



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BRASSICA OLERACEA L. (LAHANA)'DA
ANTER GELİŞİMİ VE
PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

HASAN CAN KÜÇÜKALİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2020



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BRASSICA OLERACEA L. (LAHANA)'DA
ANTER GELİŞİMİ VE
PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

HASAN CAN KÜÇÜKALİ

520117003

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2020



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



**ANTHER DEVELOPMENT AND
PROGRAMMED CELL DEATH IN *BRASSICA
OLERACEA* L. (CABBAGE)**

HASAN CAN KÜÇÜKALİ

520117003

MASTER THESIS

Department of Biology
Biology Program

Thesis Supervisor

Prof. Dr. Filiz VARDAR

ISTANBUL, 2020

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Hasan Can Küçükali'nin "*Brassica oleracea* L. (Lahana)'da Anter Gelişimi ve Programlı Hücre Ölümü" başlıklı tez çalışması, 09 Temmuz 2020 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Filiz VARDAR (Danışman)
Marmara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Işıl Sezekler (Üye)
Marmara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Özlem Aytürk (Üye)
Maltepe Üniversitesi

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22./7/2020 tarih ve 2020/17-02 sayılı kararı ile Hasan Can Küçükali'nin Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Bülent EKİCİ




TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana rehberlik eden, bilgisini ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmam sırasında yardımlarını ve değerli fikirlerini benimle paylaşan danışmanım sayın Prof. Dr. Filiz VARDAR'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimde bana her zaman yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Aslıhan ÇETİNBAŞ GENÇ'e, arkadaşlıklarıyla beni sürekli destekleyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Gamze KURTULUŞ'a ve Asude TAN'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden beri yanımda olan ve her zaman beni destekleyen değerli arkadaşım Tunahan Irmak BAŞARAN'a teşekkür ederim.

Dostluklarıyla beni bu yolda asla yalnız bırakmayan Arhun Ali BALKAN'a, İpek Türkmenoğlu'na Barış GÖKALSIN'a, Orçun TOKSÖZ'e ve Yiğitcan ÖZBAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni hep destekleyen, maddi manevi her zaman yanımda olan sevgili annem Naciye KÜÇÜKALİ'ye ve biricik kardeşim Defne KÜÇÜKALİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez kapsamındaki çalışmalarını FEN-C-YLP-170419-0121 numaralı proje ile destekleyen Marmara Üniversitesi BAPKO'ya teşekkür ederim.

Bu tez kapsamındaki çalışmalarını 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs programını ile destekleyen TUBİTAK-BİDEB'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Temmuz, 2020

Hasan Can Küçükali

İÇİNDEKİLER	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Brassicaceae</i> Familyası Hakkında Genel Bilgiler	2
1.2. Anter Gelişimi ve Anter Çeper Tabakaları	4
1.3. Programlı Hücre Ölümü	5
1.3.1. Nekroz	5
1.3.2. Otofaji	5
1.3.3. Apoptoz	6
1.3.4. Bitkilerde Programlı Hücre Ölüm	7
2. MATERYAL VE YÖNTEM	9
2.1. Bitki Materyali	9
2.1.1. Bitki Materyalinin Toplanması ve Fiksasyonu	9
2.2. Araştırma Yöntemleri	10
2.2.1. Morfolojik ve Embriyolojik Yöntemler	10
2.2.1.1. Parafine Gömme ve Kesit alma	10
2.2.1.2. Hematoksilen	11
2.2.1.3. Comassie parlak mavisi	12
2.2.1.4. Periyodik Asit-Shiff Reaktifi	12
2.2.1.5. Sudan siyahı B	13
2.2.1.6. Alizarin kırmızısı S	13
2.2.1.7. DAPI	13
2.2.1.8. TUNEL	14

2.2.2. Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemler	15
2.2.2.1. Kaspaz-1 benzeri enzimleri aktivasyonlarının belirlenmesi	15
2.2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu	16
2.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	17
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
3.1. Morfolojik ve Embriyolojik Bulgular	19
3.1.1. Anter Çeper Tabakalarının Gelişimi	19
3.1.2. Anter Çeper tabakalarındaki Programlı Hücre Ölümü	25
3.2. Anter Çeper Tabakalarında Kaspaz-1 benzeri enzimlerin aktiviteleri	30
3.3. Anter Çeper Tabakalarında DNA Fragmentasyonları	30
4. SONUÇLAR	32
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	39

ÖZET

***Brassica oleracea* L. (Lahana)'da Anter Gelişimi ve Programlı Hücre Ölümü**

Anter çeper tabakalarının gelişiminin düzenli olması bitkilerde üreme gelişiminin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde önemli rol oynar. Bu tabakalardan biri olan tapetum ile polen verimi arasında da sıkı bir bağlantı vardır. Tapetum hücreleri, polen gelişimi sırasında yüksek metabolik aktivite gösterirler. Bu hücreler, polenlerin beslenmesinde, ekzin çeper oluşumunda, mikrosporların mikrospor tetratından salınmasında, polenlerin pistilde tanınmasında görev alan sinyal moleküllerinin salgılanmasında rol oynar. Tapetum gelişiminde görülen anormallikler steril polenlere sebep olmaktadır. Sitolojik çalışmalar tapetum tabakasındaki hücrelerin programlı hücre ölümüne uğradıklarını göstermektedir. Çalışmamızın amaçlarından biri, *Brassica oleracea*'nin anter gelişiminin incelenmesi ve *Brassicaceae* familyasının embriyolojik bulgularına katkı sağlamaktır. Bunun yanında doğal gelişim sürecinde anter çeper tabakalarında gerçekleşen programlı hücre ölümünün mikroskopik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesidir. Mikroskopik çalışmalar için toplanan çiçek tomurcukları fikse edildi ve örnekler gelişim evrelerine göre ayrılarak parafine gömüldü. Örneklerden alınan kesitler ışık mikroskobu için Hematoksilen, Periyodik asit-Schiff, Coomassie parlak mavisi, Sudan siyahı B ve Alizarin kırmızısı ile boyandı. Anter çeper tabakalarında programlı hücre ölümünün belirlenmesi için kesitler DAPI ve TUNEL ile işaretlenip floresan mikroskobunun altından incelendi. Moleküler ve biyokimyasal yöntemler için taze anterlerdeki polen taneleri anter çeper hücrelerinden uzaklaştırıldı. Kaspaz-1 benzeri aktiviteleri belirlemek amacıyla kaspaz-1 kiti kullanıldı. Programlı hücre ölümünün belirteçlerinden biri olan DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için anter çeper hücrelerinden DNA izolasyonu yapıldı ve jel elektroforezinde yürütüldü. Elde ettiğimiz sonuçlara göre anter çeper hücrelerinde genç polen evresinde başlayıp vakuollü polen evresinde devam eden nukleus bozuklukları ve TUNEL pozitif sonuçlar gözlemlendi. Bunun yanında aynı evrelerde kaspaz benzeri aktivitelerin yüksek olduğu ve DNA fragmentasyonunun belirgin olduğu tespit edildi. Olgun polen evresinde ise geriye sadece epidermis ve endotesyumun kaldığı belirlendi.

Anahtar sözcükler: anter, kaspaz-1 benzeri aktivite, programlı hücre ölümü, tapetum,

Temmuz, 2020

Hasan Can KÜÇÜKALİ

ABSTRACT

Anther Development and Programmed Cell Death in *Brassica Oleracea* L. (Cabbage)

The regular development of anther wall layers plays an important role in the healthy progression of reproductive development in plants. There is also a tight connection between nutritive tissue tapetum, one of the anther layers, and pollen yield. Tapetum cells show high metabolic activity during pollen development. These cells play a role in the nutrition of pollen, the formation of the exine wall, the release of microspores from the microspore tetrate, and the secretion of signal molecules involved in the recognition of the pollen in the pistil. Abnormalities in the development of tapetum cause sterile pollen formation. Cytological studies show that cells in the tapetum layer undergo programmed cell death. One of the aims of our study is to investigate the anther development of *Brassica oleracea* and to contribute to the embryological findings of Brassicaceae family. In addition, it is the examination of programmed cell death that occurs in the anther wall layers during the natural development process using microscopic, biochemical and molecular methods. Flower buds collected for microscopic studies were fixed and samples were separated according to their developmental stages and embedded in paraffin. Sections from the samples were stained with hematoxylin, periodic acid-Schiff, Coomassie brilliant blue, Sudan black B and Alizarin red S for light microscopy. The sections were signed with DAPI and TUNEL, and examined under a fluorescent microscope to determine the programmed cell death in the anther wall layers. For molecular and biochemical methods, the pollen grains in fresh anthers were separated from the anther wall cells. Caspase-1 kit was used to determine caspase-1 like activities. DNA isolation was performed from anther wall cells to determine DNA fragmentation, which is one of the signals of programmed cell death, and genomic DNA were run in gel electrophoresis. According to the data we obtained, nucleus disorders and TUNEL positive results, which started in the young pollen stage and continued in the vacuolated pollen stage, were observed in other anther wall cells. In addition, it was found that caspase 1-like activities were higher and DNA fragmentation was evident in the same stages. In the mature pollen stage, only the epidermis and endothecium remained.

Key words: anther, caspase-1 like activities, programmed cell death, tapetum,

July, 2020

Hasan Can KÜÇÜKALİ

SEMBOLLER

μl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
nM	: Nanomolar
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
gr	: Gram
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
bç	: Baz çifti

KISALTMALAR

Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor 1 (Apoptotik proteaz aktifleřtirici faktör)
Ca⁺²	: Kalsiyum
CAD	: Caspase-activated Dnase (Kaspazla aktifleřtirilen DNAaz)
CBB	: Coomessie Brilliant Blue
CHAPS	: 3-[(3-Kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-propan sülfonat
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DISC	: Death-inducing signaling complex (Ölüm başlatıcı sinyal kompleksi)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Ditiotritol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FADD	: Fas-associated protein with death domain
HCl	: Hidroklorik asit
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
KOH	: Potasyum hidroksit
NaCl	: Sodyum klorür
PAS	: Periyodik Asit-Shiff reaktifi
PBS	: Fosfat tamponu
PHÖ	: Programlı hücre ölümü
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SBB	: Sudan Black B
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBE	: Tris / Borat / EDTA
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV	: Ultraviole
V	: Volt
VPE	: Vacuolar processing enzyme – Vakuoler işlem enzimleri
YVAD-AMC	: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp- 7-Amino-4-methylcoumarin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil.1.1.	<i>Brassica olerace</i> türüne ait gruplardan örnekler. Soldan sağa sırayla; Kara Lahana, Kailan, Karnabahar, Beyaz lahana, Brüksel lahanası, Kohlrabi, Brokoli	3
Şekil 1.2.	Hücrede otofajinin gerçekleşmesi	6
Şekil 2.1.	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> DC. subvar. <i>viridis</i> ve sistematığı	9
Şekil 2.2.	Kaspaz-1 testi için standart eğri	16
Şekil 3.1.	<i>B. oleracea</i> anterlerinin parafin kesitlerinde hematoksilin boyası ile genel yapının gösterilmesi.	20
Şekil 3.2.	Coomassie parlak mavisi boyaması	21
Şekil 3.3.	Periyodik Asit-Shiff reaktifi boyaması	22
Şekil 3.4.	Sudan siyahı B boyaması	23
Şekil 3.5.	Alizarin kırmızısı S boyaması	24
Şekil 3.6.	DAPI boyaması	27
Şekil 3.7.	TUNEL yöntemi	28
Şekil 3.8.	<i>B. oleracea</i> tapetum hücrelerindeki kaspaz-1 benzeri aktiviteler	30
Şekil 3.9.	DNA fragmentasyonlarının agaroz jel elektroforezinde gösterimi.	31

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.	Parafine Gömme işlemi	10
Tablo 2.2.	Deparafinizasyon işlemi	11
Tablo 2.3.	Hematoksilen yöntemi	11
Tablo 2.4.	Coomassie parlak mavisi yöntemi	12
Tablo 2.5.	Periyodik asit-Shiff Reaktif yöntemi	12
Tablo 2.6.	Sudan siyahı B yöntemi	13
Tablo 2.7.	Alizarin kırmızısı	13
Tablo 2.8.	DAPI boyaması	14
Tablo 2.9.	TUNEL yöntemi	15
Tablo 2.10.	Kaspaz-1 testi için çözeltilerin hazırlanması	16
Tablo 2.11.	Genomik DNA ekstraksiyonu için çözeltilerin hazırlanması...	17
Tablo 2.12	Agaroz Jel hazırlanması	18

1. GİRİŞ

Programlı hücre ölümü (PHÖ) genetik olarak düzenlemiş, bazı özel hücrelerin, dokuların veya tüm organın ölmesiyle sonuçlanan ve canlının tüm hayat evreleri boyunca gerçekleşebilen fizyolojik bir süreçtir. Bitkilerde çeşitli dokuların ve organların PHÖ'ne uğradığı bilinmektedir. Yaprak senesensinde, dişi ve erkek üreme organlarının gelişiminde, tohum çimlenmesinde sırasında endospermanın embriyo tarafından kullanılmasında, kök şapkası hücrelerinde, ksilem ve havalandırma parankimasının oluşumunda PHÖ gözlemlenmektedir (Yanık ve ark., 2018).

Erkek üreme organı olan anterin gelişimi sırasında anter çeper tabakalarından olan endotesyum, ara tabaka, epidermis ve tapetum dokularında PHÖ gerçekleştiği bilinmektedir. Bu tabakalardan biri olan tapetum ile polen verimi arasında sıkı bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Doğru zamanda hücre ölümüne uğramayan tapetum hücrelerinin polen sterilitesine sebep olduğu bilinmektedir (Gomez ve ark., 2015).

Tapetum dokusu polen gelişiminde, beslenmesinde, kallaz enzimi üreterek polenlerin mikrospor tetratından salınmasından, ekzin çeper oluşumundan, polenkit ve triphin ve çimlenme için gerekli proteinlerin sentezinden tapetum dokusu sorumludur. Gelişim sırasında tapetumda tabakasında bir bozukluk steril polenlerin oluşumuna sebep olur.

Çalışmamızda *Brassicaceae* familyasına ait *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis* (Kara lahana) türüne ait anterlerin gelişimi ve gelişimleri sırasında meydana gelen PHÖ'nün gerçekleştiği evre ve karakteristiği araştırılacaktır. Gelişim evreleri profaz-I, tetrat, genç polen, vakuollü polen ve olgun polen olmak üzere 5 evreye ayrılarak incelenecektir. Bu evrelere ait parafin kesitler alınıp histokimyasal boyalarla boyanacak ve ışık mikroskobu kullanılarak hücrelerin polisakkarit, protein, lipit, Ca²⁺ içerikleri incelenecektir. Nukleus boyası olan DAPI ve serbest 3' OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayalı TUNEL yöntemi kullanılarak gelişim sırasındaki nukleus ve DNA değişimleri floresans mikroskobu kullanılarak gözlemlenecektir.

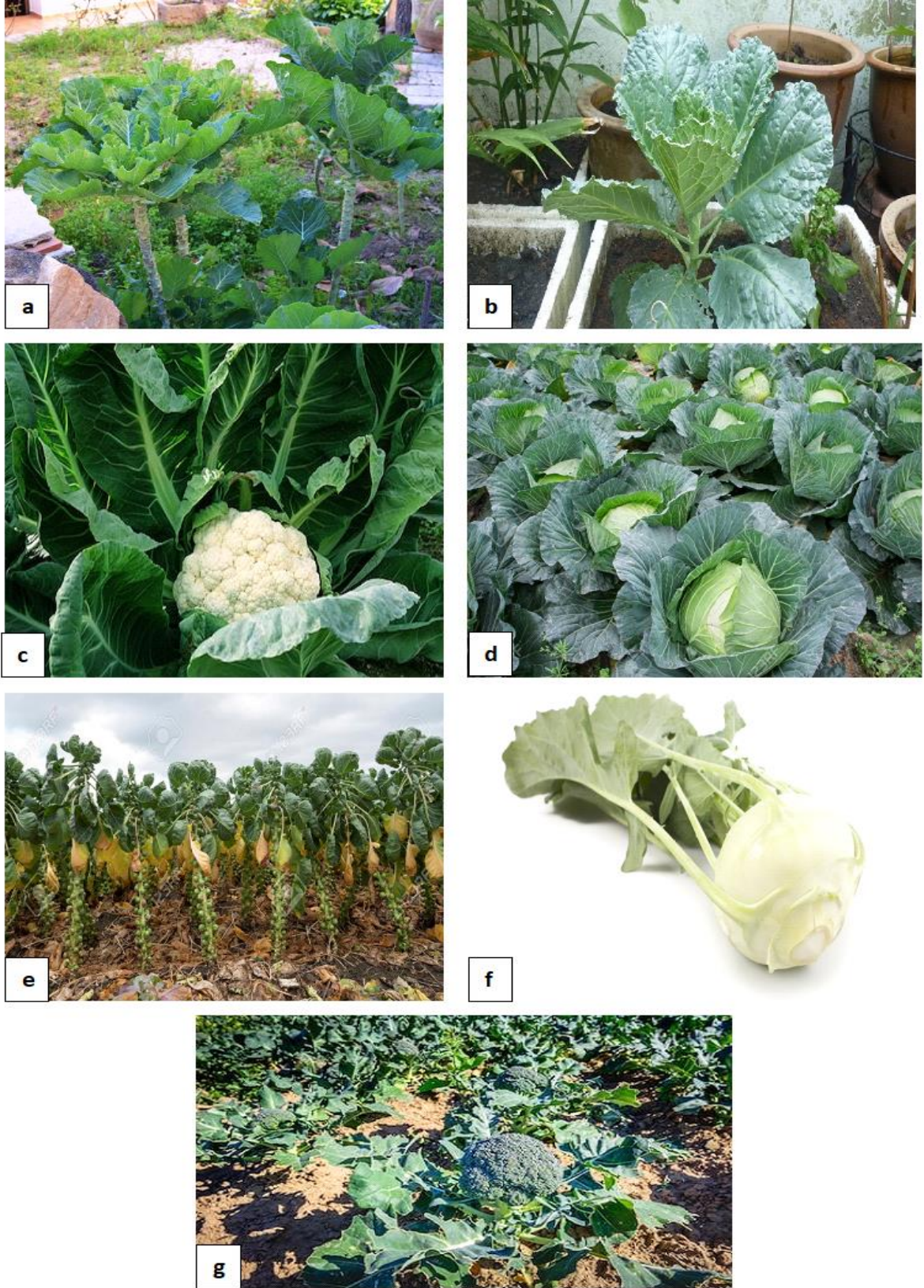
Anter çeper tabakalarındaki biyokimyasal ve moleküler çalışmalar için öncelikle anter çeper tabakaları polen tanelerinden arındırılacaktır. Daha sonra bitkilerdeki PHÖ'nde rol oynayan kaspaz-I benzeri enzimlerin aktiviteleri incelenmek üzere kaspaz-I kiti kullanılacaktır. DNA fragmentasyonlarını belirlemek için DNA izolasyonu yapılacak ve jel elektroforezi yapılarak DNA kırıkları görüntülenecektir.

Çalışmamızın amacı; *Brassica oleracea* anterlerinin gelişimi ve gelişim sırasında görülen hücrel değişiklikler ışık ve floresan boyalar kullanılarak incelenerek *Brassicaceae* familyasının embriyolojik bulgularına katkı sağlanacaktır. Bunun yanında anter gelişimini sırasında görülen programlı hücre ölümünü biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak incelenerek programlı hücre ölümü mekanizmalarının ve gerçekleştiği evrelerin aydınlatılmasında literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.1.Brassicaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Brassicaceae familyası tropikler ve Antarktika dışında dünyanın her bölgesinde yayılım gösteren, 400 cins ve 4000 türle temsil edilen, yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu, çalı ve nadiren sarmaşık formunda üyeler içeren bir familyadır. Genellikle yarı nemli bölgeleri seven bu familyanın üyelerinin çoğu soğuk, tuz ve ağır metal stresine karşı dirençlidirler. Brassicaceae familyası yiyecek, baharat ve bitkisel yağ üretimi için kullanılan ekonomik açıdan önemli birçok türü bünyesinde barındırır. Bu familyadaki bitkilerin tarımından Avrupa’da yaklaşık olarak yıllık 70 milyon ton ürün edilir (Schmidt and Bancroft, 2011). *Brassica napus* bitkisel yağ üretiminde en çok kullanılan üçüncü bitkidir (Thiyam ve ark., 2004). *Alyssum*, *Aurinia*, *Cheiranthus*, *Hesperis*, *Lobularia*, *Lunaria* cinsleri süs bitkisi olarak kullanılır. *Isatis tinctoria* türünden elde edilen mavi renk ise sentetik boyalar keşfedilene kadar boya sanayisinden kullanılmıştır. İçerdikleri fitokimyasalların antikarsinogenik ve kardiyovasküler sistem hastalıklarına karşı korucuyu oldukları belirtilmiştir (Jahangir ve ark., 2009)

Çalışmamızda kullandığımız kara lahananın (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis*) yaprakları alternat dizilimli, çiçekleri rasemos, aktinomorf simetrikli, 4 sepalli 4 petalli 6 stamenli, meyve tipi silikadır. Drenajı iyi, nemli pH’ı 6.0-6.8 ve organik madde açısından zengin topraklarda yetişmektedir. Anavatanının Baltık ülkeleri olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesi’nde ekimi yapılmaktadır ve yıllık 100.000 ton ürün elde edilmektedir. *Brassica oleracea* türü, kültüre alınmış 7 gruba sahiptir. Bu gruplar Acephala, Alboglabra, Botrytis, Capitata, Gemmifera, Gongylodes, Italica’dır.



Şekil.1.1. *Brassica oleracea* türüne ait gruplardan örnekler. **a.** Kara Lahana, **b.** Kailan, **c.** Karnabahar, **d.** Beyaz lahana, **e.** Brüksel lahanası, **f.** Kohlrabi, **g.** Brokoli

1.2. Anter Gelişimi ve Anter Çeper Tabakaları

Epidermis, anter tabakalarının en dışında bulunan ve anteri tamamen saran tabakadır. Başlıca görevi içteki dokuları korumaktır. Tek sıralı ve yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmiştir. Anter gelişimi sırasında anterin büyümesine ayak uydurabilmek için çepere dik bölünmeler geçirirler. Bazı türlerde anter epidermisinde trikomlar bulunduğu bilinmektedir.

Endotesyumun başlıca görevi anterin açılması olan anter çeper tabakasıdır. Polenler doğaya salınacağı zaman en olgun halindedir. Epidermis tabakasının altında yer alır. Endotesyum hücreleri boyuna uzama gösteren hücrelerdir. Bu hücrelerde, alt yüzeyde başlayıp üst yüzeyde son bulan fibrilli kalınlaşmalar görülür. Bu kalınlaşmalar yapısal olarak yüksek oranda selüloz ve az miktarda ligninden oluşur. Bu kalınlaşmaların farklılığı sayesinde anterler stomium adı verilen noktalardan açılır ve polenler dışarı salınır. Polenlerin olgunlaştığında gelişimini tamamlamış endotesyum hücreleri terlemeyle su kaybeder. Hacmi küçülen hücrelerin ince olan üst çeperleri içeriye doğru çöker ve endotesyum karakteristik U şeklini alır. Bu çökme sonucunda anter yüzeyinde meydana gelen gerilme kuvveti ile anterler stomium bölgesinden açılır.

Ara tabaka, endotesyum ve tapetum tabakalarının arasında bulunan, yassı hücrelerden oluşan bir tabakadır. Gelişimin erken evrelerinde programlı hücre ölümüne uğrayarak körelir. Çoğu türde ara tabaka hücreleri besin ve nişasta bakımından zengindir.

Tapetum, anterin en iç katmanında bulunan ve polen gelişiminde kritik rol oynayan tabakadır. Bol sitoplazmalı, metabolik açıdan oldukça aktif ve belirgin nukleuslu hücrelerden oluşur. Tapetum tabakası polen gelişimi sırasında birçok kritik rolü üstlenir. Polen beslenmesi, kallaz enzimi salgılayarak mikrosporların mikrospor tetradından salınması, ekzin çeper oluşumu, polenlerin dış çeperinde bulunan ve pistilde tanınip çimlenebilmeleri için gerekli olan polenkit ve tripin gibi sinyal moleküllerinin salgılanması gibi polen gelişimi ve çimlenmesinden sorumludur (Ünal, 2006).

Gelişim sırasında tapetum tabakasındaki bozuklukların polen sterilitesine sebep olduğu bilinmektedir (Mariani ve ark., 1990). Gelişimin erken evrelerinde oldukça aktif olan tapetum hücreleri mikrosporogenezin sonlarına doğru körelerek ölmeye başlar. Papini ve arkadaşları (1999) bu körelmenin programlı hücre ölümü ile gerçekleştiği fikrini ortaya atmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde tapetum

dokusundaki ölümün programlı ve genetik olarak düzenlenmiş olduğu ortaya çıkarılmıştır (Varnier ve ark., 2005; Vardar ve Ünal, 2012).

1.3. Programlı Hücre Ölümü

Programlı hücre ölümü (PHÖ), çok hücreli canlılardan, tek hücreli prokaryotlara kadar tüm canlılarda gerçekleşen fizyolojik bir süreçtir. Gelişim, metamorfoz, homeostasinin sağlanması ve istenmeyen dokuların organizmadan uzaklaştırılması gibi kritik süreçlerin kullanılan bir mekanizmadır (Joza, 2001; Locato, 2018). Hücre ölümleri yapısal olarak 3 başlığa ayrılmaktadır; Apoptoz, Otofaji ve Nekroz.

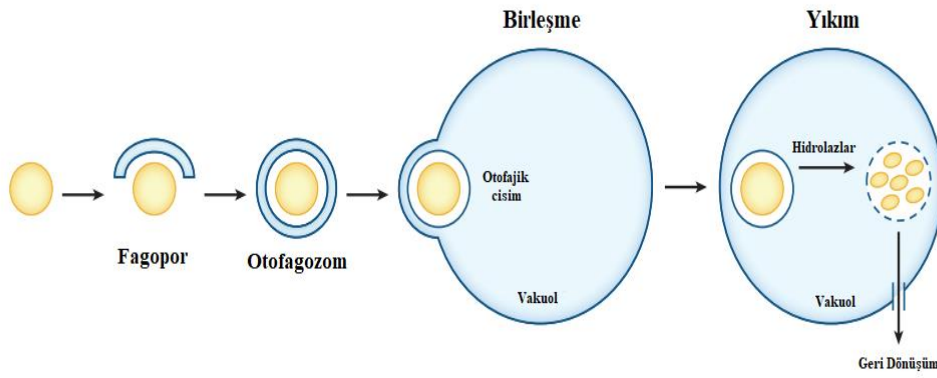
1.3.1. Nekroz

Nekroz, hücrede şişme, plazma membranının bütünlüğünün hızla bozulması ve hücresel içeriğin kontrolsüzce diğer hücrelerin etrafına yayılması ile karakterize edilen ve bulunduğu dokuda yangıya neden olan patolojik bir ölüm şeklidir. Apoptozdan farklı olarak membran bütünlüğünün ve protoplastın kaybı çok hızlı gerçekleşir. Ayrıca oligonükleozomal fragmentasyonlar ve apoptotik birimler nekrozda görülmemektedir (Proskuryakov ve ark., 2002). Nekroz sırasında mitokondri zarının geçirgenliğinin artmasıyla beraber reaktif oksijen türlerinin (ROT) miktarı artar. Hücre solunumunun gerçekleştiği mitokondride fonksiyonel bozuklular görülür. Oksijen tüketiminin azalması yani solunumun düşmesi ile ATP sentezi durur (Minia ve ark., 2013). Nekrozun uzun bir süre boyunca kontrolsüz gerçekleşen patolojik bir olay olduğu düşünülmektedir. Ancak son yıllardaki çalışmalar nekrozun belirli yollarla kontrol edilen bir olay olduğunu göstermektedir. Mitokondri membranından sitoplazmaya salınan Ca^{+2} iyonunun aktive ettiği kalpain ailesine bağlı proteazların nekrozda rol oynadığı düşünülmektedir (Van Doorn ve ark., 2011). Nekrozda, otofajiden ve apoptozdan farklı olarak hücresel içerik tamamen sindirilmediği için dokularda inflamasyona sebep olur. (McCall, 2010)

1.3.2. Otofaji

Otofaji, sitoplazmik içeriklerin ve hasarlı organellerin lizozom aktivitesi ile yıkılması temeline dayanan fizyolojik sürece verilen addır (Rubinsztein ve ark., 2011). Otofajinin bilinen 3 tipi vardır; mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji ve makrootofaji.

Mikrotofaji tonoplast invajinasyonu ile meydana gelen veziküllerle karakterize edilir. Şaperon aracılı otofaji biyokimyasal yollarla proteinlerin lizozoma getirildiği biyokimyasal bir süreçtir. Makrotofaji ise otofagozomlar ile karakterize edilen bir süreçtir. Otofagozomlar çift zarlı veziküler yapıdadırlar. Granülsüz endoplazmik retikulumdan temellendikleri düşünülmektedir. Makrotofajide öncelikle otofagozomlar oluşur. Bu yapılar lizozom ile birleşerek otofagolizozom adı verilen yapıyı oluşturur ve alakalı olan hücresel içerikleri yıkarlar (Boya ve ark., 2005). Otofaji kaspazlara gerek duymaması ve otofajiye spesifik hücre içi membransı yapılar içermesi bakımından apoptozdan farklılık gösterir.



Şekil 1.2. Hücrede otofajinin gerçekleşmesi

1.3.3. Apoptoz

Apoptoz PHÖ'nün en karakterize halidir. Apoptozda hücresel büzülme, kromatin yoğunlaşması ve kalıtsal materyalin yıkımı gözlemlenir. Buna ek olarak apoptotik cisimler adını alan küçük zarla çevrili birimlere rastlanır. Apoptoz moleküler düzeyde araştırıldığında proteaz (kaspaz) aktivitesi, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımı ve DNA fragmentasyonları görülür.

Apoptozu başlatan sinyaller iç ve dış yolak olmak üzere ikiye ayrılır. (Straser, 2000). Bu yollarda kaspaz (sistein proteaz) adı verilen ve substratlarındaki aspartik asitten sonraki peptit bağlarını kıran enzimler yer alır. Kaspazlar; inflamatuvar kaspazlar (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14), efektör kaspazlar (3, 6, 7) ve başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9, 10) olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

Hücre içi yolak, mitokondri zarında bulunan Bcl-2 protein ailesine ait anti-apoptotik ve pro-apoptotik birimlerin arasındaki denge durumunun, apoptoz

indükleyiciler tarafından bozulmasıyla başlar. Denge durumu bozulduktan sonra mitokondrinin membran geçirgenliği artar ve sitokrom-c sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c sitoplazmada Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) ile birleşerek apoptozomları oluşturur. Apoptozomlar, prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Kaspaz-9 tetramer formuna geçerek efektör kaspaz-3 ve kaspaz-6'yı aktiveleştirir. Deoksiribonükleaz (CAD), kendi inhibitörü olan ICAD ile kompleks halinde bulunur. Kaspaz-3 bu kompleksi ayırarak CAD'ı serbest bırakır. Devam eden süreçte DNA fragmentasyonu gerçekleşmeye başlar (Zimmermann ve ark., 2001; Van Hautegeem ve ark., 2015; Lee ve ark., 2017).

Hücre dışı yolak Fas reseptörlerine bağlanan FasL ligandıyla başlar. Fas ve FasL birbirlerine bağlandıklarından DISC (Death-inducing signaling complex) kompleksini oluşturur. Adaptör bir molekül olan FADD'yi (Fas-associated protein with death domain) içeren bu protein kompleksi prokaspaz-8'i kaspaz-8'e dönüştürür. Aktifleşen kaspaz-8 diğer prokaspazları aktiveleştirerek apoptozu başlatır (Kischkel ve ark., 1995; Lee ve ark., 2017).

1.3.4. Bitkilerde Programlı Hücre Ölümü

Bitkilerde PHÖ sırasında görülen morfolojik, moleküler ve biyokimyasal değişimler her ne kadar hayvanlardaki apoptoz ile benzerlik gösterse de bitkilerdeki PHÖ mekanizmaları hala tam olarak açıklanamamıştır (Danon ve ark., 2004; van Doorn ve ark., 2011). Bitki hücrelerinin komşu hücreler tarafından sindirilmesini engelleyen hücre duvarına sahip olmalarından dolayı PHÖ için kendilerine has yollar geliştirdikleri düşünülmektedir. Bitkilerdeki PHÖ iki altında incelenir: Vakuoler hücre ölümü ve Nekrotik hücre ölümü (Yanıkve ark., 2018).

Vakuoler hücre ölümünde iki farklı vakuol tipi görülür. Bunlardan ilki litik vakuoldür. Litik vakuoller içlerinde proteinazlar, nukleazlar vb. hidrolitik enzimleri barındıran ve hücrede artık kullanılmayan, görevini tamamlamış hücresel birimlerin parçalanmasından sorumludur. İkincisi ise çimlenme ve savunma gibi olaylarda kullanılacak depo proteinlerin saklandığı depo protein vakuolleridir (Hatsugai ve ark., 2004).

Bitkilerde vakuoler hücre ölümü sırasında litik vakuollerin hacmi artar. Tonoplastın parçalanmasıyla hidrolitik enzimler sitoplazmaya salınır ve hücre ölümü

başlar. Bu olay sırasında nukleus parçalanması ve DNA fragmentasyonu gözlenir. Bununla birlikte hücredeki organeller özellikle mitokondri aktivitelerine devam ederler.

Nekrotik hücre ölümünde vakuoler hücre ölümünden farklı olarak hücrede ve organellerde şişme gözükür. Mitokondrinin yapısı bozulduğu için mitokondri görevini yapamaz hale gelir ve hücredeki ATP seviyesi düşer. Bununla beraber reaktif oksijen türleri (ROT) artar (van Doorn, 2011).

Hayvanlardaki PHÖ, 'kaspaz' olarak adlandırılan sistein proteinaz ailesi enzimleri tarafından kontrol edilir. Bitkisel organizmalarda kaspazları direkt olarak kodlayan gen bölgeleri yoktur. Ancak bitkilerde PHÖ sırasında kaspaz benzeri aktivitelerde bulunan enzimlerin olduğu gözlemlenmiştir (Hatsuragi ve ark., 2018) Yapılan çalışmalarda bitkilerdeki kaspaz benzeri enzimlerin insanlardaki kaspaz-1 substratı olan YVAD-AMC ve kaspaz-3 substratı olan DEVD-AMC substratlarına etki ettiği tespit edilmiştir (Woltering ve ark., 2002; He ve ark., 2003; Aytürk ve Vardar, 2015).

Bitkilerde bulunan ve vakuoler işlem enzimleri (VPE-vacuolar processing enzyme) olarak adlandırılan sistein proteinaz ailesine bağlı enzimlerin PHÖ'nde görev yaptığı belirlenmiştir (Hatsugai ve ark., 2004). VPE'ler YVAD substratını kullanma ve 3 boyutlu yapıları bakımından hayvanlardaki kaspaz-1'e benzerler. VPE'ler hücrede ER'de öncül protein olarak sentezlenirler. Olgun formlarına asparjin rezidüllerinin C-terminal bölgelerindeki proteolitik kesim ile ulaşırlar. VPE'ler substratlarını asparjin ve aspartik asitten sonraki aminoasitten keserler.

Bitkilerde bulunan başka bir proteaz ailesi de metakaspazlardır. Metakaspazlar yapısal açıdan hayvansal kaspazlara benzer. VPE'lerden farklı olarak substratlarını lizin ve arjininden sonraki aminoasitten keserler. Bu ailenin üyeleri küçük (p10) ve büyük (p20) olmak üzere iki alt birimden oluşur. Bu enzim ailesinin PHÖ'ndeki rollerinin başlatıcı mı yoksa yürütücü mü olduğu bilinmemektedir (Kabbage ve ark., 2017).

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullandığımız karalahana bitkisinin sistematığı Şekil 2.1’de gösterildiği gibidir.



Alem: Plantae

Şube: Angiospermae

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Capparales

Familya: Brassicaceae

Cins: *Brassica*

Tür: *Brassica oleracea* L.

Varyete: *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.

Altvaryete: *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.

subvar. *viridis*

Şekil 2.1. *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis* ve sistematığı

2.1.1. Bitki Materyalinin Toplanması ve Fiksasyonu

Bitki materyalimiz olan *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis*'in çiçekleri, 2019 yılının Nisan ayında, İstanbul'un Sarıyer ilçesinin Rumelifeneri köyünden (41°14'01.9"N 29°06'07.9"E) toplandı. Morfolojik ve Embriyolojik analizler için kullandığımız çiçekler asetik asit:etanol (1:3) fiksatifliyle fikse edilerek +4°C'de muhafaza edildi. Biyokimyasal ve moleküler yöntemler için kullandığımız çiçekler alüminyum folyolara sarılarak -80°C'de muhafaza edildi. Fikse edilen anterler aseto-orsein boyası ile ezilerek mayoz bölünme evreleri belirlendi ve farklı fikse şişelerine alındı.

2.2. Araştırma Yöntemleri

2.2.1. Morfolojik ve Embriyolojik Yöntemler

2.2.1.1. Parafine Gömme ve Kesit Alma

Tarlardan toplanan *B. oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis* tomurcukları Tablo 2.1.'de gösterildiği gibi fikse edilip parafine gömüldü.

Tablo 2.1. Parafine gömme işlemi.

Yöntem	Çözelti	Süre	Ortam Sıcaklığı
Fiksasyon	Asetik Asit: %100 etanol (1:3)	24 Saat	Oda sıcaklığı
Fazla Fiksatifin Alınması	%96 Etanol	2dk x2	
	%70 Etanol	2dk x2	
Saklama	%70 Etanol		+4°C'de buzdolabında
Dehidrasyon	%80 Etanol	30 dk	
	%96 Etanol	30 dk	
	%100 Etanol	30 dk x2	
Şeffaflaştırma	%100 Etanol:Ksilol (2:1)	30 dk	
	%100 Etanol:Ksilol (1:1)	30 dk	
	%100 Etanol:Ksilol (1:2)	30 dk	
	Ksilol	30 dk x3	
Parafin infiltrasyonu	Ksilol:Parafin	24 saat	56°C'de etüvde
	Parafin	24 saat x2	56°C'de etüvde
Parafine gömme			Oda sıcaklığında

Parafin kalıplara gömülen tomurcuklar Leica RM 2125 RT marka mikrotom ile 7-8 µm kalınlığında kesilerek albümin mayer sürülmüş lamlara yerleştirildi. Lamlar bir gece boyunca 50°C'lik ısıtma tablasında bekletildi. Kesitler Tablo 2.1'de gösterilen

yöntem kullanılarak parafinden kurtarıldı ve boyandı. Kesitler boyandıktan sonra Tablo 2.2.'de gösterilen sıra kullanılarak tekrar ksilol evresine getirilmiş ve birkaç damla entellen damlatılarak kapatılmıştır. Entellan kuruduktan sonra tüm kesitler Olympus marka mikroskopta KAMERAM ışık ve floresan kamera yardımıyla KAMERAM programı ile fotoğraflandı.

Tablo 2.2. Deparafinizasyon işlemi.

Yöntem	Çözelti	Süre
Deparafinizasyon	Ksilol	10 dk x2
	Ksilol: %100 Etanol (2:1)	10 dk
	Ksilol: %100 Etanol (1:1)	10 dk
	Ksilol: %100 Etanol (1:2)	10 dk
	%100 Etanol	10 dk x2
	%96 Etanol	10 dk
	%70 Etanol	10 dk
	%50 Etanol	10 dk
	%35 Etanol	10 dk
	Distile Su	10 dk

2.2.1.2. Hematoksilen

Anter tabakalarının genel yapısını öğrenmek amacıyla kesitler Tablo 2.3'te gösterildiği gibi Hematoksilen (Gill ve ark., 1974) ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra tabakaların genel yapısı gri-siyah renkte gözlemlenmiştir.

Tablo 2.3. Hematoksilen yöntemi (Gill ve ark., 1974).

Yöntem	Çözelti	Süre
Hematoksilen	Hematoksilen	30 dk karanlıkta
	Akan su	5 dk
	Ters serilerden geçirerek entellan ile kapatma	

Hematoksilen hazırlanışı: 2 gr hematoksilen, 0.2 gr sodyum iodat ve 17.6 gr alüminyum sülfat 750 ml distile su için çözüldü. Karışıma 250 ml gliserol ve 20 ml glasiyal asetik asit eklendi. Karanlıkta 1 ay bekletildi.

2.2.1.3. Coomassie Parlak Mavisi

Anter çeper tabakalarındaki protein varlığını belirlemek amacıyla distile suya kadar getirilen kesitler Tablo 2.4'te gösterildiği gibi Coomassie parlak mavisi (Heslop-Harrison ve ark., 1973) ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra proteinler mavilacivert renkte gözlemlenmiştir.

Tablo 2.4. Coomassie Parlak Mavisi (Heslop-Harrison ve ark., 1973).

Yöntem	Çözelti	Süre
Coomassie Parlak Mavisi	%2 Coomassie Parlak Mavisi	10 dk 60°C'de etüvde
	Akan su	5 dk
	Ters serilerden geçirerek entellan ile kapatma	

%2 Coomassie parlak mavisi hazırlanışı: 0.2 gr coomassie parlak mavisi, metanol:distile su:asetik asit (5:4:1) çözeltisi içinde çözüldü ve süzüldü.

2.2.1.4. Periyodik Asit-Shiff Reaktifi

Anter tabakalarındaki suda çözünmeyen polisakkaritlerin tespiti için kesitler Tablo 2.5'te gösterildiği üzere Periyodik Asit-Shiff Reaktifi (Feder ve O'Brien, 1968) ile boyandı. Boyama işleminden sonra suda çözünmeyen polisakkaritler pembe renkte gözlemlendi.

Tablo 2.5. Periyodik asit-Shiff Reaktifi yöntemi (Feder ve O'Brien, 1968).

Yöntem	Çözelti	Süre
Periyodik Asit-Shiff Reaktifi	%1 Periyodik Asit	20 dk
	Akan su	10 dk
	Shiff Reaktifi	30 dk karanlıkta
	%0.5 Na ₂ S ₂ O ₅	5 dk x3
	Akan su	5 dk
	Ters serilerden geçirerek entellan ile kapatma	

%1 periyodik asit hazırlanışı: 1 gr periyodik asit %90 etanol içinde çözdürüldü.

2.2.1.5. Sudan Siyahı B

Anter tabakalarındaki lipit varlığını tespit etmek için kesitler Tablo 2.6'da gösterildiği gibi Sudan Black B (Pearse, 1961) ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra lipitler gri-siyah renkte gözlemlenmiştir.

Tablo 2.6. Sudan Siyahı B yöntemi (Pearse, 1961).

Yöntem	Çözelti	Süre
Sudan Siyahı B	%1 Sudan Siyahı B	60 dk 60°C'de etüv
	%70 Etanol	Çalkalama x2
	Ters serilerden geçirerek entellan ile kapatma	

%1 Sudan siyahı hazırlanışı: 1 gr sudan siyahı %70 etanol içinde çözdürüldü ve süzüldü.

2.2.1.6. Alizarin Kırmızısı

Hücre içeriğindeki Ca^{+2} iyonunun belirlenmesi için kesitler Tablo 2.7'de gösterildiği gibi Alizarin kırmızısı ile boyandı (McGee-Russel, 1958). Boyama işleminden sonra kesitler entellan damlatılara kapatıldı. Alizarin Kırmızısı S ile boyanan kesitlerdeki Ca^{+2} iyonu kırmızı/turuncu renkte gözlemlendi.

Tablo 2.7. Alizarin Kırmızısı yöntemi (McGee-Russel, 1958).

Yöntem	Çözelti	Süre
Alizarin Kırmızısı	%2 Alizarin Kırmızısı	5 dk
	Aseton	1 dk
	Aseton:Ksilol (1:1)	1 dk
	Ksilol	5 dk
	Entellan ile kapama	

%2 Alizarin kırmızısı hazırlanışı: 2 gr Alizarin kırmızısı distile suda çözülür ve %10luk amonyum hidroksit ile pH'ı 4.2'ye ayarlanır.

2.2.1.7. DAPI

Anter çeper tabakalarındaki hücre ölümünün tespiti için kesitler floresans boya DAPI (Schweizer, 1976) ile boyandı. Kesitler görüntülemeye önce 0.05 M pH 7.4 fosfat

taponuyla yıkandı. Boyama işleminden sonra hücre ölümü gösteren hücrelerin nukleuslarında mavi ışıklar gözlemlendi.

Tablo 2.8. DAPI boyaması (Schweizer, 1976).

Yöntem	Çözelti	Süre
DAPI	1µg/1ml DAPI	30 dk karanlık ortamda
	0.05 M pH 7.4 Fosfat tamponu	Çalkalama
	Lamel ile kapama	365 nm dalga boyunda inceleme

1µg/1ml DAPI hazırlanışı: 1 mg/1ml olan stok çözelti, pH'ı 7.4 olan 0.05M fosfat tamponu kullanılarak sulandırılarak hazırlandı.

2.2.1.8. TUNEL

Bir *in situ* uç işaretleme yöntemi olan TUNEL, hücre ölümü sırasında kırılan DNA'nın serbest 3'OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayanır. Bu yöntem için CHEMICON marka "ApopTag® Plus Fluorescein *In situ* Apoptosis Detection kit" kullanıldı. Tablo 2.9'da gösterildiği gibi işaretleme sonucunda 3'OH içeren kırıklar yeşil renkte gözlemlendi.

Tablo 2.9. TUNEL Yöntemi

Yöntem	Çözelti	Süre
Deparafinizasyon	Ksilol	5 dk x3
	% 100 Etanol	5 dk x2
	% 96 Etanol	3 dk
	% 70 Etanol	3 dk
	0.05 M pH 7.4 Fosfat tamponu	5 dk
Proteinlerin sindirilmesi	20 µg/ml Proteinaz K	15 dk
	PBS	2 dk x2
	75 µg/5cm ² dengeleme tamponu	30 dk
Digoksinin işaretli dUTP bağlama	55 µg/5cm ² TdT enzimi	60 dk 37°C'de etüvde

	Durdurma – Yıkama tamponu	10 dk
	0.05 M pH 7.4 Fosfat tamponu	1 dk x3
	65 µg/5cm ² antidiğoksigenin konjugatı	30 dk karanlıkta
	0.05 M pH 7.4 Fosfat tamponu	2 dk x4
	Lamel ile kapama	490 nm dalga boyunda inceleme

2.2.2. Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemler

Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerin analizi için kullanılacak anterlerin anter çeper tabakaları ve sporogen doku/polen tanelerinden ayrılması Aquali et al. (2001)'e göre gerçekleştirildi. -80°C'de saklanan tomurcuklar buz üzerinde gelişim evrelerine göre ayrıldı. Stereomikroskop altında, enjektör iğnesi ile anterler çıkartıldı ve 4 parçaya ayrıldı. Parçalanmış anterler 0.1 gr olacak şekilde 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 5 dk boyunca vortekslendi. Tüplerdeki homojenat, por genişliği 150 µm olan filtreden geçirildi. Filtrenin üzerinde kalan parçalar 2 dakika boyunca distile su ile yıkanarak polenlerden arındırıldı. Anter çeper tabakalarını içeren homojenat biyokimyasal ve moleküler analizler için kullanıldı.

2.2.2.1. Kaspaz-1 Benzeri Enzimlerin Aktivasyonlarının Belirlenmesi

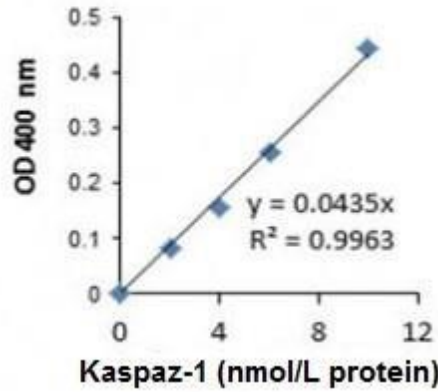
Kaspaz-1 benzeri enzim aktivitesinin belirlenmesi için Kaspaz-1/ICE Kolorimetrik Proteaz Analiz Kiti (ENZO) kullanıldı. Bu kitin çalışma prensibi, içerisinde bulundurduğu chromophore *p*-nitroanilide (*p*NA) ile işaretlenmiş substrat olan YVAD'ın Kaspaz-1 enzimi ile parçalanması sonucu serbest kalan *p*NA bölgesinin miktarının spektrofotometrik yöntemlerle tespitine dayanır.

Bu yöntem için 0,1 gr anter dokusu santrifüj tüplerine koyuldu. Üstlerine 1 ml ekstraksiyon tamponu eklendi ve homojenizatörde homojenize edildi. 14.000 rpm'de 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantları alındı. Süpernatanttaki protein miktarı nanodrop kullanılarak tespit edildi. Tüplerdeki protein miktarının eşitlenmesi için gerekli olan sulandırma yapıldı. Tablo 2.9'da gösterildiği gibi mikropilaya kuyucuklarına 50'şer µl örnek koyulduktan sonra üstlerine 50'şer µl DTT-2X reaksiyon tamponu ve 5'er µl substrat YVAD eklendi. Kör olarak 50 µl distile su kullanıldı.

Cytation marka mikropılaka okuyucusunda 400 nm’de ölçüm yapıldı. Absorbans değerleri standart eğride (Şekil 2.2) yerine konularak Kaspaz-1 enziminin aktivitesi belirlendi.

Tablo 2.10. Kaspaz-1 testi için çözeltilerin hazırlanması

Çözelti	Çözelti İçeriği	Hazırlanışı
Ekstraksiyon Tamponu	50 mM HEPES-KOH (pH 7) %10 sükröz %0.1 CHAPS 5 mM DTT 1 mM EDTA	11,9 gr HEPES bir miktar su içinde çözüldükten sonra 10 N KOH ile pH’ı ayarlandı. Üzerine, 0,037 gr EDTA, 10 gr sükröz ve 0,1 gr CHAPS 0,077 gr DTT eklenerek 100 ml’ye tamamlandı ve +4°C buzdolabında saklandı.
DTT-2X reaksiyon tamponu	2X reaksiyon tamponu 10 mM DTT	1 ml 2X reaksiyon tamponunun üstüne 10 µl DTT eklendi ve +4°C buzdoladında saklandı.



Şekil 2.2 Kaspaz-1 testi için standart eğri

2.2.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Hameed ve ark. (2004) tarafından kullanılan yöntem kullanıldı. Anter çeper tabakalarını içeren homojenat 0,1 g olacak şekilde tartıldı ve 1,5 ml’lik santrifüj tüplerine alındı. Tablo 2.10’da belirtildiği gibi tüplere 600 µl ekstraksiyon tamponu eklenerek 65°C’lik ısıtma tablasında 10 dakika bekletildi. Her 3

dakikada bir yavaşça alt üst yapıldı. Isıtma tablasından alındıktan sonra tüplere yeni hazırlanmış 600 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendi ve birkaç kez alt üst edildi. Tüpler 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant, ucu kesilerek genişletilmiş pipetlerle alınıp yeni santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere, süpernatantın hacimsel olarak 2 katı kadar miktarda -20°C’de bekletilmiş etil alkol eklendi. DNA’nın tüpün içinde toplanması için tüpler 2-3 dakika boyunca yavaşça alt üst edildi. DNA gözle görülmeye başlandıktan sonra tüpler 10.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüjleme işleminden sonra süpernatant dikkatli bir biçimde döküldü. Dipte kalan DNA’nın kuruması için örnekler vakum konsantratörde 30 dakika bekletildi. Kurutma işleminden sonra tüplere 20 µl TE tamponu eklenerek sulandırma yapıldı. Örneklerin içindeki RNA kontaminasyonunu gidermek için 2 µl DNase-free ribonuclease A (50 µg/mL) eklenerek 25 dakika boyunca 37°C’deki ısıtma tablasında bekletildi. Tüplere hacimce 3 katı olacak şekilde yani 60 µl -20°C etil alkol eklendi ve 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpler DNA’nın toplanması için yavaşça alt üst edildi. DNA gözle görülmeye başlandıktan sonra alkol dikkatlice döküldü ve örnekler kuruması için vakum konsantratöre koyuldu. Örnekler kuruduktan sonra 40 µl TE tamponu eklenerek sulandırıldı ve -20°C bozdolabında saklandı.

Tablo 2.11. Genomik DNA ekstraksiyonu için çözlülerin hazırlanması

Çözelti	Çözelti İçeriği
Ekstraksiyon Tamponu	100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1.5 M NaCl 20 mM EDTA %1 Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) %0.2 2-Mercaptoetanol
TE tamponu	0.5 mM EDTA 10 mM Tris-HCl

2.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi için 1,5 gr toz agaroz, Tablo 2.12’de belirtildiği gibi 100 ml 0.5X TBE içine ekledi ve mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Çözelti, akan su altında yavaşça soğutulup oda sıcaklığına getirildikten sonra içine 2 µl Red Safe DNA boyası eklendi. İçinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek, tarakları yerleştirilmiş elektroz

kasedine döküldü ve polimerize olması beklendi. Jel tamamen soğuyup polimerize olduktan sonra taraklar çıkartıldı. Kaset, içinde 0.5X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 9 µl olacak şekilde sulandırıldı ve üzerlerine 3 µl bromofenol mavisini eklendi. Son hacmi 12 µl olan örnekler kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 100bp'lik DNA markırı yüklendi. Örnekler 100 Volt'ta 2 saat yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra jel, Genoplex UV görüntüleme sisteminde görüntülenip Genocapture yazılımıyla fotoğraflandı.

Tablo 2.12. Agaroz Jel hazırlanması

Çözelti	Çözelti İçeriği
TBE Tamponu (10X Stok çözelti)	Trisma Base 54 gr EDTA 7,44 gr Borik Asit 27,5 gr Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır
0,5X TBE	50 ml 10X TBE 950 ml distile su

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Morfolojik ve Embriyolojik Bulgular

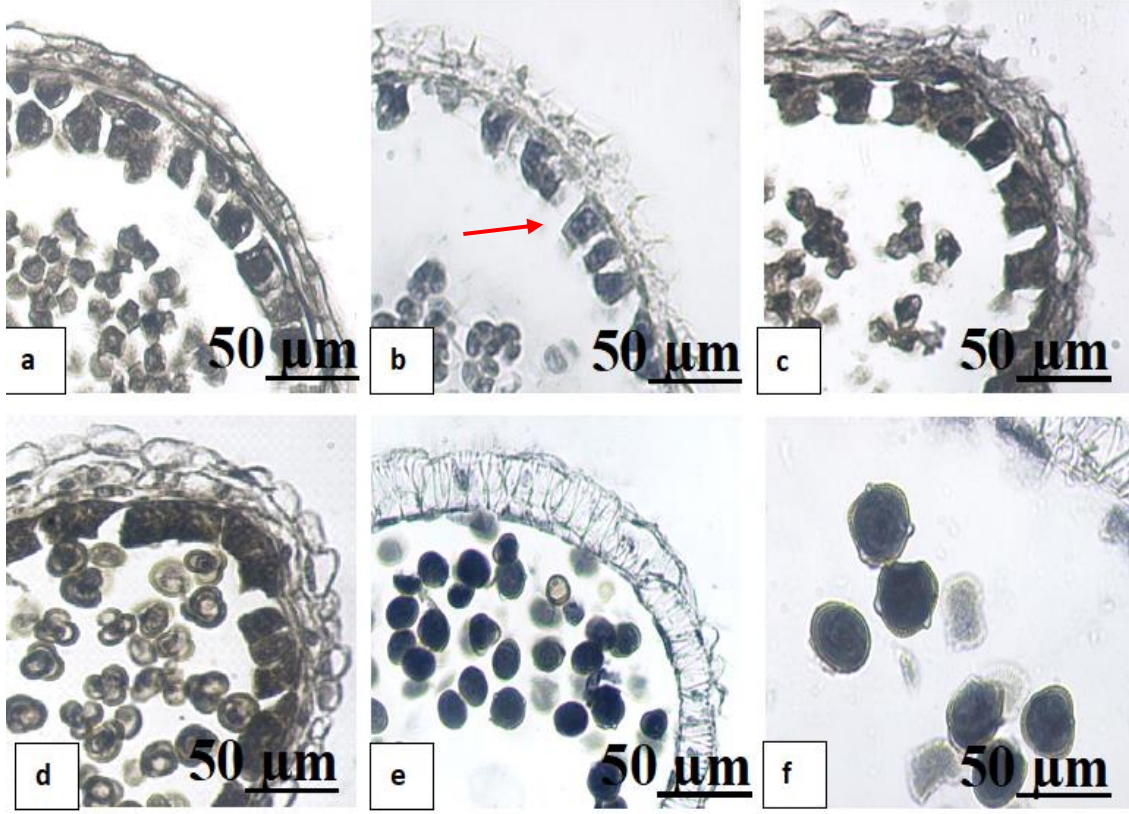
3.1.1. Anter Çeper Tabakalarının Gelişimi

B. oleracea anterleri gelişim evrelerinin başında epidermis tabakasıyla çevrili haldedir. Anterler, küresel-eliptik şekilde ve homojen bir durumdadır. Gelişim ilerledikçe anter hacminde artış gözlemlenir. Olgunlaşan anterler stomium adı verilen noktalardan açılır ve olgunlaşmış polenler dışarıya salınır.

Çalışmamızda *B. oleracea* anterlerinin gelişimi aşağıdaki evrelere ayrılarak incelendi:

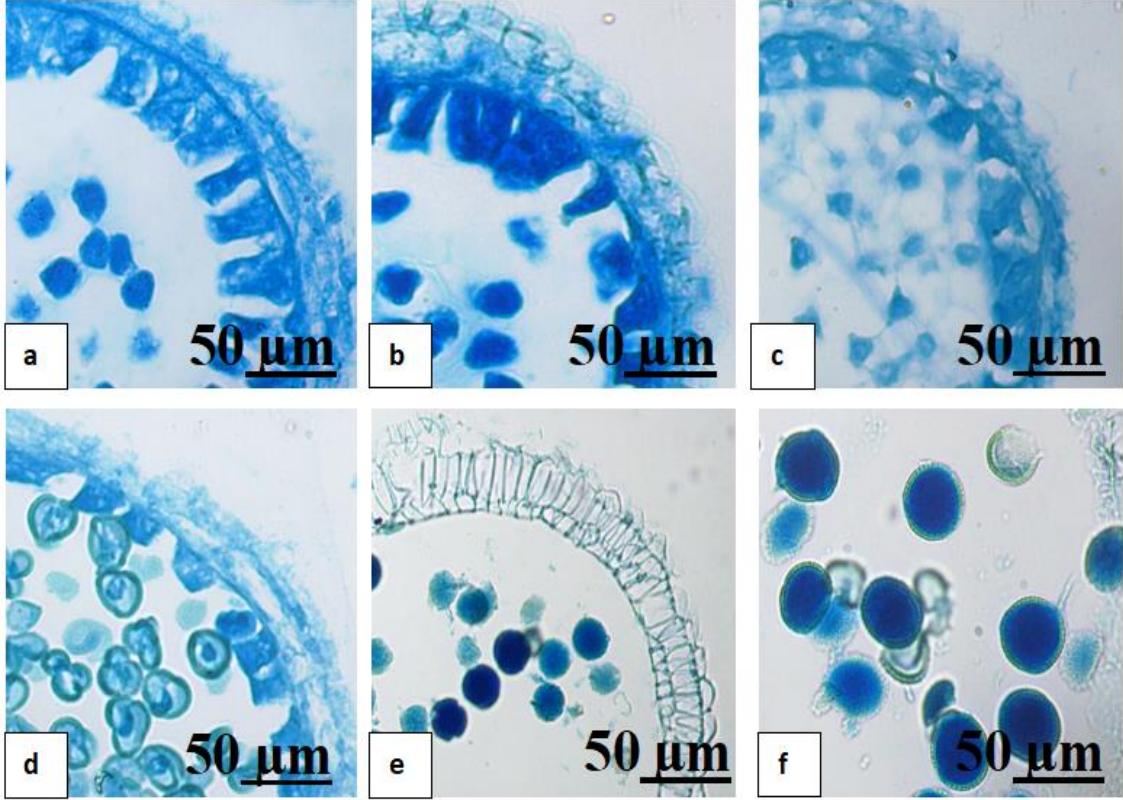
- 1- Profaz-I
- 2- Tetrat
- 3- Genç polen
- 4- Vakuollü polen
- 5- Olgun polen

B. oleraceae'nin anter gelişiminin incelenmesi için belirtilen gelişim evrelerindeki anter örneklerinden alınan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin ile boyandı. Boyama sonucunda gelişimin başında *B. oleraceae* anterlerinin dıştan içe doğru tek sıralı epidermis, endotesyum, ara tabaka ve tapetum hücrelerinden meydana geldiği gözlemlendi. Erken evrelerde mitoz bölünmeler geçiren tapetum tabakasında 2 nukleuslu hücreler de belirlendi (Şekil 3.1b). Gelişimin genç polen evresinden itibaren tapetum ve ara tabaka hücreleri değişikliğe uğramaya, vakuollü polen evresinden itibaren de körelmeye başladı. Endotesyum ve epidermis tabakaları ise gelişimin sonuna kadar gözlemlendi. Endotesyum tabakasının çeperleri kalınlaştı. Olgun anterler, anter lokuslarının birleştiği stomium adlı noktadaki hücrelerin ölmesiyle anterler açıldı ve olgun polen taneleri salındı (Şekil 3.1).



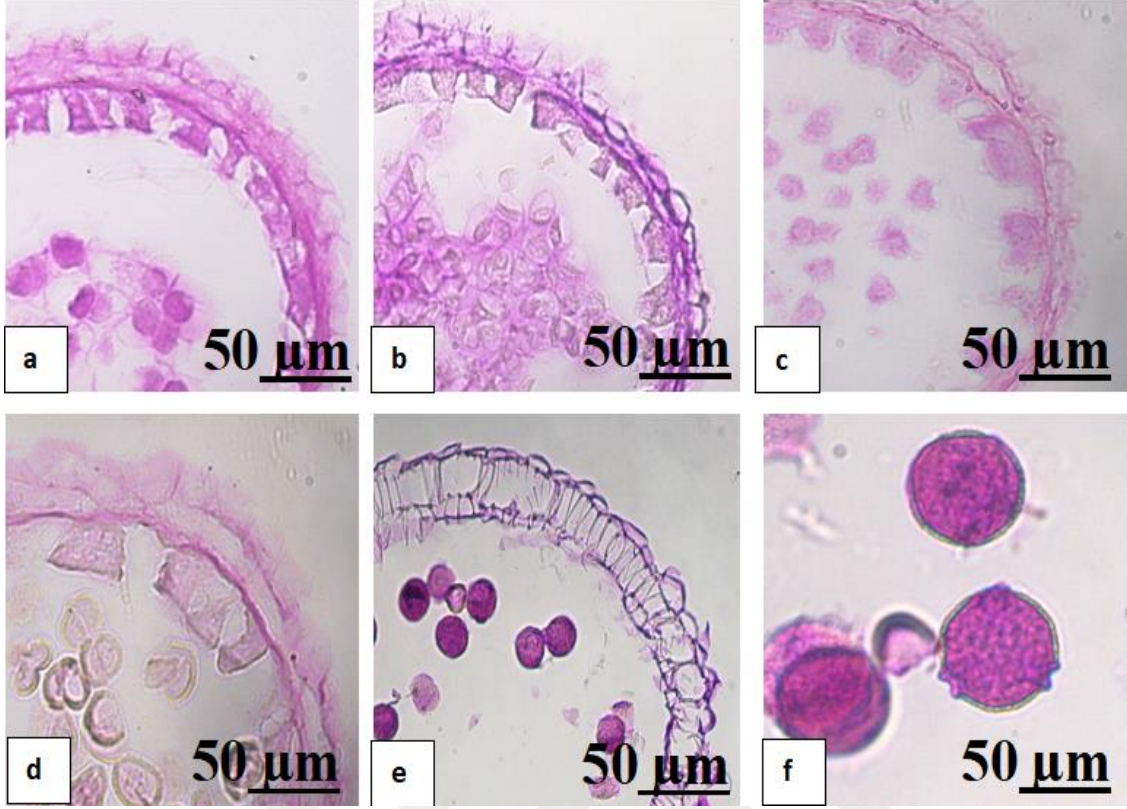
Şekil 3.1. *B. oleracea* anterlerinin parafin kesitlerinde Hematoksilen boyası ile genel yapının gösterilmesi. **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç Polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun Polen evresi **f.** Olgun polen tanesi

B. oleracea anterlerindeki protein varlığını belirlemek için yaptığımız Coomassie parlak mavisi (CBB) boyaması sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, gelişimin erken evrelerinde anter çeper tabakalarının protein varlığı açısından daha zayıf olduğu belirlendi. Tetrat evresinde özellikle tapetum hücrelerinin protein yoğunluğunun giderek arttığı tespit edildi. Gelişimin ilerleyip tapetum hücrelerinin körelmesiyle beraber protein miktarı tekrar azaldı. Olgun polen evresinde geriye kalan endostesyum ve epidermis tabakalarında yok denecek kadar az boyama belirlendi. Bunun yanında olgun polen tanelerinin sitoplazmasında yüksek miktarda protein olduğu saptandı (Şekil 3.2).



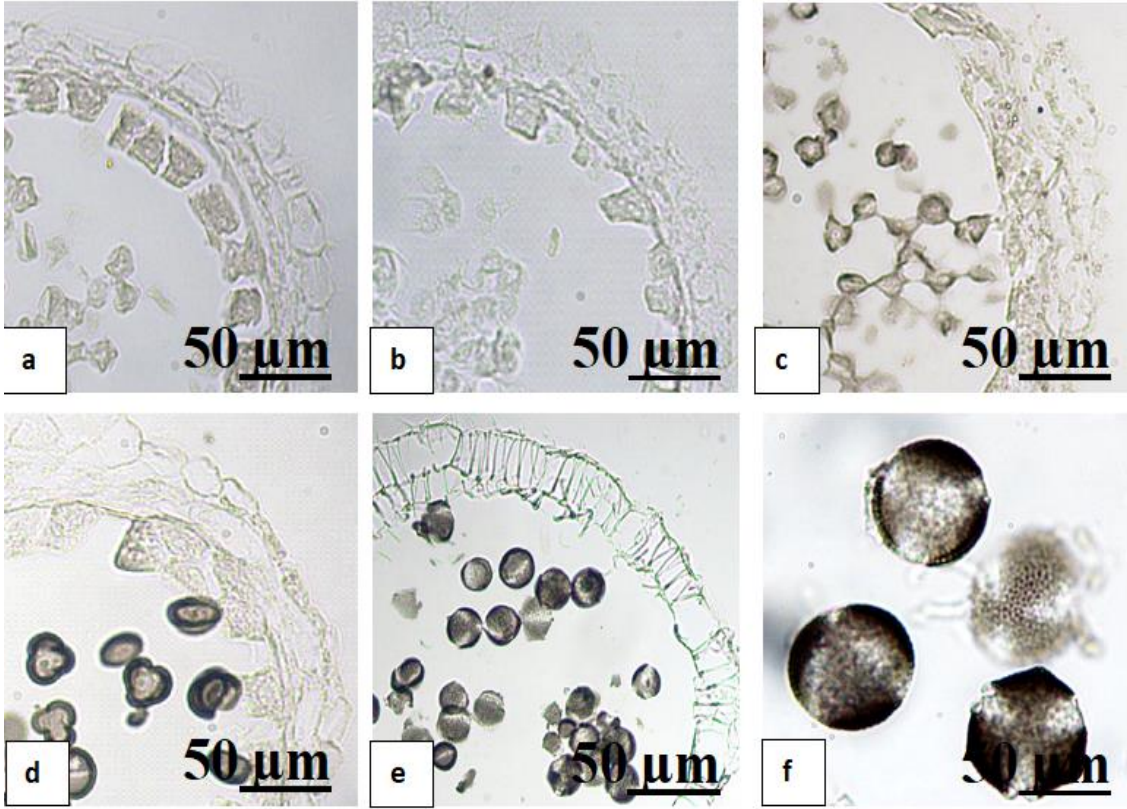
Şekil 3.2. Coomassie parlak mavisi boyaması **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç Polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun Polen evresi **f.** Olgun polen tanesi

Anter çeper tabakalarındaki nişasta, selüloz gibi suda çözünmeyen polisakkaritlerin varlığını belirlemek amacıyla yaptığımız Periyodik Asit & Schiff (PAS) boyaması sonucunda tapetum dokusu dışındaki anter çeper tabakalarındaki polisakkarit miktarının az olduğu görüldü. Tapetumda ise profaz-I evresinde yüksek miktarlarda olduğu görülen polisakkarit miktarının gelişimin ilerleyen evrelerinde giderek azaldığı belirlendi. Tetrat evresinde ara tabaka hücrelerinin ve kalloz çepere sahip mikrospor tetratlarının da PAS pozitif sonuç verdiği tespit edildi. Olgun polen evresinde endotesyum hücrelerinin çeper kalınlaşmalarında PAS pozitif reaksiyona rastlandı. Bunun yanında polen tanelerinin sitoplazmasında da yüksek miktarda polisakkarit olduğu belirlendi (Şekil 3.3).



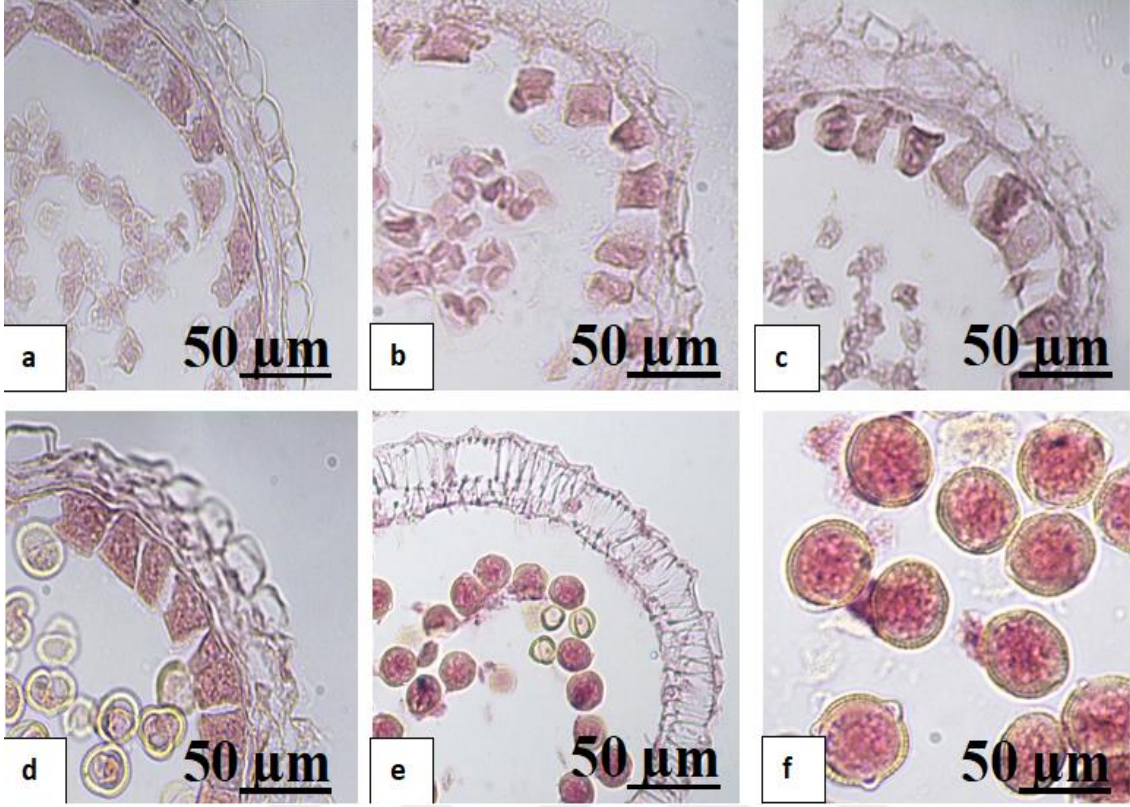
Şekil 3.3. Periyodik Asit-Shiff reaktifi boyaması **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç Polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun Polen evresi **f.** Olgun polen tanesi

Anter çeper tabakalarındaki lipit varlığının belirlenmesi amacıyla yaptığımız Sudan siyahı B (SBB) boyaması sonucunda anter çeperler tabakalarının lipit varlığı açısından oldukça fakir olduğu tespit edildi. Ancak bu boyama sonucunda *B. oleracea* polen tanelerinin ekzin çeperlerinin boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Sudan siyahı B boyaması **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç Polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun Polen evresi **f.** Olgun polen tanesi

Programlı hücre ölümü sırasında hücrede artış gösterdiği bilinen Ca^{+2} iyonunu belirlemek amacıyla kesitlere Alizarin kırmızısı boyası uygulandı. Boyama sonuçlarına göre tapetum hariç diğer anter çeper tabakalarında negatif sonuçlar gözlemlendi. Ancak tapetum tabakasında körelmeye kadar hücre içinde Ca^{+2} iyonunun artış gösterdiği belirlendi. Özellikle vakuollü polen evresinde, tapetumda Ca^{+2} iyonunun yoğun olduğu gözlemlendi. Ayrıca polen tanelerinin sitoplazmasında da yoğun Ca^{+2} bulunması dikkat çekti (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Alizarin kırmızısı S boyaması **a.** Profaz-I evresi **b.** Tetrat evresi **c.** Genç Polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun Polen evresi **f.** Olgun polen tanesi

B. oleraceae'de yaptığımız sitokimyasal boyamalar sonucunda elde ettiğimiz verilere göre tapetum dokusunun bol sitoplazmalı olduğunu; protein, çözünmeyen polisakkaritler ile beraber Ca^{+2} iyonları açısından zengin olduğunu tespit ettik. Ayrıca PAS boyamasıyla endotesyum ve ara tabakada suda çözünmeyen polisakkaritlere rastlandığı da görüldü. Xie ve arkadaşları (2005) *Brassica campestris*'te steril ve verimli anterleri karşılaştırmışlardır. Tetrat evresindeki tapetum hücrelerinde nişasta taneleri gördüklerini ancak steril anterlerdeki tapetumda nişastaya rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Sharma ve arkadaşları (2015) *Brachypodium distachyon*'da yaptıkları araştırmalarda endotesyumda kalınlaşmalar ve PAS pozitif sonuçlar gördüklerini bildirmişlerdir. Gupta ve Nanda (1978) *Techoma stans* anterlerinde yaptıkları çalışmada endotesyumda kalınlaşmalara, ara tabakada nişasta tanelerine rastladıklarını ve PAS pozitif sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Evans ve arkadaşları (1991) *Brassica napus* anterlerindeki gelişimi ve lipid varlığını incelemişlerdir. Olgun polen tanelerindeki lipidlerin gelişimin erken safhalarında

birikmeye başladığını ve tapetumdan kökenlendiklerini belirtmişlerdir. Rüter (1997) *B. oleraceae*'de yaptığı araştırmada, polen yüzeyindeki oleosin adlı, lipit gövdesine ve protein kuyruğuna sahip lipoidal moleküllerin varlığını tespit etmiş ve bu lipitlerin polenlerin stigmaya tutunmasında görev yaptığını belirtmiştir.

B. oleracea'de tapetum dışındaki anter çeper tabakaları protein içeriği bakımından zayıf bir içeriğe sahiptir. Tapetum hücreleri gelişimin başından tetrat evresine kadar yüksek protein içeriğine sahiptir. Genç polen evresinde tapetum dokusu protein içeriğini anter lokusuna bırakır. Heslop-Harrison ve ark. (1973) *Iberis amara*'da yaptıkları çalışmada, polenlerin eksin çeperindeki proteinlerin tapetum hücrelerinin endoplazmik retikulumlarından salgılandığını belirtmişlerdir.

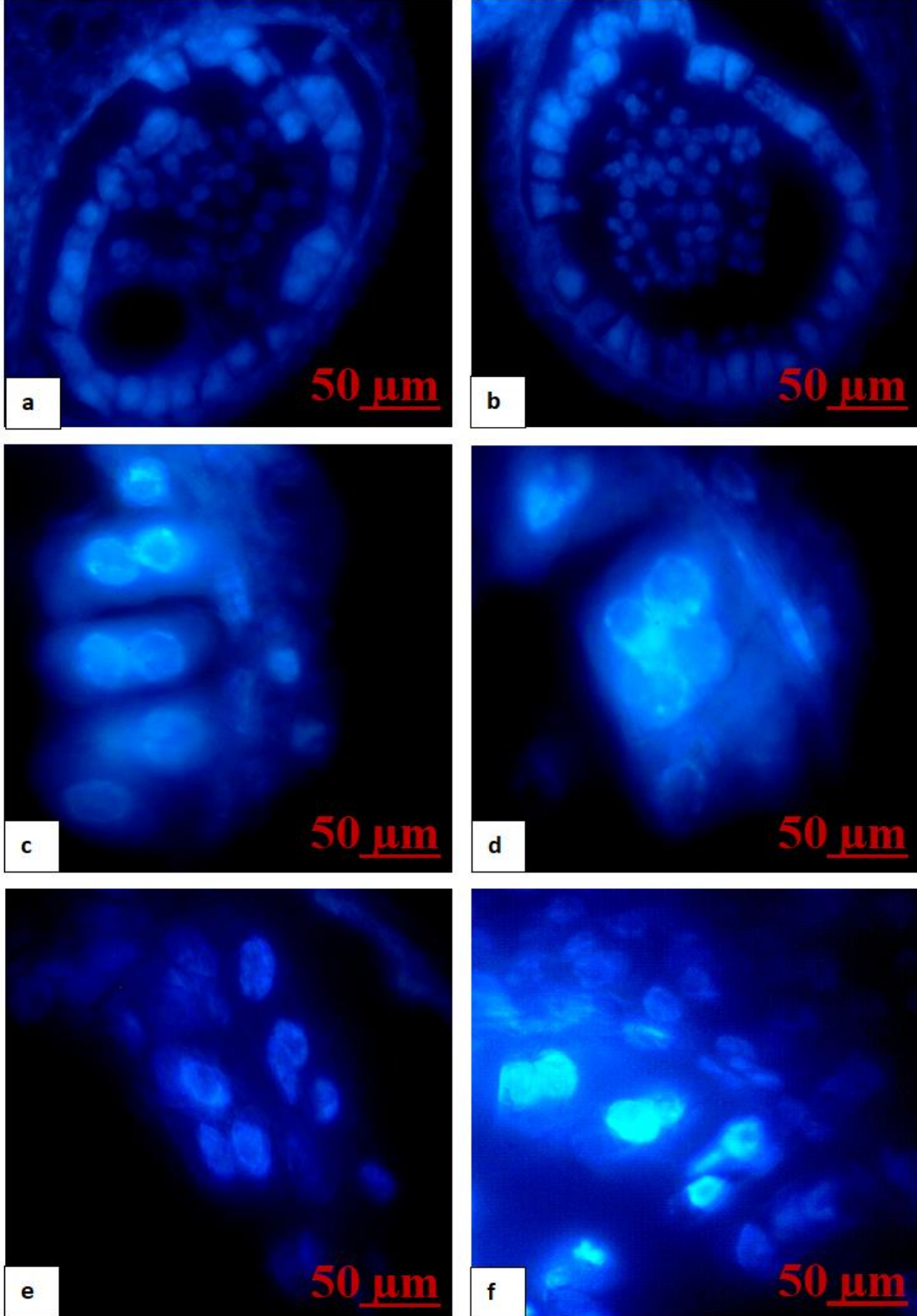
Ca^{+2} iyonlarının hem programlı hücre ölümünde görev yapan bir sinyal molekülü olduğu hem de polen tüplerinin stigma yüzeyinde çimlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Okada ve arkadaşları (1999) *Brassica rapa* polenlerinin yüzeyinde Ca^{+2} bağlayıcı proteinlerin tapetumdan salgılandığını tespit etmişlerdir. Eaves ve arkadaşlarının (2014) *Papaver rhoeas*'da yaptıkları çalışmada Ca^{+2} iyonunun, polen tüpü oluşumu için gerekli olan sinyal moleküllerini aktive ettiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Ca^{+2} iyonunun programlı hücre ölümünde görev yapan p56 proteinini aktive ettiğini ve aktin depolarizasyonunu başlattığını belirtmişlerdir. Vardar ve Ünal (2011) *Lathyrus undulatus*'un genç polen evresindeki tapetum hücrelerinde Ca^{+2} iyonunu bulundurduğunu tespit etmişlerdir.

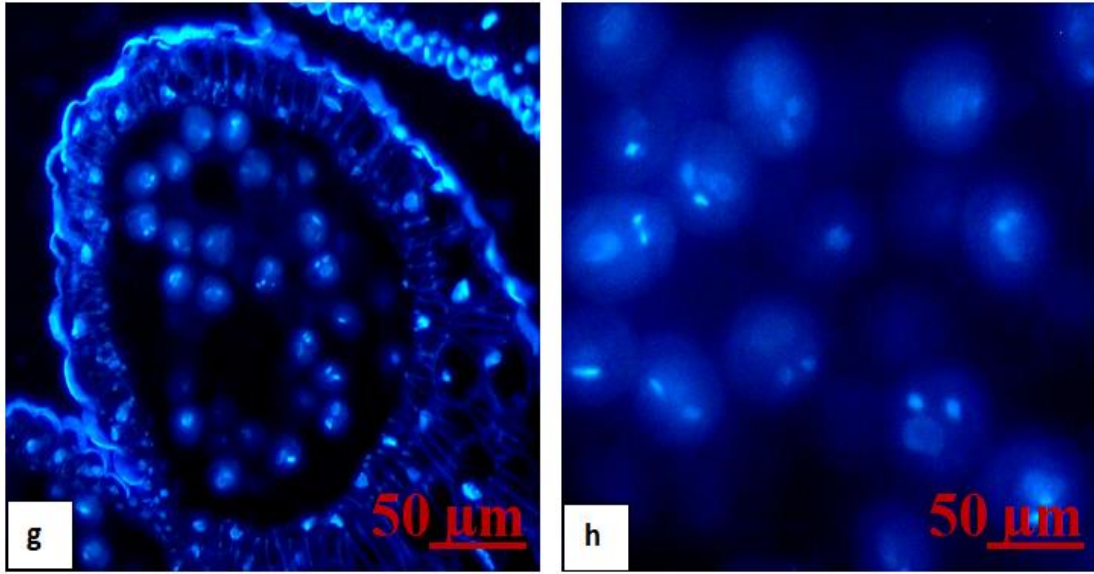
3.1.2. Anter Çeper tabakalarındaki Programlı Hücre Ölümü

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), hücre zarından geçme kabiliyetine sahip, DNA afinitesi yüksek olan floresan bir boyadır. DNA'nın adenin-timin bağlarınınca zengin bölgelerine bağlanarak mavi ışımalar verir.

Çalışmamızda DAPI ile elde ettiğimiz sonuçlara göre, genç polen evresine kadar tapetum hücrelerinin nukleusları normal ve küresel şekildedir. Erken gelişim evrelerindeki tapetum hücrelerinin çoğunluğu iki nukleusludur. İlerleyen evrelerde dört nukleuslu hücreler de belirlendi. Tetrat evresinde tapetum nukleuslarının küresel ve kalıtsal materyalin nukleusa normal şekilde yayıldığı görülmüştür. Genç polen evresinden itibaren tapetum nukleuslarının küresel şekillerini kaybettikleri ve DNA'nın nukleusta

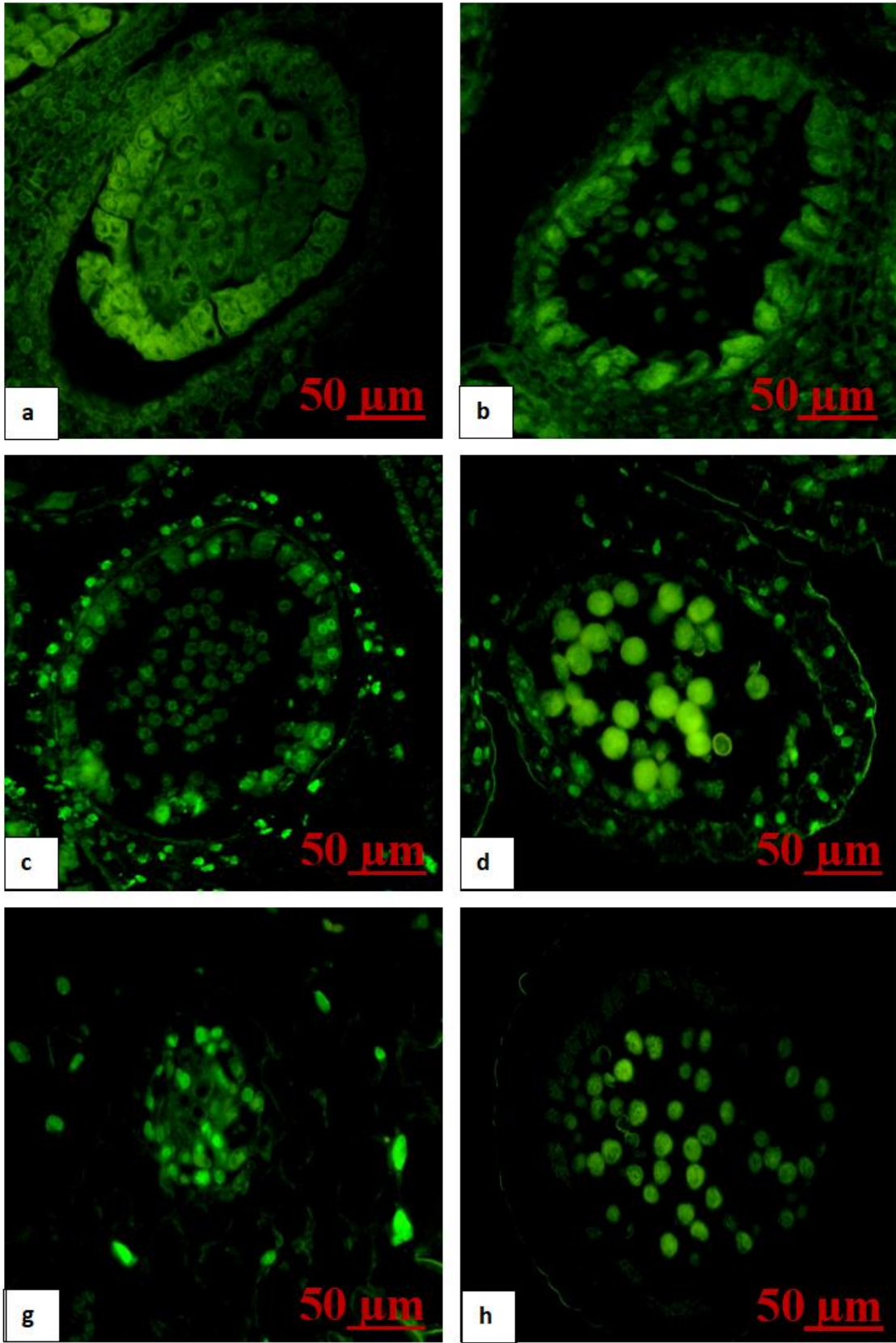
düzgün dağılmadığı gözlemlendi. Ara tabakada bu evrede nukleuslarda şekilsel bozulma saptandı. Olgun polen evresinde tapetum ve ara tabaka tamamen köreldi (Şekil 3.6).





Şekil 3.6. DAPI boyaması **a,b.** Profaz-I evresi. **c,d.** Tetrat evresi **e,f.** Genç Polen evresi **g.** Olgun Polen evresi **h.** 3 nukleuslu olgun polen taneleri

TUNEL işaretlemede elde ettiğimiz bulgulara göre profaz-I ve tetrat evrelerinde negatif işaretlenme gözlemlendi. Genç polen ve vakuollü polen evresinde ise tapetum hücrelerinde yoğun olmak üzere tüm anter çeper tabakalarında pozitif ışımalar belirlendi. Bunun yanında özellikle vakuollü polen evresinde konnektif dokuda da TUNEL pozitif ışımalar tespit edildi. Olgun polen evresinde ise tapetum ve ara tabaka tamamen köreldi. Geriye kalan tabakalarda ise TUNEL negatif işaretlenme saptandı. Polenlerin ekzin çeperlerindeki ışımalar ise sekonder ışımalardır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. TUNEL yöntemi a. Profaz-I evresi b. Tetrat evresi c. Genç Polen evresi d. Vakuollü Polen evresi e. Konektif doku hücreleri f. Olgun polen evresi

Bazı dokulardaki programlı hücre ölümünün sağlıklı üreme hücrelerinin oluşması için gerekli olduğu bilinmektedir. Polen için gerekli olan besin ve sinyal moleküllerinin anter lokusuna dağılması için tapetum hücrelerinin doğru zamanda ölmesi verimli polenler oluşabilmesi açısından kritiktir. Bu hücrelerdeki PHÖ'nün belirlenmesi için DAPI ve Feulgen gibi nükleus boyaları ve TUNEL gibi DNA işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Vardar ve Ünal'ın (2011) *Lathyrus undulatus* anterlerinin gelişimi sırasında gerçekleşen hücre ölümünü belirlemede DAPI ve TUNEL yöntemlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar DAPI ile boyanan hücrelerin genç polen evresinde DNA'nın granüler bir yapıda olduğunu, vakuollü polen evresinde ise DNA'da deformasyonlar, bozulmalar ve düzensiz bir dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir. TUNEL reaksiyonunun genç polen evresine kadar negatif olduğunu ancak bu evreden sonra anter çeper tabakalarının güçlü bir şekilde boyandığını ve TUNEL pozitif sonuçlar aldıklarını belirtmişlerdir.

Niu ve arkadaşları (2012) *Oryza sativa*'da yaptıkları araştırmada mikrosporlar mikrospor tetratından salındıktan sonra tapetum da TUNEL pozitif sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir.

Papini ve arkadaşları (1999) *Lobivia rauschii* ve *Tillandsia albida*'da yaptıkları çalışmada tapetum hücrelerindeki PHÖ'nün sitoplazmik azalma ve nükleuslardaki şekil bozuklukları şeklinde görüldüğünü kaydetmişlerdir.

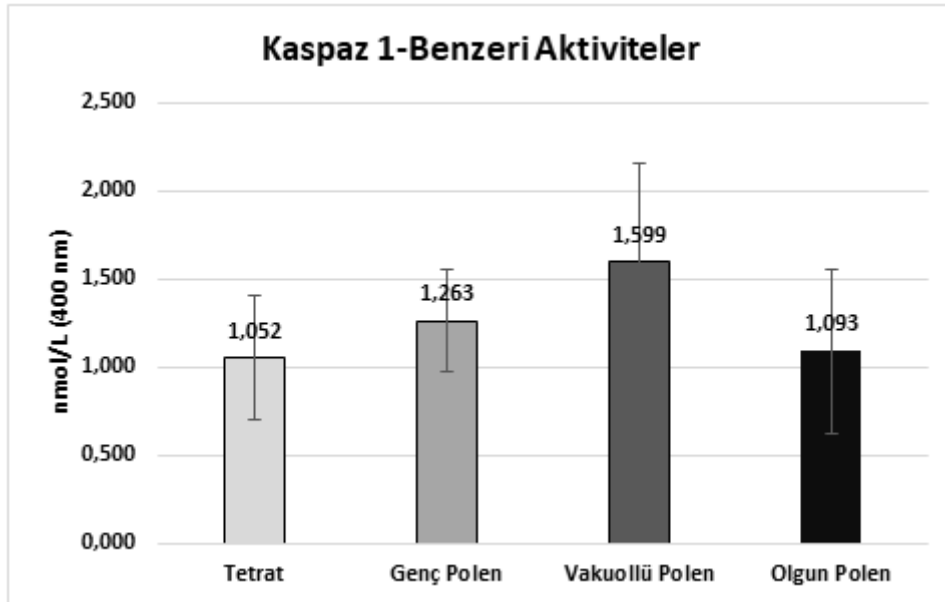
Wan ve arkadaşları (2010) *Brassica napus*'ta yaptıkları araştırmada steril ve verimli anterlerin gelişimini incelemişlerdir. Steril anterlerdeki tapetum hücrelerinin tetrat evresinin başında öldüklerini ve bu sebeple polenlerin mikrospor tetratından salınamadıklarını tespit etmiştir. Verimli anterlerde ise tapetum hücrelerinin genç polen evresinde başlayıp vakuollü polen evresinde şiddetlendiğini gözlemlemişlerdir.

Wang ve arkadaşları (2015) *Triticum aestivum*'da hibridizasyon için kullanılan bazı kimyasal ajanların erken tapetum ölümüne yol açtığını ve bunun da polen sterilitesine sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Bu bilgiler ışığında, literatürdeki bulguların çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir.

3.2. Anter Çeper Tabakalarında Kaspaz-1 benzeri enzimlerin aktiviteleri

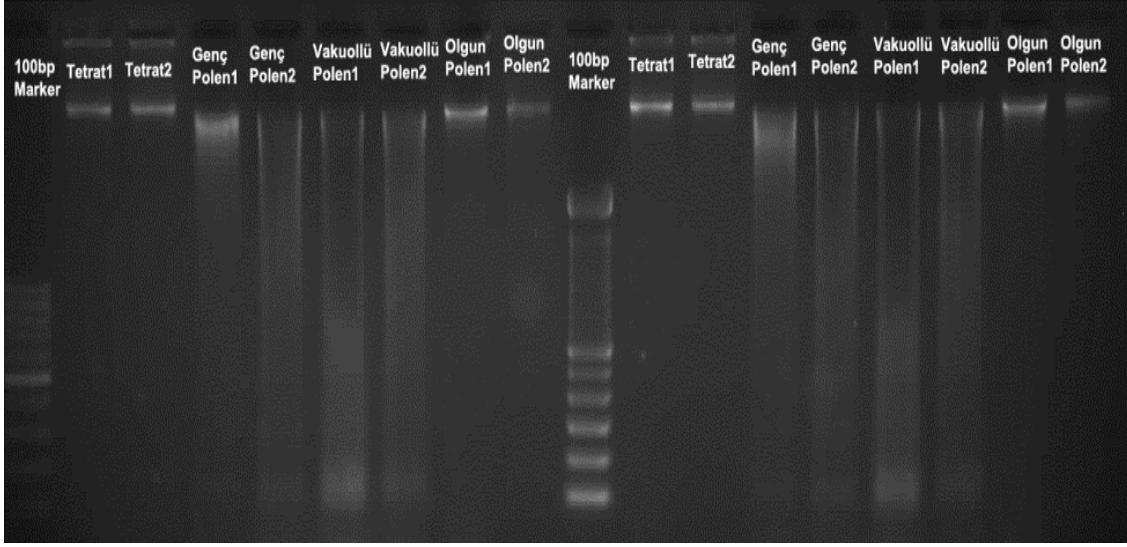
Çalışmamızda anter çeper tabakalarındaki PHÖ'nün tespiti için kullandığımız Kaspaz-1/ICE Kolorimetrik Proteaz Analiz Kiti (ENZO) sonuçlarına göre *Brassica oleracea* anter gelişimi sırasında görülen kaspaz 1-benzeri aktivite şekil 3.8'de gösterildiği gibidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tetrat ve olgun polen evrelerinde enzim aktivitesinin çok düşük olduğu görülmektedir. Olgun Polen evresinde ışık mikrosbu çalışmalarında da gördüğümüz üzere ara tabaka ve tapetum hücrelerinin ölmüş olması dolayısıyla Kaspaz-1 benzeri enzimlerin aktivitelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Genç polen evresinde kaspaz-1 aktivitesinin tetrat evresine göre %20, vakuollü polen evresinde %52 artış gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil. 3.8. *B. oleracea* tapetum hücrelerindeki kaspaz-1 benzeri aktiviteler

3.3 Anter Çeper Tabakalarında DNA Fragmentasyonları

DNA analizi ve Agaroz Jel Elektrofrezisi sonuçlarımıza göre gelişim evrelerine göre DNA fragmentasyonu şekil 3.9'daki gibi görüntülenmiştir. Genç ve vakuollü polen evresinde anter çeper tabakalarında belirgin oranda genomik DNA fragmentasyonu gözlemlenmektedir. Elde ettiğimiz mikroskopik görüntüler ve Kaspaz-1 testi de agaroz jel sonuçlarımızla uyumaktadır.



Şekil 3.9. DNA fragmentasyonlarının agaroz jel elektroforezinde gösterimi.

Bilindiği üzere bitkilerde PHÖ sırasında aktivite gösteren VPE'ler, hayvanlardaki kaspaz-1 enzime benzer aktiviteler göstermektedir. VPE'lerin biyotik stres, abiyotik stres ve yüksek aktivite gösterdiği çeşitli araştırmalarla kanıtlanmıştır (Rojo ve ark., 2004, Hatsugai ve ark., 2004, Li ve ark., 2012). Cheng ve ark. (2020) *Arabidopsis thaliana* anterlerindeki VPE'lerin aktivitelerini ve tapetum gelişimini araştırmışlardır. Sonuçlarımızı destekleyecek şekilde β VPE'nin normal gelişim sırasında çiçek dışında bitkinin başka bir noktasında görülmediğini, bu enzimin genç polen ve vakuoler polen evresinde yüksek derecede aktif olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte aynı evrelerde TUNEL pozitif reaksiyon aldıklarını belirtmişlerdir. Tran ve arkadaşları (2014) *Hordeum vulgare* tohumlarının çimlenmesi sırasında endospermada kaspaz-1 aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir.

Literatür araştırması yapıldığında *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis*'in anter tapetumunda meydana gelen PHÖ sonucunda gözlemlenen kaspaz-1 benzeri enzim aktivasyonu ve DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızı destekler nitelikte Wang ve arkadaşları (1999) *Hordeum vulgare*'de yaptıkları çalışmada gelişmekte olan anter çeper tabakalarında DNA fragmentasyonu olduğunu ancak olgun anterlerde fragmentasyonun olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte Varnier ve arkadaşları (2005) *Lilium*'un anter gelişimi sırasında genç polen ve vakuollü polen evresinde tapetum hücrelerinde yüksek miktarda DNA fragmentasyonu olduğunu belirtmiştir.

4. SONUÇLAR

Brassicaceae familyası, *Brassica* cinsine ait *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. subvar. *viridis* anterlerinin gelişimi ve gelişim sırasında anter dokularında gerçekleşen programlı hücre ölümü morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile incelendi. *B. oleracea* anterleri çoğu angiosperm gibi 4 loblu, dıştan içe doğru epidermis, endotesyum, ara tabaka ve tapetum tabakalarından oluşur. Epidermis ve endotesyum gelişimin başından sonuna kadar varlığını sürdürür. Endotesyum çeperleri gelişimin sonunda kalınlaşarak karakteristik U şeklini alır. Gelişimin sonunda anterler stomium noktalarından açılır ve olgun polen taneleri dışarıya salınır. Çalışmamızda uyguladığımız DAPI ve TUNEL yöntemi gelişimin genç ve vakuollü polen evresinde epidermis ve endotesyumda programlı hücre ölümü gerçekleştiğini göstermektedir. Bunun yanında programlı hücre ölümünün ara tabaka ve tapetum hücrelerinde genç polende başlayıp vakuollü polen evresinde şiddetlendiği görüldü. Işık ve floresans mikroskobu sonuçlarına göre tapetum hücrelerinin protein, Ca^{+2} iyonu ve suda çözünmeyen polisakkaritler açısından zengin olduğunu belirlendi. Tapetum hücrelerinin sitoplazmasındaki Ca^{+2} iyonu derişiminin genç ve vakuollü polen evresinde arttığı görülmüştür. Hücre içinde artan Ca^{+2} iyonun otolitik enzimleri içeren vakuollerin yıkımından sorumlu olduğu ve PHÖ'nü hızlandırdığı bilinmektedir (Jones., 2001; Mattson ve Chan., 2003). Genç ve vakuollü evrede hücre içinde yoğunluğu artan Ca^{+2} iyonunun Ca^{+2} bağımlı endonükleazları aktifleştirerek bu evrelerde TUNEL pozitif sonuçlar almamızı sağladığını düşünmekteyiz. DAPI boyamasıyla erken evrede küresel olan tapetum nukleuslarının ilerleyen evrelerde küresel şekillerini kaybetti. Bununla beraber ileri evrelerde tapetum kromozomlarının nukleusda homojen dağılmadığı da dikkat çekti.

VPE'ler bitkilerde PHÖ'de rol oynayan sistein proteinaz enzim ailesinin bir üyesidir. Bu enzimler substratlarını aspartik asitten sonraki aminoasitten keser. VPE'ler hem 3 boyutlu yapıları hem de etki ettikleri substrat bakımından hayvanlardaki kaspaz-1 ile benzerlik göstermektedir. Kazpaz-1 testi sonuçlarına göre anter çeper tabakalarındaki kaspaz-1 benzeri enzimlerin aktivitelerinin genç polen evresinde %20, vakuollü polen evresinde %52 arttığı belirlendi.

Programlı hücre ölümünün göstergelerinden birisi de 180-200 bç'lik DNA fragmentasyonunun gerçekleşmesidir. Fragmente olan DNA, agaroz jel elektroforezine tabi tutulduğunda farklı büyüklükteki DNA parçaları farklı hızlarda jelde ilerleyerek

merdiven basamağı görüntüsü (ladder) oluştururlar. Gelişim sırasında jel elektroforezi ile genç ve vakuollü evrelerdeki programlı hücre ölümü neticesinde oluşan DNA fragmentasyonu tespit edildi. Tetrat ve olgun polen evresinde anterde DNA fragmentasyonu olmadığı görüldü.

Konuyla alakalı literatür araştırması yapıldığında *Brassica oleracea*'nin anter gelişimi ve anter dokularındaki PHÖ hakkında ayrıntılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. R.C. Thompson (1933) *Brassica oleracea*'nin tohum ve çiçek gelişimini araştırmıştır ancak bu araştırma günümüzde güncelliğini kaybetmiştir.

Bitkilerde anter gelişimi sırasında görülen programlı hücre ölümü mekanizmalarının aydınlatılması verimli polenler elde edilmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçların anter gelişimi ve programlı hücre ölümüne ilişkin çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Bancroft, I. (2011). *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. R. Schmidt (Ed.). Germany: Springer.
- 2- Boya, P., González-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., ... & Pierron, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 25(3), 1025-1040.
- 3- Cheng, Z., Guo, X., Zhang, J., Liu, Y., Wang, B., Li, H., & Lu, H. (2020). β VPE is involved in tapetal degradation and pollen development by activating proprotease maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1943-1955.
- 4- Danon, A., Rotari, V. I., Gordon, A., Mailhac, N., & Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 779-787.
- 5- Droll, D., Minia, I., Fadda, A., Singh, A., Stewart, M., Queiroz, R., & Clayton, C. (2013). Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a zinc finger protein. *PLoS pathogens*, 9(4).
- 6- Eaves, D. J., Flores-Ortiz, C., Haque, T., Lin, Z., Teng, N., & Franklin-Tong, V. E. (2014). Self-incompatibility in *Papaver*: advances in integrating the signalling network.
- 7- Evans, D. E., Taylor, P. E., Singh, M. B., & Knox, R. B. (1992). The interrelationship between the accumulation of lipids, protein and the level of acyl carrier protein during the development of *Brassica napus* L. pollen. *Planta*, 186(3), 343-354.
- 8- Ge, J., Xie, H., & Chui, C. S. (2005). Analysis of Expressed Sequence Tags (ESTs) Derived SSR Markers in Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Agricultural Biotechnology/Nongye Shengwu Jishu Xuebao*, 13(4), 423-428.

- 9- Gómez, J. F., Talle, B., & Wilson, Z. A. (2015). Anther and pollen development: a conserved developmental pathway. *Journal of integrative plant biology*, 57(11), 876-891.
- 10- Gupta, S. C., & Nanda, K. (1978). Ontogeny and histochemistry of dimorphic tapetum in *Tecoma stans* anthers. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 125(1-2), 129-134.
- 11- Hameed A, Malik SA, Iqbal N, Arshad R, Farooq S (2004). A Rapid (100 min) Method for Isolating High Yield and Quality DNA from Leaves, Roots and Coleoptile of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Suitable for Apoptotic and Other Molecular Studies. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2, 383-387.
- 12- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., ... & Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305(5685), 855-858.
- 13- He, X., & Kermode, A. R. (2003). Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Molecular Biology*, 52(4), 729-744.
- 14- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Knox, R. B., & Howlett, B. (1973). Pollen-wall proteins: 'gametophytic' and 'sporophytic' fractions in the pollen walls of the Malvaceae. *Annals of Botany*, 37(3), 403-412.
- 15- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 31-43.
- 16- Jones, A.M.: "Programmed Cell Death in Development and Defense" *Plant Physiology*, 125 (2001) 94-97.
- 17- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., ... & Ferri, K. F. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554.
- 18- Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L. C., & Williams, B. (2017). The life and death of a plant cell. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 375-404.
- 19- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated

- proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14(22), 5579-5588.
- 20- Lee, H., Shin, E. A., Lee, J. H., Ahn, D., Kim, C. G., Kim, J. H., & Kim, S. H. (2018). Caspase inhibitors: a review of recently patented compounds (2013-2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(1), 47-59.
- 21- Li, Z., Yue, H., & Xing, D. (2012). MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in Arabidopsis. *New Phytologist*, 195(1), 85-96.
- 22- Locato, V., & De Gara, L. (2018). Programmed cell death in plants: an overview. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 1-8). Humana Press, New York, NY.
- 23- Mattson, M.P.; Chan, S.L.: "Neuronal and Glial Calcium Signaling in Alzheimer's Disease", *Cell Calcium*, 34 (2003) 385–397.
- 24- McCall, K., (2010). Genetic control of necrosis-another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6), 882-888.
- 25- Niu, N., Liang, W., Yang, X., Jin, W., Wilson, Z. A., Hu, J., & Zhang, D. (2013). EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nature communications*, 4(1), 1-11.
- 26- Okada, T., Swoboda, I., Bhalla, P. L., Toriyama, K., & Singh, M. B. (1998). Engineering of hypoallergenic mutants of the Brassica pollen allergen, Bra r 1, for immunotherapy. *FEBS letters*, 434(3), 255-260.
- 27- Papini, A., Mosti, S., & Brighigna, L. (1999). Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma*, 207(3-4), 213-221.
- 28- Proskuryakov, S. Y., Gabai, V. L., & Konoplyannikov, A. G. (2002). Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Moscow)*, 67(4), 387-408.
- 29- Rojo, E., Martín, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., & Ausubel, F. M. (2004). VPE γ exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology*, 14(21), 1897-1906.
- 30- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), 682-695.

- 31- Ruiter, R. K., Van Eldik, G. J., Van Herpen, R. M., Schrauwen, J. A., & Wullems, G. J. (1997). Characterization of oleosins in the pollen coat of *Brassica oleracea*. *The Plant Cell*, 9(9), 1621-1631.
- 32- Sharma, A., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2015). Anther ontogeny in *Brachypodium distachyon*. *Protoplasma*, 252(2), 439-450.
- 33- Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 217-245.
- 34- Thiyam, U., Kuhlmann, A., Stöckmann, H., & Schwarz, K. (2004). Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential. *Comptes Rendus Chimie*, 7(6-7), 611-616.
- 35- Thompson, R. C. (1933). A morphological study of flower and seed development in cabbage. *Journal of Agricultural Research*, 47(4), 215-232.
- 36- Tran, V., Weier, D., Radchuk, R., Thiel, J., & Radchuk, V. (2014). Caspase-like activities accompany programmed cell death events in developing barley grains. *PLoS One*, 9(10), e109426.
- 37- Ünal, M., & Alp, O. (2002). Cytological mechanisms of unreduced pollen formation in *Solanum tuberosum* L. cv. Morfana. *J cell Mol Biol*, 1, 15-18.
- 38- Ünal, M.: *Bitki (Angiosperm) Embriyolojisi*, Nobel Yayınları, (2006).
- 39- Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., ... & Mur, L. A. J. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1241-1246.
- 40- Van Hautegeem, T., Waters, A. J., Goodrich, J., & Nowack, M. K. (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in plant science*, 20(2), 102-113.
- 41- Vardar, F., & Unal, M. (2011). Cytochemical and ultrastructural observations of anthers and pollen grains in *Lathyrus undulatus* Boiss. *Acta Botanica Croatica*, 70(1), 53-64.
- 42- Varnier, A. L., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Sangwan, R. S., & Clément, C. (2005). Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of structural biology*, 152(2), 118-128.

- 43- Wan, L., Xia, X., Hong, D., Li, J., & Yang, G. (2010). Abnormal vacuolization of the tapetum during the tetrad stage is associated with male sterility in the recessive genic male sterile Brassica napus L. Line 9012A. *Journal of Plant Biology*, 53(2), 121-133.
- 44- Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, G. E., Oppedijk, B. J., van der Heijden, M. W., ... & Schilperoort, R. A. (1999). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant molecular biology*, 39(3), 489-501.
- 45- Wang, S., Zhang, G., Song, Q., Zhang, Y., Li, Z., Guo, J., ... & Wang, J. (2015). Abnormal development of tapetum and microspores induced by chemical hybridization agent SQ-1 in wheat. *PLoS One*, 10(3).
- 46- Woltering, E. J., van der Bent, A., & Hoerberichts, F. A. (2002). Do plant caspases exist? *Plant Physiology*, 130(4), 1764-1769.
- 47- YANIK, F., ÇETİNBAŞ, A., & VARDAR, F. Bitkilerde Programlı Hücre Ölümü.
- 48- Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & therapeutics*, 92(1), 57-70.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasan Can Küçükali
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 1993
Yabancı Dil : İngilizce
E-posta : hasan.cankucukali@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Giriş Yılı	Mezuniyet Yılı
Lise	Sayısal	Özdemir Sabancı Emirgan Lisesi	2007	2011
Üniversite	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2011	2016

Kongre/Sempozyum

KÜÇÜKALİ, H. C. & VARDAR, F., (2019). Anther Development And Programmed Cell Death In Brassica oleracea L. (cabbage). II. International Green Biotechnology Congress, 9-11 September, İstanbul, Türkiye

Kitap Bölümü

KÜÇÜKALİ, H.C., ÇETİNBAŞ-GENÇ, A. & VARDAR, F., (2020). Anther Development and Programmed Cell Death in Brassica oleracea L. (Cabbage). In: Programmed Cell Death: An Overview, Nova Science Publishers (Baskıda).