

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞAL APOMİKT ARABİS TÜRLERİNDEN
FİS GENİNİN (FERTILIZATION INDEPENDENT
SEED) KARAKTERİZASYONU

Sibel YILMAZ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Ağustos, 2007

ÇANAKKALE

**DOĞAL APOMİKT ARABİS TÜRLERİNDEN
FİS GENİNİN (FERTILIZATION INDEPENDENT
SEED) KARAKTERİZASYONU**

**Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

Sibel YILMAZ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**

**Ağustos, 2007
ÇANAKKALE**

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

Sibel YILMAZ tarafından Yrd.Doç.Dr. Kemal Melik TAŞKIN yönetiminde hazırlanan “DOĞAL APOMİKT ARABİS TÜRLERİNDEN FİS GENİNİN (FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED) KARAKTERİZASYONU” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yönetici

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma yapma fırsatı tanıyan danışmanım Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Kemal Melih TAŞKIN'a bilgisi, tecrübesi ile bilimin gerçek anlamını kavramamı sağlayarak yolumu aydınlattığı ve hedeflerime ulaşmamda bana destek olduğu için teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteğini benden esirgemeyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Eğitim Fakültesi öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Çiğdem TAŞKIN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında bana kendi laboratuvarında çalışma imkanı tanıyan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hanife GENÇ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim sırasında desteklerini gördüğüm ve bilgilerinden faydalandığım Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyeleri sayın Doç. Dr. Cüneyt AKI, Yrd. Doç. Dr. Tulay TURGUT, Yrd. Doç. Dr. Hanife AKYALÇIN ve Yrd. Doç. Dr. Esra KOÇUM'a teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Nurşen ÇÖRDÜK, Nurcihan HACIOĞLU, Arş. Gör. Damla ZOBAR, Arş. Gör. Çiğdem GÜL, Arş. Gör. Sefer DEMİRBAŞ, Yasemin DEMİRGAN, Hakan ÇAM ve Doğan İLHAN'a teşekkür ederim. Her zaman sevgilerini yanımda hissettiğim, annem Naciye ÖZDEMİR, ablam Ayşegül ve eşi Ali ile oğulları Burak BAYRAKTAR, ağabeyim Erkan Yılmaz'a bana her konuda destek oldukları, inandıkları ve güvendikleri için teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim sırasında bana burs sağlayarak çalışmalarımı destekledikleri için Tübitak Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına teşekkür ederim.

Sibel YILMAZ

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
<i>AtFIS2</i>	<i>Arabidopsis thaliana FIS2</i>
bç	Baz çifti
<i>BGA</i>	<i>BORGIA</i>
<i>BgFIS2</i>	<i>Boechera gunnisoniana FIS2</i>
<i>BhFIS2</i>	<i>Boechera holboellii FIS2</i>
cDNA	Komplementer DNA
<i>CLF</i>	<i>CURLY LEAF</i>
<i>DDM1</i>	<i>Decrease in DNA Methylation1</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ 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 tetraasetikası
<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	Formaldehide Agaroz jel
<i>FIE</i>	<i>FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM</i>
<i>FIS2</i>	<i>FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2</i>
FSB	Frozen Storage Buffer

g	Gram
<i>GADPH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<i>GUS</i>	<i>β-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]propanesulfonic acid
<i>MSII</i>	<i>MULTICOPY SUPPRESSOR 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	Restriksiyon Endonükleaz
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>
<i>ZmFIE</i>	<i>ZeamaysFIE</i>

DOĞAL APOMİKT ARABİS TÜRLERİNDEN FIS GENİNİN (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED) KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada, triploid apomikt *Boechea* (*Brassicaceae*) türleri *B. holboellii* ve *B. gunnisoniana*'dan *Arabidopsis thaliana* *FIS2* geni ortoloğu karakterize edilmiştir.

Çalışmada, total RNA izolasyonu *FIS2* genin ifade olduğu tahmin edilen çiçek ve bakla dokularından yapılmıştır. *Boechea* türlerine ait *FIS2* gen ortoloğu *A. thaliana*'ya özgün primerler kullanılarak RT-PCR aracılığı ile çoğaltılmıştır. Bu primerlerden yaklaşık 2250 bp büyüklüğünde DNA bandı beklenmiştir. RT-PCR ürünleri %0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra ilgili DNA bandı U.V altında görüntülenmiştir. Bu bant jelden izole edilmiş ve pJET1/blunt plazmit vektöre aktarılmıştır. Daha sonra pJET/blunt plazmit JM-109 ve JM-107 kompetent *Escherichia coli* hücre hatlarına transforme edilmiştir. Rekombinant koloniler, koloni PCR aracılığı ile tespit edilmiş ve bu kolonilerden plazmitler izole edilmiştir. Ardından rekombinant plazmitler restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek beklenen büyüklükteki DNA bandını taşıdıkları doğrulanmıştır. Son olarak, çalışmada izole edilen PCR ürünlerinin dizi analizleri yapılmış ve *AtFIS2* geni ile %83-87 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Bu sonuçlar, triploid apomikt *Boechea* türlerinde *FIS2* geni ortoloğunun mevcut olduğunu ve çiçek ve bakla oluşumu sırasında bu genin ifade edildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *FIS2*, *FIE*, *MEA*, polycomb group proteinler, *Arabidopsis thaliana*, *Boechea*

Hazırlanan bu Yüksek Lisans TUBİTAK-Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından 104T043 no'lu projeden desteklenmiştir.

CHARACTERIZATION OF THE FIS GENE (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED) OF NATUREL APOMICT ARABIS SPECIES

ABSTRACT

In this study, the orthologs of *Arabidopsis thaliana* *FIS2* (*AtFIS2*) gene, *BhFIS2* and *BgFIS2*, were characterized from triploid apomict *B.holboellii* and *B.gunnisoniana* (*Brassicaceae*).

Total RNA from flower and silique tissue (where most abundant *FIS2* gene products available) were isolated and reverse transcribed into cDNA. Then, the *FIS2* gene ortologs were amplified by RT-PCR using *AtFIS2* primers and expected to obtain 2250 bp DNA bands. RT-PCR products separated in 0,5% agarose gel electrophoresis were stained with Ethidium Bromide and recorded on U.V. table. DNA bands were purified from gel and ligated into pJET1/blunt plasmid vector. Then, pJET/blunt plasmids were transformed to JM-109 and JM-107 compotent *Escherichia coli* cell line. Recombinant colonies were analysed by colony PCR. Plasmids were isolated from verified colonies. Recombinant plasmids were verified by restriction endonuclease digestion. Finally, PCR products were sequenced which revealed that 83-87% similarity to *AtFIS2* gene.

These results showed that *AtFIS2* gene orthologs, *BhFIS2* and *BgFIS2*, are present in triploid apomict *Boechea sp.*(*Brassicaceae*) and express during flower and silique development.

Keywords: *FIS2*, *FIE*, *MEA*, polycomb group proteins, *Arabidopsis thaliana*, *Boechea*

The present M.Sc. thesis was supported by TUBITAK-TBAG under the Project no of 104T043.

İÇERİK

	Sayfa
TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	12
BÖLÜM 3 – MATERYAL ve METOT.....	24
3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi.....	24
3.2. RNA İzolasyonu.....	24
3.3. RNA Jel Elektroforezi.....	25
3.3.1. FA jel elektroforezinde kullanılan tamponların hazırlanması.....	25
3.4. cDNA Sentezi.....	26
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	27
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.6.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması.....	29
3.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi.....	30
3.8. Klonlama Çalışması.....	30
3.8.1. Competent <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Hücrelerinin Hazırlanması.....	30
3.8.1.1. Competent <i>E.coli</i> Hazırlarken Kullanılan Besiyerleri ve Tamponların Hazırlanması.....	31
3.8.2. Ligasyon.....	33
3.8.3. Transformasyon.....	34
3.8.3.1. Transformasyonda Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....	35
3.8.4. Rekombinanat Kolonilerin Belirlenmesi.....	36
3.8.4.1. Koloni PCR.....	36
3.8.4.2. Plazmit Üzerinden FIS2 geninin PCR İle Çoğaltımı.....	37

3.8.4.3. Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzim Kesimi.....	37
3.9. Dizi Analizi.....	38
BÖLÜM 4 – BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi.....	39
4.2. RNA Analizleri.....	40
4.3. RT-PCR İle <i>FIS2</i> Geninin Amplifikasyonu.....	40
4.4. Klonlama Çalışmaları.....	44
4.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Analizleri.....	48
4.6. Dizi Analizi Sonuçları.....	50
BÖLÜM 5- SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR.....	I
TABLolar DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
YAŞAM ÖYKÜSÜ	XI

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Üreme, canlı olarak kabul edilebilmenin en önemli kriterlerinden biridir. Özellikle seksüel üreme, sadece canlının neslini devam ettirebilmesi için değil, genetik çeşitliliğin sağlanabilmesi için de son derece önemlidir. Diğer biyolojik sistemler gibi üreme de evrimsel süreçte pek çok değişikliğe uğramıştır. İlkel canlılarda görülen basit, aseksüel üreme şekilleri yerini zamanla seksüel üreme süreçlerine bırakmıştır.

Bitkilerde ise seksüel üreme pek çok karmaşık süreci birlikte barındırır. Bitkilerde hayat devri diploid sporofitik ve haploid gametofitik olmak üzere iki jenerasyon arasında değişmektedir. İlkel bitkilerin hayat devrinde bu iki evre hemen hemen eşit yer alırken, gelişmiş bitkilerde bu süreç sporofitik evre lehine olmuştur. Gametofitik evre sadece yumurta hücresi (embriyo kesesi) ve polen oluşumu ile sınırlandırılmıştır.

Gametofitik ve sporofitik gelişim süreçleri birbirlerinden kesin çizgilerle ayrılmış durumdadır. Sporofit bitkinin özelleşmiş üreme dokularında mayoz meydana gelene kadar asla gametofitik bir gelişim başlamaz. Aynı şekilde, gametofitik evrede, döllenme meydana gelene kadar sporofite özgü bir gelişim görülmez. Bu durumu kontrol eden sporofit ve gametofit özgü genler bulunmaktadır. Son on yılda bitkilerde üreme üzerine yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar diploid ve haploid evre arasındaki bu geçişin döllenme ile nasıl aktive edildiğini açıklayacak önemli kanıtlar sağlamaktadır.

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

A. thaliana'da, dişi gametofit (embriyo kesesi) angiospermiler arasında yaygın olarak görülen polygonum tiptedir (Reiser ve Fischer, 1993; Schneitz ve diğ., 1997). Polygonum tipte embriyo kesesi, nusellar dokudan köken alan Megaspore Ana Hücrelerinden (MAH) gelişir. MAH mayoz bölünmeye uğrayarak dört adet haploid (n) megaspore oluşturur. Bu megasporelerden sadece bir tanesi embriyo kesesini verir, diğer üç megaspore dejenerer olur (Grossniklaus ve Schneitz, 1998; Schneitz ve diğ., 1998; Yadegari ve Drews, 2004). Bu aşamada hayatta kalan megaspore üç defa arka arkaya sitokineze uğramaksızın mitoz geçirir. Böylelikle sekiz nükleusdan oluşan bir embriyo kesesi meydana gelir. Bu nükleuslardan üç tanesi kalazal kutupta antipodal hücreleri meydana getirir. Mikropolar kutuptaki üç nükleus ise bir yumurta ve iki sinerjit hücrelerini oluşturur. Diğer iki nükleus ise (polar nükleuslar) embriyo kesesinin merkezine göç eder ve tek bir hücre zarı ile çevrilerek dikaryotik merkezi hücreyi (2n) meydana getirir (Schneitz ve diğ., 1995; Drews ve diğ., 1998). Embriyo kesesi gelişimi devam ederken epidermal ve subepidermal kökenli hücre tabakaları mitoz bölünmelerle dış ve iç integümentleri oluşturur (Robinson-Beers ve diğ., 1992; Baker ve diğ., 1997; Schneitz, 1999).

Angiospermilerde erkek gametofit (polen) anterlerde meydana gelir. Polen Ana Hücreleri (PAH) mayoz bölünme ile dört adet haploid (n) mikrospore oluşturur. Megasporelerin tersine mikrosporelerin tamamı gelişimlerine devam edebilirler. Mikrosporeler olgun bir polen tanesi meydana getirmek için asimetrik bir mitoz bölünme ile büyüklükleri birbirinden farklı iki hücre oluşturur (Bedinger, 1992; McCormick, 1993, 2004; Yang ve Sundaresan, 2000). Büyük olan hücre vejetatif hücre olarak bilinir ve polen tüpü oluşumunda görev alır. Küçük olan hücre ise generatif hücre olarak bilinir ve vejetatif hücreye göre daha yoğun bir nükleusa ve daha az sitoplazmaya sahiptir. Generatif nükleus ikinci bir mitoz bölünmeye uğrar ve iki adet sperm nükleusu (n) meydana getirir (Mascarenhas, 1989; Chen ve McCormick, 1996).

Diğer seksüel üreyen angiospermiler gibi, *A. thaliana*'da da tohum, yumurta ve polar nükleusların sperm ile döllenmesi sonucunda sırasıyla embriyo ve endospermden oluşur. Embriyoda ebeveynlere (ana:maternal:m ve baba:paternal:p)

ait genomların oranı 1m:1p (2n) iken endospermde bu oran 2m:1p (3n)'dir (Faure ve diğ., 2002; Nowack ve diğ., 2006).

Buna karşın bazı angiospermlerde tohum dölllenme olmaksızın meydana gelir. Apomiktik üreme olarak bilinen bu mekanizma ilk kez 1841 yılında J. Smith tarafından *Alchornea* (*Euphorbiaceae*) bitkisinde tanımlanmıştır (Asker ve Jerling, 1992). Apomiksi günümüzde 400'den fazla angiosperm türünde ve 40'dan fazla familyada bilinmektedir. Özellikle *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae*'de yaygındır (Carman, 1997).

Apomiktik süreçlerle üreyen bitkilerde, embriyolar yumurta hücresinden dölllenme olmaksızın farklılaşır. Bu sebeple ana bitki ile genetik olarak özdeş dölleri meydana gelir. Günümüzde gametofitik ve sporofitik (adventif embriyonu) apomiksi olarak bilinen iki farklı apomiksi mekanizması tanımlanmıştır (Asker ve Jerling, 1992; Koltunow ve diğ., 1995). Sporofitik apomiksi ovül gelişiminin geç safhasında, genellikle olgun ovüllerde meydana gelir. Adventif embriyolar ovülün nüselları ya da integüment dokularından doğrudan farklılaşırlar. Gametofitik apomiksi ise ovül gelişiminin erken safhalarında başlar ve diplospori ve apospori olmak üzere ikiye ayrılır. Gametofitik apomiksinin her iki tipinde de embriyolar mayoz geçirmemiş bir megagametofitden oluşur. Fakat diplosporide embriyolar MAH farklılaştığı anda meydana gelirken, aposporide MAH farklılaştıktan sonra ortaya çıkarlar. Apomiktik embriyolar erkek gamet olmaksızın üretilirken, merkezi hücreler ya kendiliğinden (otonom) ya da dölllenme (pseudogami) ile endospermi geliştirirler (Koltunow, 1993).

Seksüel üremenin moleküler düzeydeki kontrolünün aydınlatılabilmesi için günümüzde üzerinde en çok araştırma yapılan seksüel model bitki türü *A.thaliana* olmuştur. Bu çalışmalarda, dölllenme olmadığı halde tohum gelişimine izin veren *A.thaliana* mutantları elde edilmiştir. Tohum benzeri yapılar meydana getiren apomiksi ile ilgili bu mutantlar, daha sonra karakterize edilmiş ve mutant fenotiplerinden dolayı *FIS* (*FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED: DÖLLENME-BAGIMSIZ TOHUM*) sınıfı genler olarak adlandırılmışlardır (Ohad ve diğ., 1996;

Chaudhury ve diğ., 1997, 1998; Grossniklaus ve diğ., 1998; Luo ve diğ., 1999). Bu genler; MEA(MEDEA, FIS1, EMB173/EMBRYO DEFECTIVE 173), FIS2, FIE(FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM, FIS3), MSI1(MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA, MEDICIS) ve BGA (BORGIA)'dır. *FIS* genlerinin günümüze kadar pek çok allelleri izole edilmiştir (Kiyosue ve diğ., 1999; Ohad ve diğ., 1999; Danilevskaia ve diğ., 2003; Köhler ve diğ., 2003a; Guitton ve diğ., 2004).

FIS genlerinde mutasyon meydana geldiğinde, çoğunlukla iki fenotip gözlenmektedir; (i) Merkezi hücrelerin döllenme olmaksızın endosperm gelişimini başlatması, (ii) döllenme sonrasında anadan gelen *FIS* gen allellerinin önemli, babadan gelen allellerin ise önemsiz olması.

fie ve *msi1* mutantlarında endosperm polar nükleuslardan kendiliğinden (otonom) gelişir. Fakat bu gelişim ancak serbest nuklear safhaya kadar devam eder, hücreleşme meydana gelmez. Bu mutantlarda, embriyo kesesinde bulunan diğer hücrelerde (yumurta, sinerjitler ve antipodal hücreler) herhangi bir mutant fenotip görülmez (Ohad ve diğ., 1996, 1999; Köhler ve diğ., 2003a; Guitton ve diğ., 2004). *fis2* ve *mea* mutasyonu taşıyan embriyo kesesinde de döllenme olmaksızın endosperm gelişimi söz konusudur, fakat *fie* ve *msi1*'den farklı olarak endospermde az da olsa hücreleşme meydana gelir. Ayrıca, mikropolar kutupta bazen embriyo benzeri yapılar oluşmaktadır. Bu yapılar ancak globular aşamaya kadar gelişebilmektedir (Chaudhury ve diğ., 1997; Grossniklaus ve diğ., 1998; Luo ve diğ., 1999). *bga* ile kazanılan mutant fenotip diğer *fis* genlerinin sebep oldukları fenotipe benzer fakat *fis* sınıfı mutantlarda görülen kendiliğinden endosperm gelişimi, *bga* mutantlarında çok daha düşük frekansta meydana gelmektedir (Guitton ve diğ., 2004).

fis mutasyonlarının döllenme öncesinde sebep oldukları diğer bir fenotip meyve oluşumu ve tohum kabuğu farklılaşmasıdır (Ohad ve diğ., 1996; Chaudhury ve diğ., 1997; Grossniklaus ve diğ., 1998). Yabancıl tip bitkilere ait tohumlarda bu yapılar, döllenme sonrasında ana bitkideki bazı sporofitik dokulardan farklılaşmaktadır (Vivian-Smith ve diğ., 2001).

fis mutasyonunu taşıyan bitkiler, döllenme izin verilirse dahi, embriyo ve endosperm gelişimi açısından yabancı tip ovüllerden farklılık gösterir. Yabancı tip embriyolarda globular aşamadan kalp aşamasına geçişte hücre bölünmesinde bir artış meydana gelirken mutant embriyolarda tersine bir azalma vardır. Mutant embriyolar ancak kalp aşamasının sonlarına kadar gelişebilmekte, torpedo aşamasına geçmeden kaybedilmektedir (Ohad ve diğ., 1996; Chaudhury ve diğ., 1997; Grossniklaus ve diğ., 1998). Buna karşın, *msi1* mutantlarında diğer *fis* sınıfı mutasyonlardan farklı bir fenotip gözlenmektedir. Bu mutasyonu taşıyan bitkilerde tohumların %36'sı preglobular-globular aşamada, geri kalanlar ise daha erken aşamalarda kaybedilmekte, çok az bir kısmı ise kalp aşamasına kadar gelişebilmektedir. Ayrıca, *msi1* mutantlarında yumurta ve polar hücrelerin çift döllenmesi de bozulmuştur. Bu nedenle, diğer *fis* mutantlarında endosperm bir döllenme ürünü iken, *msi1*'de sadece ana bitkiden kendiliğinden gelişir (Guitton ve diğ., 2004). Bu sonuçlar, dişi ebeveyninden aktarılan mutant *fis* allelinin embriyodaki hücre çoğalmasını ve morfogenezini baskıladığını göstermektedir.

fis mutantlarının, döllenme sonrası endosperm gelişimi de yabancı tipten oldukça farklıdır. Yabancı tip tohumlarda embriyo kalp aşamasına geçtiğinde endospermde hücreleşme meydana gelir ve hücre bölünmesinde azalma görülür (Sørensen ve diğ., 2001). Oysa *fis* mutantlarında hücreleşme az miktarda meydana gelir ve endosperm nükleusları bölünmeye devam eder. Bu sebeple *fis* mutantı tohumlar, aynı harnup (silique) içindeki yabancı tip tohumlardan daha büyüktürler. Ayrıca yabancı tip tohumların endospermelerinde görülen mikropolar, kalazal ve periferik endosperm kısımları *fis* mutantlarında ayırt edilemez. Normalde kalazal kutupta yer alması gereken kistler mutant tohumların endospermde daha büyüktür ve endospermde farklı bölgelerinde de bulunur. Bu durum *FIS* genlerinin, döllenmeden sonra endospermdeki anterior-posterior ekseninin oluşumunda düzenleyici bir görev yaptığını göstermektedir (Ohad ve diğ., 1996; Chaudhury ve diğ., 1997; Grossniklaus ve diğ., 1998; Sørensen ve diğ., 2001;).

Ayrıca *FIS* genlerinin genellikle üreme organlarında, özellikle döllenme öncesinde dişi gametofitte ve döllenme sonrasında gelişen endospermde ve embriyoda ifade edildiği bildirilmiştir (Luo ve diğ., 2000).

fis mutasyonlarının sebep olduğu fenotipler ve bu genlerin ifade olduğu dokular, *FIS* genlerini gametofitik ve sporofitik gelişim evreleri arasındaki geçişte önemli düzenleyiciler olduğunu göstermektedir. *FIS* genleri döllenme meydana gelene kadar merkezi hücrenin bölünmesini baskılayarak gametofitik süreçte sporofitik gelişimi engellemektedir. Ancak döllenme ile bu baskılanma ortadan kalkmakta ve sporofitik gelişim aktive edilmektedir. Bu düzenleme mekanizmasını aydınlatılmak için daha sonraki çalışmalar *FIS* gen ürünleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

FIS genlerinin kodladığı proteinler, memelilerde ve *Drosophila*'da tanımlanmış polycomb grup (PcG) proteinlere dahil edilmektedir (Grossniklaus ve diğ., 1998; Kiyosue ve diğ., 1999; Ohad ve diğ., 1999; Chaudhury ve diğ., 2001). *Drosophila* ve memelilerde embriyo gelişimi PcG ve trithorax grup (trxG) genlerin kontrolü altındadır. Bu proteinler diğer homeotik genlerin düzenleyicisi olarak rol almaktadır (Pirrotta, 1997; Köhler ve Grossniklaus, 2002; Guitton ve Berger, 2005). Ayrıca hücre bölünmesinde de görev almaktadırlar ve bu genlerde meydana gelen mutasyonların kansere neden olduğu bildirilmiştir (Valk-Lingbeek ve diğ., 2004). PcG ve trxG gen ailesi, birbirleri ile antagonistik fonksiyonlara sahiptirler. PcG proteinler, çeşitli kompleksler oluşturarak belirli hedef lokusları histon deasetilasyon ve histon metilasyon yoluyla kromatin yapısını değiştirerek baskılayarak trxG proteinler, homeotik genlerin aktivasyonu için gereklidirler (Jones ve Gelbart, 1993; Köhler ve Grossniklaus, 2002; Simon ve Tamkun, 2002).

Drosophila'da PcG proteinler, Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) ve PRC2 olmak üzere iki temel kompleks oluştururlar. PRC2 kompleksine dahil olan proteinler; Enhancer of Zeste (E(z)), Extra Sex Combs (ESC), Suppressor of Zeste (SU(z)12) ve p55'dir (Tie ve diğ., 2001; Wang ve Ma, 2007). Bu kompleksteki E(z), SET domaini içeren bir proteindir. SET domainli proteinler, H3 histonu 27.lizin

kalıntısını metilleyerek PRC1 kompleksinin tanınması için epigenetik işaret oluşturur. PRC1 kompleksi ise hedef genlerin transkripsiyonlarını kromatin remodeling mekanizması ile baskılar (Jenuwein ve diğ., 1998; Müller ve diğ., 2002; Yeates, 2002; Qian ve Zhou, 2006; Wang ve Ma., 2007;).

Bugüne kadar bitkilerde PRC1 benzeri bir kompleks bulunamamış olmasına karşın, dizi analizleri sonucunda *MEA*, *FIS2*, *FIE* ve *MSI1* genlerinin kodladığı proteinlerin sırasıyla, *Drosophila* PRC2 kompleksinin proteinleri E(z), Su(z)12, ESC ve p55 ile büyük oranda homoloji gösterdiği bildirilmiştir (Grossniklaus ve diğ., 1998; Kiyosue ve diğ., 1999; Luo ve diğ., 1999; Ohad ve diğ., 1999; Wang ve Ma., 2007).

Bitkilerde, üç farklı PRC2 kompleksi tanımlanmıştır; FIS, EMF ve VERN (Chanvivattana ve diğ., 2004; Katz ve diğ., 2004; Steimer ve diğ., 2004). Tohum gelişiminde rol alan FIS kompleksi, MEA-FIE PcG kompleks olarak da bilinir. FIS2, MSI1 ve henüz tanımlanmamış başka proteinlerle de etkileşime girerek döllenme öncesinde endospermin kendiliğinden gelişimini engeller (Yadegari ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2006). Buna karşın, bu kompleksin hedef geni izole edilip klonlanmış ve *PHERES* (*PHE*) olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.1) (Köhler ve diğ., 2003b, 2004; Chanvivattana ve diğ., 2004).

Drosophila PRC2



FIS kompleksi



PHERES

Şekil 1.1. Drosophila PRC2 kompleksi ile FIS kompleksi benzerliği (Chanvivattana ve diğ., 2004'den uyarlanmıştır)

PHE tip1 MADS-box genler sınıfına dahil edilmiştir ve dişi gametofitte ifade olmaz. Buna karşın, döllenmeden sonra geçici bir süre endosperm ve embriyoda ifade olur. Fakat *mea* mutantlarında *PHE* ifadesinin döllenme öncesinde başladığı ve sonrasında embriyo ölümüne kadar yüksek miktarda devam ettiği bildirilmiştir (Köhler ve diğ., 2003b, 2004).

fis mutantlarında döllenme sonrasında embriyo kaybı, mutant allel sadece dişi gametofit ile aktarıldığında meydana gelmektedir. *FIS/fis* bitkiler ile yabancı tip bitki polenleri melezlendiğinde normal ve mutant fenotipli embriyoların oranı 1:1'dir. Bu oran *FIS/fis* bitki kendine döllendiği zaman da değişmemektedir. Resiprokal çaprazlama ile oluşan tohumlarda ise mutant fenotip gözlemlenmemektedir (Ohad ve diğ., 1996; Chaudhury ve diğ., 1997, 1998; Grossniklaus ve diğ., 1998; Luo ve diğ., 1999). Bu sonuçlar, *fis* mutasyonlarının dişi gametofit üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Buna karşın, *mea* ve *fis2* mutasyonları dişi gametofitle çok düşük oranlarda döllere aktarılabilir. Bu durum homozigot mutant bitkilerin analiz edilmesine olanak sağlamıştır. *fis/fis* homozigot bitkiler sporofitik gelişimlerinde herhangi bir anormallik göstermezler. Fakat bu bitkilerde döllenme sonrasında, harnupların tamamı mutant fenotip gösterir (Kiyosue ve diğ., 1999; Luo ve diğ., 1999). *bga* ise diğer *fis* genlerine göre dişi gametofitle daha yüksek bir oranda (%22) aktarılır. Buna karşın, *msi1* mutasyonunun dişi gametofitle aktarımı imkansızdır. Ayrıca polenle aktarımı da büyük ölçüde (%36,2) azalmıştır (Guitton ve diğ., 2004).

Başlangıçta bu sonuçlar birkaç şekilde yorumlanmıştır; (i) *FIS* genleri döllenmeden önce sentezlenen ve döllenmeden sonra fonksiyon gösterebilmek için biriktirilen bir ürün olabilir. (ii) Alternatif olarak endospermdeki 2m:1p oranından dolayı *FIS* genleri dozaja bağlı etki gösterebilir. Bu durumda dişi gametofitten gelen 2 mutant allele karşılık, polenden gelen 1 yabancı tip allel embriyo ölümlerini durduramaz. (iii) Son olarak, *FIS* genlerinin genetik etiketleme (imprinting) ile kontrol edildiği ve polende bu genlerin ifade olmadığıdır (Yadegari ve diğ., 2000; Dilkes ve Comai, 2004).

Memeli ve çiçekli bitkilerde bazı genler köken aldıkları ebeveynin cinsiyetine göre genetik olarak etiketlenir. Genetik etiketleme denilen bu durumda genler köken aldığı ebeveynlerin cinsiyetine göre ifade olur. Böylece her bir ebeveyninden, döllere aktif allelerin sadece bir seti aktarılmaktadır (Adams ve diğ., 2000; Grossniklaus ve diğ., 2001). Bu yüzden genetik etiketleme, geleneksel Mendel kalıtım kurallarının tersine, dişi ve erkek ebeveyninden katılan genlerin eşit oranda ifade olmasına engel olmaktadır (Chaudhury ve diğ., 2001; Gutierrez-Marcos ve diğ., 2003).

Bugüne kadar genetik etiketleme daha çok memelilerde çalışılmıştır. Etiketleme, memelilerde özellikle embriyo gelişimi için önemlidir ve bu mekanizma ile düzenlenen genlerin çoğu plasentada ifade olmaktadır (Vielle-Calzada ve diğ., 1999). Bitkilerde ise endosperm anne bitkiye ait kaynakların embriyoya transferinde plasenta ile analogdur. Bu nedenle endosperm gelişimi için önemli olan *FIS* genlerinin de memelilerdeki genler gibi imprinting ile düzenlenebileceği üzerinde durulmuştur. *GUS* reporter geni ve tek nükleotit polimorfizmine dayalı tekniklerle yapılan gen ifadesi çalışmalarında, tohuma polenden aktarılan *FIS* genlerinin embriyo ve endosperm gelişiminin ilk aşamalarında suskun olduğu, ancak gelişimin sonlarına doğru aktivite kazandıkları bildirilmiştir (Grossniklaus ve diğ., 1998; Kiyosue ve diğ., 1999; Luo ve diğ., 1999). Sonraki yıllarda, embriyo ve endosperm gelişiminin ilk aşamalarının dişi ebeveynin kontrolü altında olduğunu ve erkek ebeveyninden aktarılan genomun büyük çoğunluğunun suskun olduğunu kanıtlayan pek çok çalışma yapılmıştır (Grimanelli ve diğ., 2005).

FIS sınıfı genler seksüel süreçlerle üreyen *A. thaliana*'da döllenme meydana gelene kadar kendiliğinden endosperm gelişimini baskılamaktadır. Döllenme olmaksızın endosperm gelişimi ise apomiksinin bir parçasıdır. Bu sebeple *FIS* sınıfı genler farklı düzenlenmelerle apomiktik üreme süreçlerinde de görev alabilir. Bu iki üreme mekanizmasının moleküler düzeydeki yakınlıklarının aydınlatılabilmesi için doğal apomikt bitkilerde de *FIS* sınıfı genlerin karakterize edilmesi gerekmektedir.

Apomikt dölleri hem bitki ıslahı hem de tohum üretimi için büyük öneme sahiptir. Günümüzde apomiksinin, ticari öneme sahip bitki türlerine aktarılması için

araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar özellikle doğal apomikt turler ve model seksüel bitki turleri üzerinde yürütölmektedir (Koltunow ve diğ., 1995). Bu çalışmalar genellikle seksüel bitkiler ile yakın akraba apomikt turlerin hibritlenmesini kapsamaktadır. Fakat daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi için hem apomiktik üreme süreçlerinin hem de seksüel üreme süreçlerinin moleküler düzeydeki mekanizmasının iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Doğal apomikt bitkilerdeki üreme mekanizması, seksüel üreyen kültür bitkilerine aktarılabilirse bu tarımda büyük bir ilerlemeye olanak sağlayacaktır. Apomiktik üreme sayesinde hibrit bitkilerde genetik stabilite sağlanabilecek ve böylece ileriki generasyonlarda genetik açılımlara bağlı olarak meydana gelen ürün kaybının önüne geçilebilecektir. Ayrıca hibrit bitkiler tohum kaynağı olarak kullanılabilirler ve bu da hibrit tohumların doğrudan üreticiler tarafından çoğaltılabilmelerine olanak sağlayacaktır. Apomiksi sebze, meyve ve süs bitkilerinin üretiminde kullanılan zahmetli ve pahalı bir çoğaltım şekli olan doku kültürlerinin yerini alabilecektir. Vegetatif olarak üretilen bitkiler tohumla üretilebilecek ve bu sayede vegetatif üretim sırasında taşınan bazı mikrobiyal hastalıklar engellenebilecektir. Ayrıca otonom apomiksinin erkek steril varyetelere aktarılması ile transgenik karakterlerin yayılması engellenebilecek ve böylece ekolojik dengenin korunması söz konusu olabilecektir.

Bu çalışmada triploid apomikt *Boecheira holboellii* ve *Boecheira gunnisoniana* turlerinden, *A. thaliana FIS2 (AtFIS2)* gen ortoloğu izole edilip klonlanmıştır. Çalışmada kullanılan turler daha önce morfolojik karakterlerine dayanılarak *Arabis* genusuna dahil edilmekteydi. Fakat kromozom sayısı ($n=7$) ve moleküler marker çalışmaları ile bu turlerin *Arabis* genusunda yer alan diğer turlerden bağımsız olduğunu göstermiştir. Bu sebeple *Arabis* adı *Boecheira* olarak değiştirilmiştir (Al-Shehbaz, 2003).

Boecheira, *Brassicaceae* familyasına dahildir ve bir çok moleküler genetik uygulamasının mümkün olduğu *A. thaliana* ile yakın akrabadır (Koch, 2003; Dobes ve diğ., 2004). Bu sebeple apomikt *Boecheira* turleri apomiksinin moleküler

biyolojisini çalışmak için model organizma olarak tercih edilmektedir. *Boechera* türlerinde hem triploid hem de diploid seviyede apomiksi gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan türlerde pseudogamik fakültatif apomiksi bildirilmiştir (Roy, 1995; Naumova ve diğ., 2001; Taşkın ve diğ., 2004).

FIS genlerinin apomikt bitkilerdeki fonksiyonu henüz belirlenmemiştir. Bu nedenle, doğal apomikt türlerde *FIS* genlerinin ortologlarının tanımlanması, bu genlerin apomiktik üreme süreçlerindeki rollerini aydınlatmada yararlı olacaktır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ohad ve diğ. (1996), *A. thaliana*'da döllenme bağımsız tohum gelişimi başlatan mutant hatlar izole etmişlerdir. Bu mutantlarda, ovüllerin %50'sinde döllenme bağımsız, kendiliğinden endosperm gelişimi başladığı gözlenmiştir. Ayrıca bu gelişimin harnup uzaması ve tohum kabuğu farklılaşmasını da tetiklediği bildirilmiştir. Bu mutasyona sebep olan gen izole edilmiş ve fenotipinden dolayı *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM* (*FIE*:döllenme bağımsız endosperm) olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmada ayrıca *fie* mutasyonunun genetik kalıtımını da analiz edilmiştir. Bu amaçla *FIE/fie* mutant ve *FIE/FIE* yabanıl tip bitkiler melezlenmiştir. *FIE/fie* dişi ebeveyn ve *FIE/FIE* erkek ebeveyn olarak kullanıldığında, tohumların %50'si gelişimlerini tamamlayamamıştır. Bu durumun resiprokal çaprazlamasında ise dölenen ovüllerin hepsi gelişimlerini tamamlayabilmiş ve tohum oluşturabilmiştir.

Chaudhury ve diğ. (1997), *A.thaliana*'da üç farklı kromozomda üç farklı *FIS* geni haritalamışlardır (*FIS1*, *FIS2*, *FIS3*). Sırasıyla 1. ve 2. kromozom üzerinde haritalanan *fis1* ve *fis2* mutasyonlarının, döllenme olmaksızın endosperm gelişimine yol açtığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu mutant ovüllerin bazılarında yumurta hücrenin de döllenme olmaksızın embriyo benzeri yapılar oluşturduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın 3. kromozom üzerinde haritalanan *fis3* mutasyonunda embriyo benzeri yapılar bildirmemişlerdir. *fis* mutasyonlarının dişi gametofit üzerine etkili olduğunu kanıtlamışlardır.

Grossniklaus ve diğ. (1998), *Arabidopsis thaliana*'da üreme sürecine etki eden *MEDEA* (*MEA*) genini izole etmişlerdir. *mea* mutasyonu döllenme bağımsız endosperm gelişimine sebep olmuştur. *MEA/mea* heterozigot mutantlar döllendiklerinde, %50 normal ve %50 aşırı büyük fenotipe sahip tohumlar meydana getirmişlerdir. Bu büyük embriyoların torpedo aşamasına kadar hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Embriyodaki hücre bölünmesi artışına karşın endosperm gelişiminin

yabani tip bitkilere oranla daha yavaş olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak *mea*'nın embriyogenez sırasında hücre çoğalmasını kontrol edebileceğini önermişlerdir. Ayrıca mutant genin sadece dişi ebeveyn aracılığı ile döllere aktarıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada *MEA* cDNA'sı klonlanıp sekanslanmıştır ve *Drosophila*'nın *Enhancer of zeste [E(Z)]* geni ile benzer olduğu bulunmuştur. E(Z) proteininin homeotik genlerin regülasyonundan sorumlu polycomb group bir protein olduğunu ve bu iki protein arasındaki benzerliğin COOH ucunda bulunan SET domaini bölgesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Luo ve diğ. (1999), *A. thaliana*'da döllenme öncesinde endospermin gelişmesine engel olan baskılayan ve döllenmeden sonra embriyo gelişimini kontrol eden *FIS1* ve *FIS2* genlerini klonlamışlardır. *FIS1*'in *Drosophila*'nın PcG proteini E(Z)'ye benzer bir protein kodladığını ve bu benzerliğin özellikle C-terminal ucundaki SET domaininde ve sistince zengin bölgede (CXC) %65 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Genetik ve fiziksel haritalama çalışmaları sonucunda *FIS1*'in *MEA*'nın mutant alleli olduğunu göstermişlerdir. İki mutant allelin sebep oldukları fenotiplerin farklılık göstermesinin sebebini, genin farklı bölgelerinde mutasyon meydana gelmesi ile açıklamışlardır. Buna göre *fis1* pek çok protein domaininden yoksunken *mea*'da sadece C-terminalinde bulunan SET domain bölgesinde farklılıklar görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada *FIS1* proteininin E(Z)'ye benzerliğine ek olarak, floral homeotik gen ekspresyonunu düzenlemede görev alan, CURLY LEAF (CLF) ile %39 benzerlik ve SWINGER (SWN/EZA1) ile %49 benzerlik gösterdiği de bildirilmiştir. *FIS2*'nin yüksek serin içeriğine sahip C₂H₂ zinc-finger motifli bir protein olduğunu ve üç nükleer lokalizasyon sinyali içerdiğini belirtmişlerdir ve bu sebeple *FIS2*'nin bir transkripsiyon faktörü olabileceğini önermişlerdir.

Kiyosuo ve diğ. (1999), *A. thaliana*'dan kendiliğinden endosperm gelişimini başlatabilen *MEA* geninin mutant bir alleli olan *f644* mutasyonunu izole etmişlerdir. *F644* geni klonlanıp sekanslanmış ve bir SET domain PcG protein kodladığını bulunmuştur. Bu mutasyonun da diğer *fis* mutasyonları gibi embriyo ve endosperm

gelişiminde zıt etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca *f644* mutasyonunun polen ile aktarılmadığını bildirmişlerdir.

Ohad ve diğ. (1999), *A. thaliana*'dan *FIE* genini klonlamışlardır. Bu genin *Drosophila* (Esc) ve memelilerdeki (Eed) WD motifi içeren ve homeotik genleri baskılamada görev alan PcG proteinlere homolog bir protein kodladığını bildirmişlerdir. *fie* mutasyonunun dişi gametofitte, merkezi hücrelerin döllenme olmaksızın kendiliğinden endosperm gelişimine sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda *FIE* PcG proteininin fonksiyonunun, döllenme meydana gelene kadar endosperm gelişimini baskılamak olduğunu bildirmişlerdir.

Vielle-Calzada ve diğ. (1999), *A. thaliana*'da *MEA* geninin genetik etiketleme ile düzenlendiğini göstermişlerdir. *MEA* geninin sadece ana bitkiden köken aldığında aktif protein kodladığını, buna karşın polenden gelen allelin hem embriyo hem de endospermde transkripsiyonel olarak suskun olduğunu belirtmişlerdir. Bu baskılanmada DNA metilasyonunun rol oynadığını önermişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *MEA*'nın genetik etiketlemeye uğrayan bir gen olduğunu ve polendeki durumunun DNA metilasyonu ile ilgili olduğunu önermişlerdir.

Kinoshita ve diğ. (1999), *mea* mutantlarına, ana ve baba bitkiden katılan allellerin etkilerin araştırmışlardır. Bu amaçla, F1 döllerinde dişi ve erkek ebeveyne ait *MEA* mRNA'larının ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. Ebeveynlere ait *MEA* mRNA'larının ayırımını yapabilmek için tek nükleotit polimorfizmi gösteren iki türü ebeveyn olarak kullanmışlardır; *Arabidopsis Landsberg erecta* (*Ler*) ve *RLD*. *MEA* mRNA'larının seviyesini *Ler* ve *RLD* ekotiplerinin hibritlenmesi ile elde edilen F1 tohumlarında ölçmüşlerdir. Tohumları döllenmeden sonra 4, 6, 7, ve 8 günlerde hasat etmişler ve tüm aşamalarda her iki ebeveyne ait mRNA'ların tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Fakat maternal mRNA'nın daha yüksek seviyede eksprese olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca embriyoda iki ebeveyne de ait mRNA'ları tespit ettiklerini, endospermde ise ekotipe bağlı olarak farklılıklar gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre, *MEA*'nın özellikle endospermde monoallel olarak ifade olduğunu

ve *mea* mutantlarında görülen embriyo ölümüne endosperm fonksiyonundaki hataların sebep olabileceğini önermişlerdir.

Adams ve diğ. (2000), *A. thaliana*'da tohuma, ana ve baba bitkiden katılan genlerin ifadelerini araştırmışlardır. Çalışmada genetik etiketleme üzerine DNA metilasyonu ilişkisi antisense *METHYLTRANSFERASE 1 (MET1a/s)* ile gösterilmiştir. Bu sayede metillenmesi büyük oranda engellenmiş transgenik bitkiler ile yabancı tip diploid bitkiler arasında melezlemeler yapmışlardır. Sonuçta ploidi düzeyleri birbirinden farklı bitkiler arasındaki melezlemelerden elde edilen tohumlara benzer döller oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Buna göre, 2X *MET1a/s* bitkiler dişi ebeveyn ve yabancı tip 2X bitkiler de polen verici olarak kullanıldığında tohumlar 2Xx4X döllerini ile benzer fenotip oluşturmuştur. Bu tohumlarda endosperm normalden fazla geliştiği, geç hücreleştiği ve bu sebeple tohumların daha ağır olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak bitkilerde genetik etiketlemenin DNA metilasyonu ile ilgili olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca, *MET1a/s* geninin bitkideki metilasyon durumunu değiştirdiğini, normalde diğer ebeveynle aktarıldığı zaman aktif olan genlerin ifadesine yol açtığını bildirmişlerdir.

Spillane ve diğ. (2000), *FIE* ve *MEA* RNA'sı ve proteininin *in vivo*'da lokalizasyonlarını belirlemişlerdir. *MEA* ve *FIE*'in hücrede, özellikle nükleusta lokalize olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca *FIE* ve *MEA*'nın mayada fiziksel olarak etkileşimde olduğunu bulmuşlardır. Bu iki proteinin etkileşiminin *Drosophila*'daki ortologları E(z) ve ESC gibi *MEA*'da bulunan amino terminal bölgesi aracılığı ile olduğunu bildirmişlerdir. *MEA* ve *FIE*'in, etkileşimde oldukları için bu genlerin *in vivo*'da benzer şekilde ifade olduklarını önermişlerdir. *FIE* ve *MEA*'nın yumurta, merkezi ve sinerjit hücrelerinde ve döllemeden sonra embriyo ve endosperm erken gelişim aşamalarında aynı anda ifadesinin olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak, *MEA*'nın *FIE*'in transkripsiyonel düzenleyicisi olup olmadığını test etmek için *mea* mutant bitkilerde *FIE*'in ifadesini incelemişlerdir. Sonuç olarak mutant bitkilerde *FIE* mRNA ifadesinde bir değişiklik görülmediğini bildirmişlerdir.

Luo ve diğ. (2000), β -glucuronidase (*GUS*) aktivitesi sonuçlarına dayanarak *FIS* genlerinin ifade oldukları yeri ve zamanı belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre; *FIS2* geni, döllenmeden önce polar nükleuslarda ifade edilmektedir. Ayrıca sinerjitlerde ve yumurta hücresinde de bazen düşük oranda gözlenmektedir. Döllenmeden sonra *FIS2* aktivitesi öncül endosperm hücresinde ve sonrasında serbest endosperm nükleuslarında gözlemlenmiştir. Endospermin hücreleşme aşamasında *FIS2* aktivitesinin durduğu fakat kalazal kistte devam ettiği bildirilmiştir. *MEA* ifadesinin *FIS2*'ye benzediğini, fakat nükleusların etrafındaki lokalizasyonlarının daha çok yayılmış olduğunu bildirmişlerdir. *FIE* ifadesinin, döllenme öncesinde embriyo kesesinde ve antesisten önce polen mikrosporunda olduğunu fakat olgun polende ifade edilmediğini gözlemlemişlerdir. Döllenme sonrasında ise embriyoda, serbest endosperm hücresinde *FIE* geninin ifade olduğunu ve aktivitenin hücreleşmiş endospermde de devam ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca harnup, stamen, yaprak gibi bazı sporofitik dokularda da *FIE* aktivitesi olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada aynı zamanda *FIS* genlerinin erkek ebeveynden gelen allellerinin ifadeleri de incelenmiştir. Polenle aktarılan *MEA* allelinin, döllenmeden 48 saat sonra kalazal kistte ve bazende embriyoda, *FIE* allelinin, döllenmeden 4 güne sonra hücreleşmiş endospermde ve erken kalp aşamasındaki embriyoda ifade olmaya başladığını ve *FIS2* allelinin ise gelişimin hiçbir aşamasında ifade olmadığını bildirmişlerdir.

Yadegari ve diğ. (2000), Arabidopsis *FIE* ve *MEA* proteinlerinin fiziksel olarak etkileşimde olduğunu ve bu etkileşimin *MEA*'nın amino terminali aracılığı ile olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak her iki genin de babadan gelen allellerinin suskun olduğunu fakat tohum gelişiminin ilerleyen aşamalarında farklı zamanlarda ifade edilmeye başladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca polende homozigot *ddm1* mutasyonunun *mea* mutant fenotipini engelleyebildiğini, buna karşın *fie* fenotipini önleyemediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre *FIE* ve *MEA* genlerinin aktarıldıkları ebeveyne bağlı olarak tohum gelişimi sırasında ifade edildiklerini ve bu genetik etiketleme mekanizmasının iki gende birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Vinkenoog ve diğ. (2000), *A. thaliana*'da metilasyon seviyesi düşürülmüş *fie-1* mutantlarında kendiliğinden endosperm gelişimini incelemişlerdir. Normalde *fie-1* mutantlarında otonom endosperm gelişimi bir aşamadan sona bloke olur, hücreleşme meydana gelmez ve endospermde bölgesel farklılaşma olmaz. Fakat metilasyon seviyesi azaltılmış *fie-1* mutantlarında kendiliğinden gelişen endospermde hücreleşmenin oluşunu bölgesel farklılaşma görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca, babadan gelen *FIE* allelinin demetilasyonla reaktivasyonunu araştırmışlardır. Bu amaçla *fie/FIE* dişi ebeveyn ile *MET1 a/s* transgeni taşıyan bitkileri melezlemişlerdir. Oluşan tüm tohumların gelişimlerin tamamlayabildiklerini fakat 1:1 oranında iki farklı fenotip gösterdiklerini bildirmişlerdir. küçük olan tohumların *FIE/FIE* genotipine daha büyük olan tohumların ise *fie/FIE* genotipine sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu sebeple, hipometilasyonun *fie* mutant tohumlarındaki letal fenotipi engelleyebileceğini önermişlerdir.

Vinkenoog ve Scott (2001), seksüel üreyen bitkilerde, endosperm gelişiminde ebeveyn genom oranının önemini ve otonom apomikt bitkilerde tohumun bu dengeye ihtiyaç duymadan nasıl geliştiğini tartışmışlardır. Tohum gelişimi için endospermde 2m:1p (2 maternal:1 paternal) oranı son derece önemlidir. Bu dengenin her iki yönde de bozulması tohumda anormal gelişime ve embriyo kaybına neden olmaktadır. Farklı ploidi seviyelerine sahip bitkiler arasında yapılan melezlemelerde 2m:1p oranı değişir. Bu değişiklik özellikle endosperm üzerinde etkilidir. Araştırmacılar, babadan gelen genlerin endosperm gelişimini teşvik ettiğini, anneden gelen genlerin ise endosperm gelişiminin baskıladığını belirtmişlerdir. Ayrıca otonom apomiktlerde endosperm döllene olmaksızın kendiliğinden geliştiği için bu bitkilerde normalde annede suskun olan teşvik edici genlerin aktif olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kinoshita ve diğ. (2001), *pFIE::FIE-GFP* transgeni kullanarak *A. thaliana*'dan homozigot mutant *fie-1* bitkileri elde etmişlerdir. Bu transgenik bitkilerdeki vejetatif gelişim sürecini analiz ederek *FIE*'nin çiçeklenmeyi baskılayan bir gen olduğunu bildirmişlerdir. Homozigot *fie* mutant bitkilerinde sürgün apikal meristeminin bir çiçek gibi geliştiğini gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak hipokotil ve kökte de çiçek

benzeri yapılar oluştuğunu ve mutant bitkilerin embriyolarında çiçeklenmeyi teşvik edici genlerin ifade oluşunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre *FIE*'nin yabanıl tip fonksiyonunun hem tohum gelişimi hem de vejetatif gelişim süreci için önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Grossniklaus ve diğ. (2001), *fis* mutantlarının ebeveyne özgü etkilerini ve tohum gelişimi için genetik etiketlemenin önemini ele almışlardır. Tüm *fis* sınıfına dahil edilen mutantlarda iki ortak fenotip gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu fenotipler; endospermin döllenme olmaksızın kendiliğinden gelişmeye başlaması ve döllenmeden sonra embriyonun gelişimini tamamlayamadan kaybedilmesidir. Buna göre, *FIS* genlerinin asıl rolünün, endospermden hücre çoğalmasını düzenlemek olduğunu ve embriyo üzerinde ikincil bir etkiye sahip olduğunu önermişlerdir. Ayrıca *fis* mutantlarında metilasyon seviyesi azaltılmış bitkilerle yapılan denemelerin sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Bu denemelerde kullanılan bitkilerde metilasyon seviyesi, *ddm1* mutasyonu ya da antisense *MET1a/s* ile azaltılmıştır. Araştırmacılar bu şekilde bir uygulamanın tüm genomu etkileyeceğini ve polende başka genlerin de aktive olabileceğini belirtmişlerdir.

Choi ve diğ. (2002), *A. thaliana*'dan üç mutant *dme* alleli (*dme-1*, *dme-2*, *dme-3*) izole etmişlerdir. *DME*'nin DNA glycosylase ve nükleer lokalizasyon domainli 1729 aa'lık büyük bir protein kodladığını göstermişlerdir. Bu proteinin merkezi hücredeki ve endosperdeki anneye ait *MEA* geninin ifadesi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, *DME*'nin döllenmeden sonra endosperm ve embriyoda ifade edilmediğini göstermişlerdir. Endospermden *DME*'nin ifade olması durumunda, normalde suskun olan babadan gelen *MEA* allelinin aktivasyonuna sebep olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, *DME*'nin *FIE* ve *FIS2* üzerinde bir etkiye sebep olmadığını bildirmişlerdir.

Danilevskaya ve diğ. (2003), mısır bitkisinden *fie* geninin iki allelini (*ZmFIE1* ve *ZmFIE2*) klonlamışlardır. Her iki allelin dizi analizini yapmışlardır. Ayrıca ovülde döllenmeden önce ve sonra *FIE* geninin ifadesini araştırmışlardır. *FIE* genlerinin mısırdaki 13 ekzon içerdiğini belirlemişlerdir. *ZmFIE1* ve *ZmFIE2* genlerinin 1. ve 13.

ekzonları hariç tüm ekzonlarının %78 oranında homoloji paylaştığını göstermişlerdir. Ayrıca bu genlerin *Arabidopsis FIE* geni ile aynı büyüklükte olduğunu bulmuşlardır. *ZmFIE1*'in 13 intron ve *ZmFIE2*'nin 12 introna sahip olduğunu göstermişlerdir. *ZmFIE1*'in sadece gelişmekte olan danelerde, *ZmFIE2*'nin ise hem danelerde hem de vejetatif dokularda ifade olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca *ZmFIE1*'in döllenmeden sonra özellikle endospermde ifade olduğunu, *ZmFIE2*'nin ise embriyoda daha yüksek oranda ifade olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlara ek olarak, babadan gelen *ZmFIE1* allelinin danelerde suskun kaldığını, *ZmFIE2* allelinin ise *Arabidopsis*'e ait *FIE* geni gibi döllenmeden beş gün sonra ifade olmaya başladığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, mısır bitkisinde *FIE* allellerinin farklı fonksiyonları olduğunu ve farklı atasal genomlardan köken aldıklarını önermişlerdir.

Köhler ve diğ. (2003a), *A. thaliana*'da dişi gametofit üzerine etkisi olan *msi1* mutantlarını izole etmişlerdir. *msi1* diğer *fis* sınıfı mutantları gibi döllenme olmaksızın kendiliğinden endosperm gelişimine yol açmaktadır. Ayrıca, *msi1* mutantlarında embriyoların %50'sinin gelişimlerini tamamlayamadığını göstermişlerdir. Fakat diğer *fis* sınıfı mutasyonlar ile karşılaştırıldığında bu embriyoların farklı aşamalarında gelişimlerinin durduğunu bildirmişlerdir. Bu mutasyon polen ile sonraki döllere aktarılmamaktadır. Ayrıca *msi1* mutasyonunun çifte döllenmeyi bozduğunu, döllenmenin sadece yumurta hücresinde meydana geldiğini, endospermin diploid olarak kendiliğinden geliştiğini bildirmişlerdir. Protein analizleri sonucunda *MSI1* geninin WD-40 motifi içeren PcG bir protein olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *MSI1*'in *FIE* ve *MEA* ile 600 kDa'luk bir komplekste bir arada bulduklarını ve *FIE* ile direkt etkileşimde olduğunu göstermişlerdir. *MEA* ile etkileşiminin *FIE* aracılığı ile olduğunu bildirmişlerdir. *MEA*, *FIE* ve *MSI1*'in moleküler büyüklükleri 168 kDa olarak bulunduğu için bu komplekste başka alt ünitelerin de bulunabileceğini belirtmişlerdir. PcG proteinlerin belirli hedef lokusları histon deasetilasyon ve histon metilasyon yoluyla kromatin yapısını değiştirerek baskıladıklarını bildirmişlerdir.

Köhler ve diğ. (2003b), *mea* ve *fie* mutant bitkilerin transkripsiyonel profilini yabancı tip bitkininki ile karşılaştırmışlardır. Mutant bitkilerde, yabancı tip bitkilere göre sadece iki RNA'nın ifadesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bunların, tip1 MADS-box transkripsiyon faktörü ve S phase kinase-associated protein1 (Skp1) olduğunu belirtmişler ve bu genleri sırası ile *PHERES1* (*PHE1*) ve *MEIDOS* (*MEO*) olarak adlandırmışlardır. Yabancı tip bitkilerde döllenmeden önce *PHE1*'in ifade olmadığını, döllenmeden sonra ise embriyoda ve endospermde geçici olarak ifade edildiğini bildirmişlerdir. Buna karşın, *mea* ve *fie* mutantlarında *PHE1* ifadesinin döllenmeden önce başladığını ve döllenmeden sonra embriyonun ölümüne kadar yüksek oranda devam ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca *mea* ve *fie* gen ürünlerinin *PHE1*'in promoter bölgesi ile direkt etkileşimde olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda *FIS* genlerinin, *PHE1* geninin baskılanmasında rol alabileceğini ve *PHE1* geninin *mea* mutantlarında görülen embriyo ölümlerinden sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Chanvivattana ve diğ. (2004), *A. thaliana*'da PcG proteinlerin etkileşimlerini incelemişlerdir. Hayvanlarda PcG proteinlerin PRC2'nin (Polycomb Repressive Complex2) bir parçası olarak, histon metiltransferaz aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Bitkilerde de benzer bir PRC2 varlığını ispatlamışlardır. *Drosophila*'da *p55*, *ESC*, *E(z)* ve *Su(z)12* genlerinin kodladığı proteinlerin, PRC2'nin çekirdek proteinleri olduğunu belirtmişler ve bu proteinlerin ortologlarının *Arabidopsis*'den izole edildiğini belirtmişlerdir. *E(z)* ve *Su(z)12*'nin bu komplekste fiziksel olarak etkileşimde olmasına dayanarak bu proteinlerin ortologları, *MEA* ve *FIS2*'nin fiziksel olarak etkileşimde olabileceğini önermişlerdir. Yeast two hybriide deneyleri ile bu iki proteinin *FIS2*'de bulunan VEFS domaini aracılığı ile etkileşimde olduğunu bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlar ve daha önce kanıtlanan etkileşimlere dayanarak *Arabidopsis* FIS kompleksinde bulunana dört PcG proteinin (*MSI1*, *FIE*, *MEA*, *FIS2*) *Drosophila* PRC2 proteinleri gibi bir araya gelerek, tanımlanmamış başka proteinlerle etkileşebileceğini ve *PHE1* geninin transkripsiyon durumunu düzenlediğini bildirmişlerdir.

Guitton ve diğ. (2004), *A. thaliana*'dan dişi gametofit etkili on mutant gen izole etmişlerdir. Bu genlerden üç tanesinin yeni *mea* allelleri (*mea-5*, 6, 7), iki tanesinin yeni *fis2* allelleri (*fis2-6*, 7), iki tanesinin yeni *fie* allelleri (*fie-10*, 11), bir tanesinin *demeter* alleli (*dme-4*), bir tanesinin *msi1* alleli (*msi1-2*) ve bir tanesinin de yeni bir *fis* sınıfı gen olduğunu bildirmişlerdir. Yeni izole ettikleri bu geni *borgia* (*bga-1*) olarak isimlendirmişlerdir. *bga* ile kazanılan mutant fenotipin diğer *fis* genlerinin sebep oldukları fenotipe benzediğini fakat bazı farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. *fis* sınıfı mutantlarda görülen döllenenmeden bağımsız endosperm gelişiminin *bga* mutantlarında çok daha zayıf olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca *bga* mutasyonunun dişi gametofitle döllere diğer *fis* sınıfı mutasyonlarından daha yüksek oranda aktarılabildiğini belirtmişlerdir. Heterozigot *bga/BGA* dişi ebeveyn ile yabanıl tip erkek ebeveyn çaprazlandığında oluşan döllere sadece %28'inin mutant fenotip gösterdiğini ve gelişimlerini tamamlayamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca *msi1* mutasyonu da araştırılmıştır. *fis* mutantlarında görülen döllenenmeden bağımsız endosperm gelişiminin *msi1* mutantlarında daha yüksek oranda meydana geldiğini bildirmişlerdir. *msi1* mutasyonunun dişi gametofitle döllere aktarımının imkansız olduğunu ayrıca polenle aktarımının da azaldığını bildirmişlerdir (%36,2).

Moscona ve diğ. (2004), *A. thaliana*'da FIE proteininin hücre bölünmesini nasıl baskıladığını aydınlatmak için FIE ile hücre döngüsünde düzenleyici olarak görev yapan retinoblastoma (pRb) proteini arasındaki etkileşimleri araştırmışlardır. pRb geninin tümör baskılayıcı bir gen olduğunu ve bazı proteinlerle etkileşime girerek, hücre döngüsünde G1/S fazı arasındaki geçişi düzenlediğini bildirmişlerdir. FIE proteininin *Arabidopsis* (AtRb), mısır (ZmRb) ve insan (HuRb) retinoblastoma proteinleri ile *in vitro*'da ve *in vivo*'da etkileşime girdiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Arabidopsis*'de, pRb proteininin FIE, MEA ve MSI1'inde dahil olduğu PRC2'nin bir üyesi olabileceğini önermişlerdir.

Köhler ve diğ. (2005), *PHE1* geninin genetik etiketleme ile düzenlendiğini göstermişlerdir. *PHE1*'in babadan geldiğinde aktif iken anneden geldiğinde suskun olduğunu bildirmişlerdir. Anneden gelen *PHE1* geninin *MEA* ile baskılandığını, *mea*

allelinde meydana gelen mutasyonların *PHE1* geninin baskılanmasını ortadan kaldırdığını ve böylece döllenme sinyaline gerek duymadan tohum gelişiminin başlatıldığını bildirmişlerdir. Döllemeden sonra ise *PHE1* ve bilinmeyen başka genlerin de *mea* tohumlarında aşırı eksprese edilmesinin embriyo ve endospermde normalden fazla bir büyümeye sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Gehring ve diğ. (2006), *DME*'nin endospermde anneye ait *MEA* allelinin hipometilasyondan sorumlu olduğunu ve bu sayede *MEA*'nın genetik olarak etiketlenmesinde rol aldığını göstermişlerdir. *DME*'nin bu fonksiyonu *MEA*'nın 5-metilsitozin kalıntısını keserek yaptığını belirtmişlerdir. *dme* mutantlarında *MEA*'nın embriyo kesesinde ifade edilmediğini bildirmişlerdir. Bu sebeple *dme* mutantlarının da *FIS* sınıfı mutantlar gibi endosperm aşırı büyümesi ile karakterize edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca *DME*'nin *MET1* ile antogonistik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, babaya ait *MEA* allelin DNA metilasyonu ile kontrol edilmediğini, anneye ait *MEA* allelini bu işlevde rol oynadığını bildirmişlerdir.

Jullien ve diğ. (2006), *MEA*'nın genetik olarak etiketlenmesinde DNA metilasyonu ve PcG proteinlerin rolünü araştırmışlardır. *met1* mutantlarında *MEA*'nın yanlış ifade edilmediğini bildirmişlerdir. Buna karşın *FIE*, *EMF2*, *VRN2*, *CLF* ve *SWN* gibi diğer PcG proteinlerdeki mutasyonların *MEA*'nın vejetatif dokularda yanlış ifadesine sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *MEA*'nın vejetatif dokulardaki ifadesinin DNA metilasyonu ile değil PcG kompleksler tarafından baskılandığını bildirmişlerdir. Ek olarak, endospermde *MEA* allelinin aktarıldığı ebeveyne bağlı olarak diferansiyel ifadesinin de PcG kompleksler tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Wang ve diğ. (2006), *Arabidopsis*'den *FIS2* cDNA'sını RT-PCR metodu ile izole etmişlerdir. Bu cDNA'nın 2799 bp büyüklüğünde olduğunu ve önceki çalışmalarda izole edilenlerden 395 bp daha büyük olduğunu bildirmişlerdir. *FIS2*'nin 813 amino asitlik bir protein kodladığını ve bu proteinin daha önce izole edilenlerden 121 amino asit daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yeast-two hybride denemeleri ile *MEA* ve *FIS2* proteinlerini fiziksel olarak etkileşimde

olduğunu ve bu etkileşimin, FIS2'nin C-terminal bölgesinde bulunan VEFS domaini aracılığı ile olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca MEA ve FIE proteinleri arasında da fiziksel bir etkileşimin olduğunu kanıtlamışlardır. Buna karşın FIS2 ve FIE proteinleri arasında fiziksel bir etkileşim gözlemlenmemişlerdir. Buna ek olarak FIS2 proteininin MEA gibi SET-domainli bir protein olan SWINGER (SWN) ile de etkileşimde olduğunu bildirmişlerdir.

Baroux ve diğ. (2006), *MEA*'nın otoregülasyon mekanizmasına sahip bir gen olduğunu bildirmişlerdir. Yabancıl tip bitkilerde *MEA* transkripsiyon seviyesinin döllenmeden önce en yüksek seviyede ifade edildiğini döllenmeden sonra ise transkript miktarının giderek azaldığını bildirmişlerdir. *mea* mutant embriyo kesesinde ise transkript miktarının döllenmeden önce ve sonra normalden çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *MEA* proteininin *MEA* genini promoter bölgesine bağlandığını göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre *MEA*'nın kendi kendini negatif olarak düzenleyen bir gen olduğunu belirtmişlerdir. Ek olarak babaya ait *MEA* allelinin de anneye ait *MEA* alleli tarafından baskılandığını göstermişlerdir. Ayrıca PRC2 kompleksindeki diğer proteinler *fis2*, *fie* ve *msi1* mutasyonlarının *MEA* transkripsiyonunda bir değişime yol açmadığını bildirmişler ve *MEA* regülasyonunun MEA-FIE kompleksinden bağımsız olduğunu bildirmişlerdir. Tersine *mea* mutantlarında *FIE*, *FIS2* ve *MSI1* transkriptinin seviyesinde azalma gözlemlenmişler ve *MEA*'nın PRC2 kompleksindeki diğer proteinlerin de pozitif düzenleyicisi olduğunu göstermişlerdir. Bunlara ek olarak *FIS2*'nin, *FIE* ve *MSI1*'in pozitif düzenleyicisi olduğunu ve *FIE*'nin pozitif otoregülasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOT

3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışmada iki farklı apomikt *Boechera* türü (*B.holboellii* ve *B. gunnisoniana*) kullanılmıştır. Bu türler, Prof. Dr. Rod J. Scott (Bath Üniversitesi, İngiltere)'dan temin edilmiştir. Bitkiler, Schranz ve diğ. (2005) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir. Tohumlar nemli filtre kağıdı içeren petri kaplarına alınmış ve dormansiyi kırmak için +4°C sıcaklıkta karanlıkta 21 gün vernalizasyona bırakılmıştır. Tohumlar sıcaklığı 21°C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim dolabında çimlendirilmiştir. Ardından, bitkiler 121°C'de 20 dk. sürede steril edilmiş torf:perlit (4:1) içeren viyollere şaşırtılmıştır. Bu ortam içerisinde yaklaşık 22 gün sonra bitkiler 8-10 yapraklı aşamaya geldiklerinde daha büyük saksılara aktarılmıştır. Bitkiler, 7 gün sonra çiçeklenmeyi teşvik etmek amacıyla ikinci kez 6 hafta süre ile fotoperiyodu 16 saat karanlık/8 saat aydınlık, sıcaklığı +5°C/+10°C olan iklim dolabında vernalize edilmiştir. Bu sürenin bitmesini takiben, bitkiler sıcaklığı 21°C olan uzun gün fotoperiyodu altında bir hafta içerisinde çiçeklenmiştir.

3.2. RNA İzolasyonu

Her iki bitki türüne ait 100 mg çiçek ve harnup dokuları steril bir bisturi ile kesilmiş ve eppendorf (RNaz-DNaz free) tüplerine alınmış, örnekler izolasyona başlayana kadar sıvı azot içerisinde bekletilmiştir. Ardından, bitki dokuları 1-2 dakika sürede steril porselen havanda toz halina gelene kadar ezilmiştir. Daha sonra bu dokulardan RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Plant Mini kit (74904) ile gerçekleştirilmiştir. RNA'lar kullanılmaya kadar -86°C'de depolanmıştır.

İzolasyonda kullanılan havanlar ve spatüller RNaz sterilizasyonu için %0,1'lik DEPC (diethylpyrocarbonate) solüsyonunda 37°C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Daha

sonra 121°C'de 15 dakika sürede yüksek basınç ve sıcaklıkta otoklavlanmıştır. Ardından 200°C'de pasteur fırınında 4 saat bekletilmiştir.

3.3. RNA Jel Elektroforezi

RNA jel elektroforezi hazırlanırken kullanılan bütün cam ve plastik malzemeler RNaz kontaminasyonunu önlemek için %1'lik DEPC solüsyonu ile muamele edilmiştir. İzole edilen RNA'lar %1,2'lik Formaldehit Agaroz (FA) jelde ayrılmış ve analiz edilmiştir. Agaroz 1XFA tampon içinde 120°C'de çözdürülmüştür. Ardından 65°C'ye kadar soğutulmuş ve 1,8 ml %37'lik formaldehit ve 10mg/ml'lik ethidium bromür stok solüsyonundan 1 µl eklenmiştir. Homojen bir dağılım olana kadar karıştırılmış ve jel tepsinine dökülmüştür. FA jel katılaştıktan sonra elektroforez tankına yerleştirilmiş ve tank 1XFA tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler yüklenmeden önce jel 30 dakika tampon içinde bekletilmiştir. Her bitki türüne ait RNA örnekleri 5X RNA yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Marker olarak RNA ladder (#Fermentas high range SM0428) kullanılmıştır (Şekil 3.1b). Jel 5V/cm'de 3 saat yürütülmüş ve ultra violet transilluminator tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

3.3.1. FA Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponların Hazırlanması

10XFA jel tamponu: 41,85 g MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid), 4,10 g sodyum asetat ve 3,72 g EDTA 800 ml RNase-free dH₂O içinde çözdürülmüştür. 5N NaOH ile tamponun pH'si 7,0 olarak ayarlanmıştır ve son hacim RNase-free dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Tampon 0,45 µm por çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

5N NaOH: 20 g NaOH 100 ml RNase-free dH₂O içinde çözdürülerek hazırlanmıştır ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

1XFA jel tamponu: 100 ml 10XFA jel tamponu, 20 ml %37'lik formaldehit ile karıştırılmış ve son hacim 880 ml RNase-free dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

5X RNA yükleme tamponu: 16 µl bromophenol blue solüsyonu, 80 µl 500mM EDTA, 720 µl %37'lik formaldehit, 2 ml %100'lük gliserol, 3,084 ml formamide ve 4 ml 10XFA jel tamponu karıştırılmış, son hacim RNase-free H₂O ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Tampon 1 ml'lik hacimlere ayrılıp -20°C'de saklanmıştır.

500mM EDTA: 9,30 g EDTA 40 ml RNase-free H₂O içinde çözdürülmüştür. pH asetik asit ile 8,0 olarak ayarlanmıştır. Son hacim RNase-free H₂O ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Bromophenol blue solüsyonu: 1 mg bromophenol blue 1 ml RNase-free H₂O içinde çözdürülmüştür. Boyanın çözünmeyen kısmı 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çökeltilmiştir.

RNase-free H₂O: 1 ml DEPC, 1 L dH₂O içine ilave edilmiş ve 37°C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 121°C'de 15 dakika sürede yüksek basınç ve sıcaklıkta otoklavlanmıştır.

3.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi Omniscript Reverse Transcription kit (Qiagen 205113) ile yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Reaksiyon filtrelili pipet uçları (RNase-DNase free) ve ince cidarlı 200 µl'lik PCR tüplerinde kurulmuştur. Kalıp RNA'lardaki ikincil dereceden katlanmalar, reaksiyon öncesinde 5 dakika 65°C'de denatüre edilerek açılmıştır. Ayrıca kontaminasyon olmadığını göstermek için kalıp RNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu kurulmuştur. Tüpler, 37°C'de 60 dakika süreye ayarlı Thermal cycler cihazında (BIO-RAD) inkübe edilmiştir. Ardından, cDNA örnekleri 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak %0,5'lik agaroz jele (sigma A5093) yüklenmiş ve analiz edilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (μ l)	Final Konsantrasyon
10X Qiagen RT buffer	2	1X
5 mM dNTP mix	2	0,5 mM
10 μ M Oligo-dT primer	2	1 μ M
10 unit/ μ l RNase inhibitor	1	0,5 unit
Omniscript Reverse Transcriptase	1	0,2 unit
RNase-free H ₂ O	9	
Kalıp RNA	3	0,1 μ g
Toplam	20 μ l	

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, High Fidelity PCR Enzyme mix (#Fermentas K0191) ile kurulmuştur. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Tüm reaksiyonlar, enzimin 3’ \rightarrow 5’ ekzonükleaz proofreading aktivitesi nedeni ile primer degradasyonuna sebep olmaması için buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. PCR’da kalıp cDNA miktarının reaksiyon hacminin %10’unu geçmemesine dikkat edilmiştir. Reaksiyonda *A.thaliana FIS2 (AtFIS2)* genine ait primerler kullanılmıştır. Bu primerlerinden 2263 bç’lik DNA bandı beklenmiştir. cDNA’ların kalitesi dokularda sürekli ifade olduğu bilinen referans *GADPH* genine (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) ait primerler ile yapılmıştır. *GADPH* ve *AtFIS2* genlerine ait primerlerin baz dizilişleri Tablo 3.3’de gösterilmiştir. Ayrıca kontaminasyon olmadığını göstermek için kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu kurulmuştur. PCR döngüleri Tablo 3.4’te belirtilmiştir.

Tablo 3.2. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (μ l)	Final Konsantrasyon
10X High Fidelity PCR Buffer	2,5	1X
25mM MgCl ₂ solüsyonu	2	2 mM
10mM dNTP mix	0,5	0,2 mM
10pmol/ μ l reverse primer	1	0,4 pmol
10pmol/ μ l forward primer	1	0,4 pmol
Kalıp cDNA	2,5	
Nuclease-free H ₂ O	15,25	
High Fidelity PCR Enzyme Mix	0,25	2,5 unit
Toplam hacim	25 μ l	

Tablo 3.3. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

Primer	Baz dizilişi
<i>FIS2</i> forward	5’AAAATAAGATTCAACTACAGGGATG3’
<i>FIS2</i> reverse	5’ACAGATTCACAACTAGTAAGAGGG3’
<i>GADPH</i> forward	5’TGTCCACTCTATCACTGCTACTC3’
<i>GADPH</i> reverse	5’TTTGCCTTCAGATTCCTCC3’

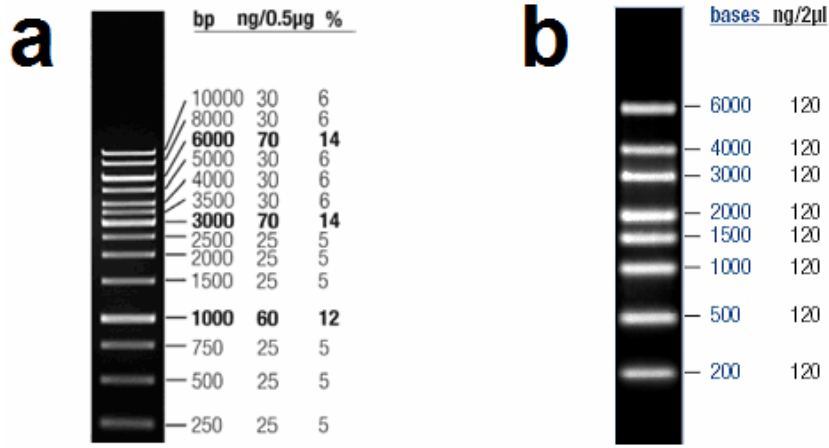
Tablo 3.4. PCR segmentleri ve döngü sayısı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	3	1
Denatürasyon	95	1	
Annealing (primerlerin bağlanması)	52	1	36
Elongation (uzama)	72	2,5	
Final elongation	72	10	1

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

cDNA ve PCR ürünleri %0,5’lik agaroz jel (Sigma A5093) elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile ultra violet transilluminator tablasında (UV) görüntülenmiştir. Agaroz 1XTAE tampon içerisinde 120°C’de eritilmiştir. Ardından, oda sıcaklığına gelene kadar soğutulan jel katılaşmadan hemen önce içerisinde tarak

bulunan jel tepsisine dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank 1 mg/L ethidium bromür içeren 1XTAE tampon ile doldurulmuştur. Örnekler 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforezde marker olarak 1kb DNA ladder (Fermentas #SM0311) kullanılmıştır (Şekil 3.1a). Jel 7V/cm'de 70 dakika yürütülmüş ve UV tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritaları, a; Fermentas 1kb DNA ladder, b; Fermentas highrange RNA ladder.

3.6.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması

10XTAE tamponu: 48,44 g tris base, 3,72 g EDTA 900ml dH₂O içinde çözdürülmüş ve tamponun pH'ı asetik asit (12 ml) ile 8,0'a ayarlanmıştır. Tamponun son hacmi dH₂O 1 L'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Ethidium bromür stok çözeltisi: 0,1 g ethidium bromür 10 ml dH₂O içinde karıştırılarak çözdürülmüş ve 10 mg/ml'lik stok çözelti elde edilmiştir. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kaplanıp karanlıkta saklanmıştır.

1XTAE tamponu: 100 ml 10XTAE tamponu 900 ml dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. İçine 10mg/ml'lik ethidium bromür stok çözeltisinden 100 µl eklenmiştir.

6X yükleme tamponu: 12,1 mg tris base (10mM), 223,3 mg EDTA (60 mM) ve 3 mg bromophenol blue (%0,3), 4 ml DNase RNase free dH₂O içinde çözdürülmüştür. Ardından 6ml gliserol (%60) eklenmiştir ve 1 ml'lik hacimlere ayrılıp -20°C'de saklanmıştır.

3.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

Agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış PCR ürünlerinden beklenen büyüklükteki ilgili bantlar steril bir bisturi ile eppendorf (DNaz-RNaz free) tüplerine alınmıştır. DNA bantları, DNA Extraction Kit (Fermentas #K0513) kullanılarak jelden izole edilmiştir. İzole edilen DNA bantlarının konsantrasyonları, %0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

3.8. Klonlama Çalışması

3.8.1. Kompetent *Escherichia coli* (*E. coli*) Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetent *E.coli* hücreleri, Hanahan (1983) metodu modifiye edilerek JM-107 hücre hattı ile hazırlanmıştır (Sambrook ve Russell, 2001). Hücreler liyofilize halde Fermentas'dan temin edilmiştir. Bakteriler SOB agar besi ortamına ekim yapılarak 16 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tek koloniler steril bir öze ile alınmış ve 100ml SOB broth besi ortamına ekilmiş ve 37°C'de 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Kültürdeki hücre yoğunluğu her saat spektrofotometrede 550 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Kültürün 4. saatinde hücre yoğunluğu 0,58 OD ulaştığında inkübasyon sonlandırılmış ve hücreler kompetent hale getirilmek için aşağıdaki metot uygulanmıştır.

- a. Kültürden 1,5 ml Steril eppendorf tüplerine alınmış ve 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
- b. Tüpler 10 dakika 4100 rpm'de +4°C'de santrifüj edilerek bakteriler çöktürülmüştür.

- c. Süpernatant atılmış, tüpler steril kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 1 dakika kurutulmuştur.
- d. Bakteri pelleti üzerine 610 µl Frozen Storage Buffer (FSB) eklenmiş ve vorteks ile pellet tamamen çözülmüştür.
- e. Tüpler 10 dakika süre ile buz üzerine alınmış, ardından 4100 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- f. Süpernatant atılmış ve tüpler steril kurutma kağıdı üzerinde 1 dakika ters çevrilerek kurutulmuştur.
- g. Pellet üzerine tekrar 121 µl FSB eklenmiş ve pellet vorteks ile resüspanse edilmiştir.
- h. Daha sonra tüplere 4,25 µl DMSO eklenmiş ve tüpler altlarına yavaşça vurularak karıştırılmıştır. Ardından tüpler 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
- i. Tüplere tekrar 4,25 µl DMSO eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tüpler 1-2 dakika buz üzerinde bekletilmiş, ardından hemen sıvı azot içinde dondurulmuştur. Hücreler kullanılıncaya kadar -86°C'de saklanmıştır.

3.8.1.1. Kompetent *E.coli* Hazırlarken Kullanılan Besi Ortamları ve Tamponların Hazırlanması

SOB broth: 20 g tryptone, 5 g yeast extract, 0,5 g NaCl 950 ml dH₂O içinde çözdürülmüştür. 10 ml 250 mM KCl solüsyonu eklenmiş ve 5N NaOH ile pH 7,0'a ayarlanmıştır. Son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121°C'de 20 dakika sürede otoklavda steril edilmiştir. Kullanmadan hemen önce 5 ml steril 2M MgCl₂ solüsyonu eklenmiştir.

SOB agar: 20 g tryptone, 5 g yeast extract, 0,5 g NaCl 950 ml dH₂O içinde çözdürülmüştür. 10 ml 250 mM KCl solüsyonu eklenmiş ve 5N NaOH ile pH 7,0'a ayarlanmıştır. 15 g agar eklenip son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlanmış ve 121°C'de 20 dakika sürede otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuş ve 5 ml steril 2M MgCl₂ solüsyonu eklenmiş ve steril petrilere dökülmüştür.

250mM KCl solüsyonu: 1,86 g KCl 100 ml dH₂O içinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

2M MgCl₂ solüsyonu: 19 g MgCl₂ 90 ml dH₂O içinde çözdürülmüş ve hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 121°C'de 20 dakika sürede otoklavda steril edilmiştir.

5N NaOH: 20 g NaOH pelleti 100 ml dH₂O içinde çözdürülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

0,1N HCl: 0,3 ml HCl (%37'lik solüsyon) dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Frozen Storage Buffer: Tablo 3.5'de verilen kimyasalların hepsi 500 ml ultra pure dH₂O içinde çözdürülmüştür. Solüsyonun pH'ı 0,1N HCl ile 6,4'e ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim ultra pure dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Solüsyon 0,45 µm por çaplı milipor filtre ile steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

1M potassium acetate: 9,82 g potassium acetate 90 ml ultra pure dH₂O içinde çözdürülmüştür. pH 2M asetik asit ile 7,5'e ayarlanmış ve son hacim ultra pure dH₂O ile 100 ml tamamlanmıştır. Solüsyon -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.5. Frozen Storage Buffer bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar	Final konsantrasyon
1M potassium acetate (pH:7,5)	10 ml	10 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,91 g	45 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,47 g	10 mM
KCl	7,46 g	10 mM
Hexamine cobalt(III)chloride	0,80 g	100 mM
Gliserol	100 ml	%10 (v/v)

3.8.2. Ligasyon

PCR ürünleri temizlendikten sonra GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas #K1221) kullanılarak pJET1/blunt cloning vektöre (Şekil 3.2) aktarılmıştır. Ligasyon için kullanılan vektör küt uçlu DNA parçalarının insersiyonu için kullanılmaktadır. Buna karşın *FIS2* geninin çoğaltımında kullanılan High Fidelity Enzyme mix yapışkan uçlu ürün oluşturmaktadır. Bu sebeple ligasyondan önce PCR ürünleri blunting reaksiyon ile kut uçlu hale getirilmiştir. Blunting reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3.6'da verilmiştir. Ligasyonun başarısı (pozitif kontrol) kit ile birlikte gelen 976 bç'lik kontrol PCR ürünü ile belirlenmiştir. Ayrıca, DNA parçası içermeyen bir negatif kontrol kullanılmıştır. Reaksiyonlar 200 µl'lik ince cidarlı eppendorf tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Tüpler 70°C'de 5 dakika Thermal cycler cihazında inkübe edilmiş, reaksiyon 2 dakika süre ile buz üzerinde durdurulmuştur. Ardından tüplere 1 µl pJET/blunt Cloning Vector (50ng/µl) ve 1 µl T4 DNA ligase (5u/µl) eklenmiştir. Ligasyon, 22°C sıcaklıkta ve 30 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin ardından transformasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. Blunting reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar
2X reaction buffer	10 µl
PCR product	2 µl
Nuclease-free H ₂ O	5 µl
DNA Blunting Enzyme	1 µl
Toplam	18 µl

3.8.3. Transformasyon

Transformasyon için iki farklı *E.coli* hücre hattı kullanılmıştır; (i) JM-107 (Fermentas #M0109) hücre hattı liyofilize halde temin edilmiştir ve Hanahan (1983) metodu modifiye edilerek kompetent hale getirilmiştir. (ii) JM-109 (Promega #TB095) hücre hattı ise kompetent halde temin edilmiştir. Transformasyon aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- a. 5 µl ligasyon ürünü 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alınmış ve buz üzerinde 2 dakika süre ile bekletilmiştir.
- b. -86°C'de saklanan kompetent hücre hatları buz üzerinde yaklaşık 5 dakika sürede çözdürülmüştür.
- c. Önceden soğutulmuş steril pipet uçları ile 50 µl kompetent hücre ligasyon reaksiyonu bulunan tüplere eklenmiş ve tüpler altlarına hafifçe vurularak karıştırılmıştır.
- d. Tüpler 30 dakika süre için buz üzerine alınmıştır.
- e. Ardından tüpler 42°C'deki su banyosunda 90 saniye bekletilmiştir.
- f. Tüpler 2 dakika süre için buz üzerine alınmıştır.
- g. Ardından tüplere 800 µl SOC broth eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta 150 rpm'de 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- h. Süre sonunda tüpler 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve bakteri pelleti 200 µl SOC broth ile süspanse edilmiştir.
- i. 200 µl hücre 100 µg/ml seçici antibiyotik (ampisilin) içeren SOB agar besi ortamına steril L baget ile yayılmıştır.

- j. Petriler oda sıcaklığında 20 dakika düz olarak bekletilmiş ve daha sonra ters çevrilerek 37°C sıcaklıkta 16 saat boyunca inkübe edilmiştir.

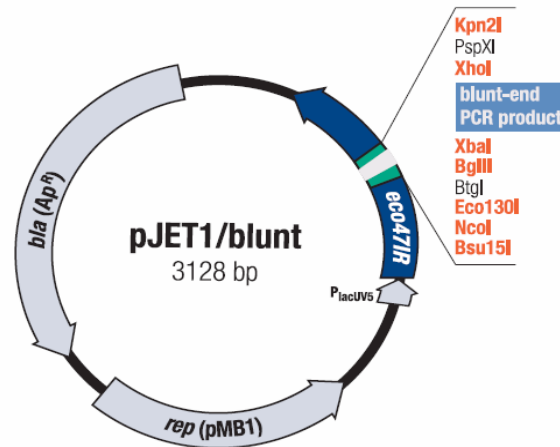
3.8.3.1. Transformasyonda Kullanılan Besi Ortamlarının Hazırlanması

SOC broth: 20 g tryptone, 5 g yeast extract, 0,5 g NaCl 950 ml dH₂O içinde çözdürülmüştür. 10 ml 250mM KCl solüsyonu eklenmiş ve 5N NaOH ile pH 7,0'a ayarlanmıştır. Son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121°C'de 20 dakika sürede otoklavda steril edilmiştir. Kullanılmadan hemen önce 5 ml steril 2M MgCl₂ ve 20 ml 1M glucose solüsyonu eklenmiştir.

1M glucose solüsyonu: 18 g glucose 90 ml dH₂O içinde çözdürülmüştür. Daha sonra dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Por çapı 0,22 µm milipor filtreden süzülerek steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Antibiyotikli SOB agar: SOB agar 121°C'de 20 dakika sürede otoklavda steril edildikten sonra 55°C'ye kadar soğutulmuş ve 1 ml ampisilin stok solüsyonundan (100mg/ml) eklenmiştir. Daha sonra yaklaşık 20 ml olarak steril petrilere dökülmüştür.

Ampisilin stok solüsyonu: 1g ampisilin 10 ml dH₂O içinde çözdürülmüş ve filtrasyonla (por çapı 0,22 µm) steril edilip -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Klonlama çalışmasında kullanılan pJET1/Blunt vektör haritası

3.8.4. Rekombinant Kolonilerin Belirlenmesi

3.8.4.1. Koloni PCR

Transformasyon sonrası üreyen rekombinant koloniler PCR ile onaylanmıştır. PCR bileşenleri Tablo 3.7’de belirtilmiştir. Bu reaksiyonda kalıp DNA steril bir pipet ucu ile alınmış bakteri kolonileri olmuştur. PCR döngüleri Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.7. Koloni PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
10X <i>Taq</i> Buffer	2,5 µl	1X
25mM MgCl ₂	3 µl	3 mM
10mM dNTP Mix	0,5 µl	0,2 mM
10pmol/µl reverse primer	1	0,4 pmol
10pmol/µl forward primer	1	0,4 pmol
<i>Taq</i> DNA polymerase (Fermentas)	0,2 µl	1u/25 µl
Nuclease-free H ₂ O	14,8 µl	
Toplam	23 µl	

Tablo 3.8. Koloni PCR segmentleri ve döngü sayısı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	3	1
Denatürasyon	95	1	
Annealing (primerlerin bağlanması)	52-58	1	36
Elongation (uzama)	72	2,5	
Final elongation	72	10	1

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. altında görüntülenmiştir. *FIS2* genini taşıyan rekombinant koloniler bu sayede belirlenmiştir. Ardından, bu koloniler içerisinde 100 µg/ml ampicilin bulunan 30 ml SOB besi ortamında 37°C’de 150 rpm’de 16 saat sürede üretilmiştir. Bu kültürlerden plazmitler Miniprep izolasyon kiti (Qiagen 27104) ile elde edilmiştir.

3.8.4.2. Plazmit üzerinden *FIS2* geninin PCR ile çoğaltımı

İzole edilen plazmitlerin *FIS2* DNA'sını taşıdıkları plazmit üzerine bağlanan primerler ile PCR yapılarak kontrol edilmiştir. Primerler GeneJET™ PCR Cloning Kit ile birlikte temin edilmiştir. Bu Primerler klonlama bölgesini de içine alacak şekilde bir amplifikasyon sağlamaktadır. Bu sebeple aynı primerlerle kurulan reaksiyonlarda, kontrol insert içeren plazmitlerden ve *FIS2* insert DNA içeren plazmitlerden farklı büyüklükte bant vermesi beklenmiştir. Reaksiyon, Tablo 3.7'de verilen koloni PCR bileşenleri ile aynı miktarlarda kurulmuştur. PCR döngüleri Tablo 3.8'de verildiği gibi programlanmıştır. Primerlerin bağlanma sıcaklığı 58°C olarak belirlenmiştir. Reaksiyon sonrasında PCR ürünleri %0,5'lik agaroz jel elektroforezinde ayrılmış ve ethidium bromür ile boyanarak U.V. tablasında görüntülenmiştir.

3.8.4.3. Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzim Kesimi

Plazmitler *EcoRI* (Fermentas #ER0271) ve *HindIII* (Fermentas #ER0501) RE enzimleri ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonu Tablo 3.9'da verilmiş, kesim 37°C sıcaklıkta 16 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünleri 1kb DNA ladder (Fermentas) ile birlikte %0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. altında analiz edilmiştir.

Tablo 3.9. Restriksiyon Endonükleaz enzim kesim reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşen	EcoRI	HindIII	EcoRI + HindIII
Nuclease-free H ₂ O	16 µl	16 µl	15 µl
10X Buffer	2 µl	2 µl	2 µl
Plazmit DNA	1 µl	1 µl	1 µl
RE enzimi	1 µl	1 µl	1 µl + 1 µl
Toplam	20 µl	20 µl	20 µl

3.9. Dizi Analizi

Çalışmada *B. holboellii* ve *B. gunnisoniana*'dan elde edilen yaklaşık 2263 bç büyüklüğündeki RT-PCR ürünlerinin *AtFIS2* geni ortoloğu olduğunu kanıtlamak için REFGEN (ODTÜ-ANKARA) firmasından hizmet alımı ile dizi analizleri yaptırılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp> ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> adreslerinden ulaşılan Blast programı ile değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada, triploid apomikt *Boechera* türleri, *B.gunnisoniana* ve *B.holboellii*'den *AtFIS2* geni ortoloğu RT-PCR yöntemi ile klonlanmıştır (Şekil 4.1). *FIS* genleri ilk kez *A. thaliana*'da tanımlanmış ve özellikle çiçek ve harnup dokularında ifade olduğu bildirilmiştir (Chaudhury ve diğ., 1997; Luo ve diğ., 1999, 2000). Bu sebeple, bu çalışmada kullanılan *Boechera* türlerinde çiçeklenmenin teşvik edilmesi önem taşımaktadır. Bitkiler, Schranz ve diğ. (2005)'te önerdikleri yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir.

Tohumlar öncelikle dormansiyi kırmak için sıcaklığı +4°C olan karanlıkta bekletilmiştir. Bunu takiben çimlenme, *B.gunnisoniana*'da bir gün içerisinde, *B.holboellii*'de ise iki gün içerisinde başlamıştır. Çimlenmeyi takiben bitkiler, yaklaşık 16 gün sonra 6 yapraklı rozet yapısını kazanmıştır. Ardından bitkiler 6 hafta süre ile ikinci kez vernalize edilmiştir. Çiçeklenme vernalizasyonu takiben 6 gün sonra *B.gunnisoniana*'da ve 7 gün sonra *B. holboellii*'de eş zamanlı başlamıştır. Schranz ve diğ. (2005) vernalizasyonun bitkilerde çiçeklenmeyi eş zamanlı teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Çiçeklenmeyi takiben 10-12 gün içinde harnup şeklinde meyve oluşmuştur.

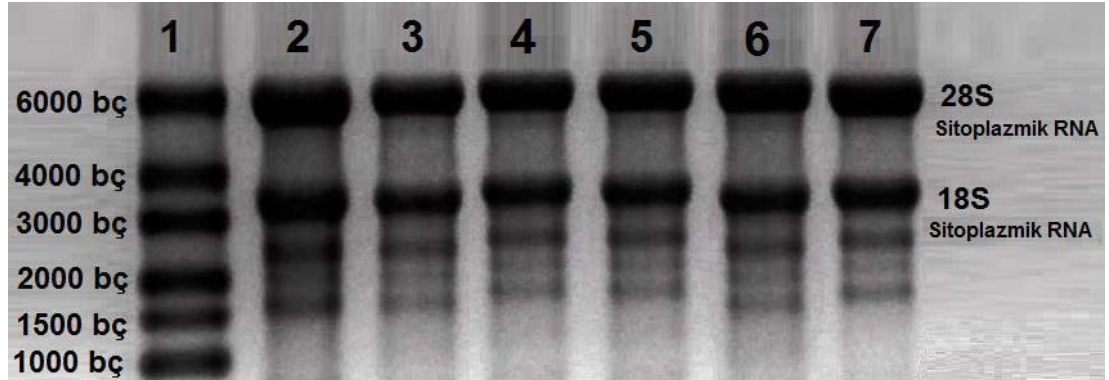


Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan *Boechera* türleri. A) *B. gunnisoniana*, B) *B. holboellii*

4.2. RNA Analizleri

Bu çalışmada kullanılan triploid apomikt *Boecheera* türlerinden RNA izolasyonu, *FIS2* geninin ifade olduğu tahmin edilen çiçek ve harnup dokularından QIAGEN RNeasy plant mini kit ile yapılmıştır. Bu kit ile birlikte temin edilen yüksek tuz içerikli liziz tamponları 200 bazdan büyük RNA moleküllerinin silika membrana bağlanmasını sağlamaktadır. Bu sebeple toplam RNA'ların %15-20'sini oluşturan 5,8S rRNA, 5S rRNA ve tRNA'lar izolasyon sırasında elemine olmaktadır.

İzolasyonun ardından total RNA'nın kalite ve miktarı FA jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.2.). Jelde her RNA örneğindeki 28S ve 18S sitoplazmik RNA bantlarının miktarı marker ile karşılaştırılarak yaklaşık 0,75 µg/µl olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, jelde düşük miktarda 16S ve 23S plastid RNA'sı da gözlemlenmiştir. Ayrıca, RNA örneklerinde kaliteyi düşüren kırık ya da dimer oluşumu görülmemiştir. Tüm RNA örneklerinin kalitesi ve miktarı cDNA sentezinde kalıp olarak kullanmak için uygun bulunmuştur.

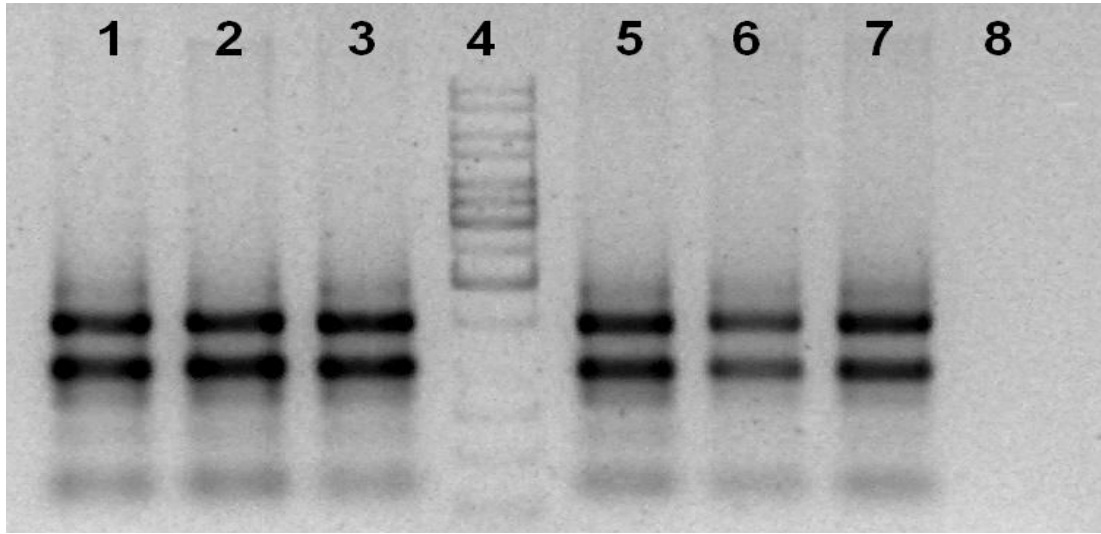


4.3. RT-PCR İle *FIS2* Geninin Amplifikasyonu

Bu çalışmada kullanılan triploid apomikt *Boecheera* türlerine ait çiçek ve harnup dokularından izole edilen RNA'lardan uygun kalitede olanları cDNA sentezi için kullanılmıştır. cDNA'lar Qiagen Omniscript Reverse Transcription kit ile

sentezlenmiştir. Total RNA örneklerindeki rRNA'ları sentez sırasında elemine etmek için, özellikle poly-A kuyruklu mRNA'lara bağlanan oligo-dT primerler tercih edilmiştir. Sentez bitiminde, enzim karışımı içinde bulunan RNaseH enzimi aktivitesi ile reaksiyon içinde kalan RNA'ların degradasyonu sağlanmıştır. Sentez sonrası ürünler %0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. altında görüntülenip kalitesi belirlenmiştir (Şekil 4.3). Bu sonuçlara göre sentezlenen tüm cDNA örneklerinin kalitesi, *Boecheera* türlerinden *AtFIS2* geni ortoloğunun PCR ile çoğaltımı için uygun bulunmuştur.

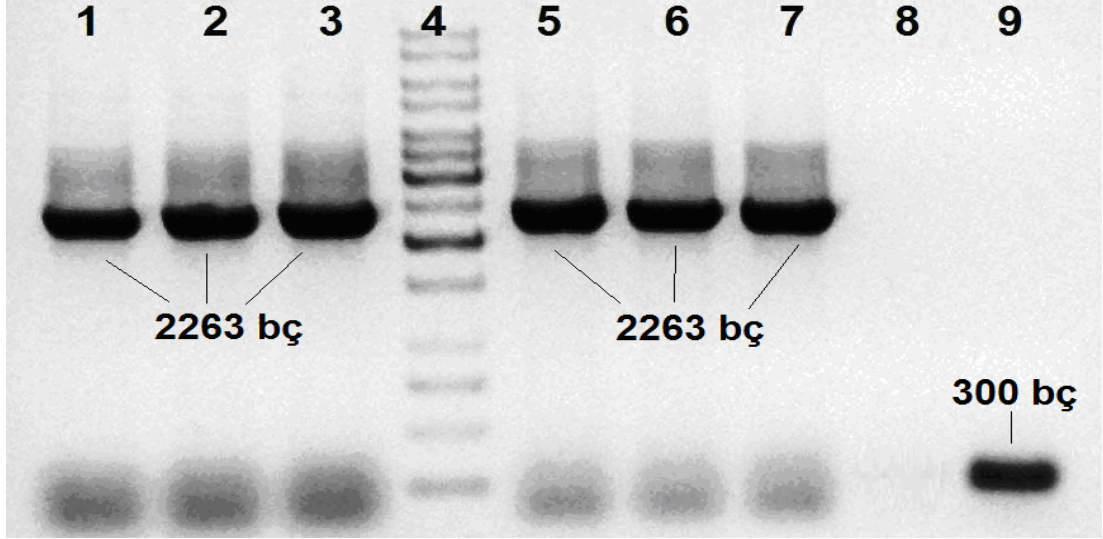
A. thaliana FIS2 geninin cDNA uzunluğu 2384 bp büyüklüğündedir. Bu çalışmada *AtFIS2* genine özgün primerler ile apomikt *Boecheera* türlerindeki gen ortoloğu çoğaltıldığında 2263 bp uzunluğunda bir DNA bandı beklenmiştir. Reaksiyon, Fermentas highfidelity PCR enzim mix ile kurulmuştur.



Şekil 4.3. *Boecheera* türlerinden sentezlenen cDNA örnekleri. Hat 1-3: *B. gunnisoniana* cDNA örnekleri, Hat 4: Fermentas 1 kb marker, Hat 5-7: *B. holboellii* cDNA örnekleri, Hat 8: negatif kontrol (3µl cDNA örneği 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

Reaksiyonda her iki *Boecheera* türüne ait üç farklı bireyden elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılmıştır. cDNA'ların kalitesi bir housekeeping gen olan *GADPH*'a ait primerler ile tekrar kontrol edilmiştir. Ayrıca PCR'da kontaminasyon olmadığını göstermek için negatif kontrol kullanılmıştır. Reaksiyon sonrasında PCR ürünleri

%0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. altında görüntülenmiştir (Şekil 4.4).



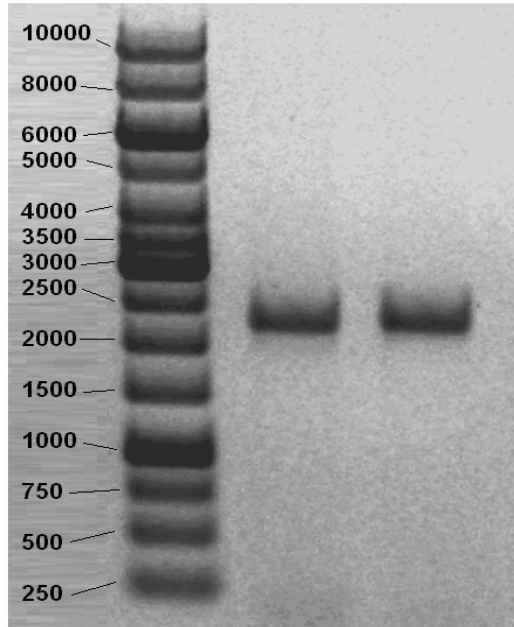
Şekil 4.4. PCR analizleri. Hat 1-3: *B. gunnisoniana* PCR ürünleri, Hat 4: fermentas 1 kb marker, Hat 5-7: *B. holboellii* PCR ürünleri, Hat 8: negatif kontrol, Hat 9: Pozitif kontrol (*GADPH*) (25 µl PCR örneği 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

Sonuç olarak *AtFIS2* genine ait primerler kullanılarak yapılan PCR'da tüm örneklerden beklenen büyüklükte 2263 bp'lik DNA bandı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, triploid apomikt *Boechea* türlerinde *AtFIS2* geni ile yaklaşık aynı boyutlarda ortolog, *BhFIS2* ve *BgFIS2* genlerinin var olduğunu, bu genlerin çiçek ve harnuplarda yüksek miktarda ifade olduklarını göstermiştir. Bu güne kadar *AtFIS2* geni ortoloğunun apomikt ya da seksüel başka bitki türlerinden izole edildiği bildirilmemiştir.

Luo ve diğ. (1999), *A. thaliana*'dan *FIS2* genini RT-PCR yöntemi ile klonlamışlar ve 2384 bp büyüklüğünde bir cDNA elde ettiklerini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Wang ve diğ. (2006), *A. thaliana*'dan izole ettikleri *FIS2* cDNA'sının büyüklüğünü 2799 bp olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen *BhFIS2* ve *BgFIS2* cDNA'larının büyüklüklerinden elde edilen sonuçlar Luo ve diğ. (1999) ile benzerdir.

Benzer şekilde, *FIS* sınıfı genlerin diğeri bir üyesi *FIE* geninin, mısır bitkisinden iki ortoloğu (*ZmFIE1* ve *ZmFIE2*) klonlanmıştır. Bu genlerin *A. thaliana* *FIE* (*AtFIE*) geni ile aynı büyüklükte olduğu ve *ZmFIE2*'nin *AtFIE* ile gen ifadelerinin benzediği bildirilmiştir. Buna ek olarak polenden gelen *ZmFIE1*'in ifade profilinin ise *AtFIS2* geni ile aynı olduğunu bildirilmiştir (Danilevskaya ve diğ., 2003).

PCR sonrasında tüp içerisinde çoğalan DNA bandının yanı sıra daha sonraki enzimatik reaksiyonlara engel olabilecek kirleticiler (örn. dNTP, DNA polimerase, primer gibi) bulunmaktadır. Bu nedenle ligasyon öncesinde PCR ürününün temizlenmesi gerekmektedir. Beklenen büyüklükteki PCR ürünleri agaroz jelden U.V. tablası üzerinde steril bir bisturi yardımı ile kesilerek eppendorf tüplerine alınmıştır ve Fermentas DNA Extraction Kit ile temizlenmiştir. Jelden geri alınan DNA örnekleri %0,5'lik agaroz jel elektroforezinde ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. altında miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bu sonuçlara göre jelden izole edilen DNA bandının konsantrasyonu yaklaşık 25ng/μl olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Jelden geri alınan PCR ürünleri. A) Hat 1: fermentas 1 kb marker, Hat 2: *B. gunnisoniana* *FIS2* PCR ürünü, Hat 3: *B. holboellii* *FIS2* PCR ürünü, B) Fermentas 1 kb marker haritası. (1 μl temizlenmiş PCR ürünü 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

4.4. Klonlama Çalışmaları

BhFIS2 ve *BgFIS2* genleri, Fermentas GeneJET™ PCR Cloning Kit aracılığı ile klonlanmıştır. Lilasyonda kullanılan pJET1/blunt plazmiti 3128 bç büyüklüğündedir. Bu plazmit üzerinde bakterilerin seçilmesi için ampisiline karşı direnç sağlayan β -lactamase geni bulunmaktadır (Şekil 3.2). Plazmit üzerindeki klonlama bölgesinde ise *eco47IR* lethal geni yer almaktadır. Bu sebeple antibiyotikli besin ortamında sadece rekombinant plazmiti taşıyan bakteriler üremektedir. Resirküle olmuş, insert içermeyen plazmit taşıyan bakterilerde lethal gen ifade olduğu için üreme meydana gelmemektedir.

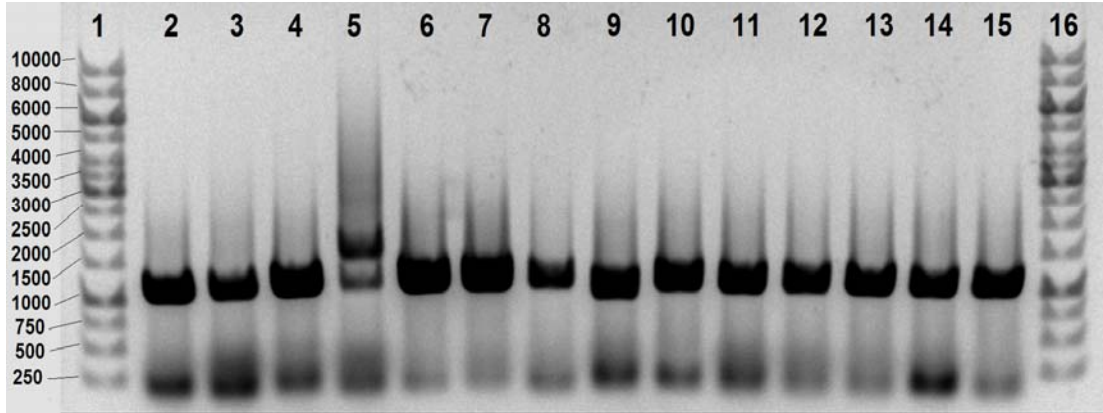
Insert:vektör oranı ligasyon başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Genellikle 3:1 (insert:vektör) molar oranı tercih edilmektedir. Fakat bu oran kullanılan plazmit ve insert DNA'nın büyüklüğüne ve konsantrasyonlarına göre değişiklik gösterebilir. Çalışmada kullanılan vektör konsantrasyonu 50 ng/ μ l'dir ve *FIS2* DNA'sının konsantrasyonu 25 ng/ μ l olarak belirlenmiştir. *FIS2* DNA'sının düşük konsantrasyonda olmasından dolayı insert:vektör molar oranı 1:1 olarak tercih edilmiştir. Bu sonuçlar formül ile hesaplanarak [(vektör konsantrasyonu)x(insert DNA büyüklüğü)]/(vektör büyüklüğü) x (insert/vektor molar oranı)] 2 μ l insert için 1 μ l vektör kullanılacağı belirlenmiştir.

BhFIS2 ve *BgFIS2* genlerini PCR ile çoğaltmak için kullanılan Highfidelity enzim mix reaksiyon ürününe polyA kuyruğu eklemektedir. Buna karşın plazmit vektörü küt uçlu DNA parçalarının insersiyonu için uygundur. Bu sebeple, ligasyondan önce klonlama kiti ile beraber gelen blunting enzim, PCR ürünlerini küt uçlu hale getirmek için kullanılmıştır. Ardından 4 farklı ligasyon reaksiyonu kurulmuştur; (i) *BhFIS2* DNA'sı ile, (ii) *BgFIS2* DNA'sı ile, (iii) kontrol insert ve (iv) insert içermeyen negatif kontrol ile.

Ligasyon ürünlerinin transformasyonu için iki farklı *E. coli* suşu kullanılmıştır. Kompetent JM-109 hattı (Promega) ve JM-107 hattı (Fermentas). JM-107 hattı Hanahan (1983) metodu modifiye edilerek kompetent hale getirilmiştir. Her iki hücre

hattı da (50 µl) yukarıda belirtilen ligasyon ürünleri (5 µl) ile transforme edilmiştir. Ardından 200 µl hücre içerisinde 100 µg/ml ampisilin bulunan SOB agar besiyerine ekilmiş, 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üreyen kolonilerin rekombinant plazmit taşıdıkları koloni PCR ile onaylanmıştır (Şekil 4.6).

Transformasyon kalitesi, kontrol insert (976 bç) taşıyan pozitif kontrol ile belirlenmiştir. Bu reaksiyonda JM-109 hücre hattında 609 adet, JM-107 hücre hattında 159 adet koloni üremiştir. Her iki hücre hattından rasgele seçilen 7 farklı koloni için PCR kurulmuştur. Reaksiyon sonrasında ürünler %0,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.6). Kontrol insert taşıyan kolonilerin beklenen 976 bç büyüklüğünde DNA bandı taşıdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, JM-109 hücre hattının JM-107 hücre hattına göre daha yüksek bir transformasyon kabiliyetinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca rasgele seçilen her hücrenin rekombinant olduğunun tespit edilmesi, ligasyon reaksiyonunun ve antibiyotik seleksiyonunun başarısını kanıtlamaktadır.

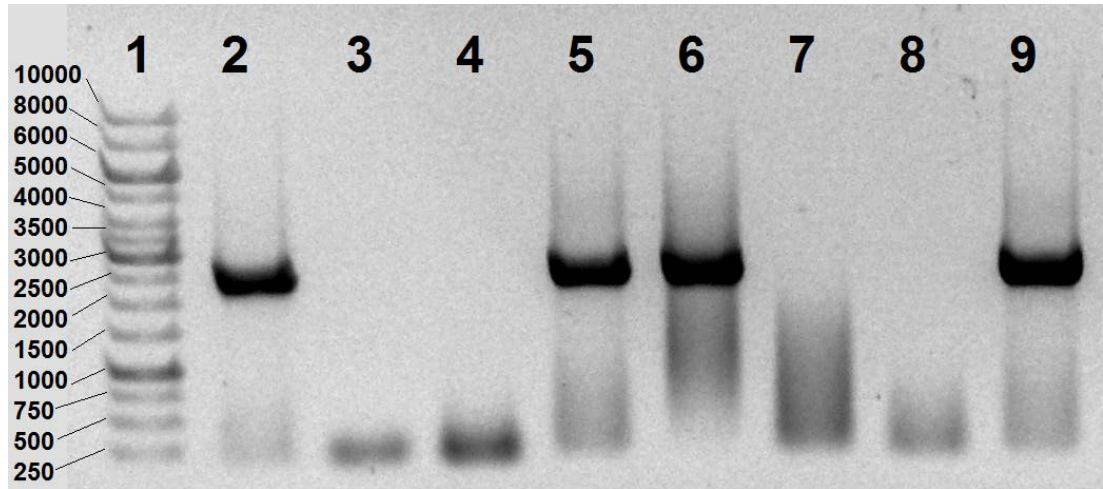


Şekil 4.6 Kontrol insert içeren koloniler ile yapılan PCR sonuçları. Hat 1,16: fermentas 1 kb marker, Hat 2-8: JM-107 hücre hattı ile yapılan koloni PCR, Hat 9-15: JM-109 hücre hattı ile yapılan koloni PCR sonuçları (10 µl PCR ürünü 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

Transformasyonda herhangi bir insert taşımayan negatif kontrolde hem JM-107 hem de JM-109 hücre hattında üreme meydana gelmemiştir. Bu sonuç da kontaminasyon olmadığını göstermiştir.

BhFIS2 ve *BgFIS2* PCR ürünlerini taşıyan vektörler ile yapılan transformasyon çalışmasında ise her iki hücre hattında da üreyen koloni sayısı pozitif kontrole göre yaklaşık %80 oranında azalmıştır. Bu kolonilerin rekombinant vektör taşıyıp taşımadıkları koloni PCR ile onaylanmıştır. Reaksiyon sonrasında ürünler %0,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.7).

Bu sonuçlara göre, *BhFIS2* geni 2 ve 5 nolu kolonilerde ve *BgFIS2* geni ise 6 ve 9 nolu kolonilerde bulunmaktadır. 3, 4, 7 ve 8 nolu kolonilerde beklenen büyüklükte bir DNA bandının gözlenmemesi, bu kolonilerin antibiyotik direnci sağlayan plazmiti taşıdığı fakat istenilen insert DNA'yı içermediğini göstermektedir. Reaksiyonda kullanılan tüm kolonilerin inkübasyon şartları ve koloni PCR koşulları eşittir. Buna karşın böyle bir sonucun elde edilmesi *BhFIS2* ve *BgFIS2* PCR ürünlerinin saflığı ile açıklanabilir. Ligasyon için kullanılan PCR ürünleri temizlenmesine rağmen, ligasyonda insert görevi görece küçük primer ya da DNA fragmentlerinin kontaminasyonu olabileceğini göstermektedir.

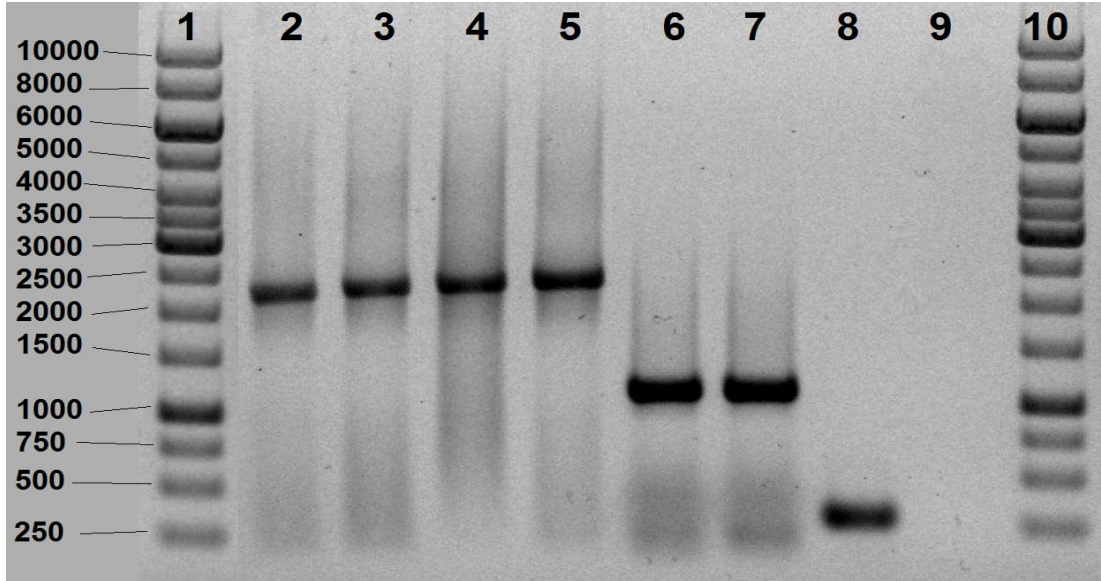


Şekil 4.7. *FIS2* DNA'sı içeren plazmitleri taşıyan koloniler ile yapılan PCR sonuçları. Hat1: fermentas 1 kb marker, Hat 2,3: *BhFIS2* JM-107, Hat 4,5: *BhFIS2i* JM-109, Hat 6,7: *BgFIS2* JM-107, *BgFIS2* JM-109 (10 µl PCR ürünü 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

Koloni PCR ile rekombinant olduğu belirlenen koloniler, içerisinde 100 µg/ml ampisilin bulunan 30 ml SOB broth besiyerinde 150 rpm'de 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bu kültürlerden Qiagen Miniprep izolasyon kiti ile plazmitler izole edilmiştir.

Bu plazmitlerin beklenen büyüklükte insert (2263bç) taşıdıkları ikinci bir PCR ile doğrulanmıştır. Bu reaksiyonda klonlama kiti ile beraber gelen ve plazmit üzerinde 451-471 bç pozisyonuna bağlanan forward ve 534-510 bç pozisyonuna bağlanan reverse primerler kullanılmıştır. Bu primerler klonlama bölgesini de içine alacak şekilde ürün oluşturmaktadır. Bu primerler ile kurulan reaksiyonda kontrol insert, *BhFIS2* ve *BgFIS2* insert DNA içeren plazmitler kalıp olarak kullanılmıştır. Bu plazmitlerden sırası ile 976 bç ve 2263 bç büyüklüğünde DNA bantları beklenmiştir. Reaksiyon sonrasında ürünler %0,5'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılıp U.V.tablasında görüntülenmiştir (Şekil 4.8).

Buna göre, kontrol insert taşıyan plazmitlerden yaklaşık 976 bç büyüklüğünde bir DNA bandı, *BhFIS2* ve *BgFIS2* insert içeren plazmitlerden ise yaklaşık 2263 bç büyüklüğünde DNA bandı elde edilmiştir. Bu sonuçlar izole edilen plazmitlerin *BhFIS2* ve *BgFIS2* DNA'sını taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.8. Plazmit üzerine bağlanan primerler ile yapılan PCR sonuçları. Hat 1,10: fermentas 1 kb marker, Hat 2: *B. holboellii FIS2 JM-107*, Hat 3: *B. holboellii FIS2 JM-109*, Hat 4: *B. gunnisoniana FIS2 JM-107*, Hat 5: *B. gunnisoniana FIS2 JM-109*, Hat 6: Kontrol insert JM-107, Hat 7: kontrol insert JM-109, Hat 8: PCR pozitif kontrol (*GADPH*), Hat 9: PCR negatif kontrol (5 µl PCR ürünü 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

4.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Analizleri

Plazmitlerin istenilen büyüklükte insert DNA parçaları taşıdıkları R.E. enzim kesimi ile de kanıtlanmıştır. Çalışmada bu amaçla, plazmit üzerinde tek kesim bölgesi bulunan iki R.E. enzimi kullanılmıştır. *EcoRI* enzim kesim bölgesi plazmiti üzerinde 178 bç, *HindIII* enzim kesim bölgesi ise 750 bç pozisyonunda bulunmaktadır. Plazmit üzerinde *EcoRI* ve *HindIII* enzimlerinin kesim bölgeleri birbirlerine 572 bç uzaklıktadır, klonlama bölgesi her ikisi arasında yer almaktadır.

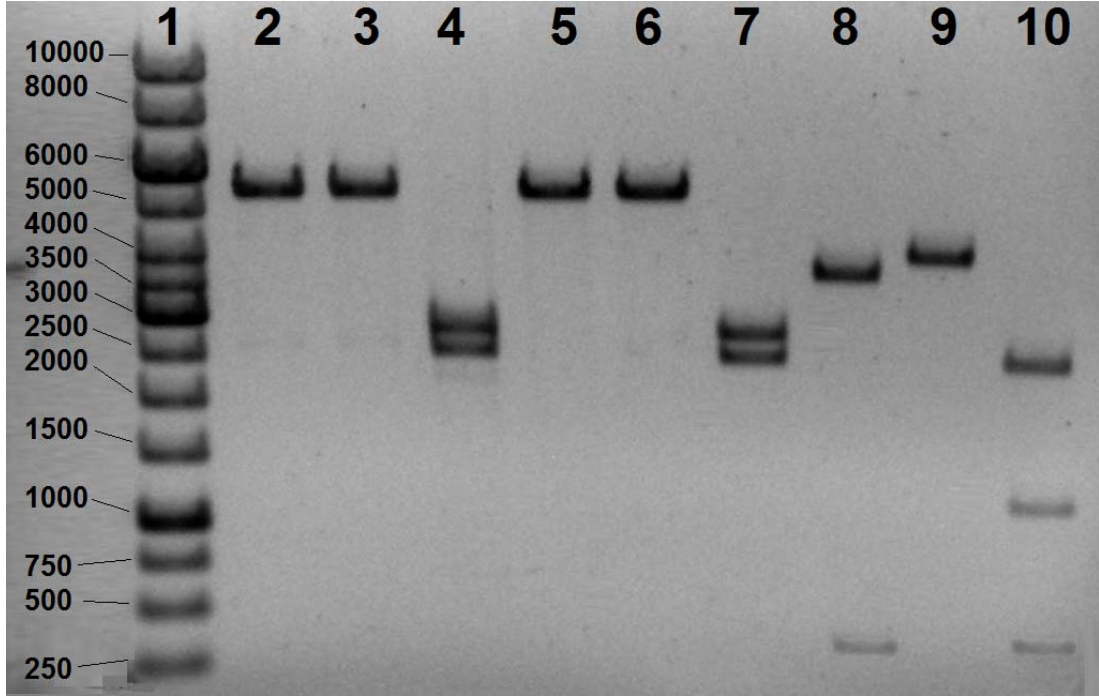
Çalışmada JM-107 hücre hattından izole edilen plazmitler analiz edilmiştir. *BhFIS2*, *BgFIS2* ve kontrol insert içeren plazmitler üç farklı reaksiyon ile kesilmiştir; (i) sadece *EcoRI* ile kesim, (ii) sadece *HindIII* ile kesim, (iii) hem *EcoRI* hem de *HindIII* enzimleri ile aynı anda kesim. Reaksiyon sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. tablasında görüntülenmiştir (Şekil 4.9). Bu üç R.E enzim kesim reaksiyonundan elde edilen DNA bantlarının yaklaşık büyüklükleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmitlerden elde edilen DNA bantlarının yaklaşık büyüklükleri

	<i>BhFIS2</i> , <i>BgFIS2</i> (bç)	Kontrol insert (bç)
<i>EcoRI</i>	~ 5391	~3800 + 304
<i>HindIII</i>	~ 5391	~ 4104
<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	~2835 + 2556	~2556 + 1244 + 304

Kontrol insert (976 bç) taşıyan plazmit (3128 bç) *HindIII* ile kesildiğinde 4104 bç’lik (976 bç + 3128 bç) tek bir DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.9, Hat: 9). Aynı plazmitin *EcoRI* ile kesimi ise yaklaşık 3800 bç ve 304 bç büyüklüğünde iki DNA bandı oluşturmuştur (Şekil 4.9, Hat: 8). *EcoRI*’in plazmit üzerinde tek bir kesim noktası bulunmaktadır. Bu nedenle ikinci bandın (304 bç) varlığı kontrol insert DNA parçasının *EcoRI* kesim bölgesi içerdiğini göstermektedir. İki enzimin birlikte kullanıldığı reaksiyonda ise, yaklaşık 304, 1244 ve 2556 bç büyüklüğünde üç DNA

bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Hat:10). Bunlardan 2556 bç büyüklüğündeki DNA bandı reaksiyondan beklenen bir üründür. Buna karşın kontrol insertin bir *EcoRI* kesim bölgesi içermesi nedeniyle 1548 olarak beklenen ikinci bant 1244 bç ve 304 bç olarak ikiye ayrılmıştır. Bu sonuçlar pozitif kontrol olarak kullanılan plazmitlerin, 976 bç'lik kontrol DNA insert taşıdığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.9. Restriksiyon Endonükleaz enzim kesim sonuçları. Hat 1: fermentas 1 kb marker. Hat 2:*BgFIS2* taşıyan plazmitin *EcoRI* ile kesimi, Hat3: *BgFIS2* taşıyan plazmitin *HindIII* ile kesimi, Hat 4: *BgFIS2* taşıyan plazmitin *EcoRI* ve *HindIII* ile birlikte kesimi, Hat 5: *BhFIS2* taşıyan plazmitin *EcoRI* ile kesimi, Hat 6: *BhFIS2* taşıyan plazmitin *HindIII* ile kesimi, Hat 7: *BhFIS2* taşıyan plazmitin *EcoRI* ve *HindIII* ile birlikte kesimi, Hat 8: kontrol insert taşıyan plazmitin *EcoRI* ile kesimi, Hat 9: kontrol insert taşıyan plazmitin *HindIII* ile kesimi, Hat 10: kontrol insert taşıyan plazmitin *EcoRI* ve *HindIII* ile birlikte kesimi. (Tüm R.E kesim ürünlerinden, 5µl ürün 1 µl 6X yükleme tomponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

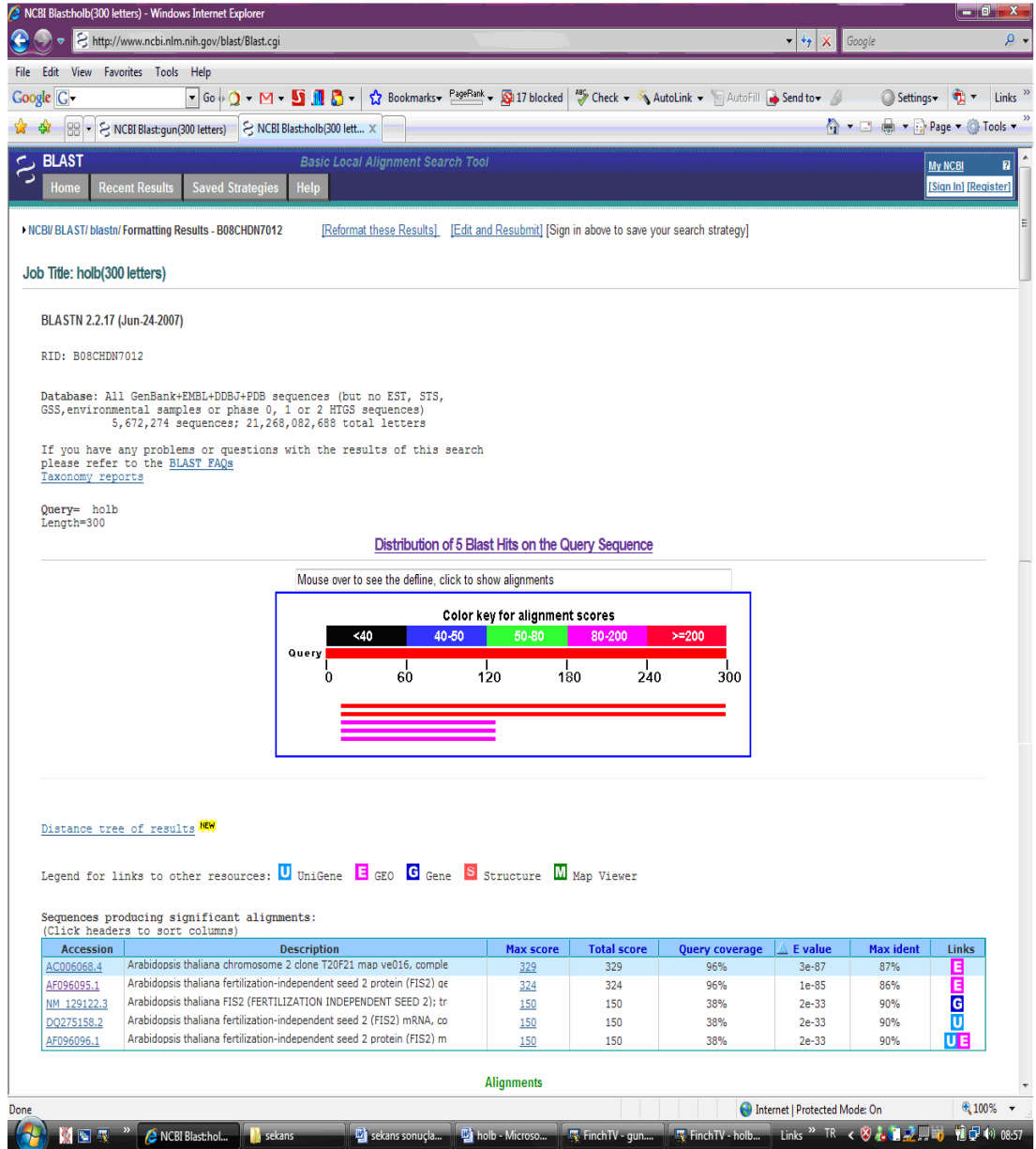
BhFIS2 ya da *BgFIS2* DNA'sını taşıyan plazmitlerin tek enzim ile kesilmesiyle yaklaşık 5391 bç'lik tek bir DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.9, Hat:2,3,5,6). Bu sonuca göre plazmit vektör (3128 bç) 2263 bç'lik bir insert taşımaktadır. Bu büyüklük *FIS2* ile aynıdır. İki enzim aynı anda kesim yapıldığında ise 2835 ve 2556 bç büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.9, Hat: 4,7). Bu reaksiyonda tespit edilen 2835 bç'lik bandın büyüklüğünün, *FIS2* DNA'sı ve plazmit üzerindeki

enzim kesim bölgeleri arasındaki uzaklığın (572 bç) toplamına eşit olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar rekombinant bakterilerden izole edilen plazmitlerin *FIS2* DNA'sı içerdiğini kanıtlamaktadır.

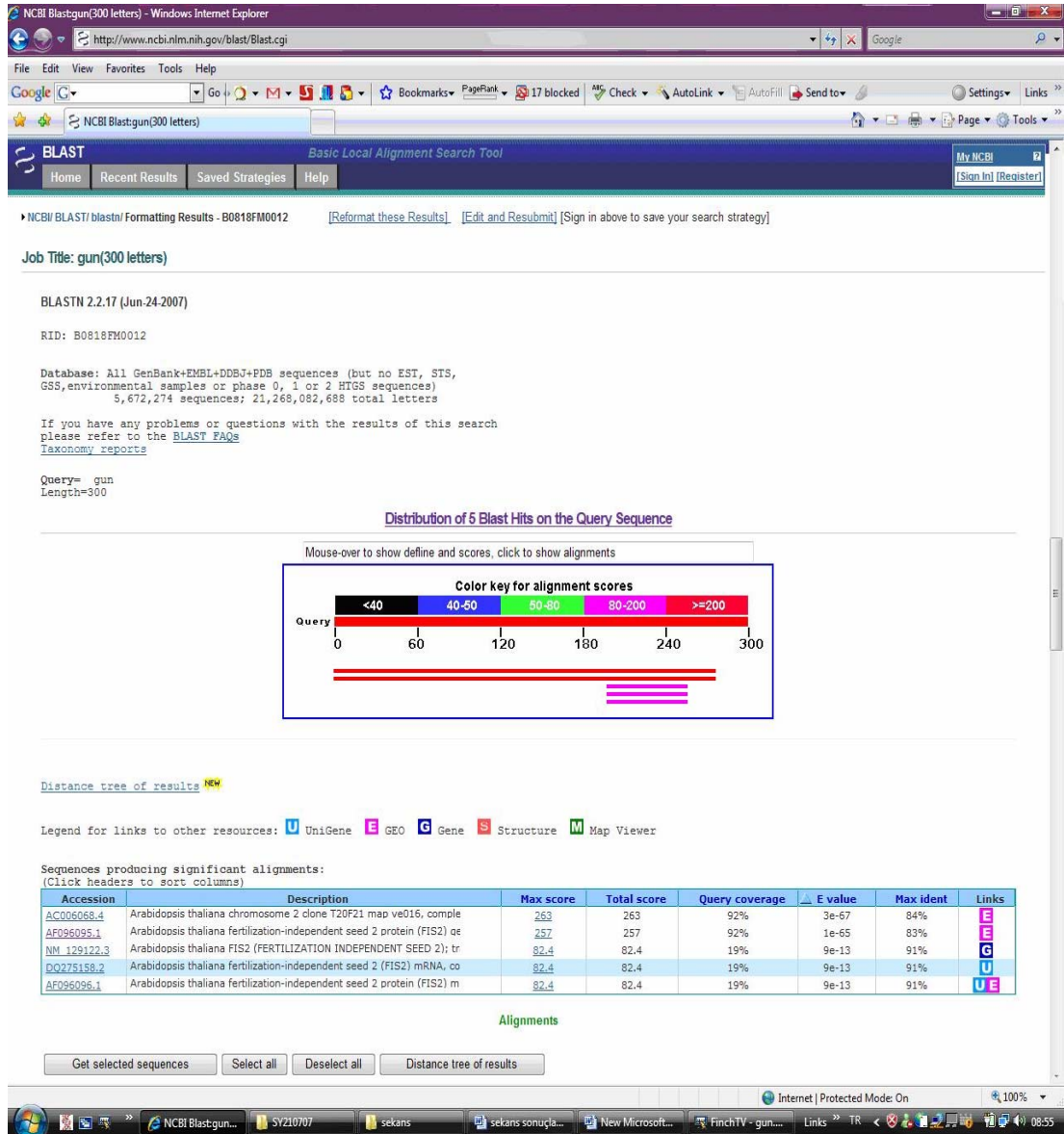
4.6. Dizi Analizi Sonuçları

PCR ürünlerinin *AtFIS2* geni ortoloğu olduğu dizi analizi ile doğrulanmıştır. Dizi analizi REFGEN (ODTÜ-ANKARA) firmasından hizmet alımı ile yaptırılmıştır. Bu amaçla, *B. holboellii* ve *B. gunnisoniana* bitkilerine ait cDNA örneklerinden çoğaltılan yaklaşık büyüklüğü 2263 bç olan PCR ürünleri dizi analizine gönderilmiştir.

Dizi analizi sonuçları <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp> ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> web sayfalarından ulaşılan Blast programı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13). Bu sonuçlara göre *B. gunnisoniana* ve *B. holboellii*'den *A. thaliana*'ya özgün primerler ile çoğaltılan DNA bandlarının *AtFIS2* genine yüksek oranda (%83-87) benzer olduğu görülmüştür. Bu sayede, bu çalışma ile ilk kez apomikt *Boecheera* türlerinden *AtFIS2* gen ortoloğunun klonlandığını kanıtlanmıştır.



Şekil 4.10. *BhFIS2* genine ait DNA dizilerinin Blast analiz sonucu (sadece 300 bç lik kısım gösterilmektedir)



Şekil 4.12. *BgFIS2* genine ait DNA dizilerinin Blast analiz sonucu (sadece 300 bç lik kısmı gösterilmektedir)

BÖLÜM 5

SONUÇ

Bu çalışmada, triploid apomikt *Boecheera* türleri, *B.holboelli* ve *B.gunnisoniana*'dan *AtFIS2* geni ortoloğu (*BhFIS2* ve *BgFIS2*) izole edilip klonlanmıştır. Çalışma sonucunda apomikt *Boecheera* türlerinde *FIS2* geninin varlığı ilk defa tespit edilmiştir.

FIS2 geni daha önce *A.thaliana*'da tanımlanmış ve diğer *FIS* sınıfı genlerle birlikte, seksüel üreme sürecinde regülatör gen olarak rol aldığı bildirilmiştir. Bu sebeple *FIS2*, özellikle dişi gametofitte ve gelişmekte olan endospermde ifade edilmektedir (Chaudhury ve diğ., 1997; Luo ve diğ., 1999).

Çalışmada *FIS2* geni RT-PCR metodu ile çoğaltılmıştır. Bu amaçla *FIS2* geninin ifade olduğu tahmin edilen çiçek ve harnup dokularından izole edilen RNA'lar cDNA eldesi için kullanılmıştır. Daha sonra *AtFIS2* genine özgün primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Her iki bitki türünden de arzu edilen büyüklükte (2263 bp) bir DNA bandı başarı ile çoğaltılmıştır.

Klonlama çalışmasında, *BhFIS2* ve *BgFIS2* DNA'ları pJET1/blunt plazmit vektöre aktarılmış ve plazmit, JM-109 ve JM-107 kompetent *E. coli* hücre hatlarına transforme edilmiştir. Rekombinant koloniler, koloni PCR yöntemi ile tespit edilmiş ardından bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bu plazmitlerin *AtFIS2* cDNA'sı ile eşit büyüklükte bir insert taşıdığı R.E. enzim kesimi ile kanıtlanmıştır.

Klonlanan DNA bandlarının *AtFIS2* geni ortoloğu olduğu ise DNA dizi analizleriyle kanıtlanmıştır. Bu amaçla, her iki bitki türünden elde edilen PCR ürünleri dizi analizine gönderilmiştir. DNA dizi analizi sonuçları <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp> ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> adreslerinden ulaşılan Blast programı ile incelenmiştir. Blast programı apomikt *Boecheera* türlerinden *AtFIS2* gen ortoloğunun klonlandığını kanıtlanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar triploid apomikt *B.holboellii* ve *B.gunnisoniana* türlerinde *AtFIS2* geni ortoloğu bulunduğunu ve bu genin çiçek ve harnup dokularında ifade edildiğini kanıtlamaktadır. Seksüel üreme sürecinde görev alan *FIS2* geninin apomikt bitkilerde de bulunması ve ifade olması, bu genin apomiksinin de kontrolünde görev alabileceğini göstermektedir.

FIS2 geninin seksüel üreme sürecindeki görevi, döllenme meydana gelene kadar endosperm gelişimini baskılamaktır. Döllenme sonucunda bu baskılama ortadan kalkar ve tohum gelişimi aktive edilir. *B. holboellii* ve *B. gunnisoniana*'nın ise pseudogamik fakültatif apomiksi ile üredikleri gösterilmiştir (Roy, 1995; Naumova ve diğ., 2001; Taşkın ve diğ., 2004). Pseudogamik apomikt bitkilerde de döllenme meydana gelene kadar endosperm gelişiminin baskılanması gerekmektedir. *FIS2* bu aşamada diğer *FIS* genleriyle birlikte seksüel türlerdekine benzer bir mekanizma ile pseudogamik apomikt bitkilerde de döllenme öncesinde endosperm gelişiminin baskılanmasında görev alabilir. Daha kesin sonuçlar için *A. thaliana*'da tanımlanan diğer *FIS* sınıfı genlerin de apomikt bitkilerde karakterize edilmesi ve seksüel bitkilerdeki gibi kompleksler oluşturup oluşturmadığının incelenmesi gerekmektedir. Buna ek olarak *FIS* genlerinin ifade çalışmaları ile bu genlerin ifade olduğu dokular ve süreç daha hassas analizlerle belirlenmelidir. Ayrıca benzer bir çalışma ile otonom apomikt bitkilerde de *FIS* sınıfı genlerin varlığı araştırılmalı ve endosperm gelişimi için döllenmeye ihtiyaç duymayan bu bitkilerde *FIS* genlerinin fonksiyonları belirlenmelidir. Böylece *FIS* genlerinin otonom apomikt bitkilerde de karakterize edilmesi bu genlerin apomiksinde bir bileşeni olabileceğini daha kesin olarak kanıtlayacaktır. Bu sayede apomiksi ve seksüel üreme süreçlerinin moleküler düzeydeki yakınlıkları açıklanabilecektir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda seksüel kültür bitkilerinin apomiktik üremeye yönlendirilmesi başarı ile sağlanabilecek, böylece apomiksi tarıma faydalı hale getirilebilecektir.

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.
- Al-Shehbaz, I. A. 2003. Transfer of Most North American species of *Arabis* to *Boechea* (Brassicaceae). *Novon* 13: 381–391.
- Asker, S. E. ve Jerling, L. 1992. *Apomixis in Plants*, Boca Raton FLA: CRC Press, 298 p.
- Baker, S. C., Robinson-Beers, K., Villanueva, J. M., Gaiser, J. C. ve Gasser, C. S. 1997. Interactions Among Genes Regulating Ovule Development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 145: 1109-1124.
- Baroux, C., Gagliardini, V., Page, D. R. ve Grossniklaus, U. 2007. Dynamic Regulatory Interactions of Polycomb Group Genes: *MEDEA* Autoregulation is Required for Imprinted Gene Expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 20: 1081-1086.
- Bedinger, P. 1992. The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant Cell*, 4: 879-887.
- Carman, J. G. 1997. Asynchronous Expression of Duplicate Genes in Angiosperms May Cause Apomixis, Bispory, Tetraspory, and Polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 51-94.
- 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.
- 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.
- Chaudhury, A. M., Koltunow, A., Payne, T., Ming, L., Tucker, M. R., Dennis, E. S. ve Peacock, W. J. 2001. Control of Early Seed Development. *Annu. Rev. Cell Development Biology*, 17: 677-699.

- Chen, Y. C. ve McCormick, S. 1996. *sidecar pollen*, an *Arabidopsis thaliana* Male Gametophytic Mutant With Aberrant Cell Divisions During Pollen Development. *Development*, 122: 3243-3253.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Jacobsen, S. E. ve Fischer, R. L. 2002. DEMETER, a DNA Glycosylase Domain Protein, Is Required for Endosperm Gene Imprinting and Seed Viability in *Arabidopsis*. *Cell*, 110: 33-42.
- 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.
- Dilkes, B. P. ve Comai, L. 2004. A Differential Dosage Hypothesis for Paternal Effects in Seed Development. *The Plant Cell*, 16: 3174-3180.
- Dobes, C., Mitchell-Olds, T. ve Koch, M. A. 2004. Intraspecific Diversification in North American *Boechera stricta* (= *Arabis drummondii*), *Boechera x divaricarpa*, and *Boechera holboellii* (Brassicaceae) Inferred from Nuclear and Chloroplast Molecular Markers - An Integrative Approach. *American Journal of Botany*, 91: 2087-2101.
- Drews, G. N., Lee, D. ve Christensen, C. A. 1998. Genetic Analysis of Female Gametophyte Development and Function. *The Plant Cell*, 10: 5-17.
- Faure, J. E., Rotman, N., Fortuné, P. ve Dumas, C. 2002. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* Wild Type: Developmental Stages and Time Course. *The Plant Journal*, 30 (4): 481-488.
- Gehring, M., Huh, J. H., Hsieh, T. F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J. J., Goldberg, R. B. ve Fischer, R. L. 2006. DEMETER DNA Glycosylase Establishes *MEDEA* Polycomb Gene Self-imprinting by Allele-specific Demethylation. *Cell*, 124: 495-506.
- 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., J.-Philippe V.-Calzada, Hoepfner, M. A., Gagliano, W. B. 1998. Maternal Control of Embryogenesis By *MEDEA*, A Polycomb Group Gene in *Arabidopsis*. *Science*, 280: 446-450.

- Grossniklaus, U. ve Schneitz, K. 1998. The Molecular and Genetic Basis of Ovule and Megagametophyte Development. *Cell & Developmental Biology*, 9: 227-238.
- Grossniklaus, U., Spillane, C., Page, D. R. ve Köhler, C. 2001. Genomic Imprinting and Seed Development: Endosperm Formation With and Without Sex. *Current Opinion in 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 Fertilization Independent Seed Polycomb Group Pathway Involved in the Control of Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131: 2971-2981.
- Guitton, A. E. ve Berger, F. 2005. Control of Reproduction by Polycomb Group Complex in Animals and Plants. *Developmental biology*, 49: 707- 716.
- 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.
- Jones, R. S. ve Gelbart, W. M. 1993. The *Drosophila* Polycomb-Group Gene *Enhancer of zeste* Contains a Region With Sequence Similarity to *trithorax*. *Molecular and Cellular Biology*, 6357-6366.
- 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*. *Curr Biol*, 16: 486–492.
- Katz, A., Oliva, M., Mosquana, A., Hakim, O. ve Ohad, N. 2004. FIE and CURLY LEAF Polycomb Proteins Interact in the Regulation of Homeobox Gene Expression During Sporophyte Development. *The Plant Journal*, 37: 707-719.
- 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. *The Plant Cell*, 11:1945-1952

- Kinoshita, T., Harada, J. J., Goldberg, R. B. ve Fischer, R. L. 2001. Polycomb Repression of Flowering During Early Plant Development. *PNAS*, 98 (24): 14156-14161.
- Kiyosue, T., Ohad, N., Yadegari, R., Hannon, M., Dinneny, J., Wells, D., Katz, A., Margossian, L., Harada, J. J., Goldberg B. R. ve Fischer, L. R. 1999. Control of Fertilization-Independent Endosperm Development By The *MEDEA* Polycomb Gene in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 96: 4186–4191.
- Koch, M. A., Dobes, C. ve Mitchell-Olds T. 2003. Multiple Hybrid Formation in Natural Populations: Concerted Evolution of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 20: 338-350
- Köhler, C. ve Grossniklaus, U. 2002. Epigenetic Inheritance of Expression States in Plant Development: The Role of Polycomb Group Proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 773-779.
- 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 & 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 Paternal Imprinting. *Nature Genetics*, 37 (1): 28-30.
- 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 Physiol*, 108: 1345–1352.

- 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. *PNAS*, 97 (19): 10637–10642.
- Mascarenhas, J. P. 1989. The Male Gametophyte of Flowering Plants. *The Plant Cell*, 1: 657-664.
- McCormick, S. 1993. Male Gametophyte Development. *The Plant Cell*, 5: 1265-1275.
- McCormick, S. 2004. Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell*, Preview: 1-12.
- Mosquna, A., Katz, A., Shochat, S., Grafi, G. ve Ohad, N. 2004. Interaction of FIE, a Polycomb Protein, With pRb: a Possible Mechanism Regulating Endosperm Development. *Mol Gen Genomics*, 271: 651–657.
- 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., Laak, J., Osadtchiy, 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.
- 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 B. R. ve Fischer, L. R. 1999. Mutation in *FIE*, a WD Polycomb Group Gene, Allow Endosperm Development Without Fertilization. *The Plant Cell*, 11: 407–415.
- Pirrota, V. 1997. PcG Complex and Chromatin Silencing. *Current Opinion in Genetic & Development*, 7: 249-258.
- Qian, C. ve Zhou, M. M. 2006. SET Domain Protein Lysine Methyltransferases: Structure, Specificity and Catalysis. *Cellular and Molecular Life Science*, 10: 1-9.
- Reiser, L. ve Fischer, R. L. 1993. The Ovule and the Embryo Sac. *The Plant Cell*, 5: 1291-1301.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R. E. ve Gasser, C. S. 1992. Ovule Development in Wild-Type *Arabidopsis* and Two Female-Sterile Mutants. *The Plant Cell*, 4: 1237-1249.
- Roy, B. A. 1995. The Breeding Systems of Six Species of *Arabis* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 82 (7): 869-877.
- Sambrook, J. ve Russell, D. V. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Schneitz, K., Hülskamp, M. ve Pruitt, R. E. 1995. Wild-type Ovule Development in *Arabidopsis thaliana*: A Light Microscope Study of Cleared Whole-mount Tissue. *The Plant Journal*, 7 (5): 731-749.
- Schneitz, K., Hülskamp, M., Kopczak, S. D. ve Pruitt, R. E. 1997. Dissection of Sexual Organ Ontogenesis: A Genetic Analysis of Ovule Development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124: 1367-1376.
- Schneitz, K., Balasubramanian, S. ve Schiefthaler, U. 1998. Organogenesis in Plants: the Molecular and Genetic Control of Ovule Development. *Trends in Plant science*, 3 (12): 468-472.
- Schneitz, K. 1999. The Molecular and Genetic Control of Ovule Development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 13-17.
- Schranz, M. E., Dobes, C., Koch, M. A. ve Olds, T. M. 2005. Sexual Reproduction, Hybridization, Apomixis, and Polyploidization in the Genus *Boechera* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 92 (11): 1797–1810

- Simon, J. A. ve Tamkun, J. W. 2002. Programming off and on States in Chromatin: Mechanisms of Polycomb and Trithorax Group Complexes. *Current Opinion in Genetic & Development*, 12: 210-218.
- Sørensen, M. B., Chaudhury, A. M., Robert, H., Bancharel, E. ve Berger, F. 2001. Polycomb Group Genes Control Pattern Formation in Plant Seed. *Current Biology*, 11: 277-281.
- Spillane, C., MacDougall, C., Stock, C., Köhler, 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.
- Steimer, A., Schöb, H. ve Grossniklaus, U. 2004. Epigenetic Control of Plant Development: New Layers of Complexity. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 11-19.
- Taşkın, K. M., Turgut, K. ve Scott, R. J. 2004. Apomictic Development in *Arabis gunnisoniana*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 52: 155-160.
- 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.
- Valk-Lingbeek, M. E., Bruggeman, S. W. M. ve Lohuizen, M. 2004. Stem Cells and Cancer: The Polycomb Connection. *Cell*, 11: 409-418.
- 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 & Development*, 13: 2971-2982.
- Vinkenoog, R., Spielman, M., Adams, S., Fischer, R. L., Dickinson, H. G. ve Scott, R. J. 2000. Hypomethylation Promotes Autonomous Endosperm Development and Rescues Postfertilization Lethality in *fie* Mutants. *Plant Cell*, 12:2271-2282
- 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.

- Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A. ve Koltunow, A. 2001. Fruit Development is Actively Restricted in the Absence of Fertilization in *Arabidopsis*. *Development*, 128: 2321-2331.
- 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.
- Wang, X. X. ve Ma, L. G. 2007. Polycomb-group (Pc-G) Proteins Control Seed Development in *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (1): 52-59.
- 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. *The Plant Cell*, 12: 2367-2381.
- Yadegari, R. ve Drews, G. N. 2004. Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*, 16: 133-141.
- Yang, W. C. ve Sundaresan, V. 2000. Genetics of Gametophyte Biogenesis in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 53-57.
- Yeates, T. O. 2002. Structures of SET Domain Proteins: Protein Lysine Methyltransferases Make Their Mark. *Cell*, 111: 5-7.

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.....	27
Tablo 3.2. PCR’da kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.....	28
Tablo 3.3. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	28
Tablo 3.4. PCR segmentleri ve döngü sayısı.....	28
Tablo 3.5. Frozen Storage Buffer bileşenleri ve miktarları.....	33
Tablo 3.6. Blunting reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.....	33
Tablo 3.7. Koloni PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	36
Tablo 3.8. Koloni PCR segmentleri ve döngü sayısı.....	36
Tablo 3.9. Restriksiyon Endonükleaz enzimleri kesim reaksiyonları bileşenleri ve miktarları.....	37
Tablo 4.1. Restriksiyon Endonükleaz enzimleri ile kesilen plazmitlerden elde edilen DNA bantlarının yaklaşık büyüklükleri.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dorosophila PRC2 kompleksi ile FIS kompleksi benzerliği.....	7
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritaları.....	29
Şekil 3.2. Klonlama çalışmasında kullanılan pJET1/Blunt vektör haritası.....	35
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Boecheera</i> türleri.....	39
Şekil 4.2. FA jel elektroforezi	40
Şekil 4.3. <i>Boecheera</i> türlerinden sentezlenen cDNA örnekleri.....	41
Şekil 4.4. PCR analizleri.....	42
Şekil 4.5. Jelden geri alınan PCR ürünleri.....	43
Şekil 4.6. Kontrol insert içeren koloniler ile yapılan PCR sonuçları.....	45
Şekil 4.7. <i>FIS2</i> DNA'sı içeren plazmitleri taşıyan koloniler ile yapılan PCR sonuçları.....	46
Şekil 4.8. Plazmit üzerine bağlanan primerler ile yapılan PCR sonuçları.....	47
Şekil 4.9. Restriksiyon endonükleaz enzim kesim sonuçları.....	49
Şekil 4.10. <i>BhFIS2</i> geni dizi analizi sonuçları.....	51
Şekil 4.11. <i>BgFIS2</i> geni dizi analizi sonuçları.....	52
Şekil 4.12. <i>BhFIS2</i> geni ile <i>AtFIS2</i> geni baz dizisinin karşılaştırmalı analiz sonuçları.....	53
Şekil 4.13. <i>BgFIS2</i> geni ile <i>AtFIS2</i> geni baz dizisinin karşılaştırmalı analiz sonuçları.....	54

YAŞAM ÖYKÜŐÜ

Sibel YILMAZ 1980 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2005 yılından beri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalındanda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.