

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

**APOMİKT BOECHERA HOLBOELLİ (HORNEM.)**  
**Á.LÖVE & D.LÖVE ANTER GELİŞİMİNE**  
**KATILAN BAZI GEN İFADELERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**Hakan ÇAM**

**BİYOLOJİ ANABİLİMDALİ**

Tezin Sunulduğu Tarih: 20.07.2009

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**Hakan ÇAM**, tarafından **Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN** yönetiminde hazırlanan “**APOMİKT BOECHERA HOLBOELLİİ (HORNEM.) Á.LÖVE & D.LÖVE ANTER GELİŞİMİNE KATILAN BAZI GEN İFADELERİNİN BELİRLENMESİ**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr.KemalMelikTaşkın

Yönetici

Doç.Dr.CüneytAKI

Jüri Üyesi

Doç.Dr.UğurGÖZEL

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi:...../...../.....

Prof.Dr.NeşetAYDIN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek LisansTUBİTAK-Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından 104O558 ve (BAP) tarafından 2008-33 no'lu projeden desteklenmiştir.

## **İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI**

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

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında, sahip olduğu bilgi, beceri ve tecrübesini paylaşmaktan kaçınmayan; manevi yardımı, desteği ve fedakarlığı esirgemeyen ve bana her zaman yol gösterip cesaret veren çok değerli Danışmanım Sayın **Yrd. Doç. Dr. Kemal Melih TAŞKIN**'a;

Çalışma kapsamında kurgu ve değerlendirmeler konusunda yardımlarını esirgemeyen Sayın **Arş.Gör. Sibel YILMAZ**'a;

Çalışma süresince yanımda olan ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen arkadaşım **Elvan GÜVEN**'e;

Bütün yaşamım boyunca maddi-manevi her türlü desteği esirgemeyen annem **Emine ÇAM**, babam **Fikri ÇAM**, Abim **İbrahim ÇAM** ve ailesine, Kardeşim **Özlem KÜRSÜZ** ve ailesine;

Sonsuz Teşekkürlerimi sunarım.

**Hakan ÇAM, 2009**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu$ l	Mikrolitre
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
<i>CLF</i>	<i>CURLY LEAF</i>
<i>DDMI</i>	<i>Decrease in DNA Methylation I</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH <sub>2</sub> O	Distile su
<i>DME</i>	<i>DEMETER</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
<i>E(z)</i>	<i>Enhancer of Zeste</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
<i>EMB173</i>	<i>EMBRYO DEFECTIVE 173</i>
<i>EMF</i>	<i>EMBRIONIC FLOWER</i>
<i>ESC</i>	<i>Extra Sex Combs</i>
FA jel	Formaldehyde Agaroz jel
<i>FIE</i>	<i>FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM</i>
<i>FIS2</i>	<i>FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2</i>
g	Gram
<i>GADPH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<i>GUS</i>	<i><math>\beta</math>-glucuronidase</i>
m	Maternal
M	Molar
MAH	Megaspor Ana Hücresi

<i>MEA</i>	<i>MEDEA</i>
<i>MEO</i>	<i>MEIDOS</i>
<i>MET1a/s</i>	<i>Antisense Methyltransferase</i>
ml	Mililitre
MOPS	3-[N-morpholino]propanesulfonicacid
<i>MSH</i>	<i>MULTICOPY SUPRESSOR OF IRAI</i>
ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
OD	Optik Densite
p	Paternal
PAH	Polen Ana Hücresi
PcG	Polycomb Group
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>PHE</i>	<i>PHERES</i>
pRB	Retinoblastoma Protein
R.E	RestriksiyonEndonükleaz
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Rotation per minute (Devir/dakika)
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
<i>SU(z)12</i>	<i>Suppressor of Zeste12</i>
<i>SWN</i>	<i>SWINGER</i>
TAE	Tris EDTA Asetat
trxG	Trithorax Group
U.V.	ultra violet
<i>VERN</i>	<i>VERNALIZATION</i>

## ÖZET

### APOMİKT BOECHERA HOLBOELLII (HORNEM.) Á.LÖVE & D.LÖVE ANTER GELİŞİMİNE KATILAN BAZI GEN İFADELERİNİN BELİRLENMESİ

Hakan ÇAM

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

20.07.2009, 56 sayfa

Bu çalışmada, apomikt *Boecheera holboellii* (Hornem.) Á.Löve & D.Löve bitkisinde *PHERES1* (*PHE1*) gen ortoloğunun yapısı ve ifadesi ortaya çıkarılmıştır. *Boecheera* anterleri döllenme öncesi ve sonrasında karpellerinden *PHE1* cDNA'sı RT-PCR aracılığı ile elde edilmiştir. *PHE1* tipI MADS MADS-box proteini kodlar ve tohum gelişimini teşvik eder. Ayrıca, tek bir allelden ifade olan *PHE1* anneye özgü suskun, babaya özgü ifade olacak şekilde etiketlenmiş bilinen tek bitki genidir. *Arabidopsis* bitkisinde, *PHE1* geni bitki Polycomb grup kompleksi 2 olarak da bilinen *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED* (*FIS*) kompleksi tarafından baskılanır. *FIS* kompleksi *Arabidopsis thaliana* bitkisinde döllenme öncesinde endosperm gelişimi baskılar ve döllenmeyi takiben endosperm gelişimini kontrol eder. Buna karşın, apomiktlerin endosperm gelişimini düzenlenmesinde ana gametlerin mayoz eksikliği nedeniyle ortaya çıkan ebeveyn genom dengesizliği üstesinden nasıl geldiği bilinmemektedir. Bu nedenle, *A. thaliana* bitkisinin yakın akrabası olarak triploid apomikt *Boecheera* türleri pseudogamik apomiktlerde *PHE1* geni fonksiyonunu araştırmak için cazip bir imkan sağlar. Büyüklüğü 310 bp olan *Boecheera PHE1* transkripti *AtPHE1* geni ile homoloji gösterir. Filogenetik analizler *Boecheera PHE1* geninin *AtPHE1* ile yakın benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Doğal apomikt *Boecheera* bitkisinde *PHE1* geninin tohum gelişimi sırasında ifade şekli ana *PHE1* alellin de döllenme öncesinde karpellerde ifade olduğunu göstermiştir.

**Anahtar sözcükler:** Apomiksi, *PHERES1*, MADS-box, Endosperm sorunu, Genetik etiketleme

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF SOME GENE EXPRESSION DURING ANTHOR DEVELOPMENT IN APOMICT BOECHERA HOLBOELLII (HORNEM.)

Á.LÖVE & D.LÖVE

Hakan ÇAM

Çanakkale Onsekiz Mart University Graduate  
School of Science and Engineering Chair for  
Biology Thesis of Master of Science Advisor:

Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

20.07.2009, 56 pages

Here we report the structure and expression patterns of orthologs for *PHERES1* (*PHE1*) gene in the apomict *Boecheera holboellii*. The *PHE1* cDNAs were obtained by RT-PCR from *Boecheera* anthers and carpels before and after fertilization. *PHE1* encodes a type 1 MADS box protein and promotes seed growth. Also, *PHE1* shows monoallelic expression is the only plant gene known to be paternally express and maternally silenced imprinted gene. In *Arabidopsis*, *PHE1* repress by the FERTILIZATION INDEPENDENT SEED (FIS) complex, also known as plant the Polycomb group complex 2. The FIS complex represses endosperm development in *Arabidopsis thaliana* prior to fertilization and plays an important role in regulating the development of endosperm following fertilisation. However, it is not known how apomicts have adjusted endosperm development to deal with parental genome imbalance due to non-reduction of maternal gametes. Therefore, the triploid apomictic *Boecheera* species, as a close relative of *A. thaliana*, provide an attractive opportunity to investigate *PHE1* function in pseudogamous apomicts. The 310 bp cDNA fragment of *Boecheera PHE1* transcript showed homology with *AtPHE1*. Phylogenetic analyses revealed that *Boecheera PHE1* is closely related to *A. thaliana*. The expression patterns of *PHE1* in natural apomict *Boecheera* during seed development were also revealed that the maternal *BhpHE1* allele is also expressed before fertilization in carpels.

**Key words:** Apomixis, PHERES 1, MADS-box, Endosperm problem, Imprinting



<b>İÇERİK</b>	<b>Sayfa</b>
TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ .....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI .....	iii
TEŞEKKUR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
<b>BÖLÜM 1 – GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>8</b>
<b>BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Sitolojik Çalışmalar.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.1. Sitolojik Çalışmalarda Kullanılan Fiksatif ve Boyanın Hazırlanışı.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. RNA İzolasyonu.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. cDNA Sentezi.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....</b>	<b>21</b>
<b>3.6. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6.1. Elektrofrezide Kullanılan Tamponların Hazırlanması.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi.....</b>	<b>24</b>
<b>3.8. DNA Dizi Analizi.....</b>	<b>24</b>
<b>3.9. Bioinformatik Çalışmaları (Filogenetik Analizler).....</b>	<b>24</b>
<b>BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Sitolojik Çalışmalar.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. PCR Optimizasyonu .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5. PHE1 Geninin Boecheera Anter ve Pistil Dokularından PCR İle Çoğaltımı.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6. BhPHE1 Geninin Sekans Analizleri.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7. PHE1 Geninin Biyoinformatik Analizleri.....</b>	<b>33</b>
<b>BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>I</b>
<b>Çizelgeler .....</b>	<b>VI</b>
<b>Şekiller .....</b>	<b>VII</b>
<b>Özgeçmiş .....</b>	<b>VIII</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Angiospermlerde erkek gametofit (polen), çiçeğin anter dokusunda bulunan Polen Ana Hücrelerinden (PAH) köken alır. PAH (2n) mayoz bölünme ile mikrosporları (n) oluşturur. Tek nükleusa sahip olan mikrospor asimetrik bir mitoz bölünme geçirerek vejetatif (büyük) ve generatif (küçük) nükleusları meydana getirir. Ardından generatif nükleus ikinci bir mitoz bölünme ile sperm nükleuslarını oluşturur (Mascarenhas, 1989; Bedinger, 1992). Dişi gametofit (embriyo kesesi) ise pistilde bulunan ovaryum içindeki integüment dokularından köken alan Megaspore Ana Hücrelerinden (MAH) meydana gelir. MAH (2n) mayoz bölünme ile 4 tane megaspore (n) meydana getirir. Bunlardan sadece bir tanesi embriyo kesesi olarak gelişirken diğerleri dejenerer olur. Embriyo kesesini verecek olan megaspore arka arkaya 3 mitoz bölünme geçirir ve bunun sonucunda 8 haploid nükleus meydana gelir. Bu nükleusların üç tanesi embriyo kesesinin kalazal kutbuna göç eder ve antipodal hücreleri oluşturur. Üç tanesi mikropolar kutba göç ederek yumurta ve sinerjistik hücrelerini oluşturur. Diğer ikisi ise embriyo kesesinin ortasında kalarak merkezi hücreyi (2n) meydana getirir (Robinson-Beers ve ark., 1992; Drews ve ark., 1998; Schneitz, 1999; Yadegari ve Drews, 2004).

Angiosperm türlerinin büyük çoğunluğunda tohum, polen tanesinin taşıdığı iki sperm nükleusunun (n) embriyo kesesindeki yumurta (n) ve merkezi hücreler (2n) ile birleşmesi sonucunda meydana gelir. Böylelikle sırası ile embriyo (2n) ve endosperm (3n) oluşur. Sonuçta embriyoda ebeveynler arasındaki genom oranları 1m:1p (1 maternal (ana): 1 paternal (baba) ) iken endospermde 2m:1p olur (Nowack ve ark., 2006). Çift döllenme olarak isimlendirilen bu mekanizma ilk kez birbirinden bağımsız olarak 1898'de Sergius Nawashin ve 1899'da Lion Quinard tarafından keşfedilmiştir (Dumas, 1984). Endospermde görülen 2m:1p oranı tohum gelişimi için son derece önemlidir. Bu oranın her iki yönde de bozulması embriyoların gelişimini engellemekte ve tohum kayıplarına sebep olmaktadır (Nowack ve ark., 2006).

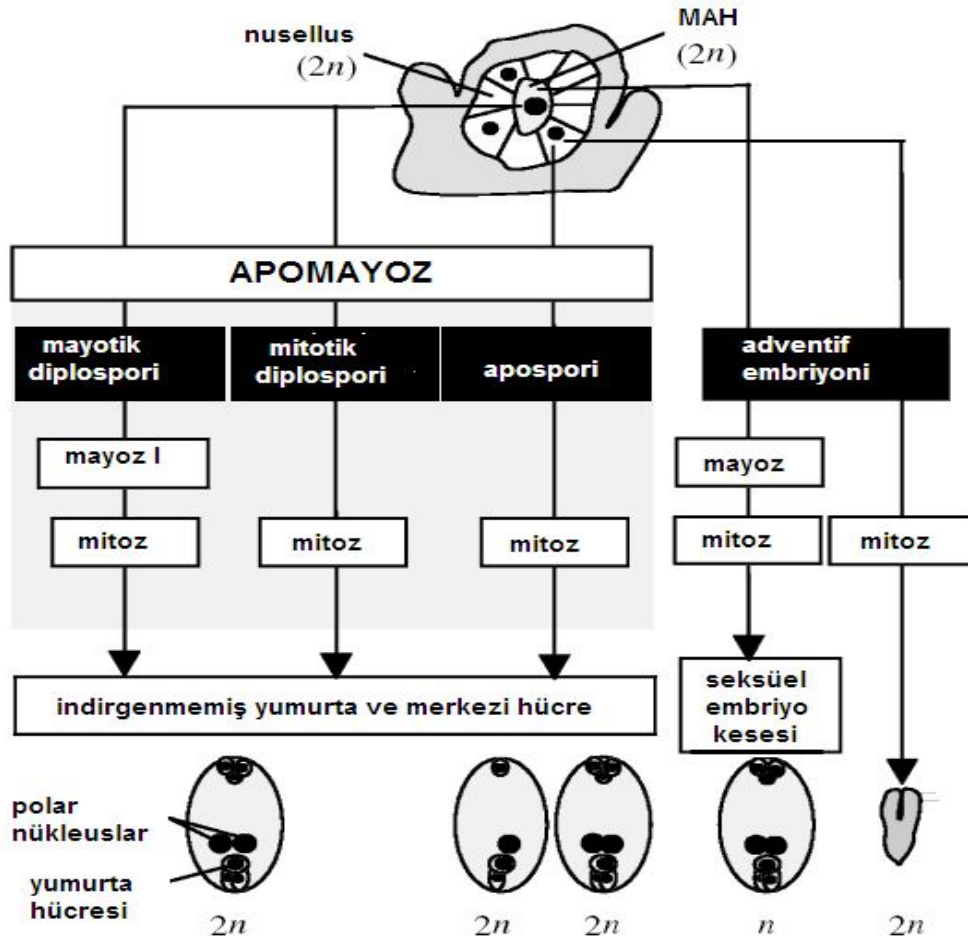
Angiospermelerin bir kısmının da ise aseksüel bir üreme şekli olan apomiksi görülmektedir. Apomiksi, ilk kez 1841 yılında J. Smith tarafından *Alchornea* (*Euphorbiaceae*) bitkisinde tanımlanmıştır (Asker ve Jerling, 1992). Günümüze kadar 400'den fazla angiosperm türü ve 40'dan fazla familyanın apomiktik olarak ürettiği bildirilmiştir (Carman, 1997). Bunlardan en yaygın olanları *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae* familyalarıdır (Luo ve ark., 1999; Koltunow ve ark., 1995).

Apomikside diğer aseksüel üreme şekillerinden farklı olarak bitki tohum oluşturabilmektedir. Buna karşın tohumlar döllenme olmaksızın meydana geldiği için oluşan yeni bireyler ana bitki ile genetik olarak özdeştir.

Bu güne kadar çalışılan apomikt bitkilerde sporofitik (adventif embriyonu) ve gametofitik apomiksi olmak üzere iki farklı mekanizma tanımlanmıştır (Asker ve Jerling, 1992; Koltunow ve ark., 1995). Sporofitik apomikside adventif embriyolar, ovül gelişiminin geç safhalarındaki olgun ovüllerin nusellar ya da integüment dokularından farklılaşırlar. Adventif embriyonu, *Citrus* türleri başta olmak üzere *Buxaceae*, *Cactaceae*, *Euphorbiceae*, *Myrtaceae* ve *Ochidaceae* familyalarında da görülmektedir (Gustafson, 1946-47). Gametofitik apomiksi ise ovül gelişiminin erken safhalarında başlar. Diplospori ve apospori olmak üzere iki tip gametofitik apomiksi tanımlanmıştır. Her iki tipte de embriyolar mayoz geçirmemiş bir megagametofitten meydana gelmesine karşın, diplosporide embriyolar MAH farklılaştığı anda meydana gelirken, aposporide MAH farklılaştıktan sonra oluşurlar (Şekil 1.1) (Koltunow, 1993; Savidan, 2000; Grimanelli, 2001).

Apomikt bitkilerde meydana gelen embriyo kesesi, mayoz bölünme olmaksızın oluştuğu için kromozom sayısı yarıya indirgenmez. Sonuçta diploid ( $2n$ ) bir yumurta hücresi ve tetraploid ( $2n+2n$ ) bir merkezi hücre içeren embriyo kesesi meydana gelir. Tohum gelişimi başladığında, yumurta hücresi döllenme olmaksızın mitotik bölünmeler geçirmeye başlar ve seksüel yollarla meydana gelen embriyoların gelişim aşamalarını geçirerek bir embriyo meydana getirir. Partenogenetik olarak gelişen bu embriyolara, polenden bir gen aktarımı söz konusu olmadığı için ana bitki ile tamamen genetik olarak özdeş tohumlar meydana gelir (Koltunow, 1993).

Endosperm ise otonom apomikt olarak bilinen bitkilerde, döllenme olmaksızın merkezi hücrelerin  $4n$  hali ile mitoz bölünmeler geçirmesi sonucunda oluşur. Buna karşın pseudogamik apomikt olarak adlandırılan bitkilerde endosperm gelişiminin başlatılması için döllenme meydana gelmesi şarttır. Bu bitkilerde merkezi hücre  $4n$  olduğu için döllenme sonucunda eğer sperm hücresi haploid ise ebeveyn genom oranları  $4m:1p$  olacaktır. Buna karşın genomlar arasındaki  $2m:1p$  oranından sapmalar tohum ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği için kayıplara sebep olmaktadır. Pseudogamik apomikt bitkiler bu endosperm probleminin çözmek için farklı mekanizmalar geliştirmişlerdir.



Şekil 1.1. Apomikt üreme mekanizmaları (Spielman ve ark., 2003'ten uyarlanmıştır).

Apomiksinin görüldüğü bazı türlerde embriyo kesesi 8 yerine 4 nükleus içerir. Böylece merkezi hücre seksüel türlerdeki gibi  $2n$  olur ve döllenme sonrasında  $2m:1p$  oranı bozulmaz. Diğer bir türde ise  $2n$  olan merkezi hücreler döllenmeden önce birleşmez. Böylece iki tane ayrı  $2n$  merkezi hücreye sahip olurlar. Bunlardan biri ya dejenere olur ya da her ikisi de bir sperm ile döllenir. Böylece döllenme sonucunda iki tane  $2m:1p$  oranı olan endosperm öncül hücresi oluşur ve oran bozulmamış olur. Üçüncü grupta ise  $4n$  merkezi hücre her iki spermle birden döllenir. Böylece  $6n$  ( $4m:2p$ ) bir endosperm oluşur ve  $2m:1p$  oranı bozulmaz (Nogler, 1984; Spielman ve ark., 2003).

Seksüel üreme ve gametofitik apomiksi arasında üç temel farklılık bulunmaktadır. (i) Seksüel üremede MAH mayoz bölünme ile kromozom sayısını yarıya indirir apomikt bitkilerde ise MAH'de mayoz bölünme normal süreçlerle devam edemez ve bu sebeple kromozom sayısı yarıya inmez (apomayoz), (ii)seksüel bitkilerde polen tanesinin taşıdığı iki spermde birisi yumurta hücresini döller ve diploid zigot gelişerek embriyoyu oluşturur. Apomikt bitkilerde ise embriyo döllenmeden partenogenetik olarak oluşur ve bu

sebeple sadece dişi ebeveyne ait genom taşır. (iii) Seksüel bitkilerde polenin diğer sperm hücresi embriyo kesesindeki diploid merkezi hücreyi döller ve bunun sonucunda triploid endosperm oluşur. Fakat apomikt endosperm ya döllenerek (6n) ya da döllenmeden (4n) meydana gelebilir (Koltunow, 1993; Koltunow ve ark., 1995).

Seksüel ve apomikt üreme mekanizmaları birbirinden son derece farklı olmasına karşın, *A. thaliana* bitkisinde görülen bazı mutant karakterlerin, apomikt tohum oluşturma mekanizmalarına benzerlik gösterdiği kaydedilmiştir. Mutant *Arabidopsis* bitkisinin ovüllerinde, merkezi hücrelerin döllenme olmaksızın diploid hali ile mitotik bölünmeler geçirdiği ve otonom bir endosperm gelişimini başlattığı bildirilmiştir. Ayrıca bu diploid endosperm gelişiminin tohum kabuğu farklılaşmasını ve otonom embriyo gelişimini de desteklediği belirtilmiştir. Buna karşın mutant tohumlarda gelişen otonom endosperm hücreleşmemektedir. Ayrıca partenogenetik embriyolar da ancak erken globüler aşamaya kadar gelişebilmektedir (Ohad ve ark., 1996; Chaudhury ve ark., 1997, 1998; Grossniklaus ve ark., 1998; Luo ve ark., 1999). Mutasyona sebep olan genler karakterize edilmiş ve *FIS* (*FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED:DÖLLENME-BAĞIMSIZ TOHUM*) genleri olarak isimlendirilmişlerdir (Ohad ve ark., 1996; Chaudhury ve ark., 1997, 1998; Grossniklaus ve ark., 1998; Luo ve ark., 1999). Bugüne kadar; *MEA* (*MEDEA/FIS1/EMBRYO DEFECTIVE 173*), *FIS2*, *FIE* (*FIS3, FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM*), *MSII* (*MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA, MEDICIS*) ve *BGA* (*BORGIA*) olmak üzere beş *FIS* geni tanımlanmıştır (Kiyosue ve ark., 1999; Ohad ve ark., 1999; Danilevskaya ve ark., 2003; Köhler ve ark., 2003a; Guitton ve ark., 2004).

*FIS* genlerinin döllenme öncesinde gösterdikler fenotipe ek olarak, döllenmiş mutant ovüllerin gelişimlerini tamamlayamadığı ve tohum kayıplarına sebep olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın yabancıl tip *FIS* alleli taşıyan ovüllerin mutant *fis* polen ile döllenmesi sonucunda oluşan heterozigot (*FIS/fis*) tohumların gelişimlerini tamamladığı ve normal bir fenotip gösterdiği bildirilmiştir (Ohad ve ark., 1996; Chaudhury ve ark., 1997, 1998; Grossniklaus ve ark., 1998; Luo ve ark., 1999). Böylece *FIS* genlerinin asıl fonksiyonlarının maternal olduğu, bu genlerin paternal olarak suskun olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *FIS* grubu genlerin genetik etiketlemeye (imprinting) maruz kaldığı bildirilmiştir (Berger, 2004).

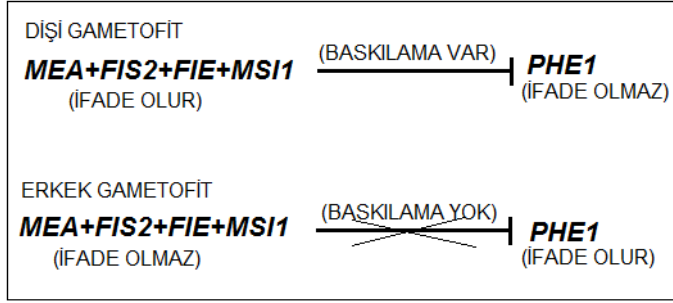
Genetik etiketleme, bazı genlerin hangi ebeveynden döllere aktarıldığına bağlı olarak ifade şeklinin belirlenmesidir. Bu durum pek çok mekanizma ile kontrol edilebilir. Bu mekanizmalardan olan DNA metilasyonunun üzerinde sıklıkla çalışılmaktadır. Metil grubu takılmış genlerin ifadesinin susturulduğu önceki çalışmalarla belirlenmiştir (Finnegan ve

ark., 1996; Genger ve ark., 1999). Özellikle embriyonik gelişim sırasında ifade olan genlerin büyük çoğunluğunun maternal kaynaklı olduğu, paternal genomun embriyo gelişiminin ilk aşamalarında suskun olduğu gösterilmiştir (Adams ve ark., 2000; Grossniklaus ve ark., 2001; Gutierrez-Marcos ve ark., 2003). *FIS* genlerinin ebeveynlere göre diferansiyel ifadesi de DNA metilasyonu ile sağlanır (Vielle-Calzada ve ark., 1999; Adams ve ark., 2000; Jullien ve ark., 2006; Baroux ve ark., 2007).

*FIS* genlerinin ve proteinlerinin moleküler karakterizasyonları sonucunda bu genlerin Polycomb group (PcG) proteinler kodladıkları bildirilmiştir. PcG proteinler memelilerde, böceklerde ve bitkilerde gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alır ve evrimsel süreçte korunmuşluk gösterirler (Tie ve ark., 2001; Chanvivattana ve ark., 2004; Guitton ve Berger, 2005; Wang ve Ma, 2007). PcG proteinler gen ifadesini düzenlemede baskılayıcı olarak rol oynarlar. Hedef genlerin metilasyon ya da histon modifikasyonları ile ifade olmasını engellerler (Jenuwein ve ark., 1998; Müller ve ark., 2002; Yeates, 2002). *FIS* proteinleri de MEA, *FIS2*, *FIE* VE *MSI1*'den oluşan dörtlü bir tetramer yapı ile hedef genlerinin ifadesini baskırlar. Oluşturdukları bu kompleks Polycomb Repressive Complex2 (PRC2) olarak adlandırılmaktadır ve bugüne kadar farklı canlı türlerinde de benzer kompleksler tanımlanmıştır. *Arabidopsis* bitkisinde otonom endosperm gelişiminin baskılanması *FIS* (PRC2) kompleksi tarafından başlatılır (Chaudhury ve ark.,1997; Grossniklaus ve Vielle-Calzada, 1998; Guitton ve ark., 2004; Köhler ve ark., 2003a; Kiyosue ve ark., 1999; Luo ve ark., 1999; Ohad ve ark., 1996, 1999; Makarevich ve ark.,2006; Wang ve ark., 2007).

*fis* mutantlarında gözlemlenen otonom endosperm gelişiminden dolayı bu PcG proteinlerin endosperm gelişimini teşvik edici genlerin maternal olarak baskılanmasında görev aldığı düşünülmüştür. *FIS* genlerinin ifadesine polende rastlanmadığı için hedef genlerin erkek gametofitte ifadesinin mümkün olduğu rapor edilmiştir. Ardından, *Arabidopsis* bitkisinde yapılan çalışmalarla *FIS* proteinlerinin hedef geni karakterize edilmiş ve *PHERES1* (*PHE1/AGL37:AGAMOUS LIKE 37*) olarak adlandırılmıştır (Köhler ve ark., 2003b, 2005). *PHE1* tip1 MADS-box genidir. Döllenme sonrasında endosperm gelişiminin başlatılmasında görev alır ve döllenme öncesinde dişi gametofitte ifade olmazken polende ifadesine rastlanmıştır (Şekil 1.2). *PHE1*, paternal olarak ifade olurken maternal olarak suskun olduğu bilinen tek bitki genidir (Makarevich ve ark., 2008). Döllenmemiş pistillerde *PHE1* geninin ifadesi *FIS* protein kompleksi ile baskılanır. *fis* mutantı bitkilerin ovüllerinde *PHE1* geninin maternal ifadesine rastlanmıştır ve böylece otonom endosperm gelişimini desteklediği ileri sürülmüştür (Köhler ve ark., 2005).

Bugüne kadar bitkilerde tanımlanan gametofitik mutasyonlardan sadece *phe1* mutasyonu paternal kaynaklıdır. Tohum kayıplarına sebep olan diğer gametofitik mutasyonların kökeni ise maternaldir. Bu durum, genetik etiketlenmeden dolayı paternal allellerin döllenmeden sonra uzun bir süre suskun kalması olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Adams ve ark., 2000; Grossniklaus ve ark., 2001; Gutierrez-Marcos ve ark., 2003).



**Şekil 1.2.** Dişi ve erkek gametofitte *PHE1* geninin ifade olma biçimleri.

Döllenme sonrasında ise *PHE1* geni paternal olarak ifade edilmekte, maternal kopyası tohum gelişiminin erken aşamalarında suskun kalmaktadır (Guttion ve Berger, 2005; Köhler ve ark., 2005). Paternal *PHE1* allelinin ifadesi polen tüpünde, mikropolar kutupta ve döllenmeden hemen sonra endospermde görülmüştür. En yüksek ifadesi ise döllenmeden dört gün sonra endospermde belirlenmiştir. Buna karşın maternal allelin ifadesi ancak döllenmeden 2 gün sonra endospermde düşük oranda görülmektedir (Makarevich ve ark., 2006, 2008).

*PHE1* geninin diferansiyel ifadesinin DNA metilasyonu ile ilgili olduğuna dair kesin kanıtlar bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarla DNA metilasyonu düşürülmüş bitkilerin polenlerinde *PHE1* ifadesinin azaldığını gösteren sonuçlar bulunmaktadır. Buna karşın bu azalma *PHE1* geninin direkt metilasyonla ilişkili olduğunu göstermemekte, *FIS* genlerinde meydana gelen ifade profilindeki değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir (Makarevich ve ark., 2008).

*A. thaliana* bitkisinde izole edilen dişi gametofit etkili diğer bir mutasyon *GLAUCE* (*GLC*) geninde meydana gelmiştir *glc* mutantlarının *mea* mutantlarında görülen otonom endosperm gelişimini baskılayarak *mea* ile epistatik etkileşimde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *GLC* geninin *PHE1*'in ifadesinin düzenlenmesinde de görev aldığı bildirilmiştir (Quy A. Ngo ve ark., 2007).

Köhler (2003) *PHE1* ile yüksek oranda homoloji gösteren (%72 amino asit benzerliği) bir gen tanımlamış ve *PHE2 (AGL38)* olarak adlandırılmıştır. Ayrıca bu genin 1. kromozom üzerinde yer aldığını ve *PHE1* e 10 kb uzakta olduğunu belirlenmiştir. Yabancıl tip tohumların gelişimi sırasında *PHE2* geninin *PHE1*'e benzer şekilde ifade olduğunu buna karşın 8 kat daha az ifade olduğunu belirtilmiştir. *PHE2* geninin de *PHE1* gibi, *FIS* mutantlarında daha erken ifade olmaya başladığı da bu çalışmada gösterilmiştir.

Bu çalışmada daha önce, seksüel yollarla tohum oluşturan *A. thaliana* bitkisinde karakterize edilen *PHE1 (AtPHE1)* geninin triploid pseudogamik apomikt *B. holboellii* bitkisindeki ortoloğu (*BhPHE1*) karakterize edilmiştir. *B. holboellii* *Brassicaceae* familyasında yer alır ve birçok moleküler genetik uygulamasının mümkün olduğu *A. thaliana* ile yakın akrabadır (Koch ve ark., 2003; Dobes 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.

Seksüel bitkilerde endosperm gelişiminde önemli bir rolü olan *PHE1* geninin apomikt bitkilerdeki fonksiyonları henüz belirlenmemiştir. Endosperm gelişimi ise normal tohum gelişimi için önemli bir kriterdir. Bu sebeple *PHE1* geninin apomikt bitkilerde, endosperm gelişimindeki fonksiyonlarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu anlamda, *PHE1* genini apomikt bitkilerde de karakterize edilmesi bu genin fonksiyonunun belirlenmesi için bir temel oluşturacaktır.



## BÖLÜM 2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Maheshwari ve ark., (1950) yılındaki makalelerinde, apomiksiyi tekrarlanan ve tekrarlanmayan apomiksi olmak üzere ikiye ayırmıştır. Tekrarlanan apomiksinin vegetatif üremeyi ve agomospermiyi kapsadığını belirtmişlerdir. Buna karşın tekrarlanmayan apomiksiyi, mayoz sonucu meydana gelen haploid embriyo kesesindeki yumurta veya diğer hücrelerin döllenme olmadan embriyo halinde gelişmesi olarak tanımlamışlardır. Fakat ikinci tipindeki gelişim mayoz bölünme içerdiği için apomiksinin içine dahil edilemeyeceğini önermişler ve gerçek apomiksi de mayoz ve singami olmaması gerektiğini belirtmişlerdir.

Rosenberg ve ark.(1970) apospori ise Eski literatürde “somatik apospori” olarak geçen apospori ilk olarak *Hieracium*'un bazı türlerinde gözlenmiştir. Aposporide, apomayotik hücre ovül içinde MAH dışındaki bir hücreden gelişir. Bu hücre genellikle MAH'ye, diata veya megaspora kalaza tarafından komşu olan somatik bir hücredir. Nadiren kalazanın daha derinlerinde, hatta iç integümentte yer alan bir hücre de olabilir. Her tohum taslağında genellikle sadece bir köken hücre oluşur. Çok hücre ortaya çıksa bile genellikle bunlardan sadece biri aposporik embriyo kesesi halinde olgunlaşır.

Köhler ve ark., 2003 yılındaki çalışmalarında, *MEA* ve *FIE* proteinlerinin *PHE1* geninin promoter bölgesi ile direkt etkileşimde olmasından dolayı bu genin *FIS* genleri tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir. Heterozigot *mea* ve *fie* mutantlarının ve yabancı tip kontrol bitkisinin transkripsiyonel profilini çıkarmışlar (mRNA profili) ve üç örnek arasındaki farklılıkları incelemişler. İzole edilen RNA'ların hiçbirinde üç bitki örneği arasında bir azalma olmamış. Fakat iki prob sinyalinde mutant bitkilerde artış gözlenmiş. Bunların tip1 MADS-box transkripsiyon faktörü ve S phase kinase-associated protein1(Skp1) olduğunu belirtmişler mitolojik bir hikayeden esinlenilerek bu genler sırasıyla PHE1 ve MEO (MEIDOS) olarak isimlendirilmiş. *PHE1* in ifade örnekleri: döllenme öncesinde dişi gametofitte ifade olmadığı döllenme sonrasında ise (1-2. günde) preglobular embriyo ve endospermde ifade olduğunu bildirmişlerdir. Embriyo globular aşamaya geldiğinde PHE ifadesi kalazal kistte sınırlı kaldığını ve kalp aşamasına kadar bu kistte ifadesi devam ettiğini bildirmişlerdir. Vegetatif ya da floral organlarda ifade gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Northern blot analizleri ile ve revers transkripsiyondan sonra real-time PCR uygulayarak *PHE1*in ifade olan örneklerini incelemişler. Yabancı tip bitkide *PHE1* ifadesi döllenmeden sonra 2-3. günde (preglobular-embriyo) başlar ve

sonraki gelişim aşamasında (3-4.gün/geç-globular aşama) azalırken fis sınıfı heterozigot mutantlarda *PHE1* ifadesi daha önce başlar (döllenmeden hemen sonra). 2-3. günde *PHE1* ifadesi mutant *mea* yabanıl tipten 3 kat fazla, *fie* den 11 kat ve *fis2* den 9 kat fazla ifade olduğu , 3-4. günde tüm örneklerde *PHE1* seviyesi azalmış fakat mutantlardaki bu azalan değer yabanıl tipteki *PHE1* ifadesini en fazla olduğu zamandakinden (2-3) yinede daha yüksek bulunmuş. Normalde döllenme öncesinde *PHE 1* ifadesi olmaması gerektiğini *PHE1* baskılanması ortadan kalkmıştır ve otonom endosperm gelişimini (3. günde) döllenme sinyaline ihtiyaç duymadan başlatmıştır. Yapılan diğer bir çalışma ise homozigot *ddm1* mutantları ile *mea* fenotipi hayatta kalması sağlanabilmesi için, metilasyon seviyesinin değişmeden *MEA* nın hedefi genlerin ifadelerinin hem yabanıl bitkideki fenotipini hemde mutant *mea* fenotipinde incelemişler ve yabanıl tipte ve mutant bitkilerde hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma için mutant *mea* ve *ddm1* homozigot bitkilerdeki *PHE1* ifadesini *mea* için homozigot mutant olan fakat *DDMI* için yabanıl tip olan bir bitkinin *PHE1* için ifade olan örnekleri ile karşılaştırmışlar. Sonuçta *ddm1* mutasyonu taşıyan bitkideki *PHE1* ifadesinin diğerine göre son derece azaldığı ve yabanıl tip ifade olan örneklerine benzediği bildirmişlerdir. Busonuçlara göre *PHE 1* geninin *mea* mutantlarındaki embryo hayatta kalmasını engellenmesinden sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Autran ve ark. (2005), Genomik etiketlenmenin epigenetik modifiye uygun bölünme döllenmeyi takiben ana bitki ve baba bitkideki genomun eşit olmayan fanksiyonladaki sonucu olduğunu bildirmişlerdir. Çiçekli bitkilerde ana ve baba bitkiye bağlı çalışmalar birçok genden sadece ana bitkiden aktarılan allelerin ifade olduğunu Arabidopsiste MADS-box geni *PHERES1* deki ifadesi boyunca tohum gelişimini düzenlenmesi polycomp grup protein *MEDEA* ile gerçekleştiğini ve annedeki *MEDEA* aktivasyonu için *DEMETER* fonksiyonu gerekli olduğunu bildirmişler. Çalışmada ebeveyne bağlı kalıtımın daha önceleri sadece anne tarafından bilindiğini fakat bu çalışmada *Oedipus* kompleksi de babadan gelen allelerinde katıldığını da belirlemişler.

Hui-Chun Li ve ark. (2005), *PIKLE(PKL)* geni çimlenme boyunca embiryonik ifadenin baskılanmasında rol alır. *PKL* rabidopsiste büyüme ve gelişiminde çok yönlü rolü olan *CHD3* kromatin remoling faktörü şifrelediği belirtmişler. Yapılan çalışmada *PKL* proteininin gelişimin düzenlenmesinde nerede ve ne zaman rol oynadığını araştırmışlar. *PKL* glucocorticoid reseptör (*PKL:GR*) kullanılarak *PKL* nin embiryonik özelliğinin ifadesinin ne zaman baskılanmasında rol oynadığını çalışmışlar. Yapılan çalışmada *PKL:GR* aktivasyonun çimlenmesi boyunca embiryonik özelliğinde mutant *pkl* nin öncül

kök fidesinin baskılanmanın yeterli olduğunu çimlenmeden sonra ise çok az aktif olduğunu belirlemişler. Gözlemlerinde MADS box tip I geni *PHE1*, yaprıl tip bitkilerde normalde embriyogenez öncesince boyunca ifade olduğunu, çimlenme sonrasında sürekli ifadesinin baskılanmasında PKL gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir. *PKL* Arabidopsiste gen ifadesinde örneklerin düzenlenmesi ve gelişimi boyunca çok yönlü önemli rol oynadığını vurgulamışlardır. *PHE1* ve *PHE2*, *PKL* ye bağlı ifadesinin sadece çimlenme sonrasında güçlü olduğunu belirtmişlerdir.

A. Ngo ve ark.(2007,) Arabidopsiste glouce döllenmeden bağımsız endosperm gelişimini de babadan gelen kalıtsal alel için gerekli iken seksüel üreyen bitkilerde hem ana bitkide hemde baba bitkiden gelen genomu gerektiğini bildirmişlerdir. Embriyo ve endosperm gelişiminden önce gelişmemiş yeni bir gametofitik ana bitkiye özgü mutant *glc*, Arabidopsis DS transpozon hattındaki populasyondan izole edilmiş ve *glc* embriyoları globular sahfa kadar geliştiğini endospermde bulunmadığını ve merkezi hücrenin döllemesinde sonra ifade olmadığını gördüğünü bildirmişlerdir. *fis* sınıfı mutant tohumlarda *glc* otonom endosperm gelişimini baskıladığını, *glc* *mea* ile epistatik etkileşimde olduğunu ileri sürmüşlerdir. ebeveynler birinde döllenmiş tohumdaki *fis* sınıfı mutantlarından *PHE1* in gelişim aşamasında ifade olduğu ve baskılanan hedef genin *MEA* 'nın öncelikli olarak ifade olması gerektiğini bildirilmiştir. Ayrıca ana bitkiye özgü *GLC*'nin görevinin embriyo ve endosperm gelişimi öncesinde ana bitkiden gelen *GLC* fonksiyonu AMP deamidaz *FAC1* geni ve ribozom protein *rp5sa* genindeki babadan gelen embriyonik ifadesi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar göstermiştir ki dişi gametofitin aktivitesinden kaynaklanan faktörlerin döllenmiş tohumdaki babadan gelen genomun altkütmesi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Makarevich ve ark. (2008) Genomik etiketlenme ya ana bitkiden ya da baba bitkiden katılan 2 gendeki alelden sadece birinin ifade edildiği bir olgu olduğunu öne sürmüşlerdir. *PHE1* geni bitkilerdeki baskılanması *PHE1* alellerin annedeki baskılanma için PcG kompleksi *FIS* deki fonksiyonu için gerekli olduğunu ve yapılan çalışmada *PHE1* in baskılama mekanizmasını araştırıldığında PcG nin susturulmasının zorunlu olduğunu fakat *PHE1* baskılanması için yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Ana bitkiden gelen *PHE1* alelinin susturulmasının *PHE1* lokusundaki downstream bölgesine uzaktan bağlı olduğunu düşünmüşlerdir. Bu bölge *PHE1* ifadesini garantilemek için metillenmesi gerektiğini ancak *PHE1* bastırılması için metillenmemesi olmaması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu mekanizma birkaç genin düzenlenmesine benzediğini memelilerde baskılanan genlerin düzenlenmesi için benzer evrimsel mekanizmaların çalıştığını ileri sürmüşlerdir.

Josefsson ve ark. (2006), Türleşme üreme bariyerine bağlı olduğu ve populasyonların birbirinden ayırımına neden olduğunu böyle bir ayrılma dozoja bağlı etkileri protein sırası kopya sayısı veya ifade değişikliğiyle sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir. Bitkilerde *Arabidopsis thaliana* and *A. Arenosa* ile yapılan çalışmalarda postzigotik bariyerinin sıklıkla gelişmemiş melezlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Interpoidi çaprazlamalarında babaya ait genomu artırdığını ve türleri kullanarak hibrit uyumsuzluğu ve gen suskunluğunu arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. Birbirine uymayan çaprazlamalar normal olarak susturulan ve heterokromatik element olan *ATHILA* baba bitkide ifade olduğunu fakat ana bitkide ifade olmadığını bildirmişlerdir. Üç polycomb düzenleyici genler olan *PHE1*, *MEO* ve *MEA* teşvik edilmiş ve *PHE1* promotörü ana bitkiden baskılanması engellenmiş ve babadan gelen *MEA* baskılanmasının kaybolduğu görülmüş. Hibrit tohumun ölümcüllüğünün oranı babadan gelen genomun dozajıyla orantılı olduğu görülmüş. Kromatin dozajına bağlı düzenlemenin türler arası hibritlerin ölümcüllüğünü etkileyen evrimsel bir olgu olduğunu sonucun varılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Köhler ve ark.(2005), Son çalışmalar *MEA-FIE* kompleksinin *PHE1* genin promotör bölgesiyle benzer olduğu ve *PHE1* ifadesinin direk kontrol ettiğini belirtmişlerdir. *MEA*'nın ana bitki ve baba bitkiden genom oranına bağlı *PHE1* ifadesini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. *PHE1*de DS transpozonlarını kullanarak *PHE1* spesifik ifadesi analiz edilmiş. *PHE1* ifadesi promotör-b-glukoridas (*PHE-GUS*) ile yeri ve zamanı belirlenmeye çalışılmış. Reporter transgeni yabancı tip tohumlarla mutant *PHE1* benzerlik gösterdiği PCR sonuçlarında DS eklenmiş bölgelerin çoğalmadığı görülmüş bu yüzden *PHE1/PHE1* çaprazlamalarında mutant anne ile yabancı tip baba arasında yapılmış sadece babadan gelen *PHE1* aleli tespit edilmiş ve yabancı tip anne ile *PHE1 /PHE1* mutant baba arasında yapılan çaprazlamada sadece anneden gelen *PHE1* aleli belirlenmiş. Bu sonuçlara göre *PHE1* genetik etiketlenmeye maruz kaldığını bildirmişlerdir. Tozlaşmadan sonra 1 ile 4 cü günler arasında anneden ve babadan gelen maksimum *PHE* transkripsiyon seviyesini ölçmüşler. Babadan gelen *PHE* ifadesi anneden gelenden daha fazla olduğunu , transkripsiyon seviyesi anneden gelen *PHE1* ifadesinin 2. Günde babadan gelen *PHE1* ifadesi anneden gelen ifadesininden 6 kat daha fazla olduğu belirlenmiş. Diğer bir çalışmada ise babada ifade olan *PHE1* ifadesinin bağımsızca ortaya çıkıp çıkmadığını araştırmışlar. *Arabidopsis thaliana* accession Columbia ile C24 arasında ki *PHE1* ifadeleri real time PCR ile incelenmiş . 1 VE 4 (DAP) olarak yapılan çalışmada anneden ve babadan gelen belirlendiği gösterilmiş. Bu yüzden spesifik alelin ifadesi genomik baskılanması genotipte etkisinin olduğu anne ve baba gametofiti incelediklerinde

transgenik bitkilerde PHE1-GUS reporter transgene sahip bitkilerde PHE 1-GUS reporter transgene sahip oldukları belirlenmiş. Döllenmeden önce transgenik bitkilerde dişi gametofitlerde gus ifadesinin bulunmadığı yabancı tipte ise güçlü olarak polen tüpünde ve zayıf olarak mikropolar tüpte bulunduğunu belirtmişlerdir. Tohum gelişimi sırasında babadan gelen allerin belirlenmediği anneden gelen kalıtsal allerin fazlaca olması babadan gelen kalıtsal allerin ifadesini baskıladığını göstermişlerdir. Önceki çalışmalarda MEA'nın baskılandığını PHE1 ifade olduğunu ,PHE1 baba ve anneden gelen aller sırasıyla yabancı tip ve mutant mea çaprazlandığında mea mutantları endosperm ve embriyoda fazla geliştiği bunun sebebinde moleküler analizlere göre MEA geni anneden geldiğinde aktif babadan geldiğinde sukun olduğudur. MEA dişi gametofitte döllenme öncesi ve döllenme sonrasında embriyo ve endospermde ifade olur. Bu sonuçlara göre PHE1 genini babadan aktarıldığında aktif olan bir gen olduğunu ve anneden aktarıldığında ise suskun olduğunu buna karşın anneden aktarılan PHE 1 geninin MEA geni tarafından baskılanmış durumda olduğunu bildirmişlerdir. anneden aktarılan mutant mea meydana gelen mutasyonların PHE1 geninin baskılanmasını ortadan kaldırdığını ve böylece döllenme sinyaline gerek duymadan tohum gelişimini başlatıldığını bildirmişlerdir. bu sonuçlar doğrultusunda PHE1 geninin genetik etiketlenmeye bağlı olarak aktarıldığını ve parental conflict teoriyi desteklediğini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Köhler ve ark. (2005) Çiçekli bitkilerde tohum gelişimi iki dişi ile iki erkek gametin birleşmesi yani yumurta hücresi ile merkezi hücrenin erkek gamet ile birleşmesiyle sırasıyla embriyo ve endosperm oluşturduğunu bildirmişlerdir.. Döllenmeden bağımsız tohum oluşumu sürecinde Polycomb group (PcG) proteini FIS ile baskılandığını ve bu protein evrimsel süreçte korunmuş bir protein içerdiğini bildirmişlerdir. FIS proteinine metilenme için histon H3 lizin 27 baskılayıcı etki için uygulanmış. Buna ek olarak FIS kompleksi döllenme öncesinde endosperm gelişimini sınırlandırdığını bildirmişler. Bu fonksiyon hedef genin anneden gelen alellin etiketlenmesini sağladığını ve endospermdeki etiketlenme sadece FIS kompleksi ile değil DNA metilasyonu ile kontrol edildiğini ileri sürmüşlerdir. PHE 1 lokusu H3lys27 tri-metilasyon işaretleyicisi ile eklendiğinde döllenme öncesinde fazla biriktiğini bu yüzden FIS kompleksi ile baskılanan PHE1 'in metilenmiş histon dişi gametofitteki ana bitkiden gelen PHE1 allelinden gelmesinin olası olduğunu belirtmişlerdir. Ana bitkiden gelen PHE1 ifadesini FIS kompleksi ile baskılanmasının hala açıklanamadığını belirtmişlerdir. PHE1 genetik etiketlenme özelliğinde olan bir gen dir fakat PHE1 transkripsiyon faktörü tohum gelişiminde ana bitkiden gelen kaynağın fonksiyonu bilinmediğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde genetik etiketlenen genlerden olan

*MEA* ve *FIS 2* ana bitkiden gelen fonksiyonlarının nasıl olduğu bilinmediğini bildirmişlerdir. Mutant *mea* ve *fis 2* endospermin aşırı gelişimine neden olduğunu bildirmişlerdir. ana bitki ve baba bitkiden gelen genomun fenotipik olarak etkisini göstermek için normal ana bitki ile mutant DNA metilasyonu bulunduran baba bitki ile çaprazlama yapmışlar küçük tohum oluştuğunu , mutant ana bitki ile normal baba bitkiyi çaprazladıklarında ise büyük tohum elde ettiklerini bu durmuda ana bitkiden gelen genomun tohum gelişiminde sınırlayıcı rolünün olduğunu bildirmişlerdir.

Makarevich ve ark. (2006) Polycomb grup (PcG) proteini epigenetiksel kalıtımın aktarılması transkripsiyonel bölgelerin baskılanmasıyla gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir. PcG' nin hareket mekanizması tamamen anlaşılmamış olmasına rağmen histon H3 lizin 27 metilasyonunun transkripsiyonel baskılanmanın PcG aracılığıyla kurulmuş olmasının önemli olduğunu bildirmişlerdir. Set-domain proteinlerinden *MEA* yada *CURLY LEAF/SWINGER H3K27* aracılığıyla hedef gen *PHE1*'in düzenlenmesi sağlandığını ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmada *MEA*'nin *PHE1* lokusuna bağlanmasında histon metilasyonunun sebep olup olmadığını test etmek amacıyla (CHIP) analizi yapılmış ve *MEA* ile *PHE1* in örtüşen dizilerin ve örtüşmeyen dizlerinde bulunduğu üzerinede 4 bölgeye( bölge 1, bölge 2 , bölge 3,bölge 4) ayrılmış. Denemeler tozlaşma öncesi ,tozlaşmış açık çiçek, sülük, tozlaşma sonrası (2-3 , 4-6 gün) olmak üzere 4 farklı parametreye göre yapılmıştır. Çalışmalar *MEA* ile *PHE1* dizlerinin örtüştüğü bölgeleriyle yapılan çalışmalar döllenme öncesi tozlaşma sonrası(2-3)' e göre yapılmış ve *PHE1* ile *MEA* nin en fazla bu zamanlarda ifade olduklarını, bu sonuçlara göre *PHE1* ile *MEA* 'nın RNA düzeyinde lokuslarının benzer olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise H3K27me3 VE H3K9me2 olmak üzere farklı histon modifikasyonlarını 2. Bölgede kullanmışlar sonuçlara göre H3K27me3 daha fazla çoğaldığını ve *PHE1* ile *MEA* daki en iyi metilasyon işaretleyicisinin olduğunu bildirmişlerdir. sporofitik dokular ile yapılan analizde *PHE1* ifadesi *CURLY LEAF:CLF* ile *SWINGER:SWN* ifadeleriyle kıyaslanması yapılmıştır. *CLF* ve *SWN* nin seçilme nedeni *MEA* ile yakın homolog olmalarından dolayı olduğunu *clf* yada *swn* mutantlarında yabancı tiptekilerine *PHE 1* ifadesinin gerçekleşmediğini *clf* *swn* çifti mutanlarında ise upregulate şeklinde ifade olduğu belirlenmiştir. *PHE1* geninde Ökromatin bölgede bulunan H3K27me3 heterokroatin bölgede bulunan H3K9me2'ye göre daha etken ve daha fazla görev aldığı bildirilmiştir. Mutant *clf* ve *swn* ile H3K27me3 birlikteliğinin *PHE1* ifadesini artırdığını, bu durumun *MEA* ile homolog olarak benzer çalıştığını ileri sürmüşlerdir.

Adams ve ark. (2000), bitkilerdeki etiketlenme mekanizmasının DNA metilasyonu ile olan ilgisini *A. thaliana* tohumlarındaki ana bitki ve baba bitkiye bağlı gen ifadesini çalışmışlar ve bu mekanizma *METHYLTRANSFERASE 1* antisense (*MET1a/s*) transgeni ile DNA metilasyonu indirgenmiş bitkiler kullanarak çaprazlamalar yapmışlar DNA metilasyonu ile olan ilgisini araştırmışlardır. Metilasyon seviyesi indirgenmiş transgenic bitkiler ve yabancı tip diploid bitkiler arasında yapılan çaprazlamalar sonucunda metilasyonlu seviyesi normal olmasına rağmen ploidi seviyeleri birbirinden farklı bitkiler arasındaki benzer tohumlar ürettiğini gözlemlemişlerdir. yabancı tip 2X bitkilerin de polen verici olarak ve *MET1a/s* transgenini içeren 2X bitkilerin dişi ebeveyn çaprazlamasının sonucunda oluşan tohumlar 2Xx4X gibi sonuçlar oluşturmuştur. Bu sonuçlar göre, bitkilerdeki baskılanma mekanizmasının DNA metilasyonu ile olan ilgisinin olduğu kanıtlanmış olduğu ve *MET1a/s* geninin bitkideki metilasyon seviyesini düşmesinin nedeninin diğer ebeveynle aktarıldığı zaman aktif olan genlerin ifadesine neden olduğu belirtilmiştir. Dişi bitki için olan genlerin endosperm gelişimin aktive ederken erkek bitki için endosperm gelişimini inhibe edici olan genlerin suskun durumda olan genler olduğu ileri sürülmüştür. parental conflict teori ile bu sonuçların uyduğu düşünülmüştür.

Vinkenoog ve Scott (2001), *A. thaliana*'da ana bitki ve baba bitkideki aktif ve suskun genlerin endosperm gelişimi üzerindeki etkilerini ve seksüel olarak üreyen bitkilerde anadan ve babadan gelen genom oranını apomiktik olarak üreyen bitkilerin bu süreci nasıl çözümlediklerini araştırmışlardır. Endosperm gelişiminde ana bitkiden(2 maternal), babadan(1 paternal) 2m:1p oranı Seksüel bitkilerde gelişim için anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu orandaki değişimler anormalliklerin oluşmasına neden olduğunu ve süreç sonucunda babadan aktarılan genlerin endosperm gelişimini aktifleştirirken anneden aktarıldığında baskılandığını ve apomiktik bitkilerde ise annede suskun olan, polen ile aktarıldığında ifade olan genlerin endosperm için uyarılması için anneden gelen genoma gerekli olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak endosperm gelişim sürecinde babadan aktarılan genoma gerek duyulmadığını bildirmişlerdir.

Rod ve ark.(1998), *A. thaliana*'da etiketlenmenin tohum gelişimindeki etkilerini ve interploidi çaprazlamaları sonucu üretilen tohumlardaki gelişim sürecini incelemişlerdir. Etiketlemenin parental conflict teori ile ilgili olduğunu ve ana ve baba bitki arasındaki gen aktarımında bir rekabet olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda 2X, 4X ve 6X bitkiler kullanılmıştır. Normal ploidi 2Xx2X çaprazlanma sonucunda embriyonun genom oranı 1m:1p iken endospermde 2m:1p şeklindedir. Bu oran 4Xx4X ve 6Xx6X çaprazlamalarında da benzer sonucu sergilediğini 2Xx4X interploidi çaprazlamalarında 3X

(1m:2p) embriyoları oluşur ve 4Xx4X göre daha az genom içermesine rağmen oluşan embriyoların daha büyük olduğunu, bunun aksine 2Xx2X çaprazlamalarına göre daha fazla genoma sahip olması rağmen 2X embriyolarından daha küçük olduğunu göstermişlerdir. 2X ve 6X ile yapılan çaprazlamalarda ise benzer durumların olduğu ancak gelişimini tamamlayamamış tohumlara neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçları anne bitkiden fazladan genomun aktarılması endosperm gelişimini engellediği , geç hücreleşmeye neden olduğunu ve tohum ile embriyonun daha küçük olmasına sebep olduğunu, aksi durumda ise endospermin iyi geliştiğini, geç hücreleşme olduğunu ve tohum ile embriyonu daha büyük olmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Tohum gelişiminde anne ve babadan gelen genom oranındaki dengenin ploidi seviyesinden daha önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Luo ve ark. (2000), Çalışmada *FIS* sınıfı genlerin hangi dokuda, nerede ve ne zaman ve ifade olduğunu belirleyebilmek için *FIS* sınıfı genlerin promoter bölgeleri ile  $\beta$ -*glucuronidase* (*GUS*) ile birleştirilmiştir. *FIS2* geni, döllenmeden önce polar nükleuslarda ifade olduğunu döllenmeden sonra ise *FIS2* endosperm oluşum sürecinde ve endosperm nükleusunda yer aldığını bildirmişlerdir. *FIE* ifadesini döllenme öncesinde embriyo kesesinde ve antesisten önce polen mikrosporunda olduğunu fakat olgun polende ifade edilmediğini bildirmişlerdir. *MEA* ifadesinin nükleusların etrafındaki bölgede daha çok yayılmış olduğunu bildirmişlerdir ayrıca *FIS2*'ye benzer bölgelerde ifade olduğunu bildirmişlerdir. Polenle aktarılan *MEA* allelinin döllenmeden sonra 48. saate kadar ifade olmadığını 48. saatten sonra *MEA* aktivitesinin kalazal kistte ve bazende embriyoda olduğunu bildirmişlerdir.

Vielle-Calzada ve ark. (1999), *A. thaliana*'da *MEA* geninin sadece ana bitki ile aktarıldığında aktif protein kodladığını ve polenle aktarılanda ise genin embriyo ve endospermde protein oluşumunda olarak suskun olduğunu, bu baskılanmada DNA metilasyonunun nedenini ve bu denemelerde *MEA* genin genetik etiketlenme ile ifade olduğunu göstermek için *Deficient in DNA Methylation 1 (DDMI)* geninde mutasyon taşıyan *Arabidopsis* ile çaprazlamalar yapmışlardır. *DDMI* geni *Arabidopsis*' de DNA metilasyonunun sürekliliği için önemli bir gen olduğunu bildirmişlerdir. Mutant *ddm1* yabanıl tip bitkiler pollen verici olarak kullanılmışlar ve mutant *mea* bitkileri ile çaprazlanmaları sonucunda tohumların mutant *mea* fenotipi göstermediğini ve neredeyse tamamının gelişimlerini tamamladığını bildirmişlerdir. Böylece mutant *mea* genini ana bitkiden alan embriyoların, polendeki *MEA* allelinin reaktivasyonu ile hayatta kalmış



olabileceğini bildirmişlerdir. Bu durumun *MEA*'nın genetik etiketlenme maruz kaldığını ve polendeki suskunluğun DNA metilasyonu ile olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Grossniklaus ve ark. (1998), *MEA* genini *Arabidopsis thaliana*'dan izole ederek ana ve baba bitkiden gelen *MEA*'nın tohum gelişiminde dozaja bağlı etkisini araştırmışlardır. Mutant *mea* döllenme öncesinde diploid otonom endosperm gelişimine neden olduğunu, *MEA/mea* heterozigot mutant bitkilerin döllendikleri zaman %50 normal ve %50 aşırı büyümüş özellikteki embriyoların oluştuğunu ve bu farklılığının tohumların antosiyanın biriktirmeleri, torpedo aşamasına oluşmadan kaybedilmelerinin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mutantlardaki embriyo hücre bölünmesi artmasına rağmen endosperm gelişiminin yabancı tip bitkilere göre daha yavaş olduğunu bu durumun *mea*'nın embriyogenesis oluşumunda hücre çoğalmasının kontrolünün ve morfogenezin ilerlemesinde görev alabileceğini ileri sürmüşlerdir. Mutant genin sadece dişi ebeveyn aracılığı ile döllere aktarıldığı zaman anormal fenotipe sebep olduğunu polenle aktarımında ise tohum gelişimini etkilemediği bildirmişlerdir. çalışmada *MEA* geni ile *Drosophila*'nın *Enhancer of zeste* [*E(z)*] geni ile benzer olduğu bildirilmiştir.

Kohler ve ark. (2003). Polycomp grup proteinleri *MEA*, *FIE* ve *FIS2* embriyo ve endosperm gelişimini kontrol ederek Arabidopsiste tohum gelişimini düzenlemektedir. *FIS* sınıfı proteinlerinin üçü de (*MEA*, *FIE*, *FIS2*) daha önce bilinmeyen hedef genleri epigenetik olarak düzenleyen bir multi protein PcG kompleksinin alt üyeleridir. Mads box geni *PHE1* genellikle *FIS* sınıfı mutantlarda genlerin düzenleyicisi olduğu gösterdiğini bildirmişlerdir. Mads box tip 1 e ait olan *PHE1* evrimsel atası henüz hiçbir bitkide fonksiyonu belirlenmemiştir ve hem *mea* mutantlarında hemde *fie* mutantlarında *PHE1* promotör bölgesiyle ilişkilidir. *PHE1* ifadesi epigenetiksel düzenlenmesi PcG proteinleri ile sağlanır. *PHE1* hem embriyoda hemde endospermde döllenmeden sonra geçici ifade olur. *PHE1* de ifade düzeyinde azalması mutant *mea* tohumlarında gelişmemiş *mea* tohumlarını baskılayabilmekte ve böylece tohum gelişiminin baskılanmasında *PHE1* anahtar rol oynamaktadır. *PHE1* ifadesi mutant *medea* hattında yabancı tip örneklerin ifadesine benzemektedir. Çalışmada mutant *mea* gelişmemiş tohumu mads box *PHE1* geninin ifadesine bağlıdır. *PHE1* geni babadan aktarıldığında aktif olan bir gen iken anneden aktarıldığında ise suskun olduğunu buna karşın anneden aktarılan *PHE1* geninin *MEA* geni tarafından baskılanmış durumdadır. Chanvittana ve ark.(2004), *A. thaliana*'da *FIS* kompleksinde bulunan dört PcG protein (*MSI1*, *FIE*, *MEA*, *FIS2*) *Drosophila* PRC2 bileşeni proteinler gibi bir araya gelerek, tanımlanmamış başka proteinlerle etkileşebilmekte ve *PHE1* geninin ifade durumunu düzenlemektedir.

Grossniklaus ve ark. (2001), *fis* sınıfı mutantlarında ana bitki ve baba bitkiden gelen genomun tohum gelişiminde genetik *fis* sınıfı mutantların ortak iki fenotipik sonuçlarından birincisi döllenme olmadan endosperm gelişimini hücre çoğalmasını düzenlemesini kendi yapması, ikicisi ise döllenme sonrasında embriyonun gelişmemesi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Ohad ve ark. (1996), *A. thaliana*'da *FIE* geninin ana ve baba bitkideki genomun etkisini çalışmışlar. Mutant *FIE/fie* ve yabancı tip *FIE/FIE* bitkiler resiprokal olarak çaprazlanmıştır. *FIE/fie* dişi ebeveyn ve *FIE/FIE* erkek ebeveyn olarak kullanıldığında, bir sülükteki tohumların %50'sinin gelişimlerini tamamlayamadıklarını bildirmişlerdir. bunun nedenini ise *fie* mutasyonunun dişi gametofit ektili bir mutasyon olduğunu ve polenle aktarılabildiğini belirtmişlerdir.

Ohad ve ark.(1999), *A. thaliana*'da döllenme sonrasındaki yabancı tipte *FIE* geninin fonksiyonunu, embriyodaki hücre çoğalmasının ve morfogenezin pozitif düzenlenmeden sorumlu olduğunu önermişlerdir. Bu genin homeotic genlerin baskılamada görev alan PcG proteinlere homolog bir protein kodladığını ve *Drosophila* (*Esc*) ve memelilerdeki (*Eed*) WD motifi içerdiğini bildirmişlerdir. Dişi gametofitte *fie* mutasyon meydana geldiğinde merkezi hücrenin döllenmeden replike olduğunu ve böylece otonom endosperm gelişimi başlattığını belirtmişlerdir.

A Daniel Schubert ve ark. (2003), *Arabidopsis polycomp* grup geni *MEA* gelişim öncesinde ve tohumlarda hücre çoğalmasında genetik etiketlenmeye maruz kaldığını bildirmişlerdir. bitkilerdeki genetik etiketlenmenin polycomb grup proteinlerinin açıklanmasında önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. *DME* merkezi hücrede ifade olduğu *MEA*'nın merkezi hücredeki ve endospermdeki ifadesi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. yapılan çalışmalarda *dme* mutantlarında *FIS* genlerinden sadece *MEA* mRNA'sının ifade olmadığını bunun aksine *mea* mutantlarında ise *DME*'nin ifadesini etkilemediğini bu sonuçlar doğrultusunda *DME*'nin *MEA*'nın ifadesi için gerekli olduğunu *MEA*'nın *DME* ifadesini etkilemediği belirtilmiş. *DME*'nin karpelde ifade olduğunu ve anterde ifade olmadığını belirtmişlerdir.

*FIE* geni endospermde pozitif ve negatif düzenleyici olmak üzere iki önemli fonksiyonu vardır pozitif düzenleyici de *FIE* geninde meydana gelen mutasyon nedeniyle döllenmeye gerek kalmadan ifade olabilmektedir ve bu süreç polar nükleuslar sperm nükleusu ile döllenmeden replikasyon olmasıyla otonom edosperm gelişimini gerçekleştirebilmektedir. Negatif düzenleyici de ise polar nükleusların döllenme sürecine kadar baskılanmasıyla endospermin gelişimini engellemiş olur.

### BÖLÜM 3 MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışmada bitki materyali olarak, *Brassicaceae* familyasına ait triploid apomikt *Boechera holboellii* türü kullanılmıştır (Şekil 3.1.a,b). Bitkilere ait tohumlar Prof. Dr. Rod J. Scott (Bath Üniversitesi, İngiltere)'dan temin edilmiştir ve Schranz ve diğ. (2005) tarafından önerilen yönteme göre yetiştirilmiştir.

Tohumlar nemli filtre kağıdı içeren petri kaplarında +4°C'de karanlıkta 21 gün vernalize edilmiştir. Ardından tohumların çimlenmesi için petriler 21°C sıcaklıktaki, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabine alınmıştır. Çimlenen fideler, 121°C'de 20 dk. sürede otoklavlanmış torf:perlit (4:1) içeren viyollere şaşırtılmış ve 21°C sıcaklıktaki, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabinde 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 kabinde 6 hafta süre ile ikinci kez vernalize edilmiştir. Vernalizasyonun bitiminde bitkiler tekrar 21°C sıcaklıktaki, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabinde yetiştirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan *B. holboellii* bitkisi. a; *B. holboellii* çiçeklenme öncesi saksıdaki görüntüsü, b; *B. holboellii* çiçek yapısı.

### 3.2. Sitolojik Çalışmalar

Çalışmanın bu kısmında, *B. holboellii* bitkisinde anter ve pistillerin gelişim aşamaları sitolojik olarak incelenmiştir.

Anterlerde PAH'lerin gelişim aşamalarını incelemek için bütün bir çiçek durumu kesilmiş ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne alınmıştır. Örneklerin üzerine FAA (Formaldehit:Asetikasit:Alkol/ 3:1:7) fiksatif eklenmiş ve örneğin tamamının fiksatif ile kaplanmasına dikkat edilmiştir. Ardından tüpler +4°C'de karanlıkta 48 saat inkübe edilmiştir. Süre bitiminde örnekler fiksatiften bir pens yardımı ile alınmış ve %70'lik etanol bulunan eppendorf tüplerinde +4°C'de kullanılabilecek kadar saklanmıştır.

Anterlerin boyutlarına göre PAH'lerin gelişim evrelerini belirlemek için fiske edilmiş olan tomurcuklar bir lam üzerine alınmıştır. Stereo mikroskop (Olympus SZ51) altında anterler diğer çiçek kısımlarından uzaklaştırılmış ve mikrometrik oküler ile boyutları ölçülmüştür. Aynı boyuttaki anterlerin içerikleri diseksiyon iğnesi yardımı ile çıkarılmıştır. Kalan anter parçaları uzaklaştırıldıktan sonra lama 50 µl karmin boyası eklenmiş ve lamel kapatılarak mikroskopta (Olympus CX31) 100X objektifte incelenmiştir. Elde edilen görüntüler fotoğraflanmış (Olympus C-5060) ve anter boyutuna göre PAH'lerin gelişim safhaları belirlenmiştir. Bu işlemler farklı boylardaki anterler için tekrar edilmiştir.

Pistil gelişimini incelemek için farklı boyutlardaki taze çiçek tomurcukları stereo mikroskop altında açılmış ve pistiller diğer çiçek parçalarından ayrılmıştır. Pistillerin boyutları mikrometrik oküler ile ölçülmüş ve fotoğraflanmıştır. Böylece döllenmenin meydana geldiği pistil boyutu belirlenmiştir.

#### 3.2.1. Sitolojik Çalışmalarda Kullanılan Fiksatif ve Boyanın Hazırlanışı

**FAA Fiksatif:** 30 ml %40'lık formaldehit, 70 ml %70'lik etanol ve 10 ml %98'lik asetik asit karıştırılmıştır. Fiksatif karanlıkta +4°C'de saklanmıştır.

**Karmin Boyası:** 45 ml asetik asit ve 55 ml dH<sub>2</sub>O karıştırılmış ve manyetik karıştırıcı ısıtıcıda 90°C'ye kadar ısıtılmıştır. İçerisine 1 g toz karmin atılmıştır ve ısıtılarak

kariştirilmiştir. 30 dakika ısıtıldıktan sonra 12 saat oda sıcaklığında dinlendirilmiştir. Süre sonunda boya filtre kağıdından süzölmüş ve +4°C’de karanlıkta saklanmıştır.

### **3.3. RNA İzolasyonu**

Çalışmada RNA izolasyonu, anter ve karpel dokularından yapılmıştır. Öncelikle mix çiçek dokuları steril bir bistüri ile kesilmiş ve eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerine alınmıştır. RNA degradasyonunu önlemek için tüplere *RNAlater* (Cat#7020) eklenmiş ve tüm dokuların *RNAlater* ile kaplanmasına dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler bir gece +4°C’de bekletilmiş ve ardından diseksiyona geçilmiştir. Uzun süreli saklama için örnekler -86°C’de depolanmıştır.

Anter ve karpel diseksiyonu için çiçek dokuları alkol ile steril edilmiş lam üzerine alınıp tomurcuklar tek tek ayrılmıştır. Anterler tomurcuklardan stereo mikroskop altında *RNAlater* solüsyonu içerisinde steril iğnelerle disekte edilmiştir. Diğer çiçek parçaları uzaklaştırıldıktan sonra anterlerin boyları mikrometrik oküler kullanılarak ölçölmüştür. Anterler sitolojik çalışmalar ile belirlenen boyutlara göre üç gruba (mayoz öncesi, mayoz ve mayoz sonrası) ayrılmış ve *RNAlater* içeren eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerinde izolasyona kadar muhafaza edilmiştir. İzolasyon için her boyuttan 180 adet anter toplanmıştır. Çalışmada kullanılan pistil dokuları da aynı yöntem ile disekte edilip boyutlarına göre iki gruba (döllenme öncesi ve döllenme sonrası) ayrılmış ve *RNAlater* içinde izolasyona kadar muhafaza edilmiştir.

RNA izolasyonundan önce, tüplerdeki *RNAlater* mikropipet ile uzaklaştırılmış ve tüpler dokuların donması için sıvı azotta bekletilmiştir. Ardından eppendorf tüpleri için kullanılan RNaz-DNaz free havan eli (USA scientific / 1415-5390) ile anter ve pistil dokuları toz haline gelene kadar ezilmiştir. Daha sonra Total RNA Mini Kit (Favorgen – FABRK 001-1) kullanılarak dokulardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonun ardından RNA’ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

### **3.4. cDNA Sentezi**

Çalışmada, cDNA sentezi Omniscript Reverse Transcription kit (Qiagen 205113) ile yapılmıştır. Reaksiyon kurulurken filtreli pipet uçları (RNase-DNase-free) ve ince cidarlı (200 µl) PCR tüpleri kullanılmıştır. Çizelge 3.1’de verilen oranlara göre cDNA reaksiyonu kurulmuştur. Kontaminasyon olmadığını göstermek için kalıp içermeyen bir negatif

kontrol reaksiyonu da eklenmiştir. Tüpler reaksiyonun gerçekleşmesi için 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.

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

Bileşen	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X Qiagen RT buffer	2	1X
5 mM dNTP mix	2	0,5 mM
10 µM Oligo-dT primer	2	1 µM
10 unit/µl RNase inhibitor	1	0,5 unit
Omniscript Reverse Transcriptase	1	0,2 unit
RNase-free water	9	
Kalıp RNA	3	0,1 µg
Toplam	20 µl	

### 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

*PHE1* geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler, Primer3 (Baren 2004) programı kullanılarak *A.thaliana PHE1 (AtPHE1)* geni referans alınarak dizayn edilmiştir. Bu primerlerden, 815 bp’lik bir DNA bandı beklenmiştir. PCR, Proofreading aktivitesine sahip High Fidelity PCR Enzyme Mix (#Fermentas K0191) ile kurulmuştur. Reaksiyon kurulurken tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir ve filtrelili pipet uçları (RNase-DNase-free), ince cidarlı (200µl) PCR tüpleri kullanılmıştır. *PHE1* geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmeden önce PCR koşulları (TM ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu) optimize edilmiştir. Optimizasyon için Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.4’te verilen parametreler kullanılmıştır. Çizelgedekilerden farklı olarak primerlerin bağlanma sıcaklığı 63-57°C olarak ayarlanmış ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 1, 1,5, 2, 2,5 mM oranlarında kullanılmıştır. Ayrıca kalıp olarak kullanılan cDNA’ların kalitesini kontrol etmek amacı ile bitkinin tüm dokularında sürekli ifade olduğu bilinen *ACTIN2* genine ait primerler ile bir reaksiyon kurulmuştur ve bu primerlerden 270 bp’lik DNA bandı beklenmiştir. *ACTIN2* geni için kurulan reaksiyonda Çizelge 3.2’de verilen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu kontrol reaksiyonu kurulduktan sonra Çizelge 3.5’te verilen PCR programı uygulanmıştır. Optimizasyon sağlandıktan sonra *PHE1* geninin çoğaltımına geçilmiştir. *PHE1* 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 Çizelge 3.3'te verilmiştir. Reaksiyon kurulduktan sonra Çizelge 3.4'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	2 mM
10mM dNTP mix	0,5	0,2 mM
10pmol/µl reverse primer	1	0,4 pmol
10pmol/µl forward primer	1	0,4 pmol
KalıpcDNA	2,5	
Nuclease-freewater	15,25	
High Fidelity PCR Enzyme Mix	0,25	2,5 unit
Toplam hacim	25µl	

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

Primer	Baz dizilişi
<i>PHE1</i> forward	5'GGGGGAAGATGAAGTTATCG'3'
<i>PHE1</i> reverse	5'AGGAGCACAAACATCAGTGG3'
<i>ACTIN2</i> forward	5'TGGTGAAGGCTGGATTTGC 3'
<i>ACTIN2</i> reverse	5'TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC3'

**Çizelge 3.4.** *PHE1* için kullanılan optimum PCR programı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94	3	1
Denatürasyon	95	1	
Primerlerin Bağlanması	62	1	36
Uzama	72	1	
Final Uzama	72	10	1

**Çizelge 3.5.** *ACTIN2* için kullanılan PCR programı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94	3 dk	1
Denatürasyon	95	1 dk	
Primerlerin Bağlanması	56	1 dk.	36
Uzama	72	30 sn.	
Final Uzama	72	10	1

### 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır. 0,5 g agaroz (sigma A5093) 50ml 1XTAE tampon içinde 120°C'de eritilmiş ve 55°C'ye ulaşıncaya 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 tepsisine dökülmüştür. 30 dakika jelin katılaşması beklenmiştir. Daha sonra tarak çıkartılmış ve jel 1XTAE tampon bulunan elektroforez 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. Elektroforezde kullanılan markerin haritası Şekil 3.2'de verilmiştir. Jel 6,5V/cm'de 80 dakika yürütülmüştür. Ayrıışan PCR ürünlerinin resimleri ultra violet transilluminator (UV) tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

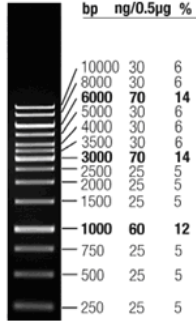
#### 3.6.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması

**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 3.2. 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 izolasyon kiti (Promega wizard SV Gel and PCR Clean-up, A9281) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yönteme göre DNA bantları jelden izole edilmiştir. İzole edilen DNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve yoğunlukları Gelpro3 programı (<http://helpdesk.agri.huji.ac.il/news/gppage.htm>) ile belirlenmiştir.

### 3.8. DNA Dizi Analizi

Jelden saflaştırılan DNA'ların dizi analizleri için MacroGen firmasından hizmet alımı yapılmıştır ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### 3.9. Bioinformatik Çalışmaları (Filogenetik Analizler)

Filogenetik analizler, için *Boechea* PHE1 proteininin amino asit sekansı homologları Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program ile elde edilmiştir (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ayrıca daha önce *A. thaliana* bitkisinde tanımlanmış olan tip I MADS-box genler kullanılmıştır. Filogenetik analizler PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) kullanılarak yapılmıştır. Sekans verilerinin filogenetik analizlerinin değerlendirilmesi ve birbirleri ile olan benzerliklerinin yorumlanması, 1000 değerlendirmesine göre yapılmış ve bunun için SEQBOOT programı kullanılmıştır.

Ağaçları yapmak için PRODIST ve NEIGHBOUR ile hesaplanan mesafe matrisi kullanılmıştır. Dizilerin birbirleri olan yakınlıkları CONSENSUS programı ile oluşturulmuştur ve ağaçlar DRAWTREE programı ile çizilmiştir. Motif incelemeleri The Conserved Domain Server ile araştırılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) ve protein sekansları ClustalW ile varsayılan parametreler kullanılarak sıralanmıştır (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>). Korunmuş bölgeyi içeren MADS domaininin sonuçlanmış sıraları ağaç yapmak için kullanılmıştır.

**BÖLÜM 4****ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi**

Çalışmada kullanılan bitki materyali Schranz ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntemle göre yetiştirilmiştir. Tohumlar, ilk vernalizasyonun ardından iklim kabine alınmış ve 2 gün içerisinde çimlenme başlamıştır. Çimlenen tohumlar 5 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.

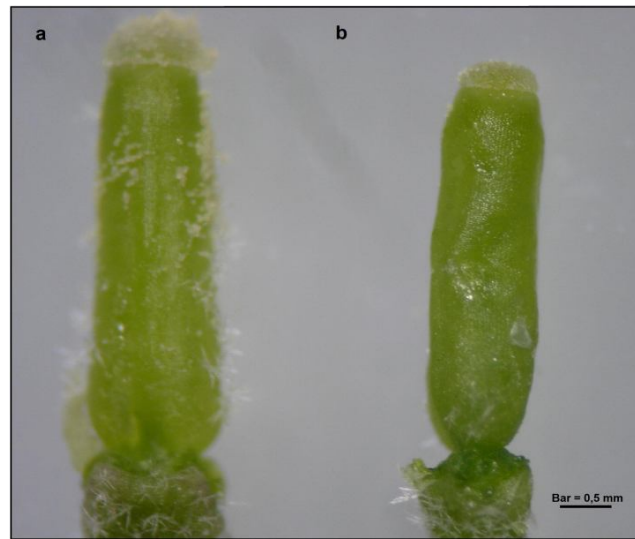
**4.2. Sitolojik Çalışmalar**

Anter boylarına göre PAH'lerin gelişim aşamalarını belirlemek için çiçek örnekleri FAA fiksantifi ile muamele edilmiş ve takibinde anterler sterio mikroskop altında boyutları ölçüldükten sonra disekte edilmiştir. Ardından karmin ile boyanarak preparat haline getirilen örnekler mikroskopta 100X objektifte fotoğraflanmıştır. İncelemeler sonucunda PAH'lerin gelişiminde üç farklı aşama görülmüştür. Anterler 0,5 mm'den daha küçük olduğu zaman PAH henüz gözlenememiştir. Anter boyutu 0,5 mm ve 0,65 mm arasında iken sıklıkla monad gözlenmiştir (Şekil 4.1. a ve d). Anter büyüklüğü 0,65 mm ve 0,85 mm arasında olduğu zaman ise diad oluşumu görülmüştür (Şekil 4.1. b ve e). Polen oluşumu ise ancak anterler 0,85 mm'den büyük olduğunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.1. c ve f). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, anterler 0,5 mm ve 0,85 mm arasındaki büyüklüklerde iken mayoz bölünmenin gerçekleştiği belirlenmiştir.

Pistillerin döllenme aşamalarını belirlemek için taze çiçek tomurcukları kullanılmıştır. Farklı boyutlardaki tomurcuklar sterio mikroskop altında açılmış ve boyutları mikrometrik oküler ile ölçülmüştür. Yapılan incelemeler sonucunda pistillerin yaklaşık olarak 2,3 mm iken döllendikleri görülmüştür (Şekil 4.2. a ve b).



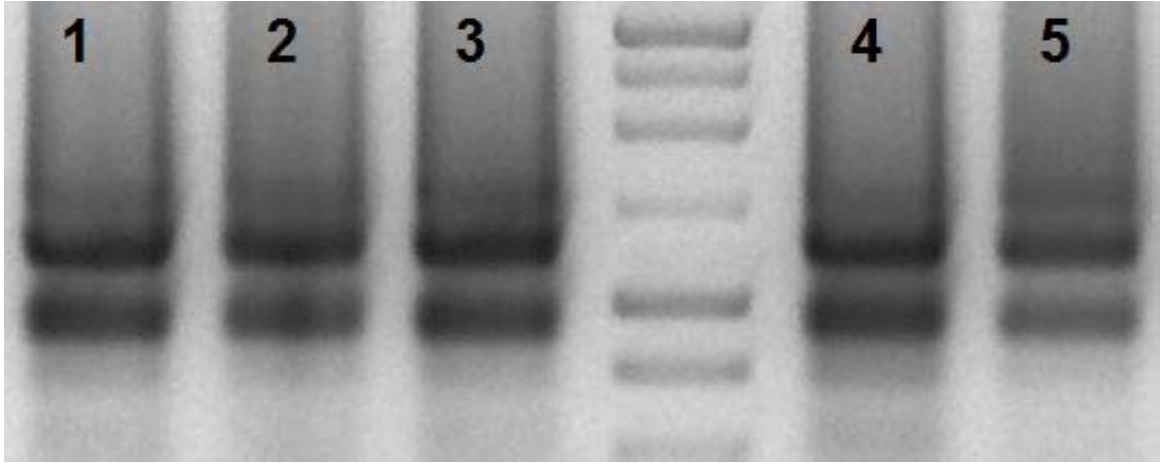
**Şekil 4.1.** Anter boyutlarına göre PAH gelişimi. a; Monad, b; Diad, c; Olgun polen, d; Monad içeren anter (0,60 mm), e; Diad içeren anter (0,75 mm), f; Olgun polen içeren anter (0,88 mm). Bar (a,b,c): 5 µm.



**Şekil 4.2.** Pistil gelişimi. a; Döllenmiş genç baklalar, b; Döllenmemiş pistil. Bar: 0,5 mm.

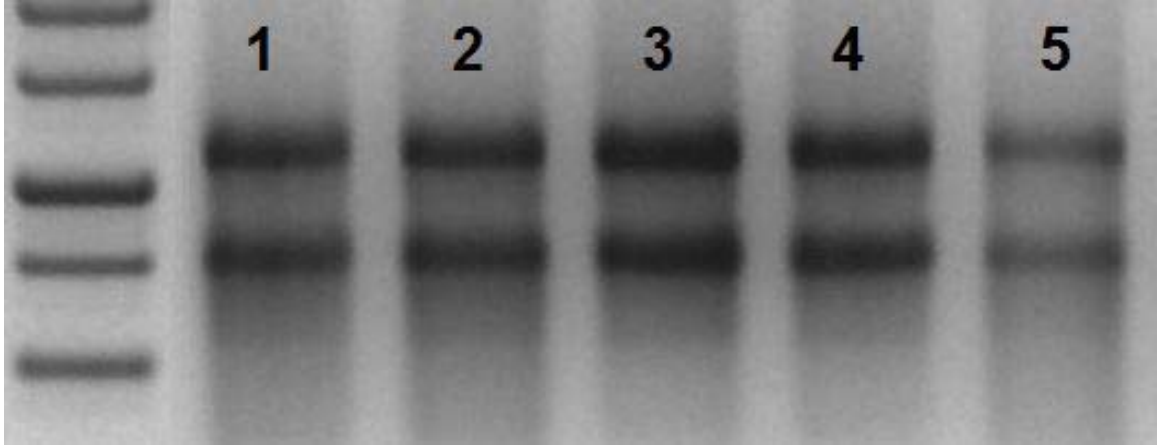
### 4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Sitolojik çalışmalarla gelişim aşamaları belirlenen anter ve pistil boyutları referans alınarak, çiçek dokuları disekte edilmiştir. Dokular izolasyona geçilene kadar RNA degradasyonunu önlemek için *RNAlater* içinde saklanmıştır. RNA izolasyonu için mayoz öncesi, mayoz ve mayoz sonrası olmak üzere üç farklı boyda anter (0,5 mm'den küçük, 0,5-0,85mm ve 0,85mm'den büyük) ve iki farklı boyda (döllenme sonrası ve döllenme öncesi) pistil (2,3mm'den büyük ve 2,3mm'den küçük) disekte edilmiştir. Bu dokulardan total RNA izole edilmiş ve RNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.3). Jel görüntüleri sonucunda izole edilen RNA'ların cDNA sentezi için uygun olduğu belirlenmiştir.

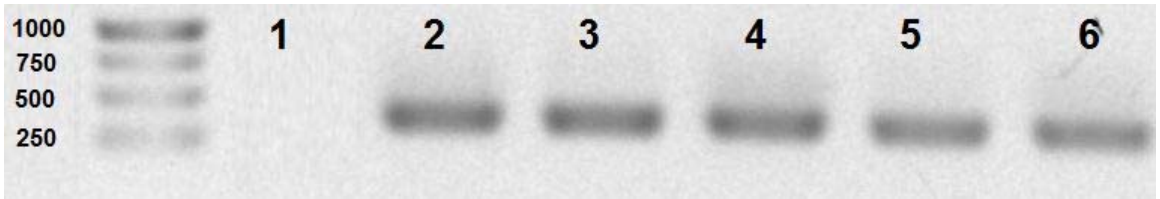


**Şekil 4.3.** Total RNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Hat1;0,5mm'den küçük anter, Hat2;0,5mm-0,85mm arası anter, Hat3;0,85mm'den büyük anter, Hat4; 2,3mm'den büyük (döllenme sonrası) pistil, Hat5;2,3mm'den küçük (döllenme öncesi) pistil (Her kuyucuğa 3 µl örnek yüklenmiştir).

İzole edilen total RNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve oligodT primerleri ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezin başarısı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.4). Ayrıca *PHE1* geninin çoğaltımında kullanılacak olan tüm cDNA'ların kalitesi *ACTIN2* geni primerleri ile test edilmiştir. Bu reaksiyondan 270 bp'lik PCR ürünü beklenmiştir. *ACTIN2* primerleri ile kurulan PCR'ın ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır (Şekil 4.5). Elde edilen sonuçlara göre tüm cDNA'ların PCR için kalıp olarak kullanılabilir kalitede olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.4.** cDNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüleri. Hat1;0,5mm'den küçük anter, Hat2;0,5mm-0,85mm arası anter, Hat3;0,85mm'den büyük anter, Hat4; 2,3mm'den büyük (döllenme sonrası) genç bakla, Hat5;2,3mm'den küçük (döllenme öncesi) pistil (Her kuyucuğa 3 µl örnek yüklenmiştir).

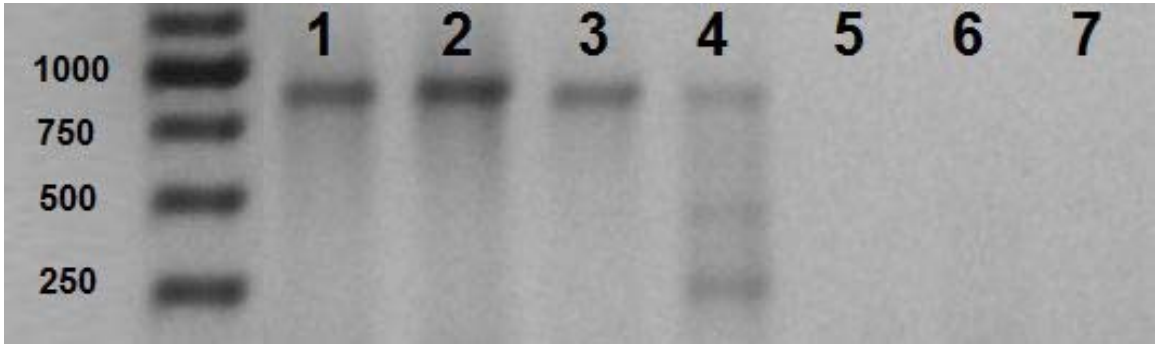


**Şekil 4.5.** *ACTIN2* primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Hat1; negatif kontrol, Hat2;0,5mm'den küçük anter, Hat3;0,5mm-0,85mm arası anter, Hat4;0,85mm'den büyük anter, Hat5; 2,3mm'den büyük (döllenme sonrası) genç bakla, Hat6;2,3mm'den küçük (döllenme öncesi) pistil (Her kuyucuğa 3 µl örnek yüklenmiştir).

#### 4.4. PCR Optimizasyonu

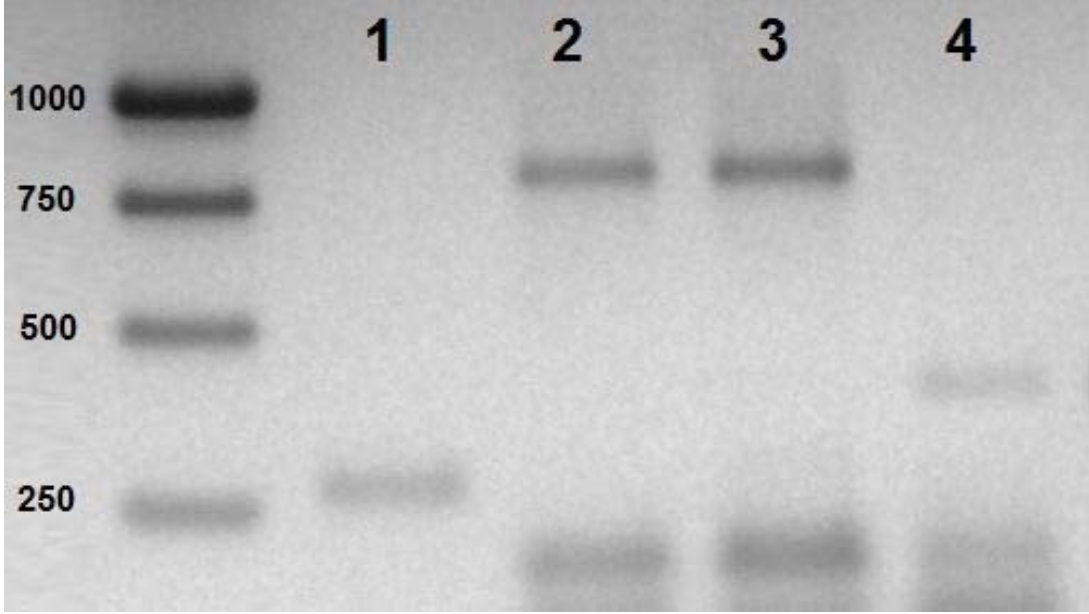
*PHE1* genini PCR ile çoğaltmak için öncelikle primerlerin bağlanma sıcaklığı optimize edilmiştir. Bunun için Gradient PCR yapılmıştır. PCR programının tüm segmenteleri Çizelge 3.4'te verildiği gibi kurulmuştur. Primerlerin bağlanma sıcaklığı için 63-57°C aralığı seçilmiştir. Kalıp olarak 0,5-0,85mm arasındaki anterlerden elde edilen cDNA kullanılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve görüntülenmiştir (Şekil 4.6). Elde edilen sonuçlara göre; 57, 58 ve 59°C'lerde primerlerin kalıp cDNA'lara bağlanmadığı görülmüştür (Şekil 4.6, Hat: 5-7). Primerlerin kalıba bağlanması 60°C'de

başlamıştır (Şekil 4.6, Hat: 4). Buna karşın beklenenden daha küçük istenmeyen PCR ürünlerinin olması ve düşük miktarda ürün elde edilmesi sebebi ile 60°C'nin PCR için uygun bir sıcaklık olmadığına karar verilmiştir. 63 ve 61°C'lerde (Şekil 4.6, Hat: 1-3) primerlerin bağlanmasının doğru olduğu fakat elde edilen ürün miktarının düşük olduğu gözlenmiştir. Optimizasyon çalışmasında en iyi bağlanma sıcaklığı, elde edilen ürün kalitesi nedeni ile 62°C (Şekil 4.6, Hat: 2). olarak belirlenmiştir ve daha sonraki PCR çalışmalarında bu sıcaklık tercih edilmiştir.



**Şekil 4.6.** *PHE1* gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Hat1;63°C, Hat2;62°C, Hat3;61°C, Hat4;60°C, Hat5;59°C, Hat6;58°C, Hat7;57°C (Her kuyucuğa 3µl örnek yüklenmiştir).

*PHE1* geninin PCR ile çoğaltımı için ikinci kriter olarak MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu optimize edilmiştir. PCR bileşenlerinin tüm konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verildiği gibidir. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları için 1,0, 1,5, 2 ve 2,5 mM olmak üzere dört farklı değer test edilmiştir. PCR'da kalıp olarak, 0,5- 0,85mm arasındaki anterlerden elde edilen cDNA kullanılmıştır. PCR programı ise Çizelge 3.5'te verilen değerlere göre kurulmuştur. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve UV tablasında görüntülenmiştir (Şekil 4.7). Elde edilen sonuçlara göre; 1,0 ve 2,5mM olarak kullanılan MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında beklenen büyüklükte ürün elde edilememiştir (Şekil 4.7, Hat: 1 ve 4). Ayrıca bu konsantrasyonlarda istenmeyen PCR ürünlerinin oluşumu da gözlenmiştir. 1,5 ve 2,0mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında ise beklenmeyen PCR ürünleri görülmemiştir ve beklenen ürünlerin kalitesi ileriki analizler için uygun bulunmuştur (Şekil 4.7, Hat: 2 ve 3). Buna karşın 2,0mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda daha fazla miktarda ürün elde edilmesi nedeni ile daha sonraki analizler için bu konsantrasyon uygun görülmüştür.



**Şekil 4.7.** MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Hat1; 1,0 mM, Hat2; 1,5 mM, Hat 2,0 mM, Hat4; 2,5 mM (Her kuyucuğa 3µl örnek yüklenmiştir).

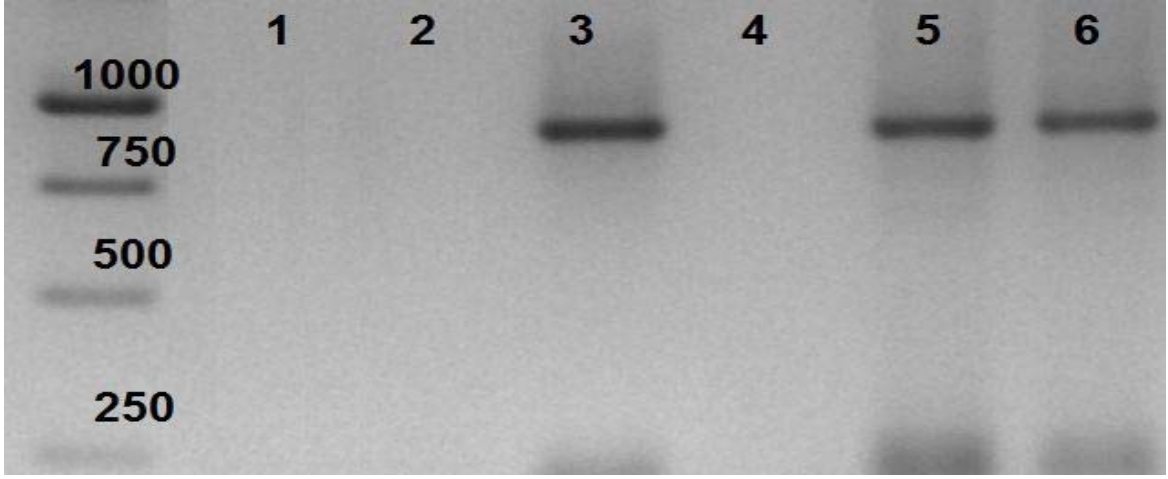
Optimizasyon çalışması sonrasında *PHE1* geninin *B. holboelli* bitkisinden çoğaltımı için 62°C primer bağlanma sıcaklığı ve 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu kullanılmasına karar verilmiştir.

#### 4.5. *PHE1* Geninin *Boechera* Anter ve Pistil Dokularından PCR İle Çoğaltımı

*PHE1* geni için uygun PCR koşulları belirlendikten sonra farklı gelişim aşamalarındaki anter ve pistil dokularında ifadesi incelenmiştir. Kalıp olarak *B. holboelli* bitkisinden disekte edilen üç farklı boydaki anter (<0,5 mm, 0,5mm-0,85mm ve >0,85mm) ve iki farklı boydaki (döllenme sonrası ve döllenme öncesi) pistillerden (>2,3mm ve <2,3mm) elde edilen cDNA'lar kullanılmıştır. PCR bileşenleri için Çizelge 3.2'de verilen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Reaksiyon kurulduktan sonra Çizelge 3.4'teki PCR programı uygulanmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve UV tablasında görüntülenmiştir (Şekil 4.8).

Bu sonuçlara göre, apomikt *B. holboellii* bitkisinde *PHE1* gen ifadesine boyutları 0.5 mm'den küçük ve 0.85 mm'den büyük anterlerde rastlanmamıştır (Şekil 4.8. Hat: 2 ve 4).





**Şekil 4.8.** *PHE1* geninin farklı gelişim aşamalarındaki anter ve pistillerden çoğaltımı. Hat1; negatif kontrol, Hat2;0,5mm'den küçük anter, Hat3;0,5mm-0,85mm anter, Hat4;0,85mm'den büyük anter, Hat5; 2,3mm'den büyük (döllenme sonrası) pistil, Hat6;2,3mm'den küçük (döllenme öncesi) pistil (Her kuyucuğa 3 µl örnek yüklenmiştir).

Sitolojik araştırmalar, boyutu 0,5mm'den küçük anterlerin monad boyutu 0,85 mm'den büyük anterlerin ise genç polenleri taşıdığını göstermiştir (Şekil 4.1. a, c, d, f). Bu sonuçlara göre apomikt *B. holboellii* türünde *PHE1* geninin mayoz öncesinde ve genç polenlerde ifade olmadığı ortaya çıkmıştır. *PHE1* gen ifadesine sadece mayoz aşamasındaki anterlerde (0,5-0,85mm) rastlanmıştır (Şekil 4.8. Hat: 3). Seksüel mekanizmalarla üreyen bir bitki olan *A. thaliana* ile yapılan çalışmalarda ise *PHE1* geninin polen ve polen tüpünde ifade olduğu bildirilmiştir (Hennig 2004). Buna karşın, bizim sonuçlarımıza göre apomikt *B. holboellii* bitkisinde *PHE1* geni ifadesine genç polen taşıyan anterlerde (>0,85mm) rastlanmamıştır.

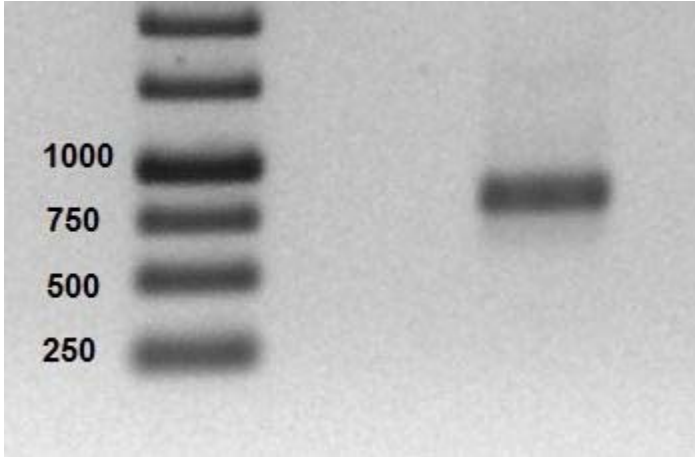
PCR çalışmaları sonucunda *B. holboellii* bitkisinde, *PHE1* geninin döllenme öncesinde pistillerde ve döllenme sonrasında genç baklalarda ifade olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8, 5-6 nolu hatlar). Buna karşın, *A. thaliana* ile yapılan önceki çalışmalarda pistillerde (döllenme öncesi) *PHE1* gen ifadesine rastlanmadığı, *PHE1* geninin genetik etiketleme ile idare edildiği ve sadece baba ebeveyne (paternal) ait alelin ifade olduğu bildirilmiştir (Köhler, 2003a). *A. thaliana* genç baklalarında (döllenme sonrasında dördüncü gününe kadar) ise *PHE1* gen ifadesinin sadece paternal kaynaklı olduğu *GUS* analizleri ile gösterilmiştir (Köhler, 2005).

Bu sonuçlara göre, pseudogamik apomikt *B. holboellii* bitkisinde *PHE1* gen ifadesinin döllenme öncesi dişi gametofitte de görülmesi *A. thaliana* bitkisinde yapılan

önceki çalışmalardan farklılık göstermektedir. Bu nedenle, bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre apomikt *Boecheera* bitkisinde *PHE1* gen ifadesi, farklı bir mekanizma ile kontrol edilmektedir. Bununla birlikte, *PHE1* gen ifadesi *B. holboellii* bitkisinde *A. thaliana* ile benzer şekilde genç baklalarda (döllenme sonrası) bulunmuştur.

#### 4.6. *BhPHE1* Geninin Sekans Analizleri

*BhPHE1* geninin sekans analizi için hizmet alımı yapılmıştır. PCR örnekleri gönderilmeden önce ilgili bantlar Promega wizard SV Gel and PCR Clean-up kit kullanılarak agaroz jelden izole edilmiştir. İzole edilen ürünün kalitesini ve konsantrasyonu agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (Şekil 4.9). Agaroz jel UV tablasında görüntülenmiş ve *PHE1* geninin konsantrasyonu Gelpro3 programı ile 55ng/μl olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre saflaştırılmış ürünlerin sekans analizi için uygun olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 4.9.** PCR ürünlerinin jelden saflaştırma sonuçları (Marker ve örnekte jelle 1μl yüklenmiştir).

#### 4.7. *PHE1* Geninin Biyoinformatik Analizleri

*A.thaliana* bitkisinde MADS-box I familyasına dahil edilmiş *PHERES1*, FIS PcG kompleksinin hedef geni olarak bilinir (Kohler 2003). *FIS* genleri bitkilerde, hayvan Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) homologu proteinlerini kodlarlar (Folter 2005). Bu kompleks DNA'yı lizin 27 ve histon H3 bölgelerinden metiller (Kohler 2006). *PHE1* cDNA'sının 840 pç uzunluğunda olduğu ve 279 amino asitten oluşan bir protein kodladığı

bildirilmiştir (Kohler 2003). MADS-box genleri ise çiçek, meyve, yaprak gelişimde ve kontrolünde kritik rol oynamaktadır (Parenicová 2006). Bununla birlikte, *PHE1* geni *A.thaliana* dışında az sayıda bitkide çalışmıştır. Bu nedenle bu çalışma, *PHE1* genin diğer bitki türlerindeki fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, triploid apomikt *B. holboellii* dokularından *A. thaliana PHE1* primerleri aracılığı ile 815 bç uzunluğunda bir PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.8). RT-PCR çalışmaları ile elde edilen bu DNA bandının *PHE1* genine ait olduğu ilgili bandın jelden izolasyonu ve DNA dizi analizleri ile araştırılmıştır. Dizi analizi sonrasında elde edilen kromotagramlar Sequencher program ile analiz edilmiş ve 310 bç uzunluğunda temiz bilgi elde edilmiştir. Bu nedenle, çalışmada *PHE1* cDNA bir kısmı elde edilmiştir. BLAST programı bu PCR ürününün *A. thaliana PHE1* geni ile %93 (Şekil 4.10) ve *PHE2* geni ile %84 (Şekil 4.11) benzerlik gösterdiğini işaret etmiştir. Bu sonuçlara göre, *Boechera* dokularından çoğaltılan DNA dizisinin, *A. thaliana PHE1* geni ile yüksek oranda benzerlik göstermesi nedeniyle elde edilen ürüne *BhPHE1* adı verilmiştir. Kısmi *BhPHE1* cDNA'sının kodladığı muhtemel polipeptid 103 amino asitten oluşmaktadır ve *A. thaliana PHE1* proteini ile %71 oranda benzerlik göstermektedir (Şekil 4.12).

```

Features in this part of subject sequence:
PHE1 (PHERES1); DNA binding / transcription factor

Score = 926 bits (501), Expect = 0.0
Identities = 589/631 (93%), Gaps = 7/631 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 19 AACATTC-CC-AAAGGAAG-AAGGGATGATGAAGAAATTCACCGAGCTAGTCACTCTATG 75
Sbjct 24270930 AACATTCACCAAAGGAAGAAAGGGATGCTGAAGAAATTCACCGAGCTAGTCACTCTATG 24270871
Query 76 TGGTGTGACGCATGTGCGGTCATCCGTAGCCCGTACAACCTCGATCCCGAGGCTTGGCC 135
Sbjct 24270870 TGGTGTGACGCATGTGCGGTCATCCGTAGCCCGTACAACCTCGATCCAGGAGCCTTGGCC 24270811
Query 136 ATCAAGGGAAGGCCGTGAAGACGIGATGTCGAAATTTATGGAGTTTTCCGGTGTGGACCG 195
Sbjct 24270810 ATCAAGGGAAGGCCGTGAAGAAAGTGAITGCGAAGTTTTATGGAGTTTTCCGGTGTGGACCG 24270751
Query 196 GACCAAGAAGATGGTGGATCAAGAGACTTTTTTACGTCAAAGGATCGCCAAAGAAACAGA 255
Sbjct 24270750 GACCAAGAAGATGGTGGATCAAGAGACTTTTTTACGTCAAAGGATCGCCAAAGAAACAGA 24270691
Query 256 ACGTCTCCAGAAGCTACGTGATGAGAACCCTAATTCTCAGATTCGAGATTTAATGTTGG 315
Sbjct 24270690 ACGTCTCCAGAAGCTACGTGATGAGAACCCTAATTCTCAGATTCGAGATTTAATGTTGG 24270631
Query 316 TTGTCTCAAAGGAGAGGTGAACGTTGCTCATCTTCATGGAAGAGATCTTCTTGATTTGAA 375
Sbjct 24270630 TTGTCTCAAAGGAGAGGTGGACGTTGCTCATCTTCATGGAAGAGATCTTCTTGATTTGAA 24270571
Query 376 TGTATTTCTTAACAAGTATCTCAATGGTGTATTTCGTAGGGTTGAGATCCTTATTGAGAA 435
Sbjct 24270570 TGTATTTCTTAACAAGTATCTCAATGGTGTATTTCGTAGGGTTGAGATCCTTAAAGGAGAA 24270511
Query 436 CGGTGAGTCTTCTTCATCTGTACCTCCTCCTATTGGTGCACCTCCTACTGCTGCGGATGC 495
Sbjct 24270510 CGGTGAGTCTTCTTCATCTGTACCTCCTCCTATTGGTGTAGCTCCTACTGTTGTGGATGC 24270451
Query 496 ATCTGTCCCAATCATTTTTGATGGTGTGATGATTCAAGATCAAAGCCAAA-TCAACTAC 554
Sbjct 24270450 ATCTGTCCCAATCGGTTTTGATGGTGTGATGATTCAAGATCAAAA-CCAAAATCAGCAAG 24270392
Query 555 AGCCGGTTTTCAATCCAATACCTGGGTCATTATAAATCTTATAATCATATTCCTATTAAAC 614
Sbjct 24270391 AGCCGGTT-CAATCCAATACCAGGCTCTTTATGATTTTATGATCAGATCCAAAGAAA 24270333
Query 615 CTTCATGATTTTAAACGTTGCAATGCAATTATA 645
Sbjct 24270332 CTTCATGATTTTAAACATGAAAATGAAT-ATA 24270303

```

Şekil 4.10. Çalışmada elde edilen DNA sekansının *AtPHE1* dizisi ile %93 benzerliğini gösteren BLAST sonucu.

```

Features in this part of subject sequence:
PHE2 (PHERES2): DNA binding / transcription factor

Score = 593 bits (321), Expect = 2e-168
Identities = 521/615 (84%), Gaps = 23/615 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 19 AACATTCC-CC-AAAGGAAG-AAGGGATGATGAAGAAATTCACCGAGCTAGTCACTCTATG 75
Sbjct 24258645 AACATTACCCAAAAGGAAGAAAGGGATGACGAAGAAACTAACCGAGCTAGTCACTCTATG 24258704
Query 76 TGGTGTTCACCGCATGTGCGGTCATCCGTAGCCCGTACAACCTCGATCCCGGAGGCTTGGCC 135
Sbjct 24258705 TGGTGTTCACCGCATGTGCGGTCATCCGTAGTCCGTTCAACTCGATCCCGGAGGCTTGGCC 24258764
Query 136 ATCAAGGGAAGCGGTTGAAGACGTGATGTCGAAATTTATGGAGTTTCGGTGTGGACCG 195
Sbjct 24258765 ATCAAGGGAAGCGGTTGAAGACGTGATGTCGAAATTTATGGAGTTTCGGTGTGGACCG 24258824
Query 196 GACCAAGAAGATCGTGGATCAAGACACTTTTTATCGTCAAAGGATCGCCAAAGAAACAGA 255
Sbjct 24258825 GACCAAGAAGATCGTGGATCAAGACACTTTTTATAAGTCAAAGGATCGCCAAAGAAAGAA 24258884
Query 256 AC-GTCTCCAGAAGCTACGTTGATGAGAACCCTAATTCTCAGATTCCGAGATTTAATGTTG 314
Sbjct 24258885 GCAG-CTGCAGAAGCTACGTTGATGAGAACCATAATTCTCAGATTCCGGGAGTTAATGTTG 24258943
Query 315 GTTGTCTCAAAGGAGAGGTTGAACGTGCTCATCTTCATGGAAGAGATCTTCTTGATTGA 374
Sbjct 24258944 GTTGTCTCAAAGGAGAGGTTGAACGTGCTCATCTTCATGGAAGGATCTTCAAGATTGA 24259003
Query 375 ATGTATTCTTAAACAAGTATCTCAATGGTGTATTTCGTAGGGTTGAGATCCTTATTGAGA 434
Sbjct 24259004 GTTTATATATTGATAAGTATCTTAAATGGTCTTACTCGCAGGATTGAGATCCTTATTGAGA 24259063
Query 435 ACGGTGAGTCTTCTTCATCTGACCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT 493
Sbjct 24259064 ACGGTGAGTCTTCTTCATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT 24259117
Query 494 GCATCTGTCCCAATCATTTTTGATGGTCGTATGATTCAAGATCAAAGCCAAATCAACTA 553
Sbjct 24259118 -CA---GTGGGA-T--TT---GATGGTCGTATGTTTCAATATCATAATCAAAATCAGCAA 24259167
Query 554 CAGCCGGTTTCAATTCCAATACCTGGGTCATTATAATTCTTATAATCATATTCTATTAA 613
Sbjct 24259168 AAGCCGGTT-CAATTCCAATATCAGGCTCTTTATGATTTTTATGATCAGATTCCAAAGAA 24259226
Query 614 CCTTCATGATTTAA 628
Sbjct 24259227 AATTCATGGTTTAA 24259241

```

**Şekil 4.11.** Çalışmada elde edilen DNA sekansının *AtPHE2* dizisi ile %84 benzerliğini gösteren BLAST sonucu.

```

Score = 132 bits (331), Expect = 4e-36, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 69/97 (71%), Positives = 71/97 (73%), Gaps = 4/97 (4%)

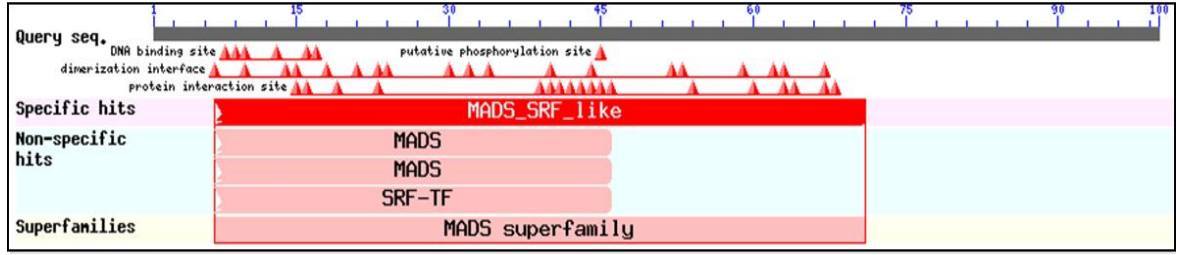
Query 4 ETTFTKRKKGMXKKFTELVTLCGV DACAVXXSPYNSIPEAWPSREGVEXVMSKFMEXSVL 63
+TTFTKRKKGM KKF ELVTLCGV DACAV SPYNSI E WPSREGVE VMSKFM SVL
Sbjct 17 KTTFTKRKKGMLKFFNELVTLCGV DACAVIRSPYNSIQEPWPSREGVEEVMSKFM EFSVL 76

Query 64 DRTKKVDQETFFTSKDRQRNRTSPEATEPFSDSRFN 100
DRTKKVDQETF RQR E + D N
Sbjct 77 DRTKKVDQETF L----RQRIAKETERLQKLRDENRN 109

```

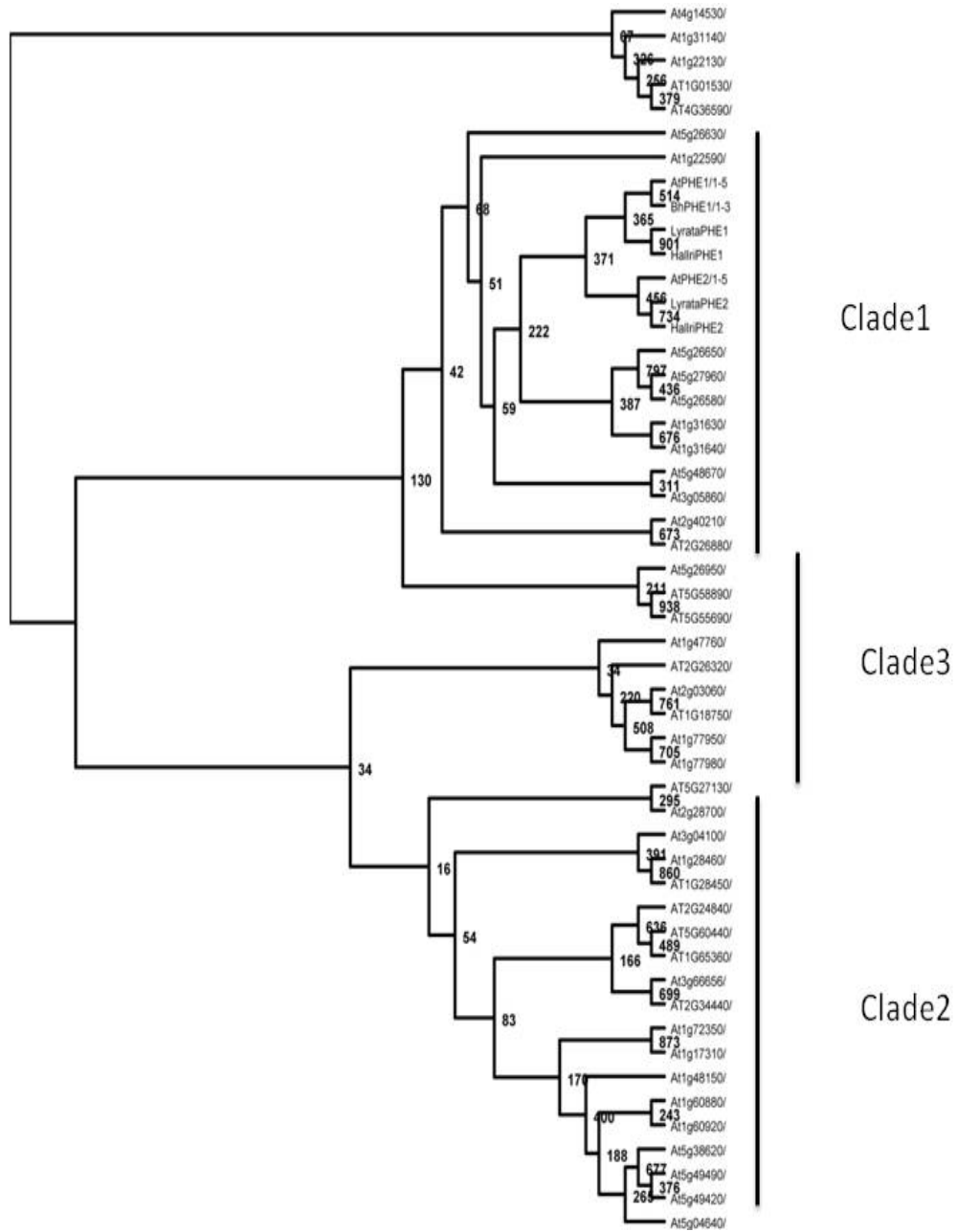
**Şekil 4.12.** Çalışmada elde edilen protein sekansının *AtPHE1* proteini dizisi ile %71 benzerliğini gösteren BLAST sonucu.

BhPHE1 proteini Conserved Domain (CD) aracı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) ile incelenmiş ve N-terminal bölgesinde 46 amino asitten oluşan bir SRF-benzeri/Type I MADS domain bulunmuştur. Bu domain içerisinde ayrıca DNA bağlanma, dimerizasyon ve protein interaksiyon bölgelerinin de olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Çalışmada elde edilen protein dizisinin SRF-benzeri/Type I MADS domain haritası.

BhPHE1 muhtemel amino asit dizileri kısa olmasına karşın korunmuş bölge içerdiği için *Arabidopsis* Tip I MADS-box gen bilgilerini taşıyan bir bilgi seti ile filogenetik ağaç kurulmuştur. Bu sete ayrıca, *A. lyrata* ve *A. halleri* gibi *A. thaliana* bitkisinin yakın akrabalarından elde edilen *PHE1* ve *PHE2* homologları da eklenmiştir. Çalışmada öncelikle, ClustalW programı orijinal parametreleri ile amino asit dizileri sıralanmıştır. Sıralama sonucunda diziler arasında büyük boşuklar gözlenmiş olmasına karşın Tip I MADS-box proteinlerinin korunmuş MADS-box bölgeleri taşıdıkları bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmada bu proteinlere ait orijinal dizilerden korunmuş bölgeler çıkarılmış ve filogenetik ağacın eldesinde kullanılmıştır. Dendogram Tip I MADS-box genlerinin daha önce bildirildiği gibi 3 ortak ata oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.14). Bu gruplardan bazıları istatistiksel olarak düşük seviyede güvenilirliğe sahip olmasına karşın bazı dalların Bootstrap değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur. AtPHE1 ile AtPHE2 ve Agamous-Like MADS-proteinlerini içeren I nolu ortak ata (clade) farklı iki grup proteinden oluşmaktadır. Bununla birlikte ortak ata grubu II 19, ortak ata grubu III ise sadece 9 protein içermektedir. Bu sonuçlara göre, *BhPHE1* geni *A. lyrata* ve *A. halleri* ortologları ile birlikte AtPHE1 proteininin de dahil olduğu ortak ata I içerisinde yer almıştır. Bu çalışmada ayrıca, BhPHE1 dizilerinin *A. lyrata* ve *A. halleri* ile karşılaştırıldığında *A. thaliana* ile benzerliğinin daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.14. *A. lyrata* ve *A. halleri* gibi *A. thaliana* bitkisinin yakın akrabalarından elde edilen *PHE1* ve *PHE2* homologları gösteren filogenetik ağaç.

## BÖLÜM 5 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, triploid apomikt *B. holboellii* bitkisinde *AtPHE1* geni ortoloğu karakterize edilmiş ve ifade modeli araştırılmıştır. Tip I MADS-box *PHE1* geni, *Arabidopsis* bitkisinde, maternal olarak suskunken paternal olarak ifade olduğu bilinen tek gen dir (Kohler ve ark., 2005; Makarevich ve ark., 2008). Maternal *PHE1* alleli dişi gametofitte *FIS* PcG kompleksi ile baskılanırken, sadece paternal *PHE1* alleli döllenmeden sonra endospermin kalazal domaininde ifade olur (Kohler ve ark., 2005; Villar ve ark., 2009). Bu sebeple *BhPHE1* ortologları, pseudogamik apomikt bitkilerde endosperm probleminin üstesinden gelmek için genetik etiketlemenin modifiye edilip edilmediğini araştırmak için önemli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca triploid apomikt *Boecheira* türlerinde genetik olarak etiketlenmiş diğer genlerin ifade profillerini ve sekanslarını da araştırmaktayız. Pseudogamik apomikt bitkilerde genetik etiketlenme sistemlerinin modifikasyonları ile ilgili sonuçlarımız, apomiksinin ürün bitkilerine transferinin başarılması için imkanların geliştirilmesini sağlayacaktır.

Seksüel mekanizmalarla üreyen bir bitki olan *A. thaliana* ile yapılan çalışmalarda *PHE1* geninin polen ve polen tüpünde ifade olduğu bildirilmiştir (Hennig 2004). Buna karşın, bizim sonuçlarımıza göre apomikt *B. holboellii* bitkisinde *PHE1* geni ifadesine genç polen taşıyan anterlerde (>0,85mm) rastlanmamıştır.

PCR çalışmaları sonucunda *B. holboellii* bitkisinde, *PHE1* geninin döllenme öncesinde pistillerde ve döllenme sonrasında genç baklalarda ifade olduğu belirlenmiştir . Buna karşın, *A. thaliana* ile yapılan önceki çalışmalarda pistillerde (döllenme öncesi) *PHE1* gen ifadesine rastlanmadığı, *PHE1* geninin genetik etiketleme ile idare edildiği ve sadece baba ebeveyne (paternal) ait alelin ifade olduğu bildirilmiştir (Köhler, 2003a). *A. thaliana* genç baklalarında (döllenme sonrasında dördüncü gününe kadar) ise *PHE1* gen ifadesinin sadece paternal kaynaklı olduğu *GUS* analizleri ile gösterilmiştir (Köhler, 2005).

Çalışmada, *A. thaliana* *PHE* gen dizilerine özgü primerler aracılığı ile *B. holboellii* türünde RT-PCR sonucunda beklenen büyüklükte (815 bp) DNA bantları elde edilmiştir. Bu bantlar jelden izole edilmiş ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi analizi sonucunda ile *BhPHE* geninin *AtPHE* ile %93 oranında benzer olduğunu göstermiştir. Dizi analizlerinin biyoinformatik çalışmaları ile *BhPHE1* olarak isimlendirdiğimiz genin *AtPHE1* geni ile ortolog olduğu ispat edilmiştir.

Ticari öneme sahip seksüel süreçlerle üreyen bitkilerinde döllenme sonucu meydana gelen genetik açılımlardan dolayı ürün kayıpları yaşanmaktadır. Apomikt bitkilerde ise embriyolar, döllenme olmadan meydana geldiği için ana bitki ile genetik olarak özdeştir. Bu sebeple apomiksinin seksüel süreçlerle üreyen bitkilere aktarılabilmesi tarımsal açıdan büyük öneme sahiptir. Buna karşın apomikt üreme süreçlerinin moleküler düzeydeki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır.



## KAYNAKLAR

- Adams S., Vinkenoog R., Spielman M., Dickinson H. G. ve Scott R. J., 2000. Parent of Origin Effects on Seed Development in *Arabidopsis thaliana* Require DNA Methylation. *Development*, 127 : 2493-2502.
- Asker S. E. ve Jerling L., 1992. Apomixis in Plants. *Plant Cell*, 4: 879–887.
- Autran D., Wilson T., Mamani H. ve Jean P., 2005. Genomic Imprinting In Plants: The Epigenetic Version of an Oedipus Complex. *Plant Biology*, 8 : 19–25.
- Bedinger P., Baren Van M. J. ve Heutink P., 2004. The PCR suite. *Bioinformatics*, 20 : 591–593
- Böcher T., 1951. Cytological Embryological Studies in the Amphi-Apomictic *Arabis holboellii* Complex. *Biologiske Skrifter*, 6: 1-58.
- Carman J. G., 1997. Asynchronous Expression of Duplicate Genes in Angiosperms May Cause Apomixis, Bispority, Tetraspority, and Polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 51-94.
- Chaudhury A. M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E. S. ve Peacock W. J., 1997. Fertilization-Independent Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 94: 4223–4228.
- Chaudhury A. M., Craig S., Dennis E. S. ve Peacock W.J., 1998. Ovule and Embryo Development, Apomixis and Fertilization. *Current Opinion in Plant Biology*, 1 : 26–31.
- Chanvivattana Y., Bishopp A., Schubert D., Stock C., Moon Y. H., Sung Z. R. ve Goodrich J., 2004. Interaction of Polycomb Group Proteins Controlling Flowering in *Arabidopsis*. *Development*, 131 : 5263-5276.
- Danilevskaya O. N., Hermon P., Hantke S., Muszynski M. G., Kollipara K. ve Ananiev E. V., 2003. Duplicated *fis* Genes in Maize: Expression Pattern and Imprinting Suggest Distinct Function. *The Plant Cell*, 15 : 425-438.
- Dobes C., Mitchell-Olds T. ve Koch M. A., 2004a. Intraspecific Diversification in North American *Boechera stricta* (*Arabis drummondii*), *Boechera xdivaricarpa*, and *Boechera holboellii* (Brassicaceae) Inferred From Nuclear and Chloroplast Molecular Markers an Integrative Approach. *Plant Biology*, 91 : 2087–2101.
- Drews G. N., Lee D. ve Christensen G. A., 1998. Genetic Analysis of Female Gametophyte Development and Function. *Plant Cell*, 10 : 5–17.

- Drews G. N. ve Yadegari R., 2002. Development and Function of the Angiosperm Female Gametophyte. *Plant Molecular Biology*, 36 : 99–124.
- Dumas C., Knox R. B., McConchie C. A. ve Russell S. D., 1984. Emerging Physiological Concepts in Fertilization. *What's New in Plant Physiology*, 15 : 17–20.
- Finnegan E. J., Peacock W. J. ve Dennis E. S., 1996. Reduced DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana* Results in Abnormal Plant Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93 : 8449–8454
- Genger R. K., Dennis E. S., Kovac K. A., Peacock W. J. ve Finnegan E. J., 1999. Multiple DNA Methyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 41 : 269–278.
- Grimanelli D., Perotti E., Ramirez J. ve Leblanc O., 2005. Timing of the Maternal to- Zygotic Transition During Early Seed Development in Maize. *The Plant Cell*, 17 : 1061-1072.
- Grossniklaus U., Philippe J., Calzada V., Hoepfner M. A. ve Gagliano W. B., 1998. Maternal Control of Embryogenesis By MEDEA, A Polycomb Group Gene in *Arabidopsis*. *Science*, 280 : 446–450.
- Grossniklaus U., Spillane C., Page D. R. ve Köhler C., 2001. Genomic Imprinting and Seed Development: Endosperm Formation With and Without Sex. *Plant Biology*, 4: 21-27.
- Guitton A. E., Page D. R., Chambrier P., Lionnet C., Faure, J. E., Grossniklaus U. ve Berger F., 2004. Identification of New Members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group Pathway Involved in the Control of Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131 : 2971-2981
- Gustafsson A., 1946. Apomixis in Higher Plants. 1-3. *Acta Univ. Lund* 42 (3) : 43-55
- Gutierrez-Marcos J. F., Pennington P. D., Costa L. M. ve Dickinson H. G., 2003. Imprinting in the Endosperm: a Possible Role in Preventing Wide Hybridization. *The Royal Society*, 358 : 1105-1111.
- Jenuwein T., Laible G., Dorn R. ve Reuter G., 1998. SET Domain Proteins Modulate Chromatin Domains in Eu- and Heterochromatin. *Cellular and Molecular Life Science*, 54 : 80-93.
- Josefsson C., Dilkes B. ve Comai L., 2006. Parent-Dependent Loss of Gene Silencing During Interspecies Hybridization. *Current Biology*, 16 (13) : 1322-8
- Juel H. O., 1900. Beitrage zur Kenntniss der Tetradentheilung. - *Jahrb. Wiss. Bot.* 35 : 626-459.

- Jullien P. E., Katz A., Oliva M., Ohad N. ve Berger F., 2006. Polycombgroup Complexes Self-regulate Imprinting of the Polycomb Group Gene *MEDEA* in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 16 : 486–492.
- Kantama L., Sharbel T. F., Schranz M. E., Mitchell-Olds T., De Vries S. ve De Jong H., 2007. Diploid Apomicts of the *Boechera holboellii* Complex Display Large-Scale Chromosome Substitutions and Aberrant Chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. *Plant Biology*, 104 : 14026-14031.
- Köhler C., Hennig L., Bouveret R., Gheyselinck J., Grossniklaus U. ve Grissem W., 2003a. *Arabidopsis* MSI1 is a Component of the MEA/FIE Polycomb Group Complex and Required for Seed Development. *The EMBO Journal*, 22 (18) : 4804-4814.
- Köhler C., Hennig L., Spillane C., Pien S., Grissem W. ve Grossniklaus U., 2003b. The Polycomb Group Protein MEDEA Regulates Seed Development by Controlling Expression of the MADS-box Gene PHERES1. *Genes and Development*, 17 : 1540-1553.
- Köhler C., Page D. R., Gagliardini V. ve Grossniklaus U., 2005. The *Arabidopsis thaliana* MEDEA Polycomb Group Protein Controls Expression of PHERES1 by Parental Imprinting. *Nature Genetics*, 37 : 28-30.
- Koch M., Al-Shehbaz I. A. ve Mummenhoff K., 2003 Molecular Systematics, Evolution and Population Biology in the Mustard Family (Brassicaceae). *Current Biology*, 90 : 151–171
- Koltunow, M. A., 1993. Apomixis: Embryos Sacs and Embryos Formed Without Meiosis or Fertilization in Ovules, *The Plant Cell*, 5 : 1425–1437.
- Koltunow M. A., Bicknell, A. R. ve Chaudhury A. M., 1995. Apomixis: Molecular Strategies for The Generation of Genetically Identical Seeds Without Fertilization. *Plant Physiology*, 108 : 1345–1352.
- Kinoshita T., Yadegari R., Harada J. J., Goldberg, R. B. ve Fischer R. L., 1999. Imprinting of the MEDEA Polycomb Gene in the *Arabidopsis* Endosperm. *Plant Cell*, 11 : 1945-1952
- Kiyosue T., Ohad N., Yadegari R., Hannon M., Dinneny J., Wells D., Katz A., Margossian L., Harada J. J., Goldberg R. B. ve Fischer R. L., 1999. Control of Fertilization Independent Endosperm Development by the MEDEA Polycomb Gene *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. *Plant Biology*, 96 : 4186-4191

- Luo M., Bilodeau P., Koltunow A., Dennis E. S., Peacock W. J. ve Chaudhury A. M., 1999. Genes Controlling Fertilization-Independent Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 96 : 296–301.
- Luo M., Bilodeau P., Dennis E. S., Peacock W. J. ve Chaudhury A. M., 2000. Expression and Parent of Origin Effects for FIS2, MEA and FIE in The Endosperm and Embryo of Developing *Arabidopsis* Seeds. *Current Biology*, 97 (19) : 10637–10642.
- Makarevich G., Villar C. B. R., Erilova A., ve Köhler C., 2008. Mechanism of PHERES1 Imprinting in *Arabidopsis*. *Journal of Cell Science*, 121 : 906-912.
- Matzk F., Meister A. ve Schubert I., 2000. An Efficient Screen for Reproductive Pathways Using Mature Seeds of Monocots and Dicots. *Plant Journal*, 21 : 97-108.
- Mascarenhas J. P., 1989. The Male Gametophyte of Flowering Plants. *Plant Cell*, 1 (7) : 657–664.
- Maheshwari, P., 1950. An Introduction to the Embryology of the Angiosperms. *Paleontological Society*. 7(1) : 54-67
- Müller J., Hart C. M., Francis N. J., Vargas M. L., Sengupta A., Wild B., Miller E. L., O'Connor M. B., Kingston R. E. ve Simon J. A., 2002. Histone Methyltransferase Activity of a *Drosophila* Polycomb Group Repressor Complex. *Cell*, 111:197-208.
- Naumova T. N., Van Der Laak J., Osadchij J., Matzk F., Kravtchenko A., Bergervoet J., Ramulu K. S., ve Boutilier K., 2001. Reproductive Development in Apomictic Populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 14 : 195-200.
- Nogler, G. A., 1984. Gametophytic apomixis. *In Embryology of Angiosperm*, 74 (3) : 475- 518.
- Nowack M., Grini P., Jakoby M. J., Lafos M., Koncz C. ve Schnittger A., 2006. A Positive Signal From the Fertilization of the Egg Cell Sets Off Endosperm Proliferation in Angiosperm Embryogenesis. *Nature Genetics*, 38 : 63-67.
- Nowack M. K., Grini P. E., Jakoby M. J., Lafos M., Koncz C. ve Schnittger A, 2006. A Positive Signal From the Fertilization of the Egg Cell Sets off Endosperm Proliferation in Angiosperm Embryogenesis. *Nature Genetics*, 38: 63–67.
- Ohad N., Margossian L., Hsu Y. C., Williams C. ve Fischer L. R., 1996. A Mutation That Allows Endosperm Development Without Fertilization. *Plant Biology*, 93 : 5319–5324.

- Ohad N., Yadegari R., Margossian L., Hannon M., Michaeli D., Harada J. J., Goldberg R. B. ve Fischer R. L., 1999. Mutations in FIE, a WD Polycomb Group Gene, Allow Endosperm Development Without Fertilization. *Plant Cell*, 11 : 407-415.
- Robinson B. R. E., Pruitt K. ve Gasser C. S., 1992. Ovule Development in Wild Type Arabidopsis and Two Female Sterile Mutants. *Plant Cell*, 4 : 1237-1249.
- Roy B. A., 1995. The Breeding Systems of 6 Species of Arabis (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 82 : 869-877.
- Roy B. A. ve Rieseberg L. H., 1989. Evidence for Apomixis in Arabis. *Journal of Heredity*, 80 : 506-508.
- Savidan Y., 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breeding*, 18 : 13-86.
- Scott R. J., Spielman M., Bailey J. ve Dickinson H. G., 1998. Parent of Origin Effects on Seed Development in Arabidopsis thaliana. *Development*, 125 : 3329-3341.
- Schneitz K., Balasubramanian S. ve Schiefthaler U., 1998. Organogenesis in plants : the molecular and genetic control of ovule development. *Trends Plant Science*. 3 : 468-472.
- Schneitz K., 1999. The Molecular and Genetic Control of Ovule Development. *Plant Biology*. 2 : 13-17.
- Schranz M. E., Dobes C., Koch M. A. ve Mitchell O. T., 2005. Sexual Reproduction, Hybridization, Apomixis and Polyploidization in the Genus Boechera (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 92 : 1797-1810.
- Schranz M. E., Kantama L., De Jong H. ve Mitchell O.T., 2006. Asexual Reproduction in a Close Relative of Arabidopsis: a Genetic Investigation of Apomixis in Boechera (Brassicaceae). *New Phytologist*, 171 : 425-438.
- Sharbel T. F., Voigt M.L., Mitchell-Olds T., Kantama L. ve Jong D. H., 2004. Is the Aneuploid Chromosome in an Apomictic Boechera holboellii a Genuine B Chromosome. *Cytogenetic and Genome Research*, 106 : 173-183.
- Sharbel T. F., Mitchell-Olds T. M., Dobes C., Kantama L. ve Jong D. H., 2005. Biogeographic Distribution of Polyploidy and B Chromosomes in the Apomictic Boechera holboellii Complex. *Cytogenetic and Genome Research*, 109 : 283-292.
- Spielman M., Vinkenoog R. ve Scott R. J., 2003. Genetic Mechanisms of Apomixis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. *Journal of Botany*, 358 : 1095-1103.

- Spillane C., MacDougall C., Stock C., Kohler C., Vielle-Calzada J. P., Nunes S. M., Grossniklaus U. ve Goodrich J., 2000. Interaction of the Arabidopsis Polycomb Group Proteins FIE and MEA Mediates Their Common Phenotypes. *Current Biology*, 10 : 1535-1538.
- Quy A. N., James M. M., Ramamurthy B., Ueli G. ve Venkatesan S., 2007. Arabidopsis *GLAUCE* Promotes Fertilization Independent Endosperm Development and Expression of Paternally. *Development*, 134 : 4107-4117
- Taskin K. M., Turgut K. ve Scott R. J., 2004. Apomictic Development in Arabis gunnisoniana. *Israel Journal of Plant Sciences*, 52 : 155-160.
- Taskin K. M., Turgut K. ve Scott R. J. 2009. Apomeiotic Pollen Mother Cell (PMC) Development in the Apomict Boechera Species. *Biologia Plantarum* in press.
- Tie F., Furuyama T., Prasad-Sinha J., Jane E. ve Harte P. J., 2001. The Drosophila Polycomb Group Proteins ESC and E(Z) are Present in a Complex Containing the Histone Binding Protein p55 and the Histone Deacetylase RPD3. *Development*, 128 : 275-288.
- Villar C. B. R., Erilova A., Makarevich G., Trosch R. ve Köhler C., 2009. Control of PHERES1 Imprinting in Arabidopsis by Direct Tandem Repeats. *Mol Plant*, 18 : 55-60.
- Vielle-Calzada J. P., Thomas J., Spillane C., Coluccio A., Hoepfner M. A. ve Grossniklaus U., 1999. Maintenance of Genomic Imprinting at the Arabidopsis *medea* Locus Requires Zygotic DDM1 Activity. *Genes and Development*, 13 : 2971-2982.
- Vinkenoog R. ve Scott R. J., 2001. Autonomous Endosperm Development in Flowering Plants: How to Overcome the Imprinting Problem. *Sexual Plant Reproduction*, 14 : 189-194.
- Yadegari R., Kinoshita T., Lotan O., Cohen G., Katz A., Choi Y., Katz A., Nakashima K., Harada J. J., Goldberg R. B., Fischer R. L. ve Ohad N., 2000. Mutations in the FIE and MEA Genes That Encode Interacting Polycomb Proteins Cause Parent of Origin Effects on Seed Development by Distinct Mechanisms. *Plant Cell*, 12 : 2367-2381.
- Wang D., Tyson M. D., Jackson S. S. ve Yadegari R., 2006. Partially Redundant Functions of two SET Domain Polycomb Group Proteins in Controlling Initiation of Seed Development in Arabidopsis. *PNAS*, 103 (35) : 13244-13249.
- Yeates T. O., 2002. Structures of SET Domain Proteins: Protein Lysine Methyltransferases Make Their Mark. *Cell*, 111 : 5-7.

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları .....	22
Çizelge 3.2. Optimum PCR bileşenleri ve konsantrasyonları .....	23
Çizelge 3.3. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	23
Çizelge 3.4. <i>PHE1</i> için kullanılan optimum PCR programı.....	23
Çizelge 3.5. <i>ACTIN2</i> için kullanılan PCR programı.....	24

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Apomikt üreme mekanizmaları.....	3
Şekil 1.2. Dişi ve erkek gametofitte <i>PHE1</i> geninin ifade olma biçimleri.....	6
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan <i>B. holboellii</i> bitkisi.....	19
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan marker haritası.....	25
Şekil 4.1. Anter boyutlarına göre PAH gelişimi.....	28
Şekil 4.2. Pistil gelişimi.....	28
Şekil 4.3. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	29
Şekil 4.4. cDNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	30
Şekil 4.5. <i>ACTIN2</i> primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	30
Şekil 4.6. <i>PHE1</i> gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	31
Şekil 4.7. MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 4.8. <i>PHE1</i> geninin farklı gelişim aşamalarındaki anter ve pistillerden çoğaltımı.....	33
Şekil 4.9. PCR ürünlerinin jelden safaştırma sonuçları.....	34
Şekil 4.10. Çalışmada elde edilen DNA sekansının <i>AtPHE1</i> dizisi ile %93 benzerliğini gösteren BLAST sonucu.....	35
Şekil 4.11. Çalışmada elde edilen DNA sekansının <i>AtPHE2</i> dizisi ile %84 benzerliğini gösteren BLAST sonucu.....	36
Şekil 4.12. Çalışmada elde edilen protein sekansının <i>AtPHE1</i> proteini dizisi ile %71 benzerliğini gösteren BLAST sonucu.....	36
Şekil 4.13. Çalışmada elde edilen protein dizisinin SRF-benzeri/Type I MADS domain haritası.....	37
Şekil 4.14. <i>A. lyrata</i> ve <i>A. halleri</i> gibi <i>A. thaliana</i> bitkisinin yakın akrabalarından elde edilen <i>PHE1</i> ve <i>PHE2</i> homologları gösteren filogenetik ağaç.....	38



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: HakanÇAM

Doğum Yeri:Malatya

Doğum Tarihi:24/04/1981

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Balıkesir Üniversitesi (Biyoloji Bölüm)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (Moleküler Genetik (A.B.D.)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a. Yayınlar -SCI –

b. Diğer : Bildiriler –

Uluslararası –

Ulusal

-Sibel YILMAZ, Hakan ÇAM, Yasemin DEMİRGAN, Kemal Melih TAŞKIN (2008) Doğal Apomikt *Boechera holboellii* Türünde Genetik Etiketlemeye Maruz Kalan *FIS* Geni İfadelerinin Belirlenmesi, XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23 - 27 Haziran 2008, Trabzon.

-Alp ALPER, Evrim ÇELEBİ, Hakan ÇAM, Süphan KARAYTUG (2006). İkizcetepeler Baraj Gölü (Balıkesir) Cladocera ve Copepoda (Crustacea) Türleri ve Mevsimsel Dağılımlarının Belirlenmesi, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26 - 30 Haziran 2006, Aydın.

-Alp Alper, Evrim Çelebi, Hakan Çam, Süphan Karaytuğ (2007). Cladocera and Copepoda (Crustacea) Fauna of İkizcetepeler Dam Lake (Balıkesir, Turkey). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Volume 7, Number 1, 71-73.

c. Katıldığı Projeler:

Genetik Etiketlemeye Maruz Kalan PHE1Gen İfadesinin Doğal Apomikt *Boechera Holboellii* Türünde Belirlenmesi (BAP)

### İS DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : 2009 Vakıf Gureba Mikrobiyoloji Laboratuvarı

İLETİŞİM :E-posta Adresi : hkncam@gmail.com

