%	2e-41	71%	
<a href="#">XM_002272553.1</a>	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100254386 (LOC100254386)	<a href="#">176</a>	176	11%	9e-40	71%	<a href="#">G</a>
<a href="#">F1149692.1</a>	Daucus carota subsp. sativus clone BAC C003N02 genomic sequence	<a href="#">125</a>	125	7%	1e-24	72%	
<a href="#">AP010330.1</a>	Lotus japonicus genomic DNA, chromosome 1, clone: LJT17D12, TM17	<a href="#">95.1</a>	95.1	6%	2e-15	70%	
<a href="#">AM446414.2</a>	Vitis vinifera contig VV78X165164.22, whole genome shotgun sequence	<a href="#">86.0</a>	86.0	9%	1e-12	66%	
<a href="#">XM_002268119.1</a>	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100247650 (LOC100247650)	<a href="#">84.2</a>	84.2	9%	4e-12	66%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_001772800.1</a>	Physcomitrella patens subsp. patens predicted protein (PHYPADRAFT_8)	<a href="#">82.4</a>	82.4	7%	1e-11	68%	<a href="#">G</a>
<a href="#">BT099458.1</a>	Soybean clone JCVI-FLGm-26P16 unknown mRNA	<a href="#">71.6</a>	71.6	6%	3e-08	68%	<a href="#">U</a>
<a href="#">BT096020.1</a>	Soybean clone JCVI-FLGm-25O8 unknown mRNA	<a href="#">71.6</a>	71.6	4%	3e-08	72%	<a href="#">U</a>
<a href="#">XM_002330425.1</a>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	<a href="#">69.8</a>	69.8	9%	9e-08	65%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">XM_001779866.1</a>	Physcomitrella patens subsp. patens predicted protein (PHYPADRAFT_9)	<a href="#">69.8</a>	69.8	7%	9e-08	66%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002325692.1</a>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	<a href="#">68.0</a>	68.0	6%	3e-07	68%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AC019012.4</a>	Genomic Sequence For Arabidopsis thaliana Clone T3J11 From Chromosome 5	<a href="#">64.4</a>	64.4	2%	4e-06	78%	
<a href="#">AC002341.3</a>	Arabidopsis thaliana chromosome 2 clone T14G11 map Ten5, complete cds	<a href="#">60.8</a>	60.8	4%	5e-05	72%	<a href="#">E</a>
<a href="#">XM_002517959.1</a>	Ricinus communis conserved hypothetical protein, mRNA	<a href="#">59.0</a>	59.0	6%	2e-04	66%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_002466693.1</a>	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	<a href="#">57.2</a>	57.2	7%	6e-04	65%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AM434466.2</a>	Vitis vinifera contig VV78X232639.8, whole genome shotgun sequence	<a href="#">55.4</a>	55.4	2%	0.002	78%	
<a href="#">NM_114459.4</a>	Arabidopsis thaliana unknown protein (AT3G45900) mRNA, complete cds	<a href="#">55.4</a>	55.4	0%	0.002	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">AK228121.1</a>	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein, clone: RAFL14-59-	<a href="#">55.4</a>	55.4	0%	0.002	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>

Şekil 4. 18 BsDYAD geni Genomik DNA dizisi blast analizi sonuçları.

```

>ref|NP_568757.2| UG SWI1 (SWITCH1); phospholipase C [Arabidopsis thaliana]
Length=639

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

Score = 748 bits (1930), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 396/546 (72%), Positives = 440/546 (80%), Gaps = 60/546 (10%)

Query 1   MKLNKPLKKRSGGGLVPLFDESHVMVSELAGDLLYRRIAPHEVSMNRNSWSFWSSASSR 60
          M NKP+KKRSGGGL+P+FDESHVM SELAGDLLYRRIAPHE+SMNRNSW FWVSS SSR
Sbjct 91   MNRNKP+KKRSGGGLVPLFDESHVMASELAGDLLYRRIAPHELSMNRNSWGFVSS-SSR 149

Query 61   RNK-----MISQPAYNTRLCRAASPEGKCVSELRSSEMIMKWRRLRVQYKSRHMMRLRVQ 115
          RNK      ++SQPAYNTRLCRAASPEGK SEL+SG MIKWRRLRVQY+S
Sbjct 150  RNKFPREVVSQPAYNTRLCRAASPEGKCSSELKSGMIMKWRRLRVQYQS----- 200

Query 116  YKSRHIDCKKNTGKESGK-EGGVCKEEIEEEDDDGNETEETKQIANEMTDGNRKRK 174
          RHID +KN EG+ESS VK E   +E +EEDDDGNE TKQ A E+T+GNRKRK
Sbjct 201  ---RHIDTRKNKEGESSRVKDEVYKEEEMEKEEDDDGNEIGGTKQEAKEITNGNRKRK 257

Query 175  LIESSTERLAQRAKVYDQKKENQIVVYKRRAEKKFIDRWSVDR----- 217
          LIESSTERLAQ+AKVYDQKKE QIVVYKR++E+KFIDRWSV+R
Sbjct 258  LIESSTERLAQKAKVYDQKKEQIVVYKRKSERKFIDRWSVERYKLAERNMLKVMKEKNA 317

Query 218  -----SQLRSEARKLIGDTGLLDHMLKHMAGKVAPGGEDRFMRKHNDGAMEYWLES 269
          +LRSEARKLIGDTGLLDH+LKHLMAGKVAPGG+DRFMRKHNDGAMEYWLES
Sbjct 318  VFGNSILRPELRSEARKLIGDTGLLDHLLKHMAGKVAPGGQDRFMRKHNDGAMEYWLES 377

Query 270  SDLIHIRKEAGVEDPYWTPPPGWKLGDNPTQDPVCAGEIREIREELASLKRELEKLASKK 329
          SDLIHIRKEAGV+DPYWTPPPGWKLGDN+QDPVCAGEIR+IREELASLKREL+KLASKK
Sbjct 378  SDLIHIRKEAGVKDPYWTPPPGWKLGDNPSQDPVCAGEIRDIREELASLKRELKKLASKK 437

Query 330  EEEELIIVTTPNSCVTSQNVVDHDLNLTTPAKEIYADLLKKKYKIEDQLVIIGETLCKMEFS 389
          EEEEL+I+TTPNSCVTSQN DNL TPAKEIYADLLKKKYKIEDQLVIIGETL KME
Sbjct 438  EEEELVIMTTPNSCVTSQN---DNLMTPAKEIYADLLKKKYKIEDQLVIIGETLRKMEED 494

Query 390  LYILDATLLVMNDESSGEGDCHWTLMQQSESSATPSVLEDSPTMETLEGEVKEVNKGNQI 449
          + L T+   DE+           ++ +S+ TP +LEDSP ++TLEGEVK VNKGNQI
Sbjct 495  MGWLKKTIV---DEN-----YPKKPDSTETPLLEDSPPITLEGEVKKVNKGNQI 541

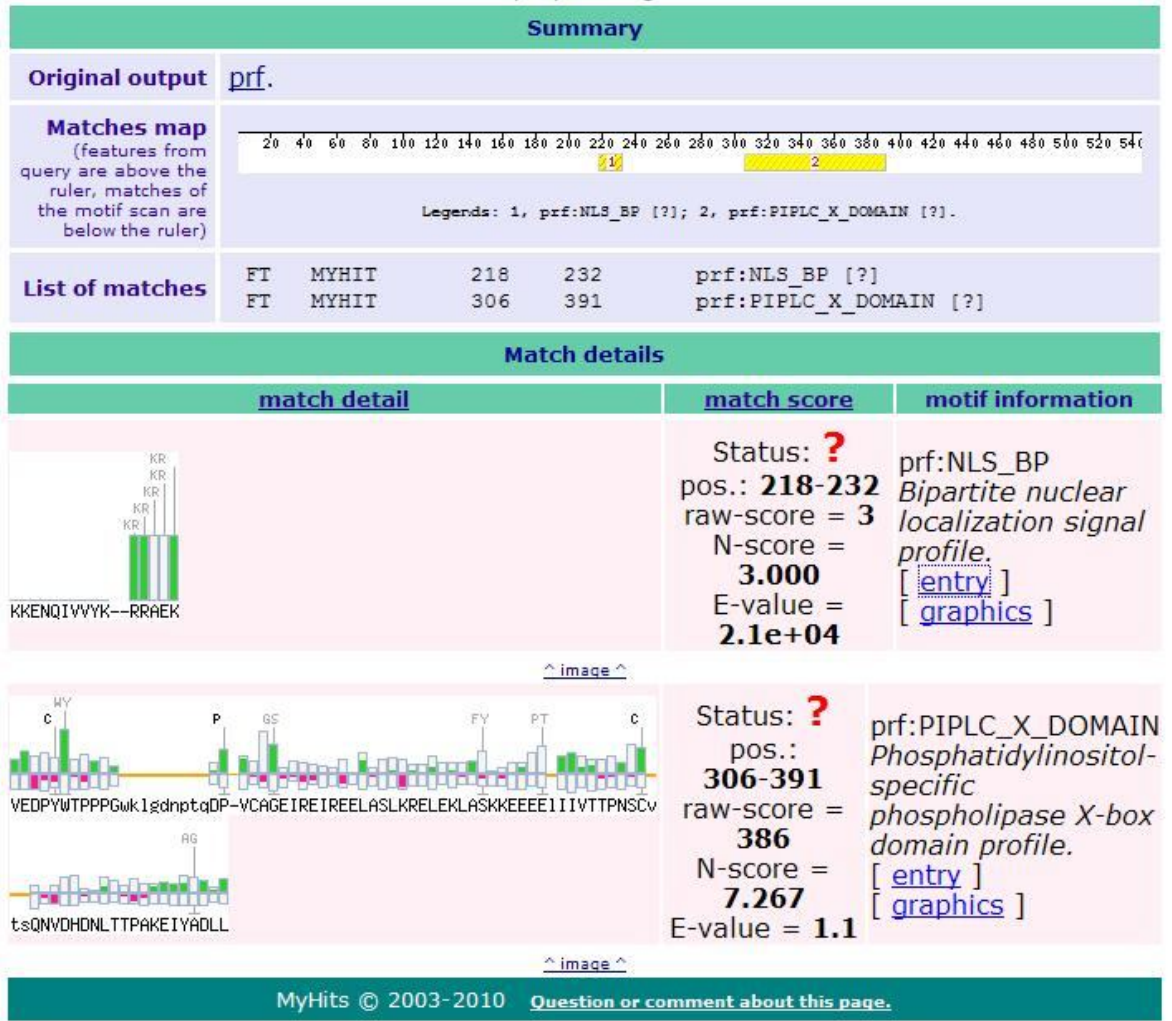
Query 450  TESPQNREKCKKHDQQERSPLSLISNTGFRICRFPVGF+FAWP+LPALAAATDTVLSNSIAK 509
          TESPQNREK +KHDQQERSPLSLISNTGFRICRFPVGF+FAWP+LPALAAATDT S+ +
Sbjct 542  TESPQNREKGRKHDQQERSPLSLISNTGFRICRFPVGMFAWPQLPALAAATDTNASSPSHR 601

Query 510  ELASSP 515
          + SP

```

**Şekil 4. 196** BSDYAD proteinin AT5G51330 ile benzerliğini gösteren blast analizi sonucu.

*BsDYAD* genine ait protein dizisi üzerindeki fonksiyonel bölgelerin ortaya çıkarılması amacıyla Motif SCAN programı ile analiz gerçekleştirilmiş ve iki muhtemel fonksiyonel bölge içerdiği ortaya çıkarılmıştır. Bu bölgeler bir nükleer lokalizasyon sinyali ve Phosphatidylinositol-specific phospholipase X-box domain bölgesidir.



Şekil 4. 20 BSDYAD proteini fonksiyonel bölgelerinin ortaya çıkarılması amacıyla motif SCAN programı ile gerçekleştirilen analiz sonuçları

**BÖLÜM 5****SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Doğal apomikt ve seksüel türleri barındıran *Boechea* türleri ile yapılan çalışmalarla polen ana hücrelerinin gelişim aşamaları ortaya konmuştur. Apomikt ve seksüel *Boechea* türlerinde polen ana hücresi mayoz süreci incelenmiştir (Taşkın ve ark., 2009). Ancak doğal apomikt türlerde apomayoza sebep olan genetik mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Buna rağmen 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).

Apomiksi süreciyle alakalı genlerin ortaya çıkarılmasında genetik haritalama tabanlı çalışmalar çeşitli apomikt türlerde gerçekleştirilmiş olmasına rağmen günümüze kadar apomiksi süreciyle alakalı bir gen bu yöntemle tanımlanamamıştır. Bunun muhtemel sebebi apomiksi süreciyle alakalı genlerin rekombinasyon açısından baskılanmış olmasıdır (Spillane ve ark., 2001). Bu sebeple bu süreçle alakalı etkenler beraber kalıtılmakta ve haritalama çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada *Hieracium* türünde delesyon haritalama metodu ile bu türde apomayoz ve partenogenezle ilişkili olduğu görülen iki locus tanımlanmıştır (Catanach ve ark., 2006). Aynı grubun bir sonraki çalışmasında apomayozla alakalı olduğunu gösterdikleri “loss of apomeiosis” mutantını araştırmışlardır (Okada ve ark., 2007). Buna rağmen çalışmaya konu olan *Hieracium* türü *Boechea* türünden farklı olarak aposporik bir apomiksi süreci göstermektedir.

Haritalama çalışmalarının bu zorlukları sebebi ile apomayoz süreci ile ilgili araştırmalar seksüel türlerde benzer fenotiplere yol açan mutant hatlarla yürütülmektedir. Bu çalışmaya konu olan *AT5G51330* proteini kardeş kromatid kohezyonunda rol alıyor olmasına rağmen bilinen proteinlerle çok az veya hiç benzerlik göstermemektedir (Agashe ve ark., 2002). Kohezis proteinleri, SC proteinleri ile birlikte çalışarak homolog

kromozomlar arasında lokalize olmakta ve kromozomların bir arada tutulmasını ve sonrasında salınmasını sağlamaktadır. Buna rağmen *BgDYAD* proteini bu genlerle benzerlik göstermemektedir.

*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.

BGDYAD ve BSDYAD kısmi protein bölgeleri 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 modelinden farklı olarak bir konsensus motif olarak tanımlanmıştır (Dingwall ve ark., 1991). *AT5G51330* proteini mayozun erken basamaklarında nükleusta lokalize olmaktadır. Seksüel ve apomikt *Boechera* türlerinde bu bölgelerin varlığı bu türlerde *AT5G51330* homologlarının *AT5G51330* genine benzer şekilde nükleusta bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanında *Boechera* türlerinde *AT5G51330* homologlarının ifade profilleri *incelenmelidir*. Böylece *AT5G51330* homologlarının hangi doku ve anatomik süreçlerde ifade olduğu ortaya çıkarılıp, *Boechera* türlerindeki fonksiyonu ortaya çıkaracaktır.

Nükleer lokalizasyon sinyalinin yanı sıra BsDYAD proteini *AT5G51330* geni 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.

*BgDYAD* geni Blast sonuçları çoğaltılan DNA dizisinin *AT5G51330* genine ait mRNA dizisi ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Elde edilen muhtemel protein dizisine ait blast sonuçları yedi protein dizisi ile benzerlikler içerdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.14, Çizelge 4.3). Dolayısı ile bu diziler daha sonraki biyoinformatik çalışmalar için seçilmişlerdir. Ayrıca *Arabidopsis thaliana At5g23610* geni mısır bitkisine ait

Ameiotic1 geninin *AT5G51330* geninin yanında ikinci bir homoloğu olabileceği rapor edilmiştir (Pawlowski ve ark., 2009). Bu sebeple elde ettiğimiz *BgDYAD* dizisi ile de benzerlik gösteren *At5g23610* geni bioinformatik çalışmalar için kullanılan genler arasına eklenmiştir.

*AMEIOTIC1* geni *BgDYAD* kısmi protein dizisine %36 oranında, *AT5G51330* genine ise %30 oranında benzemektedir. *AMEIOTIC1* geni mısır bitkisinde mayoz sürecine girişi kontrol etmektedir. *Am1* Mutant hatlarında erkek ve dişi mayositler mayoz bölünme yerine mitoz bölünmeler gözlenmektedir (Pawlowski ve ark., 2009). *AT5G51330* geninin Mayoz I sürecinde işlev görmesi, mutantlarında *aml* mutantlarına benzer şekilde diploid gametlerin oluşumuna yol açması ve protein dizilerindeki benzerlikler bu genlerin fonksiyonel homolog genler olabileceğini göstermektedir.

Bunun yanında *BgDYAD* genine benzerlik içerdiği görülen diğer protein dizileri Genomik dizilerden muhtemel transkript ve protein dizilerini ortaya çıkaran sistemlerle elde edilmiştir. Bunun yanında bu genlerin işlevleri bu bitkilerde araştırılmamıştır.

Bu çalışma ile apomiksi sürecinin önemli bir adımı olan apomayozun kontrolü için aday olarak rapor edilmiş *AT5G51330* geni ilk kez bir apomikt bitkide karakterize edilmiştir. *Boechera* ve *Arabidopsis* bitkilerinin aynı bitki ailesi içinde bulunması bu çalışmayı mümkün kılmıştır. Yakın akraba olan bu iki türe ait *AT5G51330* ve *BgDYAD* genleri %89 oranında benzemektedir. *AT5G51330* geniyle alakalı apomikt türlerde daha ileri tekniklerle yapılacak çalışmalar apomiksi sürecinin anlaşılmasında faydalı olacaktır. Ayrıca apomikt ve seksüel *Boechera* türlerinde *AT5G51330* geninin ifade profilini ve sekanslarını da araştırmaktayız. Fonksiyonu belirlenmemiş ve *BgDYAD* geni ile benzerlikler gösteren diğer genlerin fonksiyonlarının araştırılması, *AT5G51330* geninin muhtemel homologlarının ortaya çıkarılması ve bu genin türler arasında fonksiyonunun anlaşılması açısından önemlidir.

## 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.
- 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. *J. Exp. Bot.*, 54 (380): 1-10.
- Barcaccia G., Varotto S., Meneghetti S., Albertini E., Porceddu A., Parrini P. ve Lucchin M., 2001. Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago* spp.: cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs. *Sexual Plant Reproduction*, 14 (4): 233-238.
- Bedinger P., 1992. The Remarkable Biology of Pollen. *Plant Cell*, 4 (8): 879-887.
- Bhatt A. M., Canales C. ve Dickinson H. G., 2001. Plant meiosis: the means to 1N. *Trends in Plant Science*, 6 (3): 114-121.
- 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. *Mol Plant*, 1 (4): 620-633.
- Cai X. ve Makaroff C. A., 2001. The *dys10* Mutation of Arabidopsis results in desynapsis and a general breakdown in meiosis. *Sexual Plant Reproduction*, 14 (1): 63-67.
- 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.

- d'Erfurth I., Jolivet S., Froger N., Catrice O., Novatchkova M. ve Mercier R., 2009. Turning Meiosis into Mitosis. *Plos Biology*, 7 (6): e1000124.
- 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 1) lead to the production of diploid pollen grains. *PLoS Genet*, 4 (11): e1000274.
- Dingwall C. ve Laskey R. A., 1986. Protein Import into the Cell Nucleus. *Annual Review of Cell Biology*, 2 (1): 367-390.
- Dingwall C. ve Laskey R. A., 1991. Nuclear targeting sequences -- a consensus? *Trends in Biochemical Sciences*, 16: 478-481.
- Drews G. N., Lee D. ve Christensen C. A., 1998. Genetic Analysis of Female Gametophyte Development and Function. *Plant Cell*, 10 (1): 5-18.
- Faure J. E., Rotman N., Fortune P. ve Dumas C., 2002. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: developmental stages and time course. *Plant J*, 30 (4): 481-8.
- Golubovskaya I., Grebennikova Z. K., Avalkina N. A. ve Sheridan W. F., 1993. The role of the *ameiotic1* gene in the initiation of meiosis and in subsequent meiotic events in maize. *Genetics*, 135 (4): 1151-66.
- 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.
- Hirano T., 2000. CHROMOSOME COHESION, CONDENSATION, AND SEPARATION. *Annual Review of Biochemistry*, 69 (1): 115-144.
- Hulo N., Bairoch A., Bulliard V., Cerutti L., Cuče B. A., de Castro E., Lachaize C., Langendijk-Genevaux P. S. ve Sigrist C. J. A., 2008. The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 36 (suppl\_1): 245-249.
- Klein F., Mahr P., Galova M., Buonomo S. B. C., Michaelis C., Nairz K. ve Nasmyth K., 1999. A Central Role for Cohesins in Sister Chromatid Cohesion, Formation of Axial Elements, and Recombination during Yeast Meiosis. *Cell*, 98 (1): 91-103.
- Koltunow A. M., 1993. Apomixis - Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *Plant Cell*, 5 (10): 1425-1437.
- 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.
- Koltunow A. M. ve Grossniklaus U., 2003. Apomixis: A developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 547-574.



- Koltunow A. M. G. ve Tucker M. R., 2008. Functional embryo sac formation in Arabidopsis without meiosis - one step towards asexual seed formation (apomixis) in crops? *Journal of Biosciences*, 33 (3): 309-311.
- McCormick S., 1993. Male Gametophyte Development. *Plant Cell*, 5 (10): 1265-1275.
- Meldrum E., Parker P. J. ve Carozzi A., 1991. The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1092 (1): 49-71.
- 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.
- 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.
- Michaelis C., Ciosk R. ve Nasmyth K., 1997. Cohesins: Chromosomal Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids. *Cell*, 91 (1): 35-45.
- Nasmyth K., 2001. DISSEMINATING THE GENOME: Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis. *Annual Review of Genetics*, 35 (1): 673-745.
- 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 AME10TIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. *Proc Natl Acad Sci 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.
- Rhee S. G. ve Choi K. D., 1992. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 12393-12396.
- Russell S. D., 1993. The Egg Cell: Development and Role in Fertilization and Early Embryogenesis. *Plant Cell*, 5 (10): 1349-1359.
- Schneitz K., Hulskamp 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.

- Schranz M. E., Dobes C., Koch M. A. ve Mitchell-Olds T., 2005. Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechera* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 92 (11): 1797-1810.
- Schranz M. E., Kantama L., Jong H. d. ve Mitchell-Olds T., 2006. Asexual reproduction in a close relative of *Arabidopsis*: a genetic investigation of apomixis in *Boechera* (Brassicaceae). *New Phytologist*, 171 (2): 425-438.
- Sharbel T. F., Voigt M. L., Corral J. M., Thiel T., Varshney A., Kumlehn J., Vogel H. ve Rotter B., 2009. Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant Journal*, 58 (5): 870-882.
- Siddiqi I., Ganesh G., Grossniklaus U. ve Subbiah V., 2000. The dyad gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development*, 127 (1): 197-207.
- Spielman M., Vinkenoog R. ve Scott R. J., 2003. Genetic mechanisms of apomixis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358 (1434): 1095-1103.
- Spillane C., Steimer A. ve Grossniklaus U., 2001. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. *Sexual Plant Reproduction*, 14 (4): 179-187.
- 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.
- Van Heemst D. ve Heyting C., 2000. Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma*, 109 (1): 10-26.
- Yadegari R. ve Drews G. N., 2004. Female Gametophyte Development. *Plant Cell*, 16 (suppl\_1): S133-141.

<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b>	<b>Sayfa no</b>
Çizelge 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonlar.....	14
Çizelge 3.2. Optimum PCR bileşenleri ve konsantrasyonları .....	15
Çizelge 3.3. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri .....	16
Çizelge 3.4. Kullanılan Primer çiftlerinden beklenen pcr ürünü uzunlukları .....	16
Çizelge 3.5. <i>AT5G51330</i> için kullanılan optimum PCR programı .....	17
Çizelge 3.6. <i>ACTIN2</i> ve <i>GAPDH</i> için kullanılan PCR programı .....	17
Çizelge 4.1. <i>B. gunnisoniana AT5G51330</i> genine ait kısmi cDNA dizisi.....	30
Çizelge 4.2. Transeq programı ile elde edilen <i>BgDYAD</i> genine ait muhtemel protein dizileri.....	31
Çizelge 4.3. Çizelge 4.3 Protein blast sonuçlarına göre <i>BgDYAD</i> geni ile benzer diziler...	35

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritası.....	18
Şekil 4. 1 B. gunnisoniana ve B. stricta genomik DNAlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	21
Şekil 4.2. Boechera gunnisoniana bitkisine ait total RNA ve cDNA agaroz jel elektroforezi jel görüntüleri.....	22
Şekil 4.3. Pozitif kontrol olarak kullanılan ACTİN2 genine ve Negatif kontrol reaksiyonlarına ait PCR ürünlerinin jel görüntüleri.....	23
Şekil 4. 4 Boechera gunnisoniana Genomik DNA PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	24
Şekil 4. 5 B. stricta Genomik DNA PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	24
Şekil 4. 6 B. Stricta genomik DNA D7 primer çifti ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait Agaroz Jel elektroforezi görüntü.....	24
Şekil 4. 7 B. Stricta genomik DNA D8 ve D9 primer çiftleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait Agaroz Jel elektroforezi görüntüsü .....	25
Şekil 4.8. DYAD geni için beş primer çifti ile yapılan PCR sonuçları.....	26
Şekil 4.9. D6 primer çifti ile elde edilen 1243 baz çifti uzunluğunda pcr ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	27
Şekil 4.10. D6 primer çifti için yapılan optimizasyon çalışması agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	28
Şekil 4.11. BgDYAD cDNA D6 primer çifti PCR ürününün jelden izole edilmiş sonuçlarını gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	29
Şekil 4. 12 B. Stricta genomik DNA PCR ürünlerinin jelden izole edilmiş sonuçlarını gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	29
Şekil 4.13. BgDYAD kısmi cDNA dizisinin blast analizi sonuçları .....	32
Şekil 4.14. BgDYAD geninin AT5G51330 geni ile benzerliğini gösteren blast analizi sonucu .....	33
Şekil 4.15. BgDYAD proteine Benzer protein dizilerini içeren blast analizi sonucu.....	34
Şekil 4. 16 BGDYAD Proteini fonksiyonel bölgelerinin ortaya çıkarılması amacıyla Motif SCAN programı ile gerçekleştirilen analiz sonuçları.....	35
Şekil 4.17. BgDYAD geni için filogenetik analizler sonucu oluşturulan filogenetik	

ağaç.....	37
Şekil 4. 18 BsDYAD geni Genomik DNA dizisi blast analizi sonuçları.....	38
Şekil 4. 19 BSDYAD proteinin AT5G51330 geni ile benzerliğini gösteren blast analizi sonucu.....	39
Şekil 4. 20 BSDYAD Proteini fonksiyonel bölgelerinin ortaya çıkarılması amacıyla Motif SCAN programı ile gerçekleştirilen analiz sonuçları.....	40

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatih SEZER  
Doğum Yeri : ÇANAKKALE  
Doğum Tarihi :19/03/1985

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (Biyoloji)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (Biyoloji Anabilim Dalı)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI –Diğer :  
Bildiriler -Uluslararası –Ulusal :

### İS DENEYİMİ

-

### İLETİŞİM

E-posta Adresi : fsezerfatih@gmail.com