

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYÇİÇEĞİ (*HELİANTHUS ANNUUS* L.) BİTKİSİ TOHUMLARININ
ÇİMLENMESİNDE ÇİNKO (Zn^{+2}) STRESİ İLE PROTEİN İÇERİĞİ, DNA VE
DNA METİLASYON MODELİNDEKİ MEYDANA GELEN OLASI
DEĞİŞİMLERİN MOLEKÜLER MARKÖRLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Ekrem BÖLÜKBAŞI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2013

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AYÇİÇEĞİ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) BİTKİSİ TOHUMLARININ ÇİMLENMESİNDE
ÇİNKO (Zn^{+2}) STRESİ İLE PROTEİN İÇERİĞİ, DNA VE DNA METİLASYON
MODELİNDEKİ MEYDANA GELEN OLASI DEĞİŞİMLERİN MOLEKÜLER
MARKÖRLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Ekrem BÖLÜKBAŞI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Ağır metal kontaminasyonu dünyada önemli bir çevresel problemdir. Yüksek konsantrasyonlardaki ağır metaller hücrelerde ve dokularda kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Bu çalışmada ayçiçeği bitkisinde ağır metallerin toksik etkilerinin populasyon ve moleküler parametrelerde meydana getirdiği değişimlerin tespiti amaçlanmıştır. Çinko (Zn^{+2}) metalinin ayçiçeği tohumları üzerine etkileri; populasyon parametrelerinden kök uzunluğu, gövde uzunluğu ve toplam çözümlü protein miktarındaki değişimler kullanılarak belirlenmiştir. Ayçiçeği bitkisine ait total protein miktarında artan metal konsantrasyonlarına ters yönde bir ilişki tespit edilmiştir. Çinko ağır metalinin ayçiçeği bitkisindeki genotoksik etkisi ise RAPD ve CRED-RA teknikleri ile incelenmiştir. RAPD analizi için 14 RAPD primeri kullanılmış 165 özgün polimorfik bant paterni gösterdiği bulunmuştur. CRED-RA analizi için kesin ve net bantlar veren 8 primer kullanılmıştır. Çinko ağır metale maruz kalan ayçiçeğinde, hem populasyon seviyesinde hem de moleküler seviyede önemli ölçüde değişimler gözlenmiştir. Çalışma sonucunda çinko ağır metalinin ayçiçeği için genotoksik bir ajan olduğu belirlenmiştir.

Haziran 2013, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, çinko, toplam çözümlü protein, RAPD, CRED-RA.

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF THE IMPACT OF ZINC (Zn^{+2}) STRESS ON PROTEIN CONTENT AND ALSO ON THE PROBABLE CHANGES IN DNA METHYLATION MODELS BY MOLECULAR MARKERS IN SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) PLANT SEED GERMINATION

Ekrem BÖLÜKBAŞI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Heavy-metal contamination is an important environmental problem in the world. High concentrations of heavy metals cause permanent damages to cells and tissues. In this study, the toxic effects of heavy metals in sunflower plant, in population and in molecular parameters were investigated. The effects of Zinc metal on sunflower seeds were determined using the changes in population parameters; root length, body length, and total soluble protein content. Total protein content of sunflower plant was determined in a relationship in the opposite direction increasing the amount of metal concentrations. Genotoxic effects of heavy metal of zinc on sunflower plants were investigated with RAPD and CRED-RA techniques. 14 RAPD primers were used for the analysis of RAPD and 165 polymorphic band patterns were found to be authentic. 8 primers that yielded precise and clear bands were used for the analysis of CRED-RA. Serious changes were observed in sunflower plants that were exposed to zinc heavy metal both at the population level and at the molecular level. As a result of the study the heavy metal zinc was determined as a genotoxic agent for sunflower plant.

June 2013, 100 pages

Key Words: Sunflower, zinc, total soluble protein, RAPD, CRED-RA.

TEŐEKKÖR

Bu çalıőmamda ve lisanüstü eğitimimde benden yardımlarını, bilgilerini ve önerilerini esirgemeyen ve çalışmanın her aşamasında beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) yardımlarıyla karşılaőtığım sorunları aőmamı sağlayan laboratuvarıda birlikte vakit geçirdiğim arkadaşlarıma, ayrıca her an yanımda olan eőime ve tüm ailelerimize sonsuz sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

Ekrem BÖLÜKBAŞI

Ankara, Haziran 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLERİ DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Ayçiçeğinin Tarihçesi ve Orjini	1
1.2 Ayçiçeğinin Bitkisel Özellikleri	5
1.2.1 Kök...	5
1.2.2 Gövde	5
1.2.3 Yaprak....	5
1.2.4 Tabla	6
1.2.4.1 Çanak yapraklar	6
1.2.4.2 Taç yapraklar	6
1.2.5 Tabla çemberi	6
1.3 Ayçiçeği Bitkisinin Ekolojik Gereksinimleri İstekleri	7
1.3.1 Isı	7
1.3.2 Su isteği	7
1.3.3 Işık isteği	8
1.3.4 Toprak isteği	8
1.4 Çevre Kirliliği ve Etkileri	8
1.4.1 Çevre kirliliği	8
1.4.2 Çevre kirliliğinin canlılar üzerine etkileri	9
1.4.3 Ağır metaller	10
1.4.4 Ağır metallerin canlılar üzerine etkileri	12
1.4.5 Çinko (Zn ²⁺) ağır metalinin etkileri	16
1.4.6 Bitkilerde ağır metal stresine karşı oluşturulan cevaplar	17
1.4.7 Ağır metallerin detoksifikasyon mekanizmaları	20
1.5 Epigenetik	21
1.5.1 Epigenetik mekanizmaların kalıtımı	22
1.5.2 Epigenetik mekanizmalar	24
1.6 DNA Metilasyonu	26
1.6.1 DNA metiltransferazlar	28
1.6.2 Bitkilerde DNA metilasyonu	30
1.6.3 DNA metilasyonunun değerlendirilmesi için metodlar	32
1.6.4 DNA metilasyonunun değerlendirilmesi için diğer uygulamalar	34
1.7 Moleküler Belirteçler	35
1.7.1 Hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri	36
1.7.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı)	36
1.7.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)’a dayalı DNA belirteçleri	36
1.7.2.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Çoğaltılmış Parça Uzunluk Farklılığı)	37

1.7.2.2 SSR (Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarları).....	37
1.7.2.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region – Dizin Karakterli Çoğaltılmış Bölge)	38
1.7.2.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)	39
2. KAYNAK ÖZETLERİ	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	46
3.1 Materyal Temini	46
3.2 Yöntem	46
3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonu	46
3.2.2 Çimlendirme	46
3.2.3 Çinko (Zn^{+2}) çözeltisi hazırlanması ve uygulanması	46
3.3 Ölçüm ve Uygulamalar	47
3.3.1 Bitki kök ve gövde boylarının belirlenmesi	47
3.3.2 Toplam çözünür protein içeriğinin belirlenmesi (Bradford Metodu)	47
3.3.3 DNA izolasyonu	48
3.3.4 RAPD uygulamaları	49
3.3.4.1 RAPD bileşenleri ve koşulları	50
3.3.4.2 Agaroz jel elektroforezi	51
3.3.5 CRED-RA tekniği ile metilasyon uygulaması	51
3.3.5.1 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi	51
3.3.5.2 PCR bileşenleri ve koşulları	52
3.4 Veri Analizleri	52
3.4.1 Örneklerin toplam çözünür protein konsantrasyonunun hesaplanması	52
3.4.2 RAPD verilerinin yorumlanması	53
3.4.3 CRED-RA verilerinin değerlendirilmesi	53
4. BULGULAR.....	55
4.1 Yetiştirilen Ayçiçeği Örnekleri	55
4.2 Fide Gelişim Evresinde Ayçiçeği Bitkisinin Kök ve Gövde Büyümesi Üzerine Çinko Stresinin Etkisi	58
4.3 Çinko Stresinin Ayçiçeği Bitkisinde Toplam Çözünür Protein Miktarına Etkisi	59
4.4 RAPD-PCR Bulguları	59
4.5 CRED-RA Bulguları	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	86
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrad
M	Molar
Mm	Milimolar
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
G	Gram
dH ₂ O	Distile su
L	Litre
CO ₂	Karbondioksit
Cl ⁻	Klor
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH	Hidroksil
O ₂	Oksijen
ROT	Reaktif oksijen türlerinin
ROO ⁻	Peroksil radikali
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
K	Potasyum
Na	Sodyum
RNA	Ribonükleik Asit
cDNA	Tamamlayıcı DNA
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
BSA	Bovine Serum Albumin
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilen Daimin Tetraasetik Asit
GKS	Genomik Kalıp Stabilitesi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
SSR	SSR Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats)
Ha	Hektar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber Weiss ve Fentom reaksiyonu	18
Şekil 1.2 Ağır metal bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu	19
Şekil 1.3 Hidroksil radikalının oluşumu ve etkileri	20
Şekil 1.4 Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyon mekanizması	21
Şekil 1.5 Epigenetik mekanizmalar	25
Şekil 1.6 Metil grubu ve bağlanma yerleri	26
Şekil 1.7 Sitozinin metillenmesi	27
Şekil 1.8 DNA metilasyonu	27
Şekil 1.9 Desitabin'in (5-aza-2'-deoksisitidin) yapısı	29
Şekil 1.10 Normal ve kanserli hücre arasındaki gen ifadesi	29
Şekil 1.11 Normal ve kanserli hücre arasındaki metilasyon farkı	30
Şekil 1.12 De novo metilasyon ve maintenance metilasyon	31
Şekil 4.1 Oda sıcaklığında üç hafta boyunca, farklı çinko konsantrasyonlarında gelişen örneklerle ait kök uzunlukları	58
Şekil 4.2 Oda sıcaklığında üç hafta boyunca, farklı çinko konsantrasyonlarında gelişen örneklerle ait gövde uzunlukları	58
Şekil 4.3 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetiştirilen ayçiçeği örneklerine ait total protein içeriği ölçümleri	59
Şekil 4.4 OPC-01 ve OPC-02 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	60
Şekil 4.5 OPC-04 ve OPC-05 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	60
Şekil 4.6 OPC-06 ve OPC-08 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	61
Şekil 4.7 OPC-09 ve OPC-10 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	61
Şekil 4.8 OPC-07 ve OPC-11 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	62
Şekil 4.9 OPA-03 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	62
Şekil 4.10 OPF-05 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	63
Şekil 4.11 OPA-08 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	63
Şekil 4.12 OPB-07 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü	64
Şekil 4.13 Primerlere ait polimorfizm oranlarının değişimi	65
Şekil 4.14 GKS oranlarındaki % değişim	66
Şekil 4.15 Metilasyon tiplerinin tüm primerlere göre ortalama % oranları	69
Şekil 4.16 OPC-01 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	70
Şekil 4.17 OPC-01 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	71
Şekil 4.18 OPC-02 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	72
Şekil 4.19 OPC-02 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	73
Şekil 4.20 OPC-04 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	74
Şekil 4.21 OPC-04 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	75
Şekil 4.22 OPC-06 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	76
Şekil 4.23 OPC-06 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	77
Şekil 4.24 OPC-05 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	78
Şekil 4.25 OPC-05 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	79
Şekil 4.26 OPC-08 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	80
Şekil 4.27 OPC-08 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	81
Şekil 4.28 OPC-11 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	82
Şekil 4.29 OPC-11 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	83

Şekil 4.30 OPA-03 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları	84
Şekil 4.31 OPA-03 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Dünyada ayçiçeği üreten başlıca ülkeler ve üretim miktarları	4
Çizelge 1.2 Türkiye ayçiçeği ekiliş, üretim, verim miktarları ve % değişim	4
Çizelge 1.3 Türkiye'nin ayçiçeği yağı üretim miktarı ve % değişimleri	4
Çizelge 1.4 Ağır metallerin çevreye yayınında en etkin olan endüstriyel faaliyetler	11
Çizelge 1.5 Bazı önemli ağır metallerin ekolojik sınıflandırması	12
Çizelge 1.6 Ağır metallerin insanlardaki karsinojenik etkileri	15
Çizelge 1.7 Ağır metallerin deney hayvanlarında karsinojenik etkileri	16
Çizelge 3.1 Nanodrop sonuçları	48
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan primerler ve dizi bilgileri	50
Çizelge 3.3 HpaII ve MspI restriksiyon enzimlerinin kesim yeteneklerine göre oluşturulmuş metilasyon tipleri	53
Çizelge 3.4 Var-Yok olarak skorlanan CRED-RA bantlarının ifade ettiği metilasyon tipleri	54
Çizelge 4.1 Örneklere ait bant farklılıkları	64
Çizelge 4.2 Primerlere ait polimorfizm oranları	65
Çizelge 4.3 Çinko stresi uygulanan örneklere ait GTS oranları	66
Çizelge 4.4 CRED-RA analizinde kullanılan primerler ve dizi bilgileri	67
Çizelge 4.5 Seçilen primeler ile yapılan CRED-RA sonuçlarının değerlendirilmesiyle oluşturulan metilasyon tiplerinin % oranları	68

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1 Ayçiçeği bitkisi	1
Resim 1.2 Ayçiçeği bitkisinin çiçeği ve tohumları	7
Resim 1.3 Çinkonun kimyasal özellikleri	16
Resim 4.1 Yetiştirilen bitki örneklerinin genel görünüşü	55
Resim 4.2.a. Kontrol grubu ayçiçeği örnekleri, b. 20 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, c. 20 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, d. 80 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri.....	56
Resim 4.2.e. 160 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, f. 320 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, g. 640 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, h. 1280 mg/L Zn ⁺² stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri (devamı).....	57

1. GİRİŞ

Güneş çiçeği, Günebakan olarak da adlandırılan Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), bitkiler âleminin, Angiosperm (kapalı tohumlular) kısmının, Dikotiledon (çift çenekliler) sınıfının, Asterales takımının, Asteraceae (Papatyagiller) familyasının, *Helianthus* cinsinin önemli bir temsilcisidir (Davis 1965), (Resim 1.1).



Resim 1.1 Ayçiçeği bitkisi (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Sunflowers.jpg>, 2010)

1.1 Ayçiçeğinin Tarihçesi ve Orjini

Eldeki ilk kaynaklar ayçiçeği bitkisinin köklerinin PERU olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak son zamanlarda yapılan araştırmalar ayçiçeğinin muhtemelen Meksika'nın kuzeyinden ve kuzeybatı Amerika'dan gelmiş olabileceğini göstermektedir. Fakat ayçiçeğinin Avrupa'ya nasıl getirildiği konusunda farklı görüş ve fikirler vardır. Bazı görüşler İspanyolların, bazı görüşler de Fransızların geriye dönüşlerinde ayçiçeği bitkilerinin tohumlarını Avrupa'ya getirdiklerini kabul eder (Sahagun 1569).

Bazı araştırmalara göre, Kuzey Amerika'nın keşfinden önce ayçiçeği tohumları doğal bir tüketim maddesi olarak o bölgede yaşayan yerliler tarafından kullanılıyordu. O bölgede yaşayan yerlilerin söylediklerine göre, ayçiçeğinin besin maddesi olduğunu biliyorlardı fakat tohumlarını kullanarak nasıl yağ elde edileceğini bilmiyorlardı. Bölgede yaşayan yerlilerden bazıları ise ayçiçeğinin tabla ve köklerini tıbbi amaçlarla kullandıklarını tohumlardan elde ettikleri sıvıyı yani yağı besin maddesi olarak değil de saçlarını ve derilerini yağlamak için kullandıklarını belirtmişlerdir (Hernandez 1942).

Eldeki kaynaklar ayçiçeği bitkisinin 250 yıl öncesine kadar Avrupa'da yiyecek ve yağ elde edilen bitki olarak kullanılmasından ziyade ss bitkisi olarak kullanıldığını göstermektedir. Ayçiçeği yağı ilk olarak 1700'l yıllarda endüstriyel amaçlar için hammadde olarak kullanılmaya başlanmıştır. Boya sanayi ve tabaklama bunun başında gelmektedir (Heiser 1951).

Ancak ayçiçeğinin ekonomik değer ikinici dünya savaşından sonra fark edilmiştir. Bunun ardından ayçiçeği ile ilgili çalışmalar artmış, yağ oranı oldukça yüksek, yemeklik ve rafineri kalitesi iyi, besleyici değer yüksek olan kaliteli yağ için, fiziksel ve kimyasal içerikli çalışmalar yapılmıştır (Lentz vd. 2008, Blackmana 2011).

Ülkemizde de ayçiçeği üretimi yaklaşık olarak 50-60 yıldan beri yapılmaktadır. Ülkemize Bulgaristan göçmenleri tarafından getirilmiş olan ayçiçeği, özellikle Trakya bölgesindeki yağ ihtiyaını karşılamak amacıyla 1950 yıllardan sonra süratle yayılmaya başlamıştır (Heiser 1998).

Türkiye'de üretilen yağlı tohumlara sahip bitkiler insanların beslenmesi açısından büyük önem taşıyan temel gıda maddesi olarak tanımlanmaktadır (Yurdagül ve Ersoy 1997). Türkiye'de üretimi yapılan yağlı tohumlu bitkiler arasında ayçiçeğinin yanı sıra soya, susam, yer fıstığı, haşhaş, kanola ve pamuk iğidi yer almaktadır. Ayçiçeği ise bu yağlı tohumlu bitkiler arasında en çok ekim alanına ve üretim miktarına sahip olup, yüksek orandaki (%22-50) yağ miktarı sebebiyle bitkisel yağ üretimi bakımından önemli bir yağ bitkisidir (Kızıloğlu 1992, Kara 1996). Bitkisel yağ üretimimizin yaklaşık olarak %45'i ayçiçeğinden karşılanmaktadır (Anonim 2007). Ayçiçeği yağının

içeriğinde olan yağ asitlerinin yüksek oranda olması (%69) ayçiçeği yağının önemini açıklamaktadır (Sezer ve Şimşek 2005). Yağ eldesinden sonra geriye kalan küspesi (%40-45) %40'lara varan oranlarda protein içerdiği için hayvan beslenmesinde de önemli bir kaynaktır. Ayçiçeği yağ olarak kullanılmasının yanı sıra sabun ve boya sanayinde değerlendirilmekte, sapları ise yakacak olarak kullanılmaktadır. Sapı sellüloz sanayinde, çiçeği tıpta, kabuğu ise boya sanayisinde kullanılmaktadır. Ayrıca ayçiçeği üretiminin %2,6'sı ülkemizde çerezlik olarak kullanılmaktadır (Arıoğlu 2000).

Potasyum ve vitamin E bakımından da zengin olan ayçiçeği tohumları, linoleik asit bakımından önemli bir besin kaynağıdır. Linoleik asit bakımından zengin olan yiyecekler ise kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesine yardımcı olmaktadır (Anonim 2004).

Tüm dünyada üretimi yapılan ayçiçeğinin 2008 yılında ekim alanı 25 milyon ha olup üretimi 35 milyon ton, verimi 1424 kg/ha'dır. Türkiye'de üretilen ayçiçeğinin ise ekim alanı 577 bin ha, üretimi 992 bin ton, verimi 1716 kg/ha'dır (Anonim, 2010). Ülkemizde Uşak, Burdur, Yozgat, Kırşehir, Amasya, Çorum, Erzurum, Kayseri, Iğdır, Isparta, Kahramanmaraş, Elazığ, Ankara, Aksaray, Balıkesir, Bursa, Eskişehir, Tekirdağ ve Edirne illerinde ayçiçeği üretimi yapılmaktadır (Ergen ve Sağlam 2005).

Ayçiçeği üretimi bakımından dünya genelinde öne çıkan ülkeler Rusya, Ukrayna ve Arjantin olup bu ülkelerin dünya üretimindeki payları sırasıyla %20, %18, %13'tür (Çizelge 1.1). Bu üç ülkede dünya ayçiçeği üretiminin yaklaşık %51'i gerçekleşmektedir. Bir ayçiçeği üreticisi olan ülkemizde ise bu oran sadece %3'tür. Türkiye'de üretimi yapılan yağlı tohumlu bitkiler içerisinde ayçiçeğinin payı yaklaşık %30 civarındadır. Bu oranın yüksek olması Türk nüfusunun genelde bitkisel yağ olarak ayçiçeğini tercihinden kaynaklanmaktadır (Kaya 2000), (Çizelge 1.2-1.3).

Çizelge 1.1 Dünyada ayçiçeği üreten başlıca ülkeler ve üretim miktarları
(<http://www.fao.org>, 2010)

Ülkeler	Ekiliş (ha)	Üretim (Ton)	Verim (kg/Ha)
Rusya	5 980 480	7 350 240	1229
Ukrayna	4 279 400	6 526 000	1525
Arjantin	2 578 236	4 646 065	1802
Hindistan	2 050 000	1 112 000	542
Çin	1 040 000	1 850 000	1779
Amerika	969 640	1 552 570	1600
Fransa	629 519	1 607 977	2554
Türkiye	577 958	992 000	1716

Çizelge 1.2 Türkiye ayçiçeği ekiliş, üretim, verim miktarları ve % değişim
(<http://www.fao.org>, 2010)

Yıllar	Ekiliş (ha)			Üretim (Ton)			Verim (kg/Ha)		
	Miktar	%*	%**	Miktar	%*	%**	Miktar	%*	%**
I. (1980-1984)	543 560	100,00	-	670 000	100,00	-	1233	100,00	-
II. (1985-1989)	724 382	133,26	133,26	1 048 000	156,42	156,42	1447	117,36	117,36
III.(1990-1994)	614 373	113,03	84,81	833 000	124,33	79,48	1356	109,98	93,71
IV.(1995-1999)	580 000	106,70	94,40	878 000	131,04	105,40	1514	122,79	111,65
V. (2000-2004)	539 000	99,16	92,93	800 000	119,40	91,11	1484	120,35	98,02
VI.(2005-2008)	570 350	104,93	105,81	984 851	146,99	123,11	1726	139,98	116,31

*Baz yılına göre değişim **Bir önceki yıla göre değişim

Çizelge 1.3 Türkiye'nin ayçiçeği yağı üretim miktarı ve % değişimleri
(<http://www.fao.org>, 2010)

Yıllar	Üretim(Ton)	Baz dönemine göre değişim(%)	Bir önceki döneme göre değişim (%)
I. (1980-1984)	240 613	100,00	-
II. (1985-1989)	378 337	157,24	157,24
III.(1990-1994)	322 638	134,09	85,28
IV.(1995-1999)	516 993	214,86	160,24
V. (2000-2004)	422 996	175,80	81,82
VI.(2005-2008)	542 411	225,43	128,23

1.2 Ayçiçeğinin Bitkisel Özellikleri

1.2.1 Kök

Ayçiçeği bitkisi kazık köke sahiptir. Kazık kökün gelişmesi topraktaki su oranıyla doğru orantılı olarak gelişir. Kazık kökün büyümesi suya ulaştığı zaman durur. Yapılan araştırmalarda kazık kökün 2-2.5 metreyi bulduğu gözlenmiştir (Seçmen vd. 1998).

Saçak kökler toprak yüzeyine yakın gelişen köklerdir. Bu kökler yaklaşık olarak 40 cm'ye kadar uzar ve toprak satına paralel olarak gelişirler. Yapılan araştırmalarda ayçiçeğinin saçak köklerinin 5 metrelik bir çember içerisinde yayıldıkları gözlenmiştir (Seçmen vd. 1998).

1.2.2 Gövde

Düz ve dik olarak büyür. Silindirik bir yapıya sahip olup uzunluğu 50 cm ile 4 metre arasında değişmektedir. Gövde üzerinde kanallar vardır. Gövdenin tüm yüzeyi kısa dikenimsi yapıda tüylerle kaplıdır. Gövdenin dışı odunsu yapıya sahipken içi ise yumuşak bir öz ile doludur. Kültüre alınarak üretilen ayçiçeği formlarında gövde tek bir saptan oluşur (Seçmen vd. 1998).

1.2.3 Yaprak

Gövde üzerinde almaşık olarak dizilmişlerdir. Şekilleri kalp biçiminde olup yaprak kenarları dişlidir. Renkleri açık yeşilden koyu yeşile doğru farklı tonlara sahiptir. Gövdenin yaklaşık olarak orta kısmındaki yapraklar (en üstten beşinci çift yapraklar) en büyük olanlarıdır. Yaprak sapı 10-15 cm'lik bir uzunluğa sahiptir. Yaprak yüzeyindeki tüy oranının fazla olması o çeşitin kuraklığa dayanıklılığının göstergesidir (Seçmen vd. 1998).

1.2.4 Tabla

Tohumların üzerinde geliştii gövdenin son bulduğu yerdir. Aslında gövde ve dal uçlarının deforme olmuş halidir. Tabla sayısı türe ve koşullara göre değişiklik gösterir. Yağlık ayçiçeği üretiminde tek tabla oluşması istenirken çerezlik türlerde birden fazla tabla meydana getirebilirler. Çok tablalılık ise üretimi artırma açısından, ıslah çalışmalarında uygulanmaya çalışılan bir karakterdir (Seçmen vd. 1998). Tabla şu kısımlardan oluşur;

1.2.4.1 Çanak yapraklar

Tablanın kenarlarında üçgen şeklinde olup kiremit biçiminde dizilmiş, yeşil renkli yapraklardır.

1.2.4.2 Taç yapraklar

Çanak yaprakların dışarıya açılmasından sonra uzunlukları 8-10 cm'ye varan dil şeklinde üst üste dizilmiş yapraklardır. Renkleri açık sarıdan turuncu renge kadar değişir. Tablaya çekicilik kazandırır. Görevleri ise dölllenme de rol alan arı ve benzeri böcekleri cezp ederek üzerine çekmek, güneş ışınlarının depolanmasını sağlamaktır. Aynı zamanda da bir termostat görevi görürler (Seçmen vd. 1998).

1.2.5 Tabla çemberi

İçi, gövdenin içine benzer olarak öz ile doludur. Tabla alanında yüzeyi kaplayan ve arı peteklerine benzeyen havuz yaprakları vardır. Oldukça sert ve renkleri değişkendir. Tabla çemberinin üzerini fertil çiçekler kaplar ve ürünü de bu çiçekler oluşturur (Seçmen vd. 1998), (Resim 1.2).



Resim 1.2 Ayçiçeği bitkisinin çiçeği ve tohumları
(http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Sonnenblume_Helianthus_1.JPG,2009,
<http://www.fotoritimdergi.com/efod-enver-sengul-aycicegi-atolyesi>, 2010)

1.3 Ayçiçeği Bitkisinin Ekolojik Gereksinimleri

1.3.1 Isı

Ayçiçeği tek yıllık bir bitki olup subtropik bölgelerde ve ılıman iklimlerde yetişebilmektedir. Vejetasyon devresi uzundur ve yaklaşık 130-140 gün arasında değişmektedir. Ayçiçeğinin büyümesi için gerekli en düşük sıcaklık bitkinin büyüme devresi ile bağlantılıdır. Çimlenme ve topraktan çıkış dönemi için gerekli olan sıcaklık 5 °C iken, toprak teşekkülü döneminde 11-12 °C, çiçeklenme döneminde ise 15-16 °C'dir. Daha sonraki gelişme evrelerinde ise optimum ısı 20-25 °C arasındadır. 30 °C'nin üstündeki sıcaklıklar büyümeyi engellemekteyken, 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise polen tozları özelliğini kaybetmekte ve dölllenme olmamaktadır (Karaata 1992).

1.3.2 Su isteği

Ayçiçeği kurağa dayanıklı bir bitkidir. Çok gelişmiş kazık kökü sayesinde 3 m derinliklerdeki rutubeti bile kullanabilir. Kılcal kökleri de 5 m'lik bir çember oluşturabilmektedir. Fakat ayçiçeği bitkisinin vejetasyon dönemi içerisinde 200 kg suya

ihtiyaç duyduğu göz önünde bulundurulursa ayçiçeğinin su gereksiniminin yüksek oranlarda olduğu anlaşılabilmektedir. Kısa süren kuraklıkları tüylü bir yapıya sahip olmaları sayesinde atlatabiliyor olsalar bile uzun süren kuraklık dönemlerinde tablaları küçülür ve yeterince tohum bağlayamadığı için tane verimi de büyük ölçüde düşer (Karaata 1992).

Gerek dünya genelinde ve gerekse ülkemizde yapılan çalışmalarda suyun ayçiçeğinin verimi ve yağ kalitesini yükselten en önemli unsur olduğu anlaşılmıştır (Karaata 1992).

1.3.3 Işık isteği

Ayçiçeği güneş ışığını seven bir bitkidir. Zaten bu durum (helio – güneş, antus – çiçek) adından da net olarak anlaşılmaktadır. Bu nedenle güneşin az olduğu yerlerde verim azalır ve vejetasyon süresi uzar (Süzer 1993, 2002).

1.3.4 Toprak isteği

Ayçiçeği ağır killi topraklardan, hafif kumlu topraklara, asidik topraklardan, alkali topraklara kadar toprak bakımından çok çeşitli sınırlar içerisinde yetiştirilebilen bir bitkidir. Fakat en iyi gelişmesini organik madde bakımından bol, suyu tutabilen, derinliği fazla olan topraklarda sağlayabilmektedir. En ideal toprak pH isteği ise pH 6-7'dir (Süzer 1993, 2002).

1.4 Çevre Kirliliği ve Etkileri

1.4.1 Çevre kirliliği

Çevre kirliliği ilk olarak kentsel yaşam için alanlar oluşturma mecburiyeti sonucu ortaya çıkmış ve endüstriyel gelişmeyle birlikte giderek artmaya devam etmektedir. Özellikle 1950'li yıllardan sonra nüfusun hızlı artışına bağlı olarak artan kirlilik yaşam için gerekli tüm doğal kaynaklarımızın daha fazla kirlenmesine neden olmuş ve sonuçta

ekosistemin bozulması daha ciddi bir hal almıştır (Sanlı 1984, Yarsan vd. 2000).

Ekosistemin en önemli bir kısmını oluşturan su ortamı atık-kirli sular ve diğer bazı atıkların yaşam alanlarından uzaklaştırılması için kullanıldığından ekosistemin diğer kısımlarını oluşturan hava ve toprak ekosistemine oranla çok daha fazla kirlenmeye maruz kalmaktadır. Ekosistemdeki doğal dengeyi bozan bu kirleticiler şu şekilde gruplandırılabilir (Hammand ve Beliles 1980, Detlefsen 1988, Hapke 1991):

- ✓ Organik Maddeler,
- ✓ Endüstriyel Atıklar,
- ✓ Petrol Türevleri,
- ✓ Yapay Tarımsal Gübreler,
- ✓ Deterjanlar,
- ✓ Radyoaktivite,
- ✓ Pestisidler,
- ✓ İnorganik Tuzlar,
- ✓ Yapay Organik Kimyasal Maddeler,
- ✓ Atık Isı.

1.4.2 Çevre kirliliğinin canlılar üzerine etkileri

Canlılar hayatlarını devam ettirebilmek için içinde buldukları ekosistemlerle sürekli olarak ilişki halindedirler. Canlılar yaşadıkları çevrelerinde herhangi bir uygunsuz koşul oluşması halinde adaptasyon eksikliğine bağlı olarak çeşitli olumsuz durumlara maruz kalırlar. Doğaları gereği her hangi bir stres faktöründen kaçınma gibi bir seçeneği olmayan bitkiler hayvanlardan farklı olarak stres faktörlerine direkt olarak maruz kalırlar. İnsanların doğal besin kaynakları da bitkiler ve hayvanlar olduğundan bu olumsuzluklardan dolaylı olarak zarar görmektedirler (Lichtenhaler 1996).

Çevre şartlarında meydana gelen değişimler bir bitkinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkiliyorsa, bitkinin bu değişimlere karşı verdiği cevaba ya da genel duruma stres denir. Diğer bir deyişle sadece bitkilerde değil tüm canlılar üzerinde

negatif etkilere sebep olan dış faktörler olarak tanımlanır. Doğal yapıları ve sesil yaşamları gereği en çok etkilenen canlı grubu bitkilerdir. Bu durumda stres, bitkinin hayatını devam ettirebilmesi, yaşamı için çeşitli ürün ya da bileşikler oluşturabilmesi, çoğalabilmesi, biyokütle birikimi ve fotosentez gibi hayati faaliyetler ile ilişkili bir kavramdır (Büyük vd. 2012).

Bitkiler sahip oldukları özellikleri sayesinde farklı stres faktörlerine karşı farklı toleranslara sahiptir. Strese karşı oluşturulan tolerans o bitkinin türüne, maruz kalınan stres faktörüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan dokusunun veya organının sahip olduğu yapısal özelliklerle ilgilidir (Koç vd. 2012).

Bitkiler yaşamları boyunca pek çok stres faktörü ile karşılaşmakta ve bu şartlar ile birlikte yaşamak zorunda kalmaktadır. Levitt'e göre stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki grupta toplanmaktadır (Levitt 1972). Biyotik faktörler; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) oluşturduğu enfeksiyonlar ve bitkiler için zararlı olan hayvanların oluşturduğu stres faktörleridir. Abiyotik faktörler ise su, sıcaklık, radyasyon, çeşitli organik ya da sentetik kimyasallar, manyetik-elektriksel alanlar ve bunların alt basamaklarını oluşturan pek çok çevresel faktörlerdir (Lichtenhaler 1996).

Ağır metaller bu sınıflandırmaya göre, kimyasallar içinde yer alıp ekolojik dengeyi en fazla tehdit eden abiyotik faktörlerdir. Ağır metallere karşı bitkinin, hangi tepkileri verdiğinin anlaşılması ve hangi savunma mekanizmaları geliştirdiğini belirlemek oldukça önemlidir (Kırbağ ve Munzuroğlu 2006).

1.4.3 Ağır metaller

Ağır metal; 'nispeten yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirleyici olan metal' olarak tarif edilmektedir. Bilimsel olarak fiziksel ve kimyasal yapıları göz önünde bulundurulduğunda; yoğunluğu 5 g/cm³'ten büyük olan veya atom ağırlığı 50 ve daha büyük olan elementlere ağır metal denir. Ağır metal deyimini, doğadaki tüm metalleri ve metalloidleri kapsamaktadır (Hapke 1991).

Bu grubun içinde kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla ağır metal bulunmaktadır. Bu elementler sahip oldukları moleküler yapılarından dolayı genellikle karbonat, silikat ve sülfür bileşikleri halinde veya silikatlar içinde bağlı şekilde bulunmaktadır (Kahvecioğlu vd. 2007, Okcu vd. 2009).

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın hazırladığı 129 tane öncelikli ve tedbir alınması gereken çevre kirleticileri içerisinde yer alan ağır metaller, en önemli çevre kirleticileridir (Yu 2005), (Çizelge 1.4; Kamalak 2006).

Çizelge 1.4 Ağır metallerin çevreye yayınımda en etkin olan endüstriyel faaliyetler (Kamalak 2006)

Endüstri	Cd (Kadmiyum)	Cu (Bakır)	Pb (Kurşun)	Zn (Çinko)
Kağıt Endüstrisi	—	+	+	+
Petrokimya	+	—	+	+
Klor-Alkali Üretimi	+	—	+	—
Gübre Sanayi	+	+	+	+
Demir Çelik Sanayi	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+

Bu grubun içinde yaklaşık olarak 70 kadar element yer almakla birlikte ekolojik önemleri ve yarattıkları etkiler bakımından önemli 20 element dikkati çekmektedir (Fe, Mn, Zn, Cu, V, Mo, Co, Ni, Cr, Pb, Be, Cd, Tl, Sb, Se, Sn, Ag, As, Hg, Al). Bu elementlerin bir kısmı bitkiler ve hayvanlar tarafından mikrobesein (Fe, Cu,Zn, Mn, Mo, Ni) olarak kullanılmaktadır. Ayrıca belirli sınırları aşmadığı sürece toksik etki oluşturmamaktadır (Çizelge 1.5, Yıldız 2004; Okcu vd. 2009). Demir, bakır, çinko, mangan, molibden, kobalt gibi ağır metaller belli seviyelerde bitkiler için gerekli elementlerdir. Bu elementlere esansiyel elementler denir (Yu 2005).

Çizelge 1.5 Bazı önemli ağır metallerin ekolojik sınıflandırması (Yıldız 2001)

Element	g/cm ³ özgül ağırlık	Bitki ve hayvan için gereklilik	Kirletici olup olmadığı
Ag Gümüş	10.5	—	K
Cd Kadmiyum	8.5	—	K
Cr Krom	7.2	G	K
Co Kobalt	8.9	G	K
Cu Bakır	8.9	G	K
Fe Demir	7.9	G	K
Hg Civa	13.6	—	K
Mn Mangan	7.4	G	—
Pb Kurşun	11.3	—	K
Mo Molibden	10.2	G	K
Ni Nikel	8.9	G	K
Pt Platin	21.5	—	—
Tl Talyum	11.9	—	K
Sn Kalay	7.3	—	K
U Uranyum	19.1	G	K
V Vanadyum	6.1	G	K
W Tungstem	19.3	G	K
Zn Çinko	7.1	G	K

1.4.4 Ağır metallerin canlılar üzerine etkileri

Toprak, su ve hava gibi ekosistemlerde yoğun bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller bitkilerden insanlara kadar hemen her çeşit organizma için tehlikeli oranlarda giderek artan ve acilen tedbir alınmasını gereken bir çevre sorunu haline almıştır. Günümüzde teknolojiyle birlikte endüstriyel ürünlerin hızla artması ve yaşam kalitesinin yükselmesine paralel olarak ağır metallerin kullanım alanları da giderek artmaktadır. Bu artışta tarımsal uygulamalarda (kimyasal ilaçlarla mücadele) kullanılan mücadelenin de önemli payı vardır. Ağır metal kullanım alanlarının yaygınlaşmasıyla artan ağır metal kirliliği, artık küresel bir problem haline gelmiştir (Yarsan vd. 2000).

Çeşitli endüstriyel faaliyetler, kentsel atıklar, egzoz gazları, maden işletmeleri, bazı volkanik faaliyetler, tarım-zirai alanlarında yapılan gübreleme işlemi ve ilaçlama, çok yoğun şekilde kullanılmaya başlanan pestisit uygulaması gibi pek çok etmen ağır metal kirliliğinin birer unsurudur. Bu gibi nedenlerden dolayı ağır metaller (Cd, Zn, Cr, Pb...) toprağın toksik maddelerce kirlenmesine neden olmaktadır. Bu metallerin toprakta ve çevrede yaygın bir şekilde birikmesi bitkiden insana hemen her çeşit organizma için boyutları giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır (Koç vd. 2012, Kırbağ ve Munzuroğlu 2006).

Ağır metaller, çok düşük yoğunluklarda bile hava ve toprak kirliliğinin yanı sıra sucul ortamlarda yaşayan tüm organizmaları da olumsuz yönde etkilemektedirler. Bu etkileşim tüm canlıları olumsuz yönde etkilediği gibi deniz canlılarını besin olarak tüketen insanoğlunda da zehirleyici etki gösterebilmektedir (Kırbağ vd. 2005, Kırbağ ve Munzuroğlu 2006).

Meydana gelen ağır metal kirliliği tarımsal alanda verim ve ürün kalitesinin düşmesine de sebep olmaktadır. Ağır metaller grubuna dâhil olan krom, nikel ve kurşun toprak ekosisteminde 10-100 mg/kg arasında, kadmiyum ise 1 mg/kg'ın altında bulunuyorsa bu miktarlar normal seviyeler olarak kabul edilmektedir. Bu miktarların üzerine çıkmadıkları sürece olumsuz etkileri görülmemektedir. Bu sınırlar aşıldığında ise kadmiyum ve kurşun çevresel kirleticiler olarak insanlar ve hayvanlarda ciddi sağlık sorunlarına sebep olmaktadır. Krom gerekli bir mikro elementtir ve yüksek konsantrasyonlara ulaştığında memeliler ve diğer hayvanlar için toksik bir element iken nikel ise olası kanserojen bir elementtir. Aynı zamanda nikel yüksek yapılı bitkiler için gerekli besin elementi olarak kabul edilmektedir (Kırbağ vd. 2005).

Ağır metaller içinde en şiddetli toksik etkiye sahip elementlerin başında Cd, Pb ve Hg'nin olduğu ifade edilmektedir (Çepel 1997, Okcu vd. 2009). Toprak ekosisteminde birikebilen ağır metal konsantrasyonları: Cd için 1 mg/kg, kobalt için 10 mg/kg, bakır için 0,1 mg/kg, selenyum için 10 mg/kg, vanadyum için 0,5-1 mg/kg, nikel için 100mg/kg in üzerinde olduğu durumlarda ağır metallerin toksik etkileri ortaya çıkmaktadır (Yıldız 2001).

Metaller doğal olarak meydana gelir ve bazıları ekosistemlerin doğal parçalarıdır. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi ağır metaller yaşamın birer parçası olan mikro elementlerdir. Bitkilerde çinkonun rolü, bazı metabolizma olaylarını düzenleyen çeşitli reaksiyonlarda yer alan pek çok enzim ve bu enzimlerin aktivitesi için gereklidir. Ancak kurşun (Pb) ve civa (Hg) gibi daha fazla toksik etkiye sahip diğer metallerin faydalı bir biyokimyasal etkisinin olduğu bilinmemektedir (Allan 1997). Yüksek yoğunluklarda toksik etkilere sahip olmalarına rağmen, uygun konsantrasyonlarda buldukları zaman bakır (Cu) ve çinko (Zn), civa (Hg) ve kurşundan (Pb) farklı olarak fotosentetik reaksiyonlarda önemli rol oynayan moleküllerin ve enzimlerin birer parçası ve enzim aktivitesi için olmazsa olmaz mikro besin elemanlarıdır (Raven vd. 1999, Okcu vd. 2009).

Yapılan bazı araştırmalarda bazı bitki türlerinin metal ağırlıklı topraklara özgü yetişebildiğini yani o ekosisteme endemik olduğunu ve ağır metallerin toksik etkilerini diğer bitki gruplarına göre daha fazla tolere ettiği görülmüştür. Elde edilen bu verilere göre farklı bitki gruplarının değişken olan çok sayıdaki stres faktörlerine karşı farklı toleranslara sahip olduğunu göstermektedir (Gardea-Torresday vd. 1996, Meagher 2000, Okcu vd. 2009).

Bakır (Cu), çinko (Zn), nikel (Ni) ve kurşun (Pb) gibi toksik etki yaratan ağır metaller kentsel yaşamın sonucu olan lağım suları ile toprak yüzeylerinde yüksek konsantrasyonlarda sulu çamur halinde birikebilmektedir. Bunlar çeşitli yollar ile besin zinciri içerisine taşınmakta insan ve hayvan sağlığı, ürün miktarı ve kalitesi üzerinde bir tehdit unsuru olabilmektedir. Ayrıca ağır metaller su ve tarımsal ekosistemlerdeki bazı kullanım alanları yüzünden direkt olarak gıda zincirine girebilmekte ve insan sağlığını doğrudan tehdit edebilmektedir (Çizelge 1.6-1.7), (Schmidt 1997).

Ağır metaller ayrıca membran lipidlerinin de içerisinde bulunduğu fonksiyonel çoğu biyomoleküle zarar vererek, oksidatif strese neden olan süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) veya hidroksil radikali ($OH\cdot$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır (Burzynski ve Klobus 2004, Koç vd. 2012).

Ağır metallerin canlılarda genotoksisiteye yol açtığı da bilinmektedir. Bu durum biyolojik, kimyasal veya fiziksel ajanların genetik materyalde hasar yaratabilme özelliği olarak ortaya çıkmaktadır (Assche ve Clijters 1990, Conte vd. 1998, Savva 1998, Steinkellner vd. 1998, Hall 2002).

Çizelge 1.6 Ağır metallerin insanlardaki karsinojenik etkileri (Casarett ve Doull 2001)

Ağır Metallerin Karsinojenik Etkileri	
A. İnsanlarda Kansere Oluşturan Metaller	
Metal ve kaynağı	Kanser Türü
Arsenik Bakır rafinerisi Kimyasal tesisler İçme suyu (oral) Sigara dumanı	Pulmoner karsinoma Lenfoma, lösemi Dermal karsinoma Hepatik anjiyosarkoma
Kadmiyum Kadmiyum rafinerisi	Pulmoner karsinoma
Krom Krom rafinerisi Krom üretimi Kromat pigmentleri	Pulmoner karsinoma Gastrointestinal karsinoma
Nikel Nikel rafinerisi	Pulmoner karsinoma Nazolarenks karsinoması Gastrik ve renal karsinoma Sarkoma

Çizelge 1.7 Ağır metallerin deney hayvanlarında karsinojenik etkileri (Casarett ve Doull 2001)

Ağır Metallerin Karsinojenik Etkileri			
B. Deney Hayvanlarında Metallerin Karsinojenik Etkileri			
Metal	Deney Hayvanı	Tümör	Bölge
Berilyum	Fare, sıçan, maymun	Osteosarkom Karsinoma	Kemik Akciğer
Kadmiyum	Fare, sıçan, tavuk	Sarkoma Teratoma	Enjeksiyon bölgesi Testisler
Kobalt	Sıçan, tavşan	Sarkoma	Enjeksiyon bölgesi
Krom	Fare, sıçan, tavşan	Sarkoma Karsinoma	Enjeksiyon bölgesi Akciğer
Demir	Hamster, fare, sıçan, tavşan	Sarkoma	Enjeksiyon bölgesi
Nikel	Fare, sıçan, kedi, hamster, tavşan Kobay, sıçan	Sarkoma Karsinoma Karsinoma	Enjeksiyon bölgesi Akciğer Böbrek
Kurşun	Fare, sıçan	Karsinoma	Böbrek
Titanyum	Sıçan	Sarkoma	Enjeksiyon bölgesi
Çinko	Tavuk, sıçan, hamster	Karsinoma Teratoma	Testisler Testisler

1.4.5 Çinko (Zn⁺²) ağır metalinin etkileri

per	Zinc	Gall
9	30	3
U	Zn	G
55	65.39	69
1.9	1.6	

Resim 1.3 Çinkonun kimyasal özellikleri (<http://www.buzzle.com/articles/chemical-properties-of-zinc.html>, 2011)

Çinko ağır metali bitki, hayvan ve insanlar için çok düşük miktarlarda alınması gereken bir mikro elementtir (Eyüboğlu vd. 1998), (Resim 1.3).

Çinko elementinin eksikliğinde, ribonükleik asit (RNA) düzeyleri ile hücrenin ribozom içeriğinde önemli derecede azalma olmakta ve bu azalma ise protein oluşum mekanizmasını engellemektedir. Ayrıca glikoz ile serbest aminoasit ve DNA düzeylerinin artmasına yol açmaktadır (Price vd. 1972). Ayrıca, çinko eksikliğinde, bitkilerde indol-3-asetik asit (IAA) ve absisik asit (ABA) içerikleri (Çakmak vd. 1989) ile triptofan amino asit miktarı da (Tsui 1948) azalmaktadır. Bu durum bitkilerin normal gelişimini olumsuz yönde etkileyerek büyümeyi engellemekte ve bitkisel üretimde ciddi seviyelerde ürün kaybına yol açmaktadır (Taban ve Alpaslan 1996).

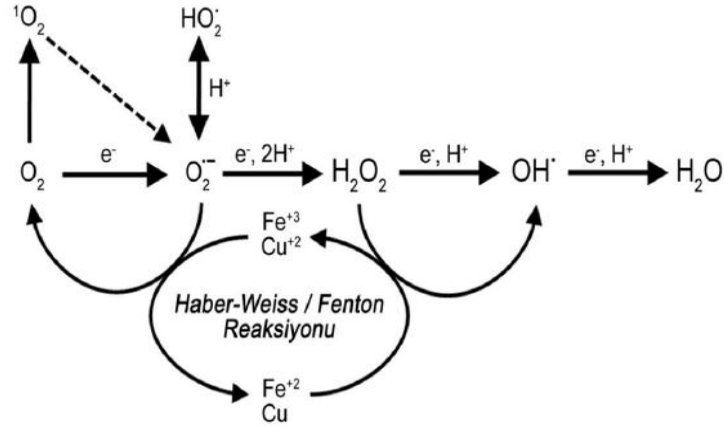
Çinko (Zn^{+2}) bitki tarafından iyon olarak kullanılan bir elementtir. Bitkilerde oksitleme ve indirgeme reaksiyonlarında görev yapmaktadır. Genel olarak en az toksik etkiye sahip olduğu kabul edilen bu metalin bitkiler için toprak toksik etkisinin kritik seviyesi, iklim faktörleri, toprak yapısı, toprak çeşitleri ve bitkinin sahip olduğu genotipine bağlı olarak değişmektedir. Zn^{+2} 'nin toksik etkisi, bitkilerde hücre bölünmesine zarar vererek, özellikle meristematik kök hücrelerinin çekirdeğinde tahribata yol açarak, hasarlı çekirdeklerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum doğal olarak tüm hücreyi olumsuz yönde etkilemektedir (Bobak 1985, Koç vd. 2012).

Zn^{+2} 'nin yüksek konsantrasyonu klorozise (bitkilerde oluşan renk kaybı) yani; kloroplast aktivitesinin bozulmasına ve bitkinin doğal büyüklüğünün küçülmesine neden olurken, aynı zamanda verimliliği de etkileyerek tohum sayısının, tohum ağırlığının, kök uzunluğunun, içeriğindeki çözünebilir protein ve klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır (Khurana ve Chatterjee 2001, Bekiaroglu ve Karataglis 2002, Koç vd. 2012).

1.4.6 Bitkilerde ağır metal stresine karşı oluşturulan cevaplar

Ağır metallerin bitkilerde meydana getirdiği stres cevabı reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) oluşumudur. ROT'lar serbest oksijen radikallerinden en yaygın olanlarıdır.

Moleküler oksijen aşırı enerjiyle birlikte eşleşmemiş elektronlarından birinin ters dönmesiyle aktif hale gelmekte ve tekli oksijen ($^1\text{O}_2$) yapısını oluşturmaktadır (Şekil 1.1, Dietz 1999).



Şekil 1.1 Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu (Vranova vd. 2002, Yıldız vd. 2011)

Benzer tepkimeler yoluyla moleküler oksijene bir, iki veya üç elektronun transferi gerçekleştiğinde süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) veya hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşmaktadır. Son reaksiyon aşamasında ise OH^\cdot radikaline bir elektronun transfer edilmesiyle su (H_2O) molekülü oluşmaktadır.

Aynı zamanda hücre içerisinde yükseltgenmiş formlarda bulunan metal iyonları (Fe^{+3} , Cu^{+2}), O_2^- varlığında çeşitli reaksiyonlarla indirgenmektedir. Daha sonra Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonlarıyla H_2O_2 'in OH^\cdot radikaline dönüşümü katalizlenmektedir (Vranova 2002).

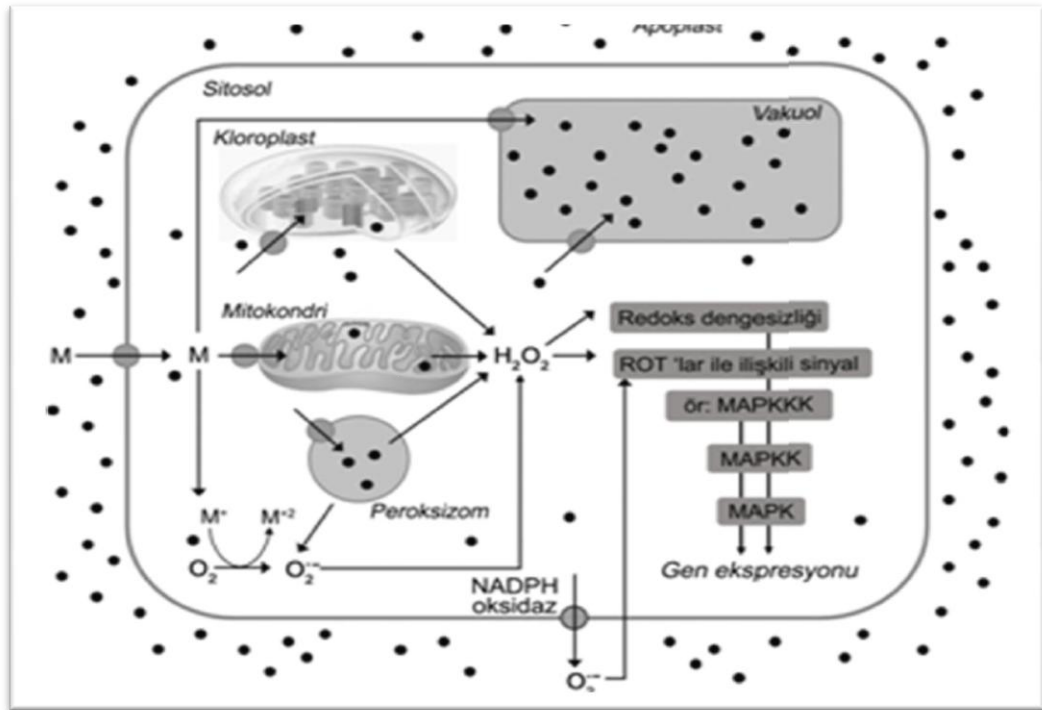
Abiyotik ve biyotik stres faktörleri altında oluşan metabolik dengesizliğe cevap olarak hücrelerde ROT üretimi artmaktadır (Mithofer 2004).

Reaktif oksijen türleri hücre içerisinde çeşitli reaksiyonlar yoluyla kimyasal reaktivite, redoks potansiyeli, yarılanma ömrü ve hücre yapısı arasında hareketliliğe bağlı olarak çeşitli hücre bileşenlerini oluşturmaktadır (Moller 2007).

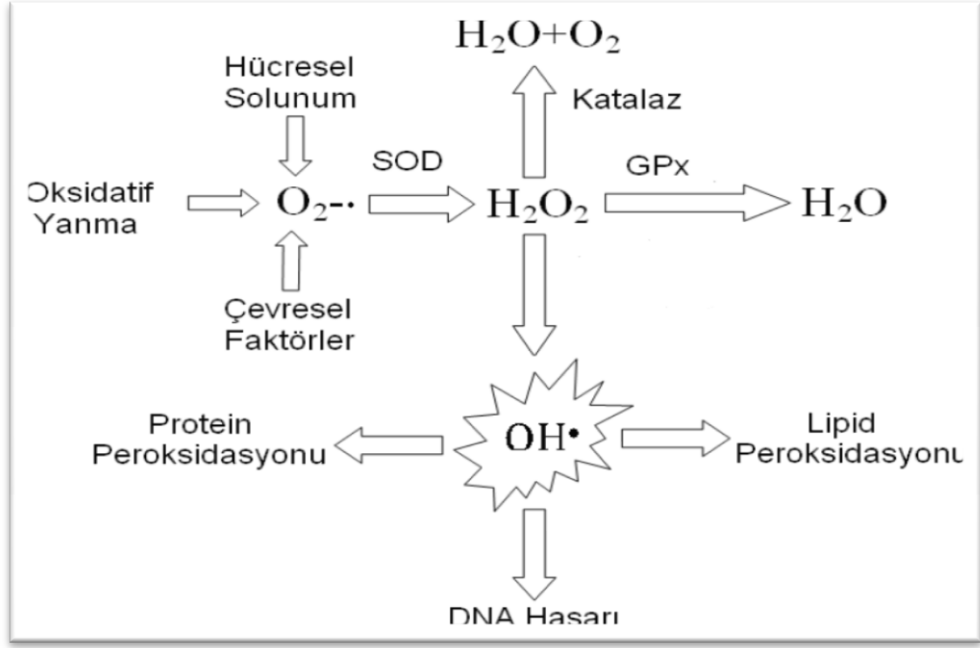
Bitkilerde ROT'ların oluşum yeri olarak kloroplast ve mitokondrilerin elektron transfer aktiviteleri ve peroksizomlar gösterilmektedir. Yani ROT'ların üretimi fotosentez, fotosentez için gerekli bileşenler ve mitokondride gerçekleşen solunum olayı gibi metabolik olaylardan kaynaklanmaktadır (Yıldız vd. 2011).

Ağır metaller yapılarına özgü çeşitli taşıyıcılar yoluyla hücre içine alınmakta ve çeşitli ağır metal redoks tepkimeleriyle metabolizmayı etkileyerek organellerde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olmaktadır (Yıldız vd. 2011).

Mitokondri membranında yer alan NADPH oksidaz enziminin ağır metal bağımlı aktivasyonu sonucunda da ROT'lar üretilmektedir. ROT'ların bitkilerde aşırı derecede üretimi bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Yıldız vd. 2011), (Şekil 1.2-1.3).



Şekil 1.2 Ağır metal bağılı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu (Sharma 2008, Yıldız vd. 2011).

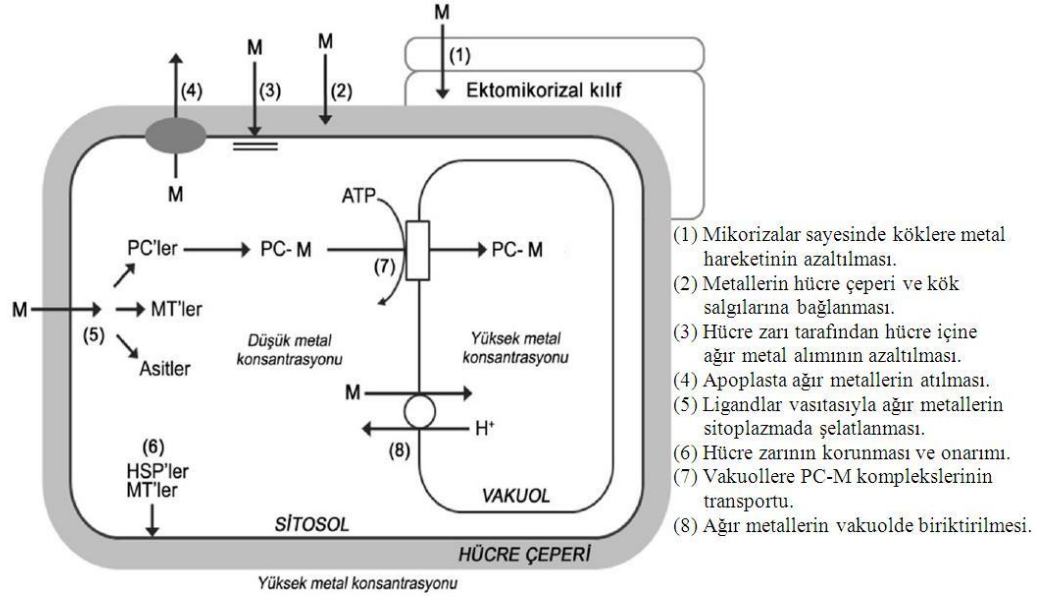


Şekil 1.3 Hidroksil radikalinin oluşumu ve etkileri

(www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html, 2008)

1.4.7 Ağır metallerin detoksifikasyon mekanizmaları

Bitkilerde ağır metallerin toksik etkilerinin azaltılması ve bu metallere karşı oluşturulan stres cevabı kompleks hücresel bir mekanizmaya sahiptir. Ağır metaller kökler tarafından salgılanan çeşitli organik asitler yoluyla bağlanır. Metal bağlayıcı ligandlar olarak bilinen metalotiyoneinler (MT'ler) tarafından ağır metaller alıkonularak etkileri yok edilir. Ayrıca ağır metal stresine karşı üretilen bazı proteinler antioksidant enzim sistemleri, prolin oluşumu ve birikimi gibi olaylar, ağır metallerin detoksifikasyonunu sağlayan mekanizmalar içerisinde yer almaktadır (Hall 2002, Sharma 2008), (Yıldız vd. 2011; Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyon mekanizması (Marschner 2002, Yıldız vd. 2011)

1.5 Epigenetik

Epigenetik kelimesi, eski Yunancada; epi- öneki; 'üstü(nde)', 'üzeri(nde)', 'ötesi(nde)', anlamlarını taşımaktadır. Genesis ise; 'doğuş', 'köken', 'yaratılış' veya 'oluşum' anlamına gelmektedir (Holliday 2006).

Epigenetik sözcüğü bir bilim dalı olarak ilk kez 1942'de Conrad Waddington tarafından kullanılmıştır. Epigenetik bilimini bir isim olarak, Epigenetic Genetics (Epigenez Genetiği) sözcüklerinden 'Epigenetics' (Epigenetik) olarak türetmiştir. Waddington'a göre epigenetik gelişim esnasında sahip olunan genetik yapının fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen bilim dalıdır (D'Alessio vd. 2006).

Waddington'a göre daha çok embriyolojik bir anlam ile oluşturduğu "epigenetik" terimi, moleküler biyoloji ve moleküler tekniklerin gelişmesiyle daha ayrıntılı olarak moleküler seviyeye indirilmiş ve de kalıtsal anlam yüklenmiştir (D'Alessio vd. 2006).

Bu anlamda en çok kullanılan ve kabul gören tanımı şöyledir: Epigenetik DNA

dizisindeki değişikliklerle açıklanamayan, mitoz veya mayoz yoluyla yavru bireylere aktarılan ve sonradan kazanılmış özellikler olmasına rağmen kalıtılabilen gen ekspresyonu (ifadesi) değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır (D'Alessio vd. 2006).

Günümüz biyoloji biliminin de ise epigenetik, DNA dizilerindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, fakat aynı zamanda kalıtsal olup nesilden nesile aktarılabilen, gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır. Diğer bir deyişle irsi (kalıtımsal) olup genetik olmayan çevresel etkilerle meydana gelen fenotipik varyasyonları incelemektedir. DNA dizilerindeki bu gibi değişiklikler hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkileyebilmektedir ancak DNA dizisinde hiçbir değişiklik olmamaktadır (Martin vd. 2007).

Epigenetik biliminin çalışmalarında özellikle cevap aradığı sorular genel anlamıyla şunlardır;

- ✓ Çevremizde meydana gelen bazı değişimler (Strese yol açan çevresel faktörler) ve yaşam şekli gen ifadesini dolayısıyla canlıyı ne kadar ve nasıl etkileyebilmekte?
- ✓ Bu etkiler gelecek kuşaklara da aktarılır mı? Aktarılıyorsa nasıl?

1.5.1 Epigenetik mekanizmaların kalıtımı

Canlıya karakterini ya da kimliğini kazandıran yani fenotipini ortaya çıkaran epigenetik mekanizmaların hücre bölünmesi esnasında bir sonraki nesile nasıl aktarıldığı henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Aynı şekilde aktarılan bu fenotipik bilgilerin organizmalarda korunarak devamlılığının nasıl sağlandığı da henüz tam manasıyla anlaşılammıştır. Ancak bu epigenetik düzenlemenin ya da epigenetik regülasyonun nesilden nesile aktarıldığına dair sayısız kanıt mevcuttur (Rakyan vd. 2006).

Erişkin sirke sineklerinin (*Drosophila melanogaster* L.) oluşumu sırasındaki embriyonik hücreler gelişim ortamlarından çıkarıldıklarında hücreler bölünmeye devam ederler. Alınan bu embriyonik hücreler gelişimi devam eden embriyoya bir süre sonra tekrar geri konulduğunda embriyonik hücrelerin sorumlu olduğu bacak veya kanat gibi

yapılar normal haliyle oluşmaktadırlar. Hücreler sadece kendi kimliklerini hatırlamakla yetinmemekte aynı zamanda bu bilgiyi hücre bölünmesinde diğer hücrelere de aktarmaktadırlar (Rakyan vd. 2006).

Farelerde yapılan bir araştırmada annenin sergilediği davranışların bebeğin DNA'sını etkileyebildiği gösterilmiştir. Bu olayın etki mekanizması anne sütü ile beslenen farelerin glikokortikoid reseptör kodlayan geninin DNA metilasyonundaki değişimi ile açıklanmaktadır. Benzer şekilde embriyonik evredeki farelerin anti-androjenik özellikli bir bileşik olan vinklozin'e maruz kalmaları sperm üretiminin azalmasına neden olmuştur. Aynı zamanda bu fizyolojik etki sonraki birçok nesilde de gözlenmiştir (Rakyan vd. 2006).

Bitkilerle yapılan çalışmalarda da aşağıdaki sonuçları elde edilmiştir;

Her hangi bir strese maruz bırakılan bitkiler gen ifadelerini değiştirerek değişen çevre koşullarına adaptasyon sağlamışlardır. Adaptasyon için gerekirse genomlarını destabilize bile etmişlerdir. Böylelikle ortaya yeni bir fenotipe sahip bir bitki çıkmıştır (Nishimura vd. 2007).

Farklı özellikler sergileyen yeni bir fenotipe sahip bitkiler stres ortamından uzaklaştırılmasına ya da stres faktörünün ortadan kalkmasına rağmen dört nesil boyunca sergiledikleri bu adaptasyonu korumuş ve devam ettirmişlerdir. Yani stres koşullarına karşı oluşturulan bu adaptif fenotipik değişimler sonraki nesile kadar aktarılmıştır (Henderson vd. 2007).

Strese maruz kalmanın hafızası canlılarda mevcuttur ve de bu sonradan kazanılan hafıza nesilden nesile aktarılabilir. Epigenetik mekanizmaların bilgisinin genellikle mitoz veya mayoz sırasında 'silinmeyen' kromatin modifikasyonları ve de bazı siRNA'larla aktarıldığı düşünülmektedir (Ringrose vd. 2007).

1.5.2 Epigenetik mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar ikiye ayrılmaktadır (Vliet vd. 2007), (Şekil 1.5).

- ✓ Dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar.
- ✓ Doğrudan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar.

Dolaylı yoldan etkiyen mekanizmalar

Dolaylı yoldan gen ifadesini etkiyen mekanizmalar post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası, yani kalıp DNA molekülünden RNA molekülünün sentezi yapıldıktan sonra) mekanizmaları, özellikle de non-koding RNA üretimini ve kodlayıcı RNA'yı (mRNA) etkileyerek protein sentezinin engellenmesine yol açmaktadır.

Doğrudan etkiyen mekanizmalar

Bu mekanizmalar da ikiye ayrılır;
Kromatin düzeyindeki modifikasyonlar,
DNA düzeyindeki modifikasyonlar.

Kromatin Düzeyindeki Modifikasyonlar

Bu modifikasyonlar hem kovalent hem de nonkovalent olabilirler. Genlerin sessizleşmesine neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğerdir (Vliet vd. 2007).

Kromatin düzeyindeki modifikasyonları kovalent ve nonkovalent olmak üzere ikiye ayırabiliriz:

Kovalent modifikasyonlar histon modifikasyonlarıdır. Bunlar;

- ✓ Asetilasyon,
- ✓ Metilasyon,
- ✓ Fosforilasyon,
- ✓ Übikitinasyon.

Nonkovalent modifikasyonları ise şunlardır;

- ✓ Histon takasları,
- ✓ Histon katımları,
- ✓ Kromatin tadilatı,
- ✓ Nonkoding RNA ile etkileşim,
- ✓ Diğer ajanlarla etkileşim (virüsler, farklı protein grupları),
- ✓ Uzun-mesafe kromozom etkileşimleri (hem kromozom içi, hem kromozomlar arası).

DNA Düzeyindeki Modifikasyonlar

DNA düzeyindeki modifikasyonları üçe ayırabiliriz (Vliet vd. 2007);

- ✓ DNA metilasyonu (Kovalent DNA modifikasyonları),
- ✓ Nonkovalent DNA modifikasyonları,
- ✓ Transkripsiyon faktörleri tarafından feed-forward otoregülasyon (Kovalent ve nonkovalent).

Bu modifikasyonların arasından DNA metilasyonu en bilinen ve en işlevsel olanıdır (Vliet vd. 2007).



Şekil 1.5 Epigenetik mekanizmalar

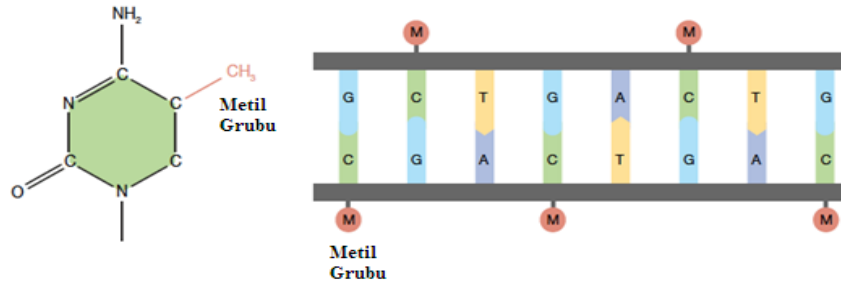
(http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Epigenetik_Mekanizmalar.jpg, 2008)

1.6 DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu DNA'nın yapısındaki kimyasal bir değişimdir. Kalıtsal olup nesilden nesile aktarılabilir ve sonradan ilk dizi yani orijinal yapı geri gelecek şekilde de çıkartılabilir. Bu özelliği nedeniyle epigenetik bir özelliktir ve epigenetik koda aittir. DNA metilasyonu en iyi karakterize edilmiş epigenetik mekanizmalardan biridir (Jaenisch vd. 2003). Metilasyon tüm virüslerde görülen öz ile öz-başka (self/non-self) yani orijinal kalıtsal yapı ile metilenmiş kalıtsal yapının ayırımına yarayan bir özellik ve yapı olduğu için epigenetik kodun viral enfeksiyon olaylarından kalma bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Villarreal 2005).

DNA metilasyonu DNA'nın öz yapısına bir metil grubunun eklenmesidir. Yani DNA'nın metillenmesidir. Örneğin sitozindeki pirimidin halkasının 5. karbonuna metil grubunun eklenmesi durumunda ifade edilen genin özelliği baskılanır ve genin ifadesi azalır. Sitozinin 5. karbonuna metil grubu eklenmesi ile metillenmesi, hemen hemen her omurgalı canlıda görülebilen bir özelliktir (Şekil 1.6-1.8). Erişkin canlıların somatik dokularında DNA metilasyonu tipik olarak CG (Sitozin-Guanin) dinükleotit dizilerinde meydana gelir. CpG dışı metilasyon ise embriyonik kök hücrelerinde görülen bir yapıdır (Haines vd. 2001, Dodge vd. 2002).

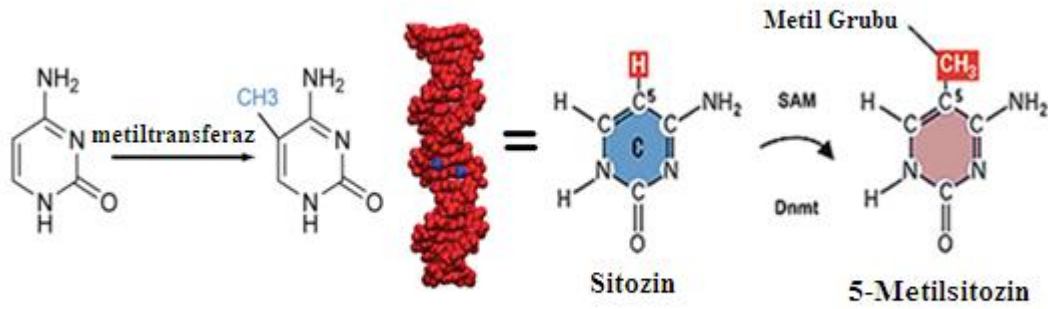
Bitkilerdeki sitozinler hem simetrik (CpG veya CpNpG (N=guanin haricinde herhangi bir nükleotittir) hem de asimetrik (CpNpNp) olarak metillenebilir.



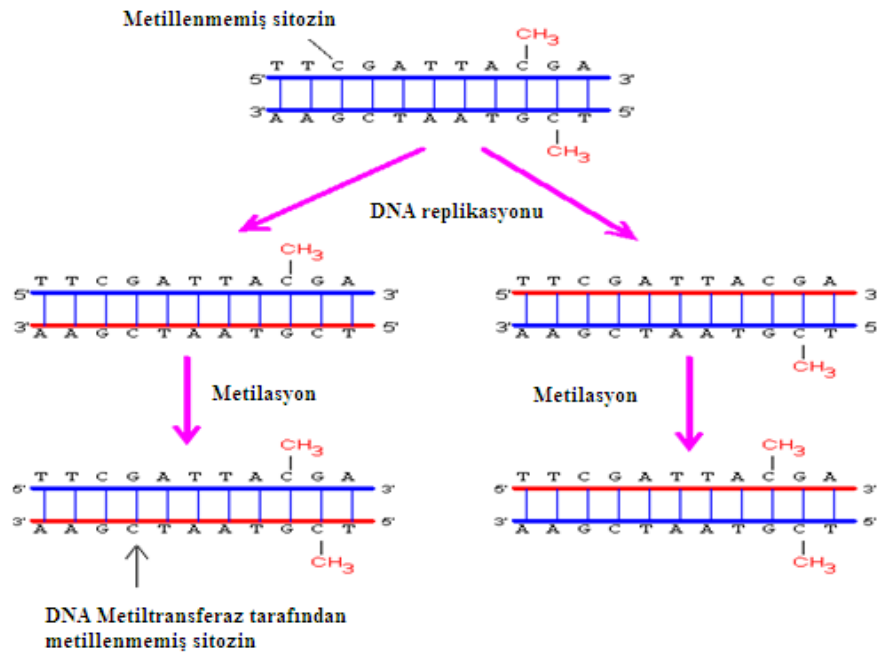
Şekil 1.6 Metil grubu ve bağlanma yerleri
(<http://www.tumblr.com/tagged/methylation,2005>)

Meyve sinekleri gibi bazı organizmalarda hemen hiç DNA metilasyonu gözlemlenmemiştir (Miller vd. 2007).

İnsanlarda meydana gelen DNA metilasyonu ise bazı hastalıkların araştırılmasında kullanıldığı gibi uzun vadeli hafıza depolaması DNA metilasyonu ile sağlanmaktadır (Powell 2008).



Şekil 1.7 Sitozinin metillenmesi (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation>, 2010)



Şekil 1.8 DNA metilasyonu (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F2.htm>, 2008)

1.6.1 DNA metiltransferazlar

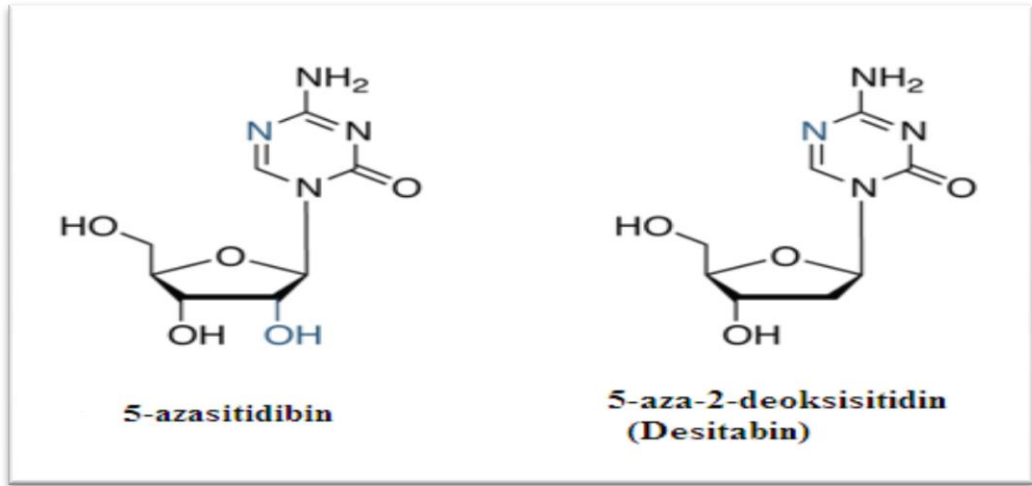
DNA metilasyonunda metil grubu DNA Metiltransferaz (DNMT) enzimi ile DNA'nın yapısına katılır. DNA metilasyonu memeli canlıların hücrelerinde öncelikle CpG dinükleotitlerinde sitozinin 5. karbonunda gerçekleşir. Bu kimyasal değişime neden olan enzim aktivitesi iki gruba ayrılmaktadır (Villarreal 2005).

- Sürdürme metilasyonu (*maintenance methylation*)
- Baştan metilasyon (*de novo methylation*)

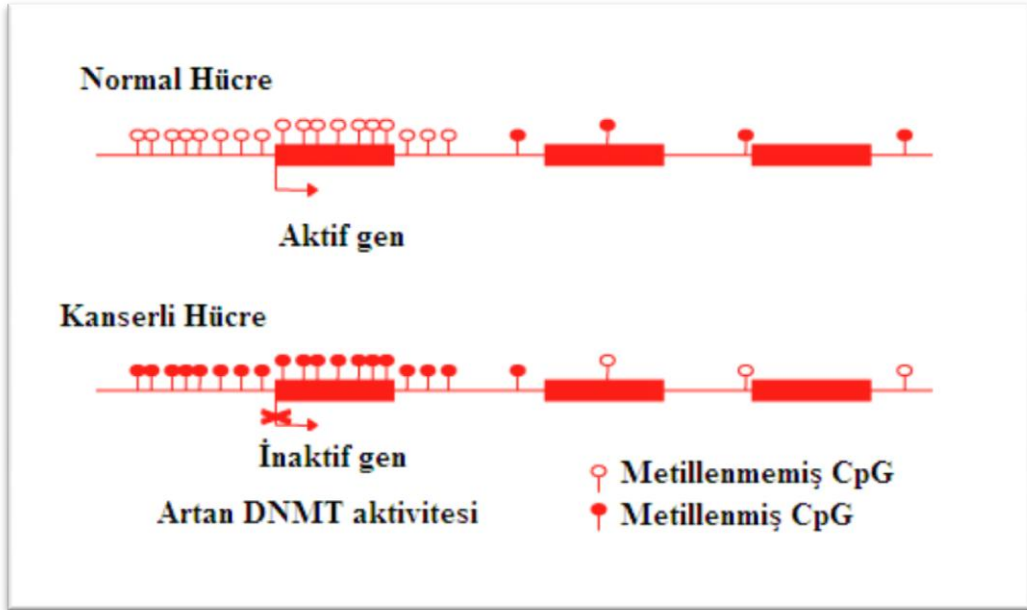
Sürdürme metilasyonu; her DNA'nın replikasyon döngüsünün sonrasında DNA'nın metilasyon durumunu korumak için gereklidir. DNA metiltransferaz (DNMT) olmazsa, replikasyon sırasında oluşacak yeni iplikler metillenemez ve zaman içinde bu durum, pasif demetilasyona sebep olur. DNMT1, DNA'nın replikasyonu sırasında DNA metilasyon örüntüsünün yeni oluşturulan DNA ipliklerine kopyalanmasından sorumlu olan ve metilasyonun devamlılığını sağlayan metiltransferaz enzimidir. Bazı canlılar embriyonik gelişim sırasında DNMT'ye gereksinim duyar. Örneğin farelerde DNMT1'in her iki kopyası da inaktivite edildiği zaman embriyo gelişimin 9. gününde ölür (Rakyan vd. 2006).

De novo (yeni baştan) metiltransferazların ise DNMT3a ve DNMT3b enzimleri olduğu ve bu enzimlerin gelişim sırasında DNA metilasyon örüntülerini oluşturduğu düşünülmektedir. DNMT3L ise diğer DNMT3 enzimleri gibi benzer özellikler taşır fakat katalitik etkinliği olmayan bir proteindir. DNMT3 enzimlerinden farklı olarak DNMT3L *de novo* metiltransferazların DNA'ya bağlanma yeteneğini artırıcı etki gösterir ve onların aktivitesini güçlendirerek metillenme esnasında DNMT3'lere yardım eder. DNA metiltransferazlar içerisinde yer alan diğer bir enzim olan DNMT2 ise DNA metiltransferazlara homolog özellik gösterir. Çünkü tüm DNA metiltransferazlarda ortak olan 10 dizi yapısına sahiptir. Fakat DNMT2 DNA'ya metil grubunu eklemek yerine aspartik asit tRNA'sının antikodon yapısındaki sitozin-38'i metiller (Cao 2008).

Yapılan pek çok kanser araştırmalarında tümör baskılayıcı gen, DNA metilasyonu ile inaktivite edildiği için bu genlerin tekrar etkinleştirilmesi için DNMT'lerin inhibe edilmesi yoluna gidilmiştir. 5-aza-2-deoksisitidin (desitabin) bir nükleozit yapısı taşır ve kataliz işlemleri sırasında bir β -eliminasyon adımıyla inaktif hale getirerek DNMT'leri DNA ile bir kovalent bağ oluşturmak suretiyle bağlar yani kilitler ve DNMT'leri çalışamaz hale getirir (Cao 2008, (şekil 1.9-1.10).

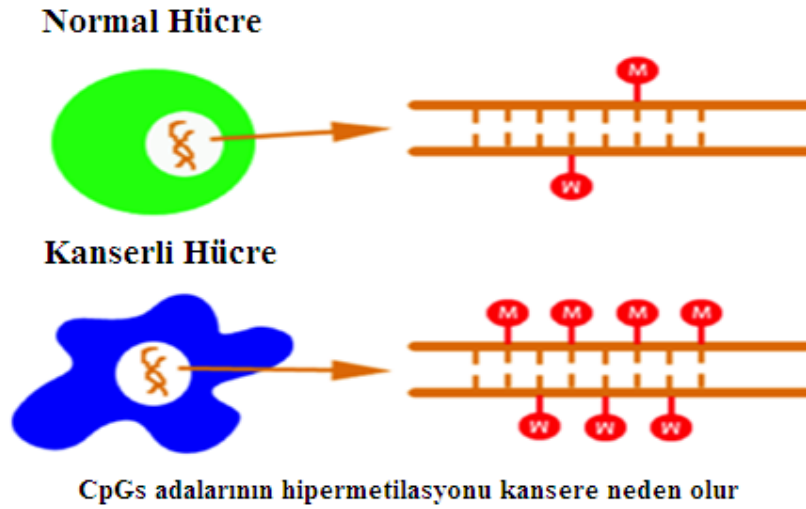


şekil 1.9 Desitabin'in (5-aza-2'-deoksisitidin) yapısı
(<http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>, 2008)



şekil 1.10 Normal ve kanserli hücre arasındaki gen ifadesi
(<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0006158.html>, 2008)

Bunun sonucu olarak da DNMT enzimleri yıkıma uğrar. Ancak desitabin'in etkin olarak işlevini yapabilmesi için desitabin'in hücreye kabul edilmesi ve hücre genomuna dahil edilmesi gerekmektedir. Bu durum ise bazı mutasyonları meydana getirir. Ayrıca desitabin kemik iliği için toksik etkiye sahip bir maddedir. Bu yüzden kanser tedavilerinde kullanımını oldukça sınırlıdır. Bu sebeplerden dolayı anti-anlam terapileri geliştirilerek mRNA'nın yıkımı hedeflenmiş ve böylece kanserli hücrelerin kendi proteinlerini üretmesi engellenmeye çalışılmıştır (Cao 2008), (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Normal ve kanserli hücre arasındaki metilasyon farkı
(<http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation>, 2011)

1.6.2 Bitkilerde DNA metilasyonu

Bitkilerdeki DNA metilasyonu çalışmalarına en iyi örnek model organizma *Arabidopsis thaliana*'dır. Bu canlıda DNA metilasyonunun anlaşılması konusunda çeşitli araştırmalar yapılmış ve önemli bilgiler elde edilmiştir. Memeli canlılarda DNA metilasyonu CpG dizilerindeki sitozinde meydana gelmesine karşın bitkilerde sitozin CpG, CpNpG ve CpNpN (burada N, guanin dışında her nükleotit anlamına gelir) dizilerinde de meydana gelmektedir (Haines vd. 2001).

Arabidopsis bitkisinde keşfedilen başlıca DNA metiltransferaz enzimleri DRM2, MET1 ve CMT3'dür. DRM2 ve MET1 proteinleri, memeli canlılardaki metiltransferaz

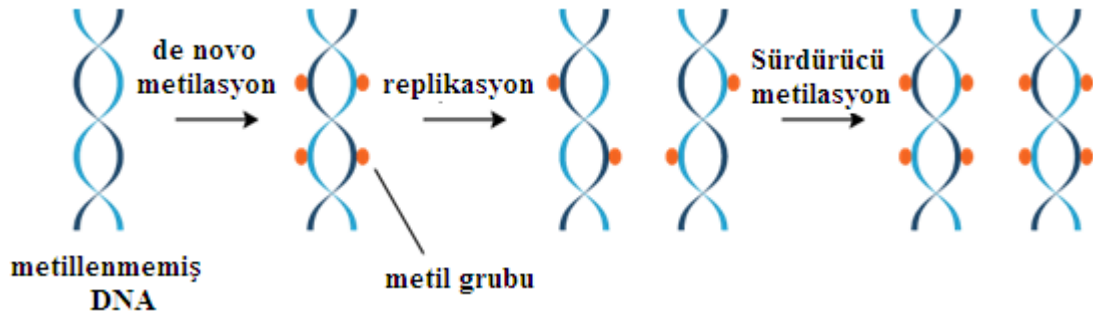
enzimleri olan sırasıyla DNMT3 ve DNMT1 ile büyük bir benzerlik gösterir ve homolog yapıya sahiptir. CMT3 enzimi ise sadece bitkiler âlemine özgü bir enzimdir (Dodge vd. 2002).

Bitkilerdeki DNA metiltransferazların da iki sınıfı vardır;

1. *De novo* sınıfı, yani DNA'da yeni metil grupların ekleyen enzimler.
2. Sürdürücü (*maintenance*) sınıfı, yani DNA'nın replikasyonu sırasında ana iplikteki metil gruplarını tanıyarak, onları yeni üretilen yavru ipliklerde aynı konumlarda metil grupları ekleyen enzimler.

DRM2 metiltransferaz enzimi, *de novo* DNA metiltransferaz özellik gösteren bir enzimdir. Ayrıca DRM2 metiltransferaz enzimi, MET1 ve CMT3 enzimleriyle birlikte, DNA'nın replikasyonu işleminde, metilasyonlu grupların korunmasını sağlamaktadır. Bitkilerde bahsedilen bu DNA metiltransferazlardan başka enzimlerin varlıkları da bulunmuştu fakat şu an işlevleri bilinmemektedir (Dodge vd. 2002).

Bitkilerdeki bu enzim gruplarının her ikisi de bitki genomunda mutasyonlara ya da kalıtsal değişikliklere yol açabilecek faktörlere karşı henüz iyi anlaşılmayan bir mekanizmayla bu zararlı bölgelerin metillenmesi sonucu bunların ifadesini sonlandırarak mutagenik etkilerinden bitkileri korumuş olur (Dodge vd. 2002), (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 De novo metilasyon ve maintenance metilasyon
(<http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>, 2008)

1.6.3 DNA metilasyonunun değerlendirebilmesi için metodlar

Genlerde meydana gelen DNA metilasyon derecelerinin değerlendirilmesinde çok çeşitli metodlar kullanılmaktadır (Gonzalzo vd. 1997). Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlar:

- Southern blot analizi,
- Bisülfid genomik DNA dizi analizi,
- MSP,
- Restriksiyon enzim-PCR uygulamalarıdır.

Southern blot

Southern blot, DNA metilasyon analizi için en sık kullanılan uygulamadır. Bu uygulamada genomik DNA, aynı dizilime sahip DNA için spesifik olan methylation-sensitive ve insensitive endonükleazlarla kesim işlemine tabii tutulur (örneğin: *HpaII* ve *MspI*). Daha sonra bu endonükleazlarla kesilen restriksiyon fragmentleri agaroz jelde vasıtası ile ayrılır. Bu fragmentler bir membrana transfer edilir ve hedef DNA dizisi için spesifik olan bir proba hibridize edilir. Otoradyografi tekniği ile tahmin edilen fragmentlerin oluşturduğu bantların varlığı tespit edilir (Gonzalzo vd. 1997).

Bu tekniğin sınırlamaları ise:

1. Southern blot analizi için gerekli olan DNA miktarı örnek başına 5-10 µg'dır. Bu miktardaki DNA elde edilmesi, özellikle tümörlü hücre çalışmalarında engelleyicidir.
2. Tamamlanmamış bir enzim kesim sonuçları değerlendirme açısından zorluklar yaratır ve değerlendirme zorlaşır.

Bisülfıt DNA dizisi

Bisülfıt metodu, metilleme yapılmış (5-metilsitozin içeren) DNA dizisi için genlerin metilasyon derecelerinin analizinde kullanılan ve yeni tekniklerin geliştirilmesine olanak sağlayan bir metottur (Grigg vd. 2005). Bisülfıt genomik dizi analizi, ilk olarak Frommer vd. (1992) tarafından yapılmıştır. Bu teknik sayesinde, genomik DNA yer alan tek 5-metilsitozinler (5-MC) bile ortaya çıkarılmıştır (Harrison vd. 1998).

Metod teknik olarak tek iplikekli DNA’da bulunan bütün sitozinleri, sodyum bisülfitle urasile deamine etmesi esasına dayanır. Böylece 5-MC değişmeden kalır (Hayatsu vd. 1970). Daha sonra bu modifiye edilmiş DNA, değiştirilmiş diziye spesifik olan bir primer seti kullanılarak PCR tekniği ile amplifiye edilir. Bu amplifikasyon işleminde tüm urasiller (yani; değiştirilmiş sitozinler) timin olarak amplifiye olurken, sadece 5-MC’lerdeki sitozinler sitozin olarak kalır. Amplifiye olmuş fragmentlere daha sonra dizi analizi yapılır (Harrison vd. 1998).

Bisülfıt dönüşümünün tamamlandığının kanıtlanması bu teknik için çok önemlidir. Çünkü metilenmiş CpG alanlarındaki Sitozinlerin bislfıt muamelesine dirençli olabileceği de araştırmalarda tespit edilmiştir (Harrison vd. 1998).

MSP

MSP ilk olarak Herman vd. (1996a) tarafından tanımlanmış bir uygulamadır. Bisülfıt muamelesi sonrasında metilenmiş ve metillenmemiş DNA sekansları arasındaki farklılıklar kullanılır. Teknik olarak bu uygulama da sitozinler urasile deamine olur ve bu urasiller PCR sırasında timine replike olur. PCR sırasında amplifiye olan DNA, metillenmemiş veya metillenmiş sekanslar için spesifik olan primer çifti ile elde edilir (Herman vd. 1996).

MSP uygulaması DNA’da bulunan bir bölgedeki metilasyonun varlığının analizi için oldukça hızlı ve nitel bir yöntemdir. Bu teknikte primerlerin dikkatli seçilmesi çok önemlidir. Çünkü yanlış seçilmiş primer çiftleri ile hem metillenmiş hem de

metillenmemiş bölgeler için pozitif sonuç elde etmek olasıdır. Bu da yanlış değerlendirmelere yol açacaktır. Ayrıca, genomik DNA'nın tamamlanmamış bisülfite modifikasyonu da metillenmiş C'ler için yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir (Herman vd. 1996).

Restriksiyon enzim PCR'ı

Bu uygulamada genomik DNA, metilasyon-sensitive ve metilasyon-insensitive restriksiyon enzimleri (örneğin: *HpaII* ve *MspI*) ile kesilir ve daha sonra parçalanmış DNA fragmentleri daha önceden belirlenen primerlerle amplifiye edilir. Metilasyon-sensitive endonükleazların kullanılmasıyla eğer hedef dizi metillenmiş CpG alanları içeriyorsa, bu alanlarda tahmin edilen bir büyüklükte DNA amplifikasyonu meydana gelir. Metilasyon-insensitive endonükleazın kullanımında ise hedef DNA dizisinin metilasyon durumu ne olursa olsun amplifikasyon meydana gelmeyecektir (Kane vd. 1997).

Bu teknikte en çok karşılaşılan zorluk ise enzim kesiminin tamamlanmak zorunda olmasıdır. Diğer zorluk ise eğer kesimi hedeflenen bölgede pek çok CpG alanı (adacıkları) varsa uygulama sırasında bazıları metillenecek bazıları ise metillenmemiş halde kalacaktır. Bu şekilde elde edilen sonuçlar değerlendirme için yetersiz kalacaktır. Bu teknik uygulama kolaylığı da göz önünde bulundurulacak olursa hedef bir dizideki DNA metilasyonunun varlığının tespitinde birincil seçici olarak oldukça faydalıdır (Kane vd. 1997).

Yapılan bu çalışmada da DNA metilasyonunun tespiti için bu teknik kullanılmıştır.

1.6.4 DNA metilasyonunun değerlendirilmesi için diğer uygulamalar

- ✓ COBRA analizi (Xiong ve Laird 1997),
- ✓ Genomik DNA'nın çeşitli bisülfite modifikasyonlarına yönelik, restriksiyon endonükleaz enzimleri için yeni spesifik bölge araştırmaları (Sadri ve Hornsby 1996),

- ✓ Metilenmiş sekansların ortaya çıkarılması için ve farklı şekillerde metilenmiş genlerin klonlanması araştırmaları (Gonzalzo vd. 1997),
- ✓ Metilasyon-sensitive tek nükleotid primer uygulaması (Gonzalzo vd.)

1.7 Moleküler Belirteçler

Protein ya da DNA'da bulunan polimorfizimlere dayanan 'moleküler belirteçler'in geliştirilmesi taksonomi, filogeni, genetik, bitki ıslahı ve ekoloji gibi bilim dallarına büyük oranda katkı sağlamıştır (Williams vd. 1990).

Protein belirteçleri arasında en yaygın kullanılanı izoenzimlerdir. İzoenzimler; yapısal karakterleri farklı fakat aynı reaksiyonu katalizleyen farklı genlerce kodlanmış enzim formlarıdır. İzoenzim analizleri, farklı dokularda ve gelişimin farklı evrelerinde düzenlemenin izlenebilmesi için de kullanılabilir. Kodominant belirteç olarak genetik bilgi sağlayabilir. Ancak izozim lokuslarının azlığı ve translyasyon sonrası değişimlere açık olmaları, izoenzimlerin kullanım olanaklarını sınırlamaktadır (Staub vd. 1982, Bernatzky ve Tanksley 1989). DNA belirteçleri stabildir, tüm dokulardan elde edilebilir ve ekolojik koşullardan etkilenmezler (Williams vd. 1990).

Bitki dokularında moleküler belirteçler ile yapılan çalışmalarda DNA profillerinin çıkarılması ve spesifik DNA parmakizlerinin elde edilmesi şu şekilde sıralanabilir (Williams vd. 1990);

- Bitkisel materyalin temin edilmesi,
- Bitkisel materyalden DNA izole edilmesi,
- Uygulanacak yönteme göre genetik materyalin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması,
- Bireyler arasındaki polimorfizmin farklı moleküler belirteç teknikleri ile tespit edilmesi (RAPD, RFLP, AFLP, SCAR, SSCP),
- DNA bant profillerinin analizi.

DNA belirteçleri hibridizasyona ve PCR'a dayalı belirteçler olmak üzere ikiye ayrılabilir (Williams vd. 1990).

1.7.1 Hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri

1.7.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı)

RFLP tekniğinde genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri kullanılarak spesifik bölgelerden kesilmesi sağlanır ve çok sayıda DNA fragmentleri elde edilebilir. DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile ayrıldıktan sonra Southern Blot tekniği ile nitroselüloz veya naylon membrana transfer edilir. Radyoaktif işaretlenmiş bir prob ile hibridizasyon yapılır. Radyoaktif DNA hibritleri otoradyografi ile gözlenebilir (Botstein vd.1980).

RFLP tekniğinin avantajları;

- Güvenilirdir. Farklı laboratuarlarda farklı araştırmacılar tarafından aynı sonuçlara ulaşılabilmektedir.
- Kodominant özellikte olduklarından heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonunda kullanılmaktadır.

RFLP tekniğinin dezavantajları;

- Analizleri pahalı, fazla zaman ve iş gücü gerektirmektedir.
- Yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır.
- Yüksek kalitede ve fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır (10-20 µg).

1.7.2 PCR'a (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) dayalı DNA belirteçleri

Polimeraz zincir reaksiyonu belirli bir DNA bölgesinin in vitro şartlarda primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir. PCR, Kary Mullis (K.B. Mullis, U.S. patent 4683195, 1987) tarafından geliştirilmiş olup, moleküler biyolojinin hızlı bir şekilde gelişmesinde katalizör olmuştur. PCR tekniği, genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti, moleküler klonlama, DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi, genetik akrabalık ve adli tıp vakalarının tespitinde kullanılmaktadır (Steffan ve Atlas 1991).

PCR'in çalışma prensibi ardarda tekrarlanan üç basamaktan oluşmaktadır;

1. DNA'nın çift iplikçığının sıcaklıkla ayrılması,
2. Oligonükleotid primerlerin oluşturulan tek zincirli DNA molekülünde hedef bölgelere bağlanması,
3. dNTPlerin varlığında DNA polimerazın primerlerle uzatılması PCR tekniğinin uygulanması thermocycler içinde in vitro koşullarda gerçekleştirilmekte olup, gerekli reaksiyon karışımı kalıp DNA'yı, nükleotid karışımını (dNTPs), bir ya da bir çift oligonükleotid primeri, DNA polimeraz enzimini, tampon çözeltisini ve MgCl₂'ü içerir.

1.7.2.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluk Farklılığı)

AFLP tekniğinde genomik DNA restriksiyon enzimleri (EcoRI/MseI) ile kesilir, biyotin ve radyoaktivite ile işaretlenmiş iki adaptör yardımıyla restriksiyon fragmentleri uygun bir DNA ligaz ile birleştirilir. Birleştirilen bu adaptörlere uygun primerler ile restriksiyon fragmentlerin pre-amplifikasyonu yapılır. Oluşturulan fragmentlerin radyoaktif işaretli özel primerlerle selektif amplifikasyonları sağlanır. Elde edilen ürünler poliakrilamid jel üzerinde yürütülür ve gümüş boyama ya da radyoaktivite ile görüntülenir (Ergül 2000).

AFLP'nin avantajları;

- Laboratuvarlar arası cihaz farklılığı sonucu etkilemez.

AFLP'nin dezavantajları;

- Radyoaktif işaretleme yapılır.
- Dominant belirteçlerdir.

1.7.2.2 SSR (Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarları)

Ardışık tekrarlanan 2-6 nükleotitli gruplara mikrosatellit denir. Mikrosatellitlerin varlığı birçok organizmada gösterildikten sonra DNA zincirindeki değişiklikleri belirleyen bir

metot kullanılmaya başlanmıştır. Bu metot, SSR lokusuna bağlanan primerlerin PCR yardımıyla farklı uzunlukta parça çoğaltması esasına dayanmaktadır ve ardarda tekrarlanan zincir elemanlarının sayısındaki değişiklikler sonucunda oluşan SSRler bireyler arasındaki farklılıkları belirler. SSRleri çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR tekniği sayesinde bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir (Steffan ve Atlas 1991).

SSR tekniğinin avantajları;

- Oldukça polimorfiktir; bundan dolayı yüksek oranda bilgi vermektedir.
- Bitki genomunda fazla bulunup düzenli bir dağılım gösterirler.
- Kodominant belirteçlerdir.

SSR tekniğinin dezavantajları;

- Fazla iş gücü gerektirir.
- Maliyeti yüksektir.

1.7.2.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region-Dizin Karakterli Çoğaltılmış Bölge)

Bir gen bölgesine ait belirli büyüklükteki RAPD bandının klonlanıp uç bölgelerinden dizileri belirlendikten sonra bu fragmana yönelik RAPD primerlerini içeren primer çiftleri ile geliştirilen bir tekniktir (Paran ve Michelmore 1993).

SCAR tekniğinin avantajları;

- Kodominant belirteçlerdir.
- RAPD belirteçlerde istenmeyen amplifikasyon ürünleri elde edilirken SCAR belirteçler spesifiklik gösterir.

SCAR tekniğinin dezavantajları;

- Uzun zaman alır ve işçiliği fazladır.

1.7.2.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele oğaltılmış DNA Farklılığı)

Diğer PCR uygulamalarının aksine iki yerine bir primer kullanılır. Bu primerler 9-10 baz çiftlik rastgele primerlerdir. Primer kalıp DNA üzerinde komplementeri olan birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesinin amplifikasyonunu sağlar. Bu şekilde çoğaltılan DNA dizileri için agaroz jel üzerinde elektroforez uygulanır ve bazı dizilerin çoğaldığı bazılarının ise çoğalmadığı gözlenir. Bu gözlem polimorfizmin göstergesidir (Welsh ve Mcclelland 1990).

RAPD tekniğinin avantajları;

- Evrensel primer seti kullanılır.
- Hızlı sonuç alınır, ucuzdur ve az iş gücü gerektirir.
- Az miktarda DNA yeterlidir.
- RAPD işaretleyicilerinin, tek bir kısa ve rastgele oligonükleotit primer kullanılarak bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılmış ürünleri olması, önceden DNA baz dizisinin bilinmesinin gerekmemesi, kısa sürede çok sayıda DNA işaretleyicisi geliştirmedeki etkinliği ve çok gelişmiş aletlere daha az gereksinim duyması avantajlarını oluşturmaktadır.

RAPD tekniğinin dezavantajları;

- Güvenilirliği sınırlıdır, farklı laboratuarlarda farklı sonuçlar hatta bir ısı döngü cihazından diğerine farklı sonuç verebilir.
- Dominant belirteçlerdir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ağır metallerin DNA üzerindeki olumsuz etkilerini belirlemek amacıyla birçok araştırmacı bitkiler üzerinde RAPD tekniğini uygulamıştır (Conte vd. 1998, Mengoni vd. 2000, Atienzar vd. 2000, 2001, Lui vd. 2005, 2007, 2009, Körpe-Aksoy ve Aras 2010, Soydam-Aydın vd. 2012). Yapılan çalışmalarda ağır metallerin konsantrasyon artışına paralel olarak PCR ürünlerindeki polimorfizm oranının da arttığı tespit edilmiştir.

Ülkemizde çevre kirliliğinin etkilerinin biyolojik monitörler aracılığıyla tespit edilmesi amacıyla endüstri ve sanayi bölgelerinden, otoyol kenarlarından, atık su alanlarından ve şehir merkezlerinden, bitki ve toprak materyalleri toplanarak ağır metal içerikleri ve yol açtığı metabolik etkileri belirlenmiştir (Çelik vd. 2005).

Mengoni vd. (2000) araştırmasında, ağır metal kirliliğinin olduğu farklı bölgelerden toplanan *Silene paradoxa* L. populasyonlarına ait bitki örneklerinde RAPD analizi yaparak bu populasyonlarda yer alan toleranslı taksonları belirlemiştir.

Kirleticilere hassas organizmalar vasıtasıyla çevresel kirlilik seviyelerinin belirlenmesi, gittikçe gelişen bir çalışma alanıdır. 1950'lerden beri yüksek yapılı bitkilerin yaprakları biyolojik monitör olarak kullanılmaktadır (Al-Shayeb vd. 1995). Bütün araştırmaların temelinde organizmaların çevrelerinde bulunan farklı tipteki etkilere karşı duyarlı olmaları ve çeşitli biçimlerde tepki vermeleri vardır. Organizmaların bu özellikleri onların içinde buldukları ortamın kirlilik seviyesi hakkında kalitatif bilgi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Dat vd. (2000) araştırmalarında, çevresel değişikliklere uyumun bir bitkinin gelişimi ve hayatta kalabilmesi için önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ancak adaptasyonun moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları yeni yeni anlaşılmaya başlansa da, sinyal iletim yolları hakkında tam bir bilginin olmadığını ifade etmişlerdir. ROT'lar hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı bitki adaptasyonunda oldukça önemlidir. Stres koşullarında biriken ROT'lar bitkide oluşabilecek zararı artırmak veya korumadan

sorumlu aktivasyonlar için sinyal oluşturmakta görevli bileşenlerdir. Çalışma sonucunda farklı rollere olanak sağlamak için ROT'ların hücresele seviyede kontrol altında tutuldukları da belirtilmiştir (Dat vd. 2000).

Xiong ve Zhu (2002)'nin gerçekleştirdikleri derlemede, bitkilerin hücresele homeostasiyi sağlamak için toksinlerin detoksifikasyonunu sağlayan ve gelişimi düzenleyen genlerin ekspresyonunu değiştirerek çeşitli streslere cevap verdikleri vurgulanmıştır. Yapılan araştırmalarda strese karşı verilen cevapların moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmaları içeren genetik yaklaşımlar aracılığı ile açıklanabileceği belirtilmiş ve *Arabidopsis* ve *Thellungiella halophila*'nın bu amaç için uygun birer genetik model sistemleri olduğuna dair fikirler ileri sürülmüştür (Xiong ve Zhu 2002).

Kaya (2004)'nin yapmış olduğu derlemede, ayçiçeğinin ıslağı konusunda klasik ıslah metodlarının istenilen verime ulaştırmadığı, yeni geliştirilen moleküler ıslah metodlarının (genetik transformasyon, PCR, RFLP, moleküler markır teknikleri vb.) ayçiçeğinde başarıyla kullanılabildiğini ve buna bağılı olarak verimin artırıldığını belirtmiştir. Ayrıca mısır, çeltik, şeker pancarı, patates, soya, buğday vb. bitkilerde uygulanan bazı moleküler ıslah yöntemlerinin de pratik olarak ayçiçeğinde kullanılabileceğini vurgulamıştır. Bu sayede hem verimin artacağını hem de ayçiçeğı için problem olan zararlılar ve hastalıklarında geliştirilen bu moleküler tekniklerle aşılabilineceğini belirtmiştir (Kaya 2004).

Koç vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada, farklı çinko konsantrasyonlarının biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi üzerine etkilerini araştırmışlar ve artan çinko konsantrasyonuna bağılı olarak hidrojen peroksit miktarında değişimler olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada yaprak dokularında peroksidaz düzeyindeki artışa dikkat çekilmiştir. Artan peroksidaz aktivitesinin H₂O₂ üretimi ile bağılılı olabileceğini ve ağır metal stresi altında onarım yollarının (lignifikasyon vb.) uyarıldığını belirtmişlerdir. H₂O₂ gibi serbest radikallerin birikimi ve buna bağılı olarak üretilen ROS'ların ağır metal stresi altında olan bitki dokusunda meydana gelen moleküler cevaplardan biri olduğu ve büyük ihtimalle de hipersensitif cevap ve sistemik kazanılmış toleransın uyarılmasında görev aldığı vurgulanmıştır.

Zengin vd. (2005)'nin yaptıkları çalışmada, civa (Hg^{++}) ağır metal stresi altında yetiştirilen ayçiçeği bitkisinde meydana gelen absisik asit (ABA) değişimleri araştırılmıştır. Civa uygulanan ayçiçeği bitkilerinin kök, gövde, fide ve yaprak disklerinde absisik asit miktarının kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirtilmiştir. Artan bu absisik asidin ağır metale karşı verilen moleküler cevaplar neticesinde bitkisel bazı hormonların miktarında artışa neden olduğu ve bu hormonlarında bitkide çeşitli fonksiyonel ve yapısal değişiklikler yaptığı öne sürülmüştür. Nitekim ağır metal stresine karşı oluşturulan ilk cevabın moleküler düzeyde olduğu ve daha sonra üretilen bazı fonksiyonel ve yapısal protein ve enzimlerin buna bağlı olarak değişim göstererek strese karşı tolerans oluşturduğu belirtilmektedir.

Taban vd. (1996)'nin yaptıkları çalışmada, ağır metallerin artışının olumsuz etkilerinin aksine çinko eksikliğinde mısır bitkisinde meydana gelebilecek değişimleri incelemişlerdir. Çinko eksikliğinde bitkisel verimliliğin azaldığını, ribonükleik asit (RNA) düzeyleri ile hücrenin ribozom içeriğinde belirgin bir azalma olduğunu, RNA sentezindeki bu azalmanın ise protein oluşumunu engellediği, glikoz ile serbest amino asit ve DNA düzeylerinin artmasına yol açtığını, bitkinin IAA (indol-3-asetik asit) ve ABA (absisik asit) kapsamlarının ve triptofan içeriğinin azaldığını belirtmişlerdir. Bu durumun mısır bitkisinin gelişimini olumsuz etkilediği vurgulanmıştır. Çalışma sonucunda da çinko ağır metalinin uygun konsantrasyonlarda olduğu zaman bitki için pozitif etkiler yarattığı ve çinkonun belirli seviyelerde esansiyel mikro-element olduğu bildirilmiştir.

Gallego vd. (1996)'nin yılında yaptıkları çalışmalarında, demir (Fe^{++}), bakır (Cu^{++}) ve kadmium (Cd^{++}) ağır metallerinin ayçiçeği yapraklarında meydana getirdiği oksitativ stres ile ağır metaller arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmada ağır metal uygulanan ayçiçeği yapraklarında klorofil miktarı, lipid peroksidaz enzimi ve lipoksigenaz aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. Demir (Fe^{++}) ve kadmium (Cd^{++}) stresine maruz kalan yapraklarda süperoksit dismütaz aktivitesi düşerken bakır (Cu^{++}) stresine maruz kalanlarda artmıştır. Uygulanan 3 ağır metalin de antioksidant enzimlerinin (Katalaz vb.) miktarlarını azalttığı belirtilerek oksitativ hasara yol açtığı vurgulanmıştır.

Iqbal vd. (2008)'nin yaptığı çalışmada, RAPD parmak izi yöntemiyle 8 ekzotik ayçiçeği türü arasındaki genotipik farklılık RAPD-PCR çalışmasıyla ortaya konmuştur. 8 farklı hibrit ayçiçeği türü için PCR çalışması esnasında 20 farklı primer kullanarak 156 adet DNA fragmenti çoğaltılmış ve bunların 104 tanesinde polimorfizm tespit edilmiştir. Çalışılan bütün ekzotik ayçiçeği genotiplerinde genetik çeşitliliğin olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca RAPD parmak izi tekniğinin ekzotik ayçiçeği genotipleri arasındaki genetik varyasyonun tespiti ve yorumlanmasında oldukça etkili ve yeterli bir teknik olduğu da açıkça vurgulanmıştır.

Iqbal vd. (2010)'nin yaptığı diğer bir çalışmada, SSR (Basit Dizi Tekrarları) tekniğiyle 8 tane parental (ebeveyn) ve bunların hibritleri olan 16 farklı ayçiçeği kullanılarak bunlar arasındaki genetik varyasyon açığa çıkarılmıştır. PCR yöntemiyle, SSR çalışmasına uygun seçilen 20 farklı primer ile çoğaltılan SSR fragmentleri elektroforetik yöntemle ayrılmış ve bu türlere ait bantlar elde edilmiştir. Bantların karşılıklı analizi sonucunda elde edilen sonuçların hibrid türler ile parental türler arasında otantik bir ilişki olduğu belirtmiştir. Çalışılan primerlerden sadece 2 tanesinde belirsiz bantlar çıkmıştır ve bununda uzama sıcaklığından (annealing temperature) ya da kullanılan $MgCl_2$ 'ün miktarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Kullanılan bu SSR tekniğinin de ayçiçeği genotipleri arasındaki genetik varyasyonun tespiti ve yorumlanmasında uygun bir teknik olduğu da önerilmiştir.

Nandini ve Chikkadevaiah (2005)'nin yaptıkları çalışmada, 8 parental(ebeveyn), 7 hibrit ve 6 farklı varyeteye ait ayçiçeği arasındaki genetik çeşitliliğin tespiti için RAPD parmak izi yöntemini kullanmışlardır. CTAB metodu ile izole ettikleri DNA'yı 10 farklı primer kullanarak ve uygun PCR koşullarını optimize ederek çoğalttıklarını fakat sadece 5 primerde tam sonuç elde ettiklerini belirtmişlerdir. Elde edilen RAPD bant profilleri öncelikle parental ve hibrit ayçiçekleri arasında karşılaştırılmış ve hibrit türlerin belirgin şekilde farklı yapıya sahip olduğu vurgulanmıştır. Aynı şekilde 6 varyeteye ait RAPD bant profilleri her bir primer için kendi arasında mukayese edilerek genotipik farklılığın olduğu belirtilmiştir.

Aksoy ve Aras (2010)'ın yaptığı çalışmada, *Solanum melongena* L. tohumlarına farklı konsantrasyonlarda Cu^{+2} çözeltisi uygulamışlardır. Kök uzunluğu, kuru ağırlık değişimi, toplam protein içeriği Cu^{+2} çözeltisi uygulandıktan sonra ve öncesinde karşılaştırılmıştır. Bunlara ilaveten RAPD PCR tekniği uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda farklı Cu^{+2} çözeltisi uygulandığında *Solanum melongena* bitkisinde kök uzunluğu, kuru ağırlık değişimi, toplam protein içeriğinde ve RAPD PCR sonuçlarında açıkça farklar gözlenmiştir.

Aras vd. (2010)'nin yaptığı çalışmada, çevresel genotoksisite değerlendirmeleri için *Pseudevernia furfuracea* L. liken örneğinin uygulanabilirliği ve uygunluğu araştırılmıştır. Likenlerde ağır metal birikiminin Demir-çelik fabrikası gibi kirlilik kaynakları, yollar ve tren yolları, endüstri ve ağır trafikte olan etkileri bilinmektedir. Çeşitli kirlilik alanlarında farklı kirleticilere maruz kalan *P. furfuracea* örneklerindeki DNA değişimleri RAPD yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu çalışma genotoksisitenin değerlendirilmesi için liken örneklerinin uygunluğunu göstermiştir ve çelik fabrikasının etrafında potansiyel genotoksik ajanların seviyeleri hakkında bilgi sağlamaktadır.

Gehan vd. (2011)'nin yaptığı çalışmada, sodyum azid (NaN_3) ile muamele edilmiş iki farklı kültüre ait on farklı mutant ayçiçeği arasındaki genetik varyasyonun RAPD parmak izi yöntemiyle tespit edildiği belirtilmektedir. Kullanılan 10 farklı primerden 8 tanesinde mutant örneklerde varyasyonun olduğu belirtilmiştir. PCR yöntemiyle elde edilen 98 adet RAPD bant profilinden 83 tanesinin polimorfizm gösterdiği ve polimorfizm oranının % 85 civarında olduğu vurgulanmıştır. Elde edilen bu farklılığın mutant ayçiçekleri arasındaki genotipik farklılığı açıkça ortaya koyduğu ve sodyum azid'in de güçlü bir mutajenik ajan olduğu rapor edilmiştir.

Cansaran-Duman vd. (2011)'nin yaptığı diğer bir çalışmada ise Karabük Yenice Ormanlarından toplanan *Evernia prunastri* liken türü kullanılarak ağır metal birikimi atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca ağır metal birikiminin DNA üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucuna göre temiz bölgeden Karabük Demir Çelik fabrikasına kadar olan alandan alınan *Evernia prunastri* liken örneklerinden en fazla genotoksik etki, fabrikaya en yakın alınan istasyonlardan

oluştugu gözlemlenmiştir.

Aras vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada, temiz bölgeden toplanan *Pseudevernia furfuracea* liken örneklerine laboratuvar şartlarında ağır metal çözeltisi ile muamele edilmiştir. 30, 60, 120 mg/L'lik Pb^{+2} çözeltisi 18, 24 ve 48 saat aralığında tallusa uygulanmıştır. 24 ve 48 saat Pb^{+2} uygulanan örneklerde yapılan RAPD-PCR sonuçlarında, polimorfizm yüksek oranda tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2011–2013 yılları arasında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyoloji Laboratuvarı I ve II’de yürütülmüştür.

3.1 Materyal Temini

Çalışmada Aladağ Tohumculuktan temin edilen Günebakan çeşidi, ticari ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) tohumları kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak olan ayçiçeği tohumlarının yüzey sterilizasyonunu sağlamak için %30’luk sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi kullanılmıştır. Tohum yüzeyindeki koruyucu renk maddesi giderilene kadar NaOCl çözeltisiyle muamele edilmiş ve daha sonra NaOCl çözeltisi distile suyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

3.2.2 Çimlendirme

Deneylerde kullanılacak olan ayçiçeği tohumları arasından görünüş açısından sağlam olan tohumlar seçilmiştir. Çimlendirme ortamı olarak ticari yolla elde edilen perlit kullanılmıştır. Tohumlar viyollere (ekim kabı/alanı), viyolün her bir kuyusuna eşit sayıda tohum gelmesine ve perlit içindeki derinliklerine özen gösterilerek düzgün bir şekilde ekilmiştir.

3.2.3 Çinko (Zn^{+2}) çözeltisi hazırlanması ve uygulanması

Ekim işlemi yapıldıktan sonra ayçiçeği tohumlarına çinko (Zn^{+2}) ile muamele edilmiştir. Çinko katyonunun ($ZnSO_4$) stok çözeltisi 5000 mg/L olarak hazırlanmıştır. Tohumlar stok çözeltisinin, 1X hogland çözeltisi kullanılarak seyreltilmesi ile elde edilmiş farklı

konsantrasyonlardaki (20 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L, 640 mg/L ve 1280 mg/L) ağır metal çözeltilerine maruz bırakılarak üç hafta süreyle belirli aralıklarla sulanmış ve oda sıcaklığında çimlenmesi sağlanmıştır. Kontrol grubu tohumlar ise sadece 1X Hogland çözeltisi ile sulanarak üç hafta süreyle oda sıcaklığında yetiştirilmiştir.

3.3 Ölçüm ve Uygulamalar

3.3.1 Bitki kök ve gövde boylarının belirlenmesi

Ağır metal stresinin bitkiler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla üç haftanın sonunda bazı büyüme parametrelerinden kök uzunluğu (mm/fide), gövde uzunluğu (mm/fide) tek tek ölçülerek belirlenmiş ve ortalama değer alınarak değerlendirilmiştir.

3.3.2 Toplam çözüner protein içeriğinin belirlenmesi (Bradford Metodu)

0.08 g tartılan kontrol ve çinko stresine maruz kalmış bitki kök örnekleri sıvı azotla havanda ezilerek 700 µl fosfat tamponu (0.2 M, pH 7.0) ile homojenize edilmiş, 14000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatantlar yeni tüplere alınmıştır (Omran 1980). Örneklerin toplam çözüner protein konsantrasyonları, Bradford metoduna (Bradford 1976) göre belirlenmiştir. Bu yönteme göre 100 µl örnek çözeltisinin üzerine 1000 µl 1X Bradford çözeltisi eklenmiştir. Blank (Kör) olarak 100 µl deiyonize ve 1000 µl 1X Bradford karışımı kullanılmıştır. Bu karışımlar ~10 saniye vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve absorban değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Hitachi U-1800) paralelli olarak blanke (köre) karşı okunmuştur. Standart, BSA (Bovin Serum Albumin) ile hazırlanmıştır.

Bradford belirtecini hazırlanması;

- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250,
- 50 ml % 95 etanol,
- 100 ml % 85 H₃PO₄ (fosforik asit)

- 1000 ml'ye su ile tamamlanır.
- 5X'lik solusyon elde edilir. Çözelti +4 °C'de karanlıkta tutulur, kullanılacağı zaman 5 kere sulandırılır. Whatman no:1 filtreden geçirilir ve cam şişede +4 °C'de tutulur.

3.3.3 DNA izolasyonu

RAPD analizlerini gerçekleştirmek üzere ayçiçeği örneklerinden DNA izolasyonu, Aras ve Cansaran (2006) tarafından optimize edilmiş protokole göre yapılmıştır. İzolasyon sonucunda 600 ile 3500 ng/µl aralığında değişen miktarlarda ve 1.99 ile 2.08 aralığında saflık gösteren DNA elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Ayrıca DNA kalitesi etidyum bromür varlığında agaroz jelde de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Nanodrop sonuçları

Örnekler	ng/ µl	260/280	260/230
Kontrol	781,2	2,06	1,62
20 mg/L	602,2	2,08	1,59
40 mg/L	608,9	2,05	1,51
80 mg/L	2843,4	2,03	1,61
160 mg/L	3465,7	2,01	1,56
320 mg/L	927,8	2,03	1,61
640 mg/L	1249,7	1,99	1,68
1280 mg/L	1151,4	2,01	1,59

DNA izolasyonu aşağıdaki protokolle gerçekleştirilmiştir.

- Bitki materyali (~200mg) toz haline gelinceye kadar sıvı azotta ezilir.
- Önceden ısıtılmış DNA ekstraksiyon tamponundan (50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 10 ml LiCl (4 M), % 1 CTAB, % 2 PVPP) her örneğe 1 ml eklenerek örnekler kısa bir süre daha tamponda ezilir.
- Örnekler 1.5 ml eppendorf tüplerine alınır ve üzerlerine 10 µl β-merkaptotanol eklenir.

- Örnekler, 65 °C’de 45 dakika boyunca su banyosunda inkübe edilir.
- İnkübasyon süresinin sonunda örneklerin oda sıcaklığına soğuması beklenir.
- Oda sıcaklığında soğuyan örneklerin üzerine 0.5 ml kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenir ve vorteks kullanılmadan iyice karıştırılır. Ardından örnekler 30 dakika süreyle -20 °C’de tutulur.
- Daha sonra örnekler 14,000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir ve santrifüj sonunda üst sıvı (süpernatant) yeni bir tüpe aktarılır. Üzerine kapak kapanacak kadar soğuk izopropanol eklenir. DNA eldesinin etkinliğini arttırmak için örnekler derin dondurucuda (-20 °C) 30 dakika inkübe edilir.
- Sonrasında örnekler tekrar 14,000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve pelletin üzerine %70’lik etanol eklenir.
- Örnekler tekrar 14,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen pellet, etanol tamamen uçana kadar oda sıcaklığında kurutulur.
- Daha sonra pellet üzerine uygun miktarda (30-60 µl) TE tamponu (10 mM Tris-HCl (pH: 8), 1 mM EDTA) veya ~100 µl ddH₂O eklenerek çözündürülür.
- Çözeltinin üzerine 10 µl ribonükleaz (RNaz, 10 mg/ml) eklenir ve 37 °C’de 20 dakika inkübe edilir.
- Örnekler kullanılana kadar -20 °C’da saklanır.

3.3.4 RAPD uygulamaları

Standart RAPD tekniği, primer olarak rastgele seçilmiş yaklaşık 10 baz uzunluğunda kısa sentetik oligonükleotidlerle nanogram miktarlardaki genomik bitki DNA’sının, polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

Isınsal döngü (Biometra Thermal Cycler) cihazını kullanarak gerekli ve uygun bir çoğaltma sıcaklığında oligonükleotidler kalıp DNA üzerindeki primer bağlanma noktalarına bağlanarak DNA parçacıklarının çoğaltılmasını sağlamaktadır. Amplifikasyon ürünleri genellikle agaroz jel üzerinde ayrılmakta ve etidiyum bromidle de boyanmaktadır. RAPD bant desenleri incelendiğinde aynı kalıp DNA üzerinden üretilen çoğaltım ürünleri arasında uzunluk bakımından farklılıklar bulunmakta ve parçacıklar oluşan profilde var/yok şeklinde görülmekte ve yorumlanmaktadır.

Çalışmada yirmi farklı primer kullanılmıştır. Kullanılan bu primerlerden 14 tanesi kesin ve net bantlar vermiştir (Çizelge 3.2). Diğer 6 primer ise amplifikasyon vermediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Gerçekleştirilen RAPD uygulamalarında tüm işlemler (PCR döngü şartları, ısı döngü cihazı, kullanılan Taq polimeraz ve diğer PCR bileşenlerinin markası ve konsantrasyonları, elektroforez şartları ve jel konsantrasyonları, tampon ve diğer çözeltiler için kullanılan kimyasalların tür ve markası vb.) Liu vd. (2005) ve Iqbal vd. (2010)'ne göre optimize edilmiş şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyondan korunmak için steril ekipmanlar kullanılmış ve her RAPD işlemi için DNA örneği içermeyen negatif kontrol kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan primerler ve dizi bilgileri

<i>Primer</i>	<i>Nükleotid Dizisi (5' → 3')</i>
OPC-01	TTCGAGCCAG
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-04	CCGCATCTAC
OPC-05	TGGACCGGTG
OPC-06	GAACGGACTC
OPC-07	GTCCCGACGA
OPC-08	TGGACCGGTG
OPC-09	CTCACCGTCC
OPC-10	TGTCTGGGTG
OPC-11	AAAGCTGCGG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-08	GTGACGTAGG
OPB-07	GGTGACGCAG
OPF-05	CCGAATTCCC

3.3.4.1 RAPD bileşenleri ve koşulları

25 µl reaksiyon içerisinde yaklaşık 200 ng genomik DNA, 2,5 µl 10x reaksiyon tamponu, 20 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM primer, 0.5 U Taq DNA polimeraz (Promega) kullanılmıştır. Bu bileşenlere standart hacime ulaşacak şekilde ultra distile su eklenmiştir.

Optimize edilmiş PCR reaksiyonları Biometra Thermal Cycler ile aşağıdaki programa göre yapılmıştır. (Liu vd. 2005, Iqbal vd. 2010).

- Kapak Sıcaklığı 105 °C
 - Ön Denatürasyon 95 °C 5 dk
 - Denatürasyon 94 °C 1dk 30 sn
 - Bağlanma 36 °C 1 dk
 - Uzama 72 °C 2 dk
 - Final Uzama 72 °C 5 dk
- (35 döngü)

3.3.4.2 Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünleri ve DNA belirteçleri (marker) (DNA ladder plus, promega, 100 bp) % 1.6 agaroz konsantrasyonu ve 0,5 µl/ml etidyum bromür içeren jelde, 1x TBE (Tris borat EDTA) tamponu içerisinde 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 2-2,5 saat koşturulmuştur. Herhangi bir kontaminasyonun var olup olmadığını belirlemek için de negatif kontrol kullanılmıştır. Jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş (Gene Genius, Syngene) ve fotoğrafları çekilmiştir (GyneSnap Software, Synoptics Ltd.).

3.3.5 CRED-RA tekniği ile metilasyon uygulaması

3.3.5.1 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

Metilasyon farklılıklarının gözlenmesi için Msp-I (Promega#R6401) ve Hpa-II (Promega#R6311) enzimleri kullanılmıştır. Aynı örneğe ait genomik DNA için her iki enzimin kesim reaksiyonu farklı mikrosantrifüj tüplerinde son hacim 20 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

20 µl reaksiyon içerisinde yaklaşık 1µg genomik DNA, 2 µl 10X enzim reaksiyon tamponu, 10 µg BSA Acetylated ve 10 U restriksiyon enzimi (Promega) kullanılmıştır.

Kesim reaksiyonunun gerçekleşmesi için yukarıda belirtilen reaksiyon bileşenleri ile

hazırlanan mikrosantrifüj tüpleri 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 4 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda restriksiyon enziminin inaktivasyonu için örnekler 95 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 15 dakika bekletilmiştir.

3.3.5.2 PCR bileşenleri ve koşulları

25 µl reaksiyon içerisinde yaklaşık 200 ng kesim ürünü, 2,5 µl 10x reaksiyon tamponu, 20 mM dNTPs, 2,5 µl MgCl₂, 0,2 mM her bir primer, 0.5 U Taq DNA polimeraz (Promega) kullanılmıştır. Optimize edilmiş PCR reaksiyonları Biometra Thermal Cycler ile aşağıdaki programa göre yapılmıştır.

Kapak Sıcaklığı	105 °C		
Ön Denatürasyon	98 °C	1 dk 30 saniye	
Denatürasyon	95 °C	30 sn	} 45 Döngü
Bağlanma	36 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	2 dk	
Final Uzama	72 °C	10 dk	

Çoğaltılan örnekler % 1.6'lık agaroz jele yüklenerek (% 50 agaroz ve % 50 Nu Sieve GTG agaroz FMC corporation), 100 V'da 3 saat koşturulmuştur. Herhangi bir kontaminasyonun varolup olmadığını belirlemek için de negatif kontrol kullanılmıştır.

3.4 Veri Analizleri

3.4.1 Örneklerin toplam çözümlü protein konsantrasyonunun hesaplanması

Örneklerin toplam çözümlü protein konsantrasyonunun hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

3.4.2 RAPD verilerinin yorumlanması

Veri analizleri kontrol örnekte gözlenen bantlar ile örneklerde elde edilen polimorfik bantların karşılaştırılması ile yapılmıştır. Yeni oluşan ve kaybolan bantlar her bir primerde her örnek için tespit edilmiş, tablolaştırılmış ve sonuçta genomik kalıp stabilitesi (GKS) oranları verilen formüle göre hesaplanmıştır. $GKS=1-(100a/n)$, 'a' RAPD'de elde edilen polimorfik profil, 'n' kontrolde elde edilen total bant sayısını göstermektedir.

3.4.3 CRED-RA verilerinin değerlendirilmesi

HpaII ve MspI enzimleri ile ayrı ayrı kesim yapılmış ve CRED-RA analizi sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde çizelge 3.3 referans olarak kullanılmıştır (Temel vd. 2008).

Çizelge 3.3 HpaII ve MspI restriksiyon enzimlerinin kesim yeteneklerine göre oluşturulmuş metilasyon tipleri

TİP	Metilasyon Kalıbı	HpaII	MspI
TİP I	CCGG GGCC CCGG GGCC	Aktif	Aktif
TİP II	CCGG GGCC	Aktif	İnaktif
TİP III	CCGG GGCC	İnaktif	Aktif
TİP IV	CCGG GGCC	İnaktif	İnaktif

Buna göre metilasyon bant profili; Var (1)-Yok (0) olarak skorlanmıştır. Bu skorlar ise ikili olarak çizelge 3.4'e göre değerlendirilmiştir.

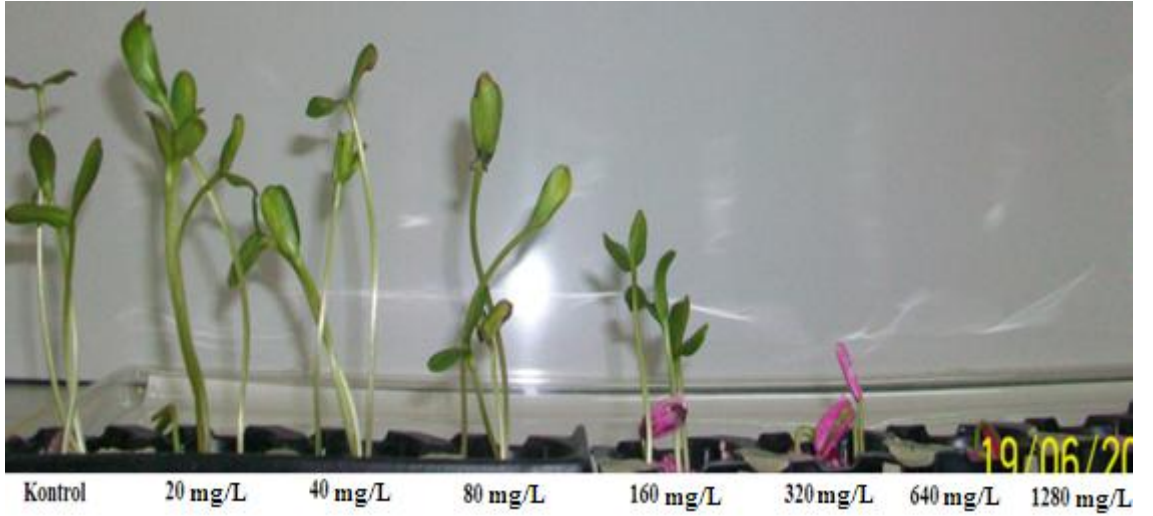
Çizelge 3.4 Var-Yok olarak skorlanan CRED-RA bantlarının ifade ettiği metilasyon tipleri

HpaII	MspI	İFADE
0	0	Tip I
0	1	Tip II
1	0	Tip III
1	1	Tip IV

4. BULGULAR

4.1 Yetiştirilen Ayçiçeği Örnekleri

Yetiştirilen ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) örneklerinin genel görünüşleri resim 4.1'deki gibidir.



Resim 4.1 Yetiştirilen bitki örneklerinin genel görünüşü (Orijinal 2012)

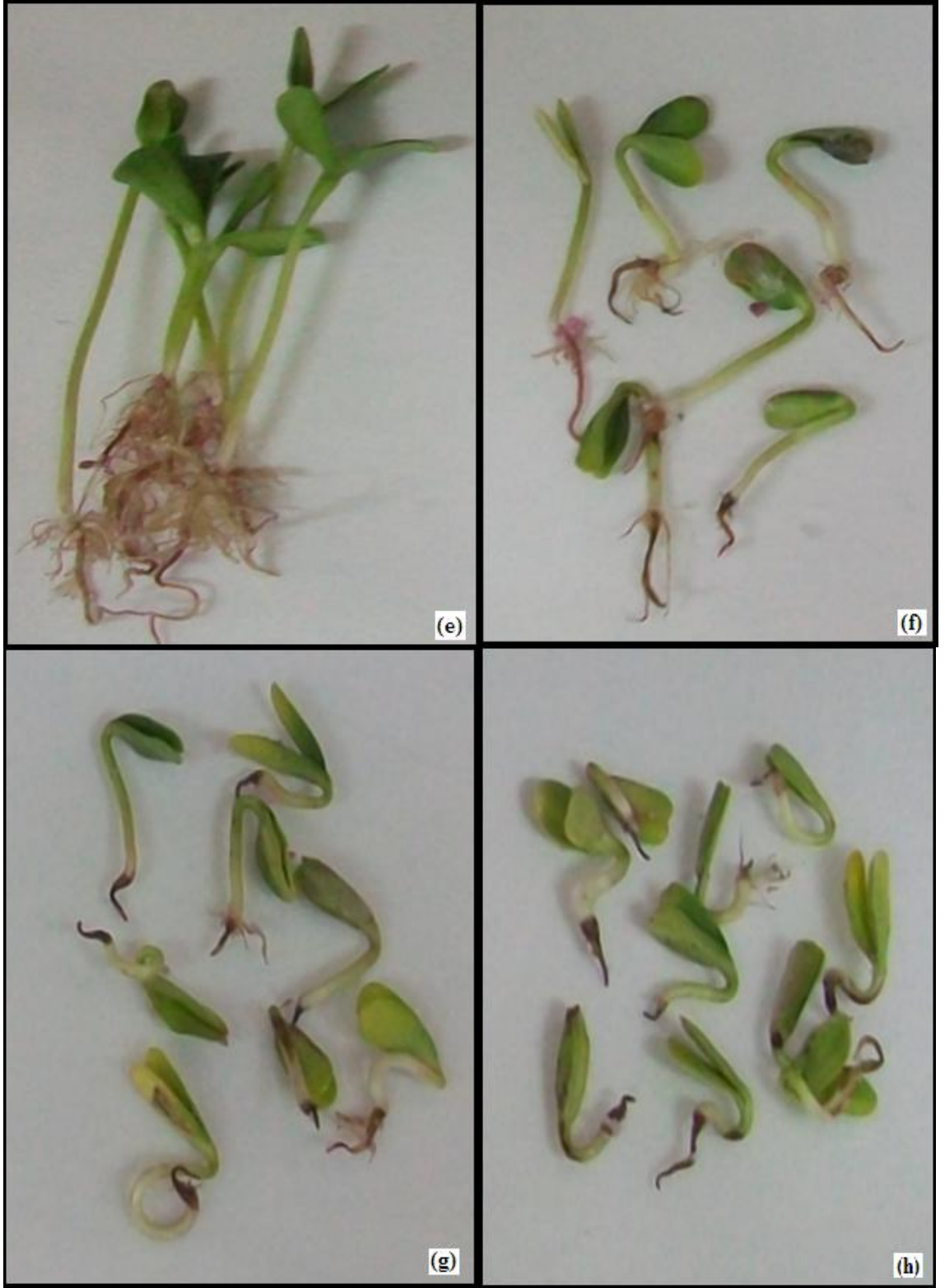
21 gün süre ile farklı Zn^{+2} konsantrasyonlardaki ağır metal stresine maruz bırakılan bitki örnekleri incelendiğinde, genel görünüş itibariyle 20 mg/L ve 40 mg/L çinko stresine maruz bırakılan bitki örneklerinin, kontrol grubuna göre gelişiminin daha fazla olduğu, 80 mg/L ve artan konsantrasyonlarda ise gelişimin giderek azaldığı gözlemlenmiştir.

Hasat edildikten sonra yapılan gözlemlerde de 20 mg/L ve 40 mg/L çinko stresine maruz bırakılan bitki örneklerinin kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu, 80 mg/L ve artan konsantrasyonlarda ise azaldığı gözlemlenmiştir.

Ayrıca 80 mg/L ve artan konsantrasyonlarda köklerde karamalarının olduğu ve giderek arttığı gözlemlenmiştir (Resim 4.2).



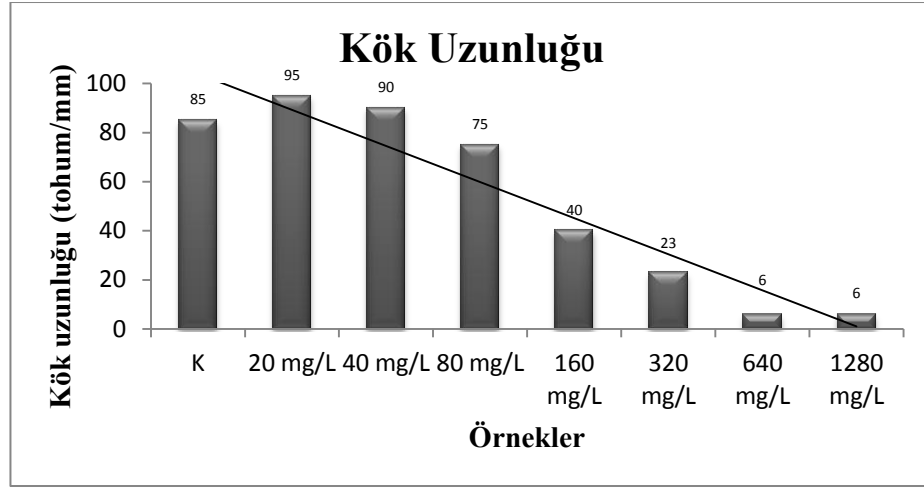
Resim 4.2.a.Kontrol grubu ayçiçeği örnekleri, b. 20 mg/L Zn²⁺ stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, c. 20 mg/L Zn²⁺ stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, d. 80 mg/L Zn²⁺ stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri



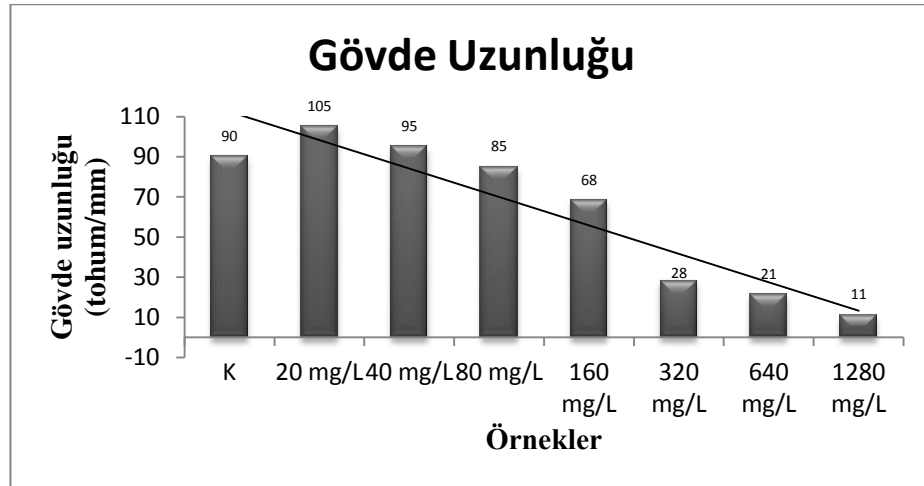
Resim 4.2.e. 160 mg/L Zn^{+2} stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, f. 320 mg/L Zn^{+2} stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, g. 640 mg/L Zn^{+2} stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri, h. 1280 mg/L Zn^{+2} stresine maruz bırakılan ayçiçeği örnekleri (devamı)

4.2 Fide Gelişim Evresinde Ayçiçeği Bitkisinin Kök ve Gövde Büyümesi Üzerine Çinko Stresinin Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Zn^{+2} stresinin ayçiçeği bitkisinin kök ve gövde uzunluğuna etkisi incelendiğinde; kontrol grubuna göre 20 mg/L ve 40 mg/L Zn^{+2} konsantrasyonlarında artış gözlemlenirken, 80 mg/L Zn^{+2} ve artan konsantrasyonlarda kök ve gövde uzunluğu önemli derecede azalmıştır (Şekil 4.1-4.2).



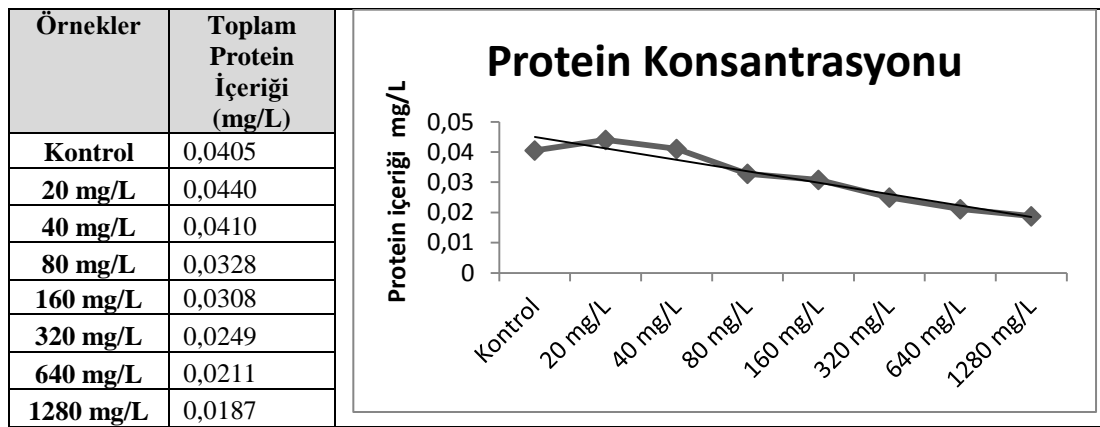
Şekil 4.1 Oda sıcaklığında üç hafta boyunca, farklı çinko konsantrasyonlarında gelişen ayçiçeklerine ait kök uzunlukları



Şekil 4.2 Oda sıcaklığında üç hafta boyunca, farklı çinko konsantrasyonlarında gelişen ayçiçeklerine ait gövde uzunlukları

4.3 Çinko Stresinin Ayçiçeği Bitkisinde Toplam Çözünür Protein Miktarına Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Zn^{+2} çözeltisinin, ayçiçeği örneklerinde toplam çözünür protein içeriği ölçümleri incelendiğinde kontrol grubunda değer 0,0405 mg/L çıkmıştır. Buna karşın 20 mg/L'de sonuç 0,0440 mg/L ve 1280 mg/L'de ise 0,0187 mg/L bulunmuştur. 20 mg/L ve 40 mg/L'de kontrol örneklerine göre artış gözlenmiştir. 80 mg/L ve artan konsantrasyonlarda ise protein içeriğinin giderek azaldığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.3).

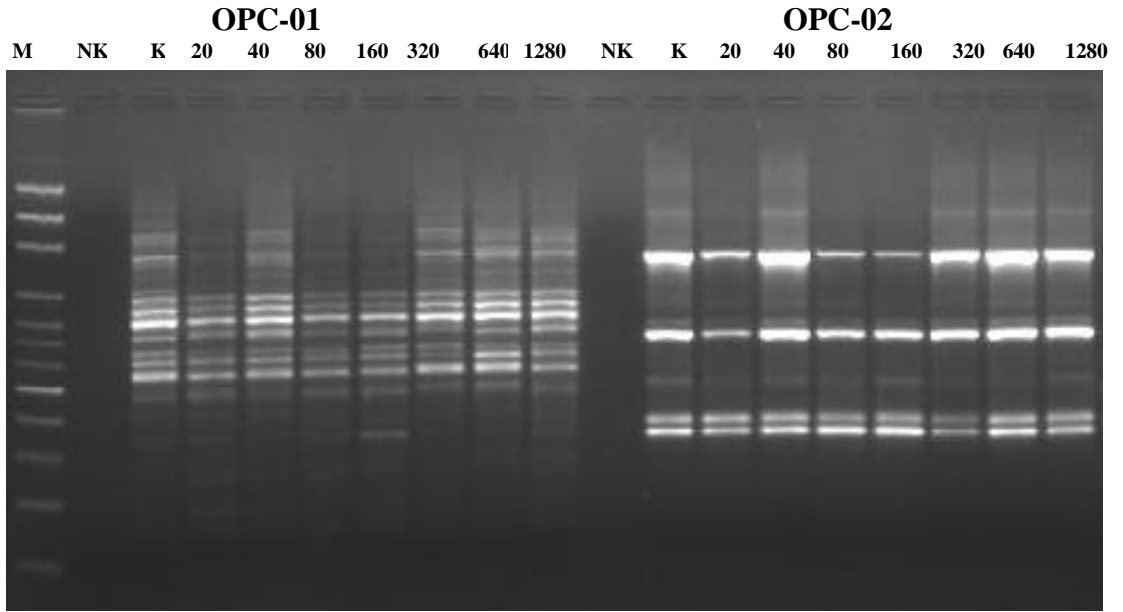


Şekil 4.3 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetiştirilen ayçiçeği örneklerine ait protein içeriği ölçümleri

4.4 RAPD-PCR Bulguları

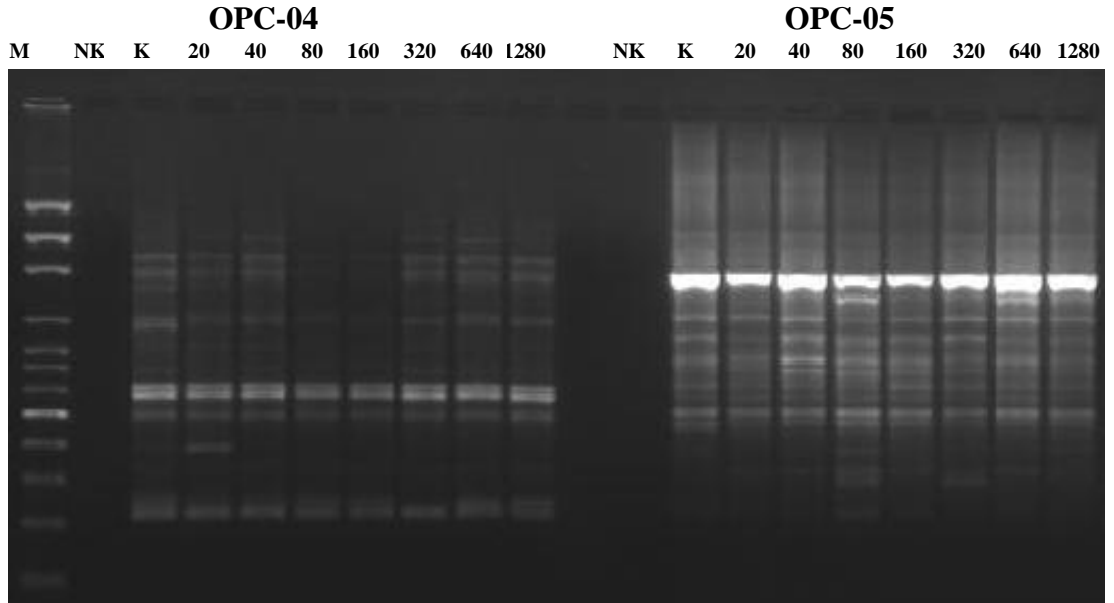
Deneylerde kullanılan 14 primer net ve tekrar edilebilir sonuçlar vermiştir. Her primer için polimorfizm hesaplamaları, kontrol örneğine karşın artan ve azalan bant sayısındaki değişim karşılaştırılarak yapılmıştır.

RAPD-PCR jel görüntüleri Şekil 4.4-4.12’te verilmiştir.



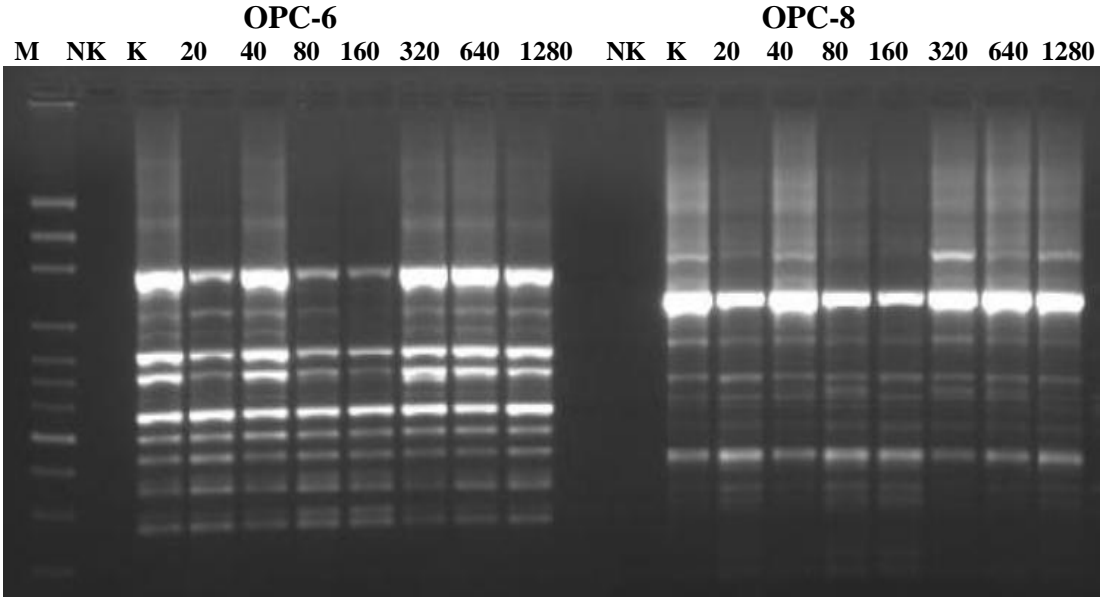
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.4 OPC-01 ve OPC-02 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



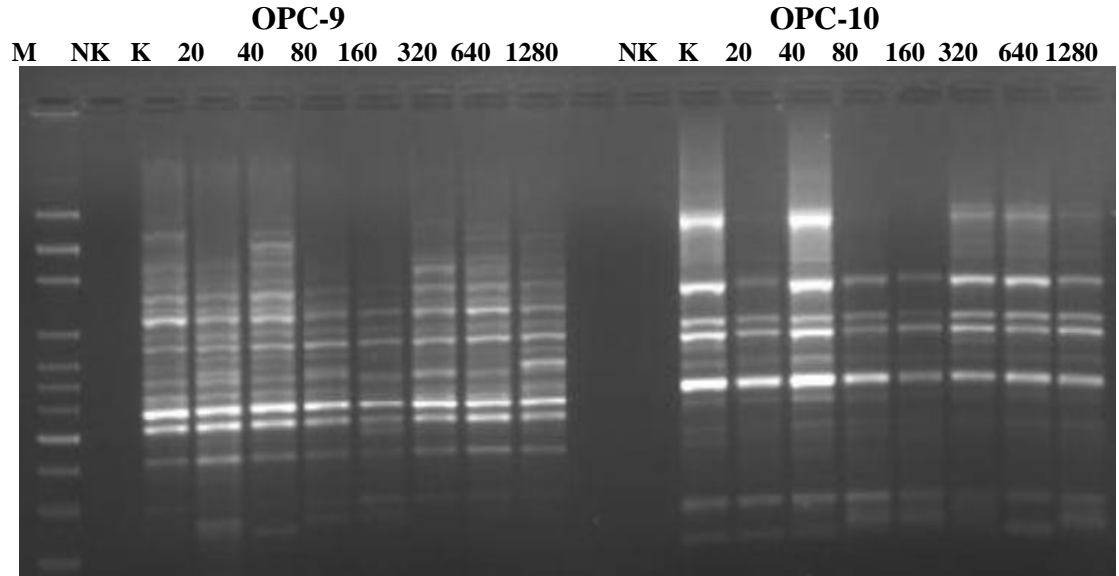
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.5 OPC-04 ve OPC-05 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



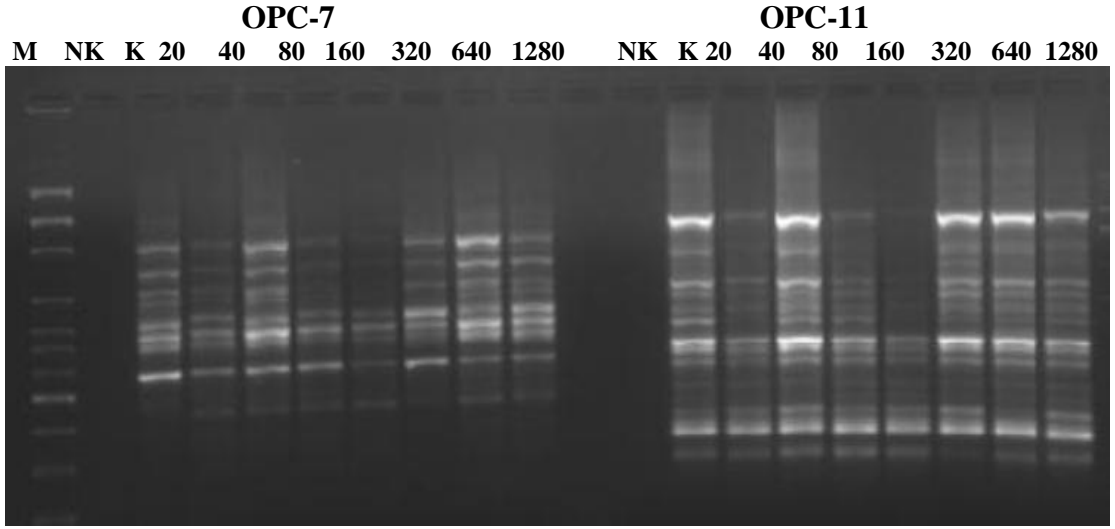
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.6 OPC-06 ve OPC-08 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



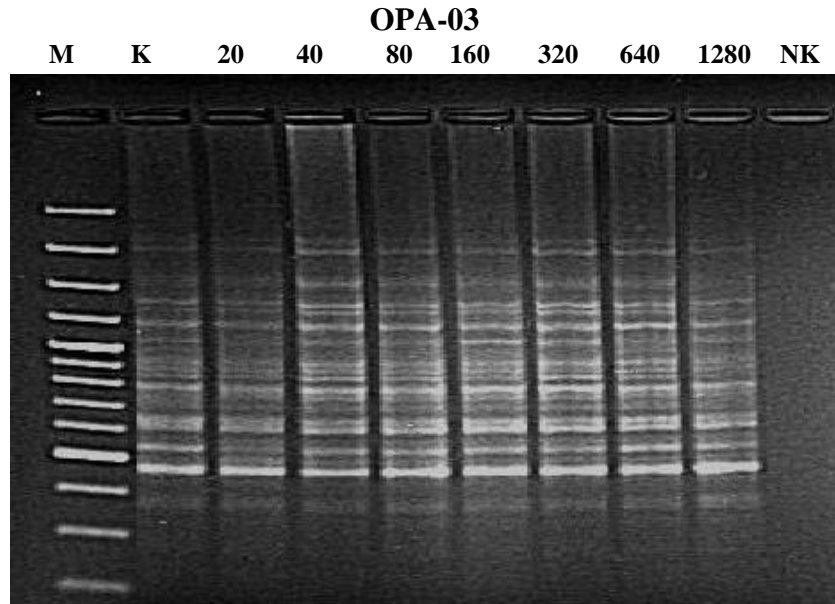
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.7 OPC-09 ve OPC-10 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



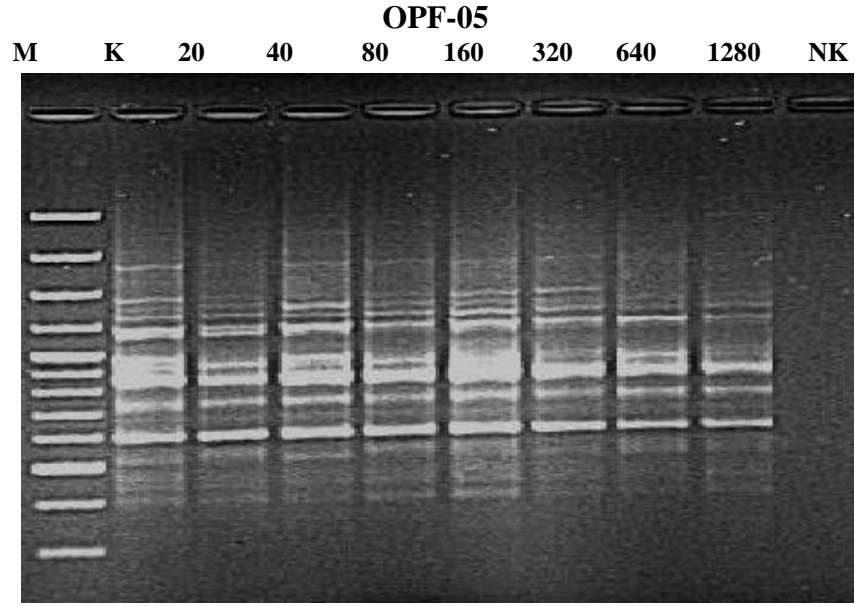
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.8 OPC-07 ve OPC-11 primerlerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



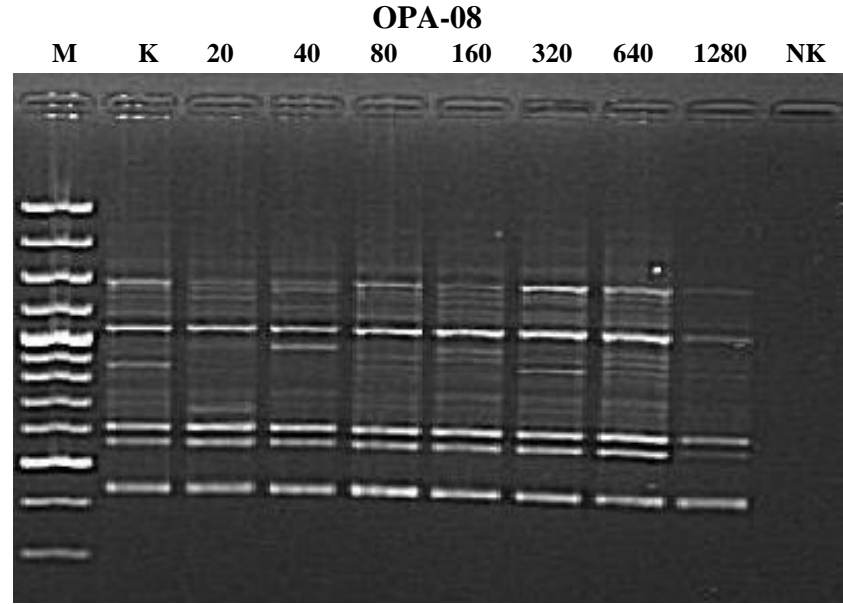
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.9 OPA-03 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



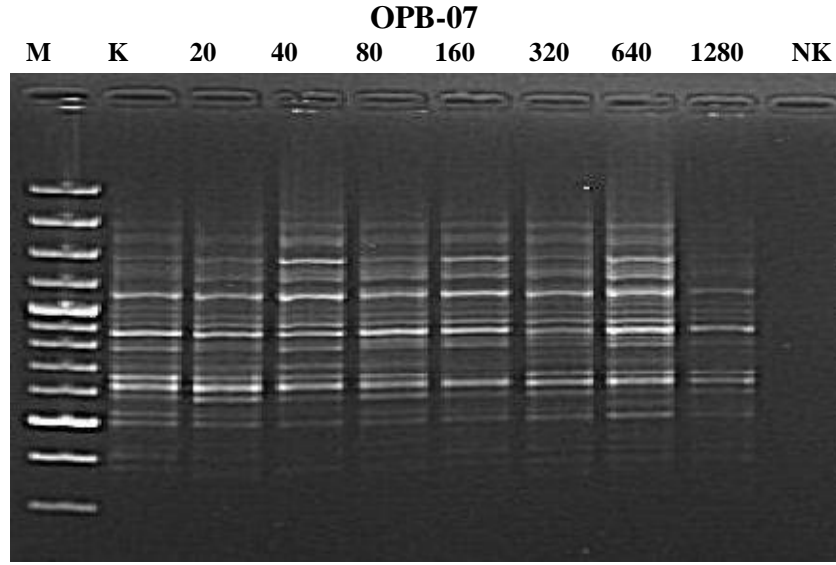
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.10 OPF-05 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.11 OPA-08 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü



M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif

Şekil 4.12 OPB-07 primerinin RAPD-PCR jel görüntüsü

Polimorfizm yüzdeleri polimorfik bant sayısına toplam bant sayıları oranlanarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge 4.1’de a; kontrole göre yeni ortaya çıkan bantları belirtmek için b; kaybolan kontrol bantlarını belirtmek için kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 Örneklere ait bant farklılıkları

Primer	K	20 mg/L		40 mg/L		80 mg/L		160 mg/L		320 mg/L		640 mg/L		1280 mg/L	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
OPA03	20	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
OPA08	16	0	2	0	4	0	2	0	1	0	0	0	0	0	7
OPB07	19	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	8
OPC01	13	1	3	2	3	1	6	1	3	3	0	2	0	2	0
OPC02	8	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
OPC04	9	1	2	1	3	0	3	0	3	1	2	1	1	0	1
OPC05	9	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
OPC06	11	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0
OPC07	8	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0
OPC08	9	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	1	0	0	0
OPC09	14	1	3	3	0	1	4	1	6	0	4	0	3	1	3
OPC10	9	0	3	0	1	0	3	0	3	0	1	0	1	0	1
OPC11	12	0	2	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
OPF05	11	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0	2
		3	17	7	13	4	26	3	26	8	16	6	7	5	24
Toplam	168	20		20		30		29		24		13		29	

K: Kontrol

a: Kontrole göre yeni oluşan bant sayısı

b: Kontrole göre kaybolan bant sayısı

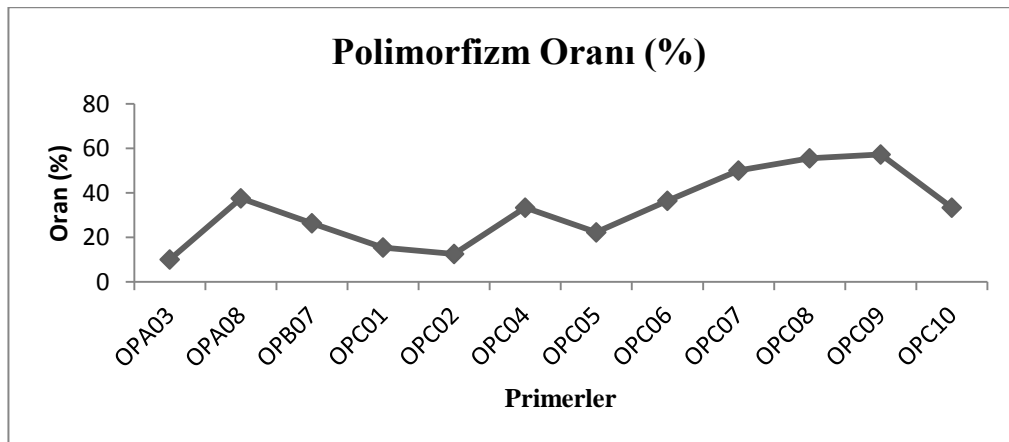
Çizelge 4.1’de kontrol grubuna göre en fazla varyasyonun 80 mg/L Zn^{+2} uygulanmış örneklerde görüldüğü ve en düşük varyasyonun ise 640 Zn^{+2} mg/L uygulanmış örneklerde görüldüğü söylenebilir.

Çizelge 4.2 Primerlere ait polimorfizm oranları

Primerler	Toplam Bant	Polimorfik Bant	Polimorfizm Oranı (%)
OPA03	20	2	10
OPA08	16	6	37,5
OPB07	19	5	26,3
OPC01	13	2	15,4
OPC02	8	1	12,5
OPC04	9	3	33,3
OPC05	9	2	22,2
OPC06	11	4	36,4
OPC07	8	4	50
OPC08	9	5	55,5
OPC09	14	8	57,2
OPC10	9	3	33,3
OPC11	12	6	50
OPF05	11	3	25,3

Çizelge 4.2’de RAPD uygulaması yapılan primerlerden en yüksek polimorfizm oranı % 57,2 ile OPC-09’da, en düşük polimorfizm oranı ise OPA-03’te gözlemlenmiştir.

RAPD uygulaması yapılan primerlere ait polimorfizm oranlarının değişimi şekil 4.13’te verilmiştir.



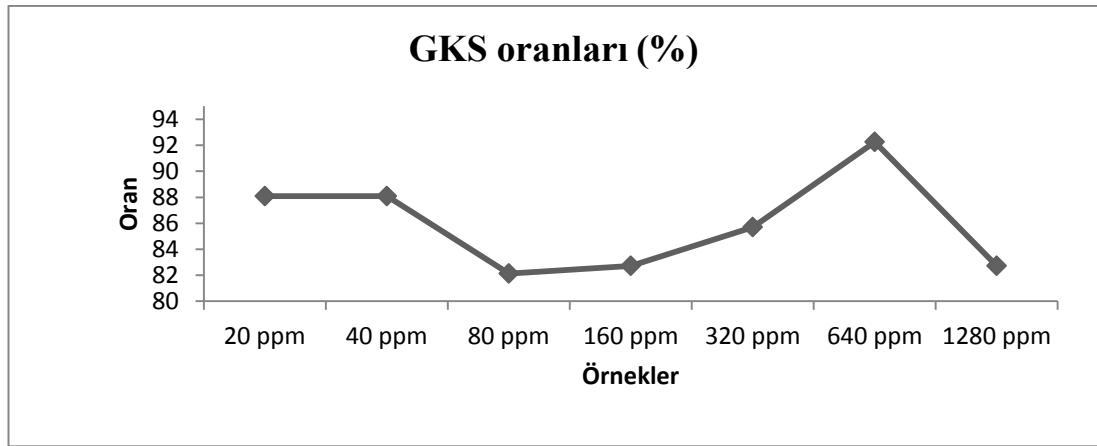
Şekil 4.13 Primerlere ait polimorfizm oranlarının değişimi

Ayçiçeği örneklerine ait RAPD sonuçları incelendiğinde en yüksek GKS değerinin 640 mg/L Zn⁺² uygulamasında % 92,26 olduğu görülmektedir. En düşük GKS değerinin ise 80 mg/L Zn⁺² uygulamasında % 82,14 olarak bulunduğu görülmektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Çinko stresi uygulanan örneklere ait GKS oranları

Örnekler	GKS (%)
20 mg/L	88,09
40 mg/L	88,09
80 mg/L	82,14
160 mg/L	82,73
320 mg/L	85,71
640 mg/L	92,26
1280 mg/L	82,73

RAPD uygulaması yapılan örneklere ait GKS oranlarındaki değişim şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14 GKS oranlarındaki % değişim

4.5 CRED-RA Bulguları

CRED-RA analizi için, RAPD analizleri sırasında kullanılan 14 tane primerden net bantlar veren 8 adet primer seçilmiştir. Seçilen 8 primer ve dizi bilgileri çizelge 4.4'te verilmiştir.

CRED-RA analizi sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde çizelge 3.3 referans olarak kullanılmıştır. Bu değerlendirmeler için metilasyon bant profili; Var (1)-Yok (0) olarak skorlanmıştır. Bu skorlar ise ikili olarak çizelge 3.4'e göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.4 CRED-RA analizinde kullanılan primerler ve dizi bilgileri

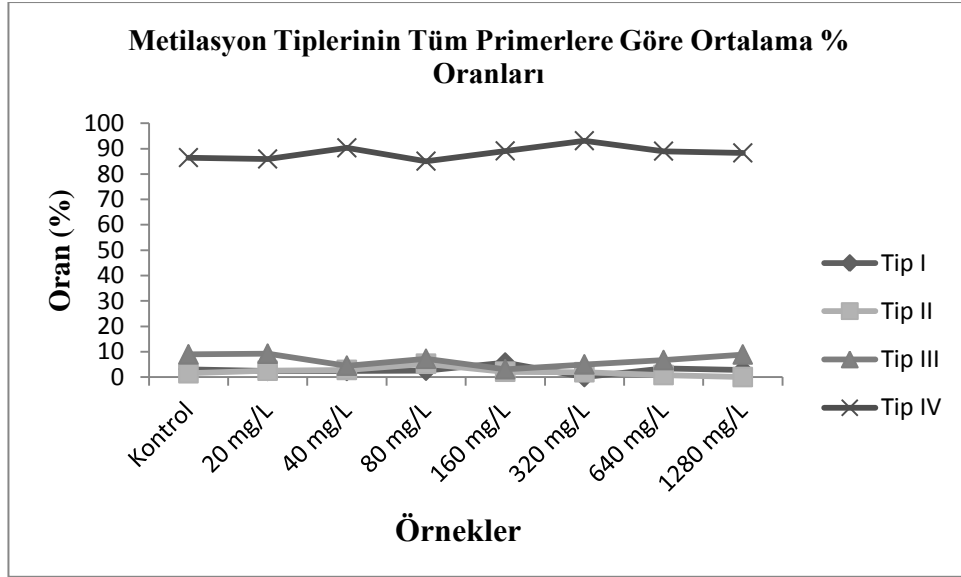
<i>Primer</i>	<i>Nükleotid Dizisi (5' → 3')</i>
OPC-01	TTCGAGCCAG
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-04	CCGCATCTAC
OPC-05	TGGACCGGTG
OPC-06	GAACGGACTC
OPC-08	TGGACCGGTG
OPC-11	AAAGCTGCGG
OPA-03	AGTCAGCCAC

Farklı konsantrasyonlarda Zn^{+2} stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin seçilen primerler ile yapılan CRED-RA sonuçlarının değerlendirilmesiyle oluşturulan metilasyon tiplerinin yüzde olarak oranları çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Seçilen primerler ile yapılan CRED-RA sonuçlarının değerlendirilmesiyle oluşturulan metilasyon tiplerinin % oranları

Primerler	Kontrol		20		40		80		160		320		640		1280	
OPC01	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0
	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0
	TipIII	12,5	TipIII	20	TipIII	7,7	TipIII	31,25	TipIII	9,1	TipIII	30,77	TipIII	30	TipIII	16,7
	TipIV	87,5	TipIV	80	TipIV	92,3	TipIV	68,75	TipIV	90,9	TipIV	69,23	TipIV	70	TipIV	83,3
OPC02	TipI	6	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	25	TipI	0	TipI	7,2	TipI	0
	TipII	6	TipII	20	TipII	22,3	TipII	29,5	TipII	16,7	TipII	0	TipII	0	TipII	0
	TipIII	41	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	11,7	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	7,7
	TipIV	47	TipIV	80	TipIV	77,7	TipIV	58,8	TipIV	58,3	TipIV	100	TipIV	92,8	TipIV	92,3
OPC04	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	7,2	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	7,6
	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0
	TipIII	5,6	TipIII	7,7	TipIII	6,25	TipIII	0	TipIII	8,4	TipIII	0	TipIII	9,1	TipIII	15,3
	TipIV	94,4	TipIV	92,3	TipIV	93,75	TipIV	92,8	TipIV	91,6	TipIV	100	TipIV	90,9	TipIV	76,9
OPC05	TipI	6,7	TipI	10	TipI	11,2	TipI	5,3	TipI	12,5	TipI	0	TipI	0	TipI	0
	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	5,3	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0
	TipIII	0	TipIII	5	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0
	TipIV	93,3	TipIV	85	TipIV	88,8	TipIV	89,4	TipIV	87,5	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100
OPC06	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0
	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0
	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	9
	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	91
OPC08	TipI	6,25	TipI	0	TipI	8,35	TipI	0	TipI	8,4	TipI	0	TipI	8,3	TipI	7,7
	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	7,2	TipII	0	TipII	9	TipII	0	TipII	0
	TipIII	6,25	TipIII	27,5	TipIII	8,35	TipIII	14,2	TipIII	0	TipIII	9	TipIII	8,3	TipIII	15,3
	TipIV	87,5	TipIV	62,5	TipIV	83,3	TipIV	78,6	TipIV	91,6	TipIV	82	TipIV	83,4	TipIV	77
OPC11	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	7,2	TipI	0	TipI	0	TipI	6,25	TipI	7,2
	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0
	TipIII	6,3	TipIII	13,4	TipIII	13,4	TipIII	0	TipIII	7,2	TipIII	0	TipIII	6,25	TipIII	0
	TipIV	93,7	TipIV	86,6	TipIV	86,6	TipIV	92,8	TipIV	92,8	TipIV	100	TipIV	87,5	TipIV	92,8
OPA03	TipI	5,9	TipI	9	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	0	TipI	6,25	TipI	0
	TipII	5,9	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	0	TipII	5,9	TipII	6,25	TipII	0
	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	0	TipIII	7,2
	TipIV	88,2	TipIV	91	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	100	TipIV	94,1	TipIV	87,5	TipIV	92,8
Ortalama	TipI	3,1	TipI	2,4	TipI	2,4	TipI	2,5	TipI	5,7	TipI	0	TipI	3,5	TipI	2,8
	TipII	1,5	TipII	2,5	TipII	2,8	TipII	5,25	TipII	2,1	TipII	1,9	TipII	0,8	TipII	0
	TipIII	8,95	TipIII	9,2	TipIII	4,5	TipIII	7,2	TipIII	3,1	TipIII	5	TipIII	6,7	TipIII	8,9
	TipIV	86,45	TipIV	85,9	TipIV	90,3	TipIV	85,05	TipIV	89,1	TipIV	93,1	TipIV	89	TipIV	88,3

Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin, 8 farklı primer ile yapılan CRED-RA uygulamasında tüm metilasyon tiplerinin ortalama değerleri incelendiğinde, Tip I metilasyonun en yüksek değerinin 160 mg/L'de % 5,7 olduğu ve 320 mg/L'de varlık göstermediği görülmektedir. Tip II metilasyonun en yüksek değeri 80 mg/L'de % 5,25 iken 1280 mg/L'de varlık göstermemektedir. Tip III metilasyonun en yüksek oranı % 9,2 ile 20 mg/L'de görülürken, en düşük değeri 160 mg/L'de görülmüştür. Tip IV metilasyon ise tüm çinko konsantrasyonlarında yüksek oranlarda bulunmuştur. En yüksek değeri 320 mg/L'de % 93,1 iken, en düşük değeri 80 mg/L'de % 85,05'dir (Şekil 4.15).

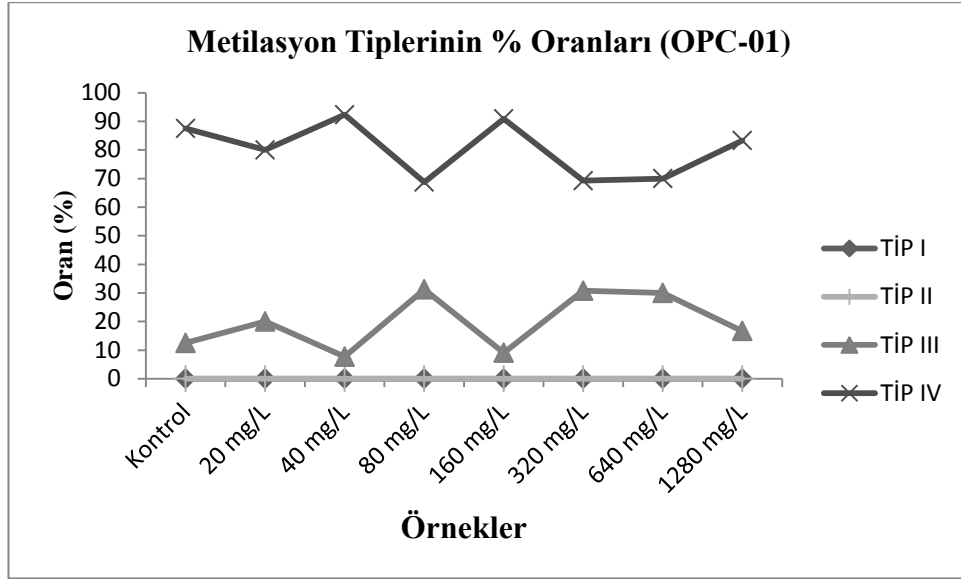


Şekil 4.15 Metilasyon tiplerinin tüm primerlere göre ortalama % oranları

Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin metilasyon modellerindeki değişimi gözlemlemek için, her bir primere göre tek tek analizler yapılmış ve değerlendirmeler kullanılan primerler de göz önünde bulundurularak incelenmiştir.

Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-01 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, kontrol grubu da dahil değişen tüm konsantrasyonlarda Tip I ve Tip II metilasyon görülmemiştir. Tip III metilasyonun en yüksek oranı 80 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 31,25 olarak çıkmıştır. Tip IV metilasyonun en yüksek oranı 40 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 92,3 olarak bulunmuştur. Tip IV metilasyonun oranının en yüksek

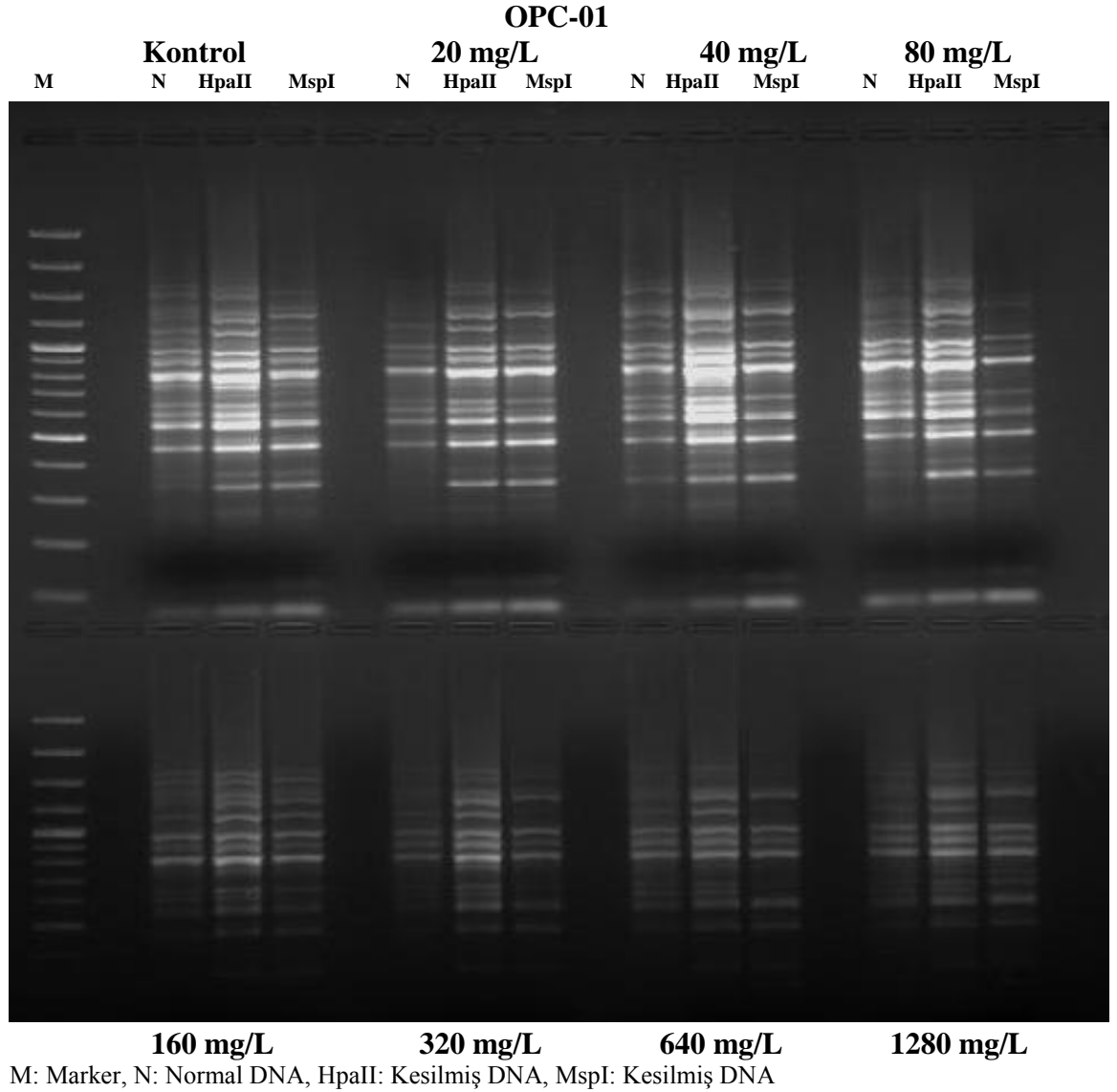
olduğu 40 mg/L Zn⁺² örneklerinde, Tip III metilasyon en düşük seviyeye gelmiştir. 160 mg/L'den sonra metilasyon tiplerinin (Tip III ve IV) kontrol seviyesine gerilediği görülmektedir. Buradan hareketle 160 mg/L Zn⁺² konsantrasyonuna kadar metilasyon hareketlilikleriyle stresle başa çıkmaya çalışan organizmanın, 160 mg/L'den sonra bu direncinin kırıldığı yorumuna gidilebilir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 OPC-01 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

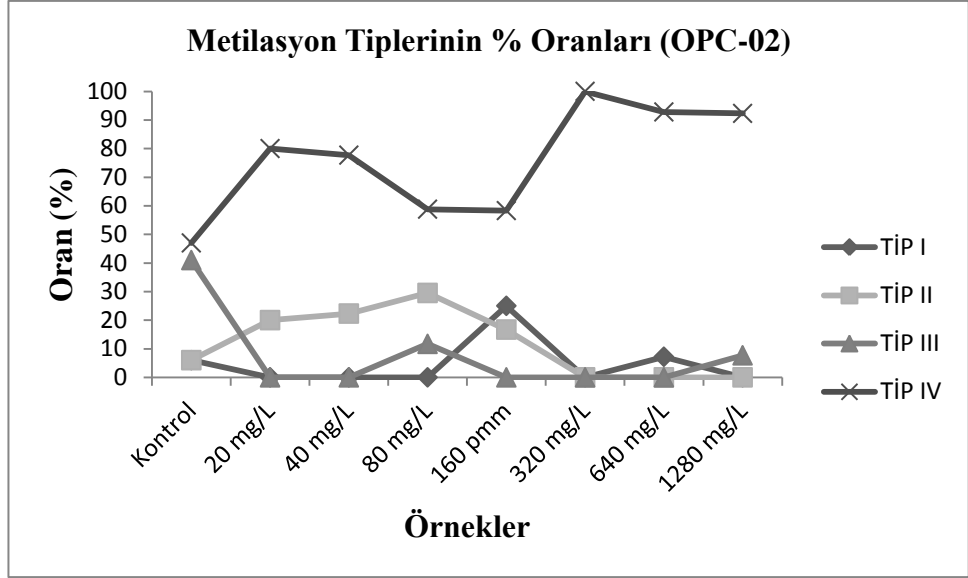
Metilasyon eğrisi incelendiğinde 40 mg/L ve 160 mg/L'de en düşük Tip III metilasyon oranı görülürken Tip IV metilasyon oranı en yüksek değerine ulaşmaktadır. Ayrıca 20 mg/L, 80 mg/L ve 640 mg/L'de Tip III metilasyona ait değerle düşüşe geçerken, Tip IV metilasyon oranı yükselmektedir.

Buradan da anlaşılacağı gibi çinko stresinin uygulandığı ayçiçeği örneklerinde meydana gelen metilasyon farklılıklarının Tip III ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü içerdiği görülmektedir. Tip I ve Tip II metilasyon modelinin kontrol grubu da dahil değişen tüm konsantrasyonlarda varlık göstermediği görülmektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 OPC-01 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

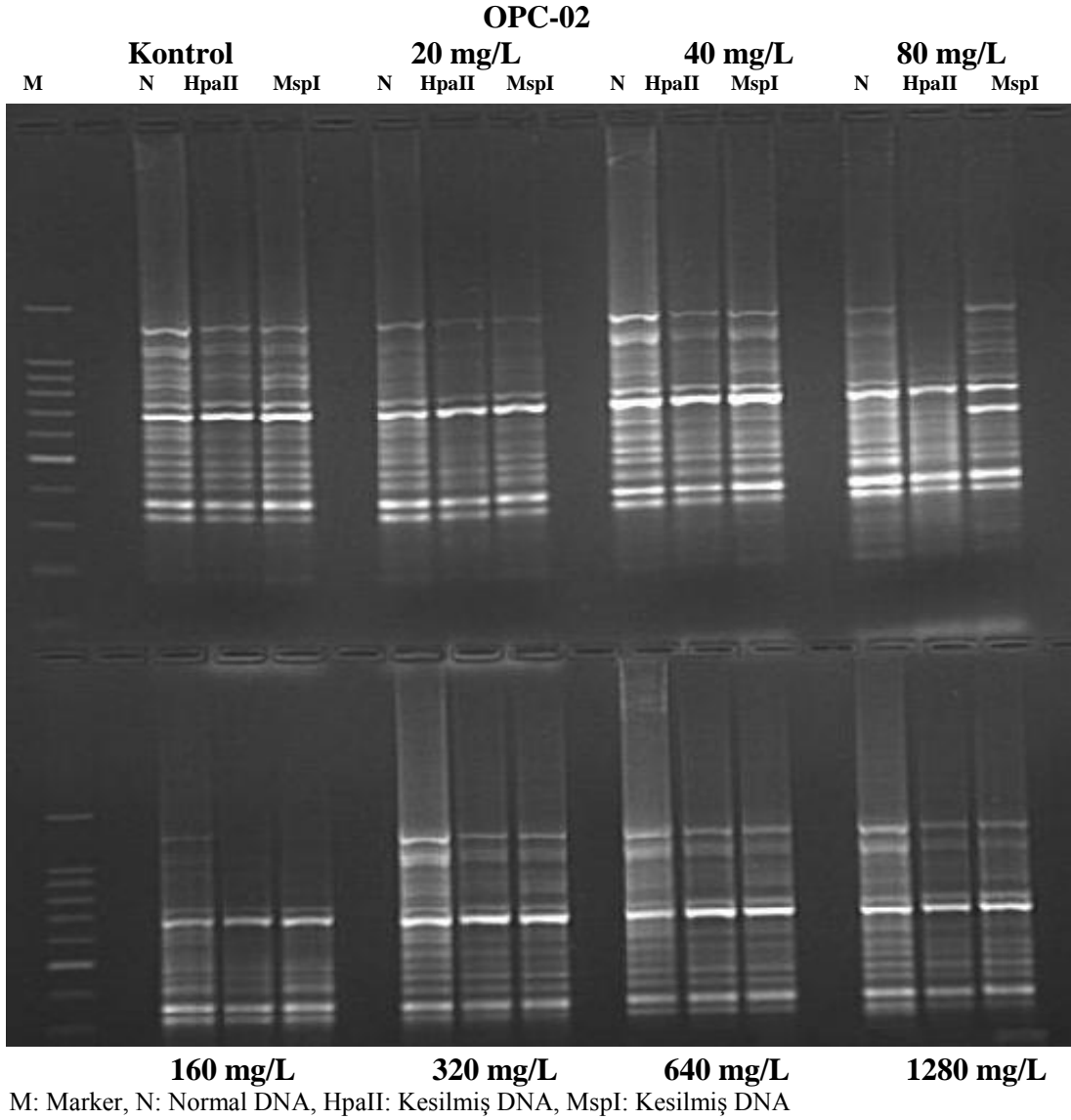
Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-02 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, Tip IV metilasyonun en yüksek oranı 320 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 100 olarak gözlemlenirken diğer metilasyon tiplerinin kaybolduğu görülmektedir. Tip I metilasyonun en yüksek oranı 160 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 25 olarak bulunmuştur. Tip II metilasyonun oranının en yüksek olduğu 80 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 29,5 olarak bulunmuştur. Tip III metilasyonun en yüksek olduğu değer kontrol grubu örneklerinde % 41 olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 OPC-02 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

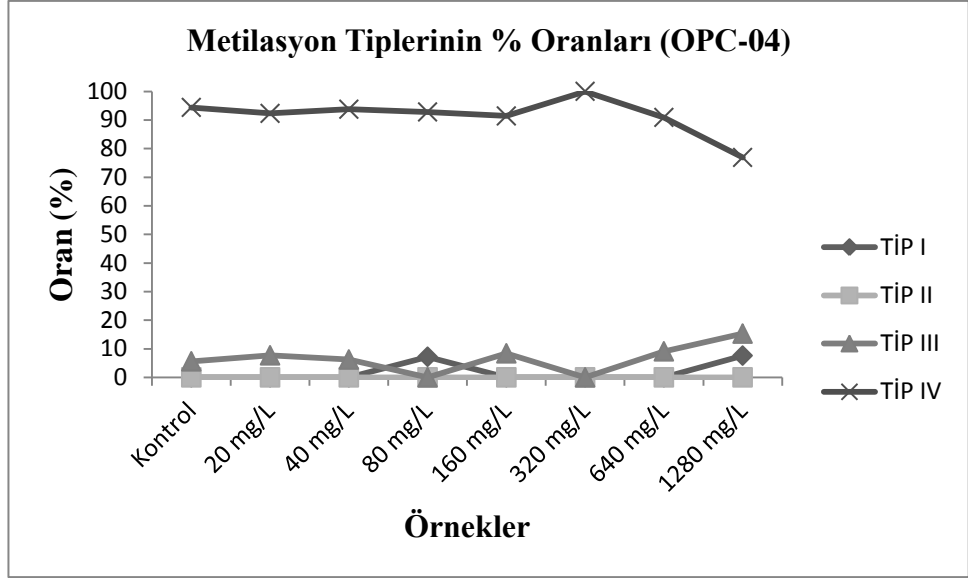
Metilasyon eğrisi incelendiğinde 320 mg/L’de diğer metilasyon tipleri kaybolurken, Tip IV metilasyon oranı en yüksek değerine ulaşmaktadır. Ayrıca 160 mg/L’de Tip III metilasyon varlık göstermezken, Tip I metilasyona ait değerler düşüşe geçmiş ve Tip IV metilasyon oranı yükselmiştir.

Buradan da anlaşılacağı gibi çinko stresinin uygulandığı ayçiçeği örneklerinde meydana gelen metilasyon farklılıklarının Tip I ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü içerdiği görülmektedir. Tip II ve Tip III metilasyon modellerinin 80 mg/L’den itibaren kontrol seviyesine gerilediği görülmektedir. Buradan hareketle 80 mg/L Zn^{+2} konsantrasyonuna kadar metilasyon hareketlilikleriyle stresle başa çıkmaya çalışan organizmanın, 80 mg/L’den sonra bu direncinin kırıldığı yorumuna gidilebilir. Fakat bu durum Tip IV metilasyonda 320 mg/L’den itibaren azalma gösterse de direncin hala devam ettiği söylenebilir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 OPC-02 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

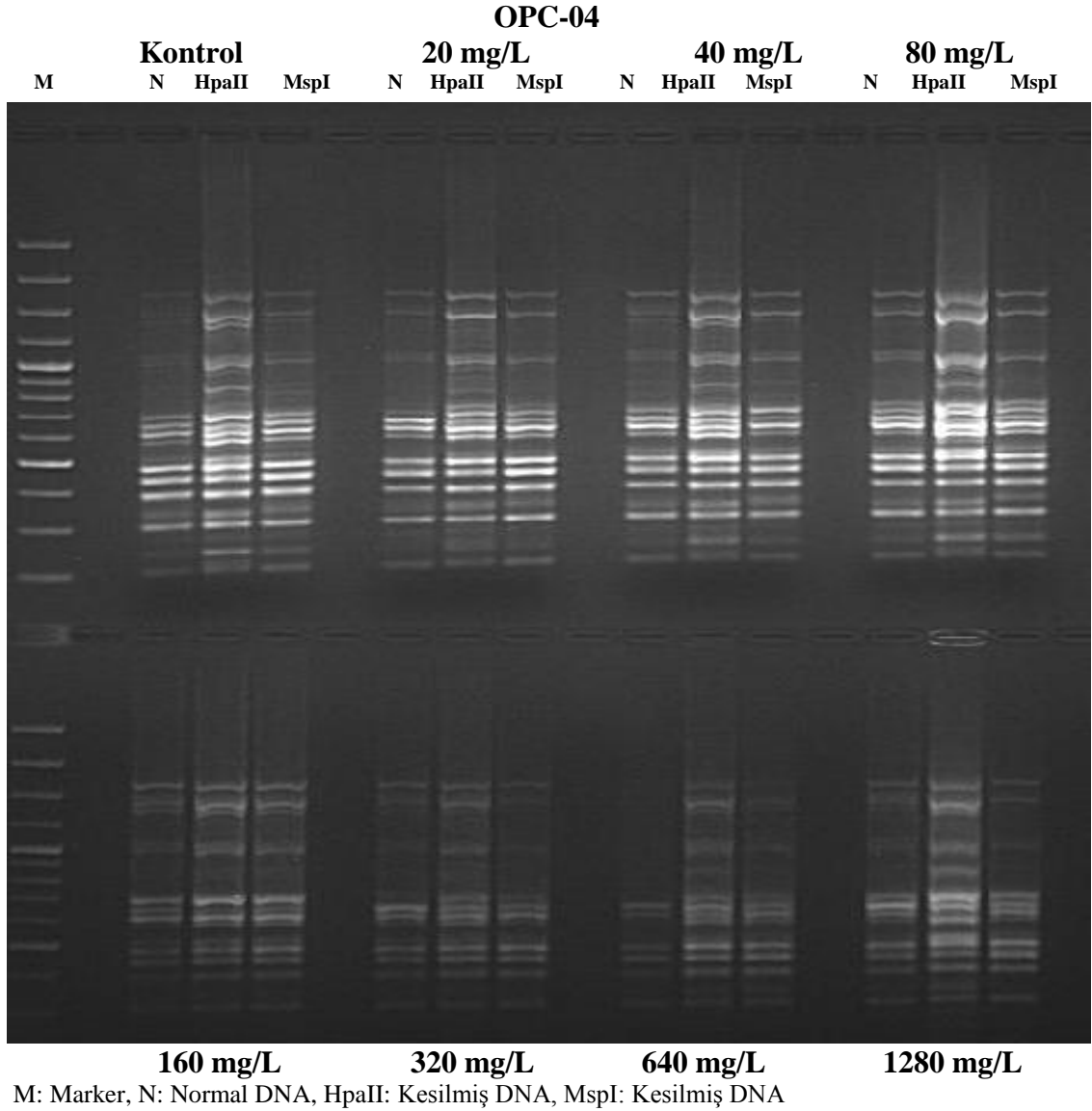
Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-04 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, Tip IV metilasyonun en yüksek oranı 320 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 100 olarak gözlemlenirken diğer metilasyon tiplerinin kaybolduğu görülmektedir. Tip I metilasyonun en yüksek oranı 1280 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 7,6 olarak bulunmuştur. Tip III metilasyonun en yüksek olduğu değer ise 1280 mg/L'de % 41 olarak bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 OPC-04 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

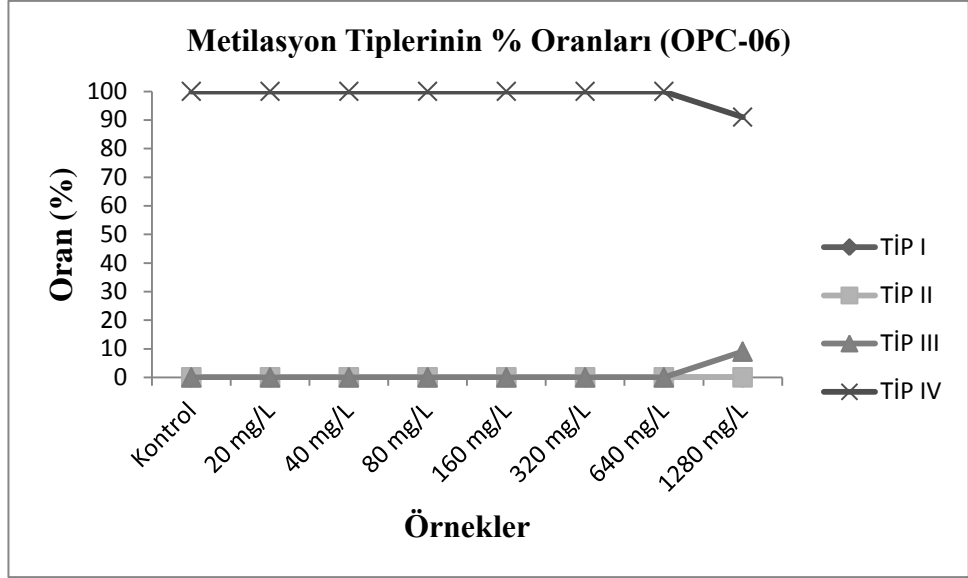
Metilasyon eğrisi incelendiğinde 40 mg/L ve 160 mg/L’de en düşük Tip III metilasyon oranı görülürken Tip IV metilasyon oranı en yüksek değerine ulaşmaktadır. Ayrıca 320mg/L, 640mg/L ve 1280 mg/L’de Tip III metilasyona ait değerle düşüşe yükselirken, Tip IV metilasyon oranı azalmaktadır.

Buradan da anlaşılacağı gibi çinko stresinin uygulandığı ayçiçeği örneklerinde meydana gelen metilasyon farklılıklarının Tip III ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü içerdiği görülmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 OPC-04 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

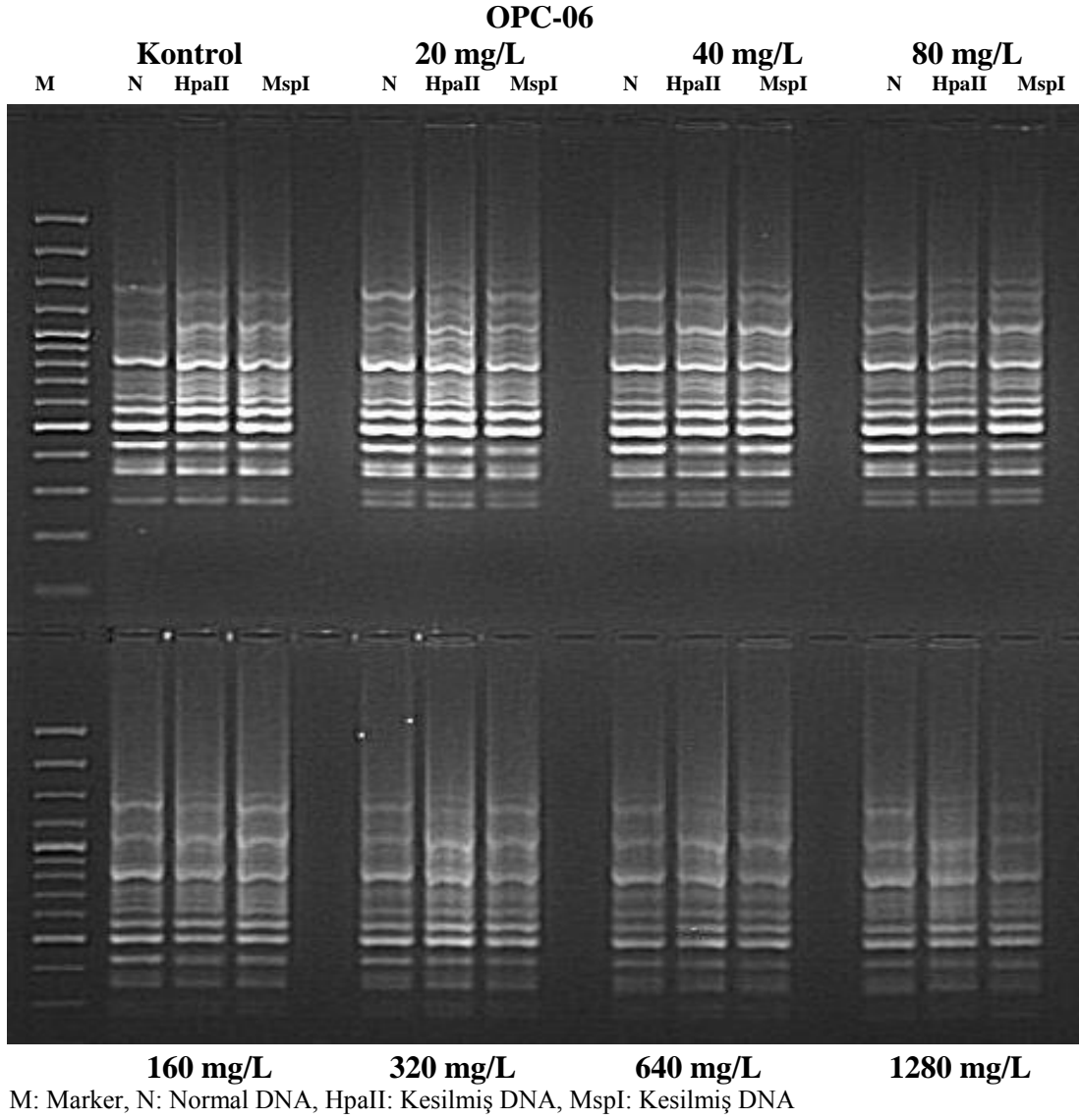
Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-06 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, kontrol grubu da dahil değişen tüm konsantrasyonlarda Tip I ve Tip II metilasyon ortadan kalkmıştır. Tip III metilasyonun tek değeri 1280 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 9 olarak çıkmıştır. Diğer konsantrasyonlarda Tip III metilasyon varlık göstermemektedir. Tip IV metilasyonun en düşük oranı sadece 1280 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 91 olarak bulunmuştur. Tip IV metilasyonu diğer konsantrasyonlarda %100 olarak bulunmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 OPC-06 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

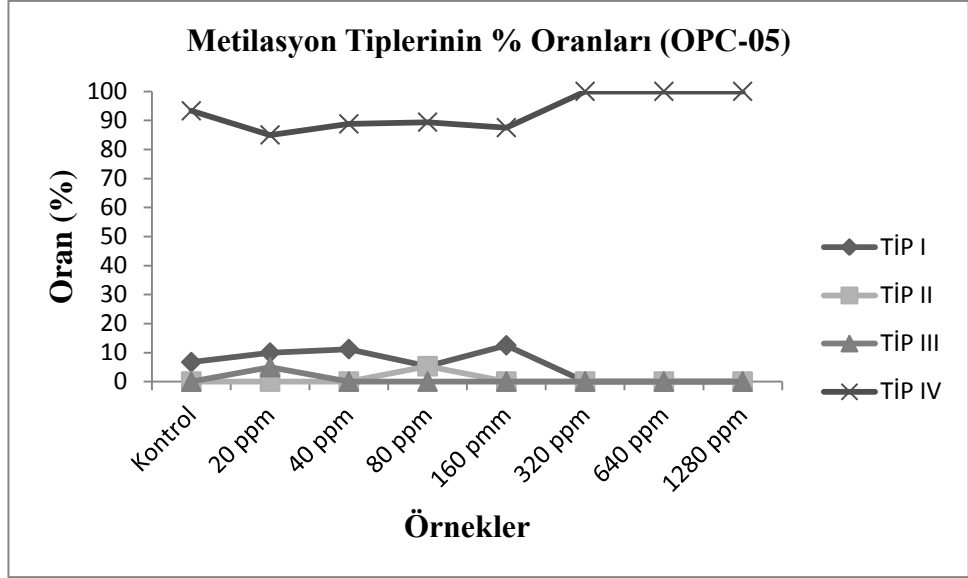
Ayrıca 1280 mg/L'de Tip IV metilasyona ait değerle düşüşe geçerken, Tip III metilasyon oranı yükselmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi çinko stresinin uygulandığı ayçiçeği örneklerinde meydana gelen metilasyon farklılıklarının Tip III ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü içerdiği görülmektedir.

Bu bulgulardan anlaşılacağı üzere, OPC-06 primeri ile yapılan CRED-RA analizinde değişen konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin, metilasyon bant profiline ve metilasyon tiplerine önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 OPC-06 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-05 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, Tip II metilasyonun tek değeri 80 mg/L Zn⁺² örneklerinde % 5,3 olarak çıkmıştır. Diğer konsantrasyonlarda Tip II metilasyon varlık göstermemektedir. Tip III metilasyonun tek değeri 20 mg/L Zn⁺² örneklerinde % 5 olarak bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda Tip III metilasyon varlık göstermemektedir (Şekil 4.24).

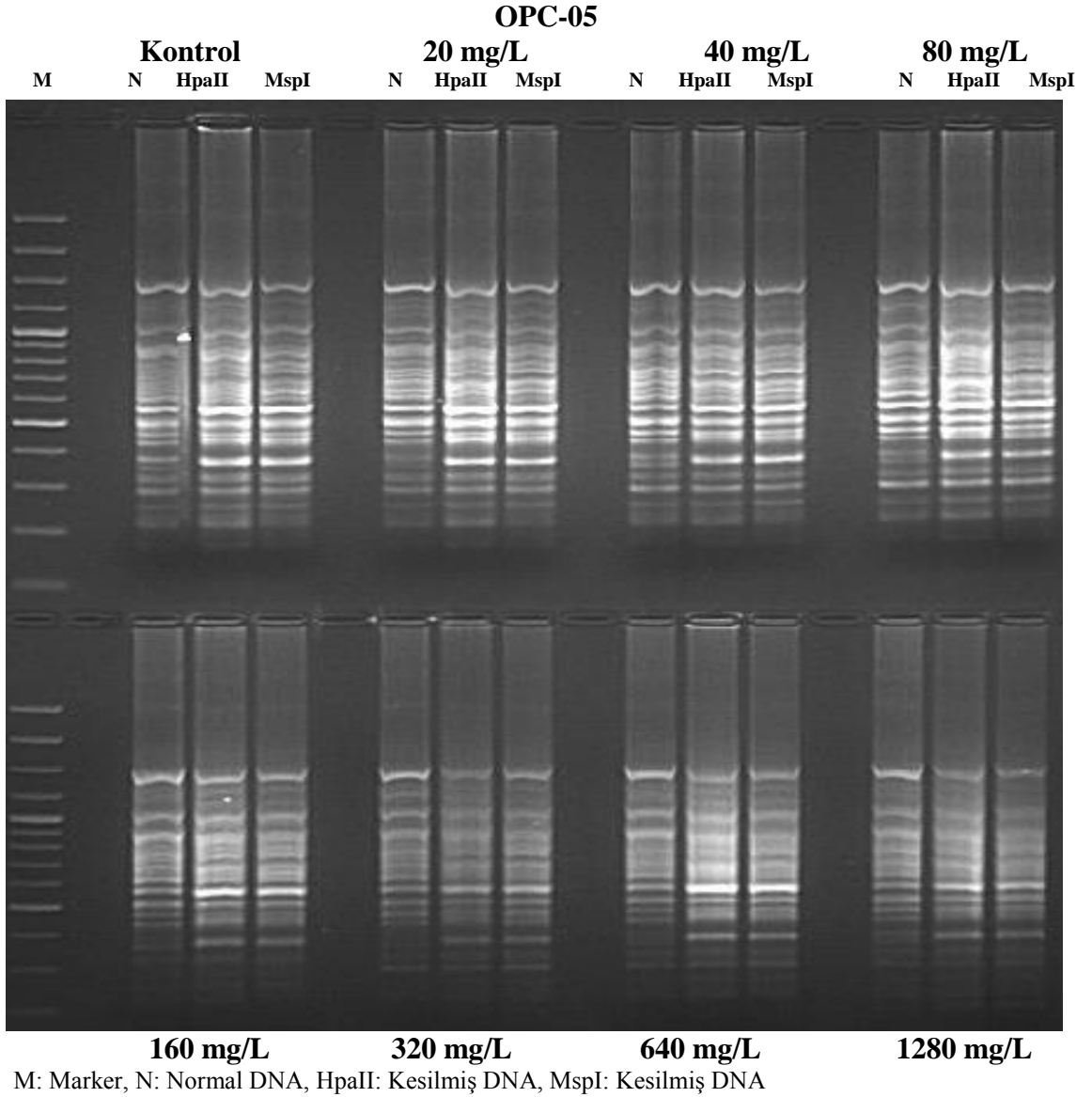


Şekil 4.24 OPC-05 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

Tip I metilasyonun en yüksek oranı 160 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 12,5 olarak çıkmıştır. Tip IV metilasyonun en yüksek oranı 320 mg/L'den itibaren % 100 olarak bulunmuştur. Tip IV metilasyonun oranının en yüksek olduğu 320 mg/L, 640 mg/L ve 1280 mg/L Zn^{+2} örneklerinde, diğer metilasyon tipleri varlık göstermemektedir.

Ayrıca 160 mg/L'de Tip I metilasyona ait değerle düşüşe geçerken, Tip IV metilasyon oranı yükselmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi çinko stresinin uygulandığı ayçiçeği örneklerinde meydana gelen metilasyon farklılıklarının Tip I ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü içerdiği görülmektedir.

Tip I metilasyon modelinin metilasyonun bulunmadığı bir pozisyonu da ifade ettiğini hatırlayacak olursak, organizmanın gen ifadesini artırmak için 160 mg/L'e kadar metilasyonu ortadan kaldırmak için direnç gösterdiği düşünülebilir (Şekil 4.25).

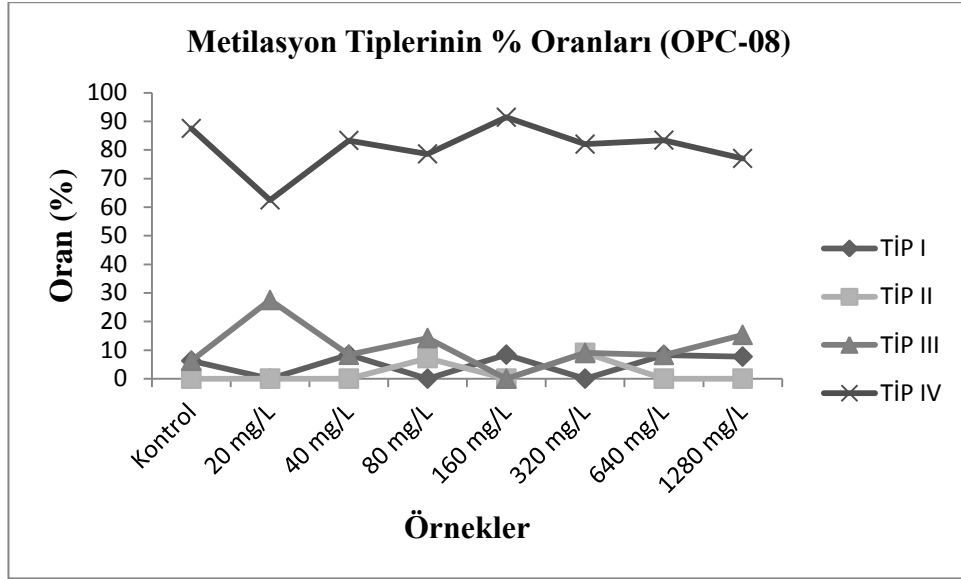


Şekil 4.25 OPC-05 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-08 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, Tip II metilasyonun 80 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 7,2 ve 320 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 9 olarak çıkmıştır. Diğer konsantrasyonlarda Tip II metilasyon varlık göstermemektedir.

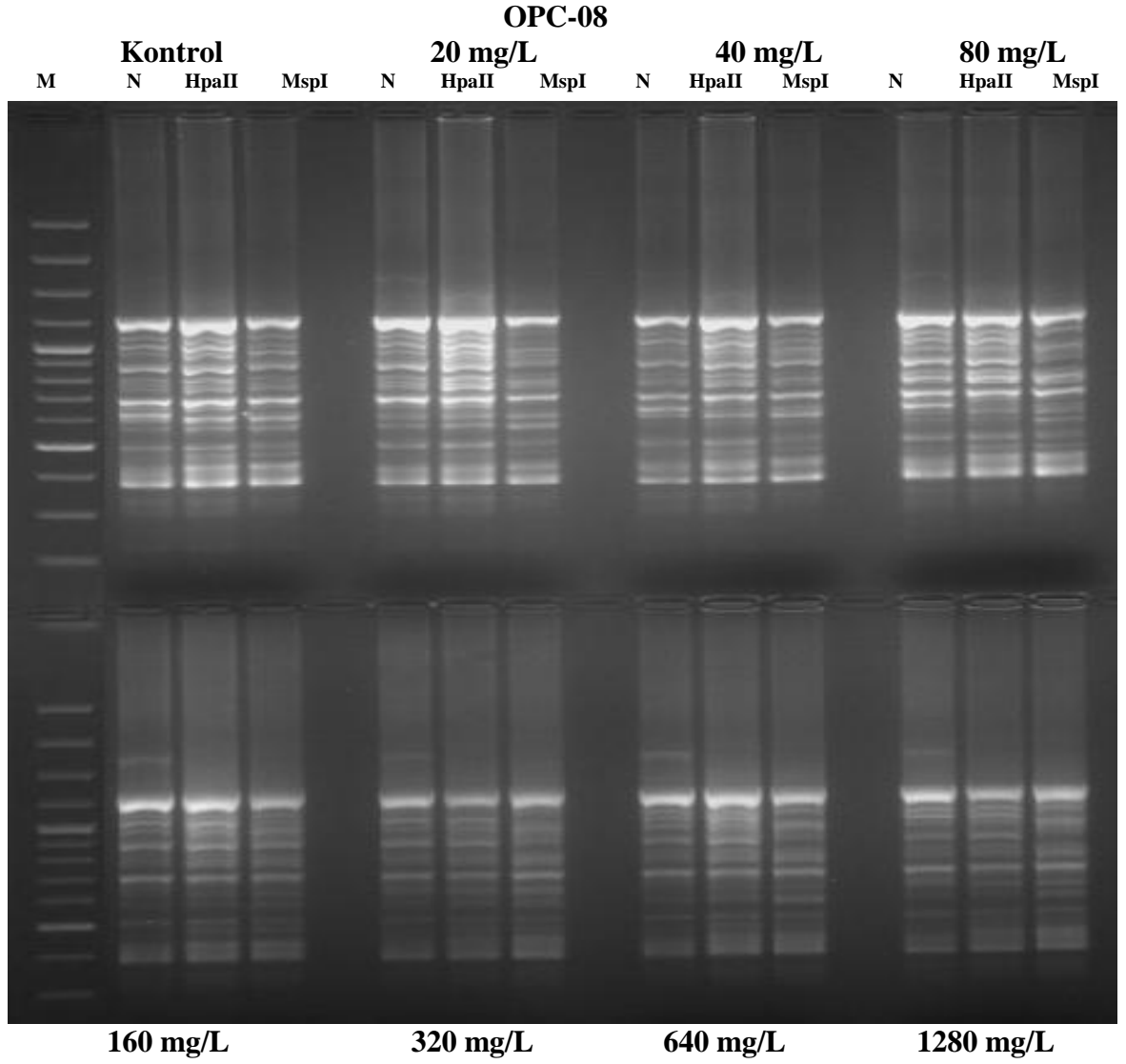
Tip III metilasyonun en yüksek oranı 20 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 27,5 olarak çıkmıştır. Tip IV metilasyonun en yüksek oranı 160 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 91,6 olarak bulunmuştur. Tip IV metilasyonun oranının en yüksek olduğu 160 mg/L Zn^{+2} örneklerinde, Tip I metilasyon değeri % 8,4 olarak bulunmuştur. Diğer metilasyon

tipleri varlık göstermemiştir. 160 mg/L'den sonra metilasyon tiplerinin kontrol seviyesine doğru doğrusal olmamakla birlikte gerilediği görülmektedir. Buradan hareketle 160 mg/L Zn⁺² konsantrasyonuna kadar metilasyon hareketlilikleriyle stresle başa çıkmaya çalışan organizmanın, 160 mg/L'den sonra bu direncinin kırıldığı yorumuna gidilebilir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 OPC-08 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

Metilasyon eğrisi incelendiğinde 20 mg/L'den itibaren Tip III ve Tip IV metilasyon farklılıkları arasındaki zıt artış ve azalışlar, Tip III ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü göstermektedir (Şekil 4.27).

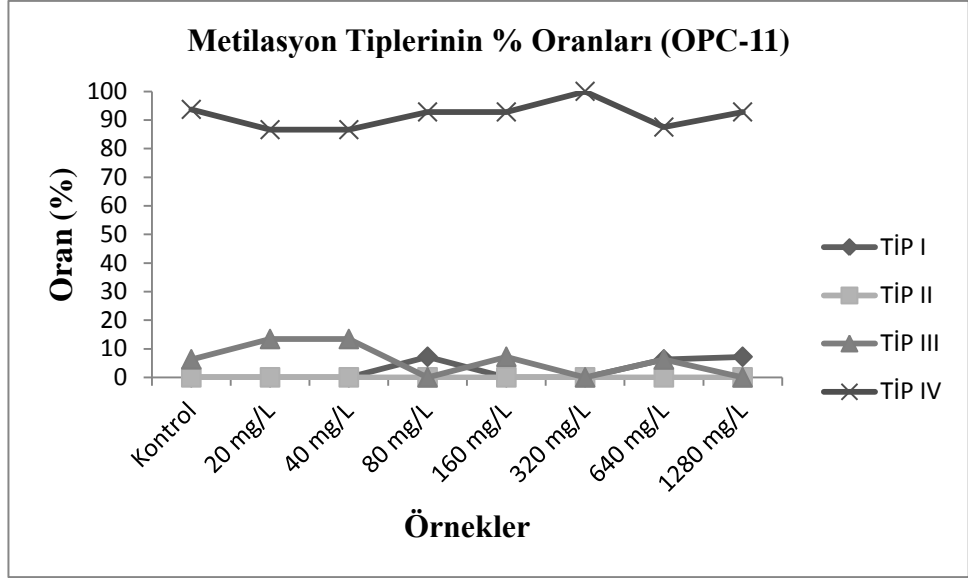


M: Marker, N: Normal DNA, HpaII: Kesilmiş DNA, MspI: Kesilmiş DNA

Şekil 4.27 OPC-08 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

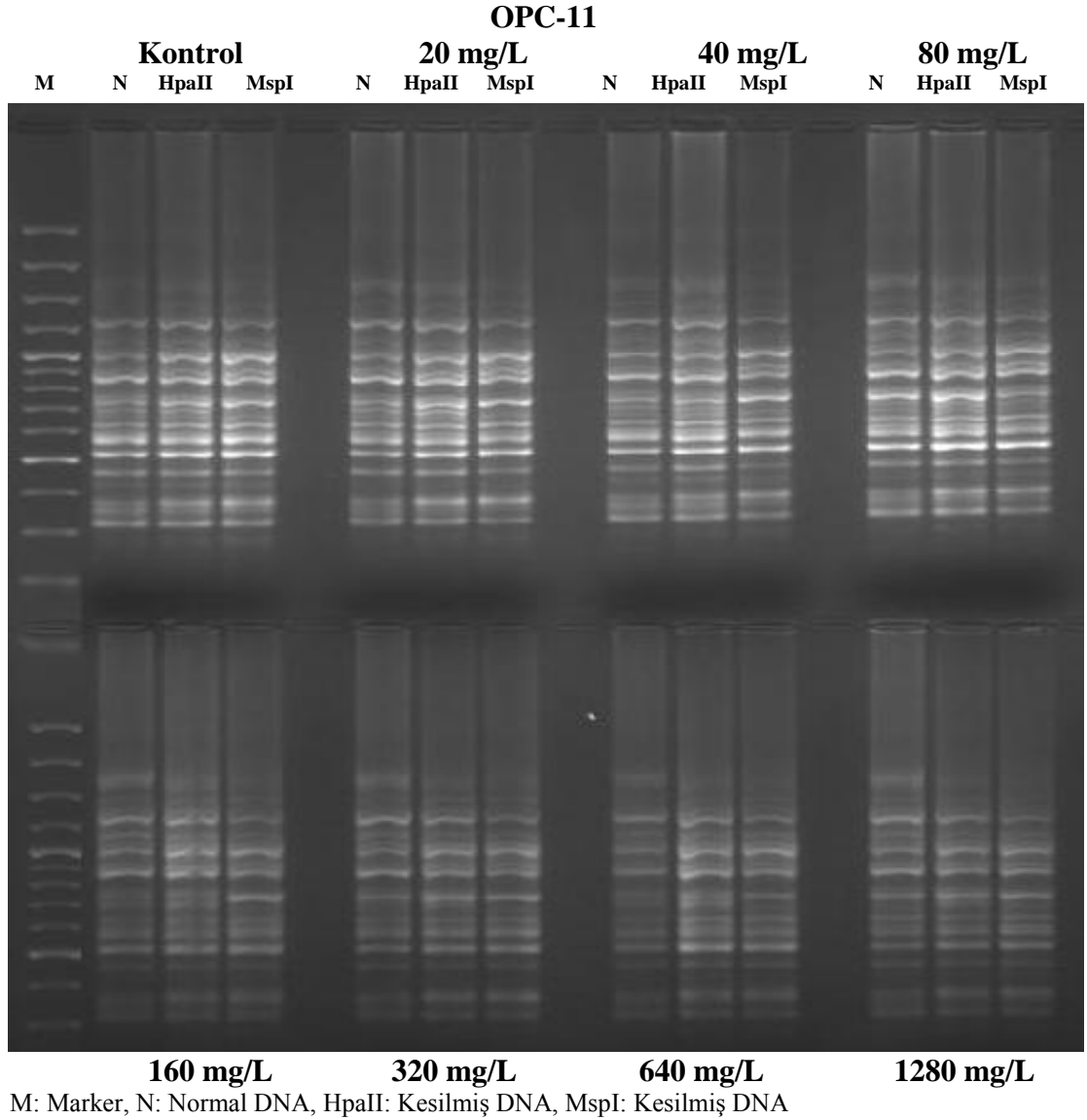
Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPC-11 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, Tip I metilasyonu 80 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 7,2, 640 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 6,25 ve 1280 mg/L'de % 7,2 olarak çıkmıştır. Tip II metilasyon bütün örneklerde varlık göstermemektedir (Şekil 4.28).

Tip III metilasyonun en yüksek oranı 20 mg/L ve 40 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 13,4 olarak çıkmıştır. Tip IV metilasyonun en yüksek oranı 320 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 100 olarak bulunmuştur. Tip IV metilasyonun oranının en yüksek olduğu 320 mg/L Zn^{+2} örneklerinde diğer metilasyon tipleri varlık göstermemiştir.



Şekil 4.28 OPC-11 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

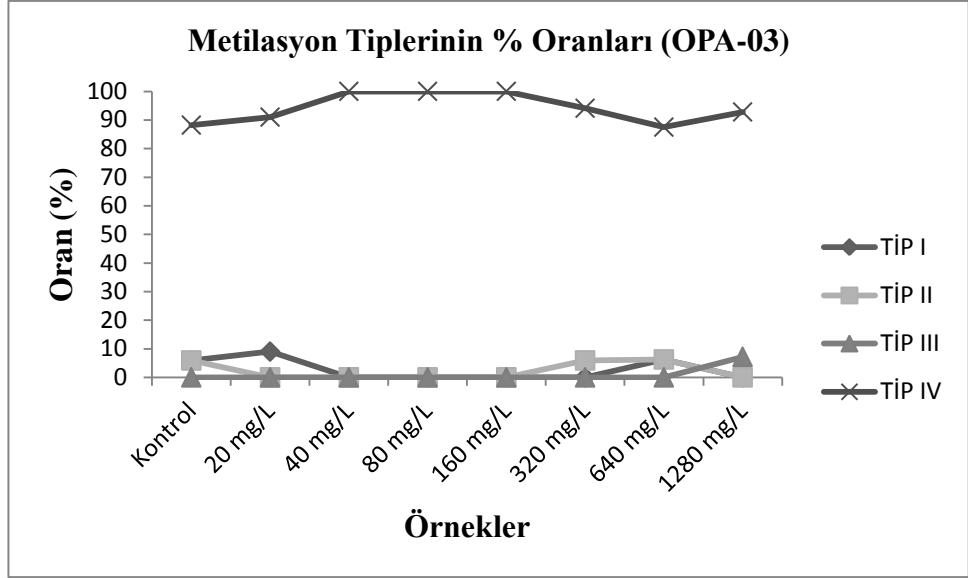
Metilasyon eğrisi incelendiğinde 160 mg/L'den itibaren Tip III ve Tip IV metilasyon farklılıkları arasındaki zıt artış ve azalışlar, Tip III ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü göstermektedir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 OPC-11 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

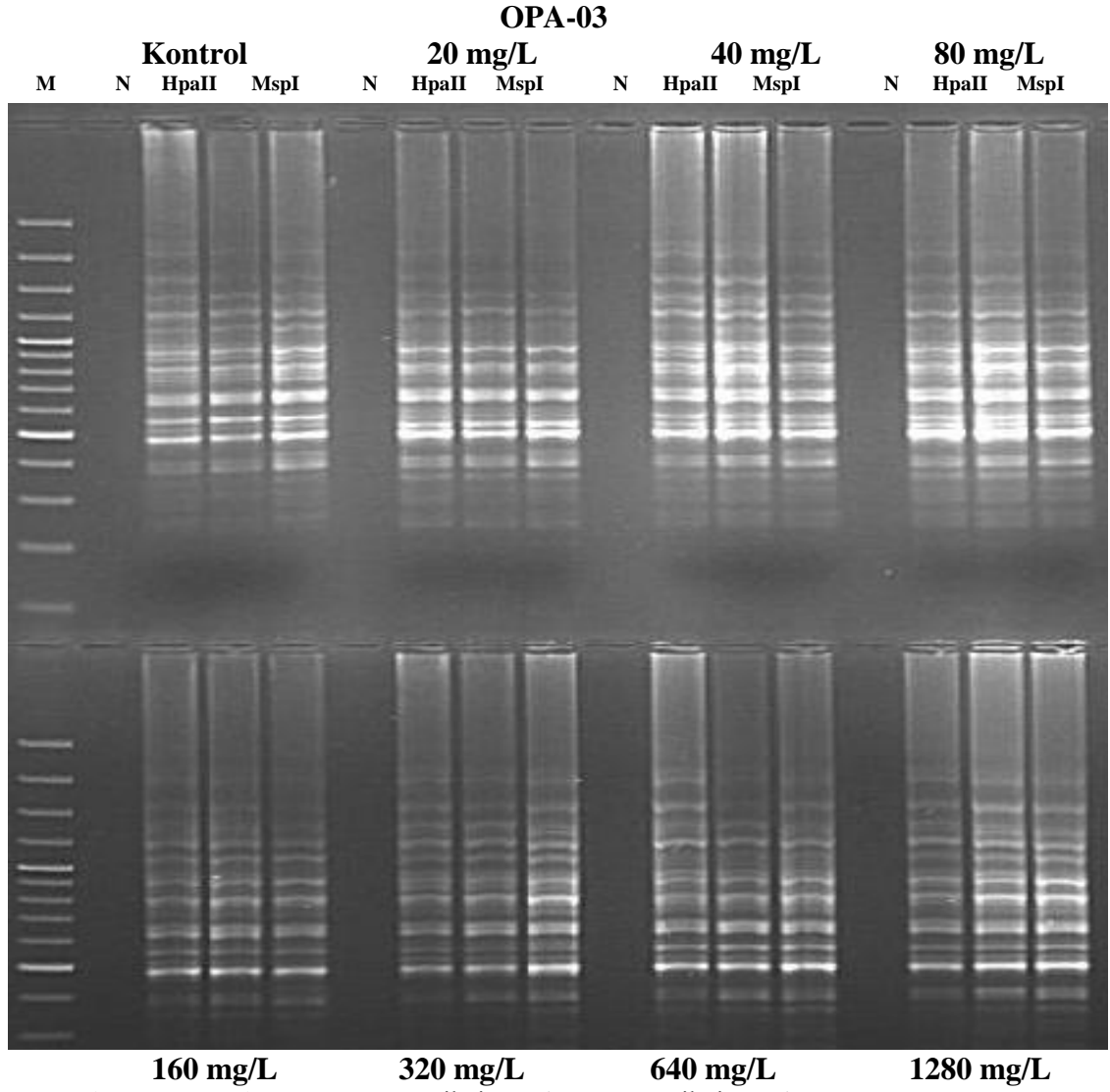
Çinko stresi uygulanmış ayçiçeği örneklerinin OPA-03 primeri ile yapılan CRED-RA sonuçları incelendiğinde, Tip I metilasyonu kontrol grubu örneklerde % 5,9, 20 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 9 ve 640 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 6,25 olarak çıkmıştır. Tip III metilasyon sadece 1280 mg/L'de % 7,2 oranla varlık göstermektedir (Şekil 4.30).

Tip IV metilasyonun en düşük oranı 640 mg/L Zn^{+2} örneklerinde % 87,5 olarak bulunmuştur. Tip IV metilasyonun oranının en yüksek olduğu örneklerde diğer metilasyon tipleri varlık göstermemiştir.



Şekil 4.30 OPA-03 ile yapılan CRED-RA metilasyon tiplerinin % oranları

Metilasyon eğrisi incelendiğinde 20 mg/L'den itibaren Tip I metilasyon oranı azalırken Tip IV metilasyon oranı artmaya başlamış ve artan konsantrasyonlarda % 100 seviyelerine gelirken, Tip I metilasyon varlık göstermemiştir. Metilasyon farklılıkları arasındaki zıt artış ve azalışlar, Tip I ve Tip IV metilasyon modellerinin birbirine dönüşümünü göstermektedir (Şekil 4.31).



M: Marker, N: Normal DNA, HpaII: Kesilmiş DNA, MspI: Kesilmiş DNA

Şekil 4.31 OPA-03 ile yapılan CRED-RA jel görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki bünyesinde biriken ağır metaller pek çok metabolik fonksiyonları engellemekte aynı zamanda verimi azaltmakta ve bitki ölümlerine neden olmaktadır. Bitkilerde ağır metal toksisitesi fotosentez (Baron vd. 1995), lipid metabolizması (Ouariti vd. 1997), nükleik asit biyosentezi (Doncheva vd. 1996) gibi çeşitli büyüme ve gelişme işlevlerinde hasarlara neden olmaktadır.

Bitkiler ağır metal stresine karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Örneğin metalin köklerde tutulması ve gövdeye dağılımının engellenmesi bu direnç mekanizmalarından biridir (Fernandes ve Henriques 1991). Metallerin köklerde tutulup biriktirilmesi köklerin yapısını ve büyümesini diğer organlara göre çok daha fazla etkilemektedir.

Ağır metallerin toksik etkilerini populasyon ve moleküler parametrelerle tespit etmek mümkündür. Populasyon seviyesinde bitki boyu, biyokütle, toplam çözümlenebilir protein miktarı, prolin ve anti-oksidatif enzimlerin miktar değişimleri belirlenmektedir. Moleküler seviyede meydana gelen değişimler belirlemek amacıyla da SSR, AFLP, RFLP ve RAPD, CRED-RA analizleri kullanılmaktadır.

Tez kapsamında farklı konsantrasyonlardaki çinko metalinin ayçiçeği tohumları üzerine etkileri; populasyon parametrelerinden kök uzunluğu, gövde uzunluğu ve toplam çözümlenebilir protein miktarındaki değişimler kullanılarak belirlenmiştir. Artan çinko ağır metal birikiminin ayçiçeği bitkisindeki genotoksik etkisi ise RAPD ve CRED-RA teknikleri ile incelenmiştir.

Toksinlerin kök ve gövde de yaptığı etkilerden biri kök ve gövde büyümesini engellemektir. Farklı konsantrasyonlarda çinko stresine maruz bırakılan örneklerde beklenildiği gibi metal konsantrasyonunun artışına paralel olarak kontrole göre belirgin oranlarda azalma olmuştur. Fakat 20 mg/L ve 40 mg/L çinko uygulamasında kök ve gövde boyunda artış gözlemlenmiştir. Bu beklenen bir sonuçtur. Çünkü çinko metali

belli seviyelerde bitkiler tarafından mikrobesein olarak kullanılmaktadır (Bobak 1985, Koç vd. 2012).

Bakır (Cu) metalinin *Phaseolus vulgaris* L. (Zengin ve Muzuroğlu 2004), *Lolium perene* (Wong ve Bradshaw 1982) bitkilerinde kök ve gövde uzunluğunu azalttığı tespit edilmiştir. Alüminyumun buğday kök hücrelerinde DNA replikasyonunu ve hücre bölünmesini azalttığı ve dolayısıyla kök büyümesini engellediği belirtilmiştir (Zhengua vd. 1993). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda (80 mg/L ve sonrası) kökte kahverengileşmelerin meydana geldiği gözlenmiştir. Kahverengileşmenin suberin miktarının artmasıyla oluştuğu, bu durumun da su alımını sınırladığı belirtilmiştir (Barcelo ve Poschenrieder 1990).

Ayçiçeği bitkisine ait total protein miktarı incelendiğinde genel olarak artan metal konsantrasyonlarına ters yönde bir ilişki tespit edilmiştir. 20 mg/L ve 40 mg/L çinko konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla protein içeriği artmıştır. Fakat artan metal konsantrasyonlarına paralel olarak protein miktarının azaldığı gözlenmiştir. Ağır metal stresinde bitkilerdeki protein miktarlarının azalmasının nedenlerinin genelde protein sentezinin engellenmesinden ya da oksidatif strese üretilen ROT'ların tetiklediği proteolizisten kaynaklandığı düşünülebilir. Gerçekleştirilen pek çok çalışmada ağır metallerin domates ve arpa gibi bitkilerde toplam çözüner protein miktarına olumsuz etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Mazhoudi vd. 1997, Liu vd. 2005).

RAPD profili çoğu canlıda genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Liu vd. 2005, 2009). Genotoksik ajanların DNA üzerinde meydana getirdiği hasarların belirlenmesinde parmakizi yöntemleri ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Parmakizi yöntemleri, konsantrasyon ve maruz kalma süresi gibi, genotoksik ajanın değişik faktörlerle olan etkileşimini birden fazla örnek üzerinde incelemeye olanak sağlamaktadır. Bakterilerden çiçekli bitkilere kadar çoğu organizma sınıfı için kullanılabilir ve eş zamanlı olarak çok sayıda örneğin incelenebildiği bir yöntemdir (Sava 2000, Theodorakis vd. 2001, Atienzar vd. 2002).

Liu vd. (2007) yaptığı çalışmada, pirinç (*Oryza sativa* L.) tohumlarına çeşitli konsantrasyonlarda kadmiyum çözeltisi uygulanmış ve yüksek konsantrasyonlu çözeltilere maruz kalan örneklerin kontrol örneklere göre RAPD bant paternlerinin değiştiğini belirlemiştir. Diğer tüm koşullar sabit tutulduğunda kontrolün sahip olduğu bant paterninin ağır metale maruz kalmış örneklerde değişmesi, bu değişimin genotoksik ajanın (Cd) mutasyonel etkisiyle oluştuğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. RAPD analizinde kontrole göre farklı bant profillerinin gözlenmesinin nedenleri kalıp DNA üzerinde primerlerin bağlanma bölgelerinde meydana gelmiş mutasyonlardır. Mutasyonlar primerlerin bu bölgeler ile eşleşmesini engelleyecek ve bu fragmentler çoğaltılamayacaktır.

Cansaran-Duman vd. (2011) yaptığı çalışmada, Karabük Demir-Çelik fabrikası, otoyollar ve demiryolu yakınlarındaki *Evernia prunastri* liken örneklerinde genotoksik kontaminasyon RAPD tekniği ile belirlenmiş ve genotoksik etki bu teknikle net olarak gösterilmiştir.

Aksoy vd. (2010) yaptığı çalışmada, patlıcan tohumlarına kontrollü ortamda farklı konsantrasyonlarda bakır (Cu) metali uygulanmıştır. Farklı bakır konsantrasyonlarında gelişmiş tohumların genomik kalıp stabilitesindeki değişimler RAPD profilleri ile tespit edilebilmektedir.

Tez çalışmasında çinko stresine maruz bırakılmış ayçiçeği örneklerinde yapılan RAPD ve CRED-RA analizlerinin sonucunda önemli derecede polimorfizm ve metilasyon değişimleri gözlemlenmiştir. RAPD profili ile belirlenen GKS oranları karşılaştırıldığında, en yüksek oranın 640 mg/L Zn⁺² uygulamasında % 92,26 olduğu, en düşük oranın ise 80 mg/L Zn⁺² uygulamasında % 82,14 olduğu görülmüştür. Bu da toksik ajana maruz kalınan konsantrasyonun önemini belirtmektedir.

Ayçiçeği bitkisinde yapılan CRED-RA analizlerinde metilasyon tiplerinin farklı konsantrasyonlarda farklı değerler aldığı gözlenmiştir. Epigenetik mekanizmalar içerisinde yer alan DNA metilasyon düzeylerine ağır metallerin etkilerinin olduğu, ayçiçeği bitkisinin de çinko ağır metaline karşı farklı metilasyon tiplerinde cevaplar

oluşturarak direnç gösterdiği görülmüştür.

Sonuç olarak çinko ağır metaline maruz kalan ayçiçeği bitkisinde, hem populasyon seviyesinde hem de moleküler seviyede ciddi değişimler gözlenmiştir. Çalışma sonucunda çinko ağır metalinin ayçiçeği bitkisinde genotoksik bir ajan olduğu belirlenmiştir. Ayrıca biyoindikatör olarak kullanılan organizma ile kirliliğin biyolojik etkileri de kantitatif olarak tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2004. Web sitesi: [http:// www.tzob.org.tr](http://www.tzob.org.tr), Erişim Tarihi: 10.01.2013.
- Anonim. 2007. Web sitesi: <http://www.gap.gov.tr/Turkish/Tarim/Tarlayt/aycicegi.html-11k>, Erişim Tarihi: 04.05.2012.
- Anonim. 2008. Hidroksil radikalının oluşumu ve etkileri. Web sitesi: <http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Anonim. 2010. Ayçiçeği Tohum. Web sitesi: [http://,http://www.fotoritimdergi.com](http://www.fotoritimdergi.com). Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Anonim. 2010. Epigenetik Mekanizmalar. Web sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/>. Erişim Tarihi: 05.05.2013.
- Anonim. 2010. Sitozinin metillenmesi. Web sitesi: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation>. Erişim Tarihi:10.05.2013.
- Anonim. 2010. Web sitesi: <http://www.fao.org>, Erişim Tarihi: 10.02.2013.
- Anonim. 2011. Normal ve kanserli hücre arasındaki metilasyon farkı. Web sitesi: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation>. Erişim Tarihi:10.05.2013.
- Anonim. 2013. Metiltransferazlar ile metil grubunun eklenmesi. Web sitesi: <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153>. Erişim Tarihi:10.05.2013.
- Anonim. 2008. Normal ve kanserli hücre arasındaki gen ifadesi. Web sitesi: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0006158.html>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Anonymous. 2008. 5-aza-2'-deoksisitidin desitabin'in yapısı. Web sitesi: <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Anonymous. 2008. De novo metilasyon ve maintenance metilasyon. Web sitesi: <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Anonymous. 2008. DNA methylation. Web sitesi: <http://www.webbooks.com/MoBio/Free/Ch7F2.htm>. Erişim Tarihi:10.05.2013.
- Anonymous. 2009. De novo metilasyon ve maintenance DNA metilasyonu. Web sitesi: <http://www.jle.com/en/revues/medecine/bdc/edocs/00/04/20/09/article.phtml?fi chier=images.htm>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.

- Anonymous. 2009. Sonnenblume_Helianthus. Web sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Anonymous. 2010. Sunflowers. Web sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki>. Erişim Tarihi: 10.05.2013
- Anonymous. 2011. Chemical-properties-of-zinc. Web sitesi: <http://www.buzzle.com>. Erişim Tarihi: 10.05.2013.
- Aksoy, D. and Aras, S. 2010. Evaluation of copper stress on Eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at molecular ve population levels using various biomarkers. Mutat. Res, Vol. 719/1-2; pp. 29-34.
- Allan, R. 1997. Introduction: mining and metals in the environment. J. Geochem. Expl. 58, 95-100.
- Aras, S. and Cansaran, D. 2006. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen species. Turkish Journal of Botany, 30; 449-453.
- Aras, S., Kanlítepe, Ç., Cansaran-Duman, D., Halıcı, M.G., Beyaztaş, T. 2010. Assessment of air pollution genotoxicity by molecular markers in the exposed samples of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in the Province of Kayseri (Central Anatolia). Journal of Environmental Monitoring, 12; 536-543.
- Aras, S., Beyaztaş, T., Cansaran-Duman, D., Gökçe, E. 2012. Evaluation of genotoxicity of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf by RAPD Analysis. Genetics ve Molecular Research. Accepted for publication.
- Assche, V., Clijters, H., 1990. Effect of metal on enzyme activity on plants, Plant Cell Environ. 13, 195-206.
- Arioğlu, H.H. 2000. Yağ bitkileri yetiştirme ve ıslahı. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları, Yayın No: A-70, Adana.
- Atienzar, F.A., Venier, P., Jha, A.N. and Depledge, M.H. 2002. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. Mutation Research, 521; 151–163.
- Baron, M., Arellano, J.B. and Gerge, L. 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. Physiologia Plantarum, 94; 174-180.
- Barcelo, J. and Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as effected by heavy metal stres. Journal of Plant Nutrition, 13; 1-37.
- Bekiaroglu, P. and Karataglis, S. 2002. The effect of lead and zinc on *Mentha spicata*. J Agron. Crop. Sci., Vol. 188; pp. 201-205.

- Bernatzky, R. and Tanksley, S.D. 1989. Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilization. in: Brown A.D.H., Marshall, D.R., Frankel, O.H. Williams J. T (eds). The Use of Plant Genetic Resources, Cambridge University Press, pp. 353-362, Cambridge.
- Blackmana, B.K., Scascitellic, M., Kanec, N.C., Lutona, H.H., Rasmussena, D.A., Byed, R.A., Lentze D.L. and Rieseberga, L.H. 2011. Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. PNAS, (108); 34, 14360-14365.
- Bobak, M. 1985. Ultrastructure changes of the nucleus and its components in meristematic root cells of the horse-bean after zinc in toxication. Physiol Plants, 15, 31-36.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, The American Journal of Human Genetics, 32; 314-331.
- Burzynski, M. and Klobus, G. 2004. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd and Pb stress. Photosynth 42(4), 505-510.
- Büyük İ, Soydam-Aydın S. and Aras S.E. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. Turk Hij. Den. Biyol. Derg, (2); 69, 97-110.
- Cakmak, İ., Marschner, H. and Bangerth, F. 1989. Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and level of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Experimental Botany, 40, 405-412.
- Cansaran-Duman, D., Beyaztaş, T., Atakol, O. And Aras, S.E. 2011. Assesment of the air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. province of iron-steel factory in Karabük, Turkey. Journal of Environmental Sciences-Chine, 23(7), 1171-1178.
- Cao, X. and Jacobsen, S.E. 2002. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. PNAS, (99); 90004, 16491-16498.
- Casarett, S. and Doull, C. 2001. Toxicology, The Basic Science of Poisons. 6th Edition. pp. 230-300.
- Çepel, N. 1997. Toprak kirliliği erozyon ve çevreye verdiği zararlar. Tema Türkiye erozyonla mücadele, ağaçlandırma ve doğal varlıkları koruma vakfı yayınları, no:14 İstanbul. (7):65-80.
- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G.R.G., Maestri, E., Marmiroli, N., 1998. DNA fingerprint analysis by PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. Chemosphere 37, 2739-2749.

- Davis, P.H. 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Island. V.5, Edinburg University Press, Edinburg.
- D'Alessio, A.C. and Szyf, M. 2006. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochemistry and Cell Biology*, (4)84, 463-466.
- Detlefsen, V. 1988. Status report on aquatic pollution problems in Europe. *Aquatic toxicol*, 11: 259-286.
- Dietz, K.J. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediator of heavy metal toxicity in plants, 73-79, In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds), *Heavy metal stress in plants, From Molecules to Ecosystem*, Berlin, Springer.
- Dodge, J.E., Ramsahoye, B.H., Wo, Z.G., Okano, M. and Li, E. 2002. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene*, (289); 41-48.
- Doncheva, S., Nikolov, B. and Ogneva, V. 1996. Effect of excess copper on the morphology of the nucleus in maize root meristem cells. *Physiologia Plantarum*, 96 (1); 118-122.
- Ergen, Y. ve Sağlam, C. 2005. Bazı çerezlik ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşitlerinin Tekirdağ koşullarında verim ve verim unsurları. www.trakya.edu.tr/Fakulte/ziraar/Turkce/Dergi/2005_2_3/3.pdf.
- Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 159-160.
- Eyüboğlu, F., Kurucu, N. ve Talaz, S. 1998. Türkiye topraklarının bitkiye yararlı bazı mikroelementler (Fe, Cu, Zn, Mn) bakımından genel durumu. Köy Hizmetleri Genel Müd. Top. ve Güb. Araş. Enst. Müd., S:72, Ankara.
- Fernandes, J.C. and Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological and structural effect off excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57; 246-273.
- 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. *PNAS*, (89); 5, 1827-1831.
- Gardea-Torresdey, J.L., Polette L., Artega S., Tiemann K.J., Bibb, J. and Gonzales, J.H. 1996. Determination of the content of hazardous heavy metals on *Larrea tridentata* grown arounsa contaminated area. Proceedings of the elevent. Annual EPA Conf. On Hazardous Waste Research, Edited by Erickson, L.R., Tillison, D.L., Grant, S.C. and Mc Donald, J.P., Albuquerque, N.M. 660.

- Grigg, G. and Clark, S. 2005. Genes and genomes: Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *BioEssays*, (16); 431-436.
- Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E. and Bestor, T.H. 2006. Methylation of tRNA (Asp) by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395-397.
- Gonzalzo, M.L. and Jones, P.A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. 1997. *Mutation Research*, (386); 107-118.
- Haines, T.R., Rodenhiser, D.I. and Ainsworth, P.J. 2001. Allele-Specific Non-CpG Methylation of the Nf1 Gene during Early Mouse Development. *Developmental Biology*, (2); 240, 585–598.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1-11.
- Hammand, P.B. and Beliles, R.P. 1980. Metals. In: J. Doull, C.D. Klaassen and Amdur, M.O. ed. *Toxicology 2th Ed.* McMillan Publishing Co. Inc. New York, 409-462.
- Hapke, H.J. 1991. Effects of metals on domestic animals. VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Harrison, J., Stirzaker, C. and Clark, S.J. 1998. Cytosines adjacent to methylated CpG sites can be partially resistant to conversion in genomic bisulfite sequencing leading to methylation artifacts. *Anal Biochemistry*, (264); 1, 129-132.
- Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K. and Iida, S. 1970. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry*, (14); 9, 2858–2865.
- Heiser, C. 1951. The sunflower among the North American Indians. *PNAS*, 95, 432–448.
- Heiser, C. 1998. The domesticated sunflower in old Mexico? *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 447-449.
- Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447, 418-424.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *PNAS*, (93); 18, 9821-9826.
- Hernandez, F. 1942. *Historia de las Plantas de Nueva Espania*. Imprenta Universitaria, Mexico City, Mexico, Vol I.
- Holliday, R. 2006. Epigenetics, A Historical Review. *Landes Bioscience, Epigenetics* (1)2, 76-80.

- Jaenisch, R. and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, 245.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven, A. and Timur, S. 2007. Metallerin çevresel etkileri-I. (erişim adresi: www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf, Erişim Tarihi: 13.05.2007.
- Kamalak, F. 2006. Kahramanmaraş bölgesindeki akarsu ve kaynak sularındaki kurşun, kadmiyum ve bakırın birlikte çöktürme/özenleştirme ve alev atomik absorpsiyon spektrometresiyle tayini. Yüksek lisans tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 16.
- Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M. and Kolodner, R. 1997. Methylation of the hMLH1 Promoter Correlates with Lack of Expression of hMLH1 in Sporadic Colon Tumors and Mismatch Repair-defective Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 57; 108.
- Kara, K. 1996. Tarla Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları, Yayın No:191, Erzurum.
- Karaata, H. 1992. Ayçiçeği sulaması. Köy Hizmetleri Atatürk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları. Genel Yayın No: 32, Bülten No: 6.
- Kaya, Y., Tan S. ve Kaya, G. 2000. Sekizinci beş yıllık kalkınma planı sanayi bitkileri alt komisyon raporu (Ayçiçeği), Edirne-İzmir.
- Kaya, S., Pirinçci, I. ve Bilgili, A. 1998. Çevre bilimi ve çevre toksikolojisi. Medisan yayın serisi, yayın no: 36.
- Kaya, S., Pirinçci, I. ve Bilgili, A. 1998. Veteriner hekimliğinde toksikoloji. Medisan yayın serisi, yayın no: 35.
- Khurana, N. and Chatterjee, C. 2001. Influence of variable zinc on yield, oil content, and physiology of sunflower. *Commun Soil Sci. Plant Anal.*, 32, 3023-3030.
- Kırbağ, F. and Munzuroğlu, O. 2006. Toxic effects of cadmium (Cd⁺⁺) on metabolism of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Acta Agric Scand, Section B - Soil and Plant Sci* (3); 56, 224-229.
- Kırbağ, F., Koçak, A. ve Munzuroğlu, Ö. 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) fidelerinde kök, gövde ve yaprak ile yaprak disklerinin absisik asit düzeyleri üzerine cıvanın (Hg⁺⁺) etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri dergisi*, (4); 645-653.
- Kızıloğlu, S. 1992. Türkiye Bitkisel Yağ Sanayi. *Hasad Dergisi*, (7); 82, 28-30, İstanbul.

- Koç, E, Üstün, A.S. and Arıcı, Y. 2012. Biber (*Capsicum annuum* L.) fidelerinde farklı çinko konsantrasyonlarının total protein, hidrojen peroksit içeriği ve peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 13(2), 205-212.
- Lentz, D.L., Pohl, M.D., Alvarado, J.L., Tarighat, S. and Bye, R. 2008. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. PNAS, 105, 6232-6237.
- Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental Stresses. New York, London: Academic Press, 697.
- Lichtenhaler, H.K. 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. J. Plant Physiol, 148, 4-14.
- Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H. and Yang, Y.S. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. Chemosphere, 61; 158-167.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q. X., Xie, L.J., Li, P.J. and Sun, T.H. 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. Chemosphere, 67; 1155-1163.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J. and Han, Y.P. 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. Journal of Hazardous Material. 161; 878-883.
- Marschner, H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press. pp.89-100.
- Martin, C. and Zhang, Y. 2007. Mechanisms of epigenetic inheritance. Current Opinion in Cell Biology, (19)3, 266–272.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habil Ghorbal, M. and El Ferjani, E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). Plant Science, 127(2); 129-137.
- Meagher, R.B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. C.Op.In Plant Biol., 3, 153-162.
- Miller, C., Sweatt, J. 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. Neuron,(6); 53, 857–869.
- Mithofer, A. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: Evidence for Common Signals, FEBS Lett., 566, 1-5.

- Moller, I.M. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants, *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58, 459- 481.
- Nishimura, T. and Paszkowski, J. 2007. Epigenetic transitions in plants not associated with changes in DNA or histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 393-398.
- Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M. ve Pehlivan, M. 2009. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri. *Alnteri*, 17, 14-26.
- Ouariti, O., Boussama, N. and Zarrouk, M. 1997. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membran lipids. *Photochemistry*, 45(7); 1343-1350.
- Paran, I. and Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85; 985–993.
- Price, C.A., Clarck, H.E. and Funkhouser, H.E. 1972. Functions of micronutrients in plants. *Soil Sci. of Amer. Inc.* 55; 85–93. USA.
- Powell, D. 2008. Memories may be stored on your DNA. *New Scientist*, <http://www.newscientist.com/article/mg20026845.000-memories-may-be-stored-on-your-dna.html>. Date: 02.12.2008.
- Rakyan, V.K. and Beck, S. 2006. Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Current Opinion in Genetics and Development*, 6(16) , 573–577.
- Raven, J.A., Evans, M.C.W. and Korb, R.E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂ evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60: 111-149.
- Ringrose, L. and Paro, R. 2007. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*, 134, 223-232.
- Sadri, R. and Hornsby, P.J. 1996, Rapid Analysis of DNA Methylation Using New Restriction Enzyme Sites Created by Bisulfite Modification. *Nucleic Acids Research*, (24); 24, 5058-5059.
- Sahagun, B. 1569. Florentine Codex. General History of the Things of New Spain. Book-9 The Merchants; trans Dibble CE, Anderson AJO 1959 (School of American Research, University of Utah, and Museum of New Mexico, Santa Fe). No:14, Part X.
- Sanlı, Y. 1984. Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2: 17-37.
- Savva, D. 1998. Use of the DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicol. Environ. Safely*, 41, 103-106.

- Savva, D. 2000. The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting to detect exposure to genotoxic chemicals. *Ecotoxicology*, 9; 341–353.
- Schmidt, J.P. 1997. Understanding phytotoxicity threshold for trace elements in land applied sewage sludge. *J. Environmental Qual.* 26, 4-10.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.J. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.*, 14, 43-50.
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.H., Kundi, M. and Knasmüller, S., 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutag.*, 31, 183-191.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y. ve Görk, G. 1998. *Tohumlu Bitkiler Sistematığı Kitabı*. Ege Üniversitesi Yayınları. İzmir.
- Sezer, S. ve Simsek, S. 2005. Çukurova’da farklı ekim sıklıklarında yetiştirilen bazı ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşitlerinin tarımsal ve teknolojik özellikleri üzerinde bir araştırma. www.cukurova.edu.tr/makale/ÇUKUROVA.pdf.
- Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B. and Grun, P. 1982. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107; 428-432.
- Steffan, R.J. and Atlas, R. M., 1991, Polymerase Chain reaction: Applications in Environmental Microbiology, *Annual Review of Microbiology*, 15; 137-161.
- Süzer, S. Ayçiçeği Tarımı. 2002. *CİNİTARIM*. Yıl: 5, Sayı: 39, 38-41.
- Süzer, S. 1993. Ayçiçeği tarımında başarılı olmanın yolları. *Marmara’ da Tarım*, Sayı: 55, 19-22.
- Taban, S. ve Alpaslan, M. 1996. Mısır bitkisi üzerine çinko gübrelemesinin etkisi. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 1(2), 69-73.
- Temel, A., Kartal, G., Gözükırmızı, N. 2008. Genetic ve epigenetic variations in barley calli cultures. *Biotech.ve Biotechnol. Equipment*, 22(4), 911-914.
- Theodorakis, C.W., Bickham, J.W. and Lamb, T. 2001. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20; 317-326.
- Tsui, C. 1948. The role of zinc in auxin synthesis tomato plant. *Amer. J. Bot.*, 35, 172-174.

- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting Menomes using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Research*, 18; 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wong, M.H. and Bradshaw, A.D. 1982. A comparison of the toxicity of heavy metals, using root elongation of ryegrass, *Lolium perenne*. *New Phytologist*, 91; 255-261.
- Xiong, Z. and Laird, P.W. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research*, (12); 25, 2532-2534.
- Villarreal, L.P. 2005. *Viruses and the Evolution of Life*. Washington, ASM Press.
- Vliet, J.V., Oates, N.A. and Whitelaw, E. 2007. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (64)12, 1531-1538.
- Vranova, E. 2002. Signal transduction during oxidative stress, *J. Exp. Bot.*, 53, 1227-1236.
- Yarsan, E., Bilgili, A. and Türel, I., 2000. Heavy metal levels in mussels (*Unio stevenianus* Krynicki) obtained from Van Lake. *Turk J. Vet. Animal Science*, 24, 93-96.
- Yıldız, N., 2001. Toprak kirlenici bazı ağır metallerin (Zn, Cu, Cd, Pb, Co ve Ni) belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 32(2), 207-213, Erzurum.
- Yıldız, M., Terzi, H. ve URUŞAK, B. 2011. Bitkilerde krom toksisitesi ve hücrel cevaplar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(2), 163-176.
- Yu, M.H. 2005. *Environmental toxicology: Biological and health effects of pollutants*. CRC press, Boca Raton.
- Yurdagül, M. ve Ersoy, Ü. 1997. The Fats and Oils Market In Turkey With Special Emphasis To Its Export. *AOCS, The World Oil Conference*, İstanbul.
- Zengin, F.K. ve Munzuroğlu, Ö. 2004. Effect of lead (Pb⁺⁺) and copper (Cu⁺⁺) on the growth of root, shoot and leaf of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *G.Ü.Fen Bilimleri Dergisi*, 17(3); 1-10.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ekrem BÖLÜKBAŞI

Doğum Yeri : KAYSERİ

Doğum Tarihi : 01.12.1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Nuh Mehmet Baldöktü Anadolu Lisesi (2004)

Lisans : Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD. (Eylül 2011-Haziran 2013)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Amasya Üniversitesi; Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi) Temmuz-Aralık 2011

Ankara Üniversitesi; Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi) Aralık 2011– devam ediyor.