

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

**ARABİDOPSIS THALIANA'NIN POLEN TÜPÜ
BÜYÜMESİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUMDA YÜKSEK
SICAKLIĞA BAĞLI YANLIŞ KATLANMIŞ PROTEİN
YANITININ BELİRLENMESİ**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Doç. Dr. Dilek Ünal
PROJE NOSU: 2018-01.BŞEÜ.04-03

ARAŞTIRMACILAR:
1- Dr Öğr. Üyesi Ayşegül AKPINAR

BAŞLAMA TARİHİ: 02-07-2018

BİTİŞ TARİHİ: 10-07-2020

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLECİK, 2020



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	3
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	4
ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	6
1. GİRİŞ	7
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.2. Polen Çimlenmesi	13
3.3. Moleküler analizler için örnek toplanması.....	13
3.4. Ribozomal Profiling (RPF) analizi.....	13
3.5. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi.....	14
3.6. Quantative Real Time PCR	15
3.7. NBT boyama	15
4. BULGULAR	15
5. SONUÇ	24
6. KAYNAKLAR.....	26
7. EKLER	30
EK-1. Proje Mali Etkinlikleri	30



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

TABLolar DİZİNİ

Çizelge 1: Sıcaklık stresi koşulunda UPR ile ilişkili genlerin transkripsiyon profili

Çizelge 2: Sıcaklık stresi koşulunda UPR ile ilişkili proteinlerin translasyon profili



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dikdörtgen petrilere moleküler çalışmalar için spatula ile yayılan polenlerin görünüşü

Şekil 2. RPF tekniğinin prensibi

Şekil 3. Col-0 bitkilerinin genel görünüşü

Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda DTT uygulamasının polen tüpü büyümesine etkisi

Şekil 5. Farklı konsantrasyonlarda spm uygulanan polenlerin 24 ve 32 °C'deki polen tüpü büyüme sonuçları

Şekil 6. DTT ve spm uygulanan örneklerin polen tüpü büyüme sonuçları

Şekil 7. *adc1-3* mutant *A. thaliana* bitkilerinin genel görünümü

Şekil 8. *adc1-3* mutant ve yabani tip *A. thaliana* polenlerine 0.1 mM DTT uygulamasının polen tüpü büyümesi üzerine etkisi

Şekil 9. *adc1-3* ve yabani tip *A. thaliana* polenlerine spm ve DTT uygulamasının polen tüpü büyümesi üzerine etkisi

Şekil 10. 0.1 mM DTT uygulanan ve uygulanmayan farklı gruplara ait polen tüplerinin NBT boyama sonucu a) yabani tip kontrol, b) yabani tip spm uygulaması, c) *adc1-3* mutant 0.1 mM DTT uygulanması, d) *adc1-3* mutant 0.1 mM DTT ve spm uygulaması

Şekil 11. NBT boyaması imaje J ölçümü ile göreceli yoğunluk sonucu

Şekil 12. Polene özgü ifade olan genlerin dağılımı (Loraine ve ark 2013 sonuçları ile karşılaştırılmıştır)

Şekil 13. Sıcaklık stresine bağlı olarak ortaya çıkan transkripsiyonal değişimlerinin DeSeg2 analiz sonucu

Şekil 14. Sıcaklık stresine maruz kalan polen tüplerinde UPR sinyalinde yer alan ER bZIP DNA bağlanma domaini (bzip60) ve protein disülfid izomeraz (PDI1-2) genlerinin ifade değişimi



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

ÖZET

Yüksek sıcaklığın bitkinin üreme organlarını özellikle polen üretimi ve canlılığını olumsuz etkilediği bilinmekte olmasına rağmen buna dair moleküler mekanizma ve sinyalizasyonun ortaya konmasına yönelik bilgilerimiz çok sınırlıdır. Endoplazmik retikulum da yer alan UPR sinyal yolağı yanlış katlanmış proteinlerin doğru katlanması için önemlidir. Bu sinyal yolağı, değişen çevresel koşullara bitkinin adaptasyonunu sağlamasında rol oynar. Bu nedenle çalışmamızda polende ER yanlış katlanmış protein yanıtlarının ortaya konması hedeflenmektedir. Çalışmamızda *A. thaliana* bitkisinin çiçeklerinden elde edilecek polenlerin normal ve yüksek sıcaklıkta çimlendirilerek moleküler analizleri gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Polen, yüksek sıcaklık, Endoplazmik retikulum yanlış katlanmış protein sinyali



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

ABSTRACT

Although high temperature is effective negatively on reproductive tissue especially pollen viability and production, it has been limited knowledge about molecular mechanisms and signalization during this progress. UPR signal pathway in Endoplasmic reticulum is a important for re-folded proteins which are unfolded proteins. This signal pathway plays a role providing plant adaptaion to changed enviromental condition. For this reason, we aim that ER unfolded protein response will showed in pollen. In this our study, we research on molecular and physiological analysis in pollen which provided *A. thaliana* flowers are germinated normal and high temperature condition.

Key words: Pollen, high temperature, endoplasmic reticulum unfoled protein signal



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

1. GİRİŞ

Sıcaklık, kuraklık, radyasyon gibi çeşitli çevresel etmenlerden dolayı, her sene birçok ülke tarım ürünlerinde önemli ölçüde verim kaybı yaşamaktadır. İklim değişikliği dünya çapında en ciddi problemlerden biridir. Küresel ısınma bitkilerin normal büyüme ve gelişim süreçlerini hiç şüphesiz olumsuz etkilemektedir. Yüksek sıcaklığın bitkinin üreme organlarını özellikle polen üretimi ve canlılığını olumsuz etkilediği bilinmektedir (Thomas ve Prasad 2003). Yüksek sıcaklık polen üretimini azaltmakta ve anterden polen tanesinin olgunlaşmadan salınmasına neden olmaktadır (Mesihovic ve ark 2016). Polen anter içindeki polen ana hücresinin mayoz geçirmesi ile oluşan mikrospordan gelişir. Yüksek sıcaklığa polenin duyarlılığı mayotik ve mitotik hücre bölünme kapasitesinin azalması ile ilişkilidir (Mesihovic ve ark 2016). Polinizasyonu takiben, polen stigma üzerine gelir ve çimlenerek dişi gematofite sperm hücrelerini ulaştıracak olan polen tüpünü meydana getirir. Polen tüpü büyümesi endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve mitokondri gibi birçok organellin koordineli çalışmasını gerektirir (Krichevsky ve ark 2007, Cai ve ark 2015). Polen tüpü büyümesinde görev alan birçok organelin yapısı yüksek sıcaklık altında değişir (Kandasamy ve Kristen 1989). Polen büyümesi ısı şokuna kısmen duyarlıdır çünkü ısı şoku proteinleri bulunmamaktadır (Gagliardi ve ark 1995, Volkov ve ark 2005). Isı şoku protein ifadesinin eksikliğinden dolayı, polen büyümesi normal gelişimi için kompleks moleküler etkileşimlere ihtiyaç duyar. Bu bağlamda son yıllarda yapılan çalışmalar, endoplazmik retikuluma bağlı meydana gelen yanlış katlanmış protein yanıtına ait yolaklarının polen çimlenmesi ve polen tüpü büyümesi ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

Endoplazmik retikulum bilindiği gibi ökaryotik hücrelerdeki salgı proteinlerinin üretiminde bir merkez olarak işlev görür. Salgı proteinleri son hedeflerine gitmeden önce endoplazmik retikuluma modifiye edilerek katlanırlar. Endoplazmik retikuluma proteinlerdeki disülfid bağ oluşumu sonunda bir reaktif oksijen molekülü (ROS) olan hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır. Bunun sonucunda hidrojen peroksit birikmesi meydana gelerek proteinlerin ve lipidlerin oksidasyonuna sebep olur. Bu koşullarda ortamda yanlış katlanmış proteinlerin oluşumu ve birikimi söz konusudur. Bu proteinlerin birikimi, proteinlerin tekrar katlanmasını veya parçalanmasını sağlayan genleri ve yolakları teşvik ederek yanlış katlanmış proteinlerin oluşumunu tetikler. Bu durumda yanlış katlanmış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

katlanmamış protein yanıtlarını da içeren sinyalizasyon mekanizması devreye girer. UPR sinyal yolağının amacı, hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin düzgün bir şekilde katlanmasını sağlamak ve endoplazmik retikulumun homeostazisini düzenlemektir. Bu sinyal yolağı ayrıca, değişen çevresel koşullarına bitkinin adaptasyonunu sağlamasında önemli bir rol üstlenmektedir.

Ökaryotik hücreler, bilindiği gibi hücre dışı ortamdaki değişikliklerin neden olduğu çeşitli stres türlerine yanıt verir. Endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi gibi hücre içi faktörler de strese neden olur. Meydana gelen bu stres şaperonlar ve proteinlerin ekspresyonunu indükleyen UPR yanıtını aktive eder. Bununla birlikte, stres aşırı veya sürekli ise ve endoplazmik retikulumda yanlış katlanan proteinlerin birikmesi engellenemez ise, UPR apoptozu tetikler ve böylece hücre elimine edilir.

Endoplazmik retikulum-lokalle edilmiş transmembran proteinleri IRE1, PERK ve ATF6, stres reseptörleri olarak görev yapan organellin lümenindeki katlanmamış proteinin yükünü tespit eder. Bu reseptörler aracılığı ile algılanan yanlış katlanmış protein sinyaline yanıt olarak transkripsiyonu tekrar düzenlemek için çekirdeğe ve protein sentezini düzenlemek için ise translasyon aparatına iletirler (Ron ve Walter, 2007).

Bu UPR stresini ortadan kaldırmak için hücre üç mekanizmayı devreye sokmaktadır:

1. Protein sentezi ve proteinin endoplazmik retikulum'un translokasyonu azaltılarak geçici bir adaptasyon ile endoplazmik retikuluma'a giren protein yükünde azalma sağlanır.
2. Katlanmamış protein cevabı (UPR/unfolded protein response) devreye sokulur. Bu amaçla UPR hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu gerektiren, daha uzun süreli bir adaptasyon amacıyla katlanmamış proteinlerle başa çıkmak için endoplazmik retikulumun kapasitesinde bir artış gerçekleşir.
3. Homeostazın yeniden sağlanamaması durumunda, katlanmamış proteinleri sergileyen hücrelerden organizmanın korunması için, hücre ölümü yanıtı oluşur[18].

Endoplazmik retikulum, neredeyse tüm salgılayıcı ve integral membran proteinleri için geniş bir membranöz ağ ve ana montaj bölgesidir. Translokasyon mekanizmaları yoluyla, translasyonu gerçekleştiren ikincil yapıdaki proteinler endoplazmik retikulumda salgı yollarına girer, burada daha sonra katlanırlar ve kovalent modifikasyonlar yoluyla daha üçüncül ve dördüncül yapılarını kazanır ya da komplekslere monte edilirler. Endoplazmik retikulumun



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

paketlenmiş moleküler alanında moleküler şaperonların mevcudiyeti, onu uygun protein katlanması ve yıkım için yanlış katlanmış proteinlerin tanımlanması ve işaretlenmesi için ideal ve benzersiz bir ortam haline getirir (Rashid ve ark 2015). Endoplasmik retikuluma giren katlanmamış proteinlerin yükü ile bu yükü idare eden hücresel makinenin kapasitesi arasında, ilk ikisi düzeltilen üç ana tepkiyi harekete geçirir. İlk olarak, Endoplasmik retikuluma giren protein yükünde, protein sentezini ve Endoplasmik retikuluma translokasyonu azaltarak elde edilen geçici bir adaptasyon olan bir azalma vardır. İkincisi, Endoplasmik retikulunun katlanmamış proteinleri işleme kapasitesinde bir artış vardır, bu da UPR hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu içeren daha uzun vadeli bir adaptasyondur. Homeostaz yeniden kurulamazsa, muhtemelen organizmayı yanlış katlanmış proteinler içeren hasarlı hücrelerden korumak için üçüncü bir mekanizma olan hücre ölümü tetiklenir.

Endoplasmik retikulum'da henüz katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler algılanması ile üç farklı membrana bağlı protein aktive olmaktadır. Bu membrana bağlı olan sinyal proteinleri; İnositol Gerektiren Enzim 1 (IRE1), Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) ve protein kinaz RNA benzeri bir Endoplasmik retikulum kinaz (PERK) dir. ATF6 normal koşullarda Endoplasmik retikulunun membranında bulunur, ancak stres altında Endoplasmik retikulundan ayrılır ve Golgi aygıtına taşındığı bilinmektedir. Transkripsiyonel ve translasyonel yeniden düzenlemeyle UPR, stresli hücrelerin stres koşullarına adapte olmasını sağlar. Bununla birlikte, endoplasmik retikulunda protein katlanması homeostazının sağlanamadığı durumlarda, UPR programlanmış hücre ölüm sinyalini başlatır.

Bitkilerdeki UPR sinyalinde hayvan ve mayalardakine benzer şekilde gerçekleşmektedir. Koizumi ve ark (2001) *A. thaliana'* da yaptıkları araştırmalar UPR sinyal yolağında IRE1, PERK ve ATF6 olmak üzere benzer üç farklı ER transmembran proteini görev aldığını ortaya koymuştur. Buna karşın, mayalardan farklı, hayvanlara benzer şekilde, bitkiler IRE1-bZIP60 sinyal yolu mevcuttur ve paralel olarak hareket eden sinyal moleküllerine sahiptir. Arabidopsis bZIP17 ve bZIP28 (ve pirinç bZIP39 ve bZIP60'taki ortologları) bZIP transkripsiyon faktörleridir. Hayvanlara benzer ATF6 – S1P / S2P sistemi, bZIP17 ve bZIP28, endoplasmik retikulum zarına sabitlenen öncü protein olarak sentezlenir. Endoplasmik retikulum stresine yanıt olarak, Golgide lokalize olan S1P ve S2P proteazları tarafından parçalanır ve bZIP alanı dahil sitoplazmik kısımlarının çekirdeğe taşınmasına izin verir (Bertolotti ve ark 2000).



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Yüksek bitkilerde UPR yanıtı kök ve yaprak gibi organlarda yaygın olarak çalışılmasına rağmen, polen çimlenmesi ve polen tüpü büyümesindeki fonksiyonlarına yönelik araştırmalar daha yeni ilgi çekmektedir. Kandasamy ve Kristen (1989) yüksek sıcaklık polen tüpü büyümesinde görev alan birçok organelin yapısının değişmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Gagliardi ve ark (1995) polende ısı şoku proteinleri bulunmadığından dolayı polen büyümesinin ısı şokuna kısmen duyarlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Isı şoku proteinlerinin ifadesinin eksikliğinden dolayı, polen büyümesi normal gelişimi için kompleks moleküler etkileşimlere ihtiyaç duyar. Bu moleküler etkileşimle ilgili bilgiler oldukça sınırlı olup, bu konuda geniş çaplı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Potocky ve ark (2007) polen tüpü büyümesinde NADPH oksidazlara bağlı reaktif oksijen türlerinin sinyalinin gerekli olduğunu göstermişlerdir. Gao ve ark (2014) polenin çimlenmesi ve tüpünün gelişmesi için ROS sinyalinin gerekli olduğunu ve düşük sıcaklık koşullarında bu sinyalin engellendiğini rapor etmişlerdir. Cai ve ark (2015) Aktin sitoskeletonunun organizasyonu ayrıca polen tüpü büyümesi boyunca organeller arasındaki trafiğin düzenlenmesi içinde gerekli olduğunu tespit etmiştir. Deng ve ark (2016) yaptıkları çalışmada IRE1'in yüksek sıcaklık koşullarında polen gelişiminde rol oynayabileceklerine işaret etmektedir. Benzer şekilde, Fragkostefanakis ve ark (2016) da polen gelişimi ve fertilitesinde Endoplasmik retikulumdaki katlanmamış protein yanıtının önemli olduğunu ve polenlerin özellikle sıcaklık toleransına adaptasyonunda rol oynayabileceğini önermektedir.

Çeşitli stres koşullarına bağlı olarak yanlış katlanmış protein sinyal yolağı bitki adaptasyonun sağlanmasında çok önemlidir. Polen büyümesinde ve gelişiminde ise Endoplasmik retikulumla bağlı katlanmamış protein yanıtı ise daha yeni çalışılmaya başlanmıştır. Bu projede UPR sinyaline bağlı olarak polen tüpünün büyümesi ve sıcaklık stresine bağlı adaptasyonun araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, poliaminlerin polen tüpü büyümesi üzerinde etkisi ve UPR yanıtı ile ilişkili olabileceğine dair literatürde çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, daha önceki çalışmalar poliaminlerin polen çimlenmesi ve tüp büyümesinde yer aldıklarını göstermiştir (Song ve ark 2001, Falaska ve ark 2010). Kısmen önceden sentezlenen s-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC; spermidin, spermin ve termospermin biyosentezi için gerekli enzim) polen çimlenmesi ve büyümesi için sınırlayıcı basamaktır. Dahası, dışsal



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

uygulanan spermidin kısmen yüksek sıcaklıkta polen çimlenmesi ve büyümesinin inhibizasyonunu engeller (Song ve ark 1999). Yüksek sıcaklıkta muhtemelen translasyon azaldığından dolayı SAMDC aktivitesi düşmesine bağlı olarak ısı şoku altında polenin performansı zayıflar (Song ve ark 2002). Bundan dolayı, yüksek sıcaklıkta polen çimlenmesi boyunca protein sentezindeki değişimler poliamin metabolizmasını negatif olarak etkileyebilir ve bu yüzden büyüme inhibe olabilir. Daha önceki çalışmalar, poliamin aktivitesi ve translasyon arasında bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir (Hanfrey ve ark 2003, Mandal ve ark 2013). Spermidin polen büyümesi süresince spermidinin kendisinden çok poliamin oksidaz enzimi tarafından spermidinin oksidasyonu yolu ile üretilen hidrojen peroksit yoluyla sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun değişimini teşvik etmektedir (Wu ve ark 2010, Chen ve ark 2014). Polen çimlenmesi ve büyümesi için poliaminlerin beklenen yararlı rolleri çeşitli moleküler çıktılara sahiptir. Bundan dolayı bu projede iş paketi olarak gösterilmemiş olmasına rağmen poliaminler ve UPR sinyali arasındaki ilişki test edilmiştir.

Tüm translasyonun moleküler çerçevesini anlamak için, ökaryotik model sistemler için geliştirilen son teknoloji “Ribozomal Footprint Profiling (RFP)” olarak adlandırılan tekniktir (Ingolia 2009, Juntawong ve ark 2013, Ingolia ve ark 2012). Bu teknoloji *in vivo* gen ifadesinin görüntülenmesi için ayrıntılı-sekuans-temelli bir araçtır. Bu yöntemin temel basamakları aktif olarak transle edilen mRNAların izolasyonu, korunmamış mRNA’ların nukleazlarla kesilmesi ve bunları takiben kütüphane yaratılması, derin sekanslama ve biyoinformatik analizidir (Ingolia ve ark 2012, Ingolia 2016). Mikroarray gibi birçok gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan yöntem mRNA seviyesi ölçümü üzerine odaklanmıştır, fakat bu yöntemler mRNA’nın translasyonel verimini ölçmeye izin vermez. Buna karşın, RFP teknolojisi her bir mRNA için translasyonel verimin ölçümü olarak ribozomda korunmuş parçaların kantitatif olarak belirlenmesine olanak sağlar (Juntawong ve ark 2013, Ingolia 2016). Böylece, bu yaklaşım sadece mRNA miktarının ölçülmesini sağlamaz, aynı zamanda 5’-öncü upstream açık okuma bölgesinin (uORFs) translasyondaki rolünün ortaya çıkmasını içeren translasyonel kontrolün mekanizmasında anlaşılmasına da olanak sağlar. Bu projede, İspanya Valencia Polytechnique üniversitesinde çalışan Dr. Alejandro Ferrnando ile iş birliği yapılarak RFP tekniği kullanarak yüksek sıcaklık altında büyüyen polenlerde UPR sinyalinin fonksiyonu ortaya konmuştur.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

2. AMAÇ VE KAPSAM

Bitki meyve veriminin artırılması için ilk adımlardan bir tanesi polen çimlenme yüzdesi ve polen büyümesinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktır. Küresel ısınma ve çeşitli kirleticiler gibi faktörler öncelikle polen gibi büyüme yapılarını etkilemektedir. Bu olumsuz etkiler ürün kaybına neden olmaktadır. Çeşitli stres koşullarına bağlı olarak yanlış katlanmış protein sinyal yolağı bitki adaptasyonun sağlanmasında çok önemlidir. Polen büyümesinde ve gelişiminde ise Endoplazmik retikuluma bağlı katlanmamış protein yanıtı ise daha yeni çalışılmaya başlanmıştır. Bu projenin amacı ER sinyaline bağlı olarak polen tüpünün büyümesi ve sıcaklık stresine bağlı adaptasyonun araştırılmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda aşağıda belirtilen çıktılar elde edilmesi planlanmaktadır.

- 1) polen büyümesinde Reaktif oksijen türleri (ROS) sinyali ve ER sinyali arasındaki ilişkinin ortaya konması
 - 2) sıcaklık koşullarına bağlı olarak ER sinyalinin belirlenmesi
 - 3) yanlış katlanmış protein sinyali teşvik edilerek farklı sıcaklıklara karşı polen adaptasyonunun nasıl sağlandığının moleküler yanıtların anlaşılması
- Bu amaçlar doğrultusunda bu projede polen tüpü büyüme testleri, NBT boyama analizi, Ribozomal profiling ve Real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmada model organizma olarak *Arabidopsis thaliana* fideleri kullanılmıştır. *A. thaliana* tohumları, laboratuvar koşullarında (toprak:perlit:vermikulite (%50:%25:%25) karışımında 22 °C kültür odasında 16:8 fotoperiyot koşullarında) yetiştirilmiştir. Çiçeklenme döneminde (en az 55-60 günlük fidederde) çiçekler toplanarak polen çimlendirme ve stres denemeleri kurulmuştur.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

3.2. Polen çimlenmesi

Laboratuvar koşullarında yetiştirilen fidelerin çiçeklerinden toplanan polenler, düşük erime sıcaklığına sahip agaroz kullanılarak hazırlanan preparatların yüzeyine sürülerek 24°C da karanlıkta bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda polen çimlenme yüzdesi ve polen tüpü uzunluğu mikroskop ve imaje J programı kullanılarak hesaplanmıştır.

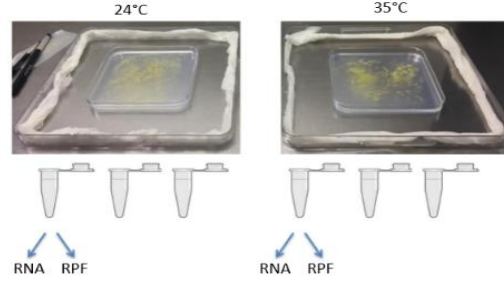
Değişik konsantrasyonda DTT koyularak hazırlanmış preparatlarda aynı denemeler 24 (normal koşullar) ve 32°C olmak üzere 2 farklı sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Her bir deneme 4 -5 bağımsız deney olarak tasarlanmıştır. İncelenecek polen tüpü sayısı 800-1000 arası olarak belirlenmiştir.

3.3.Moleküler analizler için örnek toplanması

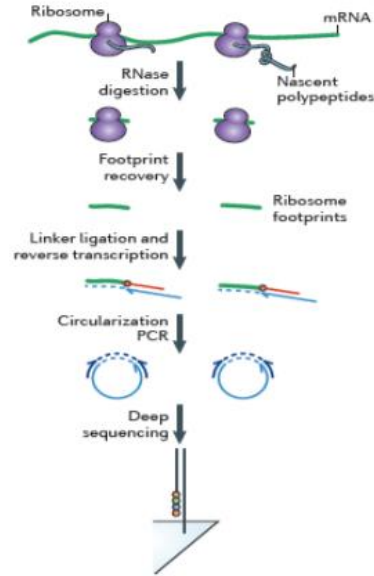
Bu araştırmada düşük erime noktalı agaroz içeren dikdörtgen petrilere çiçeklerin polenlerinin yüzeye sürülerek polen çimlenmesi için uygulanan deney düzeneği kullanılmıştır. Slaytlarda yapılan denemeler bu miktarı elde edilmesi için yeterli olmadığından dikdörtgen şeklinde geniş petrilere kullanılmıştır. Her bir deneme grubunda çimlendirilen polenler spatula yardımı ile toplanarak -80 de diğer analizler için saklanmıştır.

3.4.Ribozomal Profiling (RPF) analizi

Bu analizler İspanya'da Dr. Ferrando'nun laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Toplanan petri üzerindeki polenler sıvı azot ile öğütüldükten sonra, %0.1 Tris-HCl pH8, %1 sodium deoxycholate, 40 mM KCl, 20 mM MgCl₂, %10 polyoxyethylene-10-tridecyl ether, 1 mM DTT, 100 µg/mL cycloheximide, 10U/mL DNase I içeren ekstrasyon tamponunda homojenize edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra 100 µL RNA kütüphanesi, 200 µL RPF kütüphanesi için ayrılmıştır. Kütüphaneler Illumina Ribo Profile Mammalian kit (Illumina) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Poidevin ve ark. 2018)



Şekil 1. Dikdörtgen petrilere moleküler çalışmalar için spatula ile yayılan polenlerin görünüşü



Şekil 2. RPF tekniğinin prensibi (Poidevin ve ark. 2018)

3.5.RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Sıvı azo tile öğütülmüş 20 mg polen 1 ml Trizol ile homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. Homojenat üstüne 200 µl kloroform eklenip vorteksle karışması sağlanır ve 10dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 11.300 rpm' de 15 dk boyunca 4°C' de santrifüj edildi. Üst faz yeni ependorflara alındıktan sonar üstüne 500 µl isopropanol eklenir ve ependorf el yardımıyla yavaş bir şekilde 5 defa alt üst edilir. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. 12.000 rpm.' de 10 dk boyunca 4°C' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1 ml soğuk % 75' lik etanol ile yıkandı. 9.100 rpm' de 5 dk boyunca 4°C' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra ependorflar 15 dk boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler 100 µl DEPC water ile çözüldü. RNA'dan cDNA elde etmek için Applied Biosystems High-Capacity-cDNA RT Kit kullanıldı.

3.6. Quantitative RealTime-PCR

Bu çalışmada hedef genlerimiz RPF sonuçları temel alınarak katlanmamış protein sinyal yolağında iş gören PDI ve bipZip60 genleri olarak belirlenmiştir. Syber qPCR Master Mix ile RealTime-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

3.7. NBT boyama

Polen büyümesi için reaktif oksijen türevlerinin oluşturduğu büyüme sinyali gereklidir. Literatürde bunu ölçmek için NBT boyama tekniği yaygın olarak kullanılır. Bu amaç doğrultusunda 5 saatlik kısa dönem deney düzenekleri kurularak 0.5 mg/1 mL NBT ile boyama gerçekleştirilerek polen büyümesi için gerekli sinyalin ER stresine bağlı durumu imageJ software programı kullanılarak tespit edilmiştir.

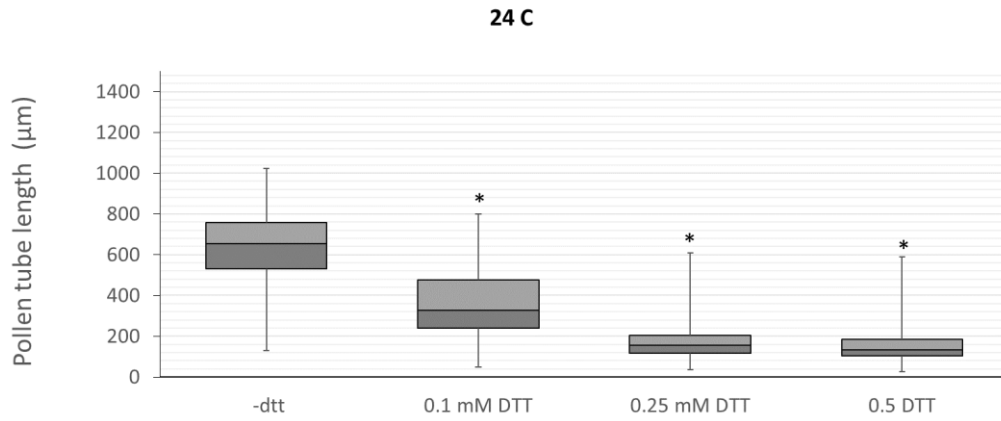
4. BULGULAR

Col-0 bitkileri 16:8 ışıklandırma periyodunda 22 °C de büyütülmüştür (şekil 3). Büyütülen fidelerden çiçekler toplanarak farklı konsantrasyonlarda DTT içeren agarozlu polen büyüme ortamında polen çimlenmesi ve oranı gözlemlenmiştir (şekil 4). Ayrıca, 32 °C' de sıcaklık denemesi kurularak DTT sonuçları ile karşılaştırılmıştır (şekil 5). Polen çimlenmesinde görülen yanıtın sıcaklık stresine benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Dr. Alejandro Ferrando ile yapılan görüşmeler sonucunda poliamin denemesi kurulmaya karar verilmiştir. Yüksek bitkilerde ER sinyalinde spm'in rolü olduğu düşünülmektedir (şekil 6). Polen sıcaklık toleransında spd'nin rolü üzerinde duruluyor olunmasına rağmen, spm ve ER sinyali ile ilişki olabileceğine dair literatürde çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı çalışmalara spm uygulaması eklenerek meydana gelen yanıtın mekanizması anlaşılmasına

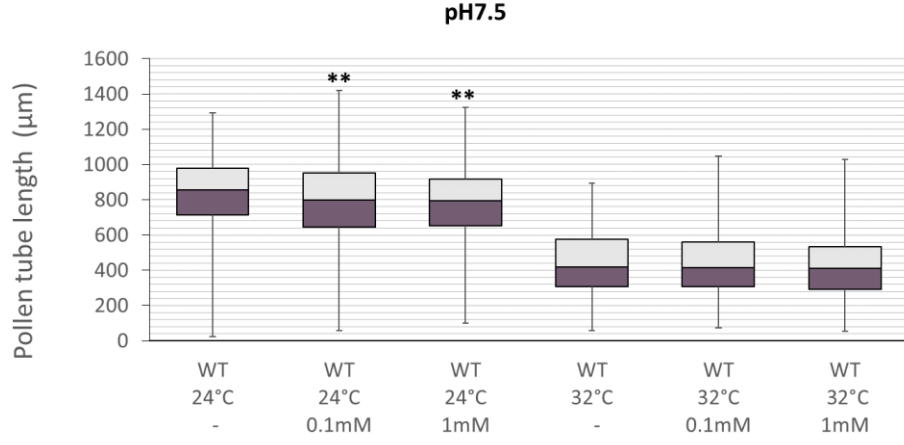
çalışılmıştır. İlk aldığımız sonuçlara göre spm uygulaması ile DTT nin etkisi arasında bir ilişki saptanmıştır.



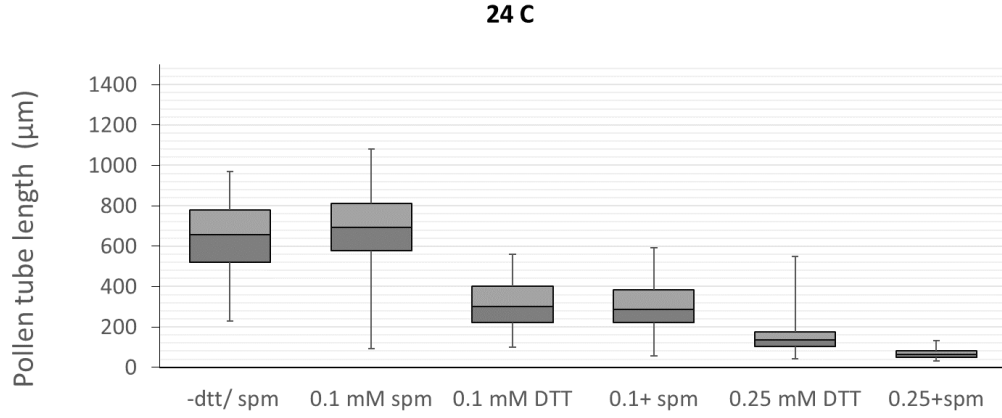
Şekil 3. Col-0 bitkilerinin genel görünüşü



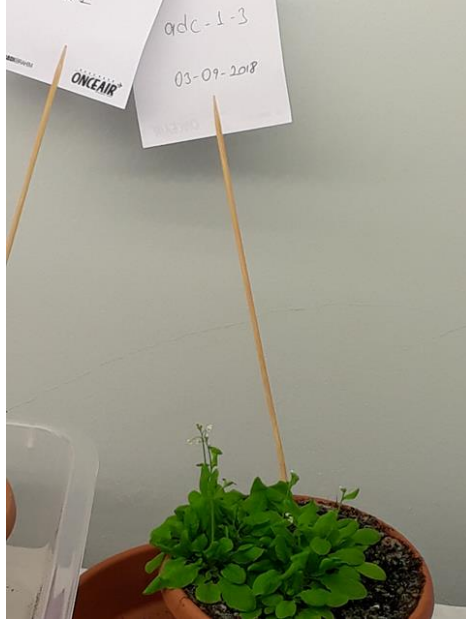
Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda DTT uygulamasının polen tüpü büyümesine etkisi



Şekil 5. Farklı konsantrasyonlarda spm uygulanan polenlerin 24 ve 32 °C'deki polen tüpü büyüme sonuçları



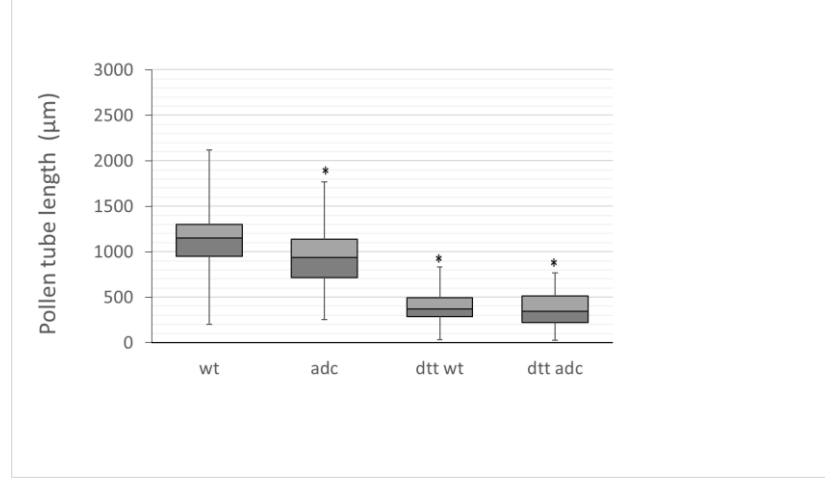
Şekil 6. DTT ve spm uygulanan örneklerin polen tüpü büyüme sonuçları



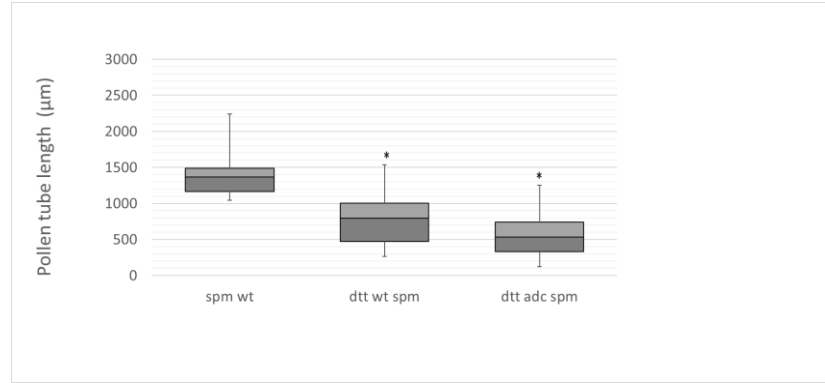
Şekil 7. *adc1-3* mutant *A. thaliana* bitkilerinin genel görünümü

Arabidopsis adc mutant bitkiler 16:8 ışıklandırma periyodunda 22 °C de büyütülmüştür (şekil 7). Büyütülen fidelerden çiçekler toplanarak 0.1 mM DTT içeren agarozlu polen büyüme ortamında wt ve *adc* mutant *Arabidopsis* polenlerinin çimlenmesi ve oranı gözlemlenmiştir (şekil 8). Ayrıca, spm uygulaması yapılarak DTT sonuçları ile karşılaştırılmıştır (şekil 9). Daha önce col-0 yabani tip *Arabidopsis* denemelerimize benzer şekilde Polen çimlenmesinde görülen yanıtın sıcaklık stresine benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanısıra DTT uygulanan yabani tip ve *adc* mutantların polen büyümesi üzerine önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Fakat, DTT uygulaması ile birlikte spm uygulaması yapılan gruplarda önemli bir değişim belirlenmiştir. Spm uygulaması sadece DTT uygulanan örneklerde daha fazla polen tübü uzaması gösterir iken, *adc* mutantlara spm uygulamasının toksik etkisi belirlenmiştir.

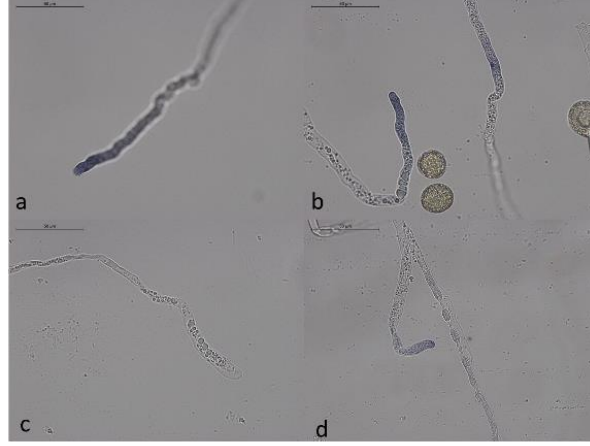
DTT uygulaması yapılmış polen tüplerinde büyüme sinyalini gözlemlmek amacı ile NBT boyama yapılmış ve büyüme sinyalinin ER sinyalinin teşvik edilmesi ile kaybolduğu gözlemlenmiştir (Şekil 10, 11). Bunun sonuçlar poliamin metabolizmasının ER sinyali ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Dr. Alejandro Ferrando ile yapılan görüşmeler sonucunda ER sinyaline dair bir yanıtın oluşup oluşmadığına ilişkin Ribozomal profiling verilerine ait biyoinformatik datalar incelenmiştir.



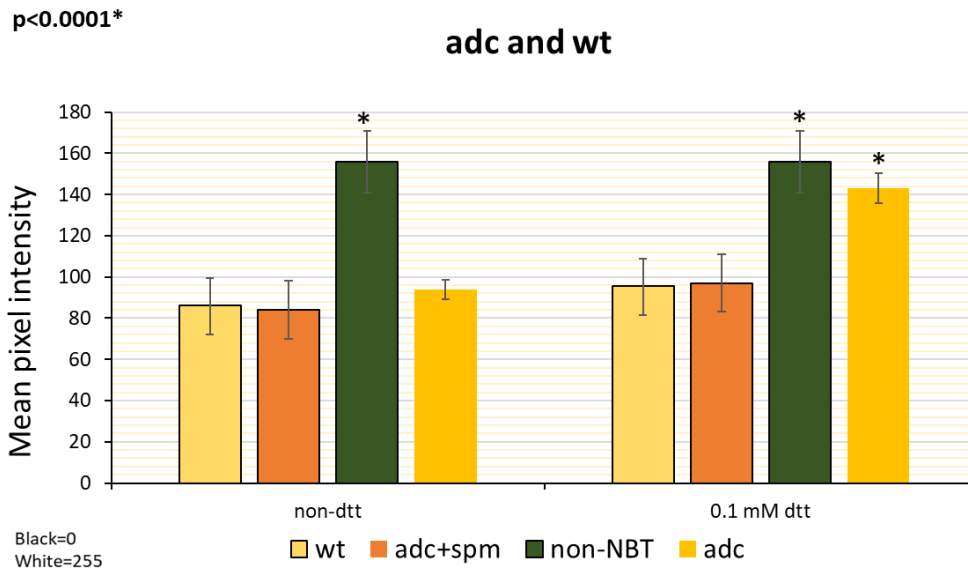
Şekil 8. *adc1-3* mutant ve yabani tip *A. thaliana* polenlerine 0.1 mM DTT uygulamasının polen tüpü büyümesi üzerine etkisi



Şekil 9. *adc1-3* ve yabani tip *A. thaliana* polenlerine spm ve DTT uygulamasının polen tüpü büyümesi üzerine etkisi

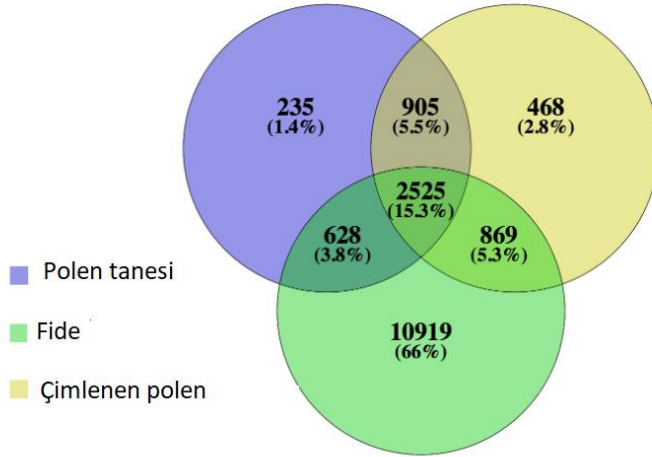


Şekil 10. 0.1 mM DTT uygulanan ve uygulanmayan farklı gruplara ait polen tüplerinin NBT boyama sonucu a) yabani tip kontrol, b) yabani tip spm uygulaması, c) *adc1-3* mutant 0.1 mM DTT uygulanması, d) *adc1-3* mutant 0.1 mM DTT ve spm uygulaması



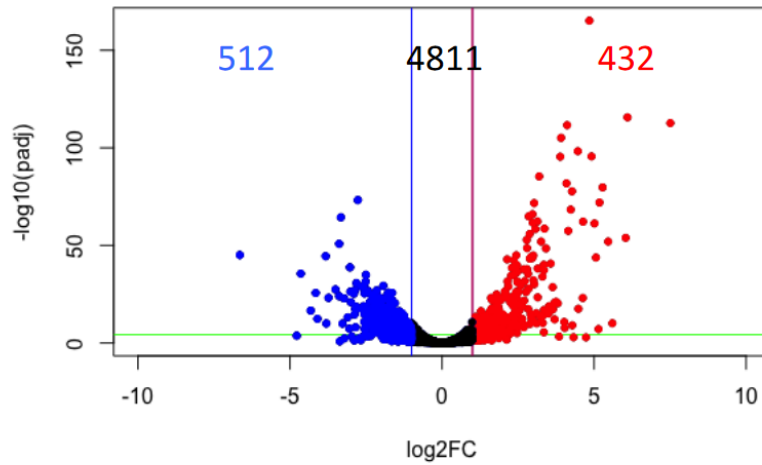
Şekil 11. NBT boyaması imaje J ölçümü ile göreceli yoğunluk sonucu

Biyoinformatik sonuçlarımıza göre çimlenen polene özgü 468 gen, polen tanesi, fide ve çimlenen polende ifade olan ise 2525 gen tespit edilmiştir (şekil 12).



Şekil 12. Polene özgü ifade olan genlerin dağılımı (Loraine ve ark 2013 sonuçları ile karşılaştırılmıştır, Poidevin ve ark. 2018)

(DESeq2 analysis)



Şekil 13. Sıcaklık stresine bağlı olarak ortaya çıkan transkripsiyonal değişimlerinin DeSeq2 analiz sonucu (Poidevin ve ark. 2018)



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Sıcaklık stresine bağlı değişen genlerin transkripsiyon profiline bakıldığında 432 gen ifadesinde artış belirlenmiştir (şekil 13). Bu genlerden bir kısmı UPR sinyali ile ilişkilidir. Bu sonuçlarda bize sıcaklık toleransı ve polen büyümesinde UPR sinyalinin yer aldığına işaret etmektedir (çizelge 1, Poidevin ve ark. 2018).

Çizelge 1. Sıcaklık stresi koşulunda UPR ile ilişkili genlerin transkripsiyon profili

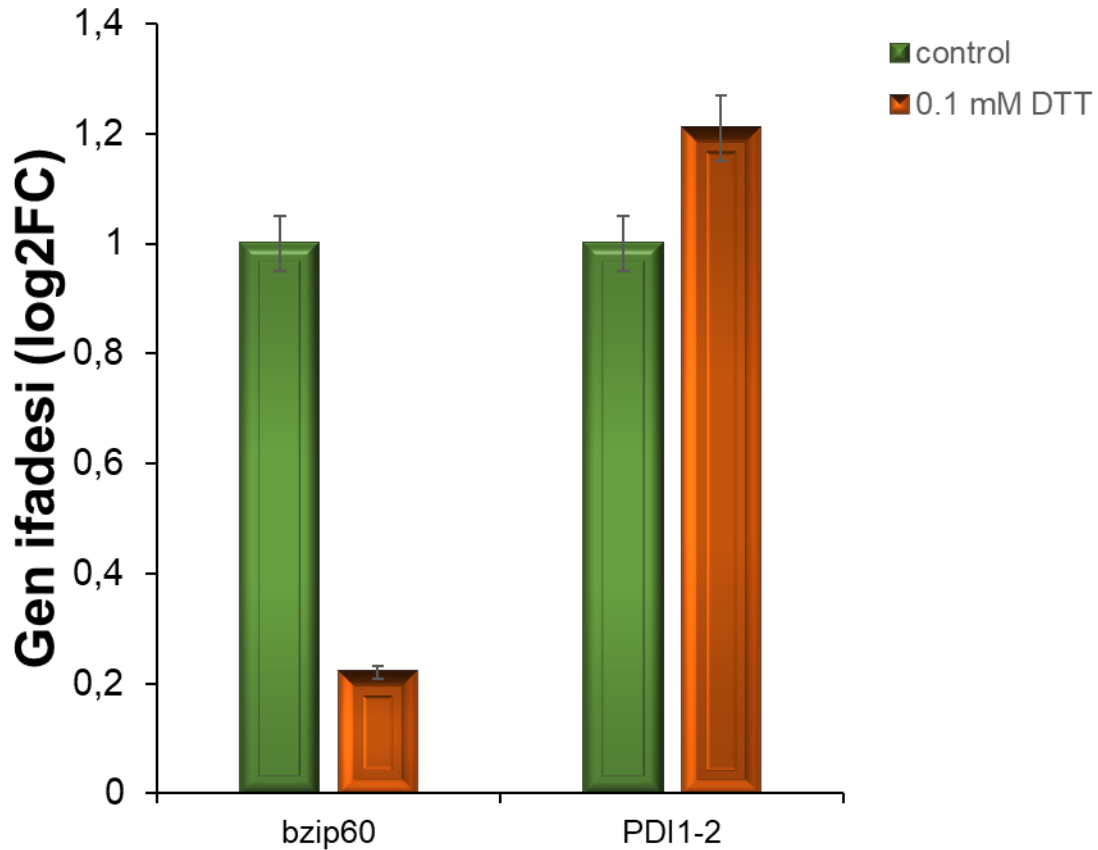
Transkripsiyon profili					
35 °C Gen ifadesi artan 432 genden UPR ile ilişkili olanlar (kat değişimi >2, p<0,05)					
İlgili biyolojik süreç adı	#	A.	#veri	beklenen	Kat
	thalliana		seti	beklenen	Kat
					değişimi
Endoplazmik retikulumla ilişkili protein	55	6	.86		7,01
Tekrar protein katlanması	26	14	.40		34,60
Endoplazmik retikulum katlanmamış protein yanıtı	18	8	.28		28.56
Ubiquitine bağlı ERAD yolu	28	7	.44		16.06

Çizelge 2. Sıcaklık stresi koşulunda UPR ile ilişkili genlerin translasyon profili

Translasyon profili					
35 °C’de translasyonu azalan 324 genden UPR ile ilişkili olanlar (kat değişimi <0,5, p<0,05)					
İlgili biyolojik süreç adı	#	A.	#veri	beklenen	Kat
	thalliana		seti	beklenen	Kat
					değişimi
Hidrojen perokside yanıt	79	18	.94		19.22
Tekrar protein katlanması	26	6	.31		19,47
Endoplazmik retikulum katlanmamış protein yanıtı	18	5	.21		23.43
Ubiquitine bağlı ERAD yolu	28	6	.33		18.08

Ribozomal profiling analizi bir proteinin hem transkripsiyonal seviyede hem de translasyonal seviyede incelenmesine olanak kılan bir yöntemdir. RPF sonuçlarımıza göre transkripsiyonal seviyede artış gösteren UPR genlerinin translasyonunun önemli derecede azalmaktadır. Başka bir deyişle, sıcaklık stresine yanıt olarak bu genler aktif olmasına rağmen, protein sentezi sırasında translasyonları engellenmiştir (çizelge 2, Poidevin ve ark. 2018). Polen tüpü büyümesi sonuçlarımız ile birlikte değerlendirdiğimizde UPR sinyalinin sıcaklık koşullarında engellenmesi uyumludur.

Bu sonuçlar temel alınarak DTT uygulanarak teşvik edilen yanlış katlanmış protein stresinde UPR sinyalinde rol oynayan iki farklı genin ifadeleri gözlemlenmiştir. Gen ifadesi sonuçlarımıza göre bzip60 gen ifadesi istatistiksel olarak önemli ölçüde azalırken, PDI1-2 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmemiştir (şekil 14).



Şekil 14. Sıcaklık stresine maruz kalan polen tüplerinde UPR sinyalinde yer alan ER bZIP DNA bağlanma domaini (bzip60) ve protein disülfid izomeraz (PDI1-2) genlerinin ifade değişimi



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

5. SONUÇ

Projede belirtilen proje amaçları ve süreci uygun şekilde tamamlanarak ‘*Arabidopsis thaliana*’nın Polen Tüpü Büyümesinde Endoplazmik Retikulumda Yüksek Sıcaklığa Bağlı Yanlış Katlanmış Protein Yanıtının Belirlenmesi’ adlı proje başarı ile tamamlanmıştır. Bu projeden elde edilen verilere göre ER sinyali ve ROS sinyali arasında bir ilişki bulunmaktadır. NBT boyama sonuçlarına göre DTT sinyali ile UPR stresinin ortaya çıkması büyüme için gerekli olan ROS sinyalini bloke edebileceğine işaret etmektedir. Ribozomal profiling sonuçlarına baktığımızda hidrojen peroksit sinyaline ait süreçlerin sıcaklık stresi altında engellendiği belirlenmiştir (çizelge 2). Bu açıdan da sonuçlarımız tutarlılık göstermektedir. Ayrıca poliamin metabolizmasının ER sinyaline bağlı olarak polen tüpünün gelişimi üzerinde etkisi olabileceğine dair ön veriler elde edilmiştir.

Sıcaklık stresine bağlı olarak UPR sinyalinde önemli rol oynayan bzip60 proteinin gen ifadesinde azalma görülürken PDI genlerinin ifadelerinde önemli bir değişim saptanmıştır. Buna karşın, sıcaklık stresi altında büyüyen polen tüplerinde UPR sinyalinde yer alan genlerin transkripsiyonu artar iken translasyonunun engellendiği saptanmıştır. Bu sonuçlar sıcaklık toleransında UPR sinyalinin önemli roller oynayabileceğine işaret etmektedir.

Projede mali olarak herhangi bir kuruluştan destek alınmamıştır. Proje, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında ve BAP biriminin karşıladığı bütçe ile yürütülmüştür. Buna karşın, bu projede kullanılan ribozomal profiling analizlerine ait biyoinformatik veri, proje yürütücüsünün EMBO projesi kapsamında Valencia Polytechnique Üniversitesinde Dr. Alejandro Fernando’nun labında bulunduğu zamanda gerçekleştirdiği araştırmadan elde edilmiştir. Proje yürütücüsü İspanya’dan döndükten sonra bu projeyi üniversitemize sunmuş ve elde edilen verilerin sıcaklık stresi ile uyum gösterdiğini belirlemiştir. Dr. Fernando ile yapılan görüşmeler ve veri paylaşımı sonucunda İspanya’da yürütülen projenin biyoinformatik analizleri endoplazmik retikulum yanlış katlanmış protein sinyaline ait genler araştırılmıştır. Bu proje ile İspanya ile uzun yıllar boyu sürmesi planlanan ilk ortak çalışmamız gerçekleşebilmiştir. İki laboratuvar arasında gerçekleşen veri paylaşımını takiben “Poidevin L., Forment J., Unal D., Ferrando A., Combined transcriptome and translome analyses on pollen thermotolerance” isimli posterlerini 5-10 ağustos 2018 tarihlerinde 12.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

International Plant Molecular Biology Kongresinde poster olarak sunmuşlardır. Bu posterde sadece ribozomal profiling analizleri yer aldığı için BAP projesine teşekkür edilmemiştir.

Proje çalışmalarımızın sonuçlarından ulusal sempozyumda sunulmak üzere **bildiri** hazırlanmıştır. Bu çalışmada Acknowledgement bölümüne proje numarası belirtilerek finansal desteği sağlayan kuruluş olarak Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi BAP birimine teşekkür edilmiştir. Ancak tüm dünyayı etkisi altına alan Covid 19 nedeniyle katılınması düşünülen Bitki Fizyolojisi sempozyumu ileri bir tarihe ertelenmiştir. Normalleşme sürecinde kongre ve sempozyum katılımları sağlanarak bilimsel olarak çalışma sonuçlarımızın literatüre kazandırılması hedeflenmektedir.

Proje çalışmalarımızın sonuçlarında içerecek şekilde Dr. Fernando ile polen tüpü büyümesi üzerine bir yayın planlanmaktadır. Bu yayında Acknowledgement bölümüne proje numarası belirtilerek finansal desteği sağlayan kuruluş olarak Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi BAP birimine teşekkür edilecektir.

Proje yürütücüsünün 2019 yılı ortasında Meme Kanseri teşhisinin konmasından dolayı proje bir süre dondurulmasına rağmen, projemizin verimli geçtiğini ve hedeflenen sonuçlar elde edilerek projenin hedeflenen sürede başarıyla tamamlandığını söyleyebilmekteyiz.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

6. KAYNAKLAR

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biol.* (2000) 2: 326-332.

Cai G, Parrotta L, Cresti M. Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth. *J. Integr. Plant Biol.*(2015) 57(1): 63-78

Chen M, Chen J, Fang J, Guo Z, Lu S. Down-regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase genes results in reduced plant height, pollen viability, and abiotic stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2014) 116:311-322

Deng Y, Srivastava R, Quilichini TD, Dong H, Bao Y, Horner HT, Howell SH. IRE1, a component of the unfolded protein response signalling pathway, protects pollen development in *Arabidopsis* from heat stress. *Plant J* (2016) 88:193-204.

Falasca G, Franceschetti M, Bagni N, Altamura MM, Biasi R. Polyamine biosynthesis and control of the development of functional pollen in kiwifruit. *Plant Physiol Biochem* (2010) 48(7): p. 565-573.

Fragkostefanakis S, Mesihovic A, Hu Y, Schleiff E. Unfolded protein response in pollen development and heat stress tolerance. *Plant Reprod* (2016) 29:81-91.

Gagliardi D, Breton C, Chaboud A, Vergne P, Dumas C. Expression of heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development. *Plant Mol Biol* (1995) 29(4): 841-856.

Gao YB, Wang CL, Wu JY, Zhou HS, Jiang XT, Wu J, Zhang SL. Low temperature inhibits pollen tube growth by disruption of both tip-localized reactive oxygen species and endocytosis in *Pyrus bretschneideri* Rehd. *Plant Physiol Biochem* (2014) 74:255-262.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C, Collier M, Thompson B, Perry B, Michael AJ. Translational regulation of the plant S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochem Soc Trans* (2003) 31(2): 424-427.

Ingolia NT. Ribosome footprint profiling of translation throughout the genome. *Cell* (2016) 165

Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, MsGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* (2012) 7(8):1534-1550

Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* (2009) 324: 218-223

Juntawong P, Girke T, Bazin J, Bailey-Serres J. Translational Dynamics revealed by genom-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *PNAS* (2014) 111(1):203-212

Kakani VG, Reddy KR, Koti S, Wallace TP, Prasad PV, Reddy VR, Zhao D. Differences in in vitro Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Cotton Cultivars in Response to High Temperature. *Ann Bot* (2005) 96(1):59-67.

Kakani VG, Prasad PV, Craufurd PQ, Wheeler TR. Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant Cell Environ* (2002) 25(12): 1651-1661.

Kandasamy MK, Kristen U. Ultrastructural responses of tobacco pollen tubes to heat shock. *Protoplasma*, (1989) 153(1-2): 104-110.

Krichevsky A, Kozlovsky SV, Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V. Review How pollen tubes grow. *Develop Biol* (2007)303: 405-420



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Kumar RR, Goswami S, Gadpayle KA, Singh K, Sharma SK, Singh GP, Pathak H, Rai RD. Ascorbic acid at pre-anthesis modulate the thermotolerance level of wheat (*Triticum aestivum*) pollen under heat stress. *J. Plant Biochem. Biotechnol* (2014) 23(3):293-306

Mandal S, Mandal A, Johansson HE, Orjalo AV, Park MH. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *PNAS*, (2013) 110(6): 2169-2174.

Mesihovic A, Iannacone R, Firon N, Fragkostefanakis S. Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant Repord* (2016) 29(1-2):93-105

Potocky M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnoff N, Zarsky V. Reactive oxygen species by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist* (2007) 174:742-751

Poidevin L., Forment J., Unal D., Ferrando A., Combined transcriptome and translome analyses on pollen thermotolerance. 12. International Plant Molecular Biology Congress, 5-10 August, 2018, Montpellier, France

Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy* (2015) 11(11):1956-1977.

Ron, D. Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2007) 8(7):519-29

Song J, Nada K, Tachibana S. Ameliorative effect of polyamines on the high temperature inhibition of in vitro pollen germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Scientia Horticul* (1999) 80(3-4):203-212.

Song J, Nada K, Tachibana S. The early increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is essential for the normal germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pollen. *Plant Sci* (2001) 161(3): 507-515.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

Song J, Nada K, Tachibana S. Suppression of S-adenosylmethionine Decarboxylase Activity is a Major Cause for High-Temperature Inhibition of Pollen Germination and Tube Growth in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Physiol* (2002) 43(6): 619-627.

Thomas JMG, Prasad PVV. Plants and the environment/global warming effects. University of Florida, Gainesville, 2003.

Wu J, Shang Z, Wu J, Jiang X, Moschou PN, Sun W, Roubelakis-Angelakis KA, Zhang S. Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels and pollen tube growth. *The Plant J.* (2010) 63:1042-1053.

Volkov R, Panchuk I, Schöffl F. Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Mol Biol* (2005) 57(4):487-502.



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ
SONUÇ RAPORU FORMU

7. EK

EK-1. Proje Mali Etkinlikleri

Doç. Dr. Dilek ÜNAL

Proje Düzenle

Proje Özeti

Detay Bilgileri

Proje Kasaları

Satınalma Talepleri

Bursiyer Talepleri

Yolluk Talepleri

Diğer Ek Talepler

Malzeme Listesi

Proje Kasaları

Hesap Kodu	Hesap Adı	Bütçe	Harcanan	Kalan
830.03.02	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	9,996.92 TL	9,996.91 TL	0.01 TL
Toplam :		9,996.92 TL	9,996.91 TL	0.01 TL

Harcama Bilgileri

Tarih	Belge No	Ödeme Yapılan	Ödeme miktarı	Ödenek	Avans
19-06-2020	202000046	MEDSANTEK LABORATUAR MALZEMELERİ SAN VE TİC LTD ŞTİ	7,017 TL	-7,017.41 TL	
17-12-2018	201800262	SAĞLIK MEDİKAL VE KİMYA TIBBİ ARAÇ GEREÇLERİ LABORATUVAR CİHAZLARI VE KİMYASALLARI	1,776 TL	-1,775.90 TL	
10-12-2018	201800253	İNERLAB LABORATUVAR ÜRÜNLERİ SAN.VE TİC. A.Ş.	1,204 TL	-1,203.60 TL	
Toplam Harcanan :			9,996.91 TL	0.00 TL	
Toplam Kalan :			0.01 TL	0.01 TL	