

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

FAKLI DOZLARDA UV-C RADYASYON IŞIĞINA MARUZ
BIRAKILAN BUĞDAY (*TRİTİCUM AESTIVUM*) BİTKİSİNİN
DNA METİLASYON SEVİYELERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ÖLÇÜLMESİ

Ümit AKGÜN

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2018
Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN danışmanlığında, Ümit AKGÜN tarafından hazırlanan bu çalışma 07/08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği (...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza:

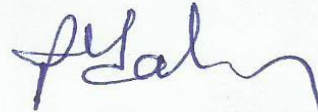
Üye : Doç. Dr. Arzu ALA GÖRMEZ

İmza:

Üye : Öğr. Üyesi Dr. Mehmet KUZUCU

İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 14 / 09 / 2018 tarih ve 32/11..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



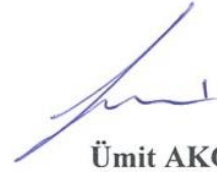
Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Faklı dozlarda UV-C radyasyon ışığına maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin DNA metilasyon seviyelerinin moleküler yöntemlerle ölçülmesi” isimli Yüksek Lisans tezini tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 06./09/2018



Ümit AKGÜN

ÖZET

Yüksek Lisans

FAKLI DOZLARDA UV-C RADYASYON IŞIĞINA MARUZ BIRAKILAN BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM*) BİTKİSİNİN DNA METİLASYON SEVİYELERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ÖLÇÜLMESİ

Ümit AKGÜN

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

UV-C stresine maruz bırakılan buğday'da (*Triticum aestivum*) meydana gelen DNA metilasyonu RAPD, CRED-RA ve IRAP teknikleri ile araştırılmıştır. RAPD, CRED-RA ve IRAP için toplam 27 primer kullanılmıştır. Kontrol grubu ile birlikte farklı dozlarda UV- C'ye maruz bırakılan örnekler 14 gün boyunca yetiştirilmiştir. Her 3 yöntem de uygulanan UV dozuna bağlı olarak % polimorfizm artarken, % GTS değerleri düşmüştür. UV radyasyon seviyesi arttıkça genomik kararsızlığın arttığı görülmüş ve bu stres faktörünün DNA hipermetilasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. RAPD, CRED-RA, IRAP profilleri DNA hasarı, mutasyon, metilasyon, kromozomal aberasyonlar, çift zincir kırıkları, modifikasyon, replikasyon, transkripsiyon ve oksidasyon hakkında nitel bilgi vermiştir.

2018, 50 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, CRED-RA, Epigenetik, IRAP, RAPD, Transpozon, UV Stresi

ABSTRACT

Master Thesis

DIFFERENT DOSES OF UV-C LIGHT RADIATION EXPOSED WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM*) PLANT MOLECULAR LEVEL MEASURING DNA METHYLATION BY METHODS

Ümit AKGÜN

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

DNA methylation in wheat (*Triticum aestivum*) exposed to UV-C stress was investigated by RAPD, CRED-RA and IRAP techniques. A total of 27 primers were used for RAPD, CRED-RA and IRAP. Specimens exposed to UV-C at different doses with the control group were grown for 14 days. In all 3 methods, the %polymorphism increased with the applied UV dose, but the %GTS values decreased. As the level of UV radiation increased, genomic instability increased and it was observed that this stress factor caused DNA hypermethylation. RAPD, CRED-RA, IRAP profiles have provided qualitative information about DNA damage, mutation, methylation, chromosomal aberrations, double chain breaks, modification, replication, transcription and oxidation.

2018, 50 Pages

Keywords: CRED-RA, Epigenetic, IRAP, RAPD, Transposon, UV Stress, Wheat

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deney kısmı Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Laboratuvarında ve Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Laboratuvarında gerçekleştirilmiőtir.

Çalıőmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aőamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danıőmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN'a derin minnet ve Őukranlarımı sunarım.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teőkükürler ederim.

Ümit AKGÜN

Ağustos, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Stres	5
2.1.1. Bitkilerdeki stres faktörleri	6
2.2. UV Radyasyon	9
2.3. Epigenetik.....	11
2.3.1. DNA metilasyonu	11
2.3.2. Transpozon	12
2.3.3. DNA metilasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal.....	16
3.1.2.Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	16
3.1.3. Kullanılan çözeltiler.....	16
3.2. Yöntem	18
3.2.1. UV-C radyasyonunun bitkiye uygulanması.....	18
3.2.2. DNA izolasyonu	20
3.2.3. RAPD.....	21
3.2.4. CRED-RA.....	22
3.2.5. IRAP	23
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi	24
3.2.7. RAPD, CRED-RA ve IRAP analizleri ile genomik kalıp sabitliğinin (% GTS) belirlenmesi.....	25
3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	26

5. SONUÇ ve TARTIŞMA	27
5.1.Sonuç	27
5.1.1.RAPD analizleri ve % GTS değerleri	27
5.1.2. CRED-RA analizleri ve % GTS değerleri	29
5.1.3. IRAP analizleri ve % GTS değerleri	32
5.2. Tartışma.....	33
6. ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
EKLER.....	50
EK-1 Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar	50
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Elektromanyetik ışık spektrumu ve UV bölgesi	10
Şekil 3.1. Ön çimlendirme safhası	19
Şekil 3.2. UV-C'ye belirlenen dozlarda maruz bırakılmış buğday grupları	19
Şekil 5.1. RAPD analizinde kullanılan OPBA-03 primerine ait jel görüntüsü.....	27
Şekil 5.2. CRED-RA analizinde kullanılan OPK-4 primerine ait jel görüntüsü.....	30
Şekil 5.3. CRED-RA analizinde kullanılan C-10 primerine ait jel görüntüsü.....	30
Şekil 5.4. IRAP analizinde kullanılan SUKULA primerine ait jel görüntüsü	32

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Triticum aestivum</i> L. sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2. Abiyotik ve biyotik stres faktörleri.....	6
Tablo 3.1. Kullanılan araç, gereçler ve markaları.....	16
Tablo 3.2. Uygulanan UV-C radyasyon doz seviyeleri.....	20
Tablo 3.3. RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.....	21
Tablo 3.4. RAPD-PCR çoğaltma öğeleri, konsantrasyon ve miktarları.....	21
Tablo 3.5. RAPD döngü protokolü.....	22
Tablo 3.6. CRED-RA analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.....	23
Tablo 3.7. IRAP analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.....	23
Tablo 3.8. IRAP-PCR çoğaltma öğeleri, konsantrasyon ve miktarları.....	23
Tablo 3.9. IRAP döngü protokolü.....	24
Tablo 5.1. UV-C uygulanması ile RAPD primerlerinde meydana gelen polimorfik bantların molekül ağırlıkları.....	28
Tablo 5.2. UV-C uygulanması ile CRED-RA primerlerinde meydana gelen polimorfik bantların molekül ağırlıkları.....	31
Tablo 5.3. UV-C uygulanması ile IRAP primerlerinde meydana gelen polimorfik bantların molekül ağırlıkları.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

w/v	Ağırlık/Hacim
%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
°	Derece
°C	Santigrat
²	Kare
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
bp	Baz çifti
C	Sitozin
Cd	Kadmiyum
CG	Sitozin guanin
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
G	Guanin
g	Gram
h	Yükseklik
H ₂ S	Hidrojen sülfür
HCl	Hidroklorik asit
Hg	Civa
J	Joule
kb	Kilo baz
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorit
ml	Mililitre
mM	Milimolar

N	Normal
N ₂ O	Azot monoksit
NaCl	Sodyum klorür
NaOCl	Sodyum hipoklorit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NO	Azot oksit
NO ₂	Azot dioksit
NpN	Nükleotit fosfo nükleotit
O	Oksijen
O ₃	Ozon
OD	Okuma değeri
P	Fosfat
ph	Hidrojenli gücü
sn	Saniye
SO ₂	Kükürt Dioksit
T	Timin
V	Volt
v/v	Hacim/Hacim
W	Watt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

5-MC	5-Metilsitozin
ABA	Absisik asit
BME	Beta merkptoetanol
BSA	Bovin serum albümin
CMT3	Sitozin metiltrasferaz 3
CpG	Sitozin fosfo guanin

CRED-RA	Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım
Ct	Eşik döngüsü
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
DRM2	DNA ribozom metil 2
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Et-Br	Etidium bromid
GTS	Genomik kalıp stabilitesi
HTFs	<i>Hpa II</i> fragmenti
IRAP	Güçlendirilmiş retrotranspozon amplifiye polimorfizm
ISSR	Basit dizi tekrarları arası bölgeler
LTR	Uzun terminal tekrar
MC	Metilsitozin
MET1	Metiltransferaz 1
MSAP	Metilasyona duyarlı amplifiye polimorfizm
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
Pvp	Polivinilpirolidon
RE	Restriksiyon enzimi
REMAP	Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizm
RFLP	Sınırlayıcı enzim parça uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SAH	S-adenosil metiyonin
SAM	S-Adenozil homosistein
SAMDC	S-adenosil metiyonin dekarboksilaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SSR	Basit dizi tekrarları
TBE	Tris-borat-EDTA tamponu
TE	Taranspoze edilebilir elementler

TE Buffer	Tris-EDTA tamponu
TIR	Ters tekrar dizileri
Tris-HCl	Tris hidroklorür



1. GİRİŞ

Canlılar yaşamları boyunca hayatsal fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için çevre ile etkileşim halindedirler. Bu etkileşim olumlu ya da olumsuz olabilmektedir. Canlıların maruz kaldığı olumsuz koşullar stres adı verilen kavramı ortaya çıkarmıştır. Stres, canlıların yapılarında morfolojik, fizyolojik, genotipik değişiklikler meydana getirmektedir. Bu değişiklikler canlıların büyüme ve gelişimini olumsuz etkilediği gibi canlıların ölümüne de neden olabilmektedir. Stresin neden olduğu zarar canlının türüne, yaşadığı çevreye ve maruz kalınan stresin derecesine bağlı olarak değişmektedir (Kadıoğlu, 2004; Madhova vd., 2005).

Canlılar stresin neden olduğu olumsuz etkileri gidermek için bir takım adaptasyonlar geçirmektedirler. Meydana gelen adaptasyonlar nesiller boyunca aktararak canlılığın devam etmesini sağlamaktadır (Ayhan, 2006).

Stresten en çok etkilenen canlı türlerinden birisi bitkilerdir. Bitkiler sessiz canlılar olduğu için yaşamları boyunca büyüme ve gelişmelerini etkileyecek birçok stres faktörüne direkt maruz kalmaktadırlar. Özellikle temel besin maddesi olarak kullanılan bitki türlerinin zarar görmesi hem bitkileri hemde bitkileri temel besin maddesi olarak kullanan canlıları olumsuz etkileyebilmektedir. Stres faktörleri bitki kaybının birincil neden olduğu gibi çoğu bitki veriminide %50'den fazla azaltabilmektedir (Bray vd., 2000).

Stres faktörleri üzerine yapılan araştırmalar neticesinde elde edilen istatistiksel verilere göre dünya üzerinde kullanılabilir alanların %26'sı kuraklık stresine, %20'si mineral stresine, %15'i ise soğuk ve don stresine, %29'luk dilimi diğer stres faktörlerine maruz kalırken, %10'luk dilimde herhangi bir stres faktörü olmadığı belirtilmektedir (Blum ve Jordan 1985; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkileri önemli bir araştırma konusu haline gelmekte ve bu alanda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. *Arabidopsis thaliana*'da kuraklık (Colaneri ve Jones 2013), tuz (Baek vd., 2011), sıcaklık (Pecinka vd., 2010), oksidatif stres (O'Kane vd., 1996); tütünde kuraklık (Rizhsky vd., 2002); ayçiçeği (Almoguera vd., 1993) ve domateste su stresi (Godoy vd., 1990); mısır (Çelik ve

Eraslan, 2015) ve biberde tuz stresi (Tuna ve Eroğlu, 2017); pirinçte kuraklık (Rahımı vd., 2017); buğdayda sıcaklık (Tekdal ve Yıldırım, 2015) ve tuz (Tıprıdamaz ve Çakırlar, 1990) gibi stres faktörleri bu çalışmalara örnek teşkil edebilmektedir.

Ozon tabakası, dünyayı çevreleyerek yeryüzünü canlılar için yaşanır hale getirmektedir. İnsan aktiviteleri sonucunda çeşitli kimyasallar atmosfere salınarak doğal havanın yapısında değişimler meydana getirebilmektedir. Bu değişimler doğal dengeyi olumsuz etkileyebilmekte ve ozon tabakasına zarar verebilmektedir. Küresel ısınmanın artmasıyla birlikte ozon tabakasında filtrelenerek dünyaya gelmesi engellenen zararlı güneş ışınları yeryüzüne ulaşmakta ve ekosistem zarar görmektedir (Akın, 2006).

Bitkiler, büyüme, gelişme ve hormonal aktivasyon için UV'ye ihtiyaç duymakta ancak ihtiyaçlarından fazla UV'ye maruz kaldıklarında ise strese girmektedirler. Strese maruz kalan bitkilerde nükleik asit, protein ve lipid yapıları doğrudan etkilenmektedir. Bu durum DNA hasarına neden olmakta, ayrıca replikasyon, transkripsiyon ve translasyonda engelleyebilmektedir (Ries vd., 2000). Fizyolojik olarak UV bitkilerin fotosentez hızını yavaşlatmakta, klorofil miktarı ve yaprak sayısında azalmaya neden olmaktadır. Aynı zamanda topraktaki mikroorganizmaları yok ederek toprağın verimsizleşmesine neden olmaktadır (Ekici ve Aksoy, 2001). UV radyasyonun neden olduğu stres, bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkilere neden olduğundan bitkiler strese cevap niteliğinde adaptasyon mekanizmaları geliştirebilmektedirler (Alexieva vd., 2001).

Dünya üzerinde hızla artan nüfusa dayalı olarak besin ihtiyacında önemli oranda artmaktadır (Hoisington vd., 2002). Bu yüzden besin olarak kullanılan bitkileri ıslahı, nesillerin devamlılığı, az alandan çok verim alabilme, toprak verimliliği, epigenetik, stres faktörleri, stresin neden olduğu zararları ortadan kaldırma veya azaltma gibi çalışmaların önemi giderek artmaktadır.

İnsanlar günlük ihtiyaç duydukları kaloringin büyük bir kısmını tahıllardan karşılamaktadırlar. Tahıl ekim alanları hem Dünya hemde Türkiye'de tarım alanlarının yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Gerek coğrafi özellikleri, gerekse iklim özellikleri itibariyle çok zengin bir tarımsal ürün çeşitliliğine sahip olan ülkemizde üretilen tarımsal ürünlerin büyük bir kısmını tahıllar oluşturmaktadır. Buğday ilk çağlardan

günümüze kadar gelmiş en önemli tahıl ürünlerden biridir. Buğday tohumunun besin değerinin yüksek olması, üretim kolaylığı, taşınımı ve geniş adaptasyon yeteneğine sahip olmasından dolayı günümüzde temel besin kaynağı durumundadır. Geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olmasına rağmen fazla sıcak ve nemden hoşlanmayan bir tahıl bitkisidir.

Dünya'daki buğday üretimi iklim koşullarına bağlı olarak yıldan yıla önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların meydana gelmesine neden olan unsurlar arasında bitkinin genetik yapısı, iklim koşulları, toprak yapısı, topraktaki azot miktarı, topraktaki azotun kullanılabilirliği ve uygulanan yetiştirme teknikleri büyük rol oynamaktadır. 2016 yılı verilerine göre Dünya buğday ekim alanı 220,107 milyon hektar, üretimi ise 749,460 milyon tondur. Türkiye'nin buğday üretim alanı yaklaşık olarak 7,609 milyon hektar, üretim miktarı ise 20 milyon ton olup Dünya'da buğday üretimi bakımından ilk on ülke içerisinde yer almaktadır (FAOSTAT, 2016). Ancak, potansiyel verim ülkemizde oldukça düşüktür. Verimin istenilen düzeye çıkması için bitkilerin ıslah çalışmalarının yapılması ve çevresel faktörlerin iyileştirilmesi gerekmektedir. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte, moleküler genetik, doku kültürü ve rekombinant DNA teknolojisi gibi konuları kapsayan teknikler ile yeni olanaklar sağlanmaktadır (Özgen vd., 2000).

Epigenetik, çevre ile genetik arası etkileşimdir. Genetik yapıda değişiklik meydana gelmemektedir fakat gen ifadesinde değişimler görülmektedir. Bu değişiklik geri dönüşümlü olup DNA dizisinde meydana gelen mutasyonlardan farklı bir özellik göstermektedir. DNA metilasyonu, ökaryotların genom düzenlenmesi ve gelişiminde önemli rol oynayan epigenetiksel bir modifikasyondur. Bu durum gen ekspresyonu ve transpozon aktivitesini etkileyebilmektedir. DNA metilasyonu ile transpoze edilebilir elementlerin (TE) susturulması, bitki genom stabilitesi için önem arz etmektedir (Chandler ve Walbot, 1986).

Günümüzde yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda bitkilerin maruz kaldıkları stres faktörleri sonucunda epigenetik değişikliklerin meydana geldiği bilinmektedir. (Kravets vd., 2010; Hauser vd., 2011; Bilichak vd., 2012).

DNA metilasyonu, ökaryotlarda CpG dizilerinde görülmektedir. CpG dinükleotidinin sitozinin 5. karbonuna metil grubu kovalent bağla eklenmesi sonucu DNA metilasyonu meydana gelmektedir. DNA metilasyon seviyesi evrendeki tüm canlılarda farklılık göstermektedir. Özellikle bitkilerde DNA metilasyonu insan ve hayvanlara göre daha fazla görülmektedir. İnsan ve hayvanlarda CpG bölgelerinin sıklığı çok az ve metillenmeler nokta mutasyonu şeklinde oluşmaktadır. Bitkilerde ise CpG bölge sıklığının fazlalığı ve CpG bölgelerinin arasındaki fosfat bağlarının diğer canlılara göre daha uzun olması DNA metilasyonunun uzun bir baz dizisi boyunca oluşmasına neden olmaktadır (Tan, 2010).

Ayrıca strese maruz kalan bitki popülasyonlarında strese bağlı olarak oluşan epigenetiksel değişimlerin ve stres koşullarına uyum sağlamak için oluşturulan adaptasyon mekanizmalarının bitkilerde stres hafızası oluşturduğu ve bunu nesilden nesile aktardığı bilinmektedir (Golldack vd., 2011).

Stres faktörlerine yanıt olarak DNA metilasyonunda hiper ve hipometilasyon da dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinde strese duyarlı genlerde DNA metilasyon seviyelerinde değişiklikler tespit edilmiştir. Buğdayda tuz (Zhong vd., 2009), UV-C stresi (Sokolova vd., 2014); tütünde oksidatif (Choi vd., 2007) ve kuraklık stresi (Kovarik vd.,1997); mısırdaki UV-C (Kravets vd., 2012) ve düşük sıcaklık stresi (Steward vd., 2010); yonca ve kenevirde ağır metal (Aina vd., 2004) stresinin DNA metilasyonuna etkileri hakkında araştırmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada, farklı dozlarda UV-C radyasyonuna maruz kalan buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinde gözlenen genetik ve epigenetik değişikliklerin RAPD, CRED-RA ve IRAP moleküler yöntemleri ile araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Buğday (*Triticum aestivum L.*) buğdaygiller (*Poaceae*) familyasından gelen tek yıllık, karasal iklimde yaşayan bir bitki türüdür. Tablo 2.1.'de *Triticum aestivum L.* sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 2.1. *Triticum aestivum L.* sınıflandırılması

Alem	Plantae
Şube	Tracheophyta
Sınıf	Liliopsida
Takım	Poales
Familya	Poaceae (Buğdaygiller)
Alt familya	Poaideae
Cins	<i>Triticum</i>
Tür	<i>Triticum aestivum L.</i>

Buğday, insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında dünyada üretim miktarı bakımından ilk sırada yer almaktadır. Buğday, Dünya nüfusuna bitkisel kaynaklı besinlerden sağlanan toplam kalorinin yaklaşık %20'sini, ülkemizde ise %53'ünü sağlamaktadır. Buğday hem çiftçiler hem de sanayiciler için önemlidir. Başta unlu mamuller olmak üzere birçok gıda ve sanayi sektöründe kullanılmaktadır. TÜİK (2016) verilerine göre ülkemizde ortalama buğday üretim miktarı 20 milyon tonun üzerindedir.

Dünya nüfusunun gün geçtikçe artması, toprak erozyonu, tuzluluk, asitlik, yoğun tarım uygulamaları, sanayileşme gibi nedenler tarım alanlarının daralmasına neden olmaktadır. Artışa bağlı olarak ürün talebinin artması da birçok sorunu beraberinde getirmektedir.

2.1. Stres

Stres, bir canlının yaşamını tehlikeye sokan, kapasite azaltıcı ve zorlayıcı olarak değerlendirilen canlı ile çevre arasındaki olumsuz etkileşim olarak tanımlanmaktadır. Stresin meydana gelmesi için canlının içinde bulunduğu ya da yaşamını sürdürdüğü ortam ve çevrede meydana gelen değişimlerin canlıyı belli düzeyde etkilemesi gerekmektedir. Birçok canlıda stres yanıtları, stres etkenlerine karşı koymak ve onunla başa çıkmaya çalışmak amacıyla doku ve organ fonksiyonlarında değişimlerle

başlamakta ve homeostasis bozulması ile sonlanmaktadır. Sözü edilen bu değişimler organizmadan organizmaya değişiklik gösteren ama benzer karakteristiğe sahip fizyolojik yanıtlardır (Dönmez vd., 2006). Stres faktörleri Tablo 2.1.'de gösterilmektedir (Levitt, 1972).

Tablo 2.1. Abiyotik ve biyotik stres faktörleri

Abiyotik stres faktörleri		Biyotik stres faktörleri
Don stresi	Ağır metal stresi	Böcekler
Su stresi (kuraklık stresi)	Hava kirliliği stresi	Hayvanlar
Su taşkını stresi	Oksidatif stres	Hastalık yapıcı bitkiler
Sıcaklık stresi		Mikroorganizmalar
Soğuk stresi		Patojenler
Radyasyon stresi		
Işık stresi		
Tuzluluk stresi		

2.1.1. Bitkilerdeki stres faktörleri

2.1.1.1. Su stresi (Kuraklık stresi)

Bitkilerde belirli bir süre içerisinde terlemeyle kaybedilen suyun çevreden alınan su miktarından fazlası durumunda ortaya çıkmaktadır. Su miktarının azalmasıyla beraber dokular arasında suyun alınması için rekabet başlar. Stres günlük ya da uzun süreli olabilmektedir. Stres durumunda turgor basıncının düşmesi nedeniyle hücre büyümesi olumsuz olarak etkilendiğinden hücrelerdeki büyüme kapasitesi azalmakta ve çeper sentezi etkilenmektedir. Su stresi ayrıca tuz ve osmotik stresin de bir parçası olmaktadır. Yeterli miktarda suyun olmaması ksilem ve floemdeki madde iletimini olumsuz olarak etkilediğinden meyvelerin küçük kalmasına, tahıllarda ise tohumların dolgunlaşamamasına ve ürün kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Korkmaz, 2017).

2.1.1.2. Tuz stresi

Tuz stresi, osmotik etkisiyle kullanılabilir suyu engelleyerek iyon içeriğini toksik düzeye ulaşmasına neden olan abiyotik bir stres faktörüdür. Tuz stresinin etkileri, tuzun çeşidine, stresin düzeyine, süresine, strese maruz kalan bitkinin genotipine ve gelişim evresine bağlı olarak değişmektedir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

2.1.1.3. Sıcaklık stresi

Bitkiler farklı gelişme kademelerine göre minimum, optimum ve maksimum sıcaklık gereksinimlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Bunlara kardinal sınırlar denmektedir. Sıcaklık bu alt ve üst limitlere ulaştığında gelişme azalmakta ve bu limitler dışında daha fazla gelişme görülmemektedir (Öztürk ve Seçmen, 1992). Bitkilerin çoğu 15-45°C arasında optimum seviyede gelişme göstermektedirler. Bu sınırın altında ve üstünde ise belirli seviyelerde bitkilerin büyümeleri, metabolizmaları, ürünlerin kalite ve miktarı olumsuz şekilde etkilenmektedir. Yüksek sıcaklık proteinlerin denatürasyonu ve enzim aktivitesinin kaybetmeleriyle hücre yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler meydana gelmektedir (Korkmaz ve Duman, 2017).

2.1.1.4. Soğuk stresi

Tropik ve yarı tropikde bitkiler sıcaklığın 15°C'ın altına düşmesiyle soğuk stresi görülmektedir. Soğuk iklim bitkileri ise bu sıcaklıklara kolaylıkla adapte olurlar ve gelişimlerini sürdürürler. Soğuk stresinde meydana gelen zarar soğukun şiddetinin yanısıra soğukta kalma süresine ve ortam sıcaklığının soğuktan sığa dönüşmesindeki süreye de bağlı bulunmaktadır (Chinnusamy vd., 2007).

2.1.1.5. Don stresi

Sıcaklığın 0°C'ın altına düşmesiyle birlikte oluşan hücre suyunun donmasından kaynaklanmaktadır. Don stresi tüm hayati fonksiyonları etkilemektedir.

2.1.1.6. Işık stresi

Güneş ışığı fotosentezi etkilemesinin yanısıra bitki sıcaklığı, ışığa bağlı tepkimeleri etkileyecek ve strese neden olmaktadır. Oluşan stres güneş enerjisinin miktarı, havadaki tozlar, kirlilik, bulutlanma durumu, enlem ve boylam derecelerine göre değişiklik göstermektedir.

2.1.1.7. Su Taşkın (Fazla su) stresi

Su azlığında olduğu gibi su fazlalığında da bitkilerde stres görülmektedir. Nehir, ırmak ve derelerin taşması ya da aşırı yağışlar sonucu suyu alt tabakalara geçiremeyen topraklar geçici olarak suyla kaplanmaktadır. Bu durumda ise toprağa oksijen giremediğinden solunum, fotosentez yapamadıklarından bitki gelişimi etkilenir ve ürün kayıpları görülmektedir.

2.1.1.8. Oksidatif stres

Bitkiler enerji üretebilmeleri için oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Fakat oksijen varlığı hücresel yapı ve reaksiyonları sürekli oksidatif bir tehdit oluşturmaktadır (Alscher vd., 1997). Bitki hücrelerinde oksijenin suya tam olarak indirgenmemesi gerekli enerjinin açığa çıkmasını sağlarken oksijenin tam olarak indirgenmemesi ise oldukça reaktif olan DNA, proteinler ve lipidler gibi birçok makromoleküle zarar veren aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Dat vd., 2000). Buda bitkilerde strese neden olmaktadır.

2.1.1.9. Hava Kirliliği stresi

Atmosfere karışarak kirliliğe neden olan stres faktörüdür. Özellikle fabrikalardan çıkan zehirli atıklar ve hava kirletici gazlar atmosfere salınımı sonucu yağmurlar aracılığı ile yeryüzüne inmekte ve bitkiler üzerinde strese neden olabilmektedir. Bitkilere zarar veren başlıca kirleticiler; SO₂, N₂O, NO, NO₂, O₃, H₂S'dir.

2.1.1.10. Ağır metal stresi

Çinko, kurşun, nikel, kobalt, krom, bakır, mangan, kadmiyum, selenyum, arsenik ve alüminyum gibi ağır metaller belirli bir dozun üstünde olması durumunda bitkilerde strese neden olabilmektedir. Ağır metaller enzimleri inhibe ederek çalışmalarını engelleyebilmektedir. Solunum ve fotosentez üzerinde ise olumsuz etkileri bulunmaktadır.

2.1.1.11. Radyasyon stresi

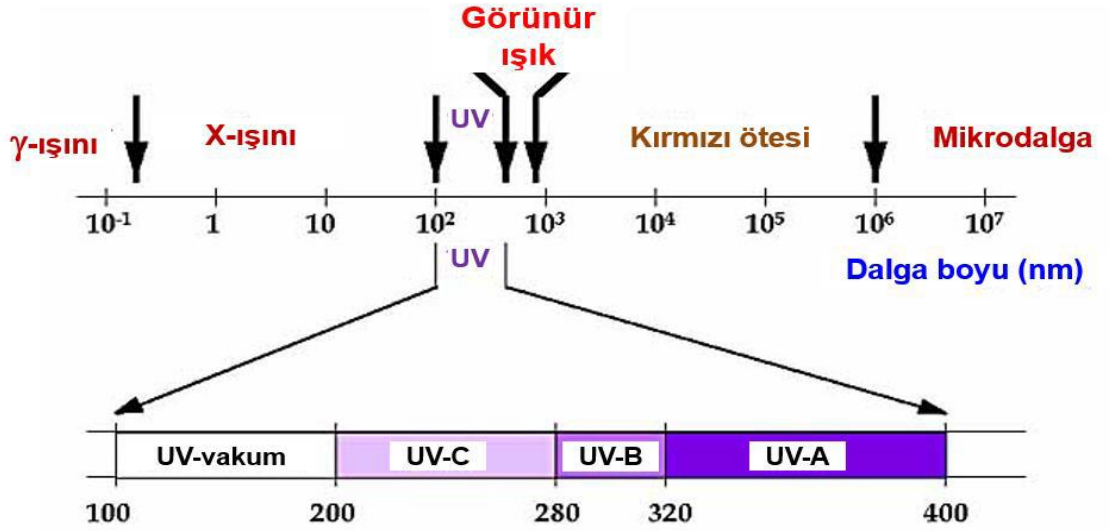
Güneş ışınlarının yeryüzüne yaydığı radyasyon dalga boylarına göre UV (100-400nm), görünür (390-750nm) ve kızılötesi (750-106nm) ışınlar olarak 3 bölüme ayrılmaktadır (Molinier, 2017) .

Radyasyonun atom düzeyindeki etkisi elektronların bir üst yörüngeye geçmesi şeklinde oluşur. Radyasyonun gücüne göre elektron ya üst yörüngeye geçer ya da elektronun geriye salınımı ile iyonize olur. Bu geçişlerin büyük çoğunluğu suda gerçekleştiğinden serbest elektron direkt ya da indirek olarak hücrede çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Serbest kalan elektronun direkt olarak etkisi DNA'nın fosfodiester bağlarında ya da H bağlarında görülür ve bu bağlardaki atomlara afinite göstererek bağların kırılmasına sebep olmaktadır. Özellikle fosfodiester bağlarının kırılması DNA'daki tek ya da çift zincir kırıklarına neden olmaktadır. İndirek etkileride serbest kalan elektronun hücredeki su ile etkileşime girerek suyun radyolizisine neden olmaktadır (Caspari, 2000).

2.2. UV Radyasyon

UV radyasyonu, toplam güneş radyasyonunun yaklaşık %8-9'unu oluşturan elektromanyetik spektrumun iyonize olmayan bölgesinin bir parçasıdır (Coohill, 1989; Frederick, 1993). UV ışınları elektromanyetik spektrumda X-Ray cihazı ile görüntülenmektedir ve dalga boyları 100-400 nm aralığındadır.

Dalga boyuna göre UV-A, UV-B ve UV-C olmak üzere 3 bölüme ayrılmaktadır. Şekil 2.1.'de elektromanyetik ışık spektrumu ve UV bölgeleri gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Elektromanyetik ışık spektrumu ve UV bölgesi

UV-A, 315–400 nm arasında dalga boyuna sahip olan UV radyasyondur. Ozon tabakası, 280 nm'den daha kısa dalga boylu UV ışınlarının çoğunu filtrelemektedir. Bu nedenle, UV-A ışını ozon konsantrasyonundaki değişikliklerden neredeyse hiç etkilenmez. Toplam UV radyasyonunun %95'ini oluşturmaktadır. UV-A ozon tabakasından geçerek dünyamıza kadar ulaşmaktadır.

UV-B, 280-315 nm arasında dalga boyuna sahip olan UV radyasyonudur (Molinier, 2017). Toplam UV radyasyonunun %5'ini oluşturmaktadır. UV-B radyasyon bitkilerin, genetik (Agrawal vd., 2009), fotosentez (Majer ve Hideg, 2012) ve membran lipid yapılarını etkilemektedir (An vd., 2000).

UV-C, 280 nm'den daha az dalga boyuna sahip olan UV radyasyonudur. UV radyasyonunun en tehlikeli kısmı oluşturmaktadır. UV-C'nin büyük kısmı ozon ve oksijen tarafından emilmektedir. Ozon düzeyindeki azalma, ozon antagonistleri olarak işlev gören kloroflorokarbonlar ve azot oksitlerin salınması gibi insan faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır (Anderson vd., 1991; McFarland ve Kaye, 1992). Ozondaki her azalma, biyolojik olarak etkili UV ışınımında aynı zamanda UV-C radyasyonunda büyük miktarda artışa neden olabilmektedir (Madronich, 1992a, 1993).

UV'nin bitkiler üzerindeki biyolojik etkileri arasında büyüme tepkilerinde değişiklik, üreme bozuklukları, epigenetik varyasyonlar, biyotik faktörlere duyarlılık, erken

yaşlanma, fotosentetik elemanlara zarar verilmesi ve membran yapılarında değişikliğe uğramış yapıların oluşumuna neden olabilmektedir (Ashwin ve Schroeder, 2011).

UV'nin, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağ yapılarında hasara neden olduğu ve transpoze elemanları harekete geçirebildiği tespit edilmiştir (Morales vd., 2003; Cadet ve Wagner, 2013). UV sonucu oluşan DNA hasarı, hücre döngüsünün durmasına ve hücre ölümüne neden olan hücresel tepkileri tetiklemektedir (Batista vd., 2009). UV, mısır (Casati, 2004, 2011a), fasulye (Casati vd., 2000), arpa (Kravets vd., 2012), kabak (Shinkle vd., 2010), asma (Martinez-Luscher vd., 2014) gibi ekin bitkilerinde araştırılmış ve mahsul verimini olumsuz etkilediği gözlenmiştir (Migicovsky ve Kovalchuk, 2014).

2.3. Epigenetik

Conrad Waddington tarafından 1942'de önerilen "Epigenetik" terimi günümüzde DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen, kromatin yapıdaki kalıtsal değişiklikler ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi olarak tanımlanmaktadır. (Waddington, 1942). Epigenetik değişimler bazı genlerin aktifleşmesine veya inaktifleşmesine neden olmaktadır. Epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşlarından dolayı diğer genetiksel mekanizmalardan ayrılmaktadırlar. Epigenetik mekanizmalar, histon modifikasyonu, kromatinlerin yeniden düzenlenmesi ve DNA metilasyonu olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Bilimsel alanda en fazla çalışma yapılan mekanizma ise DNA metilasyonudur.

2.3.1. DNA metilasyonu

DNA bazlarına metil gruplarının eklenmesi ya da bu bazların metil gruplarının çıkarılması sonucu gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan kimyasal bir değişikliktir (Kass vd., 1997). Ökaryotik organizmaların replikasyon sırasında DNA'sı metil gruplarının enzimler aracılığıyla bazlara eklenmesi sonucu değişmektedir. Metillenme ise DNA'nın CpG bölgelerindeki sitozinlerinde tek veya iki zincirinde meydana gelmektedir. Metilasyon DNA zincirindeki guanin bazlarının önünde bulunan sitozin bazlarının 5. bölgesinde bulunan karbona metil grubu eklenmesi ile oluşur bu bölgede hipermetilasyon oluşur. Gen ifadesini başlatan bölge yani promotor bölgesinde

ise CpG etkileyerek gen aktivasyonunu durdurur. CpG adacıkları olarak adlandırılan CpG bölgeleri promotor bölgeleri olarak görev yaparlar. Ayrıca replikasyonu başlatıcı bölgeler oldukları düşünülmektedir (Delgado vd., 1998).

Yüksek yapılı bitki genomlarının CpNpG trinükleotid veya CpG dinükleotidlerinde yaklaşık olarak %90'ı metillenmiş olan bölgelerinin sitozinlerinin sadece %20-50'si metillenmiştir (Yong vd., 2008).

Bitkilerde bulunan DNA metiltransferaz enzimleri DRM2, MET1 ve CMT3'dür. DRM2 ve MET1 memelilerdede bulunsada CMT3 sadece bitkilerde bulunur. DNA metiltransferazlar iki kısma ayrılmaktadır. Bunlar;

- **De-novo:** DNA'ya yeni metil grupları eklemektedir. De-novo DNA metiltransferaz olan tek enzim DRM2'dir.
- **Sürdürücü:** DNA zincir sentezi sırasında kalıp DNA'da bulunan metil gruplarını tanıyıp sentez ipliklerine aynı konumlarına metil grupları ekleyen enzimlerdir.

2.3.2. Transpozon

Transpozon ilk kez 1940'lı yılların ortalarında genetikçi Barbara McClintock tarafından mısır tanesi pigmentasyonu için gerekli olan genleri inversiyon yaparak inaktive edici olarak tespit edilmiştir (Fedoroff vd., 1998). İlerleyen çalışmalarda transpozonların ökaryot organizmalarda varlığı tespit edilmiş ve genom yapısı için önemli bir öge olduğu gözlenmiştir (Alzohairy vd., 2014; Bennetzen ve Wang, 2014; Grandbastien, 2015).

Transpozonlar, canlı genomunda kendilerini bir yerden başka bir yere transfer etme yeteneğine (transpozisyon) sahip olan DNA dizileridir. Transpozisyon mekanizmaları sayesinde transpozonlar buldukları genoma akışkanlık kazandırdıklarından genomik varyasyon olarak adlandırılmaktadırlar (Schulman, 2013). Transpozonlar aktif hareketlerinden dolayı canlı genomunda inversiyon, delesyon, duplikasyon gibi kromozom aberasyonları uyarılabilmekte ve yeni gen dizileri oluşturabilmektedir (Fedoroff, 2001; Feschotte vd., 2002). Yapılan çalışmalar sonucunda transpozonların gen fonksiyonu, yapısı, aktivitesini değiştirdiği ve genom yapısında ciddi değişimlere

neden olduğu tespit edilmiştir (Bennetzen, 2000; Federoff, 2000; Wicker vd., 2007). Bu nedenle transpozonların evrimsel süreçte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Transpozonlar kullandıkları transpozisyon biçimlerine göre retrotranspozonlar ve DNA transpozonları olarak 2 gruba ayrılmaktadırlar.

Retrotranspozonlar sınıf I transpozonlar olarak adlandırılmaktadırlar. Retrotranspozonlar, materyal olarak RNA'yı kullanılmaktadırlar ve çoğunlukla sessizdirler. Ancak stres koşulları altında aktif olmaya zorlanırlar. Retrotranspozonların transkripsiyonel düzeylerinin bitkilerde farklı stres koşulları altında arttığı rapor edilmiştir (Hirochika vd., 1996; Takeda vd., 1999; Grandbastien, 20015).

Retrotranspozonların yapısında uzun tekrar dizileri (LTR) bulunmaktadır. LTR retrotranspozonlara özgüdür ve bitişik bölgelerin çoğaltılması için genetik analizlerde LTR primerleri kullanılmaktadır. LTR ve TIR (Ters tekrar dizileri) dizileri transpozisyonunda önemli işleve sahiptirler (Voytas ve Boeke, 2002).

DNA transpozonları sınıf II transpozonlar olarak adlandırılmaktadırlar. Genomda yer değiştirme yeteneğine sahip olduklarından kendilerini buldukları kromozomdan keserek hedef gen bölgesini inversiyon yapabilmektedirler. Bu kes yapıştır mekanizmasından dolayı genom yapısında değişime neden olmaktadır. Bunun sonucunda gen ifadesinde meydana gelen değişim transkripsiyon, translasyon ve oluşan protein ürünlerindeki etkilemektedir (Wicker vd., 2007; Huang vd., 2009).

2.3.3. DNA metilasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler

2.3.3.1. Southern blot

Southern blot tekniği DNA metilasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde göre genomik DNA'da dizilim için spesifik olan metilasyona duyarlı ve duyarsız endonükleazlar kullanılmaktadır. Restriksiyon fragmentleri agaroz jelde izole edilerek membrana aktarılmakta ve hedef DNA dizisine spesifik olan bir prob yardımıyla hibridize edilmektedir. Otoradyografi ile tahmin edilen bant büyüklükleri böylelikle ortaya çıkarılmaktadır (Dubeau vd., 1986).

2.3.3.2. Bisülfıt DNA dizisi

Bisülfıt DNA dizisi analizi ilk olarak Frommer ve arkadaşları tarafından 1992’de tanımlanmıştır (Frommer vd., 1992). Bu teknik DNA’ da bulunan 5-metilsitozinleri tespit etmektedir. Metodun temelinde tek iplikçikli DNA’nın bütün sitozinlerindeki sodyum bisülfıtlerin urasile deamine olmasına dayanmaktadır. Deaminasyon sırasında 5-metilsitozinler değışmemektedir. Modifikasyona uğramış DNA’lar spesifik olan bir primer seti PCR ile amplifiyeye edilmektedir. Amplifikasyondan sonra tüm urasiller timin olarak amplifiye olurken yalnızca 5-metilsitozinler sitozin olarak kalmaktadır. Amplifiye olmuş fragmentlere direkt olarak ya da replikasyondan sonra dizi analizi yapılabilmektedir.

2.3.3.3. MSP (Methylation-sensitive amplified polymorphism / metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi)

MSP 1996’da Herman ve arkadaşları tarafından bulunan bir tekniktir (Herman, 1996). Bu yöntemde bisülfıt muamelesi sonrasında metillenmiş ve metillenmemiş DNA bölgeleri arasındaki bulunan sekans farklılıkları kullanılmaktadır. Sitozinler urasile deamine olmakta ve deamine urasiller PCR esnasında replikasyon aracılığıyla timine dönüşmektedirler. Amplifiye olmuş DNA’da metillenmemiş veya metillenmiş sekanslarına spesifik olan primer çiftleri elde edilmektedirler (Herman vd., 1996). MSP, DNA’nın belirlenmiş bir bölgesinde bulunan metilasyon varlığını analizini hızlı bir şekilde tespit etmektedir. MSP’da kullanılan primerler dikkatli seçilmelidir. Çünkü hem metillenmiş hem de metillenmemiş bölgelerin primerlerinde yanlış bir sonuç elde edilebilmekte ve bu yüzden sonuçların değerlendirmesi güçleşebilmektedir.

2.3.3.4. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion and random amplification / çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım)

Epigenetik varyasyonların temel sebeplerinden biri olan DNA metilasyonunu belirleyen bir metottur. Metilasyona duyarlı enzimler ile DNA kesildikten sonra gelişimin farklı aşamalarında veya farklı dokular arasındaki metilasyon değışikliklerini belirlemekte kullanılmaktadır. Bu teknik, diziler ve türler arasındaki varyasyon çalışmaları içinde kullanışlı olabilmektedir. Genom metilasyonu, *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri

kullanılarak analiz edilmektedir. Her iki enzimde CCGG sekansını tanır. Fakat *Hpa II* yalnızca sitozinler metillenmediğinde aktifken. *MspI* ise sitozin metillendiğinde DNA'ya eklenememektedir. DNA, RAPD yöntemi ile PCR'da çoğaltılmaktadır. Sonra restriksiyon enzimleriyle DNA kesilmekte ve tekrar PCR'da çoğaltılarak değerlendirilmeler yapılmaktadır (Bolukbasi ve Aras, 2016).

2.3.3.5. Metilasyona duyarlı tek nükleotid primer ekleme

Gonzalگو ve Jones (1997) tarafından spesifik CpG bölgelerindeki metilasyon düzey farklılığının miktarlarını ölçmek için geliştirdiği bir metottur. DNA'nın bisülfite uygulaması ve hedef sekansın spesifik primerlerle amplifikasyonundan sonra amplifiye olmuş DNA'da metilasyona duyarlı tek nükleotid, primer ekleme kalıbı olarak kullanılmaktadır. DNA'daki hedef bölge metillenmiş ise sitozin nükleotid ekleme esnasında birleşmektedir. Metillenmemiş ise timin ile birleşmektedir. Sitozin ile timin birleşme miktarı hedef bölgedeki metilasyon durumunu belirlemektedir.

2.3.3.6. COBRA (Combined bisülfite restriction analysis / Karışık bisülfite restriksiyon analizi)

Sodyum bisülfite ile tek iplikli DNA'da bulunan bütün sitozinlerin urasile deamine olması sonucu esasına dayanmaktadır. Modifiye edilmiş DNA uygun primerlerle PCR'da amplifiye edilmektedir. Replikasyon esnasında değişime uğramış sitozin olan urasiller timin şeklinde çoğaltılmaktadır. 5-metilsitozin ise bu esnada değişmeden kalmaktadır. Replikasyon olmuş fragmentler direkt ya da çoğaltılma işleminden sonra dizi analizi yapılmaktadır (Eads ve Laird, 2002).

2.3.3.7. IRAP (Inter retrotransposons amplified polymorphism)

IRAP, PCR tabanlı bir işaretleme tekniğidir ve retrotranspozonlar arasındaki bölgelerin çoğaltılmasına dayanmaktadır. Polimorfizmin saptanması için korunmuş retrotranspozon dizilerini (LTR) kullanılmaktadır. LTR bölgeleri gen ekspresyonu için gerekli dizilimi içerdikleri için korunmuş durumdadırlar. LTR (Uzun terminal tekrar) retrotranspozonlara özgüdür ve bitişik bölgelerin çoğaltılması için genetik analizlerde LTR primerleri kullanılmaktadır (Kalendar vd., 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen *Triticum aestivum L.* kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Yapılan çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin isimleri Tablo 3.1.'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Kullanılan araç, gereçler ve markaları

Kullanılan Araç ve Gereçler	Markaları
Buzdolabı	Arçelik Hacim: 610 LT
-80 C Ultra Derin Dondurucu	Haier DV-86L628
-24 C Derin Dondurucu	Arçelik Hacim: 610 LT
Hassas Terazî	Shimadzu ATX224
Vortex	Daihan VM10
Elektroforez	Owl B2
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific EC300XL2
UV Spektrometre	Perkin Elmer Lambda 35
Otoklav	Sümer SM3
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert WNE22
Ultra Santrifüj	Hanl Smart R17
PCR	Multigene GTC96S
Mikrodalga Fırın	Arzum AR245
Mikropipet Serisi	Axygen
Etüv	Daihan WIG – 105
Görüntüleme Sistemi	Vilber VL - 1011 72711

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

3.1.3.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

100mM Tris-HCl (pH 8.0)

50mM EDTA (pH 8.0)

500mM NaCl

%2 SDS (w/v)

%2 β -merkptoetanol (v/v)

%1 PVP (w/v)

CTAB/NaCl

%10 CTAB

0,7 M NaCl

Fenol: Kloroform: İzoamil alkol:

25: 24: 1 oranında hazır olarak kullanıldı (Sigma, 77617).

Kloroform: İzoamil alkol

24: 1 oranında hazır olarak kullanıldı (Fluka, 25666).

TE tamponu

10mM Tris-HCl (pH 8,0)

1mM EDTA (pH 8,0)

%70'lik Etil Alkol

70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.2. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

Etidyum Bromür Çözeltisi

500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300 μ l etidyum bromür ilave edilerek hazırlandı.

Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Primerlerin Hazırlanması

Primerler firmanın önerdiği miktarda TE ile diyalize edilerek sulandırılan hazır stok solüsyonunda uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlandı.

%1'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit)

%5 NaOCl içeren ticari *Domestos* marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

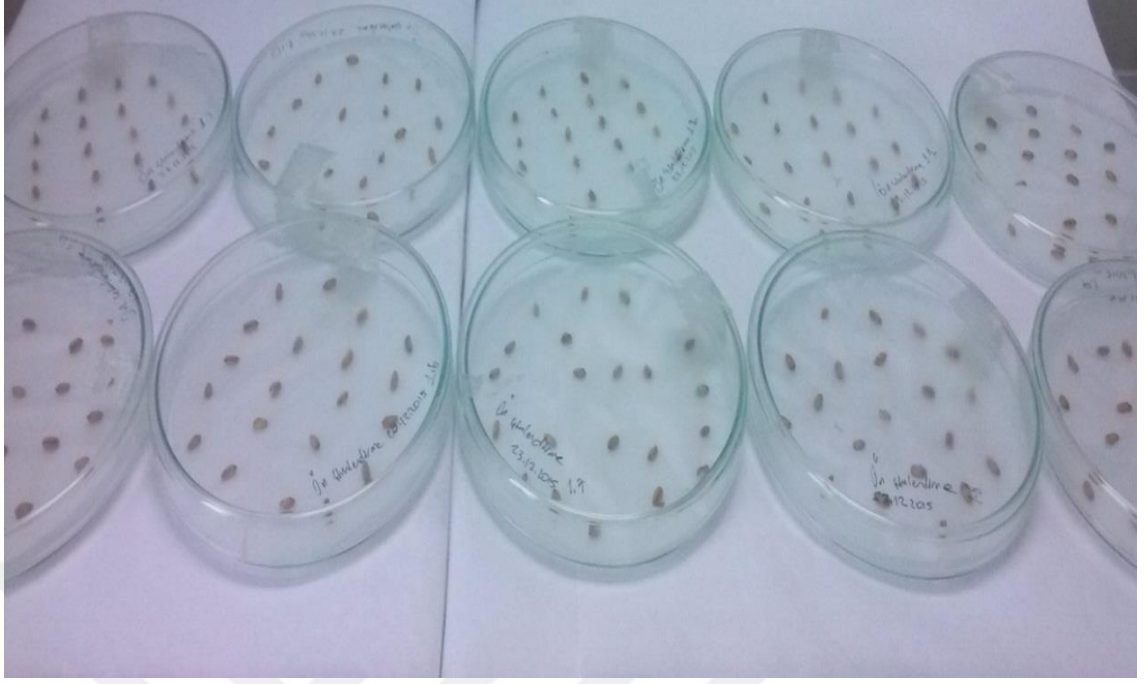
%75'lik Etil alkol

75 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. UV-C radyasyonunun bitkiye uygulanması

Tohumlar sterilizasyon için %1'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit) ile muamele edilip daha sonra saf sudan geçirilmiştir. Tohumların çimlendirileceği petriler otoklavlanarak sterilizasyonu yapılmış ve yüzeylerine 2 katlı filtre kâğıdı yerleştirilmiştir. Petrilere yerleştirilen tohumlar, ön çimlendirme işlemi için 22°C de normal koşullarda 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.1.'de ön çimlendirme safhası verilmiştir. Ön çimlendirme işleminden sonra eşit büyüklükteki ve tomurcuk tohumlar seçilerek 15 tane çimlenmiş buğday petri kaplarına yerleştirilmiştir. Petrilere bulunan buğdaylar 4 gruba ayrılmıştır. Gruplanmış tohumlar (gündüz / gece sıcaklığı = 25/22 °C) iklim odası içine yerleştirilmiştir. Gruplanan petriler kontrol grubu ve UV-C uygulanan gruplar olarak ikiye ayrılmıştır. UV-C grubu ise kendi içerisinde uygulanan doz seviyelerine göre 1.grup, 2.grup, 3.grup ve 4.grup olarak ayrılmıştır. Kontrol grubuna 18 saat gece 6 saat (09.00-15.00) gündüz olmak üzere sadece gün ışığı verilmiştir. UV-C uygulanan 1.grup, 2.grup, 3.grup ve 4.gruplara ise Tablo 3.2.'de belirtilen UV-C radyasyonun doz seviyeleri verilmiştir (Özbey, 2014). Şekil 3.2.'de UV-C'ye belirlenen dozlarda maruz bırakılmış buğday gruplarının görüntüleri verilmiştir. 14 gün sonunda kontrol ve UV-C'ye maruz bırakılan bitki örnekleri DNA izolasyonu yapılmak üzere -80 °C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Ön çimlendirme safhası



Şekil 3.2. UV-C'ye belirlenen dozlarda maruz bırakılmış buğday grupları

Tablo 3.2. Uygulanan UV-C radyasyon doz seviyeleri

	Watt	Joule/h	Joule/cm²
Kontrol grup	0	0	0
1.Grup (2 saat)	0,061w	439,2	2,70
2.Grup (4 saat)	0,061w	878,4	5,38
3.Grup (6 saat)	0,061w	1317,6	8,07
4. Grup (8 saat)	0,061w	1756,8	10,76

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü olarak Worden CTAB protokolü esas alınmış ve birkaç maddesinde değişikliğe gidilmiştir (Aygün Ertürk vd., 2014).

- Önceden sıvı azotta parçalanıp 2 ml'lik tüplere alınan bitki materyali üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmıştır ve 65°C'ye kadar ısıtılmış su banyosunda 10–60 dk. bekletilmiştir.
- 12000 g ve 40°C'de 10 dk. santrifüjlenmiş üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 1000 µl Fenol: Kloroform: İzomil alkol eklenmiş birkaç kez alt üst ederek karıştırılmıştır. 12000 g ve 40°C'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 1/10 hacim CTAB/NaCl çözeltisinden eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- 1000 µl Kloroform: İzomil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- 12000 g ve 40°C'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenerek -20°C'de 10 dk. bekletilmiştir.
- 12000 g ve 40°C'de 10 dk. santrifüjlenmiş üst faz atılmıştır.
- Pellet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- Yıkanan pellet bir gece bekletilerek kurutulmuştur.
- Kurutulan DNA 100 µl TE tamponunda çözülmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen DNA -20°C'de stoklanmıştır.

Elde edilen DNA 250 kat (3µl DNA + 747µl TE tamponu) seyreltilerek spektrofotometrede 260nm ve 280nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri

okunmuştur. OD (okuma değeri) 260/280 değeri 1,1–1,8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme katsayısı) x OD 260 (260nm'de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA miktarı hesaplanmıştır. Stok DNA'dan 50ng/μl DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.3. RAPD

Çalışmada 14 RAPD primeri (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve baz dizileri Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer Adı	Baz Dizilimi (5'-3')
OPA-4	AATCGGGCTG
C-10	TGTCTGGGTC
OPH-17	CACTCTCCTC
OPK-4	CCGCCCAAAC
OPH-10	CCTACGTCAG
OPL-15	AAGAGAGGGG
OPK-19	CACAGGCGGA
OPBA-03	GTGCGAGAAC
OPL-09	TGCGAGAGTC
B-20	GGACCCTTAC
OPN-16	AAGCGACCTG
A-1	AGTCAGCCAC
A-8	GTGACGTAGG

RAPD konsantrasyonunun toplam hacim 20 μl olacak şekilde karışım bileşenleri hazırlanmıştır. RAPD-PCR çoğaltma öğeleri, konsantrasyon ve miktarları Tablo 3.4.'de verilmiştir. Karışım her bir primer uygulaması için aynı oranda hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. RAPD-PCR çoğaltma öğeleri, konsantrasyon ve miktarları

PCR çoğaltma öğeleri	Kullanılan konsantrasyon	PCR'da kullanılan miktar
PCR tamponu	10x	2 μl
DNA	100 ng/μl	1 μl
dNTP	10 mM	0,5 μl
MgCl ₂	25 mM	1,25 μl

Primer	5 µl	1 µl
<i>Taq</i> DNApolimeraz	5 Unit/µl	1 µl
Saf su		13,25 µl
Toplam		20 µl

DNA örnekleri RAPD analizi için her bir örneğe ayrı ayrı eklenmiştir. RAPD protokolü Cenkçi ve arkadaşlarına (2009) göre oluşturulmuştur. RAPD PCR döngü protokolü Tablo 3.5.'de verilmiştir.

Tablo 3.5. RAPD döngü protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94°C	5dk	1
94°C	1 dk 30 sn	
37°C	1 dk 30 sn	4
72°C	3 dk	
94°C	1 dk	
36°C	1 dk	41
42°C	1 dk	
72°C	3 dk	
72°C	7 dk	1
4°C	∞	

3.2.4. CRED-RA

Genomda metilasyon özelliklerinin gözlenmesi için *MspI* (Promega) ve *HpaII* (Promega) enzimleri kullanılmıştır. Bu işlem için 0,5ml'lik tüpe son hacmi 20µl olacak şekilde 16,3µl sterile su, 2µl RE 10X Buffer, 0,2µl BSA (10µg/µl), 1µl DNA (1µg/µl), 0,5µl restriksiyon enzimi ilave edilmiştir. Enzim kesimi için, tüpler 37°C'deki etüvde 4 saat inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesini durdurmak için etüvde 65°C'de 15 dakika bırakılmıştır. Elde edilen ürünleri kontrol etmek amacıyla 4µl alınarak 1µl 6X yükleme tamponuyla karıştırıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde 70V'da yürütülmüştür. Yürütülen agar jel UV-C jel görüntüleme sistemiyle incelenmiştir.

Çalışmada 6 CRED-RA primeri kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve baz dizilimleri Tablo 3.6.'da verilmiştir. CRED-RA protokolü Aygun Erturk ve arkadaşlarına (2014) göre oluşturulmuştur.

Tablo 3.6. CRED-RA analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer Adı	Baz Dizilimi (5'-3')
OPH- 17	CACTCTCCTC
OPA-4	AATCGGGCTG
OPK-19	CACAGGCGGA
OPK-4	CCGCCCAAAC
C-10	TGTCTGGGTC
OPH-10	CCTACGTCAG
OPL-15	AAGAGAGGGG

3.2.5. IRAP

IRAP analizinde 5 primer kullanılmıştır. Tablo 3.7'de kullanılan primerler ve baz dizilimi verilmiştir.

Tablo 3.7. IRAP analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer Adı	Baz Dizilimi (5'-3')
Nikita-E2647	ACCCCTCTAGGCGACATCC
N-57	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC
Sukkula	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC
WLTR2105	ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA
BARE 1 (0)	ATCATTCCCTCTAGGGCATAATTC

IRAP konsantrasyon toplam hacimi 20 µl olacak şekilde karışım bileşenleri hazırlanmıştır. IRAP-PCR çoğaltma öğeleri, konsantrasyon ve miktarları Tablo 3.8.'de verilmiştir. Karışım her bir primer uygulaması için aynı oranda hazırlanmıştır.

Tablo 3.8. IRAP-PCR çoğaltma öğeleri, konsantrasyon ve miktarları

PCR çoğaltma öğeleri	Kullanılan konsantrasyon	PCR'da kullanılan miktar
PCR tamponu	10x	2 µl
DNA	100 ng/µl	1 µl
dNTP	10 mM	0,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,25 µl
Primer	5 µl	1 µl
<i>Taq</i> DNApolimeraz	5 Unit/µl	1 µl
Saf su		13,25 µl
Toplam		20 µl

DNA örnekleri IRAP analizi için her bir örneğe ayrı ayrı eklenmiştir. IRAP protokolü Kalendar ve arkadaşlarına (1999) göre oluşturulmuştur. IRAP PCR döngü protokolü Tablo 3.9.'da verilmiştir.

Tablo 3.9. IRAP döngü protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94°C	5dk	1
94°C	1 dk 30 sn	
37°C	1 dk 30 sn	4
72°C	3 dk	
94°C	1 dk	
36°C	1 dk	41
42°C	1 dk	
72°C	3 dk	
72°C	7 dk	1
4°C	∞	

3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

- Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %0,7 olacak şekilde 0,7 g agaroz tartılıp 100 ml 1xTris-Borat EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 1xTBE agaroz çözeltisi içerisine 2 µl etidyum bromür eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (1 µl bromfenol mavisi +5 µl PCR ürünü) yüklenmiştir.
- 100V elektrik akımında 60 dk DNA'lar elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez tankından çıkarılan jel UV-C ışık altında incelenmiş ve görüntülenmiştir.

3.2.7. RAPD, CRED-RA ve IRAP analizleri ile genomik kalıp sabitliğinin (% GTS) belirlenmesi

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol RAPD, IRAP, CRED-RA profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar görüntüleme cihazı Total LAB TL 120 (Nonlinear Dynamics) yazılımı ile belirlenmiştir. % GTS her bir primer ürünü $100-(100*a/n)$ formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki a her bir uygulama örneği için tespit edilen RAPD, IRAP, CRED-RA polimorfik profillerini, n ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bant sayısını göstermektedir. Uygulama gruplarına ait RAPD, IRAP, CRED-RA profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bandın ortaya çıkması veya mevcut bir bandın kaybolmasını kapsamıştır. Parametrelerin (% GTS) hassaslığını karşılaştırmak için, parametrelerdeki değişimleri kontrollerine göre yüzde değişim olarak hesaplanmıştır (Cenkci vd., 2009).

3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi her bir bireyde her primer için bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde ifade edilmiştir. Oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bantların varlığı primerlerin hibridize olduğu ve bu primerlerin ait olduğu operon bölgelerinin incelenen örneklerde bulunduğu anlamında değerlendirilmiştir. Bu bantların değerlendirilmesinde TotalLab TL120 kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmamızın RAPD uygulaması sonucunda UV-C'ye maruz bırakılan gruplarda aynı tür buğday bitkisi oldukları halde doz seviyesi artıkça % polimorfizm arttığı (bant sayılarında değişiklik) ve % GTS oranında azalmaya bağlı genomik kararsızlıkta artış tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 5.1).

CRED-RA analiz sonuçlarının yorumlanmasında uygulanan her doz UV-C için % polimorfizm ve GTS değerleri hesaplanarak ortalamaları alınmıştır. UV-C uygulamalarında doza bağlı olarak DNA hipermetilasyonu olduğu görülmüştür

IRAP analizi için Nikita-E2647, N-57(Nikita), Sukkula, LTR6150, BARE 1 (0) primerleri kullanılmıştır. Analiz sonuçları RAPD ve CRED-RA analiz sonuçları ile bütünlük göstermektedir. UV-C maruziyetinin artması ile % polimorfizm değeri artarken % GTS değerinin düştüğü gözlenmiştir.

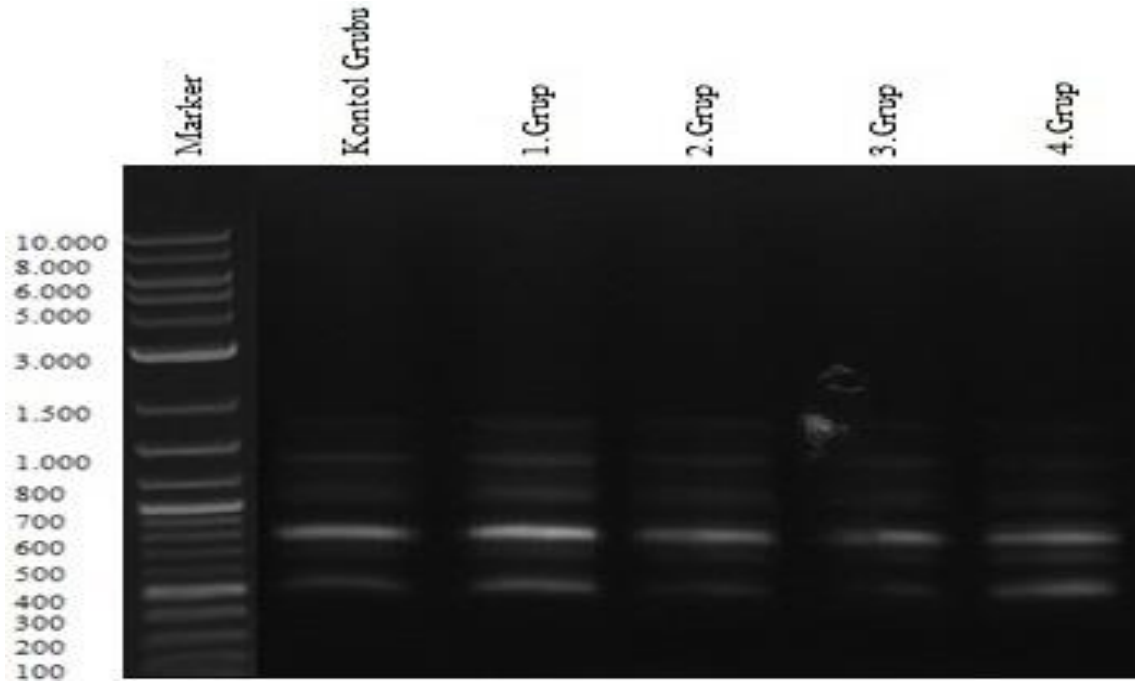
5. SONUÇ ve TARTIŞMA

5.1. Sonuç

5.1.1. RAPD analizleri ve % GTS değerleri

Kontrol ve UV-C'ye maruz bırakılmış buğday örneklerine RAPD primerleri uygulanmış ve en iyi amplifikasyon veren 13 tanesi seçilmiştir. Şekil 5.1.'de OPBA-03 primerinin bant oluşumlarını gösteren jel görüntüsü verilmiştir.

RAPD analiz sonucu oluşan bant sayıları, % polimorfizm ve % GTS oranları ayrıntılı olarak Tablo 5.1.'de verilmiştir. Bu uygulama sonucunda kontrol gruplarında 141 adet bant elde edilmiştir. UV-C uygulamasına maruz bırakılan gruplarda ise bazı büyüklükleri 119 ile 924 arasında değişen toplam 168 bant elde edilmiştir. OPK-19 primeri bütün gruplarda aynı büyüklükte 3 bant verirken (264, 541, 892), OPL-09 primeri UV-C uygulanmış gruplarda aynı büyüklükte tek bant vermiştir (338). % polimorfizm 20,6 ile 41,1 arasında değişmiştir. UV-C uygulama dozu arttıkça polimorfizm oranının arttığı saptanmıştır. % GTS seviyesi %79,4 ile % 58,9 arasında değişmiştir. UV-C uygulama dozu arttıkça % GTS seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir.



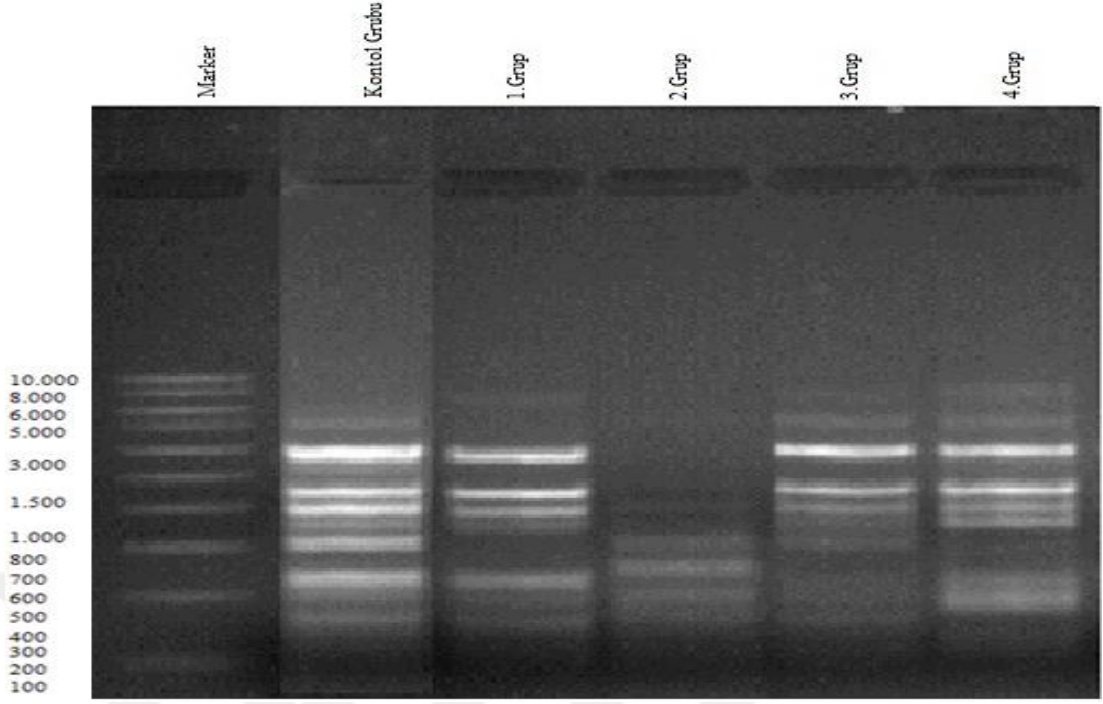
Şekil 5.1. RAPD analizinde kullanılan OPBA-03 primerine ait jel görüntüsü

Tablo 5.1. UV-C uygulanması ile RAPD primerlerinde meydana gelen polimorfik bantların molekül ağırlıkları

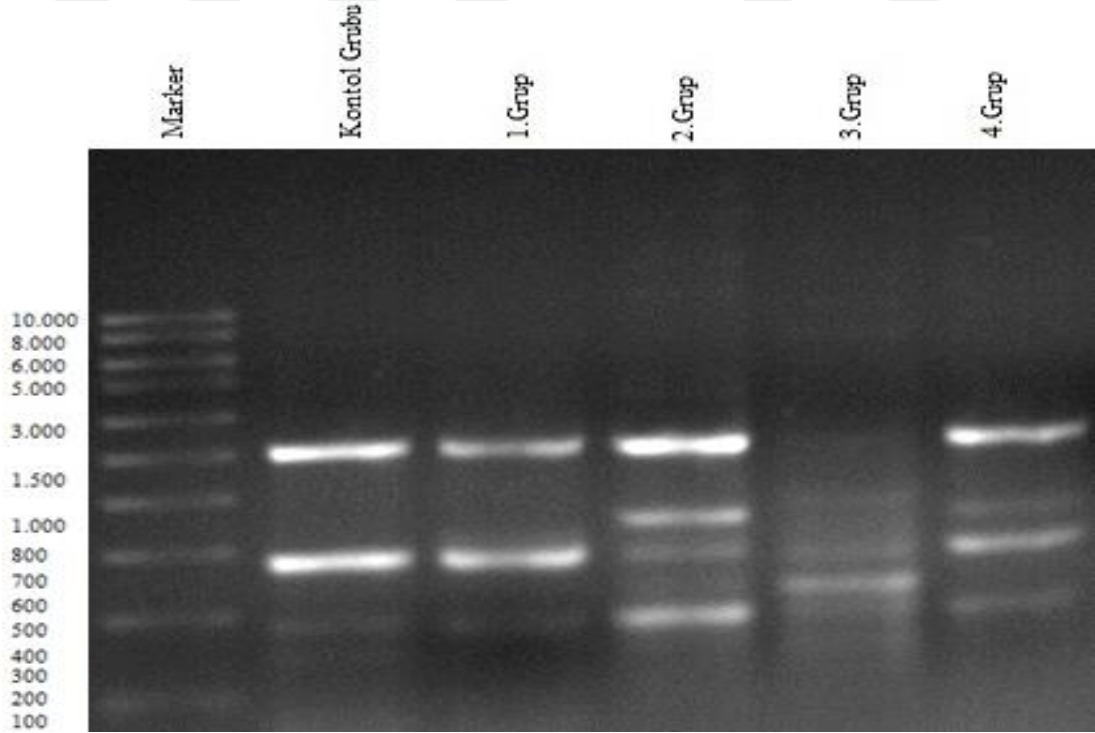
Primer	Kontrol	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
OPA- 4	9	-215 -412 +330	-215 -412 +330 +551 +658 +812	-215 -412 +330 +551	-215 -412 +330 +551 +658 +812
C-10	7	-	+119 +552	-281 +552 +814	-281 +119 +264 +552
OPH- 17	5	-342 +291 +714	-342 +291, +714	-342 +291 +413 +714,	-342 +291 +413 +714 +916
OPK-4	10	+516 +182	+516	-224 +516 +924 +182	-224 +516 +924 +182 +332 +482 -526
OPH-10	14	-	-	-157 +396 +618 +220	-157 +396 +618 +220
OPL-15	11	-186 -342 +552	-186 -342 +552 +783	-186 -342 +552 + 783	-186 -342 +552
OPK-19	8	+264 +541 +892	+264 +541 +892	+264 +541 +892	+264 +541 +892
OPBA-03	6	+417 -254	+417 +821 -254	+417 +821	+417 +821 -254
OPL-09	9	-338	-338	-338	-338
B-20	10	+516 +689 +412	-254 +516 +412 +282	-254 +412 +689	-254 +516 +689 +412 +282
OPN-16	13	-290 +452 +662	-290 +814 +452	-290 +814 +452	-290 +814 +452 +662
A-1	11	-	-	+148 +731	+148 +421 +731
A-8	16	-158 +369 +814	-158 +369	-158 +369 +516 +814 +452	-158 +369 +516 +452 +814
Bant sayısı	141	29	35	46	58
%polimorfizm		20,6	24,8	32,6	41,1
%GTS		79,4	75,2	67,4	58,9

5.1.2. CRED-RA analizleri ve % GTS değerleri

Buğdaya uygulanan UV-C'nin genom üzerindeki epigenetiksel etkilerini test etmek için CRED-RA yöntemi uygulanmıştır. CRED-RA analiz sonuçları Tablo 5.2.'de verilmiştir. 16 primer denenmiş ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren 7 primer seçilmiş olup değerlendirilmeye alınmıştır. *Msp I* enziminin metilasyonun görüldüğü yerden kesim yapması ve *Hpa II* enziminin metilasyon görülmediği zaman kesim yapması bilgisinden hareketle alınan sonuçlara göre; % polimorfizm *HpaII*'de %20 ile %100 arasında; *MspI*'de %16,6 ile %100 arasında değişmektedir. UV-C'ye maruz bırakılan gruplarda en düşük doz seviyesi olan 1.Grup'ta %56,1 iken en yüksek doz seviyesi 4. Grup'ta %81,9 oranında metilasyon gözlenmiştir. Uygulanan UV-C'nin doz seviyesi artıkça % polimorfizm giderek artığı tespit edilmiştir. Şekil 5.2.'de OPK-4 ve Şekil 5.3.'de C-10 primerlerinin bant oluşumlarını gösteren jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 5.2. CRED-RA analizinde kullanılan OPK-4 primerine ait jel görüntüsü



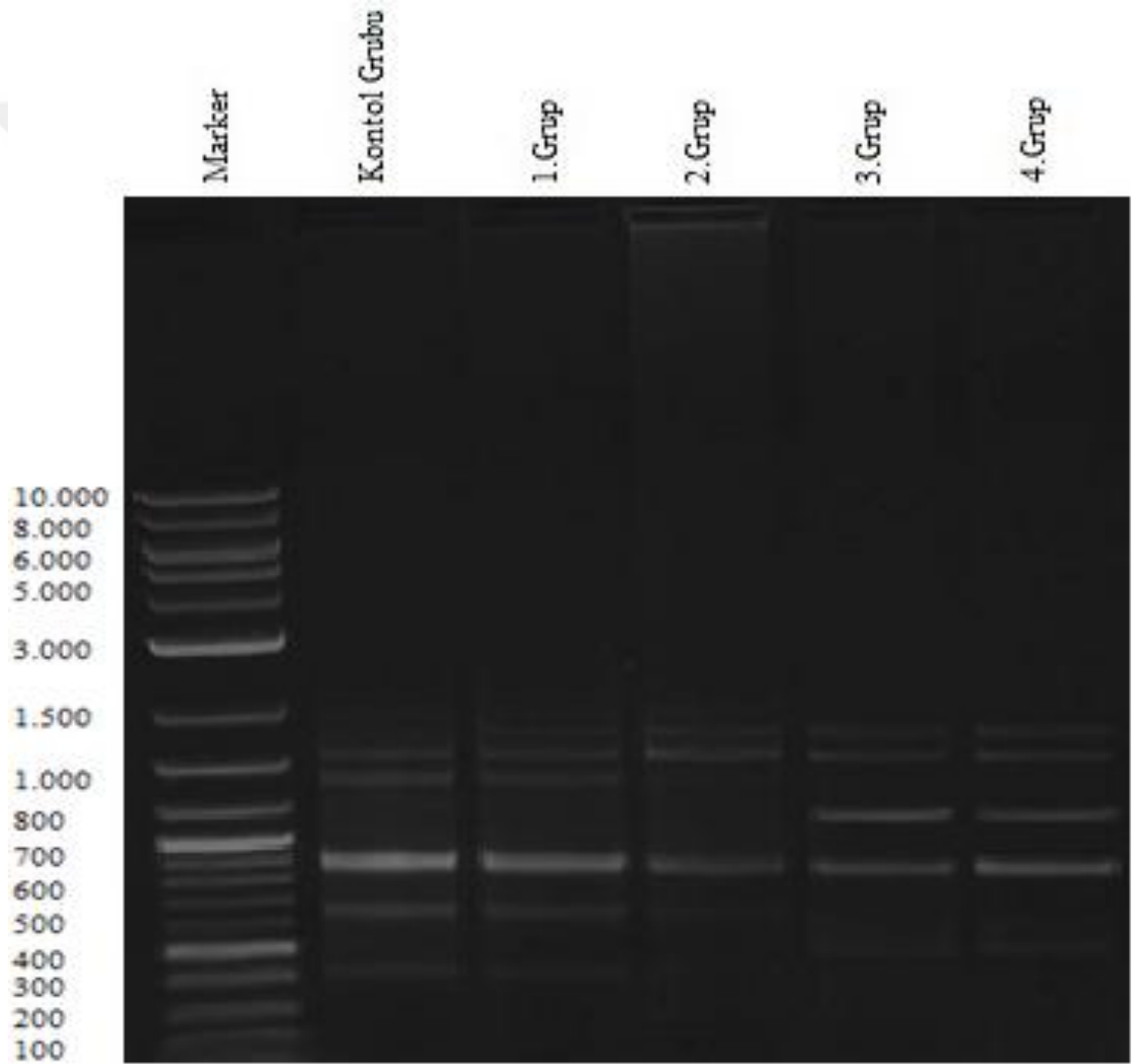
Şekil 5.3. CRED-RA analizinde kullanılan C-10 primerine ait jel görüntüsü

Tablo 5.2. UV-C uygulanması ile CRED-RA primerlerinde meydana gelen polimorfik bantların molekül ağırlıkları

Primer	Kontrol		<i>HpaII</i>				<i>MspI</i>				Polimorfik Bant Sayısı								%Polimorfizm							
	CH	CM	G H1	G H2	G H3	G H4	G M1	G M2	G M3	G M4	G H1	G H2	G H3	G H4	G M1	G M2	G M3	G M4	G H1	G H2	G H3	G H4	G M1	G M2	G M3	G M4
OPK-19	7	7	7	4	6	5	8	4	3	7	2	3	4	3	3	4	5	6	28,5	75	66,6	60	37,5	100	100	85,7
OPA-4	8	9	7	7	5	6	8	9	9	4	6	4	3	4	7	8	9	3	85,7	57,1	60	66,6	87,5	88,9	100	75
C-10	4	5	4	5	5	5	6	5	5	6	1	2	2	3	3	3	4	5	25	40	40	60	50	60	80	83,3
OPH-17	5	6	5	6	5	8	6	6	6	9	1	3	2	7	1	1	2	9	20	50	40	87,5	16,6	16,6	33,3	100
OPK-4	10	12	8	9	5	6	9	9	5	7	8	6	3	4	7	6	4	5	100	66,7	60	66,7	77,7	66,6	80	71,4
OPH-10	8	11	9	5	7	10	7	5	9	4	6	2	5	5	5	4	6	3	66,7	60	71,4	50	71,4	80	66,7	75
OPL-15	3	3	3	4	6	7	3	3	5	6	2	3	4	5	2	2	4	5	66,6	75	66,6	71,4	66,6	66,6	80	83,3
Ortalama	6,4	7,6	6,1	5	5,6	6,7	6,7	5,9	6	6,1	3,7	3,3	3,3	4,4	4	4	4,9	5,1	56,1	60,5	57,8	66,0	58,1	68,4	77,1	81,9

5.1.3. IRAP analizleri ve % GTS değerleri

IRAP analiz sonuçları Tablo 5.3.'de verilmiştir. Çalışılan 5 primer 118 ile 816 bp arasında değişen 44 bant vermiştir. Bu primerlerden Bare1 primeri bütün gruplarda aynı büyüklükte 2 bant vermiştir (118,28). % polimorfizm %16,6 ile %35,7 arasında değişirken, % GTS seviyesi %83,4 ile %64,3 arasında değişmektedir. UV uygulama dozu arttıkça % GTS seviyesinin azaldığı % polimorfizmin ise arttığı tespit edilmiştir. Şekil 5.4.'de SUKULA primerinin bant oluşumlarını gösteren jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 5.4. IRAP analizinde kullanılan SUKULA primerine ait jel görüntüsü

Tablo 5.3. UV-C uygulanması ile IRAP primerlerinde meydana gelen polimorfik bantların molekül ağırlıkları

Primer	Kontrol	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
Nikita-E2647	10	+125	-618	-618	-618
		+428	+125	+125	+125
				+428	+428
N-57	8	+507	+507	-389,	-389
			+452	+507	782
				+452	+507
				+452	+452
SUKKULA	7	-	+268	-158	-158
			+816	+816	+268
					+816
WLTR2105	8	+354	-251	-251	-251
		+517	+354	+354	+517
					+651
BARE 1 (0)	9	-118	-118	-118	-118
		+281	+281	+281	+281
Bant sayısı	42	6	10	12	15
%Polimorfizm		16,6	23,8	28,6	35,7
%GTS		83,4	76,2	71,4	64,3

5.2. Tartışma

İnsan faaliyetleri, teknolojik gelişmeler, sanayi çalışmaları, gübreleme çalışmaları toplumun refah seviyesini yükseltmesi için olumlu bir etkiye neden olsa da doğal ekosistemde bulunan insanlarda dahil diğer canlı türlerinin zarar görmesine neden olabilmektedir. Doğal ekosistem kendisini olumsuz olarak etkileyen faktörlere karşı sürekli kendini yenilemektedir. Fakat günümüzde ekosistem artık kendini yeterince yenileyemeyerek bozulmaya başlamış durumdadır.

Bitkiler yetiştirildiği doğal iklim koşulları altında normal bir büyüme evresi geçirmektedirler. Farklı iklim ve çevre şartları bitkilerin hayatta kalmalarını zorlaştırmaktadır. Bazı bitkiler bu ekstrem koşullara adapte olabilirken bazılarında bu adaptasyon görülmemektedir. Buda bitkilerin strese girmesine neden olmaktadır.

Stres faktörlerinin etkileri, bitkilerin yaşadığı çevre ve iklim şartlarına göre değişiklik göstermektedir. Yeryüzünde bitki alanlarının dağılımı göz önüne alındığında UV'nin diğer stres faktörlerine nazaran daha etkili olduğu görülmektedir. Ozon tabakasından filtrelenen zararlı UV ışınlarının etkisi günden güne artmaktadır. UV'nin neden olduğu stres diğer stres faktörlerinde olduğu gibi fizyolojik, morfolojik ve genetiksel yapılarında değişiklikler meydana getirmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalardan Zlatev ve

arkadaşları (2012) tarafından UV-B'nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere doğrudan ve dolaylı etkileri olduğunu saptamıştır. Lv ve arkadaşları (2013) tarafından 12 çeşit kışlık buğdaya farklı dozlarda UV-B verilmiş ve uygulanan düşük doz UV-B oranına buğdayların direnç gösterdiği ve bitki gelişimine destek sağladığı tespit edilmiştir. Uygulanan yüksek doz UV-B oranının ise buğdayların boyunda ve biyokütlesinde azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Sokolova ve arkadaşları (2014) ise mısıra uygulanan UV-C'nin çimlenmeyi etkilediği, embriyo hücrelerinin gelişiminin gerilemesine neden olduğu ve çimlenme sırasında bölünmeyi yavaşlattığını tespit etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada buğday tohumlarına farklı dozlarda uygulanan gama radyasyonuna bağlı olarak yaprak uzunluğu, fide boyu, yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubuna göre azaldığı belirtilmiştir (Akıncı vd., 1998).

Ekosistemde meydana gelen değişiklikler ozon tabakası konsantrasyonunda azalmaya neden olurken, UV-C ışınlarında artışına neden olmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda buğday bitkisi 4 farklı dozda UV-C'ye maruz bırakılmış ve UV-C'nin genetik ve epigenetik etkileri moleküler yöntemlerden RAPD, IRAP ve CRED-RA yöntemleri ile analiz edilmiştir.

Taşpınar ve arkadaşları (2011) tarafından nokta mutasyonlar, genetik ve kromozomal yeniden düzenlenmeler, delesyon ve insersiyon gibi genomik DNA hasarlarını tespit etmek için RAPD yönteminin kullanışlı olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda RAPD uygulaması sonucunda UV-C'ye maruz bırakılan buğday gruplarında doz seviyesi arttıkça % polimorfizm arttığı (bant sayılarında değişiklik) ve % GTS oranında azalmaya bağlı olarak genomik kararsızlıkta artış tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 5.1.). Buda stresin genom yapısında hasarlara yol açtığının bir göstergesidir.

UV'nin genetiksel olarak en önemli hedefi DNA'dır. UV-C ve UV-B DNA tarafından absorbe edilerek DNA'ya zarar vermektedirler. UV maruziyeti sonucu DNA'da oluşan hasar, hücre döngüsünün durmasına ve hücre ölümüne neden olan hücresel tepkileri tetiklemektedir (Batista vd., 2009). DNA'da çift sarmal kırıklarına, modifikasyona, replikasyona, transkripsiyona, oksidasyona neden olmaktadır (Britt, 1995; Ries vd., 2000). Ayrıca nükleotidlerin yeniden düzenlenmesine, gelişim evrelerinin

indüksiyonunu ve kontrolünü sağlamaktadırlar (Bourbousse vd., 2015; Galvao ve Fankhauser, 2015; Yin ve Ulm, 2017).

UV, ayrıca guanini (G) değiştiren 8-oksoguanini (8-oxoG) üreterek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine yol açmakta ve DNA'nın dolaylı olarak oksitlemesine neden olmaktadır (Schuch vd., 2013). Reaktif oksijen türlerinin metilasyon mekanizması üzerine etkilerinin DNA hasarına neden olan endonükleaz enzimlerinin aktivasyonuna etki ederek, özellikle CpG adacıkları yakınında oxo8dG gibi premutajenlerin oluşumunu sağlayarak, nikotinamid (NIC) seviyesi ve gen işleyişindeki önemli modifikasyonlardan biri olan ADP-riboz aktivitesini arttırarak epigenetik etki gösterdikleri düşünölmektedir (Aina vd., 2004; Hassa vd., 2006).

UV-B ve UV-C DNA'da timin (T) ve sitozin (C) içeren TT, CC, TC ve CT bölgelerinde ortaya çıkan siklobütan pirimidin dimerleri (CPD'ler) ve 6-4 pirimidin dimerleri (6-4 PP) oluşturarak ana kalıpta hasara neden olmaktadır (Schuch vd., 2013).

CRED-RA analiz sonuçlarının yorumlanmasında uygulanan her doz UV-C için % polimorfizm ve % GTS değerleri hesaplanarak ortalamaları alınmıştır. UV-C uygulamalarında doza bağlı olarak DNA hipermetilasyonu olduğu görölmüştür. Bu konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda Willing'in (2016), *Arabidopsis thaliana*'ya UV uygulaması sonucu oluşun mutasyonlar ile DNA metilasyon kalıpları arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Aynı bitkide yapılan diğer bir çalışmada ise 5'-CCG-3' trinükleotidlerin yaklaşık %20-30'unun dış C'de metilasyona ve iç C'de yaklaşık %20'sinin metilasyona uğradığı bildirilmiştir (Jeddeloh ve Richards, 1996).

Valledor ve arkadaşları (2012), UV-B'ye maruz kaldıktan 24-48-72 saat sonra *Pinus radiata*'da DNA metilasyonu seviyesinin yükseldiğini tespit etmişlerdir. Aynı şekilde Sokolova ve arkadaşları (2014) tarafından mısır üzerinde UV-C'nin neden olduğu polimorfizmin DNA metilasyonunun neden olduğu tespit edilmiştir. Norveç ladin tohumları UV-B'ye maruz kaldığında iğnelerindeki DNA metilasyon seviyesi azaldığı CCGG sekansındaki değişikliklerin metilasyona yansıdığı tespit edilirken (Ohlsson vd., 2013), mısır tohumları UV-C ve gamma radyasyonuna maruz bırakıldığında kromatin yapısında ve satellite de DNA metilasyonunda değişiklikler gözlenmiştir (Sokolova vd., 2014; Kravets vd., 2013).

Stresin neden olduğu DNA hasarlarını tespit etmede kullanılan yöntemlerden biride transpozonlardır. TE, bir kromozomal bölgeden diğerine geçebilen DNA fragmanlarıdır. TE'nin gen açısından zengin bölgelere yerleştirilmesi sıklıkla komşu genlerin ekspresyonundaki değişiklikleri etkilemektedir. Stres faktörleri transpozonları aktifleştirerek epigenetik yapıda değişime neden olabilmektedir (Wessler, 2009). Bu nedenle, retrotranspozonlar bitki gelişimi ve bitki genetik gelişiminde önemli bir araştırma aracı olarak kullanılmaktadır. UV ışınları, sıcaklık, radyasyon, yaralanma, hücre kültürü, patojen enfeksiyonu gibi biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin retrotranspozonların hareketini kolaylaştırdığı bilinmektedir (Grandbastien vd., 1997; Kalendar vd., 2000; Kubis vd., 2003).

IRAP analizi için Nikita-E2647, N-57(Nikita), Sukkula, LTR6150, BARE 1 (0) primerleri kullanılmıştır. Analiz sonuçları RAPD ve CRED-RA analiz sonuçları ile bütünlük göstermektedir. UV-C maruziyetinin artması ile % polimorfizm değeri artarken, % GTS değerinin azaldığı gözlenmiştir.

Stresin oluşturduğu genetik varyasyonlar ve epigenetiksel değişimleri transpozon yoluyla açıklayan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan, *Arabidopsis thaliana*'da transpozon açısından zengin heterokromatik bölgelerin sıklıkla metilasyona uğradığı gözlenmiştir (Lippman vd., 2004; Zhang vd., 2006). Mısır bitkisine uygulanan soğuk stres sonucunda mısır kök dokusunda DNA metiltransferazı olan ZmMET1 aşağıya regüle olduğunu ve Ac/D transpozon bölgesinde hipometilasyona neden olduğu tespit edilmiştir (Steward, 2000). Hashida ve arkadaşları (2006) tarafından *Antirrhinum majus* bitkisinde Tam3 transpozonunun 15°C'de hareketli olduğu ve bu sıcaklıkta Tam3 transpozaz (TPase)'in transpozonun subterminal bölgesine bağlanarak metilasyon oranını düşürdüğü gözlenmiştir. Sıcaklığın 25°C'ye çıkarıldığında oluşan stresin transpozon hareketini baskıladığı ve hipometilasyona neden olduğu gözlenmiştir.

Castrillo ve arkadaşları (2013), yaptıkları çalışmada arsenik stresine maruz bırakıldıktan sonra *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde transpozon hareketliğinde artış gözlenmiştir. Strese tepki olarak oluşan transpozon aktivasyonu kromozom yeniden düzenlenmesi ve gen ekspresyonu değişiklikleri gibi etkiler oluşturduğu saptanmıştır. Retrotranspozonlar, bitkilerde gen ifadesinin değişmesi ve epigenetiksel düzenlemede büyük rol oynamaktadır. Isı, soğuk, salisilik asit, gibberelik asit, 2,4-D ve UV stresine maruz

bırakılan masson çamında ters transkripsiyon (RT-PCR) sonucu hem Ty1 hem de Ty3 tipi retrotranspozonların transkripsiyonal aktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Fan vd., 2014).

Aynı zamanda başka bir çalışmada *Arabidopsis thaliana*'nın uzun süre UV-B maruziyetine bırakıldığında geniş bir gen dizisini uyardığı gözlenirken (Frohnmeier ve Staiger, 2003), UV-C maruziyeti sonucunda bitkinin yaprak sayısı, yaprak boyu, tohum büyüklüğü ve transpozon ifadesinde değişik olduğu tespit edilmiştir (Migicovsky ve Kovalchuk, 2014). UV-B ve UV-C yüzlerce genin ekspresyonunu düzenleyebildiği ve DNA bazları tarafından absorbe edildiği saptanmıştır (Ulm vd., 2004; Molinier vd., 2005; Schuch vd., 2013).

Bu çalışmada tek tür buğday üzerine uygulanan UV-C stresinin genetik ve epigenetik etkileri araştırılmıştır. RAPD, CRED-RA ve IRAP yöntemlerinden alınan sonuçlar doğrultusunda artan UV-C'nin metilasyona ve metilasyona bağlı olarak polimorfizme, genom yapısında hasara neden olduğunu göstermektedir.

6. ÖNERİLER

Günümüz dünyasında insan faaliyetlerinin zararlı etkilerinin artmasıyla birlikte meydana gelen küresel ısınma sonucu ekosistem artık kendisini yenileyemez hale gelmektedir. Bunun sonucunda dünyamızı çevreleyen ve zararlı UV-C ışınlarını filtreleyen ozon tabakası ozon antagonisti olan gazların salınımına bağlı olarak gün geçtikçe konsantrasyonunda azalma gözlenmektedir. Ekosistemin kendini yenileyememesi, zararlı UV-C ışınlarının filtrelenememesi ve bu ışınların gün geçtikçe dünya üzerindeki etkisinin artması canlı ve cansız çevreyi olumsuz etkilemektedir.

UV-C'nin neden olduğu zarar günümüzde yeterince fark edilemede ileriki yıllarda maruz kalınan doz ve etkilediği canlı sayısında artış meydana gelmesi kaçınılmaz olacaktır. Bu alanda yapılan çalışmaların artması gelecekte toplumların kalkınması ve doğal dengenin korunması açısından önem arz etmektedir.

UV-C stresinin etkilerini iyileştirmeye yönelik bir takım yaklaşımlarda bulunup çalışmaları geliştirmek gerekmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda UV-C'nin genetiksel değişikliğe sebep olduğu mekanizmalarının aydınlatılması önemlidir. Epigenetiksel mekanizmalardan DNA metilasyonu dışında diğer epigenetiksel mekanizmaların çalışılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, S. B., Singh, S. and Agrawal, M. (2009) "Ultraviolet-B induced changes in gen expression and antioxidants in plants", *Advances in Botanical Research*, 52, 47-86.
- Aina, R., Sgorbati, S. and Santagostino, A. (2004) "Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp", *Physiology Plant*, 121(3), 472-480.
- Akın, G. (2006) "Küresel Isınma, Nedenleri ve Sonuçları", *DTCF Dergisi*, 46(2), 29-43.
- Akıncı, C., Gül, İ., ve Baysal, İ. (1998) "Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşidi tohumlarına uygulanan farklı dozlardaki gama ışınlarının M1 fidelerindeki etkileri", *V. Ulusal Nükleer Tarım ve Hayvancılık Kongresi*, Konya, 20-3.
- Alscher, R. G., Donahue, J. L. and Cramer, C. L. (1997) "Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells", *Physiology Plant*, 100, 224-233.
- Alexieva, V., Sergiven, I., Mapelli, S. and Karanova, E. (2001) "The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat", *Pant, Cell & Enviromental*, 24(12), 1337-1344.
- Almoguera, C., Coca, M. A. and Jordano, J. (1993) "Tissue specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress", *Plant Journal*, 4, 947-958.
- Alzohairy, A. M., Gyulai, G., Ramadan, M. F., Edris, S., Sabir J. S. M., Jansen, R. K. and Bahieldin, A. (2014) "Retrotransposon based molecular markers for assessment of genomic diversity", *Functional Plant Biology*, 41(8), 781.
- An, L., Feng, H., Tang, X. and Wang, X. (2000) "Changes of microsomal membraneproperties in spring wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation", *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 57(1), 60-65.
- Anderson, J. G., Toohey, D. W. and Brune, W. H. (1991) "Free radicals within the antarctic vortex: the role of CFCs in antarctic ozone loss", *Science*, 231, 39-46.
- Ashwin, L. and Schroeder, D. (2011) "UV damaged dna repair and tolerance in plants", *Selected Topics in DNA Repair*, 73-74.
- Aygun Erturk, F., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G., Aydin, M. and Taspınar, M. S. (2014) "Effects of lead sulfate on genetic and epigenetic changes and endogenous hormone levels in corn (*Zea mays* L.)", *Polish Journal of Environmental Studies*, 23, 1925-1932.

- Aygun Erturk, F., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G., Aydin, M. And Şahin, Z. (2014) “Determination of genomic instability and DNA methylation effects of Cr on maize (*Zea mays* L.) using RAPD and CRED-RA analysis”, *Acta Phsiol Plant*, 36, 1529-1537.
- Ayhan, B. (2006) “Mısır (*Zea mays* L.)’in bazı çeşitlerinde ağır metal (Cd, Pb) stresinin etkilerinin belirlenmesi”, Yayınlanmamış Yüksek lisans tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 7-8.
- Baek, D., Jiang, J., Chung, J. S., Wang, B., Chen, J., Xin, Z. and Shi, H. (2011) “Regulated AtHKT1 gene expression by a distal enhancer element and DNA methylation in the promoter plays an important role in salt tolerance”, *Plant Cell Physiology*, 52, 149-161.
- Batista, L. F., Kaina, B., Meneghini, R. and Menck, C. F. (2009) “How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis”, *Mutation Research*, 681(2-3), 197-208.
- Bennetzen, J. L. (2000) “Transposable elements contributions to plant gene and genome evolution”, *Plant Molecular Biology*, 42, 251-269.
- Bennetzen, J. L. and Wang, H. (2014) “The contributions of transposable elemnts to he structure, function and evolution of plant genomes”, *Annual Review of Plant Biology*, 65, 505-503.
- Bilichak, A., Ilnystkyy, Y., Hollunder, Y. and Kovalchuk, I. (2012) “The progeny of *Arabidopsis Thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expressio”, *PLoS One*, 7, 1-15.
- Blum, A. and Jordan, W. (1985) “Breeding crop varieties for stress environments”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199-238.
- Bourbousse, C., Mestiri, I., Zabulon, G., Bourge, M., Formiggini, F., Koini, M., Brown, S., Frasz, P., Bowler, C. and Barneche, F. (2015) “Light signaling controls nuclear architecture reorganization during seedling establishment”, *PNAS*, 112 (21), 2836-2844.
- Bolukbasi, E. and Aras, E. (2016) “Determination of DNA Methylation Levels with CRED-RA Technique in the Genome of Sunflower Seedlings (*Helianthus annuus* L.) Subjected to Zinc Stress”, *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 1(3), 2456-1878.
- Bray, E. A., Bailey Serres, J. and Weretilnyk, E. (2000) “Responses to abiotic stresses”, *American Society of Plant Physiologists*, 158-1249.
- Britt, A. B. (1995) “Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation”, *Plant Physiology*, 108, 891-896.

- Cadet, J. and Wagner, J. R. (2013) "DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents and UV radiation", *Cold Spring Harb Perspect. Biology*, 5(2), a012559.
- Casati, P. and Andreo, C. S. (2001) "UV-B and UV-C induction of NADP-malic enzyme in tissues of different cultivars of *Phaseolus vulgaris*", *Plant, Cell & Environment*, 24(6), 621-630.
- Casati, P. and Walbot, V. (2004) "UV-B maize rapid transcriptome responses in irradiated and protected tissues", *Genom Biology*, 5, R16.
- Casati, P., Campi, M., Morrow, D. J., Fernandes, J. F. and Walbot, V. (2011) "Transcriptomic, UV-B signaling proteomic and metabolomic analysis in maize", *BMC Genomics*, 12, 321.
- Caspari, T. (2000) "How to activate p53", *Current Biology*, 10, 315-R317.
- Castrillo, G., Sanchez Bermejo, E., Lorenzo, L., Crevillen P., Fraile Escanciano, A. and Mohan, T. C. (2013) "WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 25, 2944-2957.
- Cenkci, S., Yildiz, M., Cigerci, I. H., Konuk, M. and Bozdag, A. (2009) "Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings", *Chemosphere*, 76(7), 900-906.
- Chandler, V. L. and Walbot, V. (1986) "DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity", *Proceeding Natural Academy Sciences*, 83(6), 1767-71.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J. K. (2007) "Cold stress regulation of gene expression in plants", *Trends Plant Sciences*, 12, 444-451.
- Choi, C. S. and Sano, H. (2007) "Abiotic stress induced demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase like protein in tobacco plants", *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 589-600.
- Colaneri, A. C. and Jones, A. M. (2013) "Genome wide quantitative identification of DNA differentially methylated sites in *Arabidopsis* seedlings growing at different water potential", *PLoS One*, 8, e59878.
- Coohill, T. P. (1989) "Ultraviolet action spectra (280 nm to 380 nm) and solar effectiveness spectra of higher plants", *Photochemistry Photobiology*, 30, 431-437.
- Çelik, A., and Eraslan, F. (2015) "Effects of exogenous nitric oxide on mineral nutrition and some physiological parameters of maize grown under salinity stress", *Sdu Journal Of The Faculty Of Agriculture*, 10(1), 55-64.

- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H. (2011) “Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları”, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11, 11-34.
- Dat, J., Vandenaabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000) “Dual action of the active oxygen species during plant stress responses”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(5), 779-795.
- Delgado, M., Munoz Elias, E. J., Kan, Y., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D. E. and Gomariz, R. P. (1998) “Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun”, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 31427-31436.
- Dönmez, A. E., Kalay., M, Özkan., F. ve Koyuncu, C. E. (2006) “FMC ve malahat yeşili sağaltım dozlarının *Oreochromis niloticus*'un bazı kan parametrelerinde meydana getirdiği değişimler”, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23, 61-64.
- Dubeau, L., Chandler, L., Gralow, J., Nicholas, P. And Jones, P. (1986) “Southern Blot Analysis of DNA Extracted from Formalin-fixed Pathology Specimens”, *Cancer Research*, 46(6), 2964-2969.
- Eads, C. A. and Laird, P. W. (2000) “Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)”, *Methods in Molecular Biology*, 200, 71-86.
- Ekici, M. ve Aksoy, B. (2001) “Ultraviyole radyasyon teknik raporu”, *DMİ Genel Müdürlüğü*, 20-25.
- Fan, F., Cui, B., Zhang, T., Ding, G. and Wen, X. (2014) “LTR retrotransposon activation, IRAP marker development and its potential in genetic diversity assessment of masson pine (*Pinus massoniana*)”, *Tree Genetics & Genomes*, 10, 213-222.
- FAOSTAT, “2018 Dünya ve Türkiye buğday üretim istatistikleri”, www.fao.org,
Son erişim tarihi: (28.02.2018).
- Federoff, N. (2000) “Transposons and genome evolutions in plant”, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7002-7007.
- Fedoroff, N.V., Kung, S. D. and Yang, S. F. (1998) “Discoveries in Biology”, *World Scientific*, 1, 89-104.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S. R. (2002) “Plant transposable elements: where genetics meets genomics”, *Nature Reviews Genetics*, 3, 329-341.
- Frederick, J. E. (1993) “Ultraviolet sunlight reaching the Earth's surface A review of recent research”, *Photochemistry and Photobiology*, 37, 173-178.

- Frohnmeier, H. and Staiger, D. (2003) "Ultraviolet-B radiation mediated responses in plants. balancing damage and protection", *Plant Physiology*, 133(4), 1420-1428.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. and Paul, C. L. (1992) "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827-1831.
- Galvao, V. C. and Fankhauser, C. (2015) "Sensing the light environment in plants: Photoreceptors and early signaling steps", *Current Opinion Neurobiology*, 34, 46-53.
- Godoy, J. A., Pardo, J. M. and Pintor Toro, J. A. (1990) "A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern", *Plant Molecular Biology*, 15, 695-705.
- Golldack, D., Lüking, I. and Yang, O. (2011) "Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network", *Plant Cell Reports*, 30(8), 1383-1391.
- Gonzalogo, M. L. and Jones, P. A. (1997) "Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)", *Nucleic Acids Research*, 25, 2529-2531.
- Grandbastien, M. A. (2015) "LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849 (4), 403-416.
- Grandbastien, M. A., Lucas, H., Morel, J. B., Mhiri, C., Verbhettes, S. and Casacuberta, J. M. (1997) "The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is linked to plant defence response", *Genetica*, 100, 241-252.
- Hashida, S. N., Uchiyama, T., Martin, C., Kishima, Y., Sano, Y. and Mikami, T. (2006) "The temperature dependent change in methylation of the Antirrhinum transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase", *Plant Cell*, 18(1), 104-118.
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. and Hottiger, M. O. (2006) "Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 789-829.
- Hauser, M. T., Aufsatz, W., Jonak, C. and Luschnig, C. (2011) "Transgenerational epigenetic inheritance in plants", *Biochimica Biophysica Acta*, 1809, 1-10.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1996) "Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands", *Proceedings National Academy Sciences*, 93(18), 9821-9826.

- Hirochika, H., Otsuki, H., Yoshikawa, M., Otsuki, Y., Sugimoto, K., Takeda, S., (1996) "Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon Tto1 in rice", *Plant Cell Online*, 8, 725-734
- Hoisington, D., Bohorova, N., Fennell, N. S., Khairallah, M., Pellegrineschi A. and Ribout, J. M. (2002) "Plant production and protection series", *FAO document respositor*, 85-92.
- Huang, J., Zhang, K., Shen, Y., Huang Z., Li, M., Tang, D., Gu, M and Cheng, Z. (2009) "Identification of a high frequency transposon induced by tissue culture *nDaiz*, a member of the *hAT* family in rice", *Genomics*, 93, 274-281.
- Jeddeloh, J. A. and Richards, E. J. (1996) "mCCGmethylation in angiosperms", *Plant Journal*, 9, 579-586.
- Kadıoğlu, A. (2004) "Bitki Fizyolojisi", *Lokman Yayın*, Trabzon, 453.
- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F. and Rhee, Y. (2000) "Epigenetic aspects of somaclonal variation", *Plant Molecular Biology*, 43,179–188.
- Kalefetoğlu T. and Ekmekci Y. (2005) "The effects of drought on plants and tolerance mechanisms", *Gazi University Journal of Science*, 18, 723-740.
- Kalendar, R., Flavell, A. J., Ellis, T., Stakste, T., Moisy, C. and Schulman, A. H. (2011) "Analysis of plant diversity with molecular retrotransposon-based markers", *Heredity*, 106, 520-530.
- Kalendar, R., Grop, T., Regina, M., Suoniemi, A. and Schulman, A. (1999) "IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques", *Theor Appl Genet*, 98, 704-711.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E. and Schulman, A. (2000) "Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence", *Proceeding Natural Academy Sciences*, 97, 6603-6607.
- Korkmaz, H. ve Durmaz, A. (2017) "Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Verdiği Cevaplar ", *GÜFBED*, 7(2), 192-207.
- Kovarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M. and Opatrny, Z. (1997) "Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress", *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 301-306.
- Kravets, A. P., Mousseau, T. A., Litvinchuk, A. V., Ostermiller, S. and Vengzhen, G. S. (2010) "Changes in DNA methylation pattern in wheat plants under chronic γ -exposure of seeds", *Tsitol Genetika*, 44,18-22.
- Kravets, A., Sokolova, D., Vengzhen, G. and Grodzinsky, D. (2013) "Corn plant DNA methylation pattern changesat UV-C irradiation fractionating", *Published in sitologiya Genetika*, 47(1), 37-43.

- Kravets, E. A., Zelena, L. B., Zabara, E. P. and Blume Y. B. (2012) “Adaptation strategy of barley plants to UV-B radiation”, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), 632-645.
- Kubis, S. E., Castilho, M., Vershinin, A.V. and Heslop Harrison, J. S. (2003) “Retroelements, retrotransposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation”, *Plant Molecular Biology*, 52, 69-79.
- Levitt, J. (1972) “Responses of plants to environmental Stresses”, *Academic Press*, 1972, 697.
- Lippman, Z., Gendrel, A. V. and Black, M. (2004) “Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control”, *Nature*, 430, 471-476.
- Liu, B. and Wendel, J. F. (2000) “Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants”, *Genome Research*, 14, 860–869.
- Lv, Z., Zhang, X., Liu, L., Guo, Y., Fan, Y., Yan Yang, X., Li, Y. and Wen Hui, Z. (2013) “Comparing intraspecific responses of 12 winter wheat cultivars to different doses of ultraviolet-B radiation”, *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 119, 1-8.
- Madhova, K., V., Raghavendra, A., S. and Janardhan, K. (2005) “Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants”, *Springer*, 345-7.
- Madronich, L. O., McKenzie, L. O. and Bjorn, M. M. (1998) “Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth’s surface”, *Journal of Photochemistry Photobiology*, 46, 5-19.
- Madronich, S. (1993) “The atmosphere and UV-B radiation at ground level”, *Environmental UV Photobiology*, 1-39.
- Madronich, S. (1992a) “Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface”, *An Agu Journal*, 19, 37-40.
- Majer, P. and Hideg, E. (2012) “Existing antioxidant levels are more important in acclimation to supplemental UV-B irradiation than inducible ones: Studies with highlight pretreated tobacco leaves”, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, 598-606.
- Martinez Luscher J., Torres N., Hilbert G., Richard T., Sanchez Diaz M. and Delrot S. (2014) “Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries”, *Phytochemistry*, 102, 106-114.
- McFarland, M. and Kaye, I. (1992) “Chlorofluorocarbons and ozone Photo-chem”, *Photobiology*, 33, 911-929.

- Migicovsky, Z. and Kovalchuk, I. (2014) “Transgenerational changes in plant physiology and in transposon expression in response to UV-C stress in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Signal Behav*, 9(11), e976490.
- Molinier, J. (2017) “Genome and epigenome surveillance processes underlying UV exposure in plants”, *Genes*, 8, 316.
- Molinier, J., Oakeley, E. J., Niederhauser, O., Kovalchuk, I. and Hohn, B. (2005) “Dynamic response of plant genome to ultraviolet radiation and other genotoxic stresses”, *Mutation Research*, 571(1-2), 235–247.
- Morales, J. F., Snow, E. T. and Murnane, J. P. (2003) “Environmental factors affecting transcription of the human L1 retrotransposon II stressors”, *Mutagenesis* 18(2), 151-158.
- Ohlsson A. B., Segerfeldt P., Lindstrom A., Borg Karlson A. K. and Berglund T. (2013) “UV-B exposure of indoor grown *Picea abies* seedlings causes an epigenetic effect and selective emission of terpenes”, *Zeitschrift für Naturforschung*, 68, 139-147.
- O’Kane, D., Gill, V., Boyd, P. and Burdon, R. H. (1996) “Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus”, *Planta*, 198, 366-370.
- Özbey, E. (2014) “*Deinococcus radiodurans* ve rekombinantlarının UV-C, ağır metal dirençliliği ve biyosorpsiyon yeteneği”, Yayınlanmamış Doktora Tezi, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi*, Malatya, 50.
- Özgen, M., Adak, S., Söylemezoğlu, G. ve Ulukan, H. (2000) “Bitki genetik kaynaklarının korunma ve kullanımında yeni yaklaşımlar”, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi*, Ankara, 80,86.
- Öztürk, M. ve Seçmen, Ö. (1992) “Bitki Ekolojisi”, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, İzmir, 141.
- Pecinka, A., Rosa, M., Schikora, A., Berlinger, M., Hirt, H., Luschnig, C. and Mittelsten Scheid, O. (2009) “Transgenerational stress memory is not a general response in *Arabidopsis thaliana*”, *Plos One*, 4(4), e5202.
- Rahımı, M., Ramezani, M. ve Kordrostamı, M. (2017) “Seleksiyon endekslerini kullanarak kuraklık stresi ve stres olmayan koşulları altında en iyi çeltik çeşitlerinin seçimi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27 (4), 473-480.
- Ries, G., Buchholz, G., Frohnmeyer, H. and Hohn, B. (2000) “UV damage mediated induction of homologous recombination in *Arabidopsis thaliana* is dependent on photosynthetically active radiation”, *Proceeding Natlural Academy Sciences*, 24, 13425-13429.

- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H. K. and Hohn, B. (2000) "Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants", *Nature*, 406, 98-101.
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2002) "The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco", *Plant Physiology*, 130(3), 1143-51.
- Sabot, F. and Schulman, A. H. (2006) "Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome", *Heredity*, 97, 381-388.
- Schuch, A. P., Garcia, C. C., Makita, K. and Menck, C. F. (2013) "DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight Photochemistry", *Photobiology Sciences*, 8, 1259-1272.
- Schulman, A. H. (2013) "Retrotransposon replication in plants", *Current Opinion in Virology*, 3(6), 604-14.
- Shinkle, J. R., Edwards, M. C., Koenig, A. and Shaltz, A. (2010) "Photomorphogenic regulation of increases in UV-absorbing pigments in cucumber (*Cucumis sativus*) and *Arabidopsis thaliana* seedlings induced by different UV-B and UV-C wavebands", *Physiology Plant*, 138, 113-121.
- Sokolova, D., Vengzhen, G. and Kravets, A. (2014) "The effect of DNA methylation modification polymorphism of corn seeds on their germination rate, seedling resistance and adaptive capacity under UV-C exposure", *American Journal of Plant Biology*, 1, 1-14.
- Steward, N., Kusano, T. and Sano, H. (2000) "Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells", *Nucleic Acids Research*, 28, 3250-3259.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H. and Hirochika, H. (1999) "A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors", *Plant Journal*, 18, 383-393.
- Tan, M. (2010) "Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation sensitive amplified polymorphism", *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 21-26.
- Taşpinar, M., Aydin, M., Sigmaz, B., Yagci, S., Arslan, E. and Agar, G. (2017) "Aluminum induced changes on dna damage, dna methylation and LTR retrotransposon polymorphism in maize", *Arabian Journal for Science and Engineering*, 1-9.

- Tekdal, S., ve Yıldırım, M. (2015), “Sıcaklık stresine maruz bırakılan bazı makarnalık buğday çeşitlerinin kalite özelliklerinin incelenmesi”, *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (2) 68-76.
- Temel, A., Kartal, G. ve Gozukirmizi, N. (2008) “Arpa calli kültürlerinde genetik ve epigenetik varyasyonlar”, *Biotechnology Biyoteknoloji Deneyleri*, 22, 911-914.
- Tıprıdamaz, R. ve Çakırlar, H. (1990) “Buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinin Türkiye’de yetiştirilen iki çeşidinde tuz ve su stresinin oransal su kapsamı prolin ve betain değişimine etkisi” *Turkish Journal of Biology*, 14, 125-148.
- Tuna, A. ve Eroğlu, B. (2017) “Tuz stresi altındaki biber (*Capsicum Annuum* L.) bitkisinde bazı organik ve inorganik bileşiklerin antioksidatif sisteme etkileri.”, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32(1), 121-131.
- TÜİK, (2016) “Tarım İstatistikleri Özeti”,
http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
Son erişim tarihi: 10.04.2016.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Mate, Z., Adam, E., Oakeley, E. J., Schafer, E. and Nagy, F. (2004) “Genome wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis thaliana*”, *Proceeding Natural Academy Sciences*, 5, 1397-1402.
- Valledor, L., Canal, M. J., Pascual, J., Rodríguez, R. and Meijon, M. (2012) “Early induced protein 1 (PrELIP1) and other photosynthetic, stress and epigenetic regulation genes are involved in *Pinus radiata* D. Don UV-B radiation response”, *Physiologia Plantarum*, 146(3), 308-320.
- Voytas, D. F. and Boeke, J. D. (2002) “Ty1 and Ty5 of *Saccharomyces cerevisiae* in mobile DNA”, *ASM press*, 631-662.
- Waddington, C. (1942) “The Epigenotype.”, *Endeavour*, 1, 18-20.
- Wicker, T. and Keller, B. (2007) “Genome wide comparative analysis of copia retrotransposons in Triticeae, rice, and Arabidopsis reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families”, *Genome Research*, 17, 1072-1081.
- Wicker, T., Sabot, F., Huan-Van, A., Bennetzen, J., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A. and Leroy, P. (2007) “A unified classification system for eukaryotic transposable elements”, *Nature Genetics*, 8, 973-982.
- Willing, E. M., Piofczyk, T., Albert, A., Winkler, J. B., Schneeberger, K. and Pecinka, A. (2016) “UVR2 ensures transgenerational genome stability under simulated natural UV-B in *Arabidopsis thaliana*”, *Nature Communications*, 7, 13522.
- Yin, R. and Ulm, R. (2017) “How plants cope with UV-B from perception to response”, *Current Opinion Plant Biology*, 37, 42-48.

- Yong, Z., Zhao Hui, L., Cheng, L., Zu Jun, Y., Ke Jun, D., Jin Hua, P., Jian Ping, Z., Guang Rong, L., Zong Xian, T. and Zheng Long, R. (2008) “Analysis of DNA methylation variation in wheat genetic background after alien chromatin introduction based on methylation sensitive amplification polymorphism”, *Chinese Science Bulletin*, 53, 58-69.
- Zhang, X.Y., Yazak, J. and Sundaresan, A. (2006) “Genome wide high resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*”, *Cell*, 126, 1189-1201.
- Zhong, L., Xu, Y. and Wang, J. (2009) “DNA methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*”, *African Journal of Biotechnology*, 8, 6201-6207.
- Zlatev, Z. S., Lidon, F. J. C. and Kaimakanova, M. (2012) “Plant physiological responses to UV-B radiation”, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, 481-501.

EKLER

Ek-1 Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Yıldırım Doğan, N., Agar, G., Bulut, H. ve Akgün, Ü. (2015) “*Vicia faba*’da Fibronilin Genetik ve Epigenetiksel Etkisinin IRAP Yöntemi ile Araştırılması”, **18. Biyoteknoloji Kongresi**, Konya, 194-194.

Yıldırım Doğan, N., Bulut, H. and Akgün, Ü. (2017) “Determination of DNA methylation level in wheat exposed to UV-C by CRED-RA”, **International INES Academic Researches Congress-INES-2017**, Antalya, 470-470.

Yıldırım Doğan, N., Bulut, H. and Akgün, Ü. (2017) “DNA methylation in wheat exposed to UV-C”, **Ecology 2017 International Symposium**, Kayseri, 517-517.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Malatya’da doğdu. İlk ve ortaokulu eğitimini Malatya Akçadağ ilçesi Ziya Gökalp İlköğretim okulunda tamamladı. Malatya Anadolu kız meslek lisesi web tasarım bölümünde eğitimini tamamladı. 2014 yılında Erzincan Üniversitesi Biyoloji bölümünde eğitimini tamamladı. 2014’de Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Biyoloji bölümü moleküler biyoloji alanında yüksek lisans eğitimine başladı.

