

Kültür Bitkilerinde Apomiksi Genlerinin Klonlanması

Kemal Melik TAŞKIN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Çanakkale, Türkiye

(Geliş Tarihi/Received: 11.07.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 09.03.2017)

ÖZ

Kültür bitkilerinin iyileştirilmesi amacıyla uygulanan birçok ıslah stratejisinde elde edilen ticari hibritler üstün özelliklerini genetik açılımlardan dolayı sonraki döllerde koruyamazlar. Apomiksi, ana bitki ile genetik olarak özdeş tohumlar oluşturmasına olanak sağlayan ve kültür bitkilerinde başarıldığı takdirde ticari hibritlerin klonal çoğaltımına izin veren bir üreme şeklidir. Eşeyli üreme mayoz geçirmiş gametlerin oluşumu ve çifte döllenmeyi gerektiren bir süreçtir. Fakat apomiksi sırasında bu adımlardan birçoğu ya atlanır ya da değiştirilmiştir. Apomiktik türlerde, erkek ve dişi gametlerde kromozom sayısı yarıya inmez (apomayoz) buna rağmen embriyo kesesi ve polen oluşumu devam eder. Ayrıca, apomayotik yumurta hücresi (2n) döllenme olmaksızın kendiliğinden embriyoyu oluşturur (partenogenez). Bu nedenle, apomiksi tohum aracılığı ile klonal çoğalmaya yol açar. Buna karşın, henüz apomiksi doğal apomiktik türlerden tarımı yapılan kültür bitkilerine melezleme yolu ile aktarım başarılamamıştır. Günümüzde bu konuda araştırmacılar iki farklı alanda çalışmalar yürütmektedir; doğal apomiktik bitki türlerinde sorumlu genleri belirlemek veya eşeyli üreme süreçlerini değiştiren düzenlenmeler sayesinde apomiksiyi oluşturmak. Bu derlemede, apomiksiyi kontrol eden genetik mekanizmalar üzerine bu güne kadar elde edilmiş sonuçlar tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Diplospori, Apospori, Sporofitik apomiksi, Klonal tohum eldesi, Apomayoz.

Cloning Apomixis Genes in Crops

ABSTRACT

Hybrid plants, produced by many breeding strategies for improvement of culture plants could not conserve their hybrid vigor within the next generations. Apomixis is a reproduction way which creates genetically identical seeds with the maternal plant and it will enable the clonal reproduction of hybrids when it is achieved in culture plants. Sexual reproduction is a process involves gametes formed by meiosis and double fertilization. However, in apomictic process, many of these steps are either bypassed or modified. In apomict species; chromosome number in male and female gametes are not reduced (apomeiosis), nevertheless embryo sac and pollen formation continues. Furthermore, the apomeiotic egg cell (2n) spontaneously forms the embryo (parthenogenesis). Therefore, apomixis leads to clonal reproduction by seeds. Although, introduction of apomixis from natural apomicts to culture plants haven't been achieved by hybridization methods. Recently researchers have been working on this subject with two different strategies. In this review, the recent knowledge about the molecular mechanisms controlling apomixis are discussed.

Keywords: Diplospory, Apospory, Sporophytic apomixis, Apomeiosis, Clonal seed production.

1. Giriş

1.1. Apomiksi Nedir?

Biyoteknoloji günümüzde kültür bitkilerinin ıslahı için yeni ve etkili stratejiler sağlamaktadır. Tohum gelişim süreçlerini kontrol eden genetik mekanizmalar son zamanlarda biyoteknologların üzerinde en çok durduğu konulardan biri olmuştur. Bunlar arasında özellikle apomiksi (aseksüel veya klonal tohum gelişimi) vaat ettiği teknoloji nedeniyle en önemli stratejilerden biridir. Aseksüel tohum gelişimi, genetik olarak ana bitki ile özdeş döllere oluşturan bir üreme şeklidir. Apomiktik süreçlerle gelişmiş bir tohum içerisinde bir sonraki jenerasyonu oluşturacak tek organ olan embriyo sadece dişi dokulardan köken alır. Üstelik embriyoyu meydana getiren hücre ne mayoz bölünmeye uğrar ne de erkek gamet ile döllenir. Buna rağmen, apomiktik bitkiler fertil tohum meydana getirmede oldukça başarılıdır. Buradan da anlaşılacağı üzere apomiksi terimi günümüzde çoğunlukla döllenme ve mayoz bölünmenin yerini aseksüel (eşsüz) üremeye bıraktığı süreçleri ifade eder (Koltunow, 1993; Koltunow vd., 1995; Grossniklaus vd., 1998a; Koltunow ve Grossniklaus, 2003; Hand ve Koltunow, 2014).

Apomiksi en az 400 farklı çiçekli bitki türünde, 40'dan fazla familyada tanımlanmıştır. İki çenekli bitkiler (dikotiledon) arasında en çok *Asteraceae* ve *Rosaceae*, tek çenekli bitkilerde (monokotiledon) ise *Poaceae* türlerinde yaygındır. Açık tohumlular (*Gymnosperm*)

arasında ise henüz bildirilmemiştir (Koltunow, 1993; Carman, 1997). Ayrıca, *Citrus* ve elma dışında tarımsal önemi olan bitkilerde de pek rastlanmaz. Apomiksinin belirli bir bitki familyasında varlığını kanıtlamak için hem genetik ve hem de sitolojik araştırmalar gerekmektedir. Buna karşın, daha fazla bitki türünde apomiktik üremenin var olduğu tahmin edilmektedir (Plitmann, 2002).

Angiosperm türlerin çoğunda tohum oluşumu dişi ve erkek gametlerin birleşmesini gerektirir. Baba ebeveyne ait polen taneciğinden çıkan spermlerden biri anne ebeveynin yumurta hücresini dölleyerek embriyoyu oluştururken, diğer sperm merkezi hücre birleşerek endospermi oluşturur. Sonuçta genellikle birbirinden farklı genetik yapıya sahip bireyler meydana gelir. Eşeyli üreme bir yandan değişen çevre koşullarına uyum için temel oluştururken, diğer taraftan yeni çeşitlerin ıslahı için araç olarak kullanılır. Buna karşın, apomiktik embriyolar erkek gamet olmaksızın üretilir. Bu yüzden, ana bitki ile genetik olarak özdeş olan apomiktik döllere hem bitki ıslahı hem de tohum üretimi için büyük öneme sahiptir. Apomiksi sayesinde arzu edilen karakterlere sahip her bitki genotipi genetik olarak sabitlenerek sonsuz sayıda çoğaltılabilecektir. Ayrıca, apomiksinin tarımsal öneme sahip bitkilere aktarılması ile kültür bitkilerinde yeni ıslah stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlanacaktır (VielleCalzada vd., 1996). Bundan dolayı apomiksi yakın bir gelecekte ticari anlamda tarımsal

biyoteknoloji için en önemli karakterlerin başında yer alacaktır.

1.2. Tarımda Apomiksinin Potansiyel Faydaları

Apomiksi ile ilgili ilk önemli bilimsel toplantı 1998 yılında “Designing A Research Strategy For Achieving Asexual Seed Reproduction in Cereals” başlığı altında Bellagio, İtalya’da gerçekleştirilmiştir. Bu toplantı sonrası bir bildiri yayınlanarak apomiksi araştırmalarının potansiyeli tüm dünyaya duyurulmuştur

(<http://billie.btny.purdue.edu/apomixis/>).

Tarımda apomiksinin potansiyel faydaları şu şekilde özetlenebilir;

1) Apomiksi sayesinde iki farklı türün melezlenmesi ile elde edilen kısır bireyler de dahil olmak üzere, istenilen her bitki bireyi genetik olarak sabitlenecek, hem eşeyli hem de vejetatif olarak üretilen kültür bitkilerinde yeni ıslah stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlanacaktır. Bu sayede, biyotik (hastalık, zararlı gibi) ve abiyotik (kuraklık, don gibi) stres şartlarına karşı direnç sağlayacak genler tamamen yabancı türlerden kültür bitkilerine aktarılabilir. Ayrıca, *Triticale* (buğday ve arpa melezi) gibi 2 ya da daha fazla türden arzu edilen özellikleri taşıyan üstelik eşeyli olarak fertil yeni kültür bitkisi varyeteleri elde edilecektir (Oettler vd., 2003). Apomiksi, ıslah süreçlerinde bitki familyası temeline bağlı stratejileri birey bazına çevirecektir.

2) Apomiksi, hemen hemen bütün kültür bitkilerinden sınırsız sayıda hibrit çeşit

eldesini, verimli atasal hatlarla bu hatlardan türetilen hibritlerin devamını ve büyük ölçeklerde üretimini hızlandıracaktır. Bu durum daha önce hibrit teknolojisi geliştirilmemiş çok sayıda kültür bitkisi için bir devrim olacaktır. Bu sayede, özel bir ıslah programı ile elde edilmiş F₁ hibritlerin genotipleri sabitlenecek, tohumlar klonal olarak sürekli ve ucuz bir şekilde üretilecektir. Apomiksi hibrit tohum üretiminde maliyeti azaltacaktır. Tozlaşma ve döllenme aksaklıkları nedeniyle meydana gelen ürün kayıplarının önüne geçilecektir. Hibrit tohumlar, doğrudan üreticiler tarafından çoğaltılacaktır. Birçok kültür bitkisinde verim ve kalite kromozom sayısında (ploidi seviyesinde) katlanma ile artmaktadır. Apomiksi sayesinde yeni ploidi seviyeleri kolaylıkla devam ettirilecektir.

3) Şu anda birçok sebze, meyve ağacı ve süs bitkisinin klonal çoğaltılmasında kullanılan doku kültürleri gibi pahalı ve zaman alıcı vejetatif çoğaltımdan kaçınmayı sağlayacaktır. Apomiksi çelikle çoğaltmanın yerini alacaktır.

4) Apomiksi sayesinde yetiştirme koşulları, patojen popülasyonu ve pazarlama ihtiyacına göre etkili olabilecek hızlı ve esnek bitki ıslahı yapılabilecektir.

5) Vejetatif olarak üretilen patates, kasava, tatlı patates ve yam gibi kültür bitkilerinin gerçek tohumla çoğaltılmasına ve bu sayede vejetatif üretim esnasında taşınan hastalıklara engel olunacaktır.

6) Otonom apomiksinin erkek kısır varyetelere aktarılması ile transgenik karakterlerin yayılması engellenecektir.

7) Gelişmekte olan ülkelerde sürdürülebilir tarıma faydalar sağlayacaktır. Örneğin, kendine döllenmiş çeltik ve buğday varyeteleri birçok ülkede kendilenmiş hat olarak üretilmektedir. Buna karşın hibrit varyetelerin kullanılması ile verim %15-30 oranında artacaktır. Bu sayede dünya nüfus çoğunluğunun gıda olarak kullandığı birçok kültür bitkisinde verim artışına sebep olacaktır.

Apomiksinin kültür bitkilerinin ıslahı için yukarıda belirtilen faydalarının gerçeğe dönüşmesi için hala birçok temel ve uygulamalı araştırmanın yapılması gerekmektedir. Buna ek olarak, ekonomik ve sosyal birçok konu da göz ardı edilmemelidir.

1.3. Çiçekli Bitkilerde Eşeyli Üreme

Çiçekli bitkilerde eşeyli üreme mayoz geçirmiş gametlerin oluşumu ve füzyonlarını gerektiren bir süreçtir. Dişi gamet oluşumu ve döllenme ovul (tohum taslağı) adı verilen özel üreme organında meydana gelir (Drews vd., 1998). Genelde ovul içerisindeki tek bir hücre (megaspor ana hücresi) mayoz bölünmeye uğrayarak kromozom sayısı yarıya indirgenmiş 4 spordan ibaret tetrad oluşturur. Bunlardan sadece genellikle faal olan bir tanesi mitotik bölünmelerle dişi gametleri içeren olgun embriyo kesesine dönüşür. Erkek gametler ise anter adı verilen üreme organında mayoz sonrasında meydana gelir. Ardından embriyo kesesi içerisindeki yumurta hücresi bir sonraki jenerasyonu

verecek embriyoyu ve merkezi hücre de tohum gelişme ve çimlenmesi için gerekli endospermi oluşturmak üzere erkek gamet (sperm) ile döllenir. Angiospermlere özgü çifte döllenme olarak bilinen bu olay tozlaşmadan hemen sonra meydana gelir. Döllenme eşeyli üremede embriyo ve endosperm taşıyan bir tohumun oluşması için mutlaka gereklidir.

Eşeyli üremeyi genetik ve moleküler seviyede incelemek için günümüzde çok iyi tanımlanmış iki model organizma mevcuttur; *Arabidopsis thaliana* ve *Zea mays* (mısır). Her iki organizma için de birçok moleküler biyoloji tekniği hali hazırda uygulanmaktadır. Ayrıca, mısır hem tarımsal açıdan değerli bir kültür bitkisi olduğu için hem de apomiktik bir yakın akrabaya (*Tripsacum dactyloides*) sahip olduğu için apomiksi araştırmalarında özel bir yere sahiptir. Apomiksi genlerinin *T. dactyloides* bitkisinden mısıra aktarılması için türler arası melezlenme çalışmaları başlatılmıştır (Leblanc vd., 1995a; Kindiger vd., 1996; Sokolov vd., 1998; Blakey vd., 2001; Grimanelli vd., 2003). Diğer yandan, *Brassicaceae* familyasına dahil olan *A. thaliana* ise hızlı hayat döngüsü, çok sayıda mutan ve genetik dizilişi tamamen ortaya çıkarılmış küçük genomu sayesinde eşeyli üreme sistemlerini de kapsayan bir çok biyokimyasal ve gelişimsel süreçler için model organizma olarak kabul edilmektedir. *A. thaliana* bitkisinde ovul ve dişi gametofit gelişimi ayrıntılı sitolojik ve genetik araştırmalar başlatılmıştır (Schneitz vd., 1995; Schneitz vd., 1997; Schneitz, 1999).

1.4. Apomiktik Üreme Mekanizmaları

Hem eşeyli hem de apomiktik bitkilerde tohum çiçekli bitkilerin üreme organları ovaryumlarda gelişir. Buna karşın apomiktik süreçlerle gelişen bir tohumda eşeyli üreme sırasında yukarıda açıklanan adımlardan birçoğu ya atlanır ya da değiştirilir. Bilinen apomiksi süreçlerinin 3 önemli ortak elemanı vardır;

1) Apomiktik bitkilerde embriyo kesesi gelişimde, eşeyli üremede haploit (kromozom sayısı yarıya indirilmiş) gamet (n) oluşumuna yol açan temel adım mayoz bölünme gerçekleşmez. Buna rağmen, kromozomları ana (maternal) bitki ile aynı sayı ve içerikte olan embriyo kesesi (2n) ve yumurta hücresi (2n) gelişir (apomayoz). Mayoz geçirmemiş embriyo kesesi ve yumurta hücresi oluşumu apomiksini ilk temel elementi olarak bilir.

2) Mayoz geçirmemiş yumurta hücresi döllenme olmaksızın çok hücreli embriyoya dönüşür. Apomiksini bu ikinci temel elementi partenogenez olarak bilir.

3) Mayoz geçirmemiş embriyo kesesinde merkezi hücreler ya kendiliğinden (otonom) ya da döllenme (pseudogami) ile endospermi geliştirirler (Koltunow, 1993; VielleCalzada vd., 1996). Apomiktik bazı bitkilerde hem embriyo hem de endosperm döllenmeye ihtiyaç duymadan kendiliğinden gelişir. Bu tip bitkilerin üreme şekilleri otonom apomiksi olarak bilir. Buna karşın, bazı apomiktiklerde ise endospermin oluşması için döllenme şarttır. Pseudogamik apomiksi olarak bilinen bu üreme şeklinde yumurta hücreleri kendiliğinden embriyoya

dönüşürken merkezi hücreler endospermi oluşturmak için döllenmeye ihtiyaç duyar. Tohumda endosperm embriyo yakınında bulunan karbonhidrat ve proteince zengin hücrelerden oluşur. Endosperm tohumda hem embriyonun gelişimini tamamlaması için hem de çimlenme sırasında gerekli enerji ihtiyacını karşılamak için kullanılır.

Günümüzde apomiksini iki farklı tipi tanımlanmıştır; Sporofitik ve gametofitik apomiksi. Sporofitik apomikside embriyo, embriyo kesesi dışında yer alan mayoz geçirmemiş sporofitik hücrelerden direk köken alır (adventif embriyonu). Adventif embriyolara köken veren bu sporofitik hücrelere embriyo öncül hücreleri adı verilir. Embriyo öncül hücreleri olgun ovüllerin nusellus ve iç integüment adındaki iki somatik dokudan farklılaşır ve genellikle diğer hücrelerden yoğun sitoplazmaları, düzensiz şekilli nükleusları ve büyüklükleri ile kolaylıkla ayırt edilebilirler. Embriyo öncül hücreleri daha sonra mitoz ile globular şekilli çok sayıda embriyo oluşturur. Buna rağmen sporofitik apomiktik türlerde de eşeyli süreçler takip edilerek bir embriyo kesesi oluşur. Adventif embriyolar ise ancak eşeyli embriyo kesesinin döllenmesi sayesinde gelişen endosperm ile desteklendiği takdirde gelişebilir. Bu nedenle, sporofitik apomiksi birden fazla sayıda embriyo içeren tohumların oluşmasına yol açar. Adventif embriyoninin özellikle nusellar formu daha yaygındır ve *Citrus* türlerinde nasıl oluştuğu açıklanmıştır (Koltunow vd., 1995). Apomiktik *Citrus* türlerinde, eşeyli ve apomiktik süreçler aynı ovül içerisinde

oluşur. Eşeyli embriyo kesesine ait yumurta ve merkezi hücreler sırasıyla embriyo ve endosperm oluşturmak için döllenirken, nüseller embriyolar zigotik embriyo etrafındaki nüseller dokudan kendiliğinden gelişirler. Bu tür ovullerde eşeyli embriyoların büyümeleri dursa bile aseksüel embriyolar endosperm tarafından beslenmeye devam edecekleri için gelişimlerini sürdürürler.

Gametofitik apomikside ise embriyo kesesi ovul içerisindeki diploid bir hücreden apomayoz olarak da bilinen bir mekanizma ile mayoz olmadan gelişir. Bu türlerde yumurta hücrelerinden embriyo döllenme olmadan (partenokarpi) gelişirken, endosperm için bazı türlerde merkezi hücrelerin döllenmesi (pseudogami) gerekli iken, bazılarında otonom olarak gelişebilir. Gametofitik apomiksi Diplospori ve Apospori adında iki farklı mekanizmadan oluşur. Her iki süreç de adventif embriyoniden farklı olarak ovul gelişiminin erken safhasında dişi gametofit gelişiminde modifikasyonlar sonucu meydana gelir. Gametofitik apomikside embriyo kesesi türüne bağlı olarak en az 9 farklı şekilde meydana gelir. Bunlar *Allium*, *Taraxacum*, *Ixeris*, *Blumea*, *Elymus*, *Antennaria*, *Hieracium*, *Eragrostis* ve *Panicum* tipi embriyo kesesi gelişimi olarak bilinirler (Crane ve Carman, 1987; Kojima ve Nagato, 1992; Leblanc vd., 1995b; Naumova ve Willemse, 1995; Koltunow vd., 1998). Bu türlerde embriyo ve endosperm ise yine en az 5 farklı yolla oluşabilmektedir. Dolayısıyla her biri türe özgü olmak şartı ile en az 45 farklı gametofitik apomiksi tipi teorik olarak mümkündür. Bununla birlikte genellikle

diplospori, megaspor ana hücresi farklılaştığı anda apospori ise daha sonra oluşur ve embriyo mayoz geçirmemiş (2n) bu megagametofitlerden meydana gelir. Diplosporide apomayotik hücre diploit (2n) bir megaspor ana hücresinden köken alır ve bu hücre ya mayozla başlar fakat mayoz çok erken safhada durur (mayotik diplospori) ya da direk mitotik süreçlerle (mitotik diplospori) kromozom sayısı indirgenmemiş embriyo kesesini (2n) oluşturur. Diplospori *Taraxacum officinale*, *Boechera* türleri, *Erigeron annuus* ve *Tripsacum dactyloides* türlerinde görülür. Aposporide ise embriyo ovul içerisinde megaspor ana hücresi dışında apospor öncülleri adı verilen somatik hücrelerden gelişir (Grimanelli vd., 2001). Apospor öncülleri ovul gelişimi sırasında farklı zamanlarında meydana gelirler. Ayrıca, *Brachiaria* türlerinde olduğu gibi bir ovul içerisinde mayotik (n) ve aposporik (2n) embriyo kesesi bir arada bulunabileceği gibi, *Hieracium* ve *Pennisetum* türlerinde olduğu gibi aposporik embriyo kesesi gelişimine devam ederken mayotik embriyo kesesi genellikle dejenere olur (Naumova vd., 1993; Lutts vd., 1994; Sherwood vd., 1994; Anton ve Connor, 1995; Naumova ve Willemse, 1995; Nogler, 1995; Martonfi vd., 1996; Bonilla ve Quarin, 1997; Carman, 1997; Naumova, 1997; Peel vd., 1997; Koltunow vd., 1998; Ma vd., 2004). Gametofitik apomiksi ile üreyen türlerin neredeyse tamamı poliploiddir (Carman, 1997). Buna karşın, aynı türün eşeyli bireyleri ya da yakın akrabaları genellikle diploittir. Poliploidi ile gametofitik apomiksi arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Fakat, apomiksi

genlerinin diploit kültür bitkilerine aktarılmasında poliploidi seviyelerine mutlaka dikkat etmek gerekir.

1.5. Apomiksinin Orijini ve Genetik Kontrolü

Apomiksinin genetik düzenlenmesi ve evrimi geçen yüzyıldan bu yana bilim adamları için merak konusudur. Yirminci yüzyılın başlarında birçok biyolog apomiksiye türler arası melezlemenin (interspesifik hibridizasyon) sebep olduğunu, genlerin ise işe karışmadığını düşünmekteydi. Çoğu apomiktik bitkinin poliploid olması apomiksinin genom katlanmaları ya da hibridizasyon olaylarının sonucunda ortaya çıktığını düşündürmüştü olsa da apomiksi sadece poliploidi ile açıklanamamaktadır (Carman, 1997). Her şeyden önce tüm apomiktikler poliploid değildir. Fakat 20. yüzyılın ortalarına doğru araştırmalar genlerin varlığını işaret ederek bu hipotezi çürütmüştür (Marshall ve Brown, 1981; Mogie, 1988; Rieseberg ve Noyes, 1998). Bunu takip eden dönemlerde araştırmacılar apomiksiye birçok genin sebep olduğunu düşünürken, kanıtlar yine tam tersini işaret etmiştir. Apomiktik bireylerin polenleri ile eşeyli bireylerin melezlemelerden elde edilen genetik açılım kanıtlara göre, apomiksi sadece dominant 1 veya bazen de 2 gen aracılığı ile basit bir kalıtımla idare edilmekteydi (Nogler, 1995; Barcaccia vd., 1998; Bicknell vd., 2000). Birçok çiçekli bitki ailesinde farklı apomiksi mekanizmalarının gözleniyor olması apomiksinin bu türlerde bağımsız olarak ortaya çıktığını işaret eder.

Apomiksi için önerilen basit kalıtım modeli yüzyılın geri kalan kısmında konu ile ilgili genetikçiler arasında kabul görmüş, apomiktik üremeye sebep olan genler "apomiksi genleri" olarak adlandırılmıştır. Bu genlerin doğal mutasyonlar sonucunda oluştuğu düşünülmüştür. Bu gün ortaya çıkan bu görüntüye göre apomiksi elemanları (apomayoz, partenogenez, endosperm oluşumu) birbirinden bağımsız bir veya daha fazla sayıda gen seti tarafından idare edilmektedir (Grimanelli vd., 1998a; Noyes ve Rieseberg, 2000; Grimanelli vd., 2003; Noyes, 2005). Buna karşın apomiksi genlerinin basit kalıtım gösterdiğini açıklayan önceki araştırmalar tekrar ele alınmıştır. Moleküler düzeyde yürütülen birçok araştırma ile apomiksi elemanlarından sorumlu genlerin çoğunun rekombinasyona uğramayan kromozom bölgelerinde süper gen kompleksleri halinde bulunduğu ispatlanmıştır (Koltunow ve Grossniklaus, 2003; Spielman vd., 2003; Pupilli vd., 2004). Genetik analizler bu türlerin apomiksi lokusunda rekombinasyonun baskılandığını göstermiştir. Mutasyon analizleri ise birçok türde apomayoz, partenogenez ve pseudogami gibi apomiksi elemanlarının bağımsız lokuslar tarafından kontrol edildiğini ortaya çıkarmıştır. Örneğin, *Taraxacum* ve *Erigeron* türlerinde diplospori ile partenogenezin, *Hypericum*, *Poa*, *Hieracium* ve *Cenchrus* türlerinde ise apospori ile partenogenezin bağımsız iki lokus tarafından kontrol edildiği bulunmuştur (Noyes ve Rieseberg, 2000; Albertini vd., 2001a; Catanach vd., 2006;

Schallau vd., 2010; Conner vd., 2013). *Hieracium* türlerinde ayrıca otonom endosperm gelişimin de diğer iki apomiksi elemanlarından bağımsız açılım gösterdiği bulunmuştur (Ogawa vd., 2013).

Apomiksinin, evrimsel gelişim süreçlerinde eşeyli üreme süreçlerinden farklılaştığına dair kanıtlar vardır (Koltunow, 1993; VielleCalzada vd., 1996; Leblanc vd., 1997; Grimanelli vd., 2001; Grossniklaus vd., 2001a; Koltunow ve Grossniklaus, 2003; Tucker vd., 2003; Sharbel vd., 2010a). Örneğin, apomiktik *Hieracium praealtum* türünde yapılan delesyon çalışmaları sayesinde apomayoz ve partenogenez lokusları olmayan iki farklı mutant elde edilmiştir. Bu lokuslara fenotipleri nedeniyle *LOSS OF APOMEIOSIS (LOA)* ve *LOSS OF PARTHENOGENESIS (LOP)* adları verilmiştir. Bu mutantlarda apomayoz lokusun kaybı nedeniyle diploid embriyo kesesi ve apospori öncül hücreleri oluşmamış, bunun yerine megaspor ana hücresi mayoz bölünmeye başlamış ve bitkiler eşeyli üremeye yönelmişlerdir (Koltunow vd., 2011).

Bazı türlerde apomiksi lokusunun heterokromatin ve tekrar dizileri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Örneğin apomiktik *Pennisetum squamulatum* türünde aposporiye özgü genom bölgesi bir kromozomun heterokromatik telomer kısmındadır (Akiyama vd., 2004). Benzer şekilde, *Hieracium* türündeki *LOA* lokusu çok sayıda tekrar dizileri ve transpozon bakımından zengin bir genom bölgesindedir (Okada vd., 2011). Bu örnekler tekrar eden kromozom yapılarının apomiksinin

anlaşılmasında önemli olabileceğini işaret etmiştir. Fakat, *Hieracium* türleri arasındaki melezleme çalışmalarından *LOA* lokusu ile ilişkili tekrar dizilerinin apospori için gerekli olmadığını, bunun yerine genomdaki bu elementlerin apomiksiden sorumlu genlerin fonksiyonları için önemli olabileceği anlaşılmıştır (Kotani vd., 2014). Bazı türlerde apomiksi ile genetik olarak birlikte açılım gösteren lokuslar incelenmiş ve bu bölgelerde önemli olabilecek bazı genler belirlenmiştir. Bunlar arasında *Pennisetum* ve *Cenchrus* türlerinde çeltik *BABY BOOM (BBM)* geni ve *Hypericum* türünde E3 ligaz ile benzer protein kodlayan bölgeler sayılabilir (Conner vd., 2008). *BBM* geni *Arabidopsis* türünde aşırı ifade ettirildiğinde vejetatif dokulardan embriyo gelişimine neden olmuştur (Boutilier vd., 2002; Schallau vd., 2010). E3 ligazın ise embriyo kesesi gelişimi ile ilgili olduğu bilinmektedir (Juranic vd., 2012). Bunlara ek olarak, günümüzde doğal apomiktik ve bunların eşeyli süreçler ile tohum oluşturan yakın akrabalarına ait üreme hücrelerinde farklı anlatıma uğrayan genler yeni nesil DNA dizi analiz ve cDNA-AFLP gibi yöntemler ile karşılaştırılabilmektedir (Sharbel vd., 2010b; Silveira vd., 2012; Okada vd., 2013). Bu çalışmalarda apomiksi süreçlerinde görev alabilecek genler belirlenmeye çalışılmaktadır. Bununla birlikte belirlenen aday genler için fonksiyon analizleri yapılması gerekmektedir.

Bir başka yaklaşımda ise eşeyli süreçler aracılığı ile tohum üreten *Arabidopsis* gibi model bitki türlerinde mutasyon ile apomiksi süreçleri ile benzer fenotipe sahip hatlar

edilmektedir. Bu çalışmalardaki temel varsayım, eşeyli süreçlerde görev alan genlerin anlatımlarının zamana ve dokuya bağlı olarak değişmesi sonucunda apomiksiye yol açtığıdır. Mutasyon sonrasında apomiksi süreçleri ile benzer fenotip sergileyen çok sayıda aday gen belirlenmiştir (Hand ve Koltunow, 2014). Bunlar arasında en dikkat çekici olan, *Arabidopsis dyad* mutantlarıdır. *dyad* mutantlarında apomayozu çok benzer bir şekilde mayoz aksadığı için $2n$ kromozoma sahip gametler üretilir (Ravi vd., 2008). Buna karşın, bu genin diplosporik *Boechera* türlerindeki homologuna ait genom dizileri incelendiğinde benzer bir mutasyonun doğal apomiktik türlerde olmadığı anlaşılmıştır (Sezer vd., 2016). Bunlara ek olarak, 3 farklı gen (*SPO11-1*, *REC8* ve *OSD1*) için mutasyon taşıyan ve *Arabidopsis MiMe* (*Mitosis instead of Meiosis*) olarak bilinen genotipe sahip hatlarda apomayozu çok benzer şekilde mayoz yerini mitozu bırakmıştır. *MiMe* genotipine sahip bitkiler daha sonra *CENH3* gen anlatımı modifiye edilmiş diğer *Arabidopsis* bitkileri ile melezlenmiştir. Bu melezleme sonrasında *CENH3* genindeki modifikasyondan dolayı ebeveyn bitki genomlarından biri elenmiş ve ana bitki ile genetik özdeş döller elde edilmiştir (Ravi ve Chan, 2010; Marimuthu vd., 2011). Daha sonra, *MiMe* genotipinin sadece *SPO11-1* geni ile değil aynı zamanda rekombinasyon başlatılmasından sorumlu *PRD1*, *PRD2* veya *PRD3/PAIR1* gibi diğer genler kullanılarak da elde edilebileceği bulunmuştur (Mieulet vd., 2016). Bir model organizma olan *Arabidopsis* türünde geliştirilen *MiMe* teknolojisi, ilk kez

çeltik gibi tarımı yapılan ve ekonomik öneme sahip bir kültür bitkisine de aktarılmıştır. Çeltikte öncelikle rekombinasyona engel olan (*pair1*), kardeş komatidlerin ayrılmasına izin veren (*Osrec8*) ve mayoz 2 aşamasını ortadan kaldıran (*Ososd1*) 3 farklı mutant elde edilmiş ve melezleme yolu ile bu mutasyonları bir arada taşıyan üçlü mutantlar elde edilmiştir. Bu mutantlarda *MiMe* genotipi sağlanmış ve başarılı bir şekilde apomayoz benzeri bir mekanizma ile diploit gametler üretilmiştir. Buna karşın henüz, *Arabidopsis* türünde uygulanan genom elenmesi çeltik gibi monokotiledon bir bitkiye henüz aktarılmamıştır (Mieulet vd., 2016).

Bu çalışmalardan farklı olarak eşeyli süreçlerde görev alan genleri kontrol eden epigenetik düzenlemelerin apomiksiye yol açabileceğini işaret eden bilgiler de mevcuttur. Epigenetik yollarda görev alan *ARGONAUTE 9*, *RNA POLYMERASE 6* ve *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3* gibi *Arabidopsis* genleri ile mısır bitkisi *DNA METHYLTRANSFERASES* (*DMT102* ve *DMT103*) ve *AGO104* genlerindeki mutasyonlar apomiksi benzeri fenotiplere yol açmıştır (Garcia-Aguilar vd., 2010; Olmedo-Monfil vd., 2010). Mısır *dmt102* ve *dmt103* mutant hatlarında diploid kromozoma sahip gametler ile çoklu embriyo kesesi gelişimi gözlenmiş olup bu sonuçlar *DNA Methyltransferaz* kodlayan genlerin apomiksi için önemli olabileceğini işaret etmiştir (Garcia-Aguilar vd., 2010). Buna ek olarak, diploid apomiktik ve eşeyli *Boechera* türlerinde yapılan bir çalışmada *DNA Metiltransferaz* gen anlatımlarının üreme

şekline bağlı olarak farklılık gösterdiği ve bu durumun özellikle endosperm gelişimde epigenetik düzenlemelere yol açabileceği önerilmiştir (Taşkın vd., 2017).

Özetle, genetikçiler basit kalıtım modelinden elde ettikleri bulgularla araştırmalarını apomiktik kültür bitkileri elde etmeye yönlendirecek mali destek bulmuşlar ve aşağıda belirtilen araştırmaları başlatmışlardır;

1) Kültür bitkilerine yakın akraba doğal apomiktik türlerden apomiksi genlerinin klasik ıslah yöntemlerinden türler arası melezleme (intogression) ile aktarılması.

2) Doğal apomiktik türlerden apomiksi genlerinin moleküler klonlanması ve daha sonra uzun vadede bu genlerin kültür bitkilerine genetik transformasyonlarla aktarılması.

3) Eşeyli bir türde mutasyon veya genetik mühendisliği aracılığı ile yeni apomiksi genlerinin oluşturulması ve uzun vadede bu genlerin kültür bitkilerine genetik transformasyonlarla aktarılması.

Buna karşın, bu programların hiçbiri henüz apomiksi genlerinin herhangi bir kültür bitkisine veya model türe aktarılmasında başarılı olamamıştır. Temel hedefin henüz başarıya ulaşmamış olmasına rağmen son yıllar içerisinde apomiksinin genetik düzenlenmesi ile ilgili çok daha net bir görüntü ortaya çıkmıştır.

1.6. Apomiksi ve Genetik Etiketleme (Imprinting)

Çiçekli bitkilerde tohum çifte dölleme ile meydana gelir. Embriyo tozlaşmadan hemen sonra bir sperm nükleusunun yumurta hücrelerini, endosperm ise ikinci bir sperm nükleusunun merkezi hücreyi döllemesi ile oluşur. Türlerin çoğunda yumurta hücresi ve merkezi hücreler dişi üreme organlarında aynı kökenden geldikleri için genetik olarak eşittir. Aynı şey her iki polen nükleusu için de geçerlidir. Bu durumda embriyo ve endosperm dokuları da genetik olarak eşittir. Fakat aralarındaki tek fark, genomlarındaki kromozom set sayılarının farklı olmasıdır. Embriyo biri anasal (maternal:1m) diğeri babasal (paternal:1p) iki set kromozomdan oluşan diploit bir genoma (1m:1p), endosperm ise ikisi anasal (2m) ve diğeri babasal (1p) triploit bir genoma (2m:1p) sahiptir. Çoğu bitkide endosperm dokusundaki maternal:parental oranının 2m:1p'den farklı olması tohum kaybına yol açar. Çünkü bu orandan sapmalar endosperm gelişimini engeller. Embriyo ise endosperm tarafından beslenemediği için gelişmez. Bunun sebebi, endospermin *ebeveyn-kökene*'ne (parent-of-origin) göre gelişim göstermesidir (Vinkenoog vd., 2000). Bir başka deyişle, endosperm gelişimi *ebeveynce etiketlenmiş genler* (parentally imprinting genes) tarafından kontrol edilir (Haig ve Westoby, 1991; Chaudhury vd., 2001; Grossniklaus vd., 2001b; Vinkenoog vd., 2003). Bu durum özellikle farklı ploidi seviyelerine (kromozom set sayısına) sahip bireyler mezlemlendiklerinde ortaya çıkar.

Örneğin, ana ebeveyn diploid (2x) bir bitki, baba ebeveynin ise tetraploid (4x) olduğu melezlemelerde endosperm dokusunda mitotik aktiviteler artar, mikropilar ve kalazal bölgede hücre yığılmaları meydana gelir. Oysaki bunun tam tersi melezlemede (4x X 2x) mitotik aktivite ve hücre yığılmaları çok azdır. Bunun sonucunda da birçok bitki türünde 2x X 4x ve 4x X 2x melezleri tohum bağlayamazlar. Fakat bu tür melezlemelerde endosperm belirlenir bir aşamaya kadar büyümesi endosperm gelişiminde *ebeveyn-kökeninin* önemli olduğunu ortaya koyar. Çiçekli bitkilerde bu durum *ebeveyn-zıtlaşma* (parental conflict) teorisi adı altında açıklanmıştır (Haig ve Westoby, 1991). Bu modele göre endosperm gelişimi üzerine anasal ve babasal kökenli aleller zıt etkiye sahiptir. Fazladan babasal genom, tohumda aynı zamanda polen ebeveyn kökenli alel ifadesinde artışa neden olacağı için tohum büyüklüğü de artar. Fazladan anasal genomsa, tohumda sadece ana ebeveyn kökenli alel ifadesi artışına sebep olacağı için tohum büyüklüğü sınırlanır. *Arabidopsis thaliana* ile yapılan araştırmalar bu teoriyi doğrulamıştır. Çünkü *A. thaliana* gibi bazı bitkilerde 2x X 4x ve 4x X 2x melezlemeleri boyutları birbirinden farklı da olsa canlı tohum oluşmaktadır. Fazladan iki kat babasal genom içeren *Arabidopsis* tohumları büyük endosperm ve embriyo oluştururken, fazladan iki kat anasal genom içeren tohumlarda ise tam tersi bir etki söz konusudur (Vinkenoog ve Scott, 2001). Çünkü *etiketleme* (imprinting) endosperm yapısına katılan anasal ve babasal

genomlardaki bazı alelleri *susturur* (silence). Sonuç olarak, ebevenyler endosperm genomuna farklı sayıda aktif alele katılırlar. Bu gün, babasal kökenli alellerin *etiketleme* nedeniyle döllerde büyümeyi teşvik ettiği, anasal kökenli alellerin ise tam tersi bir etkiye yol açtığına dair moleküler ve fenotipik kanıtlar mevcuttur (Haig ve Westoby, 1991; Alleman ve Doctor, 2000). *Etiketleme* çiçekli bitkiler dışında memelilerde de görülmektedir.

Gametofitik apomiksi ile üreyen bitkilerde ise dişi gametler apomayoz sonrası oluştuğu için kromozom sayıları ana bitki (2m) ile eşitir. Buna karşın, çoğu gametofitik tür mayoz geçirmiş polen (1p)'de üretebilir. Dolayısıyla, bu bitkilerin bazılarında tohumlar pseudogamik endosperme (4m:1p) sahiptir. Pseudogamik endosperm, anasal kökenli iki merkezi hücrenin (4m) babasal kökenli bir sperm nükleusu (1p) tarafından döllenmesi sonucu oluşur. Eşeyli bitkilerin aksine endosperm genomunda 2m:1p oranındaki sapmayı tolere edebilen apomiktik türler fertil tohum oluşturabilmektedir. Büyük bir ihtimalle bu türlerin evrimsel gelişimleri sırasında genetik *etiketleme* sistemlerinde değişiklikler meydana gelmiştir (Spielman vd., 2003). Yine de bazı apomiktik türlerde endosperm genomundaki 2m:1p oranı alternatif gamet oluşum ve döllenme süreçleri sayesinde korunmuştur. Fakat bazılarında ise ebeveyn genomları arasındaki hassas dengeye gereksinim tamamen ortadan kalkmıştır. Otonom apomiktik olarak bilinen bu türlerde endosperm (4m:0p) babasal katılım olmaksızın gelişmektedir. Daha önce de

belirtildiği gibi, eşeyli türlerde, endosperm gelişimi sadece babasal kökenli genlerin ifade edilmesi ile teşvik edilmektedir. Bu durumda, otonom endospermde aynı görevi anasal genom kökenli genler üstlenmelidir. Bir başka deyişle, büyük bir ihtimalle otonom apomiktiklerde anasal etiketlenme ortadan kalkmıştır (Vinkenoog ve Scott, 2001; Taskin vd., 2009).

1.7. Kültür Bitkilerine Apomiksinin Aktarılması

Apomiksi genlerinin kültür bitkilerine aktarılması için günümüzde araştırmalar hem doğal apomiktik türler hem de model eşeyli bitki türleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar arasında en çok çalışılan tek çenekli (monokotiledon) doğal apomiktik bitki türleri pseudogamik apospori ile üreyen şu sınıflara girerler;

Panicum (Chen vd., 1999), *Pennisetum* ve *Cenchrus* (Roche vd., 1999), *Brachiaria* (Pessino vd., 1997; Pessino vd., 1998), *Paspalum* (Martinez vd., 2001; Martinez vd., 2003) ve *Poa* (Naumova vd., 1999; Albertini vd., 2001b).

Pseudogamik diplospori ile üreyen tek çenekli bitki türleri ise *Tripsacum* sınıfına girerler (Leblanc vd., 1995b; Grimanelli vd., 1997; Grimanelli vd., 1998b; Sokolov vd., 1998; Grimanelli vd., 2003). Üzerinde en çok çalışılan iki çenekli bitki sınıfları ise şunlardır;

Otonom diplosporik *Taraxacum* ve *Erigeron* (Tas ve Van Dijk, 1999; Van Dijk vd., 1999; van Baarlen vd., 2000; van Dijk ve Bakx-Schotman, 2004; Noyes ve Allison, 2005).

Otonom apospori ile üreyen *Hieracium* (Koltunow vd., 1998, 2000). Pseudogamik apospori ile üreyen *Hypericum perforatum* (Matzk vd., 2001; Matzk vd., 2003). Pseudogamik diplospori ile üreyen *Boechera* (Roy ve Rieseberg, 1989; Roy, 1995; Naumova vd., 2001; Sharbel ve Mitchell-Olds, 2001; Taskin vd., 2004, 2009).

Bunun karşılığında, *Arabidopsis* ve mısır gibi birçok moleküler biyoloji tekniğinin kolaylıkla uygulandığı bitki türleri ise eşeyli üreme için model organizma olarak kullanılmaktadır.

Apomiksiyi tarımsal açıdan kullanılabilir hale getirmek için yapılan ilk çalışmalarda birbirine yakın türler arasında melezlemeler yapılmıştır. Türler arası melezleme programlarının amacı doğal apomiktik türlerden kültür bitkilerine apomiksi genlerini taşıyan mümkün olan en küçük kromozom parçasını aktarmaktır. Örneğin apomiktik *Tripsacum* ile yakın akraba eşeyli mısır bitkileri arasında melezlemeler yapılmıştır. Moleküler işaretleyiciler kullanılarak *Tripsacum* türünde apomiksiyi kontrol eden lokusun mısır bitkisine aktarıldığı gösterilmiştir (Leblanc vd., 1996). Yine benzer bir çalışmada, apomiktik *Pennisetum squamulatum* ile eşeyli *P. glaucum* (pearl millet) arasında yapılan melezlemelerden obligat apomiktik bir hat elde edilmiştir. Ayrıca, *P. squamulatum* genomunda yakın eşeyli akrabalarında gözlenmeyen apomiksi ile ilgili bir bölge olduğu gösterilmiştir (Ozias-Akins vd., 1998). Buğday ve apomiktik yakın akrabası *Elymus rectisetus* arasında yapılan melezlemeler

sonucunda ise sadece apomiksi elementlerinin ifade olduğu görülmüştür (Peel vd., 1997). Buna karşın, bu çalışmalar apomiksi özelliğinin kaybolması ve tohum bağlamada bazı sorunlar ile karşı karşıya kalmıştır. Özellikle tohum bağlamada karşılaşılan sorunların kökeninde endosperm problemi yatmaktadır. Çünkü bu melezlerin endospermelerinde mayoz geçirmemiş merkezi hücrelerin (4m) eşeyli bir sperm hücresi (1p) ile döllenmesi nedeniyle ebeveyn kromozom setleri arasında olması gereken denge (2m:1p) ortadan kalkmış, endosperm yeterince gelişmemiştir (Morgan vd., 1998; Grimanelli vd., 2001; Spillane vd., 2001).

Apomiksi genlerinin *haritaya-dayalı* (map-based) klonlanması oldukça umut vericidir. Fakat beraberinde bazı sorunlar getirmektedir. Moleküler işaretleyiciler apomiksi ile ilgili bölgenin *Pennisetum squamulatum* genomunda rekombinasyona uğramayan 50 Mbp büyüklüğünde bir yer kapladığını göstermiştir (Roche vd., 2002). Benzer şekilde *Tripsacum dactyloides*, *Paspalum*, *Poa pratensis* ve *Brachiara* türlerinde de apomiksiden sorumlu bölgenin rekombinasyona uğramadığı gösterilmiştir (Grimanelli vd., 1998b; Pessino vd., 1998; Albertini vd., 2001b; Blakey vd., 2001; Martinez vd., 2001). Apomiksi genlerinin bu bitkilerin genomlarında rekombinasyona uğramayan bir bölgede bulunması *haritaya-dayalı* klonlama süreçlerini zorlaştırmaktadır. Ayrıca, bu bitkilerin poliploid olmaları ve genomlarında çok sayıda tekrarlanan baz dizileri içermeleri de sorunlara yol açmaktadır.

Apomiksiyi kontrol eden süreçler hakkında bilgi edinmenin bir yolu da eşeyli süreçlerle üreyen türlerde apomiksi elemanları gösteren mutantları analiz etmektir. Bu amaç doğrultusunda, günümüzde en çok çalışılan eşeyli model tür *A. thaliana* olmuştur. Birçok laboratuvarında, döllenme gerçekleşmediği halde tohum gelişimine izin veren *A. thaliana* mutantları tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu taramalarda *A. thaliana* erkek steril mutant hatları tercih edilmiştir. Erkek steril mutantlarda yapılan bu yoğun taramalarda fenotip olarak pistil boyu kullanılmıştır. Normalde *A. thaliana* çiçeklerinde pistiller döllenme gerçekleşmeden uzamaz. Döllenme olduktan sonra ise pistiller uzayarak meyva (bakla) oluşturur. Erkek steril mutantlarda ise normalde pistil boyu döllenme gerçekleşmediği için uzamaz. Bu mutantlarda pistil boyunda uzamaya ancak tohum gelişimine yol açacak ikinci bir mutasyon sebep olabilir. Pistil boyu ayrıca binlerce mutant bitki arasında aranılan özelliklere sahip bireyleri kolaylıkla tespit etmeyi sağlayarak zaman ve maddi kayıpları engelleyen bir fenotiptir. Bu araştırmalarda bir çok farklı erkek steril mutant kullanılmıştır; stamen oluşturamayan *pistillata (pi)* mutantları (Koltunow vd., 1995; Chaudhury vd., 1997) ve sadece yüksek nem içeren ortamlarda fertil erkek steril *pop1* mutantları (Ohad vd., 1996).

Yukarıda açıklanan yöntemle binlerce mutant bitki taranmış, bunlar arasında 3 farklı fenotip görülmüştür; 1) Polen üreten mutantlar 2) Tohum içermeyen partenokarpik bakla üreten mutantlar 3)

Tohum benzeri yapılar oluşturan apomiksi elementleri ile ilgili mutantlar.

Bu çalışmaların ilkinde, homozigot *pop1* mutantları öncelikle EMS (etil metan sülfat) ile mutasyona uğratılmıştır. Ardından polen oluşumuna izin vermeyen bir ortamda yetiştirilen bitkiler (50 000 M1 bitkisi) mutant fenotip için taranmış, aralarında pistil boyu uzayanlar seçilmiştir (Ohad vd., 1996). Bunlar arasında 12 hat izole edilmiş ve sadece bir tanesinin aranılan özellikte olduğuna karar verilmiştir. Bu mutant önceleri *fie* (fertilization independent endosperm development; döllenme bağımsız endosperm gelişimi) olarak adlandırılmış fakat sonradan bu *fis3* (fertilization independent seed development; döllenme bağımsız tohum gelişimi) olarak değiştirilmiştir (Ohad vd., 1996).

Stamen oluşturmayan *pi* mutantları ise ilk önce yabancı tipler ile melezlenmiş, daha sonra buradan elde edilen heterozigot F1 popülasyonu direk olarak mutasyona uğratılmıştır (Chaudhury vd., 1997). Ardından, mutant fenotip gösteren bitkileri seçmek için M2 popülasyonunda stamen oluşturmayan 50 000 birey taranmıştır. Bunlar arasında istenilen özellikte 3 mutant ile karşılaşmıştır. Bu mutantlara da *fis1*, *fis2* ve *fis3* (fertilization independent seed development; döllenme bağımsız tohum gelişimi) adı verilmiştir (Chaudhury vd., 1997). Benzer şekilde izole edilen *medea* mutantlarının ise *fis1* ile aynı olduğu bulunmuştur (Grossniklaus vd., 1998b). Bu mutantlarda endosperm kendiliğinden geliştiği için tohum oluşumu ve döllenme

birbirinden bağımsızdır. *fis* mutantlarına ait tohumlarda çok hücreli diploid endosperm bulunur. Buna karşın, embriyo sadece *fis1* ve *fis2* mutantlarında globüler safhaya kadar gelişir.

FIS1/ MEDEA, *FIS2* ve *FIS3/ FIE* genlerinin fonksiyonu döllenme bağımsız tohum gelişimini engellemektir. Bu genler, hayvanlarda evrimsel süreç boyunca korunmuş ve transkripsiyonel represör olarak tanımlanmış *Drosophila* Polycomb grubu (PcG) ile benzer proteinleri kodlarlar (Ng vd., 2000; Grossniklaus vd., 2001b). Eğer *FIS* genlerinde bir mutasyon meydana gelirse otonom apomikside olduğu gibi döllenme olmasa bile endosperm gelişimi başlar. Bundan dolayı, otonom apomiktik bitkilerde endosperm gelişimi için PcG'nin baskılayıcı özelliğinin ortadan kaldırılmış olması gerekir. Ayrıca, *FIS* genleri genomik *etiketleme* ile kontrol edilir; tohum gelişimde anadan gelen *FIS* gen alelleri çok önemli iken babadan gelen alelleri ya hiç yada çok az öneme sahiptir (Vinkenoog ve Scott, 2001).

Bu çalışmalar dışında, apomiksi için aday olabilecek başka genler de izole edilmiştir. Döllenme olmaksızın embriyo gelişimine izin veren bu genlerden ilki *AtSERK1* genidir. *AtSERK1* normalde *Arabidopsis* ovul ve embriyolarında ifade olur. Fakat *AtSERK1* gen ifadesi artırıldığı zaman doku kültüründe embriyogenik kallus oluşumuna yol açar (Hecht vd., 2001). Döllenme olmaksızın embriyo gelişimine izin veren ikinci gen ise *BABY BOOM*'dur. *BABY BOOM* ise tohum gelişimi sırasında ifade olur ve gen ifadesi artırıldığında çeşitli vejetatif dokularda

embriyo gelişimine sebep olur (Boutilier vd., 2002). Fakat bu genlerin tohumda partenogenik embriyo oluşturup oluşturmayacağı henüz bilinmemektedir.

Apomiksinin kültür bitkilerine hem klasik ıslah yöntemleriyle hem de genetik mühendisliği aracılığı ile aktarılmasında kullanılmak üzere başlatılan diğer yaklaşımlar ise şunlardır;

- 1) Polen tüpü gelişimini veya sperm salınımına engel olacak genler izole edilmektedir. Bu sayede fakültatif apomiktik bitkilerde dölleme engellenecektir.
- 2) Apomiksi elementlerini uyararak için embriyo kesesine özgü vektörlerin geliştirilmektedir.
- 3) Tohuma özgün promotorlar izole edilmektedir.
- 4) Eşeyli tohum oluşumuna engel olmak için mayoza özgün promotorlar izole edilmektedir.
- 5) Embriyo ve endosperm gelişimi kontrol eden yeni genler ve bunların promotorlarını izole edilmektedir .

1.8. Diplosporik Apomiktiklerde Embriyo Kesesi Gelişimi

Kapalı tohumlu (angiosperm) bitkilerde ovul gelişimi birçok yöntemle incelenmektedir. Bunlar arasında en çok kullanılan sitolojik teknikler *ovul-temizleme* (ovul-clearing) ve kesit almaktır (Young vd., 1979; Crane ve Carman, 1987; Naumova, 1997). Özellikle *ovul-temizleme* son zamanlarda apomiktik bitkilerde embriyo kesesi gelişimini ortaya

çıkarmada son derece başarılı olmuştur. Çünkü bu teknik sayesinde nükleus bölünmeleri rahatlıkla izlenebilmektedir. Bu tekniklere ek olarak, flow sitometri ise embriyo ve endosperm hücrelerinin nükleus içerikleri (ploidi seviyeleri) hakkında bilgi verir (Matzk vd., 2000; Matzk vd., 2001). Böylelikle, tohum gelişim süreçleri (apomiksi veya eşeyli üreme) ortaya çıkarılabilir.

1.9. Ovul-temizleme

Bu kısımda, diplospori ile üreyen *Boecheera gunnisoniana* türünde *ovul-temizleme* tekniği kullanılarak embriyo kesesi gelişiminin nasıl incelendiği açıklanmaktadır (Taskin vd., 2004). *A. thaliana* ile yakın akraba olan *Boecheera* türleri apomiksi araştırmaları için çok önemli model bir organizmadır. Çünkü *Boecheera* (*Brassicaceae*) cinsinde çok çeşitli üreme mekanizmaları vardır. Bu cins içerisinde bazı türler tamamen eşeyli ürerken, bazıları apomiktik olarak ürerler (Roy, 1995).

Embriyo kesesi gelişimini incelemek için sera koşullarında yetiştirilmiş 4-5 aylık bitkilerden alınan çiçek tomurcukları FAA (Formaldehit %40 : Etanol %70 : Asetik asit %98) içerisinde 48 saat boyunca karanlıkta fikse edilmiş, ardından %70'lik Etanol içerisinde 4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Fikse edilmiş çiçeklerden pistiller stereo mikroskop altında ince uçlu pens ve bistrü yardımıyla çıkarılmıştır. Ardından pistil dokuları artan konsantrasyonlarda Etanol serisi (%70, 80, 90 ve 100) ile 20'şer dakika boyunca dehidrate edilmiştir. Pistiller içerisinde, sırasıyla 1:2, 1:1 ve 2:1 oranlarında metil

salisilat ve etanol olan karışımlarda, 1'er saat süre ve son olarak da saf metil salisilat içerisinde 12 saat boyunca temizlenmiş ve ovüller tek tek çıkarılarak embriyo kesesi gelişimi incelenmiştir (*ovüle-temizleme*) (Naumova vd., 1999). Temizlenmiş ovüller Nomarsky optikleri kullanılarak incelenmiştir. Pistil boyu (ovaryumun dip kısmından stigmanın ucuna kadar) bir cetvel yardımı ile ölçülerek pistiller boyutlarına göre sınıflandırılmıştır. Aynı bitkiye ait farklı çiçeklerden alınan pistiller boylarına (0.5-1, 1-1.5, 1.5-2 ve 2-5 mm) göre tek tek

incelenmiştir. Toplamda üç farklı bitkiden bitki başına en az 300 temizlenmiş ovül Nomarski optik kullanılarak incelenmiştir. Embriyo kesesi içeriği (embriyo kesesi içerisindeki nukleus sayısı, tetrad ya da dyadların veya endosperm ve embriyo keselerinin varlığı) kayıt edilmiştir.

Farklı bitkilerden alınan uzunluğu 0.5-1 mm boyundaki pistillerde ovüllerin plasentadan henüz farklılaştığı ve megaspor ana hücresi, iç ve dış integümentler ve nusellusdan meydana geldiği gözlenmiştir (*Tablo 1*).

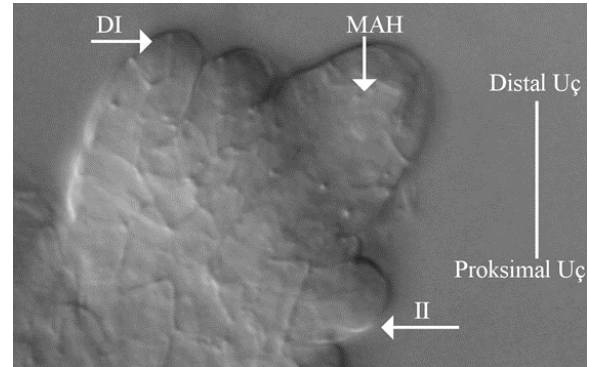
Tablo 1: *B. gunnisoniana* ovüllerinde embriyo kesesi gelişimi

Pistil Uzunluğu (mm)	Ovül Gelişim Evresi (İncelenen Ovül Sayısı)
0.5-1	Megaspor Hücresi Farklılaşması (340)
1-1.5	Apomayoz (300)
1.5-2	Megasporlarından biri dejenere olan Dyad (600)

Denemede toplam 3 farklı bitkiden alınan ovüller analiz edilmiştir.

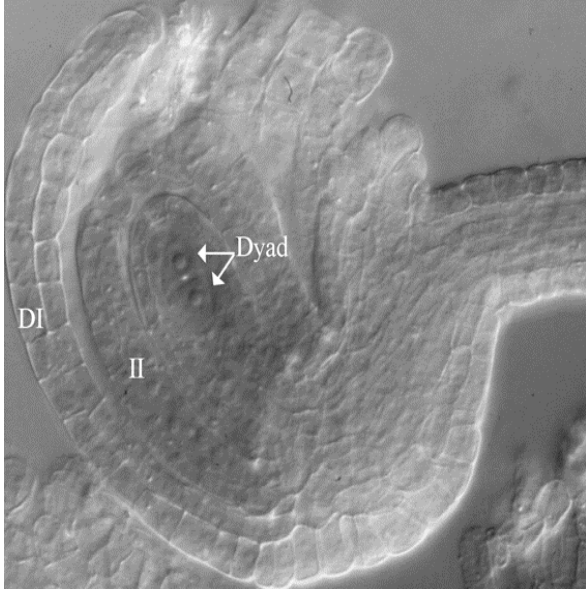
Bu erken evrede dahi ovülün bir polaritesi vardır. Buna göre ovülün plasenta ile birleştiği yere kalazal (ya da proksimal) uç, diğer tarafda kalan kısmına ise mikropilar (ya da distal) uç denir. Nusellus bu tanımlamaya göre distal uçta yer alır ve megaspor ana hücresine köken olacak hücreleri içerir. Megaspor ana hücresi nusellusun epidermal tabakası altında bulunur ve diğer hücelere göre daha büyük bir nükleusa (2n) sahip, geniş bir hücre olması ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Diğer uçta yer alan kalaza ise

henüz farklılaşmakta olan integümentlere ev sahipliği yapar (Şekil 1).



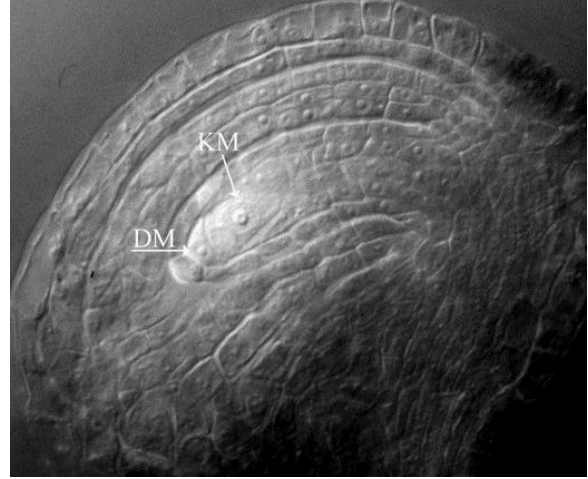
Şekil 1. *B. gunnisoniana* ortalama boyu 0.5-1 mm olan pistillerde erken ovül gelişimi. DI: Dış İntegument; II: İç integument; MAH: Megaspor Ana Hücresi

Ortalama uzunluğu 1.5 mm'ye ulaşan pistillerin 2. gelişme evresinde oldukları gözlenmiştir (Tablo 1). Bu evrede iç ve dış integümentler nusellusu tamamen sarmış, megaspor ana hücresi ise apomayotik bölünmeye uğramıştır. Megaspor ana hücresi apomayoz sonrası eşeyli üreyen bitkilerin aksine tetrad (n) yerine diplosporik diad (2n) oluşturmuştur (Şekil 2).



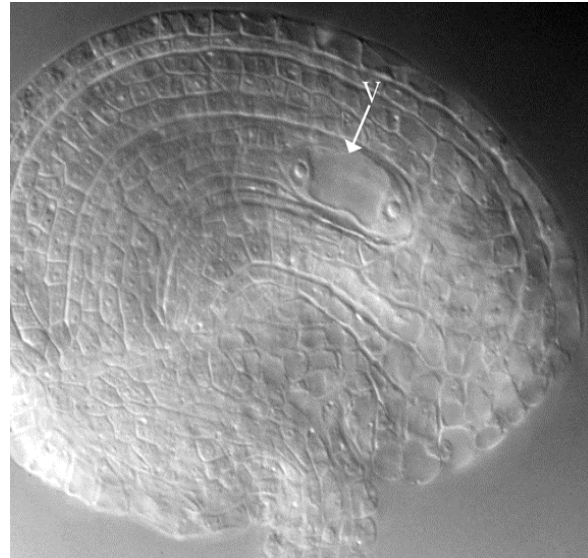
Şekil 2. *B. gunnisoniana* ortalama boyu 1.5 mm olan pistillerde mayoz bölünme sonrası diad oluşumu. DI: Dış İntegument; II: İç integument

Uzunluğu 1.5-2 mm'ye ulaşan pistillerde ise mikropilar uçta yer alan dyadın dejenere olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).

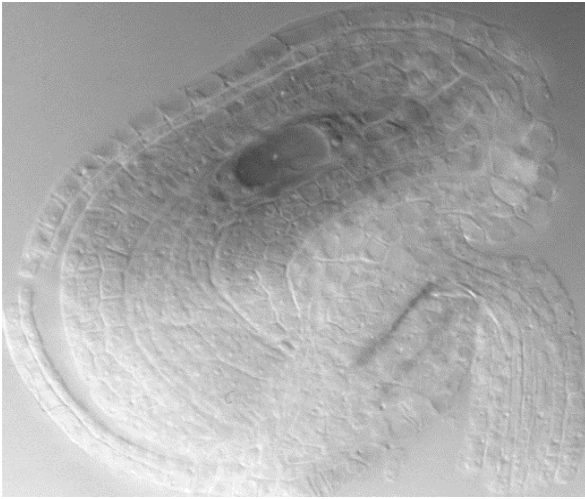


Şekil 3. *B. gunnisoniana* ortalama boyu 1.5-2 mm'ye ulaşan pistillerde Dejenere olan Mikropilar Megaspor: DM ile genişleyen Kalazal Megaspor: KM.

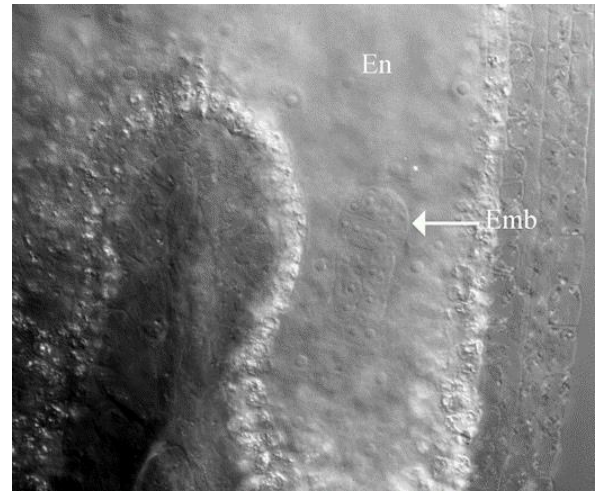
Kalazal uçta olanı ise hacimce genişleyip, mitoz bölünmeler geçirerek, önce 2 (Şekil 4), 4 (Şekil 5) ve son olarak da 8 hücreli embriyo kesesi oluşturmuştur (Şekil 6).



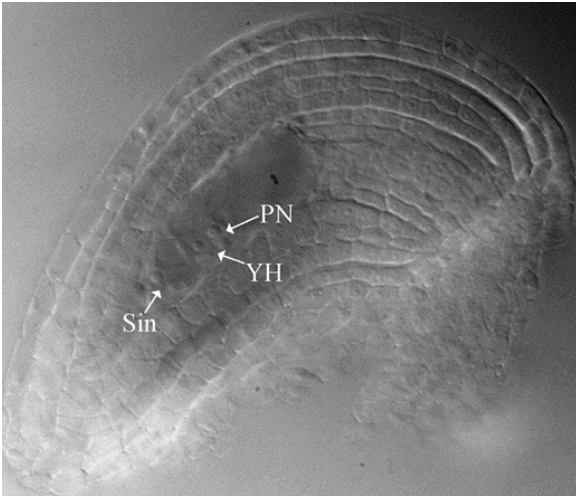
Şekil 4. *B. gunnisoniana* kalazal megasporun mitoz bölünme geçirmesi ile meydana gelmiş, büyük bir vakoul (V) içeren iki nukleuslu embriyo kesesi



Şekil 5. *B. gunnisoniana* dört nukleuslu embriyo kesesi



Şekil 7. *B. gunnisoniana* ortalama boyu 5 mm'ye ulaşan pistiller, **Embriyo (Emb)** ve **Endosperm (En)** gelişimi



Şekil 6. *B. gunnisoniana* sekiz nukleuslu tam olarak gelişmiş embriyo kesesi. PN: Polar nukleus, Sin: Sinerjitler; YH: Yumurta hücresi

Embriyo kesesi gelişimi uzunluğu 5 mm'ye ulaşan pistillerde sonlanmıştır. Bu evrede embriyo ve endosperm belirginleşmiştir (Şekil 7).

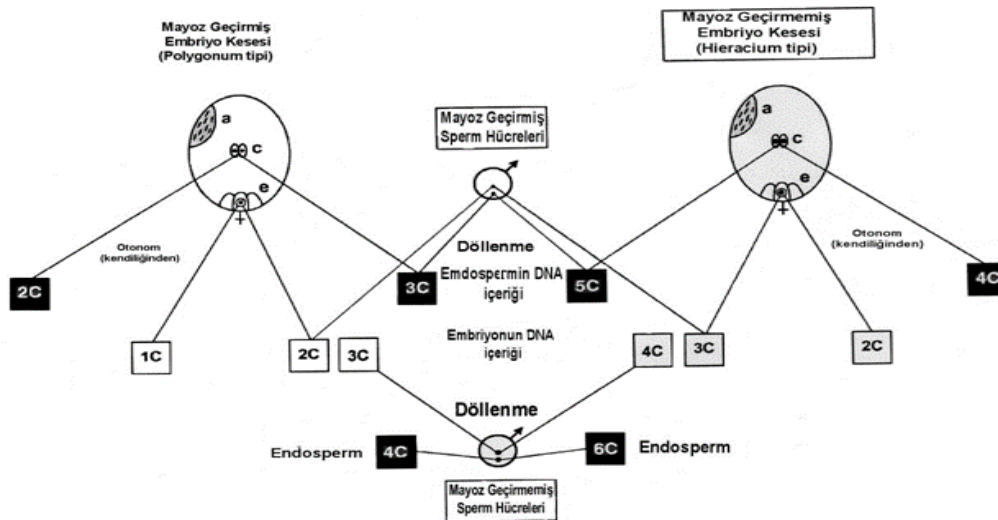
Boechera holboellii ovüllerinde yapılan incelemeler sonucunda *Taraxacum* tipi diplospori gözlemlendiği bildirilmiştir (Böcher, 1951; Naumova vd., 2001). *Taraxacum* tipi diplosporide megaspor ana hücresi mayoz bölünmeye girer fakat, normalde oluşan kromozom eşleşmesi meydana gelmez. İlk bölünme tamamlandığında bir restitasyon nukleusu oluşurken, ikinci bölünme normal bir şekilde ilerler. Dolayısıyla mayoz sonrası, kromozom sayısı indirgenmemiş iki tane hücre (dyad) meydana gelir. Bu hücrelerden biri dejenere olurken diğeri mitozla 8 nukleuslu embriyo kesesini meydana getirir. Buna karşılık eşeyli üreyen bitkilerde ise mayoz 4 tane hücre (tetrad) ile sonlanır ve bu hücrelerden sadece biri embriyo kesesini geliştirir (Schneitz vd., 1995). Bu nedenle eşeyli ve apomiktik üreme arasındaki en büyük sitolojik fark tetradların yerine dyad'ın oluşması, dyad'lardan birinin dejenere olurken diğerin embriyo kesesini

oluşturmak üzere mitoz bölünmelere devam etmesidir (Böcher, 1951).

1.10. Tohumlarda flow sitometri analizleri

Flow sitometri, hücre ve mikropartikülleri saymak ve ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Süspansiyon halindeki hücreler ince bir akım halinde bir küvetten geçirilir. Bu esnada bir ışık (laser) kaynağı ya da elektriksel alan kullanılarak her partikül için bir sinyal tespit edilir. Flow sitometri son 15 yıl içerisinde bitki hücrelerinde nükleer DNA miktarını belirlemek için kullanılmaya başlanmıştır. Nükleer DNA bitki hücrelerinden ya dokuların mekanik olarak parçalanması ya da protoplastların lizisi ile elde edilir. Bitki nükleer DNA'sı floresan boyalar (DAPI gibi) kullanılarak analiz edilmektedir. Flow sitometri, temel araştırmalardaki kullanımına ek olarak, günümüzde özellikle bitki ıslahında çeşitli alanlarda çok yararlı hale gelmiştir; Ploidi seviyesini belirlemede, aneuploid bitkilerin

seçiminde ve anter, mikrospor veya ovaryum kültürlerinden elde edilen haploid ve dihaploid bitkilerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Pfosser vd., 1995). Ayrıca, DNA miktarlarına göre türler arası hibritleri ve genom büyüklüğü belirlemede kullanılmaktadır. Buna ek olarak, apomiktik bitkilerin analiz edilmesinde oldukça faydalıdır. Olgunlaşmış kuru tohumlar kullanılarak endosperm ve embriyo dokularının ploidi seviyelerini belirlemek mümkündür. Bu sayede, incelenen tohumların üreme şekilleri anlaşılabilir. Bu çalışmalarda örnekler çoğunlukla şu şekilde hazırlanır; 1-50 tane tohum örneği DNA boyayan bir boya olan DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ile hazırlanmış tampon içerisinde mekanik olarak parçalanır, ardından da filtrelerden (30 µm) geçirilip buz üzerinde depolanır. Hücreler içerisindeki DNA miktarları (C değerleri) PLOIDY ANALYZER Partec ile analiz edilir (Matzk vd., 2000; Matzk vd., 2001; Naumova vd., 2001; Taskin vd., 2004).



Şekil 8. Eşeyli veya Apomiktik üreyen bitkilerde erkek veya dişi gametlerin mayoz geçirmelerine bağlı olarak meydana gelen embriyo ve endosperm hücreleri nükleus içeriği (Matzk vd., 2000).

Embriyo ya da endospermin ploidi seviyesi embriyo kesesinin mayoz bölünme geçirip geçirmemesine bağlı olarak değişir. Diploit (2C) eşeyli bir bitki diploit 2C (1 maternal:1paternal) embriyo ve triploit 3C (2m:1p) endosperm oluşturur. Triploit (3C) embriyolar kromozom sayısı indirgenmemiş erkek (2p) ya da dişi gametlerden (2m), tetraploid 4C (2m:2p) ya da pentaploid 5C (4m:1p) endospermle birlikte oluşur (Şekil 8). Bu nedenle, embriyo ve endosperm nükleus DNA miktarları arasındaki ilişki göz önüne alınarak üreme şekilleri belirlenebilir. Apomiktik bitkilerde apomayoz nedeniyle embriyo kesesinde diploit (2C) yumurta ve tetraploit (4C) polar hücreler vardır. Embriyo ve endosperm gelişimi için döllenmeye ihtiyaç duymayan otonom apomiktiklerde embriyo diploit 2C (2m:0p) endosperm ise tetraploid 4C (2m:2p) seviyededir. Endosperm oluşumu için döllenmeye ihtiyaç duyan pseudogamik apomiktiklerde ise embriyo yine diploid 2C (2m:0p) iken endosperm sperm hücresinin mayoz geçirip geçirmemesine bağlı olarak pentaploit 5C (4m:1p, sperm hücresi mayoz geçirmiş) veya hexaploit (4m:2p, sperm hücresi mayoz geçirmemiş) seviyededir (Şekil 8).

2. Sonuç

Apomiksi yakın bir gelecekte tüm kapalı tohumlu kültür bitkilerine uygulanacak bir teknoloji olarak karşımıza çıkacaktır. Bu sayede ekonomik öneme sahip tahıllar, endüstri bitkileri, meyve ve sebzelerde hatta orman alanlarında kullanılan birçok bitki türünde tarımsal üretim %10-50 arasında

artacak, hibrit tohum üretiminde ise masrafları %50 oranında azalacaktır. Bu etkiler çiftçilerden tohum üreticilerine kadar birçok tabakada tarımsal üretim için bir devrim yaratacak, yeni ve güçlü pazarlama ve endüstri stratejilerinin doğmasına sebep olacaktır. 1999'da apomiksi genlerini klonlamak amacı ile üç çok uluslu şirket ve Fransız IRD (Institut de Recherche pour le Développement) Meksika'da CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) ile 5 yıllık bir ortak çalışma başlatmıştır. Pioneer Hi-Bred (Dupont'un bir kolu), Groupe Limagrain ve Novartis (şu anda Syngenta) isimli bu şirketler ve ayrıca CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research) destekli çok sayıda uluslararası tarım merkezi bu projeden elde edilecek sonuçları kullanmakta özgür bırakılmıştır. Bu projede apomiksi genleri henüz klonlanmamış olmasına karşın gerek çok uluslu büyük şirketlerin gerekse tarım merkezlerin ortak bir amaç için bir araya gelmesini sağlamıştır.

Apomiksi teknolojisi haksız rekabete neden olmayacak bir düzende, toplumlar arasında eşit ve özgürce paylaşıldığı takdirde dünya ekonomisine beklenen katkıları sağlayacaktır.

3. Kaynaklar

Akiyama Y., Conner J.A., Goel S., Morishige D.T., Mullet J.E., Hanna W.W., Ozias-Akins P., 2004. High-resolution

- physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. *Plant Physiology*, 134(4), 1733-1741.
- Albertini E., Barcaccia G., Porceddu A., Sorbolini S., Falcinelli M., 2001a. Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties. *Molecular Breeding*, 7(4), 293-300.
- Albertini E., Porceddu A., Ferranti F., Reale L., Barcaccia G., Romano B., Falcinelli M., 2001b. Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. *Sexual Plant Reproduction*, 14(4), 213-217.
- Alleman M., Doctor J., 2000. Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Molecular Biology*, 43 (2-3), 147-161.
- Anton A.M., Connor H.E., 1995. Floral biology and reproduction in *Poa* (Poeae: Gramineae). *Australian Journal of Botany*, 43(6), 577-599.
- Barcaccia G., Mazzucato A., Albertini E., Zethof J., Gerats A., Pezzotti M., Falcinelli M., 1998. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1-2), 74-82.
- Bicknell R.A., Borst N.K., Koltunow A.M., 2000. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity*, 84(2), 228-237.
- Blakey C.A., Goldman S.L., Dewald C.L., 2001. Apomixis in *Tripsacum*: Comparative mapping of a multigenic phenomenon. *Genome*, 44(2), 222-230.
- Bonilla J.R., Quarin C.L., 1997. Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Science*, 127 (1), 97-104.
- Boutilier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L.M., Hattori J., Liu C.M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M., Campagne M.M.V., 2002. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 14(8), 1737-1749.
- Böcher T., 1951. Cytological and Embryological Studies in the Amphipomictic *Arabis holboellii* Complex. *Biologiske Skrifter*, 6, 1-58.
- Carman J.G., 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1), 51-94.
- Catanach A.S., Erasmuson S.K., Podivinsky E., Jordan B.R., Bicknell R., 2006. Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America, 103(49), 18650-18655.
- Chaudhury A.M., Koltunow A., Payne T., Luo M., Tucker M.R., Dennis E.S., Peacock W.J., 2001. Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 677-699.
- Chaudhury A.M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E.S., Peacock W.J., 1997. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 4223-4228.
- Chen L.Z., Miyazaki C., Kojima A., Saito A., Adachi T., 1999. Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology*, 154(1), 55-62.
- Conner J.A., Goel S., Gunawan G., Cordonnier-Pratt M.M., Johnson V.E., Liang C., Wang H., Pratt L.H., Mullet J.E., DeBarry J., Yang L., Bennetzen J.L., Klein P.E., Ozias-Akins P., 2008. Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiology*, 147(3), 1396-1411.
- Conner J.A., Gunawan G., Ozias-Akins P., 2013. Recombination within the apospory specific genomic region leads to the uncoupling of apomixis components in *Cenchrus ciliaris*. *Planta*, 238(1), 51-63.
- Crane C.F., Carman J.G., 1987. Mechanisms of Apomixis in *Elymus-Rectisetus* from Eastern Australia and New-Zealand. *American Journal of Botany*, 74(4), 477-496.
- Drews G.N., Lee D., Christensen G.A., 1998. Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell*, 10(1), 5-17.
- Garcia-Aguilar M., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D., 2010. Inactivation of a DNA Methylation Pathway in Maize Reproductive Organs Results in Apomixis-Like Phenotypes. *Plant Cell*, 22(10), 3249-3267.
- Grimanelli D., Garcia M., Kaszas E., Perotti E., Leblanc O., 2003. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *tripsacum*. *Genetics*, 165(3), 1521-1531.
- Grimanelli D., Hernandez M., Perotti E., Savidan Y., 1997. Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum* (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 10(5), 279-282.
- Grimanelli D., Leblanc O., Espinosa E., Perotti E., De Leon D.G., Savidan Y., 1998a. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity*, 80, 33-39.
- Grimanelli D., Leblanc O., Espinosa E., Perotti E., De Leon D.G., Savidan Y.,

- 1998b. Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity*, 80, 40-47.
- Grimanelli D., Leblanc O., Perotti E., Grossniklaus U., 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*, 17(10), 597-604.
- Grossniklaus U., Koltunow A., Campagne M.V., 1998a. A bright future for apomixis. *Trends in Plant Science*, 3 (11), 415-416.
- Grossniklaus U., Nogler G.A., van Dijk P.J., 2001a. How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell*, 13(7), 1491-1497.
- Grossniklaus U., Spillane C., Page D.R., Kohler C., 2001b. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(1), 21-27.
- Grossniklaus U., Vielle-Calzada J.P., Hoepfner M.A., Gagliano W.B., 1998b. Maternal control of embryogenesis by medea, a Polycomb group gene in Arabidopsis. *Science*, 280(5362), 446-450.
- Haig D., Westoby M., 1991. Genomic Imprinting in Endosperm - Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 333(1266), 1-13.
- Hand M.L., Koltunow A.M.G., 2014. The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation. *Genetics*, 197(2), 441-450.
- Hecht V., Vielle-Calzada J.P., Hartog M.V., Schmidt E.D.L., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S.C., 2001. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3), 803-816.
- Juranic M., Srilunchang K.O., Krohn N.G., Leljak-Levanic D., Sprunck S., Dresselhaus T., 2012. Germline-Specific MATH-BTB Substrate Adaptor MAB1 Regulates Spindle Length and Nuclei Identity in Maize. *Plant Cell*, 24 (12), 4974-4991.
- Kindiger B., Sokolov V., Dewald C., 1996. A comparison of apomictic reproduction in eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* (L) L) and maize-Tripsacum hybrids. *Genetica*, 97(1), 103-110.
- Kojima A., Nagato Y., 1992. Diplosporous Embryo-Sac Formation and the Degree of Diplospory in *Allium-Tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction*, 5(1), 72-78.
- Koltunow A.M., 1993. Apomixis - Embryo Sacs and Embryos Formed without

- Meiosis or Fertilization in Ovules. *Plant Cell*, 5(10), 1425-1437.
- Koltunow A.M., Bicknell R.A., Chaudhury A.M., 1995. Apomixis - Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. *Plant Physiology*, 108(4), 1345-1352.
- Koltunow A.M., Grossniklaus U., 2003. Apomixis: A developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 547-574.
- Koltunow A.M., Johnson S.D., Bicknell R.A., 1998. Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sexual Plant Reproduction*, 11(4), 213-230.
- Koltunow A.M., Johnson S.D., Bicknell R.A., 2000. Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. *Sexual Plant Reproduction*, 12(5), 253-266.
- Koltunow A.M.G., Johnson S.D., Rodrigues J.C.M., Okada T., Hu Y.K., Tsuchiya T., Wilson S., Fletcher P., Ito K., Suzuki G., Mukai Y., Fehrer J., Bicknell R.A., 2011. Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. *Plant Journal*, 66(5), 890-902.
- Kotani Y., Henderson S.T., Suzuki G., Johnson S.D., Okada T., Siddons H., Mukai Y., Koltunow A.M.G., 2014. The LOSS OF APOMEIOSIS (LOA) locus in *Hieracium praealtum* can function independently of the associated large-scale repetitive chromosomal structure. *New Phytologist*, 201(3), 973-981.
- Leblanc O., Armstead I., Pessino S., Ortiz J.P., Evans C., doValle C., Hayward M.D., 1997. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B-brizantha*, an apomictic tropical forage. *Plant Science*, 126(1), 49-58.
- Leblanc O., Grimanelli D., Gonzalezdeleon D., Savidan Y., 1995a. Detection of the Apomictic Mode of Reproduction in Maize-Tripsacum Hybrids Using Maize Rflp Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7-8), 1198-1203.
- Leblanc O., Grimanelli D., IslamFaridi N., Berthaud J., Savidan Y., 1996. Reproductive behavior in maize-Tripsacum polyhaploid plants: Implications for the transfer of apomixis into maize. *Journal of Heredity*, 87(2), 108-111.
- Leblanc O., Peel M.D., Carman J.G., Savidan Y., 1995b. Megasporogenesis and Megagametogenesis in Several *Tripsacum* Species (Poaceae). *American Journal of Botany*, 82(1), 57-63.
- Lutts S., Ndikumana J., Louant B.P., 1994. Male and Female Sporogenesis and Gametogenesis in Apomictic *Brachiaria-Brizantha*, *Brachiaria-Decumbens* and F1 Hybrids with Sexual Colchicine Induced Tetraploid

- Brachiaria-Ruziziensis. *Euphytica*, 78 (1-2), 19-25.
- Ma G.H., Huang X.L., Zhao N.X., Xu Q.S., 2004. Apospory in *Paspalum thunbergii*. *Australian Journal of Botany*, 52(1), 81-86.
- Marimuthu M.P.A., Jolivet S., Ravi M., Pereira L., Davda J.N., Cromer L., Wang L.L., Nogue F., Chan S.W.L., Siddiqi I., Mercier R., 2011. Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds. *Science*, 331(6019), 876-876.
- Marshall D.R., Brown A.H.D., 1981. The Evolution of Apomixis. *Heredity*, 47 (Aug), 1-15.
- Martinez E.J., Hopp H.E., Stein J., Ortiz J.P.A., Quarin C.L., 2003. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding*, 12(4), 319-327.
- Martinez E.J., Urbani M.H., Quarin C.L., Ortiz J.P.A., 2001. Inheritance of apospory in babliagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas*, 135(1), 19-25.
- Martonfi P., Brutovska R., Cellarova E., Repcak M., 1996. Apomixis and hybridity in *Hypericum perforatum*. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 31(3), 389-396.
- Matzk F., Hammer K., Schubert I., 2003. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. *Sexual Plant Reproduction*, 16(2), 51-58.
- Matzk F., Meister A., Brutovska R., Schubert I., 2001. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. *Plant Journal*, 26(3), 275-282.
- Matzk F., Meister A., Schubert I., 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal*, 21 (1), 97-108.
- Mieulet D., Jolivet S., Rivard M., Cromer L., Vernet A., Mayonove P., Pereira L., Droc G., Courtois B., Guiderdoni E., Mercier R., 2016. Turning rice meiosis into mitosis. *Cell Res.*
- Mogie M., 1988. A Model for the Evolution and Control of Generative Apomixis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 35(2), 127-153.
- Morgan R., Ozias-Akins P., Hanna W.W., 1998. Seed set in an apomictic BC3 pearl millet. *International Journal of Plant Sciences*, 159(1), 89-97.
- Naumova T., Dennijs A.P.M., Willemse M.T.M., 1993. Quantitative-Analysis of Aposporous Parthenogenesis in *Poa-Pratensis* Genotypes. *Acta Botanica Neerlandica*, 42(3), 299-312.
- Naumova T.N., 1997. Apomixis in tropical fodder crops: cytological and functional aspects. *Euphytica*, 96 (1), 93-99.

- Naumova T.N., Hayward M.D., Wagenvoort M., 1999. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sexual Plant Reproduction*, 12(1), 43-52.
- Naumova T.N., van der Laak J., Osadtchij J., Matzk F., Kravtchenko A., Bergervoet J., Ramulu K.S., Boutilier K., 2001. Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 14(4), 195-200.
- Naumova T.N., Willemse M.T.M., 1995. Ultrastructural Characterization of Apospory in *Panicum-Maximum*. *Sexual Plant Reproduction*, 8(4), 197-204.
- Ng J., Hart C.M., Morgan K., Simon J.A., 2000. A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Molecular and Cellular Biology*, 20(9), 3069-3078.
- Nogler G.A., 1995. Genetics of Apomixis in *Ranunculus-Auricomus* .6. Epilogue. *Botanica Helvetica*, 105(1), 111-115.
- Noyes R.D., 2005. Inheritance of apomeiosis (diplospory) in fleabanes (*Erigeron*, Asteraceae). *Heredity*, 94(2), 193-198.
- Noyes R.D., Allison J.R., 2005. Cytology, ovule development, and pollen quality in sexual *Erigeron strigosus* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 166(1), 49-59.
- Noyes R.D., Rieseberg L.H., 2000. Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics*, 155(1), 379-390.
- Oettler G., Burger H., Melchinger A.E., 2003. Heterosis and combining ability for grain yield and other agronomic traits in winter triticale. *Plant Breeding*, 122(4), 318-321.
- Ogawa D., Johnson S.D., Henderson S.T., Koltunow A.M.G., 2013. Genetic separation of autonomous endosperm formation (AutE) from the two other components of apomixis in *Hieracium*. *Plant Reprod*, 26(2), 113-123.
- Ohad N., Margossian L., Hsu Y.C., Williams C., Repetti P., Fischer R.L., 1996. A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5319-5324.
- Okada T., Hu Y.K., Tucker M.R., Taylor J.M., Johnson S.D., Spriggs A., Tsuchiya T., Oelkers K., Rodrigues J.C.M., Koltunow A.M.G., 2013. Enlarging Cells Initiating Apomixis in *Hieracium praealtum* Transition to an Embryo Sac Program prior to Entering Mitosis. *Plant Physiology*, 163(1), 216-231.
- Okada T., Ito K., Johnson S.D., Oelkers K., Suzuki G., Houben A., Mukai Y., Koltunow A.M., 2011. Chromosomes Carrying Meiotic Avoidance Loci in Three Apomictic Eudicot *Hieracium*

- Subgenus *Pilosella* Species Share Structural Features with Two Monocot Apomicts. *Plant Physiology*, 157(3), 1327-1341.
- Olmedo-Monfil V., Duran-Figueroa N., Arteaga-Vazquez M., Demesa-Arevalo E., Autran D., Grimanelli D., Slotkin R.K., Martienssen R.A., Vielle-Calzada J.P., 2010. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, 464(7288), 628-U200.
- Ozias-Akins P., Roche D., Hanna W.W., 1998. Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5127-5132.
- Peel M.D., Carman J.G., Liu Z.W., Wang R.R.C., 1997. Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus* (Nees in Lehm) A Love & Conner. *Crop Science*, 37(3), 717-723.
- Pessino S.C., Evans C., Ortiz J.P.A., Armstead I., Do Valle C.B., Hayward M.D., 1998. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas*, 128(2), 153-158.
- Pessino S.C., Ortiz J.P.A., Leblanc O., doValle C.B., Evans C., Hayward M.D., 1997. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(3-4), 439-444.
- Pfossor M., Amon A., Lelley T., Heberleborgs E., 1995. Evaluation of Sensitivity of Flow-Cytometry in Detecting Aneuploidy in Wheat Using Disomic and Ditelosomic Wheat-Rye Addition Lines. *Cytometry*, 21(4), 387-393.
- Plitmann U., 2002. Agamospermy is much more common than conceived: A hypothesis. *Israel Journal of Plant Sciences*, 50, 111-117.
- Pupilli F., Martinez E.J., Busti A., Calderini O., Quarin C.L., Arcioni S., 2004. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics*, 270(6), 539-548.
- Ravi M., Chan S.W.L., 2010. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, 464(7288), 615-U180.
- Ravi M., Marimuthu M.P.A., Siddiqi I., 2008. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature*, 451(7182), 1121-U1110.
- Rieseberg L.H., Noyes R.D., 1998. Genetic map-based studies of reticulate evolution in plants. *Trends in Plant Science*, 3(7), 254-259.
- Roche D., Cong P.S., Chen Z.B., Hanna W.W., Gustine D.L., Sherwood R.T., Ozias-

- Akins P., 1999. An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and Pennisetum squamulatum Fresen. *Plant Journal*, 19(2), 203-208.
- Roche D., Conner J.A., Budiman M.A., Frisch D., Wing R., Hanna W.W., Ozias-Akins P., 2002. Construction of BAC libraries from two apomictic grasses to study the microcolinearity of their apospory-specific genomic regions. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 804-812.
- Roy B.A., 1995. The Breeding Systems of 6 Species of Arabis (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 82(7), 869-877.
- Roy B.A., Rieseberg L.H., 1989. Evidence for Apomixis in Arabis. *Journal of Heredity*, 80(6), 506-508.
- Schallau A., Arzenton F., Johnston A.J., Hahnel U., Koszegi D., Blattner F.R., Altschmied L., Haberer G., Barcaccia G., Baumlein H., 2010. Identification and genetic analysis of the APOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. *Plant Journal*, 62(5), 773-784.
- Schneitz K., 1999. The molecular and genetic control of ovule development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(1), 13-17.
- Schneitz K., Hulskamp M., Kopczak S.D., Pruitt R.E., 1997. Dissection of sexual organ ontogenesis: A genetic analysis of ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124(7), 1367-1376.
- Schneitz K., Hulskamp M., Pruitt R.E., 1995. Wild-Type Ovule Development in *Arabidopsis-Thaliana* - a Light-Microscope Study of Cleared Whole-Mount Tissue. *Plant Journal*, 7(5), 731-749.
- Sezer F., Yuzbasioglu G., Ozbilen A., Taskin K.M., 2016. Genome-wide identification and expression analysis of SWI1 genes in *Boechera* species. *Comput Biol Chem*, 62, 75-81.
- Sharbel T.F., Mitchell-Olds T., 2001. Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabis holboellii* complex (Brassicaceae). *Heredity*, 87, 59-68.
- Sharbel T.F., Voigt M.-L., Corral J.M., Galla G., Kumlehn J., Klukas C., Schreiber F., Vogel H., Rotter B., 2010a. Apomictic and Sexual Ovules of *Boechera* Display Heterochronic Global Gene Expression Patterns. *Plant Cell*: tpc.109.072223.
- Sharbel T.F., Voigt M.L., Corral J.M., Galla G., Kumlehn J., Klukas C., Schreiber F., Vogel H., Rotter B., 2010b. Apomictic and Sexual Ovules of *Boechera* Display Heterochronic Global Gene Expression Patterns. *Plant Cell*, 22(3), 655-671.
- Sherwood R.T., Berg C.C., Young B.A., 1994. Inheritance of Apospory in Buffelgrass. *Crop Science*, 34(6), 1490-1494.
- Silveira E.D., Guimaraes L.A., Dusi D.M.D., da Silva F.R., Martins N.F., Costa M.M.D., Alves-Ferreira M., Carneiro V.T.D., 2012. Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria*

- brizantha reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. *Plant Cell Reports*, 31(2), 403-416.
- Sokolov V.A., Kindiger B., Khatypova I.V., 1998. Investigation of apomictic maize-Tripsacum hybrids. *Genetika*, 34(4), 492-498.
- Spielman M., Vinkenoog R., Scott R.J., 2003. Genetic mechanisms of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 358(1434), 1095-1103.
- Spillane C., Steimer A., Grossniklaus U., 2001. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. *Sexual Plant Reproduction*, 14(4), 179-187.
- Tas I.C.Q., Van Dijk P.J., 1999. Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). I. The inheritance of apomixis. *Heredity*, 83, 707-714.
- Taskin K.M., Turgut K., Scott R.J., 2004. Apomictic development in *Arabis gunnisoniana*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 52(2), 155-160.
- Taskin K.M., Turgut K., Scott R.J., 2009. Apomeiotic pollen mother cell development in the apomictic *Boechera* species. *Biologia Plantarum*, 53(3), 468-474.
- Taşkın K.M., Özbilen A., Sezer F., Hürkan K., Güneş Ş., 2017. Structure and expression of dna methyltransferase genes from apomictic and sexual *Boechera* species. *Comput Biol Chem*, 67, 15-21.
- Tucker M.R., Araujo A.C.G., Paech N.A., Hecht V., Schmidt E.D.L., Rossell J.B., de Vries S.C., Koltunow A.M.G., 2003. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *Plant Cell*, 15(7), 1524-1537.
- van Baarlen P., van Dijk P., Hoekstra R.F., de Jong J.H., 2000. Meiotic recombination in sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum officinale* L.). *Genome*, 43 (5), 827-835.
- van Dijk P.J., Bakx-Schotman J.M.T., 2004. Formation of unreduced megaspores (diplospory) in apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*, s.l) is controlled by a sex-specific dominant locus. *Genetics*, 166(1), 483-492.
- Van Dijk P.J., Tas I.C.Q., Falque M., Bakx-Schotman T., 1999. Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. *Heredity*, 83, 715-721.
- VielleCalzada J.P., Nuccio M.L., Budiman M.A., Thomas T.L., Burson B.L., Hussey M.A., Wing R.A., 1996. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L) Link. *Plant Molecular Biology*, 32(6), 1085-1092.
- Vinkenoog R., Bushell C., Spielman M., Adams S., Dickinson H.G., Scott R.J.,

2003. Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Molecular Biotechnology*, 25 (2), 149-184.
- Vinkenoog R., Scott R.J., 2001. Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem? *Sexual Plant Reproduction*, 14(4), 189-194.
- Vinkenoog R., Spielman M., Adams S., Fischer R.L., Dickinson H.G., Scott R.J., 2000. Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in *flie* mutants. *Plant Cell*, 12(11), 2271-2282.
- Young B.A., Sherwood R.T., Bashaw E.C., 1979. Cleared-Pistil and Thick-Sectioning Techniques for Detecting Aposporous Apomixis in Grasses. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique*, 57 (15), 1668-1672.