

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

***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.**
KALLAZ KOMPONENTİ
 β -1,3-GLUCANASE'İN TANIMLANMASI

Yasemin DEMİRGAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **20.07.2009**

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

Yasemin DEMİRGAN tarafından Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN yönetiminde hazırlanan “ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. KALLAZ KOMPONENTİ β -1,3-GLUCANASE’ IN TANIMLANMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. K. Melih TAŞKIN

Yönetici

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Doç. Dr. Uğur GÖZEL

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 20/ 07 / 2009

Prof. Dr. Neşet AYDIN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2008/ 34 no’ lu projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde gorsel, isitsel ve yazılı bicimde sunulan tum bilgi ve sonucların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez icinde yer alan ancak bu calısmaya ozgu olmayan tum sonuc ve bilgileri tezde kaynak gostererek belirttiğimi beyan ederim.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma fırsatı tanıyan, çalıŐmalarım sırasında bilgi, tecrube ve desteğini gördüğüm danıŐmanım Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN' a teşekkür ederim.

Tez çalıŐmalarımın yürütölmesi esnasında manevi desteğinin yanı sıra çalıŐmalarımda yardımcı olan ve bilgilerini benimle paylaşan arkadaŐım ArŐ. Gör. Sibel YILMAZ' a, laboratuvar çalıŐmalarımda yardımcı olan arkadaşlarım Gözde NİŐLİ ve Fatih SEZER' e ayrıca manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Semih ÜSTEL, Hakkı ÖZMEN, Damla ERDEN ve Meltem TEZCAN' a teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan gerek manevi gerek maddi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca bu çalıŐmayı destekleyen Çanakale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederim.

Yasemin DEMİRGAN

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
FAA	Formalin-Asetik asit-Alkol
g	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı
ng	Nanogram
⁰ C	Santigrat derece
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
U.V.	Ultra violet
kD	Kilo dalton
CHS	Chalcone synthase
BG	β-1,3- Glucanase
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase

ÖZET

***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. KALLAZ KOMPONENTİ β-1,3-GLUCANASE'İN TANIMLANMASI**

Yasemin DEMİRGAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

20 Temmuz 2009, 48 sayfa

Bu çalışmada bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh bitkisinde henüz tanımlanmamış olan kallaz enzim kompleksi bileşeni β-1,3-glukanaz kodlayan gen veya genlerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada öncelikle, β-1,3-glukanaz gen ailesine dahil 50 gen biyoinformatik araçlar kullanılarak incelenmiş, üye genlerin ifade profilleri mikrodizilim veritabanları kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Kallaz bileşeni β-1,3-glukanaz kodladığı varsayılan altı aday gen tespit edilmiştir. *A. thaliana* (L.) Heynh. bitkisinden total RNA izolasyonu kallaz enziminin aktif olduğu tetrat safhasındaki anterlerden gerçekleştirilmiştir. Aday genlerin anterdeki ifadeleri özgün primerler kullanılarak RT-PCR ve semi-quantitative RT-PCR aracılığı ile belirlenmiştir. Bu primerlerden sırasıyla 767, 609, 890, 840, 557 ve 672 bp' i büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir. Ayrıca aday genlerin somatik (yaprak ve gövde) dokulardaki ifadeleri de karşılaştırma amacı ile ortaya çıkarılmıştır. PCR ürünleri %1' lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra U.V. altında görüntülenmiştir. Bu sayede, biyoinformatik analizler sonucu aday olarak belirlenen altı genin anter ve somatik dokulardaki ifade profilleri belirlenmiştir. Buna göre somatik dokularda At3g55780 ve At3g61810 genlerinin ifadelerinin yüksek olduğu görülmüştür. Buna karşın anterde kalloz degradasyonu sırasında At4g14080, At3g23770 ve At3g55780 genlerinin tercihen ifade olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh bitkisinde β-1,3-glukanaz kodlayan At4g14080, At3g23770 ve At3g55780 genlerinin kallaz enzim kompleksi bileşeni olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Kallaz, kalloz, β-1,3-glukanaz, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF CALLASE COMPONENT β -1,3- GLUCANASE GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Yasemin DEMİRGAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Yrd. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

20 Temmuz 2009, 48 pages

In this study, it is aimed to characterize gene or genes encoding the β -1,3-glucanase components of callase enzyme that has not been identified before, in *Arabidopsis thaliana* as a modal organism.

In this study, 50 genes belongs to β -1,3-glucanase family 17 were screened by applying various bioinformatic filters and microarray databases were revealed the expression profiles of these genes. Six candidate genes encoding β -1,3-glucanase component of callase were determined. Total RNA was isolated from *A. thaliana* anthers at tetrad stage when callase enzyme is active. The candidate genes profiles in anthers were determined by RT-PCR using gene specific primers. The RT-PCR products obtained with these primers were 767, 609, 890, 840, 557 and 672 bp in lengths. Also the candidate genes expression profiles in somatic tissues were revealed to compare with anthers. PCR products separated in %1 agarose gel electrophoresis were stained with Ethidium Bromide and recorded on U.V. table. We observed that while genes were preferentially expressed in somatic tissues, in anthers during callose degradation At4g14080, At3g23770 and At3g55780 genes were expressed. These results indicate that At4g14080, At3g23770 and At3g55780 genes encoding β -1,3-glucanase could be concluded to be part of the callase enzyme complex in *Arabidopsis*.

Keywords: Callase, callose, β -1,3-glucanase, *Arabidopsis thaliana*

İÇERİK

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
BÖLÜM 1-GİRİŞ	1
BÖLÜM 2-ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
BÖLÜM 3-MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Biyoinformatik Çalışmalar	16
3.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi	17
3.3. Sitolojik Araştırmalar	17
3.4. Total RNA İzolasyonu	18
3.5. cDNA Sentezi	18
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	19
3.7. Semi-quantitative (yarı-sayısal) PCR.....	20
3.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	22
3.9. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması	22
BÖLÜM 4-ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	24
4.1. Biyoinformatik Çalışmalar	24
4.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi	36
4.3. Sitolojik Araştırmalar	36
4.4. RT-PCR ile Genlerin Anter, Gövde ve Yaprakta Amplifikasyonu	37
4.5. Semi-quantitative RT-PCR ile Genlerin Anterdeki Amplifikasyonu	40
4.5.1. Semi-quantitative RT-PCR ile gerçekleştirilen miktar denemeleri.....	41
4.5.2. Farklı sayıda amplifikasyon döngüleri seçilerek gerçekleştirilen semi-quantitative RT-PCR	42
4.5.2.1. Döngü sayısı 29, 32, 35, 38 ve 41 olan semi-quantitative RT-PCR	42
4.5.2.2. Döngü sayısı 20,23,26,29 ve 32 olan semi-quantitative RT-PCR	45
BÖLÜM 5-SONUÇLAR ve ÖNERİLER	47

KAYNAKLAR	I
ÇİZELGE LİSTESİ	IX
ŞEKİL LİSTESİ	X
ÖZGEÇMİŞ.....	XI

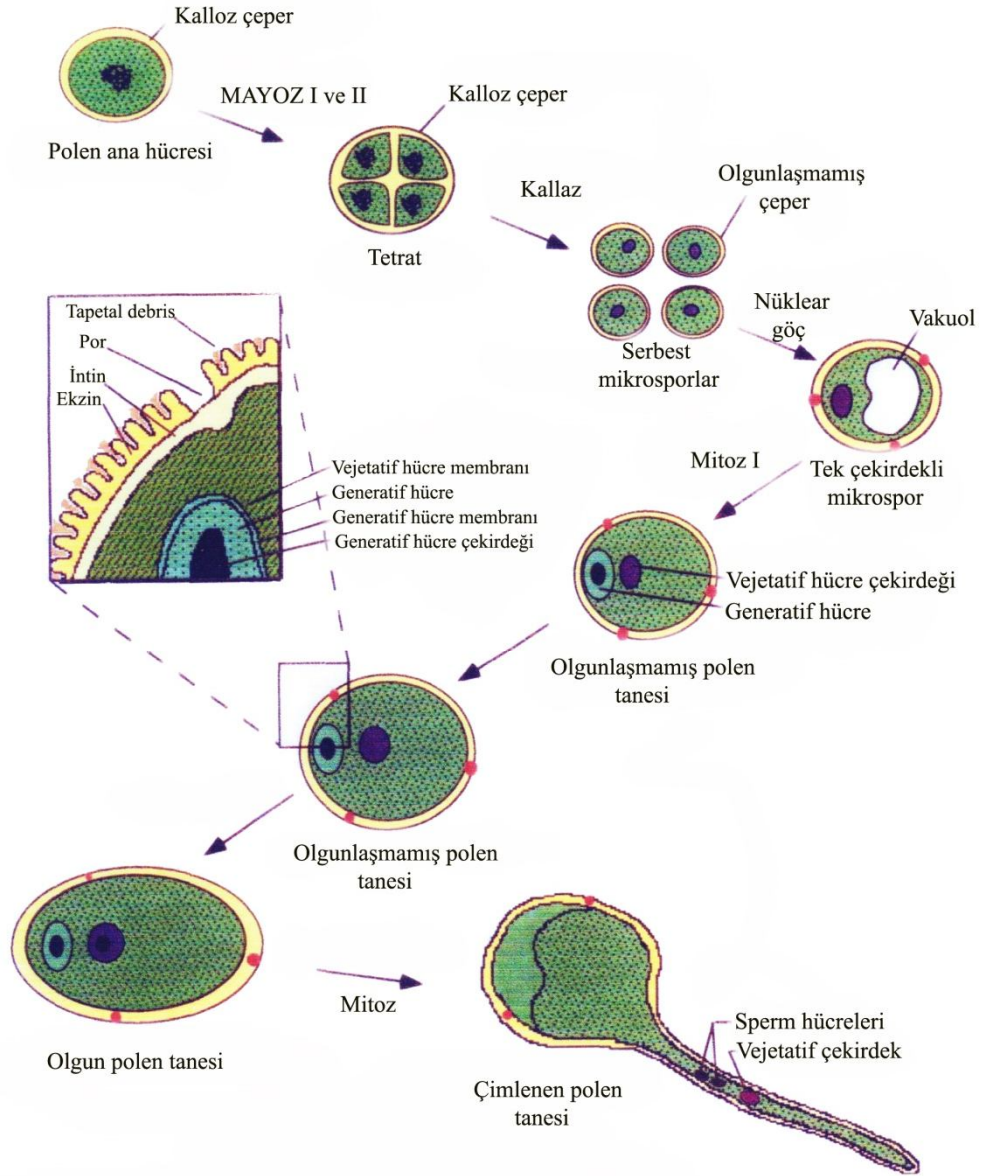
BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Angiosperm türlerinin çoğunda tohum mayoz geçirmiş gametlerin birleşmesi ile meydana gelir. Bu türlerde erkek gamet anter polen kesesinde bulunan mikrospor ana hücrelerinden köken alır. Mikrospor ana hücreleri, mayoz sayesinde haploid kromozoma sahip dört adet mikrospor oluşturur (tek hücreli safha). Ardından, her bir mikrospor, mitoz sonucunda generatif ve vejetatif hücre içeren olgunlaşmamış erkek gametofiti meydana getirir (iki çekirdekli safha). Generatif hücre, ikinci bir mitoz daha geçirerek iki sperm hücresi oluşturur. Bu aşamada olgun polen taneleri anter loküllerinde birikmiş durumdadır (üç hücreli safha) (Regan ve Moffatt., 1990).

Dişi gamet ve döllenme ise ovül adı verilen üreme organında meydana gelir (Drews ve ark., 1998). Ovül içerisinde genelde bir megaspor ana hücresi mayoz ile haploid kromozoma sahip tetrat oluşturur. Bunlardan sadece bir tanesi ard arda mitoz bölünmelerle dişi gametleri içeren olgun embriyo kesesine dönüşür.

Polinasyon ile dişi organ tepeciğine (stigma) gelen polen vejetatif çekirdeği dişicik borusundan (stilus) embriyo kesesine ilerleyen polen tüpünü oluşturur. Generatif hücre ise bu aşamada mitoz bölünme geçirerek iki sperm oluşturur. Polen tüpünün uç kısmı mikropile geldiğinde patlar ve sperm çekirdekleri embriyo kesesine ulaşır. Sonuçta polinasyon ile embriyo kesesine gelen spermlerden biri yumurta hücresi ile birleşerek embriyoyu (2n) oluştururken diğeri ise kutup çekirdekleri ile birleşerek tohumun gelişmesi ve çimlenmesi için gerekli olan triploid (3n) endospermi meydana getirir.

Çiçekli bitkilerin erkek üreme organı stamen, dişi üreme organı ise karpel olarak bilinir. Stamenler polen gelişiminin meydana geldiği bir anter ve antere besin ve su iletimini sağlayan sap benzeri bir filamentten oluşur. Anter ise polen kesesi (mikrosporangiyum) olarak adlandırılan dört odacık içerir ve her bir polen kesesinde çok sayıda mikrospor ana hücresi (2n) veya diğeri adı ile mikrosporosit gelişir.

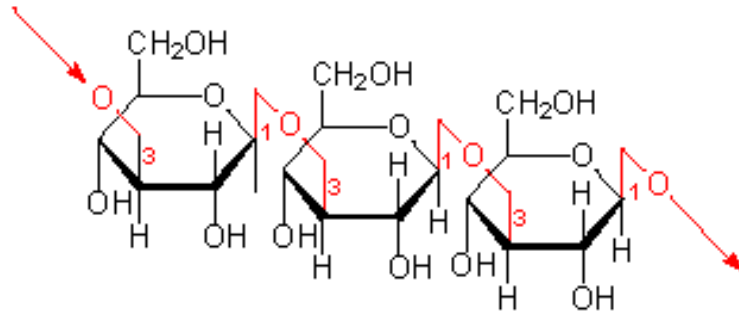


Şekil 1.1. Angiospermlerde görülen tipik mikrosporogenez (McCormick, 2004'den izin alınmıştır).

Çiçekli bitkilerde polen üretiminin en kritik adımlarından biri mayoz sırasında tetratların etrafını çevreleyen kalloz duvarların parçalanarak mikrosporların anter lokülüne salınmasıdır. Angiosperm türlerinin çoğunda polen ana hücreleri profaz I safhasında plazma membranı ve orijinal selüloz hücre çeperi arasında kallozdan (β -1,3- glukan) oluşan özel bir hücre çeperi salgılar. Mayoz bölünme boyunca kalloz, sitokinez sırasında oluşan hücresel plakalar boyunca da birikmeye devam eder. Böylelikle tetratı oluşturan her bir mikrospor da kalın bir kalloz çeper ile sarılmış olur. Kalloz, mayoz bölünme sonunda anter tapetumu tarafından salgılandığı düşünülen (Stieglitz ve Stern, 1973; Bucciaglia ve Smith, 1994) ve β -1,3- glukanazlardan (EC 3.2.1.39) oluşan bir enzim kompleksi diğer bir adıyla kallaz tarafından parçalanır (Frankel ve ark., 1969). Kalloz çeperin parçalanmasıyla mikrosporlar, anter lokülünde serbest hale geçerler ve gelişimlerine devam ederler. Kallaz ayrıca mikrosporositlerin orijinal selüloz çeperini degrades etmek için selülazları da içermektedir (Worrall ve ark., 1992).

Arabidopsis thaliana bitkisinde çiçek (floral) gelişimi, organların şekil, boyut ve yüzey özelliklerine göre 12 (Smyth ve ark., 1990), anter gelişimi ise 14 safhaya bölünmüştür (Sanders ve ark., 1999). Polenin geliştiği anter lokülleri adaksiyal yüzeyde dışbükey çıkıntılar şeklinde 8 (floral)/ 4 (anter) safhasında ortaya çıkmaktadır. Bu safhada ayrıca poleni oluşturacak olan sporogen hücreler bölümlere ayrılmış anterlerin loküllerinde görülebilir durumdadır. Tüm anter hücre tipleri 9 (floral) / 5 (anter) safhasındaki anterde mevcuttur. Anter safhası 7, tapetumdan kallazın salgılandığı ve bunun sonucunda kallozun parçalandığı, safha 8 ise mikrosporların anter loküllerine salındığı safhadır (Stieglitz ve Stern, 1973).

Kalloz, β -1,3- glikozidik bağlarla bir araya gelmiş glukoz birimlerinden oluşan ve β -glukan olarak da bilinen bir bitki polisakkaritidir. Bu bağ yapısı polimerin heliks (sarmal) şeklinde organize olmasına sebep olur. Heliks yapısı ise anilin blue adı verilen bir boyayı bağlayarak kallozun ultra viyole ışık altında parlak sarı florasan olarak görülmesini sağlar.



Şekil 1.2. Kallozun moleküler modeli (<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e17/17c.htm> adresinden alınmıştır).

Kallozun biyolojik fonksiyonları üzerine çeşitli hipotezler önerilmiştir. Kalloz normal hücre duvarının bir parçası değildir, bununla birlikte yaralanmaya karşı cevap olarak üretildiği zaman (Goodman ve ark., 1986) patojen saldırılarına karşı fiziksel bir bariyer oluşmasına da katkıda bulunur. Waterkeyn (1962), kallozun geçici bir duvar görevi üstlenerek hem mayoz ürünlerini izole ederek hücrelerin birbirlerine yapışmasını ve birleşmesini önlediğini hem de parçalanmasıyla birlikte bu hücrelerin serbest kalmasını sağladığı için önemli bir biyolojik rol üstlendiğini önermiştir. Heslop- Harrison (1964), kalloz duvarın bir moleküler filtre ya da bariyer gibi davranarak mikrosporları diploid dokulardan ve kardeş sporların etkilerinden izole ettiğini önermiştir (Heslop- Harrison ve Mackenzie, 1967). Bu araştırmacılar kallozun, mikrosporların erken (zamansız) şişmesini önleyebileceğini de ifade etmişlerdir. Ayrıca, Waterkeyn ve Beinfait (1970), kalloz çeperin olgun polen tanelerinin üzerinde görülen türe özgü ekzin tabakasının oluşumu için bir kalıp görevi yaptığını önermişlerdir.

Bazı sitoplazmik erkek kısır petunya hatlarının anter loküllerinde kallaz aktivitesinin erken yada geç gerçekleşmesi kalloz çeperinin de erken yada geç parçalanmasına yol açmıştır (Izhar ve Frankel, 1971). Bu sonuç kalloz çeper parçalanmasının yanlış zamanda meydana gelmesinin bu hatlarda (Izhar ve Frankel, 1971) ve ayrıca erkek steril sorgum (süpürge darısı) hatlarında da (Warmke ve Overman, 1972) erkek kısırlığın birincil sebebi olduğunu işaret etmiştir. Daha sonra Worrall ve ark. (1992), transgenik tütünde erken kalloz parçalanmasının erkek kısırlığa sebep olduğunu göstermişlerdir. Bu bitkilerde erkek kısır bireylerde mikrosporogenez normal ilerlemiş fakat mikrosporların hücre çeperinde anormallikler ve tapetal hücrelerde ise hipertrofi gözlenmiştir.

Erkek kısırılığa yol açan birçok sitoplazmik ve nuklear mutasyonların tapetal gelişim ve tapetal fonksiyon ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Chaudhury, 1993; Kaul, 1988).

Erkek kısır mutantlar, hibrit bitki üretiminde tarımsal öneme sahiptir. Hibrit bitki üretiminde erkek kısır bitkiler anterlerin çiçeklerden mekanik olarak uzaklaştırılması (emaskülasyon) ile elde edilmektedir. Buna karşın, birçok ürün bitkisinde erkek ve dişi organlar bir arada bulunurlar. Ayrıca, çeltik gibi bazı bitkiler her çiçekte sadece bir tohum üretir. Çeltik, buğday, soyafasulyesi gibi ürün bitkileri için, anterleri uzaklaştırarak çok sayıda hibrit bitki üretimi çok zor bir işlemdir. Buna karşın, bu bitkilerde erkek kısır hatların geliştirilmesi polinasyonun kontrol altına alınmasını mümkün kılacaktır. Ayrıca genetik mühendisliği kullanılarak elde edilen erkek kısır ürün bitkileri, genetik olarak değiştirilmiş organizmaların genlerinin yabancı tiplere yayılmasının kontrolünde de yararlı olacaktır (Ma, 2002).

Tapetal hücreler ve gelişmekte olan polen arasındaki ilişki henüz detayları ile açıklanamamış olsa da tapetumun mikrosporlar için sadece bir besin kaynağı olmadığı aynı zamanda polen gelişimine yardımcı olan bazı maddelerin de kaynağı olduğu ifade edilmiştir (Pacini ve ark., 1985). Örneğin, tapetal hücreler polen dış çeperinin (ekzin) oluşması için bir salgı işleminde de görev alır (Blackmore ve ark., 2007). Tapetal hücreler ayrıca mikrosporositlerin salgılamış olduğu özel kalloz çeperin parçalanmasından da sorumludur.

β -1,3- glukanaazlar (glukan endo-1,3- glukozidazlar, β -1,3-glukanaaz, E. C. 3.2.1.39) β -1,3- glukan polisakkaritlerindeki 1,3- β -D- glukozidik bağların kesimini katalizleyen hidrolitik bir enzim sınıfıdır (Simmons, 1994). β -1,3-glukanaazlar bakteri, mantar, metazoa (Bachman ve McClay 1996) ve virüslerde (Sun ve ark., 2000) bulunmaktadır. Boller, (1985); Pan ve ark., (1989) ise bu enzimlerin bitki, maya, aktinomiset, bakteri, mantar, böcek ve balıklarda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bitki β -1,3-glukanaazları patojen saldırılarına karşı bitki savunmasında rol oynadıkları düşünülen patojen-ilişkili (Pathogenesis-related: PR) proteinlerdir. PR-2 ailesinin üyeleri olarak sınıflandırılan bu proteinler patojen enfeksiyonu ile indüklenirler ve fungal hücre duvarlarının en önemli yapısal bileşeni olan β -1,3- glukanın hidrolizinde aktif antifungal bir rol oynarlar (Leubner- Metzger ve Meins, 1999). Günümüze kadar yapılan araştırmalar öncelikli olarak patojen ilişkili β -1,3- glukanaazlar üzerine yoğunlaşmış olsa da bu enzimlerin enfekte olmamış bitkilerde hücre bölünmesi (Fulcher ve ark., 1976), mikrospor

oluşumu (Bucciaglia ve Smith, 1994), polen çimlenmesi ve tüp büyümesi (Roggen ve Stanley, 1969; Meikle ve ark., 1991), dölllenme (Ori ve ark., 1990), embriyo oluşumu (Helleboid ve ark., 2000), meyve olgunlaşması (Hinton ve Pressey, 1980), tohum çimlenmesi (Morohashi ve Matsushima, 2000; Buchner ve ark., 2002), tahıl tohumlarının endospermelerinde depo kaynaklarının harekete geçirilmesi, tohum dormansisi (Krabel ve ark., 1993) ve yaralanma, soğuk, ozon ve U.V. ışınlarına karşı bitkiyi savunma gibi farklı fizyolojik ve gelişimsel süreçlerde de görev aldığına dair güçlü kanıtlar vardır.

Ayrıca, sağlıklı bitkilerin kök ve çiçek dokularında sürekli ifade olan bir β -1,3-glukanaz sınıfı tanımlanmıştır (Memelink ve ark., 1990). Floral dokuda β -1,3-glukanazların bitki gelişimine bağlı olarak biriktiği ve bunun bitki savunmasıyla ilgili olmadığı bildirilmiştir (Lotan ve ark., 1989). β -1,3-glukanazlar sepal, ovaryum, pedisel, stilüs ve anterde bulunabilirler (del Campillo ve Lewis, 1992; Lotan ve ark., 1989). Bunların çoğunun fonksiyonu henüz bilinmemekle birlikte, anterde ifade olan kallaz komponenti β -1,3-glukanazların tetrat kallos çeperinin parçalanmasından ve genç mikrosporların anter lokülü içerisine salınmasından sorumlu olduğu bildirilmektedir (Frankel ve ark., 1969).

β -1,3- glukanaz genlerinin kodladığı proteinler boyut, izoelektrik nokta, öncül yapı, hücresel lokalizasyon ve düzenlenmelerindeki farklılıklara göre çoklu yapısal izoformlara sahiptir. Bu farklılıklara bakılarak β -1,3- glukanazlar *Nicotiana* cinsinde dört sınıfa ayrılmıştır (Payne ve ark., 1990; Ward ve ark., 1991; Leubner- Metzger ve Meins, 1999). Bu sınıflandırmalar benzer yapısal izoformlara sahip diğer bitki türlerine ait β -1,3- glukanazları da kapsamaktadır (Van Kan ve ark., 1992; Beerhues ve Kombrink, 1994; Domingo ve ark., 1994; Oh ve ark., 1995). Sınıf I proteinlerinin çoğu baziktir ve hücre vakuolünde bulunur. Sınıf II, III ve IV' e ait proteinlerin çoğu ise asidiktir ve hücrelerarası boşluklara salgılanır. Olgunlaşmamış Sınıf I proteinleri bir sinyal peptid içerir ve bu sınıfa ait enzimlerin çoğu da bir C- terminal uzantı içerir. Bununla birlikte Sınıf II, III ve IV içerisinde yer alan β -1,3- glukanazlar C- terminal uzantı içermezken bazı Sınıf II üyeleri ise Sınıf I üyeleri gibi sinyal peptid içerirler.

β -1,3-glukanazların, bazik izoformları temel olarak hücre vakuolünde bulunurken (Boller ve Vögeli, 1984), asidik izoformları ise hücre dışı bölmelere salgılanırlar (Parent ve Asselin, 1984). Karakteristik izoelektrik özelliklerine bakıldığında ise, β -1,3-glukanazlar, β -1,3- glukanlar üzerindeki etkilerine göre iki gruba ayrılırlar; endoglukanazlar, bu

substratı keserek kısa zincirlere indirgerken ekzoglukanazlar, substratı uç kısımlarından indirgeyerek tek glukoz birimlerine ayırır.

Bilinen β -1,3-glukanaz genlerinin çoğu 340- 400 aminoasit uzunluğunda öncül proteinler kodlarlar. Bazı öncül proteinler bir sinyal peptid (N- terminal) içerir ve hücre dışı boşluklara salgılanır. Öncül proteinlerin çoğu ayrıca yaklaşık olarak 20 aminoasitten oluşan C- terminal uzantısına sahiptir. C- terminal amino asit dizisi, enzimin golgi cisimciği aracılığıyla endoplazmik retikulumdan vakuolü hedeflemesini sağlayan bir sinyal içerir. Sinyal peptid ve C- terminal uzantı olgun protein oluşurken uzaklaştırılır (Shinshi ve ark., 1988). Olgun proteinlerin moleküler ağırlıkları ise 33 ila 40 kD arasında değişiklik göstermektedir.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh, *Brassicaceae* familyasına ait olan ve bitki biyolojisinde yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. *A. thaliana* (thale cress) 2000 yılının sonunda genom sekansı belirlenen ilk bitkidir (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Ticari bir önemi olmamasına rağmen *A. thaliana* altı hafta süren kısa bir hayat döngüsüne sahip olması, laboratuvar şartlarında kolay yetiştirilebilmesi, bir bitkiden dahi çok fazla tohum elde edilebilmesi, çok fazla mutant hattının, genomik kaynaklarının ve 5 kromozomunun genetik ve fiziksel olarak haritalarının mevcut olması gibi bazı avantajları nedeniyle moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları için model bir organizma olarak seçilmiştir.

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

Bu çalışmada biyoinformatik yaklaşımlar aracılığı ile kallaz komponenti β -1,3-glukanazı kodlayan aday genler tespit edilmiş, daha sonra ise bu aday genlerin anter dokularındaki ifadesi RT-PCR ve semi-quantitative RT-PCR aracılığı ile belirlenmiştir. Kallazı oluşturan genlerin belirlenmesi erkek kısır bitkilerin elde edilmesinde ve bunun sonucunda da bu genlerin sadece ifadelerinin değiştirilmesiyle tarımsal alanda büyük önem taşıyan hibrit bitkilerin üretilmesinde de yararlı olacaktır.

BÖLÜM 2**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Stieglitz ve Stern (1973), zambak mikrospor ana hücrelerinin muhtemelen bir β -1,3-glukoz polimeri olan kallozdan oluşan özelleşmiş çeperlere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Mayoz sonunda çeperler, genç mikrosporların salınımı ile sonuçlanan ani ve hızlı bir parçalanmaya maruz kalırlar. Bu olay β -1,3-glukanaz aktivitesinde meydana gelen net bir artış ile ilişkilidir. Bu aktivite mayozun herhangi bir aşamasında iken mikrospor ana hücreleri ile ilişkili olan total aktivitenin %7,3' ünden daha az olacak şekilde anterin somatik bölgesinde sınırlandırılmıştır. Bunun sonucu olarak, β -1,3-glukanazın, mayotik hücrelerin gelişimi için ihtiyaç duyulan bununla birlikte görevi mayotik hücrelerden çok bu hücreleri çevreleyen somatik dokular tarafından yerine getirilen bir enzim olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Stieglitz (1977), zambakta yaptığı çalışmada kallaz komponentinin bir 32 kDa endoglukanaz ve bir 62 kDa ekzoglukanaz olmak üzere iki β -1,3-glukanazdan oluştuğunu göstermiştir. In vitro deneylerle her iki glukanaz aktivitesinin kalloz çeperin yok edilmesi üzerindeki görevi izlenmiş ve sadece endoglukanaz ile kesiminin kalloz çeperlerin boyutlarında önemli bir azalmaya sebep olduğunu, sadece ekzoglukanazın ise fark edilebilir bir etki oluşturmadığını göstermiştir. Araştırmacı, bundan dolayı, ekzoglukanazların endoglukanazlar tarafından meydana getirilen oligosakkaritleri parçalamadan sorumlu olduğunu önermiştir.

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

Samac ve ark. (1990), *A. thaliana* bitkisinde asidik ve bazik kitinaz kodlayan genlerin ekspresyon analizlerini ve nükleotit sekanslarını belirlemişlerdir. Bazik kitinazların organ-spesifik ve yaşa bağlı ifade olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek ifadenin kökte bulunduğunu bununla birlikte yaprak ve sürgün kısımlarında da az seviyede bir ifadenin bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bazik kitinazların etilenle muamele edilmiş bitkilerde ifadesinin arttığını asidik kitinazların ise, ne normal bitkilerde ne de etilen ve salisilik asitle muamele edilmiş bitkilerde ifadesinin saptanmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu genlerin çok az sekans benzerliği gösterdiğini ve intron içerdiğini belirtmişlerdir.

Dong ve ark. (1991), patojen saldırılarına karşı bitki savunmasında görev alan bazı *Arabidopsis thaliana* genlerinin aktivasyonuna yol açan sinyal transdüksiyon süreçlerini araştırmışlardır. *Arabidopsis* yapraklarına nüfuz ettiği zaman hastalık ve direnç semptomlarına neden olan virülan ve avirülan *Pseudomonas syringae* suşlarının karakterizasyonunu ve tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Virülan ve avirülan suşlar, enfekte olan yapraklarda *Arabidopsis* PAL, BG ve CHS genlerine eş mRNA birikiminin ölçülmesi ve *Arabidopsis* yapraklarında patojen gelişmesinin belirlenmesi ile karakterize edilmiştir. İlginç bir şekilde, virülan ile avirülan *P. syringae* suşları PAL ve BG genleri üzerinde zıt etkiler yaratmıştır. Bundan başka, avirülan suştan klonlanan bir *avr* geni taşıyan virülan suşun, PAL ve BG genlerini avirülan suşun etkilerine benzer şekilde aktive ettiğini bildirmişlerdir. Bu da *avr* geni kodlayan DNA sekansının, konak canlıya ait savunma genlerinin ifadesine sebep olduğunu göstermektedir. Virülan *P. syringae* suşu, *Arabidopsis* yapraklarında 10^5 kat çoğalmış, çok fazla miktarda BG1, BG2 ve BG3 mRNA birikimine sebep olmuştur. Fakat, PAL mRNA birikimi az gerçekleşmiştir. Buna karşın, avirülan suş, yapraklarda 10 kattan daha az çoğalmış, BG1, BG2 ve BG3 genleri üzerinde minimal bir etkiye sebep olmuştur. Fakat, PAL mRNA birikimi indüklenmiştir. Her iki suşta da CHS mRNA birikimi gözlenmemiştir. Bu sonuçlara bakarak PAL artışına sebep olan sürecin bir *avr* gene sahip olduğu için kısmen patojen spesifik olabileceğini fakat BG artışını sağlayan sürecin patojen spesifik olmayan bir sinyalden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Mariani ve ark. (1990), tütün bitkisinden izole ettikleri tapetum-spesifik TA29 promotörü ile *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinden elde edilen *barnase* genini birleştirerek bir kimerik ribonükleaz geni elde etmişlerdir. Kimerik ribonükleaz geni *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile kolza bitkisine aktarılmıştır. *Barnase* geninin ürünü sitotoksiktir ve polen kesesini çevreleyen tapetumun parçalanmasına sebep olarak

polen gelişimini önlemektedir. Sonuç olarak bu genin ifadesinin polen gelişimini önleyerek erkek kısırılığa yol açtığını bildirmişlerdir. Erkek kısırılığa yol açan TA29- RNaz gen yapısının diğer ürün bitkilerine de uygulanabileceğini önermişlerdir.

Mariani ve ark. (1992), genetik mühendisliği yoluyla elde ettikleri erkek kısır kolza bitkilerinde fertilitiyi başarılı bir şekilde restore etmişlerdir. *Barnase* genini taşıyan erkek kısır bitkileri homozigot tapetum-spesifik ribonükleaz inhibitör (*barstar*) genini taşıyan fertil tozlayıcılarla melezlemişlerdir. Her iki genin de ifade edildiği F1 jenerasyonunda, hücre-spesifik *Rnase/Rnase* inhibitör kompleksinin bulunması ile anterlerde sitotoksik ribonükleaz aktivitesi bastırılmış ve fertilitate restore edilmiştir. Araştırmacılar, bu sistemin ürün bitkilerinin genelinde hibrit tohum üretimini kolaylaştıracağını bildirmişlerdir.

Paul ve ark. (1992), *Brassica napus* cDNA klonu A9 ve bu gene homolog bir *Arabidopsis thaliana* genini sekanslamışlardır. *B. napus* cDNA' sı ve *A. thaliana* geni, sırasıyla boyutlarının 10.3 kDa ve 11.6 kDa olması beklenen ve %73 aynı olan proteinleri kodlamaktadır. Araştırmacılar *A.thaliana* A9 promotörüne bir RNaz geni ve bir reporter gen β -glukuronidaz (GUS) füzyonu gerçekleştirdikleri çalışmalarında, tütünde A9 promotörünün yalnızca tapetal hücrelerde aktif olduğunu göstermişlerdir. A9 promotörünün belirgin şekilde sporogen hücreler erken mayozda iken aktive olduğunu ve mikrosporlar interfazdayken de sona erdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca A9 proteininin ortaya çıkarılan sekansının, tohum depo proteinlerini, çeşitli proteazları ve α -amilaz inhibitörlerini içeren bitki tohum proteinlerinin bir ailesinde mevcut olan bir sistein motifi içerdiğini belirtmişlerdir.

Worrall ve ark. (1992), tütün bitkisinde anter lokülünde kallaz aktivitesinin erken gerçekleşmesinin sitoplazmik erkek sterilitateye sebep olup olmadığını araştırmışlardır. Bunun için, tapetumdan normal zamanından daha önce aktive olan modifiye bir patojen ilişkili vakuolar β -1,3-glukanaz salgılayan transgenik tütün bitkileri elde etmişlerdir. Sonuç olarak tapetum-spesifik promotörlere sahip modifiye glukanaz salgılayan bitkilerde erkek fertilitenin azaldığını, tam veya kısmi erkek sterilitateye sebep olduğunu bildirmişlerdir. Erkek steril transgenik bitkilerde profaz I' e kadar kalloz oluşumunun ve dağılışının normal olarak gerçekleştiğini ardından kallozun bu aşamada degrades olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte mayozun ve hücre bölünmesinin normal olarak meydana geldiğini, fakat mayoz sonunda oluşan mikrosporların anormal şekilde ince ve yüzey şekillenmesinden yoksun bir hücre çeperine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar

erkek kısırlığa muhtemelen mikrosporların salınımının gerçekleştiği anda anormal mikrosporların aniden açılmalarının sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlara bakarak erken kallos degradasyonunun erkek sterilité için yeterli olduğunu ve kallosun normal bir mikrospor hücre çeperi oluşumu için esas olduğunu göstermişlerdir.

Hird ve ark. (1993), yaptıkları çalışmada anter spesifik bir *Brassica napus* cDNA' sını olan A6 ve bu gene homolog iki *Arabidopsis thaliana* genlerini izole etmişlerdir. Bu bitkilere ait A6 proteinlerinin sekans analizleri sonucunda önemli derecede bitki β -1,3-glukanazlarına benzediğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte A6 proteininin diğer glukanazların sekanslarında bulunmayan yaklaşık 116 amino asitten oluşan uzun bir C-terminal bölgesine sahip olduğu belirtilmiştir. A6 geninin geçici ve bölgesel ekspresyon durumlarını belirlemek için *A. thaliana* genomik klonundan elde edilen promotörler, *GUS* raportör ve *RNase barnase* genleri ile bir araya getirilmiş, tütün ve *B. napus* bitkisine transforme edilmiştir. Sonuç olarak A6 geninin, bitkide kallaz enziminin normal olarak ifade olduğu safhada geçici olarak çok fazla ifade olduğunu ve tapetum-spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara bakarak A6' nın kallaz enzim kompleksinin bir parçası olabileceğini önermişlerdir.

Bucciaglia ve Smith (1994), PCR tekniğini kullanarak, polen gelişiminde mayozun başlamasından mikrosporların serbest bırakıldığı safhaya kadar sadece anterlerde ifade olan bir β -1,3- glukanaza, tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) anter glukanazı (*Tag 1*), eş cDNA' yı çoğaltmışlar ve ardından klonlamışlardır. Klonun kimliği, DNA ve ortaya çıkarılan protein sekansının diğer bilinen β -1,3- glukanazlara benzerliği ile belirlenmiştir. Glukanazların dört sınıfında da tamamen korunan çeşitli bölgelerin *Tag 1* proteininde de korunduğunu bildirmişlerdir. *Tag 1*'i, RNA ifade modeli ve filogenetik analizlere bakarak değerlendirdiklerinde ise yeni bir sınıfı temsil ettiğini belirtmişlerdir. *In situ* olarak *Tag 1* RNA' sının sadece tapetumda tetraer erimesinden hemen önce maksimum seviyede ifade olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, *Tag 1*' in ekspresyon modeline ve diğer β -1,3- glukanazların sekans benzerliğine bakarak *Tag 1*' in kallos parçalanmasından sorumlu olabileceğini düşünmüşlerdir.

Turgut ve ark. (1994), mikrosporogenezde çok fazla eksprese olan ve tapetuma özgü A9 transkriptinin fonksiyonunu belirlemek için bir antisens girişiminde bulunmuşlardır. Bir *B. napus* A9 cDNA klonu, sens ve antisens yönelimlerinde *A. thaliana* A9 promotörüne bağlanmış ve oluşan kimerik genleri *B.napus* içerisine aktarmışlardır.

B.napus antisens A9 bitki döllerinin büyük bir kısmının çok düşük veya saptanamayan A9 mRNA seviyesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu bitkilerin tohum oluşturduğunu ve normal veya normale yakın polen canlılığı gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bununla birlikte A9 proteininin *B.napus* bitkisinde erkek fertilité için gerekli olmadığını belirtmişlerdir.

Tsuchiya ve ark. (1995), soya fasülyesi bitkisinden izole ettikleri patojen ilişkili bir endo- β -1,3-glukanaz cDNA' sını ile pirinç bitkisinden izole ettikleri Osg6B anter-spesifik promotörüne bağlayarak tütün bitkisine aktarmışlardır. Araştırmacılar tetratların oluştuğu sırada anter tapetumunda promotörün aktive olduğunu ve transgenik bitkilerde meydana gelen glukanaz aktivitesinin fertil polen tanelerinin sayısında önemli derecede bir azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir. Osg6B promotörü kontrolünde tütün bitkisine aktarılan endo-beta-1,3-glukanaz geninin ifadesi, tetrat safhasının başlangıcına denk gelen normal glukanaz aktivitesinin ortaya çıktığı zamandan çok kısa bir süre önce kallos çeper parçalanmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlara bakarak polen tetratlarında erken kallos çeper degradasyonunun erkek sterilitéye sebep olduğunu ve glukanaz aktivitesinin normal zamanında gerçekleşmesinin normal polen gelişimi için önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Jeon ve ark. (1999), pirinç bitkisinden anter-spesifik bir gen izole etmişlerdir. RNA blot analizleri ile RA8 gen ekspresyonunun anterle sınırlı kaldığını ve bu genin gelişimsel olarak düzenlendiğini göstermişlerdir. Genomik DNA blot analizleri gerçekleştirilerek RA8 geninin pirinç genomunda tek bir kopyasının bulunduğunu bildirmişlerdir. RA8 cDNA' sına homolog bir genomik klon izole edilmiş ve bu klonun promotör bölgesi β -glukuronidaz (*GUS*) genine birleştirilmiştir. Transgenik pirinç bitkilerinde *GUS* raportör geninin anter-spesifik ifade olduğu gözlenmiştir. Histokimyasal *GUS* analizleri RA8 promotörünün tapetum, endotesyum ve anterlerin bağ dokularında aktif olduğunu göstermiştir. Deneyle, genin ekspresyonunun mikrosporların tetratlardan salındığı zaman başlayıp geç polen safhalarında maksimum seviyeye ulaştığını göstermiştir. Araştırmacılar RA8 geninin ekspresyon örneklerine bakarak bu genin anter parçalanmasında bir rolü olabileceğini ve RA8 promotörünün erkek kısır bitkilerin üretimi için tahıl bitkilerinin anterlerinde gen ekspresyonunu kontrol etmekte yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Delp ve Palva (1999), β -1,3-glukanazların farklı izoformlarını kodlayan ve ard arda diziliş gösteren iki Arabidopsis geni BG4 ve BG5' i karakterize etmişlerdir. BG4 ve

BG5' in ortaya çıkarılan polipeptidleri birbirlerine yüksek derecede benzerlik göstermiş (%89), fakat daha önce karakterize edilen farklı kategorilerdeki β -1,3-glukanazlarla çok az ilişkili olduğu belirtilmiştir. RNA blot ve in situ hibridizasyon verileri BG4' ün spesifik olarak stilus ve ovaryum septumlarında ifade olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlardan bu genin bitkinin üreme sürecinde bir görevi olduğunu önermişlerdir.

Thomas ve ark. (2000), pirinç genomunda Glikozil hidrolaz aile 17' den ondört geni karakterize etmişlerdir. Sekans dendrogram analizleri ile bu genleri dört alt familyaya ayırmışlardır. Alt familya B' ye ait olan GNS1 geninin *E. coli*' deki ifadesi sonucunda bu enzimin 1,3;1,4- β glukanaz aktivitesine sahip olduğunu ve bitki gelişiminde bir rolü olabileceğini önermişlerdir.

Bucciaglia ve ark. (2003), tütünden klonladıkları bir β -1,3-glukanaz (*Tag1*) cDNA' sının diğer β -1,3-glukanazlara çok benzeyen ve polen gelişiminde tetrattan serbest mikrosporların salındığı safhada sadece anterlerde eksprese olan bir geni temsil ettiğini belirtmişlerdir. *Tag1* cDNA' sı *E. coli* vektörüne klonlanarak *Tag1* proteininin *E. coli*' de çok fazla eksprese olması sağlanmıştır. *Tag1* rekombinant proteinine karşı üretilen poliklonal antikorlar, β -1,3-glukanaz aktivitesinin mevcut olduğu tetrat ve serbest mikrospor safhasında sadece anterlerde biriken 33 kD' luk tek bir proteini tanımıştır. Bu sonuca bakarak araştırmacılar *Tag1* proteininin tetrat parçalanması ve serbest mikrosporların üretilmesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Anter gelişiminde *Tag1*' in fonksiyonunu daha iyi anlayabilmek üzere *Tag1* antisens RNA ifade eden transgenik bitkiler üretilmiştir. Transgenik bitkilerde endojen *Tag1* RNA ve protein seviyeleri önemli derecede azaldığı halde tetrat parçalanması ve polen morfolojisinde hiçbir fenotipik farklılık gerçekleşmemiştir. Sonuç olarak yabancı tip *Tag1* ekspresyon seviyelerinin kaloz duvar parçalanması için gerekli olmadığını bildirmişlerdir.

Shi (2005), çilek bitkisinin savunma sisteminde β -1,3-glukanazların görevlerini araştırmıştır. Öncelikle 2 genomik klon, *FaBG2-1* ve *FaBG2-2*, bir cDNA klonu ve *FaBG2-3* olmak üzere üç farklı β -1,3-glukanaz geni kromozomda yürüme ve 3' ve 5' RACE yöntemleri gerçekleştirilerek izole edilmiştir. İzole edilen genlerin ifade seviyelerini belirlemek için real time PCR gerçekleştirilmiştir. İki önemli çilek bitki patojeni, *Colletotrichum fragariae* and *Colletotrichum acutatum* ile enfekte olan çilek bitkisinde *FaBG2-1* ve *FaBG2-3* ifadeleri araştırılmış, *C. fragariae* ile enfekte olan bitkide

her iki genin de çok fazla ifade olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada beta-1,3-glukanaz genlerinin bitki gelişiminde ve bitki savunmasında görevleri olabileceği belirtilmiştir.

Doxey ve ark. (2007), *Arabidopsis*' te β -1,3-glukanaz gen ailesinin fonksiyonel ayrımlarını araştırmak için elde ettikleri filogenetik ve gen ekspresyon analizlerini birleştirmişlerdir. 50 β -1,3-glukanaz genini, mikrodizilim ekspresyon verilerini kullanarak farklı ekspresyon kategorileri içerisinde gruplandırmışlardır. Mevcut literatür ve β -1,3-glukanaz genlerinin dışında β -1,3-glukanazlarla birlikte eksprese olan genlerin bilgilerinden yararlanarak bu genlerin fonksiyonlarına ait bilgileri de ekspresyon kategorilerine ilave etmişlerdir. Ardından elde edilen ekspresyon kümeleri için bir filogenetik ağaç oluşturulmuş, atasal ekspresyon durumları ise parsimoni rekonstrüksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylelikle ekspresyon ayrımının bir modeli elde edilmiştir. Bu modele göre genler 13 ekspresyon kümesi içerisinde gruplandırılmış ve bu kümeler A' dan M' ye kadar olan harflerle belirtilmiştir. H ve K harfleriyle gösterilen ekspresyon gruplarının yüksek derecede çiçek/üreme organlarına spesifik β -1,3-glukanazları içerdiği, polen gelişimi sırasında tetratları çevreleyen kalloz duvarın parçalanmasından sorumlu olan genlerin ise K ekspresyon grubunda bulunduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlar, gelişimsel ekspresyon durumunun filogeni analizinde rastgele olmayan bir dağılıma sahip olduğunu göstermiştir. Gelişimsel ekspresyon ayrımı modeline göre, β -1,3-glukanazların atasal fonksiyonunun daha çok hücre duvarı oluşumu ve hücre bölünmesi olduğu belirtilmiştir (Grup M). Bu fonksiyonun ise gen aile üyelerinin %25' inden daha fazlası tarafından devam ettirildiğini ve bu verilerin yakın ilişkili gen ailelerinde olduğu kadar daha ilkel organizmalarda bulunan β -1,3-glukanazların fonksiyonları ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Diğer bir ilginç sonuç olarak ise uzak ilişkili sekanslarda yüksek derecede benzer gelişimsel ekspresyon profillerinin bağımsız orijinlerden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Önceki hipotezlerle uyumlu olarak patojen-ilişkili β -1,3-glukanazların gelişimsel olarak düzenlenen atasal β -1,3-glukanazlardan evrimleşerek ortaya çıktığı bildirilmiştir. Sonuç olarak protein sekansı, ekspresyon ve filogeni olmak üzere bir araya gelmiş analizlerin büyük gen ailelerinde fonksiyonel ayrımı araştırmak için çok güçlü bir yaklaşım olduğunu göstermişlerdir.

Zhang ve ark. (2007), bir transkripsiyon faktörü kodlayan *AtMYB103* geninin 3 knock-out mutantındaki fonksiyon analizlerini incelemişlerdir. Bu mutantlardan *ms188-1* ve yabanıl tip bitkiler ışık mikroskobunda incelenmiş, anterlerde tetratların meydana geldiği aşamada yabanıl tipe ait tapetal hücre duvarının degrades olduğunu fakat *ms188-1*' e

ait olanın ise bozulmadan kaldığını bildirmişlerdir. Kallozun, tetratların oluştuğu safhadan sonra yabancı tipe ait anter loküllerinde bulunmadığını buna kıyasla *ms188-1* anterlerinde daha ileri safhalara kadar gözlendiğini belirtmişlerdir. Arabidopsis anterlerinde çok fazla ifade olan 12 gen ile gerçekleştirdikleri real-time RT-PCR ve RT-PCR sonuçlarına bakarak sadece A6 geninin ifadesinde bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak kallaz ilişkili A6 geninin *AtMYB103* tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir.

Alves-Ferreira ve ark. (2007), Arabidopsis' te stamen gelişimi sırasında meydana gelen gen ekspresyonları hakkında daha detaylı bilgi edinmek için mikroarray analizlerini kullanarak yabancı tip çiçeklerin gen ekspresyon profillerini, bu bitkilerde stamen oluşumunun farklı şekillerde bozulmasına sebep olan *apetala3*, *sporocyteless/ nozzle* ve *male sterile1 (ms1)* floral mutantlarıyla karşılaştırmışlardır. In situ hibridizasyon kullanarak stamen gelişiminin erken, ara ve geç safhalarında ifade olması beklenen genleri belirlemişlerdir. Özellikle mikrospor oluşumu esnasında ifade olan genleri karakterize etmek üzere ilave deneyler gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak farklı gelişim safhalarında olan yabancı tip çiçeklerin gen ekspresyon profillerini bunların *ms1* mutantlarıyla karşılaştırmışlardır. Bu deneylerden elde edilen verikümelerinin sayısal analizleri, genlerin muhtemelen mikrosporogenez sırasında anahtar gelişim süreçlerinin kontrolünde görev aldığını göstermiştir. Çalışmada ayrıca, yabancı tipe kıyasla *ms1* mutant çiçeklerinde ifadesi devam eden büyük bir gen ailesi de tanımlamışlardır. Bu sonuçlara bakarak bir transkripsiyon faktörü kodlayan MS1' in bu genlerin safhaya özel baskılamada görev aldığını belirtmişlerdir.

Jun Zhu ve ark. (2008), Arabidopsis' te tapetumda fonksiyon bozukluğuna ve düzensiz bölünmelere yol açan *tdfl (defective in tapetal development and function 1)* mutantının karakterizasyonu ve belirlenmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmalarda tetratların oluştuğu safhada (anter safhası 7) hem yabancı tip hem de *tdfl* mutant bitkilerinin loküllerinde kalloz belirgin bir şekilde gözlenirken, anter safhası 8' den sonra yabancı tipte kalloz kaybolurken *tdfl* mutantlarında gözlemlenmeye devam etmiştir. *tdfl* mutantlarında A6 geninin ifadesi RT-PCR kullanılarak analiz edilmiş, A6 genine ait hiçbir RT-PCR ürünü belirlenmemiştir. Bu sonuçlara bakarak TDF1' in anter gelişiminde kalloz yıkımı için gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3**MATERYAL ve YÖNTEM****3.1. Biyoinformatik Çalışmalar**

Çalışmada Glikozid Hidrolaz 17. nolu aileye ait tüm genler TAIR (The Arabidopsis Information Resource) web sayfasından (www.arabidopsis.org) elde edilerek bir liste düzenlenmiştir. Bu listede bulunan 50 gen arasından aday genler çeşitli filtreler geliştirilerek belirlenmiştir.

İlk filtrede, TAIR web sayfasından elde edilen protein bilgileri incelenerek kitinaz, protein kinaz ve sintaksin enzimlerini indükleyen gen ürünlerine benzer β -1,3- glukanaz genleri elenmiştir. II. filtrede, Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch/>) ve Arabidopsis Gene Family Profiler (<http://www.agfp.ueb.cas.cz/>) olmak üzere iki farklı mikrodizilim veritabanı kullanılarak geriye kalan genlerin hangi dokularda ifade oldukları belirlenmiştir. Bu veritabanları incelenerek elde edilen bilgilere göre tüm bitki, anter, stamen ve kallazın aktif olduğu çiçek safhalarında ifade olan genler aday gen listesine eklenmiştir. III. filtre olarak Diğer bir filtre olarak Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanı kullanılmış ve geriye kalan genlerin ifadeleri belirlenirken cDNA kaynaklarının elde edildiği dokular incelenmiştir. Bu aşamada çiçek ve tomurcuk dışındaki dokulardan alınmış cDNA' lardan elde edilen genler elenmiştir.

IV. filtre olarak Chromosome Map Tool (www.arabidopsis.org) programı kullanılarak geriye kalan genlerin *A. thaliana* kromozomları üzerindeki dağılışı gösterilmiştir. Ardından Clustal X (<http://www.clustal.org/download/current/>) programı kullanılarak geriye kalan 15 genin protein dizileri karşılaştırılmış Phylip kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Felsenstein J. Phylogeny Inference Package (PHYLIP) Version 3.5. University of Washington, Seattle, 1993). Filogenetik ağaç üzerinde ise özellikle anter- spesifik olan ve bu genlerle yakınlık gösteren genler seçilerek 6 aday gen belirlenmiştir. Ayrıca bu genlerin *ap3*, *spl/nzz* ve *ms1* mutant bitkilerindeki ifadeleri incelenmiş ve anterde ifadeleri değişen genler belirlenmiştir (Alves-Ferreira ve ark., 2007).

3.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışmada bitki materyali olarak *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipi kullanılmıştır. Bu ekotipe ait tohumlar, Prof. Dr. Rod J. Scott (Bath Üniversitesi, İngiltere)' dan temin edilmiştir. Bitkiler, Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir (http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrc_handling_mw2004.pdf). Bu yönteme göre tohumlar, % 1 BactoAgarTM içeren 0.5x Murashige ve Skoog (Murashige ve Skoog, 1962) agar besi ortamı içerisinde çimlendirilmiştir. Çalışmada hazır MS besi ortamı (Sigma M-5524) kullanılmıştır. Tüm işlemler steril kabin içerisinde yürütülmüştür. MS besi ortamı için 4,31 g MS tuzu 1,8 L distile su içerisinde çözülmüş ve pH 1M NaOH kullanılarak 5.7' ye ayarlanmıştır. Daha sonra hacim 2 L' ye tamamlanarak agar (10 g/ L) ilave edilmiştir. Son olarak MS agar besi ortamı 121°C' de 15 dk. süre ile otoklavlanmış ve 55°C' ye kadar soğutulup petri kaplarına dökülmüştür.

Tohumlar, % 6' lık sodyum hipoklorit içerisinde 8 dk. bekletilerek yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Ardından tohumlar 3-5 kez steril distile su ile durulanmıştır. Daha sonra tohumlar aseptik koşullar altında bir miktar steril distile su ile karıştırılmış ve MS besi ortamı içeren petrilere dökülmüştür. Petriler yavaşça çalkalanarak tohumların yayılması sağlanmış ve yüzeydeki fazla su steril pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

Tohumlar agarlı petrilere ekildikten sonra petriler kapatılmış ve kenarları kurumayı önlemek amacıyla streç film ile sıkıca sarılmıştır. Bu işlemden sonra petriler dormansiye kırmak amacıyla 4°C' de 2 gün süreyle buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra petriler doğrudan 25°C sıcaklıktaki büyüme kabinine yerleştirilmiştir. Fideler kök sistemleri geliştikten sonra 121°C' de 15 dk. sürede steril edilmiş toprak: perlit (4:1) karışımı içeren saksılara aktarılmış, sıcaklığı 25°C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık olan büyüme kabininde yetiştirilmiştir. Yaklaşık 3-4 hafta içerisinde bitkiler çiçeklenmiştir.

3.3. Sitolojik Araştırmalar

A. thaliana bitkilerinden pens yardımı ile toplanan farklı büyüklükteki çiçek tomurcukları FAA (Formaldehit % 40: Etanol %70: Asetik asit %98) içerisinde 48 saat boyunca karanlıkta fikse edilmiş ardından %70' lik etanol içerisinde 4°C sıcaklıkta saklanmıştır. Fikse edilmiş tomurcukların anterleri sterio mikroskop altında diseksiyon

iğnesi ve bisturi yardımıyla çıkarılmıştır. Bu çalışmalar lam üzerinde %70' lik alkol içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tomurcukların ve tomurcuklardan çıkarılan anterlerin boyları mm cinsinden ölçülmüş ve anterler diseksiyon iğnesi yardımıyla açılarak içeriği ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra içerik karmin boyası ile boyanmış ve lamel kapatılarak polen gelişimi incelenmiştir.

3.4. Total RNA İzolasyonu

Bitkilere ait yaprak ve gövde dokuları (100 mg) steril bir bisturi ile kesilerek eppendorf (arındırılmış) tüplerine alınmış, tüpler izolasyona başlayana kadar sıvı azot içerisinde bekletilmiştir. Ardından, bitki dokuları steril porselen havanda toz haline gelene kadar ezilmiştir. Bu aşamadan sonra bu dokulardan RNA izolasyonu FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit (FAPRK 001-1) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anter dokuları ise çok küçük olduklarından dolayı sterio mikroskop altında diseksiyon iğneleri kullanılarak tomurcuktan çıkarılmış ve içerisinde RNAlater solüsyonu (Ambion #7020) bulunan bir eppendorf tüpünde belirli bir sayıda (en az 150 adet) biriktirilmiştir. İzolasyona başlamadan önce RNAlater pipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve eppendorf tüpü sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Ardından, anterler eppendorf içerisinde pestil yardımıyla iyice ezilmiştir. Devamında RNA izolasyonu ise Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (78904) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonunda elde edilen RNA' lar -86°C' de depolanmıştır.

3.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas #K1612) ile gerçekleştirilmiştir. Bu kite ait üretici firma tarafından sağlanan reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar Tablo 3.1' de gösterilmiştir. Reaksiyon arındırılmış pipet uçları ve ince cidarlı 200 µl' lik PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kalıp RNA, oligo(dT)₁₈ primer ve DEPC-uygulanmış su tüplere konularak 70°C' de 5 dk. inkübe edilmiştir. Ardından, 5x reaksiyon tamponu, RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor ve 10mM dNTP mix eklenerek 37°C' de 5 dk. inkübe edilmiş, son olarak da M-MuLV Reverse Transcriptase eklenerek 37°C' de 60 dk. inkübe edilmiştir. Reaksiyon 70°C' de 10 dk. sıcaklık uygulamasıyla sonlandırılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri yukarıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle ayarlanmış bir Thermal cycler cihazında (BIO-RAD) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (μ l)
Total RNA	5
Oligo (dT) ₁₈ Primer (0,5 μ g/ μ l)	1
DEPC-treated water	5
5x Reaksiyon Buffer	4
RiboLock TM RNase Inhibitor (20u/ μ l)	1
10mM dNTP mix	2
M-MuLV Reverse Transcriptase (20u/ μ l)	2
Toplam	20 μ l

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR uygulamaları BİO-RAD thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.2' de gösterilmiştir. PCR, *Taq* DNA Polymerase (recombinant) (Fermentas #EP0402) enzimi ile kurulmuştur. Kalıp cDNA miktarının, reaksiyon hacminin %10' unu geçmemesine dikkat edilmiştir. PCR segmentleri ve döngü sayısı Tablo 3.3' te gösterilmiştir. Reaksiyonda altı farklı genle ve bu genlere ait primerlerle çalışılmıştır. Öncelikle TAIR web sayfasından (www.arabidopsis.org) ilgili genlere ait diziler elde edilmiş, ardından Primer 3 programı kullanılarak bu dizilere uygun primerler elde edilmiştir (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Bu primerlerden sırasıyla 767, 609, 890, 840, 557 ve 672 bp' lik DNA bandı beklenmiştir. Dokularda sürekli ifade olduğu bilinen *Actin2* geni çoğaltılarak cDNA' ların kalitesi belirlenmiştir (pozitif kontrol). At4g14080, At3g23770, At3g07320, At3g61810, At3g55780, At3g13560 ve *Actin2* genlerine ait primerlerin baz dizilişleri Tablo 3.4' te gösterilmiştir. Ayrıca reaksiyonda kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (μ l)	Final konsantrasyon
10 mM dNTP mix	0,5	0,2 mM
Nuclease- free H ₂ O	14,375	
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,125	2,5 unit
10X <i>Taq</i> buffer	2,5	1X
25 mM MgCl ₂ solüsyonu	3	2 mM
Kalıp cDNA	2,5	
10 pmol/ μ l reverse primer	1	0,4 pmol
10 pmol/ μ l forward primer	1	0,4 pmol
Toplam hacim	25 μ l	

Çizelge 3.3. PCR segmentleri ve döngü sayısı

Segment	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Süre (dak.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	2,5	1
Denatürasyon	95	1	
Annealing (Primerlerin bağlanması)	55	1	36
Extension (uzama)	72	2,5	
Final extension	72	10	1

3.7. Semi-quantitative (yarı sayısal) PCR

Semi-quantitative PCR, farklı örneklerin mRNA seviyelerini karşılaştırmak için gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler bir serideki farklı PCR tüpleri için hem kalıp cDNA miktarı değiştirilerek hem de farklı sayıda amplikasyon döngüleri seçilerek yapılmıştır. Reaksiyonda 6 gen ve kontrol olarak kullanılmak üzere bir konstitütif gen, Actin2 çoğaltılmıştır. cDNA sentezi için eşit miktarda RNA kullanılmıştır. Tüm reaksiyonlar, tüplerde farklılık olmaması için bir süpermix hazırlanarak aynı zamanda gerçekleştirilmiştir. Farklı sayıda döngülerde yapılan PCR reaksiyonlarında tüpler arzu edilen döngülerde extension safhasının ortasında sırası ile cihazdan alınmıştır. Ardından, tüpler 72 $^{\circ}$ C' de 10 dakika su banyosunda bekletilerek extension safhasının tamamlanması sağlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri, hiçbir farklılığa sebep olmamak için aynı agaroz jelde yürütülmüştür. Farklı miktarlarda cDNA içeren tüp serileriyle yapılan PCR' da ise 1,

1,5, 2,5 ve 5 µl' lik 4 farklı cDNA miktarı denenmiştir. Semi-quantitative PCR segmentleri ve döngü sayıları yaprak, gövde ve anter dokuları için sırasıyla Tablo 3.5 ve 3.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR' da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

Primer	Baz dizilişi
At4g14080 left	5' AATCCGTTTTGTCCTTGTCG 3'
At4g14080 right	5' CGTTGTTCGTCGGTTTAGGT 3'
At3g23770 left	5'GGTGCACCTATACCGACGTT 3'
At3g23770 right	5'CTTGCACAACAATGGGACAC 3'
At3g07320 left	5' AACATCCTCCCGTTTTACCC 3'
At3g07320 right	5' TTATTCCCCTGTGAGCAAGC 3'
At3g61810 left	5' ACCAAATCTTTCGCCAACAC 3'
At3g61810 right	5' CGGCGAGAAATTCAGATCAT 3'
At3g55780 left	5' CCTCGCTTCAAATCGTTCTC 3'
At3g55780 right	5' CAGAGCTAGGCCAACAGTC 3'
At3g13560 left	5' GTTGATCCCAACACGCTTTT 3'
At3g13560 right	5' TCGGTTTAAGCTTCCCGTAT 3'
Actin2 left	5' TGGTGAAGGCTGGATTTGC 3'
Actin2 right	5' TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC 3'

Çizelge 3.5. Yaprak ve gövde dokuları için semi-quantitative PCR segmentleri ve döngü sayıları

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	2,5	1
Denatürasyon	95	1	
Annealing	55	1	29,32,35,38,41
Extension (uzama)	72	2,5	
Final extension	72	10	1

Çizelge 3.6. Anter dokusu için semi-quantitative PCR segmentleri ve döngü sayıları

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	2,5	1
Denatürasyon	95	1	
Annealing	55	1	20,23,26,29,32
Extension (uzama)	72	2,5	
Final extension	72	10	1

3.8. Agaroz Jel Elektroforezi

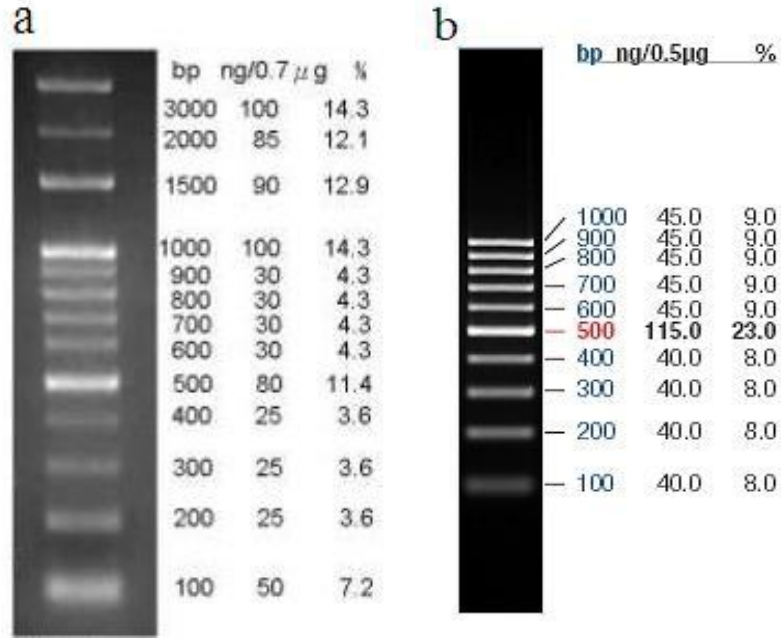
PCR ürünleri %1' lik agaroz jel (Sigma A5093) elektroforezi ile ayrılmış ve ultra violet transilluminator (U.V.) tablasında görüntülenmiştir. 2 g agaroz 200 ml 1XTAE tampon içerisinde 120°C' de eritilmiştir. Jel oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra içerisine 10 µl ethidium bromür (10mg/ml) eklenmiş ve katılaşmadan önce içerisinde tarak bulunan jel tepsisine dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank, 1XTAE tamponu ile doldurulmuştur. Ardından örnekler marker ile birlikte alınan 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforezde marker olarak 100 bp DNA ladder (Fermentas #SM0241), 100 bp DNA ladder (Favorgen FALA 100-1) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Jel 5V/cm' de yaklaşık 90 dakika yürütülmüş ve U.V. tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir.

3.9. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması

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

1XTAE tamponu: 100 ml 10XTAE tamponu 900 ml dH₂O ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

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



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritaları, a; Favorgen 100bp DNA ladder, b; Fermentas 100bp DNA ladder.

BÖLÜM 4**ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA****4.1. Biyoinformatik Çalışmalar**

Bu çalışmada, *A. thaliana* (L.) Heynh. bitkisinde henüz belirlenmemiş olan kallaz komponenti β -1,3- glukanaaz enzimini kodlayan genlerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu enzimi kodlayan genler Glikozid hidrolaz gen ailesinin 17. aile üyesidirler. Bu aile 50 adet gen içermektedir. Çalışmada, öncelikle bu aileye ait genler TAIR (The Arabidopsis Information Resource) web sayfasından elde edilmiştir (<http://www.arabidopsis.org>) (Tablo 4. 1). Ardından 50 gen arasından kallaz komponenti β -1,3- glukanaaz sentezlediği öngörülen aday genleri belirlemek üzere biyoinformatik veritabanları çeşitli filtreler kullanılarak incelenmiştir.

İlk biyoinformatik filtrede, Glikozid hidrolaz 17 nolu ailesine dahil edilen genlerin kodladıkları proteinler bir liste halinde sıralanmıştır (Çizelge 4.1). Bu aileye dahil edilen genlerin farklı yapıda ve fonksiyonda proteinler kodladıkları görülmüştür. Aynı gen ürününe sahip olan genler 7 grup içerisinde sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.1. Grup A-G). Bunlardan ilki 16 gen tarafından kodlanan kitinazlardır (Grup A). Kitinazlar, mantarların hücre duvarlarını ve bazı hayvanların dış iskelet elementlerini oluşturan kitindeki glikozidik bağları parçalayan sindirim enzimleridir. Mauch ve ark. (1988), kitinazların ve β -1,3-glukanazların fungal gelişimi inhibe etmek için birlikte hareket ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuç olarak bu proteinler patojen ilişkilidir ve bitki savunmasında görev almaktadırlar. Çalışmada ayrıca bu proteinlerin içerdikleri domainler incelenmiş ve At4g31140, At2g05790, At4g29360, At4g26830, At1g64760, At2g16230, At2g19440, At5g55180, At5g56590, At5g58480, At5g18220, At5g64790 ve At5g20870 olmak üzere 13 tanesinin Glycosyl hydrolase family 17 ile X8 domainlerini içerdikleri görülmüştür (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Geriye kalan At1g11820, At3g15800 ve At4g18340 genleri ise X8 domaini içermemektedir. X8 domaini glikozid hidrolaz aile 17' nin C terminal ucunda bulunmaktadır ve günümüzde bu domain β -1,3- glukanaaz bağlamadan sorumlu karbohidrat bağlayıcı modüller için yeni bir sınıf olarak tanımlanmıştır (Barral ve ark., 2005). Glikozid hidrolaz aile 17' ye ait genlerden sadece AT3g24350 ve AT3g07070 genlerinde Glycoside Hydrolase family 17 domaini bulunmamaktadır.

AT3g24350 proteini Glikozid hidrolaz aile 17' nin sintaksin benzeri protein kodlayan tek genidir. Sintaksinler, ökaryotik hücrelerde sayısız veziküler füzyon işleminin gerçekleşmesinden sorumlu enzimlerdir (Teng ve ark., 2001). AT3g24350 yapısında Glikozid hidrolaz aile 17' nin diğer üyelerinde görülmeyen t-SNARE (H3) domain, Soluble NSF- Attachment protein (SNAP) Receptor domain ile Syntaxin N-terminus domain (Habc) bulunmaktadır. Soluble NSF- Attachment protein (SNAP) Receptor proteinler SNARE motif olarak adlandırılan ve bir alfa-helikal coiled-coil domain ile karakterize edilen membran-ilişkili proteinlerden oluşan bir ailedir (Grup B).

AT3g07070 geni ise protein kinaz benzeri bir protein kodlamaktadır ve Serine/Threonine protein kinaz, katalitik domainine sahiptir. Protein kinazlar, substrat proteinlere kimyasal olarak fosfat grubu ekleyerek hedef proteinin aktivitesini değiştiren kinaz enzimleri olarak bilinirler (Grup C).

AT3g57260, AT3g46570 ve AT5g58090 genleri Glikozidaz benzeri proteinler kodlarlar ve bu genlerden sadece At5g58090 X8 domainine sahiptir (Grup D). AT4g16260, AT1g32860, AT1g30080 ve AT1g66250 genleri β -1,3-glukanaz öncülüne benzer proteinler kodlarlar. Bu genler arasında ise At1g66250 X8 domainine sahiptir (Grup E). AT4g34480 geni ise Glikozidaz öncülüne benzer bir protein kodlamaktadır ve X8 domainine sahiptir (Grup F).

Geriye kalan diğer aile üyeleri ise AT3g57240, AT5g20330, AT1g33220, AT5g20390, AT5g20560, AT4g17180, AT5g20340, AT2g27500, AT3g61810, AT2g39640, AT3g55780, AT3g07320, AT3g57270, AT5g42720, AT5g42100, AT3g13560, AT3g23770, AT3g04010, AT3g55430, AT1g77780, AT1g77790, AT2g01630, AT2g26600, AT4g14080 β -1,3-glukanaz ve β -1,3- glukanaz benzeri protein kodlayan genlerden oluşmaktadır (Grup G). Bu genlerden AT4g17180, AT3g07320, AT3g13560, AT3g23770, AT3g04010, AT3g55430, AT2g01630 ve AT4g14080 genleri X8 domainine sahipken AT2g39640 geni ise 2 adet X8 domaini içermektedir.

Sonuç olarak bu filtrede genlerin kodladıkları proteinler incelenmiş ve aralarında kallos parçalanmasında rol almayan kitinaz, sintaksin ve protein kinaz enzimlerini kodlayan genler elenmiştir (Çizelge 4.1. Grup A, B ve C). Bu filtre sonucunda 18 gen elenmiş, geriye 32 aday gen kalmıştır.

Çizelge 4.1. Glikozid hidrolaz aile 17' ye ait 50 gen ve tanımları

Lokus adı	Gen ürün ismi	Grup adı
AT4g31140	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (β -1,3-glukanaz benzeri protein)	A
AT2g05790	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (Varsayılan β -1,3- glukanaz)	
AT4g29360	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (β -1,3-glukanaz benzeri protein)	
AT4g26830	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (Varsayılan bir β -1,3-glukanaz)	
AT1g11820	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (bilinmeyen protein)	
AT1g64760	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (Varsayılan bir β -1,3- glukanaz)	
AT2g16230	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (Varsayılan bir β - 1,3-glukanaz)	
AT2g19440	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer (Varsayılan bir β - 1,3-glukanaz)	
AT5g55180	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer	
AT5g56590	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer	
AT5g58480	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer	
AT5g18220	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer	
AT3g15800	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer, β -1,3-glukanaz benzeri protein	
AT5g64790	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer, β -1,3-glukanaz	
AT4g18340	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer, β -1,3-glukanaz benzeri protein	
AT5g20870	Kitinazı indükleyen elisitöre benzer	
AT3g24350	Sintaksin benzeri protein	B
AT3g07070	Varsayılan bir protein kinaz	C
AT3g57260	Glukan endo-1,3-beta- glikozidaza benzer	D
AT3g46570	Glikozidaz benzeri protein	
AT5g58090	Glukan endo-1,3-beta-glikozidaz, glukanaz	
AT4g16260	Beta-1,3- glukanaz sınıf I öncülü	E
AT1g32860	Varsayılan bir β -1,3-glukanaz öncülüne benzer	
AT1g30080	Beta-1,3-glukanaz öncülüne benzer	
AT1g66250	Varsayılan bir beta-1,3-glukanaz öncülü	
AT4g34480	Glukan endo-1,3-beta-glikozidaz öncülüne benzer	F
AT4g14080	A6 anter- spesifik protein	
AT3g57240	Hemen hemen beta-1,3- glukanaza özdeş	
AT4g17180	Glukanaz benzeri protein	
AT5g20330	Bitki β -1,3-glukanaz bg4' e özdeş	

AT5g20340	Bitki β -1,3-glukanaz bg5' e özdeş	G
AT2g27500	Varsayılan bir β -1,3- glukanaz	
AT3g61810	β -1,3-glukanaza benzer (Varsayılan bir protein)	
AT2g39640	Varsayılan bir β -1,3-glukanaz	
AT3g55780	β -1,3-glukanaz benzeri protein	
AT3g07320	β -1,3-glukanaza benzer	
AT3g57270	β -1,3-glukanaza benzer	
AT5g42720	β -1,3-glukanaz benzeri protein	
AT5g42100	β -1,3-glukanaz benzeri protein	
AT3g13560	Beta-1,3-glukanaza benzer	
AT3g23770	A6 anter-spesifik proteine benzer, β -1,3-glukanaz	
AT3g04010	Varsayılan bir β -1,3-glukanaz	
AT3g55430	Beta-1,3-glukanaz benzeri protein	
AT1g77780	Varsayılan bir endo-1,3-beta-glukanaz	
AT1g77790	Varsayılan bir endo-1,3-beta-glukanaz	
AT2g01630	Muhtemel bir beta-1,3-glukanaz	
AT2g26600	Muhtemel bir beta-1,3-glukanaz	
AT1g33220	Bitki beta-1,3-glukanaz bg4' e benzer	
AT5g20390	Bitki beta-1,3-glukanaz bg4' e benzer	
AT5g20560	Bitki beta-1,3-glukanaz genleri bg4' e benzer	

İkinci filtre olarak mikrodizilim veritabanı kökenli Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) ve Arabidopsis Gene Family Profiler (<http://agfp.ueb.cas.cz>) programları kullanılmıştır. Bu veritabanlarından genlerin tercihen ifade oldukları dokular ortaya çıkarılmış ve anter dışında ifade olan genler elenmiştir. Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP) araştırmacıların, standartlaştırılmış Affymetrix ATH1 mikrodizilim veri kümelerine ulaşabilmelerini sağlayan bir gen ekspresyon veritabanıdır. aGFP, bireysel genler, önceden tanımlanmış gen aileleri veya özel gen setlerinin ifade verileri için kolay kullanım araçları olarak dizayn edilmiştir (Dupl'áková ve ark., 2007). Genevestigator ise istenilen çevre koşullarında, büyüme safhalarında veya organlarda bireysel genlerin ifade verilerine ulaşılabilen bir veritabanıdır (Zimmermann ve ark., 2004). Genevestigator ile dört tip analiz gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada, Meta-profile analizi Northern Tool kullanılarak genlerin ifade olduğu bitki organları incelenmiş veriler çizelgeye dönüştürülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Genevestigator ve aGFP (Arabidopsis Gene Family Profiler) veritabanlarına göre genlerin ifade oldukları dokular

Lokus adı	AGFP	Genevestigator
AT4g14080	<i>Çiçek safhası 9,10,11, çiçek</i>	
AT3g57260	<i>Çiçek safhası 15 sepal, rozet ve senesens yaprak</i>	
AT3g57240	<i>Sülük, rozet yaprak</i>	
AT4g16260	<i>Kök, çiçek safhası 15 sepal, yaprak</i>	<i>Anterde yok</i>
AT4g17180	<i>Olgun polen hariç tüm bitki, tohum, çiçek, sülük</i>	
AT5g20330	<i>Olgun polen, çiçek safhası 12 karpel, çiçek safhası 12</i>	
AT5g20340	<i>Olgun polen</i>	<i>Anterde yok</i>
AT2g27500	<i>Olgun polen hariç tüm bitkide, yaprak, çiçek, fide, sepal</i>	
AT3g46570	<i>Sinyal yok</i>	
AT3g61810	<i>Çiçek safhası 9</i>	<i>Anterde yok</i>
AT2g39640	<i>Sülük</i>	
AT3g55780	<i>Çiçek safhası 9, çiçek, sürgün ucu</i>	
AT3g07320	<i>Tüm bitki, çiçek safhası 9/10/11, sürgün ucu</i>	
AT3g57270	<i>Sinyal yok</i>	<i>Anterde yok</i>
AT1g32860	<i>Sülük, çiçek safhası 12 petal, çiçek</i>	
AT5g58090	<i>Olgun polen hariç tüm bitki, fide, yaprak, sürgün ucu</i>	
AT5g42720	<i>Çoğu organda var, sürgün ucu, çiçek safhası 9/10/11</i>	
AT5g42100	<i>Olgun polen hariç tüm bitki, çiçek safhası 9/10/11</i>	
AT3g13560	<i>Olgun polen hariç tüm bitki, çiçek safhası 9/10/11</i>	
AT3g23770	<i>Çiçek safhası 9/10/11, çiçek</i>	
AT3g04010	<i>Yaprak, kök, çiçek safhası 15 stamen, petal, tohum</i>	
AT1g30080	<i>Çiçek safhası 15 stamen ve petal, kök, çiçek safhası 9</i>	
AT3g55430	<i>Tüm bitki, olgun polen, çiçek</i>	
AT1g77780	<i>Sülük</i>	
AT1g77790	<i>Sülük ve kök</i>	
AT4g34480	<i>Olgun polen hariç tüm bitki, rozet yaprak, çiçek, gövde</i>	
AT1g66250	<i>Tüm bitkide, sürgün ucu, sülük, çiçek</i>	
AT2g01630	<i>Çoğu organda var, çiçek safhası 9/10/11, sürgün ucu</i>	
AT2g26600	<i>Olgun polen hariç tüm bitki, sepal, yaprak, kök, çiçek</i>	
AT1g33220	<i>Sinyal yok</i>	
AT5g20390	<i>Olgun polen, çiçek safhası 15 stamen</i>	
AT5g20560	<i>Sinyal yok</i>	<i>Anterde yok</i>

Genevestigator veritabanı At4g16260, At5g20340, At3g61810, At3g57270 ve At5g20560 genlerinin anterde ifade olmadığını işaret etmiştir. Bununla birlikte, aGFP veritabanında At3g57270 ile At5g20560 genlerine ait bilgilerin yer almadığı gözlenmiştir.

At4g16260 geninin ise çiçekte ifade olmadığı özellikle kök olmak üzere yapraklarda ifadesinin fazla olduğu gözlenmiştir.

At5g20340 geninin sadece olgun polende ifade olduğu gözlenmiştir. AT3g61810 geninin Genevestigator veritabanına göre anterde ifade olmadığı gösterilmişse de, aGFP veritabanına göre 9. çiçek safhasında çok ifade olduğu gözlenmiştir.

At1g33220 ve At3g46570 genlerinin Genevestigator veritabanına göre anterde çok az ifade olduğu, aGFP veritabanında ise bu genlere ait bilgilerin yer almadığı gözlenmiş ve bu aşamada elenmiştir. At1g77790 geni incelendiğinde ise sadece kök ve baklalarda, At1g77780 ile At2g39640 genlerinin ise sadece baklalarda ifade oldukları gözlendiği için elenmişlerdir.

At3g57260 geninin çiçekte ifadesinin olmadığı, özellikle sepal olmak üzere yapraklarda çok fazla ifadesinin olduğu gözlenmiştir. At3g57240 geninin ise çiçek, olgun polen, karpel, fide ve stamen dokularında ifade olmadığı bununla birlikte özellikle baklalarda ve yapraklarda ifadesinin çok olduğu gözlenmiştir. At3g04010 geninin çiçekte ifadesinin olmadığı buna ilaveten çiçek safhası 15/stamen, çiçek safhası 15/petal, kök ve yaprak gibi dokularda ifade olduğu gözlenmiştir. At5g20330 geninin sadece olgun polen, çiçek safhası 12, çiçek safhası 12/karpel ile çiçek safhası 15/karpelde ifade olduğu bulunmuştur. At5g20390 geninin ise olgun polen, çiçek safhası 15, çiçek safhası 12,15/stamende çok fazla ifade olduğu gözlenmiştir. Genevestigator veritabanına göre anterde ifade olmadığı belirlenen ve aGFP veritabanına göre farklı dokularda ifadesi gözlenen 14 gen bu aşamada elenmiş, geriye 18 aday gen kalmıştır (Tablo 4.2). Bu veritabanlarından elde edilen bilgilere göre özellikle anterde olmak üzere stamen, tüm bitki, çiçek safhası 9/10/11' de ifade olan genler ise aday genler olarak seçilmiştir.

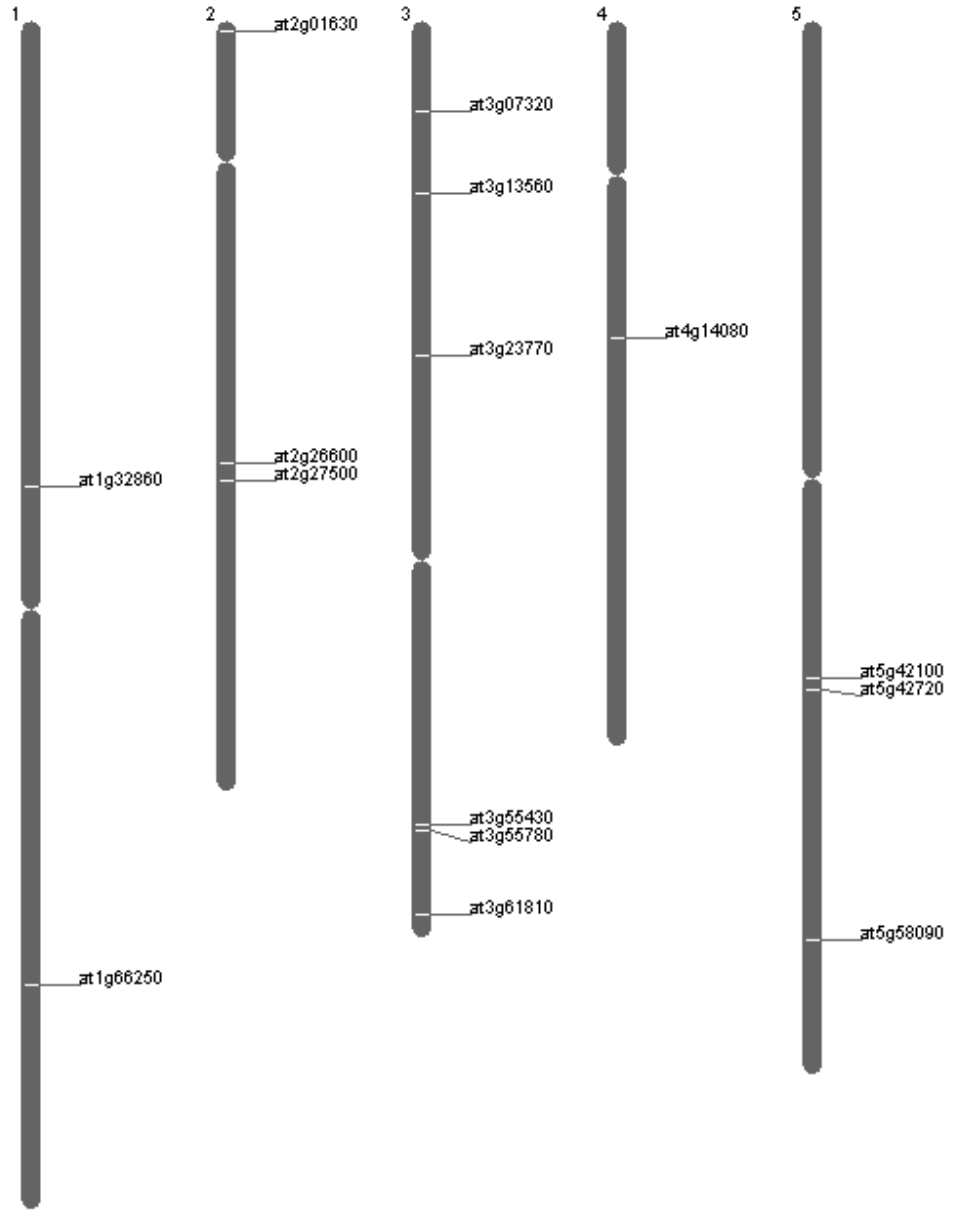
Üçüncü filtre olarak Unigene veritabanı kullanılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bu veritabanı geriye kalan genlerin ifadeleri incelenirken cDNA kökenlerinin hangi dokular olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu şekilde genlerin hangi dokularda tercihen ifade olduğu anlaşılmıştır. Buradan elde edilen bilgilere göre özellikle tomurcuk ve çiçek dokularına ait cDNA' lardan elde edilen genler ortaya çıkarılmıştır. At1g17180 ile At4g34480 genlerinin cDNA örneklerinin karışık ve belirlenememiş dokulardan elde edilmiş olmasından dolayı bu aşamada bu genler elenmiştir. At1g30080 genine ait cDNA' ların ise karışık, tüm bitki ve kökten elde edildiği gözlendiğinden bu gen

de aday gen olarak alınmamıştır. Sonuç olarak 3 gen bu filtrede elenmiş, 15 aday gen belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

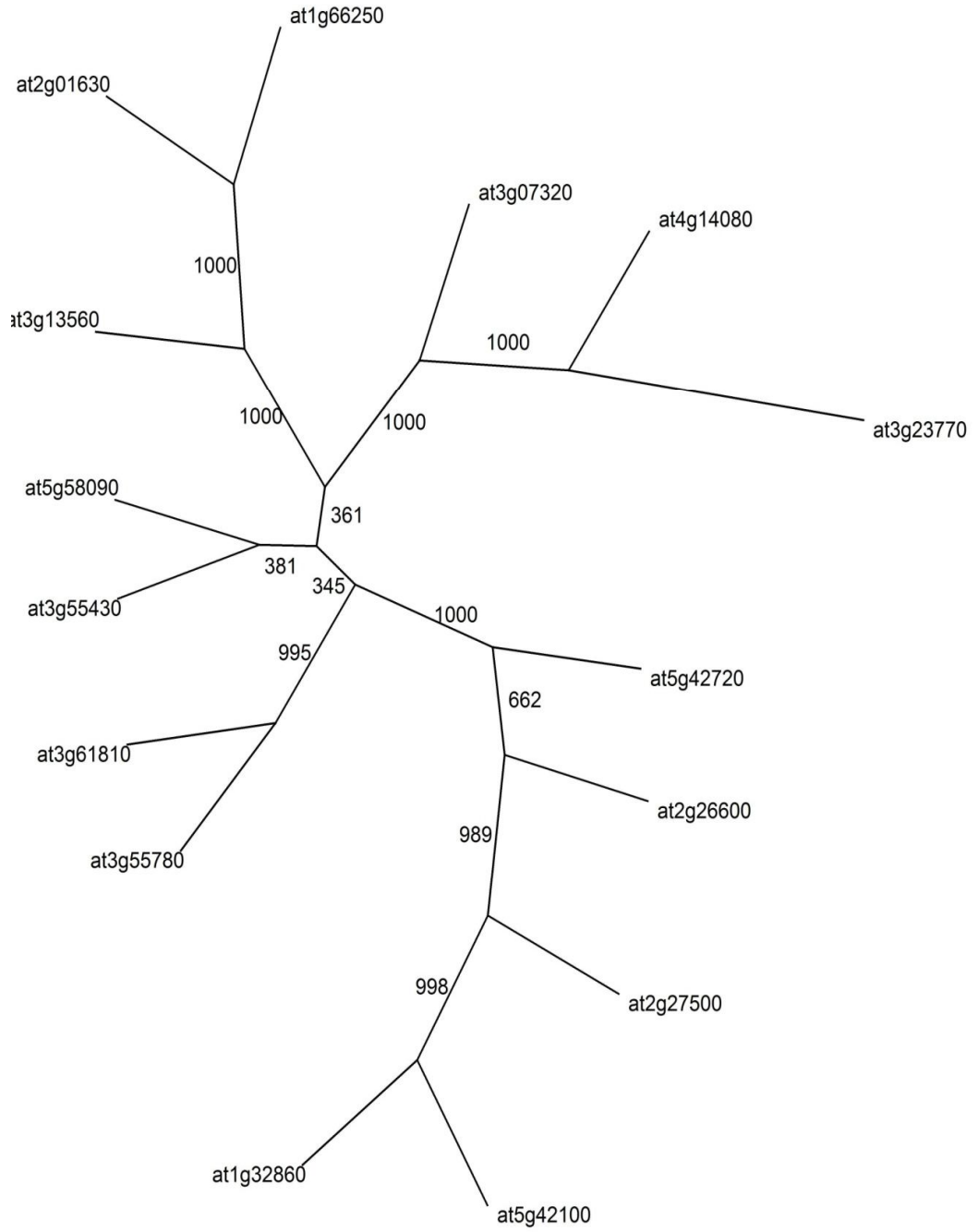
Çizelge 4.3. Unigene veritabanına göre genlerin elde edildiği cDNA dokuları

Lokus adı	UNIGENE
AT4g14080	tüm bitki, tomurcuk, karışık
AT1g17180	karışık, belirlenmemiş doku
AT2g27500	karışık, belirlenmemiş doku, tüm bitki, tomurcuk, kök
AT3g61810	karışık, tüm bitki, çiçek
AT3g55780	karışık, tomurcuk, floral meristem, belirlenmemiş doku, kök, tüm
AT3g07320	bitki, yaprak, çiçek
At1g32860	tüm bitki, karışık, kök, flower
At5g58090	karışık, tüm bitki, kök, belirlenmemiş doku, tomurcuk
At5g42720	karışık, tüm bitki, kök, tomurcuk, belirlenmemiş doku
AT5g42100	karışık, tüm bitki, tomurcuk, diğer, sülük, belirlenmemiş doku, kök
AT3g13560	karışık, kök, tüm bitki, çiçek, infloresens, diğer, belirlenmemiş doku
AT3g23770	karışık, çiçek
AT1g30080	karışık, tüm bitki, kök
AT3g55430	karışık, tüm bitki, tomurcuk, floral meristem
AT4g34480	karışık, belirlenmemiş doku
AT1g66250	karışık, flower
AT2g01630	karışık, tomurcuk, belirlenmemiş doku, tüm bitki
AT2g26600	karışık, sülük, çiçek, tomurcuk

Dördüncü filtre olarak geriye kalan genlerin Arabidopsis kromozomları (n:5) üzerindeki yerleşimleri Chromozom Map Tool kullanılarak belirlenmiştir (www.arabidopsis.org).



Şekil 4.1. Elemeler sonucu elde edilen 15 aday genin Chromosome Map Tool ile kromozom üzerindeki dağılışının gösterilmesi.



Şekil 4.2. ClustalX programı kullanılarak 15 genin protein dizilişlerine göre filogenetik ağaç üzerinde gösterilmesi.

Beşinci filtrede, aday olarak belirlenen 15 gen için ClustalX (<http://www.clustal.org/download/current/>) ve PHYLIP (Felsenstein J. Phylogeny Inference Package (PHYLIP) Version 3.5. University of Washington, Seattle, 1993) programları kullanılarak filogenetik bir ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.2). Bu filtrede kallaz enzim kompleksinde yer alan genlerin protein dizilerinin birbirine benzer diziliş göstermesi beklenmiştir. Bu sebeple, aday genlerin protein dizileri karşılaştırılmış ve benzerlikleri ortaya çıkarılmıştır. Dizilerin karşılaştırılması DNA veya protein dizilerindeki evrimsel, fonksiyonel ve yapısal bilgileri ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak iki dizi arasındaki benzerlik aynı fonksiyonu işaret etmektedir (Mount, 2004). Aday genlere ait protein dizileri TAIR web sayfasından elde edilmiştir. Çalışmada öncelikle, ClustalX programı orijinal parametreleri ile amino asit dizileri hizalanmıştır. Hizalama sonucunda dizilerin korunmuş bölgeler taşıdıkları bulunmuştur. Sonuç olarak filogenetik ağaç üzerinde 5 grup olduğu gözlenmiştir. Bu gruplardan bazıları istatistiki olarak bootstrap değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur. I. grupta anter-spesifik protein kodladığı bilinen At4g14080 ile At3g23770 ve At3g07320 genlerinin bulunduğu gözlenmiştir. II. grupta ise daha önceden tüm bitkide ifade olduğu belirtilmiş olan (Çizelge 4.2) At2g01630, At1g66250 ve At3g13560 genlerinin bulunduğu görülmüştür. III. grup ise genellikle olgun polen hariç tüm bitkide ifadesi olan At5g42720, At2g26600, At2g27500, At5g42100 ile At1g32860 genlerinden oluşmuştur. IV. grupta ise yine genellikle tüm bitkide ifadesi olan At5g58090 ile At3g55430 genlerinin bulunduğu gözlenmiştir. Son olarak V. grupta ise bitkide kallaz aktivasyonunun gerçekleştiği zamana denk gelen 9. çiçek safhasında ifade olduğu daha önce belirtilmiş olan At3g55780 ve At3g61810 genlerinin bulunduğu gözlenmiştir.

Elde edilen filogenetik ağaç sonuçlarına göre At4g14080 (anter-spesifik protein A6), At3g23770, At3g07320, At3g13560, At3g61810 ve At3g55780 genleri aday genler olarak belirlenmiştir.

Sonuncu filtre olarak bazı *Arabidopsis* erkek kısır mutantlarında önceki filtreler sonucu aday olarak belirlenen genlerin anterdeki ifadeleri incelenmiştir. Alves- Ferreira ve ark. (2007), çalışmalarında yabancı tip bitkilerle bu bitkilerin *ap3*, *spl/nzz* ve *ms1* mutantlarında stamen gelişiminin farklı safhalarında genlerin ifadelerini araştırmışlardır. *ap3* mutantında bitki tamamen petal ve stamenden yoksun olmakla birlikte ekstra sepal ve karpellere sahiptir. *spl/nzz* mutantlarında ise bir transkripsiyon faktörü kodlayan SPL/NZZ geninin hem erkek hem de dişi sporangia gelişiminde önemli bir rol oynadığını gösterecek şekilde nusellus ve polen kesesi oluşmamaktadır (Schieffhale ve ark., 1999; Yang ve ark., 1999). *ms1* mutantları ise fenotipik olarak normal fakat canlı polen üretiminin

gerçekleşmediği mutantlardır (Wilson ve ark., 2001; Ito ve Shinozaki, 2002). *ms1* mutant bitkilerinde polen dejenerasyonu tetratlardan mikrospor salınımının gerçekleştiği safhanın hemen ardından gerçekleşmektedir. Çalışmalarında yukarıda tanımlanan mutant bitkilerin anterlerinde ifadesi değişen β -1,3-glukanaz genlerinin At4g14080, At3g23770, At3g07070, At3g04010, At1g66250, At4g26830, At3g55780 ve At3g61810 genleri olduğu görülmüştür (Alves- Ferreira ve ark., 2007- Supplemental Tablo S1). Bunlar arasında At3g04010, At3g07070, At1g66250 ve At4g26830 genleri daha önceki filtrelerde tarafımızca elenmiştir.

Mikrospor ana hücrelerinin, anterin 5. ve 7. safhaları arasında mayoz ile mikrospor tetratlarını oluşturduğu ve tetratlardan mikrosporların salınımının ise 8 anter safhasında gerçekleştiği bildirilmiştir (Sanders ve ark., 1999). Sanders ve ark. (1990)' na göre bu olayların 9 ve 10. çiçek safhalarında meydana geldiği gösterilmiştir (Smyth ve ark., 1990). Ayrıca aGFP veritabanından elde edilen bilgilerden yararlanılarak 9/10/11. çiçek safhalarında ifade olan genler de aday genler olarak seçilmiştir.

β -1,3- glukanazların polen gelişimindeki en önemli görevi tetratların çevresinde biriken kallozun parçalanmasıdır. Hird ve ark. (1993), çalışmalarında At4g14080 (A6) geninin tapetum spesifik olduğunu ve bitkide özellikle kallazın aktive olduğu safhada ifadesinin arttığını ve bu ifadenin geçici olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar At4g14080 geninin kallaz enzim kompleksinin bir parçası olabileceğini önermişlerdir (Hird ve ark., 1993). Çalışmamızda biyoinformatik filtreler sonucunda geriye kalan genler arasında yer alan At4g14080 geninin sadece 9/10/11. çiçek safhalarına özgü ifade olduğu belirlenmiştir. Özellikle çiçek safhası 9' da çok fazla ifade olduğu belirlenmiştir. ATTED (*Arabidopsis thaliana* trans-factor and cis-element prediction database) (<http://atted.jp/>) veritabanı incelenerek At4g14080 ile birlikte ifade olan genler incelenmiştir. At3g23770 geninin At14080 geni ile birlikte ifade olan genler arasında olduğu belirlenmiştir. At3g23770 geninin MS2 geni ile birlikte tetratların salınımı sırasında ifade olduğu bildirilmiştir (Doxey ve ark., 2007). Bu bilgilere ilaveten protein dizilişleri baz alınarak elde edilen filogenetik ağaç At3g07320 geninin bu iki gene benzer olduğunu göstermiştir. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada At3g23770, At4g14080 ve At3g07320 genleri kallaz oluşumundan sorumlu aday genler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Genevestigator ve aGFP veritabanlarında At3g07320 geninin ifade profilleri incelendiğinde tüm bitkide özellikle sürgün ucunda ve 9/10/11. çiçek safhalarında tercihen güçlü ifade olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

At3g55780 geni ise filogenetik ağaç üzerinde At3g61810 geni ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.2). Bu genin aGFP veritabanındaki ifade profiline bakıldığında ise çiçek safhası 9 ve sürgün ucunda tercihen ifade olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakarak bu iki gen de aday genler olarak belirlenmiştir.

Son olarak At3g13560 aday gen olarak seçilmiştir. Olgun polen dışında tüm bitkide ifade olmasına rağmen en güçlü ifadesinin çiçek safhası 9/10' da olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde At5g42100 geni de olgun polen dışında tüm bitkide ifade olurken çiçek safhası 9/10/11, karpel, yaprak gibi dokularda da ifadesi çok yüksek olmasına karşın ve filogenetik ağaç üzerinde anter spesifik genler olarak bilinen genlere uzak olarak bulunduğu için elenmiştir.

Çiçek gelişiminde β -1,3-glukanazların diğer görevi, polen tüpü gelişimi sırasında stilusa ait matrixte bulunan kalloz dokusunun parçalanmasından sorumlu olmasıdır. Bu görevi stilusta ve polen tanelerinde ifade olan glukanazların gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Delp ve Palva, 1999; Huecas ve ark., 2001; Takeda ve ark., 2004). Aday genlerden At5g20330 (BG4)' un RNA blot ve in situ hibridizasyon sonuçları bu genin stilus ve ovaryum septumunda ifade olduğunu göstermiştir (Delp ve Palva, 1999). At5g20340 (BG5) geninin ise aynı çalışmada stilus ve ovaryumda ifade olmadığı fakat çiçeğe özgü bir ifade modeli gösterdiği bildirilmiştir. Doxey ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada BG4 ve BG5 genlerini diğer bazı genlerle (At1g33220, At5g20390, At5g20560, At1g77780, At1g77790, At5g64790, At3g55430, At4g26830 ve At3g57270) aynı grup içerisinde kümelendirmiş ve bu grupta bulunan genlerin tercihen polen ve/veya stamende ifade olduğunu dolayısıyla polen tüpü gelişiminde rol aldıklarını önermişlerdir. Bu çalışmada genler ifadelerine bakılarak incelendiğinde de BG4' ün sadece olgun polende ve karpelde ifade olduğu gözlenmiştir. BG5' in ise sadece olgun polende ifade olduğu gözlenmiştir. At4g26830 ve At5g64790 genleri kitinazı indükleyen elisitöre benzer proteinler sentezledikleri için, At5g20560 ve At3g57270 genleri ise anterde ifade olmadıkları için elenmiştir.

Dong ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada CHS, PAL ve BG genlerinin avirulan ve virulan bakteri suşları tarafından enfekte edilmiş bitkilerdeki aktivasyonlarını incelemişler ve BG1 (At3g57270), BG2 (At3g57260) ve BG3 (At3g57240) genlerinin ifadesinin büyük ölçüde bakteri gelişmesine karşılık olarak arttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Doxey ve ark. (2007), PR β -1,3- glukanazları belirlemek üzere 5 farklı fungal fitopatogene karşı cevap olarak ifadelerinde 3 kattan daha fazla artış gösteren β -1,3-glukanazları tanımlamışlardır. Sonuç olarak At3g57260, At3g57240, At4g16260, At3g04010 ve

At3g55430 genleri olmak üzere 5 genin patojen ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen ifade profillerine bakıldığında At3g57260 ve At3g57240 genlerinin yaprak dokusunda, At4g16260 ve At04010 genlerinin ise yaprak ve kök dokusunda çok fazla ifade olduğu belirlenmiş ve elenmiştir.

Sonuç olarak biyoinformatik analizler sonucunda At4g14080, At3g23770, At3g07320, At3g61810, At3g55780 ve At3g13560 genleri aday genler olarak belirlenmiştir.

4.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipine ait tohumlar Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir. Fideler kök sistemleri geliştikten sonra saksılara aktarılmış, sıcaklığı 25°C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık olan büyüme kabiniinde yetiştirilmiştir. Yaklaşık 3-4 hafta içerisinde bitkiler çiçeklenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh türü.

4.3. Sitolojik Araştırmalar

Sterio mikroskop altında FAA içerisinde fikse edilmiş tomurcukların ve tomurcuklardan çıkarılan anterlerin boyları ölçülmüştür. Ardından, anterler diseksiyon iğnesi yardımıyla açılarak içeriği ortaya çıkarılmıştır. Farklı boyuttaki tomurcuklar ve anterler incelenerek kallaz enzim kompleksinin aktive olduğu tetrat safhasında bulunan

anter ve tomurcuk uzunlukları belirlenmiştir. Büyüklüğü 0,62-0,67 mm olan tomurcuklardan elde edilen 0,22-0,25 mm uzunluğundaki anterlerin çoğunlukla tetrat safhasında bulunduğu belirlenmiş ve 0,22-0,27 mm boyutundaki anterlerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



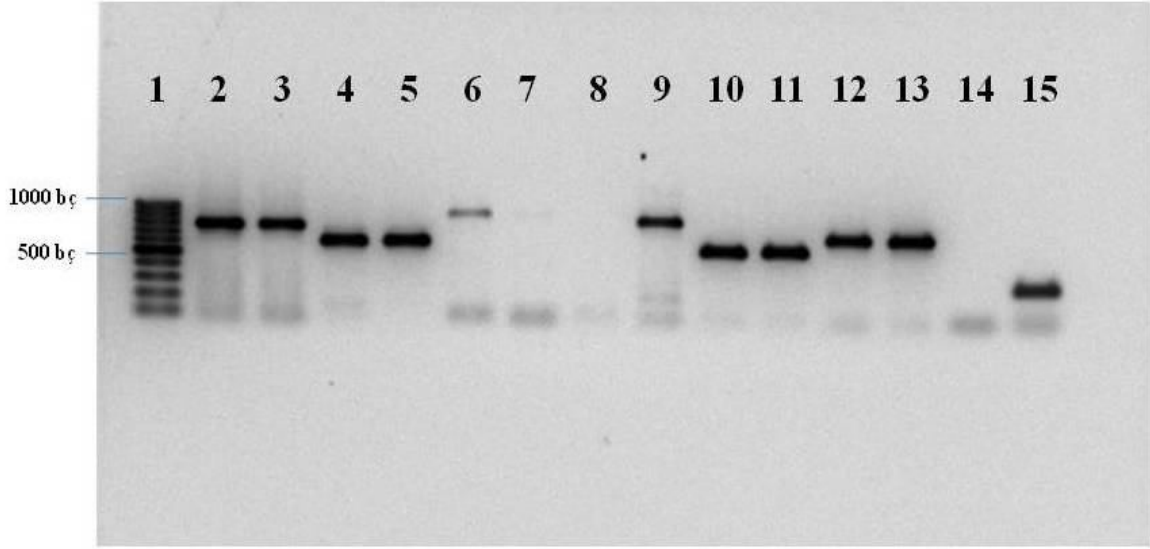
Şekil 4.4. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Columbia wild type) bitkisinde kallos çeper ile çevrili tetrat yapısı.

4.4. RT-PCR ile Genlerin Anter, Gövde ve Yaprakta Amplifikasyonu

Bu çalışmada *A. thaliana* bitkisine ait anter, gövde ve yaprak dokularından izole edilen RNA' lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA' lar First Strand cDNA Synthesis Kit ile sentezlenmiştir. Total RNA örneklerindeki rRNA' ları elemine etmek için özellikle poly- A kuyruklu mRNA' lara bağlanan oligo- dT primerler tercih edilmiştir.

Çalışmada biyoinformatik filtreler yardımı ile belirlenen At4g14080, At3g23770, At3g07320, At3g61810, At3g55780 ve At3g13560 olmak üzere altı aday genle ve bu genlere ait primerlerle çalışılmıştır. Bu primerlerden sırasıyla 767, 609, 890, 840, 557 ve 672 bp uzunluğunda DNA bandı beklenmiştir. Reaksiyonlar, *Taq* DNA Polymerase (recombinant) enzimi ile kurulmuştur.

cDNA' ların kalitesi bir housekeeping gen olan *Actin2*' ye ait primerler ile kontrol edilmiştir. Ayrıca PCR' da kontaminasyon olup olmadığını göstermek için negatif kontrol kullanılmıştır. Reaksiyonlar sonrasında PCR ürünleri %1' lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. tablasında görüntülenmiştir (Şekil 4.5, 4.6, 4.7).



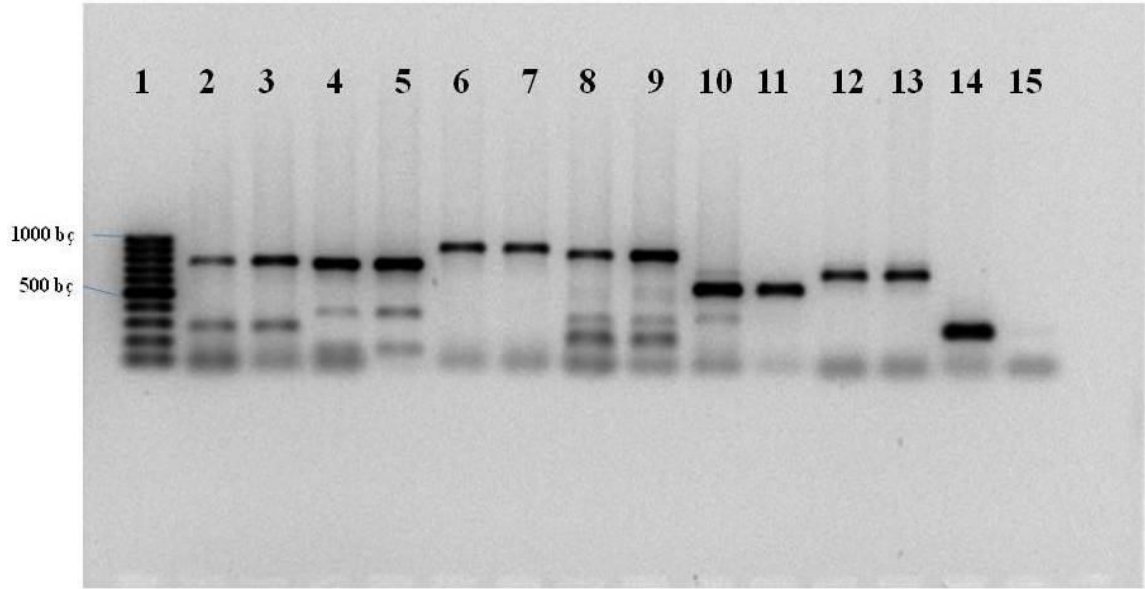
Şekil 4.5. Anter PCR analizi. Hat 1: fermentas 100bp marker, Hat 2-3: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 4-5: At3g23770 PCR ürünleri, Hat 6-7: At3g07320 PCR ürünleri, Hat 8-9: At3g61810 PCR ürünleri, Hat 10-11: At3g55780 PCR ürünleri, Hat 12-13: At3g13560 PCR ürünleri, Hat 14: negatif kontrol, Hat 15: pozitif kontrol (*Actin2*) (10 µl PCR örneği 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

Çalışmada ilk olarak gene özgü seçilen primerler test edilmiştir. Anter dokusundan elde edilen cDNA' lar kullanılarak At4g14080, At3g23770, At3g07320, At3g61810, At3g55780 ve At3g13560 genleri ile bu genlere ait primerlerle gerçekleştirilen RT-PCR sonucunda bu primerlerinden tüm örneklerde beklenen büyüklükte sırasıyla 767, 609, 890, 840, 557 ve 672 bç' lik DNA bandı elde edilmiştir. Bununla birlikte, At3g07320 geninin ifadesinin diğer genlerden daha az olduğu gözlenmiştir. At3g61810 geninin ise anterde ifade olduğu gözlenmiştir.

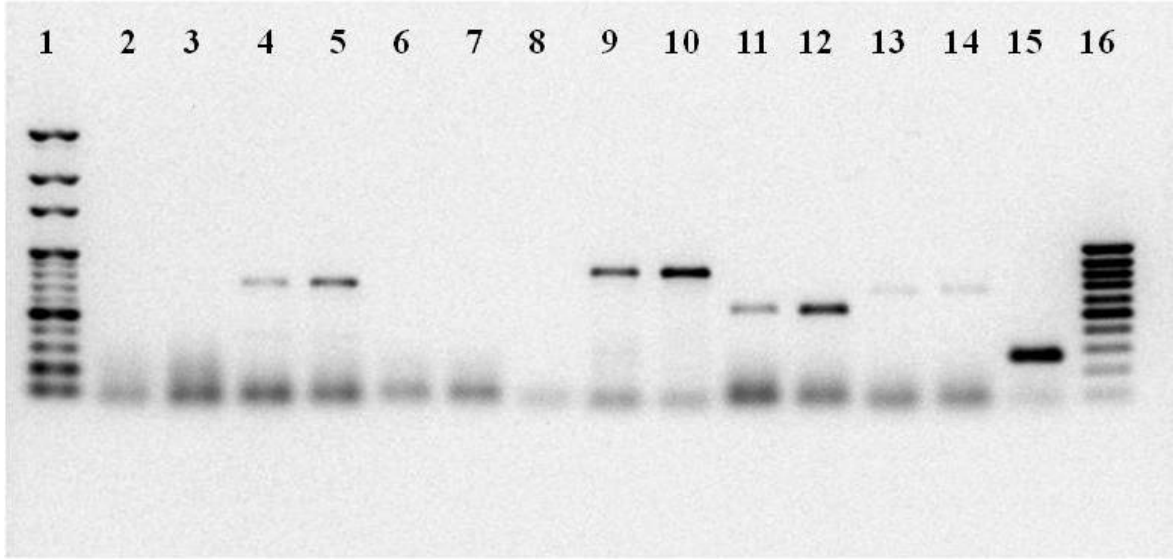
Hird ve ark. (1993), *Brassica napus* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinden izole ettikleri A6 geninin, bitkide kallaz enziminin normal olarak ifade olduğu safhada bu genin, geçici olarak fakat yüksek miktarda ifade olduğunu ve tapetum-spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara bakarak A6' nın kallaz enzim kompleksinin bir parçası

olabileceğini önermişlerdir. Bir diğer çalışmada Zhang ve ark. (2007), bir transkripsiyon faktörü *AtMYB103* mutasyonunun tapetum gelişimi, kalloz çeper parçalanması ve ekzin oluşumu üzerine etkilerini araştırmak üzere sitolojik araştırmalar yapmışlardır. Kallozun, tetratların oluştuğu safhadan sonra yabancı tipe ait anter loküllerinde bulunmadığını buna kıyasla *ms188-1* anterlerinde daha ileri safhalara kadar gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Ardından, RT-PCR analizleri için *Arabidopsis* anterlerinde çok fazla ifade olan 12 gen belirlemişlerdir. Seçtikleri bu genler arasından ise *ms188-1* mutantlarında sadece A6 geninin ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir. At3g07320 geninin ise ifadesinin değişmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmada daha sonra aday genlerin ifadeleri yaprak ve gövde gibi somatik dokularda RT-PCR aracılığıyla incelenmiştir. Buna göre, tüm genlerin gövde dokularında ifade olduğu ve beklenen boyutlarda DNA bantları elde edildiği gözlemlenmiştir. Yaprak dokusu için elde edilen sonuçlara bakıldığında At3g23770, At3g61810, At3g55780 ile At3g13560 genlerinin yaprakta ifade olduğu fakat At4g14080 ve At3g07320 genlerinin yaprakta ifade olmadığı gözlenmiştir. At3g13560 geninin ifadesinin ise çok az olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Gövde PCR analizi. Hat 1: fermentas 100bp marker, Hat 2-3: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 4-5: At3g23770 PCR ürünleri, Hat 6-7: At3g07320 PCR ürünleri, Hat 8-9: At3g61810 PCR ürünleri, Hat 10-11: At3g55780 PCR ürünleri, Hat 12-13: At3g13560 PCR ürünleri, Hat 14: pozitif kontrol (*Actin2*), Hat 15: negatif kontrol (10 µl PCR örneği 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).



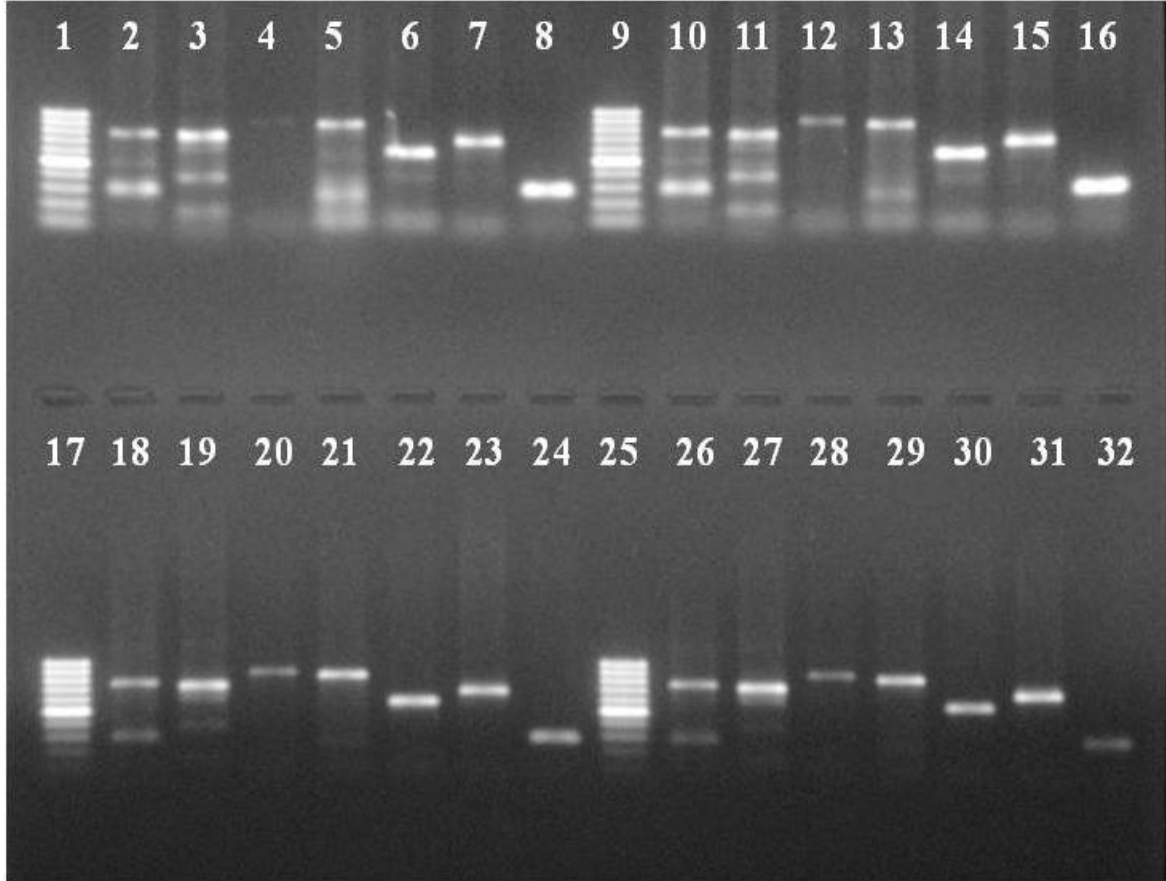
Şekil 4.7. Yaprak PCR analizi. Hat 1: Fermentas 1 kb DNA ladder Hat 2-3: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 4-5: At3g23770 PCR ürünleri, Hat 6-7: At3g07320 PCR ürünleri, Hat 8: negatif kontrol, Hat 9-10: At3g61810 PCR ürünleri, Hat 11-12: At3g55780 PCR ürünleri, Hat 13-14: At3g13560 PCR ürünleri, Hat 15: pozitif kontrol (*Actin2*), Hat 15: negatif kontrol, Hat 16: fermentas 100bp marker (10 µl PCR örneği 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir).

4. 5. Semi-quantitative RT-PCR ile Genlerin Anterdeki Amplifikasyonu

Çalışmada, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkisinin çeşitli dokularında aday gen transkriptlerinin varlığı semi-quantitative RT-PCR ile analiz edilmiştir. Total RNA izolasyonu 9-11. çiçek safhalarına karşılık gelen tomurcuklardan toplanan anterlerden ve çeşitli somatik (yaprak ve gövde) dokulardan gerçekleştirilmiştir. Aday genler gen spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. *Actin2* ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. RT-PCR sonucunda altı genin anterdeki ifadeleri incelendiğinde hepsinin ifadesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bundan dolayı anterdeki ve vejetatif dokulardaki RNA ifade seviyelerini belirlemek üzere semi-quantitative RT-PCR tekniği kullanılmıştır. İlk olarak RT-PCR analizleri için optimum cDNA miktarı belirlenmiştir. Yaprak ve gövde dokuları ile anter dokusu karşılaştırıldığında, anter dokusu çok küçük olmasına rağmen, PCR reaksiyonlarında bir platoya ulaşmak için yeterli olan cDNA miktarının her iki dokuda da aynı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte farklı sayılarda gerçekleştirilen amplifikasyon döngüleri sayesinde genlerin ifade seviyelerindeki farklılıklar ortaya çıkarılmıştır.

4.5.1. Semi-quantitative RT-PCR ile gerçekleştirilen miktar denemeleri.

Farklı miktarlarda cDNA içeren tüp serileriyle yapılan PCR' da 1, 1,5, 2,5 ve 5 μ l' lik 4 farklı cDNA miktarı denenmiştir. Bu şekilde yaprak, anter ve gövde dokularında, belirlenen genlerin ifade seviyelerinin incelenebilmesi için yeterli oranda kalıp miktarı ortaya çıkarılmıştır. PCR ürünleri, hiçbir farklılığa sebep olmamak için aynı agaroz jelde yürütülmüştür.



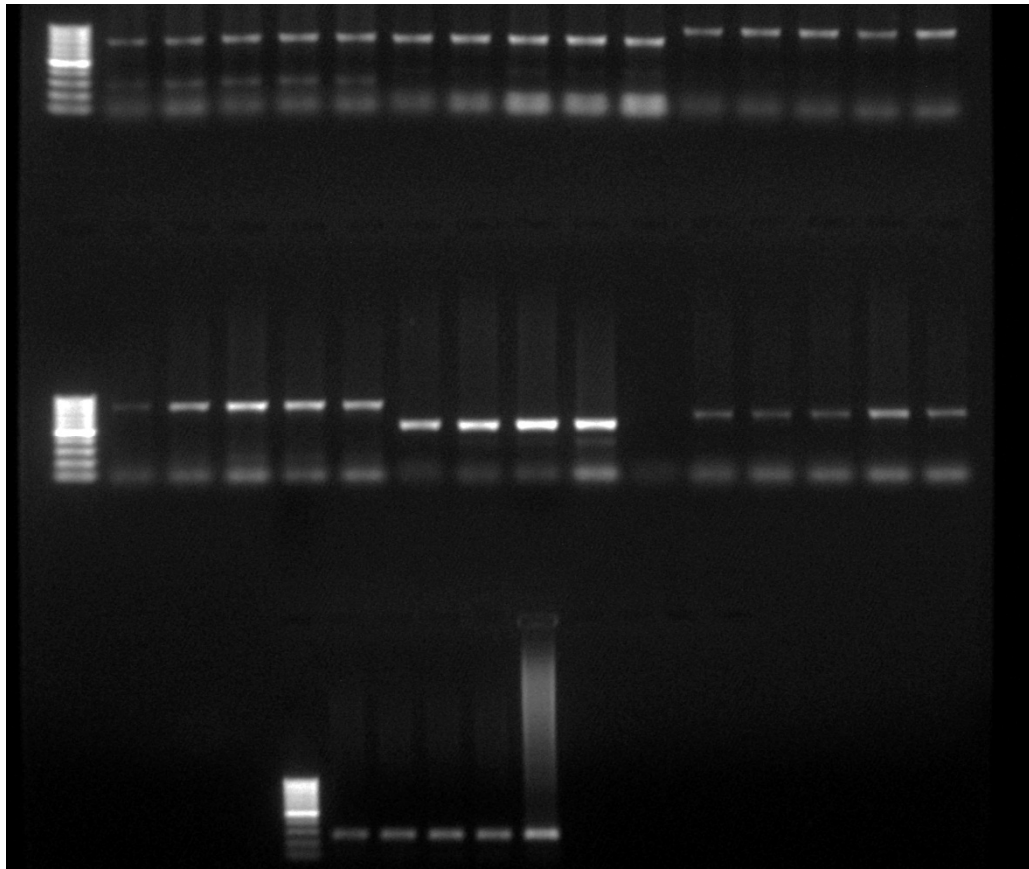
Şekil 4.8. Yaprak dokusunda miktar denemesi. Hat 1,9,17,25: fermentas 100 bp marker, Hat 2,10,18,26: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 3,11,19,27: At3g23770 PCR ürünleri, Hat 4,12,20,28: At3g07320 PCR ürünleri, Hat 5,13,21,29: At3g61810 PCR ürünleri, Hat 6,14,22,30: At3g55780 PCR ürünleri, Hat 7,15,23,31: At3g13560 PCR ürünleri, Hat 8,16,24,32: *Actin2*.

Sonuç olarak yaprak dokusunda gerçekleştirilen kalıp miktarı denemelerinde tüm genler için 2,5 μ l cDNA içeren tüplerden elde edildiği gözlenmiştir. At4g14080 ile At3g07320 genlerinin de yaprakta ifade oldukları bununla birlikte, At3g07320 geninin çok az ifadeye sahip olduğu gözlenmiştir.

4.5.2. Farklı sayıda amplikasyon döngüleri seçilerek gerçekleştirilen semi- quantitative RT-PCR

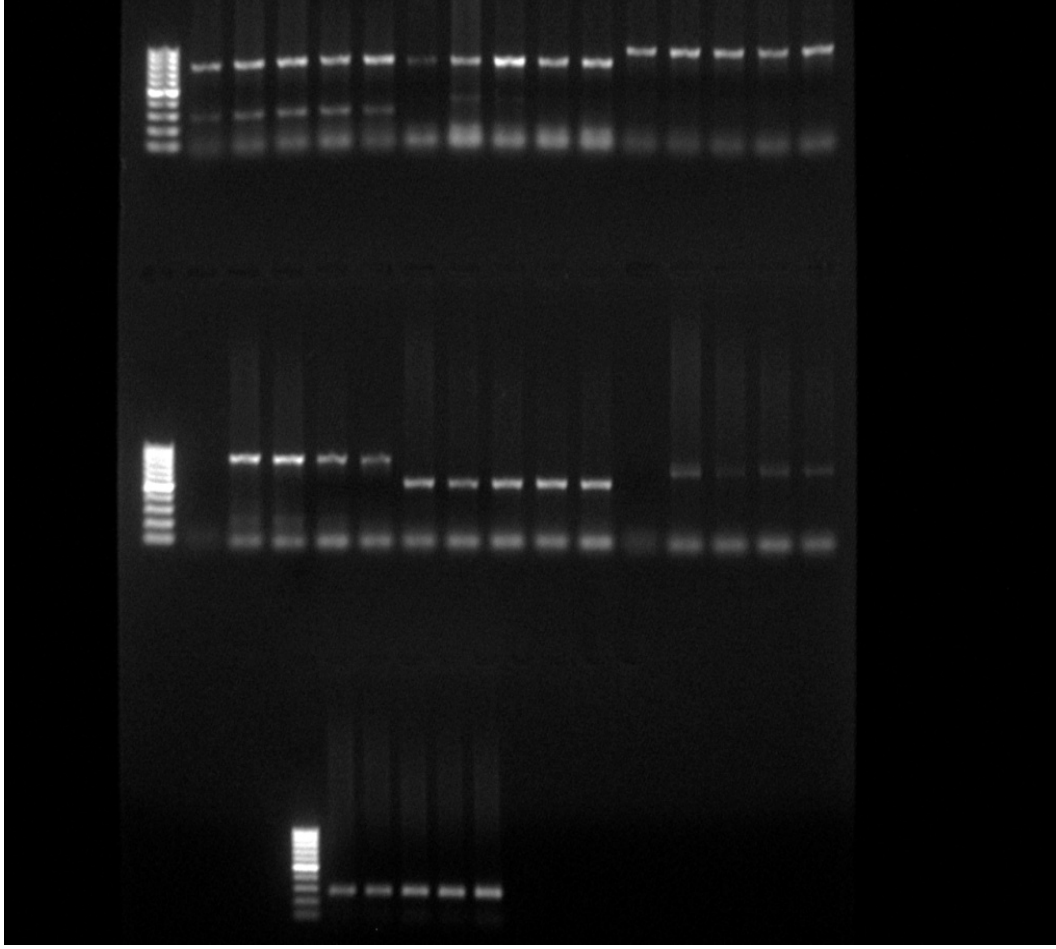
4.5.2.1. Döngü sayısı 29, 32, 35, 38 ve 41 olan semi-quantitative RT-PCR

Farklı sayıda döngülerde yapılan PCR reaksiyonlarında 29, 32, 35, 38 ve 41. döngülere gelindiğinde tüpler extension safhasının ortasında iken sırası ile cihazdan alınmıştır. Ardından, tüpler 72°C’ de 10 dakika su banyosunda bekletilerek extension safhasının tamamlanması sağlanmıştır. PCR ürünleri aynı agaroz jelde yürütülmüştür.



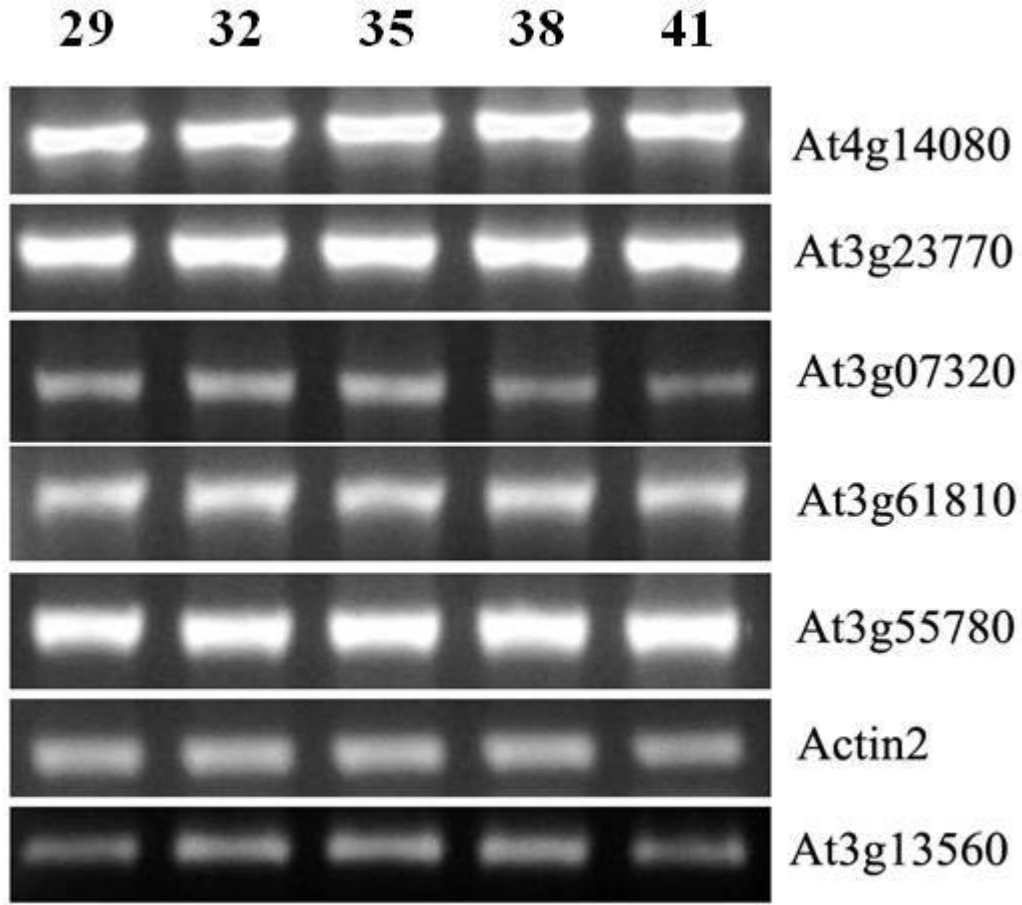
Şekil 4.9. Döngü sayısı 29,32,35,38 ve 41 olan yaprak PCR sonucu. Hat 1,17,33: fermentas 100 bp marker, Hat 2-6: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 7-11: At3g23770 PCR ürünleri, Hat 12-16: At3g07320 PCR ürünleri, Hat 18-22: At3g61810 PCR ürünleri, Hat 23-27: At3g55780 PCR ürünleri, Hat 28-32: At3g13560 PCR ürünleri, Hat 34-38: *Actin2*.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında yapraklarda sadece iki aday genin, At3g55780 ile At3g61810 genlerinin ifade seviyelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Geriye kalan diğer genlerin ise yaprağa özgü bir ifade profili göstermediği ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.10. Döngü sayısı 29, 32, 35, 38 ve 41 olan gövde PCR sonucu. Hat 1,17,33: fermentas 100 bp marker, Hat 2-6: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 7-11: At3g23770 PCR ürünleri, Hat 12-16: At3g07320 PCR ürünleri, Hat 18-22: At3g61810 PCR ürünleri, Hat 23-27: At3g55780 PCR ürünleri, Hat 28-32: At3g13560 PCR ürünleri, Hat 34-38: *Actin2*.

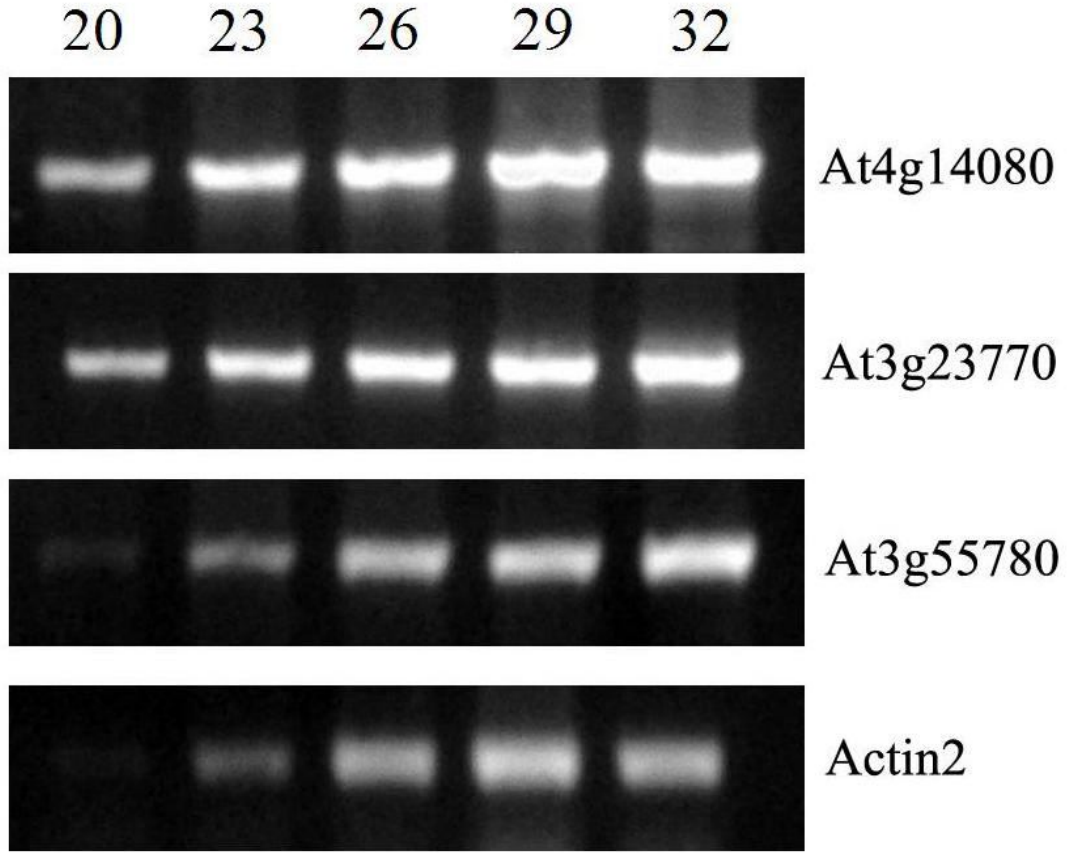
Sonuçlar incelendiğinde; gövde dokusunda aday genlerin ifade seviyelerinin hemen hemen birbirine benzer olduğu fakat, At3g13560 geninin ifade seviyesinin çok zayıf olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte At3g13560 geninin yapraklardaki ifade seviyesinin gövdeye kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9, 4.10). Bu sonuçlar At3g55780 ile At3g61810 mRNA seviyelerinin yapraklarda yüksek olduğunu buna karşın gövde dokusunda hiçbir aday genin tercihen ifade olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.11. Döngü sayısı 29, 32, 35, 38 ve 41 olan anter PCR sonucu. Hat 1: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 2: At3g23770, Hat 3: At3g07320, Hat 4: At3g61810, Hat 5: At3g55780, Hat 6: Actin2 Hat 7: At3g13560.

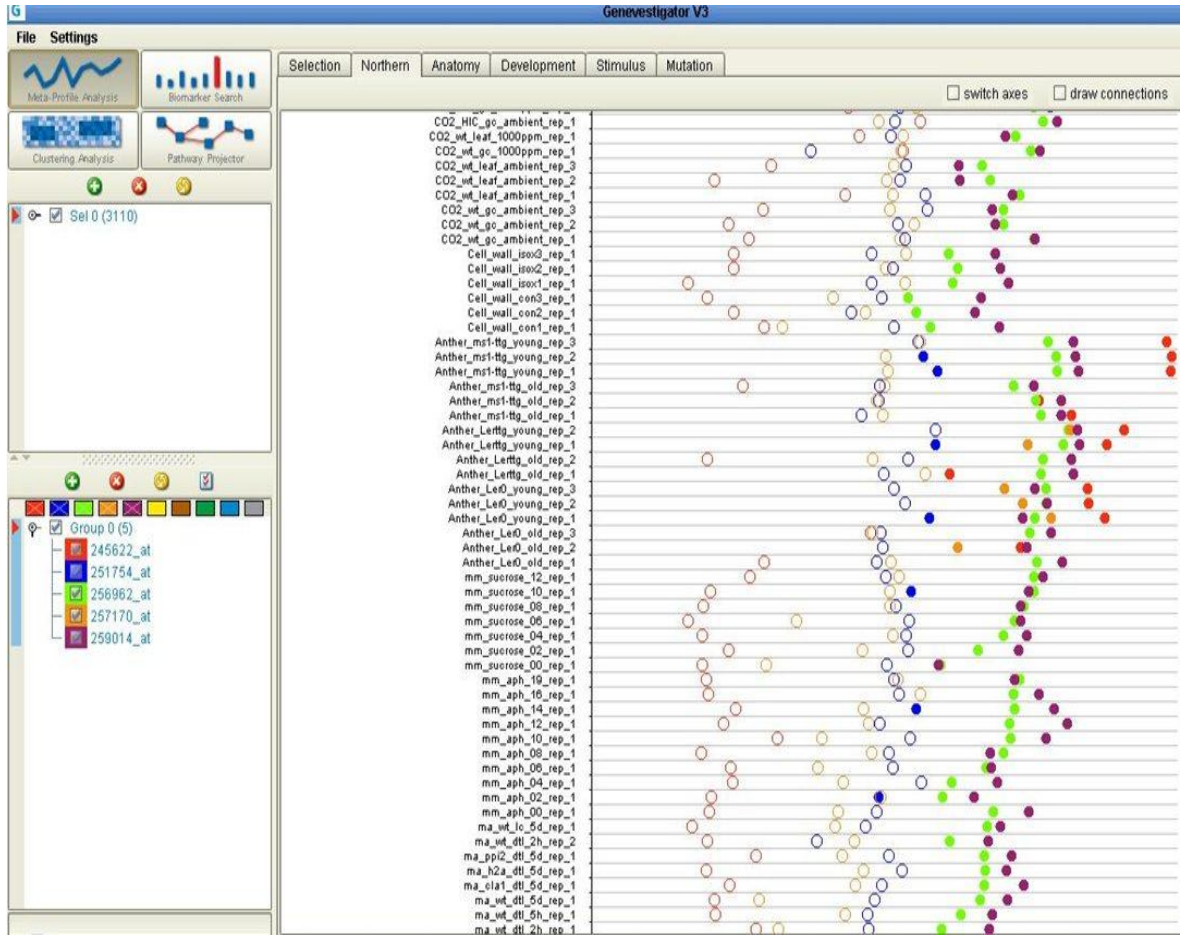
Bu sonuçlara göre At4g14080, At3g23770 ve At3g55780 genlerinin diğer aday genlere kıyasla daha yüksek ifade seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, At3g61810 ve At3g13560 genlerinin anterde çok ifade olmadığı, At3g07320 mRNA seviyesinin ise daha düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca At4g14080, At3g23770 ve At3g55780 genlerinin anterdeki ifadelerinin vejetatif dokulardaki ifade profillerine kıyasla daha fazla ifade olduğu gözlenmiştir. Farklı döngüler seçilmiş olmasına rağmen ifade profillerine bakıldığında döngüler arasında bir değişiklik (artış) gözlenmemiştir(Şekil 4.9). Deneyde en düşük (erken) döngüde bile genlerin ifadelerinin yüksek olması sebebiyle aynı deney daha düşük döngüler seçilerek tekrarlanmıştır.

4.5.2.2. Döngü sayısı 20,23,26,29 ve 32 olan semi-quantitative RT-PCR



Şekil 4.12. Döngü sayısı 20,23,26,29 ve 32 olan anter PCR sonucu. Hat 1: At4g14080 PCR ürünleri, Hat 2: At3g23770, Hat 3: At3g55780, Hat 4: *Actin2*.

Bu deneyin sonuçlarına bakıldığında At4g14080, At3g23770 ile At3g55780 genlerinin anterde çok fazla ifade oldukları bu genlerden At4g14080 ile At3g23770' nin daha fazla ifade olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.13. Biyoinformatik analizler sonucu belirlenen altı aday genin Genevestigator veritabanı Meta-Profile Analizi ile anterdeki ifade profilleri.

BÖLÜM 5**SONUÇLAR ve ÖNERİLER**

Bu çalışmada, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkisinde biyoinformatik analizler sonucunda kallaz komponenti β -1,3-glukanaz kodladığı varsayılan altı aday gen, At4g14080 (anter-spesifik protein A6), At3g23770, At3g07320, At3g13560, At3g61810 ve At3g55780 tespit edilmiştir. Glikozid hidrolaz aile 17' ye ait 50 gen arasından 6 aday gen, biyoinformatik veritabanları kullanılarak kodladıkları proteinler, ifade oldukları doku ve organlar, cDNA kaynakları ve filogenetik ağaç üzerindeki yakınlıkları incelenerek belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda At4g14080, At3g23770, At3g07320, At3g13560, At3g61810 ve At3g55780 genleri arasından At4g14080, At3g23770 ile At3g55780 genlerinin kallaz enzim kompleksinin oluşmasından sorumlu genler olabileceği önerilmiştir.

Çalışmada altı aday gen, anter ve somatik (yaprak ve gövde) dokulardan elde edilen cDNA' lar kullanılarak RT- PCR ve semi- quantitative RT- PCR yöntemleri ile çoğaltılmıştır. Bu deneylerde kullanılmak üzere elde edilen anter RNA örnekleri kallaz enzim kompleksinin aktif olduğu tetrat aşamasında bulunan anterlerden izole edilmiştir. Sonuç olarak, her gene ait özgün primerler kullanılarak gerçekleştirilen RT- PCR ve semi- quantitative RT- PCR deneyleri ile genlerin anterdeki ve somatik dokulardaki ifade profilleri belirlenmiştir. Bu primerlerden sırasıyla 767, 609, 890, 840, 557 ve 672 bp' i büyüklüğünde DNA bantları başarı ile çoğaltılmıştır. Anterlerin yanı sıra yaprak ve gövde gibi somatik dokulardan ise karşılaştırma amacı ile PCR yapılmıştır.

RT- PCR ve semi- quantitative RT- PCR sonuçları incelendiğinde At4g14080, At3g23770, At3g07320, At3g13560, At3g61810 ve At3g55780 genlerinin anterde ifade olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten, bu genlerden At4g14080, At3g23770 ve At3g55780 genlerinin diğer genlere nazaran daha fazla ifade olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında bu üç genin kallaz komponenti β -1,3-glukanaz kodladığı düşünülen genler olabileceği sonucuna varılmıştır.

İlerde bu genlerin mutant hatlarıyla gerçekleştirilecek çalışmalar sayesinde genlerin fonksiyonları hakkında daha kesin bilgiler elde edilebilecektir.

Bu genlerin belirlenmesi erkek kısır bitkilerin elde edilmesinde ve bunun sonucunda da tarımsal alanda büyük önem taşıyan hibrit bitkilerin üretilmesinde de yararlı olabilecektir. Erkek kısır bitkilerin bir avantajı, kaliteli bir şekilde üretilmesi hem zor hem de pahalı olan hibrit varyetelerin üretimidir. Birçok ürün bitkisinde erkek ve dişi organların aynı çiçek üzerinde bir arada bulunması, bununla birlikte pirinç gibi bazı bitkilerde ise her çiçekte sadece bir tohum üretilmesi gibi durumlarda sadece anterleri uzaklaştırarak çok sayıda kaliteli hibrit bitki üretimini başarmak çok zor bir işlemdir. Buna karşın, bu bitkilerde erkek kısır hatların geliştirilmesi polinasyonun kontrol altına alınmasını mümkün kılacaktır. Genetik mühendisliği kullanılarak elde edilen erkek kısır ürün bitkileri, genetik olarak değiştirilmiş organizmaların genlerinin yabancı tiplere yayılmasının kontrolünde de yararlı olacaktır. Genetik mühendisliği kullanılarak elde edilen bu kısır bitkiler polen üretmeyecekler ve yabancı tiplerle çapraz polinasyona maruz kalmayacaktır.

Kallaz enzim kompleksini meydana getiren genlerin belirlenmesi erkek kısır bitkilerin elde edilmesinde ve bunun sonucunda da bu genlerin sadece ifadelerinin değiştirilmesiyle tarımsal alanda büyük önem taşıyan hibrit bitkilerin üretilmesi sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

- Alves-Ferreira M., Wellmer F., Banhara A., Vijaya K., Riechmann J.L. ve Meyerowitz E.M., 2007. Global Expression Profiling Applied to the Analysis of Arabidopsis Stamen Development. *Plant Physiol.* 145: 747-762.
- Bachman E.S. ve McClay D.R., 1996. Molecular Cloning of the First Metazoan B-1,3-Glucanase from Eggs of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 6808- 6813.
- Beerhues L. ve Kombrink E., 1994. Primary Structure and Expression of mRNAs Encoding Basic Chitinase and 1,3- β - Glucanase in Potato. *Plant Mol. Biol.* 24: 353- 367.
- Boller T. ve Vögeli U., 1984. Vacuolar Isolation of Ethylene- Induced Chitinase in Bean Leaves. *Plant Physiol.* 74: 442- 444.
- Boller T., 1985. in Cellular and Molecular Biology of Plant Stress (Key, J.L., and Kosuge, T., Eds.) pp. 247- 262, A. R. Liss, New York.
- Bucciaglia P.A. ve Smith A.G., 1994. Cloning and Characterization of Tag 1, a Tobacco Anther β -1,3- Glucanase Expressed at Tetrad Dissolution. *Plant Mol. Biol.* 24: 903- 914.
- Bucciaglia P.A., Zimmermann E. ve Smith A.G., 2003. Functional Analysis of a β -1,3-Glucanase Gene (Tag 1) with Anther- Specific RNA and Protein Accumulation Using Antisense RNA Inhibition. *Plant Physiol.* 160: 1367- 1373.
- Buchner P., Rochat C., Wulleme S. ve Boutin J-P., 2002. Characterization of a Tissue-Specific and Developmentally Regulated β -1,3-Glucanase Gene in Pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol. Biol.* 49: 171- 186.
- del Campillo E. ve Lewis L.N., 1992. Occurrence of 9,5 Cellulase and Other Hydrolases in Flower Reproductive Organs Undergoing Major Cell Wall Disruption. *Plant Physiol.* 99: 1015- 1020.
- Chaudhury A., 1993. Nuclear Genes Controlling Male Fertility. *Plant Cell.* 5: 1277- 1283.

- Delp G. ve Palva E.T., 1999. A Novel Flower- Specific Arabidopsis Gene Related to Both Pathogen- Induced and Developmentally Regulated Plant Beta-1,3-Glucanase Genes. *Plant Mol. Biol.* 39: 565- 575.
- Domingo C., Conejero V. ve Vera P., 1994. Genes Encoding Asidic and Basis Class III β -1,3-Glucanases are Expressed in Tomato Plants upon Viroid Infection. *Plant Mol. Biol.* 24: 725- 732.
- Dong X., Mindrinos M., Davis K.R. ve Ausubel F.M., 1991. Induction of Arabidopsis Defense Genes by Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae* Strains and by a Cloned Avirulence Gene. *Plant Cell.* 3: 61- 72.
- Doxey A.C., Yaish M.W.F., Moffatt B.A., Griffith M. ve McConkey B.J., 2007. Functional Divergence in the Arabidopsis β -1,3-Glucanase Gene Family Inferred by Phylogenetic Reconstruction of Expression States. *Mol. Biol. Evol.* 24 (4): 1045- 1055.
- Drews G.N., Lee D. ve Christensen C.A., 1998. Genetic Analyses of Female Gametophyte Development and Function. *Plant Cell.* 10: 5-18.
- Dupl'áková N., Reňák D., Hovanec P., Honysová B., Twell D. ve Honys D., 2007. Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP) – User- Oriented Transcriptomic Database with Easy-to-Use Graphic Interface. *BMC Plant Biol.* 7: 39.
- Frankel R., Izhar S. ve Nitsan J., 1969. Timing of Callase Activity and Cytoplasmic Male Sterility in Petunia. *Biochem. Genet.* 3: 451- 455.
- Fulcher R.G., Mc Cully M.E., Setterfield G. ve Sutherland J., 1976. B-1,3- Glucans May Be Associated with Cell Plate Formation During Cytokinesis. *Can. J. Bot.* 54: 459- 542.
- Goodman N., Kiraly Z. ve Wood K.R., 1986. Resistance to infection. *In the Biochemistry and Physiology of Plant Disease.* (Columbia: University of Missouri Press) pp. 352- 365.
- Helleboid S., Chapman A., Hendricks T., Inze D., Vasseur J. ve Hilbert J.L., 2000. Cloning of β 1,3- Glucanases Expressed during *Cichorium* somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 42: 377- 386.

- Heslop-Harrison J., 1964. Cell Walls, Cell Membranes, and Protoplasmic Connections During Meiosis and Pollen Development. *In Pollen Physiology and Fertilization*, H. F. Linskens, ed (Amsterdam: North Holland Publishing Company), pp. 39-47.
- Heslop-Harrison J. ve Mackenzie A., 1967. Autoradiography of Soluble [2- ¹⁴C] Thymidine Derivatives During Meiosis and Microsporogenesis in Liliun Anthers. *J. Cell Sci.* 2: 387- 400.
- Hinton D.M. ve Pressey R., 1980. Glucanase in Fruits and Vegetables. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 499- 502.
- Hird D.L., Worrall D., Hodge R., Smartt S., Paul W. ve Scott R., 1993. The Anther-Specific Protein Encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 Gene Displays Similarity to B-1,3- Glucanases. *Plant J.* 4: 1023- 1033.
- Ito T. ve Shinozaki K., 2002. The *MALE STERILITY1 (MS1)* Gene of Arabidopsis, Encoding a Nuclear Protein with a PHD- Finger Motif, is Expressed in Tapetal Cells and is Required for Pollen Maturation. *Plant Cell Physiol.* 43: 1285-1292.
- Izhar S. ve Frankel R., 1971. Mechanism of Male Sterility in Petunia: The Relationship between pH, Callase Activity in The Anthers, and the Breakdown of the Microsporogenesis. *Theor. Appl. Genet.* 41: 104- 108.
- Jeon J-S., Chung Y-Y., Lee S., Yi G-H., Oh B-G. ve An G., 1999. Isolation and Characterization of an Anther- Specific Gene, RA8, from Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 39: 35- 44.
- Kaul M.L.H., 1988. Male- Sterility in Higher Plants: Monographs on Theoretical and Applied Genetics 10. (Berlin: Springer).
- Krabel D., Eschrich W., Wirth S. ve Wolf G., 1993. Callase- (1,3-β-D-Glucanase) Activity during Spring Reactivation in Deciduous Trees. *Plant Sci.* 93: 19-23.
- Leubner- Metzger G. ve Meins F.Jr., 1999. Functions and Regulation of Plant B-1,3- Glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S, Editors. Pathogenesis- Related Proteins in Plants. Boca Raton (FL): CRC Press LLC. p. 49- 76.
- Lotan T., Ori N. ve Fluhr R., 1989. Pathogenesis- Related Proteins are Developmentally Regulated in Tobacco Flowers. *Plant Cell.* 1: 881- 887.

- Ma H., Zhao D-Z., Wang G.F. ve Speal B., (July 31, 2002). New Gene Discovered for Male Fertility in Plants. from <http://www.science.psu.edu/alert/Ma7-2002.htm>.
- Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G.H., Mullokandov M., Song J.S., Tasneem A., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D., Zhang N. ve Bryant S.H., 2009. CDD: Specific Functional Annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* 37: 205- 210.
- Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemanas J. ve Goldberg R.B., 1990. Induction of Male Sterility in Plants by a Chimeric Ribonuclease Gene. *Nature.* 347: 737- 741.
- Mariani C., Gossele V., De Beuckeleer M., De Block M., Goldberg R.B., De Greef W. ve Leemans J., 1992. A Chimaeric Ribonuclease- Inhibitor Gene Restores Fertility to Male Steril Plants. *Nature.* 357: 384- 387.
- Mauch F., Mauch-Mani B. ve Boller T., 1988. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue: II. Inhibition of Fungal Growth by Combinations of Chitinase and β -1,3- Glucanase. *Plant Physiol.* 88(3): 936- 942.
- McCormick S., 1993. Male Gametophyte Development. *Plant Cell.* 5: 1265- 1275.
- Meikle P.J., Bonig I., Hoogenraad N.J., Clarke A.E. ve Stone B.A., 1991. The Location of (1-3)- β -Glucans in the Walls of Pollen Tubes of *Nicotiana glauca* Using a (1-3)- β -Glucan-Specific Monoclonal Antibody. *Planta.* 185: 1- 8.
- Memelink J., Linthorst J. M.H., Schilperoort A.R. ve Hoge C.H., 1990. Tobacco Gene Encoding Acidic and Basic Isoforms of Pathogenesis- Related Proteins Display Different Expression Patterns. *Plant Mol. Biol.* 14: 119- 126.
- Morohashi Y. ve Matsushima H., 2000. Development of β -1,3-Glucanase Activity in Germinated Tomato Seeds. *J. Exp. Bot.* 51: 1381- 1387.
- Mount D.W., 2004. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2nd ed.).71
- Oh H.Y. ve Yang M.S., 1995. Nucleotid Sequence of Genomic DNA Encoding the Potato β -1,3-Glucanase. *Plant Physiol.* 107: 0032- 0889.

- Ori N., Sessa G., Lotan T., Himmelhoch S. ve Fluhr R., 1990. A Major Styler Matrix Polypeptide (Sp41) is a Member of the Pathogenesis- Related Proteins Superclass. *EMBO J.* 9: 3429- 3436.
- Pacini E., Franchi G.G. ve Hesse M., 1985. The tapetum: It' s Form, Function, and Possible Phylogeny in Embryophyta. *Plant. Syst. Evol.* 149: 155- 185.
- Pan S.Q., Ye X.S. ve Kuc J., 1989. Direct Detection of B-1,3- Glucanase isozymes on Polyacrylamide Electrophoresis and Isoelectrofocusing Gels. *Anal. Biochem.* 182: 136- 140.
- Parent J.G. ve Assalin A., 1984. Detection of Pathogenesis- Related Proteins (PR or b) and of Other Proteins in the Intercellular Fluid of Hypersensitive Plants Infected with Tobacco Mosaic Virus. *Can. J. Bot.* 62: 564- 569.
- Paul W., Hodge R., Smartt S., Draper J. ve Scott R., 1992. The Isolation and Characterization of the Tapetum-Specific *Arabidopsis thaliana* A9 Genes. *Plant Mol. Biol.* 19: 611- 622.
- Payne G., Ward E., Gaffney T., Goy P.A., Moyer M., Harper A., Meins F.Jr. ve Ryals J., 1990. Evidence for a Third Structural Class of β -1,3- Glucanase in Tobacco. *Plant Mol. Biol.* 15: 797- 808.
- Regan S.M. ve Moffatt B.A., 1990. Cytochemical Analyses of Polen Development in Wild- Type *Arabidopsis* and a Male- Sterile Mutant. *Plant Cell.* 2: 877- 889.
- Roggen H.P. ve Stanley R.G., 1969. Cell-Wall-Hydrolyzing Enzymes in Wall Formation as Measured by Pollen- Tube Extension. *Planta.* 84: 295- 303.
- Samac D.A., Hironaka C.M., Yallaly P.E. ve Shah D.M., 1990. Isolation and Characterization of the Genes Encoding Basic and Asidic Chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 93: 907- 914.
- Sanders P.M., Bui A.Q., Weterings K., McIntire K.N., Hsu Y.C., Lee P.Y., Truong M.T., Beals T.P ve Goldberg R.B., 1999. Anther Developmental Defects in *Arabidopsis thaliana* Male- Sterile Mutants. *Sex Plant Reprod.* 11: 297- 322.
- Schieffthaler U., Balasubramanian S., Sieber P., Chevalier D., Wisman E. ve Schneitz K., 1999. Molecular Analysis of *NOZZLE*, a Gene Involved in Pattern Formation and

- Early Sporogenesis During Sex Organ Development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11664-11669.
- Scott R.J., Spielman M. ve Dickenson H.G., 2004. Stamen Structure and Function. *Plant Cell*. 16: S46- S60.
- Shi Y., 2005. Isolation, Characterization, and Expression Analysis of β -1,3-Glucanase Genes from Strawberry Plants (Doktora tezi). B.S., Northwestern University, China.
- Shinshi H., Wenzler H., Neuhaus J.M, Felix G., Hofsteenge J. ve Meins F.Jr., 1988. Evidence of Amino and Carboxyl- Terminal Processing of a Plant Defense-Related Enzyme Primary Structure of Tobacco β -1,3-Glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5541- 5546.
- Simmons C., 1994. The Physiology and Molecular Biology of Plant 1,3- β -D- Glucanases and 1,3; 1,4- β -D- Glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 325- 387.
- Smyth D.R., Bowman J.L. ve Meyerowitz E.M., 1990. Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2: 755- 767.
- Stieglitz H., 1977. Role of B-1,3- Glucanase in Postmeiotic Microspor Release. *Devel. Biol.* 57: 87- 97.
- Stieglitz H. ve Stern H., 1973. Regulation Of B-1,3- Glucanase Activity in Developing Anthers of *Lilium*. *Devel. Biol.* 34: 169- 173.
- Sun L., Gurnon J.R., Adams B.J., Graves M.V. ve Van Etten L.J., 2000. Characterization of a Beta-1,3- Glucanase Encoded by Chlorella Virus PBCV-1. *Virology*. 276: 27- 36.
- Thomas B.R., Romero G.O., Nevins D.J. ve Rodriguez R.L., 2000. New Perspectives on the Endo- Beta- Glucanases of Glycosyl Hydrolase Family 17. *Int. J. Biol. Macromol.* 27: 139- 144.
- Tsuchiya T., Toriyama K., Yoshikawa M., Ejiri S. ve Hirata K., 1995. Tapetum- Specific Expression of the Gene for an Endo- β -1,3- Glucanase Causes Male Sterility in Transgenic Tobacco. *Plant Cell Physiol* 36: 487- 494.

- Turgut K., Barbsby T., Craze M., Freeman J., Hodge R., Paul W. ve Scott R., 1994. The Highly Expressed Tapetum- Specific A9 Gene is not Required for Male Fertility in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 24: 97- 104.
- Van Kan J.A.L., Joosten M.H.A.J. ve Wagemakers C.A.M., 1992. Differential Accumulation of mRNAs Encoding Extracellular and Intracellular PR Proteins in Tomato Induced by Virulent and Avirulent Races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol. Biol.* 20: 513- 527.
- Ward E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F.Jr. ve Ryals J.A., 1991. Differential Regulation of β -1,3- Glucanase Messenger RNAs in Response to Pathogen Infection. *Plant Physiol.* 96: 390- 397.
- Warmke H.E. ve Overman M.A., 1972. Cytoplasmic Male Sterility in Sorghum. 1. Callose Behaviour in Fertile and Sterile Anthers. *J. Hered.* 63: 103- 108.
- Waterkeyn L., 1962. Les Parois Microsporocytaires de Nature Callosique Chez Helleborus et Tradescantia. *Cellule.* 62: 225- 255.
- Waterkeyn L. ve Beinfait A., 1970. On a Possible Function of the Callosic Special Wall in *Ipomoea purpurea* (L.) *Roth. Grana.* 10: 13-20.
- Wilson Z.A., Morroll M.S., Dawson J., Swarup R. ve Tighe J.P., 2001. The Arabidopsis *MALE STERILITY1 (MS1)* Gene is a Transcriptional Regulator of Male Gametogenesis, with Homology to the PHD- Finger Family of Transcription Factors. *Plant J.* 28: 27-39.
- Worrall D., Hird D.L., Hodge R., Paul W., Draper J. ve Scott R., 1992. Premature Dissolution of The Microsporocyte Callose Wall Causes Male Sterility in Transgenic Tobacco. *Plant Cell.* 7: 759- 771.
- Yang W.C., Ye D., Xu J. ve Sundaresan V., 1999. The SPOROCTELESS Gene of Arabidopsis is Required for Initiation of Sporogenesis and Encodes a Novel Nuclear Protein. *Genes Dev.* 13: 2108-2117.
- Zhang Z.B., Zhu J., Gao J.F., Wang C., Li H., Li H., Zhang H.Q., Zhang S., Wang D.M., Wang Q.X., Huang H., Xia H.J. ve Yang Z.N., 2007. Transcription Factor

AtMYB103 is Required for Anther Development by Regulating Tapetum Development, Callose Dissolution and Exine Formation in Arabidopsis. *Plant Journal*. 52: 528- 538.

Zhu J., Chen H., Li H., Gao J-F., Jiang H., Wang C., Guan Y-F. ve Yang Z-N., 2008. Defective in Tapetal Development and Function 1 is Essential for Anther Development and Tapetal Function for Microspor Maturatıon in Arabidopsis. *Plant Journal*. 55: 266- 277.

Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L. ve Grissem W., 2004. GENEVESTIGATOR: Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol*. 136: 2621- 2632.

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa no

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonlar.....	19
Çizelge 3.2. PCR' da kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.....	20
Çizelge 3.3. PCR segmentleri ve döngü sayısı.....	20
Çizelge 3.4. PCR' da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	21
Çizelge 3.5. Yaprak ve gövde dokuları için semi-quantitative RT-PCR segmentleri ve döngü sayıları.....	21
Çizelge 3.6. Anter dokusu için semi-quantitative RT-PCR segmentleri ve döngü sayıları.....	22
Çizelge 4.1. Glikozid hidrolaz aile 17' ye ait 50 gen ve tanımları.....	26
Çizelge 4.2. Genevestigator ve aGFP veritabanlarından elde edilen bilgilere göre genlerin ifade olduğu dokular.....	28
Çizelge 4.3. Unigene veritabanına göre genlerin elde edildiği cDNA dokuları.....	30

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 1.1. Angiospermlerde görülen tipik mikrosporogenez.....	2
Şekil 1.2. Kallozun moleküler modeli.....	4
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker haritaları.....	23
Şekil 4.1. Elemeler sonucu elde edilen 15 aday genin Chromosome Map Tool ile kromozom üzerindeki dağılışının gösterilmesi.....	31
Şekil 4.2. Clustal X programı kullanılarak 15 genin protein dizilişlerine göre filogenetik ağaç üzerinde gösterilmesi.....	32
Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh türü.....	36
Şekil 4.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. (Columbia wild type) bitkisinde kalloz çeper ile çevrili tetrat yapısı.....	37
Şekil 4.5. Anter PCR analizi.....	38
Şekil 4.6. Gövde PCR analizi.....	39
Şekil 4.7. Yaprak PCR analizi.....	40
Şekil 4.8. Yaprak dokusunda miktar denemesi.....	41
Şekil 4.9. Döngü sayısı 29,32,35,38 ve 41 olan yaprak PCR sonucu.....	42
Şekil 4.10. Döngü sayısı 29,32,35,38 ve 41 olan gövde PCR sonucu	43
Şekil 4.11. Döngü sayısı 29, 32, 35, 38 ve 41 olan anter PCR sonucu.....	44
Şekil 4.12. Döngü sayısı 20,23,26,29 ve 32 olan anter PCR sonucu.....	45
Şekil 4.13. Biyoinformatik analizler sonucu belirlenen altı aday genin Genevestigator veritabanı Meta-Profile Analizi ile anterdeki ifade profilleri.....	46

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Yasemin DEMİRĞAN

Doğum Yeri: Hamburg

Doğum Tarihi: 14/ 03/ 1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: 2002-2006 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: 2006- Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce, Almanca

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar- SCI- Diğer

b) Bildiriler- Uluslar arası- Ulusal

Yasemin Demirgan, Kemal Melih TAŞKIN (2008). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Kallaz Bileşeni β -1,3- Glukanaz Gen İfadesinin Belirlenmesi. Trabzon 23-27 Haziran 2008. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (Poster bildiri).

Sibel YILMAZ, Hakan ÇAM, Yasemin DEMİRĞAN, Kemal Melih TAŞKIN (2008). Apomiksi ve Genetik Etiketleme: Doğal Apomikt *Boechera holbellii* Türünde Genetik Etiketlemeye Maruz Kalan Gen İfadelerinin Belirlenmesi. Trabzon 23-27 Haziran 2008. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (Sözlü bildiri).

c) Katıldığı Projeler

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Bitkisinde Kallaz Komponenti β -1,3-glucanase Geninin Tanımlanması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) 2008/34.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

İLETİŞİM

E-posta adresi: ydemirgan@gmail.com