

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

145903

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MISIR (*Zea mays* cv. B73) YAPRAĞINDA SOĞUK STRESİ ETKİLERİ VE
GELİŞİM EVRELERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜ GENLERİNİN TRANSKRİPT
ANALİZLERİ

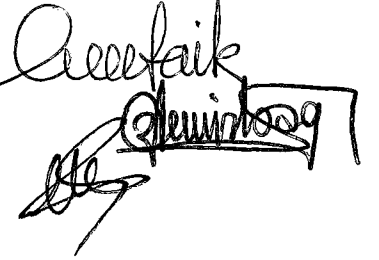
145903

Biyolog Fatma KARTAL

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.01.2006
Tezin Savunma Tarihi : 02.02.2006

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Faik Ahmet AYAZ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. İlknur TOSUN



Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT



Trabzon 2006

ÖNSÖZ

Mısır (*Zea mays*. cv. B73) yaprağında soğuk stresi etkileri ve gelişim evrelerinde hücre döngüsü genlerinin transkript analizlerinin yapıldığı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'na 'Yüksek Lisans Tezi' olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde bana yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Faik Ahmet AYAZ'a derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Belçika'nın Ghent Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü'nde Socrates/Erasmus öğrencisi olduğum sürede tezime ilgili çalışmalarında bana laboratuvar imkanlarını sunan Dr. Gerrit BEEMSTER'e sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

Fatma KARTAL
Trabzon 2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Yaprak Büyümesi ve Hücre Bölünmeleri Arasındaki İlişki	4
1.3. Hücre Döngüsü.....	5
1.4. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi.....	6
1.5. Yaprak Gelişimi Sırasında Hücre Döngüsünde Meydana Gelen Değişimler	8
1.6. Kantitatif RT-PCR (Real-Time Quantitative-RT-PCR).....	9
1.7. Üşüme Hasarı	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	12
2.1. Bitki Materyali ve Büyüme Şartları	12
2.2. Yaprak Boyunun Ölçülmesi	13
2.3. Hücre Uzunluğunun Ölçülmesi.....	13
2.4. Meristem Uzunluğunun Hesaplanması	14
2.4.1. DAPI ile Nükleus Boyanması	15
2.5. Büyüme Bölgesinde Bölünen Hücre Sayısının, Hücre Üretiminin, Hücre Bölünme Oranının ve Hücre Döngüsü Zamanının Sayısal Analizleri	16
2.6. Flow Sitometri.....	17
2.7. Hücre Döngüsü Genlerinin Transkript Analizleri.....	19
2.7.1. RNA İzolasyonu.....	19
2.7.2. RNA'nın Temizlenmesi	20
2.7.3. cDNA Sentezi.....	21

2.7.4.	Primerler.....	21
2.7.5.	Kantitatif RT-PCR (Real-Time Quantitative-RT-PCR).....	22
2.7.5.1.	Bilgilerin Analiz Edilmesi.....	24
3.	BULGULAR	26
3.1.	Yaprak Uzunluğunun Ölçülmesi.....	26
3.2.	Hücre Boyununun Ölçülmesi.....	29
3.3.	DIC Mikroskopuyla Meristem Büyüklüğünün Hesaplanması	30
3.4.	Büyüme Bölgesindeki Bölünen Hücre Sayısı, Hücre Üretimi, Bölünme oranı ve Hücre Döngüsü Zamanı.....	31
3.5.	Büyüme Bölgesinin DNA Miktarı	34
3.6.	Q-RT-PCR ile Hücre Döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi	35
3.6.1.	Meristem, Uzama ve Olgunluk Bölgelerinde, <i>rubp</i> , <i>rp6-1</i> ve Referans Genlerinin Transkript Seviyelerinin Karşılaştırılması	37
3.6.2.	Meristemde, Hücre döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Meydana Gelen Değişim	38
3.6.3.	Uzama Bölgesinde, Hücre döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Gelen Değişim.....	39
3.6.4.	Olgunluk Bölgesinde, Hücre döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Meydana Gelen Değişim.....	40
4.	TARTIŞMA	42
5.	SONUÇLAR	46
6.	ÖNERİLER	47
7.	KAYNAKLAR	48
8.	EKLER.....	52
	TEŞEKKÜR.....	56
	ACKNOWLEDGMENT	57
	ÖZGEÇMİŞ	59

ÖZET

Bu çalışmanın amacı düşük sıcaklıkta yetiştirilen mısır fidelerinin yapraklarının büyüme bölgeleri boyunca (meristem, uzama bölgesi ve olgunluk bölgesi) hücre hareketleri incelemektir. Bunun için yaprak büyümesinin kinematik analizleri yapılmıştır. Sonuçlar, yaprak büyümesinin düşük sıcaklıklarda azalışının meristemdeki hücre üretiminin ve hücre bölünmesinin düşmesiyle meydana geldiğini ve uzama bölgesinde hücre genişlemesinin ise kısmen etkilendiğini göstermektedir. Bu nedenle, aynı çevresel koşullarda yetişen mısırların yapraklarından izole edilen öz hücre döngüsü genlerinin transkript analizleri yapıldı. Düşük sıcaklıkta yetiştirilen fidelerin transkript seviyesindeki değişimler daha yavaş ilerleyen hücre döngüsü ile uyumlu sonuçlar vermiştir. CDK genlerinin birçoğunda ifade analizleri sonucu transkript seviyesinde düşüş görülürken bazı hücre döngüsü genlerini engelleyen proteinler (KRP'ler, DEL'ler)'in transkriptlerinde artış görülmüştür. Bu sonuçlar olgun bir yaprakta hücre döngüsünün düşük sıcaklıktan etkilendiğini göstermektedir. Bu etkilerin moleküler seviyede anlaşılmasıyla dane bitkilerinin optimumun altındaki büyüme sıcaklıklarında büyütülmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesine imkan bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: *Zea mays* cv. B73, Hücre Döngüsü, Hücre Büyümesi, Yaprak Gelişimi, CDK, KRP, DEL, E2F/DP, Kinematik Analizleri, Flow Sitometre, Q-RT-PCR

SUMMARY

Transcriptional Analysis of Core Cell Cycle Genes in Developmental Stage and Cold-induced Effects in Maize Leaves

The aim of this study is to analyze cell dynamics along the growth zone (meristem, elongation zone, mature zone) of maize leaves grown at low temperature. To this end, a kinematic analysis of leaf growth was performed. The results indicated that the reduction in leaf growth at low temperature was explained by a decrease in meristem cell production and division rate whereas cell expansion in the elongation zone was only marginally affected. Consequently, we analyzed the transcription of core cell cycle genes under the same environmental conditions. Low temperature resulted in changes in gene transcription level consistent with slower cell cycle progression: the level of several CDKs were downregulated and transcripts of some proteins inhibiting the cell cycle (KRPs, DELs) were upregulated. These results show that cell cycle in mature leaves is affected by low temperature and that understanding these effects at the molecular level may offer new strategies to improve growth and performance of crops under sub-optimum growth temperature.

Key words: *Zea mays* cv. B73, Cell Cycle, Cell Growth, Leaf Development, CDK, KRP, DEL, E2F/DP, Kinematic Analysis, Flow Cytometry, Q-RT-PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Mısır yaprağının model sistem olarak gösterimi..... 4
Şekil 2.	Hücre döngüsünün şemasal gösterimi..... 5
Şekil 3.	Bitkilerde hücre döngüsünün düzenlenmesini gösteren model..... 7
Şekil 4.	Hücre döngüsü aktiviteleri ve bitki gelişimi arasındaki ilişkiyi gösteren model..... 9
Şekil 5.	Kantitatif real-time PCR prensibinin şemasal gösterimi..... 10
Şekil 6.	Mısır fidesi yaprağının büyüme bölgesinin 1 cm'lik 10 parçaya ayrılması.. 13
Şekil 7.	Mısır yaprağında yaprak ayası boyunca dağılan hücrelere ait hücre uzunluğunun dağılımı..... 15
Şekil 8.	Flow sitometrik pikleri gösteren bir diyagram..... 18
Şekil 9.	Öncesinde biraz kalıntıyla birlikte iyi bir amplifikasyonu gösteren tek bir pik veren bir erime eğrisi..... 24
Şekil 10.	Logaritmik ölçekte bir PCR amplifikasyon eğrisi..... 25
Şekil 11.	Üçüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra kaydedilen boy uzunluğu..... 26
Şekil 12.	Dördüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra kaydedilen boy uzunluğu.. 27
Şekil 13.	Üçüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra stres ve kontrol bitkilerine ait ışık periyodu süresince kaydedilen yaprak uzama oranı (YUO)..... 28
Şekil 14.	Dördüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra stres ve kontrol bitkilerine ait ışık periyodu süresince kaydedilen yaprak uzama oranı (YUO)..... 28
Şekil 15.	Stres ve kontrol şartlarında yetiştirilen bitkilerin 3. ve 4. yapraklarının son boyunun (cm) karşılaştırılması..... 29
Şekil 16.	DIC mikroskopuyla belirlenen stresli ve kontrol bitkilerinin hücre boyu profilleri..... 30
Şekil 17.	UV-DIC mikroskopuyla gözlenen nükleusların görüldüğü bir fotoğraf 31
Şekil 18.	Kontrol ve stres bitkilerinin Flow Sitometre ile belirlenen DNA miktarı (%)..... 34
Şekil 19.	Kontrol bitkilerinin yapraklarında, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyesi..... 36
Şekil 20.	<i>rubp</i> (gelişimle ilgili gen), <i>rp6-1</i> (soğukla uyarılan gen) ve referans genlerinin (<i>atpase</i> , <i>mac1</i> , <i>ubi</i>) transkript seviyelerinin, gelişim evrelerinde ve stres altında değişimi..... 38

Şekil 21.	Meristemde, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyelerinde meydana gelen değişim.....	39
Şekil 22.	Uzama bölgesinde, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyelerinde meydana gelen değişim.....	40
Şekil 23.	Olgunluk bölgesinde, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyesinde meydana gelen değişim.....	41



TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış mısır fideleri ile kontrol bitkilerine ait büyütme şartları	12
Tablo 2.	Kantitatif PCR reaksiyonları için gerekli ön karışımının bileşenleri ve miktarları.....	23
Tablo 3.	PCR'ın sıcaklık ve döngü şartları.....	23
Tablo 4.	Kinematik analizler sonucu hesaplanan stres uygulanmış bitkilere ve kontrol bitkilerine ait büyüme parametrelerinin sayısal değerleri.....	33
Tablo 5.	Yapraklarda görev yapan Kompensatör Sistem'i gösteren bazı deliller	44
Ek Tablo 1.	Hücre döngüsü genlerinin dizi tanımları.....	52
Ek Tablo 2.	Hücre döngüsü genleri primerlerinin dizi sıraları	54

SEMBOLLER DİZİNİ

ATPASE	: <i>atpase</i> geni
CDK	: <i>Siklin</i> bağımlı kinaz genleri
CDKA, -B, -C, -D, -E	: <i>siklin</i> bağımlı kinaz genleri A, -B, -C, -D, -E
CKS1,-2	: CDK alt ünite proteinleri 1 ve -2
Ct	: Eşik değerine karşılık gelen döngü sayısı
CYCLIN	: <i>siklin</i>
CYCLINA, -B, -C, -D, -H	: <i>siklin</i> genleri A, -B, -C, -D, -E
\bar{D}	: Hücre bölünmesi oranı
DAPI	: 4'-6-diamino-2-phenylindole
DEL1, -2, -3	: <i>del</i> genleri 1, -2, -3 (CDK inhibitörleri)
DEPC	: Diethylprokarbonat
DIC	: Differential interference contrast mikroskobu (Nomarski mikroskobu)
dsDNA	: Çift zincirli DNA
E2F/DP1, -2, -3	: Transkripsiyon faktörleri
HBO	: Hücre bölünme oranı
KRP1, -2, -3	: Kip bağımlı proteinler 1, -2, -3 (CDK inhibitörleri)
MAC1	: <i>actin</i> geni
$N_{gz,div}$: Büyüme bölgesinde bölünen hücre sayısı
P	: Hücre üretimi
PCR	: Polimer zincir reaksiyonları
Q-RT-PCR	: Quantitative real-time PCR
RBA, -B, -C, -D	: RB proteinleri A, -B, -C, -D, -E
RP6-1	: Rubiloz bifosfataz
RUBP	: <i>rubisco</i> geni
\bar{T}_c	: Hücre döngüsü zamanı
UBI	: <i>ubiquitin</i> geni
WEE1,-2,-3	: <i>wee</i> genleri 1, -2, -3 (CDK inhibitörleri)
YUO	: Yaprak uzama oranı

2C : İki kopya
4C : Dört kopya
8C : Sekiz kopya



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yüzyıllardır bilim adamları canlılığın nasıl meydana geldiği, bir organizmanın nasıl büyüdüğü ve geliştiği gibi sorulara cevap bulmaya çalıştılar. Bu sorular 17.yüzyılda Robert Hooke ve Anton Van Leenwenhoek'un mikroskopi keşfetmesinin ardından çözülmeye başladı. İki yüzyıl sonra onların bu buluşları Matthias Schleiden, Theodor Schwann ve Rudolph Virchow tarafından Hücre Teorisi olarak biçimlendirildi. Bu teori şu üç prensibe dayanmaktadır: (i) hücreler yaşamın temel üniteleridir; (ii) her canlı organizma bir veya daha fazla hücreden oluşmuştur; (iii) ve bütün hücreler daha önce var olan bir hücreden meydana gelmiştir. Bu sebeple büyüme ve gelişimle ilgili sorular hücre üretimi mekanizmasıyla ilgili çalışmalara paralel olarak cevap bulacaktır.

Son yıllarda, hücre teorisine karşıt olarak Organizma Teorisi önerildi. Hücre teorisini destekleyenler, çok hücreli organizmaların morfogeneğinde temel birimi hücrelerin oluşturduklarına inanırlar. Organizma teorisyenleri ise bu fikre karşı çıkarlar (Beemster vd, 2003). Hücre teorisyenlerine göre bütün hücreler bir önceki hücreden meydana gelmektedir. İlk olarak, bir hücre önce kendisini iki katına çıkarır, daha sonrada ikiye bölünür. Bu olaylar, hücre büyümesi ve ardından görülen hücre bölünmesi şeklinde döngü halinde birbirini izler. Bütün bölünmüş bitki hücreleri organları oluşturmak suretiyle birbirlerine plasmodesmata adı verilen köprülerle bağlı olarak kalırlar. Hücrenin kendisini bu şekilde ikiye katlaması ve ardından bölünmesi hücre döngüsü olarak adlandırılır ve tüm ökaryotik canlılarda çok iyi korunmuş bir mekanizma olarak bilinir. Bir hücre belirli bir hacime ulaştığı zaman bölünme için sinyaller oluşturulur. Tam olarak bölünmeyi neyin tetiklediği anlaşılamamış olmasına rağmen bir şekilde hücre büyüklüğünün buna yol açtığı düşünülmektedir. Bütün hücrelerin kesin olarak belirlenmiş büyüklüklerde bölündüğünü gösteren deliller bu fikri desteklemektedir (Beemster vd., 2003). Fakat bu alanda bitkiler üzerinde yapılacak çalışmalar bu iki kavramın daha anlaşılır olmasına yardımcı olacaktır.

Cüce mutantlar üzerinde yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde, mutant organların yabani organlara nazaran daha az hücreye sahip olduğu ortaya çıkar. Hücre teorisyenleri, bu mutant fenotipin oluşmasına hücre aktivitelerinde meydana gelen bazı değişmelerin sebep olmuş olabileceğini ileri sürdüler (Tsukaya, 2002). Organizma teorisyenlerinin bakış

açısına göre ise hücre sayısındaki bu değişim hücrenin kontrolü altında değildir. Çünkü bitki hücreleri plasmodesmataların varlığıyla bir arada tutulduklarından, bitki hücrelerini bireysel hücreler olarak düşünmek yalmış olur. Organizma teorisini anlamaya yardımcı olan diğer bir çalışmada radyasyona maruz bırakılmış bitkiler üzerinde yapılan çalışmalardır. Haber (1962), γ radyasyonuna maruz bırakılmış arpalarda, gelişimini tamamlamış yaprakların büyüklüğünün azaldığı fakat yaprak indeksinin (yaprak uzunluğu ve genişliği) ise aynı kaldığını gördü (Tsukaya, 2002). Hücre sayısının azalmasına rağmen yapraklar normal büyüklüklerini korumuşturlar. Yine, *Arabidopsis*'in hücre döngüsünde anahtar düzenleyici olan *cdc2a* geninde meydana getirilen bir dominant mutasyon, bitkinin büyüme zamanında, morfogenezinde ve histogenezinde herhangi bir olumsuz etkiye yol açmamıştır. Bu deneylerden anlaşıldığı gibi hücre bölünmesi morfogenezisle bağlantılı değildir (Hemerly, 1995).

Sonuç olarak, bu iki teorinin savunucuları arasında bir anlaşma sağlanamadı. Her iki teoride kendi içinde doğruluğa sahip olmasına rağmen, organ morfogenezinin nasıl kontrol edildiği hala aydınlatılmamıştır. Ancak, son yıllarda bu iki teori Yeni Hücre Teorisi olarak adlandırılan yeni bir yaklaşımla birleştirilir. Bu çerçevede, morfogenezin temel birimi olarak hücreler kabul edilir. Ancak, her hücre yine hücrelerden oluşan organların morfogenezini yöneten faktörler tarafından da kontrol edilir (Tsukaya, 2002).

Hücresel seviyede bitkilerin organ büyümesi hücre bölünmesi ve genişlemesi işlevleri sonucu meydana gelir. Dolayısıyla, büyüme ve gelişim ile hücre döngüsü kontrolü arasında bir ilişki olduğu açıkça görülmektedir. Bu sebeple, bu iki işlevi çözümlmek büyümenin hücresel ve moleküler mekanizmasını aydınlatmada çok önemlidir. Bitki büyüme ve gelişimi meristem aktiviteleri sonucu gövde ve kökün her ikisinde de post embriyonik devrede sürekli olarak devam etmektedir. Bu aktiviteler çoğunlukla hormonların vasıtasıyla gelişime bağlı ve çevresel sinyallerle düzenlenir (De Jager, 2005).

Monokotiledon yaprakları büyümenin lineer fazında yaprak büyümesinin çevresel şartlara karşı cevabını incelemede çok iyi bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır (Ben Haj Salah ve Tardieu, 1995). Yaprığın taban kısmında bulunan hücre bölünme olaylarının gerçekleştiği meristem bölgesinden itibaren hücrelerin olgunluğa eriştiği kısma kadar olan kısım büyüme bölgesi olarak adlandırılır. Burada yaprağın kısmi uzama oranı ve yaprağın tabanında bulunan hücrelerin uzunlukları sabit oranda artar (Muller vd., 2001). Bu da hücre bölünmesinin ve genişlemesinin zamana ve konuma bağlı olarak hesaplanmasına imkan sağlar. Bu amaca uygun olarak kinematik analizler geliştirilmiştir. Bu metot, bilinen

bir konumda bulunan dokunun hareket hızını hesaplamak için belirli aralıklarla yapılan ölçümler gerektirmektedir (Silk vd., 1989). Bu yöntem sayesinde monokotiledon yapraklarında hücre döngüsü süresi, bölünme oranı, hücre üretimi ve büyüme bölgesindeki bölünen hücre sayısı gibi hücre bölünmesi parametreleri kolayca hesaplanır. Mikroskopik gözlemlerde olgun hücre uzunluğunun, meristem büyüklüğünün ve meristem hücre uzunluğunun ölçülmesiyle kinematik analizlere yardımcı olur. Çünkü yaprak büyüme bölgesinde bölgesel hızın direkt olarak ölçülmesine imkan yoktur (Fiorani, 2001).

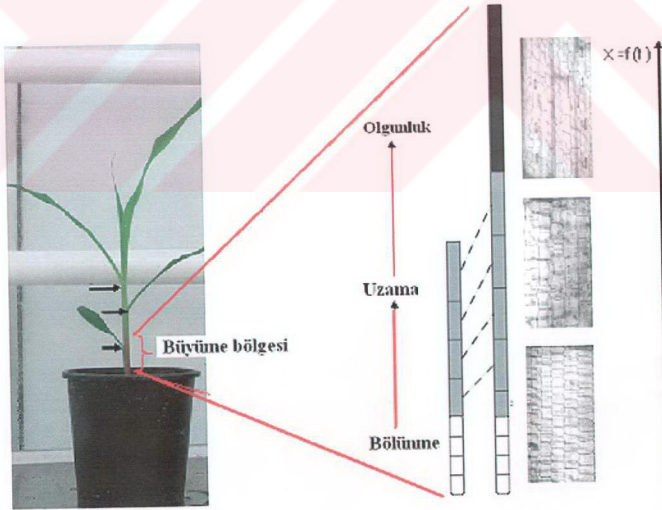
Bitkiler hareketsiz canlılar olduklarından uygun olmayan çevresel şartlara karşı kendilerini savunamazlar. Sıcaklık, ışık ve besin mevcudiyeti gibi çevresel faktörler bitkileri olumsuz olarak etkileyebilir ve strese yol açabilir. Eğer stresin şiddeti yüksekse bitki hayatta kalamayabilir. Bu yüzden bitkilerin büyüme ve gelişim mekanizmalarını çözümlemek için stres fizyolojinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışma, hücre üretiminin azaltılması suretiyle hücre döngüsü üzerinde meydana gelen etkinin, bitki büyüme oranının bu çevresel faktörlerden etkilenmesiyle meydana geldiğini öne sürmektedir. Bitkiler bu etkilere karşı bazı tolerans mekanizmaları geliştirir (Levitt, 1972).

Üşüme stresi en önemli büyüme sınırlayıcılarından birisidir. Özellikle, mısır gibi birçok ekin bitkisi ve tropikal veya subtropikal bölgelerden orjinlenmiş bahçe bitkileri hasara karşı çok duyarlıdır. Bu türlerde soğuk stresi 15°C'nin altındaki sıcaklıklarda meydana gelir. Üşüme hasarı bitki hücreleri içerisinde buz çekirdeklerinin oluşmamasıyla soğuk stresinden farklıdır (0 ve 15°C arası). Düşük sıcaklık, tohum çimlenmesi ve büyümesi, fotosentez, çiçeklenme, bitki büyümesi ve dane verimi gibi geniş ölçüde birçok işlevi şiddetli olarak etkilemektedir (Ercoli vd., 2003). Ayrıca düşük sıcaklıklar membran lipid muhtevasını değiştirerek membranda hasara sebep olur (Lee vd., 2005). Membran hasarı sonucu iyon alınımlar mekanizması değişikliğe uğrar (Shabala vd., 2001).

Bu çalışmada, mısır fidesinin yaprak gelişiminin hücresel ve moleküler seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. Mısır bitkisi sıcaklık değişimlerine çok duyarlı olduğundan çalışmalarda düşük sıcaklık faktörü kullanılarak karşılaştırmalı araştırmalar yapılacaktır. Yaprak büyümesi, hücre bölünmesi ve genişlemesiyle kontrol edilen bir mekanizmadır. Burada kinematik analizler kullanarak, hücre bölünmesi parametreleri belirlenecektir. Kinematik analizlerde kullanılmak üzere mısır fidesinin morfolojik ve mikroskopik gözlemleri yapılacaktır. Düşük sıcaklığın etkisi olarak bitkide endoduplikasyon olup olmadığı Flow Sitometre ile araştırılacaktır. Moleküler seviyede ise, hücre döngüsünde yer alan başlıca genler belirlenerek, bu genlerin transkript analizleri yapılacaktır.

1.2. Yaprak Büyümesi ve Hücre Bölünmeleri Arasındaki İlişki

Çim bitkilerinde yaprak büyümesi longitudinal aksis boyunca meydana gelir. Bu aksis boyunca yaprak uzunluğu düzgün olarak arttığı için, büyümenin bu linear safhasında belirli zaman aralıklarında yaprak uzunluğunu ölçmek mümkündür. Monokotiledon yapraklarının büyüme bölgesi, bölünme zonu ve uzama zonundan oluşur (Şekil 1). Büyüme zonunda, burada bulunan interkalar meristem faaliyetleriyle hücre bölünmeleri meydana gelir ve bölünmesini tamamlamış hücreler daha sonra uzama bölgesine geçerek simültane olarak genişlerler. Dolayısıyla her bir hücre, meristemin taban kısmında devam eden hücre bölünmeleri sonucunda üretilen hücreler tarafından itilerek bir üst zona doğru yer değiştirirler. Uzama bölgesine giren hücreler bölünme özelliklerini kaybederler. Bu bölgede hücreler sadece genişlerler. Genişlemesini bitiren hücreler olgunluğa ulaşırlar. Her bir hücre büyüme aksisi boyunca bu gelişim basamaklarını takip ederek ilerler. Büyüme bölgesinin bitişinde olgunluk zonu yer alır ve burada doku olgunlaşması meydana gelir (Fiorani, 2001).



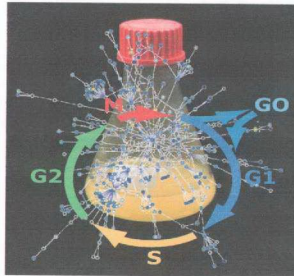
Şekil 1. Mısır yaprağının model sistem olarak gösterimi

1.3. Hücre Döngüsü

Hücre, büyüklük bakımından belirli bir sınıra ulaştığı zaman bölünmek zorunda kalır ve çevresinden bölünmek için sinyaller almaya başlar. Hücrenin büyüklüğünün artmasıyla fizyolojik faaliyetleri için harcadığı enerji iki katına çıkacağı için metabolik aktiviteleri yetersiz kalacaktır. Ayrıca gerilen hacimde meydana gelen artışın hücre zarının gerilmesine yol açtığı için hücre parçalanmamak için kendisini iki eş parçaya ayırarak devamlılığını sağlar (URL-1, 2006).

Hücre bölünmesi olayına mitoz adı verilir. Mitoz bölünmenin amacı kalıtım materyalini eşit olarak kardeş iki hücreye dağıtmaktır. Mitoz bölünme sürekli bir durum olmasına rağmen izlemede kolaylık olması açısından onu evrelere ayırmak mümkündür. Hücredeki tüm yapıların ikileşerek, daha sonra iki yavru hücreye verilmesini sağlayan bu evrelerin tümü Hücre Siklusı (Hücre Döngüsü) olarak adlandırılır. Bir hücre döngüsünde genel olarak hücrenin büyümesi ve ardından bölünmesi meydana gelir.

Mitozun ilk evresi, DNA replikasyonunun olduğu S fazıdır. İkincisi ise iki katına çıkan genetik materyalin eşit olarak iki kardeş hücreye bölündüğü M fazıdır. Bu iki evre arasında G1 ve G2 olarak adlandırılan iki boşluk fazı bulunmaktadır. G1, S ve G2 hep birlikte hücre döngüsünün interfaz bölümünü oluşturmaktadır. G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlar. Ribozomlar, enzimler, membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılır. S fazında, DNA replikasyonu ile her kromozomun kopyası yapılır ve kromozom sayısının ikiye katlanması sağlanır. G2 fazı, büyümenin ve sentezin ikinci dönemi olarak mitozun başlamasına öncülük eder (URL-2, 2006). Şekil 2'de hücre döngüsü şema ile gösterilmektedir.



Şekil 2. Hücre döngüsünün şemasal gösterimi

İnsanın deri hücrelerinde olduğu gibi bazı hücrelerin döngü süresi devamlıdır. Sınır hücreleri gibi diğer bazı hücreler ise G1 fazından çıkarak hiçbir zaman bölünmenin olmadığı duruma geçerler. Bu faz G0 olarak bilinir. Beyaz kan hücreleri gibi diğer hücreler G0 fazından çıkıp tekrar hücre döngüsüne girerek kendilerini yenileyebilirler.

Hücre döngüsü süresi (iki mitotik bölünme arasındaki süre) organizmalar arasında çeşitlilik gösterir. Organizmaların yaşam döngülerinin farklı basamakları arasında ya da aynı organizmanın farklı hücre tipleri arasında da hücre döngüsü süresi farklılık gösterir. Örneğin, hayvan hücre döngüsünün tahmini süresi birkaç dakikadan birkaç aya kadar olabilir. Bu değişkenlik G1'de harcanan süreden ileri gelmektedir. Diğer yandan S ve G2'nin tamamlanması için gerekli olan süre birçok hücre çeşidinde göreceli olarak sabittir. Bu sürelerin tamamlanmasıyla mitoz hızlı bir şekilde, bir saatten az bir sürede tamamlanır. Zamanın büyük bir bölümü hücre döngüsü sırasında, interfazda harcanır.

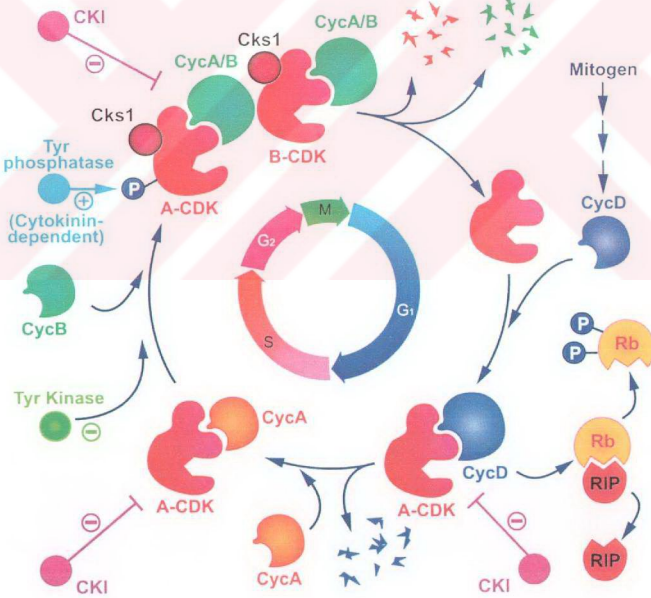
1.4. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

Ökaryotik hücreler, genomun kendini eşlediği *DNA replikasyonu* (S fazı) ve genomun birbirinin aynı iki kardeş hücreye bölündüğü *mitoz* (M fazı) olmak üzere başlıca iki olaydan sonra oluştururlar. Bu iki faz, boşluk fazları olan G1 ve G2 olarak adlandırılan iki fazla ayrılırlar. Hücre döngüsü esnasında genom kararlılığını sağlamak için G1/S ve G2/M fazları arasında iki kontrol noktası vardır. Hücre döngüsü özel bir sınıf olan serin-treonin protein kinazları tarafından düzenlenirler. Bu proteinler aktive edilebilmeleri için kendilerine uygun Siklin'ler olarak adlandırılan düzenleyici proteinlere bağlanmaya ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden hücre döngüsü düzenleyicileri siklin bağımlı kinazlardır ve kısaca CDK'ler olarak adlandırılırlar. Bu protein kompleksleri CDK aktifleyici kinazların (CAK) fosforilasyonu ile aktifleşirler. Yine bu kinazların aktivasyonu, WEE1 kinazlar tarafından fosforillenmeyle veya inhibisyon proteinlerinin [Kip-bağımlı proteinler (KRP)] bu komplekse bağlanmasıyla inaktif hale gelirler. CDK alt ünite proteinleri (CKS) hedef substratla etkileşim halindedir (Dewitte ve Murray, 2003). E2F ve DP proteinleri (transkripsiyon faktörleri) ise hücre döngüsünün ilerleyişini düzenleyen Rb proteinleriyle etkileşim halindedir. Bütün bu proteinler genel olarak ana hücre döngüsü proteinleridir ve farklı kategorilerde sınıflandırılırlar. Bu sınıfta sırasıyla, Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK), CDK Aktifleyici Kinazlar, Siklin'ler, CDK İnhibitörleri, CDK Alt Üniteleri, Retinoblastoma Protein'leri (Rb) ve E2F/DP'ler yer alır (Van de Poele vd., 2002). Şekil

3'de hücre döngüsünün düzenlenmesinde bu genlerin görev mekanizmaları model olarak gösterilmektedir.

Eğer hücre kendini ikiye katladığı halde karyokinezis gerçekleşmezse hücreler mitoz safhasından çıkmış olur ve bu olay endoduplikasyon olarak adlandırılır. Endoduplikasyon genellikle birçok bitki türünün olgun dokularında görülür ve özellikle bitkilerde endosperm gelişimi sırasında meydana gelir

Hücre döngüsünde bu düzenleyici genlerinin her birinin *G1/S* ve *G2/M* geçişleri arasında özel görevleri vardır. *G1*'den *S* fazına geçiş başlıca D-tipi cyclin'ler tarafından kontrol edilir. *G2/M* geçişi ve mitoz CDKA, CDKB, CYCA, CYCB kinaz aktivitesi ile kontrol edilir. Mitozun ilerleyişi ise CDK komplekslerinin mikrotübüller ve kromatin yapılarıyla birleşmeleriyle sağlanır. KRP, DEL, WEE1 gibi CDK-inhibitörlerinin endoduplikasyona sebep olduğu gösterilmiştir.



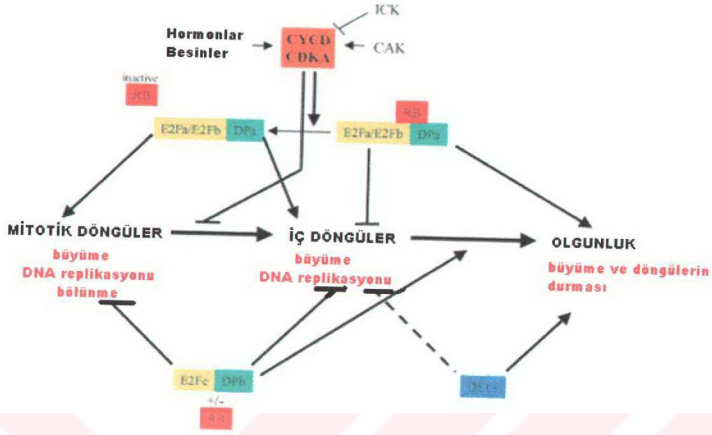
Şekil 3. Bitkilerde hücre döngüsünün düzenlenmesini gösteren model

1.5. Yaprak Gelişimi Sırasında Hücre Döngüsünde Meydana Gelen Değişimler

Bitkilerde hücre bölünmesi üzerinde yapılan çalışmalar, 1980'lerde hücre döngüsü mekanizmasının aydınlatılmasıyla hızla ilerlemeye başlamıştır. Hayvanlarda ve mayalarda aydınlatılan hücre döngüsü genlerinin bitkilerdeki homologlarının tanımlanmasının ardından, bu genlerin klonlanması gibi birçok çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Böylece tam genom dizisi bilinen *Arabidopsis thaliana*'ya ait 61 hücre döngüsü geni tanımlanmıştır (Vandepoele vd., 2002). Hücre döngüsü genlerinin gelişim süresinde görevlerinin tam olarak aydınlatmak için, bu genlerin ekspresyonunun baskılanması veya tam tersi olarak ekspresyonlarının artırılmasıyla bitkide meydana gelen değişimler izlenmektedir. Hücre döngüsü genlerinin ekspresyon seviyelerinin genetik manipülasyonlarla kontrol edilmesiyle bitkide hücre bölünmelerinin seyri değiştirilebilir.

Yaprak gelişimi hücre döngüsü aktivitelere göre üç safhadan oluşmaktadır. Bunların ilki, hücre büyümesinin, DNA replikasyonunun ve hücre bölünmelerinin olduğu mitotik safhadır. İkincisi, iç döngüler olarak adlandırılan, hücre büyümesinin ve DNA replikasyonunun meydana geldiği ancak hücre bölünmesinin gerçekleşmediği safhadır. Son safha ise, olgunluk safhasıdır. Hücre olgunluk safhasına girdiğinde ergin halini almış olur. Bu safhada hücrenin büyüme ve bölünme faaliyetleri durmuştur. Hücre döngüsü aktivitesinin ve yaprak gelişiminin üç safhası (mitotik, iç döngüler ve olgunluk) arasındaki ilişki Şekil 4'deki şemada gösterilmektedir (De Jager, 2005).

Erken yaprak primordiumlarında aktif CYCD-CDKA komplekslerinin görevi sonucu hızlı mitotik döngülerle hücre sayısında bir artış meydana gelir. RB proteinlerinin CYCD-CDKA kompleksleri (CAK ve ICK/KRP proteinleri tarafından düzenlenir) tarafından fosforilasyonu hücre döngüsü sırasında mitotik ve iç döngülerin her ikisinin de devamını sağlayan E2F komplekslerini aktif eder. *e2fc*, E2F sınıfından farklılaşmayı sağlayan bir inhibitör genidir. Mitotik fazdan iç döngüler fazına geçiş CYCD aktivitesinin bir alt düzenlenmesini gerektirir. *cycd*'ın aşırı ekspreslenmesi bu dönüşümü inhibe eder. İç döngüler fazı G-S-G döngüleriyle karakterize edilir. Bu faz E2F aktivitesi tarafından yürütülür ve normal G1 (CYCD) ve G2/M (CYCB) düzenleyicilerinin ekspreslenmediği zaman görülür. Bitkilerde son olarak farklılaşma ve olgunluk safhası meydana gelir. Bu olay, yüksek RB ve RB bağımsız bir yolla E2F ile etkileşim halinde olan genlerin faaliyetlerini engelleyen inhibitör bir gen olan *del* tarafından yürütülmektedir (Şekil 4).

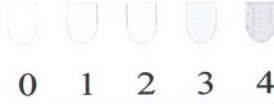


Şekil 4. Hücre döngüsü aktiviteleri ve bitki gelişimi arasındaki ilişkiyi gösteren model

1.6. Kantitatif RT-PCR (Real-Time Quantitative-RT-PCR)

Kantitatif RT-PCR (Real-time Quantitative-RT-PCR) reaksiyon tüpüne ilave edilen primere komplementar olan cDNA'nın miktarını belirleyebilen bir tekniktir. Bu teknik, denaturasyon, primerlerin bağlanması ve uzama olmak üzere başlıca üç adımdan oluşur. Normal PCR' la sadece sonuç noktası belirlenebilirken, Q-RT-PCR amplifikasyon döngüleri boyunca DNA'nın nispi miktarını gösterebilir. Q-RT-PCR prensip olarak yeni sentezlenmiş DNA'ya bağlanarak, ürünün miktarıyla doğru orantılı olarak floresans veren SYBR Green adlı molekülün tespitine dayalıdır. Kesişim noktalarının [Ct (threshold cycle)] değerlerini karşılaştırarak, artan ürünün miktarını birbirleriyle nispi olarak belirlenebilir. Ct değeri, amplifikasyonun üstel olarak arttığı faz esnasında belirli bir eşik değerine ulaşmak için gerekli döngü sayısıdır. Her durumda, PCR işlemi bittikten sonra reaksiyonların özgünlüğü ürünün elektroforezle, erime eğrileriyle ve sekans bilgileriyle kontrol edilebilir. Şekil 5'de. kantitatif real-time PCR prensibi şemasal olarak gösterilmektedir.

①



Konsantrasyon

Özgünlük

+ **florokom**
(RCR ürünü sentezlendiğinde floresans verir)
+ **spesifik primerler**
(reaksiyon karışımı dNTP, taq ve tampon içerir)

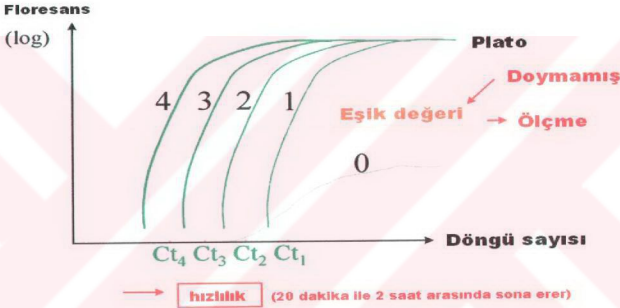
ÖRNEKLER

(Spesifik hedefi içeren DNA veya cDNA)

②

PCR REAKSİYONLARI

Duyarlılık



③

ÖLÇME $Ct_n = f$ (Hedef sekansın başlangıç miktarı)

↳ Bilinen miktarın kalibrasyon serileriyle karşılaştırma yapılırsa, hedef sekansın başlangıç miktarı bulunur. (kopya sayısı)

Şekil 5. Kantitatif real-time PCR prensibinin şemasal gösterimi. (1) Kantitatif PCR farklı örneklerde bulunan hedef gen ürününün farklı miktarlarını tam ve doğru şekilde ölçmek için kullanılır. Kantitatif RT-PCR'la ise ilk önce RNA örneklerinden cDNA sentezlenir. (2) İçerisindeki reaksiyon karışımında sadece spesifik bir ürünün fark edildiğinde veya sentezlendiğinde ışık veren florokomu bulunduran her bir örnek aynı anda PCR amplifikasyonuna maruz kalır (Şekil 2). Floresan eşiği, amplifikasyon veriminin en iyi olduğu eğrinin lineer kısmına denk gelecek şekilde ayarlanır. 'Ct' değeri bu floresan eşiğine varmak için gerekli olan döngülerin sayısıdır. $Ct=f$ (\log_{10} özel hedefin başlangıç konsantrasyonu). (3) Spesifik hedefin bilinen başlangıç miktarı kullanılarak paralel koşullardan bir kalibrasyon eğrisi çizilir. Bu da istenilen örnekte mevcut olan hedef ürünün miktarının hesaplanmasına yardımcı olur (Gachon vd., 2004).

1.7. Üşüme Hasarı

Bitkilerde üşüme hasarı 15 ve 0°C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelir. Bu sıcaklıklarda hücre içerisinde buz çekirdeklerinin oluşmamasından dolayı soğuk stresi üşüme hasarından ayrılır. Özellikle tropik ve subtropik bölgelerde yetişen bitkiler üşümeye karşı daha duyarlı olduklarından, buradaki bitkilerin gelişimi için çok önemlidir. Tahıl bitkilerinin büyüme ve gelişimleri sırasında üşüme stresinden etkilenmelerine rağmen, üründe aşırı bir kayıp gözlenmez. Yine, üşüme ürün hasadı sonrasında da bazı tarım ürünleri için önemli bir faktördür. Çünkü birçok meyve ve sebze düşük sıcaklıklarda depolandıklarında tazeliklerini koruyamayıp bozulurlar (Ercoli vd., 2003).

Üşüme hasarlı bitkinin büyüme ve gelişim sürecinde şu olaylar gözlenir;

- Yüzey lezyonları (turunçgillerde ve salatalıkta),
- Dokunun su emmesi (biberde, mantarda ve üzümde),
- Su kayıpları, kuruma ve bütülme,
- İç kısımlarda renk kayıpları,
- Doku parçalanmaları,
- Meyvelerin olgunlaşmasının durdurulması veya yavaşlatılması,
- Etilen hormonu biriktirilmesiyle senesensin meydana gelmesi,
- Depolanma yarı ömrünün kısalması,
- Kuru madde bileşenlerinin kompozisyonunun değiştirilmesi,
- Büyüme kapasitesinin kaybedilmesi,
- Solma,
- Bitki metabolitlerinin akışı yüzünden çürüme başlatılır. Bu durum bitki üzerinde mikroorganizmaların özellikle mantarların büyümesini teşvik eder.

2. YAPILAN ÇALIŞMAR

2.1. Bitki Materyali ve Büyüme Şartları

Mısır daneleri (ıslah tür *Zea mays*. cv. B73) çimlenmeleri için 51 adet kuyu içeren çimlendirme kaplarına dikildi. Çimlendirildikten sonra fideler, 2 litre kapasiteli besin elemanlarınca zenginleştirilmiş özel toprak içeren saksılara transfer edildiler. Daha sonra fideler büyüebilmeleri için yeterli ışığın, sıcaklığın ve nemin tam olarak kontrol edilebildiği iklim dolabına yerleştirildiler. Bu iklim dolabında bitkiler bir çeşit çevresel stres olan soğuk uygulamasına tabi tutuldular. Bitkilere, düşük sıcaklık muamelesi için 16 saatlik ışık periyodu süresince 25°C ve 8 saatlik karanlık periyodu süresince ise 6 saat boyunca 4°C sıcaklık uygulamasına maruz kaldılar. Kontrol durumunda ise, bitkilere, 16 saatlik ışık periyodunda 25°C ve 8 saatlik karanlık periyodunda ise 6 saat 18°C sıcaklık uygulaması yapıldı. Tablo 1'de stres ve kontrol bitkilerine ait yetiştirme şartları verilmiştir.

Tablo 1. Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış mısır fideleri ile kontrol bitkilerine ait büyüme şartları

Zaman	Fiziksel uygulama	Stres	Kontrol
0.00 h	0	4°C	18°C
0.00 h	1	70%	70%
4.00 h	0	4°C	18°C
5.59 h	2	0%	0%
6.30 h	2	100%	100%
6.30 h	0	25°C	25°C
21.30 h	0	25°C	25°C
21.30 h	2	100%	100%
22.00 h	2	0%	0%
23.59 h	0	4°C	18°C
23.59 h	1	70%	70%

*0, Sıcaklık, *1, Nem, *2, Işık

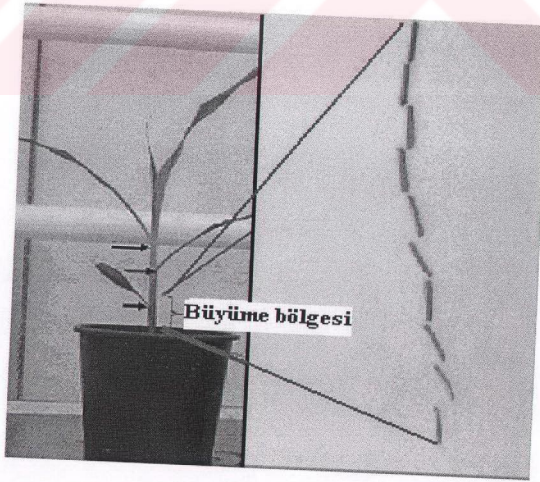
2.2. Yaprak Boyunun Ölçülmesi

Yaprağın büyüme parametrelerini gözlemek için üçüncü ve dördüncü yaprakların ortaya çıkmalarından itibaren büyümelerinin durduğu ana kadar günde iki kez ölçüldüler. Ölçümler, kontrol ve stres grupları için ayrı ayrı yetiştirilen 12 bitki üzerinde yapıldı. Yaprak uzama oranı (YUO), belirli zamandaki yaprak uzunluğuna ait eğrinin türevi alınarak hesaplandı.

$$YUO = \frac{YU_2 - YU_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

2.3. Hücre uzunluğunun ölçülmesi

Bitkinin dördüncü yaprağı ortaya çıktıktan sonra bitkiler hasat edildi. Dördüncü yaprak dışarısından kendisini çevreleyen yapraklardan ayrıldıktan sonra 1 cm'lik segmentler halinde parçalar ayrıldı (Şekil 6). Kesim işleminden sonra bu parçalar klorofilin uzaklaştırılması ve fiksasyon için iki gün etanol içerisinde bekletildi.



Şekil 6. Mısır fidesi yaprağının büyüme bölgesinin 1 cm'lik 10 parçaya ayrılması

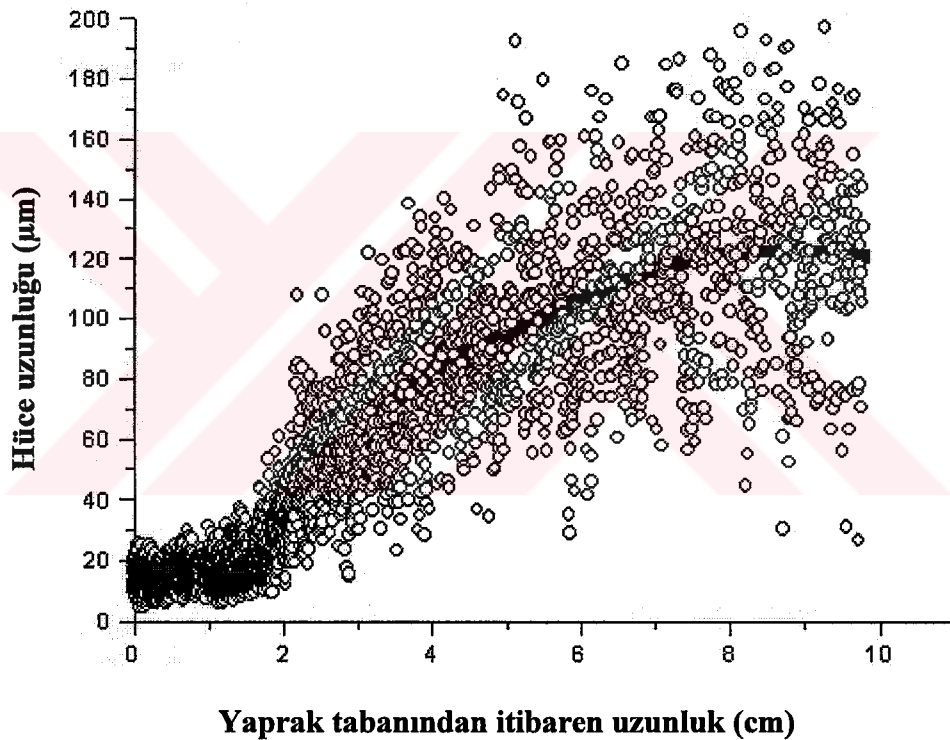
Daha sonra parçalar, temizlenmesi, saklanması ve mikroskop preparatlarının hazırlanması için, içinde %90'luk laktik asit bulunan cam şişelere konuldu.

Hücre uzunluğu, adaksial epidermiste bulunan stoma hücrelerine bitişik birbirine eş değerde hücre bulunduran, farklı iki sırada yer alan hücrelerin, yaprak tabanından başlanarak yaprağın uç kısmına doğru ilerlenerek DIC (differential interference contrast) mikroskop kullanılarak ölçüldü. Düzenek bir ışık mikroskobuna (Axioscope, Zeiss, Germany) bağlı siyah beyaz WC-CD50 tipi bir fotoğraf makinesinden oluşmuştur. Mikroskoptaki görüntü fotoğraf makinesi sayesinde televizyon ekranından takip edilebildi. Daha sonra bu görüntü bilgisayara aktarılarak ScionImage (Scion Corp., USA) programının yardımıyla analiz edildi. Bireysel hücrelerin uzunluğu ise ayrı bir görüntü analizör programı olan ImageJ (NIH tarafından geliştirildi) kullanılarak bir hücrenin çeperinden diğer hücrenin duvarına kadar ard arda dizili hücreler buldukları sıra boyunca ilerlenerek teker teker ölçüldü (URL-1, 2005). Farklı bireylere ait yapraklar arasındaki sonuçların ortalaması alındı ve stresli bitkilerle kontrol bitkilerin hücre uzunlukları birbirleriyle karşılaştırıldı. Kalibrasyon için cetvel bulunan bir mikroskop lamının aynı büyüklükte fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraf ImageJ ile belirlenen bir hücrenin uzunluğunun gerçekte neye karşılık geldiğini bulmak için kullanıldı. Yaprak eksenini boyunca hücre uzunluğu dağılımı grafik yapılarak gösterildi. Yaprak tabanındaki hücrelerden başlanarak her bir hücrenin orta noktası hesaplanıp grafiğin X-ekseni oluşturuldu. Y-eksenine ise, X-ekseninde bulunan hücrenin pozisyonundaki hücrelerin ortalama hücre uzunlukları yazıldı. Her yaprakta iki sıra hücre ölçüldü. Öncelikle bu iki hücre sırasında aynı konumda bulunan hücrelerin uzunluğunun ortalaması alındı. Daha sonra bu değerler Kernel Smoothing metodu kullanılarak 50 µm eşit aralıklar kullanarak bunlara karşılık gelebilecek değerler hesaplandı (Beemster ve Baskin, 1998). Bu metodu geliştirmek için Microsoft Visual Basic 5 kullanılarak Microsoft Excel ile tamamlandı (Microsoft, Redmond, WA). Kernel Smoothing kullanılarak elde edilen sonuçlardan yapılan bir grafik Şekil 7'de sunulmuştur.

Büyüme bölgesinin uzunluğu, yaprak tabanından itibaren, olgun hücrelerin uzunluğunun %95'e ulaştığı noktaya kadar olan uzaklık olarak hesaplandı. Daha sonra farklı bireylerin yapraklarına ait bu değerlerin ortalaması alınarak takip eden hesaplamalarda kullanıldı.

2.4. Meristem Uzunluğunun Hesaplanması

Yaprak dokusu klorofili uzaklaştırıldıktan sonra mikroskop lamı üzerine yerleştirildi ve dokunun üzerine, içerisinde DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole) bulunan nükleus boyayıcı tampondan bir damla damlatıldı. DAPI floresan işaretçisi olarak kullanılır. DAPI, DNA'ya bağlanan ve 460–350 nm dalga boyundaki ışıkları emebilen bir tür boyadır. Hücre uzunluğunun ölçülmesinde kullanılan görüntüleme sistemi yine aynı şekilde burada da kullanılmıştır. Stoma hücrelerine bitişik hücre sıraları yaprağın tabanından ucuna kadar takip edilerek mitotik şekiller gözlenmiştir. Meristem sınırı en uzakta bulunan mitotik şeklin görüldüğü yere kadar olan kısım olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Mısır yaprağında yaprak ayası boyunca dağılan hücelere ait hücre uzunluğunun dağılımı (adaksial epidermis; 4. yaprak). Koyu renkli olan çizgi 50 µm aralıklar kullanılarak Beemster ve Baskin (1998)'in tanımladığı Kernel Smooting algoritmasıyla hesaplanmıştır

2.4.1. DAPI ile Nükleus Boyanması

Nükleusları boyamak için ilk önce DAPI boyama tamponu (50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, pH 7) çözeltileri hazırlandı. Burada kullanılan DAPI

konsantrasyonu 0,5 ile 2,0 µg/ml arasında olmalıdır. Bu çalışmada 1 µg/ml kullanıldı. Yaprak parçaları, klorofili uzaklaştırmak ve fiske edilmek için 3:1 (v:v) etanol:asetik asit karışımı içerisinde 25 saat 4°C'de bekletildi. Doku örnekleri 3 kez tamponla yıkandı. Örnekler 20 dakika DAPI-tamponuyla 4°C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

2.5. Büyüme Bölgesinde Bölünen Hücre Sayısının, Hücre Üretimini, Hücre Bölünme Oranının ve Hücre Döngüsü Zamanının Sayısal Analizleri

Yaprak uzama oranı hesaplarına ve mikroskopik gözlemlere dayanarak hücre uzunluğu dağılımı, meristem uzunluğu ve hücre üretimi, bölünme oranı, döngü süresi, büyüme bölgesindeki bölünen hücre sayısı gibi büyüme parametreleri kinematik bir yaklaşımla hesaplanabilir (Fiorani, 2001). Sıra başına düşen hücre sayısı büyüme bölgesinde N_{gz} ve bölünme bölgesinde N_{dz} olarak gösterilir ve aşağıdaki eşitliğe göre bölgesel hücre uzunluğu $[l(x)]$ 'na karşılık gelen bölgedeki hücre yoğunluğunun $[\rho(x)]$ hesaplanmasıyla hesaplanır.

$$N_{gz,div} = \Delta x \sum_n \frac{\rho(n\Delta x) + \rho[(n-1)\Delta x]}{2} \quad (2)$$

Burada $n=1,2,3,\dots$ ve Δx ise hücre uzunluğu ölçümlerinde tanımlanan Kernel Smoothing uygulamasından elde edilen değerlerdir.

Bölünme zonunda bölünmüş hücreler meristemin taban kısmında devam eden hücre bölünmeleriyle oluşan hücrelerin yukarı doğru itmesiyle bulunduğu bölgeden daha uzak bölgeye kayacaktır. Uzama zonunun tabanında biten meristemdeki hücre sırası başına düşen hücre üretimi (P ; saatte üretilen hücre) aşağıdaki formülle belirlenir;

$$P = \frac{YUO}{l_m} \quad (3)$$

Burada l_m olgun hücrelerin uzunluğunu (yaprığın olgun kısmındaki hücrelerin uzunluğunun ortalaması alınarak hesaplanmıştır) gösterir. Sabit oranda büyümenin olduğu sürede birim zamanda büyüme zonundan ayrılan hücrelerin sayısı uzama zonunun tabanından bu bölgeye giren hücre sayısına eşittir. Hücre üretimi ve bölünme bölgesindeki

hücrelerin sayısı bilindikten sonra meristemdeki hücre bölünmesinin ortalama oranını (\bar{D}); birim zamanda her hücre başına düşen hücre oranı) aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Beemster ve Baskin, 1998).

$$\bar{D} = \frac{P}{N_{div}} \quad (4)$$

Aynı anda bölünen hücrelerden oluşan bir populasyonda, hücre döngüsünün süresi, ortalama bir hücrenin döngüyü tamamlayabilmesi için geçen zaman, diğer bir ifadeyle populasyonun büyüklüğünün iki katına çıkartılması için gerekli zamandır (Granier ve Tardieu, 1998). Bu ilkeyle, hücre döngüsü işleminin normal doğası gereği her defasında mevcut hücre sayısının iki katı kadar hücre üretildiğini var sayarsak ortalama olarak bir hücre döngüsü için geçen süre (\bar{T}_c ; saat) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Fiorani, 2001).

$$\bar{T}_c = \ln(2) \frac{N_{div}}{P} \approx 0.69 \frac{1}{D} \quad (5)$$

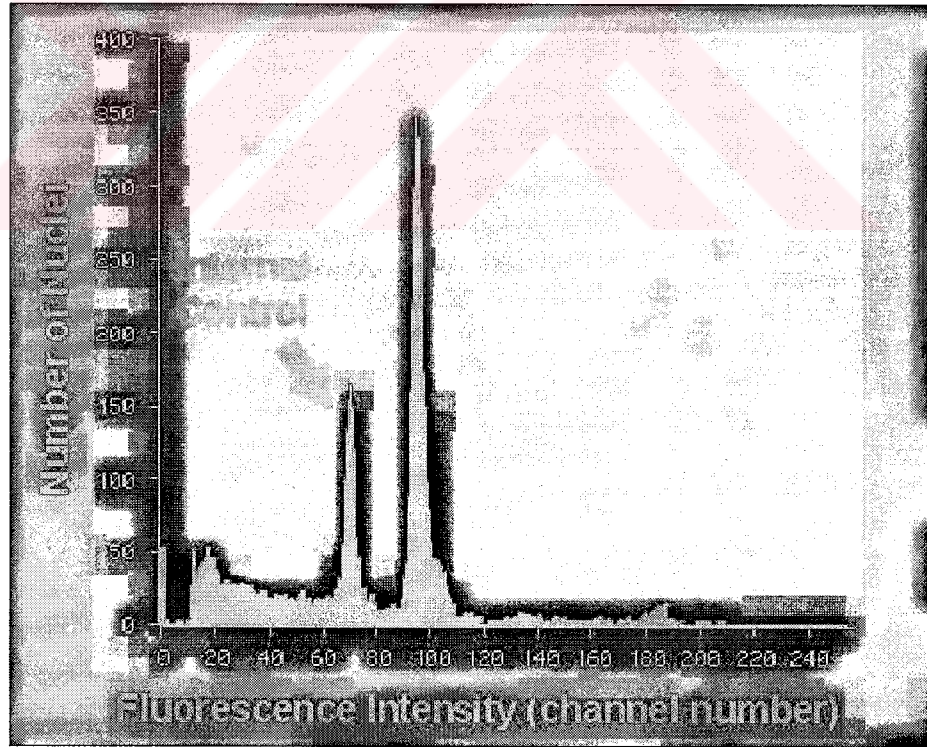
2.6. Flow Sitometri

Flow sitometri büyüme zonunda bulunan DNA miktarını belirlemek için kullanıldı. Bu deneyde kullanılan flow sitometre cihazı FloMax yazılımıyla birlikte CyFlow analizöre sahip bir Partec flow sitometre çeşitli bileşenden oluşur. Bunlar, uyarıcı bir kaynak, ışık emebilen bir filtre ve bir detektördür. Uyarıcı kaynak olarak genellikle belirli dalga boyunda ışık veren bir lazer kullanılır.

Dördüncü yaprak ortaya çıktığı zaman, yapraklar hasat edildi ve yaprağın tabanından başlayarak 1 cm'lik 10 parçalara ayrıldı. Bu on parçanın her biri ayrı ependorf tüplere koyuldu. Bu tüpler ise daha sonra yapılacak olan flow sitometrik analizlerde kullanılmak üzere çok vakit geçirmeden direk olarak sıvı azota bırakıldılar. Yaprak parçaları, bir petri kabına koyulup üzerine de 1 ml Partec Tampon'u (%0,1 Triton X-100, 4 mM MgCl₂ ve 200 mM Tris-HCl, pH:7,5) ilave edilerek jilette küçük parçalara doğranır (Dilkes vd., 2001). Tamponun soğukta muhafaza edilmesi önemlidir. Yaprak parçalarının

doğranmasıyla nükleuslar serbest hale gelir ve tampon sayesinde izotonik bir ortam sağlanarak nükleusun dağılması önlenir. Daha sonra bu süspansiyon 30 μm 'lik bir naylon filtreden szdrlr. Bu sayede parçalar filtrede tutulur ve içerisinde nükleus bulunan sznt 3 ml'lik örnek tüpünde biriktirilir. Bu süzüntüye 1 μl DAPI (1mg/ml) ilave edildikten sonra analiz edilmek üzere CyFlow analizöre yerleştirilir. Flow Sitometre, uyarıcı kaynağı sayesinde DAPI'nın ışık emmesine oransal olarak verdiği floresansa bağlı olarak belirli bir hücrede bulunan nükleus miktarını aşağı yukarı tespit edebilir. Sıvı akışkan lazere geçer. DAPI ile işaretili nükleus lazere geçtiği zaman, florokom çıkarılır ve uyarıcı ışıktan (floresans) daha uzun dalga boyundaki ışık filtreler tarafından emilecektir. Daha sonra bir detektör filtrelerin emdiği ışığın dalga boyunu ler.

Flow Sitometre ile tespit edilen floresans miktarı hücrelerin DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Bilgisayarla sayılan her hücre başına düşen floresans miktarının yoğunluğunu grafik halinde gösterir. FloMax yazılımı otomatik olarak bu floresansı fark eder ve grafikte gözle kolayca fark edilebilen pikler oluşturur Şekil 8. Bu yolla, 2, 4 ve 16C vb. oransal olabilen DNA miktar belirlenebilir.



Şekil 8. Flow sitometrik pikleri gösteren bir diyagram

2.7. Hücre Döngüsü Genlerinin Transkript Analizleri

Ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere, dördüncü yaprak, yaprak uzunluğu ölçülmesiyle tespit edilen, sabit büyüme evresinde hasat edildi. İlk yarım cm, beşinci ve onuncu cm (sırasıyla meristem, uzama bölgesi ve olgun zona ait) kesildi ve ependorf tüplere koyuldu. Daha sonra vakit geçirmeden direkt olarak sıvı azot içerisine koyuldu. Mısır yaprağının farklı gelişim evrelerinden, stres ve kontrol uygulanmış grupların her birine ait örnekler RNA izolasyonunun ardından, RNA'nın temizlenmesi, cDNA sentezi ve Q-RT-PCR işlemleriyle aşağıda açıkça anlatıldığı gibi işlem görmüştür.

2.7.1. RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu TRIzol metodu kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak bitkinin meristem, uzama ve olgun kısmından alınan örnekler sıvı azot içerisinde iyice toz haline gelene kadar öğütüldü. Örneklerin çözünmeden kalmasına dikkat edildi (örnekler buz içerisinde muhafaza edildi). Daha sonra bitki 1 ml TRIzol ayırıcıyla (her 50–100 mg doku için) homojenize edildi. Trizol fenol ve guanidin izotiosinat'ın tek fazlı solüsyonudur. Bu ayıraç hücreyi parçalayıp hücre bileşenlerini serbest hale geçirirken RNA'nın kararlılığını korur. Ayrıca TRIzol ayırıcı kansorejen bir madde olduğundan, çalışırken vücudun herhangi bir yerine temas etmesinden kaçınılmalıdır. Doku örnekleri bu işlemin ardından doku iyice çözünene kadar vorteksle karıştırıldı. Bundan sonraki işlemlerde oda sıcaklığında yürütüldü. Homojenize edilen doku örnekleri 5 dakika için oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, inkübasyona bırakılmış doku örneklerinin üzerine her 1 ml TRIzol ayırıcı için 200 µl kloroform koyuldu. Kloroform proteinleri ve organik fazda bulunan diğer kirliliğe sebep olan maddeleri çözmek için kullanıldı. RNA ise kloroform tarafından çözünmeden kalabilir. Tüplerin ağzını güvenli bir şekilde kapattıktan sonra elle 15 saniye çalkalandı. Doku örnekleri 2–3 dakika oda sıcaklığında tekrar inkübasyona bırakıldıktan sonra 15 dakika 11 000 rpm hızında 4°C'de santrifüj edildi. Daha sonra sıvı faz RNase içermeyen temiz bir tüpe transfer edildi ve RNA'nın çöktürülmesi için her bir ml TRIzol ayırıcı için 500 µl isopropanol ayırıcı numunenin üzerine eklendi ve iyice karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 dakika 11 000 rpm'de ve 4°C'de santrifüj edildi. RNA'nın çöktürülmesinin ardından RNA'yı kaybetmemeye dikkat edilerek tüpün içerisindeki supernatant kısım döküldü.

Ardından RNA pelleti her 1 ml TRIzol ayırıcı için %75'lik 1 ml etanol ile yıkandı. Örnekler 5 dakika 11,000 rpm'de ve 4°C'de santrifüj edildikten sonra pellet oda sıcaklığında 10 dakika hava ile kurutma kurumaya bırakıldı. Bazen RNA pelleti gözle görülmeyebilir. Bu yüzden yıkama basamağında çok dikkatli olmak gerekir.

RNA kurutulduktan sonra kuru pelletin üzerine 40 µl DEPC ile muamele edilmiş su (100 µl DEPC (diethylprokarbonat) 100 ml saf su içinde çözüldü ve bir gece bekletildikten sonra otoklav edildi) ilave edildi. Örnekler 65°C'de ki termoblok içerisinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından bu örnekler bir gece 4°C'de bırakıldı. Ertesi gün örnekler dolaptan alınarak 10 dakika 11 000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice yeni temiz bir RNase'sız tüpe aktarıldı ve konsantrasyonu spektrofotometre ile 260/280 nm dalga boyunda ölçüldü. Yine bu solüsyondan 2 µl alınarak RNA agaroz jelde varlığı kontrol edildi (% 1,2 agorose / 0,5 x TB). Ekstrakte edilen RNA'nın miktarını belirlemek için her RNA örneğinden 1–2 µl alınarak nanodrop sistemiyle kontrol edilir. Nanodrop sistemi numunenin konsantrasyonunu spektrofotometrik olarak ölçmeye yarar.

2.7.2. RNA'nın Temizlenmesi

İzole edilen RNA'nın kalitesini artırmak için örneklerin daha saf hale getirilmesi bu yöntem kullanılarak yapıldı. RNA, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) markalı kit kullanılarak yapıldı. Bu kitin içerisinde çöktürme prosedürleri esnasında seçici bağlayan özellikte bir silikajel membran bulunur. Örnekler, RNA'nın bütün şekilde izolasyonunu sağlamak için RNase'ları hemen inaktif edebilen guanidin-izotiyosinat (GITC) içeren lizis tamponla denatüre edilir. Lizis işleminden sonra, örnekler kalıntıların uzaklaştırılması için içerisinde silikajel membran bulunan QIAshredder spin kolonlar kullanılarak santrifüjle süzdürülür. Örnekler, RNA'nın silika membrana (spin kolon) seçici bağlanmasını sağlamak için etanol ilave edildi. Daha sonra örnekler, spin kolondan süzdürülür. Bu sayede, RNA silikajel membrana bağlanır ve kontamine olmuş maddeler ise yıkanarak uzaklaştırılır. RNA'nın membrandan tekrar tüpün içerisinde biriktirilmesi için membranın tam üzerine gelecek şekilde ihtiyaca göre 30–40 µl yine kitin içerisinde mevcut olan RNase içermeyen sudan pipetle bırakılır. RNeasy kiti RNA'yı izole etmek içinde kullanılır. Ayrıca isteğe bağlı olarak temizleme procedüründen önce enzimatik reaksiyonlar yapılabilir. Örneğin DNase enzimiyle DNA'nın parçalanmasıyla solüsyondaki DNA'lar inaktif edilir.

2.7.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) markalı kit kullanılarak yapıldı. mRNA'nın kalıp olarak kullanıldığı cDNA sentezi, reverse transkriptaz enzimi (RNA'ya bağlı DNA polimeraz) kullanılarak yapıldı. cDNA ve PCR hazırlanırken her ikisi içinde örnekler arasındaki deneysel el değişimlerinden kaynaklanan varyasyonu mümkün olduğunca azaltmak için ön karışımlar hazırlandı.

cDNA yapmak için her reaksiyon başına 3,5 µg RNA kullanıldı. cDNA miktarı yeterli olmadığından, her örnek için bir reaksiyon tüpünde 3 reaksiyon olacak şekilde materyaller hazırlandı (meristeme, uzama bölgesine ve olgun kısma ait üç örneğimiz var). Bu sebepten dolayı her bileşenden tüpe 3 kez eklendi. Karışım 1 (1 µl 50 µM oligo(dT)₂₀, 1 µl 10 mM dNTP karışımı, 3,5 µg RNA çözeltisi konularak hacim DEPC ile muamele edilmiş su ile 10 µl'ye tamamlandı) her reaksiyon tüpüne ekledikten sonraki işlemler aşağıdaki sıraya göre yapıldı.

Karışım 1 ilave edildikten sonra doku örneklerinin içinde bulunduğu tüpler 65°C'de 5 dakika termoblokta inkübasyona bırakıldı. Ardından en az 1 dakika için buza koyuldu. Daha sonra cDNA Sentez Karışımı (2 µl 10X RT tamponu, 4 µl 25 mM MgCl₂, 0,2 µl 1 M DTT, 1 µl RNaseOUT (40 U/ µl), 1 µl SuperScript III RT (200 U/ µl) hazırlandı. Her RNA /primer karışımı için 10 µl cDNA Synthesis karışımı eklendi ve çok narince karıştırıldı. Kısa bir santrifüjle bileşenler bir araya toplandı. Ardından örnekler 50 dakika 50°C'de termoblok içerisinde inkübasyona bırakıldı. Reaksiyonlar 85°C'lik termoblokta 5 dakika inkübe edilerek sonlandı. Sonrasında örnekler direk olarak buza yerleştirildi. Reaksiyon ürünleri kısa bir santrifüjle bir araya toplandı. Her reaksiyon başına 1 µl RNase H eklenerek örnekler 37°C'lik termoblokta 20 dakika inkübe edildi. cDNA sentez reaksiyonlarıyla oluşturulan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı. Direk olarak PCR için kullanmakta mümkündür.

2.7.4. Primerler

Vandepoele ve arkadaşları (2002) tarafından yayınlanan *Arabidopsis* hücre döngüsü genlerinin pirinç bitkisinin genomik dizelerin içerisinde homologları arandı. Daha sonra *Arabidopsis* ve pirinç arasında protein uyumuna bakıldı. Çünkü protein sekansları türler arasında daha çok korunmuştur. Mısır ve pirinç aynı familyadan iki bitkidir. Bu sebeple,

genom dizelerinin birbirlerine diğer türlere göre daha çok uygun olduğu düşünülmektedir. Bu genlere ait dizeler belirlendikten sonra mısırın genomik dizesi, EST ve cDNA kütüphaneleri arasında Blast araştırmaları yapıldı. Beacon Designer 4,0 (Biosoft international) programı kullanılarak 42 hücre döngüsü geni için primerler tasarlandı. Primer tasarım yazılımı kullanarak primerlerin hedef dizeye özgün olup olmadığını, primerlerin kendi içerisinde sekonder yapı oluşturup oluşturmadığını ve her primerin kendi içinde ve birbirleri arasında 3' uçta oluşabilecek birleşmelerden sakınıldığını garanti altına alır. Kantitatif PCR daha verimli olabilmesi için amplicon uzunluğu yaklaşık olarak 80–250 bp olmalıdır. Primer konsantrasyonu ise 100 ve 500 nM arasında olmalıdır.

2.7.5. Kantitatif RT-PCR (Real-Time Quantitative-RT-PCR)

Bütün bu RNA ekstraksiyonu, RNA'nın temizlenmesi ve cDNA sentez işlemlerinin ardından son işlem ise doku örneklerine ait cDNA'nın Kantitatif RT-PCR (q-RT-PCR) ile amplifikasyonudur. Q-RT-PCR, floresan uyarısını ve emilim miktarını belirleyen optik kısım, bilgiyi alan ve analizleyen bir yazılım, bilgisayar ve termal cycler (iCycler Bio-Rad) gibi bileşenleri içeren bir enstrümental platforma gibi kısımlardan oluşur. Bu deneyde floresan boya olarak çift zincirli DNA'ya bağlanan ve ışık emebilen SYBR Green I kullanıldı. SYBR Green I, direk olarak çift zincirli DNA (dsDNA)'ya bağlanarak floresans veren bir boyadır. Kantitatif PCR sırasında sentezlenen dsDNA'ya bu boya bağlanarak, mevcut DNA miktarına oransal olarak sinyal oluşturur ve bu sinyaller cihaz tarafından tespit edilir. SYBR[®] Green I'in prosedürde belirtildiği miktar kadar reaksiyon karışımına eklenmesiyle, 1 pg kadar küçük miktarda ki DNA veya RNA kalıbı örneğinin içindeki hedef gene ait yaklaşık olarak 10 kopyaya karşılık gelebilen ürünün tespit edilmesi mümkündür. Bu boyanın kullanım miktarı geniş bir dinamik aralığa sahiptir ve erime eğrileri analizleri içinde kullanılması uygundur.

Q-RT-PCR işlemi, Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (invitrogen) markalı kit kullanarak yapıldı. Pipetleme hatasını en aza indirmek için öncelikle her örneğe ait bütün karışım bir tüpte hazırlandı ve sonradan kuyucuklara bölündü. 5 µl'den az pipetlemelerde olabilecek hatalardan kaçınmak için dikkat edilmelidir. 96 kuyucuklu kaplara numuneler koyuldu. Meristem, uzama bölgesi, olgun bölge ve H₂O örnekleri için ön karışım yapıldı. Bu karışım için gerekli bileşenler ve hacimleri Tablo 2'de sunulmuştur. Bu deneyde, primer bağlanmasında oluşabilecek bir problemi ya da herhangi bir

kontaminasyonun olup olmadığından emin olmak için negatif kontrol olarak cDNA örneği yerine reaksiyon karışımına su ilave edildi. Ön karışımdan her örneğin ait olduğu kuyucuğa 20 µl ilave edildi. Primerler ön karışım yerine direk olarak kuyucuklara koyuldu. Her örnek için 3 teknik tekrar yapıldı. Bu yüzden yine pipetleme hatasını önlemek için üç kuyucuk için gerekli hacim önce birinci kuyucuğa koyuldu ve buradan diğer kuyucuklara eşit hacimlerde paylaştırıldı.

Tablo 2. Kantitatif PCR reaksiyonları için gerekli ön karışımının bileşenleri ve miktarları

Bileşen	1 rxn için gerekli hacim (µl)	25 rxn için
Platinum SYBR supermix	12,5	312,5
1/10.000 floresans	2,5	62,5
cDNA (1-2 ug/ml)	5	125
Primers (1 µM)	5	*

İçerisine hedef cDNA'ya spesifik primerlerin eklendiği toplam 25 µl'den oluşan reaksiyon karışımının her biri 96 kuyucuklu kaba ayrı ayrı konulduktan sonra, bu kap Kantitatif RT-PCR cihazına yerleştirildi. Ardından termal siklusun sıcaklık ayarları yapıldı. Reaksiyon şartlarına uygun koşullar ve döngü sayısı ayarlandıktan sonra PCR işlemi başlatıldı. Tablo 3'de PCR'in sıcaklık ve döngü şartları görülmektedir.

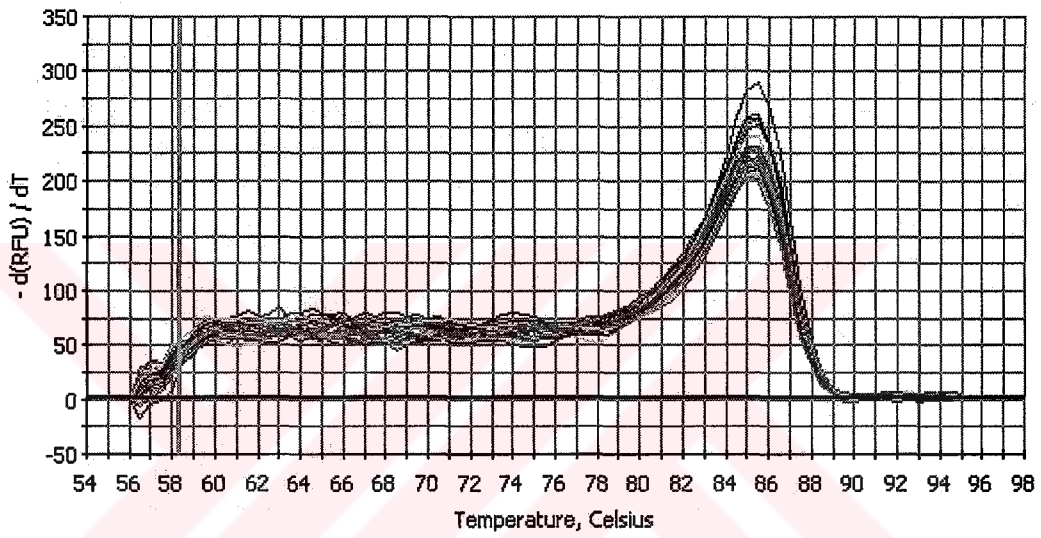
Tablo 3. PCR'in sıcaklık ve döngü şartları

Başlangıç adımı	40 Döngü	Bekleme
2 dakika 50°C	1 dakika 95°C	4°C
4 dakika 95°C	1 dakika 60°C	

Platinum® *taq* DNA polymerase, oda sıcaklığında reaksiyon sırasında *taq* DNA polimeraz genini inhibe eden spesifik monoklonal antibadillerle oluşturulmuş bir öncül komplekstir. PCR'de otomatik olarak sıcak bir başlangıcı sağlayacak şekilde PCR döngülerinde denatürasyon basmağının ardından bütün polimeraz aktiviteleri eski haline

döndürüldü. Bu özgün olmayan primer ile cDNA'nın eşleşmesini ve amplifikasyonları önemli derecede azaltır. Dolayısıyla, amplifikasyon verimini, duyarlılığını ve ürünü artırılmış olur.

Q-RT-PCR işlemi sonlandıktan sonra herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını ve primerlerin özgünlüğünü kontrol etmek için her bir gen için ayrı ayrı erime eğrilerine bakıldı. Şekil 9'da erime tek bir gene ait erime eğrisi gösterilmektedir. Burada kontaminasyonun olup olmadığını içerisinde spesifik primer içeren örneğin, her döngü sonrasında erime eğrilerinin tek bir pik oluşturmasından anlaşıldı.

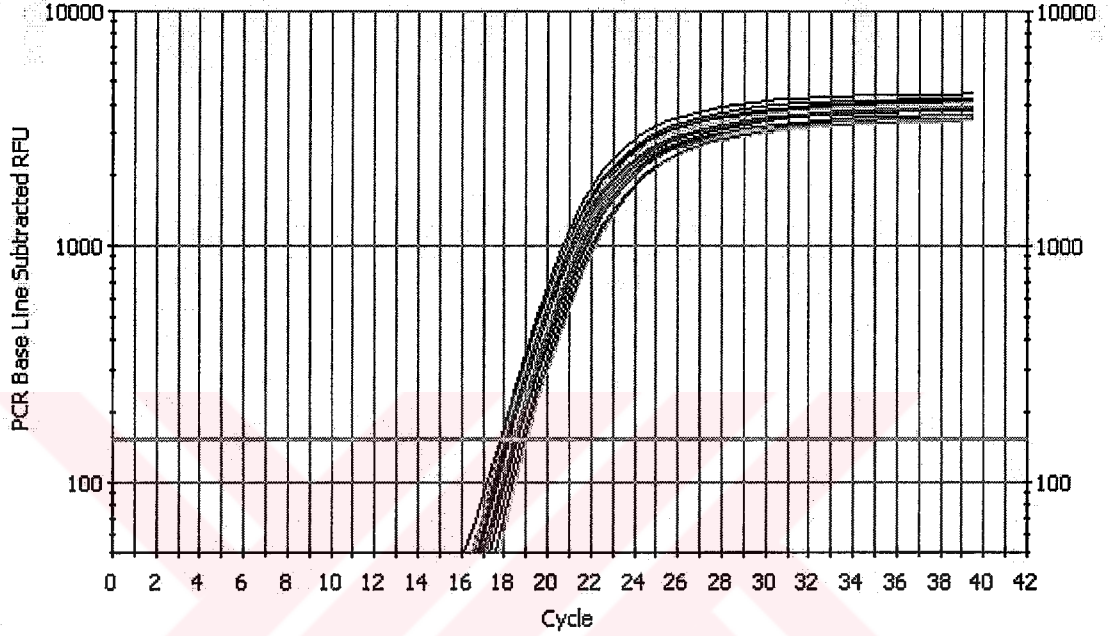


Şekil 9. Öncesinde biraz kalıntıyla birlikte iyi bir amplifikasyonu gösteren tek bir pik veren bir erime eğrisi. X eksenı sıcaklık ve Y eksenı nispi floresan birimidir (-d (RFU)/dT).

2.7.5.1. Bilgilerin Analiz Edilmesi

İdeal olarak, reaksiyonun üstel fazında her döngüde PCR konsantrasyonu ikiye katlanır. Bu yüzden ürünün son miktarı 2^{Ct} eşit olmalıdır. Ancak, PCR'ın amplifikasyon verimi her zaman ideal olmadığı için reaksiyonlar sonrasında verimin hesaplanması gerekmektedir. Bu sebeple standart eğrilerden elde edilen bilgiler kullanılarak verimlilik hesaplandı. Amplifikasyon eğrileri kullanarak, Ct değerlerinin türevi alındı. Logaritmik ölçüdeki amplifikasyon eğrilerinin lineer fazında beş farklı eşik değeri için Ct değerleri belirlendi. Bu değerlere dayanarak eğrinin eğimi hesaplandı. Logaritmik ölçüden dolayı verimlilik $10^{E_{gim}}$ 'e eşittir. Her bir örneğe ait ampikonların ortalaması alındı. Logaritmik

ölçekli PCR amplikon eğrisine ait bir örnek Şekil 10'da sunulmuştur. Verimliliğinin hesaplanmasının ardından eşik değeri isteğe bağlı olarak 150 RFU olarak belirlendi. Çünkü bütün örnekler logaritmik ölçekte bu eşik değerinde amplifikasyon eğrilerinin lineer bölgesindedir. Eşik değeri 150 olarak hesaplandığı takdirde ürünün son miktarı Eff^{Ct} olarak hesaplanır.

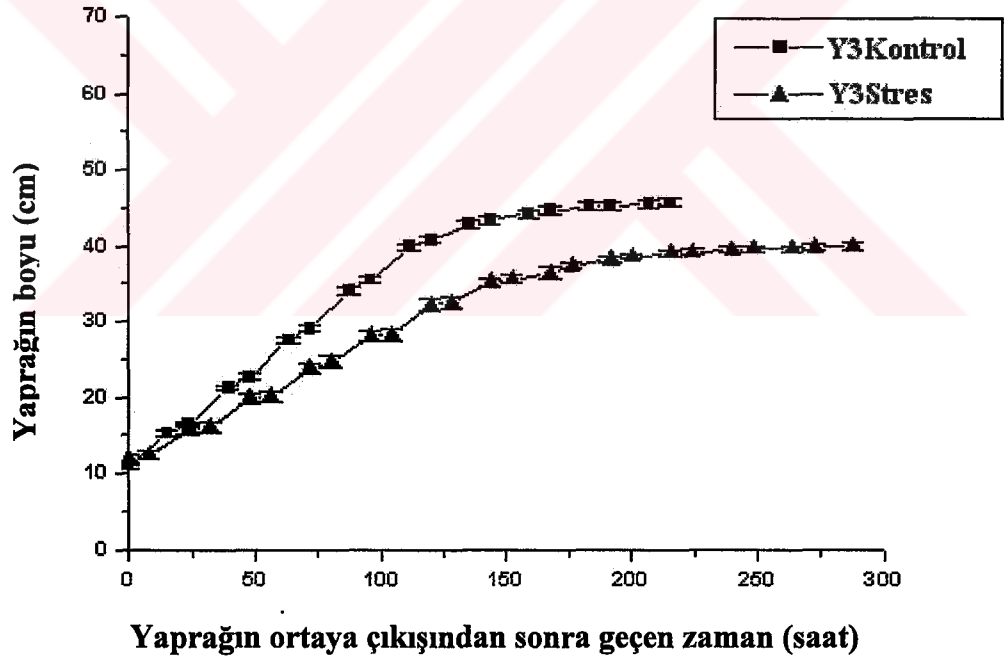


Şekil 10. Logaritmik ölçekte bir PCR amplifikasyon eğrisi. X eksenini döngü sayısı ve Y eksenini nispi floresans miktarını göstermektedir (nispi floresans birimi RFU ile gösterilmiştir).

3. BULGULAR

3.1. Yaprak Uzunluğunun Ölçülmesi

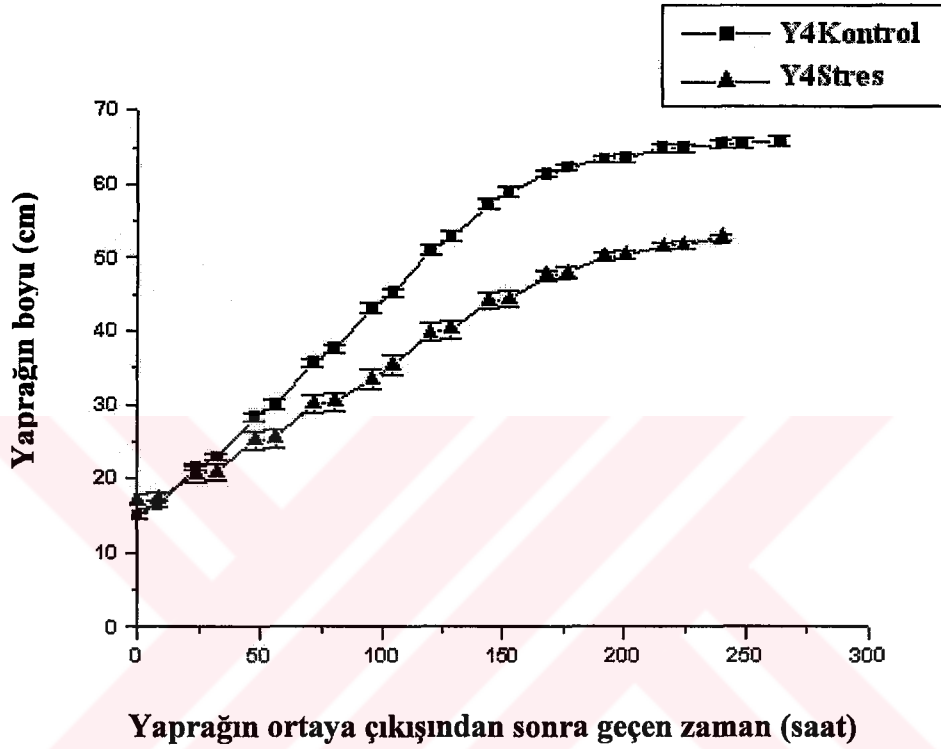
Mısır daneleri 28°C'de çimlendirildikten sonra yapılan uygulamaya göre farklı sıcaklık şartlarına ayarlanmış iklim dolabına transfer edildiler. Kontrol bitkileri için ışık periyodunun sıcaklığı 25°C, karanlık periyodun sıcaklığı ise 18°C olarak belirlendi. Stres uygulaması için, ışık periyoduna ve karanlık periyoduna ait sıcaklıklar sırasıyla 25 ve 4°C olarak ayarlandı. Mısır fidesinin 3. ve 4. yaprakları, ilk ortaya çıktığı andan itibaren sabahleyin ışıklar açılmadan önce ve akşam ışıklar kapanmadan önce olmak üzere günde iki kez ölçüldü. 3. ve 4. yaprağa ait yaprak uzama artışını gösteren grafikler sırasıyla Şekil 11 ve 12'de sunulmuştur.



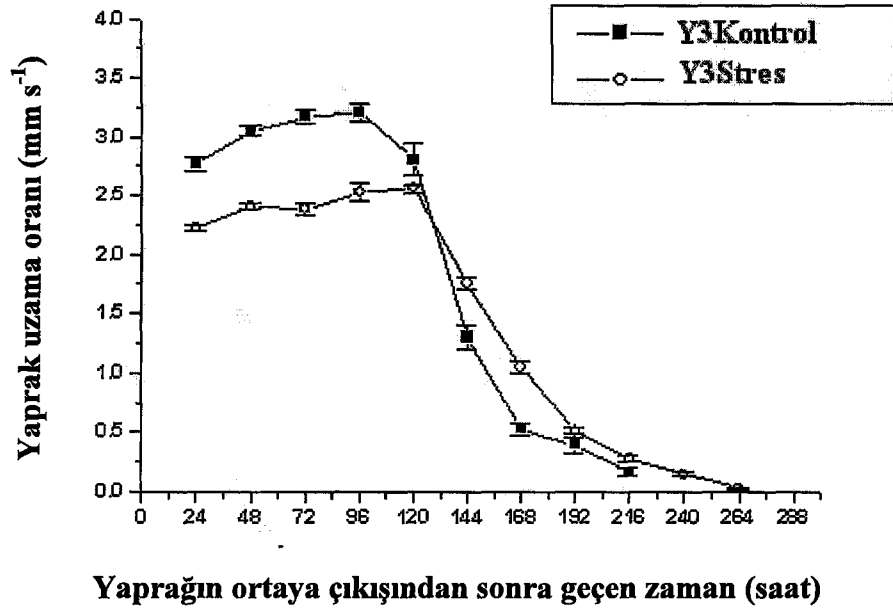
Şekil 11. Üçüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra kaydedilen boy uzunluğu. X eksenini zaman cetvelidir ve saat (s) olarak sunulmuştur. Y eksenini santimetre (cm) cinsinden yaprak boyunu gösterir. Ölçümler 12 adet B73 ırkına ait mısır fidelerinin 3. yaprak ölçümlerinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n=12).

Elde edilen bulgulara göre stres şartlarında yetişen bitkilerin yaprakları kontrol şartlarında yetişenlere göre daha yavaş büyümüştür ve bu durum stres uygulaması

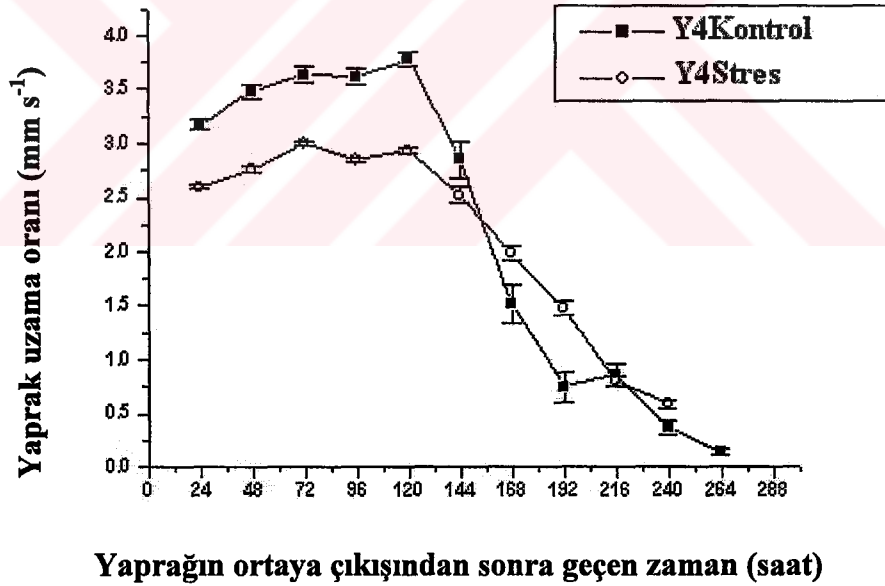
yüzünden yaprak uzama oranı (YUO)'nda düşüşe sebep olur. YUO, belli bir zamana karşı yaprak uzunluğunun gösterildiği grafikte eğimin türevinin alınmasıyla hesaplandı. Sonuçlara göre yaprak uzama oranında Yaprak 3 için %25, Yaprak 4 için %20 azalış kaydedildi (Şekil 13, 14). Yaprakların son uzunluğunda da bir azalış görüldü. Bu azalış Yaprak 3 için %13 ve Yaprak 4 için %20 olarak hesaplandı (Şekil 15).



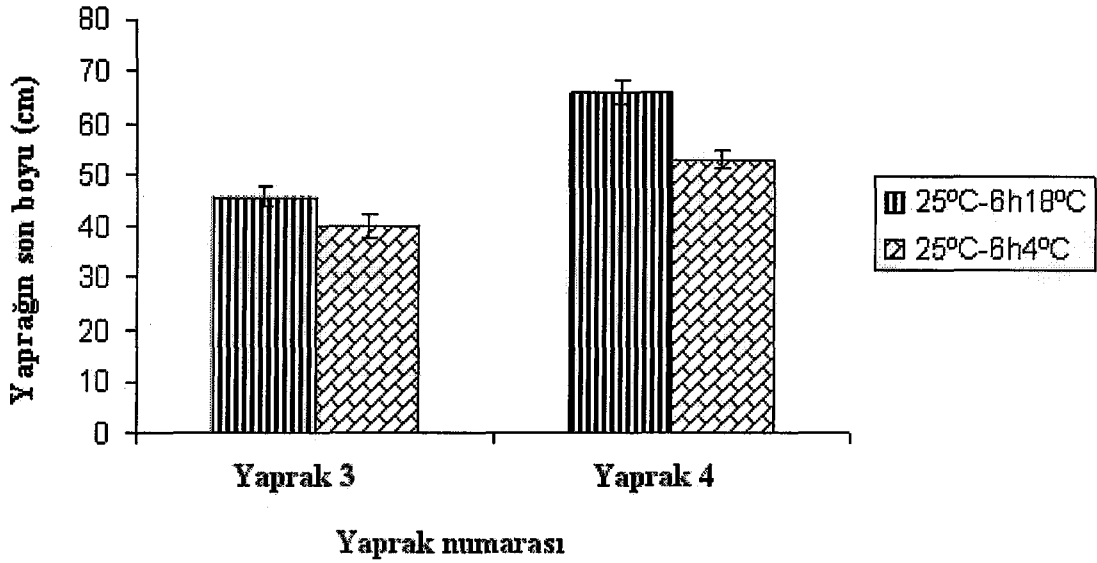
Şekil 12. Dördüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra kaydedilen boy uzunluğu. X eksenini zaman cetvelidir ve saat (s) olarak sunulmuştur. Y eksenini santimetre (cm) cinsinden yaprak boyunu gösterir. Ölçümler 12 adet B73 ırkına ait mısır fidelerinin 4. yaprak ölçümlerinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n=12).



Şekil 13. Üçüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra stres ve kontrol bitkilerine ait ışık periyodu süresince kaydedilen yaprak uzama oranı (YUO). YUO (mmh⁻¹) zaman periyoduna karşı grafiğe yerleştirilmiştir. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n=12).



Şekil 14. Dördüncü yaprağın ortaya çıktığı andan sonra stres ve kontrol bitkilerine ait ışık periyodu süresince kaydedilen yaprak uzama oranı (YUO). YUO (mmh⁻¹) zaman periyoduna karşı grafiğe yerleştirilmiştir. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n=12).

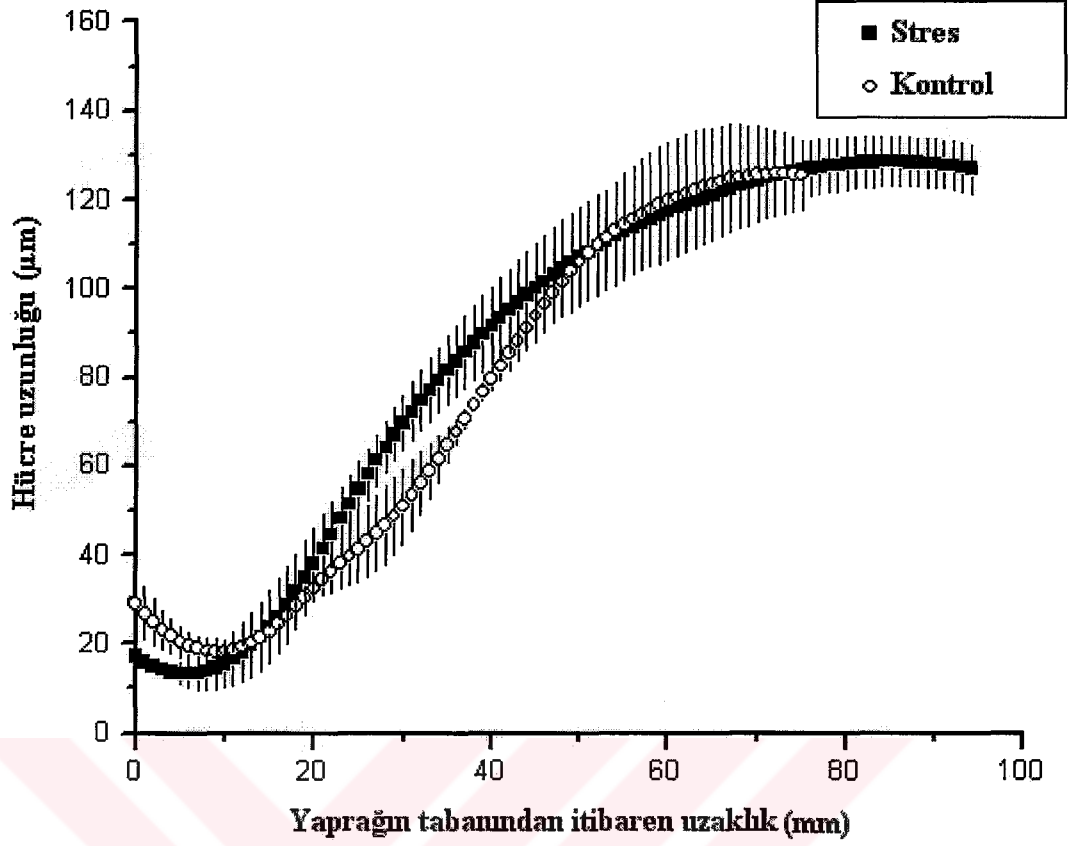


Şekil 15. Stres ve kontrol şartlarında yetiştirilen bitkilerin 3. ve 4. yapraklarının son boyunun (cm) karşılaştırılması. İlk iki sütun Yaprak 3'e ve ikinci iki sütun ise Yaprak 4'e aittir. Çizgili sütun kontrol şartlarında yetişen bitkilere diğeri ise stres altında yetiştirilen bitkilere aittir. Hata çubukları ise standart hatayı göstermektedir (n=12).

3.2. Hücre Boyunun Ölçülmesi

Hücre boyu yaprak eksenini boyunca yaprağın tabanından ucuna doğru ilerleyerek ölçüldü. Sonuçlara göre stres uygulamasında meristem hücrelerinin boyunun %21 oranında küçüldüğü görüldü (Şekil 16).

Uzama bölgesinde bulunan hücrelerin ise stres uygulanmasıyla %8 oranında uzunluğunun arttığı belirlendi. Olgun kısımda ki hücrelerin boyunda ise stres uygulanmasıyla bir değişiklik gözlenmedi. Bu sonuçlara göre, uzama bölgesindeki hücrelerin özellikle meristem hücrelerinin düşük sıcaklığa, olgun hücrelerden daha duyarlı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla, düşük sıcaklık uygulanmasının meristemdeki hücreleri etkileyerek bitki büyümesinde direkt etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.



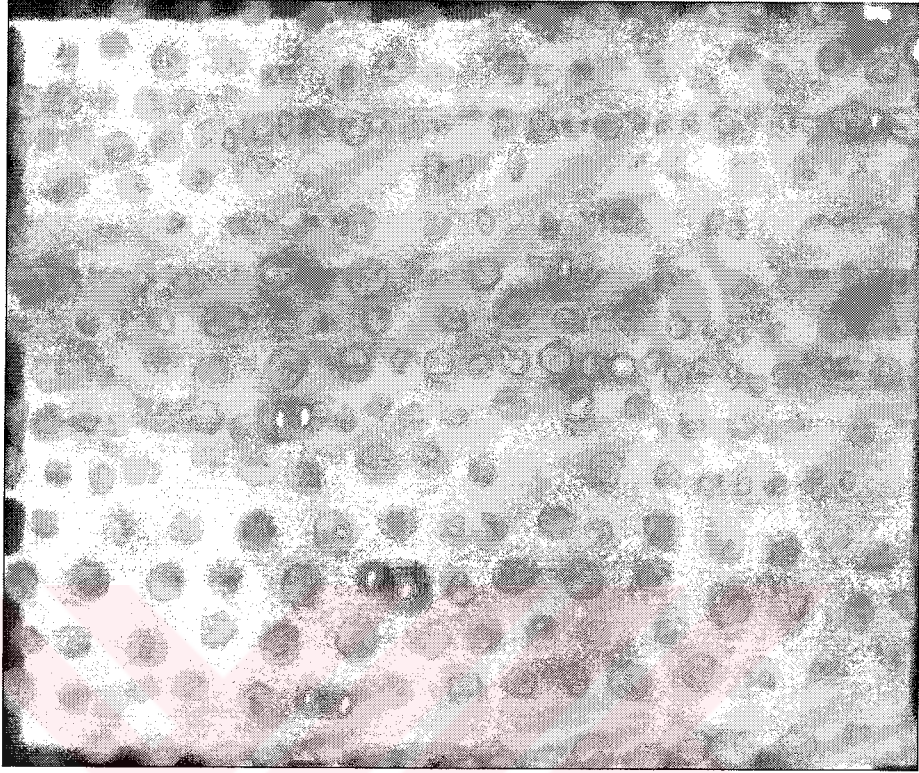
Şekil 16. DIC mikroskobuyla belirlenen stresli ve kontrol bitkilerinin hücre boyu profilleri. X eksenı yaprağın tabanından ucuna kadar olan uzunluğuna ait değerlerdir (mm). Y eksenı ise hücrelerin uzunluğudur. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir (n=6).

3.3. DIC Mikroskobuyla Meristem Büyüklüğünün Hesaplaması

Meristem büyüklüğünü belirlemek için nükleusun DAPI ile boyanmasının ardından yapraklar DIC mikroskobu altında incelendi. Şekil 17'de DAPI ile boyanmış nükleusları gösteren bir fotoğraf sunulmuştur.

Normalde, mitoz öncesinde nükleusun şekli yuvarlaktır. Bir hücre mitozla girdiği zaman, mitozun evrelerine bağlı olarak nükleusun şekli değişir (profaz, metafaz, anafaz, telofaz). Nükleusun bu şekilleri mitotik şekiller olarak adlandırılır. Mısır yaprağında hücre bölünmeleri sadece meristem bölgesinde görülür. Bu sebeple mitotik şekiller sadece meristem bölgesinde yer alır. Bu bilgilere dayanarak, meristem büyüklüğünü hesaplamak için en son mitotik şeklin nerede görüldüğü belirlendi. Sonuç olarak, stres uygulanmış bitkilerle kontrol bitkilerinin meristem büyüklüğü arasında fark gözlemlenmiştir. Stresli bitkilerin meristem büyüklüğü kontrol bitkilerine göre daha kısa olarak kaydedildi. Kontrol

bitkilerinin meristem uzunluğu 1.74 μm iken, stresli bitkilerin 1.55 μm 'dir. Fakat bu fark önemli değildir.



Şekil 17. UV-DIC mikroskopuyla gözlenen nükleusların görüldüğü bir fotoğraf. Hücreler bölünmeden önce yuvarlak şekillidirler. Daha sonra mitoz süresince buldukları evreye göre şekil alırlar.

3.4. Büyüme Bölgesindeki Bölünen Hücre Sayısı, Hücre Üretimi, Bölünme oranı ve Hücre Döngüsü Zamanı

Yaprak uzama oranı (YUO)'nın, hücre uzunluğu dağılımının ve meristem büyüklüğünün belirlenmesiyle, büyüme bölgesindeki bölünen hücre sayısı, hücre üretimi, bölünme oranı ve hücre döngüsü zamanı gibi büyüme ile ilgili parametreleri kinematik bir yaklaşımla hesaplamak mümkündür.

Hücre bölünmeleri meristem bölgesinde görülür. Bölünmüş bir hücre önce uzama bölgesine daha sonrada olgun kısma doğru hareket eder. Bilindiği gibi çim bitkilerinin yaprak hücreleri düzgün sıralar halinde bulunur. Bu durum, bir hücrenin hangi hücre tarafından meydana getirildiğini takip edebilmeyi sağlar. Bir hücre bulunduğu bölgenin bitişiğindeki bölgeye hareket ettiğinde, boş kalan yer, meristemin alt kısımlarında üretilen

hücreler tarafından doldurulacaktır. Düşük sıcaklık uygulamasından sonra, bir hücrenin bulunduğu konumdan bir üst konuma hareket etmesinin, düşük büyüme oranı yüzünden daha fazla zaman aldığı bulundu. Bu zaman süresince, hücreler tolerans mekanizmaları sayesinde hacimlerini artırarak strese karşı kendilerini korurlar. Bundan dolayı uzama bölgesindeki hücreler stresli fidelerde daha uzun olarak saptandı. Meristemdeki bölünen hücre sayısı, kontrol bitkileri için 821 ± 94 ve stresli bitkiler için 1060 ± 214 olarak hesaplandı (Tablo 4).

Sonuçlara göre, düşük sıcaklığın fidelerin meristem büyüklüğünde azalmaya, buna karşı hücre sayısında artışa sebep olduğu bulundu. Fakat meristem büyüklüğündeki bu azalış istatistiksel olarak önemli değildir. Dolayısıyla, bitkinin, meristem büyüklüğünü değiştirmemek için kompensatör sistem kullandığı görüldü. Kompensatör sistem, burada, azalan hücre büyüklüğüne karşı hücre sayısını artırarak meristem büyüklüğünü aynı tutmak için görevlidir (Tsukaya, 2002). Yapraklar stres şartlarında hücre büyümesini devam ettirebilmek için bu şekilde tolerans mekanizmalarına sahiptirler. Bu uyum mekanizmaları sayesinde büyümelerini olumsuz çevre şartlarında dahi sürdürebilirler (Levitt, 1972). Bu uyum sürecinde, düşük sıcaklığın etkisi olarak meristemdeki hücrelerin normalden daha küçük ve buna karşı olarak hücre sayısının daha fazla olması burada bir uyum mekanizmasının olduğunu ortaya koymuştur. Aksi takdirde meristem büyüklüğünün önemli derecede küçük olması gözlenecekti. Bu yüzden, bitkinin, normal meristem büyüklüğüne ulaşabilmek için azalan hücre uzunluklarına rağmen bölünen hücre sayısını artırdığı gözlemlendi.

Hücre üretimi (hücre s^{-1}), meristemde birim zaman başına üretilen hücre sayısıdır. Hücre üretimi kontrol bitkileri için $30 \pm 1,4$ iken, stres bitkilerinde 23 ± 1 olduğu saptanmıştır. Görüldüğü gibi, düşük sıcaklık uygulamasına maruz bırakılan bitkilerin hücre üretiminde %22 oranında azalış saptandı. Bu sonuç, % 21 azalış gösteren yaprak uzama oran (LER)'i ile de uygun düşmektedir (Tablo 4). Dolayısıyla, yaprak uzama oranındaki azalışın azalan hücre üretiminden kaynaklandığı gözlemlendi.

Bilindiği gibi meristemdeki hücreler gövde apikal meristemi tarafından meydana getirilmektedir. Bu sebeple, hücrelerin meristeme gelmeden önce düşük sıcaklıktan etkilenmiş olabilecekleri düşünüldü. Bu etki sonucu meristemdeki hücrelerin daha küçük olması muhtemeldir. Diğer bir ifadeyle, stres etkisiyle hücrenin daha yavaş büyüdüğü görüldü. Fakat hücreye çevreden bölünme sinyali geldiğinde bu hücre tam büyüklüğüne erişmeden bölünmek zorunda kalacaktır. Bir hücre mitoz girdiği zaman, onu hiçbir etken

durduramaz ve mitozu normal süresinde bitirir. Sonuçta, hücre ve genetik materyal iki kardeş hücreye bölüştürülür. Bu sebeple, yapılan gözlemler sonucu, stres etkisiyle hacmi küçük olan hücrenin bölündüğü zaman, strese maruz kalmamış normal büyüklükte olan bir hücrenin bölünmesiyle oluşturulacak hücrelerden daha küçük büyüklükte hücre ürettiği gözlemlendi.

Hücre üretimi ve büyüme bölgesinde bölünen hücre sayısı bilindikten sonra, bölünme oranı (\bar{D} hücreler hücre⁻¹ s⁻¹) hesaplanabilir. Bölünme oranı, kontrol bitkilerinde 0.04 ± 0.004 ve stres bitkilerinde 0.02 ± 0.005 olarak saptandı (Tablo 4). Sonuç olarak, bölünmenin kontrol bitkilerinde daha hızlı olduğu gözlenmiştir.

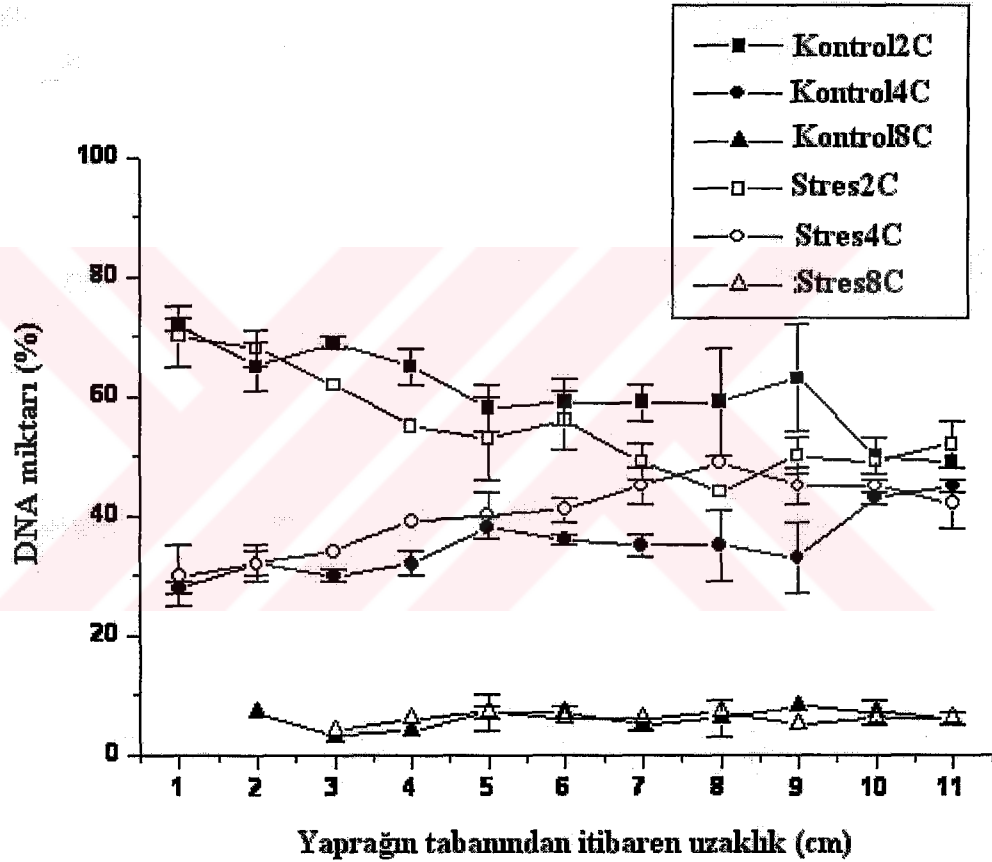
Hücre üretimi ve büyüme bölgesindeki bölünen hücre sayısı gibi büyüme parametreleri hesaplandıktan sonra bir hücre döngüsü tamamlayıncaya kadar geçen zaman hesaplanabilir. Hücre döngüsü süresi, bütün hücrelerin aynı anda bölündüğü bir hücre popülasyonunun büyüklüğünü iki katına çıkarabilmesi için gerekli zamandır. Yapılan hesaplamalar sonucu hücre döngüsü zamanı kontrol bitkileri için $19,8 \pm 2,2$ iken, stres bitkileri için $31,8 \pm 6$ olarak saptandı (Tablo 4). Sonuç olarak, kontrol bitkilerinde hücrelerin bölünmeleri için gerekli süre, stres uygulanmış bitkilere oranla %60 daha kısa olduğu belirlendi.

Tablo 4. Kinematik analizler sonucu hesaplanan stres uygulanmış bitkilere ve kontrol bitkilerine ait büyüme parametrelerinin sayısal değerleri

	Kontrol	Stres
Yaprak uzama oranı (mm/h)	3680 ± 0.09	2930 ± 0.02
Meristem uzunluğu (μm)	16981 ± 2794	16119 ± 1409
Hücre üretimi (hücre/s)	$30 \pm 1,4$	23 ± 1
Meristemde bölünen hücre sayısı	821 ± 94	1060 ± 214
Bölünme oranı (hücreler/hücre s)	0.036 ± 0.004	0.022 ± 0.005
Hücre döngüsü zamanı (s)	$19.8 \pm 2,2$	31.8 ± 6

3.5. Büyüme Bölgesinin DNA Miktarı

Taban kısımdan başlanarak uç kısma doğru, 1 cm uzunluğunda kesilen mısır yaprağına ait parçalar, yapılan çalışmalar kapsamında tanımlanan Partec Buffer'ın içinde çok ince şekilde doğrandı. Bu doğranmış ve süspansiyon haline getirilmiş yaprak parçaları, DNA'ya bağlanabilen DAPI ile nükleusların boyanmasının ardından, Flow Sitometri ile analiz edildi. Her nükleus içerisinde bulunan DNA miktarına oransal olarak floresans verdi. Sonuçlar Şekil 18'deki grafikte sunulmuştur.



Şekil 18. Kontrol ve stres bitkilerinin Flow Sitometre ile belirlenen DNA miktarı (%). İçerisi dolu olarak gösterilen şekiller kontrol bitkilerine ve boş olarak gösterilen şekiller ise stres bitkilerine aittir. X eksenini, yaprak eksenini boyunca tabandan uca kadar ki yaprak parçalarının numarasını göstermektedir. Y eksenini, X ekseninde verilen belirli bir yaprak uzunluğuna rastlayan DNA miktarını göstermektedir. Hata çubukları Standard hata olarak hesaplandı (n=3).

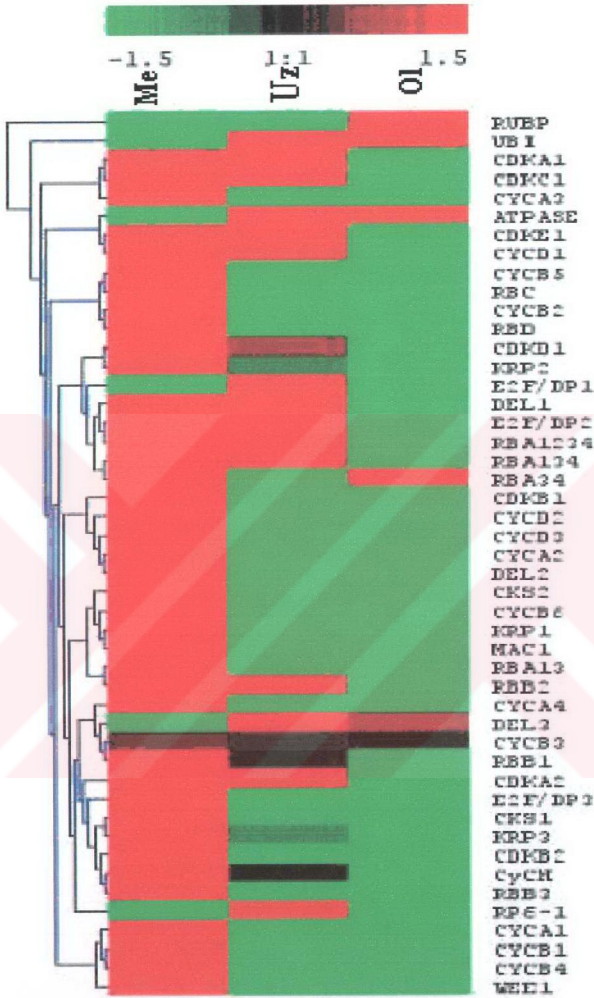
Sonuçlar, G1 fazını temsil eden 2C, G2 fazını temsil eden 4C, hücrede endoduplikasyonların olduğu takdirde 8C olarak adlandırılan histogramlar şeklinde gösterildi. Deney sonucunda, yaprağın ilk iki santimetresinde kontrol ve stres uygulanmış bitkilerin her ikisinde 2C pik miktarı 4C pikinden daha fazladır. Kontrol bitkilerinin birinci ve ikinci parçalarının DNA miktarı sırasıyla 72% ve 70% iken, stres uygulanmış bitkilerde bu miktar 65% ve 68% olarak hesaplandı.

Bu bilgiler, meristemin yaklaşık 2 cm olduğunu gösterdi. Yaprığın üçüncü santimetresiyle birlikte 2C miktarı düşmeğe, 4C ise artmaya başlamıştır. Stres uygulanmış bitkilerde bu azalış ve artış kontrol bitkilerine göre daha fazla olarak saptandı. Buna, düşük sıcaklığın etkisi olarak, hücrelerin G2 fazında bekletilmesi sebep olmuştur. Mısır yaprağının olgun kısmında az miktarda 8C pike rastlandı. Bilindiği gibi mısır bitkisinin yapraklarında endoduplikasyon görülmez. Böyle bitkilerde 8C pikinin görülmesi olgun organların özelliğidir.

3.6. Q-RT-PCR ile Hücre Döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Hücre döngüsü genlerinin transkript seviyesinde ekspresyonlarını belirlemek için, meristeme, uzama ve olgunluk bölgelerine ait her bir örnek Q-RT-PCR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Her örnek, her bir döngüde, ürünün başlangıç miktarına oransal olarak floresans verdi. Floresans miktarı, üssel olarak arttığı için hesaplamalar logaritmik ölçekte yapıldı. Her gene ait eşik değeri (Ct), her deneyin ardından hesaplanan verimliliğe göre doğrulandı. Hierarchical Clustering İstatistik programı kullanarak, benzer davranış gösteren genler gruplandı. Şekil 19'da kontrol bitkilerine ait gruplama ağacı sunulmuştur.

Birçok hücre döngüsü geninin ekspresyonunun meristemde yüksek olduğu, uzama bölgesinde azaldığı ve olgun kısımda neredeyse kaybolduğu görüldü. *cdkb*'ler (*cdkb1*, *cdkb2*) ve diğer *cdk*'lar (*cdka*, *cdkc*, *cdkd*, *cdke*) meristem ve uzama bölgesinde ekspreslendiler, fakat olgunluk safhasında ise kayboldukları tespit edildi (Şekil 19). *siklin*'lerin birçoğunun ekspresyonu, meristemde yüksek olduğu, uzama bölgesinde ve olgun kısımda neredeyse kayboldukları bulundu (Şekil 19). Üç bölgede de *cycb3* ekspreslendi fakat seviyesi düşük seyrettiği görüldü. *cycd* ve *cych* uzama bölgesinde ekspreslendi fakat *cych* geninin ekspresyon seviyesi düşüktü. *rb* genlerinin ekspresyonu meristem bölgesinde yüksekti fakat bazı *rb* genlerinin, uzama ve olgunluk safhalarında da



Şekil 19. Kontrol bitkilerinin yapraklarında, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyesi (Renk gradienti, genlerin doğrulanmış eşik değerlerine göre kırmızıdan yeşile doğru değişmektedir. Kırmızı renk, genin ekspresyon yüksek, yeşil ise düşük olduğunu gösterir. Üç bitkiye ait ekspresyon değerlerinin ortalaması alınmıştır. Hierarchical Clustering uygulanmıştır).

ekpreslendiği bulundu. *cks*'ler, *del*'ler, *krp*'ler ve *wee*'ler gibi hücre döngüsü inhibitörleride meristemde ekspreslendi fakat özellikle *krp*'ler uzama bölgesinde de ekspreslendi. Farklı olarak, *del3*'ün seviyesinde, meristemde düşüş, uzama bölgesinde artış ve olgun bölgede yavaşça tekrar bir azalış gözlemlendi.

Bu deneyde *mac1*, *ubi* ve *atpase* genleri referans olarak kullanıldı. Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin, bütün gelişim evrelerinde sabit olması gerekmesine rağmen, meristemde düşük olarak kaldığı görüldü.

Yine, bu deneyde, gelişimle ilgili *rubp* (rubisko) geni, gelişim evrelerini gözlemlemek için kullanıldı. *rubp*, olgun evrede daha fazla olarak saptandı. Bu gen fotosentezde görevli bir genidir. Dolayısıyla, olgun yaprağın fotosentez oranının daha yüksek olması *rubp*'nin yüksek miktarıyla alakalı olduğu görüldü. Çünkü olgun yaprak daha fazla klorofile sahiptir ve bu da bitkinin daha etkili bir fotosentez yaptığının delilini ortaya koyar.

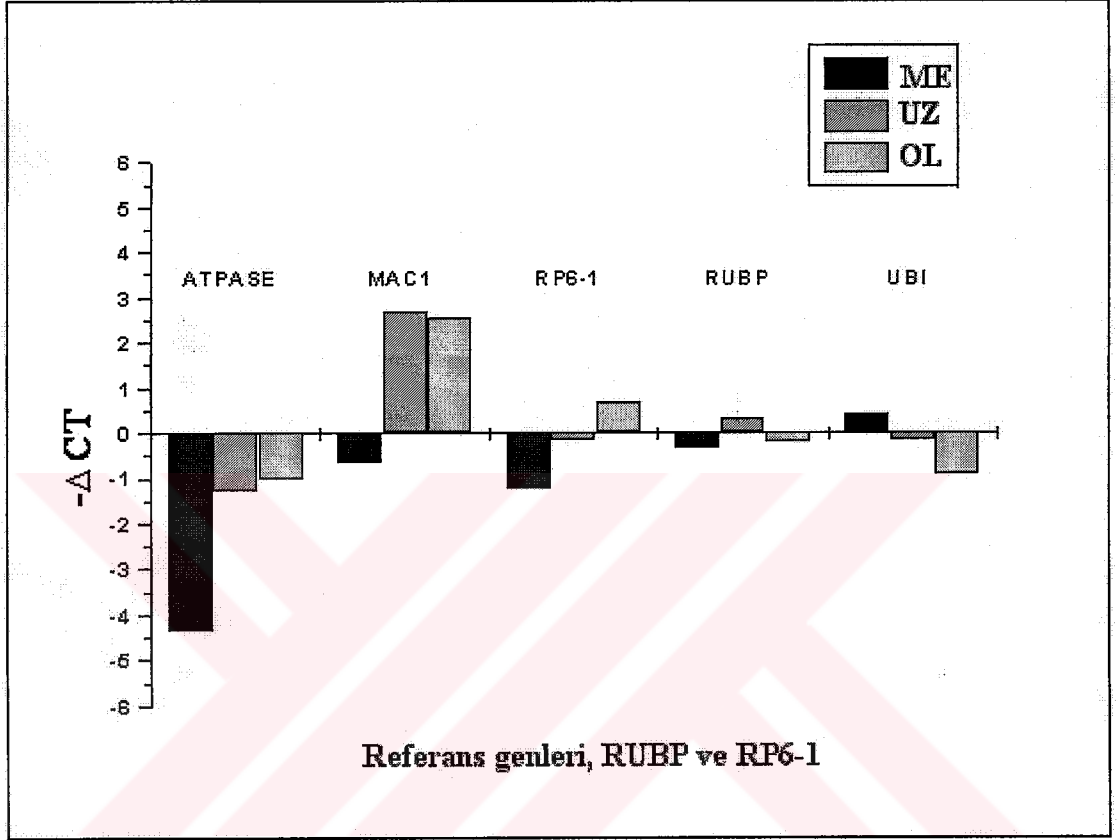
Deneyde kullanılan diğer bir gen ise, soğukla uyarılan *rp6-1* genidir. Bu gen bitkiler üzerinde düşük sıcaklığın etkisini transkript seviyede gözlemlemek için kullanılmıştır. Deneyler sonucunda, *rp6-1* geninin ekspresyon seviyesinin, kontrol bitkilerinde, uzama bölgesinde, düşük sıcaklığa maruz kalmış bitkilere göre daha fazla olduğu görüldü.

3.6.1. Meristem, Uzama ve Olgunluk Bölgelerinde, *rubp*, *rp6-1* ve Referans Genlerinin Transkript Seviyelerinin Karşılaştırılması

Q-RT-PCR yönteminin güvenilirliğini test etmek için, deneyler sırasında Şekil 20'de gelişim evrelerinde, kontrol ve stres şartlarında ifadelerinin nasıl değiştiği görülen *atpase*, *mac1* ve *ubi* genleri referans olarak kullanılmıştır. Bu genlerin transkript seviyelerinde bir değişim olmaması gerekmesine rağmen, gelişim sürecinde değişim görüldü ve düşük sıcaklıktan etkilendikleri kaydedildi. *atpase* geninin transkript seviyesinde gelişim evrelerinde ve özellikle meristemde azalış tespit edildi. *mac1* geninde ise, meristemde azalış, uzama ve olgunluk bölgelerinde artış görüldü. *ubi* geninin ise düşük sıcaklıktan en fazla olgunlukta etkilendiği gözlemlendi.

rp6-1 geninin transkript seviyesinde, meristemde ve uzama bölgesinde azalış, olgunlukta ise artış tespit edildi.

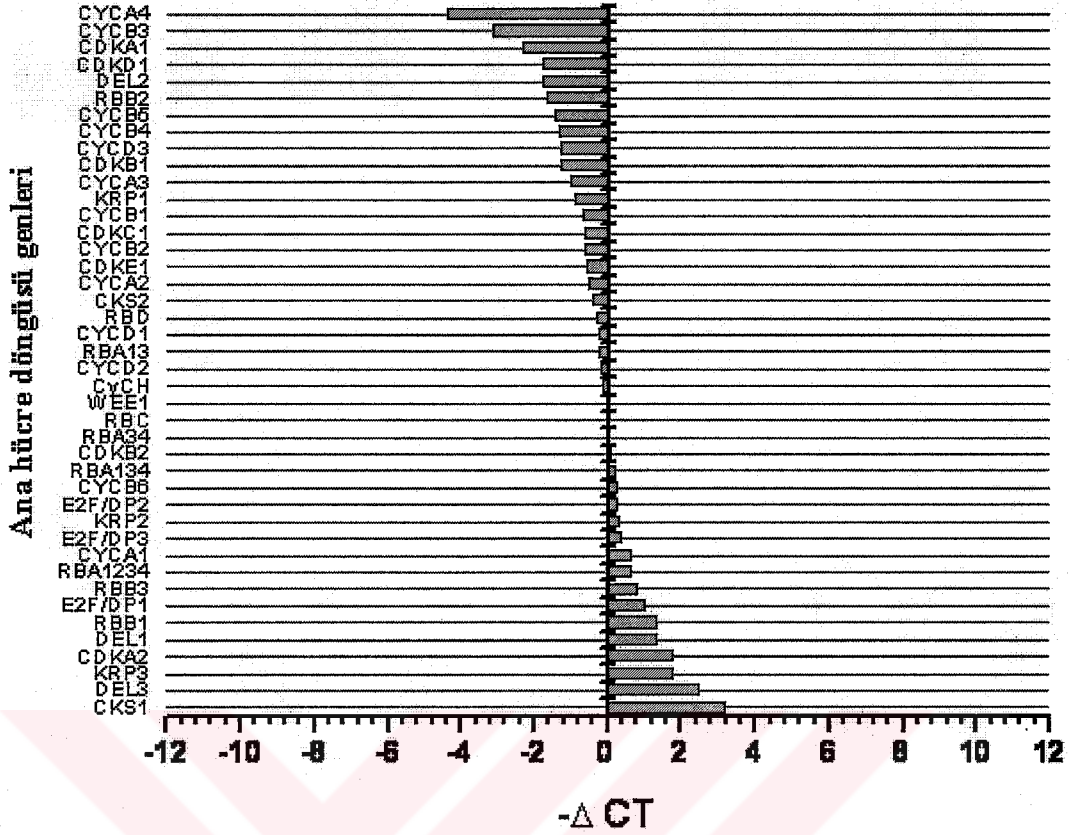
rubp geninin, stresten çok fazla etkilenmediği görüldü. *rubp* geninin transkript seviyesinin, meristemde azaldığı, uzamada arttığı ve tekrar olgunluk safhasında azaldığı kaydedildi.



Şekil 20. *rubp* (gelişimle ilgili gen), *rp6-1* (soğukla uyarılan gen) ve referans genlerinin (*atpase*, *mac1*, *ubi*) transkript seviyelerinin, gelişim evrelerinde ve stres altında değişimi (X eksenleri genleri ve Y ekseninde $-\Delta Ct$ değerlerini gösterir).

3.6.2. Meristemde, Hücre döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Meydana Gelen Değişim

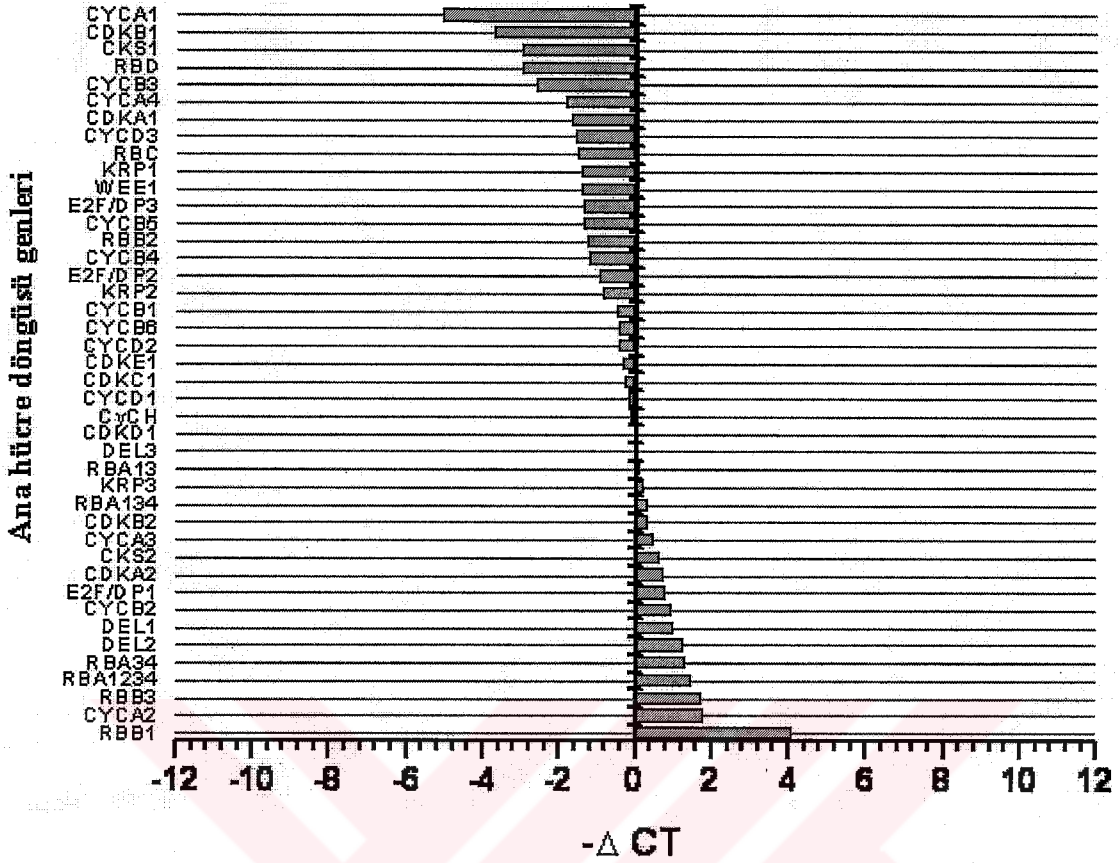
Meristemde *cks*, *del*, *kfp* gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin transkript seviyeleri, düşük sıcaklık uygulamasıyla artış gösterdi. Düşük sıcaklık uygulanmış mısır fidelerinde *cdk*'ların ve *siklin*'lerin seviyelerinde azalış gözlemlendi. Özellikle, uygulamadan en fazla *cyca4* ve *cycb3* genlerinin olumsuz etkilendiği görüldü. Bazı *rb* ve *wee* genlerinin transkript seviyesinin değişmediği görüldü (Şekil 21).



Şekil 21. Meristemde, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyelerinde meydana gelen değişim. (X eksen $-\Delta Ct$ [-(kontrol bitkilerinin Ct değerleri – stres bitkilerinin Ct değerleri)]değerlerini göstermektedir. Y eksen genlerin isimlerini göstermektedir. 0'ın altındaki değerler düşük, 0'ın üstündeki değerler yüksek ifade seviyesini göstermektedir. Deneyler üç bitki üzerinde tekrarlanmıştır).

3.6.3. Uzama Bölgesinde, Hücre döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Meydana Gelen Değişim

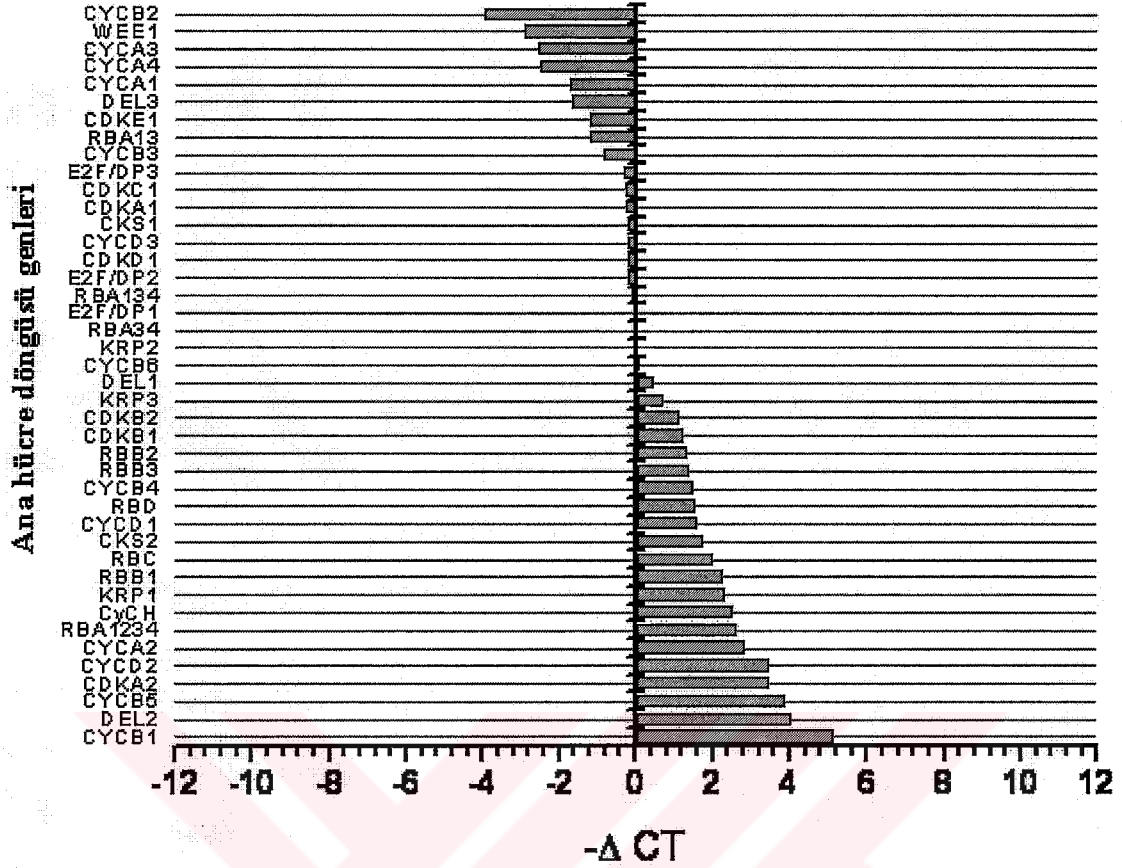
Uzama bölgesinde, *cdkb1*, *cyca1*, *cyca4*, *cycb3*, *cks1*, *rbd* genleri düşük sıcaklıktan en fazla etkilenen genler olduğu ve transkript seviyelerinin düştüğü gözlemlendi. *del* genleri gibi bazı CDK inhibitörlerinin transkript seviyesi stres altında artarken, diğer inhibitör genlerinde azalış kaydedildi. Bazı *eb* ve *e2f/dp* genlerinin seviyesi ise stres şartlarında artış gösterdiği bulundu (Şekil 22).



Şekil 22. Uzama bölgesinde, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyelerinde meydana gelen değişim (X eksen $-\Delta Ct$ [$-(\text{kontrol bitkilerinin Ct değerleri} - \text{stres bitkilerinin Ct değerleri})$] değerlerini göstermektedir. Y eksen genlerin isimlerini göstermektedir. 0'ın altındaki değerler düşük, 0'ın üstündeki değerler yüksek ekspresyon seviyesini göstermektedir. Deneysel üç bitki üzerinde tekrarlanmıştır).

3.6.4. Olgunluk Bölgesinde, Hücre döngüsü Genlerinin Transkript Seviyesinde Meydana Gelen Değişim

Olgunluk bölgesinde, stresten en fazla *cycb2*, *wee1*, *cycq3* ve *cyca4* genlerinin olumsuz etkilendiği tespit edildi. *krp*, *cyca2*, *cycb5*, *cycb1 del* ve *cks* genlerinin transkript seviyelerinde, bu bölgede artış kaydedildi. Özellikle, *e2f/dp1*, *cycb1*, bazı *rb* ve *cycb5* genlerinin transkript seviyelerinin arttığı görüldü (Şekil 23).



Şekil 23. Olgunluk bölgesinde, hücre döngüsü genlerinin transkript seviyesinde meydana gelen değişim (X eksen $-\Delta Ct$ [-(kontrol bitkilerinin Ct değerleri - stres bitkilerinin Ct değerleri)]değerlerini göstermektedir. Y eksen genlerin isimlerini göstermektedir. 0'ın altındaki değerler düşük, 0'ın üstündeki değerler yüksek ekspresyon seviyesini göstermektedir. Deneyler üç bitki üzerinde tekrarlanmıştır).

4. TARTIŞMA

Bitkiler, sesil yaşayan canlılar olduklarından, büyümeleri buldukları çevre şartlarına sıkıca bağlıdır. Bilindiği gibi, bitkilerin yaşayışına uygun olmayan çevre şartlarında, hücrelerin bölünmesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesi etkilenir ve bitki bu şartlara cevap olarak büyümesini durdurur (Bursens vd., 2000). Bu çalışmada, hücre döngüsü ve mısır yapraklarının düşük akşam sıcaklığına karşı büyüme cevabı araştırıldı. Gerçekte, bu deney düzeninde mısır fidelerine uygulanan düşük sıcaklık muamelesi, bitkilerde sürekli strese sebep olmadı. Burada amaç, normal fizyolojik sıcaklığı soğuk stresinden ayırmaktır. Bu nedenle, geceleyin uygulanan düşük sıcaklığın mısır fideleri üzerindeki etkisini gözlemleyebilmek için, mısır yapraklarının büyüme oranı gündüz vaktinde ölçüldü. Çalışmanın sonucu olarak, yaprağın gündüz büyümesinin bu şartlar altında azaldığı açıkça görülmektedir. Burada sadece büyümenin yavaşlatılması amaçlanmıştır. Bitkileri tam anlamıyla strese sokmak değildi. Bu sebeple, bu uygulama, oldukça hafif bir stres olduğundan hücre ölümlerine sebep olmamıştır. Bu düzenek, sadece hücre bölünmesini yavaşlatıp durdurmadığı için, hücre dinamiğini gözlemlemek için çok kullanışlıdır. Özellikle, bu düzenek geceleyin uygulanan soğuk muamelesinin ardından, gündüz periyodu süresince mısır fidesinin kendisini çevre şartlarına uyum sağlama (aklimasyon)'sına izin verir. Ayrıca, mısır yaprağında büyüme bölgesi (meristem, uzama ve olgunluk bölgesi), yaprak eksenini boyunca yer aldığı için, hücre kinetiğinin ölçülmesi için mısır bitkisi iyi bir modeldir. Çünkü tek bir mısır yaprağında bütün büyüme parametreleri belirlenebilir ve yaprak büyümesi esnasında bütün gelişim evrelerini aynı yaprak üzerinde görmek mümkündür.

Düşük sıcaklıkta büyütülen bir mısır bitkisinde, çevresine ilk cevapta, bitkinin ilk olarak yaprak uzama oranını düşürdüğü görüldü (YUO, -(%21) mm/s azaltılmıştır). YUO'nun azaltılmasının sonucu olarak büyüme de azaltıldı. Büyümenin azaltılmasına ne sebep olmuştur? Bu soruya cevap verebilmek için, çalışmalar hücresel ve moleküler seviyede araştırmalara yönelmiştir. Hücresel gözlemlerin sonucunda, stres altında, meristem hücrelerinin büyüklüğünün önemli derecede azalmasına rağmen, meristem ve olgun hücre büyüklüğünün, kontrol ve stres şartlarında yetiştirilen mısır fidelerinde aynı olduğu bulundu. Kinematik analizlerin sonucunda, bu sorunun cevabı aydınlatılmış oldu. Hücre üretiminin (birim zamanda hücre başına üretilen hücre sayısı), stres altında %22

oranında azaltıldığı bulundu. YUO ve hücre üretimi karşılaştırıldığında, her ikisinde de meydana gelen azalışın aynı olması (sırasıyla %21 ve %22), YUO'da meydana gelen azalışın geciktirilmiş hücre bölünmesinden kaynaklandığı görülmektedir. İkinci soru ise, hücre üretiminde meydana gelen azalışa neyin sebep olduğudur. Yine kinematik analizlerin sonucunda bu sorunun cevabı bulunmuştur. Sonuç olarak, hücre üretiminde meydana gelen azalışın, hücre döngüsü süresinin stresle, %65 oranında azalmasından kaynaklandığı bulunmuştur.

Yine, YUO ile hücre bölünme oranı (HBO) arasında da bir ilişki vardır (Granier ve Tardieu , 1998). Kinematik analizler ışığında, YUO'nun HBO'dan yüksek olduğu bulundu. Bu durumda, hücre alanı zamanla artar. Diğer bir ifadeyle, hücre bölünmesi geciktirildiği için, hücreler uzama bölgesinde daha fazla zaman geçirecekler. Dolayısıyla meristemde bölünmelerin azalmasıyla, bölünerek oluşturulan hücre sayısı azalır ve yukarı doğru hücre hareketi daha seyrek görülür. Bu sayede, uzama bölgesindeki hücreler hacimlerini artırmaya fırsat bulacaklardır. Analizler sonucu, HBO'da, aynı zamanda YUO'nunda azalmasına sebep olan %38 oranında bir azalış vardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, genetik deliller, bitkilerin yaprak morfogenezisinin Kompensatör Sistem'le kontrol edildiğini göstermiştir (Tsukaya, 2001). Bu sistemin, artan hücre hacmine karşı, hücre sayısını düşürerek organın normal büyüklüğünü korumaya çalıştığı ileri sürüldü. Bitkilerde bu sistemle ilgili yapılan çalışmaların özeti Tablo 5'de sunulmuştur. Bu çalışma sırasında sorulan bir diğer soruda, mısır bitkisi yapraklarında da bu sistemin çalışıp çalışmamasıydı. Deneyle sonucunda, karanlık periyodunda uygulanan düşük sıcaklığın, yaprağın son boyunu azalttığı bulundu. Bu sonuç, büyüme bölgesindeki hücrelerin gözlenmesiyle ortaya atıldı. Kontrol ve stres şartlarının her ikisinde de yetiştirilen fidelerin meristem ve olgun hücre büyüklükleri aynıydı. Bu durumda, yaprak boyunda meydana gelen kısalma, hücre döngüsü zamanının uzaması sonucu daha az hücre üretilmesinden kaynaklanır. Kinematik Analizler uygulandığında, bu azalışın daha az sayıda hücrenin üretilmesinden kaynaklandığı ispatlandı. Bu durumda, mısır yapraklarında Kompensatör Sistem'in olmadığı anlaşıldı. Sonuç olarak, düşük gece sıcaklığının etkisi olarak, yaprağın olgun kısmına doğru daha az hücre akışı olmuştur. Fakat, meristem boyunun ölçüldüğünde, meristemdeki hücrelerin boyunun kısalmasına rağmen, buradaki hücrelerin sayısında artış gözlenmesi burada kompansatör sistemin varlığını gösterir. Sonuç olarak mısır yaprağının son boyunun kompansatör sistemle telafi edilmemesine rağmen, meristem uzunluğunda bu sistem görev almaktadır.

Tablo 5. Yapraklarda görev yapan Kompensatör Sistem'i gösteren bazı deliller (Tsukaya, 2001).

Muhtemel sebep ve sonuç	Bu sebep ve sonuç ilişkisini destekleyen örnekler
Hücre hacminin artması → hücre sayısında azalma	: <i>ABP1</i> 'in aşırı ekspreslenmesi (Jones vd., 1998)
Hücre hacminin azalması → hücre sayısında artma	: rapor edilmedi
	→ hücre sayısında etki yok : <i>axr2</i> (Timpte vd., 1992; <i>an, rot3</i> (Tsuge vd., 1996); : <i>AtEXP10</i> antisense (Cho ve Consgrve, 2000); : <i>AtHB13</i> 'ün aşırı ekspreslenmesi (Hamson vd., 2001)
Hücre sayısının artması → hücre hacminde azalma	: <i>CdcD2</i> 'nin aşırı ekspreslenmesi (Cockcroft vd., 2000)
	→ hücre hacmine etkisi yok : <i>ANT</i> 'nin aşırı ekspreslenmesi (Mizukami ve Fischer, 2000)
Hücre sayısının azalması → hücre hacminde artma	: <i>Cdc2</i> 'nin aşırı ekspreslenmesi (Hemerly vd., 1995); : <i>ant</i> (Mizukami ve Fischer, 2000); : <i>ICK1</i> overexpressor (Wang et al, 2000); : <i>gpa1</i> (Ullah et al., 2001)

Sorulan bir diğer soruda, mısır yapraklarında, düşük gece sıcaklığının endoduplikasyona sebep olup olmadığı idi. Bu amaçla, Flow Sitometri yöntemiyle hücrelerin sahip olduğu DNA miktarları belirlenmeye çalışıldı. Endoduplikasyon, hücrede, DNA'nın miktarı birkaç kere ikiye katlandığı halde, mitoz bölünmenin gerçekleşmediği zaman meydana gelir. Endoduplikasyon, mısır endospermünde sıkça görülen bir durumdur (Grafi vd., 1996). Bitkilerde özellikle yaşlanan dokuların özelliği olarak endoduplikasyon gerçekleşir. Yine, endoduplikasyon birçok bitki ve hayvan türlerinde görülmektedir. Bu işlev, hücre döngüsünde görevli bazı düzenleyicilerin proteolizisiyle gerçekleşir. Yine, DEL'ler, KRP'ler ve WEE1 gibi CDK inhibitörlerinin endoduplikasyona sebep olduğu gösterildi. Gen ekspresyon analizleri sırasında, CDK inhibitörlerinin miktarında bir artışın

görülmesi, acaba meydana gelen bu artışın mısır yapraklarında endoduplikasyonu tetikleyebilir mi sorusunu sormaya zorladı. Fakat mısır yapraklarında meydana gelen endoduplikasyon seviyesi önemli derecelere ulaşmamıştır. Analizlerle 4C'de ve 8C'de miktarında artış saptandı fakat bu artış *Arabidopsis*'de görüldüğü kadar değildi (De Veylder vd., 2001). Fakat CDK inhibitörlerinin, görevlerin ve gen ekspresyon seviyesinin neden yüksek olduğu sorusu hala yanıt bulmamıştır.

HBO'nda meydana gelen azalışa neyin sebep olduğunu (ikinci cevap olarak) moleküler seviyede hücre döngüsü aktivitelerini araştırarak bulunabilir. Hücre döngüsünün transkripsiyon seviyesinde düzenlenerek kontrol edildiği kabul edilir (Beemster vd., 2005). Bu yüzden, ana hücre döngüsü genlerinin analiz edilmesiyle, bitkinin çevresel faktörlere karşı büyüme cevabı aydınlanacaktır. Burada, bu genlerin gelişim evrelerinde nasıl bir görev üstlendiğinin bilinmesi çok önemlidir. Bu yolla, hangi genin hangi olaydan sorumlu olduğu ve bu genin ifadesinde meydana gelen değişimlerin nelere sebep olabileceği tahmin edilebilir. Yapılan araştırmalar sonucunda, organ büyümesi sırasında bazı genlerin ifadelerinin seviyesinin çok benzer olduğu görüldü. Bu yüzden ana hücre döngüsü genleri işlev esnasındaki davranışlarına göre şu şekilde gruplanır;

Konstitütif ekspreslenen genler: Bu gruptaki genlerin gelişimin her safhasında ekspreslendiği bulundu. *cdka*, *cdkc*, *cdkd*, *cdke*, *wee1*, *dell*, *cycd1*, *ccyb3*, *e2f* ler, *dp*'ler ve *rb*'ler bu grupta yer alır.

Çoğalmaya özgü genler: Bu gruptaki genlerin ekspresyonunun hücre bölünmeleri sırasında artıkları tespit edildi. *del2*, *kpr1*, *cks1*, *cks2*, *rbc*, *rbd*, CDK'lerin aktivitesini belirleyen çoğu A- ve B- tip *siklin*'ler ve aşağı bölge transkripsiyon faktörleri bu grupta yer alır.

Gelişim sırasında artan genler: Bu genler bitkinin gelişimi sırasında ekspreslendiği bulundu. Bunlar; *e2f1*, *dp1* ve *del3*, *kpr2* ve *kpr3* gibi CDK inhibitörleri.

Bu genlerin hücre döngüsünde görevlerini biraz daha yakından inceleyelim. Hücre döngüsü, CDK genlerine *siklin*'lerin bağlanmasıyla aktif hale gelen Transkripsiyonel Kontrol Yolu'yla kontrol edilir. Bu yolda en önemli düzenleyici protein, insanda tümör baskılayıcı olarak bilinen Retinoblastoma proteindir. *rb*'ler, hücre döngüsünün G_1 fazına doğru ilerleyişin ve hücreyel farklılaşmanın düzenlenmesinin her ikisinde de anahtar role sahiptir. RB proteinlerinin, transkripsiyon faktörleri olan *E2F*'ler ile etkileşimi, bu transkripsiyonel kontrol yolunu inhibe eder. RB proteinleri, D tipi *siklin*'ler ile fosforile edildiği zaman, RB'ler E2F'de ayrılır ve hücre döngüsü ilerler. Görüldüğü gibi, RB'ler

fosforillenme ile fonksiyonel olarak inaktif olurlar. RB'lerin endoduplikasyonda da görevli oldukları bulundu. Bunu hücre döngüsünü durdurarak, hücrenin farklılaşmasını sağlayarak yaparlar (Grafi vd., 1996). B tipi *siklin*'ler ise, hücre çoğalmasının gözlemlenebilmesi için G₂/M fazına özgü iyi bir işaretirler. B- ve D- tip *siklin*'lerin aşırı ifadeleri, bitki büyüme oranını artırabilir. *knp*'ler gibi bazı CDK inhibitörlerin aşırı ifadeleri, *Arabidopsis* yapraklarında, kinaz aktivitesinin ve hücre bölünme oranının her ikisinde de azalmaya yol açmıştır (De Veylder vd., 2001). *weel* geninde de CDK'leri fosforilleyerek inhibe etme özelliği vardır ve bu yüzden endoduplikasyona sebep olur (Sun vd.,1999).

Yüksek ozmolarite, kalsiyum ve UV radyasyonu gibi bazı hücre dışı uyarıcı etkenler, fosforilasyon olaylarını düzenleyerek hücre bölünmelerini etkilerler (Sun vd., 1999). Bu yüzden, hücre döngüsünde görevli genlerin ifadesinin, düşük gece sıcaklığı uygulamasında nasıl düzenlendiği araştırılmalıdır. Gen ekspresyonu seviyesinde ki değişikliklere göre, büyüme değişimlerinden sorumlu genler belirlenebilir. Eğer genlerin ifadeleri incelenecek olursa, büyüme kısmında meydana gelen hücre döngüsü ilerleyişinde çok önemli rolleri olan *cyc4*, *cyc3*, *cyc4*, *Ccycb5*, *cycd3*, *cdkb1* ve *cdka1* genlerinin ifadelerinde önemli derecede bir azalış olduğu açıktır. Ayrıca, stres şartları altında, *del*'ler, *knp*'ler ve *CKS* gibi bazı CDK inhibitörlerinin ifadesinde bir artış olmuştur. Bu yüzden, bu genlerin büyümede azalma meydana getirdiği ileri sürüldü. Stresli bitkilerin olgunluk safhasında, hücre döngüsü genlerinin çoğunun ifadesi artmıştır. Fakat aynı zamanda CDK inhibitörlerinin de ifadesi arttığından, olgun kısımda hücre bölünmeleri görülmez.

Bütün bu bulgulara göre, mısır yapraklarının düşük gece sıcaklığına en duyarlı kısmının büyüme bölgesi olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle, büyüme bölgesinde hücre bölünmelerinin olması, büyümede meydana gelen azalışın, hücre döngüsü düzenlenmesinde meydana gelen bir değişimden kaynaklandığı sonucuna varılır.

5. SONUÇLAR

Mısır fidelerinin büyümesinde meydana gelen azalış, fidelere uygulanan düşük sıcaklık etkisiyle hücre döngüsü zamanının uzamasından ve dolayısıyla hücre üretimindeki azalmadan kaynaklandığı bulunmuştur. Ayrıca, hücre üretiminde meydana gelen azalış yaprağın son boyunda da azalışa sebep olmuştur.

Yapılan çalışmalar sonucunda yaprak uzama oranının meristem bölgesinin sıcaklığıyla çok yakından ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak, daha hızlı uzayan bitkilerde hücrelerin bölünme oranının da daha hızlı olduğu görülmüştür. Hücrenin yer değiştirmesi, sıcaklığa bağlı olarak değişiklik gösteren hücre boyu ve bölünen hücre sayısı tarafından belirlenir. Bu hareket, bölünme sonucu üretilen hücrelerin bu hücreyi yukarı doğru itmesiyle meydana gelmiştir. Hücrenin yer değiştirmesinin daha hızlı olması ise bitkinin daha hızlı büyümesini sağlamıştır. Burada hücrelerin yer değiştirmesi olayının hücreden hücreye haberleşmeyle sağlanmadığı gösterilmiştir. Hücre yer değiştirmesi, hücre bölünmesinin zamanına ve konumuna bağlı olarak meydana geldiği kaydedilmiştir. Bu durum, yaprak uzama oranı (YUO) ve hücre bölünme oranı (HBO) arasındaki ilişkinin varlığını göstermiştir. Hücre büyüklüğünün bölünme ve uzama işlemleriyle koordine edildiği bulunmuştur. Hücre büyüklüğünün belirlenmesinde direkt olarak bir genetik kontrol olduğuna dair herhangi bir delil kaydedilmemiştir.

Mısır fidelerine karanlık periyodunda düşük sıcaklık uygulamasında, ana hücre döngüsü genlerinin transkript ekspresyonları çok fazla etkilenmiştir. Bu durum büyümede meydana gelen azalışın başlıca sebeplerinden biri olarak tespit edilmiştir. *cdk* ve *siklin* genlerinden birçoğunun ifadesi baskılanırken, *knp* ve *del* gibi CDK inhibitör genlerinin ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Elde edilen bulgular ışığında sıcaklık değişimlerine çok duyarlı olduğunu gördüğümüz *Zea mays* cv. B73 bitkisinin yaprak gelişimi ve büyümesinde moleküler ve hücresel değişimlerin araştırılacağı çalışmalarda kullanılabilir. Ayrıca, lineer büyüme gösteren ve monokot olan bu tür, hücrelerin büyüme bölgesindeki yerleşimleri göz önüne alındığında hücre hareketlerinin izlenmesinde kullanılabilir.

Hücre döngüsü genlerinin ifade analizleri sonucunda, düşük sıcaklık uygulamasıyla bazı *cdk* genlerinin ekspresyonunun azaldığı ve buna karşı bazı CDK inhibitör genlerinin ise ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bu sonuca belli zamandaki belli bir miktar transkripte bakılarak varılmıştır. Ancak, genin protein seviyesinde analizleri yapılmadığı için fonksiyonu konusunda kesin yargıya varmak doğru değildir. Bu yüzden bu genlerin tam olarak ekspresyon analizlerine bakılmalıdır.

İlerideki çalışmalarda transkript analizlerinin yapıldığı bu genlerin tanımlanması ve tam dizelerinin belirlenmesiyle, genetik düzenlenmeler sonucu stres şartlarına daha dayanıklı bitkiler tasarlanabilir.

7. KAYNAKLAR

- Beemster, G.T.S. ve Baskin, T.I., 1998. Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*, American Journal of Botany, 116, 1515–1526.
- Beemster, G.T.S., De Veylder, L., Vercruyssen, S., West, G., Rombaut, D., Van Hummelen, P., Galichet, A., Gruijsem, W., Inze, D., 2005. Ve Vuylsteke, M., Genome-Wide Analysis of Gene Expression Profiles Associated with Cell Cycle Transitions in Growing Organs of *Arabidopsis*, Plant Physiol, 138, 734-743.
- Beemster, G.T.S., Fiorani, F. ve Inze, D., 2003. Cell cycle: the key to plant growth control?, TRENDS in Plant Science, 8.
- Ben Haj Salah, H. ve Tardieu, F., 1995. Temperature affects expression rate of maize leaves without change in spatial distribution of cell length, Plant physiology, 109, 861-870.
- Burssens, S., Himanen, K., Van De Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inze, D. ve Verbruggen, N., 2000. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*, Planta, 211, 632-640.
- Cho, H.-T., ve Cosgrove, D., 2000. Altered expression of expansion modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 21 431–443.
- Cockcroft, C.E., Den Boer, B.G.W., Healy, J.M.S. ve Murray, J. A. H., 2000. Cyclin D control of growth rate in plants, Nature, 405, 575-579
- De Jager, S.M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. ve Murray, J.A.H., 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants, Seminars in Cell & Developmental Biology, 16, 385-396.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. ve Inze, D., 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*, The Plant Cell, 13, 1653-1667.
- Dewitte, W ve Murray, J.A.H., 2003. The plant cell cycle, Annual Review of Plant Biology, 54, 235-64.
- Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C. ve Larkins, B.A., 2002. Genetic analysis of endoreduplication, in *Zea mays* endosperm: evidence of sporophytic and zygotic maternal control, Genetics, 160, 3, 1163-1177.

- Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A. ve Arduini, I., 2003. Growth responses of sorghum plants to chilling temperature and duration of exposure, European Journal Of Agronomy, 21, 93-103.
- Fiorani, F., 2001. Leaf growth of contrasting *Poa* species, Department of Plant Ecophysiology. Utrech, Utrech University.
- Gachon, C., Mingam, A., ve Charrier, B., 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies?, Journal of Experimental Botany, 55, 402, 1445-1454.
- Grafi, G., Burnett, R., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R. ve Kaelin, W.G., 1996. A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication. Proceeding of the National Academy of sciences USA, 93, 8962–8967.
- Granier, C. ve Tardieu, F., 1998. Spatial and temporal analysis of expression ve cell cycle in sunflower leaves, Plant Physiology, 116, 991-1001.
- Haber, A.H., 1962. Nonessentiality of concurrent cell divisions for degree of polarization of leaf growth. I. Studies with radiation-induced mitotic inhibition, American Journal of Botany, 49, 583–589.
- Hanson, J., Johannesson, H., ve Engstrom, P., 2001. Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZip gene *ATHB13*, Plant Mol. Biol., 45, 247-262.
- Hemerly, A., Engler, J.d.A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inze, D. ve Ferreira, P., 1995. Dominant negative mutants of the *cdc2* kinases uncouple cell division from iterative plant development, EMBO Journal, 14, 3925-3936.
- Jones, A., Im, K.-H., Savka, M. A., Wu, M. J., DeWitt, N. G., Shillito, R., ve Binns, A., 1998. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed Auxin-Binding Protein, Science, 282, 1114-1117.
- Lee, S.H., Ahn, S.J., Im, Y.J., Cho, K., Chung, G.-C., Cho, B.-H. ve Han, O., 2005. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in fig leaf gourd and cucumber roots, Biochemical and Biophysical Research Communications, 330, 1194-1198.
- Levitt, J., 1972. Respsnes of plants to environmental stresses, Academic Press, New York.
- Mizukami, Y., ve Fischer, R. L., 2000. Plant organ size control:*AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 942–947.
- Muller, B., Reymond, M. ve Tardieu, F., 2001. The elongation rate at the base of a maize leaf shows an invariant patterns during both the steady-state elongation and the establishment of the elongation zone, Journal of Experimental Botany, 52, 1259-1268.

- Shabala, S. ve Shabala, L., 2002. Kinetics of net H^+ , Ca^{+2} , K^+ , Na^+ , NH_4^+ , and Cl^- fluxes associated with post-chilling recovery of plasma membrane transporters in *Zea mays* leaf and root tissues, Physiologia Plantarum, 114, 47-56.
- Silk, W.K., Lord, E.M. ve Eckard, K.J., 1989. Growth patterns inferred from anatomical records. Plant Physiology, 90, 708–713.
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J. ve Larkins, B.A., 1999. Characterization of maize (*Zea mays* L.) WEE1 and its activity in developing endosperm, Proceeding of the National Academy of sciences USA, 96, 4180-4185.
- Timpte, C.C., Wilson, A. K., ve Etselle, M., 1992. Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence, Planta, 188, 271-278.
- Tsuge, T., Tsukaya, H., ve Uchimiya, H., 1996. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh, Development, 122, 1589-1600.
- Tsukaya, H., 2002. Interpretation of mutants in leaf morphology: genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theories. Int Rev Cytol., 217, 1-39.
- Ullah, H., Chen, J.G., Young, J.C., Im, K.-H., Sussman, M.R., ve Jones, A.M., 2001. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*, Science, 292, 2066-2069.
- URL–1, <http://www.genetikbilimi.com/gen/hucredongusu.htm> Genetik Bilimi. 03 Şubat. 2006
- URL–2, http://www.genbilim.com/prog_cells1.htm Gen Bilim 03 Şubat 2006.
- URL–3, <http://rsb.info.nih.gov/> Research Services Branch. 15 mayıs 2005.
- Vandepoele, K., Jeroen, R., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. ve Inze, D., 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*, The Plant Cell, 14, 903-916.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S. ve Fowke, L.C., 2000. Expression of the plant cyclin dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology, Plant J., 24.

8. EKLER

Ek Tablo 1. Hücre döngüsü genlerinin dizi tanımları

No	Genlerin dizi tanımı
1	gi 168510 gb M60526.1 MZEKINAA <i>Z.mays</i> protein <i>cdc2</i> kinase mRNA, complete cds
2	TC237599 TC261503
3	TC221118 TC249974
4	TC239691 TC273679
5	TC221495 TC259924
6	TC239285 TC273258
7	TC218507 TC248058
8	gi 1399509 gb U50064.1 ZMU50064 <i>Zea mays</i> type A-like cyclin (CYCZM2W) mRNA, complete cds
9	gi 516549 gb U10077.1 ZMU10077 <i>Zea mays</i> B73 cyclin IIzm mRNA, partial cds
10	TC226007 TC263835
11	TC258803
12	gi 31363480 gb CD447837.1 CD447837 EL01N0201F01.b Endosperm_1 <i>Zea mays</i> cDNA, mRNA sequence
13	gi 516551 gb U10078.1 ZMU10078 <i>Zea mays</i> B73 cyclin Ibzm mRNA, complete cds
14	gi 516553 gb U10079.1 ZMU10079 <i>Zea mays</i> B73 cyclin Iazm mRNA, partial cds
15	gi 1545870 gb U66607.1 ZMU66607 <i>Zea mays</i> cyclin type B-like partially processed transcript, complete cds
16	gi 1545872 gb U66608.1 ZMU66608 <i>Zea mays</i> cyclin type B-like mRNA, complete cds
17	gi 516547 gb U10076.1 ZMU10076 <i>Zea mays</i> B73 cyclin IIIzm mRNA, complete cds
18	TC273722
19	TC238420 TC251565

Ek Tablo 1'in devamı

20	gi 19070610 gb AF351189.1 <i>Zea mays</i> cultivar Mo17 D-type cyclin (<i>cycD2</i>) mRNA, complete cds
21	gi 19070614 gb AF351191.1 <i>Zea mays</i> cultivar Hi-II D-type cyclin (<i>cycD4</i>) mRNA, complete cds
22	gi 19070612 gb AF351190.1 <i>Zea mays</i> cultivar Mo17 D-type cyclin (<i>cycD1</i>) mRNA, complete cds
23	TC238530 TC259929
24	TC225518 TC263698
25	gi 5821716 gb AF123594.1 AF123594 <i>Zea mays</i> Wee1-like protein (<i>Wee1</i>) mRNA, partial cds
26	TC247915
27	TC239658 TC252217
28	TC223035 TC261980
29	TC241144 TC253291
30	Q6QP49
31	TC239844 TC272920
32	TC241850 TC272921
33	gi 9733131 gb BE511883.1 BE511883 946064A10.y1 946 - tassel primordium prepared by Schmidt lab <i>Zea mays</i> cDNA, mRNA sequence
34	TC226371 TC253601
35	TC239731 TC252549
36	TC239258 TC262945
37	gi 2352794 gb AF007793.1 AF007793 <i>Zea mays</i> retinoblastoma-related protein 1 (RRB1) mRNA, complete cds
38	gi 9716501 gb AF250050.1 <i>Zea mays</i> retinoblastoma related protein RBR1 (<i>rbr1</i>) mRNA, complete cds
39	gi 1617473 emb X98923.1 ZMRB1 <i>Z.mays</i> mRNA for Rb1 protein
40	gi 18426917 gb U52099.2 ZMU52099 <i>Zea mays</i> retinoblastoma-like protein (ZmRB) mRNA, partial cds
41	gi 24561940 emb AJ279062.1 ZMA279062 <i>Zea mays</i> rbr2 gene for retinoblastoma-related protein, exons 1-16

Ek Tablo 1'in devamı

43	gij2352796 gb AF007794.1 AF007794 <i>Zea mays</i> retinoblastoma-related protein 2a (RRB2a) mRNA, partial cds
44	TC232400 TC273465
45	TC230009 TC276336
46	TC239013 TC252199

Ek Tablo 2. Hücre döngüsü genleri primerlerinin dizi sıraları

No	Gen	ileri primer	geri Primer
1	CDKA(1)	GCGGGCGAGGAGCAGAC	AGTGGCGAGGAAGCGGAAG
2	CDKA(2)	AAGAACCACCGCATAGTCAAATCC	AGCCCTCGCCAGTCCAAG
3	CDKB(1)	CACAACACAACACTCCACTCCTC	CCGCTCGCTCTCGTCTACC
4	CDKB(2)	CTGAAGCGACCCGAGTAGTAGG	CTCCCTGCCTTATCCATCACAAC
5	CDKC(1)	AGCAACAGAGGCAGGCAGAG	GCAAGCGAGAATGTGGTGGAG
6	CDKD(1)	CCGTCGCCTCCGCCTAC	AAGCACCTCCGCCTCAACC
7	CDKE(1)	GCCTTCAACGCTGCCTCAC	TCCGCCTTCCTTCTCAACTGG
8	CYCA(1)	TCCCGCCGCTCCTCCTC	GTCCCGCCGCTTGGTAG
9	CYCA(2)	GGCTCGTGGAAGTTGCTGAAG	CCGTTTGCCTGATTTGTTG
10	CYCA		
11	CYCA(3)	CGCTTCTCTCCGTCAATGC	TTGGTGTAGGTGTTGTCTGTGATG
12	CYCA(4)	GCCTCCGACATCTACACCTACC	CACCCGCCGCACCAAATC
13	CYCB(1)	GATGGACTACGGTATGGTGATGAC	CAGTGTGGTGCTTCAAGGTCTC
14	CYCB(2)	AGCAGGACGCAGTTGGAGAG	GAGCCGAGAGCACAGAAGAAAG
15	CYCB(3)	GGATGATGCGTGTAACCGTAACC	CAACGAGCCTCAACCTGACAAC
16	CYCB(4)	CGGGTTTCGCTCCACGTTTAC	CGCCGCCGTTTCATCTGTTC
17	CYCB(5)	TGAGATGGAGAGGAGGATAGTGAAC	CTGATTGTGCTGCCTTTAGAAACC
18	CYCB		
19	CYCB(6)	CAGTAGTCCAGTCTCCTCCTTC	ATAATAACAAGCAGCAACGGTAACG
20	CYCD(1)	CAAGTAGGTGGCGTGGCAAG	CCGAGAATAGCAGCGTTGTCC
21	CYCD(2)	GGTCTGGTGGAGCGGGAAC	CTGTGGTGCGTGTAAGCCTTC
22	CYCD(3)	GCGTCCTCGGGCGTCTC	GTCTCCTTGTGCGGTTGTC
23	CYCD		
24	CYCH(1)	CCCGCCGCCGCTGAATC	GCCGCCACCTCTCCATC
25	WEE(1)	TGGTAATGGTCTTTCACGCTATCG	TCTTTCAGTCTTGCCTCCTTTC
26	CKS(1)	GGTGTGATCTGGTTAGTAGCACTG	AATCACCATGACCATACTGACCATC

Ek Tablo 2'nin devamı

27	CKS(2)	AAATGTTCTCTGTCTGTCTGTC	GTGAAATCCCAAGCCAACCTACC
8	DEL(1)	CAGCCGCAAGCAGAAGTCC	TCGTCCAGCCCAATCACCTC
29	DEL(2)	CCACGAGGAGACCAATATGAGAAC	GCCCTACCCAACCAACGAAAC
30	DEL(3)	GAGGAGGACGGCAGCAAGG	GAGGAGGGAGCACGGGATTC
31	E2F/DP(1)	CCACCGTCCAGCCGCAG	CGTCGTCCCGTTGATGTC
32	E2F/DP(2)	GTTCACTGGCGTTGTCTGTC	GTTACACCCGTCGTTCTACCAATC
33	E2F/DP(3)	GAAGCGTCGGCGGCAATG	GTAGTCCGTCCTTTGGTCTCAAC
34	KRP(1)	CTGTTGCTGCGTGCGACTG	CCGAGGCGTTGGTGGTAGG
35	KRP(2)	GAGGGAGCGGAGGTGAGTTC	AGGCAGGTTTGAATGGGTGAAG
36	KRP(3)	AGCAGCAGACGCAGTGGG	ACGCCTCAGCCTCCTTAGTTG
37	Rb(A3)		
38	Rb(A4)		
39	Rb(A1)		
40	Rb(A2)		
41	Rb(B1)	CCAGCAGAAGCAATCGGAGAG	AGAGGAAGGTGTGTAGCATCATTAC
42	Rb(B2)		
43	Rb(B3)	CAAATGGAGAAGGGCGATATATAGG	GCTGTGAAATGAAATGATGAACCTC
44	Rb		
45	Rb(C)	AGGACAGTTTACTTGGTAGTGGAAG	CGTGGAGGAGACATTGGATTTGG
46	Rb(D)	GTAACGGGAAAACAGGAGAAGACC	GGACTTGACGGCAGGAATGAATAC
	RbA1-2-3-4	TGTCAAGGCAGAATGTTCTGATCG	GTGGCTTTGCTTGGGTGGAG
	RbA1-3-4	GGCATCTCCCACAAAGACAATAAAG	CACCTCACGAAGCCACTTAGC
	RbA1-3	ACGGTAGTGATGGCAGGAGAC	AAGGTGGATGCTCTTGGTCAATAC
	RbA3-4	GGTAAATCTACTGACGCAGGGAAG	AGGTCCTTGAACAATTCTGGTGATC
	RbB1-2	AGGTTAGGTGTTGCTGTAGAATGAG	AGAATTGGTGTGGCCTGGAAAG
	RbB1	CCAGCAGAAGCAATCGGAGAG	AGAGGAAGGTGTGTAGCATCATTAC
	RbB3	CAAATGGAGAAGGGCGATATATAGG	GCTGTGAAATGAAATGATGAACCTC

ACKNOWLEDGEMENTS

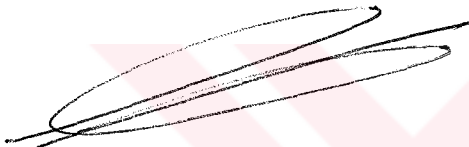
During the thesis stage of my Master of Science program (M.Sc.) I was admitted to Erasmus/Socrates program; therefore, I had the unique opportunity to continue the experiments for my research purposes at Gent University. To this end, most of the analyses in this thesis were completed in the Department of Plant Systems Biology at Gent University, Belgium. This was an invaluable opportunity for me, so I owe great debt to thank all who provided me with a good study environment during my stay there. As only one means of many to express my feelings I am indebted to those who helped me from the beginning to the end of my thesis period. First of all, I wish to thank Prof. Dirk Inze to have accepted me as an Erasmus student in his laboratory. Especially I wish to thank Dr. Gerrit Beemster, who provided me with a nice study atmosphere and permission to access the resources in his lab and offered all possibility for research purposes. His constructing comments significantly improved this work. His enlightening discussing about transcriptional regulation of cell cycle has also improved my insight in this field very much. Especially, I wish to thank Dr. Gerrit for his permission to use the research findings in my thesis. Besides, I am also very glad that he appeared in my viva. I also gratefully acknowledge the assistance of Dr. Fabio Fiorani for his stimulating discussions which contributed to the completion of this work. The other person who contributed to this work very much is Bart Rymen. As a of member of our small group he helped me very much in computer work and analysis of our data. He is also the one who helped me with measurement of cell length and observation of mitotic figure. Here, my last but not the least thanks go to the small group members; namely, Dr. Gerrit Beemster, Dr. Fabio Fiorani, my supervisor and Bart Rymen. I thank them for the cheerful conversations about kinematic analysis and all.

Gent, 6-12-2005

To whom it may concern,

This is to certify that Ms. Fatma Kartal, a Socrates/Erasmus student who also studied in my Project between the period of 2004-2005, is free to use her findings as a Master Science Thesis in the 'Institute of Graduate School of Natural and Applied Science' of Karadeniz Technical University, Turkey. I would like to be glad to appear as a thesis advisor on her Turkish thesis and in her viva.

Best regards,



Gerrit T.S. Beemster
Group leader Leaf Development and Growth Control
Plant System Biology
University of Gent / Flemish Institute of Biotechnology
Technology Park 927
9052 Zwijnaarde
Belgium



ÖZGEÇMİŞ

18.05.1981 yılında Samsun'da doğdu. İlk ve orta okulu Çarşamba Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, liseyi ise Ankara Özel Hafsa Sultan Kız Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Faik Ahmet AYZAZ danışmanlığında tezli yüksek lisans öğrenimine başladı. 2004–2005 öğretim yılında Belçika'nın Gent Üniversitesi'nde Erasmus öğrencisi olarak yüksek lisans çalışmalarına devam etti.

