

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNİN BÜYÜMESİNİ DÜZENLEYEN YENİ BİR
GENİN TANIMLANMASI**

DOKTORA TEZİ

Fatma AYDINOĞLU

**ARALIK 2010
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNİN BÜYÜMESİNİ DÜZENLEYEN YENİ BİR
GENİN TANIMLANMASI**

Biyolog Fatma AYDINOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor”
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 08.11.2010
Tezin Savunma Tarih : 03.12.2010**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Faik Ahmet AYZAZ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
Jüri Üyesi : Prof. Dr. İbrahim TURNA
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
Jüri Üyesi : Prof Dr. İsmail TÜRKAN**

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin büyümesini düzenleyen yeni bir genin tanımlanması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ’a teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca rapor sunumlarımı izleyen ve değerli yorumlarıyla çalışmalarımın geliştirilmesinde emeği geçen tez izleme jürilerim sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU ve Prof. Dr. İbrahim TURNA’ya şükranlarımı sunarım. Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında bana laboratuvar imkanlarını sunan başta Belçika’nın Gent Üniversitesi Bitki Sistemleri Bölümü başkanı Prof. Dr. Dirk INZE olmak üzere, grup üyesi olarak beni laboratuvarına kabul eden Bitki Organ Gelişimi Regülasyonu grup lideri Prof. Dr. Gerrit BEEMSTER ve literatür taraması ve metotlar konusunda yardım aldığım ve tavsiyelerinden yararlandığım Yrd. Dr. Hilde Nelissen’e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans hayatım boyunca arkadaşlıklarımı esirgemeyen ve çalışma ortamını daha zevkli kılan KTÜ Bitki Fizyolojisi ve Biyokimyası Laboratuvarı üyelerine teşekkür ederim. Burada, Biyoloji alanını bana sevdiren ve bu alanda yetişmemi sağlayan KTÜ Biyoloji Bölümü’ndeki tüm hocalarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmam süresince, 2214 nolu Yurtdışı Araştırma Burs Programından yararlanmamı sağladığından dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na minnettarlığımı sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi akademik çalışmalarım süresince desteklerini benden hiç esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler sunarım.

Son olarak, tez çalışmam boyunca moral desteğiyle her zaman yanımda olan, yurtdışı ve laboratuvar çalışmalarım süresince anlayış ve hoşgörü gösteren sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU’na tüm kalbimle teşekkür ederim.

Fatma AYDINOĞLU
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Mısır Bitkisinin (<i>Zea mays</i> L.) Biyolojisi	5
1.3. Bitkilerde Büyüme	6
1.4. Bitki Büyüme Evreleri	10
1.4.1 Büyümenin Hücre Üretimi Evresi	10
1.4.1.1. Hücre Döngüsü	10
1.4.1.2. Ana Hücre Döngüsü Düzenleyicileri..	11
1.4.2 Hücre Genişleme Evresi.....	15
1.5. Bitki Büyümesini Etkileyen Faktörler	18
1.5.1. Çevresel Faktörler	18
1.5.2. Genetik Faktörler	20
1.6. Bitkilerde Stres ve Stres Çeşitleri	20
1.6.1. Kuraklık Stresi.....	25
1.6.1.1. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri	26
1.6.2. Üşüme Stresi.....	28
1.7. Kromatin Biyolojisi.....	31
1.7.1. DNA Metilasyonu.....	33
1.8. Monokotillerde Yaprak Büyümesinin Analiz Edilmesinde Kullanılan Metodlar	35
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	37
2.1. Bitki materyalinin Sağlanması ve Büyütme Şartları.....	37
2.2. Tohum Stokunu Artırmak için Tozlaştırma İşlemi.....	40

2.3.	Popülasyondaki Mutant Mısır Hatlarının Belirlenmesi	41
2.3.1.	Yaprak Boyama Testi.....	41
2.3.2.	Lateral Flow Testi.....	42
2.3.3.	dCAPS Metodu.....	43
2.3.3.1.	Edward Metodu ile Bitki Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	44
2.3.3.2.	PCR Şartları ve Primerlerin Tasarımı	45
2.3.3.3.	DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi	46
2.3.3.4.	Kesilen DNA'ların Jel Elektroforezi ile Yürütülmesi.....	46
2.3.4.	Gen Dizi Analizi	47
2.4.	Yaprak Uzama Oranının Belirlenmesi	47
2.5.	Büyüme Bölgesinin Hücre Uzunluğu Profiline Belirlenmesi.....	48
2.6.	Meristem Uzunluğunun Hesaplanması	50
2.7.	Hücre Büyümesinin Sayısal Analizleri	51
2.8.	Hücre Döngüsü İlerleyişini Flow Sitometri Tekniği ile Belirlenmesi	53
2.9.	Q_RT-PCR ile Kromatin Genlerinin Suskunluk Derecesinin ve Hücre Döngüsü Genlerinin Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	56
2.9.1.	TRIZol ile RNA Ekstraksiyonu.....	56
2.9.2.	RNA'nın Temizlenmesi	57
2.9.3.	RNA Miktarının Belirlenmesi	58
2.9.4.	cDNA Sentezi	58
2.9.5.	Primerler	58
2.9.6.	Kantitatif Real Time PCR (q_RT-PCR).....	61
2.10.	İstatistik Analizler	64
3.	BULGULAR	65
3.1.	Populasyondaki Mutant Mısır Hatlarının Genotipleri	66
3.2.	Tozlaşma ve Transgenin Kalıtımı.....	68
3.3.	Kromatin Genlerinin Büyüme Üzerindeki Rolü.....	68
3.3.1.	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 101 (DMT101)</i> Geninin Büyümedeki Rolü	68
3.3.1.1.	Hat32'nin Yaprak Büyüme Parametreleri.....	68
3.3.1.2.	Hat32.1'in Yaprak Büyüme Parametreleri.....	70
3.3.2.	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 102 (DMT102)</i> Geninin Büyümedeki Rolü	71
3.3.3.	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 103 (DMT103)</i> Geninin Büyümedeki Rolü	73
3.3.4.	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 106 (DMT106)</i> Geninin Büyümedeki Rolü	76
3.3.5.	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 107 (DMT107)</i> Geninin Büyümedeki Rolü	76

3.3.6.	<i>SET DOMAIN 118 (SDG118)</i> Geninin Büyümedeki Rolü	77
3.3.7.	<i>SET DOMAIN 122 (SDG122)</i> geninin büyümedeki rolü	79
3.3.7.1.	Hat39'un Yaprak Büyüme Parametreleri	80
3.3.7.2.	Hat39.1'in Yaprak Büyüme Parametreleri	82
3.3.8.	<i>NÜKLEOZOM KONUMLANDIRI GEN 102 (NFE102)</i> geninin büyümedeki rolü	85
3.4.	Hat05'in Meristem Uzunluğu	88
3.5.	Hat05'in Hücre Uzunluğu Profili	89
3.6.	Hat05'in Yaprak Büyümesinin Sayısal Değerleri	92
3.7.	Hat05'in Hücre Döngüsünün İlerleyişi	94
3.8.	Hat05'in Hücre Döngüsü Genlerinin Ekspresyon Profili	95
3.9.	<i>DMT103</i> Geninin Abiyotik Strese Cevaptaki Rolü	96
3.9.1.	<i>DMT103</i> Geninin Kuraklık Stresindeki Rolü	96
3.9.2.	<i>DMT103</i> Geninin Üşüme Stresindeki Rolü	97
3.9.2.1.	Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen Hat05'in Meristem Uzunluğu	99
3.9.2.2.	Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen Hat05'in Hücre Uzunluğu Profili	99
3.9.2.3.	Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen Hat05'in Büyüme Parametreleri	99
3.9.2.4.	Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen <i>DMT103</i> ve <i>DMT107</i> Genlerinin B73 Fidelerinde Ekspresyonu	103
3.10.	Hat05'in <i>DMT</i> Ailesine Ait Genlerin Ekspresyonu	104
3.11.	<i>DMT103</i> geninin kök gelişimindeki rolü	104
4.	TARTIŞMA	106
5.	SONUÇLAR	119
6.	ÖNERİLER	120
7.	KAYNAKLAR	121

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Bu doktora çalışmasının amacı mısır bitkisinin büyümesini düzenleyen yeni bir gen tanımlamaktır. Bitkilerde büyüme, hücre bölünmesi ve genişlemesi mekanizmalarının koordinasyonu ile gerçekleşir. Mısır yaprağı, farklı gelişim bölgelerinde gerçekleşen bu işlevlerin araştırılmasında çok kullanışlı bir modeldir. Yaprak tabanından itibaren sırasıyla, bölünen hücrelerden oluşan meristem, uzayan hücreleri barındıran uzama ve son olarak en uçta olgun hücrelerin yer aldığı olgunlaşma bölgeleri yer alır. Çalışmamızda, mısır yaprağının bu gelişim evrelerine spesifik genleri belirlemek için mikrodizi analizleri kullanıldı. Özellikle, muhtemel büyüme düzenleyici olabileceklerinden, meristem bölgesinde ekspresyonlarında farklılık gösteren genlere odaklanılmıştır. Bu kümede kromatin genlerinin aşırı ifade edildiği görülmüştür. Bu sebeple, kromatin mutant mısır hatlarının yaprak büyümeleri incelenmiştir. *DNA METİLTRANSFERAZ103 (DMT103)* geni susturulmuş bir RNAi mutantı olan Hat05'in yaprak uzunluğunda ve yaprak uzama oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalış saptanmıştır. Büyümede meydana gelen bu azalışın sebebini ayrıntılı olarak araştırmak üzere yapılan kinematik analizler sonucu, mutantlarda yaban tiplere nazaran hücre üretiminden ziyade uzama işlevlerinde bir aksaklık meydana geldiği belirlendi. *DMT103* geninin ifadesinin gelişime bağlı olarak artması bu genin uzama işlevindeki muhtemel rolünü desteklemektedir. Bu bulgular, çoğu hücre döngüsü geninin ekspresyonunun istatistiksel olarak önemli derecede değişmediğini gösteren ekspresyon analizleri ile de doğrulanmıştır. Flow sitometri ile hücre döngüsü evrelerine düşen DNA miktarlarının değişmediği ve hücre döngüsü ilerleyişinin aynı kaldığı tespit edildi. *dmt103* mutantlarında mısır bitkisinin primer kök gelişiminin de etkilendiği gözlenmiştir. *DMT103* geninin stres toleransında rol alıp almadığını gözlemek için Hat05, kuraklığa ve üşüme stresine maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, *DMT103* geninin kuraklıkta rol almadığını ancak üşüme toleransında bir fonksiyonunun olduğunu göstermiştir. Hat05'in mutantlarında DMT ailesine ait diğer iki genin de ekspresyonlarının istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar, *DMT103* geninin büyümede rolüne işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mısır, Bitkilerde Büyüme, Hücre Bölünmesi ve Uzaması, Kinematik Analizler, Kromatin Genleri, DNA Metilasyonu, Hücre Döngüsü

SUMMARY

Identification of the New Growth Regulatory Gene in Maize (*Zea mays* L.)

The aim of this research is to identify new growth regulatory genes in maize. Plant growth is the results of cell division and cell expansion and the maize leaf offers a powerful system to investigate these processes since they take place in distinct developmental zones along the axis of a single leaf. The basal part of leaf consists of the meristematic zone of dividing cells, followed by elongation zone in which cells elongate and finally the most distal part containing mature cells. We used microarray analysis on these leaves to identify genes specific to each developmental stage. Our main focus is on the genes specifically upregulated in the meristematic zone since these might represent new growth regulators. In this cluster, an overrepresentation of chromatin genes is detected. Therefore, mutants from the Chromatin Database were screened for leaf growth phenotypes. The RNAi line for the DNA METHYLTRANSFERASE103 (*DMT103*) showed significantly shorter leaves and reduced leaf elongation rate. To further unravel this growth effect, we performed a kinematic analysis showing that cell expansion rather than cell production was affected in the mutant compared to wild type. This corresponds to the expression profile of the gene, which is low in the meristem and very high in the mature zone. Those findings were also correlated by expression analysis of cell cycle genes thus most of the genes' expression did not change significantly. Flow cytometry showed the proportion of the DNA amount was also stayed unchanged meaning. It was also observed that the primary root was affected in the mutant ones. Line05 was also treated cold and drought to see whether *DMT103* have function to tolerate that kind of stress. It was seen that *DMT103* did not play role in drought but had function in cold stress. Expression analysis was done whether to see the other DMT family members were affected and it was found that two other members of the family were significantly down regulated in mutant ones. Nevertheless, our data clearly demonstrate the feasible role of *DMT103* gene for growth regulation.

Key Words: *Zea mays*, Plant Growth, Cell Division and Elongation, Kinematic Analysis, Chromatin Genes, Cell Cycle

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Mısır bitkisinin kısımlarının şematik gösterimi	6
Şekil 1.2. Bitkilerde zamana göre büyümeyi gösteren büyüme eğrisi.....	8
Şekil 1.3. Mısır bitkisinin büyüme evrelerinin gösterimi.....	11
Şekil 1.4. Soğan bitkisinde mitozun evreleri.....	13
Şekil 1.5 Hücre döngüsünün G1/ S kontrol noktası.....	14
Şekil 1.6. Hücre döngüsünün G2/S kontrol noktası.....	16
Şekil 1.7 Başlıca stres tipleri	22
Şekil 1.8. Abiyotik strese karşı bitki cevabının oluşum mekanizması	24
Şekil 1.9. DNA'nın kromatin içerisinde organizasyonu	32
Şekil 1.10. Bitki ve hayvanlara ait DNA metiltransferaz enzimlerinin filogenetik analizi	35
Şekil 2.1. Kök büyümesini gözlemleyebilmek için kağıt rulo sisteminde yetiştirilen bitkilerin lovibond içerisindeki temsili fotoğrafı	39
Şekil 2.2. Sera ortamında isteye bağlı tozlaştırma yapılmış mısır bitkilerinin temsili fotoğrafı	40
Şekil 2.3. Bir marker ile işaretlenen yaprağın sünger yardımıyla basta çözültüsü ile boyanmasını	42
Şekil 2.4. Lateral flow testinin şematik gösterimi	43
Şekil 2.5. Yaprak ölçümü.....	48
Şekil 2.6. Mısır fidesi yaprağının büyüme bölgesinin 1 cm'lik 10 parçaya ayrılması.....	49
Şekil 2.7. Yaprak tabanından itibaren onuncu santimetrenin 20X'lik objektif büyütmede görünüşü.....	50
Şekil 2.8. Mısır fidelerinin yaprak ayası boyunca yer alan hücrelere ait uzunluk dağılımı	51
Şekil 2.9. A, B ve C sırasıyla 3, 2. ve 1. cm'lerdeki epidermal hücrelerin 40X DIC mikroskobu büyütmesi altında görünümü	54
Şekil 2.10. Floresans yoğunluğuna oransal olarak hücrenin sahip olduğu DNA'yı gösteren FloMax yazılımıyla elde edilen histogram.....	56
Şekil 2.11. Öncesinde biraz kalıntıyla birlikte iyi bir amplifikasyonu gösteren tek bir pik veren bir erime eğrisi... ..	63
Şekil 2.12. Logaritmik ölçekte bir PCR amplifikasyon eğrisi.....	63
Şekil 3.1. Basta uygulanmış mısır yaprağı... ..	66
Şekil 3.2. Lateral Flow Test çubuklarının görünümü... ..	67

Şekil 3.3. TILLING mutant hattı olan DMT107 dCAPS metodu sonrasında üretilen bantlar.....	67
Şekil 3.4. Hat 32'in yaprak uzama oranı.....	69
Şekil 3.5. Hat 32'nin ait yaprak genişliği, alanı ve olgun hücre uzunluğu....	69
Şekil 3.6. Hat 32.1'in yaprak uzama oranı.....	70
Şekil 3.7. Hat 32.1'nin yaprak genişliği, yaprak alanı, ve olgun hücre uzunluğu.....	71
Şekil 3.8. Hat 20'in yaprak uzama oranı.....	72
Şekil 3.9. Hat 20'nin yaprak genişliği, alanı ve olgun hücre uzunluğu....	72
Şekil 3.10. Hat 05'in dördüncü yaprağının uzunluk profili ve yaprak uzama oranı.....	73
Şekil 3.11. Hat 05'e ait yaban tip ve mutant mısırların dördüncü yaprakların görünümü....	74
Şekil 3.12. Hat05'in yaprak genişliği, aya uzunluğu, alanı ve hücre uzunluğu....	74
Şekil 3.13. Hat05'in <i>DMT103</i> geninin farklı büyüme basamaklarında suskunluk derecesi ve ekspresyon profili....	75
Şekil 3.14. TILLING Hat DMT107'nin yaprak uzunluğu ve yaprak uzama oranı.....	76
Şekil 3.15. Hat 29'un Yaprak uzunluğu ve yaprak uzama oranı.....	77
Şekil 3.16. Hat 29 yaprak genişliği, alanı ve hücre uzunluğu....	78
Şekil 3.17. Hat29'da <i>SET DOMAIN GENİ 118 (SDG118)</i> 'nin suskunluk derecesi.....	78
Şekil 3.18. <i>DMT101</i> , <i>DMT102</i> ve <i>DMT103</i> genlerinin Hat29 köklerinde ekspresyonu....	79
Şekil 3.19. Hat 39'un Yaprak uzunluğu ve yaprak uzama oranı.....	80
Şekil 3.20. Hat 39 yaprak genişliği, alanı ve hücre uzunluğu....	81
Şekil 3.21. Hat39'un <i>SDG122</i> geninin suskunluk derecesi.....	81
Şekil 3.22. Hat 39'un <i>SDG118</i> , <i>DMT101</i> , <i>DMT102</i> ve <i>DMT103</i> genlerinin ekspresyonu.....	82
Şekil 3.23. Hat 39.1'un Yaprak uzunluğu ve yaprak uzama oranı.....	83
Şekil 3.24. Hat 39.1 yaprak genişliği, alanı ve hücre uzunluğu....	83
Şekil 3.25. Hat39.1'in <i>SDG122</i> geninin susukunluk derecesi.....	84
Şekil 3.26. Hat 39'un <i>SDG118</i> , <i>DMT101</i> , <i>DMT102</i> ve <i>DMT103</i> genlerinin ekspresyonu.....	84
Şekil 3.27. Hat 44'ün yaprak uzunluğu ve yaprak uzama oranı.....	85
Şekil 3.28. Hat 39.1'in yaprak genişliği, alanı ve hücre uzunluğu.....	86
Şekil 3.29. Hat44'ün <i>NFE102</i> geninin suskunluk derecesi.....	86
Şekil 3.30. Hat 44'ün <i>DMT101</i> , <i>DMT102</i> ve <i>DMT103</i> genlerinin ekspresyonu.....	80
Şekil 3.31. Hat05'in meristem uzunluğu.....	89
Şekil 3.32. Hat05'in büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profili.....	90

Şekil 3.33. Hat05'in birim hücre uzama profili.....	91
Şekil 3.34. Hat05'in dördüncü yaprağının büyüme bölgesi boyunca yer alan hücrelerin nüklear DNA miktarı.....	94
Şekil 3.35. Hat05'in 4. yaprağının meristeminde hücre döngüsü genlerinin ekspresyon miktarı.....	95
Şekil 3.36. Hat 05'in kuraklık stresi altında yaprak uzama oranı.....	96
Şekil 3.37. Hat 05'in soğuk stresi altında yaprak uzunluğu.....	97
Şekil 3.38. Hat 05'in soğuk stresi uygulaması sonucu fotoperiyod büyüme sürecinde kaydedilen yaprak uzama oranı... ..	98
Şekil 3.39. Kontrol ve üşüme stresi şartlarında yetiştirilen Hat05'e ait meristem Uzunluğu	99
Şekil 3.40. Hat05'in soğuk stresi altında büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profili.....	100
Şekil 3.41. Hat05'in soğuk stresi altında birim hücre uzama profili... ..	101
Şekil 3.42. Üşüme stresi altında yetiştirilen B73 fidelerinde <i>DMT103</i> geninin gelişim süresince ekspresyonu... ..	103
Şekil 3.43. Üşüme stresi altında yetiştirilen B73 fidelerinde <i>DMT107</i> geninin gelişim süresince ekspresyonu	104
Şekil 3.44. Hat05'in muatnt ve yaban tiplerinin büyüme evreleri boyunca DMT genlerinin ekspresyonu... ..	105
Şekil 4.1 <i>DMT103</i> geninin büyüme işlevleri sırasındaki muhtemel rolünü gösteren Model.....	116

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Hücre döngüsü fazlarında rol alan genlerin <i>Arabidopsis</i> homologları.....	12
Tablo 1.2. Üşüme stresinin hücrede meydana getirdiği semptomlar	29
Tablo 2.1. RNAi ve TILLING mutant mısır hatları ve mutant genleri.....	37
Tablo 2.2. İklim dolabının büyütme koşulları	39
Tablo 2.3. Mutant TILLING hatlarını belirlemek için kullanılan dCAPS primerlerin listesi	46
Tablo 2.4. Gen dizi analizi için kullanılan primerlerin listesi	47
Tablo 2.5. cDNA sentezi için kullanılan karışımlar ve miktarları.....	58
Tablo 2.6. RNAi kromatin mutantları ve referans genleri için kullanılan primerlerin listesi	59
Tablo 2.7. Hücre döngüsü genleri için kullanılan primer listesi.....	60
Tablo 2.7 'nin devamı	61
Tablo 2.8. Kantitatif PCR reaksiyonları için gerekli karışımın bileşenleri ve miktarları ve PCR'in sıcaklık ve döngü şartları	62
Tablo 3.1. Mutant hatların yaprak fenotip parametreleri	88
Tablo 3.2. Aynı büyüme şartlarında yetiştirilen Hat05'in yaban tip ve mutantlarının büyüme parametrelerinin karşılaştırılması	93
Tablo 3.3. Üşüme stresine maruz bırakılan Hat05'in yaban tipleri ve mutantlarına ait büyüme parametreleri.....	102
Tablo 3.3 'ün devamı	103
Tablo 3.4. Hat05'in kök sayısı.....	105

SEMBOLLER DİZİNİ

ABF/ABRE	: ABA-Binding Factor/ABA-Responsive Element
ANT	: <i>AINTEGUMENTA</i>
AN3/GIF1	: <i>ANGUTIFOLIA 3 GROWTH INTERACTING FACTOR 1</i>
<i>AtGRF5</i>	: <i>Arabidopsis thaliana GROWTH REGULATING FACTOR5</i>
ATP	: Adenin three phospat
ATPASE	: Atpaz
Basta	: Glufosinat herbisiti
BAR	: Bialaphos direnç geni
Bç	: Baz çifti
BRX	: <i>Brevis radix</i>
CAK	: CDK aktifleyici kinazlar
CAPS :	: Çoğaltılmış polimorfik dizenin kesilmesi metodu
CBF/DREB	: C-repeat binding factor/ Dehydration Response Element-binding protein
<i>Cdc2a</i>	: <i>Cell division control 2</i>
CDI	: Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	: Siklin bağımlı kinaz genleri
CDKA, -B, -C, -D, -E	: Siklin bağımlı kinaz genleri A, -B, -C, -D, -E
ChromDB	: Kromatin veritabanı
CpG	: Sitosin bazlarına
CKS1,-2	: CDK alt ünite proteinleri 1 ve -2
Ct	: Eşik değerine karşılık gelen döngü sayısı
CYCLIN	: Siklin
CYCLINA, -B, -C, -D, -H	: Siklin genleri A, -B, -C, -D, -E
\bar{D}	: Hücre bölünmesi oranı
DAPI	: 4`-6-diamino-2-phenylindole
DCAPS	: Çoğaltılmış polimorfik dizenin kesilmesinden türetilmiş
DMAT	: Düşük moleküler ağırlıklı tiyollerin
DMT101, -102, -103, -104	: <i>Zea mays</i> DNA Metiltransferaz genleri
DMT105, -106, -107	: <i>Zea mays</i> DNA Metiltransferaz genleri

DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
<i>DEL1, -2, -3</i>	: Del genleri 1, -2, -3 (CDK inhibitörleri)
DEPC	: Dietilprokarbonat
DIC	: Differential interference kontrast mikroskopu (Normanski)
dsDNA	: Çift zincirli DNA
EDTA	: Etilen deamin tetra asetik asit
EMS	: Etilmetansülfonat
E2F/DP1, -2, -3	: Transkripsiyon faktörleri
fw2.2	: Domatesi bitkisinde olgunlaşmadan sorunlu bir kantitatif karakter lokusu
G1/ G2	: Hücre döngüsünün Gap1/2 (Boşluk) safhası
H1, H2A, H2B, H3, H4	: Histon proteinleri
HBO	: Hücre bölünme oranı
HCL	: Hidroklorik asit
HSF	: Heat Shock Faktör
<i>KRP1, -2, -3</i>	: Kip bağımlı proteinler 1, -2, -3 (CDK inhibitörleri)
LEA	: Late embryogenesis abundant proteinleri
M	: Mitoz
MAC1	: Actin geni
<i>MAP</i>	: <i>Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase</i>
MyC	: Transkripsiyon faktörü
$N_{gz,div}$: Büyüme bölgesinde bölünen hücre sayısı
P	: Hücre üretimi
PAT	: Phosphinothricin acetyl transferase enzimi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonları
Q-RT-PCR	: Quantitative real-time PCR
QTL	: Quantitative trait loci (Kantitatif Karakter Lokusu)
<i>RBA, -B, -C, -D</i>	: <i>Retinoblastoma proteinleri A, -B, -C, -D, -E</i>
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNase	: RNAaz
RNAi	: RNA interference
RP6-1	: Ribuloz bifosfat
<i>RUBP</i>	: Rubisco geni

S	: Hücre döngüsünün sentez safhası
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
<i>SOS3</i>	: <i>For salt overly sensitive3</i> (Tuz tolerans geni)
SRS	: Serbest radikal süpürücüleri
SWI/SNF	: SWItch/Sucrose NonFermentable
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA solusyonu
\bar{T}_c	: Hücre döngüsü zamanı
TILLING	: Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TWEEN 20	: Islatma ajanı
<i>UBI</i>	: Ubiquitin geni
WEE1,-2,-3	: Wee 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

Bitkiler insan hayatında vazgeçilemez bir yere sahiptir. Pek çok faktöriyel ürünün hammaddesinden soframıza gelen tabağa kadar birçok alanda bitkilerden yararlanılmaktadır. Bitkiler sahip oldukları yapraklar sayesinde adeta güneş panelleri gibi görev yapan havayı temizleyici ve besin yapıcı fabrikalar gibidirler. Yapraklar güneş ışınlarını etkili bir şekilde absorbe ederek ve yine havadan aldıkları karbondioksiti fotosentez mekanizması sayesinde şekerlere indirgeyerek ışık enerjisinin kimyasal enerji içerisinde depolanmasını sağlarlar. Bu işlemler esnasında soluduğumuz oksijen ve yediğimiz besinler sentezlenmiş olur. Günümüzde ise Avrupa Birliği, fosil yakıtların hızla tükenmesi nedeniyle alternatif enerji kaynağı olarak bitkilerden faydalanmayı ön görmüş ve bu bağlamda 2010 yılının enerji ihtiyacının %12'sini bitkilerden karşılayacak şekilde stratejiler belirlemiştir (Bloem vd., 2010). Bu sebeple, mısır başta olmak üzere birçok tahıl bitkisinin büyüme potansiyelleri artırılarak, Avrupa'da yaygınlaşan biyodizel üretimi için gerekli biyokütle kaynağı olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bunlar gibi sayılabilecek pek çok faydaya sahip olduklarından, bilim adamları yüzyıllardır bitkileri en iyi şekilde yetiştirebilmek ve onlardan daha fazla ürün alabilmek için çalışmalarını sürdürmüşlerdir. Günümüzde ise, bunun, bitki büyümesi ve onu düzenleyen genetik, çevresel ve hormonal faktörlerle ilişkisinin aydınlatılmasıyla sağlanacağı konusunda hemfikir olmuşlardır.

Günümüze kadar büyümeyi açıklamak üzere bilim adamları tarafından başlıca üç teori ortaya atılmıştır. Bunlar sırasıyla, Hücre, Organizmal ve Yeni Hücre Teorileridir. Hücre teorisine göre, hücreler yaşamın temel üniteleridir, her canlı organizma bir veya daha fazla hücreden oluşmuştur ve bütün hücreler daha önce var olan bir hücreden meydana gelmiştir. Dolayısıyla, hücre teorisine göre, organın son şeklini almasında hücreler bir kontrol söz konusudur. Cüce mutantlar üzerinde yapılan araştırmalar, mutant organların yaban tiplere nazaran daha az hücreye sahip olduğunu gösterdi. Hücre teorisyenleri, hücre aktivitelerinde meydana gelen bazı değişmelerin bu mutant fenotipin oluşmasına sebep olabileceğini ileri sürmektedirler (Tsukaya, 2002). Aksine, Organizmal teorisyenlerinin bakış açısına göre ise, hücre sayısındaki bu değişim hücreler kontrol

altında değildir. Çünkü bitki hücreleri plasmodesmataların varlığıyla bir arada tutulduklarından onlar bireysel hücreler olarak düşünülemezler. Dolayısıyla, Organizmal teoriye göre, organın büyüklüğü bitkinin kendisi tarafından belirlenir. Bunu destekleyen bir çalışmada, γ radyasyonuna maruz bırakılmış arpalarda hücre sayısının azalmasına rağmen yaprakların normal büyüklüğünü koruduğu rapor edilmektedir (Haber, 1962). Yine Organizmal teoriye örnek olarak verilen bir çalışmada, *Arabidopsis*'in hücre döngüsünde anahtar düzenleyici olan *Cdc2a* geninde meydana getirilen bir dominant mutasyonun bitkinin büyüme zamanında, morfogenezinde ve histogenezinde her hangi bir olumsuz etkiye yol açmadığı görülmüştür (Hemerly vd., 1995). Bu deneylerden anlaşıldığı gibi hücre bölünmesi morfogenezle bağlantılı değildir. Son yıllarda, bu iki teori Yeni Hücre Teorisi olarak adlandırılan yeni bir yaklaşımla birleştirildi. 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).

Büyüme, genel anlamıyla bitkilerde geri dönüşümü olmayan hacim artışı olarak tanımlanmaktadır. Moleküler seviyede ise büyüme, hücre bölünmesi ve hücre genişlemesi gibi genlerle zamana ve konuma bağlı olarak kontrol edilen işlevler bütünüdür. Hücre bölünmesi hücre üretimi ile organın hücre sayısının artırılmasıdır. Tam olarak bölünmeyi neyin tetiklediği anlaşılammış olmasına rağmen bir şekilde hücre büyüklüğünün buna yol açtığı düşünülmektedir. Bütün hücrelerin kesin olarak belirlenmiş büyüklüklerde bölündüğünü gösteren deliller de bu fikri desteklemektedir (Beemster vd., 2003). Bir hücre belirli bir büyüklüğe ulaştığında, hacim ve yüzey oranı hücrenin besin gereksinimini ve gaz alışverişine, sınırlı bir alana sahip çekirdek ise büyüyen hücrenin ihtiyaçlarını karşılamada yetersiz kalır. Bu nedenle, hücre mitozla genetik olarak birbirine eş olan iki hücreye bölünür. Bu işlev hücre döngüsü genleri tarafından yürütülür (Vandepoele vd., 2002). Hücre genişlemesi ise hücrenin boyutlarının artmasıdır. Bu olay ksiloglukan endotransglukosilaz/hidrolaz ve ekspansin familyasına ait spesifik enzimler tarafından yürütülen hücre çeperi sentezi ve gevşetilmesi işlevleri sonucu gerçekleşir. Kortikal mikrotübül (MT)'lerden oluşan hücre duvarının fiziksel şeklinin de hücre genişlemesinde önemli bir role sahip olduğu saptanmıştır (Sanchez-Rodriguez vd., 2010).

Büyümenin hücre bölünmesi ve genişlemesi sonucu gerçekleştiği göz önüne alındığında, bir bitki organının son büyüklüğünün de bu iki mekanizma ile kontrol edildiği anlaşılmaktadır. Ayrıca, bir bitki organının büyüklüğünü, sahip olduğu hücre sayısını ortalama bir hücre büyüklüğüyle çarparak belirlemek mümkündür (Horiguchi vd., 2006).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, bitkilerin hücre üretimi ve genişlemesi artış yönünde teşvik edilerek daha büyük bitkiler elde edileceği açıkça görülmektedir (Ferjani vd., 2007).

Bitki büyümesi, bitkilerin kök ve gövdelerinde post embriyonik olarak aktivitelerinin sürdüğü meristem adı verilen bölgelerde gerçekleşir. Bu aktiviteler çoğunlukla hormonların vasıtasıyla gelişime bağlı olarak ve çevresel sinyallerle düzenlenir (de Jager vd., 2005). Meristem aktiviteleri sonucu gerçekleşen büyümenin incelenmesi için monokotil bir bitki olan mısır bitkisinin yaprakları iyi bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır (Ben Haj Salah ve Tardieu, 1995). Mısır yaprağında, gelişim evrelerinin gerçekleştiği yerler olan meristem, uzama ve olgunlaşma bölgelerinin tek bir yaprak eksenini boyunca ardışık olarak sıralanması büyüme ve gelişimin incelendiği çalışmalarda kolaylık sağlamaktadır. Bu yerleşim, hücre bölünmesinin ve genişlemesinin zamana ve konuma bağlı olarak hesaplanmasına imkan sağlar (Muller vd., 2001). 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 hücre döngüsü süresi, bölünme oranı, hücre üretimi ve büyüme bölgesindeki bölünen hücre sayısı gibi hücre bölünmesi parametreleri kolayca hesaplanabilmektedir. Mikroskopik gözlemler ile olgun ve meristematik hücrelerin uzunluğunun ve meristem büyüklüğünün ölçülmesi de kinematik analizlere yardımcı olmaktadır. Çünkü yaprak büyüme bölgesinde bölgesel hızın direkt olarak ölçülmesinde şu ana kadar geliştirilmiş bir yöntem mevcut değildir (Fiorani vd., 2000).

Bitkiler sesil canlılar olduklarından büyümelerine uygun olmayan çevre şartlarına maruz kaldıklarında buldukları ortamdaki ortamdaki kaçamazlar. Sıcaklık, ışık, su ve besin mevcudiyeti gibi çevresel faktörler, optimum değerlerin dışına çıktığında bitkileri olumsuz olarak etkileyerek strese yol açabilir (Levitt, 1972). Bu stres faktörleri ile karşılaşan bitkide ilk olarak büyüme inhibisyonu gerçekleşir. Eğer stresin şiddeti yüksekse bitkinin ölümüne bile yol açan ağır semptomlar meydana gelir. Dolayısıyla, bitkinin, büyümeye devam edebilmesi ve ürün verebilmesi için karşılaştığı strese karşı en kısa zamanda tolerans sağlaması hayati önem taşımaktadır. Bu yüzden çalışmamızda, bitki büyümesi ve stres toleransı arasındaki ilişki, mısır fidelerini kuraklık ve üşüme gibi stres faktörleri ile muamele ederek aydınlatılmaya çalışılmıştır

Kuraklık ve üşüme stresi en önemli büyüme sınırlayıcılarından. Özellikle, mısır gibi birçok ekin bitkisi ve tropikal veya subtropikal bölgelerden orjinlenmiş bahçe bitkileri bu streslerin sebep olduğu hasarlara karşı çok duyarlıdırlar. Kuraklık sonucu bitkinin su

kaybetmesine bağlı olarak ilk olarak bitkide turgor kaybı görülür. Hücre içi iyon konsantrasyonu artması sonucu zar bütünlüğü ve proteinlerin yapısı bozulur. Yine, kuraklık stresi sonucu artan süperoksit, lipid peroksidasyonuna ve yağ asidi doygunluğuna neden olarak zarların bütünlüğünü bozar (Sgherri vd., 1996). Üşüme stresi ise, 15°C'nin altındaki sıcaklıklarda meydana gelir. Üşüme hasarı bitki hücreleri içerisinde buz çekirdeklerinin oluşmamasıyla soğuk stresinden ayrılır (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 sıcaklık, zarların lipid içeriğini değiştirerek hasara sebep olur (Lee vd., 2005). Zar hasarı sonucu iyon alınımların mekanizması değişikliğe uğrar (Shabala vd., 2001).

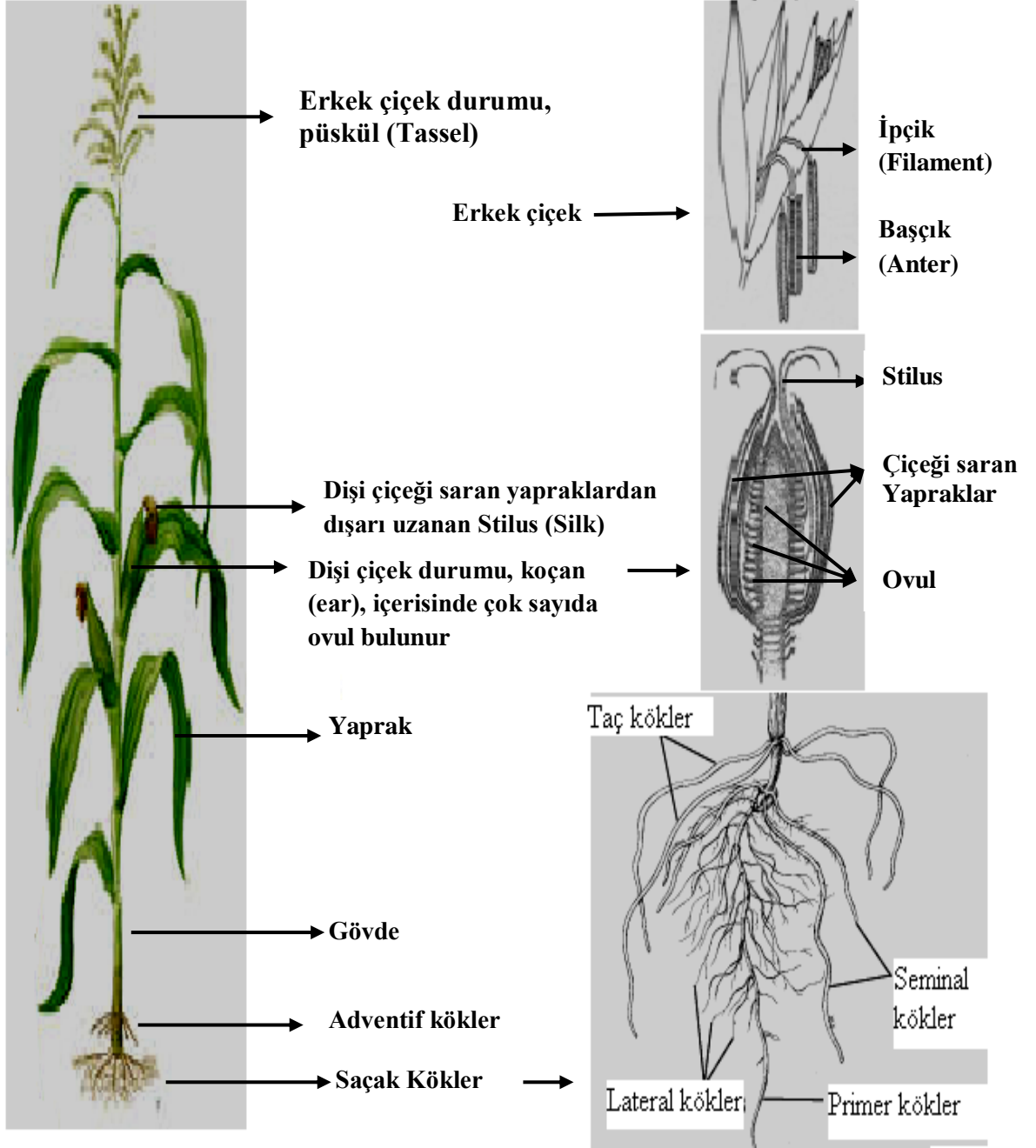
Günümüze kadar bitki büyümesinden sorunlu pek çok genin tanımlanmış olmasına rağmen büyüme mekanizmasının düzenlenişi tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Bu nedenle kinematik analizler, uyarılabilen promotör sistemler, mutant ve transgenik koleksiyonlar, mikrodizi analizleri ve görüntüleme sistemlerini kullanarak pek çok disiplini birleştiren hücrenel ve moleküler bir sistem biyolojisi yaklaşımı sayesinde hücre bölünmesi ve hücre genişlemesi mekanizmalarının koordinasyonu büyük ölçüde aydınlatılmış olacaktır (Tsukaya ve Beemster, 2006).

Bu amaçla, çalışmamızda, mısır bitkisinin büyümesini düzenleyen yeni bir gen tanımlanarak büyüme mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır. Bu bağlamda mısır yaprağının meristem, uzama ve olgunlaşma gibi gelişim evrelerine spesifik olan genleri mikrodizi analizleri ile belirlemeye çalışıldı. Özellikle büyümeden sorumlu başlıca bölge olduğu için meristem bölgesinde gen ifadesi farklılık gösteren gen kümelerine odaklanıldı. Bu gen kümeleri arasında kromatin organizasyonu ile ilgili genlerin bulunduğu saptandı. Bu sebeple kromatin veritabanından (ChromDB) tedarik edilen çeşitli kromatin mutant mısır hatlarının büyümeleri incelenerek fenotip analizleri yapıldı. Büyümede meydana gelen değişimler kinematik analizler ve hücre döngüsü genlerinin ekspresyon analizleri ile belirlemeye çalışıldı. Mısır yaprağının büyüme bölgesi boyunca yer alan hücrelerin DNA miktarları flow sitometri ile belirlenerek hücre döngüsünde herhangi bir değişiklik olup olmadığı saptandı. Kromatin genlerinin farklı gelişim evrelerinde ifade analizleri yapılarak genlerin suskunluk dereceleri belirlendi. DNA Metiltransferaz (DMT) familyasına ait genlerin farklı gelişim evrelerine ait ifade analizleri yapıldı. Ayrıca büyüme kusurlu mutantın kök gelişimi incelendi ve kuraklık ve soğuk gibi çevresel stres faktörler ile muamele edilerek belirlenen genin stres cevabında rolü olup olmadığı belirlendi.

1.2. Mısır Bitkisinin (*Zea mays* L.) Biyolojisi

Mısır Gramineae (Buğdaygiller) familyasına ait, 1-2 m yüksekliğe ulaşabilen, bir yıllık, tek evcikli (monokotil), anavatanı Güney Amerika olan bir ılıman iklim tahıl bitkisidir (Şekil 1.1). Gövdeleri sert ve diktir. Saçak köklere sahiptir. Yaprakları sapsız, geniş, uzun, üst yüzü tüylü, alt yüzü tüysüz olup, tabanı ile bir kın halinde gövdeyi sarar. Erkek çiçekler gövdenin ucunda salkım şeklinde dizilmiş başakçıklarda toplanırlar. Çiçekler kavuz adı verilen yaprakçıklarla örtülür. Dişi çiçekler, gövdenin alt ve orta kısımlarındaki yaprakların koltuğundan çıkan ve taşıyıcı yaprakçıklarla örtülü olan, kalınlaşmış, çomak şeklinde bir eksen üzerinde toplanırlar. Her bitkide 1-3 koçan bulunur. Mısır bitkisi tek evcikli (monoik) yani erkek ve dişi çiçekler aynı bitki üzerinde fakat ayrı yerlerdedir. Önce tepe püskülü (erkek çiçekler) bitkide çıkar ve hemen bir iki gün içinde aşağıdaki koçanların uçlarında dişi çiçeklerin stigmaları (uzun yeşil püsküller) görülür. Rüzgârın yardımıyla tepe erkek organlarında oluşan milyonlarca polen tanesi aşağıya koçanların uçlarındaki dişicik tepelerine düşerek tozlanma (döllenme) gerçekleşir. Mısır yabancı tozlanan bir bitkidir. Danelerin oluştuğu koçan boyu yetiştirme şartları ve çeşide bağlı olarak 10-40 cm arasında değişir. Bir mısır koçanında 500 ile 1000 arasında tohum oluşur. Meyve, yani mısır taneleri, açık veya koyu sarı, esmer veya kırmızımtırak renklindedir (Bennetzen ve Hake, 2009).

Mısır bitkisinin, ülkemizde başlıca Karadeniz bölgesi olmak üzere pek çok ilimizde ortalama 500 bin hektar kadar alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Belli başlı mısır çeşitleri: Sert mısır, unlu mısır, at dişi mısır, patlak mısır ve kavuzlu mısırdır. Kullanıldığı yerler: Dişi çiçeklerin güneşte kurutulmuş stilüsleri (mısır püskülü), taneleri ve tanelerinden elde edilen yağ (mısır yağı) kullanılır. Mısır danelerinde % 67 nişasta, % 10 azotlu maddeler ve % 8 yağ bulunmaktadır. Mısır tanelerinden gıda maddesi olarak ve hayvan yemi olarak faydalanılmaktadır. Mısır tanelerinden elde edilen yağ, yemeklik yağ olarak veya kozmetik sanayinde hammadde olarak kullanılır. Mısır yağı, doymuş yağ asidi miktarının düşük olması sebebiyle damar sertliği olan hastalara yemek yağı olarak tavsiye edilir. Mısır sapları da hayvan yemi olarak, kuru veya taze halde kullanılmaktadır. Mısır püskülü ise tedavide kullanılabilir. Püskülün bileşiminde karbonhidratlar, potasyum, sodyum ve kalsiyum tuzları vardır. İdrar söktürücü ve taş düşürücü olarak kullanılırlar (Şar ve Asil, 1985).



Şekil 1.1. Mısır bitkisinin kısımlarının şematik gösterimi

1.3. Bitkilerde Büyüme

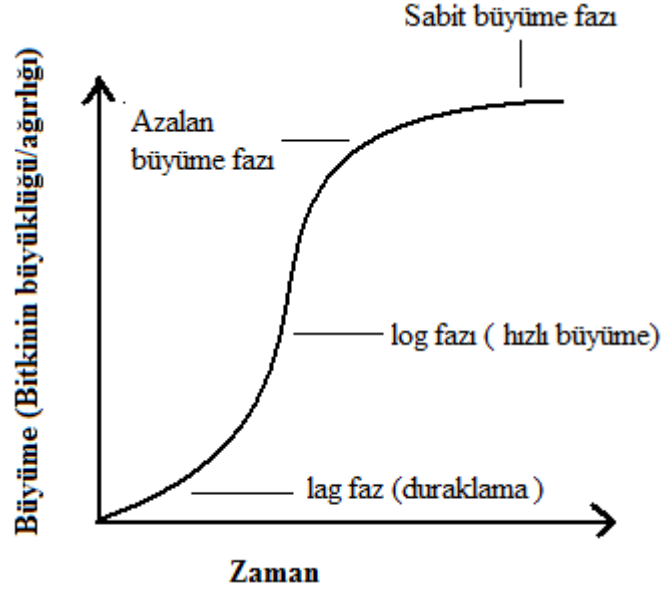
Bitkilerde büyüme, hücre bölünmesi ve hücre genişlemesi ve ardından hücre farklılaşması ile meydana gelen bir olaydır. Büyüme meristem olarak adlandırılan bölgelerde gerçekleşir. Bu bölgelerde bulunan meristematik hücreler devamlı olarak mitoz bölünme ile çoğalarak yeni hücreler meydana getirir. Meydana gelen bu hücreler büyüyüp

farklılaşarak sürekli doku hücreleri halini alır. Meristemler buldukları yerlere göre isim alırlar ve başlıca üçe ayrılırlar; birincisi, kök, gövde ve dal uçlarında bulunan apikal meristemdir ve bitkinin uzamasını sağlayarak primer (birincil) büyümeyi gerçekleştirir. İkincisi, sürekli dokular arasında yer alan interkalar meristemlerdir ve apikal meristemler gibi bitkinin boyuna büyümesini sağlar. Üçüncü ise iletim demetlerinde bulunan kambiyum dokusunda yer alan lateral meristemdir ve bitkinin enine büyümesini sağlayan sekonder (ikincil) büyümeyi gerçekleştirir (Barton ve Poeting, 1993).

Her bitki kendine özgü bir büyüme oranına sahiptir ve bu oran bitkiler arasında oldukça değişkendir. Örneğin bazı yosunlar saatte 0.001 mm'den daha az büyürken çoğu ağaç saatte 0.025-0.250 mm kadar büyür. Tırmanıcı bir bitki olan kudzu (*Pueraria phaseoloides*) ise kalın destekleyici doku üretmeye gerek duymaz ve 12.5 mm kadar büyüyebilir. Zamana göre büyümeyi bir grafikte göstererek elde edilen eğriye büyüme eğrisi denir (Taiz ve Zeiger, 2006). Bu büyüme eğrisi tipik bir sigmoid veya S şeklindedir (Şekil 1.2). Başlangıçta bitkiler yavaş büyürler. Bu safhaya lag (duraklama) fazı denir. Sonra bitki hızla büyümeye başlar. Bu safha log (hızlı büyüme) fazı olarak adlandırılır ve burada büyümenin üssel olarak arttığı görülür. Bir süre sonra büyüme yavaşlar ve durur. Bu evre sabit büyüme fazı veya durgun faz olarak adlandırılır (Zwietering vd., 1990).

Bitki büyüme ve gelişimi hücre bölünmesi ve hücre genişlemesi işlevleri arasındaki koordinasyon ile sağlanır (Jorgensen ve Tyers, 2004; Horiguchi vd., 2006). Bu mekanizmalar pek çok ökaryotik organizmada benzer özelliklere sahip olmasına rağmen bitki büyüme ve gelişimi bazı farklılıklar gösterir. Bunlardan ilki, hayvanların organ sistemleri gelişmiş olarak dünyaya gelmelerine rağmen, bitkilerin meristem adı verilen bölgelerinde bulunan kök hücreler sayesinde hayatları boyunca yeni organlar yapıp postembriyonik olarak büyüme ve gelişimlerini sürdürmeleridir (Dolan vd., 1993). İkincisi, bitkilerin postembriyonik büyüme özelliklerinden dolayı diğer organizmalara göre daha fazla hücre döngüsü genine sahip olmalarıdır (Kejnovsky vd., 2009). Üçüncüsü, bitki hücresinin, DNA'larını eşledikleri halde bölünmeksizin endodüplikasyon adı verilen işlem ile poliploidi haline gelebilmeleridir. Dördüncüsü, bitkilerin kendilerine gelişimsel esneklik kazandıran pluripotent (tüm bir canlıyı oluşturabilme) özelliğine sahip olmaları sayesinde laboratuvar şartlarında tek bir bitki hücresinden yeni bir bitki elde edilebilmesidir. Beşincisi, bitkilerin, sesil özelliklerinden dolayı ışık, sıcaklık ve besin varlığına bağlı olarak büyümelerini düzenleyebilmeleridir. Son olarak, bitki hücreleri sahip

oldukları hücre çeperi ile bölünmelerinden sonra dahi bir arada kalarak organın şeklini almasını sağlamaktadır (Smith, 2001).



Şekil 1.2. Bitkilerde zamana göre büyümeyi gösteren büyüme eğrisi (Yin vd., 2003; Henshaw vd., 1966).

Bir organizmanın organ büyüklüğü sahip olduğu genetik bilgi doğrultusunda aynı tür içerisinde aynı büyüme şartları altında hemen hemen aynıdır. Bu olgu bir organının son boyutunun içsel bir mekanizma tarafından belirlendiğini göstermektedir. Bu güne deyin pek çok araştırma yapılmasına rağmen bu mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Çünkü bitki büyümesini ve dolayısıyla organ büyüklüğünü kontrol eden mekanizmalar, bitkilerin yaşadıkları ışık, sıcaklık, besin, tuzluluk, kuraklık gibi değişen çevre şartlarında yaşamaya adapte olabilmelerini sağlayan plastisite özelliklerinden dolayı son derece karışıktır. Ayrıca bitkinin kök, gövde gibi organlarının sınırsız büyüebilmeleri, yaprak ve çiçeklerinin ise sınırlı büyümeye sahip olmaları, büyümeyi düzenleyen mekanizmaları daha karmaşık hale getirmektedir (Mizukami, 2001).

Sınırlı büyüme özelliği taşıyan bir organın büyüklüğü, bu organda bulunan toplam hücre sayısını ortalama bir hücrenin büyüklüğüyle çarparak hesaplanabilir. Bu yüzden bilim adamları bitkilerde rastgele mutasyonlar meydana getirerek hücre sayısı ve büyüklüğünde değişiklikler meydana getirerek büyümede rol alan genleri ve büyümedeki rollerini belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan bir çalışmada küçük yapraklı mutantların

hücre sayısının ve büyüklüğünün önemli derecede azaldığı ancak bunun fotosentetik genlerin mutasyona uğraması sonucu olabileceği görüldü (Horiguchi vd., 2006). Yine aynı çalışmada mutantların yaban tiplere oranla daha büyük yapraklı oluşları hücre büyüklüğünde ve ya hücre sayısının artmasına bağlı olduğu gözlemlendi. Ancak hücre sayısının ve büyüklüğünün aynı anda arttığı bir durumla karşılaşılmadı. Şöyle ki, *AINTEGUMENTA (ANT)*, *Arabidopsis thaliana GROWTH REGULATING FACTOR 5 (AtGRF5)* ve *ANGUSTIFOLIA 3 / GROWTH-INRERACTING FACTOR 1 (AN3/GIF1)* gibi transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifade edildiği mutantlarda yaban tiplere nazaran yaprak büyüklüğünün artması hücre sayısındaki artışa bağlanmıştır. Fakat bu bitkilerde hücre büyüklüğü aynı kalmıştır (Mizukami ve Fischer, 2000; Kim ve Kende, 2004; Horiguchi vd., 2005). Bunun aksine *AtGRF1* ve *AtGRF2*'yi aşırı ifade eden mutantlarda ise yaprak büyüklüğünde artışın hücre büyüklüğüyle orantılı olduğu bulunmuştur (Kim vd., 2003).

Yine günümüze kadar yapılan çalışmalarda kantitatif karakter locusu (QTL) gen haritalama tekniği kullanarak domates bitkisinde meyve büyüklüğünün kontrolünde *fw2.2* geninin yer aldığı (Frary vd., 2000), *Brevis radix (BRX)* geninin de *Arabidopsis thaliana* kök gelişiminde rol oynadığı ortaya konmuştur (Mouchel vd., 2004). Ancak yapılan çalışmalar bazı mutantlarda hücre sayısının azalmasına rağmen hücre büyüklüğünün artması sebebiyle organın son büyüklüğünün yaban tiplere aynı kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum kompensasyon (telafi) olarak adlandırılmıştır ve organ büyüklüğünün bütün organ düzeyinde meydana gelen bir mekanizma ile denetlendiğini göstermektedir (Beemster vd., 2003). Şöyle ki, bir mutantta yaban tipe nazaran daha az hücre bölünmesi gerçekleştiği halde hücre büyüme oranının aynı kaldığında, bölünme sonrası oluşan kardeş hücreler normale göre daha büyük olacaktır. Örneğin bir hücre döngüsü geni olan *SiklinD3*'nin aşırı ifade edildiği mutantlarda kompensasyon meydana geldiği gösterilmiştir (Dewitte ve Murray, 2003). Bir diğer çalışmada, *Tangled* geni fonksiyonunu yitirmiş bir mısır mutantının hücre bölünmesinin etkilendiği halde yaprak büyüklüğünün değişmediği gözlemlenmiştir. Bütün mutantlarda bu durumun görülmemesinin sebebi büyük ölçüde bilinmemesine rağmen kompensasyon için bir eşik sayı değerinin olmasıyla açıklanabilmektedir.

Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda yaprak büyüklüğü ve şeklinde anormallikler gösteren pek çok mutant bitki koleksiyonu meydana getirilmiştir (Berna vd., 1999). Bu şekilde meydana getirilmiş mutantları muhtemel hücre sayısı ve büyüklüğü kombinasyonlarına dayanarak sekiz grupta incelemek mümkündür. Bunlar; hücre sayısı

azalan, hücre büyüklüğü azalan, hücre sayısı artan, hücre büyüklüğü artan, hücre sayısı ve büyüklüğü azalan, hücre sayısı ve büyüklüğü artan, hücre sayısı artan ve hücre büyüklüğü azalan, hücre sayısı azalan ve hücre büyüklüğü artan.

Sonuç olarak, günümüze kadar pek çok genin büyüme ile ilgili olduğu fonksiyon kaybı (lost-of-function) mutantları çalışılarak ortaya konulmasına rağmen büyümeyi düzenleyici mekanizmanın tümü ortaya konulamamıştır.

1.4. Bitki Büyüme Evreleri

Büyüme sırasında meristematik hücre üç aşamadan geçer. İlk olarak hücre bölünür ardından genişler ve nihayet farklılaşarak son halini alır. Büyüme işlevi bu 3 metabolik aktivitenin koordinasyonu sonucu gerçekleşir. Bu aşamalar; *i*) Hücre üretimi evresi; *ii*) Hücre genişleme evresi; *iii*) Hücre farklılaşma evresi olarak adlandırılır (Fiorani, 2001) (Şekil 1.3). İlk aşamada, hücreler mitoz bölünmeye uğrayarak bölünme öncesinde iki katına ulaşan genetik materyalin iki kardeş yavru hücreye eşit olarak dağıtılması sağlanır. İkinci aşamada, hücreler sahip oldukları genetik bilgi doğrultusunda üç boyutlu olarak genişlemeye ve uzamaya başlar. Son olarak üçüncü aşamada ise, hücreler, buldukları konuma ve fonksiyonuna bağlı olarak her biri farklı şekil alarak büyüme evrelerini tamamlarlar. Diğer bir deyişle, başlangıçta homojen bir yapıya sahip meristem hücresi büyüme evrelerinden geçerek ihtiyaç duyulduğu yerdeki görevini almak üzere farklılaşarak son şeklini alır.

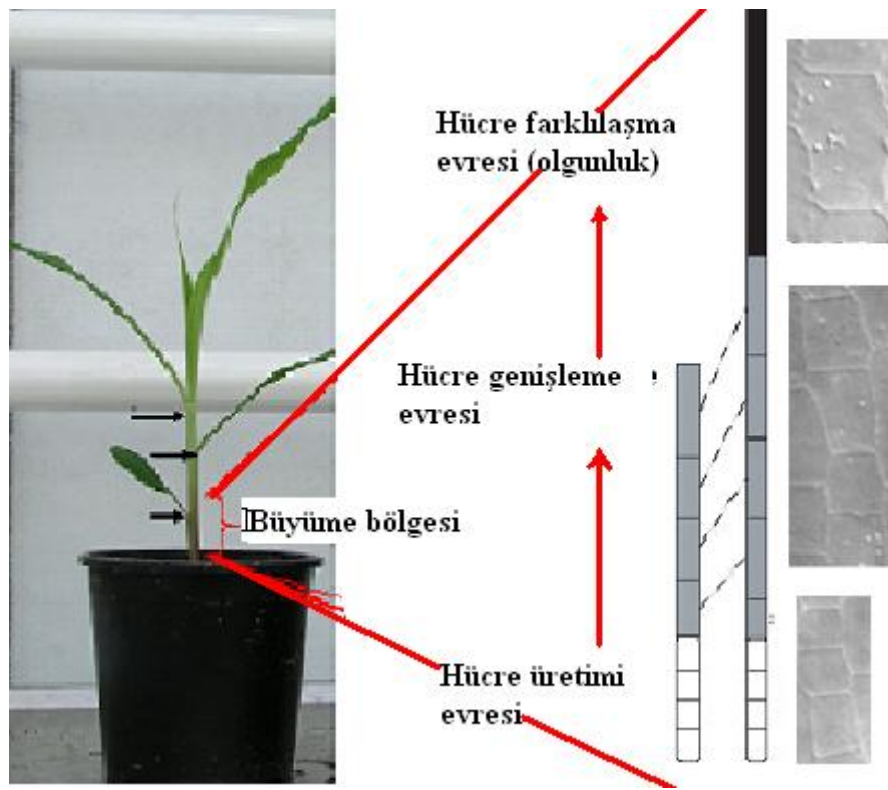
1.4.1. Büyümenin Hücre Üretimi Evresi

1.4.1.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bitkinin büyümesi için, hücrelerin bölünme sinyallerini algılamasıyla başlayan bir dizi biyokimyasal aktiviteleri ve morfolojik değişiklikleri içeren bir süreçtir. Bir döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıpa benzeyen yavru iki hücreye bölünerek döngüyü tamamlar.

Hücre döngüsü sürekli bir olay olmakla birlikte izlemede kolaylık olması açısından hücre döngüsünü dört evreye ayırmak mümkündür. Bu evrelerden biri hücre organellerinin

ve kromozomlarının iki katına katıldığı Sentez evresi (S), diğer biride kromozomların iki kardeş hücreye bölündüğü Mitoz evresidir (M). Bu iki evre G1 ve G2 (Gap= Boşluk) evreleriyle ayrılmaktadır. Hücre döngüsü esnasında genom kararlılığını sağlamak için G1/S ve G2/M fazları arasında iki kontrol noktası vardır (Şekil 1.4; Şekil 1.5). G1, S ve G2 hep birlikte interfaz olarak adlandırılır. G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlar; ribozomlar, enzimler, zar türevli organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılır (Donnelly vd., 1999; Reichheld vd., 1999; Dewitte ve Murray, 2003).



Şekil 1.3. Mısır bitkisinin büyüme evrelerinin gösterimi

1.4.1.2. Ana Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

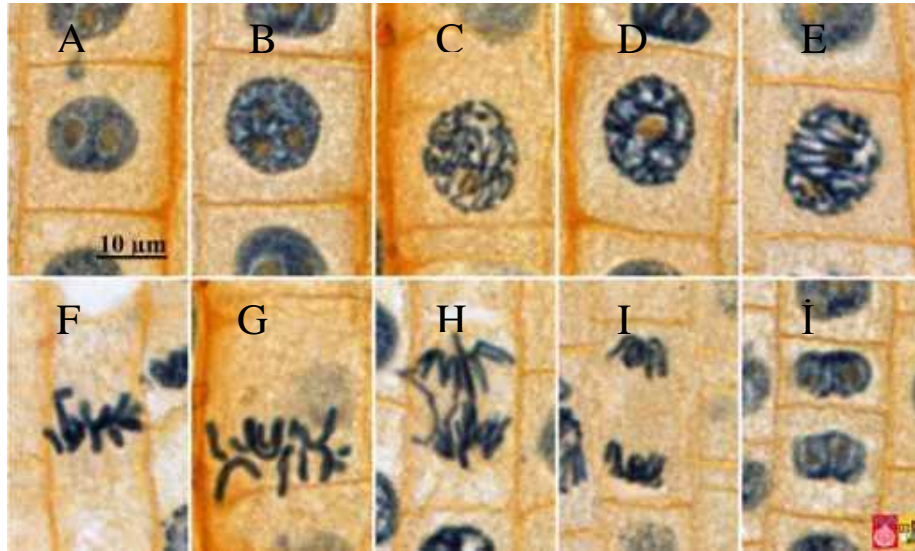
Hücre döngüsü başlıca siklinler, serin/treonin protein sınıfına ait siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından düzenlenir (Tablo 1.1). CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin proteinlerine bağlandıklarında aktifleşirler. Bu yüzden hücre döngüsü düzenleyicileri siklin bağımlı

kinazlardır ve kısaca CDK (Siklin Bağımlı Kinazlar)'lar olarak adlandırılırlar. Böylece aktif CDK/siklin kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir. Bu CDK/siklin 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 gelir. 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 (Berckmans ve de Veylder, 2009). Bütün bu proteinler ana hücre döngüsü proteinleridir ve Tablo 1.1'de gösterildiği gibi farklı kategorilerde sınıflandırılırlar (Vandepoele vd., 2002; van Leene vd., 2010).

Tablo 1.1. Hücre döngüsünde rol alan genlerin *Arabidopsis* homologları (de Jager, 2005).

Homologlar	Hücre döngüsü fazı	<i>Arabidopsis</i> proteinleri
Siklinler: D tipi	G1/S geçişi (ve G2/M)	SiklinD1;1 SiklinD2;1 SiklinD3;1; -3;2; -3;3 SiklinD4;1; -4;2 SiklinD5;1 SiklinD6;1 SiklinD7;1
Siklinler: A tipi	G1/S; S fazı	SiklinA1;1; -1;2 SiklinA2;1; -2;2; -2;3; -2;4 SiklinA3;1; -3;2; -3;3; -3;4
Siklinler: B tipi	G2/M geçişi	SiklinB1;1; -1;2; -1;3; -1;4 SiklinB2;1; -2;2; -2;3; -2;4 SiklinB3;1
CDK'lar Bitkiye spesifik CDK'lar	G1/S geçişi; G2 fazı G2/M geçişi G2 fazı; mitoz	CDKA;1 CDKB1;1; -1;2 CDKB2;1; -2;2
CAK'lar		SiklinH;1/CDKD;1; -2; -3; CDKF;1
KRP'ler	G1/S geçişi	KRP1; -2; -3; -4; -5; -6; -7
RB'ler	G1/S geçişi	RBR
E2F ailesi	G1/S geçişi	E2Fa; -b; -c DPa; -b DEL1; -2; -3
WEE1	G2/M geçişi	

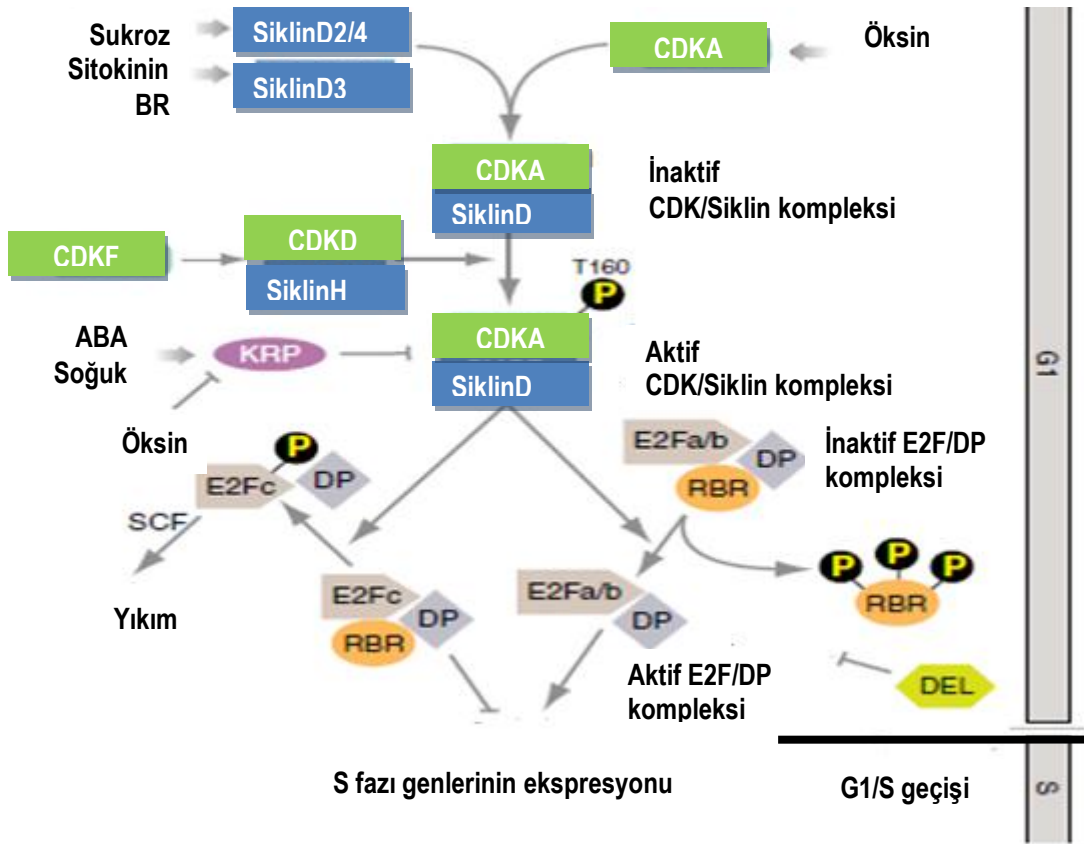
Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. Yıkımları ise “ubiquitin” metabolik yoluyla sağlanır. Hücre bölünmesi büyüme faktörleri veya mitojenler ile D tip siklinlerin uyarılması ile başlatılır. Hücre döngüsünün süresi organizmaya ve hücre tipine göre farklılık gösterir. Bu fark döngünün en uzun ve süre olarak çok değişken olan G1 fazından kaynaklanmaktadır. Bu fazda hücre ya bölünmek, ya farklılaşmak, ya da ölmek için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar. Eğer hücre bölünmeye karar verirse mitoz girer. Mitoz diğer fazlara göre daha kararlı bir fazdır ve yaklaşık 1 saat içerisinde tamamlanır. Mitoz kromatin ipliklerinin kısalıp yoğunlaşarak kromozomları oluşturduğu profaz, kromozomların hücrenin ekvatorial ekseninde sıralandığı metafaz, kardeş kromatidlerin karşılıklı kutuplara çekildiği anafaz ve son olarak hücre plağı oluşumunun meydana geldiği telofaz safhalarından oluşur (Şekil 1.4) (van Damme, 2009).



Şekil 1.4. Soğan bitkisinde mitozun evreleri. A, B, C, D, E; profaz, F, G; Metafaz, H, I, İ; telofaz (URL-1).

Bitkilerde hücre döngüsünün birinci kontrol noktası olan G1 fazından S fazına geçiş hormonların teşvikiyle başlar ve hücre döngüsü genleri ile devam ettirilir (Şekil 1.5). Şöyle ki, D tipi siklinlerin (*SiklinD*), sukroz, öksin, sitokinin ve brassinosteroid gibi büyüme düzenleyicilerin varlığında *A tipi CDK (CDKA)*'lara bağlanarak aktif CDKA/SiklinD kompleksi meydana getirilir. Bu kompleks *CDKF* ve *H tip siklin (SiklinH)* ile bileşik oluşturan CDKD'den oluşan CDK aktifleyici kinazlar (*CAK*) ile fosfarillenerek aktiflenir. Bu noktada aktif CDK/SiklinD kompleksi, antimitojenik uyarılar olan absisik asit (ABA),

soğuk ve KRP'ler ile inhibe edilebilir. CDKA/SiklinD kompleksi G1/S geçişini iki şekilde sağlayabilir. Birincisi; CDKA/SiklinD kompleksi, E2Fc/DP/RBR transkripsiyonel represörünü fosforilleyerek SCF E3-ubiquitin-protein liyaz aracılığıyla yıkımını sağlar. İkincisi; CDKA/SiklinD kompleksi, RBR'ı fosforilleyerek E2Fa-b/DP/RBR kompleksinden ayrılmasıyla transkripsiyonel faktörün aktif hale gelerek S faz genlerinin sentezlenmesini sağlar. Aktif E2F/DP transkripsiyon faktörü DEL tarafından inhibe edilebilir (Inze ve de Veylder, 2006).



Şekil 1.5. Hücre döngüsünün G1/ S kontrol noktası (Inze ve de Veylder, 2006).

Bitkilerde hücre döngüsünün ikinci kontrol noktası olan G2 fazından S fazına geçiş yine hücre döngüsü genleri ile sürdürülür (Şekil 1.6). G2 fazında A, B ve D tip siklinler (*SiklinA*, *SiklinB* ve *SiklinD*) A ve B tipi CDK'lerin (*CDKA* ve *CDKB*) her ikisiyle de bileşik oluşturabilirler. B tipi CDK'lerin transkripsiyonel kontrolü E2F metabolik yolu ile düzenlenerek G1'den S'ye ve G2'den M'ye geçiş arasındaki iletişimi sağlar. *CDKF* ve *H tipi siklin (SiklinH)* ile bileşik oluşturan *CDKD*'den oluşan CDK aktifleyici kinaz metabolik yolu sayesinde CDK/Siklin kompleksleri aktiflenir. Aksine, WEE1 kinaz,

CDK/Siklin kompleksini fosforilleyerek inhibe eder. CDK/Siklin kompleksi aktive edildiği zaman farklı substratları fosforilleyerek G2'den M'ye geçişi sağlar. Mitoz siklinlerin proteolitik olarak parçalanmasıyla sonlandırılır. Bu parçalanma, CCS52 protein ile anafaz teşvikleyici kompleks (APC)'in aktiflenmesi ile sağlanır (Inze ve de Veylder, 2006).

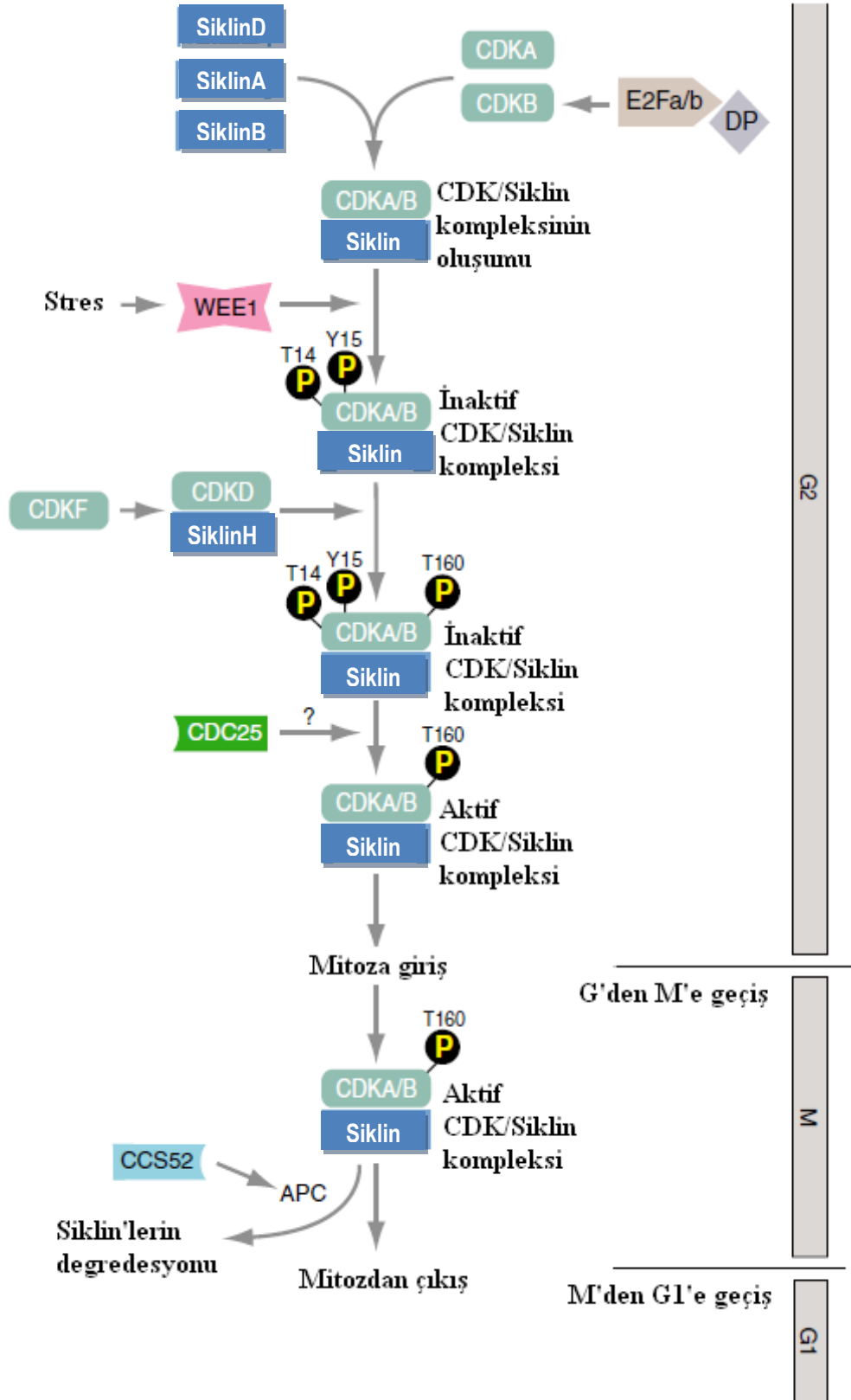
1.4.2. Hücre Genişleme Evresi

Bitki büyüme evrelerinden bir diğeri de hücre genişleme evresidir. Hücre genişlemesi meristem bölgesinde mitoz bölünme sonucu meydana getirilen yavru hücrelerin uzama bölgesine hareket ederek, burada bazı metabolik faaliyetler sonucu hacimlerini artırması ile meydana gelir (Verbelen ve Vissenberg, 2006). Böylece hücre bölünmesi ile üretilen hücre sayısına ve bu hücrelerin genişleme oranına bağlı olarak bitki ve organın büyüklüğü belirlenmiş olur (Lyndon, 1990).

Bilindiği gibi hücrenin tanımlanması ve aydınlatılması ancak 17. yüzyılda Robert Hooke ve Anton Van Leenwenhoek'un ışık mikroskopunu keşfetmesinin ardından başlamıştır. Işık mikroskopunun keşfinden yaklaşık 200 yıl sonra Matthias Schleiden ve Theodor Schwann bitki hücrelerini, Rudolph Virchow hayvan hücrelerini aydınlatmışlardır. Hücre bölünmesi ve genişlemesi mekanizmaları ise ancak 19. yüzyılda tam olarak tanımlanabilmiştir. Wilhelm Hofmeister (1867) yaptığı mikroskopik gözlemler sonucu ana hücre nükleusunun ikiye bölündüğünü ve bu iki yavru nükleus arasında yeni bir hücre çeperi sentez edilirken ana hücre materyalinin yarı yarıya bölünerek yavru nükleusların etrafını sardığını göstermiştir. Ardından, Sachs (1882) büyümekte olan kökte parankimal hücreleri inceleyerek hücre genişlemesi sırasında merkezi vakuolün hacminin arttığını saptamıştır. Böylece hücre genişlemesi mekanizmasının temelini hücre turgoru ve su alınımına dayandığı ortaya konulmuştur. Lockhart (1965) bu ilişkiyi formülize ederek hücre genişleme oranının turgor basıncı ve hücre duvarının mekanik bileşimi arasındaki dengesizlik sonucu simplast ve apoplast arasında meydana gelen faaliyetlere bağlı olduğunu göstermiştir (Eşitlik 1). Lockhart (1965) eşitliği:

$$r = \Phi (P-Y) \quad (1.1)$$

Burada r büyüme oranı, Φ çeperin genişleme kabiliyeti, P turgor basıncı, Y ise büyüme için gerekli minimum basıncı göstermektedir.



Şekil 1.6. Hücre döngüsünün G2/S kontrol noktası (Inze ve de Veylder, 2006).

Bitkilerde hücre bölünmesi ve genişlemesi mekanizmalarının zamana ve konuma bağlı olarak ayrı gerçekleştiği ilk olarak Sachs (1874) tarafından tam olarak tanımlanmıştır. Bu temel keşfin ardından günümüze kadar geçen süreçte pek çok araştırma ile hücre bölünmesi ve genişlemesi mekanizmaları ayrıntılı olarak tanımlanabilmiştir (Dewitte ve Murray, 2003; de Veylder vd., 2003). Bu araştırmalar sonucunda yeni bölünmüş yavru iki hücre arasında oluşan hücre plağı ve çeperinin yapımı sırasında rol alan sitoskeleton aktivitesi ve çeper elementlerinin sentezi ve taşınması gibi hücresel faaliyetler hakkında detaylı bilgi sağlanabilmiştir (Otegui ve Staehelin, 2000a, b; Otegui vd., 2001).

İlk botanikçiler, hücre genişlemesinin esas olarak vakuolün hacim artışı sonucu hücre çeperinin incilmesi, gerilmesi ve etrafına yeni çeper materyallerinin birikmesiyle gerçekleştiğini tanımlamışlardır. Bu işlevlerin ardındaki fizyolojik düzenleme ise öksin hormonun hücre uzaması ve kontrolü üzerindeki etkisinin keşfiyle aydınlanmaya başlamıştır (Went ve Thimann, 1937).

Günümüzde hücre çeperinin selüloz, hemiselüloz, pektin ve proteinlerden meydana geldiği bilinmektedir. Selüloz, selülaz sentaz enzimi tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim, selülaz sentaz kompleksleri şeklinde organize olur (Arioli vd., 1998; Kimura vd., 1999). Bu proteinlerin floresans ile işaretlenmesi ile daha gözlenebilir hale gelen selülaz mikrofiberlerinin çeperdeki dizilişleri incelenerek sitoskeleton yapı aydınlatılmıştır (Paredes vd., 2006).

Hücre genişlemesi mekanizması, ekspansin proteinlerinin hücre çeperi gevşetilmesindeki rollerinin keşfinin ardından ortaya konan asit büyüme teorisi ile yeni bir yaklaşım kazanmıştır (Cooper ve Varner, 1984; McQueen-Mason vd., 1992; Gosgrove, 2005). Teoriye göre, ilk olarak ekspansin gibi hücre çeperi yapımından sorumlu proteinlerin yapımı öksin tarafından uyarılır (Overvoorde vd., 2005). Buna ilaveten öksin, protonların hücre duvarına doğru salınımını teşvik ederek apoplastın pH'sının düşmesini sağlarken ekspansin gibi çeper gevşeticileri de aktive eder (Kutschera ve Niklas, 2007). Sonuç olarak, çeperin, gevşetilerek genişlemesi sağlanır.

Hücre genişlemesinin mekanizmasının aydınlatılması sırasında yapılan diğer bir çalışmada da, vakuolar zarlar boyunca su transferi yapan supor (aquaporin) proteinleri tanımlanmıştır (Crispeels ve Maurel, 1994).

Yapılan pek çok çalışma, hücre genişlemesi mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olacak yeni bilgiler kazandırırken bir taraftan da bilinenlere yeni bir yaklaşım kazandırmıştır. Örneğin, öksin hormonunun etki mekanizması detaylı bir şekilde

aydınlatılırken yeni büyüme düzenleyicileri de tanımlanmaya başlanmıştır (Weijers ve Jorgensen ve Tyers, 2004).

Günümüze kadar hücre genişlemesi mekanizmasında rol alan pek çok gen ve protein tanımlanmış olmasına rağmen, bu proteinlerin düzenlenişi tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu, ancak, elde edilen bilgilerin bir 'sistem biyoloji' yaklaşımı ile bütünleşik olarak değerlendirilmesi ile başarılabilir. Bu konuda en kapsamlı araştırma *Arabidopsis* kök apeksinde yapılan genom çaplı transkriptomik analizler sonucunda elde edilmiştir (Birnbaum vd., 2005). Bu bilgiler doğrultusunda, meristemden uzama bölgesine geçişte, çevresel ve ya hormonal uyarana karşı ekspresyonunda değişim gösteren genler tespit edilerek büyümedeki rolleri aydınlatılmaya başlanmıştır.

1.5. Bitki Büyümesini Etkileyen Faktörler

1.5.1. Çevresel Faktörler

Sesil doğalarından ötürü buldukları çevre koşulları bitkilerin büyüme ve gelişimini etkiler. Bitkilerde büyümeyi etkileyen başlıca çevresel etkenler sıcaklık, ışık, su ve toprak bileşenleri, pH ve atmosfer bileşenleri olarak sınıflandırılabilir. Bu faktörlerden her biri bitki büyümesini kısıtlayıcı bir etki gösterebilir. Ayrıca, bu faktörler, birbirleri ile ilişkilidirler. Örneğin toprağın nemi ile hava arasında zıt bir ilişki vardır. Şöyle ki, sıcaklığın artması toprakta bulunan suyun azalışına sebep olur ve bunun sonucunda bitkide su stresi meydana gelebilir (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 2006).

Bitkilerde büyümeyi etkileyen faktörlerden biri olan sıcaklık bir ısı yoğunluğu ölçüsüdür. Genel olarak sıcaklık fotosentez, solunum, transpirasyon ve topraktan su ve mineral emilimini etkiler. Sıcaklık artışı kimyasal reaksiyonların artışını sağlayarak dereceli olarak bitkilerde büyümeyi artırır. Ancak, bitkinin ihtiyacı olan optimum sıcaklık değerlerinin dışına çıktığında plazma zarlarının normal fonksiyonlarının etkilenmesi sonucu büyümede hızlı bir düşüş meydana gelir (Pietruszka vd., 2007; Patel ve Franklin, 2009). Ayrıca düşük sıcaklık toprakta yaşayan nitrifikasyon bakterilerini olumsuz etkiler. Yüksek sıcaklıklar ise, mikroorganizma aktiviteleri sonucu toprak pH'sının düşmesine sebep olur (Orcutt ve Nilsen, 1996).

Bitkilerde büyümeyi etkileyen bir diğer faktör olan ışığın kalitesi, yoğunluğu ve süresi fotosentezi etkilediğinde dolaylı çok önemlidir. Bu yüzden mısır bitkisinde olduğu

gibi bitkilerin yaprakları ışığı en iyi derecede alabilecek şekilde dizilirler. Tarla şartlarında ışık kalitesini kontrol etmek zordur ve her bitkinin ışık ihtiyacı oldukça değişkendir. Işığın süresi fotoferyodizm olarak adlandırılır ve gün uzunluğu ile bitki metabolizması arasında kuvvetli bir ilişki vardır (Dalchau vd., 2010; Greenup vd., 2010). Örneğin yonca ve tahıllar gibi uzun gün bitkileri günler uzamaya başlayınca çiçeklenme sinyallerini alırlar (Yano vd., 2001). Aksine soya fasulyesi gibi kısa gün bitkileri günler kısılınca çiçeklenirler. Her iki kategoriye de girmeyen domates, pamuk ve karabuğday gibi bazı bitkiler ise farklı gün uzunluklarda çiçeklenirler.

Bir diğer çevresel faktör olan su ve toprak bileşenleri bitkinin büyümesinde oldukça önemli role sahiptir (Beemster ve Masle, 1996a; b; Beemster vd., 1996). Bitki büyümesi toprağın su veya nem miktarına oldukça duyarlıdır. Bitki optimum toprak nemi sayesinde ihtiyaç duyduğu besin alımına devam eder. Bitkiler topraktan karbon, hidrojen, oksijen, nitrojen, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum, kükürt, bakır, manganez, çinko, boron, molibden, klor, demir, kobalt, vanadin, sodyum ve silikon gibi besin ve mineralleri alırlar. Toprak partiküllerinin büyüklüğü yüzeyinde birikecek su, besin ve mineral miktarını doğrudan etkilediğinden bitki büyümesinde önemlidir. Aksine, nikel, kurşun, kanalizasyon, fabrika ve maden atıklarında bulunan fenol ve yağlar gibi organik bileşikler de büyümeyi sınırlayıcı besin maddeleridir. Ayrıca toprağın havalandırılması da bitki büyümesinde oldukça önemli bir role sahiptir. Çünkü toprak partikülleri arasında bulunan boşluklarda bulunan oksijen miktarı kök büyümesini doğrudan etkiler (Barber vd., 1963).

Toprağı pH'sı da bazı besin maddelerinin mevcudiyetini ve kökler tarafından emilimini etkileyeceğinden bitkilerde büyümeyi sınırlandırır. Örneğin asidik topraklarda fosfat miktarı azalır. Yine asidik topraklarda artan alüminyum (Al) miktarı ise bitkilere toksik etki gösterir (Panda vd., 2009). Bitki hastalıkları da pH'dan etkilenir (Lazarovits, 2001).

Son olarak büyümeyi etkileyen çevresel faktörler arasında atmosfer bileşenleri sayılabilir. Bir birim havanın yüzde 0,03'i karbondioksit (CO₂)'den oluşur. Karbondioksit fotosentez sayesinde bitkilerde organik materyale dönüştürülür ve solunum ve bitkinin çürümesi ile tekrar havaya verilir. Bir mısır tarlasında ve ya serada CO₂ seviyesi düşebilir. Bu durumda CO₂ büyüme sınırlayıcı bir faktör olur. Artan CO₂ seviyesi ise büyümeyi ve ürün verimini önemli derecede artırır. Havanın kalitesi ise sahip olduğu sülfürdioksit, karbonmonoksit, hidroflorik asit gibi kirleticilerin bitkilere toksik etki yapmasından dolayı büyümeyi sınırlandırıcı bir faktördür (Crittenden ve Read, 1978).

1.5.2. Genetik Faktörler

Verim potansiyeli bitkinin genleri tarafından belirlenir. Bu sebeple verim artışının büyük bir kısmı yıllar boyunca devam eden melezleme çalışmaları sayesinde geliştirilmiş çeşitler ile sağlanmıştır. Buna örnek olarak başlangıçta yenilemeyen ve melezleme sonucu günümüzde en fazla tüketilen tahıllardan olan mısır verilebilir. Ürün kalitesinin yanında hastalık direnci, kuraklığa dayanıklılık gibi özellikler de bitkinin sahip olduğu genetik bilgi tarafından belirlenir (Bloemberg ve Lugtenberg, 2001). Günümüzde genetik mühendisliği bitkilerin büyüme ve verim potansiyellerini değiştirerek istenilen özellikleri bitkiye kazandıran önemli bir araç haline gelmektedir.

1.6. Bitkilerde Stres ve Stres Çeşitleri

Bitkilerin yaşamlarının herhangi bir döneminde fizyolojik ve metabolik olaylarında belirgin değişimler meydana getiren çevresel ve biyolojik faktörlere tek tek veya birlikte maruz kalması olayı stres olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerde stres meydana getiren etkenlere ise stres faktörü denir. Stres faktörünün şiddeti ve yoğunluğuna ve bitkinin genetik adaptasyon derecesine bağlı olarak bitkilerde hasarlar meydana gelir. Stres faktörünün bitkinin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yapısını değiştirmesiyle meydana gelen metabolik bozukluklar sonucunda oluşan bu hasarlar bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına ve hatta bitkinin ve ya organlarının ölümüne yol açar (Ayaz vd., 2000; Hale ve Orcutt, 1987).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kısma ayrılabilir (Fujita vd., 2006) (Şekil 1.7). Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, ekstrem sıcaklıklar, besin, mineral, kimyasal toksisite ve oksidatif stres vb.) stresler beslenmemizde önemli bir yere sahip tahıllar da dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açarak ürün kayıplarına neden olurken doğal ekosisteminde dengesini bozmaktadır. Bu bağlamda yapılan araştırmalardan birinde gelecek 25 yıl içerisinde ekilebilir alanların %30'unun tuzlanma nedeniyle kullanılamaz hale geleceği yönünde tahminde bulunulmuştur (Türkan ve Demiral, 2009; Wang vd, 2003a, 2003b, 2004). Yine araştırmacılar, dünyanın ortalama sıcaklığında 1°C'lik azalmanın pirinç üretiminde % 40'luk düşüş meydana getireceğini,

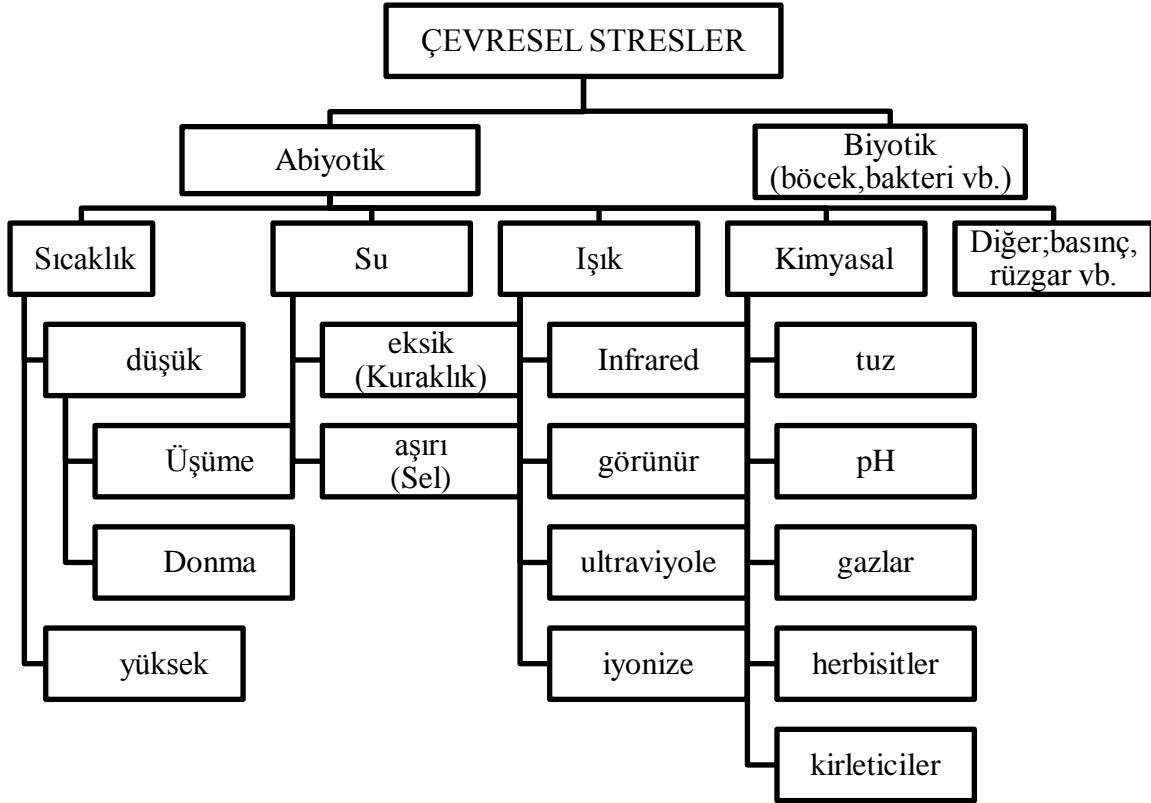
bununla beraber narenciye, kışlık tahıl, bazı sebzelerin ve meyve ağaçlarının dona dayanıklılığının 2°C yükselmesinin dünyadaki üretimi önemli derecede artıracığını ileri sürmüşlerdir (Tiryakioğlu, 2006).

Bilindiği gibi en önemli çevresel sorunlardan ve doğal ekosistemi tehdit eden unsurlardan biri olan ağır metal bileşikleri bitkilerde toksisiteye yol açarak fizyolojik, moleküler ve morfolojik seviyede birçok metabolik faaliyeti sekteye uğratar. Örneğin Cd⁺⁺'nin bitkinin büyümesinde gecikmeye, fotosentezde inhibisyona, enzimlerin uyarılmasına veya inhibisyonuna, stomatal hareketlerin ve su ilişkilerinde değişime, kationların akışına ve serbest radikallerin oluşumuna neden olduğu saptanmıştır (Pietruszka vd., 2007). Ayrıca Cd⁺⁺'lu ortamda yetiştirilen mısır fidelerinde Kükürt (S) konsantrasyonunun ve düşük moleküler ağırlıklı tiyollerin (DMAT) üretimin arttığı saptanmıştır (Castillo-Michel vd., 2009).

Tabiatta doğal olarak meydana gelen abiyotik streslerin etkileri birbirleriyle ilişkilidirler ve bitkilerde benzer hücrel hasarlara yol açabilirler (Sekmen vd., 2007). Örneğin, kuraklık ve tuzluluk stresleri bitkilerde benzer sonuçlar meydana getirerek hücrenin iç dengesini ve iyon dağılımını bozarak ozmotik stres meydana getirmeleriyle fark edilirler (Zhu vd., 1997; Serrano vd., 1999; Zhu vd., 2001a). Diğer taraftan, yüksek sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi farklı stres faktörleri sonucunda da bitkilerde proteinlerin denatürasyonuna sebep olan oksidatif stres meydana gelebilir (Smirnoff, 1998). Aynı şekilde, yüksek sıcaklığa dayanıklılık, onunla birlikte meydana gelen kuraklık şartlarına dayanıklılığa da bağlıdır. Yine donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile bağlantılıdır (Hale ve Orcutt, 1987). Bu nedenle abiyotik stresler hücrelerde benzer sinyal yolunu oluştururlar (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight ve Knight, 2001; Zhu 2001b, 2002). Aynı şekilde, stres proteinleri üreterek, antioksidanların seviyesini artırarak ve compatible solute (iç yoğunluğu artıran erir madde) biriktirerek çeşitli streslere karşı benzer cevap verirler (Vierling ve Kimpel, 1992; Zhu vd., 1997; Cushman ve Bohnert, 2000; Sökmen vd., 2004).

Bitkiler maruz kaldıkları stres faktörüne karşı bir takım özellikler geliştirmiştir. İlk olarak, her bitki sahip olduğu genetik bilgi doğrultusunda kendi fizyolojik yapısına uygun bölgelerde yayılış gösterir. Bu bağlamda, bitkiler yaşadıkları çevreye kısmen veya tamamen uyum sağlarlar (Bidwell, 1974). Ancak yayılışlarına uygun bu bölgelerde ani iklim değişiklikleri ve bu değişiklikleri takip eden bir takım olumsuz şartlar oluşabilir. Değişen bu şartlar bitkilerin normal fizyolojik işlevlerini etkileyerek strese sebep olabilir.

Her bitki belirli derecelerde bu streslere karşı koyma ve canlı kalabilme özelliğine sahiptir. Yine, her bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuk ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir. Bu yüzden belirli bir strese maruz bitkileri bu strese karşı dayanıklı veya hassas olarak sınıflandırmak mümkündür (Bohnert vd., 1995).



Şekil 1.7. Başlıca stres tipleri (Saruhan, 2008).

Strese dayanıklı bitkiler sakınma ve tolerans mekanizmalarına sahiptir (Levitt, 1972). Sakınma mekanizması sayesinde bitki dıştan gelen olumsuz bir faktörün etkisini stres oluşturmadan önleyebilir (Street ve Öpik, 1984). Sakınma mekanizmalarına örnek olarak bazı bitkilerin kuraklık stresinden sakınmak için geliştirdiği yüzey tüyleri, alt durumlu stoma ve kserofitik bitkilerde su kaybını azaltan yaprak kıvrılması mekanizmaları gibi benzer mekanizmalar verilebilir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Ayaz vd., 2001). Aynı şekilde kaktüs bitkisi su stresi sırasında hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakınabilir (Bidwell, 1974). Tolerans mekanizması sayesinde ise bitki stres sonucu oluşan

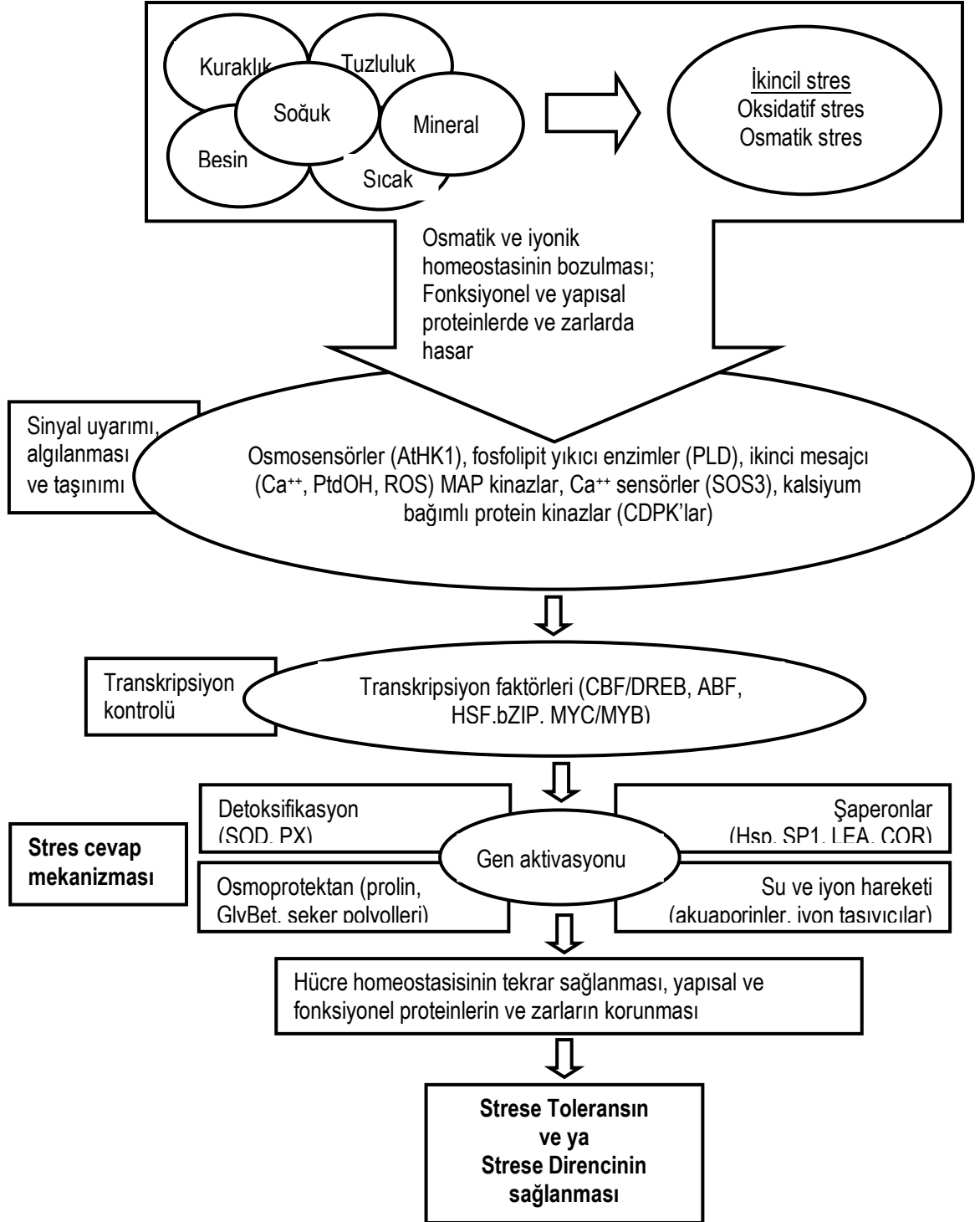
hasarları azaltabilir veya hiç hasar oluşturmayabilir. Hasarın derecesi bitkinin maruz kaldığı strese dayanabilme yeteneği ile doğru orantılıdır (Street ve Öpik, 1984). Örneğin kuraklık toleransına sahip bitkiler protoplazma su kaybettiği zaman protoplazması yeniden su alana kadar hayatsal faaliyetlerine devam edebilirler (Hopkins, 1995).

Stres altındaki bitkiler üzerinde çalışma yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Birincisi bitkilerin strese karşı tepki mekanizmasının öğrenilmesidir. İkincisi ise tarımsal alanlarda stres altında bulunan bitkilerin söz konusu streslere dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve dolayısıyla daha verimli ürün elde edilmesidir. Bilindiği gibi dünya topraklarının % 10'undan daha azı tarıma elverişlidir ve bu ekilebilir alanında %26'lık kısmı kuraklık, %20'lik kısmı mineral, %15'lik kısmı soğuk ve don ve %29'luk kısmı da diğer çevresel stres faktörlerinin tehdidi altındadır (Blum, 1986). Bu nedenle aşırı olumsuz şartlardan kaynaklanan streslere dayanabilen ya da bu stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirmeye ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve toleranslı bitkiler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekir (Bidwell, 1974).

Bitkilerin abiyotik streslere karşı toleransı pek çok genin görev aldığı kompleks biyokimyasal mekanizmalar ile kontrol edilir (Chinnusamy vd., 2004; Cushman ve Bohnerd, 2000) (Şekil 1.8). Bu genler stres genleri olarak adlandırılır ve başlıca üç gruba ayrılarak incelenir. Birinci grupta MyC, MAP kinazlar ve SOS kinaz gibi sinyal yolunda ve transkripsiyonel kontrolde görevli proteinleri, fosfolipazları ve *HSF*, *CBF/DREB* ve *ABF/ABRE* familyalarına ait transkripsiyon faktörlerini üreten genler yer alır (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Munnik vd., 1999; Zhu, 2001b; Chapman, 1998; Frank vd., 2000; Stochinger vd., 1997; Schöffl vd., 1998; Choi vd., 2000; Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2000). İkinci grupta ise, zarları ve proteinleri koruyan ısı şok proteinler ve şaperonlar, late embryogenesis abundant (LEA) proteinleri, ozmotik koruyucular ve serbest radikal süpürücüleri (SRS) üreten genler yer alır (Lafuente vd., 1991, Vierling, 1991; Ingram ve Bartels, 1996; Tomashow, 1998, 1999, 2001; Bray vd., 2000; Bohnert ve Sheveleva, 1998). Son olarak üçüncü grupta ise su ve iyon alımı ve taşınmasında görevli su porları ve iyon taşıyıcıları üreten genler yer alır (Maurel, 1997; Serrano vd., 1999; Tyerman vd., 1999; Zimmermann ve Sentenac, 1999; Blumwald, 2000).

Bitkilerde büyümenin ve ürün veriminin devamının sağlanması için stres toleransının rolü açıkça görülmektedir. Bu sebeple bilim adamları çeşitli abiyotik veya biyotik streslere karşı bitkinin toleransını artırmak için gen mühendisliğinden yararlanarak sinyal ve regülasyon yolunda görevli, ozmolitler ve antioksidanlar gibi koruyucuları veya stres

toleransında görevli proteinleri kodlayan genleri tek tek ve ya birkaçını bitkiye transfer etmeye çalışmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu önemli başarılar elde edilmesine rağmen tolerans mekanizmasının kompleks doğasından dolayı tam bir başarı sağlanması mümkün olamamıştır.



Şekil 1.8. Abiyotik strese karşı bitki cevabının oluşum mekanizması (Wang vd., 2003b).

1.6.1. Kuraklık Stresi

Kuraklık meteorolojide kullanılan bir kavram olup, toprağın su içeriği ile bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönem için kullanılan bir terimdir. Kuraklığın bitkilerde stres oluşturması ise şiddetine, süresine, diğer stres türleri ile etkileşimlerine, toprağın su tutma kapasitesine, strese maruz kalan bitkinin genotipine, gelişim basamağına ve bitkinin buharlaşma veya transpirasyon hızına bağlıdır (Jones, 1992; Kozlowski ve Pallardy, 1997).

Dünya genelinde tarım alanlarında doğal olarak rastlanan çevresel stres faktörlerinden biri olan kuraklık %26'lık payla bitki büyümesini ve verimini etkileyen en yaygın stres türüdür (Blum, 1986). Kuraklık stresi, bitkilerde metabolik, mekanik ve oksidatif birçok değişikliğe sebep olarak bitkinin homeostasisinin bozulmasına neden olur. Bitkilerde bozulan homeostasinin tekrar sağlanması için fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede stres cevabı gelişir (Kadıoğlu vd., 2002; Kadıoğlu ve Turgut 1999). Değişen çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak olan bu stres cevabı kuraklıktan sakınma ve kuraklığa tolerans gösterme olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Arora ve Mohan, 2002; Kramer, 1980). Sakınma mekanizmalarına sahip bitkilere örnek olarak çöl bitkileri ve sukkulent bitkiler verilebilir. Çöl bitkileri yağmur periyodu sırasında büyüyüp ürerler ve kuraklık periyodunda ise dormant tohumlar meydana getirerek kuraklıktan sakınırlar. Yine, her dem yeşil çöl bitkileri kuraklık periyodu boyunca dokularındaki turgoru devam ettirebilmek için suda çözünebilir maddeleri biriktirerek kuraklıktan sakınırlar (Mundree vd., 2002). Ayrıca, sukkulent bitkiler, kuraklığa karşı sukkulent dokularında su depolayarak su kaybını en az oranda tutarlar. Böylece uzun bir süre canlılıklarını sürdürebilirler (Salisbury ve Ross, 1992). Stresten sakınmak için bazı bitkiler ise birtakım metamorfozlar geçirir. Örneğin, kurak ortam bitkileri ışık etkisinden korunmak ve suyu iyi bir şekilde absorbe etmek için yaprak yüzeyinde tüy, kutikula ve stoma modifikasyonları gibi özel yapılar geliştirirler (Bosabalidis ve Kofidis, 2002).

Stresten kaçınan bitkiler yalnızca orta şiddetteki kuraklık stresi durumunda hayatta kalırken strese toleranslı bitkilerde ise çok daha şiddetli kuraklık stresi durumunda hayatta kalabilirler. Kuraklığa toleranslı bitkiler dehidrasyonu erteleyenler ve dehidrasyona tolerans gösterenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Kramer, 1980). Dehidrasyonun ertelenmesi, transpirasyonu azaltan veya su absorpsiyonunu artıran mekanizmalar ile

sağlanır. Böylece bitkinin zarar oluşturacak derecede düşük su potansiyeline ulaşması önlenir. Dehidrasyon toleransı ise, hücreler su hasarına ve düşük su potansiyeline maruz bırakıldıktan sonra bitkinin canlılığını devam ettiren veya büyüten mekanizmaları içerir. Su hasarı artarsa hücreler turgor durumlarını kaybederler ve böylece hücreler büyümesi sınırlandırılır. Ayrıca, hücreler, içsel ozmotik potansiyellerinin ayarlayarak da hücre büyüme ve gelişmesini düzenlerler (Hasegawa vd., 1984).

Kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmalarından biri de ozmotik düzenlemedir (Kramer, 1980). Kuraklık stresinin bir sonucu olarak bitkiler, ozmolitler olarak bilinen ve turgorun devamını sağlayan maddeleri biriktirirler (Saruhan vd, 2010; Saruhan vd., 2009; Terzi vd, 2009). Ozmotik düzenleme, kuraklık sonucu turgor özelliğini kaybeden bitki hücrelerinin, sakınma mekanizmalarının yokluğunda turgoru yeniden kazanmaları ve büyümeyi devam ettirebilmeleri için başvurdukları bir yoldur (Handa vd., 1983). Ozmotik düzenlemeye en önemli kaynağı indirgen şekerler sağlar (Hasegawa vd., 1984). Bunun yanında prolin, betainler, trehaloz, K⁺, fruktanlarda, osmotik ayarlama sağlamak için bitkiler tarafından sentezlenirler (Smirnoff, 1998). Yapılan araştırmalar, ozmotik düzenlemenin bitkinin türüne, yaşına, stresin derecesine, çevresel şartlara ve strese maruz kalan bölgeye bağlı olduğunu göstermektedir (Ackerson vd., 1980; Turner vd., 1986). Ozmotik ayarlama, stoma açıklığının korunmasına (Turner vd., 1978; Ackerson vd., 1980; Ludlow vd., 1985) ve fotosentezin devam etmesine (Ackerson vd., 1980) katkı sağlar.

Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri mekanik, metabolik ve osmatik olarak gruplandırılır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Bunlardan ilki olan mekanik etki, kuraklığa maruz kalan bitkinin su kaybetmesi sonucu turgorun azalması nedeniyle ortaya çıkar (Lewitt, 1980). Bilindiği gibi zarları oluşturan çift fosfolipid tabakasının hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruk kısımları su ile itilerek zarın dolayısıyla hücrenin gergin yapıda durması sağlanır (sıvı-katı faz). Hücrenin su kaybetmesiyle hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşarak zarın gerginliği bozulur ve zarlar kompakt bir görüntü alır (Jel fazı). Dolayısıyla zar hareketleri sınırlandırılmış olur. Su kaybına bağlı olarak hücre hacminin azalması plazma zarının hücre duvarından ayrılmasına neden olur. Gerilim altındaki plazma zarı ve tonoplastta gerçekleşen çökme, yırtılmalara yol açabilir (McKersie ve Lehsem, 1994) ve bu durum, zarlar üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimlerin serbest kalması ve dolayısıyla sitoplazmanın otolizi ile sonuçlanabilir (Salisbury ve Ross, 1992) Bu etki, normal hücresel metabolizmayı genelde kalıcı olarak bozar.

Bitkilerde kuraklık stresinin etkilerinden ikincisi olan metabolik etki, hücrenin su kaybetmesine bağlı olarak hücre içi iyon konsantrasyonunun artması sonucu zar bütünlüğünün ve proteinlerinin yapısının bozulması ile gözlenir. Bilindiği gibi hücrenin metabolik işlevlerini sürdürebilmesi, reaksiyonlarda gerekli moleküllerin taşınmasında ve çözünmesinde görevli suyun varlığına bağlıdır. Su kaybı, hidrofobik ve hidrofilik aminoasitlerin su ile etkileşimlerini bozarak proteinlerin denatürasyonuna sebep olur (Campbell, 1991; Bray, 1997; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Bunun sonucunda, metabolik yollarda görevli enzimler inhibe olur ve amonyak (NH_3) gibi toksik bir bileşik ortaya çıkar. Amonyak, bitkide metabolik dengenin bozulmasına neden olduğu gibi suyun yukarı doğru taşınmasını da engelleyerek iki yönlü zarar verir. Kuraklık stresi sırasında DNA ve RNA gibi nükleik asitlerinde zarar gördüğü rapor edilmiştir. Yapılan araştırmalar, kuraklığın RNA az aktivitesini artırdığını göstermiştir (Kessler, 1961). Yine, kuraklık stresinin hormon seviyelerinde değişime yol açtığı saptanmıştır. Bu bağlamda, kuraklık stresinin ABA miktarında artışı, sitokinlerin, GA'nın ve IAA'nın miktarlarında azalışı teşvik ettiği gözlenmiştir (Çırak ve Esendal, 2006).

Bitkilerde kuraklık stresinin etkilerinden üçüncüsü olan oksidatif etki, hücrede hidroksil (OH^\bullet), süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet -}$), peroksinitrit (ONOO^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikallerin oluşumu nedeniyle meydana gelir. Serbest radikaller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektrona sahip olduklarından son derece reaktiftirler ve indirgen ve yükseltgen özellikleri sonucu hücre hasarına neden olurlar. Bu radikaller, hücrenin plazma zarında, mitokondrisinde ve ER zarlarında oluşabilir (McKersie ve Lehsem, 1994). Kuraklık stresi sırasında, bitki daha fazla su kaybetmemek için stomalarını kapattığında CO_2 'nin alımını da kısıtlamış olur. Böylece fotosentezdeki elektron akseptörü NADP^+ kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin NADP yerine oksijeni indirger ve PSI'in elektronları, O_2 'ye transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet -}$) üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi vd., 2000). Kuraklık stresi altında artan süperoksit, lipid peroksidasyonuna ve yağ asidi doymunluğuna neden olarak zarların bütünlüğünü bozar (Sgherri vd., 1996). Süperoksit, H_2O_2 ve OH^\bullet radikallerini oluşturur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksitin hidroksil radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da artırabilir (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) (Smirnoff, 1993). Serbest radikallerin DNA, hücresel proteinler ve lipidler üzerinde de zararlı etkileri olduğu rapor edilmiştir (Çırak ve Esendal, 2006).

1.6.2. Üşüme Stresi

Düşük sıcaklık veya üşüme stresi donma sıcaklığının üstünde, fakat bitkilere zarar verebilen genellikle 0 ila 15 °C arasındaki sıcaklıklarda meydana gelir. Üşüme stresi, bu sıcaklıklarda hücre içerisinde buz çekirdeklerinin oluşmamasıyla soğuk stresinden ayrılarak farklı bir stres çeşidi olarak incelenir. Üşüme stresi ilk olarak, 1926 yılında, düşük gece sıcaklığına maruz bırakılan şeker pancarının yapraklarında kloroz meydana geldiğini bildiren çalışma ile rapor edilmiştir (Faris, 1926). Üşüme stresinin sistematik olarak incelenmesi ise ancak 1970'li ve 1980'li yıllarda düşük sıcaklık altında yetiştirilen salatalık, mısır ve domates gibi bitkilerin fotosentetik dokularının yapısı ve fizyolojisinin incelenmesiyle başlamıştır (van Hasselt, 1974; Taylor ve Craig, 1971; Gemel vd., 1986).

Bitkilerde üşüme stresinin etkileri, sıcaklık derecesine, maruz kalma süresine, bitkinin genotipine ve gelişim evresine, gün içerisinde maruz kaldığını zamana ve sıcaklık, rüzgar, su ve besin gibi diğer çevresel stres faktörlerine bağlı olarak farklılık gösterir (Saltveit ve Morris, 1990). Kısa süreli düşük sıcaklığa maruz kalan bitkilerde gözle görülür etkiler gözlenmemesine rağmen uzun süreli üşüme stresi altındaki bitkilerde zamanla artan doz aşımına bağlı olarak semptomlar hızla belirginleşmeye başlar. Düşük sıcaklığa maruz kalan bitkilerde büyüme durdurulurken, üşümeye hassas türlerde sıcaklık normale döndüğünde hasarlar meydana gelir. Örneğin, 24 saat 0.3°C'ye maruz kalan mısır fidelerinin normal yaprak uzama oranına dönmesi dört gün gerektirdiği saptanmıştır (Creencia ve Bramlage, 1971). Özellikle tropik ve subtropik bölgelerde yetişen bitkiler sıcaklık düşüşlerine karşı daha duyarlıdır. Bu bağlamda, 1980 yılında Amerika'da sıcaklığın mevsimsel normallerin altında seyretmesi sonucunda pamuk bitkisinden 60 milyon dolar zarar edildiği rapor edilmiştir (Wilson, 1984). Tahıl bitkilerinde ise, düşük sıcaklıklar nadiren ürün kayıplarına sebep olurken, büyüme ve gelişimi önemli ölçüde geciktirir. Yine, üşüme, ürün hasadı sonrasında da bazı tarım ürünleri için önemli bir faktördür. Çünkü birçok meyve ve sebze düşük sıcaklıklarda depolandıklarından üşümeye duyarlı olanlar tazeliklerini koruyamayıp bozulmaktadırlar (Ercoli vd., 2003).

Üşüme hasarı, etilen miktarının artmasına ve metabolizmik elektrolitlerin sızmasına sebep olarak hücresel ve fenotipik değişimlere neden olur (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Üşüme stresinin hücrede meydana getirdiği semptomlar (Kratsch ve Wise, 2000).

Üşüme stresi şekli	Gözlenen semptomlar	Kaynaklar
Karanlıkta üşüme	Nişasta azalır, kloroplastlar şişer ve tilakoyidler genişler.	Jagels, 1970; Wise vd., 1983
Işıktaki üşüme	Işık üşüme semptomlarını daha da artırır. Nişasta azalır, kloroplastlar şişer, tilakoyidler genişler ve periferik retikulum oluşur.	Jagels, 1970; Murphy ve Wilson, 1981; Musser vd., 1984; van Hasselt, 1974; Taylor ve Craig, 1971; Terishima ve Inoue, 1985
Su stresi ile birlikte	Kloroplastlar şişer, lipit damlaları birikmeye başlar, kloroplastlarda dağılma gözlenir.	Wise vd., 1983
Üşüme süresi	İlk aşama: tilakoyid zarlar bozulur, nişasta azalır, periferik retikulum oluşur. İkinci aşama: kloroplastlar dağılır ve lipit damlaları birikmeye başlar. Üçüncü aşama: granalar kopar, tilakoyid iç boşlukları genişler.	van Hasselt, 1974; Wise vd., 1983; Taylor ve Craig, 1971; Wu vd., 1997
Üşümeye alışma	Tilakoyid zar yapısı (granalarını küçültür), yaprağın mezofil sitoplazması ve fosfolipitleri, yaprak hücre zarlarının serbest sterol oranı değiştirilir.	Garber ve Steponkus, 1976; Huner vd., 1993; O'Neil vd., 1981
Üşüme sonrası iyileşme	İyileşme bitkinin türüne bağlıdır ve aşırı hassas türlerin tekrar yeşermesi imkansızdır.	Jagels, 1970; Murphy ve Wilson, 1981
Kalıtımsal üşüme hassasiyeti	Aşırı hassas türlerde mitokondrilerinde şişme gözlenir; hassas türlerde plazmoliz meydana gelir; dirençli türlerde hasar meydana gelmez.	Ishikawa, 1996; Leddet ve Geneve, 1982; Murphy ve Wilson, 1981; Nessler ve Wernsman, 1980; Taylor ve Craig, 1971; Wise ve Naylor, 1987; Wise vd., 1983
Üşümenin ontogenik etkileri	Üşümeye dirençli türlerde kloroplastlar gelişimi yavaşlar.	Karpilova vd., 1980; Humbeck vd., 1994

Şiddetli üşüme hasarları ise bitkide hücrel otolize ve senesense sebep olabilir (Saltveit ve Morris, 1990). Üşüme stresi başlıca metabolizmayı ve zarları etkiler (Kaniuga, 2008). Düşük sıcaklıklar, proteinlerin yapısını ve kinetiğini etkileyerek bir metabolik yolun inhibisyonuna sebep olur. Bu durum hücrede toksik ara ürünlerin birikmesine yol açar. Bu toksinler zarların bozulmasına veya diğer hücrel ve fenotipik semptomların gelişmesine önderlik eder. Zarların bozulmasını açıklayan bir diğer modele göre ise, düşük sıcaklığın zar lipidlerinin açıl kuyrukları tarafından algılanması ile sıvı kristal halinde bulunan zarlar jel fazına dönüştürülür (Guy vd., 2008; Raison ve Chapman, 1976; Raison ve Lyons, 1986; Raison vd., 1979). Jel fazı, lipidlerin kinetik enerjisinin az olduğu ve sıkıca ve katı bir şekilde depolandığı fazdır. Zarların jel fazda olması normal seçici geçirgenlik fonksiyonlarını yerine getirememesine sebep olur. Sonuç olarak hücrede turgor kaybı, sitoplazma içeriğinin akışı, enerji metabolizmasında ve fotosentezde aksaklıklar, hücrenin otolizi ve ölümü gibi olaylar meydana gelir.

Başlıca etkisi zar bütünlüğünü bozmak olan üşüme stresi, hücrede en çok zarlarla çevrili olan kloroplast, mitokondri ve nükleus gibi organelleri etkiler. Üşüme stresi, kloroplastların ve mitokondrilerin şişip şekillerinin bozulmasına, nişasta granüllerinin sayısının ve büyüklüğünün azalmasına, tilakoyidlerin genişlemesine, granalarda kopmalara, kloroplast zarflarında periferel retikulum adı verilen keselerin oluşmasına, kloroplastlarda lipid damlacıklarının oluşmasına ve nükleusta kromatin materyalinin yoğunlaşmasına neden olur (Kratsch ve Wise, 2000). Kloroplastlarda şişme, üşüme stresinin asimilat ihracını azaltmasıyla nişasta parçalayan enzimlerin faaliyetlerinin artması sonucu stromada çözünen şeker birikimine bağlı olarak su potansiyeli düşürülmesi nedeniyle gerçekleşir. Tilakoyidlerin genişlemesi, üşüme stresi ve ışığın etkisi ile oluşan fotooksidasyon sonucu meydana gelir. Periferel retikulum ise, üşüme stresi altında daha etkili metabolit transferi yapabilmek için zar yüzeyinin artırılması için oluşturulur.

Düşük sıcaklıklara hassas bitkilerde stres semptomlarının meydana gelmesi bitkinin bulunduğu gelişim evresine göre farklılık gösterir. Oldukça kuru olan tohumlar uzun süre düşük sıcaklıklara karşı toleranslıdır. Ancak çimlenme sırasında su alımının başlamasıyla bitkide üşüme stresi meydana gelebilir (Herner, 1990). Eğer toprak sıcaklığı dikim sırasında çok düşükse, tohum tarafından emilen su, zar bütünlüğünün bozulmasına, elektrolit akışının artmasına ve çimlenmenin durmasına neden olur. Su emilimi sonucu gerçekleşen üşüme stresi bazı hassas türlerin polenlerinde de görülür (Crowe vd., 1989). Polen zarlarının lipid fazı su miktarına ve sıcaklığa oldukça duyarlıdır. Şöyle ki, düşük

sıcaklık sonucu jel fazına geçen zarlar su emmeye başladığında fonksiyonlarını tamamen kaybederler. Ancak, düşük sıcaklığa maruz kalmasına rağmen normal sıvı kristal fazını koruyan zarlar ise su emilimi sırasında zarar görmezler. Diğer taraftan bitkiler fide evresinde düşük sıcaklıklara daha duyarlıdır. Ayrıca kök, rizom, soğan gibi bitki kısımları diğer organlara nazaran düşük sıcaklıklara daha hassastır.

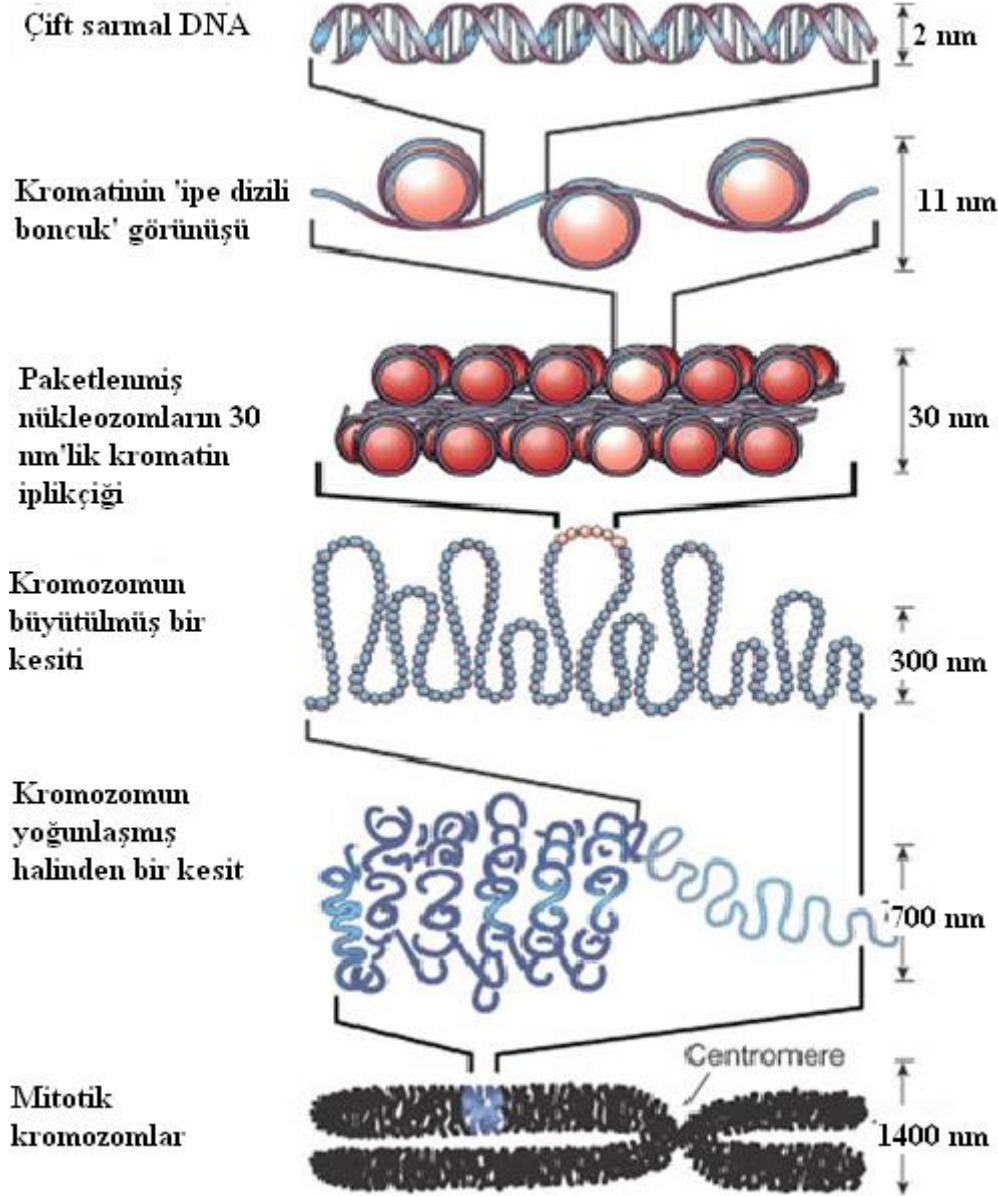
Düşük sıcaklığa maruz kalan bitkinin ilk tepkisi fotosentezi engellemektedir. Fotosentezin engellenmesi, düşük sıcaklığın enzim kinetiğini ve protein yapısını etkileyerek CO₂ fiksasyonunu sekteye uğratması ve stoma kapanmasına sebep olarak transpirasyonu etkileyerek CO₂ ve su alışverişini engellenmesi sonucu meydana gelir (McWilliam vd., 1982; Guye ve Wilson, 1987; Sassenrath vd., 1990). Eğer stres yüksek ışık yoğunluğunda meydana gelirse bitki daha fazla zarar görür. Çünkü düşük sıcaklığın fotosentezi inhibe etmesine rağmen fotosentetik aygıt ışık ile uyarılmaya devam edecektir. Bu durum ışık enerjisinin O₂ tarafından yakalanarak aktif oksijen türlerinin oluşmasına ve bitkide ikincil bir stres olarak fotooksidatif stresin meydana gelmesine sebep olacaktır (Foyer vd., 1994; Prasad vd., 1994a,b).

1.7. Kromatin Biyolojisi

Kromatin, ökaryotik genomun bir nükleoprotein kompleks içerisine paketlenerek bir metreden daha uzun olan DNA'nın küçük hacimli nükleus içerisine sığmasını sağlayan yapıya denir. H1, H2A, H2B, H3, H4 olarak beş tipi olan ve histon adı verilen proteinlerden ve DNA'dan oluşur. Tekrar eden birimlerine nükleozom denir. Her bir nükleozom, H2A, H2B, H3, H4 dimerlerinin oluşturduğu oktamer etrafında iki süperhelikal döngü yaparak sarılan 146 baz çiftinden oluşan DNA'dan ve bitişik iki histon oktamerleri arasında bulunan bağlayıcı DNA'dan oluşur. Nükleozomlar bu haliyle ipe dizili boncuk gibi görülürler. H1 proteini iki bitişik oktameri birleştirerek kromatinin daha yoğun bir görünüm almasını sağlar (Şekil 1.9).

Kromatin heterokromatin ve ökromatin olmak üzere iki farklı kısımdan oluşur. Heterokromatin bölgeler DNA boyaları ile koyu bir şekilde boyanır ve hücre döngüsü boyunca yoğun olarak kalır. Ökromatin bölgeler ise açık olarak boyanır ve interfaz sırasında yoğunluğu azalır. Heterokromatin muntazam bir şekilde nükleozom içerisine paketlenir ve telomerler, kromozomların perisentrik bölgeleri, tekrar eden dizeleri ve transpozal elementleri içerir ve gen bakımından fakirdir. Buna karşın ökromatin bölgeler

nükleozom içerisinde düzensiz bir şekilde yerleştirilir ve gen bakımından zengindir. Ayrıca ökromatin bölgelerde doku tipine, hücre soyuna veya gelişim evrelerine göre aktif veya inaktif olabilen heterokromatin bölgeleri bulunur (Hsieh ve Fischer, 2009).



Şekil 1.9. DNA'nın kromatin içerisinde organizasyonu. 165 baz çiftinden oluşan DNA'nın 2 süperhelikal döngü ile histon oktameri etrafına dolanmasıyla nükleozom oluşur. İki bitişik nükleozom arasında bağlayıcı DNA'lar bulunur. Nükleozomların birbiri üzerine katlanması ile 30 nm'lik iplikçikler oluşur. Nükleozomlar bu şekilde katlanmaya devam ederek 1400 nm çapında kromozomlar oluşur (Felsenfeld ve Groudine, 2003).

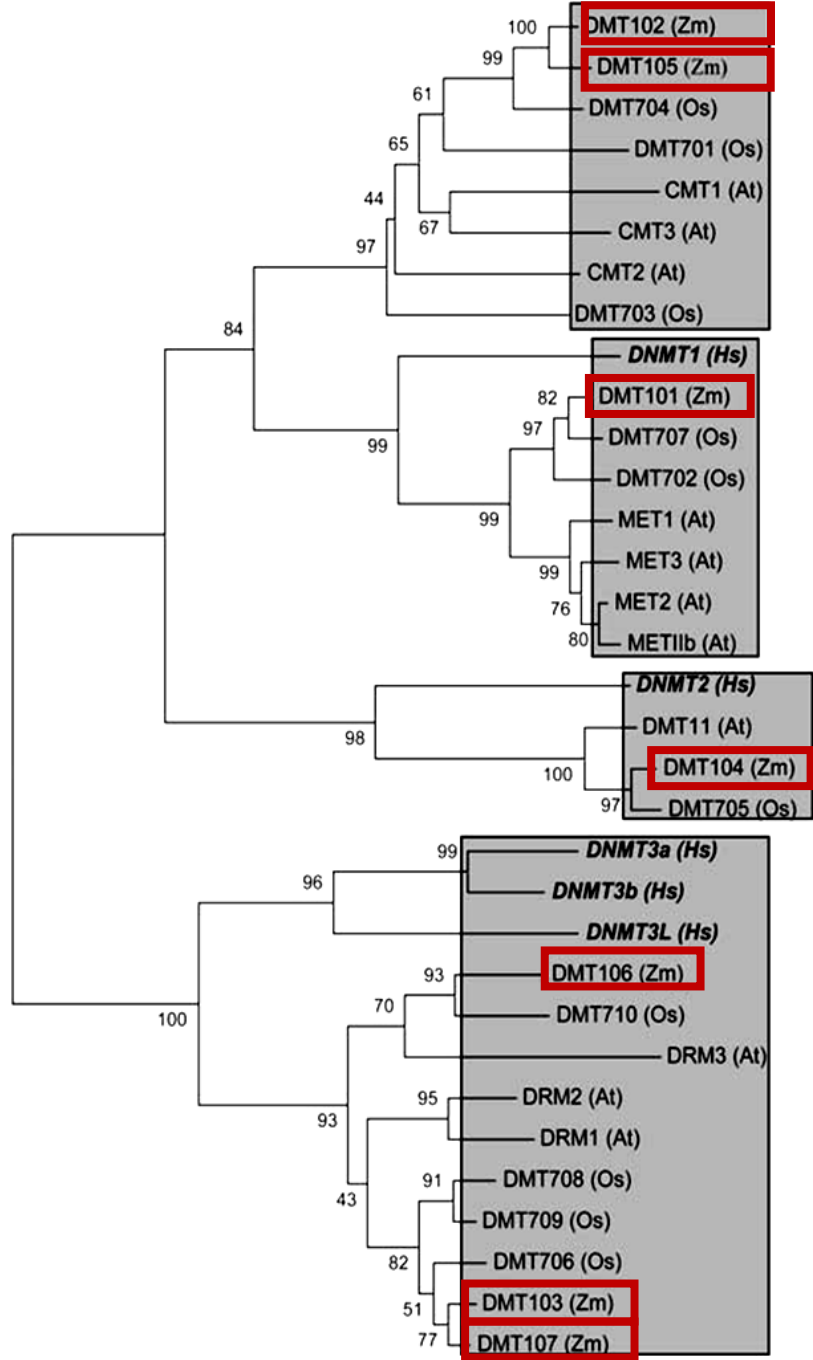
DNA'nın kromatin şeklinde organizasyonu, DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve DNA tamiri gibi enzimatik reaksiyonlarda proteinlerin erişimini zorlaştırır. Bu nedenle, kromatin bazı modifikasyonlarla yeniden düzenlenerek gerekli enzimlerin DNA'ya ulaşmaları sağlanır. Birincisi, SWI/SNF ailesine ait ATP bağımlı yeniden düzenleyici kompleksler ile histonların hareket ettirilerek kromatinin yoğunluğunun değiştirilmesiyle transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgelere bağlanması sağlanır (Nemeth ve Langst, 2004). İkincisi ise, histon oktamerlerinden dışarı uzanan histon kuyruklarının ubiquitinasyon, asetilasyon, metilasyon, ribosilasyon, sumolasyon, fosforilasyon, karbonilasyon ve glikasyon gibi postranskripsiyonel kovalent modifikasyonlar ile düzenlenmesidir. Bu modifikasyonlar, heterokromatini ökromatine dönüştürerek genoma erişimi sağlar. Üçüncüsü, nükleozom içeriğinde yer alan histonların varyantları ile değiştirilmesidir. Sonuncusu ise DNA' da bulunan sitozin bazlarının metilasyonudur (Nelissen, 2008).

DNA metilasyonu, DNA Metiltransferaz (DMT) ailesine ait enzimlerin guaninden önce gelen sitozin bazlarına (CpG) metil grubu eklemesi ile yapılır. *Arabidopsis*'de yapılan gözlemler sonucunda metillenmiş DNA'ların (CpG) çoğunlukla sentromerik bölgelerde bulunan ardışık dizilerde, ribozomal DNA sıralarında, transpozomlarda ve ya retrotanspozon türevi elementlerde, konstitütif heterokromatin bölgelerde bulunur. DNA üzerinde hemen hemen daima metillenmiş olarak bulunan ve seyrek olarak yerleşim gösteren CpG dinükleotidleri yer alır. Tersine, DNA'nın bazı bölgelerinde CpG nükleotidlerine zengin olduğu ve bu sitozinlerin çoğunlukla metillenmemiş olarak bulunduğu ve CpG adaları olarak adlandırılan bölgeler vardır. Bu CpG adaları genellikle promotor bölgelerinde bulunur ve ada içerisinde meydana gelen metilasyon işlemi ile genlerin transkripsiyonel olarak inaktif olması sağlanır. Dolayısıyla DNA'nın bu şekilde metilasyon seviyesinin değiştirilmesiyle genlerin ifadesin düzenlenmesinin bitki büyüme ve gelişiminde önemli role sahip olduğu görülmüştür (Ooi ve Bestor, 2008).

DNA'nın metilasyon seviyesinde meydana gelen değişim ile genetik kodda herhangi bir değişiklik yapmaksızın genlerin ifadesi epigenetik olarak düzenlenir. Bu işlem DNA Metiltransferaz enzimler tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler, C terminal katalitik ve N terminal regülatör olmak üzere iki kısımdan oluşur. DNA'nın metillenmesi ile gen susturulması meydana gelir. Housekeeping genlerinin promotor bölgelerinin az metillendiği dolayısıyla transkripsiyonel olarak aktif olduğu saptanmıştır. DNA'nın

metilasyon derecesinin değişimi, genlerin ifadelerinde ve genom kararlılığında bozukluklara sebep olur.

Mısır bitkisinin DMT gen ailesinde DMT101, DMT102, DMT103, DMT104, DMT105, DMT106, DMT107 olarak adlandırılan yedi gen bulunur (Şekil 1.10) (Springer ve Keepler, 2005).



Şekil 1.10. Bitki ve hayvanlara ait DNA metiltransferaz enzimlerinin filogenetik analizi. Kırmızı kareye alınan genler mısır DNA metiltransferazlarını göstermektedir (Springer ve Kaepler 2005).

1.8. Monokotillerde Yaprak Büyümesinin Analiz Edilmesinde Kullanılan Metotlar

Pek çok çevresel stresin bitkilerde meydana getirdiği ilk görülür etkilerden birisi yaprak büyümesinin sınırlandırılmasıdır. Yapraklar güneş ışığının emilmesinde ve fotosentezden sorumlu başlıca bitki organı olduklarından büyümelerinde meydana gelen azalış direk olarak bitki verimini etkileyecektir. Yapılan birçok araştırmada kuru madde birikiminin yaprak ayasının büyüklüğüyle doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Örneğin *Chloris gayana* bitkilerinin yüksek tuz konsantrasyonlarda büyütüldüğünde yaprak alanında meydana gelen azalmanın kuru madde birikimini de aynı oranda etkilediği saptanmıştır (de Luca vd., 2001).

Mısır bitkisinin de içerisinde bulunduğu monokotil bitkilerin yapraklarının büyüme bölgesi, fizyolojik özelliklerinden dolayı üç bölgeye ayrılarak incelenir. Bu büyüme bölgeleri birbirini takip ederek yaprak boyunca uzanır. Yaprak tabanında hücre bölünmelerinin meydana geldiği meristem, devamında yeni bölünmüş hücrelerin genişlemeye başladığı uzama ve nihayet hücrelerin farklılaşarak son halini aldığı olgunlaşma bölgeleri yer alır. Meristemde hücre bölünmesi faaliyetleri sonucu üretilen hücreler meristem bölgesini doldurduğu vakit, meristemin en dışında bulunan hücre altta üretilen yeni hücreler tarafından bir üst bölge olan uzama bölgesine itilir. Uzama hücresine ulaşan bu hücre, alttan gelen yeni hücrelerin itmesiyle olgunlaşma bölgesine doğru yol alırken burada kaldığı sürece genişler. Olgunlaşma bölgesine ulaştığı zaman son uzunluğuna da ulaşmış olur. Bir hücre olgunlaşma bölgesine ulaştığı zaman bir hücre üretilmiş olur. Burada hücre yeni çeper materyalleri üreterek ve biyokütlesini arttırarak olgunlaşmasını tamamlar (Fiorani, 2001).

Büyüme bölgesinin yaprak eksenini boyunca sıralanışı sayesinde bölünmüş ve bölünmekte olan hücreleri zamana ve konuma bağlı olarak takip etmek mümkün olmaktadır. Ayrıca bitki hücre bölünmesinin özelliğinden dolayı yeni bölünmüş kardeş hücreler hücre plağı ile bir arada tutulurlar. Böylece bölünen her yeni hücrenin bir diğerine bağlı kalmasıyla bir hücre dosyası meydana gelir. Epidermal hücre dosyaları yaprak eksenine paralel bir şekilde uzanır. Bu sayede bir hücre dosyası içerisinde bulunan hücre soyunun bölünme, genişleme ve olgunlaşma safhaları boyunca hücre uzunlukları ölçülmek suretiyle hücre uzunluğu profili çıkartılır. Ancak hücre uzunluğu profili çıkartılırken ölçümlerin yaprağın büyümesi sırasında yapılması gerekmektedir (Fiorani, 2001).

Mısır yapraklarının her biri daha yaşlı yapraklar tarafından kuşatılır ve en genç yaprak en içte olandır. Büyümekte olan bu en genç yaprağa ulaşmak ancak üsteki yaprakları sıyırarak mümkün olmaktadır. Etrafındaki yaprakların uzaklaştırılmasından sonra daimi veya geçici doku preparatları hazırlandıktan veya doku üzerine transparan bir bant yapıştırarak bir kopya alındıktan sonra bir Normanski mikroskobu ile hücre uzunlukları ölçülür (Volenec ve Nelson, 1981). Bu metoda alternatif olarak geliştirilen bir diğer teknik de çevredeki yapraklar uzaklaştırıldıktan sonra ölçülecek yaprağın üzerine belirli aralıklarla mürekkeple ve ya iğne ile işaretleme yapılır ve bu işaretler arasındaki uzunluk belirli zaman aralıklarıyla ölçülür (Schnyder vd., 1987). Ancak bu metodun yaralama sonucu hücre genişlemesinde bir azalmaya sebep olduğu saptanmıştır (Bernstein vd., 1993). Ayrıca bu teknikte ölçüm aralıklarının uzunluğu oldukça önemlidir (Erickson ve Silk, 1980).

Hücre uzunluğu dağılımı ve işaretlerin yer değişimiyle elde edilen ölçümler, sıvı akışkan dinamiği ve mekanik bilimlerinden türeyen bir takım matematiksel formüller kullanılarak analiz edilebilir (Silk, 1984). Bu doğrultuda büyüyen organda meydana gelen hücre bölünmelerini ve genişlemelerini zamana ve konuma bağlı olarak tanımlayabilmek için kinematik bir yaklaşım geliştirilmiştir (Good-win ve Stepka, 1945; Erickson ve Sax, 1956; Hejnowicz, 1956; Silk ve Erickson, 1979; Gandar, 1980; Silk, 1984; Fiorani, 2001; Silk, 2006; Tsukaya ve Beemster, 2006;). Böylece hücre uzunluklarının konumsal dağılımı ve yaprak uzunluğu oranı verilerinden yola çıkarak bölgesel uzama oranı ve hücre bölünme ve genişleme işlevlerinin yaprak büyümesine katkısı kinematik analizler sayesinde belirlenebilmektedir (Volenec ve Nelson, 1981; Schnyder vd., 1987; Silk vd., 1989; Ben-Haj-Salah ve Tardieu, 1995; Beemster vd., 1996; Sacks vd., 1997).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki Materyalinin Sağlanması ve Büyütme Şartları

Bu çalışmada bitki materyali olarak, RNAi (RNA interference) ve TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) gibi biyoteknolojik yöntemler ile mutasyona uğratılmış on adet mısır hatları kullanıldı. Her biri farklı bir kromatin geni bakımından mutant olan mısır daneleri kromatin veritabanı (Chromatin Database= ChromDB)'ndan tedarik edildi. Tablo 2.1 bu mısır hatlarının isimlerini, mutasyon tipini ve hangi geninin mutasyona uğradığını göstermektedir. Mutant mısır hatlarına ait tohumlar içerisinde toprak bulunan 2 lt'lik saksılara toprak yüzeyinden 2 cm içeriye doğru tohumun radikulası aşağı gelecek şekilde toprağa ekildi. Ardından saksılar sıcaklık, nem ve ışık gibi büyütme şartlarının kontrol edilebildiği odalarına konumdan kaynaklanan etkileri elimine etmek için rastgele yerleştirildi. Mısır hatları 24°C'de, 16 saat gündüz, 8 saat gece periyodunda, %70'lik nem içeren odalarda büyütüldü.

Tablo 2.1. RNAi ve TILLING mutant mısır hatları ve mutant genleri

Hattın ismi	Mutasyona uğratılan genin ismi	Mutasyon tipi
Hat 05	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 103 (DMT103)</i>	RNAi
Hat 20	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 102 (DMT102)</i>	RNAi
Hat 29	<i>SET DOMAIN GENİ 118 (SDG118)</i>	RNAi
Hat 32	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 101 (DMT101)</i>	RNAi
Hat 32.1	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 102 (DMT101)</i>	RNAi
Hat 39	<i>SET DOMAIN GENİ 122 (SDG122)</i>	RNAi
Hat 39.1	<i>SET DOMAIN GENİ 122(SDG122)</i>	RNAi
Hat 44	<i>NÜKLEOZOM KONUMLANDIRICI GEN (NFE102)</i>	RNAi
DMT106	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 107 (DMT106)</i>	TILLING
DMT107	<i>DNA METİLTRANSFERAZ 107 (DMT107)</i>	TILLING

DNA METİLTRANSFERAZ 103 (DMT103) geni RNAi tekniği ile susturulmuş ve Hat05 olarak adlandırılan bir mısır mutant hattı kuraklık stresine maruz bırakıldı. Karşılaştırmalı analizler yapabilmek için mısırın günlük normal ihtiyacı kadar sulanan bir kontrol grubu ve strese sebep olabilecek kadar sulanan deney grubu oluşturuldu. Her iki

gruba ait bitkiler 24°C’de, 16 saat gündüz 8 saat gece periyodunda, %70’lik nem içeren büyütme odalarına yerleştirildiler. Kuraklık stresi uygulanan grubu verilecek su miktarı toprağın su tutma kapasitesini de göz önüne alınarak hesaplandı. Toprağın su tutma kapasitesini belirlemek için deneyde kullanılan topraktan 1 gr alınarak tartıldı. Daha sonra fırında kurutuldu ve ardından tekrar tartıldı. Fırında kurutulmadan önceki ve sonrasındaki oluşan fark 1 gr toprağın su tutma kapasitesini göstermektedir. Deneyde aynı ağırlığa sahip saksılara yine aynı ağırlıkta toprak konuldu. Böylece bütün saksıların içerisinde bulunan toprakla birlikte ağırlıklarının aynı olması sağlandı. Her gün saksılar bir tartı ile tartılarak ilk ağırlıklarına göre farkları gözlemlendi. Kontrol grubu oluşan farkın başlangıçtaki ağırlığa gelene kadar su eklendi. Stres uygulanan grup ise başlangıçtaki ağırlığının %30’una ulaşmaya kadar susuz bırakıldı. Bu değerin altına düşmeye başladığında başlangıç ağırlığının %30’una varmaya kadar sulandı.

Hat05 ve *DNA METİLTRANSFERAZ 107 (DMT107)* geni TILLING tekniği ile mutasyona uğratılmış ve *DMT107* olarak adlandırılan bir mısır hattı soğuk stresine maruz bırakıldı. İlk olarak mutant mısırlara ait tohumlar 51 kuyucuklu çoklu kaplarda çimlendirildi. Ardından bir günlük fideler sıcaklığı, ışık yoğunluğu ve nemin kontrol edilebildiği iklim dolaplarına transfer edildi. Tablo 2.2 iklim dolabının büyüme şartlarını göstermektedir. Karşılaştırmalı analizler yapabilmek için bir kontrol grubu ve gece sıcaklığının düşürüldüğü soğuk stresi grubu oluşturuldu. Kontrol grubundaki bitkiler 16 saatlik gündüz periyodunda 25°C ve 8 saatlik gece periyodunda 18°C’de büyütüldü. Stres grubundaki bitkiler ise 16 saatlik gündüz periyodunda 25°C ve 8 saatlik gece periyodunda 4°C’de büyütüldü.

Kök büyümesini inceleyebilmek için Hat05 kağıt rulo sistemi kullanılarak yetiştirildi (Şekil 2.1). Mısır tohumları ekilmeden önce % 6’lık sodyumhipoklorit (çamaşır suyu) çözelti içerisinde 2 dakika boyunca karıştırılarak sterilize edildi. Ardından her biri 5 dakika süren 3 defa karıştırılmak suretiyle durularak tohumlar sodyumkloritten tamamıyla arındırıldı. Steril edilen tohumların radikulları aşağı gelecek şekilde laboratuvar tezgahına serilmiş ve ıslatılmış kağıtların üst hizasında 2 cm aşağısına gelecek şekilde yerleştirildi. 2 tohum arasında 10 cm kalacak şekilde tohumlar ardışık olarak kağıda dizildi. Ardından kağıt rulo haline getirildi ve bir tüp içerisine yerleştirildi. Tüpler yarıya kadar su ile tamamlandı ve bu işlem her gün tekrarlanarak kağıdın ıslak kalması sağlandı. İçerisinde mısır tohumları bulunan tüpler 24°C ve 16 saat gündüz 8 saat gece periyoduna sahip olan

lovibonda yerleştirildi. Fideler bir haftalık olunca daha uzun tüplere aynı şekilde transfer edilerek lovibonda yerleştirildi.

Tablo 2.2. İklim dolabının büyüme koşulları (Voetsch, Germany).

			Soğuk stresi	Kontrol
0	0.00 h	0	4°C	18°C
1	0.00 h	1	70%	70%
2	4.00 h	0	4°C	18°C
3	5.59 h	2	0%	0%
4	6.30 h	2	100%	100%
5	6.30 h	0	25°C	25°C
6	21.30 h	0	25°C	25°C
7	21.30 h	2	100%	100%
8	22.00 h	2	0%	0%
9	23.59 h	0	4°C	18°C
10	23.59 h	1	70%	70%

*0, Sıcaklık,

*1, Nem

*2, Işık



Şekil 2.1. Kök büyümesini gözlemleyebilmek için kağıt rulo sisteminde yetiştirilen bitkilerin lovibond içerisindeki temsili fotoğrafı

2.2. Tohum Stokunu Artırmak için Tozlaştırma İşlemi

Mısır fideleri, yaprak büyümesi incelendikten sonra, tohum stokunun artırılması için içerisinde fertilizör eklenen 5 lt'lik saksılara transfer edildi. Ardından saksılar 27°C'lik seraya yerleştirildi. Toprağa eklenen fertilizör, miktarı fazla olması halinde bitkilerin ölümüne sebep olacağından, 1 çuval toprağa 3 kaşık oranında eklendi. Mısır bitkileri gün aşırı sulanarak gelişimleri her gün izlendi. Böylece fidelerin çiçeklenmeye başladığı an tespit edildi. İlk olarak erkek çiçekler püskül şeklinde bitkinin en tepsinde ortaya çıkışının ardından dişi çiçeğin çıkacağı an dikkatlice takip edildi. Dişi çiçek yaprak koltuğunda görünmeye başladığı andan itibaren istenmeyen tozlaşmaları önlemek için Şekil 2.2'de gösterildiği gibi beyaz bir kağıtla polenlerin ulaşamayacağı şekilde kapandı. Dişi çiçeklerin gelişimleri takip edilerek çiçek stiluslarının çiçeği saran yapraklardan dışarı uzanması beklendi. Bekleme süresini azaltmak için embriyoya zarar vermemek kaydıyla çiçeği saran yapraklar dikkatlice kesilerek stilusların daha çabuk uzaması sağlandı.



Şekil 2.2. Sera ortamında isteye bağlı tozlaştırma yapılmış mısır bitkilerinin temsili fotoğrafı. Kırmızı oklar tozlaştırma yapıldıktan sonra üzeri kapatılan mısır koçanlarını göstermektedir.

Dişi çiçeği saran yaprakların kesilmesinden yaklaşık bir gün sonra istenilen genetik bilgiye sahip babadan Şekil 2.2’de görülen kahverengi kağıt torbalara toplanan polenler dişi çiçeğin sitülusları üzerine bırakıldı ve dişi çiçek tekrar kapatıldı. Tozlaşmanın gerçekleşmesini sağlamak için ilk tozlaştırma işleminden bir gün sonra bu işlem tekrarlandı. Tozlaşmanın gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için stilusların gelişimleri incelendi. Eğer tozlaşma başarılı ise stilusların uzaması durarak parlak sarı olan renkleri pembeden giderek kahverengiye dönen bir renk alacaktır. Mutant mısırların hepsinin aynı geçmişe sahip olmalarını sağlamak için mısırlar kendine tozlaştırıldı.

2.3. Popülasyondaki Mutant Mısır Hatlarının Belirlenmesi

2.3.1. Yaprak Boyama Testi

Yaprak boyama testi RNAi mutantlarını tespit etmek için kullanıldı (Dennehey, 1994; Spencer, 1992). RNAi tekniği ile mısıra ait kromatin genleri, komplementer yapay dsRNA’nın mısırlara aktarılması ile bir dize enzimatik parçalanma işleminden oluşan RNAi işlevi uyarıldı. Böylece, mısıra ait genin ürettiği mRNA’ların sitoplazmada parçalanması teşvik edilerek genin ifadesinin susturulması sağlandı. Yaprak boyama testi ile genleri susturulmuş mutant yani transgenik mısırları belirleyebilmek için yapay dsRNA ile birlikte aktarılan ve fosfotrozin asetil transferaz (PAT) enzimini kodlayarak bitkilere herbisitlere karşı dayanıklılık özelliği kazandıran bialapos direnç (*BAR*) geninin tespiti yapıldı (Hoshino vd., 1998). Bu boyama testi için mısırların büyümesini tamamlamış beşinci yaprakları bir çeşit herbisit olan basta (glufosinat) çözeltisi ile muamele edildi. Basta glutamin sentezinde ve amonyumun detoksifiye edilmesinde görevli glutamin sentaz genini inhibe eden gulufosinat içerir. PAT enzimini ise gulufosinatı detoksifiye ederek bitkiye bastaya karşı dirençlilik kazandırır. Basta çözeltisi % 0.01 oranında Tween 20 (ıslatma ajanı; TWEEN 20)’nin ve % 1 oranında glufosinat amonyumun karıştırılmasıyla hazırlandı. Mısırların beşinci yapraklarının yarısına bir kalem yardımıyla yaprağın enine doğru bir çizgi çizilerek işaretlendi. Bu çizgiden itibaren yaprağın ucuna doğru, bir süngere emdirilmiş basta çözeltisi ile yaprak boyandı. Uygulamadan bir gün sonra başlayarak üç ila yedi gün içinde yaprağın basta uygulanan kısmında meydana gelen değişimler kaydedildi. Yaprakların test edilen kısmında sararma, solma, kuruma gibi semptomların meydana gelişini mısırların herbisite duyarlılığıyla transgeni içermediğini gösterir (Şekil 2.3). Mutant

mısırlarda ise sahip oldukları PAT enzimi sayesinde yaprağın test edilen kısmında hiç bir semptom gelişmeyecektir. Bu uygulama çok genç bitkilerde uygulandığında ölümcül olabilir fakat sekizinci yaprak aşamasında uyguladığında sadece yaprağın ölmesine bitkinin ise yaşamasına imkan sağlar.

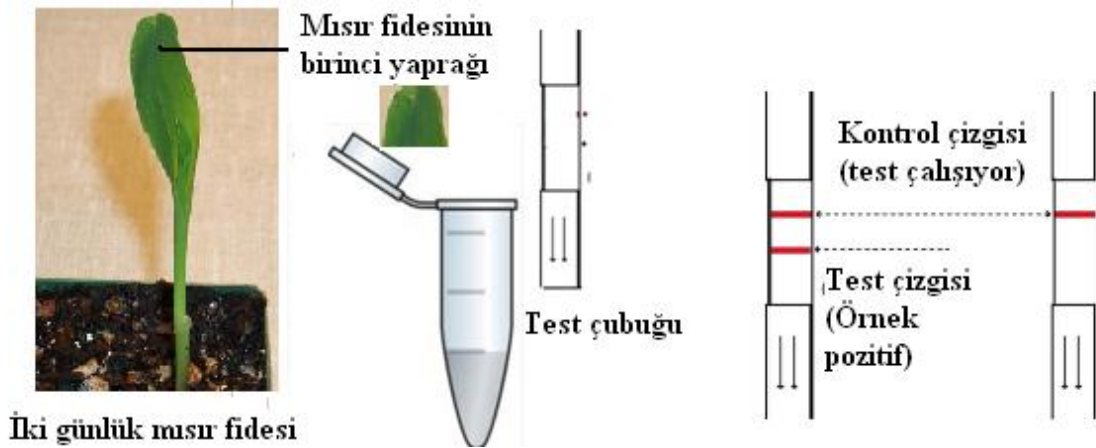


Şekil 2.3. Bir marker ile işaretlenen yaprağın sünger yardımıyla basta çözeltisi ile boyanmasını

2.3.2. Lateral Flow Testi

Lateral Flow testi, genleri susturulmuş mutant mısır hatlarından kalıtılan bir popülasyonda transgenik aleli taşıyan mutant mısır hattını bulmak için alternatif bir yöntem olarak kullanıldı. Bu test ile mutant mısırlara aktarılan *BAR* geninin ürettiği PAT proteini tespit edildi. Bu test antipodi sandviç esasına göre tasarlandı. Bu amaçla bir renk işaretçisiyle birleştirilmiş PAT proteini bir lateral flow çubuğuna yerleştirildi. Bu lateral flow test çubukları PAT proteinine sahip bitki dokusundan elde edilen ekstraktan alınan bir miktar sıvı içerisine daldırıldığında pat proteini ile çubukta bulunan renk maddesi birleşerek su ile yukarı doğru taşınır. Test çubuğunun yukarı kısmında biri renk maddesini biri renk maddesi ile birleşen proteini yakalayan iki adet yakalama kısmı bulunur. PAT proteini ile bileşen renk maddesi veya tek başına renk maddesi bu bölgede yakalandığı zaman kırmızı bir renk oluşur. Yakalama bölgesinde tek bir çizgi oluşması testin çalıştığını gösteren pozitif kontroldür. Ancak PAT proteininin varlığını göstermez. Bu bölgede beliren ikinci kırmızı bant bitki ekstraktında PAT proteinin varlığını gösterir (Şekil 2.4).

Bitki materyali çimlenmeden iki gün sonra birinci yaprağın ucundan 1 cm kesilerek 1.5 ml'lik ependorf tüplere konarak hazırlandı. Üzerine 0.5 ml su konularak karıştırıcı ile 1 dakika boyunca ezilerek PAT proteininin su içerisine geçmesi sağlandı. Test çubuğu elde edilen ekstraktın içerisine daldırıldı. Birkaç dakika sonra çubuğun sonuç penceresinde bant oluşmaya başladı. Eğer gösterge penceresinde sadece bir kırmızı bant oluşmuşsa bitkinin yaban tip, iki kırmızı bant oluşmuşsa mutant olduğunu gösterir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Lateral flow testinin şematik gösterimi

2.3.3. dCAPS Metodu

Çoğaltılmış polimorfik dizenin kesilmesinden türetilmiş (dCAPS) metot, TILLING mutant mısır hatlarını belirleyebilmek için kullanıldı (Neff vd., 1998). Mısır tohumlarının veya polenlerinin bir çeşit mutajen kimyasal madde olan etilmetansülfonat (EMS) ile muamele edilmesiyle istenilen hedef gende aminoasit değişikliğine sebep olan nokta mutasyonu meydana getirilir. dCAPS metodu ile bu şekilde meydana getirilen TILLING mutant hatlarında bulunan nokta mutasyonu belirlendi. Bu metot, hedef dizinin çoğaltılması işleminin dahil olduğu restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ile çoğaltılmış polimorfik dizinin kesilmesi (CAPS) tekniklerinden türetilmiştir. CAPS'de RFLP'den farklı olarak restriksiyon bölgeleri mutasyon ile oluşturulur veya var olan bölge kaybettirilir. dCAPS metodunun da ise mutasyona uğrayan hedef gen sırasına uyumsuz bazlar kullanarak bir restriksiyon bölgesi oluşturacak şekilde PCR primerleri dizayn edildi. TILLING mutantlar, PCR ürününün restriksiyon endonükleazlar ile muamelesinin ardından kesilip kesilmemesine göre belirlendi.

EMS-mutasyonu için TILLING mutant hattı olan DMT107 için B73, DMT106 için W22 adlı hibrit mısırlar kullanıldı.

2.3.3.1. Edward Metodu ile Bitki Genomik DNA Ekstraksiyonu

dCAPS metodu ile TILLING mutant mısır hatlarını belirleyebilmek için gerekli olan DNA Edward vd. (1991)'nin geliştirdiği metoda göre ekstrakte edildi. Mutant mısır hatlarına ait tohumlar çimlendirildi ve yapraklarından bir parça kopartılarak içerisinde her biri 4 cm çapında olan 3 adet metal topun bulunduğu 2 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Ardından bitki materyalinin bulunduğu ependorf tüpler DNA ekstraksiyon işlemine kadar -70°C'de dondurarak saklandı. Ekstraksiyon işleminin ilk adımı olarak bitki materyalleri erimelerine izin verilmeden mekanik sallayıcı yardımıyla 40 saniye ile 1.5 dakika süresince 30 Hz hızında iyice homojenize edildi. Elde edilen homojenatların her birinin üzerine 1 ml ve içerisinde 200 mM Tris HCL (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM etilen daimin tetra asetik asit (EDTA), %0.5 Sodyum dodesil sülfat (SDS) maddelerini içeren ekstraksiyon tampon ilave edildi. Bu karışım 10 ila 15 dakika kadar 65°C'lik fırında veya termoblokta inkübe edildi. Ekstraksiyon tamponunda bulunan SDS bir çeşit deterjandır ve hücre çeperini ve zarını parçalayarak hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağladı. İnkübasyonun ardından ekstraktlar 14000 rpm hızında 2 dakika boyunca santrifügasyona tabii tutularak içerisinde bulunan hücre artıklarının ependorf tüplerinin dibine çökmesi sağlandı. Tüp içerisinde oluşan faz ayrımını bozmadan tüpün üst kısmında bulunan ve DNA'nın bulunduğu supernatanttan 300 µl alınarak temiz bir ependorf tüpe transfer edildi. Üzerine ise DNA'da oluşabilecek kırıkları önlemek için hassas bir şekilde pipetle aşağı yukarı karıştırarak fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek bir çeşit sıvı sıvı ekstraksiyon kolonu kuruldu. Fenol suda doğal olarak çözünür ve kloroform ile birlikte belirgin bir faz oluşumuna sebep olur. İzoamil alkol de köpüklenmeyi önler. Bu karışımın ilave edildiği bitki ekstraktları 5 dakika 14000 rpm hızında santrifüj edilerek tüpte belirgin faz ayrımları oluşturuldu. Tüpün altına çökelen organik faz ile DNA'nın bulunduğu üstteki sıvı faz arasında ince bir protein tabaka oluştu. Üstteki sıvı fazdan bu protein tabakasını hareket ettirmeden 1.5 ml alınarak temiz bir ependorf tüpe alındı. Yine pipet ile hassas bir şekilde iyice aşağı yukarı karıştırarak ekstraktın üzerine 300 µl izopropanol eklendi. Numune 10 dakika boyunca 14000 rpm hızında santrifüj edilerek DNA'nın tüpün dibinde şeffaf bir pellet oluşturacak şekilde çöktürülmesi sağlandı. Pellet 500 ila 1000 µl %75'lik etanol ile

yıkandı ve 50 µl distile su ile yaklaşık 1 saate 37°C'de inkübe edilerek tekrar çözüldü. Ardından ekstrakte edilen DNA 4 °C'de muhafaza edildi. DNA'da kırıklar oluşmasına sebep olacağından DNA örnekleri sık sık dondurup çözülmemelidir. Restriksiyon endonükleazlarla kesim ve ligasyon ile birleştirme işlemleri yapmadan önce DNA numuneleri 2 dakika 14000 rpm hızında santrifüj edildi.

2.3.3.2. PCR Şartları ve Primerlerin Tasarımı

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) işlemi Taq DNA Polimeraz kiti kullanarak yapıldı (Invitrogen). Taq DNA Polimeraz enzimi bir *Thermus aquaticus* DNA polimeraz geninin klonlandığı *E. coli*'den sentezletilip saflaştırılmıştır. Bu enzim 5'→3' DNA Polimeraz ve 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir fakat 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi yapamaz. Bu enzim sığağa dayanıklıdır ve primer varlığında tek zincirli DNA'ya komplementer DNA sentezi yapar.

Kit içerisinde ayrıca 50 mM magnezyum klorid ve 200mM Tris-HCL (pH8.4), 500 mM potasyum klorid bileşenlerinden oluşan 10x PCR buffer-Mg bulunur.

Bir amplifikasyon reaksiyonu için 5µl 10x PCR buffer-Mg, 1 µl 10 mM dNTPs, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 1.5 µl ileri primer (10 µM), 1.5 µl geri primer (10 µM), 3 µl genomik DNA, 0.5 µl Taq polimeraz ve toplam hacmi 50 µl'ye tamamlayana kadar su ilave edildi. Her bir reaksiyon tüpüne bu reaksiyon karışımı ilave edildikten sonra tüpler PCR cihazına yerleştirildi. Numuneler ilk olarak 94°C'de 3 dakika inkübe edilerek DNA'nın iki iplikçığının tamamen birbirinden ayrılması sağlandı. Ardından 94°C'de 30 saniye DNA'nın denatürasyonu, 52°C'de 30 saniye primerlerin tutunması ve 72°C'de 3 dakika yeni ipliğin sentezi işlemlerinden oluşan 35 döngü boyunca DNA çoğaltıldı. Son olarak reaksiyonlar 4°C'de saklandı. PCR işlemi sonrasında hedef sıranın çoğaltılıp çoğaltılmadığını kontrol etmek için PCR ürününden 20 µl alıp % 0,8'lik agoroz jelde yürüterek 180 bç'lik bantların varlığı gözlemlendi. DNA ekstrakte edildikten sonra uygun restriksiyon endonükleazlar kullanarak kesim işlemi yapıldı.

Primerler dCAPS Finder program kullanılarak tasarlandı (URL-2). Bu program ile yaban tip mısırlara ait DNA'ları çoğaltmak için tasarlanan primerlerde uyumsuz (mismatch) bazlar kullanarak hedef dizide restriksiyon endonükleazların tanıma bölgesi meydana getirildi. Bu primerler ile yaban tipte restriksiyon tanıma bölgesi oluşturulurken nokta mutasyonu meydana gelmiş TILLING mutantlarda bu bölge mutasyon sebebiyle

oluşmayacaktır. Tablo 2.3’de TILLING mutant hatları için kullanılan dCAPS primerleri gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Mutant TILLING hatlarını belirlemek için kullanılan dCAPS primerlerin listesi

Hat	Primer sekansı (5'→3') İleri /Geri	Ürün uzunluğu (bç)	Tm (°C)	Enzim
DMT106	GAGAAAAGAAGTGTCGTGGATC /CCTCTTGACTCTCTAACCATGC	179	52.1	BamHI (YT' keser)
DMT107	CCTACACAAGCTAATTGGAGCAT /CGACCTTCTCTCAAGTGGTAG	186	52.2	SfaNI (YT' keser)

2.3.3.3. DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi

DNA'lar dCAPS primerlerin meydana getirdiği restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerinden kesildi.

TILLING mutant mısır hattı DMT106 için PCR ürününden 17.3 µl alınarak üzerine 0.5 µl BamHI enzimi ile 2 µl 10X buffer E, 0.2 µl BSA karışımından oluşan tampon eklenerek 37 °C’de 1 gece boyunca kesim işlemi yapıldı.

TILLING mutant mısır hattı DMT107 için PCR ürününden 8.5 µl alınarak üzerine 0.5 µl SfaNI enzimi ile 2 µl 10X NEB3 tamponu eklenerek 37 °C’de 1 gece boyunca kesim işlemi yapıldı.

Bu çalışmada yaban tiplerde restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi yapıldığı için DNA'sı enzimle kesiliyorsa yaban tip, kesilmiyorsa mutant olduğunu gösterir.

2.3.3.4. Kesilen DNA'ların Jel Elektrofrezisi ile Yürütülmesi

Yaklaşık 200 bç olan PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek elde edilen yaklaşık 180 ve 20 bç’lik fragmentlerin varlığı jel elektrofrezisi ile belirlendi. Oluşan bu 20 bç’lik küçük fragmentin jelden akıp gitmesini önlemek için yoğun bir jel kullanıldı. Bunun için %1’lik agoroz ve %3’lük Nussive agoroz trisasetikasit-EDTA (TAE) çözeltisi içerisinde çözüldü. Karışımın erimesi güç olduğundan çözünmeyi hızlandırmak için karışım 60-65°C’de 15 dakika inkübe edildi. Fırından alınan karışımın soğutulduktan sonra içerisine her 100 ml için 10 µl güvenli SYBR eklendi. Güvenli SYBR

bir çeşit jel boyasıdır ve etidyum bromid'in kansorejen etkisini azaltmak için geliştirilmiştir. DNA'ya bağlanarak 280-502 dalga boyundaki UV ışığı soğurur. Jelin ilk kuyucuğuna küçük fragmentli markır, geri kalanlara ise 20 µl örnek yüklendi. Jel 15 dakika yürütüldü.

2.3.4. Gen Dizi Analizi

TILLING mutantları dizi analizi ile belirlemek için nokta mutasyonu olduğu tahmin edilen gen uygun primerler kullanarak PCR işlemi ile çoğaltıldı. Bu işlem için kullanılan primerler Tablo 2.4'de sunulmuştur. PCR karışımı yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlandı. PCR işlemi, DNA denatürasyonu için 94°C'de 10 dakika İnkübasyonun ardından 30 döngü boyunca 30 saniye 94°C, 30 saniye 55°C'de ve 72°C'de 1,5 dakika boyunca gerçekleştirildi. Son olarak 3 dakika 72°C'de PCR ürünlerinin tamamının sentez olması beklenerek 4°C'de işlem sonlandırıldı. PCR ürününden 20 µl alınarak DMT106 için ± 1030 bç ve DMT107 için 1497 bç uzunluğundaki bantların varlığı % 0,8'lik agaroz jel ile kontrol edildi. PCR işlemi gerçekleştiğinde ürün dizi analizine gönderildi.

Tablo 2.4. Gen dizi analizi için kullanılan primerlerin listesi

Hat	Primer sekansı (5'→3') İleri /Geri	Ürün uzunluğu (bç)
DMT106	AGGGGCCTCCAGTAGTCACCTTGG/ GTTCGAATCCATGCCATTGTCGT	1030
DMT107	CCCCTGTTCACTGATCATGCACCTT/ C ACCAGTCGACCTTCAAATCATTCA	1497

2.4. Yaprak Uzama Oranının Belirlenmesi

Yaprak uzama oranının belirlenmesi için mısır fidelerinin dördüncü yaprakları yaprak kınından çıkmaya başladığı andan tamamen büyüdüğü ana kadar toprak seviyesinden yaprak ucuna kadar bir metre ile ölçüldü (Şekil 2.5).

RNAi ve TILLING mutant mısır hatlarının gözlemlendiği zaman, fidelerin dördüncü yaprakları günde bir kez ölçüldü. Kuraklık stresi deneyinde yine aynı şekilde yapraklar günde bir kez ölçüldü. Soğuk stresi deneyinde ise yapraklar ışık periyodunun başlangıcında

ve sonunda olmak üzere günde iki kez ölçüldü. Yaprak uzama oranı 1. Eşitlikte verilen formül ile hesaplandı. Burada x_1 ilk gün ölçülen uzunluğu, x_2 ise ikinci gün ölçülen uzunluğu göstermektedir. t ise iki ölçüm arasında geçen zamanı göstermektedir. Yaprak uzama oranı iki ölçüm arasındaki uzunluk farkının zamana bölünmesiyle hesaplandı. Böylece yaprağın birim zamanda ne kadar uzadığı belirlendi.

$$y = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1} \quad (2.1)$$



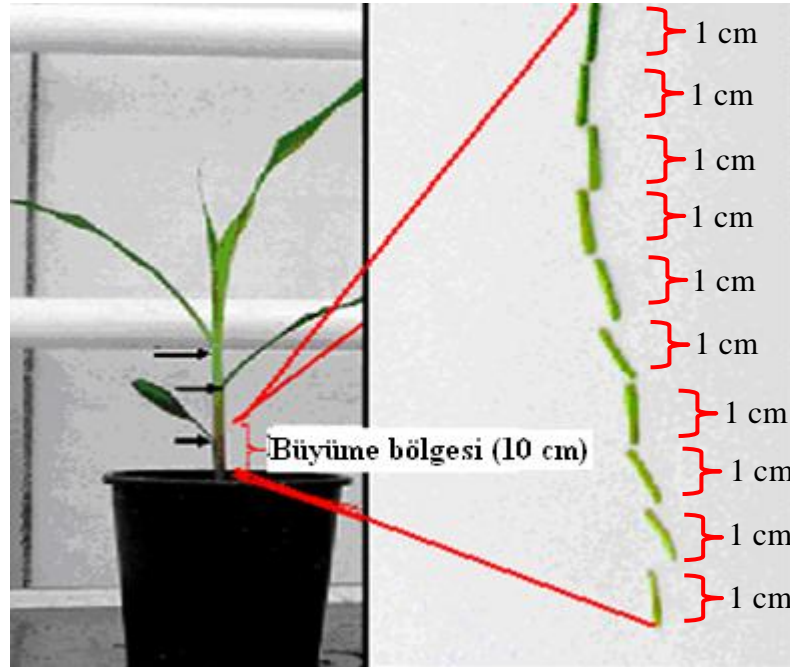
Şekil 2.5. Yaprak ölçümü

2.5. Büyüme Bölgesinin Hücre Uzunluğu Profilinin Belirlenmesi

Büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profilini belirlemek için mısır fidelerinin dördüncü yaprakları, ortaya çıktıktan 72 saat sonra hasat edildi. Dördüncü yaprak, dıştan kendisini çevreleyen yapraklardan ayrıldıktan sonra 1 cm'lik segmentler halinde parçalara ayrıldı (Şekil 2.6). Kesim işleminden sonra bu parçalar klorofilin uzaklaştırılması ve fiksasyon için iki gün boyunca periyodik olarak değiştirilen etanol içerisinde bekletildi. Daha sonra bitki materyalleri, temizlenmesi, saklanması ve mikroskop preparatlarının hazırlanması için %90'lık laktik asit bulunan cam şişelere transfer edildi.

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

kontrast) mikroskobu kullanılarak ölçüldü. Düzenek bir ışık mikroskobuna (Axioscoop, 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, USA) kullanılarak bir hücrenin çeperinden diğer hücrenin duvarına kadar ard arda dizili hücreler buldukları sıra boyunca ilerlenerek teker teker ölçüldü. Verilerin değerlendirilmesi için aynı grupta bulunan farklı bireylere ait ölçümlerin ortalamaları karşı grup ile karşılaştırıldı.



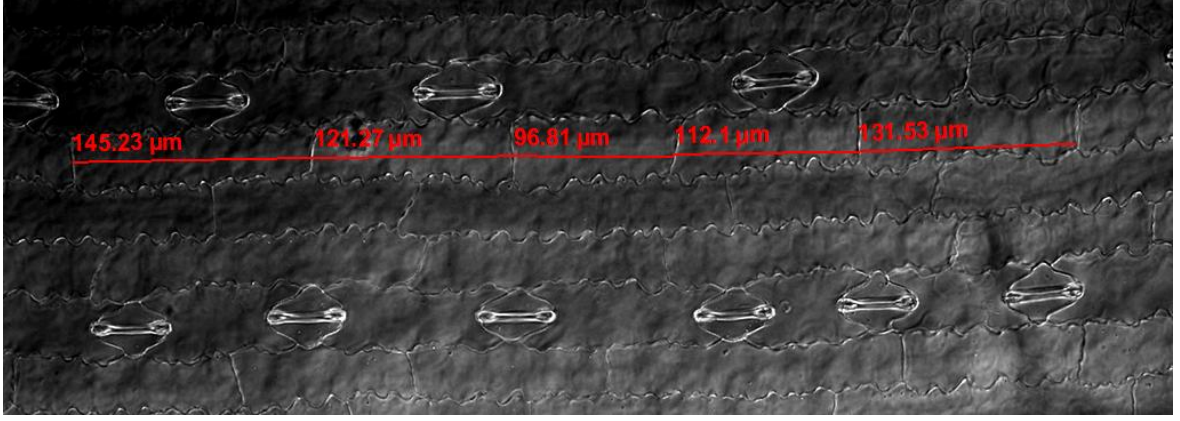
Şekil 2.6. Mısır fidesi yaprağının büyüme bölgesinin 1 cm'lik 10 parçaya ayrılması

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 dağılımını bir 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 2.8’de sunulmuştur.

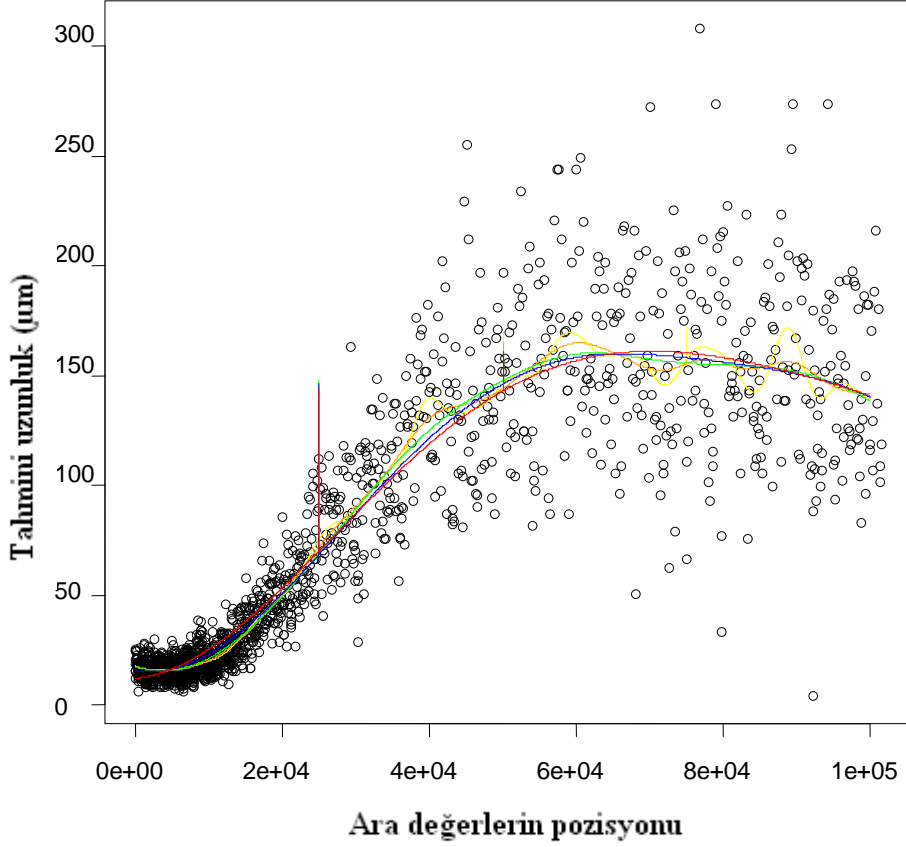
Büyüme bölgesinin uzunluğu, yaprak tabanından itibaren, olgun hücrelerin uzunluğunun % 95’e ulaştığı noktaya kadar olan uzaklık olarak hesaplandı. Daha sonra farklı bireylerin yapraklarına ait bu değerlerin ortalaması alınarak takip eden hesaplamalarda kullanıldı.



Şekil 2.7. Yaprak tabanından itibaren onuncu santimetrenin 20X’lik objektif büyütmede görünüşü. İki epidermal hücre dosyası arasında gramine tipi stomalar yer alır.

2.6. Meristem Uzunluğunun Hesaplanması

Meristem uzunluğunu hesaplamak için mısır fidelerinin dördüncü yapraklarının tabandan itibaren 4 cm’lik kısmı 1 cm’lik parçalara ayrıldı. Her bir parça konumuna göre adlandırılarak fiksasyon ve klorofil uzaklaştırılması için 3:1 (v:v) etanol: asetik asit çözeltisi içerisine alındı. Numuneler +4°C’de saklandı. Yaprak materyalleri floresans mikroskobu altında gözlenmeye başlamadan önce 3 kez 4’-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) tamponuyla (50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCL (pH 7) yıkandı. Ardından bitki materyali mikroskop lamı üzerine yerleştirilerek 1 damla DAPI tamponu ve 1 μl nükleusları görebilmek için bir çeşit floresans işaretçisi olarak DNA’ya bağlanan ve 460–350 nm dalga boyundaki ışıkları emebilen bir tür boya olan DAPI damlatılarak numune lamel ile kapatıldı. Örnekler 20 dakika DAPI-tamponuyla 4°C’de karanlıkta inkübe edildi.



Şekil 2.8. Mısır fidelerinin yaprak ayası boyunca yer alan hücelere ait uzunluk dağılımı (adaksial epidermis; 4. yaprak). Renkli çizgiler 50 μm aralıklar kullanarak Kernel Smoothing algoritmasıyla hesaplanmıştır (Beemster ve Baskin, 1998).

Fiksasyon işleminin ardından örnekler mikroskop lamı üzerine konularak floresans mikroskobu altında incelendi. Hücre uzunluğunun ölçülmesinde kullanılan görüntüleme sistemi yine aynı şekilde burada da kullanıldı. Stoma hücrelerine bitişik hücre sıraları yaprağın tabanından ucuna kadar takip edilerek mitotik şekiller gözlemlendi. Meristem sınırı en uzakta bulunan mitotik şeklin görüldüğü yere kadar olan kısım ölçülerek hesaplandı.

2.7. Hücre Büyümesinin Sayısal Analizleri

Yaprak uzama oranı hesaplarına ve mikroskobik 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 hesaplandı (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 bulundu.

$$N_{gz,div} = \Delta x \sum_n \frac{\rho(n\Delta x) + \rho[(n-1)\Delta x]}{2} \quad (2.2)$$

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 belirlendi;

$$P = \frac{YUO}{l_m} \quad (2.3)$$

Burada l_m olgun hücrelerin uzunluğunu (yaprağın olgun kısmındaki hücrelerin uzunluğunun ortalaması alınarak hesaplandı) 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 sayısını bulduktan sonra meristemdeki hücre bölünmesinin ortalama oranını (\bar{D} ; birim zamanda her hücre başına düşen hücre oranı) aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (Beemster ve Baskin, 1998).

$$\bar{D} = \frac{P}{N_{div}} \quad (2.4)$$

Aynı anda bölünen hücrelerden oluşan bir popülasyonda, hücre döngüsünün süresi, ortalama bir hücrenin döngüyü tamamlayabilmesi için geçen zaman, diğer bir ifadeyle popülasyonun 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 hesaplandı (Fiorani, 2001).

$$\bar{T}_c = \ln(2) \frac{N_{div}}{P} \approx 0.69 \frac{1}{D} \quad (2.5)$$

Büyüme bölgesinin uzunluğu yaprak tabanından itibaren hücre uzunluğu profili grafiğinde ilk olgun hücreye rastlanan uzunluğun hesaplanmasıyla bulundu. Uzama bölgesinin uzunluğu ise büyüme bölgesi uzunluğunun meristem uzunluğundan çıkartılmasıyla bulundu. Uzama bölgesine giren hücrelerin uzunluğu (l_e) yine hücre uzunluğu profili grafiğinde uzama bölgesine giren ilk hücrenin uzunluğu bulunarak belirlendi. Uzama bölgesinde yer alan hücre sayısı (N_{el}) ise büyüme bölgesinde bulunan hücre sayısından meristemde bulunan hücre sayısı çıkarılarak hesaplandı (Eşitlik 2.6).

$$N_{el} = N_{gz} - N_{div} \quad (2.6)$$

Hücre uzama süresi (\bar{D}_e) bir hücrenin uzama bölgesine ilk girişinden olgun uzunluğuna erişinceye kadar geçen süredir ve uzama bölgesinde bulunan hücre sayısının hücre üretim oranına bölünmesi ile hesaplandı (Eşitlik 2.7).

$$\bar{D}_e = \frac{N_{el}}{P} \quad (2.7)$$

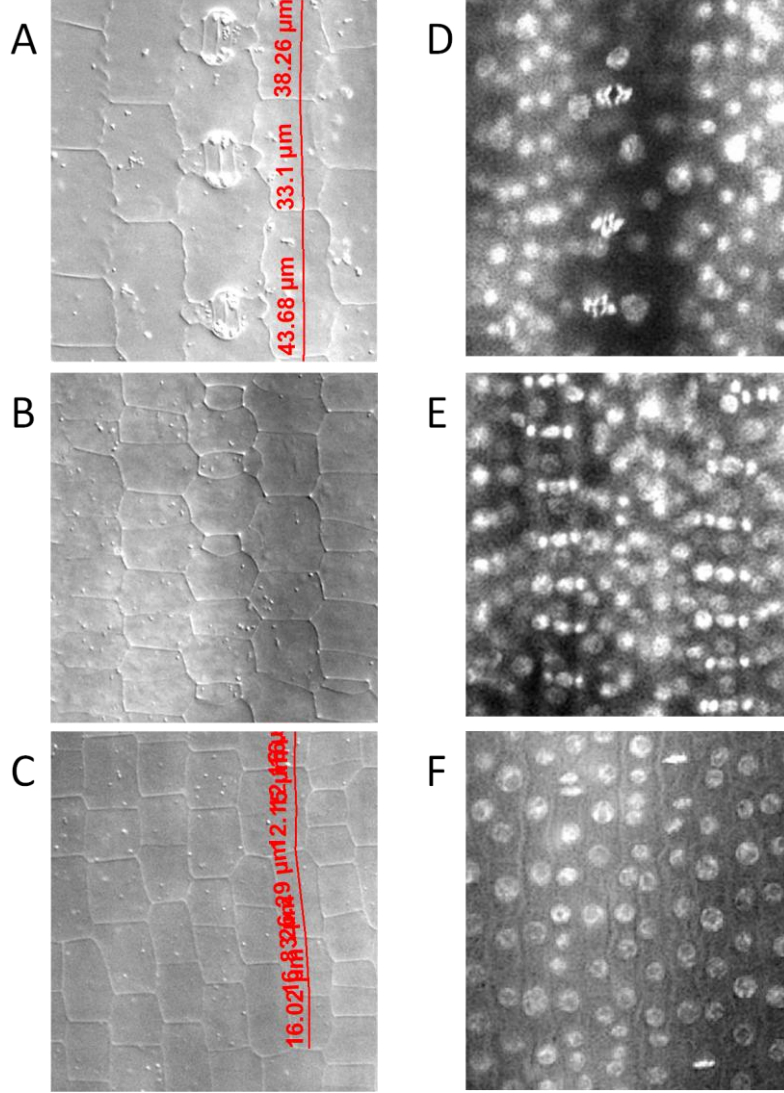
Ortalama hücre uzama oranı (\bar{T}_e ; s) ise olgun ve uzama bölgesinin hücre uzunluklarının ln'leri arasındaki farkın hücre döngüsü süresine bölünmesiyle hesaplandı (Eşitlik 2.8):

$$\bar{T}_e = \ln(l_m) - \ln(l_s) / \bar{D}_e \quad (2.8)$$

2.8. Hücre Döngüsü İlerleyişini Flow Sitometri Tekniği ile Belirlenmesi

Hücre döngüsü ilerleyişini belirlemek için yaprağın büyüme bölgesi boyunca yer alan hücrelerin DNA miktarları flow sitometri tekniği ile ölçüldü. Bu bağlamda hücrelerin yaprak aksisi üzerinde buldukları konuma karşı düşen DNA miktarları belirlenerek hücre döngüsü safhalarına düşen oranları yüzde olarak hesaplandı. Bu deneyde, FloMax

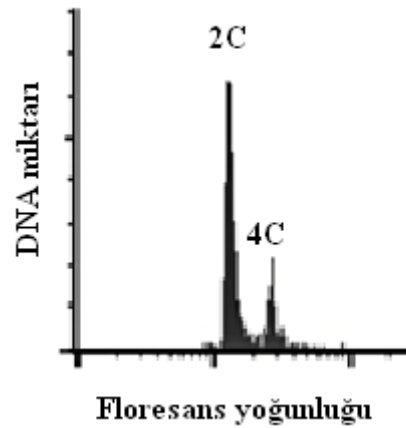
yazılımıyla birlikte CyFlow analizöre sahip, uyarıcı kaynak olarak belirli dalga boyunda ışık veren bir lazere, ışık emebilen bir filtreye ve bir detektöre sahip flow sitometre (Partec, Germany) kullanıldı.



Şekil 2.9. A, B ve C sırasıyla 3, 2. ve 1. cm'lerdeki epidermal hücrelerin 40X DIC mikroskobu büyütmesi altında görünümü. Stomaların iki epidermal hücre arasında parantez şeklinde ve 2.cm (B)'den itibaren oluşmaya başladığı ve 3.cm'(A) de daha büyük olduğu görülmektedir. D, E ve F 20X floresans mikroskobu altında epidermal hücrelerin nükleuslarını göstermektedir. DNA'ları DAPI ile boyanan normal hücrelerin nükleuslarının yuvarlak, mitoz bölünme geçiren hücrelerin nükleuslarının ise bulunduğu mitoz evresine göre şekil aldığı görünüyor.

Bitki materyalleri flow sitometre cihazına yüklenmeden önce bir petri kabına alınarak 1 ml Partec Tampon'u (% 0,1 Triton X-100, 4 mM MgCl₂, ve 200 mM Tris-HCl, pH:7,5) içerisinde jilette doğrandı (Dilkes vd., 2001). Böylece hücrelerin nükleusları serbest hale getirilerek aynı zamanda tamponun sağladığı izotonik ortam sayesinde nükleusun dağılması önlenmiştir. Elde edilen bu süspansiyon 30 µm'lik bir naylon filtreden geçirilerek süzüldü. Bu sayede parçalar filtrede tutulurken içerisinde serbest nükleusların bulunduğu 3 ml kadar süzüntü örnek tüpünde biriktirildi. Bu süzüntüye 1 µl DAPI (1mg/ml) ilave edildikten sonra numune flow sitometre cihazına yüklendi.

Flow Sitometre, uyarıcı kaynağı sayesinde DAPI'nın ışık emmesine oransal olarak verdiği floresansa bağlı olarak belirli bir hücrede bulunan nükleus miktarını tespit edebilir. Sıvı akışkan, lazere geçer. DAPI ile işaretli nükleus lazere geçtiği zaman, florokom çıkarılır ve uyarıcı ışıktan daha uzun dalga boyundaki ışık filtreler tarafından emilir. Filtrelerin emdiği ışığın dalga boyu detektör ile ölçülür. Flow Sitometre cihazı ile tespit edilen floresans miktarı hücrelerin DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Bilgisayarla sayılan her hücre başına düşen floresans miktarının yoğunluğunu grafik halinde gösterir (Şekil 2.10). FloMax yazılımı otomatik olarak bu floresansı fark eder ve grafikte gözle kolayca fark edilebilen pikler oluşturur. Bu yolla 2n ve katları kadar DNA'ya sahip hücre sayısı belirlenerek belirli bir konumda bulunan hücrelerin hücreleri döngünün hangi evresinde oldukları sahip oldukları DNA'nın kopya sayısının oransal olarak belirlenmesiyle bulundu.



Şekil 2.10. Floresans yoğunluğuna oransal olarak hücrenin sahip olduğu DNA'yı gösteren FloMax yazılımıyla elde edilen histogram. 2C 2n, 4C 4n sayıda DNA miktarına sahip hücreleri göstermektedir.

2.9. Q_RT-PCR ile Kromatin Genlerinin Suskunluk Derecesinin ve Hücre Döngüsü Genlerinin Ekspresyonunun Belirlenmesi

Kromatin genlerin suskunluk derecesini belirlemek için mısır fidelerinin kök uçlarından meristem kısmını içerecek şekilde 1 cm numune alınarak önceden içerisine 3 adet 4 mm çaplı metal top konulan ve kapağına bir iğne ile delik açılan 2 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Hücre döngüsü genlerinin suskunluk derecesini belirlemek için ise dördüncü yaprağın ortaya çıkışından yetmiş iki saat sonra yaprağın meristem kısmını içeren birinci cm, uzama bölgesini içeren dördüncü cm ve olgunluk kısmını içeren onuncu cm kesip alınarak aynı şekilde ependorf tüplere yerleştirildi. Toplanan bitki materyalleri fiksasyon işlemi için sıvı azot içerisine konuldu. Daha sonraki işlemlere kadar numuneler -80°C'de saklandı. RNA ekstraksiyon işlemi aşağıda anlatıldığı gibi TRIzol metoduna göre yapıldı. Ekstrakte edilen toplam RNA temizleme prosedürüne tabi tutuldu. Ardından cDNA sentezletilerek q_RT-PCR ile genlerin ekspresyonları belirlendi. Veriler kontrol genlerine göre normalize edildi.

2.9.1. TRIzol ile RNA Ekstraksiyonu

Toplam RNA izolasyonu TRIzol (Invitrogen, USA) 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 ayracıyla (her 50–100 mg doku için) homojenize edildi. Trizol fenol ve guanidin izotiosinat'ın tek fazlı çözücüsüdür. Bu ayıraç hücreyi parçalayıp hücre bileşenlerini serbest hale geçirirken RNA'nın kararlılığının korunmasını sağlar. Ayrıca, TRIzol ayracı kansorejen bir madde olduğundan, çalışırken vücudun herhangi bir yerine temas etmesinden özenle kaçınılmıştır. TRIzol ayracı içerisinde bulunan donmuş bitki materyalleri iyice homojenize olmaları için çözünene kadar iyice vortekle karıştırıldı. Homojenize edilen doku örnekleri 5 dakika için oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bundan sonraki işlemlerde oda sıcaklığında yürütüldü.

İnkübasyonun ardından doku örnekleri her 1 ml TRIzol ayracı için 200 µl kloroform kullanılarak saflaştırıldı. Proteinler ve organik fazda bulunan diğer kirliliğe sebep olan maddeleri kloroform ile çözünürken RNA 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.

RNA’nın çöktürülmesi için her bir ml TRIzol ayırıcı için 500 µl isopropanol ayırıcı kullanıldı. 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.

RNA’nın temizlenmesi için, pellet, 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 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 (dietilprokarbonat) 100 ml saf su içinde çözüldü ve bir gece bekletildikten sonra otoklav edildi) ilave edildi. Örnekler 65°C’de ki termoblok içerisinde 10 dakika inkübe edildikten sonra bir gece 4°C’de bırakılarak RNA’nın çözünmesi sağlandı. Ertesi sabah numuneler 10 dakika 11 000 rpm’de santrifüj edilerek atık maddeler dibe çöktürüldü ve supernatant dikkatlice yeni temiz bir RNase’sız tüpe aktarıldı.

2.9.2. RNA’nın Temizlenmesi

İzole edilen RNA’nın kalitesini artırmak ve örnekleri daha saf hale getirilmek için RNA, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) markalı kit kullanılarak yapıldı. Bu kitin içerisinde çöktürme prosedürleri esnasında seçici bağlayan özellikte bir silika jel membran bulunur. Örnekler, RNA’nın bütün şekilde ekstraksiyonunu sağlamak için RNase’ları hemen inaktif edebilen guanidin-izotiyosinat (GITC) içeren lizis tamponla denatüre edildi. Lizis işleminden sonra, örnekler kalıntıların uzaklaştırılması için içerisinde silika jel membran bulunan QIAshredder spin kolonlar kullanılarak santrifüjle süzdürüldü. Örnekler, RNA’nın silika membrana (spin kolon) seçici bağlanmasını sağlamak için etanol ilave edildi. Daha sonra örnekler, spin kolondan süzdürüldü. Bu sayede, RNA silika jel membrana bağlandı ve kontamine olmuş maddeler ise yıkanarak uzaklaştırıldı. RNA’nın membrandan tekrar tüpün içerisine birikmesi için membran 30–40 µl RNase içermeyen su ile yıkandı.

2.9.3. RNA Miktarının Belirlenmesi

Ekstrakte edilen RNA miktarını belirlemek için nanodrop spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. Her bir RNA örneğinden 1–2 µl numune 260/280 nm dalga boyunda nanodrop ile kontrol edildi. Elde edilen RNA ürününden 2 µl alınarak RNA'nın varlığı agaroz jel ile de kontrol edildi (% 1,2 agaroz / 0,5 x TB).

2.9.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen, USA) markalı kit kullanılarak yapıldı. mRNA'in 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 (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. cDNA sentezi için kullanılan karışımlar ve miktarları

Ürün	Miktar
Karışım 1	
50 µM oligo(dT) ₂₀	1 µl
10 mM dNTP karışımı	1 µl
RNA	3,5 µg
DEPC ile muamele edilmiş su	10 µl'ye tamamla
Karışım 2	
10X RT tamponu	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
1 M DTT	0,2 µl
1 RNaseOUT (40 U/ µl)	1 µ
SuperScript III RT (200 U/ µl)	1 µl
DEPC ile muamele edilmiş su	10 µl'ye tamamla

2.9.5. Primerler

RNAi kromatin mutantları için kullanılan primerler, Kromatin Veri bankasından elde edilen EST'lere göre Beacon Designer 4,0 (PREMIER Biosoft international, USA) program kullanılarak yapılmıştır (Tablo 2.6). Yine, referans genlerine uygun primerler mısır genetik ve genomik veribankasından elde edilen sekansa göre (MaizeGDB) Beacon Designer 4,0 program kullanılarak yapılmıştır (Tablo 2.6).

Hücre döngüsü genleri, Vandepoele vd. (2002) tarafından yayınlanan *Arabidopsis* hücre döngüsü genlerinin pirinç bitkisinin genomik dizeleri arasında homologlarının aranmasıyla belirlendi (Rymen vd., 2007). Mısır ve pirinç aynı familyadan iki bitki olduğu için ve protein sekansları arasında daha fazla korunmuş bölge olabileceği esasına dayanarak *Arabidopsis* ve pirinç arasında protein uyumuna bakıldı. Bu genlere ait dizeler belirlendikten sonra mısırın genomik dizesi, EST ve cDNA kütüphaneleri arasında Blast araştırmaları yapıldı. Beacon Designer programı kullanılarak 42 hücre döngüsü geni için primer tasarlandı (Tablo 2.7).

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 sakınıldı.

Kantitatif PCR daha verimli olabilmesi için ampikon uzunluğu yaklaşık olarak 80–250 bp olmasına dikkat edildi. Primer konsantrasyonu ise 100 ve 500 nM arasında kullanıldı.

Tablo 2.6. RNAi kromatin mutantları ve referans genleri için kullanılan primerlerin listesi

Gen ismi	Primer dizesi (5'→3') İleri / Geri
SDG118_q12	AATGTTGAGGCGGGTGAGAG/GCCCTCAGTGTCTCCTTCAC
SDG122_qab	TTCCTGCCACCCTAATGCTC/CGGCTTTGATGTCCCTGGAC
SDG122_q34	AATGGACAGGATCTTGAAGG/TTAGGGTGGCAGGAATGG
DMT101_qab	GAGTTTGGTGGCTCAATGATTTG/TGTAAGTAAAGAAAGTAGCTGAGG
DMT101_q34	TCGGTCACAGGGCTTCC/CGCTTGTCAACGGCTTCC
DMT102_q12	GCTGCCTTGTGCTATGAAGTAC/CATCCTGAACTGTGGCAGACC
DMT103_qab	AGGTGTCTGGACTACCATATCAAG/CTCAAGTGGCAGGTTGTGTATG
DMT103_q34	GAGTTCAGAAGTATGTGTTGG/TCTCTGTCCTGCTGATACC
DMT103_q56	TGACGAGGATTTCTTACATGAGATG/CATAGTCAGACAGATTGCCACAG
DMT104_q12	GCCTGAGCCTGACTGAG/TGGGACCATATAATCCTGCAAAC
DMT105_q12	CTCATCAGAAAATGGGCAGTCAG/CAACAGCCCATCGAGTTTCAAG
DMT106_q12	ATTCTTATATAATGTGGAGCCTGAG/GAATGGAAGTGCTTCTTCAATAGTC
DMT107_q12	GCAGTGACAACTTTGAATGGGATAG/TCAGTGTTGTTGATCTCAGAGC
NFE102_q34	AGTCAGGAGAATCAGACAGATG/TGTACCAAGTGTCTGTTTCC
actin_q12	CATTCCTGCTCTCTTGCTCTCC/CCATCAGCCATTTCTACAGAACTG
GADPH_q12	GGGCCTCCTATGAGGATATCAAG/TCTTCCACATAACCCATGATACCC
EF1A_q12	AGTCCGTTGAGATGCACCATG/CACATAACCCACGCTTCAGATCC
18SrRNA_q12	ACCTTACCAGCCCTTGACATATG/GACTTGACCAAACATCTCACGAC
cyclophylin_q12	GAAGCCGCTCCACTACAAGG/CGAACTTCTCGTCGGGGAAC

Tablo 2.7. Hücre döngüsü genleri için kullanılan primer listesi

Gen ismi	Primer dizisi (5' → 3') İleri / Geri
<i>Cdc25</i>	GTCCGGTGCAAGGTGAAGC/TTGGACGAGATGAATGGTGGTG
<i>Cdka;1;1</i>	AGTACCTGGATCTGGACCTCAAG/GCAACACCGTGGAGTATCTGG
<i>Cdka;2;1</i>	GTTGATGTGTGGTCAGTTGGTTG/GCCATGTTTCTTTAGTTGGAGTGC
<i>Cdkb;1;1</i>	CCACAACACAACACTCCACTCC/ACCGTCGATGGGCAAGGG
<i>Cdkb;2;1</i>	CAAGCAGGGCGTCAACAAGG/GAACTTCTTCAGGTCCGGTGTCC
<i>Cdkc;2</i>	AGCAACAGAGGCAGGCAGAG/GCAAGCGAGAATGTGGTGGAG
<i>Cckd;1</i>	GTTGCTGCACCTCCACTACG/GCCTTGGAAAGCTGCGATGG
<i>Cdke;1</i>	GCCTTCAACGCTGCCTCAC/TCCGCCTTCCTTCTCAACTGG
<i>Cks1</i>	GGTGTGATCTGGTTAGTAGCACTG/AATCACCATGACCATACTGACCATC
<i>Cks2</i>	AAATGTTCCCTCTGTCTGTCTGTGTC/GTGAAATCCCAAGCCAACCTACC
<i>Cycl1;1</i>	GGCTCGTGGAAGTTGCTGAAG/CCGTTTGCGTCTGATTTTCGTTG
<i>Cycl1;2</i>	CCAGTATCACGCCATGACAGC/AGGCAGGAGCACGACTTGG
<i>Cycl3;1</i>	GCCTCCGACATCTACACCTACC/CACCCGCCGCACCAAATC
<i>Cycl3;2</i>	CGCTTCCTCTCCGTCAATGC/TTGGTGTAGGTGTTGTCTGTGATG
<i>Cycl3;3</i>	CCGATAACACCTACACCAAGCAAG/GTGACGGCAAGAAGCGAAGC
<i>Cycl3;4</i>	TCCTACCGCCAAGACGTTCC/GAATCAAGCCATAATCCAGCAAGC
<i>Cyclb1;1</i>	AGCAGGACGCAGTTGGAGAG/GAGCCGAGAGCACAGAAGAAAG
<i>Cyclb1;2</i>	GATGGACTACGGTATGGTGTGAC/CAGTGTGGTGTCTCAAGGTCTC
<i>Cyclb1;3</i>	CGGGTTCGCTCCACGTTTAC/CGCCGCCGTTTCATCTGTTC
<i>Cyclb2;1</i>	TGAGATGGAGAGGAGGATAGTGAAC/CTGATTGTGCTGCCTTTAGAAACC
<i>Cyclb2;2</i>	CAGTAGTCCAGTCCCTCCTCCTTC/ATAATAACAAGCAGCAACGGTAACG
<i>Cycld1;1</i>	ACTCGCACTCGCACTGACC/CAAGTGATGAGGGAGGGTAGAGG
<i>Cycld2;1</i>	CAAGTAGGTGGCGTGGCAAG/CCGAGAATAGCAGCGTTGTCC
<i>Cycld4;1</i>	GGTCTGGTGGAGCGGGAAC/CTGTGGTGCCTGTAAGCCTTC
<i>Cycld4;2</i>	ATCAGAGCCAGACAGCCAATC/AGGGTGGAAAGCCGCCATC
<i>Cycld5;1</i>	CATCGCCGTAGCATCCATCC/CGGTGTCTAGCTGCGGAAATG
<i>Cycld5;2</i>	GTTCTTGGCTTCTTGTCTTGTG/TCTCGTCAGACGTGTCACCAC
<i>Cych</i>	CCCGCCGCCGCTGAATC/GCCGCCACCTCTCCATC
<i>Del1</i>	CCACGAGGAGACCAATATGAGAAC/GCCCTACCCAACCAACGAAAC
<i>Del2</i>	CAGCCGCAAGCAGAAGTCG/TCGTCCAGCCCAATCACCTC
<i>Dpa</i>	GAAGCGTCGGCGGCAATG/GTAGTCCGTCCTTTGGTCTCAAC
<i>Dpb</i>	CGTGAATGTCCTAATGGCTATGG/GCTGCTCATTTGCCGAACC
<i>Dpc</i>	GTTCACTGGCGTTGTCTGTG/GTTACACCCGTCGTTCTACCAATC

Tablo2.7'nin devamı

<i>Dpd</i>	CGCTTGTGTCTCCTTCCCTAG/CGAGGAGAGCGGGAGCTAG
<i>E2f</i>	ACTACCCCTGGACCTGTAAAAGC/ATAGCGGCAGTGGTTTAATGTGG
<i>Krp1</i>	AGCAGCAGACGCAGTGGG/ACGCCTCAGCCTCCTTAGTTG
<i>Krp2</i>	GGCATGGTCTCCGTTTCTCTTG/TCTGACAGTGGTCTGGTGGTAG
<i>Krp3</i>	CACACCCACCTACCTACCTACC/GGTCCCCTCCGTGCTAAGC
<i>Krp4</i>	GTCCCTCAACTCCAATGTAACCC/CATTAATTCGGCAACTGGTAACAGG
<i>Rbr1;1</i>	AGGACAGTTTACTTGGTAGTGGAAAG/CGTGGAGGAGACATTGGATTGG
<i>Rbr2;1</i>	GGCATCTCCCACAAAGACAATAAAG/CACCTCACGAAGCCACTTAGC
<i>Rbr2;2</i>	GGCGAGAAGTCATTGCTGCTAGC/CCCTTCTCCATTTGCTAGGAACAAG
<i>Wee1</i>	TGGTAATGGTCTTTCACGCTATCG/TCTTTCCTGCTTGCCTCCTTTC

2.9.6. Kantitatif Real Time PCR (q_RT-PCR)

RNA ekstraksiyonu, RNA'nın temizlenmesi ve cDNA sentezi işlemlerinin ardından doku örneklerine ait cDNA'nın kantitatif real time PCR (q_RT-PCR) ile çoğaltıldı. Bu çalışmada, floresans uyarısını ve emilim miktarını belirleyen optik kısım, bilgiyi alan ve analiz eden bir yazılım, bilgisayar ve termal cyclers gibi bileşenlerden oluşan bir q_RT-PCR (iCycler Bio-Rad, USA) cihazı kullanılmıştır. Floresans boya olarak ise çift zincirli DNA'ya bağlanan ve ışık emebilen SYBR Green I (Promega, USA) kullanıldı. Kantitatif PCR döngüleri sırasında sentezlenen dsDNA'ya bağlanan bu floresans boya, mevcut DNA miktarına oransal olarak sinyal oluşturdu ve bu sinyaller cihaz tarafından tespit edildi.

Q_RT-PCR işlemi, Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, USA) markalı kit kullanarak yapıldı. Pipetleme hatasını en aza indirmek için ön karışım hazırlandı ve 5 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara bölüştürüldü (Tablo 2.8). 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. Her örnek için 3 teknik ve 3 biyolojik tekrar yapıldı.

Numuneler 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 2.8). Platinum[®] taq DNA polimerazın sentezlenecek yeni ürüne hasar vermesini önlemek

amacıyla PCR döngülerine başlarken sıcak başlangıç seçeneği seçilerek bu enzimin inaktif edilmesi sağlandı. Böylece, amplifikasyon verimi, duyarlılığı ve ürünü artırılmış olur.

Tablo 2.8. Kantitatif PCR reaksiyonları için gerekli karışımın bileşenleri ve miktarları ve PCR'in sıcaklık ve döngü şartları

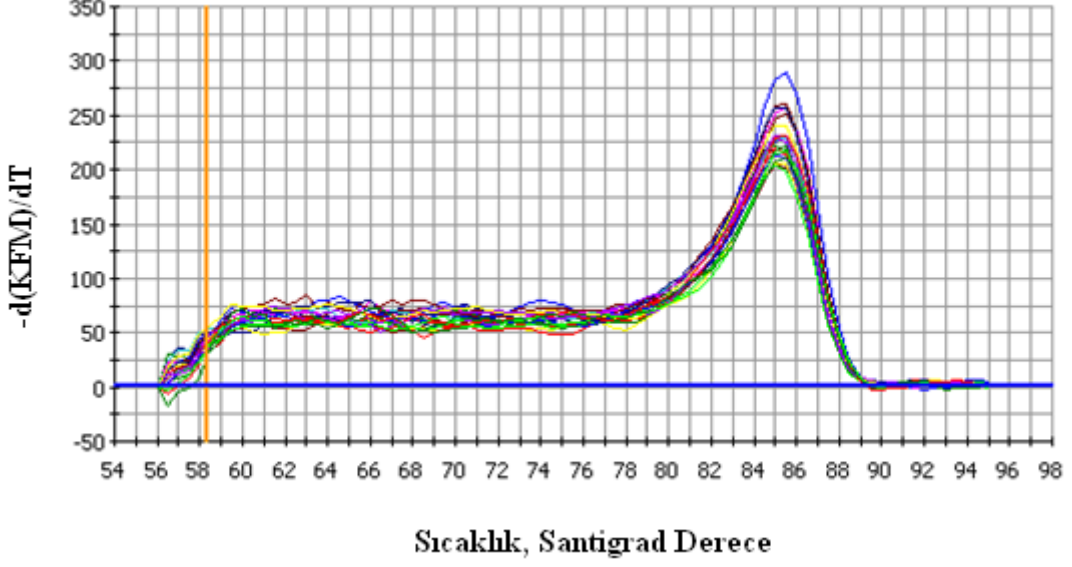
Karışım		
Bileşen	1 rxn için (µl)	25 rxn için
Platinum SYBR supermix	12,5	312,5
1/10.000 floresans	2,5	62,5
cDNA (1-2 ug/ml)	5	125
Primer (1 µM)	5	*
PCR'in sıcaklık ve döngü şartları		
Başlangıç adımı	40 Döngü	Bekleme
2 dakika 50°C	1 dakika 95°C	4°C
4 dakika 95°C	1 dakika 60°C	

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. Her bir kuyucukta yer alan belirli bir genin çoğaltılması sırasında kontamine olup olmadığı her döngü sonrasında oluşan erime eğrilerinin tek bir pik oluşturup oluşturumamasına göre belirlendi (Şekil 2.11).

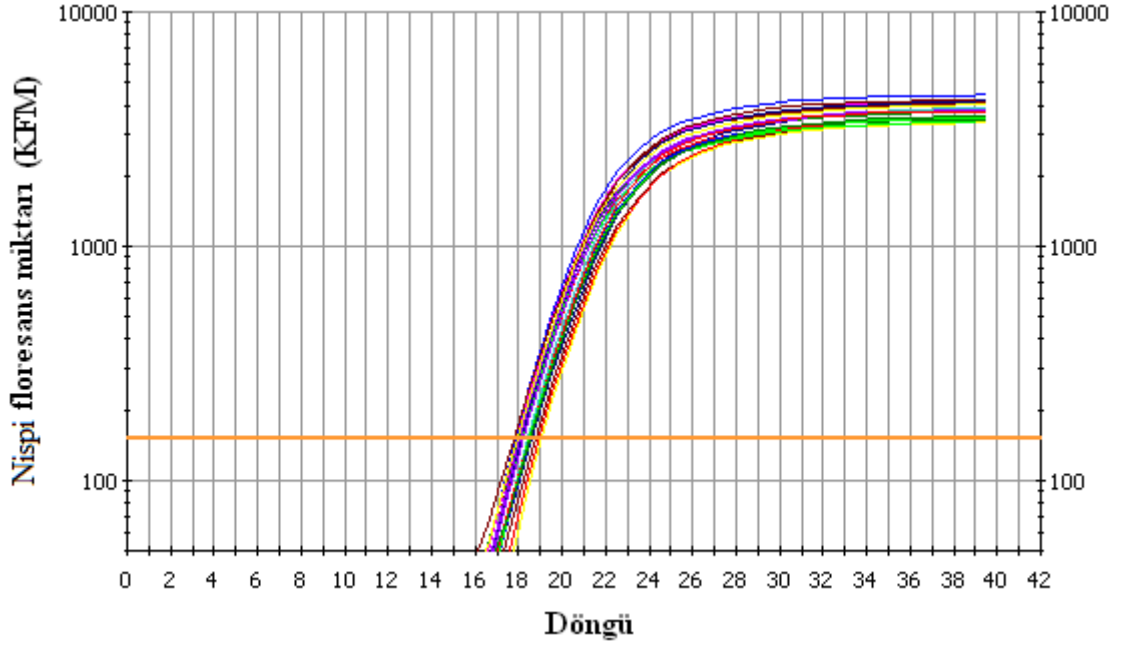
Q-RT-PCR verilerinin analiz edilmesi Livak ve Schmittgen (2001) tarafından tanımlanan formüller göre yapıldı. Buna göre bir q-RT-PCR işlemi sırasında ideal olarak her döngü sonrasında PCR ürünü konsantrasyonu ikiye katlanır (Heide vd., 1996). Bu sebeple ürünün son miktarı $2^{E_{şik\ döngü}}$ (2^{E_d}) eşit olmalıdır. Ancak, PCR'in amplifikasyon verimi her zaman ideal olmadığı için işlemin verimi hesaplandı. Bu sebeple, eşik döngülerin eğimi hesaplandı ve $10^{E_{gim}}$ formülü ile sonuçlar logaritmik değere dönüştürüldü. Logaritmik ölçekli PCR amplikon eğrisine ait bir örnek Şekil 2.12'da sunulmuştur. Bu çalışmada eşik değeri isteğe bağlı olarak 150 kısmi floresans miktarı (KFM) olarak belirlendi. Çünkü bütün örnekler logaritmik ölçekte bu eşik değerinde amplifikasyon eğrilerinin lineer bölgesindedir. Eşik değeri 150 olarak belirlendikten sonra q-RT-PCR ürünün miktarı Eff^{Ct} formülü ile hesaplandı.

Verileri normalize etmek için Hellems vd. (2007) tarafından geliştirilen qBase adı verilen bir program kullanılmıştır. Bu program her analizde kullanılan referans genini baz

olarak eşik döngü değerini kısmi ekspresyon miktarına dönüştürerek genler arasındaki ekspresyon farklılıklarını gösterir.



Şekil 2.11. Öncesinde biraz kalıntıyla birlikte iyi bir amplifikasyonu gösteren tek bir pik veren bir erime eğrisi. X eksenini sıcaklık ve Y eksenini nispi floresans birimidir ($-d(RFU)/dT$).



Şekil 2.12. Logaritmik ölçekte bir PCR amplifikasyon eğrisi. X eksenini döngü sayısı ve Y eksenini nispi floresans miktarını göstermektedir (nispi floresans birimi RFU ile gösterilmiştir).

2.10. İstatistik Analizler

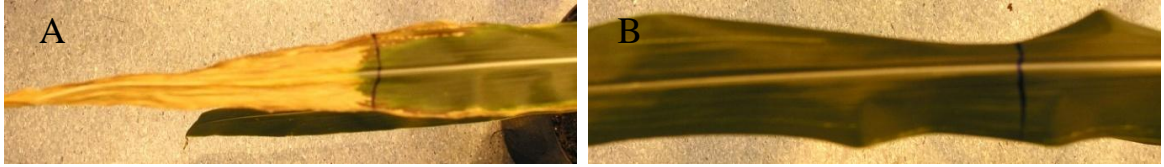
İlgili bölümlerde verilen sayıda biyolojik ve teknik tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi iki grup ortalamasının istatistiksel olarak birbirinden farklı olup olmadığını gösteren ve Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 10.0) paket programı içerisinde yer alan Student's t-testi'ne göre belirlendi.

3. BULGULAR

Doktora tezimin bu bölümünde, mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin büyümesini düzenleyen yeni bir gen tanımlamak için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular sunulmuştur. Bu yeni geni belirlemek için, mısır bitkisinin meristem, uzama ve olgunlaşma olarak adlandırılan büyüme evrelerine ait doku örneklerinin genom çaplı mikrodizi analizi ile belirlenen gen ekspresyon profilleri verilerinden yararlanılmıştır. Bu bağlamda, özellikle büyümenin meydana geldiği başlıca yer olması nedeniyle, meristemde ekspresyonunda farklılık gösteren genlere odaklanılmıştır. Mikrodizi analizinden elde edilen ekspresyon verilerini kümeleme analizi ile gruplara ayırdığımızda büyüme evreleri boyunca ekspresyonları artan, azalan veya aynı kalan çeşitli gen grupları elde edildi. Bu grupların birinde, kromatin genlerinin varlığı tespit edildi. Bu amaçla, 8 farklı kromatin genine ait 8 RNAi mutandı ve 2 TILLING mutant mısır hattı temin edilerek bu kromatin genlerinin büyümedeki fonksiyonları araştırılmaya başlandı. Bu bölümde ilk olarak, temin edilen daneleri toprağa ekerek meydana gelen popülasyondaki bireylerin genotip analizleri yapılarak mutant veya yaban tip olarak sınıflandırması ve popülasyonun devamı için yapılan çalışmalarla ilgili bulgular sunulmuştur. İkinci olarak, her bir kromatin geninin büyümedeki rolünü belirlemek için fidelerin yaprak uzunluğu, uzama oranı, genişliği, alanı, olgun hücre uzunluğu gibi büyüme parametreleri ve q_RT-PCR ile mutant genin suskunluk derecesi belirlendikten sonra yapılan karşılaştırmalı analizlere ait bulgular sırasıyla verilmiştir. Üçüncü kısımda, mısır fidesinin büyümesinde değişiklik meydana getirdiği saptanan *DMT103* geninin hücre bölünmesi, uzaması gibi büyüme işlevlerinin hangisine etki ettiğini belirlemek için yapılan kinematik analizlere ait bulgular sunulmuştur. Dördüncü kısımda, *DMT103* geninin hücre döngüsü safhalarında aksaklık meydana getirip getirmediğinin araştırıldığı flow sitometri bulguları sunulmuştur. Beşinci kısımda, büyümede meydana gelen gecikmenin hücre döngüsünde meydana gelen bir etkiden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için yapılan ana hücre döngüsü genlerinin ekspresyon analizleri bulguları verilmiştir. Altıncı kısımda, bu genin üşüme ve kuraklık gibi streslerdeki rolüne ait bulgular sunulmuştur. Yedinci kısımda, mısırın DMT ailesine ait genlerinin ekspresyon analizlerine ve son olarak sekizinci kısımda, *DMT103* geninin kök büyümesindeki rolüne ait bulgular sunulmuştur.

3.1. Popülasyondaki Mutant Mısır Hatlarının Genotipleri

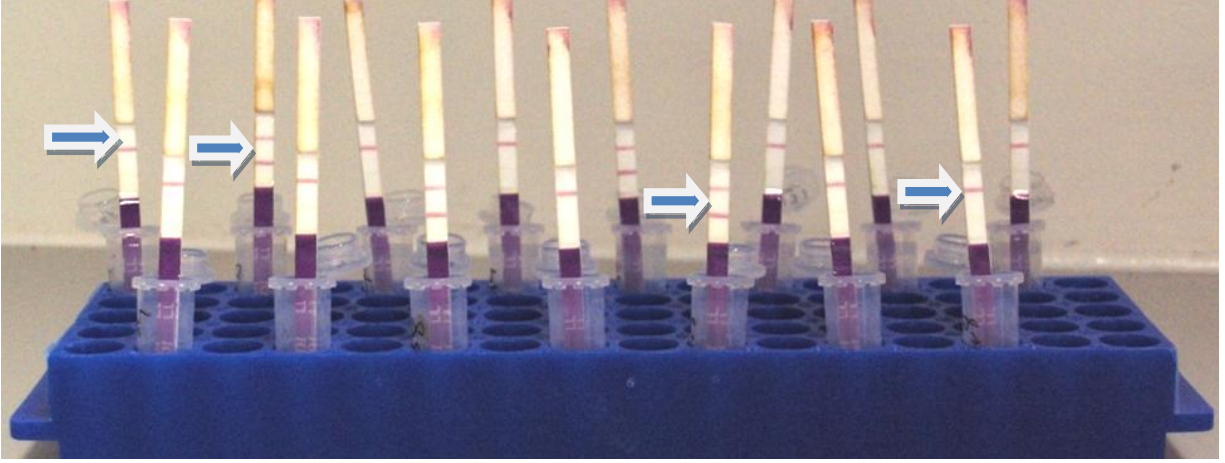
Yaprak boyama testi ile RNAi mutant mısır hatlarını belirlemek için 5. yaprağın kullanılmasının daha uygun olduğu gözlemlendi. Yaprakların basta herbisit solüsyonu ile boyanmasının ardından yapılan gözlemler sonucu yaprakta ilk semptomların 24 saat içerisinde meydana geldiği saptandı. İlk olarak, yaprağın markır ile işaretli kısmından uçlarına doğru sararma ve solmaların meydana geldiği ve bu semptomların hızla ilerleyerek yaprağın tamamının kuruduğu gözlemlendi (Şekil 3.1). Ancak, bitki, testin uygulandığı yaprak haricinde herhangi bir hasara uğramaksızın yaşamını sürdürdü.



Şekil 3.1. Basta uygulanmış mısır yaprağı. A: Basta uygulamasından etkilenen yaprak; B: Basta uygulamasından etkilenmeyen yaprak.

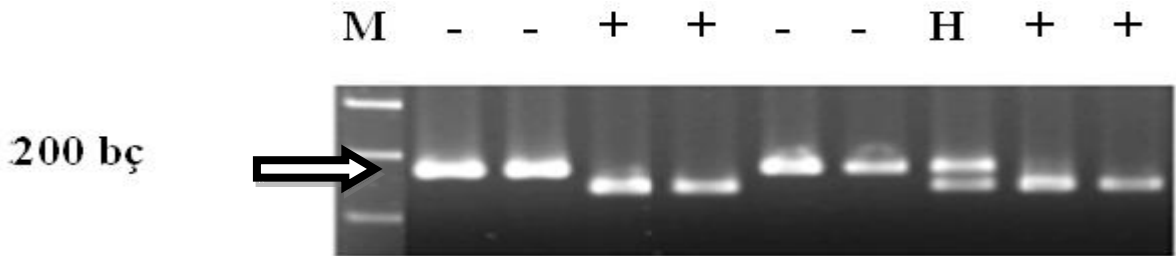
Lateral Flow testi ile mısırların çimlenmelerinin ikinci günü çıkan ilk yaprağın kullanılması ile hızlı ve doğru bir sonuç alındı. Ayrıca bitki bu işlemde herhangi bir zarar görmedi. Test için yaprak ucundan 1 cm kadar kesilip alınan numunenin yeterli olduğu görüldü. Dokunun 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisinde ezilmesiyle PAT proteininin kolayca hücre dışına çıktığı gözlemlendi. Test çubuklarının bu süzöntü içerisine batırılmasının ardından birkaç dakika içerisinde bantlar oluşmaya başladı. Çubuk üzerinde tek bant oluşması PAT proteini bakımından negatif, iki bant oluşması ise pozitif yani numunenin mutant mısıra ait olduğunu gösterdi (Şekil 3.2).

TILLING mutant mısır hatlarını belirlemek için kullanılan dCAPS metodu için bitkinin herhangi bir yaprağının orta damarı kesilip çıkartıldıktan sonra 6 cm kadar numune alınması ile yeterli miktarda DNA elde edildiği görüldü. Nokta mutasyonu olduğu muhtemel genin PCR ile çoğaltılmasının ardından uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi sonucu oluşan ürünün jel elektroforezi ile yürütülmesi ile 3 farklı bant elde edildi (Şekil 3.3). PCR ürünü yaklaşık 200 bç'dir. Eğer bu ürün kesime uğrarsa yaklaşık 20 bç kısılacaktır. Buna göre yaban tip mısırlarda 180 bç'lik bir band, mutant mısır hatlarında 200 bç'lik bir band görüldü. Bu genin iki farklı kopyasına sahip mısırlarda iki band oluştu.



Şekil 3.2. Lateral Flow Test çubuklarının görünümü. Test çubuğu üzerinde oluşan iki bant numunenin mutant hatta, tek bant yaban tipe ait olduğunu gösterir.

TILLING mutant hatlarını sekans analizi ile belirlemek için, mısır fidelerinden ekstrakte edilen genomik DNA'nın, PCR ile çoğaltılması için oldukça saf olması gerektiği görüldü. Nokta mutasyonu taşıyan genin PCR ile çoğaltılmasının ardından yapılan sekans analizi ile TILLING mutantlarının dCAPS metoduna göre daha etkili ve doğru bir şekilde belirlendi.



Şekil 3.3. TILLING mutant hattı olan DMT107 dCAPS metodu sonrasında üretilen bantlar. +: SfaNI ile kesilen bant, -: kesilmeyen, H: heterozigot, M: Marker.

3.2. Tozlaşma ve Transgenin Kalıtımı

Analizler sonucu harcanan mutant mısır tohumlarını yerine koyabilmek için mısırları tozlaştırmak gereği ortaya çıktı. Gözlemleri biten mısır fidelerinin yeni tohumlar üretebilmesi için fertilizör içeren daha büyük saksılara ihtiyaç duyduğu görüldü. Mısırlar yaklaşık 10 haftalık olduklarında ilk olarak erkek çiçeklerinin açtığı gözlemlendi. Erkek çiçeklerin açmasından yaklaşık birkaç gün sonra dişi çiçeklerin yaprak koltuklarında

belirmeye başladı. Dişi çiçeklerin ortaya çıkışından yaklaşık bir hafta sonra, püsküller, çiçeği saran yaprakların dışına doğru uzadı. Mısırlar kendilendi ya da aynı yaşta olduğu yaban tipi ile geri çaprazlandığında, transgenin, Mendelin kalıtım kanununa göre kalıtıldığı görüldü (1:1).

3.3. Kromatin Genlerinin Büyüme Üzerindeki Rolü

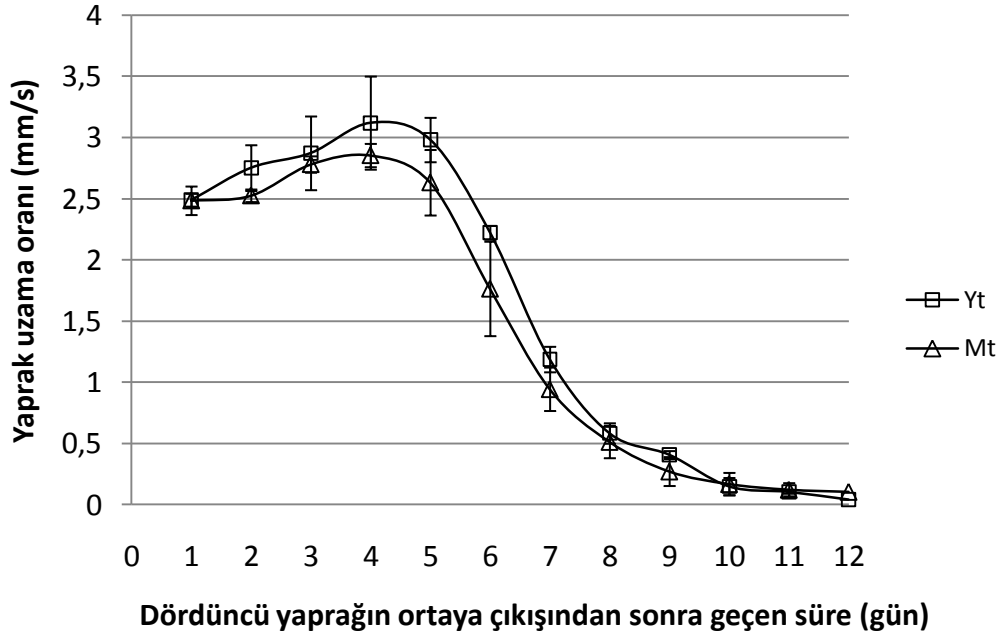
3.3.1. DNA METİLTRANSFERAZ 101 (DMT101) Geninin Büyümedeki Rolü

DNA METİLTRANSFERAZ 101 (DMT101) geninin büyümedeki rolünü araştırmak için Hat 32 ve Hat32.1 adlı iki farklı RNAi mutant mısır hattı kullanılmıştır.

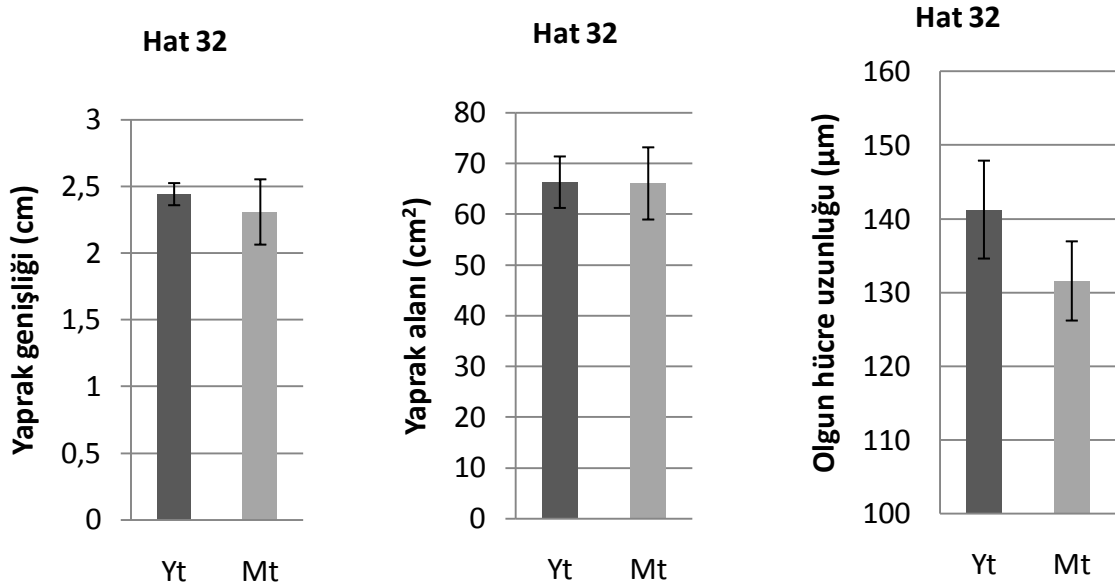
3.3.1.1. Hat32'nin Yaprak Büyüme Parametreleri

Bir RNAi mutandı olan ve *DNA METİLTRANSFERAZ 101 (DMT101)* geni susturulmuş Hat 32'nin mutant ve yaban tip mısırlarının 4. yapraklarının büyümeleri incelendiğinde, mutantların yaban tiplere oranla daha geç büyüdüğü gözlemlendi. Yaprak uzama oranı mutantlarda 2.8 ± 0.1 ve yaban tiplerde 2.7 ± 0.1 olarak hesaplandı (Şekil 3.4). Ancak yapılan istatistiksel analizler sonucunda mutant ve yaban tiplerin yaprak uzama oranları arasında gözlenen büyüme farkının istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($P \leq 0.05$). Yaprak genişliği ve alanı arasında görülen farkın yine istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi (Şekil 3.5). Olgun hücre uzunluğunun ise mutantlarda yaban tiplere oranla daha kısa olduğu gözlenirken yapılan istatistiksel analizler bu sonucun önemli olmadığını gösterdi (Şekil 3.5).

Hat 32



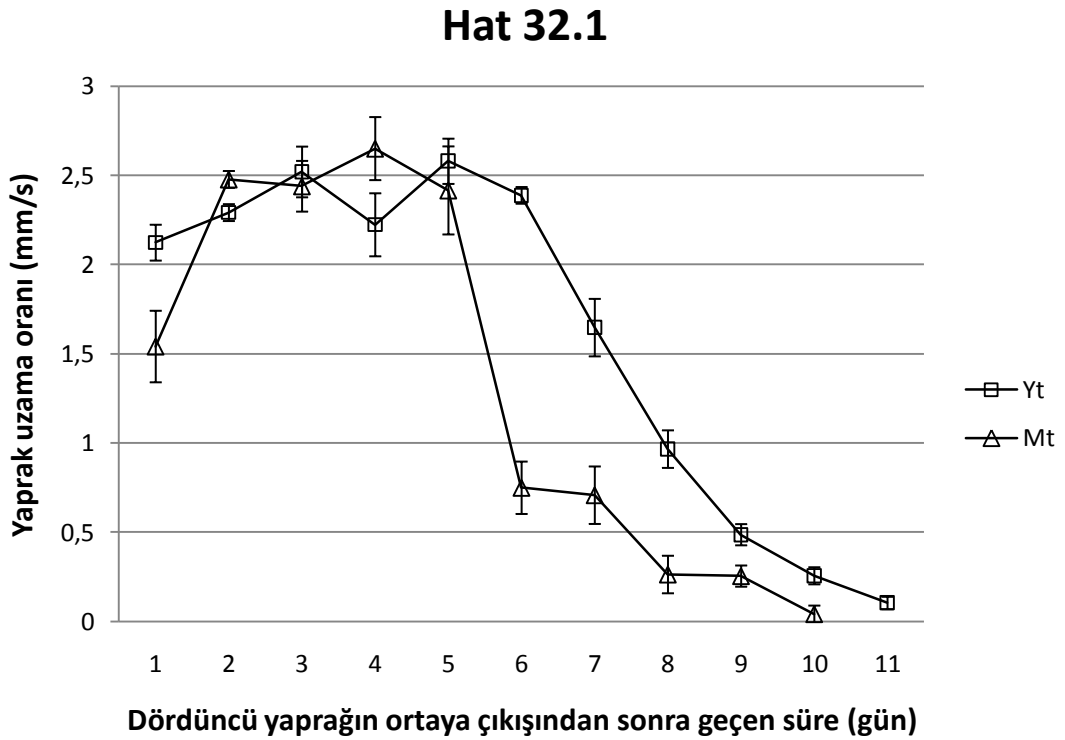
Şekil 3.4. Hat 32'in yaprak uzama oranı. X eksenini dördüncü yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksenini yaprak uzama oranını göstermektedir. \square -Yt: yaban tipi; \triangle -Mt: mutant. Mt(n)=3, Yt(n)=2, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



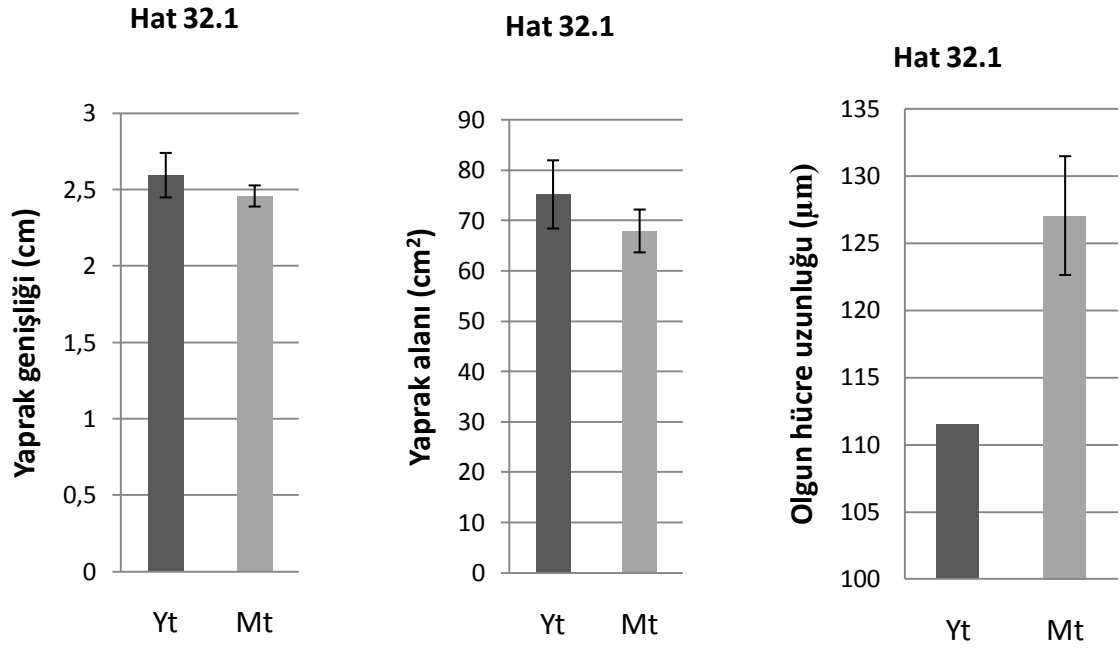
Şekil 3.5. Hat 32'nin yaprak genişliği (solda), alanı (ortada) ve olgun hücre uzunluğu (sağda). \blacksquare -Yt: yaban tipi; \blacksquare -Mt: mutantı göstermektedir. n(Yt)=3, n(Mt)=6, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

3.3.1.2. Hat32.1'in Yaprak Büyüme Parametreleri

Bir RNAi mutandı olan ve *DNA METİLTRANSFERAZ 101 (DMT101)* geni susturulmuş Hat 32.1 çimlenmenin ardından ciddi derecede büyüme kusurları gösterdiği ve bu semptomların mısırların ölümüne sebep olduğu görüldü. Hayatta kalabilen mutant ve yaban tip mısırların logaritmik büyüme fazında yaprak uzama oranları, sırasıyla 2.3 ± 0.2 ve 2.4 ± 0.1 olarak hesaplandı (Şekil 3.6). Ancak yaprak uzama oranındaki bu farkın *t*-testine göre anlamlı olmadığı saptandı. Dördüncü yaprağın ortaya çıkışından sonraki beş gün mutant ve yaban tiplerin aynı oranda büyüdüğü ve beşinci günden sonra ise mutantların büyümesinde hızlı bir düşüş olduğu saptandı. Yaprak genişliğinde, alanında ve olgun hücre uzunluğunda mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Hat 32.1'in yaprak uzama oranı. X eksenini dördüncü yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksenini yaprak uzama oranını göstermektedir. \square -Yt: yaban tip; \triangle -Mt: mutant. Mt(n)=3, Yt(n)=2; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

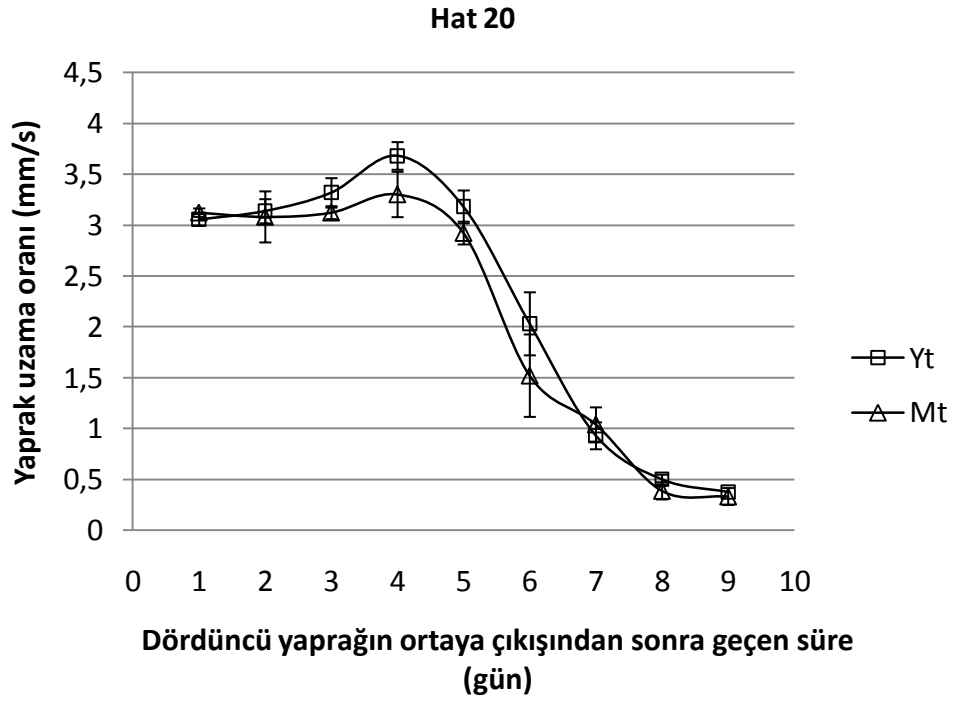


Şekil 3.7. Hat 32.1'nin yaprak genişliği (solda), yaprak alanı (ortada), ve olgun hücre uzunluğu (sağda). ■Yt: yaban tip; ■Mt: mutant. n=5, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

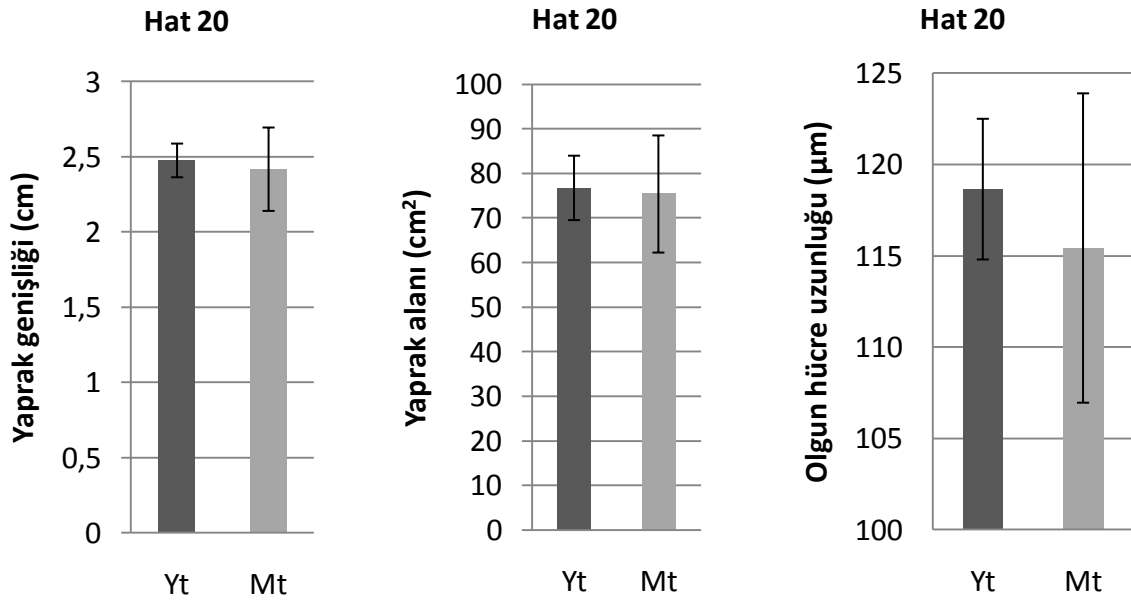
3.3.2. DNA METİLTRANSFERAZ 102 (DMT102) Geninin Büyümedeki Rolü

DNA METİLTRANSFERAZ 102 (DMT102) geninin büyümedeki rolünü araştırmak için Hat 20 adlı RNAi mutant mısır hattı kullanılmıştır. Yaban tip ve mutant mısırlara ait yaprakların aynı büyüme profiline sahip olduğu gözlemlendi. Mısırların 6 gün boyunca hızlı bir şekilde uzadığı, sonraki günlerde büyümelerinin yavaşladığı ve 10. günün sonunda ise uzamanın durduğu saptandı. Hat 20'in logaritmik büyüme fazında yaprak uzama oranı, mutantlarda 3.2 ± 0.1 ve yaban tip mısırlarda 3.3 ± 0.3 olarak hesaplandı. Ancak, aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Şekil 3.8).

Hat20'nin yaprak genişliğinde, alanında ve hücre uzunluğunda istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı saptanmadı (Şekil 3.9).



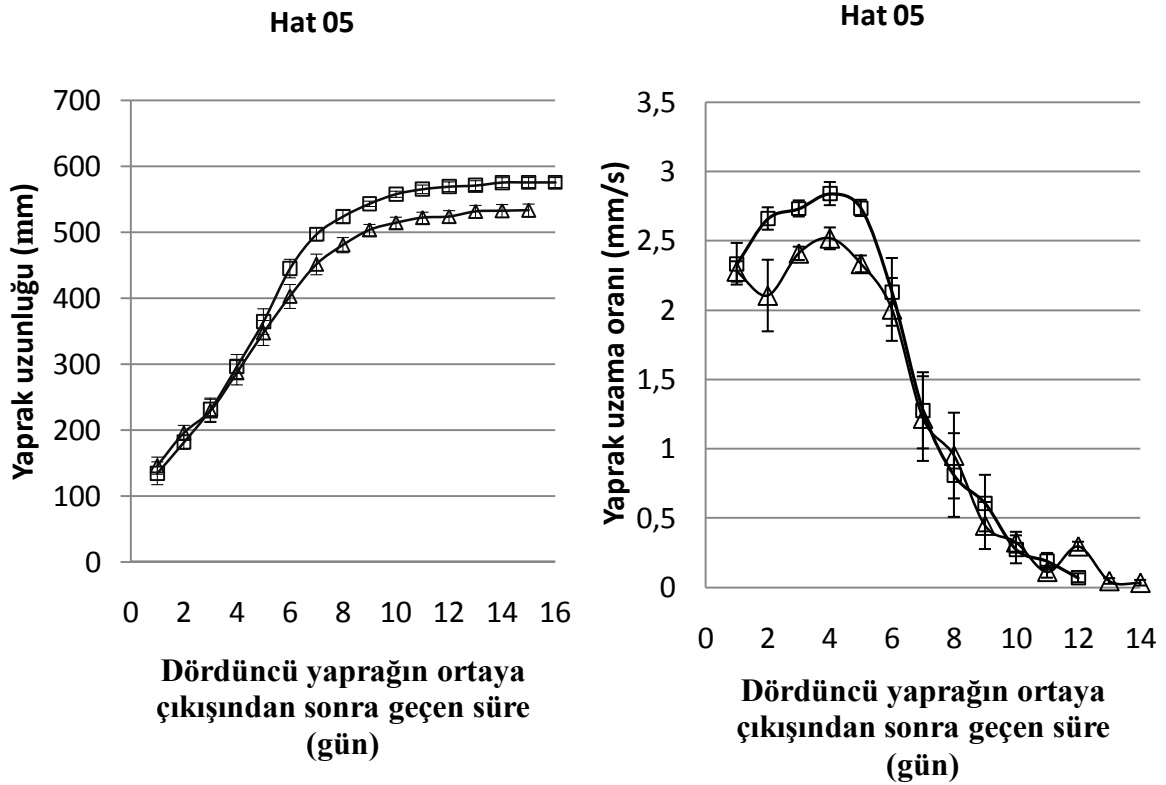
Şekil 3.8. Hat 20'in yaprak uzama oranı. X eksenini dördüncü yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksenini yaprak uzama oranını göstermektedir. \square -Yt: yaban tipi; \triangle -Mt: mutant. $n=5$, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.9. Hat 20'nin yaprak genişliği (solda), alanı (ortada) ve olgun hücre uzunluğu (sağda). \blacksquare -Yt: yaban tipi; \blacksquare -Mt: mutant. $n(Yt)=5$, $n(Mt)=6$, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

3.3.3. DNA METİLTRANSFERAZ 103 (DMT103) Geninin Büyümedeki Rolü

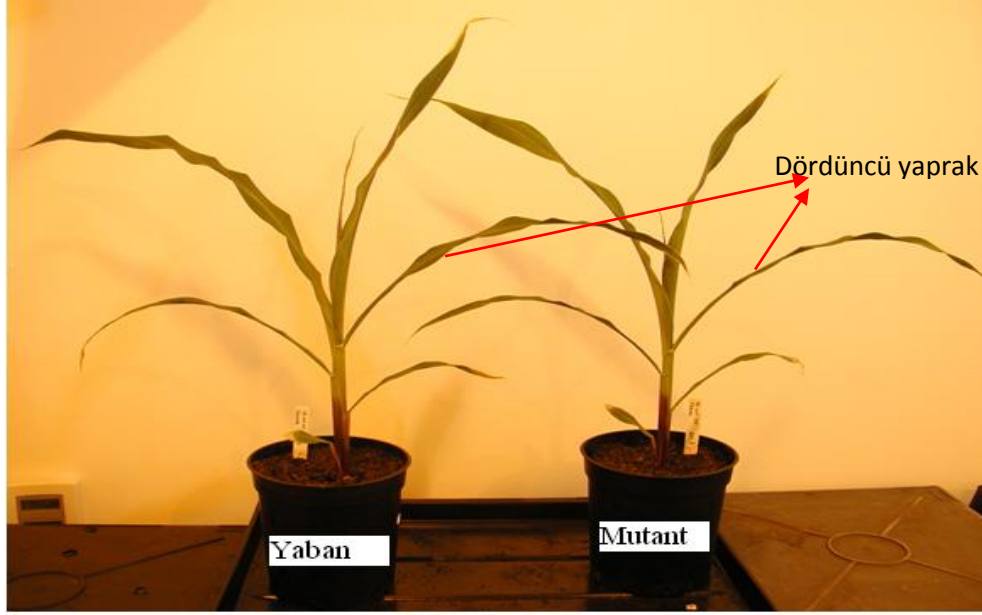
DNA METİLTRANSFERAZ 103 (DMT103) geninin büyümedeki rolünü araştırmak için DMT103 geni RNAi tekniğiyle susturulmuş olan Hat05 adlı mutant mısır hattı kullanılmıştır. Hat05'in dördüncü yaprağının uzunluğu, mutantlarda yaban tiplere kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede ($p \leq 0.05$) % 8 oranında azaldığı saptandı (Şekil 3.10; Şekil 3.11).



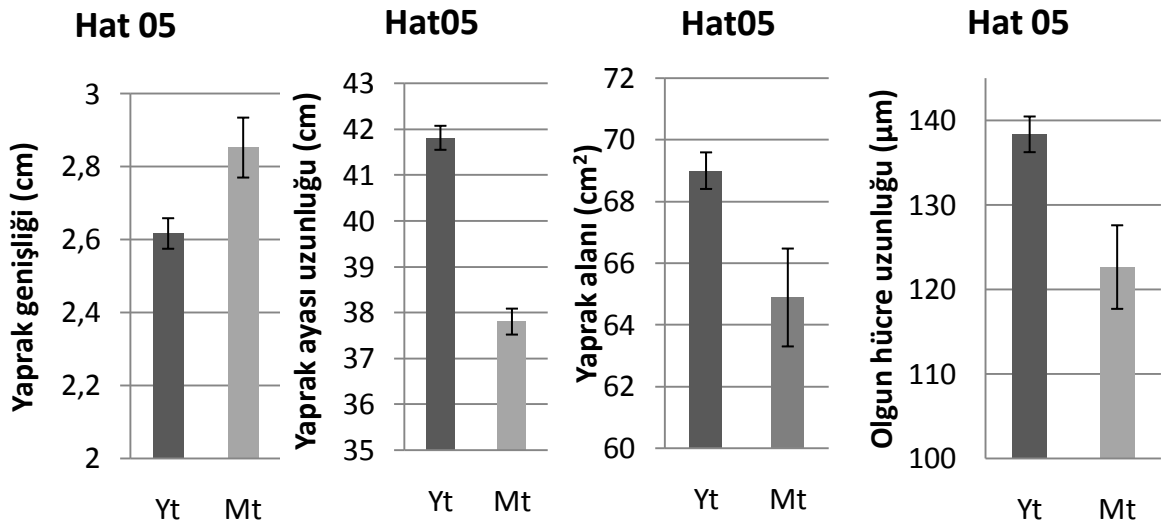
Şekil 3.10. Hat 05'in dördüncü yaprağının uzunluk profili (solda), yaprak uzama oranı (sağda). X eksenini 4. yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi (solda ve sağda), Y eksenini yaprak uzunluğunu (mm) (solda), yaprak uzama oranını (sağda) göstermektedir. \square -Yt: yaban tipi; \triangle -Mt: mutant. n=5, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Hat05 fidelerinin dördüncü yapraklarının lineer büyüme safhasında mutantların yaban tiplere oranla daha yavaş büyüdüğü gözlemlendi. Hat05'in yaprak uzama oranının mutant mısırlarda yaban tiplere kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede %12 ($p \leq 0.05$) oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 3.12).

Hat05'in mutant fidelerinin dördüncü yapraklarının genişliği yaban tiplere nazaran %4 oranında artarken yaprak ayasının uzunluğu %10 ($p \leq 0.05$) azaldı. Yaprak alanı ise, mutantlarda yaban tiplere göre %6 oranında azalış gösterdi. Mutantların olgun hücre uzunluğu yaban tiplere kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede ($p \leq 0.05$) %8 oranında kısaldı (Şekil 3.12).

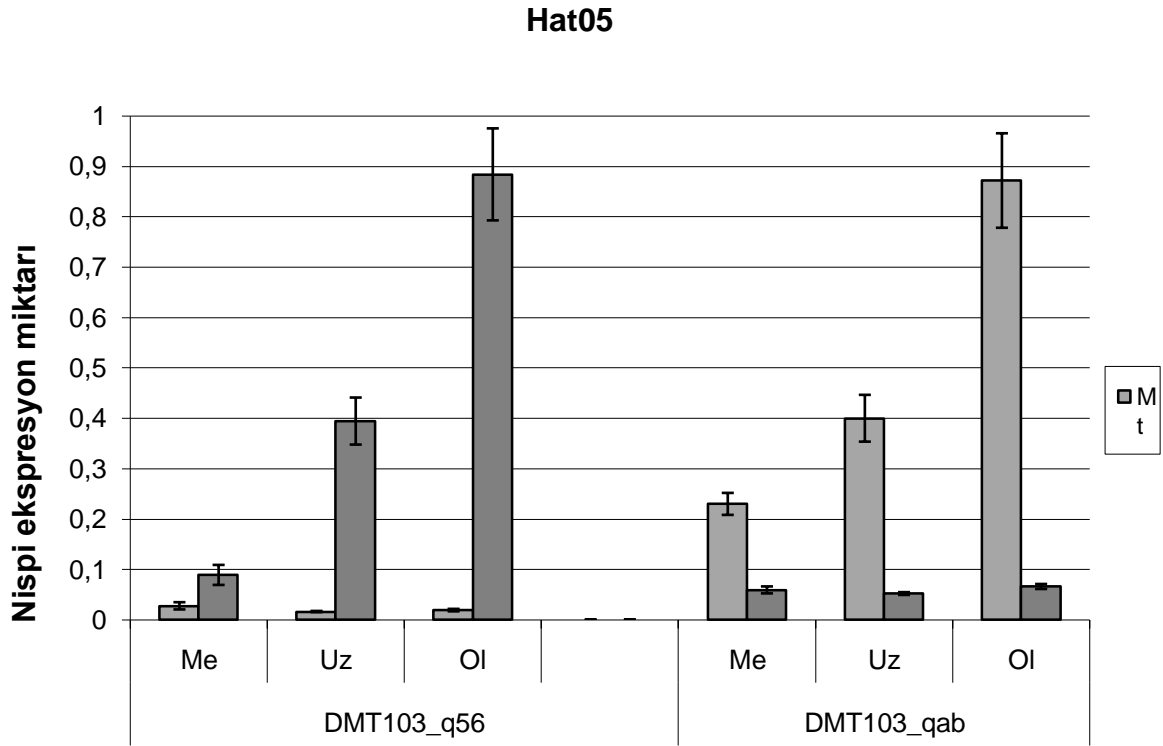


Şekil 3.11. Hat 05'e ait yaban tip (solda) ve mutant (sağda) mısırların dördüncü yaprakların görünümü



Şekil 3.12. Hat05'in yaprak genişliği, aya uzunluğu, alanı ve hücre uzunluğu. ■ Yt= Yaban tip; ■ Mt= Mutant; n(Yt)=7, n(Mt)=5, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Hat05'in RNAi tekniğiyle susturulmuş *DMT103* geninin suskunluk derecesini belirleyebilmek için transgene ve endogene uygun olarak dizayn edilerek, sırasıyla DMT103-qab ve DMT103-q56 olarak adlandırılan iki adet primer ile çoğaltılan genin transkript miktarı Q-RT_PCR ile belirlenmiştir. Ayrıca, *DMT103* geninin mısır yaprağının farklı büyüme evrelerindeki ekspresyon profilini görebilmek için genin meristem, uzama ve olgunlaşma evrelerindeki transkript miktarları da belirlenmiştir. Sonuçlar, endogenin tüm büyüme basamakları boyunca önemli derecede suskun olduğunu gösterdi (Şekil 3.13). Aksine, transgenin ise büyüme basamakları boyunca yüksek oranda ekspreslendiği saptandı. Bu sonuç, RNAi kasedinin etkili bir şekilde çalıştığını göstermektedir (Şekil 3.13). Ayrıca, *DMT103* geninin ekspresyonunun, yaprağın olgunlaşma safhasında en yüksek seviyeye ulaştığı saptandı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Hat05'in *DMT103* geninin farklı büyüme basamaklarında suskunluk derecesi ve ekspresyon profili. X eksenin büyüme evrelerini ve gen isimlerini, Y eksenini ise büyüme evrelerine göre ilgili genin transkript miktarını göstermektedir. DMT103-q56: endogen; DMT103-qab: transgen; Me: Meristem; Uz: Uzama bölgesi; Ol: Olgunlaşma bölgesi; ■Mt: Mutant; ■Yt: Yaban tip, n=3, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

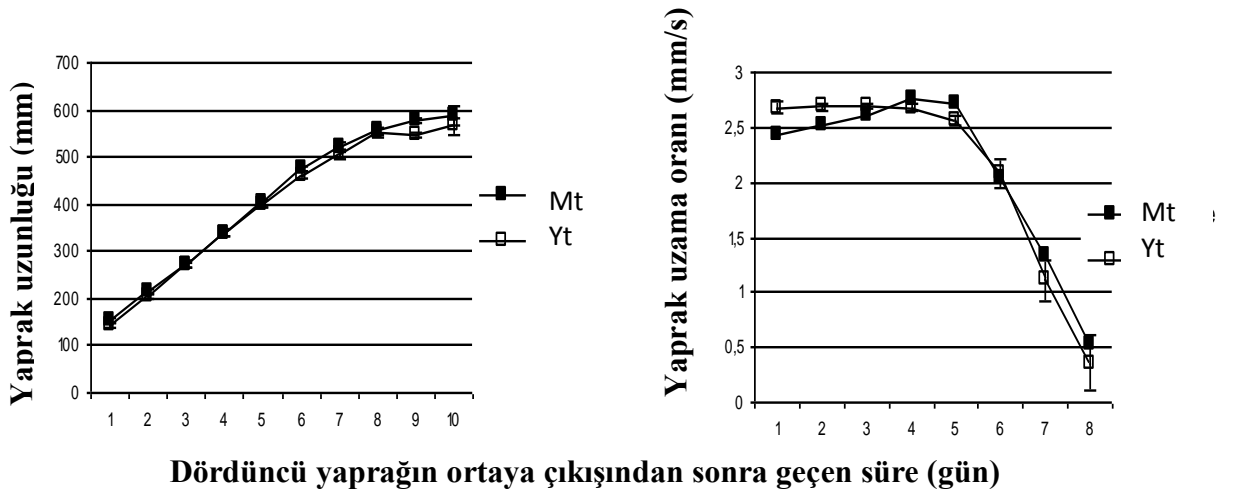
3.3.4. DNA METİLTRANSFERAZ 106 (DMT106) Geninin Büyümedeki Rolü

DNA METİLTRANSFERAZ 106 (DMT106) geninin büyümedeki rolünü araştırmak için TILLING tekniğiyle DMT106 geninde nokta mutasyonu meydana getirilen Hat DMT106 kullanılmıştır. Bu mutasyonun mısırdaki çimlenme sorunlarına yol açtığı gözlemlendi.

3.3.5. DNA METİLTRANSFERAZ 107 (DMT107) Geninin Büyümedeki Rolü

DNA METİLTRANSFERAZ 107 (DMT107) geninin büyümedeki rolünü araştırmak için TILLING tekniğiyle DMT107 geninde nokta mutasyonu meydana getirilen Hat DMT107 olarak adlandırılan bir mutant kullanılmıştır. Hat DMT107'nin mutant ve yabancı tiplerine ait mısırların yaprak uzunluğu profillerinin birbirine çok benzediği gözlemlendi (Şekil 3.14). Yaprak uzama oranları ise ilk iki gün mutantlarda yabancı tip mısırlara kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede ($p \leq 0.05$) %10 oranında azaldığı saptandı (Şekil 3.24). Ancak, ilerleyen günlerde mutant mısırların büyümesi yabancı tiplere oranla daha erken durarak sonuçta aynı uzunluğa ulaştığı kaydedildi (Şekil 3.14).

TILLING Hat DMT107

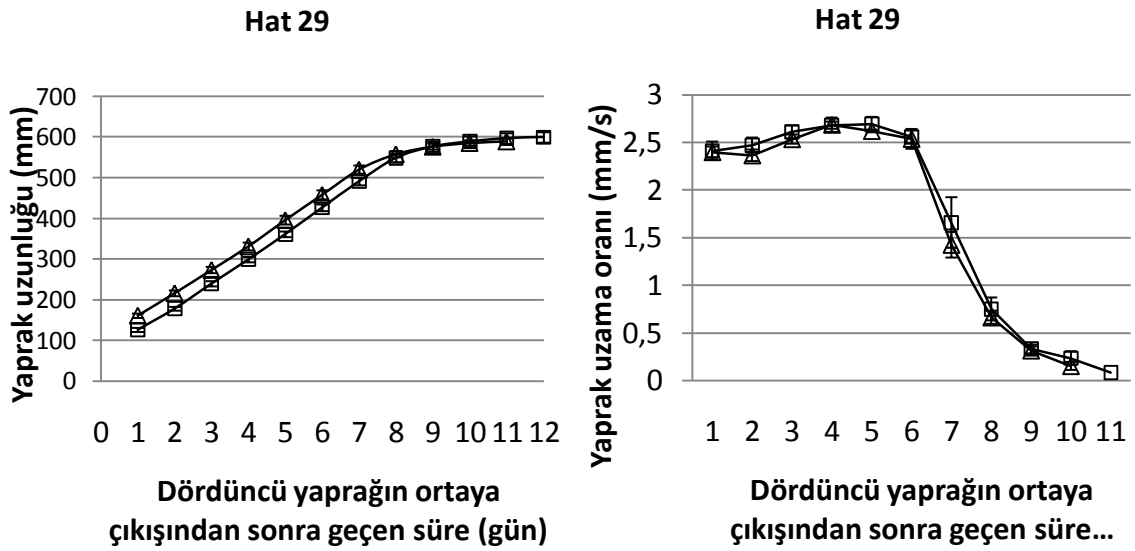


Şekil 3.14. TILLING Hat DMT107'nin yaprak uzunluğu (solda) ve yaprak uzama oranı (sağda). Her iki grafikte X eksenini dördüncü yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksenini yaprak uzunluğunu (mm) (solda), Y eksenini yaprak uzama oranını (sağda) göstermektedir. —■—Mt mutant; —□—Yt yabancı tip. n=10; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

3.3.6. SET DOMAIN 118 (SDG118) Geninin Büyümedeki Rolü

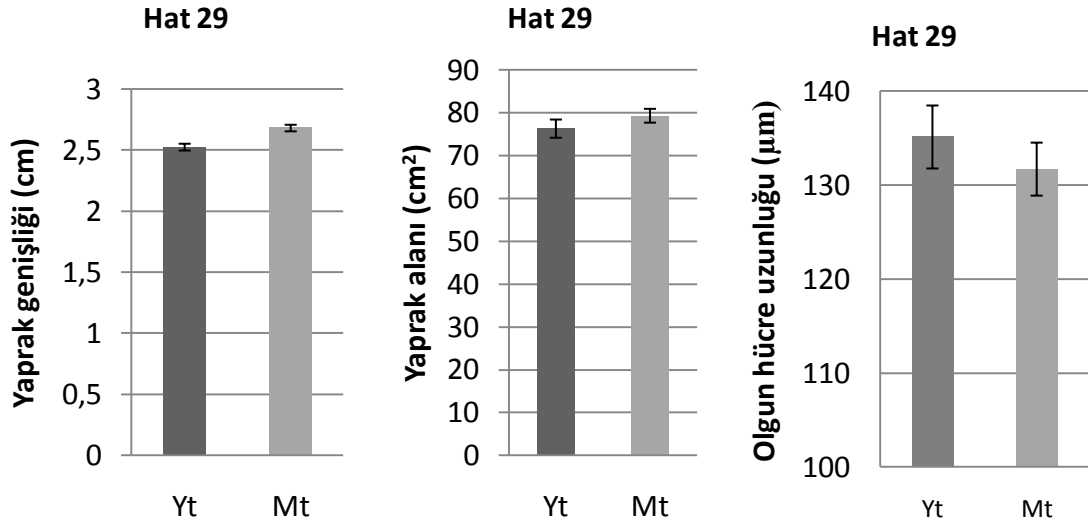
SET DOMAIN 118 (SDG118) geninin büyümedeki rolünü araştırmak için RNAi tekniğiyle susturulmuş Hat29 adlı bir mutant kullanılmıştır. Hat 29'un mutant ve yaban tip mısırlarının dördüncü yapraklarının uzunlukları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 3.8). Aynı şekilde, mutant ve yaban tip mısır fidelerinin yaprak uzama oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı (Şekil 3.15).

Hat29'un mutant ve yaban tip mısır fideleri arasında yaprak genişliği, alanı ve olgun hücre uzunluğu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı (Şekil 3.16).

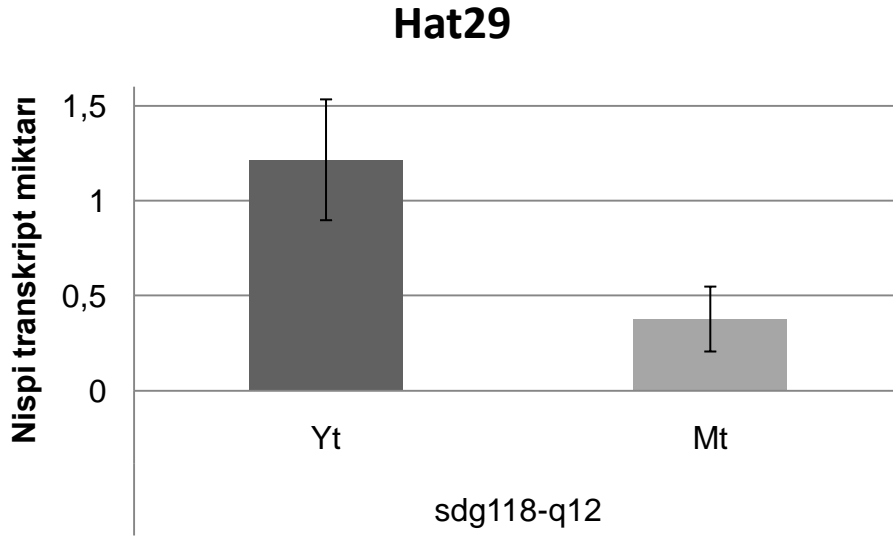


Şekil 3.15. Hat 29'un Yaprak uzunluğu (solda) ve yaprak uzama oranı (sağda). X eksenini dördüncü yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi (solda ve sağda), Y eksenini yaprak uzunluğunu (mm) (solda), yaprak uzama oranını (sağda) göstermektedir. \square -Yt: yaban tipi; \triangle -Mt: mutant. $n(Yt)=5$, $n(Mt)=7$; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Hat29'un RNAi tekniğiyle susturulmuş olan *SDG118* geninin suskunluk derecesini belirleyebilmek için endogene göre dizayn edilen DMT103-q12 adlı primer kullanarak çoğaltılan genin transkript miktarı Q-RT_PCR ile belirlendi. Sonuçlara göre, *SDG118* geninin ekspresyonu Hat29'un mutant fidelerinde yaban tiplere nazaran azalış gösterdi. Ancak, yapılan istatistik analizler sonucu görülen bu ekspresyon farkının önemli olmadığı saptandı (Şekil 3.17).



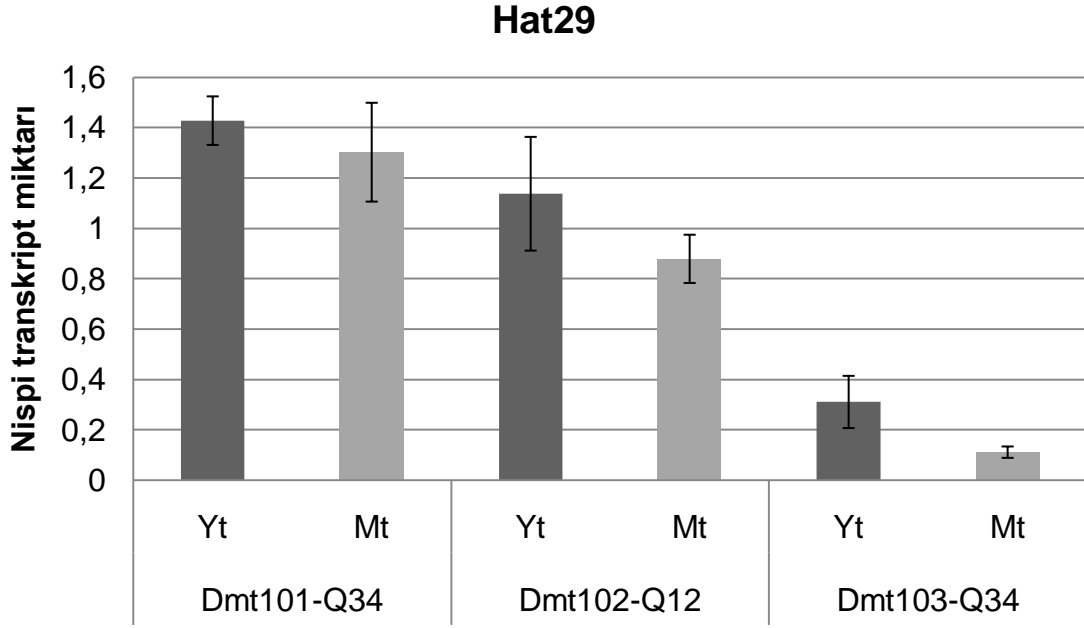
Şekil 3.16. Hat 29'un yaprak genişliği (solda), alanı (ortada) ve hücre uzunluğu (sağda). ■ Yt: yaban tip; ■ Mt: mutant. n(Yt)=4, n(Mt)=5, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.17. Hat29'da *SET DOMAİN GENİ 118 (SDG118)*'nin suskunluk derecesi. ■ Yt: Yaban tip; ■ Mt: Mutant. n=3, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$),

Hat 29'da *SDG118* kromatin genini susturmak için kullanılan RNAi kasetinin, diğer kromatin genlerini hedef alarak ekspresyonlarında değişikliğe yol açıp açmadığını ve *sdg118* geninin susması sonucu yerine getiremediği görevinin diğer genler tarafında kompanse edilip edilmediğini araştırmak üzere *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin

ekspresyonları Q-RT_PCR ile belirlendi (Şekil 3.18). Sonuçlar, Hat29’da *DMT101* geninin transkript miktarının *DMT102* ve *DMT103* genlerinin transkript miktarlarına nazaran daha yüksek ve *DMT103*’ün transkript miktarının ise en düşük olduğunu gösterdi (Şekil 3.18). Ancak, *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin ekspresyon seviyelerinde, mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Hat29’un *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin ekspresyonu. ■ Yt: Yabancı tip; ■ Mt: Mutant. n=3, Ortalama ± Ss, Student’s t-test, ($p \leq 0,05$)

3.3.7. SET DOMAİN 122 (*SDG122*) Geninin Büyümedeki Rolü

SET DOMAİN 122 (SDG122) geninin büyümedeki rolünü araştırmak üzere Hat 39 ve Hat39.1 adlı iki farklı RNAi mutant mısır hattı kullanılmıştır.

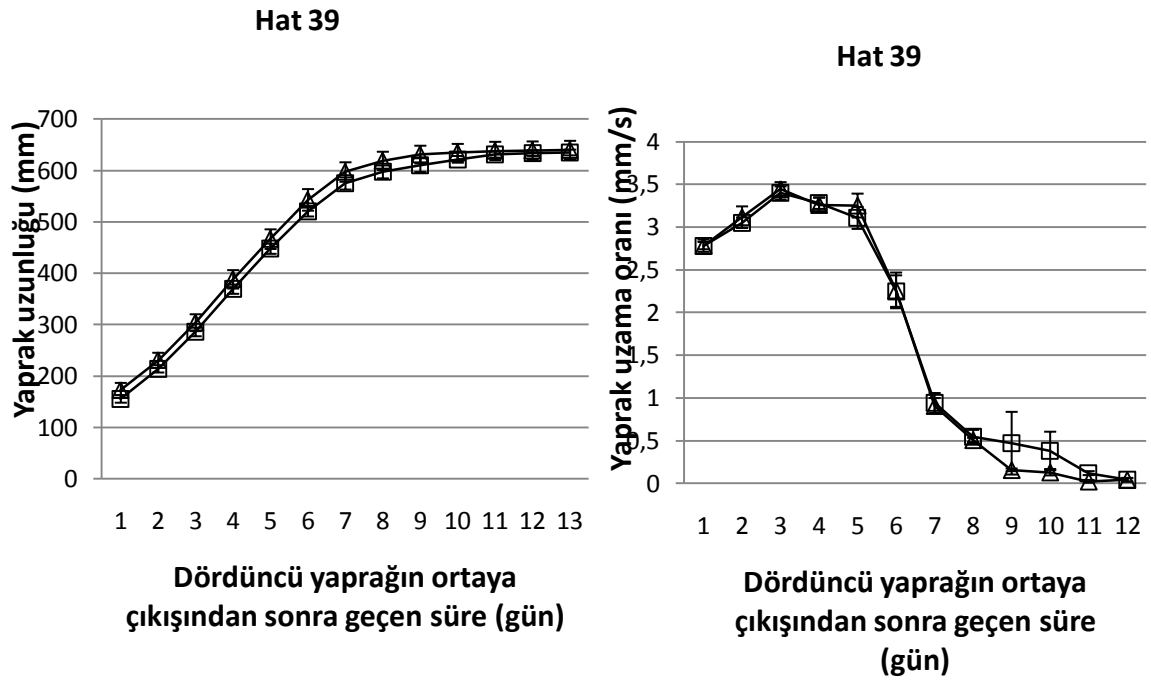
3.3.7.1. Hat39’un Yaprak Büyüme Parametreleri

Bir RNAi mutandı olan ve *SET DOMAİN 122 (SDG122)* geni susturulmuş Hat 39’un mutant ve yaban tip mısır fidelerinin yaprak uzunlukları profil grafiğinin birbirine benzer şekilde büyüme eğrisi oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 3.19). Ancak, yapılan ölçümler sonucunda, Hat39’un mutant ve yaban tip mısır fideleri arasında yaprak uzunluğu ve

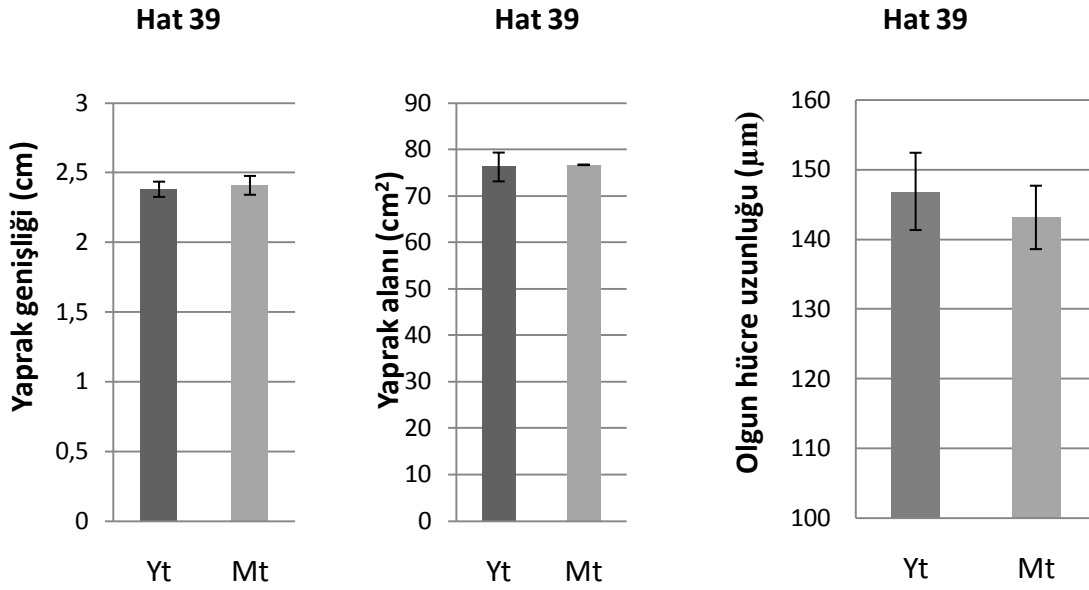
yaprak uzama oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı (Şekil 3.19).

Hat39'un yaprak genişliği, alanı ve olgun hücre uzunluğunun mutant ve yaban tip mısır fideleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı (Şekil 3.20).

Q-RT_PCR analizleri sonucu, Hat39'a aktarılan RNAi kasedinin mutant mısır fidelerinde çalıştığı tespit edilirken, *SDG122* geninin suskunluk derecesinin istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Şekil 21).

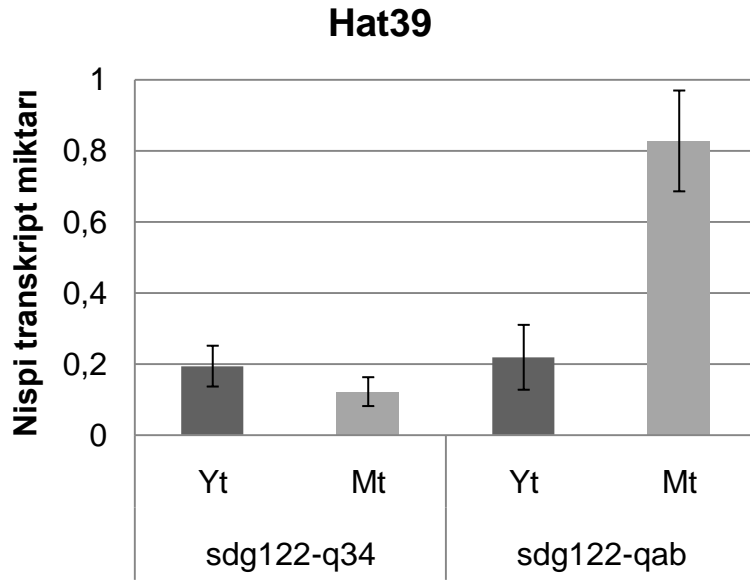


Şekil 3.19. Hat 39'un Yaprak uzunluğu (solda) ve yaprak uzama oranı (sağda). X eksenini 4. yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi (solda ve sağda), Y eksenini mm cinsinden yaprak uzunluğunu (solda), yaprak uzama oranını (sağda) göstermektedir. \square -Yt: yaban tipi; \triangle -Mt: mutant. Mtn=5, Ytn=7; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

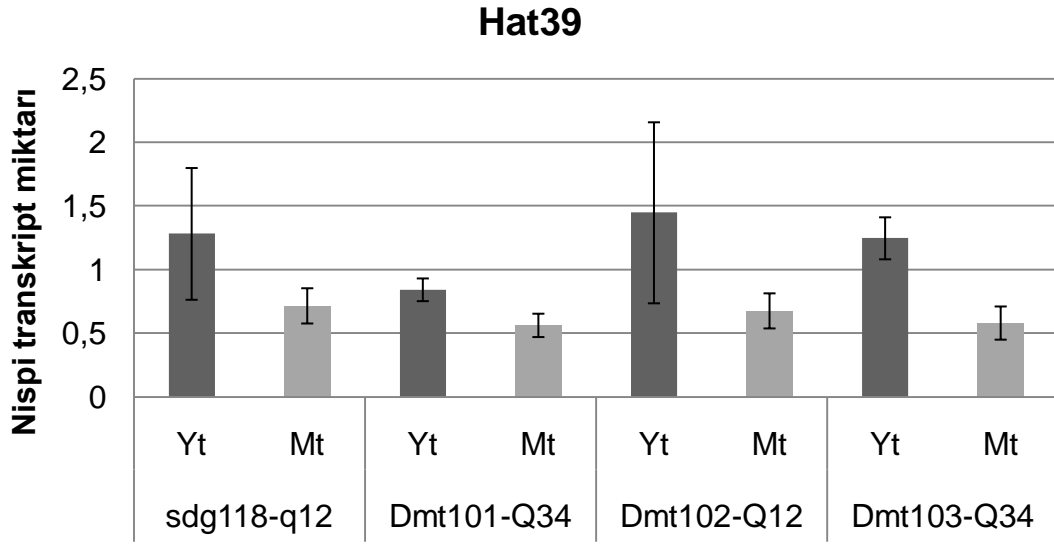


Şekil 3.20. Hat 39 yaprak genişliği (solda), alanı (ortada) ve hücre uzunluğu (sağda). ■ Yt: yaban tip; ■ Mt: Mutant. n=5, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Q-RT_PCR ile ekspresyon analizleri sonucunda, Hat 39'un mutant ve yaban tip mısır fidelerinin *sdg118*, *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin transkript miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Şekil 3.22).



Şekil 3.21. Hat39'un *SDG122* geninin suskunluk derecesi. X ekseninde Sdg122-qab transgeni, sdg-q34 endogeni, Y eksenini ise bu genlerin ekspresyon miktarını göstermektedir. ■ Yt: Yaban tip; ■ Mt: mutant, n=3, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.22. Hat 39'un *sdg118*, *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin ekspresyonu. ■ Yt: Yabancı tip; ■ Mt: Mutant, n=3, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

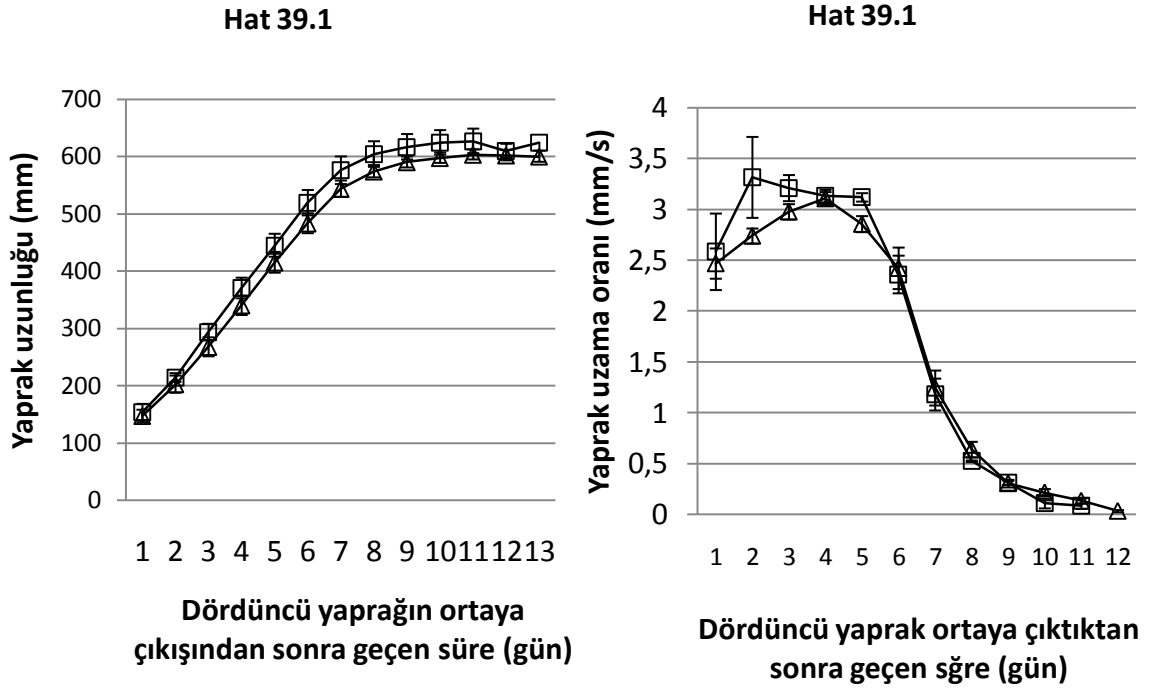
3.3.7.2. Hat39.1'in Yaprak Büyüme Parametreleri

Bir RNAi mutandı olan ve *SET DOMAIN 122 (SDG122)* geni susturulmuş Hat 39.1'in mutant ve yabancı tip mısır fidelerinin yaprak uzunlukları profil grafiklerinin birbirine benzer şekilde bir büyüme eğrisi oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 3.23). Hat39.1'in mutant ve yabancı tip mısır fideleri arasında yaprak uzunluğunda ve yaprak uzama oranında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı (Şekil 3.23).

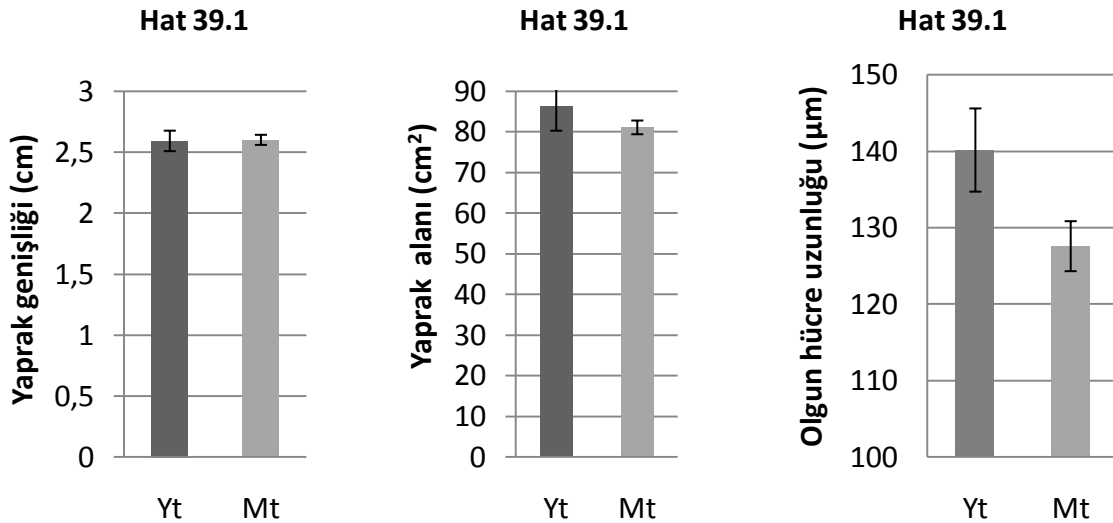
Hat39.1'in mutant ve yabancı tip mısır fideleri arasında yaprak genişliğinde ve alanında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ancak olgun gücre uzunluğunda mutantlarda yabancı tiplere kıyasla %10 oranında azalış meydana geldiği saptandı (Şekil 3.24).

Q-RT-PCR ile ekspresyon analizleri sonucunda, Hat39.1'in mutant fidelerinde RNAi kasedinin çalıştığı tespit edilirken, mutant ve yabancı tip fidelerin *SDG122* genlerinin transkript miktarlarında görülen farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Şekil 3.25).

Q-RT-PCR ile ekspresyon analizleri sonucu, Hat 39.1'in *DMT101* ve *DMT102* genlerinin transkript miktarlarının mutant fidelerde yabancı tip fidelere nazaran daha fazla olduğu, *DMT103* ve *SDG118* genlerinin transkript miktarlarının ise mutant ve yabancı tipler arasında fark göstermediği saptandı (Şekil 3.26).

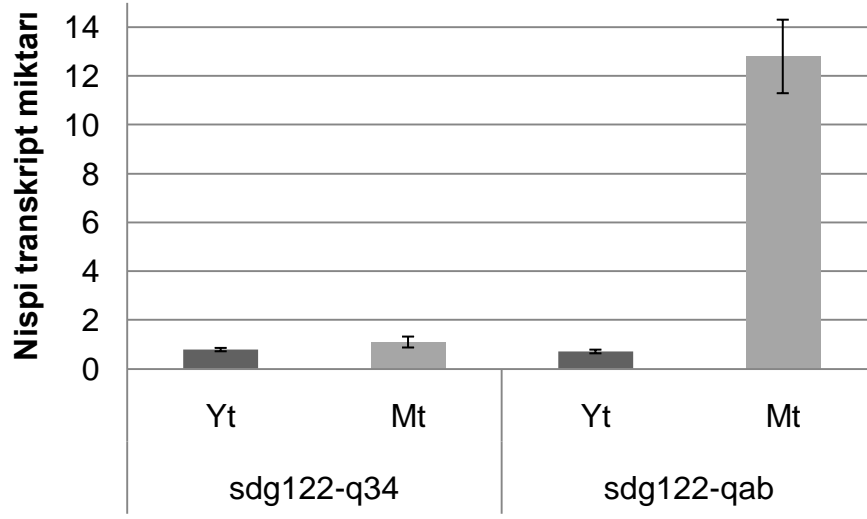


Şekil 3.23. Hat 39.1'un Yaprak uzunluğu (solda) ve yaprak uzama oranı (sağda). X eksenini 4. yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi (solda ve sağda), Y eksenini mm cinsinden yaprak uzunluğunu (solda), yaprak uzama oranını (sağda) göstermektedir. \square -Yt: Yaban tipi; \triangle -Mt: Mutant. Mt(n)=9, Yt(n)=3; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



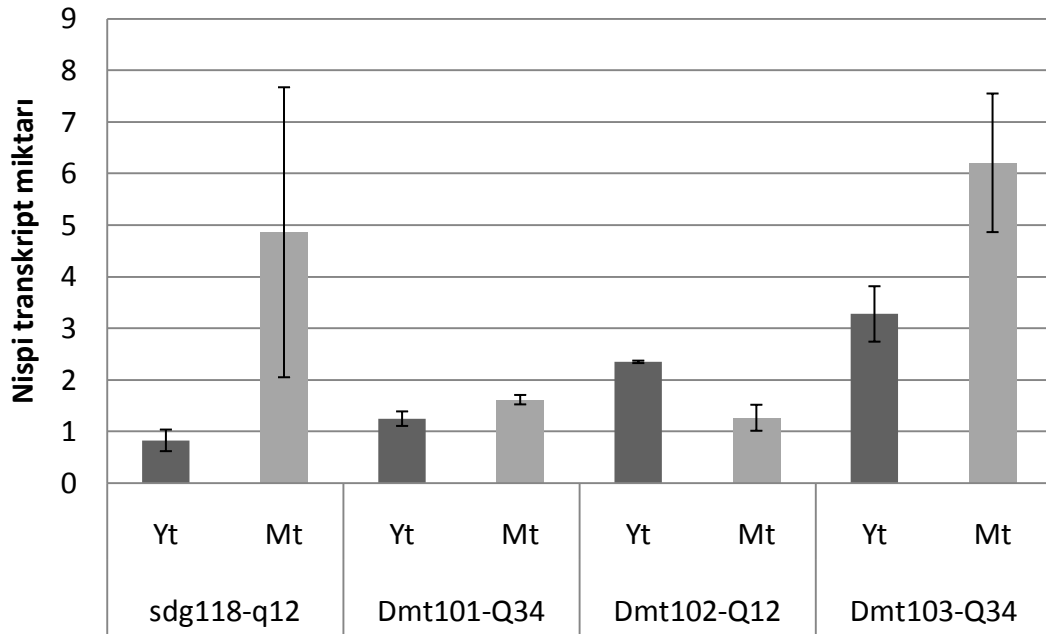
Şekil 3.24. Hat 39.1 yaprak genişliği (solda), alanı (ortada) ve hücre uzunluğu (sağda). \blacksquare Yt: yaban tip; \blacksquare Mt: mutant. n(Yt)=3, n(Mt)=7, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Hat39.1



Şekil 3.25. Hat39.1'in *SDG122* geninin suskunluk derecesi. X ekseninde Sdg122-qab transjeni, sdg-q34 endogeni, Y eksenine ise bu genlerin ekspresyon miktarını göstermektedir. ■Yt: Yabancı tip; ■Mt: mutant; n=3, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Hat39.1

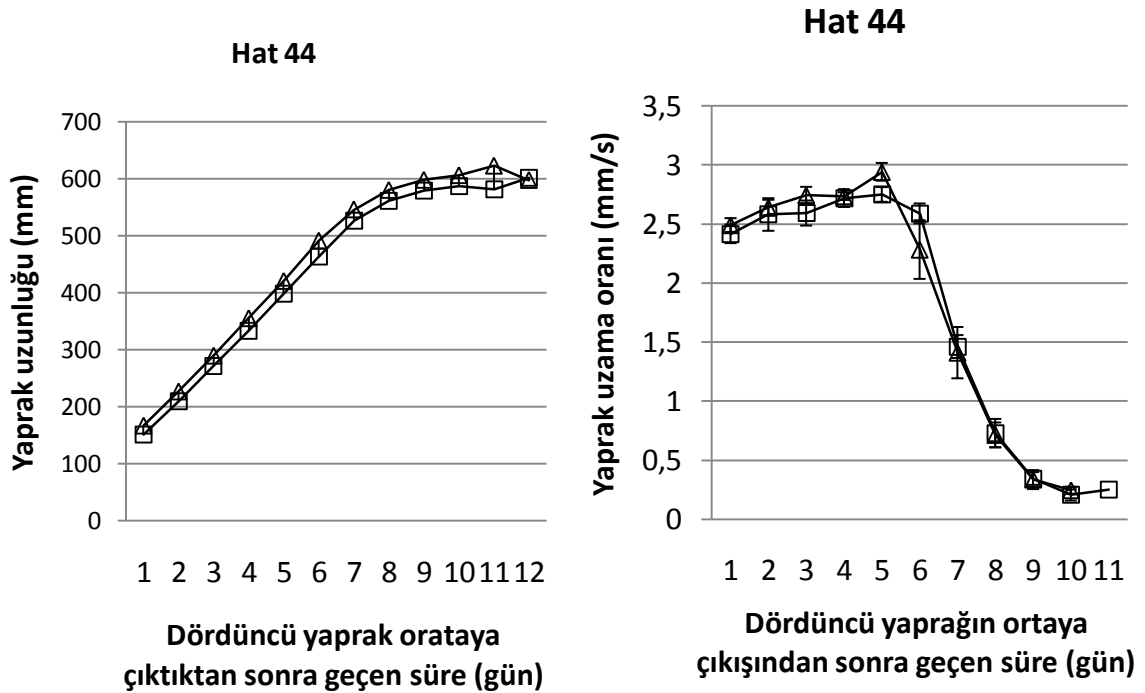


Şekil 3.26. Hat 39.1'in *SDG118*, *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin ekspresyonu. ■Yt: Yabancı tip; ■Mt: Mutant. n=3, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

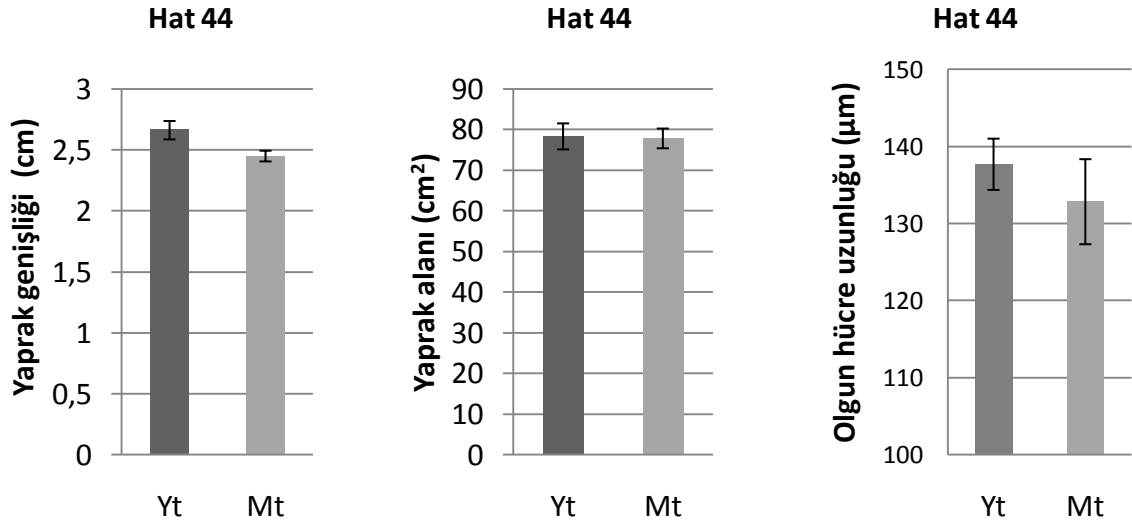
3.3.8. NÜKLEOZOM KONUMLANDIRICI GEN 102 (NFE102) Geninin Büyümedeki rolü

NÜKLEOZOM KONUMLANDIRICI GEN 102 (NFE102) geninin büyümedeki rolünü incelemek için RNAi tekniğiyle *NFE102* geni susturulmuş bir mutant hattı olan Hat44 kullanılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda, Hat 44'ün mutant ve yaban tip mısır fidelerinin yaprak uzunluk profil grafiğinin birbirine benzer şekilde büyüme eğrisi oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 3.27). Hat44'ün mısır fidelerinin yaprak uzunluğu ve yaprak uzama oranı bakımından mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı (Şekil 3.27).

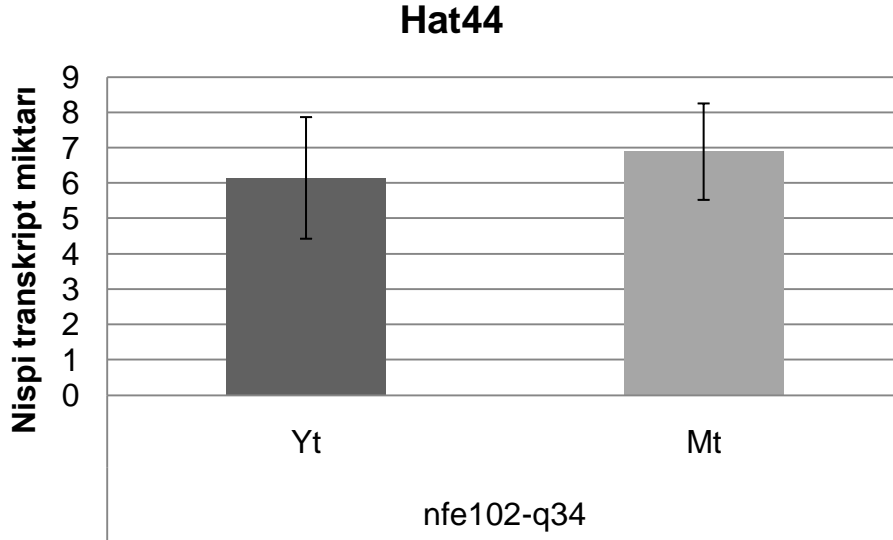
Hat44'ün mutant ve yaban tip mısır fidelerinin yaprak genişliği, alanı ve olgun hücre uzunluğu gibi fenotipik özellikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Şekil 3.28). Q-RT_PCR ile ekspresyon analizleri sonucuna göre, Hat44'ün yaban tip ve mutant mısır fidelerinin *NFE102* geninin ekspresyon miktarları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı (Şekil 3.29).



Şekil 3.27. Hat 44'ün yaprak uzunluğu (solda) ve yaprak uzama oranı (sağda). X eksenini 4. yaprağın ortaya çıkışından sonra geçen süreyi (solda ve sağda), Y eksenini mm cinsinden yaprak uzunluğunu (solda) ve yaprak uzama oranını (sağda) göstermektedir. \square -Yt: yaban tipi; \triangle -Mt: mutant. $n(Mt)=5$, $n(Yt)=7$; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

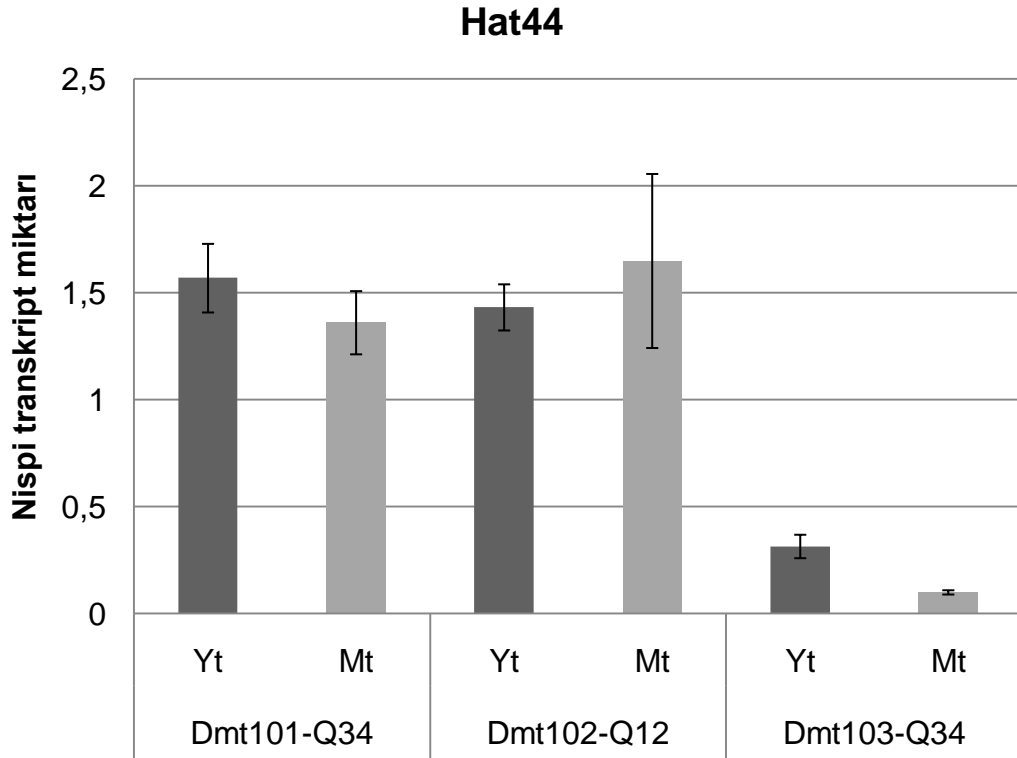


Şekil 3.28. Hat 44'ün yaprak genişliği (solda), alanı (ortada) ve hücre uzunluğu (sağda). ■ Yt: yaban tip; ■ Mt: mutant. n(Yt)=7, n(Mt)=5, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.29. Hat44'ün *NFE102* geninin suskunluk derecesi. X ekseninde nfe102-qab transgeni, nfe-q34 endogeni, Y eksenine ise bu genlerin ekspresyon miktarını göstermektedir. ■ Yt: Yaban tip; ■ Mt: mutant. n=3, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Q-RT_PCR ile ekspresyon analizleri sonucu, Hat44 mısır fidelerinde *DMT101* ve *DMT102* genlerinin transkript miktarlarının *DMT103*'e göre daha fazla olduğu ancak, bu genlerin ekspresyon miktarlarının yaban tip ve mutantlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede değişmediği saptandı (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. Hat 44'ün *DMT101*, *DMT102* ve *DMT103* genlerinin ekspresyonu. ■Yt: Yabancı tip; ■Mt: Mutant. n=3, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

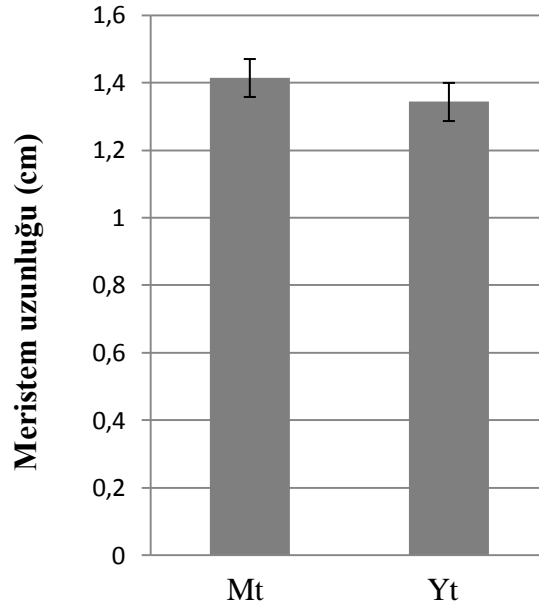
Buraya kadar yapılan çalışmalarda, 8 farklı kromatin geninin büyümedeki rolü, mutant ve yabancı tip mısır fidelerinin yaprak büyüme parametreleri arasında yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda belirlendi. Çalışmada kullanılan mutant hatların yaprak büyüme parametrelerine ait değerler yabancı tiplerle karşılaştırmalı olarak Tablo 3.1'de sunulmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda, *DMT103* geni RNAi tekniğiyle susturulmuş Hat05'in yaprak uzunluğunun mutantlarda yabancı tiplere kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede %8 oranında azaldığı saptandı. Ayrıca, mutantların yaprak uzama oranının yabancı tiplere göre istatistiksel olarak önemli derecede %12 oranında azaldığı belirlendi. Bu bulgular, Hat05'in mutant ve yabancı tip mısır fideleri arasında gözlenen büyüme farkının mutasyona uğrayan *DMT103* geninin sebep olduğuna işaret etmektedir. Bu sebeple, bundan sonraki çalışmalarda *DMT103* geninin büyümenin hangi işlevine etki ettiğini belirlemeye odaklanıldı.

Tablo 3.1. Mutant hatların yaprak fenotip parametreleri. Yt: Yaban tip; Mt: Mutant, Ortalama \pm Ss

Hat ismi		Yaprak genişliği (cm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak ayası uzunluğu (cm)	Olgun hücre uzunluğu (μ m)	Yaprak uzunluğu (mm)	Yaprak uzama oranı (mm/s)
Hat05	Mt	2.9 \pm 0.08	83 \pm 5	40 \pm 2	123 \pm 5	533 \pm 7	2.3 \pm 0.1
	Yt	2.6 \pm 0.04	80 \pm 3	44 \pm 1	138 \pm 2	579 \pm 6	2.7 \pm 0.1
Hat20	Mt	2.4 \pm 0.28	75 \pm 13	40 \pm 5	115 \pm 8		
	Yt	2.5 \pm 0.11	77 \pm 7	40 \pm 4	119 \pm 4		
Hat29	Mt	2.7 \pm 0.03	79 \pm 2	42 \pm 1	132 \pm 3	590 \pm 7	2.5 \pm 0.1
	Yt	2.5 \pm 0.03	76 \pm 2	42 \pm 1	135 \pm 3	599 \pm 13	2.6 \pm 0.1
Hat32	Mt	2.3 \pm 0.24	66 \pm 7	41 \pm 1	132 \pm 5		
	Yt	2.4 \pm 0.08	66 \pm 5	39 \pm 1	141 \pm 7		
Hat32.1	Mt	2.5 \pm 0.07	68 \pm 4	39 \pm 2	127 \pm 4		
	Yt	2.6 \pm 0.04	75 \pm 7	35	112		
Hat39	Mt	2.4 \pm 0.07	77 \pm 0	46 \pm 1	143 \pm 5	640 \pm 18	3.2 \pm 0.1
	Yt	2.4 \pm 0.05	76 \pm 3	44 \pm 1	147 \pm 6	635 \pm 7	3.1 \pm 0.1
Hat39.1	Mt	2.6 \pm 0.04	81 \pm 2	43 \pm 1	128 \pm 3	601 \pm 1	2.8 \pm 0.1
	Yt	2.6 \pm 0.08	86 \pm 6	44 \pm 2	140 \pm	622 \pm 4	3.1 \pm 0.1
Hat44	Mt	2.5 \pm 0.04	78 \pm 2	43 \pm 1	133 \pm 6	606 \pm 6	2.7 \pm 0.1
	Yt	2.7 \pm 0.08	78 \pm 3	41 \pm 1	138 \pm 3	588 \pm 5	2.6 \pm 0.1

3.4. Hat05'in Meristem Uzunluğu

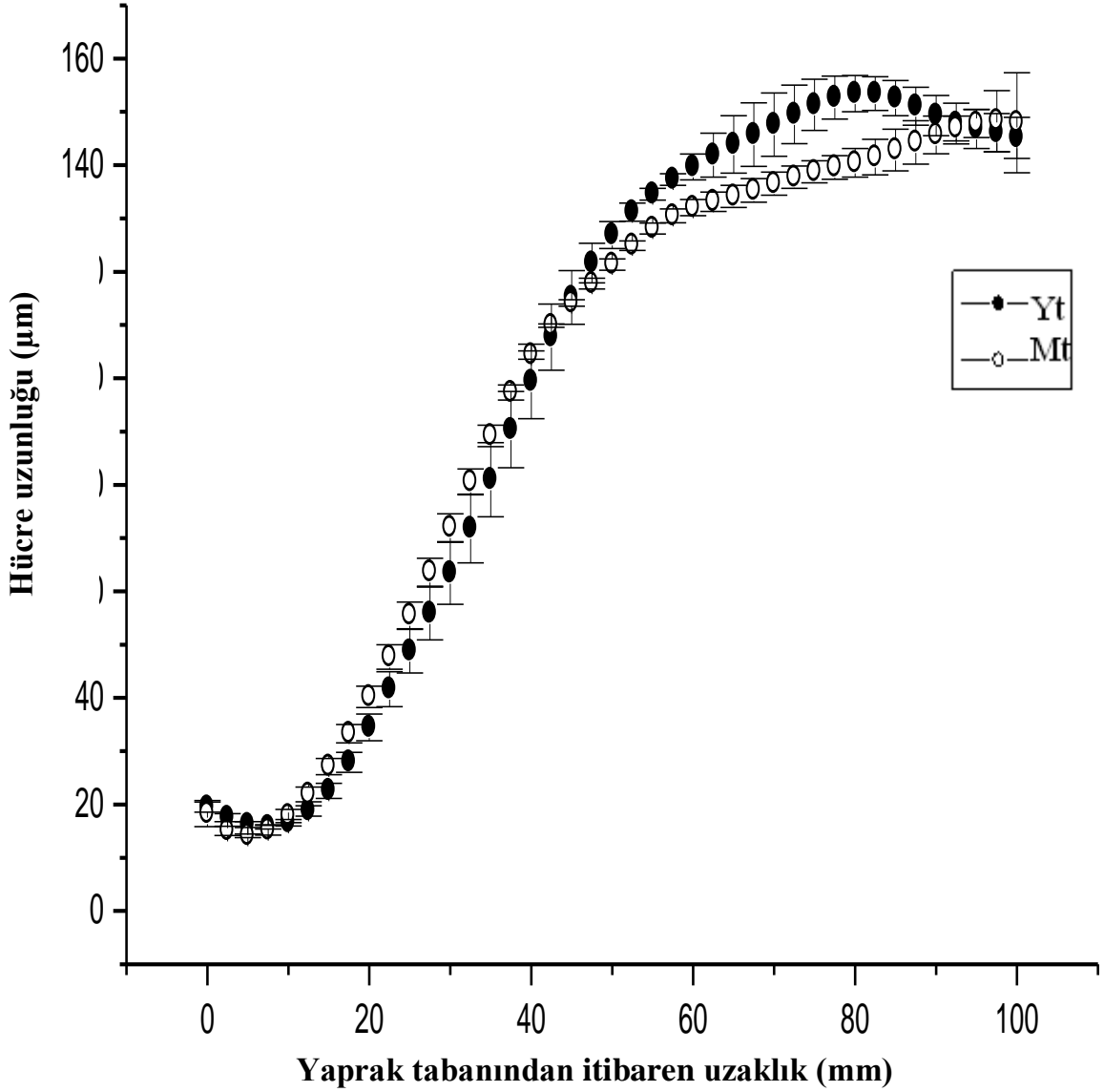
Meristem, yaprağın tabanında yer aldığından, Hat05'in meristem uzunluğu, yaprak tabanından itibaren 4 cm uzunluğunda bitki numunesi boyunca yer alan ve DAPI ile boyanarak belirgin hale gelen mitotik figürlerin bittiği son noktanın Floresans mikroskobu altında ölçülmesi ile belirlendi. Meristem uzunluğu yaban tiplerde 13438 ± 565 (μ m) ve mutantlarda 14148 ± 562 (μ m) olarak belirlendi ve Students's *t*-testine göre aralarındaki farkın önemsiz olduğu saptandı (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. Hat05'in meristem uzunluğu. Mt: mutant, Yt: yaban tip, n(Yt) = 7; n(Mt) = 8; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

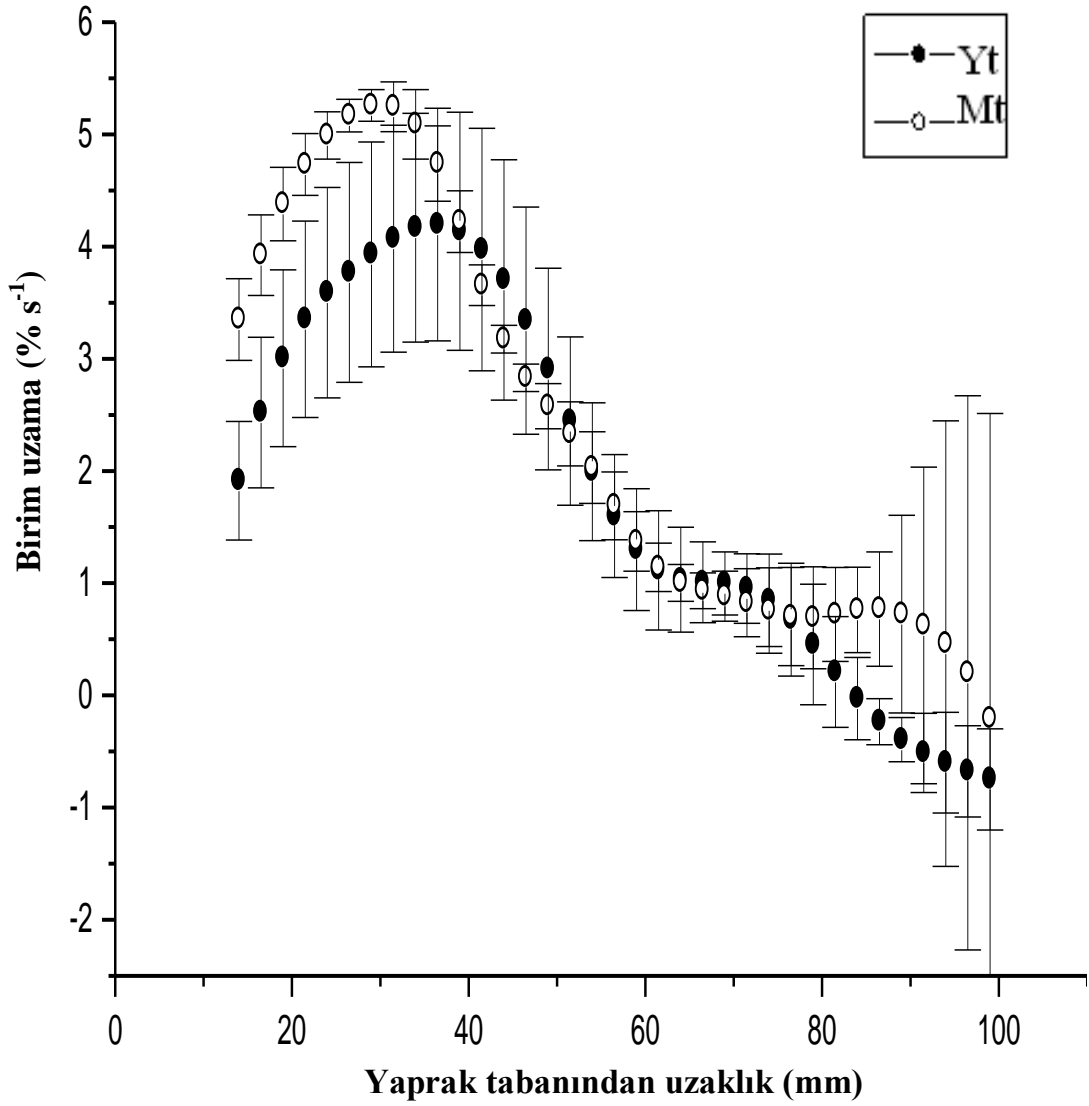
3.5. Hat05'in Hücre Uzunluğu Profili

DMT103 geni mutant olan Hat05'in olgun hücre boyunun istatistiksel olarak önemli derecede %8 oranında azaldığı tespit edildiğinden, mutasyonun büyüme bölgesi boyunca yer alan hücrelerin uzunluklarında herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığını incelemek üzere büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profili DIC mikroskobu ile yapılan gözlemler sonucunda belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, yaban tip ve mutant mısır fidelerinin dördüncü yapraklarının büyüme bölgelerinin hücre uzunluğu profilinin birbirine benzer şekilde büyüme eğrisine sahip olduğu gözlemlendi. Yaprak tabanından itibaren yaklaşık 2cm boyunca uzanan meristematik bölgede yer alan hücrelerin boylarının en küçük değerinde olduğu, 3cm'den 6cm'ye kadar uzama bölgesini içine alan kısımda hücrelerin logaritmik bir şekilde uzadığı, 7. ve 8. cm'ler itibariyle hücrelerin uzamasının yavaşladığı ve 10. cm'de uzamanın tamamen durarak hücrelerin olgun uzunluklarına ulaştığı görüldü (Şekil 3.32). Yapılan hesaplamalar sonucunda, meristem ve uzama bölgelerinde yer alan hücrelerin uzunluklarının ortalama değerleri arasında yaban tip ve mutantlarda istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı. Ancak, olgunlaşma bölgesinde bulunan hücrelerin uzunlukları, mutantlarda yaban tiplere kıyasla %8 oranında istatistiksel olarak önemli derecede ($p \leq 0.05$) azaldı.



Şekil 3.32. Hat05'in büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profili. Dördüncü yaprağın tabanından itibaren 100 mm uzunluğu boyunca yaprağın abaksial epidermisinde stoma sırasına bitişik hücreler ölçülmüştür. X eksenini yaprak tabanından uzaklığı, Y eksenini ise ilgili pozisyondaki hücre uzunluğunu göstermektedir. Siyah yuvarlaklar yabancı tipe, beyaz yuvarlaklar mutanlara aittir. Yapraklar arasında ortalama alabilmek için veriler 50 µm'lik aralıklarla materyal ve metodda anlatıldığı gibi smoothed ve interpolated işlemine tabi tutuldu. -●-Yt: yabancı tip; -○-Mt: mutant, n= 5, Ortalama ± Ss, Student's t-test, (p ≤ 0,05)

Hücre uzama oranlarını karşılaştırmaya yarayan bir diğer yöntem olan ve hücre uzunluğu profil grafiğinin türevi alınarak elde edilen birim uzama grafiği, mutasyon sonucu, uzama bölgesinde yer alan hücrelerin uzunluklarının etkilenmediğini gösterdi (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. Hat05'in birim hücre uzama profili. X eksenini yaprak tabanından uzaklığı, Y eksenini ise ilgili pozisyondaki hücrenin birim uzama miktarını göstermektedir. Siyah yuvarlaklar yaban tipe, beyaz yuvarlaklar mutanlara aittir. Grafik hücre uzunluğu profile grafiğinin türevi alınarak hesaplanmıştır. Ancak hesaplamalar yapılırken meristem bölgesine ait veriler kullanılmamalıdır. -●-Yt: yaban tip; -○-Mt: mutant, n=5, Ortalama ± Ss, Student's t-test, (p ≤ 0,05)

3.6. Hat05'in Yaprak Büyümesinin Sayısal Değerleri

Hat05 adlı RNAi mutant mısır hattının yaban tip ve mutant fidelerinin yaprak uzama oranları, meristem uzunlukları, olgun ve meristematik hücre uzunlukları belirledikten sonra hücre üretimi, hücre bölünme oranı, hücre döngüsü süresi, hücre uzama süresi ve oranı gibi

büyüme parametreleri materyal ve metot bölümünde sunulan matematiksel formüllerden oluşan kinematik analizler ile hesaplandı.

Hat05'in fenotipik analizleri sonucu, mutant fidelerde yaban tiplere kıyasla yaprak uzunluğunun %8, yaprak uzama oranının %12 ve olgun hücre uzunluğunun %8 oranında istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı tespit edildi. Bu verilerden yola çıkarak, yaprak uzama oranının olgun hücre uzunluğuna bölünmesiyle hesaplanan hücre üretiminin mutant ve yaban tip mısır fideleri arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir fark göstermediği saptandı (Tablo 3.2). Yine, DAPI ile nükleusların boyanması sonucu belirlenen meristem uzunluğunda ve DIC mikroskobu ile yapılan gözlemler sonucu belirlenen meristem hücre uzunluğunda, mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ortaya çıktı (Tablo 3.2). Dolayısıyla, meristem uzunluğunun meristematik hücre uzunluğuna bölünmesiyle elde edilen bölünen hücre sayısı farkının, mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlemlendi (Tablo 3.2). Hücre üretiminin meristemde bölünen hücre sayısına bölünmesiyle hesaplanan bölünme oranında ve bölünme oranının tersinin logaritması alınarak hesaplanan hücre döngüsü süresinde gözlenen farkın, mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Tablo 3.2). Ancak, olgun ve uzama bölgesinin hücre uzunluklarının \ln 'leri arasındaki farkın, hücre döngüsü süresine bölünmesiyle hesaplanan hücre uzama oranının, mutantlarda yaban tiplere nazaran istatistiksel olarak önemli derecede %13 oranında azaldığı saptandı (Tablo 3.2). Bir hücrenin uzama bölgesine ilk girişinden olgun uzunluğuna erişinceye kadar geçen süre olan uzama süresi, uzama bölgesinde bulunan hücre sayısının hücre üretim oranına bölünmesi ile hesaplandı ve mutant ve yaban tipler arasında fark göstermediği saptandı. Aynı şekilde, büyüme ve uzama bölgelerinin uzunluğunda ve burada bulunan hücre sayısında iki grup arasında görülen farkın, istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü. Meristemden uzama bölgesine geçmekte olan hücrelerin mutantlarda yaban tiplere oranla %16 daha uzun olduğu saptanırken, hücrelerin uzama bölgesinde geçirdikleri sürenin her iki grupta aynı olduğu saptandı (Tablo 3.2).

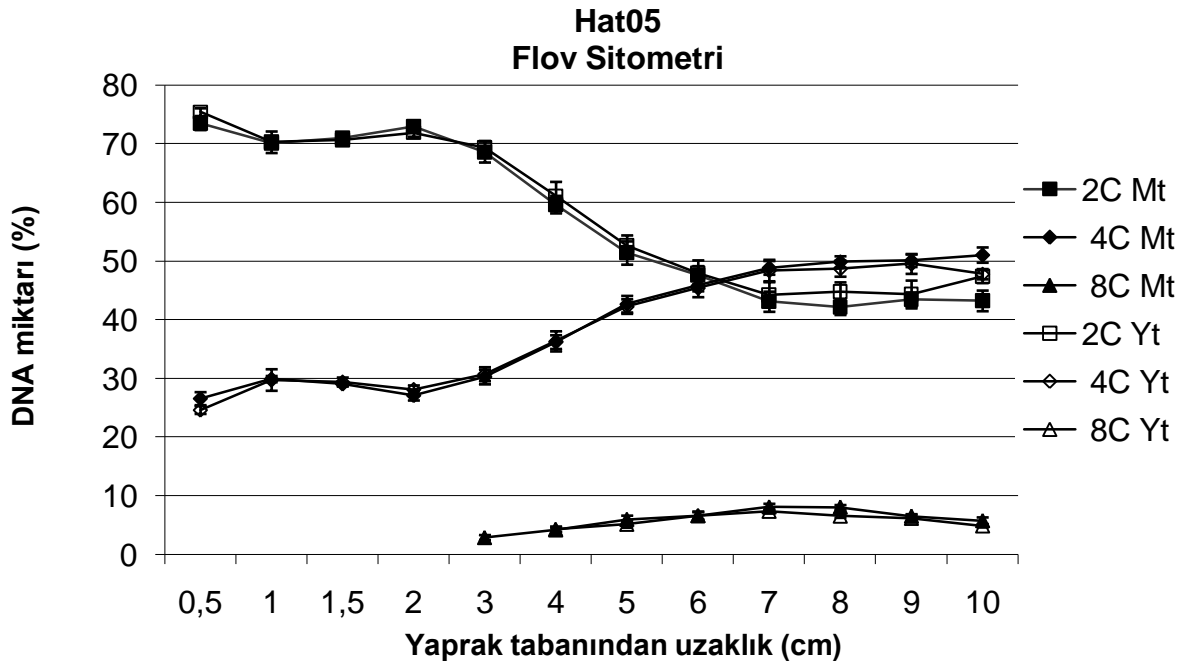
Tablo 3.2. Aynı büyüme şartlarında yetiştirilen Hat05'in yaban tip ve mutantlarının büyüme parametrelerinin karşılaştırılması

Büyüme parametreleri	Yaban tip	Mutant	">%Fark	t_değeri
^a Yaprak uzunluğu (mm)	579 ± 5	533 ± 7	-8 (**)	0.0001
^a Yaprak uzama oranı (mm/s)	2.62 ± 0.09	2.32 ± 0.06	-12 (*)	0.02
^b Olgun hücre uzunluğu (µm)	151 ± 2	139 ± 2	-8 (**)	0.0003
^a Meristem hücre uzunluğu (µm)	17,1 ± 0,3	16.9 ± 0,6	-2 NS	0.8
Hücre üretimi (hücre/s)	17.5 ± 0.6	16.7 ± 0.5	-4 NS	1.00
Bölünme oranı (hücre/hücre s)	0.022 ± 0.0002	0.020 ± 0.0001	-9 NS	0.06
Hücre döngüsü süresi (s)	32 ± 0.4	35 ± 0.3	9 NS	0.06
^c Meristem uzunluğu (µm)	13438 ± 565	14148 ± 562	5 NS	0.9
Büyüme bölgesinin uzunluğu (µm)	71430 ± 4574	77537 ± 5329	8 NS	0.4
Uzama bölgesinin uzunluğu (µm)	57249 ± 4574	63389 ± 5329	10 NS	0.4
Hücre uzama oranı	0.042± 0.001	0.037± 0.001	-13 (*)	0.03
Büyüme bölgesinin hücre sayısı	1643 ± 62	1650 ± 79	NS	0.8
Meristemin hücre sayısı	799 ± 31	840 ± 27	5 NS	0.5
Uzama bölgesinin hücre sayısı	844 ± 59	810 ± 54	-4 NS	1.0
Hücre uzama süresi	50 ± 4	49 ± 3	2 NS	0.8
Meristemin sonundaki hücre uzunluğu (µm)	20 ± 1	24 ± 1	16 NS	0.1

^a Ortalama ± Ss; n=5; ^b Ortalama ± Ss; n=8; 4'ü birinci, 4'ü ikinci deneyden; ^c Ortalama ± Ss; n=3 ikinci, n=5 üçüncü, n=2 ikinci deneyden, n=5 yaban tip numune üçüncü deneyden; * İstatistiksel önem derecesi Student's t-Test (İki numunenin eşit varyansa sahip olduğu varsayılmıştır)'ine göre. (*), P ≤ 0.05; (**) P ≤ 0.01; NS Önemsiz

3.7. Hat05'in Hücre Döngüsünün İlerleyişi

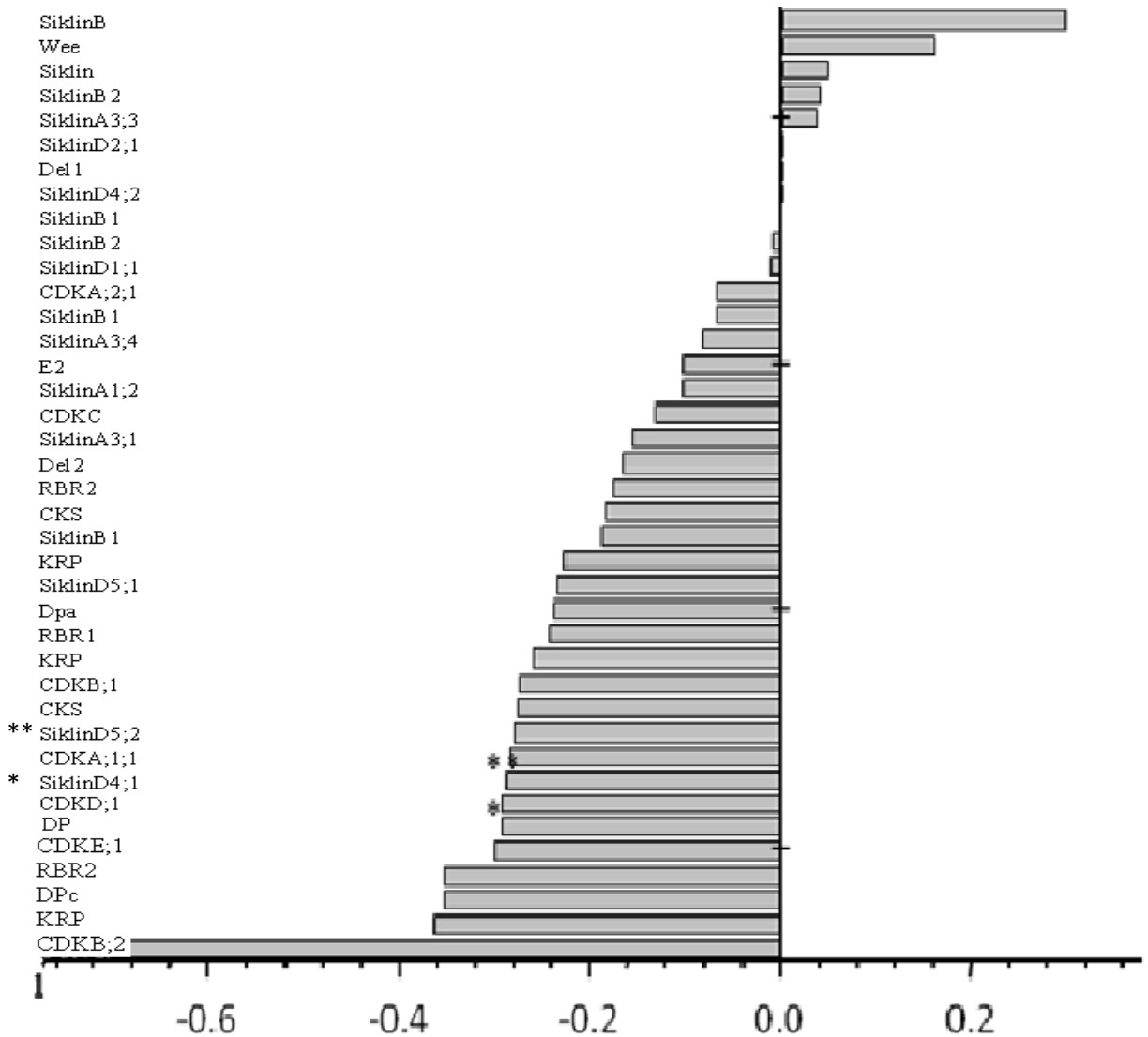
DMT103 geni mutant olan Hat05'in hücre döngüsü safhalarında herhangi bir gecikmenin olup olmadığını belirlemek için bitkinin büyüme bölgesini kapsayan yaprak tabanından itibaren 10 cm kadar kısım hasat edilerek büyüme bölgesi boyunca yer alan hücrelerin sahip olduğu DNA miktarları flow sitometri analizleri ile belirlendi. Analizler sonucunda, mutant ve yaban tip fidelerin büyüme bölgeleri boyunca yer alan hücrelerinin DNA miktarları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark meydana gelmediği, yaprak tabanından itibaren 2cm içerisinde bulunan hücrelerin yaklaşık %70'in haploid DNA (2C)'ya, %30'unun tetraploid DNA (4C)'ya sahip olduğu görüldü (Şekil 3.34). Ayrıca, mutantlarda 3. cm'den ve yaban tiplerde 4. cm'den itibaren endodüplikasyon başladığı gözlemlendi (Şekil 3.34).



Şekil 3.34. Hat05'in dördüncü yaprağının büyüme bölgesi boyunca yer alan hücrelerin nüklear DNA miktarı. Analizler Flov sitometri ile yapılmıştır. X eksenini yaprak tabanından itibaren uzaklığı, Y eksenini ise ilgili pozisyonda bulunan hücrelerin DNA miktarı oranlarını göstermektedir. 2C: Haploid DNA; 4C: Tetraploid DNA; 8C: Oktaploid DNA. Siyah semboller mutantları, beyaz semboller yaban tipleri göstermektedir. Yt: yaban tip; Mt: mutant, n=5; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

3.8. Hat05'in Hücre Döngüsü Genlerinin Ekspresyon Profili

DMT103 geni mutant olan Hat05'in hücre döngüsü safhalarında herhangi bir gecikmenin olup olmadığını moleküler seviyede belirlemek için Hat05'in dördüncü yaprağının meristeminde, 39 adet hücre döngüsü geninin Q-RT_PCR ile ekspresyon miktarları belirlendi. Sonuçlara göre, *CDKA;1;1* ve *CDKD;1* genlerinin transkript miktarlarının mutantlarda yaban tip fidelere nazaran istatistiksel olarak 2 kat azaldığı saptandı ($P \leq 0.05$) (Şekil 3.35).

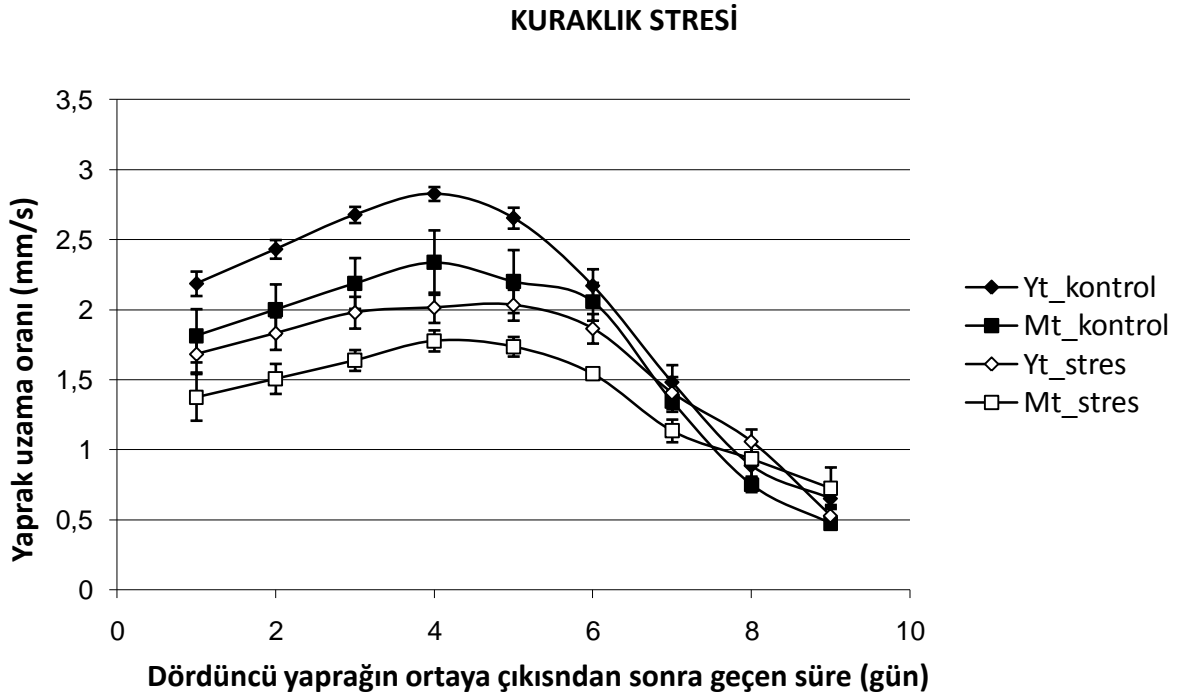


Şekil 3.35. Hat05'in 4. yaprağının meristeminde hücre döngüsü genlerinin ekspresyon miktarı. X eksenini mutant ve yaban tipler arasında görülen ekspresyon farkını göstermektedir. Veriler *CYCLOPHLLIN* ve *EF1A* genlerine göre qBase program ile normalize edildi. n=3; Ort.±Ss, Student's t-test, (**): $p \leq 0.05$; (*): $p \leq 0.01$

3.9. DMT103 Geninin Abiyotik Strese Cevaptaki Rolü

3.9.1. DMT103 Geninin Kuraklık Stresindeki Rolü

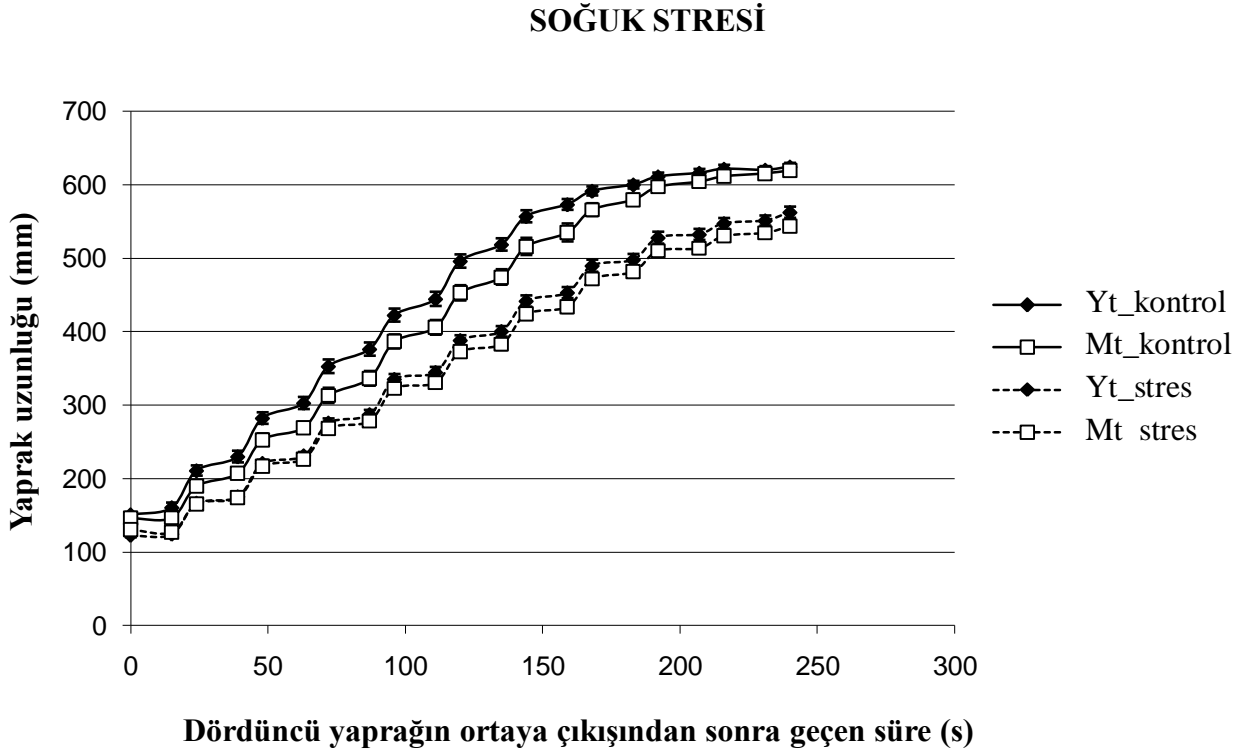
Hat05'in yaban tip mısır fidelerinin yaprak uzama oranı kuraklık stresi sonucu % 26'lık azalış gösterirken mutantların yaprak uzama oranının % 24 oranında azaldığı saptandı (Şekil 3.36). Kontrol şartları altında yetişen mutant mısırların yaprak uzama oranlarında yaban tiplere oranla % 18 oranında azalış saptandı. Kuraklık stresi altında yetiştirilen mutant mısırların yaprak uzama oranlarında yaban tiplere oranla % 17 oranında azalış saptandı. Sonuç olarak kuraklık stresine maruz bırakılan Hat05'in büyümesinin olumsuz olarak etkilendiği ancak mutant mısırlar yaban tipleri ile kıyaslandığında kontrol ve kuraklık şartları altında aynı büyüme profiline sahip olduğu görüldü.



Şekil 3.36. Hat 05'in kuraklık stresi altında yaprak uzama oranı. Yt_kontrol ve Mt_kontrol: sırasıyla kontrol grubunun yaban tip ve mutantları; Yt_stres ve Mt_stres: sırasıyla kuraklık stresine maruz bırakılan yaban tip ve mutantları göstermektedir. X eksen 4. Yaprak ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksen mm cinsinden yaprak uzunluğunu göstermektedir. —◆— Yt_kontrol(n)=12; —■— Mt_kontrol(n)=8; —◇— Yt_stres(n)=13; —□— Mt_stres(n)=7; Ort. ± Ss, Student's t-test, (p ≤ 0,05)

3.9.2. DMT103 Geninin Üşüme Stresindeki Rolü

Hat05'in gece düşük sıcaklık şartları altında yetiştirilmesi sonucu, stres şartlarında yetiştirilen mısır fidelerinin yaprak uzunluklarının kontrol grubundakilere nazaran büyüme grafiğinde 2 gün daha geç platoya ulaştıkları saptandı (Şekil 3.37).

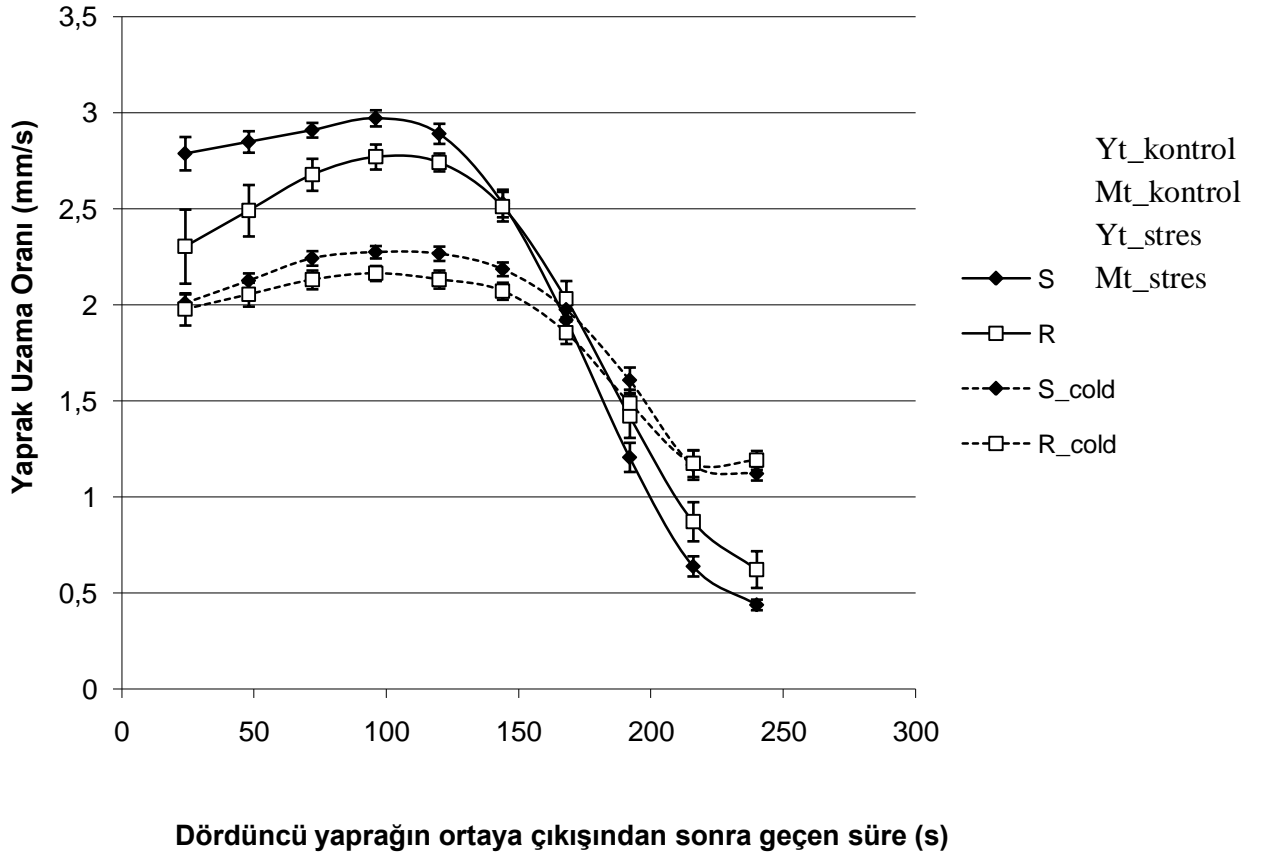


Şekil 3.37. Hat 05'in Üşüme stresi altında yaprak uzunluğu. Yt_kontrol ve Mt_kontrol: sırasıyla kontrol şartlarında yetiştirilen yaban tip ve mutantları; Yt_stres ve Mt_stres: sırasıyla Üşüme stresi maruz bırakılan yaban tip ve mutantları göstermektedir. X eksen 4. Yaprak ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksen mm cinsinden yaprak uzunluğunu göstermektedir. —◆— Yt_kontrol(n)=14; —□—Mt_kontrol(n)=6; ---◆--- Yt_stres(n)=8; ---□--- Mt_stres(n)=8; Ortalama ± Ss, Student's t-test, (p ≤ 0,05)

Hat 05'in Üşüme stresi maruz kalması sonucu yaban tip mısırların yaprak uzama oranında %31, mutantlarda ise %27 oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalış meydana geldiği saptandı (Şekil 3.38). Ayrıca yaprakların son boyu stres sonucu yaban tip mısırlarda %10 ve mutant mısırlarda %13 oranında azaldı. Kontrol şartlarında yetiştirilen mutant mısırların yaprak uzama oranlarının yaban tiplere nazaran istatistiksel olarak önemli derecede %9 oranında azaldığı saptandı. Ancak, yaprak uzama oranında meydana gelen bu

farkın, üşüme stresi uygulanan mutant ve yabancı tip mısır fideleri arasında kaybolduğu gözlemlendi. Sonuçlara göre, kontrol şartlarında Hat 05'e ait mutant mısır fidelerinde yabancı tiplere nazaran büyüme gecikmesi meydana gelirken, üşüme stresi altında bu farkın kaybolduğu saptandı. Bu durumu teyit etmek için kinematik analizlere başvuruldu. Bu sebeple, üşüme stresine maruz bırakılan mısırların meristem uzunluğu, büyüme bölgesinde yer alan hücrelerin uzunluk profili ve hücre büyümesinin sayısal sonuçları belirlendi.

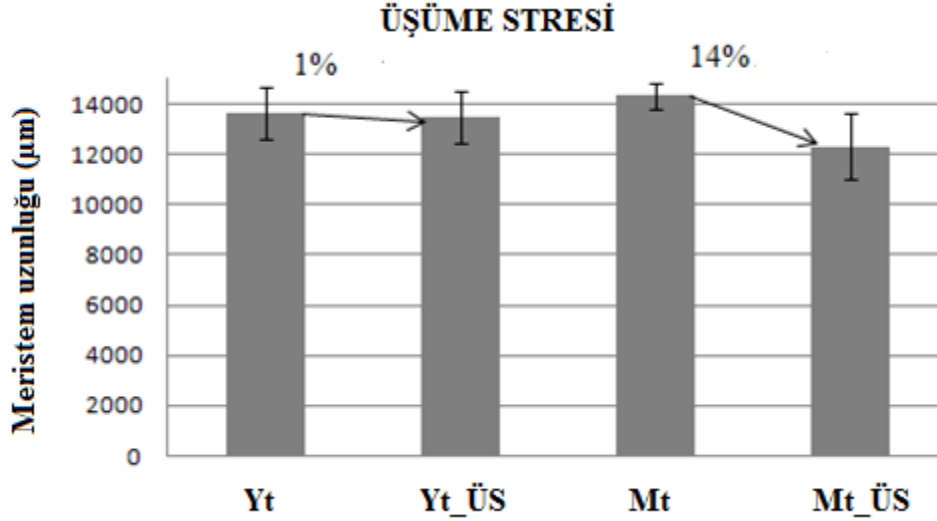
SOĞUK STRESİ



Şekil 3.38. Hat 05'in üşüme stresi uygulaması sonucu fotoperiyod büyüme sürecinde kaydedilen yaprak uzama oranı. Yt: kontrol şartlarında yetiştirilen yabancı tip, Mt: kontrol şartlarında yetiştirilen mutant, Yt_stres: üşüme stresine maruz bırakılan yabancı tip, Mt_stres: üşüme stresine maruz bırakılan mutant mısırları göstermektedir. X eksenini 4. Yaprak ortaya çıkışından sonra geçen süreyi, Y eksenini mm cinsinden yaprak uzunluğunu göstermektedir. —◆— Yt_kontrol(n)=14; —□— Mt_kontrol(n) =6; ---◆--- Yt_stres(n)= 8; ---□--- Mt_stres(n)=8; Ortalama ± Ss, Student's t-test, (p ≤ 0,05)

3.9.2.1. Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen Hat05'in Meristem Uzunluğu

Üşüme stresine maruz bırakılan *DMT103* geni mutant olan Hat05'in meristem uzunluğunun stresten etkilenmediği saptandı (Şekil 3.39).



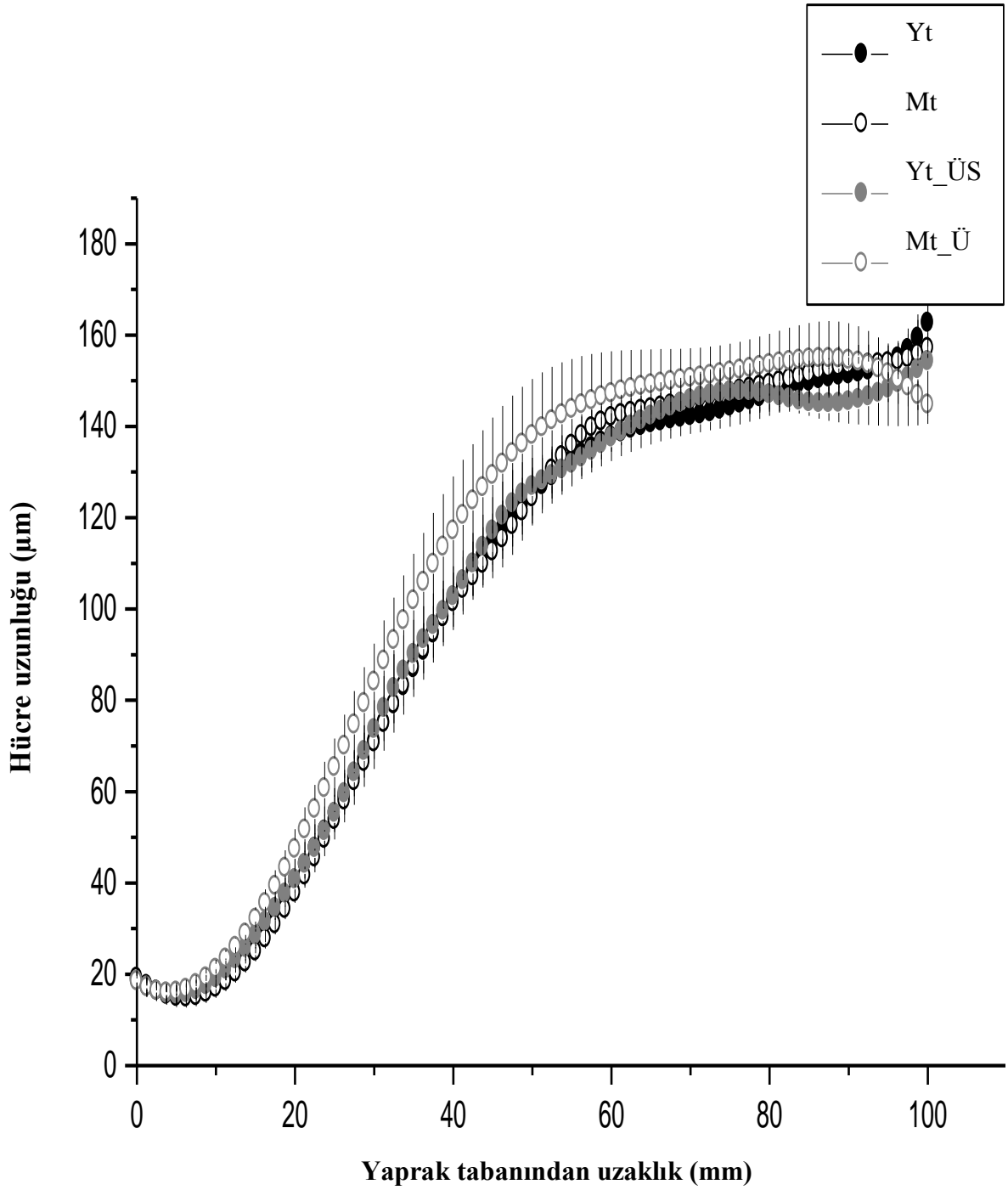
Şekil 3.39. Kontrol ve üşüme stresi şartlarında yetiştirilen Hat05'e ait meristem uzunluğu. $n(Yt) = 3$; $n(Mt) = 3$; $n(Yt_ÜS) = 3$; $n(Mt_ÜS) = 3$; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

3.9.2.2. Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen Hat05'in Hücre Uzunluğu Profili

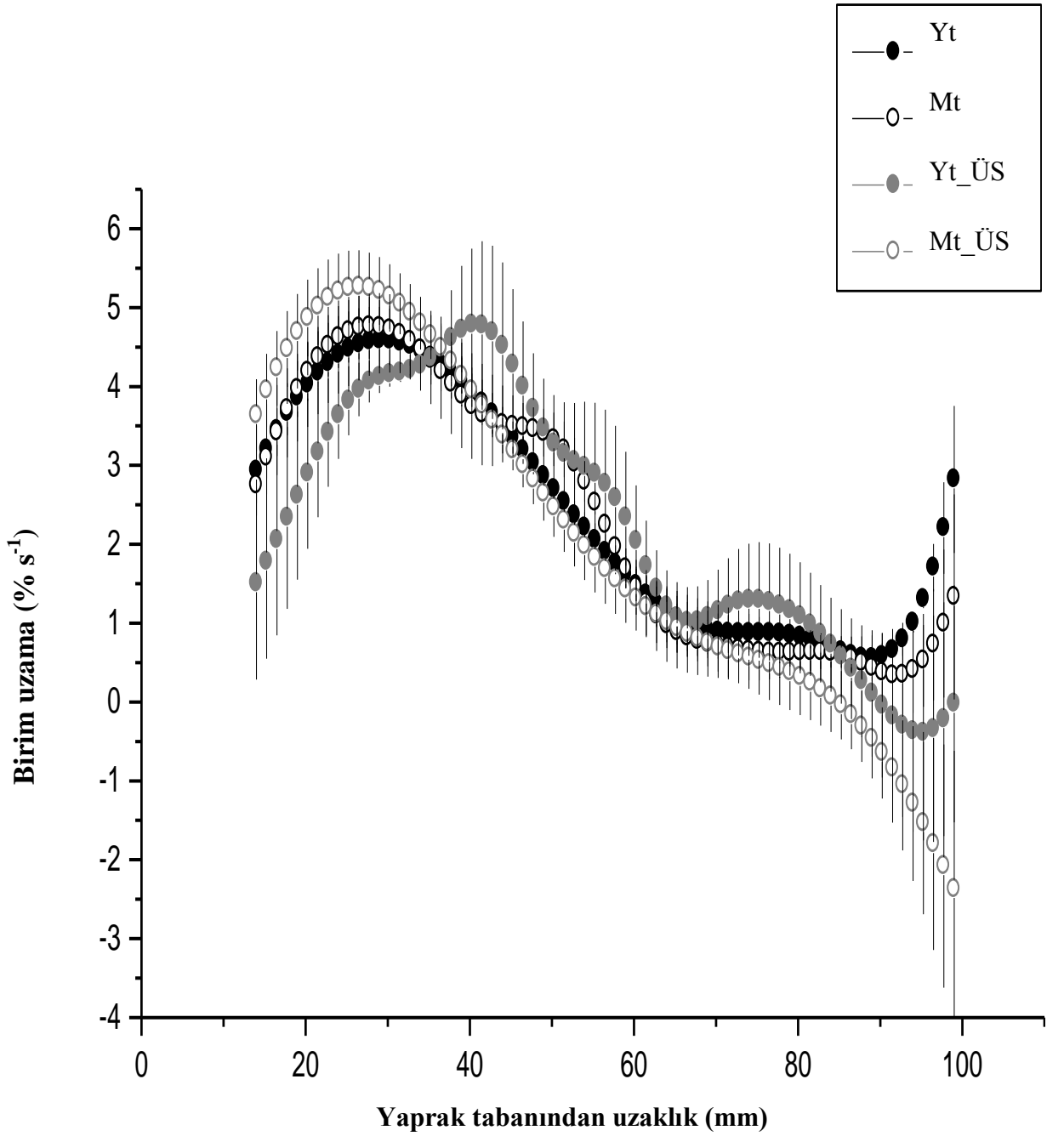
Üşüme stresine maruz bırakılan Hat05'in kontrol ve stres şartlarında kaydedilen hücre uzunluğu profillerinde ve birim uzama grafiğinde mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı saptandı (Şekil 40; Şekil 41).

3.9.2.3. Üşüme Stresi Altında Yetiştirilen Hat05'in Büyüme Parametreleri

Üşüme stresine maruz bırakılan Hat05'in kontrol ve stres şartlarında kaydedilen büyüme parametrelerinde mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı saptandı (Tablo 3.3).



Şekil 3.40. Hat05'in Üşüme stresi altında büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profili. Dördüncü yaprağın tabanından itibaren 100 mm uzunluğu boyunca yaprağın abaksial epidermisinde stoma sırasına bitişik hücreler ölçülmüştür. X eksenini yaprak tabanından uzaklığı, Y eksenini ise ilgili pozisyondaki hücre uzunluğunu göstermektedir. Siyah semboller kontrol, gri semboller stres gruplarına aittir. İçi dolu semboller yaban tipi, içi boş olanlar mutanlara aittir. Yapraklar arasında ortalama alabilmek için veriler 50 µm'lik aralıklarla materyal ve metodda anlatıldığı gibi smoothed ve interpolated işlemine tabi tutuldu. n=3, Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.41. Hat05'in Üşüme stresi altında birim hücre uzama profili. X eksenini yaprak tabanından uzaklığı, Y eksenini ise ilgili pozisyondaki hücrenin birim uzama miktarını göstermektedir. Siyah semboller kontrol, gri semboller stres gruplarına aittir. İçi dolu semboller yaban tipe, içi boş olanlar mutantlara aittir. Grafik hücre uzunluğu profile grafiğinin türevi alınarak hesaplanmıştır. Ancak hesaplamalar yapılırken meristem bölgesine ait veriler kullanılmamalıdır. n=3, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Tablo 3.3. Üşüme stresine maruz bırakılan Hat05'in yaban tipleri ve mutantlarına ait büyüme parametreleri. K: Kontrol; ÜS: Üşüme stresi

^a Büyüme parametreleri		Yaban tip	Mutant	% fark	t değeri
^b Yaprak uzunluğu (mm)	K	626 ± 3	618 ± 1	-1	0.05
	ÜS	573 ± 5	531 ± 4	-6	0.008*
Yaprak uzama oranı (mm/s)	K	2.78 ± 0.03	2.52 ± 0.03	-9	0.0003*
	ÜS	1.92 ± 0.06	1.84 ± 0.20	-4	0.13
Olgun hücre uzunluğu (µm)	K	149 ± 6	146 ± 4	2	0.61
	ÜS	147 ± 5	154.05 ± 5	4	0.38
Meristem hücre uzunluğu (µm)	K	18 ± 0.6	17 ± 0.5	-5	0.36
	ÜS	18 ± 0.7	18 ± 0.5	-2	0.66
Hücre üretimi (hücre/h)	K	19 ± 0.3	17 ± 0.3	-7	0.0001*
	ÜS	13 ± 0.2	12 ± 0.4	-7	0.11
Bölünme oranı (hücre/hücre s)	K	0.025 ± 0.001	0.020 ± 0.001	-18	0.00001*
	ÜS	0.0168 ± 0.0003	0.0162 ± 0.0003	-3	0.15
Hücre döngüsü süresi (s)	K	29 ± 0.5	34 ± 0.6	15	0.00004*
	ÜS	42 ± 0.7	46 ± 1.7	9	0.06
Meristem uzunluğu (µm)	K	13608 ± 1047	14333 ± 511	5	0.58
	ÜS	13458 ± 1015	12317 ± 1296	-8	0.53
Büyüme bölgesi uzunluğu (µm)	K	86117 ± 782	87733 ± 3340	2	0.68
	ÜS	79508 ± 12528	72975 ± 10908	-8	0.71
Uzama bölgesi uzunluğu (µm)	K	72508 ± 782	73400 ± 3340	1	0.82
	ÜS	66050 ± 12528	60658 ± 10908	-8	0.76
Meristemdeki hücre sayısı	K	778 ± 84	854 ± 21	9	0.47
	ÜS	771 ± 45	785 ± 8	2	0.79
Uzama bölgesinin hücre sayısı	K	853 ± 22	853 ± 5	-0.01	1.00
	ÜS	801 ± 86	629 ± 121	-21	0.32
Büyüme bölgesinin hücre sayısı	K	1632 ± 106	1707 ± 25	4	0.55
	ÜS	1572 ± 90	1414 ± 127	-10	0.27
Hücre uzama süresi	K	46 ± 1.2	49 ± 0.3	7	0.09
	ÜS	63 ± 6.8	53 ± 10.2	-15	0.49
Ortalama hücre uzama oranı	K	0.039 ± 0.001	0.035 ± 0.001	-10	0.91
	ÜS	0.029 ± 0.004	0.037 ± 0.007	20	0.67

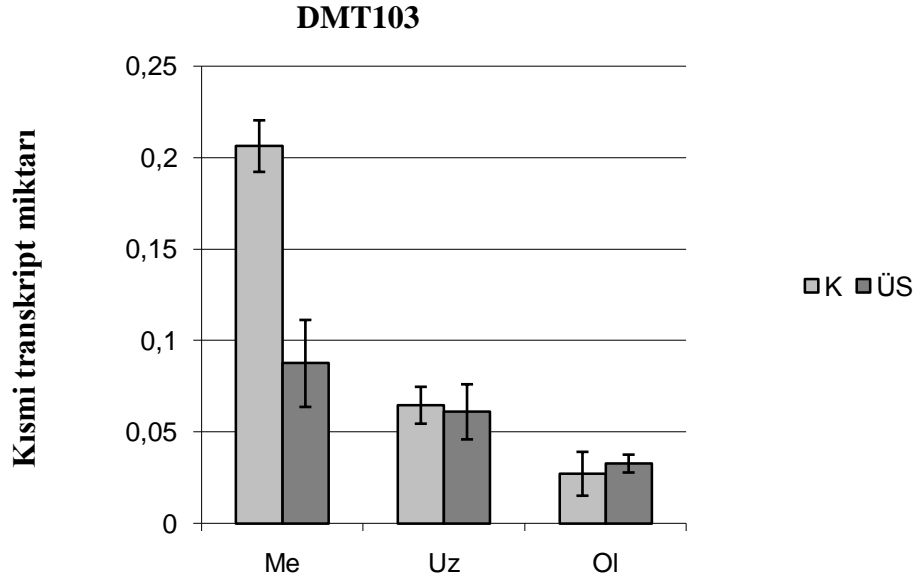
Tablo 3.3'ün devamı

Meristem sonunda hücre uzunluğu	K	24.7± 0.89	23.5 ± 0.69	-5	0.96
	ÜS	24.5 ± 1.16	25.1± 0.67	2	0.98

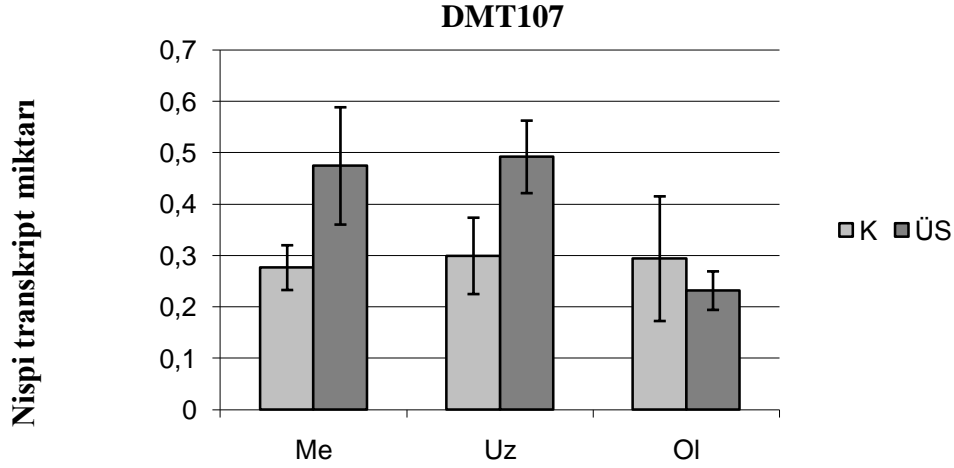
^aOrtalama±Ss; n=3; ^bBirinci deney verileri; *Student's t-Test önem değeri (İki grup eşit varyansa sahip olduğu varsayıldı); NS=önemsiz

3.9.2.4. Üşüme Stresi Altında *DMT103* ve *DMT107* Genlerinin B73 Fidelerinde Ekspresyonu

Üşüme stresine maruz bırakılan yaban tip mısırlarda farklı büyüme evreleri boyunca *DMT03* ve *DMT107* geninin ekspresyon miktarı Q-RT_PCR ile belirlendi. Sonuçlara göre *DMT103* geninin kontrol şartlarında meristemde yüksek miktarda sentezlendiği ve gelişim süreci boyunca ekspresyonun düştüğü saptandı (Şekil 3.42). Ayrıca, *DMT103* geninin ekspresyonunun stres altındaki mısırlarda azaldı. *DMT10* geni ise kontrol şartlarında gelişim süreci boyunca aynı oranda ekspreslenirken, stres altında meristem ve uzama bölgelerinde ekspresyonu artı (Şekil 3.42; Şekil 3.43).



Şekil 3.42. Üşüme stresi altında yetiştirilen B73 fidelerinde *DMT103* geninin gelişim süresince ekspresyonu. Me: Meristem; Uz: Uzama bölgesi; Ol: Olgunlaşma bölgesi; □K: Kontrol; ■ÜS: Üşüme stresi. n=3; Ortalama ± Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.43. Üşüme stresi altında yetiştirilen B73 fidelerinde *DMT107* geninin gelişim süresince ekspresyonu. Me: Meristem; Uz: Uzama bölgesi; Ol: Olgunlaşma bölgesi; □K: Kontrol; ■ÜS: Üşüme stresi. n=3; Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

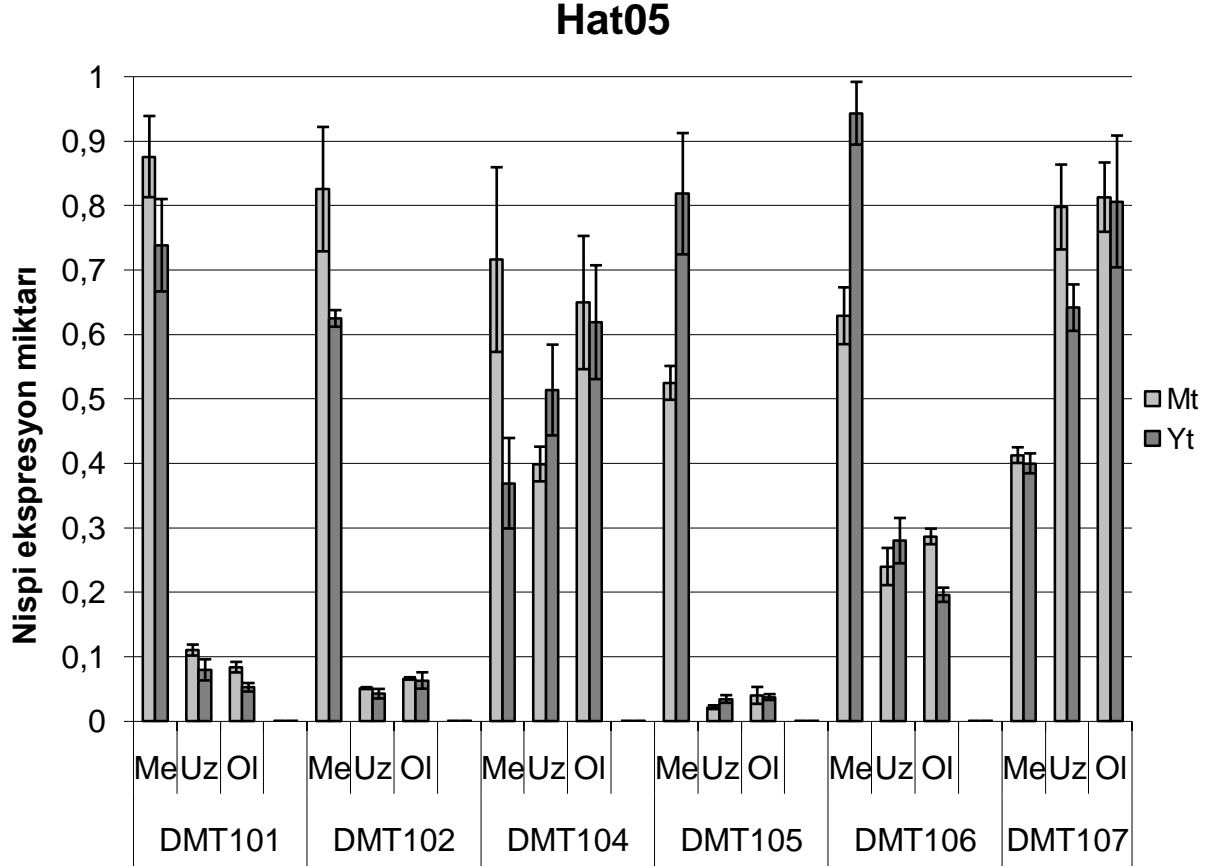
3.10. Hat05'in DMT Ailesine Ait Genlerin Ekspresyonu

DMT103 geni mutant olan Hat05'de yedi üye ile temsil edilen ve kısaca *DMT101*, *DMT102*, *DMT103*, *DMT104*, *DMT105*, *DMT106* ve *DMT107* olarak adlandırılan DNA Metiltransferaz ailesine ait genlerin, büyüme evreleri boyunca ekspresyon profilleri, Q-RT_PCR analizleri ile belirlendi. Sonuçlar *DMT101*, *DMT102*, *DMT105* ve *DMT106* genlerinin ekspresyonunun meristemde en yüksek seviyede olduğunu ve gelişim süresince azaldığını gösterdi (Şekil 3.43). *DMT104* geninin ise gelişim süresi boyunca sabit oranda ekspreslendiği görüldü (Şekil 3.43). *DMT107*'nin ise meristemde, uzama ve olgunlaşma evrelerinden daha fazla ifade olduğu belirlendi (Şekil 3.43). *DMT102* geninin mutantlarda yaban tiplere kıyasla meristemde önemli derecede %32 oranında, *DMT104* geninin ise %50 oranında daha fazla ve *DMT105* geninin ise mutantlarda yaban tip fidelere kıyasla %56 oranında daha az ifade oldu(3.43).

3.11. *DMT103* geninin kök gelişimindeki rolü

DMT103 geninin kök gelişiminde bir rol alıp almadığını belirlemek için Hat05 kağıt rulo sisteminde yetiştirildi. Dikimden on gün sonra mısır fidelerinin kökleri kesildi, resimleri tarandı ve görüntü analizatörü sayesinde kök uzunlukları belirlendi. Kök

sayısında mutant ve yaban tipler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi (Tablo 3.4). Primer kökün ise mutantlarda yaban tiplere kıyasla önemli derecede %15 oranında kısaldığı fakat lateral köklerin değişmediği saptandı. Seminal köklerin ise mutantlarda yaban tiplere oranla % 12 oranında kısaldığı saptandı. Kök yoğunluğunun ise değişmediği saptandı.



Şekil 3.44. Hat05'in mutant ve yaban tiplerinin büyüme evreleri boyunca DMT genlerinin ekspresyonu. Veriler *18S RRNA*, *ACTİN*, *CYCLOPHİLİN*, *EF1A*, *GADPH* genlerine göre qBase program yardımıyla normalize edilmiştir. Uz: Uzama bölgesi; Ol: Olgunlaşma bölgesi; □Mt: Mutant; ■Yt: Yaban tip. n=3, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

Tablo 3.4. Hat05'in kök sayısı

		Primer kök	Seminal kök	Taç kök 1.halka	Taç kök 2.halka
Hat05	Yaban tip	1	2.8 ± 0.2	3.9 ± 0.09	2 ± 0.3
	Mutant	1	3 ± 0.2	4	2.5 ± 0.7

n= 5, Ortalama \pm Ss, Student's t-test, ($p \leq 0,05$)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, mısır bitkisinin büyümesini düzenleyen yeni bir gen tanımlanarak bu genin hangi büyüme parametrelerini etkilediği, büyüme işlevlerinin hangisinde ve ne şekilde rol aldığı, bu işlevlerin öncelikle sorumlu olduğu olayları ve bu genin kuraklık ve soğuk stresi gibi büyüme inhibisyonuna yol açan çevresel streslere karşı bitkiye bir direnç sağlayıp sağlamadığı hücresel ve moleküler seviyede araştırılmıştır. Bu bağlamda, mısır fidelerinin yapraklarının farklı gelişim evrelerine ait genom çaplı ekspresyon profillerini gösteren mikrodizi analizleri incelendiğinde, meristematik evreden uzama evresine geçiş sırasında kromatin modifiye genlerinin bir rolü olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, mutantları mevcut olan farklı 10 mısır hattı temin edilerek yaprak uzunluğu, uzama oranı (YUO), alanı, olgun hücre uzunluğu gibi fenotipik ve mikroskobik, genlerin suskunluk derecesi ise moleküler olarak analiz edilerek 8 farklı kromatin modifiye geninin büyümedeki rolleri incelenmiştir. Yapılan gözlemler sonucu, büyümede bir rolü olduğu tespit edilen genin büyüme işlevlerinin hangisinde görev aldığı kinematik analizler sayesinde aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bitkilerde büyüme, hücre bölünmesi ve genişlemesi işlevleri arasında koordinasyon ile sağlanan ve böylece bitkinin kütlesinde artış meydana getiren, genlerle sıkı bir şekilde kontrol edilen metabolik işlevler bütünüdür. Bu nedenle, çalışmamızda, bitkilerde büyümenin gerçekleştiği başlıca yer olan meristem bölgesinin gen ekspresyon profili incelenmiş ve elde edilen kümelerde kromatin modifiye genlerinin aşırı ifade edildiği saptanmıştır. Kromatin genlerinin gen kodunda değişiklik yapmaksızın bazı modifikasyonlar ile transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya fiziksel ulaşımını düzenleyerek genlerin ifadelerini epigenetik seviyede düzenlediği ve böylece büyümenin de yer aldığı pek çok hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Nelissen vd., 2008). Bu sebeple çalışmamızda kromatin genlerinin büyümedeki muhtemel fonksiyonlarının aydınlatılması hedeflenmiştir. Literatüre baktığımızda kromatin modifiye genlerinin bu gelişim evreleri arasındaki geçişi düzenlediği birçok *Arabidopsis* mutantı kullanılarak gösterilmiştir (Wagner, 2003). Örneğin *Pickle (PKL)* ve *Embriyonic flower2 (EMF2)* genlerinin embriyonik programı baskılayarak bitkinin vejetasyon evresine geçmesini sağladığı saptanmıştır (Ogas vd., 1999; Moon vd., 2002). Yine, *EMF2*, *fertilization-independent endosperm (FIE)*, *Splayed (SYD)*, *Like heterokromatin*

protein1/terminal flower2 (LHP1/TFL2), *Imitation switch (ISWI)* ve *Curly leaf (CLF)* genlerinin vejetasyon evresinde reproduktif programı baskıladığı gösterilmiştir (Wagner ve Meyerowitz 2002; Goodrich vd., 1997; Kinoshita vd., 2001; Yoshida vd., 2001; Gaudin vd., 2001; Takada vd., 2002). Bu çalışmaların aksine *Vernalization2 (VRN2)* geninin ise vejetasyon evresi sırasında bitkinin üretim kabiliyetini artırdığı ileri sürülmüştür (Gendall vd., 2001). Diğer bir çalışmada da *Fertilization-independent seed2 (FIS2)*, *Medea (MEA)* ve *FIE* genlerinin fertilizasyon öncesinde tohum gelişimini önlediği ortaya konulmuştur (Chaudhury ve Berger 2001; Grossniklaus vd., 2001).

RNAi mutantları kalıtılan bir popülasyondan oluştuğu için genotiplerini belirlemek çok önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda, yaprak boyama testi ve lateral flow testi olmak üzere iki farklı metot kullanılmıştır. Her iki metodda bir çeşit herbisit olan bastaya karşı dirençli (mutant) ve hassas (yaban tip) fideleri seçebilmek üzere RNAi kasetine yerleştirilen phosphinothricin acetyl transferase (PAT) geninin varlığının tespitine dayanır. Ancak, her iki metodun da birbirine göre bir takım avantajlar sağladığı görülmüştür. Bu bağlamda, yaprak boyama testi lateral flow testine göre daha çabuk uygulanır ve daha ekonomiktir. Ancak, lateral flow testi çimlenmenin hemen ardından uygulanabilirken basta uygulaması erken fide döneminde ölümcül olmaktadır. Buna ek olarak, lateral flow testi birkaç dakika içerisinde sonuçlanarak mutant ve yaban tiplerin kısa bir sürede belirlenmesini mümkün kılar.

Bilindiği gibi bitkilerde büyüme işlevleri neticesinde biyokütle artışı meydana gelmektedir. Dolayısıyla, büyümede meydana gelen herhangi bir artışı veya azalışı fenotipik olarak belirleyebilmek mümkündür. Bu doğrultuda, çalışmamızda, mutant mısır hatlarında meydana gelen büyüme farklılıklarını gözlemleyebilmek için mısır fidelerinin dördüncü yaprakları yaprak kınından çıktığı andan tamamen olgunlaşmaya kadar gözlenerek günlük uzunluk değerleri kaydedilmiştir. Yapraklar tamamen olgunlaştığında hasat edilerek yaprakların aya uzunluğu, genişliği ve toplam alanları hesaplanmıştır. Buna göre, mutant fidelerde yaprak ayasının yaban tiplere oranla istatistiksel olarak önemli derecede %10 oranında kısaldığı, yaprak genişliğinin %4 oranında artışı ve sonuç olarak toplam yaprak alanının %6 oranında azaldığı saptanmıştır. Yaprak alanı hücre sayısına ve büyüklüğüne bağlıdır (Tsukaya, 2008). Bu bağlamda, mikroskop altında mutant hatların olgun hücre uzunlukları ölçülmüş ve Hat05'in olgun hücre uzunluğunda istatistiksel olarak önemli derecede %8 oranında azalış saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında, mutant fidelerin, yaprak ayasının uzunluğu azalırken yaprak genişliğini artırarak yaprak alanında meydana

gelecek küçülmeyi kompanse etmeye çalıştığı görülmektedir. Kompensasyon hücre üretiminde aşırı bir azalış sonucu hücre genişlemesinin tetiklenmesi ile karakterize edilen ve organ büyüklüğünü kontrol eden başlıca fenomenlerden biridir (Tsukaya, 2008). Bu şekilde bitki organ gelişimi sırasında kompensatör sistemin varlığına dair pek çok araştırma mevcuttur (Beemster vd., 2003; Beemster ve Masle, 1996; Tsukaya, 2002). Örneğin, hücre döngüsü inhibitör genlerinden biri olan *KIP-Related Protein 2 (KRP2)* geninin aşırı ekspresletildiği mutant *Arabidopsis* bitkilerinin yapraklarında kısalma meydana geldiği ve yapılan incelemeler sonucunda daha kısa yapraklara sahip olan mutantlarda daha az fakat geniş hücrelerin üretildiği saptanmıştır (de Veylder vd., 2001). Yine, bitkilerde büyüme düzenleyici bir gen olan *AINTEGUMENTATA (ANT)*'nin fonksiyonunun kaybedildiği mutant *Arabidopsis* yapraklarında daha az fakat geniş hücrenin üretildiği gösterilmiştir (Mizukami ve Fischer, 2000). Organ büyüklüğünü belirleyen bir diğer fenomen ise yüksek ploidi sendromudur ve kromozom sayısının katlanarak artması sonucu artan hücre hacmine karşın daha küçük organların meydana gelmesi ile karakterize edilir (Melaragno vd.,1993). Ploidi seviyesinin artması bitkilerde çoğunlukla hücre döngüsü sırasında genomun kendini eşlediği halde mitoz geçirmeksizin meydana gelen endodüplikasyon sonucu meydana gelir. Yüksek ploidi sendromunu açıklayan bir çalışmada, *brassinosteroid-insensitive4 (bin4)* geni bakımından mutant olan *Arabidopsis thaliana* mutantlarında, *bin4*'un endodüplikasyonu artırırken organ büyüklüğünde azalış meydana getirdiği rapor edilmiştir (Breuer vd., 2007).

Bitki büyüme farklılığını gösteren bir diğer faktör yaprak uzama oranı (YUO)'dır. YUO, iki yaprak ölçüm değeri arasındaki uzunluk farkının bu ölçümler arasında geçen zamana bölünmesiyle hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucu, Hat05 olarak adlandırılan ve *DNA METİLTRANSFERAZ* geni bakımından mutant olan mısır hattının yaprak uzama oranında istatistiksel olarak önemli derecede %12 oranında azalış saptanmıştır. Yaprak uzama oranı hücre üretimi ve genişlemesine bağlı olduğundan, tespit edilen bu azalış, iki büyüme işlevi sırasında meydana gelen bir aksaklıktan kaynaklanabilir. Bu aksaklıklar ise, hücre sayısı ve büyüklüğüne bağlı olarak son büyüklüğüne erişen yaprağın uzunluğunda farklılıklara yol açacaktır (Micol, 2009). Ayrıca, literatüre baktığımızda çoğu bitki türünde çevresel streslere karşı ilk cevabın fotosentez hızını düşürmeden önce yaprak uzama oranını düşürmek olduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir. Bu bağlamda, yaprak uzama oranının hücre bölünmesinde meydana gelen değişim sonucu, su (Tardieu vd., 2000; Lecoeur vd.,1995; Granier ve

Tardieu, 1999a), ışık (Dengler, 1980; Granier ve Tardieu, 1999b) ve sıcaklık (Francis ve Barlow, 1988; Ben Haj Salah ve Tardieu, 1995) gibi çevresel streslerden ciddi bir şekilde etkilendiği gösterilmiştir. Örneğin, düşük nitrojen şartlarında yetiştirilen fescue bitkisinde yaprak başına düşen hücre sayısı azalırken yaprağın son uzunluğunun aynı kaldığı ve bunun sonucunda normalden daha kısa yaprak meydana geldiği rapor edilmiştir (Gastal ve Nelson, 1994). Aynı durum su stresine maruz bırakılan bezelye bitkisinin erken yaprak gelişimi sırasında da görülmüştür (Lecoeur vd, 1995). Yapılan bir diğer araştırmaya göre ise 30°C’de büyütülen mısır bitkisinin 13°C’de büyütülenlere göre hücre bölünmelerinin ve bunun sonucunda hücre uzamasının daha hızlı olduğu rapor edilmiştir (Ben-Haj-Salah ve Tardieu, 1995). Aynı şekilde, daha önce yayınladığımız bir çalışmamızda, 18°C gece sıcaklığında büyüttüğümüz mısır fidelerinin 4°C’de büyütülenlere nazaran %21 daha yüksek yaprak uzama oranına sahip olduğu ve bunun sebebinin düşük sıcaklığın hücre üretimini %22, olgun yaprak uzunluğunu ise %20 oranında azaltması sonucu meydana geldiği gösterilmiştir (Rymen vd., 2007). Mısır köklerinde ise, artan sıcaklıklara rağmen hücre üretiminde meydana gelen değişim ile hücre uzama oranında meydana gelen değişim arasında kompensasyon sonucu olgun hücre uzunluğunun değişmediği rapor edilmiştir (Silk, 1992). Burada artan hücre üretimine rağmen hücre uzaması sabit kalarak birim alan başına düşen hücre sayısının artmasına rağmen yaprak büyüklüğünün değişmediği görülmüştür. Uygulanan stres sonucu hücre üretiminin etkilendiği araştırmalar, stresin bölünmekte olan hücrelerde, hücre döngüsünün S, G2 ve M fazlarında herhangi bir etkiye yol açmaksızın G1 fazında duraklamaya neden olarak bitkinin uzamasını yavaşlattığını göstermiştir (Tardieu ve Granier, 2000). Özetle bu örnekler yaprak uzama oranının kontrolünün hücreseviye hücre bölünmesi ve genişlemesi işlevleri arasındaki kontrole sağlandığını göstermektedir.

Bitkilerde büyüme işlevlerinden hücre üretiminin meydana geldiği yer olduğundan meristem uzunluğu büyümeyi etkileyen başlıca faktörlerden biridir. Bu nedenle, çalışmamızda Hat05’in mutant ve yaban tip bireyleri arasında meydana gelen büyüme farklılığının meristem uzunluğundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını incelemek üzere mısır fidelerinin dördüncü yaprakları büyümenin sürekli ve kararlı (steady-state) fazında hasat edilmiş ve DAPI ile boyanarak mikroskop altında meristem uzunlukları ölçülmüştür. Meristem uzunluğu, DAPI ile belirgin hale gelen mitotik figürlerin yoğunluklarının yaprak eksenini boyunca gözlenerek hesaplanmıştır. Gözlemler, yaban tip ve mutantların her ikisinde de mitotik figürlerinin, yaprak tabanından itibaren birinci cm’de yoğunlaştığını,

ikinci cm itibariyle düşüş gösterdiği ve üçüncü cm'nin sonunda kayboldukları tespit edilmiştir. Yine, mutant ve yaban tiplerin meristem uzunlukları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı. Ancak meristemde meydana gelen hücre üretimi burada bölünen hücre sayısına ve bölünme oranına bağlıdır. Bölünen hücre sayısı hücrelerin büyüklüğüne ve meristemin uzunluğuna bağlı iken bölünme oranı hücre döngüsünün regülasyonuna bağlıdır. Bu yüzden hücre üretiminde meydana gelen bir değişiklik pek çok bileşenden kaynaklanabilir. Bölünen hücre sayısında meydana gelen artış hücre döngüsü mekanizmasında oluşan bir aksaklık sonucu bölünme sürecinin uzamasından kaynaklanırken bölünme oranı hücre döngüsü kontrol noktalarından geçişin hızlanması ile sağlanabilir. Örneğin, hızlı büyüyen bitkilerde hücre üretimi fazla olduğu ve bunun da meristem uzunluğunun daha büyük olmasından kaynaklandığı bulunmuştur (Beemster ve Baskin, 1998). Bu bağlamda, Hat05 mutantlarında meydana gelen bu büyüme farkı, büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profilinin, hücre döngüsünün genetik regülasyonu ve evrelerinde meydana gelen farklılıkların belirlenmesinin ardından yapılan kinematik analizler ile açığa kavuşturulacaktır.

Hat05'in mutant bireylerinin büyümelerinde meydana gelen azalışın sebebini hücresele seviyede araştırmak üzere mısır fidelerinin yapraklarının büyüme bölgesinin hücre uzunluğu profili belirlenmiştir. Bu amaçla, çalışmamızda, yaprağın büyüme bölgesi boyunca yer alan bir epidermis hücre dosyasında bulunan hücrelerin uzunlukları ölçülmüştür. Çalışma sırasında, mısır yaprağının, büyüme bölgesi (meristem, uzama ve olgunluk bölgesi)'nin yaprak eksenine boyunca ardışık olarak yerleşiminden dolayı, hücre kinetiğinin ölçülmesinin gerekli olduğu deneyler için kullanışlı bir model organizma olduğu görülmüştür. Böylece tek bir mısır yaprağında bütün büyüme parametreleri belirlenebilmiştir. Büyüme bölgesinin bu yerleşimi sayesinde yeni bölünmüş bir hücrenin olgunluğa ulaşmaya kadar takip edilmesi mümkün olmuştur. Mutant ve yaban tip mısır fidelerinin hücre uzunluğu profilleri kıyaslandığında, her ikisinde ilk iki cm'nin küçük hücrelerden, üçüncü cm'de hücrelerin lineer olarak uzamaya başladığı ve sekizinci cm'de platoya ulaşarak onuncu cm'de hücrelerin son uzunluklarına ulaştıkları görüldü. Her iki grupta yer alan meristematik ve uzayan hücrelerin uzunluklarında bir fark görülmezken olgun hücre uzunluğunun mutant fidelede yaban tiplere nazaran istatistiksel olarak önemli derecede %8 oranında azaldığı belirlenmiştir.

Hat05'in mutant bireylerinde meydana gelen büyüme farklılığının hücre döngüsü evrelerinde meydana gelen herhangi bir aksaklıktan kaynaklanıp kaynaklanmadığını test

etmek için mutant ve yaban tip mısır fidelerinden yaprak örnekleri alınarak büyüme bölgeleri boyunca yer alan hücrelerin DNA miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar yaban tip ve mutant bireylerin yapraklarının büyüme bölgeleri boyunca sahip oldukları DNA miktarlarının gelişim süreçlerine uygun bir şekilde dağıldığını ve mutant bireylerde yaban tiplere nazaran hücre döngüsü evrelerinde önemli derecede bir aksaklığın olmadığını göstermiştir. Ayrıca flow sitometri analizi meristem uzunluğunu belirlememize de yardımcı olmuştur. Buna göre, meristemin mısır yaprağının tabandan itibaren iki cm içerisinde yer aldığını ve mutant ve yaban tiplerin meristem uzunluğunda istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı görülmüştür. Bu sonuç DAPI metoduyla bulduğumuz sonucu da desteklemektedir. Bunlara ek olarak, flow sitometri analizi ile *DMT103* geninin endoduplikasyona yol açıp açmadığı belirlenmiştir. Endoduplikasyon, hücrenin sahip olduğu DNA miktarının ikiye katlandığı halde, mitoz bölünmenin gerçekleşmediği durumlarda meydana gelir (Bauer ve Birchler, 2006). Çalışmamızda, mutant ve yaban tip mısır fidelerinin her ikisinin de yapraklarında az miktarda endoduplikasyona rastlanırken gelişime paralel olarak miktarının arttığı saptandı. Ancak, endoduplikasyonun mutant fidelede yaban tiplere oranla gelişimin daha erken safhalarında ortaya çıktığı görülmüştür. Literatüre baktığımızda kromatin genlerinin endoduplikasyonda rol oynadığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların birinde, *H2A-1* adlı kromatin geninin mitoz ve endomitozun G1 ve S fazlarının geç safhalarında ekspreslenerek endodüplikasyonda görev aldığını göstermiştir (Koning vd., 1991). Diğer bir çalışmada da, *Arabidopsis* endospermünde DNA metilasyon miktarının farklı olduğuna işaret edilmektedir (Baroux vd., 2007). Yine, endoduplikasyonun, çoğunlukla mısır endospermünde (Dilkes vd., 2002; Grafi vd., 1996) meydana gelirken, mısır köklerinde (Biradar vd., 1993) ve yapraklarında (Cavellini vd., 1997) görüldüğü ve çeşitli hormon uygulamalarıyla (Joubes ve Chevalier, 2000), kimyasal ajanlarla (Cortes vd., 2004) ve çeşitli çevresel streslerle (Setter ve Flannigan, 2001) tetiklendiği araştırmalar sonucu saptanmıştır. Endodüplikasyon sırasında hücre döngüsünde mitoz geçişten sorumlu genlerin proteolize uğradığı ve DEL'ler, KRP'ler ve *WEE1* gibi CDK inhibitörlerinin miktarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir (de Veylder vd., 2001).

Hat05'in mutant bireylerinde meydana gelen büyüme farklılığına neyin sebep olduğunu araştırmak üzere moleküler seviyede ana hücre döngüsü genlerinin meristem bölgesindeki ekspresyonları belirlenmiştir. Hücre döngüsü, CDK genlerine *siklin*'lerin bağlanmasıyla aktif hale gelen transkripsiyonel kontrol yoluyla düzenlenir (Beemster vd.,

2005). Kromatin genleri ise, bu yolda yer alan genlerin ekspreslenebilmesi için hücre döngüsü baskılayıcı olan *Retinoblastoma* genini (*rb*) kovalent olarak modifiye ederek *E2F/Dp* transkripsiyon faktöründen ayrılmasını sağlar ve bu şekilde hücre döngüsünü düzenlediği saptanmıştır (Sanchez vd., 2008). Bu bağlamda, çalışmamızda, *DMT103* geninin hücre döngüsü genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde görevli olup olmadığını araştırmak üzere daha önce yayınlanan 39 adet hücre döngüsü geninin ekspresyon miktarları belirlenmiştir (Rymen vd., 2007). Sonuç olarak, sadece *CDKA1:1* ve *CDKD1* genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak önemli derecede fark olduğu saptanmıştır. Ana hücre döngüsü genleri büyüme sırasındaki görevlerine göre, gelişimin her safhasında ekspreslenen konstitutif, bölünmeleri sırasında ekspreslenen proliferatif ve gelişimsel olmak üzere üç sınıfa ayrılarak incelenir (Beemster vd., 2005). Birinci grupta B-tipi hariç tüm CDK'ler, ikinci grupta A- ve B-tipi siklinler ve üçüncü grupta *CDK/siklin* kompleksinin aktivitesini baskılayan hücre döngüsü inhibitör genleri yer alır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda ekspresyonlarında azalış tespit ettiğimiz *CDKA1:1* ve *CDKD1* genlerinin gelişim süresi boyunca ekspreslenen gen sınıfında yer aldığı ve ekspresyonunda meydana gelen farklılığın bitkinin gelişimini etkilediğini göstermektedir. Hücre döngüsü genlerinin spesifik görevlerine baktığımızda, *siklin*'lerin, hücre döngüsünün G2/M fazına özgü iyi bir işaret olduğunu görmekteyiz. B- ve D- tip *siklin*'lerin aşırı ifadelerinin ise, bitki büyüme oranını artırdığı, *krp* gibi bazı CDK inhibitörlerin aşırı ifadelerinin *Arabidopsis* yapraklarında bölünme oranını azalttığı rapor edilmiştir (De Veylder vd., 2001). *wee1* geninde de CDK'leri fosforilleyerek inhibe ettiği ve bu yüzden endoduplikasyona sebep olduğu saptanmıştır (Sun vd.,1999).

Çalışmamızda, Hat05 adlı mutant mısır hattında meydana gelen büyüme farklılığının mutasyon nedeniyle meydana gelip gelmediğini araştırmak üzere moleküler seviyede RNAi tekniğiyle susturulmuş *DMT103* geninin suskunluk derecesi belirlenmiştir. Bu amaçla endogene ve transgene hedef alan iki farklı primer kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, mutant fidelerde endogen ekspresyonunun yaban tiplere oranla tüm büyüme basamakları boyunca önemli derecede azaldığı görülmüştür. Transgen ise beklenildiği gibi endogenin zıddı bir ekspresyon profili göstermiştir. Bunun sebebi transgenin kuvvetli bir promotörün arkasına klonlanmasıdır. Böylece transgenin aktarılan bitkide fazlaca sentezlettilerik endogeni daha etkili bir şekilde susturması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Hat05 adlı mutant mısır hattında RNAi tekniğiyle susturulmuş *DMT103* geninin yaprak uzama oranında %12 ve yaprak uzunluğunda %10 oranında

meydana getirdiği azalışın sebebini aydınlatmak üzere büyüme bölgesinin kinematik analizleri yapılmıştır. Kinematik analizler başlıca hücre üretimi, bölünme ve uzama oranı, hücre döngüsü ve uzaması süreleri olmak üzere büyüme ile ilgili parametrelerin zamansal ve konumsal olarak hesaplanmasını sağlayan bir takım matematiksel formülleri içerir (Fiorani, 2000; Schnyder vd., 2009). Daha önce de belirttiğimiz gibi yaprak uzama oranında meydana gelen azalış, hücre üretiminin veya hücre genişleme oranının azalmasından kaynaklanabilir. Her iki durumda yaprak uzunluğunda farklılığa yol açacaktır. Çünkü bir organın son büyüklüğü sahip olduğu hücre sayısına ve hücre büyüklüğüne bağlıdır (Micol, 2009). Örneğın bir çayır bitkisinin düşük nitrojen şartlarında büyütülmesi sonucu yaprakların sahip oldukları hücre sayısının azalmasına rağmen olgun hücre boyutunun değişmeden kalmasıyla normalden daha kısa yaprakların meydana geldiği gözlenmiştir (Gastal ve Nelson, 1994). Bu nedenle çalışmamızda ilk önce hücre üretimi belirlenmiştir. Hücre üretimi, belirli bir zamanda hücre bölünmeleriyle meydana getirilen hücre sayısıdır ve bu nedenle yaprak uzama oranının olgun bir hücrenin uzunluğuna bölünmesiyle hesaplanmıştır. Ancak, sonuçlara baktığımızda hücre üretiminin mutant ve yaban tip fidelerde farklılık göstermediği saptanmıştır. Bu durum olgun hücre uzunluğunun istatistiksel olarak önemli derecede %8 oranında azalmasından kaynaklanmaktadır. Hücre üretimi ile ilgili bölünme oranı ve hücre döngüsü zamanı gibi parametrelere bakıldığında bu sonucu destekledikleri görülmektedir. Çünkü bölünme oranı hücre üretimi ve belli bir zamanda bölünmekte olan hücre sayısına bağlıdır. Buna bağlı olarak, birim zamanda, meristemden uzama bölgesine göç eden hücre sayısı kadar hücre, aynı anda büyüme bölgesini terk edecektir. Bu yüzden hücre üretiminin değişmemesi doğal olarak hücre bölünme oranının aynı kalmasından kaynaklanmaktadır. Hücre döngüsü zamanı ise bir hücrenin bölünmesini tamamlayıncaya kadar geçen süredir ve meristemde bölünmekte olan hücre sayısına ve hücre üretimine bağlıdır. Sonuçlar mutant ve yaban tip fidelerin hücre döngüsü süreleri arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Bu bulgular bütünleşik olarak değerlendirildiğinde yaprak uzunluğunda meydana gelen azalışın hücre döngüsü işlevlerinden kaynaklanmadığı görülmektedir. Bu durum, hücrelerin DNA replikasyon oranlarının mutant ve yaban tiplerde etkilenmediğini gösteren flow sitometri analizi ile doğrulanmıştır. Buna ek olarak, ana hücre döngüsü genlerinin ekspresyonlarının mutant ve yaban tiplerde önemli derecede çeşitlilik göstermemesi de bu bulguları desteklemektedir. Bu nedenle çalışmamızda hücre genişlemesi ile ilgili parametreler belirlenmiştir. İlk olarak, meristemden uzama bölgesine geçmiş bir hücrenin olgun

uzunluğuna ulaşıncaya kadar geçen süre hesaplanmıştır. Bu süre uzama bölgesinde bulunan hücre sayısına ve hücre üretim oranına bağlıdır. Sonuçlara göre, hücre genişleme sresinin, mutant ve yaban tipler arasında önemli derecede değişiklik göstermediği görülmüştür. Ancak, hücre uzama oranı, mutantlarda yaban tiplere kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede %13 oranında azalmıştır. Tüm bu bulgular, *DMT103* geninin hücre genişlemesi işlevinde rol aldığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda Hat05 adlı mutant mısır hattında *DMT103* geninin büyüme basamakları boyunca ekspresyon profili belirlenmiştir. Mısır yaprağının büyüme bölgesini oluşturan meristem, uzama ve olgunluk kısımlarının yaprak üzerinde ardışık olarak yer alması, *DMT103* geninin gelişim süresince ekspresyonunda meydana gelen farklılıkları zamansal ve konumsal olarak belirlememizi sağlamıştır. Sonuçlar *DMT103* geninin gelişime bağlı olarak arttığını göstermiştir. Buna göre, *DMT103* geninin ekspresyonu meristemde en düşükken uzama bölgesinde arttığı ve olgunlukta en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. *DMT103* geninin gelişim süresince artış göstermesi, Hat05'in mutant fidelerinin yaban tiplere oranla azalan yaprak uzama oranının hücre genişleme oranından kaynaklandığını gösteren kinematik analizlerin sonuçlarını kuvvetlendirmektedir.

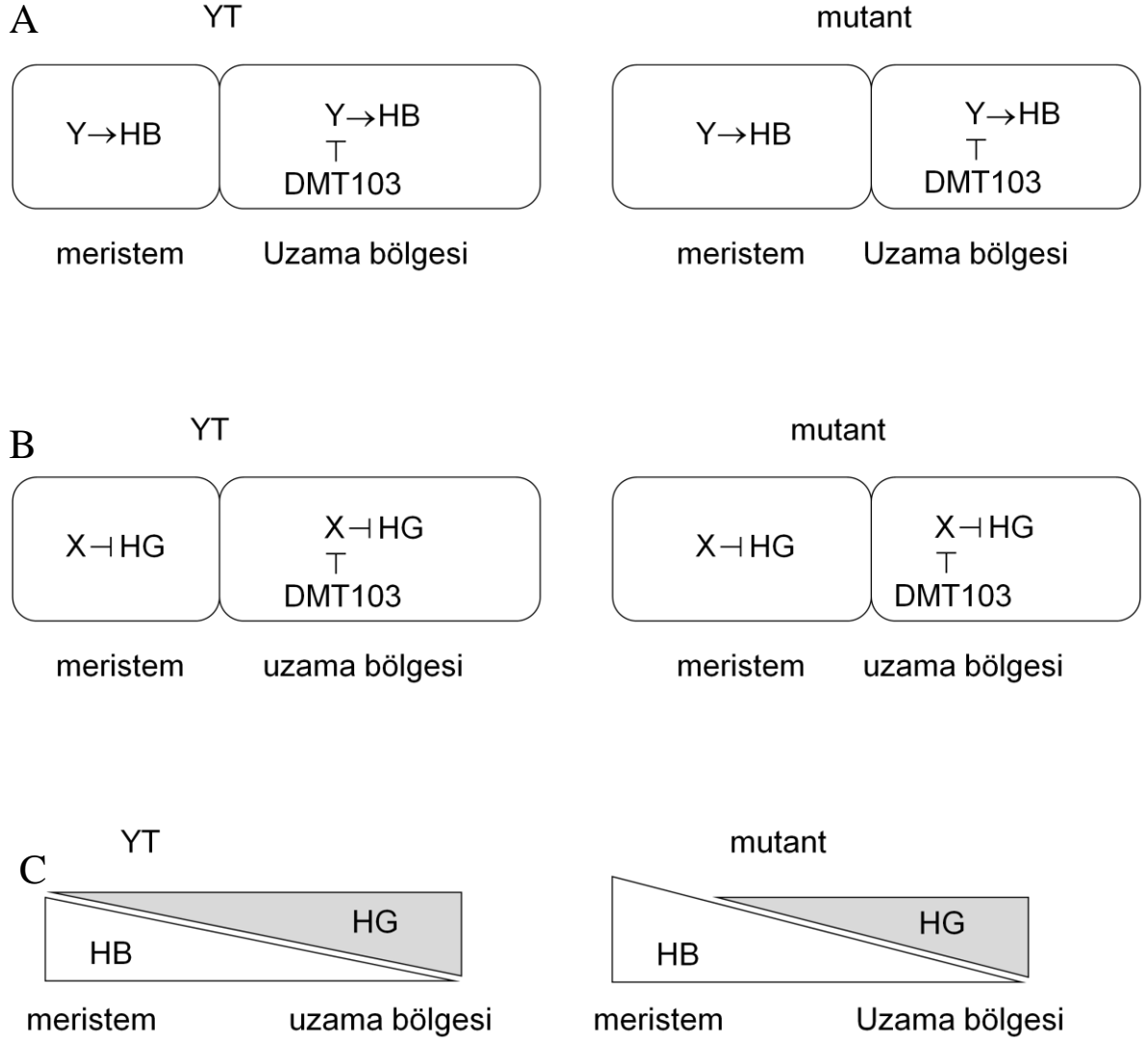
Çalışmamız sonucunda *DMT103* geninin yaprak uzama oranını etkilediği saptanmıştır. Ayrıca, bu genin uzama bölgesinde daha fazla ifade edildiği bulunmuştur. Bilindiği gibi *DMT103* geni sorumlu olduğu hedef gende bulunan guanin ve sitozin bazlarına metil grupları ekler ve bu şekilde geni baskılayarak ekspresyonunu değiştirir. Hat05 adlı mutant mısır hattında ise *DMT103* geni susturulmuştur. Dolayısıyla metilasyon fonksiyonunu yerine getirememekte ve sorumlu olduğu hedef geni baskılayamamaktadır. Tüm bu bulgular ışığında *DMT103* geninin hücre bölünmesi ve uzaması arasında geçişi düzenlediği aık görülmektedir. Bu bilgiler, *DMT103* geninin bu görevi, hücre döngüsü aktivatörünü baskılayarak, hücre genişlemesini baskılayan geni baskılayarak veya bu iki işlev arasındaki dengeyi sağlayan geni baskılayarak yerine getirebileceğini göstermektedir (şekil 4.1).

Bilindiği gibi bitkiler sesil doğalarından ötürü olumsuz vre koşullarından kaçamadıkları için kendilerini değişen vre şartlarına adapte edecek şekilde bazı moleküler düzenlemelere başvururlar. Bu bağlamda, bitkilerin aynı görevden sorumlu birden fazla gen kopyasına sahip olması onlara değişen şartlara göre kendilerini ayarlamasını sağlayabilen plastisite özelliği kazandırır. Bu nedenle alışmamızda Hat05'de mutasyon sonucu görevini yerine getiremeyen *DMT103* geninin fonksiyonunun aynı

familyadan bir başka gen ile telafi edilip edilmediği araştırılmıştır. Bu doğrultuda, mısır bitkisinin sahip olduğu yedi adet *DNA METİLTRANSFERAZ* geninin ekspresyon analizi yapılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, *DMT101*, *DMT102* ve *DMT106* genlerinin meristem bölgesinde diğer bölgelere nazaran istatistiksel olarak önemli derecede fazla ekspreslenmesi, bu genlerin hücre bölünmesi regülasyonunda görevli olabileceklerini işaret etmiştir. Protein dizesi *DMT103* genine en yakın olan *DMT107* geninin ekspresyon profillerinin ise birbirlerine benzer oldukları saptandı. *DMT106* geninin ekspresyonu ise meristem bölgesinde mutant fidelerde yaban tiplere kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır. Bu durum *DMT103* ve *DMT106* genleri arasında bir kompensasyon meydana gelmiş olabileceğini göstermektedir.

Yukarıda da açıklandığı gibi, bitkilerin yaşayışına uygun olmayan çevre şartlarında, hücre bölünmesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesi etkilenir. Bunun sonucunda, bitki cevap olarak büyümesini durdurur (Bursens vd., 2000). Ayrıca, bitkilerde büyüme ve gelişim evreleri arasındaki geçişin çeşitli çevresel sinyallerin algılanması ile tetiklendiği göz önüne alındığında, kromatin modifiye genlerinin aktivitelerini çevresel etkenlere karşı düzenleyeceği açıkça görülmektedir. Bu bağlamda, kromatinin, sıcaklığa (Stockinger vd., 2001; Gendal vd., 2001), ışığa (Chua vd., 2001) ve fotoperiyodizme (Wagner 2002; Gaudin 2001; Takada 2002) bağlı olarak yeniden düzenlendiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, DNA metilasyon motifinde farklı gelişim evrelerine (Bitonti vd., 2002) ve çevresel etkenlere göre değiştiği saptanmıştır (Steward vd., 2002). Bu nedenle çalışmamızda *DMT103* geninin abiyotik streslerde olası rolünü araştırmak üzere Hat05 fideleri kuraklık ve düşük sıcaklık şartlarında yetiştirilerek yaprak büyüme cevapları araştırılmıştır. Bu uygulamalarda amaç bitkiyi ciddi bir strese sokmak değildir. Yalnızca, bitkinin normal fizyolojik su ve sıcaklık isteğini stres oluşturacak sınırdan tutarak yaprak büyümesinde farklılık meydana getirmek amaçlanmıştır.

Hat 05 adlı mutant mısır hattı kuraklık stresine maruz bırakılarak *DMT103* geninin kuraklık toleransında görev alıp almadığı test edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar mutant ve yaban tip mısırlar arasında görülen büyüme profilinin kuraklık stresi altında da aynı şekilde korunduğunu gösterdi. Bu doğrultuda, *DMT103* geninin kuraklık toleransında rol almadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.1. *DMT103* geninin büyüme işlevleri sırasındaki muhtemel rolünü gösteren model. *DMT103* geninin A. Hücre döngüsü aktivatörünü baskıladığı; B. Hücre genişlemesini baskılayan geni baskıladığı; C. Bu iki işlev arasında ki dengeyi sağlayan geni baskıladığını gösterilmektedir.

Hat 05 adlı mutant mısır hattı gece düşük sıcaklığına maruz bırakılarak *DMT103* geninin soğuk toleransında görev alıp almadığı test edilmiştir. Bu bağlamda, mısır fidelerinin yapraklarının üşüme stresine karşı büyüme cevabı araştırıldı. Bu deney düzeninde mısır fidelerine uygulanan düşük sıcaklık muamelesi, bitkilerde sürekli strese sebep olmamıştır. 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. Uygulama sonucu, yaprak büyümesinin düşük sıcaklıktan etkilendiği açıkça görülmüştür.

Bu düzeneğin, sadece hücre bölünmesini durdurmayıp yavaşlattığı için, hücre dinamiğini gözlemek için çok kullanışlı olduğunu görülmüştür. Özellikle, bu düzenek geceleyin uygulanan üşüme stresinin ardından, gündüz periyodu süresince mısır fidesinin kendisini çevre şartlarına uyum sağlama (aklimasyon)'sına izin verir. Çalışmamız sonucunda, kontrol şartlarında yetiştirilen mutant mısırların yaprak uzama oranlarının yaban tiplere nazaran %9 oranında azaldığı ancak üşüme stresi uygulandığında bu farkın kaybolduğu saptanmıştır. Bu sonuç, *DMT103* geninin üşüme toleransında bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Literatürde, soğuk stresinin genlerin demetilasyonunu teşvik ederek ilgili genlerin ekspresyonlarını düzenlediği rapor edilmiştir (Steward 2000). Bu şekilde bitki pek çok geni aktive ederek veya baskılayarak savunma cevabının oluşmasını sağlar (Thomashow 1998). Çalışmamızda, *DMT103* geninin uzamayı inhibe eden geni inhibe ederek büyüme işlevinde görev aldığı bulunmuştur. Ancak, düşük sıcaklık uygulamasında kontrol şartlarında meydana gelen mutant ve yaban tip fideler arasında büyüme farklılığının kaybolması, sıcaklığın *DMT103* geninin ekspresyonda farklılıklar meydana getirdiğini göstermektedir. Daha önce yayınladığımız bir çalışmada da, düşük gece sıcaklığının hücre döngüsü ilerleyişinde rol alan *cyc4*, *cycb3*, *cycb4*, *Ccycb5*, *cycd3*, *cdkb1* ve *cdka1* genlerinin ifadelerini önemli derecede azalttığı ve *del*, *kfp* ve *CKS* gibi bazı CDK inhibitörlerinin ifadesini artırdığı tespit edilmiştir (Rymen vd., 2007). Tüm bu bilgiler ışığında büyümenin ve stres toleransının genetik düzenleme altında olduğu ve düşük sıcaklığın da genlerin demetilasyonuna sebep olarak büyüme farklılıklarına yol açtığı görülmüştür.

Elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde, bir kromatin geni olan *DMT103* geninin yaprak ve kök gibi bitki organlarının büyümesinin düzenlenmesinde görev aldığı saptanmıştır. Bu genin, hücre bölünmesi ve uzaması işlevleri arasında geçişin sağlanmasından sorumlu olduğu moleküler ve hücresele seviyede tespit edilmiştir. Bu bağlamda, *DMT103* geninin hücre uzamasını sağladığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, *DMT103* geninin bitkinin soğuk stresi toleransında görevli olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR

1) Mısır yaprağının gelişim evrelerine spesifik genlerini belirlemek için yapılan mikrodizi analizleri sonucu elde edilen verilerde kromatin genlerinin meristem bölgesinde aşırı ifade edildiği belirlendi.

2) Popülasyondaki mutant bireyleri belirlemek için yapılan genotip analizleri sonucu Lateral Flow Testinin fidelerin birinci gününden itibaren uygulanabilmesi ile hızlı ve doğru sonuç alınması sebebiyle Yaprak Boyama Testine göre avantaj sağladığı görüldü.

3) Transgenin Mendel Kalıtım Yasalarına uygun olarak kalıtıldığı görüldü (3:1).

4) DNA METİLTRANSFERAZ103 (DMT103) geni susturulmuş bir RNAi mutantı olan Hat05'in yaprak uzunluğunda ve yaprak uzama oranı (YUO)'nda istatistiksel olarak önemli derecede azalış saptandı.

5) Büyümede meydana gelen bu azalışın sebebini ayrıntılı olarak araştırmak üzere yapılan kinematik analizler sonucu, mutantlarda yaban tiplere nazaran hücre üretiminden ziyade uzama işlevlerinde bir aksaklık meydana geldiği belirlendi.

6) DMT103 geninin ekspresyonunun gelişime bağlı olarak artması bu genin uzama işlevinde muhtemel rolünü desteklemektedir.

7) Hat05'in mutant fidelerinde hücre döngüsü genlerinin ekspresyonlarının istatistiksel olarak önemli derecede değişmemesi Dmt103 mutasyonunun hücre döngüsünü etkilemediğini göstermektedir.

8) Flow sitometri analizleri sonucu, mutant fidelerde, hücre döngüsü evrelerine düşen DNA miktarının değişmediği ve hücre döngüsü ilerleyişinde herhangi bir aksaklığın meydana gelmediği tespit edildi.

9) DMT103 mutasyonunun, mısırın primer kök gelişimini de etkilendiği gözlemlendi.

10) DMT103 geninin stres toleransında rol alıp almadığını gözlemlemek için Hat05, kuraklığa ve üşüme stresine maruz bırakıldı. Sonuçlar, DMT103 geninin kuraklıkta rol almadığını ancak üşüme toleransında fonksiyonu olduğunu gösterdi.

11) Hat05'in mutantlarında DMT ailesine ait diğer iki genin ekspresyonlarının da istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı saptandı.

12) Tüm bu sonuçlar DMT103 geninin büyüme işlevinin hücre genişlemesinden sorumlu olduğuna işaret etmektedir.

6. ÖNERİLER

Bitkiler, güneş enerjisini kimyasal bağlar içine depolayan yegane primer üreticiler olarak ekolojik döngünün devamını sağlamaları, besin ve çeşitli sanayi ürününün hammaddesi olmaları gibi sayılabilecek pek çok faydaları göz önüne alındığında insanoğlunun hayatında vazgeçilemez bir öneme sahiptirler. Bu nedenle bilim adamları yüzyıllardır bitkilerin en iyi şekilde büyüebilmeleri için araştırmalarını sürdürmektedirler. Ayrıca bitkiler sesil doğalarından ötürü hareketsiz olduklarından yaşadıkları ortamın değişen çevre şartlarına karşı son derece duyarlıdır. Bu nedenle optimum olmayan çevre şartları bitkilerde strese sebep olur. Strese ilk cevap olarak bitkiler büyümelerini durdurur. Stresin şiddetine bağlı olarak ürün kayıpları ve hatta bitki ölümleri meydana gelir. Buna ek olarak günümüzde tarım alanlarının yerleşime açılması sebebiyle giderek azalması sonucu birim alandan mümkün olan en fazla ürünü elde etme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bilim adamları günümüzün en faydalı alanlarından biri olan biyoteknolojiden yararlanmak suretiyle bitkilerin büyüme potansiyelini artırarak verimlerini artırma çalışmalarına başlamıştır. Bu bağlamda yapılacak araştırmalarda, çalışmamızda kullandığımız mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin monokotiledonlu bitkilerin büyüme ve gelişim çalışmalarında kullanılabilir faydalı bir model olacağı düşünülmektedir.

Büyüme ile ilgili bilinmeyen yeni genler tanımlamak için mutant gözlemleri faydalı olacaktır. Bu doğrultuda, ticari olarak var olan ve yeni elde edilecek mutantların fenotipik olarak incelenmesi ile büyümede azalışa sebep olan mutasyonun büyümenin hangi olayına etki ettiğini kinematik analizler ile belirlenebilir.

Çalışmamızda *DMT103* geninin büyümenin hücre genişlemesi olayında görevli olduğu bulunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda bir metiltransferaz geni olan *DMT103* geninin etkileşimde olduğu diğer genler metilasyona duyarlı AFLP metodu ile genom çaplı araştırmalar sonucu belirlenebilir. Böylece yeni genler tanımlanırken metilasyon derecesinde belirlenmiş olacaktır. Ayrıca *DMT103* geninin protein sekansına en yakın olan bir diğer metiltransferaz olan *DMT107* genleri bakımından mevcut iki mutantın çaprazlanarak elde edilecek yeni bir double mutantın bitki büyümesinde meydana gelen değişimler incelenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Ackerson, R.C., Kreig, D.R. ve Sung, F.J.M., 1980. Leaf Conductance and Osmoregulation of Field Grown Sorghum Genotypes, Crop Science, 20, 10-14.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, AS., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J. ve Williamson, RE., 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*, Science, 279, 717-720.
- Arora, A. ve Mohan, J., 2002. Expression of Dwarfing Genes under Nitrogen and Moisture Stress in Wheat (*Triticum sp.*): Dry Matter partitioning, Root Growth and Leaf Nitrogen, J. Agronomy & Crop Sci., 186, 111-118.
- Atkin OK., Loveys BR., Atkinson LJ. ve Pons TL., 2006. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability, J Exp Bot., 57, 2, 267-281.
- Ayaz, F.A., Kadioğlu, A. ve Turgut, R., 2000. Water Stress Effects on The Content of Low Molecular Weight Carbohydrates and Phenolic Acids in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler (Marantaceae), Can. J. Plant Sci., 80, 373-378.
- Ayaz, F.A., Kadioglu, A. ve Dogru, A., 2001. Leaf Rolling Effects on Lipid and Fatty Acid Composition in *Ctenanthe setosa* (Marantaceae) Subjected to Water-Deficit Stress, Acta Physiol. Plant. 23, 43-47.
- Barber, S.A., Walker, J.M. ve Vasey, E.H., 1963. Mechanisms for the Movement of Plant Nutrients from the Soil and Fertilizer to the Plant Root, Agricultural and Food Chemistry, 11, 3, 204-207.
- Barton, M.K. ve Poethig R.S., 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant, Development, 119, 823-831.
- Baroux, C., Pecinka, A., Fuchs, J., Schubert, I. ve Grossniklaus U., 2007. The Triploid Endosperm Genome of *Arabidopsis* Adopts a Peculiar, Parental-Dosage-Dependent Chromatin Organization, The Plant Cell, 19, 1782–1794.
- Bauer, M.J. ve Birchler, J.A., 2006. Organization of endoreduplicated chromosomes in the endosperm of *Zea mays* L., Chromosoma , 115, 383–394.
- Beemster, G.T.S. ve Masle, J., 1996a. Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.): composition, number and size of epidermal cells in mature blades, Journal of Experimental Botany, 47, 304, 1651-1662.

- Beemster, G.T.S., Masle, J., Williamson R.E. ve Farquhar G.D., 1996b. Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.): kinematic analysis of leaf elongation, Journal of Experimental Botany, 47, 304, 1663-1678.
- Beemster, G. T.S., de Veylder, L., Vercruyssen, S., West, G., Rombaut, D., van Hummelen, P., Galichet, A., Gruissem, W., Inze, D. ve Vuylsteke, M., 2005. Genome-Wide Analysis of Gene Expression Profiles Associated with Cell Cycle Transitions in Growing Organs of *Arabidopsis*, Plant Physiology, 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, 4, 154-158.
- 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.
- Bennetzen, J.L. ve Hake, S.C., 2009. Handbook of Maize: Its Biology, Springer.
- Berckmans, B. ve de Veylder, L., 2009. Transcriptional control of the cell cycle., Current Opinion in Plant Biology, 12, 5, 599-605.
- Berna, G., Robles, P. ve Micol, J.L., 1999. A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Genetics, 152, 729-742.
- Bernstein, N., Lauchli, A. ve Silk, W.K., 1993. Kinematics and Dynamics of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Leaf Development at Various Na/Ca Salinities (1. Elongation Growth), Plant Physiology, 103, 1107-1114.
- Bidwell, R.G.S., 1974. Plant Physiology, Giles, McMillan Co., New York.
- Biradar, D.P., Rayburn, A.L. ve Bullock, D.G., 1993. Endopolyploidy in diploid and tetraploid maize (*Zea mays* L.), Ann Bot, 71, 417–421.
- Birnbaum, K., Jung, J.W., Wang, J.Y., Lambert, G.M., Hirst, J.A., Galbraith, DW. ve Benfey, P.N., 2005. Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines, Nature Methods, 2, 615-619.
- Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Giannino, D., Ruffini, C.M., Dewitte, W., Mariotti, D., van Onckelen, H. ve Innocenti, AM., 2002. Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch), The Journal of Experimental Botany, 53, 1047-1054.
- Blum, A., 1986. Plant Breeding for Stress Environments, CRC Press, Boca Raton, USA, 1-223.
- Bloem, H., Monforti-Ferrario, F., Szabo, M. ve Jäger-Waldau, A., 2010. Renewable Energy Snapshots 2010, Joint Research Centre Institute for Energy, Luxembourg.

- Bloemberg, G.V. ve Lugtenberg, B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by *Rhizobacteria*, Current Opinion in Plant Biology, 4, 343–350.
- Blumwald, E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants, Current of Opinion of Cell Biology, 12, 431–434.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. ve Weretilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchanan B, Jones R (eds) Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158–1249.
- Bray, E.A., 1997, Plants Responses to Water Deficit, Trends in Plants Science, 2, 48-54.
- Breuer, C., Stacey, N.J., Roberts, G., West, C.E., Zhao, Y., Chory, J., Tsukaya, H., Azumi, Y., Maxwell, A., Roberts, K. ve Sugimoto-Shirasu, K., 2007. *Arabidopsis* *BIN4*, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, promotes organ growth by endoreduplication, Plant Cell, 19, 3655–3668.
- Bohnert, H.J. ve Sheveleva, E., 1998. Plant stress adaptations making metabolism move, Current Opinion of Plant Biology, 1, 267–274.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. ve Jensenayb, R.G., 1995. Adaptations to Environmental Stresses, The Plant Cell, 7, 1099-1111.
- Bosabalidis, A.M. ve Kofidis, G., 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive Cultivars, Plant Science, 163, 375-379.
- 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.
- Castalz, F. ve Nelson, C.J., 1994. Nitrogen Use within the Growing Leaf Blade of *Tall Fescue*, Plant Physiology, 105, 191-197.
- Castillo-Michel, H.A, Hernandez, N., Martinez-Martinez, A., Parsons, J.G., Peralta-Videa, J.R. ve Gardea-Torresdey, J.L., 2009. Coordination and speciation of cadmium in corn seedlings and its effects on macro- and micronutrients uptake, Plant Physiology and Biochemistry, 47,7, 608-14.
- Campbell, M.K., 1991. Biochemistry, Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, Fort Worth, USA.
- Cavallini, A., Natali, L., Cionini, G., Balconi, C. ve D'Amato, F., 1997. Inheritance of nuclear DNA content in leaf epidermal cells of *Zea mays* L., Theor Appl Genet, 94, 782–787.
- Chapman, D., 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stres, Trends in Plant Science, 3, 419–426.

- Chaudhury, A.M. ve Berger, F., 2001. Maternal control of seed development, Semin. Cell Dev. Biol., 12, 381-386.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. ve Zhu, J.K., 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, Journal of Experimental Botany, Crosstalk in Plant Signal Transduction Special Issue, 55, 395, 225-236.
- Choi, H.I., Hong, J.H., Ha, J., Kang, J.Y. ve Kim, S.Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors, The Journal of Biological Chemistry, 275, 1723–1730.
- Cooper, J.B. ve Varner, J.E., 1984. Cross-linking of soluble extension in isolated cell walls, Plant Physiology, 76, 414-417.
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6, 850-861.
- Cortes, F., Mateos, S., Pastor, N. ve Dominguez, I., 2004. Toward a comprehensive model for induced endoreduplication, Life Sci, 76, 121–135.
- Creencia, R.P., ve Bramlage, W.J., 1971. Reversibility of chilling injury to corn seedlings, Plant Physiology, 47, 389-392.
- Crittenden, P.D. ve Read, D.J., 1978. The effects of air pollution on plant growth with special reference to sulphur dioxide. II. Growth studies with *Lolium perene* L., New Phytologist, 80, 49-62.
- Grossniklaus, U., Spillane, C., Page, D.R. ve Kohler, C., 2001. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex, Curr. Opin. Plant Biol., 4, 21-27.
- Cushman, J.C. ve Bohnert, H.J., 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance Current Opinion in Plant Biology, 3, 117–124.
- Crispeels, M.J. ve Maurel C., 1994. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells, Plant physiology, 105, 9-13.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. ve Crowe, L.M., 1989. Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen, The Proceedings of the National Academy Sciences (USA), 86, 520-523.
- Çırak, C. ve Esenal, E., 2006. Soyada Kuraklık Stresi, OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 21, 231-237.
- Dalchau, N., Hubbard, K.E., Robertson, F.C., Hotta, C.T., Briggs, H.M., Stan, G.B., Gonçalves, J.M. ve Webb, A.A., 2010. Correct biological timing in *Arabidopsis* requires multiple light-signaling pathways, Proceedings. National Academy of Sciences (PNAS) U S A, 107, 29, 13171-13176.

- Dengler, N.G., 1980. Comparative histological basis of sun and shade leaf dimorphism in *Helianthus annuus*, Can J Bot, 58, 717–730.
- Dennehey, B.K., Petersen, W. L., Ford-Santino, C., Pajeau, M. ve Armstrong, C.L., 1994. Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene bar in maize transformation, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36, 1-7.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M., Jacquard, A., Kilby, N.J. ve Murray, J.A., 2003. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the *D-type cyclin CYCD3*, Plant Cell, 15, 1, 79-92.
- 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 Luca, M., García, Seffino L., Grunberg, K., Salgado, M., Córrodoba, A., Luna, C., Ortega, L., Rodríguez, A., Castagnaro, A. ve Taleisnik, E., 2001. Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar, Australian Journal of Agricultural Research, 52, 9, 903 – 910.
- de Veylder, L., Joubes, J. ve Inze, D., 2003. Plant cell transitions, Current Opinion of Plant Biology, 6, 536-543.
- de Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. ve Dirk, I., 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. Plant Cell; 13, 1653–1667.
- Dewitte, W. ve Murray, J.A.H., 2003. The plant cell cycle, Annual Review of Plant Biology, 54, 235-264
- Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C. ve Larkins, B.A., 2002. Genetic analyses of endoreduplication in *Zea mays* endosperm: evidence of sporophytic and zygotic maternal control, Genetics, 160, 1163–1177.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. ve Scheres, B., 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root, Development, 119, 71-84.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E. ve Dengler, N.G., 1999. Cell Cycling and Cell Enlargement in Developing Leaves of *Arabidopsis*, Developmental Biology, 215, 407–419.
- 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.

- Erickson, R.O. ve Sax, K.B., 1956. Rates of cell division and cell elongation in the growth of the primary root of *Zea mays*, Proceedings of the American Philosophical Society, 100, 5, 499-514.
- Erickson, R.O. ve Silk, W.K., 1980. The kinematics of plant growth, Scientific American, 242, 134-151.
- Faris, J.A., 1926. Cold chlorosis of sugar cane, Phytopathology, 16, 885–891.
- Felsenfeld, G. ve Groudine, M., 2003. Controlling the Double helix, Nature, 421, 448-453.
- Ferjani, A., Horiguchi, G., Yano, S. ve Tsukaya, H., 2007. Analysis of Leaf Development in fugu Mutants of *Arabidopsis* Reveals Three Compensation Modes That Modulate Cell Expansion in Determinate Organs, Plant Physiology, 144, 988–999.
- Fiorani, F., 2001, Leaf growth of contrasting *Poa* species, Department of Plant Ecophysiology. Utrecht, Utrecht University.
- Fiorani, F., Beemster, G. T. S., Bultynck, L. ve Lambers H., 2000. Can Meristematic Activity Determine Variation in Leaf Size and Elongation Rate among Four *Poa* Species? A Kinematic Study, Plant Physiology, 124, 845-856.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. ve Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stres in plants, Physiologia Plantarum, 92, 696-717.
- Francis, D. ve Barlow, P.W., 1988. Temperature and the cell cycle. In S Long, FI Woodward, eds, Plants and Temperature, Company of Biologists, Cambridge, UK, 181–202.
- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F. ve Bartels, D., 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, Plant Cell, 12, 111–124.
- Frery, A., Nesbit, T.C., Frery, A., Grandillo, S., van der Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B. ve Thanksley, S.D., 2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size, Science, 289, 85-88.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stres signaling Networks, Current Opinion in Plant Biology, 9, 436–442.
- Gandar, P.W., 1980. The analysis of growth and cell production in root apices, Botanical Gazette JSTOR, 141, 2, 131-138.
- Garber, M. ve Steponkus, P.L., 1976. Alterations in chloroplast thylakoids during cold acclimation, Plant Physiology 57, 681–686.

- Gastal, F. ve Nelson, C.J., 1994. Nitrogen Use within the Growing Leaf Blade of Tall Fescue, Plant Physiol., 105, 1, 191-197.
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D. ve Grandjean, O., 2001. Mutations in *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*, Development, 128, 4847-4858.
- Gemel, J., Golinowski, W. ve Kaniuga, Z., 1986. Low-temperature induced changes in chloroplast ultrastructure in relation to changes of Hill reaction activity, manganese and free fatty acid levels in chloroplasts of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. Acta Physiologiae Plantarum, 8, 135–143.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A. ve Dean, C., 2001. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*, Cell, 107, 525-535.
- 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., 1999a. Water deficit and spatial pattern of leaf development: variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development, Plant Physiol., 119, 609–620.
- Granier, C. ve Tardieu, F., 1999b. Leaf expansion and cell division are affected by reducing absorbed light before but not after the decline in cell division rate in the sunflower leaf, Plant Cell Environ, 22, 1365–1376.
- Greenup, A., Peacock, W.J., Dennis, E.S. ve Trevaskis, B., 2009. The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals, Annals of Botany, 103, 8, 1165-72.
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M. ve Coupland G. 1997. A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*, Nature, 386, 44-51.
- Goodwin, R.H. ve Stepka, W., 1945. Growth and differentiation in the root tip of *Phleum pratense*, American Journal of Botany, 32, 36-46.
- Guye, M.G. ve Wilson, J.M., 1987. The effect of chilling and chill-hardening temperatures on stomatal behaviour in chill-sensitive species and cultures, Plant Physiological Biochemistry, 25, 717-721.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. ve Hinch, D.K., 2008. Metabolomics of temperature stress, Physiologia Plantarum, 132, 2, 220-235.

- 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, 49:583-49:589.
- Hale, M.G. ve Orcutt, D.M., 1987. The Physiology of Under Stress, John Wiley and Sons, New York, USA, 117-127.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Clarendon Press.
- Handa, S., Bressan, R.A., Handa, A.K., Carpita, N.C. ve Hasegawa, P.M., 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress, Plant Physiology, 73, 834-843.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. ve Handa, A.K., 1984. Cellular Mechanisms of Tolerance to Water Stress, Horticultural Sciences, 19, 371-377.
- Hejnowicz Z., 1956, Growth and differentiation in the root of *Phleum ratense*. II. Distribution of cell divisions in the root, Acta Soc Bot Pol, Polonya, 25, 615-628.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. ve Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology, 8, R19-R19.14.
- Heid, C.A, Stevens, J., Livak, K.J. ve Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR., Genome Research, 6, 10, 986-994.
- 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.
- Henshaw, G.G., Jha, K.K., Mehta, A.R., Joan Shadashaft, D. ve Street, H.E., 1966. Studies on the Growth in Culture of Plant Cells: I. GROWTH PATTERNS IN BATCH PROPAGATED SUSPENSION CULTURES, Journal of Experimental Botany, 17, 2, 362-377.
- Hofmeister, W., 1867. Die Lehre von der Pflanzenzelle. W Engelman, Leipzig.
- Hoshino, Y., Türkan, İ. ve Mii, M., 1998. Transgenic bialaphos-resistant snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) produced by *Agrobacterium rhizogenes* transformation Scientia Horticulturae, 76, 37-57.
- Herner, R.C., 1990. The effects of chilling temperatures during seed germination and early seedling growth, 51-69, In: Ed. Wang CY., Chilling injury of horticultural crops, CRS Press. Boca Raton.
- Hopkins, WG., 1995. Introduction to Plant Physiology, The University of Western Ontario, John Wiley and Sons Inc., 423-443.

- Horiguchi, G., Ferjani, A., Fujikura, U. ve Tsukaya, H., 2006. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*, Journal of Plant Research, 119, 1, 37-42.
- Horiguchi, G., Kim, G.T. ve Tsukaya, H., 2005. The transcription factor *AtGRF5* and the transcription coactivator *AN3* regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*, Plant Journal, 43, 1, 68-78.
- Hsieh, T. ve Fische, R.L., 2005. Biology of Chromatin Dynamics, Annual Review of Plant Biology, 56, 327-351.
- Humbeck, K., Melis, A. ve Krupinska, K., 1994. Effects of chilling on chloroplast development in barley primary foliage leaves, Journal of Plant Physiology, 143, 744-749.
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Hurry, V.M., Krol, M., Falk, S. ve Griffith, M., 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. Photosynthesis Research, 37, 19-39.
- Ingram, J. ve Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants, Annual Review of Plant Biology, 47, 377-403.
- Inze, D. ve de Veylder, L., 2006. Cell Cycle Regulation in Plant Development, Annual Review of Genetics, 40, 77-105.
- Ishikawa, HA., 1996. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension cultured mung bean cells, American Journal of Botany, 83, 825-835.
- Jagels, R., 1970. Photosynthetic apparatus in *Selaginella*. II. Changes in plastid ultrastructure and pigment content under different light and temperature regimes. Canadian Journal of Botany, 48, 1853-1860.
- Jones, H.G., 1992. Plants and Microclimate, Cambridge University Press, Cambridge.
- Jorgensen, P. ve Tyers, M., 2004. How cells coordinate growth and division, Current Biology, 14, 23, R1014-R1027.
- Joubes, J. ve Chevalier, C., 2000. Endoreduplication in higher plants, Plant Mol Biol, 43, 735-745.
- Kadioglu, A. ve Terzi, R., 2007. Dehydration Avoidance Mechanism: Leaf Rolling. The Botanical Review, 73, 4, 290-302.
- Kadioğlu, A. ve Turgut, R., 1999. Some Biochemical Changes During Leaf Rolling in *Ctenanthe setosa* (Marantaceae), Acta Physiol. Plant., 21, 209-214.
- Kadioğlu, A., Turgut, R., Palavan-Ünsal, N. ve Saruhan, N., 2002. Effect of Polyamines on Leaf Rolling in *Ctenanthe setosa*, Israel J. Plant. Sci. 50, 19-23.

- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y., 2005. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms, G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 18, 723-740.
- Kaniuga, Z., 2008. Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals, Plant Biology (Stuttgart), 10, 2, 171-84.
- Karpilova, I., Chugunova, N., Bilç, K. ve Chermnykh, L., 1980. Ontogenetic changes of chloroplast ultrastructure, photosynthates, and photosynthate outflow from the leaves in cucumber plants under conditions of reduced night temperature, Soviet Plant Physiology, 29, 113–120.
- Kejnovsky, E., Leitch, I.J. ve Leitch, A.R., 2009. Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes, Trends in Ecology & Evolution, 572-82.
- Kessler, B., 1961. Nucleic Acids As Factors in Drought Resistance of Higher Plants, Recent Advan. Bot., 1153-1159.
- Kim, J.H. ve Kende, H., 2004. A transcriptional coactivator, *AtGIF1*, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*, Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 101, 36, 13374-13379.
- Kim, J.H., Choi, D. ve Kende, H., 2003. The *AtGRF* family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*, Plant Journal, 36, 1, 94-104.
- Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C.R. ve Brown, R.M., 1999. Immunogold labeling of rpssetta terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*, Plant Cell, 11, 2075-2085.
- Kinoshita, T., Harada, J.J., Goldberg, R.B. ve Fischer, R.L., 2001. Polycomb repression of flowering during early plant development, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 14156-14161.
- Knight, H. ve Knight, M.R., 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk, Trends Plant Science, 6, 262–267.
- Koning, A.J., Tanimoto, E.Y., Kiehne, K., Rost, T. ve Comaia, L., 1991. Cell-Specific Expression of Plant *Histone H2A* Genes, The Plant Cell, 3, 657-665.
- Kutschera, U. ve Niklas, K.J., 2007. The epidermal-growth-control theory of stem elongation: an old and a new perspective, Journal of Plant Physiology, 164, 11, 1395-409.
- Kozłowski, T.T. ve Pallardy, S.G., 1997. Physiology of Woody Plants, Academic Press, San Diego.
- Kramer, P.J., 1980. Water Relations in Plants, Academic Press, New York.

- Kratsch, H.A. ve Wise, R.R., 2000. The ultrastructure of chilling stress, Plant, Cell and Environment, 23, 337–350.
- Lazarovits, G., 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past, Canadian Journal of Plant Pathology, 23, 1, 1-7.
- Lafuente¹, M.T., Belver, A., Guye, M.G. ve Saltveit, M.E., 1991. Effect of Temperature Conditioning on Chilling Injury of Cucumber Cotyledons, Plant Physiology, 95, 443-449.
- Lecoecur, J., Wery, J., Turc, O. ve Tardieu, F., 1995. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development, J Exp Bot, 46, 1093–1101.
- Leddert, P.C. ve Geneves, L., 1982. Effects of low temperatures (+6 degrees C and +2 degrees C) on the fine structure of mitochondria and chloroplasts in the *Ephedra* tissues, cultivated in vitro, Annales Des Sciences Naturelles, 13, 27–49.
- Levitt, J., 1972, Responses of plants to environmental stresses, Academic Press, New York.
- Lewitt, J., 1980, Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, Methods, 25, 402–408.
- Ludlow, M.M., Fisher, M.J. ve Wilson, J.R., 1985. Stomatal Adjustment to Water Deficits in Three Tropical Grasses and A Tropical Legumen Grown in Controlled Conditions and in the Field, Australian Journal of Plant Physiology, 12, 131-149.
- Lyndon, R.F., 1990. Plant Development, Unwin Hyman, United Kingdom.
- Lockhart, J.A., 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. Journal of Theoretical Biology, 8, 264-275.
- Maurel, C., 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes, Annual Review of Plant Biology, 48, 399–429.
- McKersie, B.D. ve Lehsem, Y., 1994, Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M. ve Cosgrove, D.J., 1992, Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants, Plant Cell, 4, 1425-1433.
- McWilliam, JR., Kramer, PJ. ve Musser, RL., 1982. Temperature induced water stress in chilling sensitive plants. Australian Journal of Plant Physiology, 9, 343-352.

- Melaragno, J.E., Mehrotra, B. ve Coleman, A.W., 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*, Plant Cell, 5, 1661–1668.
- Micol, J.L., 2009. Leaf development: time to turn over a new leaf?, Current Opinion in Plant Biology, 12, 1, 9-16.
- Mizukami, Y. ve Fischer, R.L., 2000. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis, Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 18; 97, 2, 942-947.
- Mizukami, Y., 2001. A matter of size: developmental control of organ size in plants. Current Opinion in Plant Biology, 4, 6, 533-539.
- Moon, Y.H., Chen, L., Pan, R.L., Chang H.S., Zhu, T., Maffeo, D. ve Sing, Z.R., 2002. EMF repression of embryo and flower development in *Arabidopsis*, XIII International Conference on Arabidopsis Research, Seville, Abstract 11-12.
- Mouchel, C.F., Briggs, G.C. ve Hardtke, C.S., 2004. Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies *BREVIS RADIX*, a novel regulator of cell proliferation and elongation in root, Genes Development, 18, 700-714.
- 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.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. ve Thomson, J.A., 2002. Physiological and Molecular Insights into Drought Tolerance, Afr. J. Biotechnol., 1, 23-38.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A. ve Hirt, H., 1999. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stres, Plant Journal, 20, 381–388.
- Murphy, C. ve Wilson, J.M., 1981. Ultrastructural features of chilling-injury in *Episcia reptans*, Plant Cell and Environment, 4, 261–265.
- Musser, R.L., Thomas, S.A., Wise, R.R., Peeler, T. ve Naylor, A.W., 1984. Chloroplast ultrastructure, chlorophyll fluorescence, and pigment composition in chilling-stressed soybeans, Plant Physiology, 74, 749–754.
- Nameth, A. ve Langst, G., 2004. Chromatin higher order structure: Opening up chromatin for transcription, Briefings in Functional Genomics and proteomics, 2, 4, 334-343.
- Nelissen, H., Boccardi, T.M., Himanen, K. ve Van Lijsebettens, M., 2008. Impact of Core Histone Modifications on Transcriptional Regulation and Plant Growth, Critical Reviews in Plant Sciences, 26, 243-263.

- Nessler, C.L. ve Wernsman, E.A., 1980. Ultrastructural observations of extranuclear temperature-sensitive lethality in *Nicotiana tabacum* L., Botanical Gazette, 141, 9–14.
- Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J. ve Somerville, C., 1999. *PICKLE* is a *CHD3* chromatin-remodelling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*, Science, Proc Natl Acad Sci USA, 96, 13839-13844.
- O'Neil, S.D., Priestley, D.A. ve Chabot, B.F. 1981. Temperature and aging effects on leaf membranes of a cold hardy perennial, *Fragaria virginiana*, Plant Physiology, 68, 1409–1415.
- Orcutt, D.M. ve Nilsen, E.T., 1996. The Physiology of Plants Under Stress: Soil and biotic factors, Jon Wiley & Sons.
- Otegui, M. ve Staehelin LA., 2000a. Cytokinesis in flowering plants: more than one way to divide a cell, Current opinion of plant Biology, 3, 493-502.
- Otegui, M. ve Staehelin, L.A., 2000b. Syncytial-type cell plates: a novel kind of cell plate involved in endosperm cellularization of *Arabidopsis*, Plant Cell, 12, 933-947.
- Otegui, M., Mastrorarde, D.N., Kang, B-H, Bednarek, SY. ve Staehelin, L.A., 2001. Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plate during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography, Plant Cell, 13, 2033-2052.
- Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. ve Theologis, A., 2005. Functional Genomic Analysis of the *AUXIN/INDOLE-3-ACETICACID* Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*, The Plant Cell, 17, 3282–3300.
- Ooi, S. ve Bestor, T.H., 2008. The colorful history of DNA Demethylation, Cell, 133.
- Panda, S.K, Baluska, F. ve Matsumoto, H., 2009. Aluminum stress signaling in plants, Plant Signal Behav., 4, 7, 592-597.
- Paradez, A.R., Somerville, C.R. ve Ehrhardt, D.W., 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules, Science, 312, 1491-1495.
- Patel, D. ve Franklin, K.A., 2009. Temperature-regulation of plant architecture., Plant Signaling and Behavior, 4, 7, 577-579.
- Pietruszka, M., Lewicka, S., ve Pazurkiewicz-Kocot, K., 2007. Temperature and the Growth of plant cells, Journal of Plant Growth Regulation, 26, 15-25.

- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. ve Stewart, C.R., 1994a. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide, Plant Cell, 6, 1, 65-74.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D. ve Stewart, C.R., 1994b. Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Abscisic Acid Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings, Plant Physiology, 105, 2, 619-627.
- Raison, J.K. ve Lyons, J.M., 1986. Chilling injury: a plea for uniform terminology, Plant Cell Environment, 9, 685.
- Raison, J.K. ve Chapman, E.A., 1976. Membrane phase changes in chilling-sensitive *Vigna radiata* and their significance to growth. Australian Journal of Plant Physiology 3, 291-299.
- Raison, J.K., Chapman, E.A., Wright, L.C. ve Jacobs, S.W.L., 1979. Membrane lipid transitions: their correlation with the climatic distribution of plants, In JM Lyons, D Graham, JK Raison, eds, Low Temperature Stress in Crop Plants, Academic Press, New York, 177-186
- Reichheld, J.P., Vernoux, T., Lardon, F., van Montagu, M. ve Inzé, D., 1999. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress, The Plant Journal, 17, 6, 647-656.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D. ve Beemster, G.T., 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes, Plant Physiology, 143, 3, 1429-1438.
- Sacks, M.M., Silk, W.K. ve Burman, P., 1997. Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize, Plant physiology, 114, 519-527.
- Sachs, J., 1882. Vorlesungen über Pflanzen-Physiologie: XXXIII Vorlesung. Engelmann W, Leipzig.
- Sachs, J., 1874. Ueber das Wachstum der Haupt-und Nebenwurzeln. Archiv für die Gesamte Anatomie und Physiologie, 1, 385-474.
- Saltveit, M.E. ve Moris, L.L., 1990. Overview of chilling injury of horticultural crops, In CY Wang, ed, Chilling Injury of Horticultural Crops. CRC Press, Boca Raton, FL, 3-15.
- Salisbury, F.D. ve Ross, C.W., 1992. Plant Physiology, Wadsworth Publishing Co., California.
- Sanchez, Mde L., Caro, E., Desvoyes B, Ramirez-Parra E. ve Gutierrez C., 2008. Chromatin dynamics during the plant cell cycle, Seminars in Cell and Developmental Biology, 19, 6, 537-546.

- Sanchez-Rodriguez, C., Rubio-Somoza, I., Sibout, R. ve Persson, S., 2010. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth, Trends in Plant Science, 15, 5.
- Saruhan, N., Terzi, R., Sağlam, A. ve Kadioğlu, A., 2010. Scavenging of reactive oxygen species in apoplastic and symplastic areas of rolled leaves in *Ctenanthe setosa* under drought stress, Acta Biologica Hungarica, 61, 3, 282-98.
- Saruhan, N., Terzi, R., Sağlam, A. ve Kadioglu, A., 2009. The relationship between leaf rolling and ascorbate-glutathione cycle enzymes in apoplastic and symplastic areas of *Ctenanthe setosa* subjected to drought stress. Biological Research, 42, 3, 315-326.
- Saruhan, N., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yarak kıvrılması sırasında antioksidan sistemde meydana gelen apoplastik ve simplastik değişimler, Trabzon, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Sassenrath, G.F., Ort, G.F. ve Portis, A.R., 1990. Impaired reductive activation of stromal biphosphatases in tomato leaves following low temperature exposure at high light, Archives of Biochemistry and Biophysics, 282, 302-308.
- Schnyder, H., Kavanova, M. ve Nelson, C.J., 2009. Kinematic analysis of leaf growth in grasses: a comment on Spatial and temporal quantitative analysis of cell division and elongation rate in growing wheat leaves under saline conditions, J Integr Plant Biol., 51, 5, 433-6.
- Schnyder, H., Nelson, C.J. ve Coutts, J.H., 1987. Assessment of Spatial Distribution of Growth in the Elongation Zone of Grass Leaf Blades, Plant Physiology, 85, 1, 290-293.
- Schöffl, F., Prandl, R. ve Reindl, A., 1998. Regulation of the heat-shock response, Plant Physiology, 117, 1135–1141.
- Sekmen, A.H., Türkan, I. ve Takio, S., 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*, Physiologia Plantarum, 131, 399–411.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R. ve Montesinos, C., 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress, Journal of Experimental Botany 50, 1023–1036.
- Serrano, R., Mulet, J.M, Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R. ve Montesinos, C., 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress, Journal of Experimental Botany, 50, 1023–1036.

- Setter, T.L. ve Flannigan, B.A., 2001. Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm, J Exp Bot., 52, 360, 1401-1408.
- Sgherri, C.L.M., Maffei, M. ve Navari-Izzo, F. 2000. Antioxidative Enzymes in Wheat Subjected to Increasing Water Deficit and Rewatering, Journal of Plant Physiology, 157, 273-279.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response, Plant Physiology, 115, 327-334.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways, Current Opinion of Plant Biology, 3, 217-223.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response, Plant Physiology, 115, 327-334
- Silk, W.K., 1984. Quantitative description of development, Annual Review of Plant Physiology, 35, 479-518.
- Silk, W.K., Lord, E.M. ve Eckard, K.J., 1989. Growth patterns inferred from anatomical records, Plant Physiology, 90, 708-713.
- Silk, W.K. ve Erickson, R.O., 1979. Kinematics of plant growth, Journal of Theoretical Biology, 76, 4, 481-501.
- Silk, W.K., 2006. Moving with the flow: what transport laws reveal about cell division and expansion, Journal of Plant Research, 119, 23-29.
- Smith, L.G., Hake, S. ve Sylvester, A.W., 1996. The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape, Development, 122, 2, 481-489.
- Smith, L.G., 2001. Plant cell division: building walls in the right places, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2, 33-39.
- Smirnoff, N., 1998. Plant resistance to environmental stress. Current Opinion Biotechnology, 9, 214-219.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, New Phytologist., 125, 27-58.
- Sökmen, A., Sökmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Unlu M. ve Akpulat, H.A., 2004. The in vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae), Phytotherapy Research, 18, 451-456.

- Springer, N.M. ve Kaeppler, S.M., 2005. Evolutionary Divergence of Monocot and Dicot Methyl-CpG-Binding Domain Proteins, Plant Physiology, 138, 92-104.
- Stochinger, E.J, Gilmour, S.J. ve Thomashow, M.F., 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit, The Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 94, 1035–1040.
- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. ve Sano, H., 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress, J. Biol. Chem., 277, 37741-37746.
- Stochinger, E.J., Mao, Y., Regier, M.K., Triezenberg, S.J. ve Thomashow, M.F., 2001. Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with *CBF1*, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression, Nucleic Acids Research, 29, 1524-1533.
- Street, H.E. ve Öpik, H., 1984. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development, Third Edition, Baltimore.
- Spencer, T.M., O'Brien, J.V., Start, W.G., Adams, T.R., Gordon-Kamm, W. J. ve Lemaux, P.G., 1992. Segregation of transgenes in maize, Plant Molecular Biology, 18, 2, 201-210.
- Şar, S. ve Asil, E., 1985. İç Anadolu Bölgesinde Böbrek Taşlarına Karşı Kullanılan Halk İlaçları, Ankara Ecz. Fak. Der., 15. 58.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2006. Plant Physiology, Fourth Edition.
- Takada, S., Kotake, T. ve Goto, K., 2002. *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)* gene encodes an HP1-like protein and negatively regulates FT expression, XIII International Conference on Arabidopsis Research, Seville, Abstract 11-12.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guiamet, J.J. ve Araus, J.L., 2000. Oxidative Damage to Tylakoid Proteins in Water-Stressed Leaves of Wheat (*Triticum aestivum*), Physiol. Plant., 108, 398-404.
- Taylor, A.O. ve Craig, A.S., 1971. Plants under climatic stress. II. Low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. Plant Physiology, 47, 719–725.
- Terashima, I. ve Inoue, Y., 1985, Vertical gradients in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependent on intra-leaf light environment. Plant and Cell Physiology, 26, 781–785.
- Terzi, R., Saruhan, N., Sağlam, A., Nar, H. ve Kadioğlu, A., 2009. Photosystem II functionality and antioxidant system changes during leaf rolling in post-stress emerging *Ctenanthe setosa* exposed to drought, Acta Biologica Hungarica, 60, 4, 417-431.

- Thomashow, M.F., 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance, Plant Physiology, 118, 1–7.
- Thomashow, M.F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, Annual Review of Plant Biology, 50, 571–599.
- Thomashow, M.F., Gilmour, S.J., Stockinger, E.J., Jaglo-Ottosen, K.R. ve Zarka, D.G., 2001, Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation, Physiologia Plantarum, 112, 171–175.
- Tiryakioğlu, Y., 2006. Dondan koruyucu bazı preparat uygulamalarının örtü altında yetiştirilen karanfilde (*Dianthus caryophyllus L.*) düşük sıcaklığa dayanım, verim ve kaliteye etkileri, Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Tardieu, F. ve Granier, C., 2000. Quantitative analysis of cell division in leaves: methods, developmental patterns and effects of environmental conditions. Plant Molecular Biology, 43, 555-567.
- Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, P., Granier, C. ve Muller B., 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature, J Exp Bot., 51, 350, 1505-1514.
- Tsukaya, H. ve Beemster, G.T.S., 2006, Genetics, cell cycle and cell expansion in organogenesis in plants, Journal of Plant Research, 119, 1–4.
- Tsukaya, H., 2008. Controlling size in multicellular organs: Focus on the leaf, Plos Biology, 6, 7, 1373-1376.
- 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 theor, Int Rev Cytol., 217, 1–39.
- Tyerman, S.D., Bohnert, H.J., Maurel, C., Steudle, E. ve Smith, J.A.C., 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. Journal of Experimental Botany, 50, 1055–1071.
- Turner, N.C., Begg, J.E. ve Tonnet, M.L., 1978. Osmotic Adjustment of Sorghum and Sunflower Crops in Response to Water Deficits and Its Influence on the Water Potential at Which Stomata Close, Aust. J. Plant Physiol., 5, 597-608.
- Turner, N.C., O'Toole, J.C., Cruz, R.T., Nambuco, O. S. ve Ahmad, S., 1986. Responses of Seven Diverse Rice Cultivars to Water Deficits. I. Stress Development, Canopy Temperature, Leaf Rolling and Growht, Field Crops Research, 13, 257-271.
- Türkan, İ. ve Demiral, T., 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance, Environmental and Experimental Botany, 67, 2–9.

- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. ve Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, Plant Science, 168, 223–231.
- URL-1, <http://www.vcbio.science.ru.nl/en/image-gallery/show/PL0096/>, 05.05.2010.
- URL-2, <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>, 10.10.2009.
- URL-3, http://www.chromatin-consortium.org/docs/leaf_paint_assay.pdf, 20.09.2009.
- Wang, W.X., Barak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O. ve Altman, A., 2003a. Abiotic resistance and chaperones: possible physiology role of SPI, a stable and stabilizing protein from *Populus*, In: Vasil IK (ed) Plant biotechnology 2000 and beyond. Kluwer, Dordrecht, 439–443
- Wang, W., Vinocur, B. ve Altman, A., 2003b. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218, 1–14.
- Wang, W., Vinocur B., Shoseyov O. ve Altman A., 2004, The role of plant heat-shock proteins/molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science, 9, 244-252.
- Wagner, D. ve Meyerowitz, E.M., 2002. *SPLAYED*, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*, Current Biology, 12, 85-94.
- Wagner, D., 2003. Chromatin regulation of plant development, Current Opinion in Plant Biology, 6, 20-28.
- Weijers, D. ve Jurgens, G., 2004. Funneling auxin action: specificity in signal transduction, Current Opinion of Plant Biology, 7, 687-693.
- Went, F.W. ve Thimann, K.V., 1937. Phytohormones., Macmillan, New-York.
- Wilson, J.M., 1984. The economic importance of chilling injury, Outlook Agriculture, 14, 197-203.
- Wise, R.R. ve Naylor, A.W., 1987. Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiology, 83, 272–277.
- Wise, R.R., McWilliam, J. ve Naylor, A.W., 1983. A comparative study of low-temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. Plant Cell and Environment, 6, 525–535.
- Wu, J., Lightner, J., Warwick, N. ve Browse, J., 1997. Lowtemperature damage and subsequent recovery of *fab1* mutant *Arabidopsis* exposed to 2°C. Plant Physiology, 113, 347–356.

- van Damme, D., 2009. Division plane determination during plant somatic cytokinesis., Current Opinion in Plant Biology, 12, 6, 745-751.
- van Hasselt, P., 1974. Photo-oxidative damage to the ultrastructure of *Cucumis* chloroplasts during chilling. Proceedings Koninkl Nederl Akademie Van Wetenschappen, Amsterdam Series C, 77, 50–56.
- van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P.C., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J.D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J.C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M, De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E. ve De Jaeger, G., 2010. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*, Molecular Systems Biology, 6, 397-409.
- 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.
- Volenec, J.J. ve Nelson, C.J., 1981, Cell dynamics in leaf meristems of contrasting tall fescue genotypes, Crop Science, 21, 381-385.
- Verbelen, J.P. ve Vissenberg, K., 2006. The expanding cell, Plant Cell Monogram.
- Vierling, E., 1991. The roles of heat-shock proteins in plants, Annual Review of Plant Biology, 42, 579–620.
- Vierling, E. ve Kimpel, J.A., 1992. Plant responses to environmental stres, Current Opinion of Biotechnology, 3, 164–170
- Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses., Annual Review of Plant Biology, 57, 781-803.
- Yano, M., Kojima, S., Takahashi, Y., Lin H. ve Sasaki, T., 2001. Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant, Plant Physiology, 127, 4, 1425-1429.
- Yin, X., Goudriaan, J., Lantinga, E., Vos, J. ve Spiertz, H.J., 2003. A Flexible Sigmoid Function of Determinate Growth, Annals of Botany, 91, 3, 361-371.
- Yoshida, N., Yanal, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R. ve Tkahashi, S., 2001. *EMBRYONIC FLOWER2*, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*, Plant Cell, 13, 2471-2481.
- Zhu, J.K., 2001a. Plant salt tolerance, Trends in Plant Science, 6, 66–71.

- Zhu, J.K., 2001b. Cell signaling under salt, water and cold stresses, Current Opinion Plant Biology, 4, 401–406.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology, 53, 247–273.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M. ve Bressan, R.A., 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. Critical Review of Plant Science, 16, 253–277.
- Zimmermann, S. ve Sentenac, H., 1999. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions, Current Opinion of Plant Biology, 2, 477–482.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. ve Vantriet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve, Applied and Environmental Microbiology, 1875-1881.

ÖZGEÇMİŞ

18.05.1981 tarihinde Samsun'un Çarşamba ilçesinde doğdu. Orta öğrenimini Ankara Samanyolu Koleji'nde tamamladı. 2003 yılında KTÜ Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans öğrenimine başladı. 2004-2005 öğretim yılında Belçika'nın Gent Üniversitesi Bitki Sistemleri Biyolojisi Bölümü'nde Erasmus programıyla 1 yıl süreyle akademik çalışmalarını yürüttü. 2006 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. TÜBİTAK BİDEB 2214 Yurt Dışı Doktora Araştırma Burs Programı'nın desteği ile 2008-2009 yıllarında 1 yıl süreyle Belçika'nın Gent Üniversitesi Bitki Sistemleri Biyolojisi Bölümü'nde doktora çalışmalarını sürdürdü. İyi derecede ingilizce bilmektedir.