



**AĞIR METAL STRESİNİN MISIRDA  
(*Zea mays* L.) MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU  
RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE  
HUMİK ASİTİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Esmâ YİĞİDER**

**Yüksek Lisans Tezi  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı  
Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR**

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞIR METAL STRESİNİN MISIRDA (*Zea mays* L.) MEYDANA  
GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPON POLİMORFİZMİ  
ÜZERİNE HUMİK ASİTİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Esmâ YİĞİDER

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

AĞIR METAL STRESİNİN MISIRDA (*Zea mays L.*) MEYDANA GETİRMİŞ  
OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE HUMİK ASİTİN  
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR danışmanlığında, Esmâ YİĞİDER tarafından hazırlanan bu çalışma 20/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (3/0.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun 23.../06.../2016... tarih ve 26.../26... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AĞIR METAL STRESİNİN MISIRDA (*Zea mays* L.) MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE HUMİK ASİTİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Esmâ YİĞİDER

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

Mısır genomunda LTR retrotranspozonlarının yüzdesi oldukça fazladır ve çeşitli çevresel etmenlerden dolayı uyarılarak genomun yeniden düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Bu çalışma dört farklı ağır metale maruz bırakılan mısır tohumlarında genomik stabilite ve LTR retrotranspozon polimorfizmi üzerine humik asitin etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. Araştırmada dört farklı ağır metal (demir, çinko, mangan, kobalt) ve bu ağır metallerde üç farklı dozu (20, 40, 60 mM demir, mangan, çinko ve 10, 20, 40 mM kobalt) kullanılmıştır. Genetik analizler için 6 IRAP primeri (*Nikita-E2647*, *Sukkula*, *Stowaway*, *WLTR2105* ve *Bare 1(0)*, *Nikita N-57*) ve yine retrotranspozona dayalı başka yöntem olan REMAP tekniğinde de bunlara kombine olarak 2 adet ISSR (8081, 8082) primerleri kullanılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki ağır metallerin bütün dozları retrotranspozon polimorfizmde bir artışa ve DNA hasarına bağlı olarak GTS oranında da azalmalara neden olmuştur. Fakat ağır metaller ile humik asitin beraber uygulanmasıyla retrotranspozon polimorfizmi ve DNA hasarında azalış aynı zamanda GTS oranında da artış görülmüştür. Araştırma verileri üzerinde yapılan değerlendirmeler ışığında, kullanılan ağır metallerin toksik etkilerinin humik asitle beraber azaldığı ve özellikle de ağır metal kirliliğine maruz kalmış tarım alanlarında humik asit uygulamasının bu amaçla kullanılabileceği söylenebilir.

**2016, 112 sayfa**

**Anahtar Kelimeler;** Mısır, Ağır Metal Stresi, Humik Asit, IRAP, REMAP, Retrotranspozon

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF EFFECT OF HUMIC ACID ON RETROTRANSPOSON POLYMORPHISM INDUCED BY HEAVY METALS STRESS IN MAIZE (*Zea mays L.*)

Esmâ YİĞİDER

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Agricultural Biotechnology  
Plant Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

LTR retrotransposons play an important role for the reorganization of various environmental factors stimulated genomes and they have high percentage of whole corn genome. This study aimed to examine the effects of humic acid on genomic stability and LTR retrotransposon polymorphisms in four different heavy metals treated corn seeds. Four different heavy metals (iron, zinc, manganese, cobalt) and three different doses of those metals (20, 40, 60 mM for iron, manganese, zinc, and 10, 20, 40 mM for cobalt) were used in the study. Six IRAP primers (*Nikita-E2647*, *Sukkula*, *Stowaway*, *WLTR2105* and *Bare 1(0)*, *Nikita N-57*) and 2 more ISSR primer (8081, 8082) which combined with previous primers for REMAP technique were used for the genetic analyzes. Results showed that all doses of heavy metals caused to increase of retrotransposon polymorphisms and decrease of the percentages of GTS values due to DNA damages. In the some other way, the combine uses of humic acid and heavy metals result in decreases of retrotransposon polymorphism and DNA damages and also increase of GTS values. The evaluations of research data provides to suggest that humic acid can be used to reduces toxic effects of heavy metals on the polluted agricultural areas.

**2016, 112 pages**

**Keywords:** Corn, Heavy Metal Stres, Humic Acid, IRAP, REMAP, Retrotransposon

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca yardım ve katkılarıyla bana yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince manevi desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a bana ayırdığı değerli zaman ve sağladığı imkânlar için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin başlangıcından bitimine kadar bana inanan, benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bildiklerini paylaşan ve paylaşmamızı öğreten Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yine bana bilgilerini aktaran, tez aşamam boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Esra ARSLAN'a, Sayın Burcu SİĞMAZ'a, Sayın Semra YAĞCI'ya ayrıca Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda çalışan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar ve tez çalışmalarım da her zaman yanımda olan değerli çalışma arkadaşım Sayın Seba TURHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Eda CİMİN'e, Sayın Kardelen AKYÜREK'e, Sayın Onur VURAL'a, Sayın Arş. Gör. Sibel TURAN'a, Sayın Yusuf Zekeriya BALIK'a, Sayın Mustafa YILGIN'a, saygıdeğer bölüm hocalarıma ve tez aşamamda benimle bilgilerini paylaşan ve yol gösterip desteğini esirgemeyen Sayın Ahmet KARAKUŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim babam Saffet YİĞİDER, annem Nursel YİĞİDER ve abim Selçuk YİĞİDER'e hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Esmâ YİĞİDER**

**Haziran, 2016**

## İÇİNDEKİLER

|   |           |
|---|-----------|
| ÖZET.....   | i         |
| ABSTRACT.....   | ii        |
| TEŞEKKÜR.....   | iii       |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....   | vi        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....  | xi        |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....  | xii       |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>  | <b>18</b> |
| 2.1. Mısır.....   | 18        |
| 2.2. Stres.....   | 21        |
| 2.2.1. Abiyotik stres.....  | 22        |
| 2.3. Ağır Metal Stresi.....   | 24        |
| 2.4. Humik Asit.....  | 30        |
| 2.5. Transpozonlar.....   | 32        |
| 2.5.1. Retrotranspozonlar.....  | 33        |
| 2.5.1.a. LTR'li retrotranspozonlar.....   | 33        |
| 2.5.1.b. LTR'siz retrotranspozonlar.....  | 34        |
| 2.5.2. DNA transpozonları.....  | 35        |
| 2.5.3. Sınıf III transpozonlar.....   | 36        |
| 2.6. Retrotranspozonları Belirlemede Kullanılan Moleküler Markırlar.....  | 37        |
| 2.6.1. Sequence-specific amplified polymorphism (SSAP-Diziye Özel<br>Çoğaltma Polimorfizmi).....                      | 38        |
| 2.6.2. Retrotransposons- based insertion polymorphism (RBIP-Retrotranspozon<br>Temelli İnsersiyonel Polimorfizm)..... | 39        |
| 2.6.3. Inter-primer binding site Amplification (iPBS-Primer Arası Bağlantı<br>Yerinin Çoğaltması).....                | 40        |
| 2.6.4. Inter-SINE Amplified Polymorphism (ISAP-SINE Arası Çoğaltma<br>Polimorfizmi).....                              | 41        |
| 2.6.5. Inter-Retrotransposons Amplified Polymorphisms<br>(IRAP-Retrotranspozonlar Arası Çoğaltma Polimorfizmi).....   | 42        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.6. Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP-<br>Retrotranspozon Mikrosatellit oğaltma Polimorfizmi) ..... | 43        |
| 2.7. Epigenetik ve Transpozon İlişkisi .....   | 44        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>   | <b>46</b> |
| 3.1. Materyal.....   | 46        |
| 3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal .....  | 46        |
| 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....   | 46        |
| 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve solüsyonlar .....  | 47        |
| 3.1.3.a. Kullanılan ağır metal ve humik asit çözeltileri .....   | 47        |
| 3.1.3.b. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler; .....  | 48        |
| 3.1.3.c. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler.....   | 51        |
| 3.1.3.d. Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler .....  | 52        |
| 3.2. Yöntem .....  | 52        |
| 3.2.1. Ağır metal ve humik asit çözeltilerinin bitkiye uygulanması.....  | 52        |
| 3.2.2. DNA izolasyonu .....  | 53        |
| 3.2.3. IRAP .....  | 54        |
| 3.2.3.a. IRAP primerleri .....   | 54        |
| 3.2.3.b. IRAP-PCR protokolü .....  | 54        |
| 3.2.4. REMAP .....   | 56        |
| 3.2.4.a. REMAP primerleri .....  | 56        |
| 3.2.4.b. REMAP-PCR protokolü.....  | 56        |
| 3.2.5. Agaroz jel elektroforezi .....  | 57        |
| 3.2.6. IRAP, REMAP analizleri ve genomik kararlılık sabitliğinin (%GTS)<br>belirlenmesi.....                                       | 58        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>  | <b>59</b> |
| 4.1. IRAP, REMAP Analizleri ve Genomik Kalıp Kararlılığı (Genomik Template<br>Stability; %GTS) .....                               | 59        |
| 4.2. IRAP-REMAP Jel Görüntüleri.....   | 82        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>   | <b>86</b> |
| KAYNAKLAR .....  | 97        |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | 113       |



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|  |   |
|--|---|
| AA   | Askorbat  |
| ABA  | Absisik asit  |
| Ac   | Aktivatör elementi  |
| AFLP   | Amplified fragment length polymorphism (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) |
| ALDH   | Aldehit dehidrogenaz  |
| APX  | Askorbat peroksidaz   |
| ATP  | Adenozin trifosfat  |
| ATPaz  | Adenozin trifosfataz  |
| B  | Bor   |
| bp   | Base pair (baz çifti)   |
| BPs  | Toplu partiküller   |
| C  | Karbon  |
| Ca   | Kalsiyum  |
| CAT  | Katalaz   |
| Cd   | Kadmiyum  |
| CDF  | Katyon difüzyon kolaylaştırıcı  |
| cm <sup>3</sup>                                      | Santimetreküp   |
| Co   | Kobalt  |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | Kobalt nitrat heksahidrat   |
| CpG  | Sitozin-fosfat-guanin bölgeleri   |
| CRES   | Cis-düzenleyici elementler  |
| CTAB   | Setil trimetil amonyum bromür deoksiribonükleik asit                            |
| Cu   | Bakır   |
| dH <sub>2</sub> O                                    | Distile su  |
| DME  | Demeder   |
| DNA  | Deoksiribonükleik asit  |
| dNTP   | Deoksiribonükleotit trifosfat   |
| Ds   | Ayrışma elementi  |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| EDTA                          | Etilendiamintetraasetik asit   |
| ENP                           | Engeneered nanoparticle  |
| epiRILs                       | Epigenetic recombination inbred lines  |
| FAO                           | Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) |
| Fe                            | Demir  |
| FeSO <sub>4</sub>             | Demir-II sülfat  |
| GAA                           | Glasiyel asetik asit   |
| GCR2                          | G-protein coupled reseptör   |
| GPx                           | Glutasyon peroksidaz   |
| g                             | Gram   |
| GR                            | Glutasyon redüktaz   |
| GSH                           | İndirgenmiş glutasyon  |
| GSSG                          | Oksitlenmiş glutasyon  |
| GST                           | Aldehit dehidrojenaz   |
| GTS                           | Genomik template stability (Genomik kararlılık sabitliği)  |
| H                             | Hidrojen   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen peroksit  |
| ha                            | Hektar   |
| HA                            | Humik asit   |
| HCl                           | Hidroklorik asit   |
| Hg                            | Civa   |
| HM                            | Humik maddeler   |
| HNS                           | Hogland besi ortamı  |
| IRAP                          | Inter-retrotransposon amplified polymorphism (Retrotranspozon arası çoğaltma polimorfizmi)         |
| IRT                           | Demir ile indüklenmiş taşıyıcı   |
| ISSR                          | Inter-Simple Sequence Repeat (Basit dizi tekrarları arası)   |
| iPBS                          | Inter-primer binding site amplification (Primerler arası bağlanma yerinin çoğaltılması)            |
| K                             | Potasyum   |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| LEA                                 | Late Embryogenesis Abundant proteins (geç embriyogenez bağımlı proteinler)                          |
| LTR                                 | Long terminal repeats (Uzun uç tekrarlar)   |
| Mg                                  | Magnezyum   |
| mg                                  | Miligram  |
| MITE                                | Miniature inverted repeat transposable element (Minyatür evrik tekrarlı yer değiştirebilen element) |
| miRNA                               | Mikro RNA   |
| ml                                  | Mililitre   |
| mM                                  | Milimolar   |
| Mn                                  | Mangan  |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | Mangan sülfat monohidrat  |
| Mo                                  | Molibden  |
| mRNA                                | Messenger ribonucleic acid (Mesajcı ribonükleik asit)   |
| MSAP                                | Methylation-sensitive amplified polymorphism (Metilasyona duyarlı çoğaltma polimorfizmi)            |
| MT                                  | Metallotiyonein   |
| N                                   | Azot  |
| NA                                  | Nikotinamin   |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | Sodyum sülfat   |
| NaCl                                | Sodyum klorür   |
| NADPH                               | Nikotinamid adenin dinükleotid  |
| NaOCl                               | Sodyum hipoklorit   |
| ng                                  | Nanogram  |
| Ni                                  | Nikel   |
| NO <sup>•</sup>                     | Nitrik oksit  |
| Nramp                               | Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (Doğal dirence bağımlı makofaj proteinleri)       |
| NtGPDL                              | Gliserolfosfodiesteraz  |
| O <sub>2</sub>                      | Oksijen   |
| ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>        | Süperoksit  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| OECD            | Organisation for Economic Co-operation and Development<br>(Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü)               |
| OH <sup>-</sup> | Hidroksil   |
| P               | Fosfat  |
| PBS             | Primer binding site (Primer bağlanma bölgesi)   |
| PCR             | Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)   |
| pH              | Power of hydrogen   |
| PLGSH-Px        | Fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz   |
| POX             | Peroksidaz  |
| ppm             | Parts per million   |
| RBIP            | Retrotransposon based insertional polymorphism (Retrotranspozon temelli insersiyonel polimorfizm)               |
| REMAP           | Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism<br>(Retrotranspozon –mikrosatellit çoğaltma polimorfizmi) |
| RNA             | Ribonükleik asit  |
| RNAi            | RNA-interferaz  |
| ROS             | Reaktif oksijen türleri   |
| ROS-1           | Repressor of silencing-1 (baskılayıcı susturma)   |
| RT              | Ters transkriptaz   |
| S               | Sülfür  |
| SINE            | Short interspersed nuclear elements (Kısa serpiştirilmiş nükleer element)                                       |
| siRNA           | Small RNA   |
| SOD             | Süperoksit dismutaz   |
| Spm             | Suppressor mutator  |
| S-SAP           | Sequence-specific amplified polymorphism (Diziye özel çoğaltma polimorfizmi)                                    |
| TBE             | Tris-borat-EDTA tamponu   |
| TE              | Transpozon elementleri  |
| TE              | Tris-EDTA tamponu   |
| TPase           | Transpozaz  |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| TPRT                                 | Target-primed reverse transcription (primer hedefli ters transkripsiyon) |
| tRNA                                 | Transfer ribonucleic acid (Taşıyıcı ribonükleik asit)                    |
| USDA                                 | United States Department Of Agriculture (ABD Tarım Bakanlığı)            |
| UV                                   | Ultraviyole  |
| V                                    | Volt   |
| v/v                                  | Hacim/Hacim  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | Çinko sülfat heptahidrat   |
| ZIP                                  | Protein taşıyıcılar  |
| Zn                                   | Çinko  |
| ZRT                                  | Çinko ile düzenlenmiş taşıyıcı   |
| µg                                   | Mikrogram  |
| µl                                   | Mikrolitre   |
| µM                                   | Mikromolar   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Bitkilerin abiyotik strese verdiği cevaplar .....  | 23 |
| Şekil 2.2. Bitkilerde stres tolerans yolu .....   | 24 |
| Şekil 2.3. Bitkilerde varsayılan metal taşıyıcılar .....  | 27 |
| Şekil 2.4. LTR retrotranspozonlarının büyük iki sınıfı copia ve gypsy .....                           | 34 |
| Şekil 2.5. Otonom ya da otonom olmayan LTR'siz transpozon LINE ve SINE'lar .....                      | 35 |
| Şekil 2.6. S-SAP Modelini Gösteren Bir Taslak.....  | 39 |
| Şekil 2.7. Retrotranspozon based insertion polymorphism (RBIP).....                                   | 40 |
| Şekil 2.8. İPBS'nin şematik gösterimi .....   | 41 |
| Şekil 2.9. IRAP (Inter-Retrotranspozon Amplified Polymorphism) .....                                  | 43 |
| Şekil 2.10. REMAP (Retrotranspozon-microsatellite amplified<br>polymorphismamplifikasyon) .....       | 44 |
| Şekil 4.1. E2647-IRAP primerine karşı oluşan (Demir-Çinko) amplifikasyon<br>ürünleri .....            | 82 |
| Şekil 4.2. Nikita-N57-IRAP primerine karşı oluşan (Demir-Çinko) amplifikasyon<br>ürünleri .....       | 83 |
| Şekil 4.3. Stowaway+8081-REMAP primerine karşı oluşan (Demir-Çinko)<br>amplifikasyon ürünleri.....    | 84 |
| Şekil 4.4. E2647-IRAP primerine karşı oluşan (Mangan-Kobalt) amplifikasyon<br>ürünleri .....          | 84 |
| Şekil 4.5. Stowaway+8081-REMAP primerine karşı oluşan (Mangan- Kobalt)<br>amplifikasyon ürünleri..... | 85 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 2.1. Mısır türleri ve alt türleri .....  | 19 |
| Çizelge 2.2. Biyotik ve Abiyotik stres faktörleri .....  | 22 |
| Çizelge 2.3. Hidroksil radikallerini içeren kimyasal reaksiyonlar .....  | 29 |
| Çizelge 2.4. ROS'lara karşı (enzim ve antioksidant) savunma sistemi .....  | 30 |
| Çizelge 2.5. Bitkilerde transpozon elementlerine örnekler .....  | 36 |
| Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar .....  | 46 |
| Çizelge 3.2. IRAP-PCR'da kullanılan primer dizileri, erime (T <sub>m</sub> ) ve bağlanma<br>(T <sub>a</sub> ) sıcaklıkları ..... | 54 |
| Çizelge 3.3. IRAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları .....   | 54 |
| Çizelge 3.4. REMAP-PCR'da kullanılan primer dizileri .....   | 56 |
| Çizelge 3.5. REMAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları .....  | 57 |
| Çizelge 4.1. Mn ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen<br>bantların moleküler ağırlığı (bp) .....             | 66 |
| Çizelge 4.2. Mn ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen<br>bantların moleküler ağırlığı (bp) .....            | 67 |
| Çizelge 4.3. IRAP markırında Mn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık<br>sabitliliği oranları (%GTS) .....                  | 68 |
| Çizelge 4.4. REMAP markırında Mn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık<br>sabitliliği oranları (%GTS) .....                 | 69 |
| Çizelge 4.5. Co ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen<br>bantların moleküler ağırlığı (bp) .....             | 70 |
| Çizelge 4.6. Co ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen<br>bantların moleküler ağırlığı (bp) .....            | 71 |
| Çizelge 4.7. IRAP markırında Co ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık<br>sabitliliği oranları (%GTS) .....                  | 72 |
| Çizelge 4.8. REMAP markırında Co ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık<br>sabitliliği oranları (%GTS) .....                 | 73 |
| Çizelge 4.9. Zn ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen<br>bantların moleküler ağırlığı (bp) .....             | 74 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Çizelge 4.10.</b> Zn ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp) ..... | 75 |
| <b>Çizelge 4.11.</b> IRAP markırında Zn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS).....        | 76 |
| <b>Çizelge 4.12.</b> REMAP markırında Zn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS).....       | 77 |
| <b>Çizelge 4.13.</b> Fe ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp) .....  | 78 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> Fe ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp) ..... | 79 |
| <b>Çizelge 4.15.</b> IRAP markırında Fe ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS).....        | 80 |
| <b>Çizelge 4.16.</b> REMAP markırında Fe ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS).....       | 81 |



## 1. GİRİŞ

Son zamanlarda sanayileşmenin de artmasıyla çeşitli kaynaklardan çıkan katı, sıvı gaz halindeki kirleticiler zamanla hava, su ve toprakta birikerek çevre kirliliğine neden olurlar. Oluşan çevre kirliliği sonucunda tarım alanları bitkilerin gelişimi için uygun olmayan koşullar haline gelir. Değişen çevre şartları bitkilerin büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyerek strese girmelerine neden olur (Nagajyoti *et al.* 2010). Özellikle ağır metal kirliliği; endüstriyel atıklar, tarımda ilaç kullanımı, maden ocaklarının, artmasıyla günümüzde ciddi bir sorun haline gelmiştir. Diğer taraftan biyotik faktörlerden olan hastalık, zararlı ve yabancı otlardan dolayı dünyada buğday, mısır, çeltik, pamuk, soya gibi önemli kültür bitkilerinde ürün kaybı %67,15' dir (Oerke *et al.* 2012).

Bitkilerin hayatlarını sürdürmeleri için gerekli olan elementlere 'bitki besin elementleri' denir. Bir bitki dokusunda doğadaki bütün elementlere rastlamak mümkündür. Doğada bulunan elementlere bitkinin ihtiyacı olsun ya da olmasın fazla ya da az miktarda bünyesine alma özelliği vardır. Karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N), fosfor (P), potasyum (K), sülfür (S), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), çinko (Zn), mangan (Mn), bakır (Cu), bor (B), klor (Cl), nikel (Ni) ve molibden (Mo) gibi elementler bütün bitkiler için mutlak gereklidirler (Okcu vd 2009). Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), ve kobalt (Co) esansiyel mikroelementlerdir (Reeves and Baker 2000). Mikroelementler aynı zamanda çevrede bulunma oranlarına göre ultra iz ( $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ , ya da  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ya da iz olarak ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , ya da  $\text{mg L}^{-1}$ ) adlandırılırlar (Nagajyoti *et al.* 2010).

Özgül ağırlığı  $8,9 \text{ g/cm}^3$  olan kobalt bitkiler ve hayvanlar için iz miktarda gerekli mikro besin elementidir (Okcu vd 2009). Kobalt elementi bitkilerde vitamin B<sub>12</sub> formunda bulunur (Beyersmann and Hartwig 1992; (Mateuca *et al.* 2005; Norwood *et al.* 2007). Kobalt elementinin çeşitli topraklarda ortalama konsantrasyonları  $10-40 \text{ mg kg}^{-1}$  arasında değişir. Bitkiler için toprakta uygun olan kobalt miktarı  $0,1-70 \text{ ppm}$  arasındadır. Kobalt toprakta  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Co}^{+3}$  iki oksidasyon formunda bulunur. Toprakta

yeterli miktarda kobalt biyolojik aktivite için gereklidir (Bakırcıoğlu 2009). Mısıır bitkisinde ortalama kobalt konsantrasyonu 0,148 ppm'dir (Erturk *et al.* 2013).

Mangan bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için temel mikrobesein elementlerindendir ve özgül ağırlığı 7,4 g/cm<sup>3</sup> dür. Protein ve karbonhidratların sentezi, solunum ve fotosentez olaylarında birçok enzime bağlı olarak önemli rol oynamaktadır (Okcu vd 2009). Mn<sup>+2</sup> olarak toprakta bulunan mangan toprak çözeltisinden alınır. Mangan türleri 25-8000 µg L<sup>-1</sup> arasında toprakta çözünmüş halde bulunur (Bakırcıoğlu 2009).

Çinko bitkiler için çok gerekli bir elementtir ve özgül ağırlığı 7,1 g/cm<sup>3</sup> tür. Bitkilerin bünyelerinde barındırdıkları enzimlere bakarak, karbonhidrat, protein, fosfat, RNA oluşumunda rol aldığı söylenebilir. Membranların geçirgenliğinin de önemli rolü olduğu bulunmuştur. Bunlara ilaveten bakteri ve mantarların oluşturduğu hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğu da bilinir (Okcu vd 2009). Topraklarda bulunan çinko konsantrasyonu 10-300 ppm arasındadır, bitkiler tarafından alınabilir çinko konsantrasyonu 3,6-5,5 ppm arasında değişiklik göstermektedir. Çinko ağır metali hem enzim reaksiyonlarının aktivatörü ve kofaktörü olarak (Nagajyoti *et al.* 2010) hem de metaloproteinlerin prostetik grubu olarak katalitik etki gösterir. Bu iz miktardaki elementlerin redoks reaksiyonlarına katılmak, elektron transferi yapmak ve nükleik asit metabolizmasında yapısal işlevleri vardır (Roat and Das 2003). RNA polimeraz, süperoksit dismütaz, alkol dehidrogenaz, karbonik anhidraz gibi birçok enzim çinko içerir. Çinko ribozomun bütünlüğünü korumak için gereklidir (Nagajyoti *et al.* 2010).

Demir tüm organizmalar için birçok metabolik süreçte önemli bir rol oynayan vazgeçilmez bir elementtir. Demir redoks reaksiyonlarını katalize eder ve proteinin bir bileşeni olarak bulunur (Nagajyoti *et al.* 2015). Demirin özgül ağırlığı 7,9 g/cm<sup>3</sup> dür. Toprak çözeltisinde demir konsantrasyonu 30-550 µg L<sup>-1</sup> arasındadır (Rodecap *et al.* 1994). Yeryüzünde demir bol miktarda bulunsa da çözünemeyen formu olan Fe<sup>+3</sup> çökeltileri hakimdir ve özellikle nötr ve alkali topraklarda bitkiler büyük ölçüde bu formu kullanamazlar. Köklerden demir alımı bitkideki demir durumuna göre ayarlanır. Ayrıca diğer elementlerin bitkilerde ki durumu da demir durumuna göre değişebilir

(Cohen *et al.* 1998). Rodecap *et al.* (1994) Arabidopsis bitkisinde demir eksikliği olan bitkiler ile demir fazlalığı olan bitkileri kıyaslamış ve demir eksikliği olan bitkilerin tohumlarında ve çiçek salkımlarında magnezyum ve kadmiyumun yüksek konsantrasyonlarda olduğunu bildirmiştir.

Bitki besin elementleri bitkiler için gerekli olsada doğadaki bütün elementler bitkiler için esansiyel değildir ve fazla miktarda bulunması bitkilerde toksik etkiye neden olabilir. Civa (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi bazı ağır metaller bitkiler için esansiyel değildir ve düşük konsantrasyonlarda bile bitkide ciddi toksik etki yaparlar (Salt *et al.* 1995; Rubin *et al.* 2005). Ağır metaller arasında en fazla toksik etki yapan metaller kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa (Hg) olarak bilinmektedir (Çepel 1997). Kobalt toksisitesi topraktaki kobalt konsantrasyonuna bağlıdır, eğer toprak ve bitkide bulunma sınırı aşırsa toksik etkisi gözlenmektedir (Micó *et al.* 2008; Li *et al.* 2009).

Ağır metallerin dokuda fazla miktarda birikimi bitkide strese neden olmakta ve çimlenme, enzim aktivitesi, transpirasyon, mineral besin alımı, stoma hareketleri, fotosentez, nükleik asit yapısı, su absorpsiyonu, protein sentezi, membran stabilitesi ve hormonal denge bozuklukları gibi birçok olayın bozulmasına neden olmaktadır (Kennedy and Gonsalves 1987). Kobalt elementi genellikle toprakta faydalı olarak tanımlanır fakat metal rafineleri ve tarımsal atıklardan dolayı kirlenici olabilir. Artan kobalt miktarı bitkilerin büyümesini ve metabolik fonksiyonlarını ciddi bir şekilde etkilediği ve hücre zarı, bitki hücresi ve önemli metabolik maddelere geri dönüşümsüz olarak zarar verdiği bilinir. Kobalt elementi bitkilerde, ağırlığı azaltmasının yanı sıra bitkinin aktif iyon taşınmasını ve yeşillenmesini engeller (Imtiyaz *et al.* 2014). Mn elementi gerekli besin elementi olmasına rağmen 500 ppm mangan varlığında bütün bitkiler etkilenir (Bakırcıoğlu 2009). Mangan toksisitesinin bitki üzerine besin alımında azalma, klorofil biyosentezi inhibisyonu, fotosentez olayının azalması gibi hayati sonuçları vardır (Sheng *et al.* 2015). Topraklarda fazla miktarda çinko biriktiğinde bitkilerin kök ve sürgün büyümesi azalır, kökler inceler, genç yapraklar kıvrılır ve kloroz görülür, hücre büyümesi ve uzaması engellenir, hücre organelleri parçalanır ve klorofil sentezi azalır (Roat and Das 2003). Bitkilerdeki çinko konsantrasyonları normal

bitkilerde 5-100 ppm arasındadır. Görülen toksisiteler genellikle 400 ppm'den sonra başlamaktadır (Asri ve Sönmez 2006).

Hu and Wenjiao (2015) yaptığı bir çalışmada çinkonun orta ve yüksek seviye dozlarına (0-400 mg L<sup>-1</sup> bir mangrove çeşidi olan *Kandelina obovata* L. tolerans ve birikim potansiyelini incelemişlerdir. Sera ortamında gerçekleştirilen deneyde toplam biyokütle, yaprak alanı, kök uzunluğu, kök sayısı üzerine çinkonun etkisi incelenmiştir. Bu deneyde aynı zamanda çinko bitkide birikimi incelenmiştir. *K. obovata* çinkonun 400 mg L<sup>-1</sup> dozunda hayatta kalmıştır ancak bu konsantrasyonda biyoküttelede %34'e varan azalma görülmüştür. Yüksek seviyede çinko uygulamasında bitki köklerinin antioksidant enzim seviyelerinde önemli miktarda artış olmuştur. *K. obovata* tohumlarında ağır metale tolerans 200 mg L<sup>-1</sup> dozuna kadar görülmüştür. Demir hücrel olaylar için gereklidir ancak miktarı aşıldığı zaman toksisiteye neden olur. Demir radikal reaksiyonlarda katalitik rol oynar. Demirin dokuda dengesinin bozulması hücrel lipit, nükleik asit, protein ve karbonhidratlar gibi hücrel hasara neden olur buda hücrel fonksiyonların ve hücrel bütünlüğün bozulması ile sonuçlanır (Britton *et al.* 2002).

Kouhi *et al.* (2015) yapmış oldukları bir çalışmada ise kolza (*Brassica napus* L.) bitkisi üzerine çinko iyonlarının (Zn<sup>+2</sup>) farklı çinko kaynaklarının çinko oksit (ZnO) NPs (nanopartiküller), ZnO BPs'nin (toplu partiküller) yüksek konsantrasyonlarına uzun süre maruz bırakılmasından sonra karşılaştırılmalı etkileri incelenmiştir. Tohumlar dört farklı gruba ayrılmıştır; birinci grup kontrol grubu, ikinci grup ZNO NPs'nin beş farklı dozu (10, 25, 50, 75, 100 mg L<sup>-1</sup>), üçüncü grup ZNO BPs (250 mg L<sup>-1</sup>) ve dördüncü grupta Zn<sup>+2</sup>'nin altı farklı konsantrasyonu (8, 20,1, 40,2, 60,2, 80,3 ve 200 mg L<sup>-1</sup>) uygulanmış ve bu dört grup %10 Hoagland nutrient solution (HNS) besi ortamında büyütülmüştür. Kolzanın büyümesi üzerine uygulamaların inhibitör etkileri sırasıyla Zn<sup>+2</sup> > ZnO BPs > ZnO NPs olarak belirlenmiştir. Sonuç göstermiştir ki uygulamaya cevap olarak yapraklarda çözünür şeker, prolin, çözünür proteinler, toplam klorofil ve antioksidant enzim aktivitelerinde önemli derecede değişiklikler olmuştur. Ancak toplam fenolik bileşikler hiçbir uygulama tarafından belirgin bir şekilde

etkilenmemiştir. Çalışmada *B. napus* üzerine ZnO NPs toksisitesi  $Zn^{+2}$  veya ZnO BPs'ye göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. *B. napus* üzerine ZnO NPs ve BPs'nin negatif etkisi kısmen çözünen  $Zn^{+2}$  iyonlarının toksik etkilerinden dolayı olabileceği ifade edilmiştir. Bu olay muhtemelen kök salgısı tarafından uyarılma ya da fonksiyonel ve yapısal bozukluklar ile köklerin ZnO parçacıklarının fiziksel etkileşimine dayanır. ZnO BPs'nin  $250 \text{ mg L}^{-1}$  konsantrasyonunun yapraklardaki SOD aktivitesini artırırken Zn ne 8 nede  $20,1 \text{ mg L}^{-1}$  konsantrasyonunun SOD aktivitesinde önemli derecede değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir.

Imtiyaz *et al.* (2014) *Glycine max* bitkisine kobalt ve kurşunun (50, 100 ve 150  $\mu\text{M}$ ) üç farklı konsantrasyonu uygulamıştır. Kurşunun karbonhidrat içeriği, protein, prolin, karetenoidler ve klorofil a, b gibi biyokimyasal bileşenler üzerine etkisini ve kobaltın fitotoksitesini üzerine etkisini inceleyen çalışmalar yürütmüştür. Kobalt ve kurşuna maruz kalan soya çeşitlerinde klorofil, karetenoidler, karbonhidrat, protein ve prolin içeriğinde azalmalar olmuştur. En fazla zararlı etkinin 100 ve 150  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Ağır metal stresinin bitkide neden olduğu morfolojik ve fizyolojik etkilerin yanında oksidatif strese neden olarak çoğu hücrede moleküler düzeyde değişikliklere ve gen mutasyonlarına yol açtığı bilinmekte olup bu nedenle ağır metal stress mekanizmalarının araştırılması giderek önemli bir konu haline gelmiştir. Bitkilerde ağır metal stresi oksidatif stresine de yol açar (Schützendübel and Polle 2002). Oksidatif stres sonucunda DNA'da mutasyonla sonuçlanacak hasarlar meydana gelebilir (Blokina *et al.* 2003).

Bitkiler enerji üretimi için oksijen kullanmaktadır ve  $O^{\cdot-}$ 'nin  $H_2O$ 'ya indirgenmesi sonucunda reaktif oksijen türleri olan  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot-}$  açığa çıkmaktadır. Aşırı miktarda alınan enerji  $O_2$ 'yi reaktif oksijen türü olan  $^1O_2$ 'ye (singlet oksijen) dönüştürür. (Foyer *et al.* 1994; Çaylak 2011). Singlet oksijen içeriğinde metal olan enzimlerin  $Fe^{+3}$  ve  $Cu^{+2}$ 'yi ve quinonları indirgeyerek inaktif hale getirir.  $H_2O_2$  enzimlerin tiyol gruplarına etki ederek oksidasyona sebep olur ve enzim aktivitesini bozar.  $H_2O_2$  alkali koşullar

altında bir nükleofil ve asidik koşullarda bir elektrofil gibi reaksiyon verir (Doskočil *et al.* 2014). Redoks aktive edici metal iyonları Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarına katılabilir ve böylece hidroksil gruplarının oluşumunu tetikleyebilirler (Halliwell and Gutteridge 1990). Hidroksil radikali DNA'yı etkileyerek serbest bazların oluşumuna ipliklerin kırılmasına, apürinik ve apimidinik bölgelerin oluşmasına ve çapraz bağlantının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Miser-Salihoglu *et al.* 2010). OH<sup>-</sup> biyolojik moleküllerin hepsiyle tepkimeye girebilir ve çok fazla üretildiğine hücrelerin ölümüne neden olur (Halliwell and Gutteridge 1990). Reaktif oksijen türleri, aerobik metabolizmanın toksik ürünleri olarak kabul edilmiştir. Bitkilerde hayatlarını devam ettirebilmek için serbest radikallere karşı çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Bu antioksidanlar enzim yapılı olanlar ve olmayanlar diye ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), fosfolipit hidroperoksit (GPX) ve peroksidazlar, aldehit dehidrojenaz (ALDH) , glutatyon s-transferaz (GST), fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-PX), askorbat peroksidaz (APX), NADPH-bağımlı quinon oksiredüktaz ve aldoketoredüktaz ile uzaklaştırılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise vitamin E, askorbik asit, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir (Çaylak 2011). Son yıllarda yapılan araştırmalar ROS'ların büyüme, gelişme, abiyotik ve biyotik çevresel uyarılara tepki ve hücre ölümü programlama gibi bitki kontrol sistemlerinde önemli bir sinyal rolüne sahip olduğunu göstermiştir (Asada 2006). Bitki hücrelerinde ROS kloroplast, mitokondri, plazma membranı, apoplastik alanlarda meydana gelmektedir. Peroksizomlarda da normal metabolizma süresince süperoksit radikalleri meydana gelmektedir. Meydana gelen reaktif oksijen türleri, SOD ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilmektedir (Luis *et al.* 2002).

Rellán-Álvarez *et al.* (2006) mısır bitkisinin oksidatif strese tepkisini belirlemek için bir hidrofobik deney gerçekleştirmiştir. Bitkiler farklı konsantrasyonlarda kadmiyum ve civa bulunan ortamda büyütülmüş ve ağır metal uygulaması yapılmıştır. Ağır metal uygulaması sonrası bitkide oksidatif stres ortaya çıkmıştır. ROS'ların temizlenmesinde rol alan enzimler SOD ve APX aktivitesi ölçülmüştür. Ağır metal varlığı hücrel indirgenmiş glutatyon (GSH)'ın giderek azalmasına ve fitoşelatin (PC) sentezi boyunca

polimerizasyon ya da oksitlenmiş glutatyon (GSSG) birikmesine bağlı olarak oksidatif stres belirtilerinde artışa neden olmuştur. bitkiye 6 µM kadmiyum uygulandığında GSH içeriği artarken, GSSG içeriğinde artış olmamış fakat 30 µM kadmiyum, 6 ve 30 µM civa maruz bırakılan bitkilerde GSH oranı değişmezken GSSG oranında artış olmuştur. Araştırmacılar fizyolojik parametrelerden aldıkları bilgilere göre civa kadmiyumdan daha toksik etki yarattığını bildirmişlerdir.

Mısır bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise demir ve krom kombine ya da tek başına bitkilere uygulanmış ve büyüme parametreleri, klorofil içeriği, antioksidant enzimler, lipid peroksidasyonu ve besin alımı (bakır, çinko ve mangan) üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada krom muamelesi görmüş bitkilerin köklerinin bodurlaştığı, kök saçak oluşumunun büyük ölçüde azaldığı ve yapraklarda solmaların olduğu gözlenmiştir. Köklerde krom birikmesi sonucunda köklerden bakır absorpsiyonu azalmıştır. Demir kaynaklı lipid peroksidasyonu iki konsantrasyonda da (3 ve 9 µg l<sup>-1</sup>) yapraklarda artmıştır. Yaprakların çoğunda antioksidan konsantrasyonları, tek muameleye kıyasla kombine muamelede daha da artmıştır. Metal konsantrasyonlarına bitki morfolojik parametrelerinin hassasiyet sırası, kök uzunluğu > sürgün uzunluğu > biyokütle olarak sıralanmıştır. Çalışmada demir muamelesi yapılmış bitkilerde oksidatif stresi önlemek için antioksidan enzimlerinin arttığı görülmüştür (Mallick *et al.* 2010).

Yapılan bir çalışmada domates bitkileri manganın (80, 160, 320, 640 ve 1280 µM) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Araştırmada ilk olarak bitkilerin stres etkisini belirlemek için lipid peroksizomları ölçülmüş daha sonra CAT gen ürününü değerlendirmek için strese giren domates bitkilerinde enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek lipid peroksizomu 1280 µM'lik dozda gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucu olarak ROS ile ortaya çıkan lipid peroksidasyonu seviyesinin manganın farklı konsantrasyonlarına bağlı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra mangan stresine karşı ortaya çıkan antioksidan cevapların domates bitkisinde CAT enzim aktivitesinin değişimi olarak yansıyabildiği belirlenmiştir (Soydam-Aydın *et al.* 2013).

De Oliveira Jucoski *et al.* (2013) yapmış oldukları bir çalışmada genç *Eugenia uniflora* bitkisi üzerine demirin toksik konsantrasyonlarının etkisini incelemiştir. Demirin üç farklı dozuyla muamele edilen bitkiler 45 gün pH 5,0' da Hogland besi ortamında büyütülmüştür. Uygulamanın sonunda hasat edilen bitkilerde demirin yüksek konsantrasyonlarının bitki büyüme oranını düşürdüğü görülmüştür. Sadece yaprak kısımlarında demir konsantrasyonunun da ki artışa bağlı olarak SOD ve GR enzim aktivitelerinde artışlar görülmüştür. CAT, POX, APX seviyeleri aynı zamanda demirin konsantrasyonu ile artarken maruz kalma süresinin artmasına bağlı olarak azalmıştır. GPX aktivitesi maruz kalma süresi ve demir konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır. Ascorbate (AA) ve GSH içerikleri ve AA/DHA ve GSH/GSSG oranları maruz kalma süresine bağlı olarak artmıştır. Çalışmanın sonucu göstermiştir ki demir toksik seviyesi altında genç *E. uniflora* bitkisi oksidatif stres oluşturmuştur. AA ve GSH antioksidantlarının içeriği ve antioksidan enzimlerin aktivitelerinin değişmesiyle daha olumlu sonuçlar alınabildiği vurgulanmıştır.

Rao and Shekhawat (2014) *Brassica juncea*'da, çinko oksit tasarlanmış nanopartiküllerin (ZnO ENP) bitki büyümesi, biyoakümülyasyon ve antioksidatif enzim aktivitesi üzerine bir çalışma yapmıştır. Tohum, topraksız şartlar altında değişen ZnO ENP farklı konsantrasyonlarında (0, 200, 500, 1000 ve 1500 mg/l) 96 saat çimlendirilmiştir. Bitki biyokütlesindeki önemli azalış; prolin içeriği, lipid peroksidasyonunun 1000 mg/l konsantrasyonuna kadar kayıt altına alınmıştır. Farklı bitki dokularındaki antioksidan enzimlerinin CAT, APX, GR ve SOD aktivite ölçümü yapılmıştır. Ayrıca ZnO ENP'lerin biyoakümülyasyonu kaydedilmiştir. Bu araştırma ile ENP'lerin bitki dokularındaki ROS ile beraber birikiminden dolayı *B. juncea* üzerinde tehlikeli olan önemli bir etkiye neden olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Hüresel olayların genetik materyaller tarafından kontrol edildiği bilinir ve bu genetik materyaller çeşitli mutajenik etkilerle bozulabilir ve bu bozukluklar onarılmadığı sürece kalıcı olabilir. Ağır metallerinde genetik materyaller üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Ağır metaller mutajenik etkisi nükleik asitlerin özel bölgelerine bağlanması ile ilgili olabilir. Pozitif yüklü metal iyonları doğrudan yada dolaylı olarak



DNA' nın yüksek elektron yoğunluklu veya negatif yüklü olarak ifade edilen bölgeleriyle etkileşime girebilirler. DNA' nın bu gibi bölgeleri negatif yüklü fosfat grupları ve azot ve oksijen gibi bazların elektron vericisi olan atomları olabilir. Metal iyonlarının nükleik asitlere bağlanması tek zincirde ya da her iki zincirde kırılmalara neden olabilir. Çift zincirdeki kırılmalar homolog rekombinasyon tarafından kısmen onarılabilir. Homolog rekombinasyonun ve nokta mutasyonların sıklığı ağır metaller tarafından oluşturulan DNA hasarının düzeyini yansıtır (Kovalchuk *et al.* 2001). Nükleik asitlerin yapısının bozulması bağlanan metal çeşidine göre değişiklik gösterebilir (Beyaztaş vd 2008). Cıvanın özellikle ökaryotlarda iğ ipliklerine ve SH gruplarına bağlanarak c-mitoz, anöploidi ve poliploidiye neden olduğu bilinmektedir (De Flora *et al.* 1994). Yine kadmiyum, bakır, kurşun ve çinkonun patates ve tütün bitkisinin yaprak çekirdeklerinde DNA hasarını ölçmek için Comet testi kullanılmıştır. Ağır metallerin DNA hasarında artışa neden olduğu ve bu artışın nekrotik ve apoptotik DNA fragmentleriyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (Gichner *et al.* 2006).

Ağır metallerin genetik toksisitesi DNA'da hasar yaparak genetik toksisiteye neden oldukları bilinmektedir (Bal *et al.* 2011). *In vivo* ve *in vitro* koşullarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar metallerin epigenomu etkilediğini göstermiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar meydana çıkarmıştır ki genetik düzenleme, epigenetik düzenleme ve ABA-bağımlı bitkisel düzenlemelerde önemli bir rol oynar. Epigenetik gen fonksiyonlarındaki değişiklikler mitotik ya da mayotik kalıtılır ve DNA dizisi içerisinde bir değişiklik oluşturmazlar (Morris 2001).

Epigenetik modifikasyonlar, genomik baskılama (Feil and Berger 2007), paramutasyon (Alleman *et al.* 2006), transposon çoğalmasına karşı savunma (Vaucheret *et al.* 2001) ve transkripsiyonel gen susmasında (Gong *et al.* 2002) önemli bir rol oynar. Ayrıca bu olayların yanı sıra genomlara yanıt verebilir ve epigenetik süreç boyunca çevreyi, ipeçlerini ve gelişmeyi düzenler (Chinnusamy *et al.* 2008). Metilasyon sonucunda gen ifadesi, ağır metallerin değişikliğe uğratılması, protein işlevleri ve RNA metabolizması etkilenir. Metilasyon biyolojik sistemlerde protein metilasyonu ve DNA metilasyonu olmak üzere iki şekilde gerçekleşir.

Arabidopsis çift fonksiyonlu DNA glikosilaz/liyaz Repressor Of Silencing-1 (ROS-1) aktivitesi DNA demetilasyonuna neden olmaktadır (Gong *et al.* 2002; Agius *et al.* 2006) ve bu yüzden epigenom esnekliğinde önemli bir rol oynar (Zhu 2008).

Arabidopsis DEMEDER (DME) ROS-1'e benzer bir proteindir ve endosperm de gen baskılama ve tohum canlılığı için gereklidir (Choi *et al.* 2002).

Protein metilasyonunda en çok histon modifikasyonları çalışılmıştır ve bu yüzden histon metilasyonu olarak tanımlanır (İzmirli *et al.* 2012). Histon asetilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon transkripsiyonu aktive ederken (Peterson and Laniel 2004; Houben *et al.* 2007; Sridhar *et al.* 2007) biyotiniylasyon ve sumaylasyon ise gen ifadesini baskılamaktadır (Camporeale *et al.* 2007). DNA ve histon modifikasyonları bir jenerasyon ya da jenerasyonlar boyunca epigenetik hafıza ile nesillere aktarılabilir (Khorasanizadeh 2004; Vaillant and Paszkowski 2007).

Yapılan bir çalışma da *Populus alba.*'nin bir ticari klonunun (*Villafranca*) çinko yüksek konsantrasyonuna toleransını araştırmak için sürgün sistemi ile bir *in vitro* model kullanılmıştır. Klorofil içeriğine (yaprak klorozu) ve sürgün çelikten kök oluşumunun oranına dayalı hasarın parametresi olarak, 0,5–4 mM çinko konsantrasyonunun farklı derecelerde de olsa tümü toksik etki yapmıştır. Çinko uygulamasına maruz bırakılmış bitkilerin sap, yaprak ve köklerde ki 1, 2 ve 3 PaMT (*Populus alba.* Metallothioneins) genlerinin ekspresyon profillerini incelemek için Northern Blot ve Revers Transkriptaz (RT) PCR kullanılmıştır. Yapraklarda MT1 ve MT3'ün mRNA seviyeleri çinko tarafından artırılırken, MT2' nin transkripti etkilenmemiştir. Araştırma sonuçlarına göre, PaMT ekspresyon profilleri organa özgü bir şekilde çinko tarafından farklı bir şekilde etkilenmiştir (Castiglione *et al.* 2007).

Lauria *et al.* (2014) mısır bitkisinde yaptığı bir çalışma da, sekiz mısır bitkisi grubu MSAP (methylation-sensitive amplified polymorphism) yöntemi ile analiz edilmiş ve bu gruplar arasında CCGG bölgelerinde bireyler arasında farklı sitozin metilasyonu bulunmuştur. İlk kendileme (SO) generasyonunda farklı metillenmiş

parçalar belirlenmiş ve yaklaşık %12 'nin en az altı generasyon boyunca mayotik olarak kalıtsal olduğu bildirilmiştir ve bu çalışma Mc metilasyonunun mayotik olarak kalıtsal olduğunu göstermiştir.

Mısırdaki soğuk stresi DNA dimetilasyonuna neden olmuştur (Steward *et al.* 2002).

Yine tütün de alüminyum, tuz ve soğuk stresinde protein benzeri gliserolfosfodiesteraz (NtGPDL) geninin demetilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Choi and Sano 2007).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kadmiyuma maruz kalan bitkilerde DNA metilasyon motiflerinde değişikliklerle sonuçlandığını açıklamıştır (Cheng *et al.* 2006).

Manganın DNA replikasyonunu ciddi oranda etkilediği bilinmektedir (Foy *et al.* 1978).

*Vicia faba* üzerinde yapılan bir çalışmada kobaltın DNA metilasyon-demetilasyonuna neden olduğu ortaya çıkmıştır (Rancelis *et al.* 2012).

Nikel, kadmiyum ve krom gibi ağır metallerin DNA demetilasyonuna neden olduğu bulunmuş ve metilasyon bölgesindeki değişiklikler MSAP yöntemi kullanılarak test edilmiştir (Aino 2004).

Biyotik ve abiyotik strese neden olan bazı çevresel nedenler epigenetik mekanizmalardan olan DNA demetilasyonu yoluyla transpozonları harekete geçirebilir. Genler içinde TE (Transpozon Elementleri) eklemeleri okuma çevresini ya da ekleme desenini değiştirerek mutant alleller oluşturabilir ve böylece zararlı olabilir fakat transpozon elementleri, gen ekspresyonunun düzenlenmesine ve çevresel strese karşı cevap oluşturmaya katkıda sağlayabilir. Stress şartları altında transpozon elementleri harekete geçerek transkripsiyon sergileyebilir. Örneğin tütünde Tnt1 gen ifadesi biyotik ve abiyotik stres ile uyarılabilir (Grandbastien *et al.* 2005). Doku kültürü ve kompleks

bir stress, pirinçte retrotranspozon ve mısırdaki DNA transpozonlarının aktive edilmesine neden olabilir (Makarevitch *et al.* 2007).

Retrotranspozonlar revers transkriptaz enzimi sayesinde RNA'nın DNA'ya çevrilerek genomun rastgele bir yerine taşınan hareketli elementlerdir. Retrotranspozonlar, bitkiler aleminde bol miktarda bulunmaktadır. Bilinen retrotranspozonların çoğunluğu bitkide normal şartlarda büyüme ve gelişme boyunca inaktif halde olup biyotik ve abiyotik şartlar altında aktif şekle geçmektedir ve böylece bitkilerde genetik çeşitlilik ortaya çıkmaktadır (Kumar and Bennetzen 1999). Retrotranspozonlara bağlı olarak ortaya çıkan polimorfizm belirlenmesinde IRAP (Inter-Retrotransposons amplified polymorphisms), REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), RIBP (Retrotransposon Based Insertional Polymorphism), ve S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism) gibi moleküler markırlar yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Kalendar *et al.* 2011).

Sharma and Nandineni (2014) patates bitkisinde yaptıkları bir çalışmada uzun terminal tekrarlı retrotranspozonların (copia ve gypsy) insersiyonel polimorfizmini araştırmak için 47 çeşit patates bitkisinde IRAP, SSR ve REMAP markırlarını kullanarak genetik çeşitliliklerini belirlemiştir. IRAP ve REMAP tekniği kullanılmış ve elde edilen DNA profilleri SSR'daki verilerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen bantlar temel koordinat analizi (PCoA) ve küme analizi kullanılarak genetik çeşitlilik belirlenmiş elde edilen sonuçlarda SSR ve REMAP markırına göre IRAP markırının daha yüksek polimorfizm gösterdiğini bildirmişlerdir.

Finatto *et al.* (2015) pirinçte yapmış olduğu bir çalışmada yüksek demir toksisitesine karşı oluşacak strese cevabı retrotranspozon ve özel genler açısından incelemiştir. Yapraklardaki strese karşı cevapları ölçmek için microarray testleri yapılmıştır. Uygulama altındaki yapraklarda yukarı ve aşağı gen düzenlemeleri görülmüştür. Strese cevap olan genlerin gen ontolojisi ve metabolik yolları analiz edilmiş ve cis-düzenleyici elementlerin (CREs) yukarı düzenleyici genlerin promotor bölgelerinde bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu genlerin çoğunluğunun bitki hormonları, ikincil metabolitlerin

biyosentezi, karbonhidrat metabolizması, yağ metabolik sürecinde aktif olduğu görülmüştür. Bu genlerin yanı sıra oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu ve demir stresine yanıt için düzenleyici mekanizmalar, katyonların taşınması ve demirin alım ve taşınımıyla ilgili genler bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma demir stresinin LTR retrotranspozonlarının çoğunun artarak düzenlemesini tetiklediği göstermiştir.

Bitkiler ağır metal stresinde hayatta kalmak için adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Kalefetoğlu and Ekmekci 2005). Bitkinin ağır metal toksisitesine karşı toleransı bitkinin türüne, bitki çeşidine, strese maruz kalma süresine, metal türüne, toprak kompozisyonuna, pH'ya, kimyasal forma, maruz kalan doku ve organa göre değişebilir. Bitkiler maruz kaldıkları stres koşullarını ya tolere etmekte ya da stres koşullarından kaçabilmektedirler. Son zamanlarda yapılan çok sayıda transkriptomik ve proteomik çalışmalar bitkide ortaya çıkan değişimlere yol açan abiyotik strese karşı cevabın oldukça karışık olduğunu ve bu mekanizmaların birbirleriyle bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (Ergen and Budak 2009). Ağır metal stresinin etkileri elementin tipine ve konsantrasyonuna tamamen bağımlı olmayıp bitki türlerinin genetik yapılarına bağlı olarak değişmektedir (Haktanır ve Arcak 1998). Bitkilerin streslere karşı moleküler düzeyde cevap mekanizmaları stres altında bazı genlerin aktive olmasına ve regülasyonuna dayanmaktadır (Bartels and Sunkar 2005). Bu genlerin oluşturdukları ürünler hücrenin iç ve dış ortamla iletişimde (signaling), genlerin transkripsiyonal olarak kontrol edilmesinde, hücre zarı ve proteinlerin korunmasında, oluşan serbest radikallerin ve toksinlerin temizlenmesinde görev yapmaktadır (Wang *et al.* 2003). Bitkilerde strese karşı toleransı artırmada ya da stresin etkilerini azaltmada bazı protein grupları strese tolerans ve uyum sağlama süreçlerinde önemli rol oynayabilirler. Ağır metal stresi bitkilerde, metal bağlayıcı ligandlar ile şelatlama, antioksidant savunma sistemi ve şaperonlar gibi birkaç savunma mekanizmasını teşvik etmektedir. Bitkiler metallerle kirletilmiş topraklarda yaşamak için bazı stratejiler geliştirmiştir bunlar; metal indikatörler, metal dışlayıcılar ve toplayıcılar olarak sıralanabilir (Baker and Walker 1990). Ağır metal stresi sonucu bitkilerde moleküler cevap mekanizmaları oluşur. Bunlar makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi,

koruyucu moleküllerin sentezi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve detoksifikasyon olmak üzere üç grupta toplanabilir (Büyük vd 2012).

Bitkilerin stres altında oluşturduğu cevap mekanizmalarından birisinin de RNA kaynaklı mekanizma olan RNAi mekanizmasıdır. Kodlanmayan düzenleyici siRNA'lar yaklaşık 20-24 bp uzunluğundadır, miRNA veya siRNA olarak adlandırılırlar ve bitki gelişimi ve stres metabolizmasında önemli rol oynarlar (Jones-Rhoades *et al.* 2006; Sunkar *et al.* 2007). Biyotik ve abiyotik strese maruz kalan bitkilerde ortaya çıkan miRNA'lar bitki stres cevap mekanizmasında transkripsiyon sonrası (post-transcription) düzenleyicilerdir. Bu düzenleyiciler ile hedef gen ifadesi engellenmektedir. Arabidopsis, mısır, çeltik ve buğday bitkilerinde farklı stres koşullarında miRNA ve siRNA'ların (küçük inhibe edici RNA'lar) görev aldığı görülmüştür. Değişik bitki çeşitlerinde ise neredeyse aynı miRNA'ların görev aldığı bulunmuştur (Eldem *et al.* 2013). Bazı ABA-bağlantılı siRNA'lar ve RNA-bağımlı RNA polimerazlar abiyotik strese cevabın epigenetik düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Chinnusamy *et al.* 2008).

Ağır metale maruz kalma ve miRNA ifadesi arasında bağlantıyı araştırmak için çeşitli bitki türlerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Cheng *et al.* 2006).

Örneğin bir baklagil bitkisi olan ve topraktaki ağır metallere dirençli olan *Medicago truncatula* bitkisi 80 mM kadmiyuma maruz bırakılmış ve yukarı regülasyon (up-regulation) miR-393, miR-171, miR-319 and miR-529 ve aşağı regülasyon (down-regulation) miR-166 and miR-398 gibi 6 miRNA ifade edilmiştir (Zhou *et al.* 2008).

Yine metal stresinde miRNA'nın rolünü araştırmak için farklı türde ki bitkiler (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum* ve *Phaseolus vulgaris*) kullanılarak çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu amaçla bitkiler esansiyel elementler (Bakır, demir, çinko ve mangan) ve esansiyel olmayan elementlere (kadmiyum, civa, alüminyum ve arsenik) maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak mangan ağır metalinin Pv miR319, Pv miR169, Pv miR170 up (yukarı)

regülasyonuna ve Pv miR397'nin down (alt) regülasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Yine çinkonun At-miR398a down (alt) regülasyonuna ve At miR398h/c'nin up (yukarı) regülasyonuna ve demirin ise At miR398'in down (alt) regülasyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir (Sunkar *et al.* 2006; Huang *et al.* 2010; Cuypers *et al.* 2011).

Bitki hormonlarından olan absisik asitin (ABA) stres altında arttığı ve bitkiye direnç sağladığı bilinmektedir (Zengin ve Munzuroğlu 2005). Absisik asitin bitkide sinyal iletim yollarını düzenlediği ve çoklu reseptör olduğu [FCA (Flowering Time Control Protein A)] (Razem *et al.* 2006), ABA-R (ABA Reseptörü) (Shen *et al.* 2006), GCR2 (G Protein- Coupled Receptor) (Liu *et al.* 2007)] bilinmektedir. Bakır ve nikel gibi ağır metallerinin ABA seviyesini artırdığı belirlenmiştir (Monni *et al.* 2001). Yine başka bir çalışmada koabl, nikel ve çinko ağır metallerinin varlığında fasülye bitkilerinde absisik asit birikimi görülmüştür (Rauser and Dumbroff 1981). Ağır metaller toprak ve suyun kalitesini bozarak oluşturdukları ağır metal stresi sonucu bitkide su stresine yol açabilirler. Absisik asitin fizyolojik olarak en büyük görevi su stresinde bitkinin stomalarının kapatmasını uyarmaktadır. Bu yolla yapraklarda CO<sub>2</sub> konsantrasyonu düşecek ve fotosentez hızı azalacaktır. ATP'ye duyulan ihtiyaç azalacak ve bitkide enerji fazlası ortaya çıkacaktır (Zengin and Kirbag 2007). Bakır ve nikel kirliliğine maruz kalan bitkilerde absisik asit miktarının arttığı gözlemlenmiştir (Monni *et al.* 2001).

Birçok araştırmaya konu olan humik asit toprakta organik maddelerin çoğunluğunu sağlayan humusun en aktif maddesidir. Humik maddeler yeryüzünde en bol bulunan organik moleküller olarak tanınmasıyla birlikte (Simpson *et al.* 2002) toprakta besin kontrolünü, toprak ve atmosfer arasında oksijen ve karbon alışverişini, toksik kimyasalların taşınması ve dönüşümü gibi bitki fonksiyonlarını ve toprak çeşitliliğini sağlamakta önemli bir rol oynadığı ifade edilmiştir (Piccolo and Spiteller 2003).

Humik maddeler, humik asit, fulvik asit ve huminler olarak sınıflandırılmıştır. Humik asit alkali topraklardan ekstrakte edilirken asidik ortam içinde çöker. Fulvik asit hem alkali hem de asidik toprak içinde çözülür. Huminlerin ise topraktan ekstrakte

edilmediği bildirilmiştir (Stevenson 1994; Berbara and Garcıa 2014). Humik asit bu grup içerisinde en buyk moleküler ağırlığa sahiptir (Nardi *et al.* 2009) ve yapılarında bulunan horman benzeri maddelerden dolayı bitkinin büyüme ve gelişmesine olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Demir ve imrin 2011). Humik maddeler toprağın pH özelliğine göre katyonlarla metal kompleksler oluşturarak bitki besin elementlerini alınamaz formlara dönüştürür. Bunun sebebi humik asitin üzerinde bulunan fonksiyonel gruplardır (Stevenson 1994). Böylece humik asit ağır metallerin bitki bünyesine girişini minimum düzeye indirgeyebilir (Pujola *et al.* 1992). Humik maddelerin orta düzeyde uygulandıkları zaman lipit peroksidasyonuna neden olmadığı bunun aksine humik maddeler yüksek oranda uygulandığı zaman lipit peroksidasyonuna yol açarak bitki büyüme gelişmesinde negatif etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Berbara and Garcıa 2014).

Patlıcanda yapılan bir çalışmaya göre ağır metal içeriği yüksek su ile sulanan bitkilere humik asit uygulaması yapılmış ve bitkinin ağır metal stresine karşı gösterdiği büyüme ve gelişme üzerindeki olumsuz etkisinin humik asit uygulamasıyla azaldığı bildirilmiştir (Kıran *et al.* 2014).

Zhang *et al.* (2014) arsenik toksisitesi üzerine humik asitin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Humik asitin koruyucu etkisinin arsenik konsantrasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Humik asitin organizmanın büyümesi üzerine pozitif etkide bulunmasının yanı sıra ortamdan arsenik alımı ve ROS üretimini etkileyerek toksik etkisini azalttığı belirtilmiştir.

Yine Sergiev *et al.* (2013) yapmış oldukları bir çalışmada triticale bitkisi üzerinde ağır metallerin toksik etkisinin ve bu etki üzerine biomin (humik asit)'nin etkisini araştırmışlardır. Ağır metal stresi biyometrik parametreler, bazı stress belirteçleri ve enzim aktiviteleri yaprak ve köklerde araştırılmıştır. Bütün ağır metal uygulamaları bitki byktlesini ve büyümesini yavaşlatmıştır. Ağır metaller süperoksit dismutaz, glutasyon S transferaz, guaiakol peroksidaz ve malondialdehit ve prolin gibi stress belirteçlerinde artışa neden olmuştur. Biomin (humik asit) uygulamasından sonra karşıt



bir eğilim gözlemlenmiştir. Parametrelerin ölçümünden sonra ağır metal stresine karşı biominlerin koruyucu etkisi olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada mısır bitkisi üzerinde uygulanan kobalt, demir, çinko, mangan ile oluşturulan ağır metal stresinin meydana getirdiği genetik ve epigenetik değişiklikler üzerine humik asitin etkisinin REMAP ve IRAP yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Mısır

Mısır bitkisi çok yönlü kullanım alanıyla son yıllarda dünyanın en önemli dane ürünlerinden biri haline gelmiştir. Son yıllarda modern dünyanın vazgeçilmez gıda bitkisi olan mısır çok yönlü kullanım alanıyla en önemli tane ürünü haline gelmiştir (Özcan 2009). Ülkemizde tarım sektörünün önemli bir yeri vardır, çalışan nüfusun kaydadeğer bir kısmı tarımsal alanda çalışmaktadır. En yüksek enerji stoğuna sahip olan mısırın birim alan verimi yeni teknikler kullanılarak geliştirilmiştir (Şahin 2001).

Danesinin genel yapısı ve bileşiminde bulunan temel maddelerden dolayı oldukça besleyici olan mısır çok fazla kullanım alanına sahip olup ekonomik değeri yüksektir (Özcan 2009). Yüksek tane ve yeşil aksam veriminden dolayı mısırın hem insan hem de hayvan beslenmesinin vazgeçilmez bir parçası olmasının yanı sıra biyo-yakıt olarakta son zamanlarda dikkatleri üstüne çekmiştir. Tahmini olarak dünya mısır üretiminin %60'ı hayvan yemi, %20'si insan gıdası, %10'u işlenmiş gıda ve %10'u diğer tüketimler ile tohumluk olarak ayrılmaktadır. Mısır taze olarak tüketim, konserve, mısır unu, nişasta, cips, çerez, tatlandırıcı, şekerleme, çikolata ürünleri, bebek mamaları, salata sosları gibi ürünlerde insan gıdası olarak geniş ölçüde kullanılır. İnsan gıdası olmasının yanı sıra özellikle gelişmiş ülkelerde hayvan yemi ve sanayi hammaddesi olarak da yaygın kullanım alanına sahiptir (Özcan 2009).

Mısır dünyada tahıllar arasında ekiliş alanı yönünden üçüncü, üretimde ise birinci sırada olan bir tahıldır (FAO 2015). Dünya mısır üretimi 2015 yılında 18 419 253 ha alanda 1 016 736 092 tona ulaşmıştır (TEPGE 2015). Türkiye'nin mısır üretimi 2015 yılında 660 000 ha alanda 5,9 milyon tona ulaşmıştır (FAO 2015). Mısır üretimindeki artışın nedeni verim üzerindeki artış olarak gösterilebilir. Geleneksel mısır üretim bölgesi olan Akdeniz'de (2 096 108 ton) mısır üretiminin yaklaşık yarısı yapılmaktadır. Bölgede mısır üretimi özellikle Adana (1 005 651 ton) ve Mersin (235 639 ton) başta olmak

üzere Doğu Akdeniz’de yoğunlaşmaktadır. Adana’yı 581 560 ton ile Şanlıurfa, 569 153 ton ile Mardin, 382 099 ton ile Konya, 364 339 ton ile Manisa ve 360 346 ton ile Osmaniye takip etmektedir (TÜİK 2015).

Mısır bitkisi, *Poaceae* familyasında *Ponicoideae* alt familyasında *Andropogoneae* takımına aittir (OECD 2003; USDA 2005). *Andropogoneae* takımıyla birlikte 86 cinsi vardır. (USDA 2005) Mısır bitkisi *Zea diploperennis* (2n=20), *Zea luxurians* (2n=20), *Zea mays* L. (2n=20), *Zea nicaraguensis* (2n=?) ve *Zea perennis* (2n=40) olmak üzere beş tür içerir. *Zea* türlerinin büyük çoğunluğu *Z. Perennis* hariç 2n=20 kromozom sayısına sahiptir (Çizelge 2.1) (Tito *et al.* 1991; Ellneskog-Staam *et al.* 2007). *Zea mays* ssp. *mays* ekilen türdür diğer türler ve alt türler yabancı türlerdir ve teosinteler olarak adlandırılır. Mısır bitkisi temel A kromozomlarının yanında mayozda A kromozomu ile eşleşmeyen B kromozomlarına da sahiptir (Jones *et al.* 2008).

**Çizelge 2.1.** Mısır türleri ve alt türleri (USDA 2005)

| Türler   | Kromozom sayıları | Alt türler   | Benzerleri   |
|--|-------------------|--|--|
| <i>Zea diploperennis</i> HH Iltis <i>et al.</i> (1980) | 2n=20             | -  | -  |
| <i>Zea luxurians</i> (Durieu and Asch.) RM bird        | 2n=20             | -  | <i>Euchlaena luxurians</i> durieu and asch.<br><i>Zea mays</i> spp. <i>Luxurians</i> (Durieu and Asch.) HH Iltis |
| <i>Zea mays</i> L.                                     | 2n=20             | <i>Zea mays</i> ssp. <i>huehuetenangensis</i> Doebley (HH Iltis and doebley) |  |

Çizelge 2.1. (devam)

|  |       |   |  |
|--|-------|---|--|
|  |       | <i>Zea mays</i> spp. <i>mays</i>                                    | <i>Zea curagua</i> Molina<br><i>Zea indentata</i> Sturtev<br><i>Zea indurata</i> sturtev<br><i>Zea japonica</i> Van Houtte<br><i>Zea mays</i> cv <i>alba</i> Alef.<br><i>Zea mays</i> cv <i>leucodon</i> Alef.<br><i>Zea mays</i> var <i>flavorubra</i><br><i>Zea mays</i> var <i>indentata</i><br>(sturtev.) LH Bailey<br><i>Zea mays</i> var <i>indurata</i><br>(Sturtev.) LH Bailey<br><i>Zea mays</i> var <i>japonica</i> (Van<br>Houtte) Alph. Wood<br><i>Zea mays</i> var <i>saccharata</i><br>(Sturtev.) LH Bailey<br><i>Zea mays</i> var <i>tunicata</i><br>Larranaga ex A.St.-Hil.<br><i>Zea mays</i> var <i>vulgate</i> Koem.<br>And H werner<br><i>Zea saccharata</i> sturtev |
|  |       | <i>Zea mays</i> ssp <i>maexicana</i><br>(schrad) HH Iltis           | <i>Euchlaena mexicana</i> Schrad<br><i>Zea mexicana</i> (Schrad.)<br>Kunize  |
|  |       | <i>Zea mays</i> spp.<br><i>Parviglunnis</i> HH Iltis and<br>doebley | <i>Zea mays</i> var <i>parviglunnis</i>  |
| <b><i>Zea micaraguensis</i> HH<br/>Iltis and BF Benz</b>       | 2n=?  | -   | -  |
| <b><i>Zea perennis</i> (Hitchhc.)<br/>Reeves and Mangelsd.</b> | 2n=40 | -   | <i>Euchlaena perennis</i> Hitcho.  |

Mısır 2,3-2,7 bp arasında değişen büyük bir genoma sahiptir (Arumuganathan and Earle 1991) gen sayısı ise 42,000 ve 56,000 arasındadır. Mısır genomunda transpozon ve retrotranspozonları da içine alan tekrarlı dizilerin yüzdesi oldukça fazladır (Hake and Walbot 1980). Bu güne kadar en iyi tanımlanan transpozon aktivatör (Ac) ve ayrışma (Ds) elementleridir ve ilk olarak Barbara McClintock tarafından belirlenmiştir (Fedoroff 2000). Mısır aynı zamanda genotoksik ve genetik çalışmalarda kullanılan model bir organizmadır.

Mısırın orijini Mezoamerika bölgesidir ve muhtemelen Meksika'nın dağlık bölgelerinden hızla yayılmıştır. En eski mısır bitkisine ait arkeolojik çalışmalar ve filogenetik çalışmalara göre 6000 yıl önce kültürü yapılmaya başlanmıştır (Piperno and Flannery 2001). Mısır 15. yy'da Amerikanın keşfinden sonra dünyaya ve özellikle Avrupa'ya yayılmıştır (Paliwal *et al.* 2000; Farnham *et al.* 2003).

Mısır 40° güney (Şili) enlem ile 58° kuzey enlemi (Kanada ve Rusya) arasında kalan bölgeler de yetiştirilebilmektedir. Genellikle tropikal mısırlar 30° güney enlemde ve 30° kuzey enlemde, subtropikal mısırlar hem kuzey enlemde hem de güney enlemde 30°-34° arasında, ılıman mısırlar ise 34° kuzey ve güney enlemlerinin yukarısında yetiştirilebilmektedir (Farnham *et al.* 2003).

Mısır bitkisi tropical şartlar altında yetiştirilir ve C4 bitkisi olduğu için C3 bitkilerinden daha etkili olarak karbondioksiti kullanır (Esau 1977). Sıcak iklimlerde yetişen mısırın son zamanlarda kullanım alanlarının artmasına bağlı olarak önemi günden güne artmaktadır. İlk başlarda sadece insan ve hayvan beslenmesi için kullanılan mısır tanesi, kompozisyonunda taşıdığı besin maddeleriyle nişasta bazlı şeker sanayisinde, bitkisel yağ sanayisinde ve biyoyakıt üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır (Koca *et al.* 2010). Artan mısır kullanım alanlarının sebeplerinden bazıları da mısır bitkisinin yetiştiriciliğinin kolay olması, C4 bitkisi olması ve su kullanım etkinliğinin fazla olmasıdır (Esau 1977).

## 2.2. Stres

Çevre şartlarının bir bitkinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde bitkide meydana gelen duruma stres denir. Bitkiler doğaları gereği yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek birçok stres faktörü ile karşılaşılırlar. Stres faktörleri bitkilerin yaşam döngülerinin belirli bir anında ortaya çıkıp bitki büyüme ve gelişmesini engellerler. Bu etkenler bitkide gelişmeyi olumsuz etkilerken aynı zamanda bitkide ürün kalitesinde önemli ölçüde etkilemektedir. Her bitkinin ağır metal stresine verdiği yanıt bitkinin genetik yapısına

bağlı olmaktadır. Bitkiler bu olumsuz koşullardan ya kaçabilirler ya da bu koşullara uyum sağlayabilirler. Levitt'e göre bu etmenler biyotik ve abiyotik olarak adlandırılmaktadır (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** Biyotik ve Abiyotik stres faktörleri (Levitt 1980)

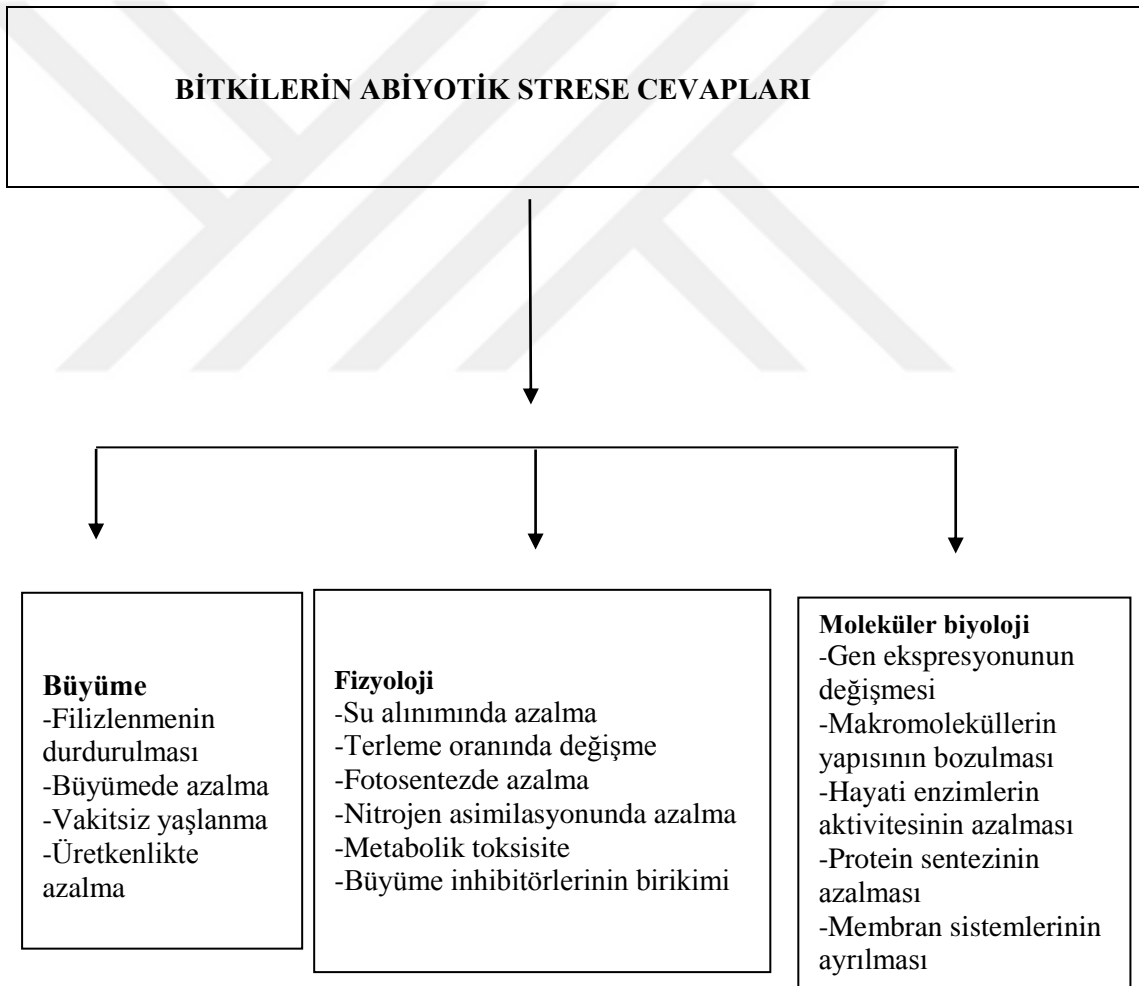
| ABİYOTİK FAKTÖRLER                |                         | BİYOTİK FAKTÖRLER               |
|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| FİZİKSEL                          | KİMYASAL                |                                 |
| Su                                | Hava Kirliliği          | Hastalık Etmenleri (Patojenler) |
| Tuzluluk                          | Tuzlar                  | Yabani Bitkiler                 |
| Sıcaklık                          | Pestisitler             | Böcekler                        |
| Işık                              | Toksinler               | Mikroorganizmalar               |
| Bitki Besin Maddeleri             | Bitki Besin Elementleri | Hayvanlar                       |
| Radyasyon                         | Toprak pH'sı            |                                 |
| Mekanik Etkiler (Kar, Buz Örtüsü) |                         |                                 |

Dünyamızda nüfus yoğunluğunun giderek artması ve ekilebilir alanların hızla azalması, bitkilerin stres faktörleri nedeniyle oluşan ürün kayıplarının önüne geçilmesini zorunlu hale getirmiştir.

### 2.2.1. Abiyotik stres

Bitkiler sesil yaşamları gereği hiçbir stres faktöründen kaçamazlar ve bitkiler hiçbir koruma olmaksızın farklı abiyotik stres faktörlerine sürekli maruz kalırlar. Bitkiler bu farklı abiyotik stres faktörleriyle başa çıkmak için benzersiz moleküler mekanizmalar geliştirmişlerdir. Fakat bitkiler arasında da tolerans mekanizmaları farklılıklar gösterir. Bazı bitkilerin morfolojik özellikleri onların bir takım stres faktörlerini önlemesini sağlar. Bitkiler stres etkileri ile başa çıkmak için fizyolojilerini, gen ifadelerini, metabolik mekanizmalarını ve gelişme aktivitelerini değiştirirler. Bu bitkiler daha toleranslı, koruyucu, dayanıklı ve diğerlerinden farklı olarak hayatta kalabilmek için aklimasyon mekanizmalarına sahiptirler. Gen ürünleri bitkilerde strese toleransın moleküler mekanizmalarında anahtar rol oynar. Kuraklık, tuzluluk, yüksek ya da düşük

sıcaklık, ışık, besin elementlerinin eksikliği ya da fazlalığı, ağır metal ve kirlilik gibi faktörler ya tek başına ya da kombine biçimde abiyotik strese neden olurlar. Strese neden olan abiyotik faktörler bitki metabolizması üzerinde büyüme, gelişme ve koruma gibi olaylarda negatif etkiye sahiptirler (Şekil 2.1). Eğer stres uzun süre devam ederse ve artarsa bitki büyümesinin azalmasına ve hücrelerde dayanılmaz negative etkisi metabolik ürünlerin artmasına neden olur ve bu durum bitki ölümleriyle sonuçlanır. Yeni moleküller ve moleküler mekanizmaların oluşumu ile strese toleranslı hale gelmek için bitkiler evrim sürecinde birçok mekanizma geliştirmişlerdir.



**Şekil 2.1.** Bitkilerin abiyotik strese verdiği cevaplar (Büyük vd 2012)

Abiyotik stres faktörlerinin çoğunun en yaygın hedefi membran sistemleridir ki bu sistemler normal şartlar altında birçok yaşam olayını (organellerin ve hücrelerin sınırlarının belirlenmesi, elektron taşıma, sinyal algılama, ATP üretilmesi, çözünen maddeleri taşıma, iyon pompalama, iyon kanalları, taşıyıcı proteinler, elektriksel uyarılma) gerçekleştirir. Bu yüzden tüm membran işlemleri abiyotik stresten etkilenir. ROS aerobik yaşam ile ilişkilendirilir. Abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde ROS üretimini hızlandırdığı bilinir. ROS'larda membran ve diğer hücresel işlemlerde hasara neden olur (Dat *et al.* 2000; Mittler 2002; Mittler *et al.* 2004). Antioksidatif sistemler hem enzim hem de enzim olmayan yapıdadırlar ve oksidatif hasarın önlenmesinde ve dengelenmesinde önemli bir rol oynarlar (Bowler *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1994). Stres tolerans mekanizması stresi algılama ile başlar ve ardında gen ürünleri oluşur, oluşan bu gen ürünleri hücrelerin korunmasında ve onarılmasında rol oynar (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Bitkilerde stres tolerans yolu

### 2.3. Ağır Metal Stresi

Son yıllarda endüstrileşmenin artmasıyla sanayi atıklarının çevrede birikmesi toprakta ağır metallerin birikmesinide artırmıştır. Demir, bakır, çinko, kobalt ve nikel toprakta

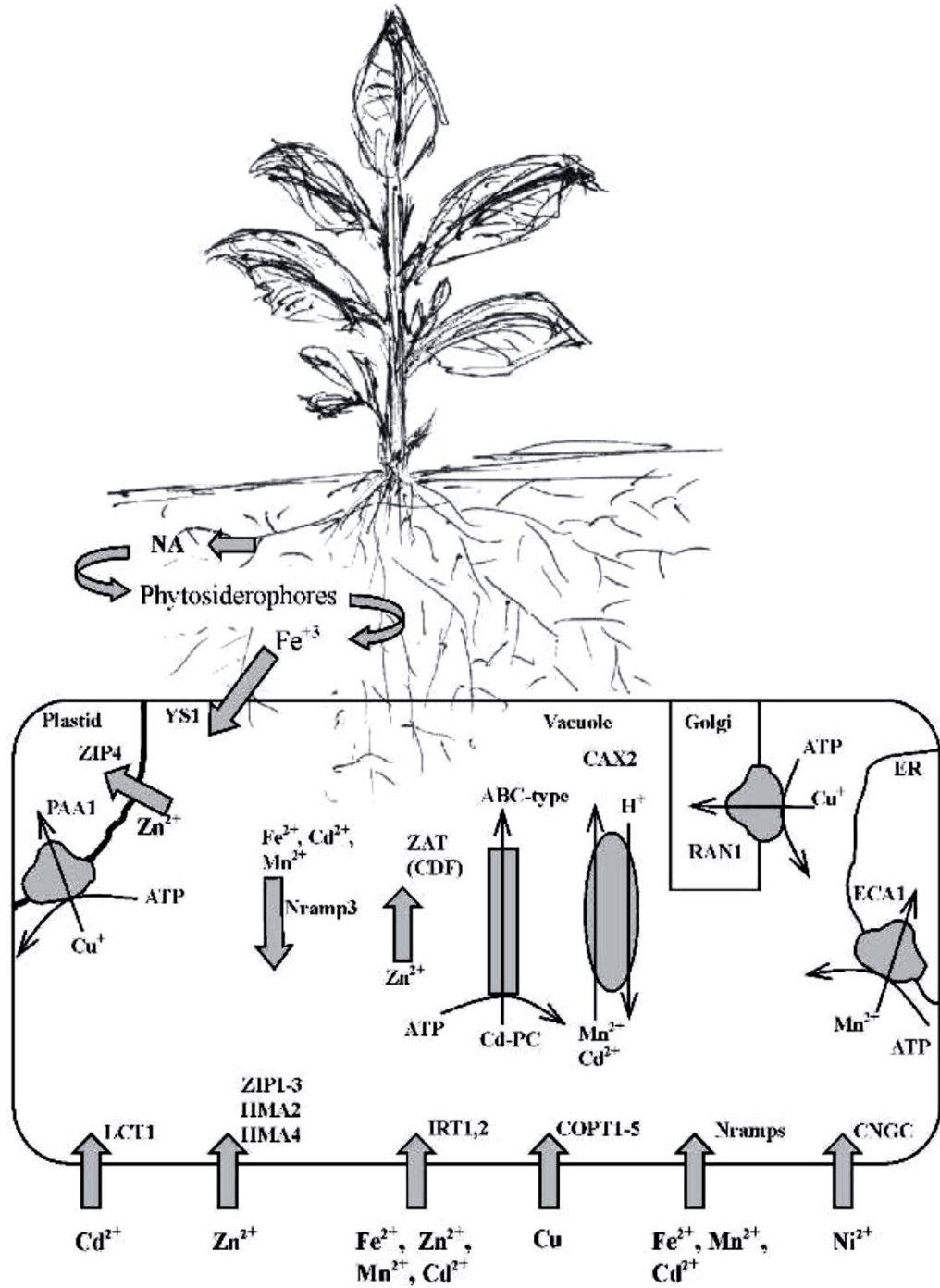


düşük dozda bulduklarında esansiyel mikroelementlerdir ve bitki gelişmesi için önemlidirler. Fazla miktarda bulduklarında ise bitkide toksik etki yaparlar. Kadmiyum, kurşun, civa ve diğer elementler ise esansiyel değildirler ve bitkiler için yüksek derecede toksiktirler. Bu elementler toprakta bulunduğu geniş alanda zararlı olabilirler ve ayrıca bitkileri etkileyerek gıda zincirinde ise hayvan ve insanları olumsuz şekilde etkileyebilirler. Abiyotik stres faktörleri bitkilerde ortalama %50'den fazla verim kaybına neden olurken, dünyadaki tarımsal ürün kaybında temel nedenlerindedir (Bray *et al.* 2000; Wang *et al.* 2003). Ağır metaller, adsorpsiyon ve iyon değişimi ile toprakta birikerek toprağın elverişliliği üzerine negatif etki oluşturmaktadır (Algan ve Bilen 2005). Ağır metaller bitki bünyesine alındıktan sonra kolay kolay yok edilemez ve bitki bünyesinde birikir, böylece bitkide kök ve sürgün gelişiminde gerileme, çimlenme oranının düşmesi gibi olumsuzluklar görülmektedir (Munzuroglu and Geckil 2002; Ergen and Budak 2009). Bitkiler hücresel düzeyde geniş bir potansiyel mekanizma alanına sahiptirler, bu alana detoksifikasyonda dahildir ve böylece ağır metal stresine toleranslıdırlar. Ağır metaller yüksek derecede reaktiftirler, bunun sonucunda da çoğu organda toksisite oluşturmaktadırlar. Redoks reaktif metallerinin artan dozlarına maruz kalan bitkilerde antioksidan enzimlerin artması yerine azaldığı görülmüştür (Schützendübel and Polle 2002). Bitkiler üzerine ağır metallerin toksik etkisi şöyle sıralanabilir;

- a) Fenton reaksiyonu ve otooksidasyon tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimidir ki bu da demir ve bakır gibi geçiş elementleri için normaldir,
- b) Biyomoleküllerin temel fonksiyonel gruplarının bloke edilmesi, biyomoleküllerle esansiyel metallerin yer değiştirmesi (Schützendübel and Polle 2002).

Topraktaki ağır metallerin taşınımını sağlayan protein yapısında metal taşıyıcılar vardır. Metal taşıyıcı gen ailelerinin (çinko ile düzenlenmiş taşıyıcı (ZRT), protein benzeri demir-düzenlenmiş taşıyıcı (IRT), taşıyıcı (ZIP) ve kation difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) yüksek kararlı haldeki transkript seviyeleri arasındaki ilişkileri metallerin ortamda fazla miktarda birikiminde (Pence *et al.* 2000; Lombi *et al.* 2002) yada metala toleransında (Van Der Zaal *et al.* 1999; Assunção *et al.* 2001; Persans *et al.* 2001)

gözlemlenmiştir. Bakterilerde, insanlarda ve bitkilerde benzer olarak bulunan ağır metal ATPaz'lar bütün ağır metalleri pompalarlar (Palmgren and Axelsen 1998). P tipi ATPaz'lar bir membran boyunca metal iyonlarının taşınımını sağlar. Hem pirinçte hem de Arabidopsis'de bu P tipi ATPaz'ların beş ailesi mevcuttur. Bunlar ağır metal ATPaz (P1B),  $Ca^{2+}$ -ATPaz,  $H^+$ -ATPaz, aminofosfolipid ATPaz (ALA, P4) ve bilinmeyen bir grup olan (P<sub>5</sub>) dir. Metal taşıyıcı ZIP gen ailesi üyelerine kadmiyum, demir, manganez, çinko gibi çeşitli kation taşıyıcıları dahildir. Arabidopsis'de IRP1 geni ilk izole edilen genler arasındadır ve topraktan yüksek afiniteli demir alımında en önemli taşıyıcıdır (Eide *et al.* 1996). Nikotinamin (NA) bitkilerde her zaman mevcut olan bir metal şelatlayıcıdır. Otsu bitkiler de, NA fitosidereför'un bir biyosentetik ön maddesidir. Mısırdaki  $Fe^{+3}$  fitosidereför (Yellow Stripe) YS1 taşıyıcıları tarafından köklerden alınır. Ağır metal homeostazisinde YS1 taşıyıcıları önemli rol oynamaktadır. Bir başka taşıyıcı protein ailesi ise Nramp (natural resistance-associated macrophage proteins) genleridir ve bakteri, mantar, insan ve hayvan gibi organizmalarda metal iyonlarının (kadmiyum, demir, mangan) taşınımını sağlarlar (Hall and Williams 2003). Bitkilerin metal alımında çeşitli yöntemler geliştirdikleri ve her bir metal alımı için çeşitli mekanizmalara sahip oldukları bildirilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Bitkilerde varsayılan metal taşıyıcılar (Hall and Williams 2003)

Bazı bitkiler stres koşullarına doğuştan toleranslıdır ve stres koşullarında hayatta kalabilirler. Fakat bazı stres toleransı düşük bitkilerin (*Arabidopsis thaliana*) ise stres koşulları altında strese cevap olarak fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevaplar verdikleri araştırılmıştır (Boscaiu *et al.* 2008). Çalışmalar sonucunda elde edilen

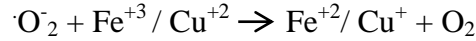
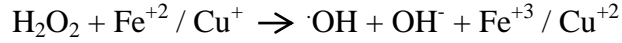
bilgilere göre bitkilerin stres koşullarına oluşturdukları moleküler cevaplar; makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi, koruyucu moleküllerin sentezi, reaktif oksijen türleri ve detoksifikasyon olmak üzere üç grupta toplanmaktadır. Abiyotik çevresel stres faktörlerinin çoğu bitkilerde hücrel dehidrasyona yol açmakta ve homeostoziyi (iç denge) bozmaktadır. Stres koşulları altında bitkilerde belirli H-ATPazlar ve H-pyrofosfatazlar yoluyla iyonların iletimine bağlı olarak homeostaz sağlanır (Hasegawa *et al.* 2000). Stres faktörleri altında bitkinin oluşturduğu cevaplardan diğeri ise ozmolitler (şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler), ısı şoku proteinleri (Heatshock) ve LEA proteinleri (geç embriyogenez bağımlı proteinler) gibi özel proteinlere dayanmaktadır. Ozmolitler, stres altında oluşan ROS'ların temizlenmesinde kullanılır (Smirnoff and Cumbes 1989). Isı şoku proteinleri ise stres koşullarında sentezlenen moleküler şaperon gibi görev yapan yani proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesi sürecinde yer alan proteinlerdir (Henle *et al.* 1998). LEA proteinlerinin de bitkilerde strese karşı koruyucu mekanizmalar arasında yer aldığı bilinmektedir. Stres varlığında LEA genlerinden ifade edilen hidrofilik LEA proteinleri suyu bağlayabilme yeteneklerinden dolayı su eksikliği etkilerini azaltırlar hücrel bütünlüğün sağlanmasında görev alırlar (Sairam and Tyagi 2004).

Strese karşı en önemli moleküler savunma cevaplarından biri ise ROS'lardır. Ağır metal kaynaklı  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  gibi reaktif oksijen türleri (ROS)'lar genellikle stres şartları altında oluşur ve güçlü oksitleyici etkileri olup biyomoleküllerin bütün tiplerini etkileyebilirler (Mithöfer *et al.* 2004). Aslında bu oksijen türleri  $H_2O_2$ 'nin  $O_2$ 'ye sırayla indirgenmesi boyunca ortaya çıkan ara maddeleri temsil etmektedirler. Bazı ağır metal iyonlarına maruz kalan bitkiler  $H_2O_2$  'nin birikimiyle serbest radikallerin dengesini değiştirirler.  $Cu^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  redoks aktive edici geçiş metallerinin varlığında  $H_2O_2$ 'yi Fenton reaksiyonu yoluyla bir metal katalize edilmiş reaksiyonda yüksek reaktif  $OH$ 'a dönüştürebilir ve oksitlenmiş metal iyonları daha sonra süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ) ile yeniden bir indirgenme reaksiyonuna girebilir.  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'den doğrudan  $OH$  oluşumunda alternatif bir mekanizma olan metal bağımsız Haber-Weiss mekanizmasıdır (Çizelge 2.3).

**Çizelge 2.3.** Hidroksil radikallerini içeren kimyasal reaksiyonlar (Mithöfer et al. 2004).

---

Fenton reaction:

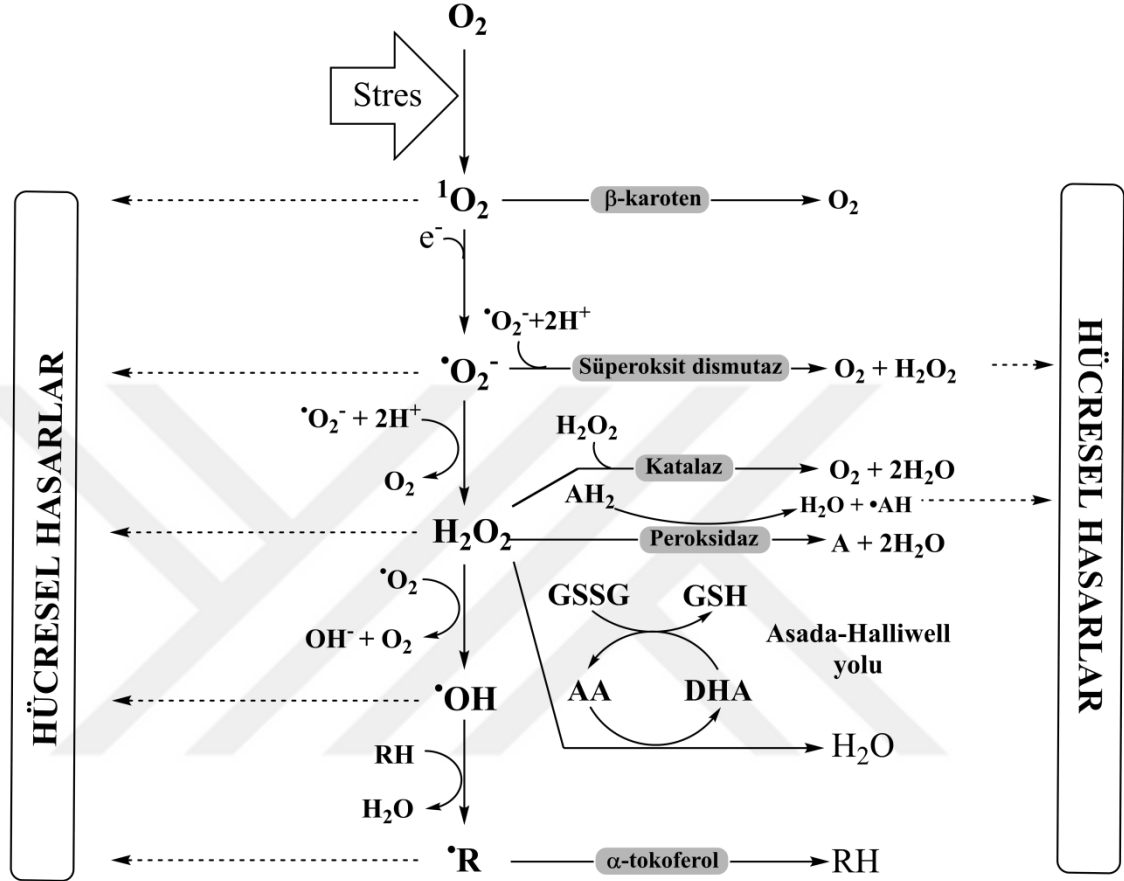


Haber-Weiss reaksiyonu;



$\cdot\text{OH}$  molekülü en reaktif tür olarak bilinir. Hidroksil radikalının radikal zincir reaksiyonlarını başlatma yeteneği vardır ve bu nedenle çeşitli hücrel bileşenlerin geri dönüşümsüz kimyasal değişikliklerinden sorumlu tutulurlar. Diğer ROS'lar lipid peroksidasyonunu etkileyebilirler. Hidroperoksil radikal ( $\text{O}_2\text{H}$ ),  $\cdot\text{O}_2^-$ 'nin protonlanmış formudur ve kararlılık gösterir.  $\text{Hg}^{+2}$  geçiş metallerine ait olmadığı için Fenton reaksiyonlarında  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^+$  yerini alamaz. Bu da farklı bir mekanizma olarak adlandırılır ve ROS'ların birikmesine yol açar.  $\text{Hg}^{+2}$  iyonları bir antioksidant enzim olan glutatyon redüktazın aktivitesini inhibe eder ve aynı zamanda GSH'nin geçici olarak tükenmesini artırır. Bu da ROS'ların doğal birikimi ile sonuçlanır. Oksidatif stres altında bitkiler hayatta kalabilmek ve stresle başa çıkabilmek için ROS'ların temizlenmesinde görev alan çeşitli antioksidanlara sahiptirler (Aydın *et al.* 2012). Antioksidanlar (Vitamin E, Askorbik Asit, Glutatyon, flavanoidler, taninler, hidroksisinamat esterleri ve lignin) ve antioksidan enzimler (Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Fosfolipit hidroperoksit GPX ve peroksidazlar, aldehit dehidrojenaz, GST, fosfolipit-hidroperoksit GPX, askorbat peroksidaz, NADPH-bağımlı quinon oksiredüktaz ve aldoketoredüktaz) ile uzaklaştırılabilir (Çaylak 2011).

**Çizelge 2.4.** ROS'lara karşı (enzim ve antioksidant) savunma sistemi (Gaspar *et al.* 2002).



## 2.4. Humik Asit

Hümik maddeler (HM) toprak ve yüzey suları gibi ortamlarda bulunan ve bitkilerin bozunması sonucu ortaya çıkan makromoleküler bileşiklerdir. Humik maddelerin içeriği humik asit, fulvik asit ve huminlerden oluşur (Wang *et al.* 2011). Ticari bir ürün olan humik asit çok sayıda mineral maddenin yanı sıra %44-58 karbon (C), %42-46 oksijen (O), %6-8 hidrojen (H) ve %0,5-4 nitrojen (N) içerir (Larcher 2003). Humik asit mineral maddelerin yararlı formlara dönüşmesini sağlayarak besin elementlerinin bitkiler tarafından kullanılabilirliğini artırır (Büyükkeskin *et al.* 2015). Humik maddeler genellikle iz mineralleri yüksek oranda içerir ve bitki büyümesi üzerine horman benzeri etkiler gösterirler (Chen and Aviad 1990). Humik asit oksin ve sitokinin benzeri etkiler içerir (Zhang and Ervin 2004). Hücrelerde çeşitli metabolik işlemlerde kullanılan humik

asidin bazı bileşenleri doğrudan bitki vasküler sistemine taşınabilir ve absorbe edilebilir (Büyükkökin *et al.* 2015). Toprakta besin elementlerinin alımı en fazla hücre membranından bitki köküne doğru olur (Tipping 2002; Kulikova *et al.* 2005; Yılmaz *et al.* 2007). Humik asitin bitkilerde besin alımı üzerine etkisi hakkında birçok araştırma yapılmıştır.

Sánchez-Sánchez *et al.* (2006) yaptığı çalışma da üzüm üzerine humik asit uygulamış ve demir ve fosfor alımında artış olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Salatalık (El-Nemr *et al.* 2012), armut (Marino *et al.* 2012) ve biberde (Çimrin *et al.* 2013) yapılan çalışmalarda humik asit uygulamasıyla azot, fosfor, potasyum, kalsiyum ve magnezyum alımında artış olduğu bildirilmiştir. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) (Aydın *et al.* 2012), buğday (Tahir *et al.* 2011), ve salatalık (Mora *et al.* 2010) üzerine yapılan çalışmada da humik asit uygulanmış ve nitrat alımında artış olduğu görülmüştür. Humik asit mısır bitkisinin köklerinin kuru ağırlığında ve uzunluğunda artışa neden olurken aynı zamanda azot, fosfor, potasyum, kalsiyum, bakır, mangan, çinko ve demir alımını da artırmıştır (Eyheraguibel *et al.* 2008). Humik asitin üzerinde fonksiyonel gruplar mevcuttur ve metaller bu fonksiyonel gruplara bağlanmak için birbirleriyle rekabet içerisinde. Bu fonksiyonel gruplar metal iyonlarıyla, metal oksitlerle, metal hidroksitlerle ve minerallerle metal-organik birleşiklerini oluşturmaktadırlar (Kerndorff and Schnitzer 1980). Humik asitin yüksek değerlikli metallerle yaptığı bağlar alkali metallerle oluşturduğu bağlardan daha kuvvetli olduğu için çok değerlikli metallerin bitkiye alınımı humik asit tarafından engellenebilir.

Yonebayashi *et al.* (1994) yaptığı bir çalışmada yüksek pH değerinde humik maddelerin şelatlama etkisinin daha yüksek olduğunu ve bu etkiyle topraktaki ağır metallerin bitkiler tarafından alınmaz formlara dönüştüğünü saptayarak, humik maddelerin metalleri adsorbe gücünü bakır > demir > çinko > mangan olarak belirlemiştir.

Humik asitlerin bu özellikleri ile ağır metallerle kirletilmiş alanların temizlenmesinde bir kimyasal ayırma yöntemi olan adsorpsiyon prosesi ile çevrenin ağır metallerden arınması sağlanabilmektedir (Apak ve Hizal 2012). Humik asitin bitki gelişmesi ve

beslenmesine olan yararının yanı sıra ağır metal, kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik stres altındaki bitkiler üzerine de olumlu etkisi olduğu bilinmektedir (Gülser vd 2009). Humik asit antiklostojenik olabilir ve antitoksik eylemi ve antimutejen aktiviteyi açığa çıkarabilir (Marova *et al.* 2011). Humik asit stres koşulları altında bitkilerde solunum ya da fotosentezi, klorofil, karbonhidrat ve proteinlerin biyosentezini, azot, potasyum ve mikroelementlerin alınımını, büyüme ve tohum çimlenmesi gibi olayları uyararak bitkileri koruyabilir (Kulikova *et al.* 2005). Yıldırım *et al.* (2004) yapmış olduğu çalışmada stres şartları altında humik asitlerin epigenetik mekanizmalar yoluyla bitki büyümesi üzerine pozitif bir etkide bulunduğunu ve humik asitin bu koruyucu etkisinin enzimatik aktivasyon sistemi üzerindeki etkisinden ve antioksidan özelliğinden dolayı olduğunu belirtmiştir.

## 2.5. Transpozonlar

Transpozon elementleri genom boyutunu değiştirebilen mobil DNA sekanslarıdır (El-Osta *et al.* 2008). Transpozon elementleri (TE) Barbara McClintock tarafından 1948'de mısırdaki araştırılmıştır ve hareketli genomik elementler olarak adlandırılmıştır. Transpozonlar genin ifade şeklini değiştirebilir ve kromozomal düzenlemeleri uyarabilir (McClintock 1948). McClintock kontrol elementleri olarak adlandırdığı TE'leri iki önemli fonksiyonda görev yapabilir; TE'leri gelişim esnasında gen ekspresyonunu düzenlemek için 'uyum içinde' transpoze olabilir ve TE'leri stres koşulları altında genomun yeniden yapılandırılmasında işlev görebilir (McClintock 1956). Aktivator (Ac) ve ayrışma (Ds) elementi ve bastırıcı-mutator (Spm) elementlerine bağımlı olan bu elementlerin hareketi mısır bitkisinde farklı pigmentasyonlara neden olduğu için farkedilmiştir (McClintock 1950; Döring and Starlinger 1984). Transpozonlar, tek bir hücrenin içerisinde bulunan ve sıklıkla buldukları yerden koparak farklı bölgelere sıçrayan gen parçalarıdır. Transpozonal sıçramalar, transpozonal bölgelerin önce kendilerini kopyalayıp, sonra bu kopyaların sıçraması şeklinde olabileceği gibi (Kopyala/Yapıştır) gen parçalarının olduğu gibi, buldukları yerden koparak yeni bir yere yerleşmeleri şeklinde de olabilir (kes/yapıştır). Ökaryot genomunun yaklaşık %50'sini transpozonlar oluşturur. Transposable hareketler sonucunda ökaryotlarda



genom boyutu değişebilir. Transpozonlar transpozisyon mekanizmalarına göre iki sınıfta toplanabilir;

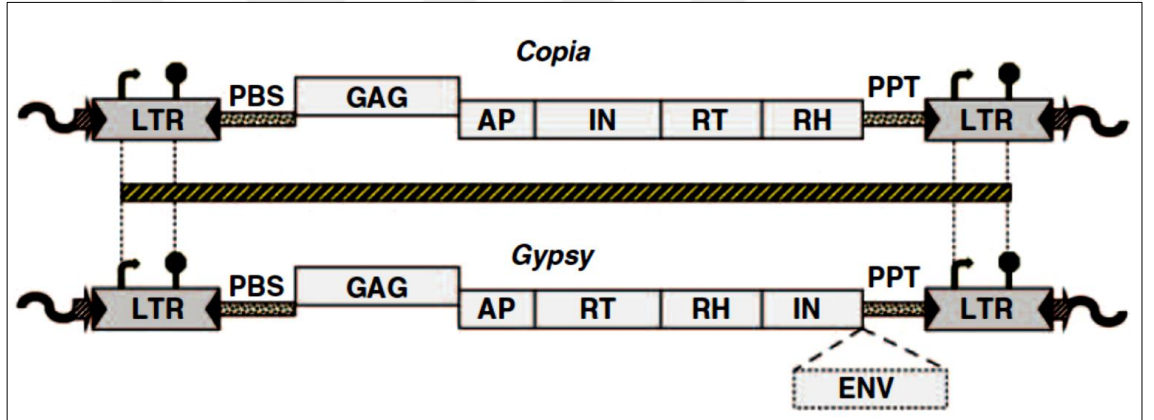
### **2.5.1. Retrotranspononlar**

Genomik retrotranspononlar transposable elementler arasında ökaryotik genomda sayıca en fazla bulunan sınıftır (Sabot and Schulman 2006; Feschotte *et al.* 2002; Lander *et al.* 2001). Retrotranspozonlar kendilerini kopyalayıp sonra bu kopyalarını genomda çeşitli yerlere yerleştirirler. Retrotranspozonlar önce transkripsiyon yoluyla kendilerini bir RNA molekülü olarak kopyalarlar, sonra bu RNA (çoğu zaman transpozon tarafından kodlanan) bir ters transkriptaz tarafından tekrar DNA'ya dönüştürülür ve genoma geri entegre edilir. Kopyala yapıştır hareket mekanizmalarından dolayı genom boyutunu değiştirebilirler (Mansour 2007). Retrotranspozonlar her iki ucunda uzun uç tekrarlarına sahip olup olmadıklarına göre LTR'li ve LTR'siz olmak üzere ikiye ayrılırlar. LINE ya da L1 ve Alu genleri LTR'siz retrotranspozonlara örnektir. L1 elementlerinin ortalama uzunluğu yaklaşık 6 kb kadardır. Aksine Alu genlerinin ortalama uzunluğu sadece birkaç nükleotitden oluşur. Bu yüzden Alu elemanları kısa serpiştirilmiş transposable element olarak ya da SINE diye adlandırılır (Mansour 2008).

#### **2.5.1.a. LTR'li retrotranspononlar**

Uzun uç tekrarlı retrotranspozonlar (LTR) retrotranspozonların en bol sınıfıdır (Schulman and Kalendar 2005). LTR retrotranspozonları bitki genomlarının yapısal çeşitliliğine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadırlar (Vitte and Panaud 2005). Bitki genomlarında büyük sayıda LTR retrotranspozon insersiyonları birçok türde bulunur ve bazı durumlarda yarısından fazlası tüm genomu teşkil eder (Kumar and Bennetzen 1999); (SanMiguel *et al.* 1996). LTR retrotranspozonlar *retrovirüslere* benzeyen ters transkripsiyon ile çoğalırlar (HIV gibi) (Feschotte *et al.* 2002). LTR retrotranspozonlar proteinlerin çoğunu kendi replikasyonları için şifrelerler ve genomun içine geri sokarlar (Sabot and Schulman 2006). Farklı stres koşullarında birçok bitkide LTR retrotranspozonlarının etkilendiği görülmüştür (Mansour 2007). Örneğin çeşitli biyotik

ve abiyotik stresler altında ikili haploit üretimi, *in vitro* rejenerasyon hibridizasyon, mekanik hasar, enfeksiyon, don olayları LTR retrotranspozonların çeşitli transkripsiyonel aktivitesinin ekspresyonunu artırdığı görülmüştür (Hirochika 1995; Grandbastien *et al.* 2005). LTR retrotranspozonları genin sırası ve korunmuş dizi özellikleri temelinde copia ve gypsy grubu olarak iki ana grup altında toplanabilirler (Xiong and Eickbush 1990). Şekil 2.4’de görüldüğü gibi Copia ve Gypsy elemanlarının her ikisinde iki önemli gen bölgesi (gag ve pol) içerir. Gag geni, retrotranspozon tarafından sentezlenen RNA’nın paketlenmesinde kılıf yapısında olan bir proteini kodlarken, pol geni retrotranspozon yaşam çemberi için gerekli bir polipeptidi kodlar (Kalendar *et al.* 2011)

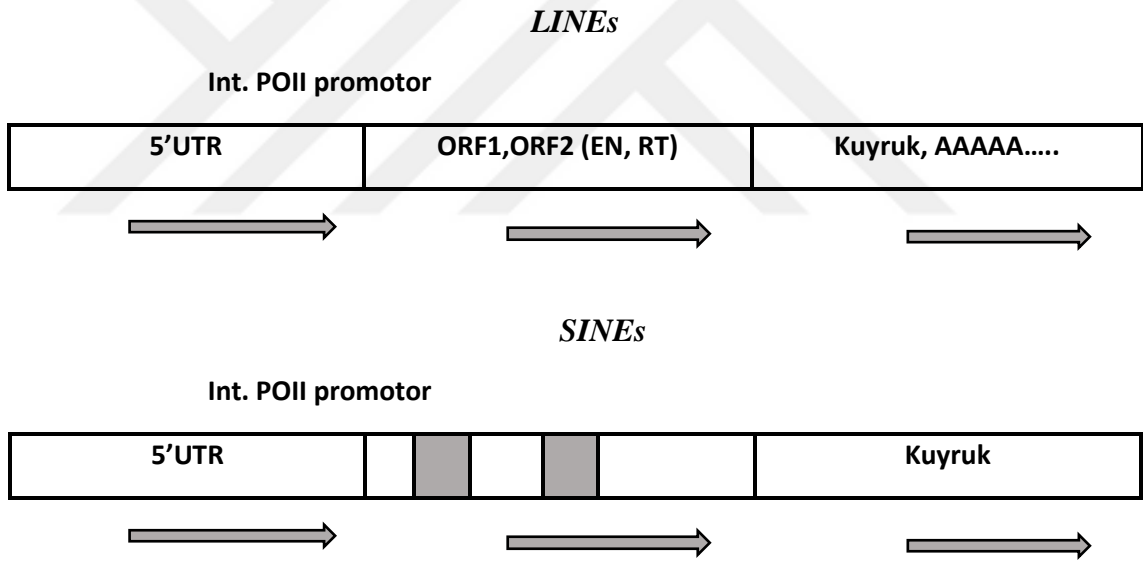


Şekil 2.4. LTR retrotranspozonlarının büyük iki sınıfı copia ve gypsy (Kalendar *et al.* 2011)

### 2.5.1.b. LTR’siz retrotranspozonlar

İnsan genomunun yaklaşık dörtte biri uzun ve kısa serpiştirilmiş nükleer elementlerden oluşmaktadır (Lander *et al.* 2001). LTR transpozonlarının başında ‘Long Interspersed Nuclear Elements’ (Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elementler) LINE ve ‘Short Interspersed Nuclear Elements’ (Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Elementler) SINE dizileri gelmektedir. LINE retrotranspozonlarının tam boyda olanlarında geri transkriptaz enzimleri bulunur ve RNA’dan DNA sentezleyebilirler. Endonükleaz enzimleride taşıyarak çoklu-nükleotit dizilerinin orta bölgelerindeki fosfodiester bağlarını kırabilir.

LINE'lar RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla çoğalır. LINE retrotransponlarının mekanizması ve genom içine entegrasyonu primer hedefli ters transkripsiyon (TPRT) ile gerçekleşir (Mansour 2008). Birçok LTR'siz retrotransponların stres ile aktive edildiği bildirilmiştir. Birçok selüler stres sinyallerinin LINE-1(L1)'i aktive ettiği bilinmektedir (Mansour 2008). SINE'lar otonom olmayan LTR'siz retrotransponlardır. Mozaik yapılarında tRNA ya da 7S ya da 5S ribozomal RNA ve 5' internal pol III içerirler (Mansour 2008). RNA polimeraz III enzimi ile çoğalır. Fonksiyonel geri transkriptaz enzimleri bulundurmazlar ve sadece farklı bölgelere sıçrayarak, orada salgılanmış enzimleri kullanarak kendilerini kopyalayabilirler. SINE'lar fonksiyonel bir ters transkriptaz proteinini kodlamazlar ve aktarılması için diğer hareketli elemanları kullanırlar (Mansour 2008).



**Şekil 2.5.** Otonom ya da otonom olmayan LTR'siz transponon LINE ve SINE'lar (Mansour 2008)

### 2.5.2. DNA transpononları

Retrotranspononlardan farklı olarak RNA yer almaz. Retrotranspononların aksine kendilerini kopyalayamazlar ve kes yapıştır yöntemiyle genomda bir yerden başka bir yere hareket edebilirler. Bu hareketlilik transposaz denilen enzimlerle sağlanır. Bu enzimlerin bir kısmı, transpononların DNA'nın sadece belirli bölgelerine bağlanmasını

sağlayabilirken, bir diğer kısmı DNA' nın hemen her bölgesine bağlanmasını sağlayabilir. Çıkarılan parçanın yerini doldurulmasında DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimleri görev alır. Bu hareketlilik sonucunda genom boyutu değişmezken mutasyonlar meydana gelir. Bazen DNA transpozonlarında kendilerini kopyaladıkları görülür.

### 2.5.3. Sınıf III transpozonlar

Minyatür Evrik Tekrarlı Traspozabl Elemanlar (Miniature Inverted-repeats Transposable Elements; MITE), Sınıf II (DNA) transpozonlarına benzerler ama çok küçüklerdir (100-500 bp), transpozisyonları için gerekli olan genleri bulundurmazlar (Çizelge 2.5). On yıl önce yapılan çalışmalarda otonom olmayan baskın MITE elementlerine rastlanılmıştır (Bureau *et al.* 1996). MITE'ların boyutu 600 bp daha azdır. MITE'lar önce bitki genomunda çalışılmış ve daha sonra iplik kurdu, bit, balık ve kurbağayı içeren birkaç hayvan genomunda bulunmuştur.

**Çizelge 2.5.** Bitkilerde transpozon elementlerine örnekler (Feschotte *et al.* 2002)

| Sınıf/alt sınıf/üst familya       | Türler              | Bağımsız üyeler  | Bağımlı üyeler | Tüm ailenin kopya sayısı |
|-----------------------------------|---------------------|------------------|----------------|--------------------------|
| <b>Class 1</b>                    |                     |                  |                |                          |
| <b>LTR'siz retrotranspozonlar</b> |                     |                  |                |                          |
| LINEs; L1 clade                   | <i>Z. mays</i>      | <i>Cin4</i>      | -              | 50-100                   |
|                                   | <i>L. speciosum</i> | <i>Del2'</i>     | -              | 250,000                  |
|                                   | <i>A. thaliana</i>  | <i>Tal'</i>      | -              | 1-6                      |
| SINEs                             | <i>N. tabacum</i>   | -                | <i>TS</i>      | 50,000                   |
|                                   | <i>B. napus</i>     | -                | <i>SI</i>      | 500                      |
| <b>LTR'li retrotranspozonlar</b>  |                     |                  |                |                          |
| <i>copia</i>                      | <i>N. tabacum</i>   | <i>Tnt1A</i>     | -              | >100                     |
|                                   | <i>N. tabacum</i>   | <i>Tto1</i>      | -              | 30(300)                  |
|                                   | <i>Hordeum sp.</i>  | <i>Bare-1</i>    | -              | 5,000-22,000             |
|                                   | <i>O. sativa</i>    | <i>Tos17</i>     | -              | 2-5 (30)                 |
|                                   | <i>Z. mays</i>      | <i>Hopscotch</i> | -              | 5-8                      |

Çizelge 2.5. (devam)

|                           |                    |                   |                 |         |
|---------------------------|--------------------|-------------------|-----------------|---------|
|                           | <i>Z.mays</i>      | <i>Ople-2'</i>    | -               | 100,000 |
|                           | <i>Z.mays</i>      | -                 | <i>BS1</i>      | 1-5     |
| <i>gypsy</i>              | <i>Z.mays</i>      | <i>Magellan</i>   | -               | 4-8     |
|                           | <i>Z.mays</i>      | <i>Huck-2'</i>    | -               | 200,000 |
|                           | <i>O. sativa</i>   | <i>RIRE2?</i>     | <i>Dasheng</i>  | 1,200   |
|                           | <i>A.thaliana</i>  | <i>Athilla 4'</i> | -               | 22      |
|                           | <i>A.thaliana</i>  | <i>Athilla 6'</i> | -               | 11      |
|                           | <i>A.thaliana</i>  | <i>Ta3</i>        | -               | 1       |
|                           | <i>A.thaliana</i>  | <i>Tar17</i>      | -               | 2       |
| <b>Class 2</b>            |                    |                   |                 |         |
| <b>DNA transpozonları</b> |                    |                   |                 |         |
| <i>hAT</i>                | <i>Z.mays</i>      | <i>Ac</i>         | <i>Ds</i>       | 50-100  |
| <i>CACTA</i>              | <i>Z.mays</i>      | <i>Spm</i>        | <i>dSpm</i>     | 50-100  |
| <i>Mutator</i>            | <i>Z.mays</i>      | <i>MuDR</i>       | <i>Mu1</i>      | 10-100  |
|                           | <i>A.thaliana</i>  | <i>AtMu1</i>      | -               | 1(4)    |
| <i>PIF/Harbinger</i>      | <i>Z. mays</i>     | <i>PIFa</i>       | <i>mPIF</i>     | 6,000   |
|                           | <i>Angiosperms</i> | <i>PIF</i>        | <i>Tourist</i>  | Çeşitli |
| <i>Tc1/mariner</i>        | <i>Angiosperms</i> | <i>MLEs</i>       | <i>Stowaway</i> | Çeşitli |

## 2.6. Retrotranspozonları Belirlemede Kullanılan Moleküler Markırlar

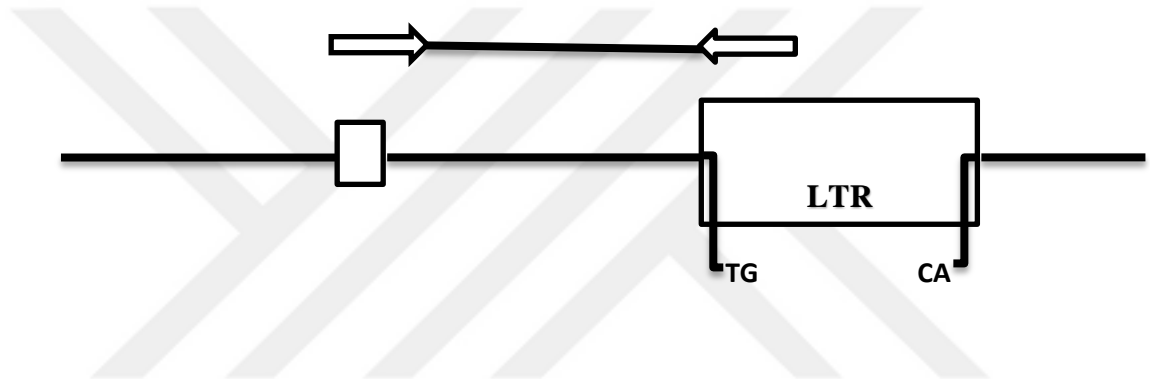
Moleküler markırlar gelişim biyolojisi, moleküler ekoloji, koruma biyolojisi, sistematik ve filogenetik uygulamaların yanısıra adli tıpta babalık testlerinde ve birçok hastalık testlerinde kullanılmıştır (Poczai *et al.* 2012). Moleküler markırların kaynağı kendilerinin üretildiği DNA'lardır. Moleküler markırlar bitki populasyonundaki çeşitlilik veya o populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde neredeyse %100'e yakın sonuçlar verirler. Moleküler markırlar bitki sistematığının oluşturulmasında, bitki ıslahında ve bitki gen kaynaklarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (Kartal-Alacam *et al.* 2014). Diğer markır sistemlerinin aksine transpozon temelli markır sistemleri bitki genomundaki değişiklikleri büyük oranda belirleyebilir. TE'lerin çeşitli gruplarının dağılımı ve dinamizminin olması onların moleküler markır olarak kullanım alanını gitgide artırmıştır (Kalendar *et al.* 2011). Retrotranspozonların entegrasyonu korunan uçlar ve DNA arasında yeni eklemeler oluşturduğu için moleküler markır olarak kullanılabilirler. Retrotranspozonlar bitkinin genetik çeşitliliği için önemli bir kaynaktır (Mansour 2008).

Özellikle retrotranspozonların sınıf 1 elemanları, kopyala-yapıştır metoduyla genomda bol bulunduğu için markır sistemlerinin geliştirilmesinde önemli bir temel sağlar. Bitki temelli markırlardan en çok sınıf bir kullanılmaktadır. LTR'ler hiçbir proteini kodlamazlar fakat bunun yerine promotör ve terminatör bölgeleri içerirler. Bu bölgeler birçok teknikte primerlerin bağlanması için temel sağlar. AFLP markırı ile retrotranspozon metodları kıyaslandığında bitki türlerinin belirlenmesinde retrotranspozon markırlarının kullanılması daha bilgilendirici olduğu kanaatine varılmıştır (Waugh *et al.* 1997; Mignouna *et al.* 1998; Yu and Wise 2000; Porceddu *et al.* 2002; Tam *et al.* 2005). Retrotranspozon markır metodlarının iki büyük avantajı vardır birincisi transpozisyonel aktivitelere göre büyük insersiyonlara neden olurlar ikincisi ise korunmuş alanları içeren PCR primerlerinden tasarlanabilmektedirler. (Kalendar and Schulman 2006).

### **2.6.1. Sequence-specific amplified polymorphism (SSAP-Diziye Özel Çoğaltma Polimorfizmi)**

Sequence-specific amplified polymorphism (S-SAP or SSAP) analizi ilk retrotranspozon metodlarından biridir. İlk olarak arpada BARE-1 geninin yerini belirlemek için kullanılmıştır (Waugh *et al.* 1997). AFLP tekniğine çok benzeyen bu teknik AFLP'den daha yüksek polimorfizm gösterir. SSAP yönteminde kullanılacak primerlerin tekrarlanabilir olması, yüksek derecede polimorfizm vermesi ve SSAP bantlarını açık şekilde vermesi yöntemin kalitesini artırmaktadır. S-SAP metodu organizmada özel retroelementlerin popülasyonunu ve dağılımını ölçmek için kullanılır. S-SAP yönteminde genomik DNA önce MseI veya PstI ile ya da başka herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilir. Daha sonra adaptörler kesilen DNA parçalarına bağlanır. Bu adımdan sonra adaptör homolog primerler kullanılarak ön seçici bir PCR amplifikasyonu yapılır. Sonraki adım adaptör primer yerine bir transpozon primeri ile seçici bir amplifikasyondur. Primerler genellikle retrotranspozonların LTR bölgelerine ya da bu elementlerin iç bölgelerine bağlanır (Şekil 2.6). S-SAP amplifikasyonlarında genel olarak Ty1-copia veya Ty3-gypsy retrotranspozonları kullanılır (Poczei 2013). SSAP yöntemi birden fazla bitki türü için optimize edilmiştir (Kalendar *et al.* 2011).

Örneğin; buğday (Queen *et al.* 2004) and *Aegilops* türleri (Nagy *et al.* 2006), elma (Venturi *et al.* 2006), marul (Syed *et al.* 2006) ve tatlı patates (Yamashita and Tahara 2006) bitkilerinde yaygın olarak kullanılmıştır. SSAP analizi aynı zamanda türlerin evrimsel geçmişini göstermek için kullanılmıştır. Bu analizler için mısır (García-Martínez and Martínez-Izquierdo 2003), tütün (Petit *et al.* 2007), fiğ (Sanz *et al.* 2007), çeltik (*Oryza sativa*) (Gao *et al.* 2004), buğday (Queen *et al.* 2004) kullanılmıştır. amplifiye edilmiş fragmentler yaygın olarak %6 poliakrilamid jelde ayrıştırılır ve otoradyografi ile görüntülenir (Mansour 2008).

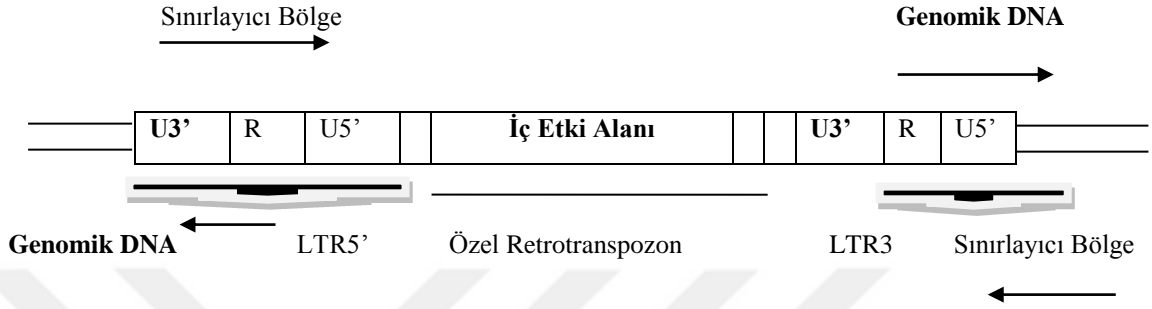


**Şekil 2.6.** S-SAP Modelini Gösteren Bir Taslak. Primerler LTR retrotranspozonları ve adaptörleri eşleme ve çoğaltımı için kullanıldı (Kalendar 2011)

### 2.6.2. Retrotransposons- based insertion polymorphism (RBIP-Retrotranspozon Temelli İnsersiyonel Polimorfizm)

RBIP yönteminin ilk olarak bezelyede PDR1 geninin incelenmesi esnasında geliştirildiği bilinmektedir (*Pisum sativum*) (Smýkal *et al.* 2008). Bu teknik transpozon insersiyonlarını belirlemek için kullanılan diğer metodlardan daha pahalı ve uygulaması tüm sekans bilgisinin bilinmesi gerektirdiğinden dolayı teknik olarak daha zordur. RBIP insersiyonun hem varlığını hem de yokluğunu belirleyebilir fakat çoklu yaklaşımlarda sadece varlığını belirler, yokluğu ise çıkmayan bantlardan belirlenir. RBIP’de S-SAP gibi türlerin evrimsel sürecini belirlemek için kullanılan yöntemdir (Mansour 2008). Retrotranspozon insersiyonunu tamamen bilmek için 5’ ve 3’ bölgelerinin dizilerinin bilinmesi gerekir. Bu nedenle diğer yöntemlerden farklıdır. RBIP, PCR yoluyla retrotranspozonların varlığını ve yokluğunu belirleyebilir. Genomik

polimorfizm, amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin hibridizasyonu ile ya da agaroz jel elektroforezi kullanılarak belirlenebilir. Yüksek verimli analiz ve sistemi otomatikleştirmek için hibridizasyon daha yararlıdır (Şekil 2.7.) (Mansour 2008).

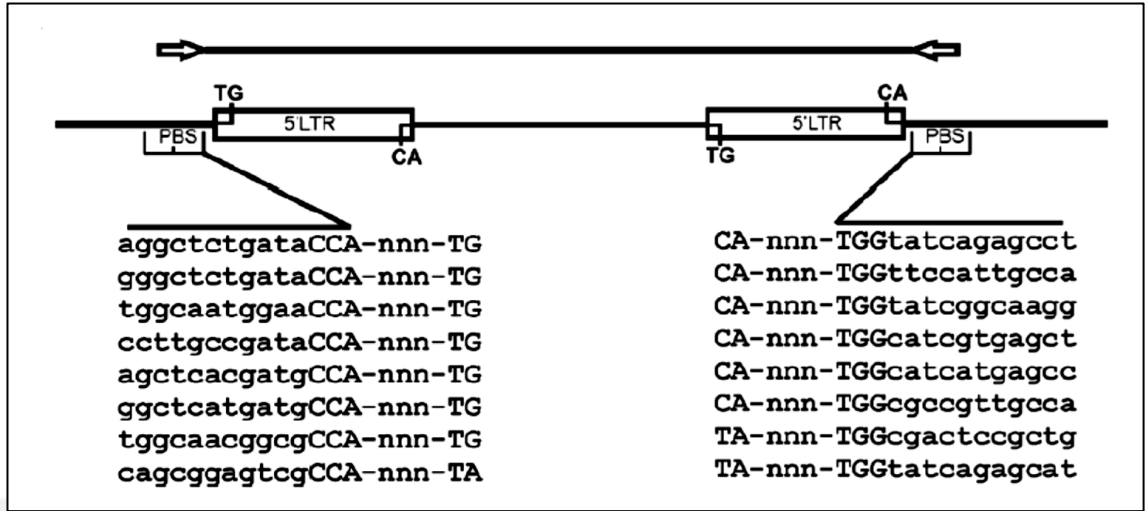


**Şekil 2.7.** Retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP). Bu teknik retrotranspozon varlığını ve yokluğunu belirlemek için kullanılır (Mansour 2008)

### 2.6.3. Inter-primer binding site Amplification (iPBS-Primer Arası Bağlantı Yerinin Çoğaltması)

Retrotranspozonların moleküler markır olarak kullanılmasında sınırlayıcı faktör LTR dizilerinin bilinmesi gerekmesidir. Eğer önceden bu diziler bilinmiyorsa LTR bölgeleri klonlanmalı ve sekans analizi yapılmalıdır. Bu problemin üstesinden gelmek için Kalendar *et al.* (2010) tarafından geliştirilmiş bir teknik ile LTR transpozonları tarafından paylaşılan retrotranspozonların primer bağlanma bölgelerini kullanarak 18 nükleotidlik tamamlayıcı ve sınırlı sayıda taşıyıcı RNA (tRNA) ile bu problemin üstesinden gelinmiştir. iPBS yöntemi için retrotranspozonlar zıt yönlü olmalıdır ve genler arası bölgeleri çoğaltmak için her birine yeterince yakın olmalıdır (Şekil 2.8) Bu teknik aynı zamanda genom tarama ve retrotranspozon izolasyonu için çok etkili bir yöntemdir. Transposon elementlerinin çeşitliliğinin belirlenmesinde ya da geleneksel parmakizi analizi tekniklerine ihtiyaç duyulduğunda bu yöntem çok kullanışlı olabilir (Poczai *et al.* 2013).





**Şekil 2.8.** İPBS'nin şematik gösterimi

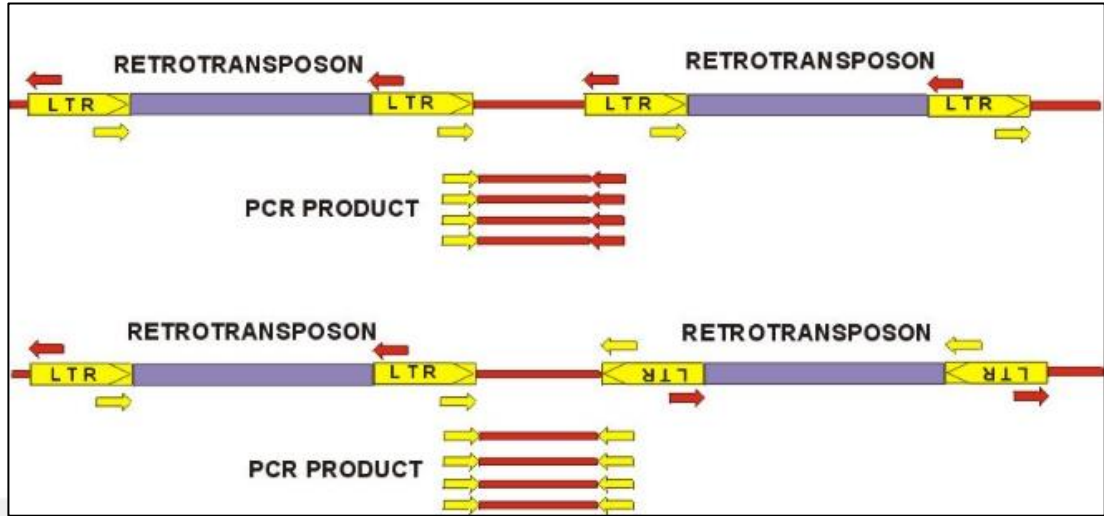
\*Ters yönlere iç içe iki LTR retrotranspozonu primer bağlanma bölgelerinden farklı iki primer yada tek primerden çoğaltıldı. PCR ürünleri PCR primerleri gibi hem PBS hemde LTR dizilerini içerir. Şekilde PBS ve LTR dizilerinin genel yapısı ve 5'LTR (5'..CA) ve PBS (5'-TGG..3') arasında birçok uzun nükleotid arası boşluklar şematize edilmiştir (Kalender 2011).

#### 2.6.4. Inter-SINE Amplified Polymorphism (ISAP-SINE Arası Çoğaltma Polimorfizmi)

Seibt *et al.* (2012) tarafından geliştirilen bu teknik eksik LTR motif retrotranspozonları temeline dayanır. Özellikle patates bitkisinde yaygın kullanıma sahiptirler. SINE (Solanaceae-specific short interspersed) elementlerinin ailesi ve alt ailesinin belirlenmesinde biyoinformatik sistemlerinden yararlanılmıştır ve bu elementlerin yaklaşık 6500 kopyası bulunmuştur. ISAP markırları bitişik SINE elementleri arasında genomik DNA'nın çoğaltılması esasına dayanır. Özel primer dizaynı farklı Solanaceae (patlıcangiller) SINE elementlerinin uygunluğu karşılaştırılarak elde edilir. Bu elementler Solanaceae bitkilerinde yaygın olduğu için tür ve cinsler içerisinde kolayca aktarılabilirler. Bu markır sistemi son derece spesifik olabilir. Bitki genetiğinde çok fazla kullanılmamasına karşın mevcut veri kaynakları ve veritabanlarını kullanmak için iyi bir sistemdir. ISAP primerlerinin dizaynı öncesinde SINE elemanları hakkında kapsamlı genomik bilgi elde etmek gerekir.

### **2.6.5. Inter-Retrotransposons Amplified Polymorphisms (IRAP-Retrotranspozonlar Arası oğaltma Polimorfizmi)**

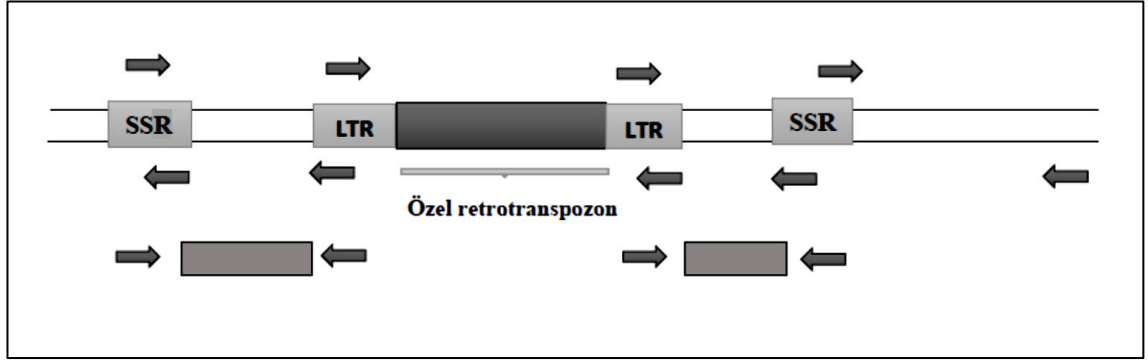
IRAP, DNA parmakizi oluşturmak için Kalendar *et al.* (1999) tarafından açıklanan mobil element temelli markır sistemidir (Şekil 2.9). 100-1500 bp büyüklüğünde farklılık gösteren LTR içeren retrotranspozon grubunu hedefler ve IRAP primerleri bu bölgelere bağlanarak iki LTR sekansı arasındaki DNA segmentini amplifiye ederek retrotranspozon insersiyon polimorfizmini belirler (Mansour 2008; Poczai *et al.* 2012). IRAP primerleri bu bölgelere bağlanır ve LTR dizisi arasında DNA segmentlerini çoğaltır. LTR için özellikle tasarlanan bir veya iki primer aynı PCR da kullanılabilir. Hedeflenen Sınıf I elemanları, her iki yönde de gerçekleŐebilen (5'-3' veya 3'-5') kopyala-yapıştır transpozisyon metodunu kullanırlar (Poczai *et al.* 2012; Poczai *et al.* 2013). Retrotranspozonlar bitki genomlarında kümeler halinde bulunduğundan dolayı IRAP sonuçları yüksek oranda polimorfizm gösterir. IRAP markırının avantajları yüksek derecede polimorfizm göstermesi, otomasyonu genotipleme olasılığı ve düşük maliyetleri olmasıdır. IRAP markırını ile yeni türlerin analizi, özel türlerde retrotranspozon element dizilimleri hakkında bilgi sağlanabilir. Retrotranspozon ailelerinin kopya sayısı marker ile belirlenen lokus sayısını etkileyecektir (Kalendar and Schulman 2007). Ters transkriptaz gibi bazı poliprotein alanları retrotranspozon elementleri grupları arasında yüksek derecede koruyucu olabilir bu yüzden IRAP primerleri bu alanları tamamlayabilir (Kalendar *et al.* 1999).



**Şekil 2.9.** IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Kalendar *et al.* 2011)

#### 2.6.6. Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP- Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltma Polimorfizmi)

REMAP metodu primerlerinden dolayı IRAP metodunda farklıdır. REMAP tekniği LTR dizileri ve bağlantılı bir SSR primerleri ile çoğaltılmış bölgeler arasında polimorfizmi açıklar (Şekil 2.10). Özel olarak tasarlanmış bir LTR primerine ek olarak basit bir tekrar içeren ((CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>) rastgele seçilen primer ve 3' ve 5' uçlarında (C(CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>G) nükleotide bağlanan rastgele seçilmiş primer ile karıştırılır. REMAP tekniği IRAP primerleri ile simple sequences repeat (ISSR) primerlerinin kombininin kullanılmasından dolayı ISSR tekniğinin gelişmişisi olarak görülmektedir. IRAP ve REMAP tekniği güvenilir ve tekrarlanabilir bant profilleri oluşturdukları için birçok bitki cinsinde genetik çeşitliliği belirlemede kombine ya da ayrı ayrı kullanılabilir (Poczai *et al.* 2012; Poczai *et al.* 2013).



**Şekil 2.10.** REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) amplifikasyonu

\*Bir SSR primeri ve LTR primeri arasında eşleşme ile gerçekleşir (Poczai *et al.* 2012).

## 2.7. Epigenetik ve Transpozon İlişkisi

Epigenetik gen fonksiyonlarındaki değişiklikleri çalışmak için tasarlanmış ve DNA dizisinde değişikliğe yol açmadan mitotik ve mayotik bölünmelerle kalıtsal olarak tanımlanmıştır. Epigenetik mekanizmalar siRNA, DNA metilasyonu ve demetilasyonu ve histon modifikasyonları içerir. Epigenetik modifikasyonlar genomun baskılanmasında, paramutasyonda, transpozonların çoğalmasına karşı savunmada ve transkripsiyonel gen susturmada önemli rol oynar (Chinnusamy *et al.* 2004). Transpozon elementleri gelişim boyunca gen ekspresyonunu düzenlemek için uyumlu şekilde transpoze olabilirler ve çeşitli stres şartları altında genomun yeniden yapılandırılmasında işlev görürler (Cui and Cao 2014). Son yıllarda gen ekspresyonu üzerine transpozon elementlerinin etkilerine ilişkin sorular bitkilerde genomik ve epigenetikteki hızlı gelişmeler ile yeniden ortaya çıkmıştır. Genomik diziler göstermiştir ki transpozon elementleri bugüne kadar incelenmiş bütün bitkilerin ortak bileşenidir ve birçok durumda transpozon elementleri nükleer DNA'nın en bol sınıfını (mısır genomunun yaklaşık %85'ini) oluştururlar. Transpozonların zararlı etkilerini en aza indirmek için bitkiler histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve RNAi içeren transpozon elementleri aktivitelerini bastırmak için birçok epigenetik yol geliştirilmiştir. Bu yollar son derece etkilidir fakat mekanizmada transpozon elementlerin susturulması cis ve trans endojen genlerinin ekspresyonunu etkileyebilir. Örneğin; polen vejetatif çekirdeğinde DNA metilasyonunun DDM1 ekspresyonunun azalmasına ve birçok

transpozon elementleri transkripsiyonunun yeniden artmasına yol açar (Slotkin *et al.* 2009). Bu durum transpozon elementlerinin yeniden aktivasyonu 24-nt siRNA'ların seviyesinde bir azalma ile ilişkilidir fakat 21-nt siRNA'da artışa neden olmuştur. Bu 21 nt siRNA'lar yeni generasyonda epigenomik kaliteyi korur ve sessizleşen transpozon elementlerinin güçlendirilmesi için susturma sinyallerinde fonksiyon yapar. Bu transpozon elementlerden türetilmiş 21-nt siRNA'lar aynı zamanda ddm1 ve met1 mutantlarında gözlemlenmiştir. DNA metilasyonu harekete geçmiş transpozon elementlerini önlemede önemli bir rol oynar. Transpozon elementlerinin metilasyonu transkripsiyonel sessizlik durumu ile ilişkilidir ve bozulmuş DNA metilasyonu sıklıkla transpozon elementlerinin yeniden aktivasyonuna yol açar (Cui and Cao 2014). Örneğin; CACTA benzeri DNA transpozonları ve retrotranspozonların birkaç tipi Arabidopsis ddm1 mutantında yeniden aktif edilmiştir (Tsukahara *et al.* 2009).

Ayrıca epigenetik rekombinasyonun kalıtsal hatları (epiRILs) transpozon elementlerinin mobilizasyonunun üzerine metilasyonun cis etkisini incelemek için eşsiz bir sistemdir. DNA metilasyonuna ek olarak, transpozon elementlerinin susturulmasında aktif histon modifikasyonlarının tükenmesi ile ya da baskıcı histon modifikasyonları tarafından sağlanabilir. RdDM yolu da transpozon elementlerinin doku spesifik susturulması için bir kontrol mekanizması olarak davranır. Bitkilerde uygun gelişmeyi ve üremeyi sağlamak için transpozon elementleri monitörlerinin; polen, endosperm ve apikal meristem sürgünleri olmak üzere üç kontrol noktası vardır. Transpozon elementleri aktivasyonu bitkilerde stres altında tetiklenir (Cui and Cao 2014). Örneğin; sıcaklık şoku altında Arabidopsis'de Transpozon elementlerinin transkripsiyonunda artışlar olmuştur ve ONSEN LTR retrotranspozonları yeniden harekete geçmiştir (Ito *et al.* 2011).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen *Zea mays* L. tohumları kullanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen kök ve gövdeden yararlanılmıştır.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır;

**Çizelge 3.1.** Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar

| NO | ALET ve CİHAZ               | MARKA                              |
|----|-----------------------------|------------------------------------|
| 1  | Buzdolabı                   | Arçelik 8190NF                     |
| 2  | Destile Su Cihazı           | GFL 2004                           |
| 3  | Elektroforez Tankı (Yatay)  | OWL B2                             |
| 4  | Elektroforez Akım Sağlayıcı | OWL OSP300-2Q                      |
| 5  | Otoklav                     | HMC HIRAYAMA HVE 50                |
| 6  | Hassas Terazı               | Mettler Toledo AL204               |
| 7  | Kar Üretme Makinesi         | Scotsman, AH 198285                |
| 8  | Manyetik Karıştırıcı        | Daihan Scientific MSH 20A          |
| 9  | pH Metre                    | InoLab pH730 wtw Series            |
| 10 | Santrifüj                   | Hettich EBA-20                     |
| 11 | Soğutmalı Santrifüj         | Hettich Mikro 220R                 |
| 12 | Jel Görüntüleme Sistemi     | DNR BioImaging Systems MiniBis Pro |

Çizelge 3.1. (devam)

|    |                       |                         |
|----|-----------------------|-------------------------|
| 13 | Mikrodalga Fırın      | Arçelik, MD 592         |
| 14 | Su Banyosu            | Memmert WNB14           |
| 15 | Ependorf Tüpler       | Ependorf                |
| 16 | PCR                   | Corbett Research CG1-96 |
| 17 | Spektrofotometre      | Cecil, CE 5502          |
| 18 | Mikropipet Takımı     | Ependorf                |
| 19 | Steril Kabin          | Esco AC2-4E1            |
| 20 | Derin Dondurucu (-86) | Nuarie                  |

### 3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıda verilmiştir:

#### 3.1.3.a. Kullanılan ağır metal ve humik asit çözeltileri

##### a.1 FeSO<sub>4</sub> çözeltisi;

| <u>Konsantrasyon</u> | <u>Miktar (g/l)</u>       |
|----------------------|---------------------------|
| 0 mM                 | 1000 ml saf su            |
| 20 mM                | 5,56 g FeSO <sub>4</sub>  |
| 40 mM                | 11,12 g FeSO <sub>4</sub> |
| 60 mM                | 16,18 g FeSO <sub>4</sub> |

##### a.2 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltisi;

| <u>Konsantrasyon</u> | <u>Miktar (g/l)</u>                         |
|----------------------|---|
| 0 mM                 | 1000 ml saf su                              |
| 20 mM                | 3,22 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O |

|       |   |
|-------|---|
| 40 mM | 6,45 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O |
| 60 mM | 9,68 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O |

### **a.3 Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisi;**

| <b><u>Konsantrasyon</u></b> | <b><u>Miktar (g/l)</u></b>                                   |
|-----------------------------|--|
| 0 mM                        | 1000 ml saf su   |
| 10 mM                       | 2,91 g Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O  |
| 20 mM                       | 5,82 g Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O  |
| 40 mM                       | 11,64 g Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O |

### **a.4 MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O çözeltisi;**

| <b><u>Konsantrasyon</u></b> | <b><u>Miktar (g/l)</u></b>                  |
|-----------------------------|---|
| 0 mM                        | 1000 ml saf su                              |
| 20 mM                       | 3,38 g MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O  |
| 40 mM                       | 6,76 g MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O  |
| 60 mM                       | 10,14 g MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O |

### **a.5 %10'luk humik asit çözeltisi;**

1500 ppm (0,075 g) % 10 Humik Asit

### **3.1.3.b. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler;**

#### **1M Tris-HCl (1000 ml)**

121,1 gram Tris-base

700 ml dH<sub>2</sub>O

42 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M)



700 ml su içerisine 121,1 gr Tris-base karıştırılmıştır. Üzerine 42 ml konsantre HCl eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

**0.5 M EDTA PH=0.8 (1000 ml)**

136,1 g EDTA

20 g NaOH

800 ml dH<sub>2</sub>O

800 ml su içerisine 136,1 g EDTA eritilip, üzerine 20 g NaOH eklenerek pH=8.0 olarak ayarlanmıştır. Filtreden geçirilmiş ve otoklavlanmıştır.

**5 M NaCl (500 ml)**

146,1 g NaCl

450 ml dH<sub>2</sub>O

146,1 g NaCl 450 ml suda eritilmiştir. Toplam hacim 500 ml'ye tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır (otoklavlanmamıştır).

**10X TE Buffer (1000 ml)**

100 ml 1 M Tris-HCl pH=8.0

20 ml 0,5 M EDTA

880 ml dH<sub>2</sub>O kullanılarak hazırlanmıştır.

**1X TE Buffer (1000 ml)**

10X TE Buffer'dan 100 ml alınıp 900 ml saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

(DNA 1X TE'de çözülmüştür)

**3 M Sodyum Asetat (Ph= 5,2) (100 ml)**

40,8 g Sodyum Asetat ( $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 80 ml ultra saf suda iyice eritilir ve pH= 5,2 oluncaya kadar glasiyel asetik asit (GAA) eklenmiş ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**10 M Amonyum Asetat**

77 g Amonyum asetat,  
800 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ,

77 g Amonyum asetat 800 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Distile su kullanarak hacmi 1 litreye tamamlanarak stok hazırlanmış ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

**DNA ekstraksiyon tamponu (50 örnek için):**

1 g toz CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)  
0.5 g (%0,1) Sodyum bisüfit ( $\text{NaHS}_3$  ve  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  karışımı) (Sigma, 243973)  
5 ml Tris-HCl (1 M)  
14 ml NaCl (5 M)  
2 ml EDTA (0.5 M)  
0.1 ml (%0.2)  $\beta$ -merkaptoetanol (v/v)

**Kloroform: İzooamil alkol:**

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

**2-propanol (izopropanol)**

Hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, I9516).

**Proteinaz K**

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma, P2308).

**Ribonükleaz (RNaz)**

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma R6513).

**%70'lik Etil Alkol:**

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

**3.1.3.c. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler****Etidyum Bromür Çözeltisi:**

500 ml 0,5 X TBE tamponu içerisine 300 µl etidyum bromür ilave edilerek hazırlanmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

**Bromfenol Blue Çözeltisi:**

0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

**10X TBE tamponu:**

108 g Tris-base

55 g Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA

700 ml dH<sub>2</sub>O

700 ml distile su içerisinde 108 g Tris-base, 55 g Borik asit ve 40 ml 0,5 M EDTA çözülmüştür. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

**0,5X TBE tamponu:**

Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak hazırlanmış ve seyreltilerek (50 ml 10X TBE Tamponu + 950 ml saf su) 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

**Primerlerin Hazırlanması:**

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1  $\mu$ M olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

**3.1.3.d. Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler****%10'luk NaOCl (Sodyum hipoklorit):**

10 ml NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari *Domestos*<sup>®</sup> marka çamaşır suyundan 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**%70'lik Etil Alkol:**

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

**TWEEN<sup>®</sup> 20****3.2. Yöntem****3.2.1. Ağır metal ve humik asit çözeltilerinin bitkiye uygulanması**

Eşit boyutlarda seçilen 20-25 *Zea mays* L. tohumları musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 45 saniye karıştırılarak bekletilmiş daha sonra %10'luk sodyum hipoklorid solüsyonu (NaOCl) içerisine 4-5 damla TWEEN 20 damlatılarak 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Daha sonra tohumlar 3-4 kez saf su ile durulanmıştır. Kabin %70'lik etil alkol ile önceden silinmiş ve 15 dakika UV ile steril edilmiştir. Steril edilen tohumlar laminar kabin içerisinde steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur. İki kat steril edilmiş kurutma kağıdı üzerine 20-25 tohum alınmış, grupların her birine ayrı ayrı olacak şekilde 20, 40, 60 mM demir sülfat, mangan sülfat, çinko sülfat ve 10, 20, 40 mM cobalt nitrat çözeltileri ilave edilmiştir. Bu uygulamalara ek olarak bütün ağır metal dozları 1500 ppm humik asit uygulaması ile beraber ekilmiş ve laboratuvar

ortamında 14 gün boyunca çimlenmeye bırakılmıştır. 14 gün sonunda hasat edilen bitkilerle DNA izolasyonu yapılmıştır.

### 3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi yapılmıştır;

1. Çalışma anında hazırlanmış DNA Ekstraksiyon tamponu önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda bekletilmiştir. Bitki materyaline ilave edilmeden önce ekstraksiyon tamponuna %0.2 (v/v) oranında β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.
2. Daha sonra sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınan 0.3 g bitki materyali üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda her 10 dk'da alt üst edilip karıştırılarak 60 dk. bekletilmiştir.
3. Su banyosu aşamasından sonra 10 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır ve bu süre sonunda her örneğe 750 µl kloroform izoamil alkol eklenip tüm örnekler 15 dk. yavaşça alt üst ederek karıştırılmıştır.
4. 14000 g ve 24°C'de 20 dk. santrifüjlenilip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
5. Alınan oranda kloroform izoamil eklenmiştir.
6. 14000 g ve 4°C'de 20 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
7. Üst faza 2,5 µl RNaz ve 8 µl proteinaz K eklenmiş ve 45 dak. 37°C'de bekletilmiştir.
8. DNA'yı çöktürmek için her tüpe 100 µl amonyum asetat, 100 µl sodyum asetat (3M), ve hacmin iki buçuk katı kadar -20°C'de muhafaza edilen izopropanol eklenir. Yavaşça alt üst edilmiş ve bu esnada DNA görülmüştür.
9. 14000 g ve 4°C'de 20 dk. Santrifüj yapıldıktan sonra üst faz atılmıştır. Tekrar 1 dak. Santrifüj yapılarak kağıtta ters çevrilip kurutulmuştur.
10. 37°C'de 15.dak. kurutulur ve üzerine 100 µl 1× TE eklenmiştir.
11. 24 saat +4°C'de dinlendirildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.3. IRAP

#### 3.2.3.a. IRAP primerleri

Çalışmada 6 adet IRAP primeri (Metabion International AG Lena-Christ-Strasse 44/I D-82152 Martinsried, Deutschland) kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizileri (Çizelge 3.2) verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri, erime (T<sub>m</sub>) ve bağlanma (T<sub>a</sub>) sıcaklıkları

| No | Primer adı      | Dizisi 5' → 3'            | T <sub>m</sub> °C |
|----|-----------------|---------------------------|-------------------|
| 1  | Stowaway        | CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT  | 62.0              |
| 2  | Sukkula         | GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC | 71.0              |
| 3  | Bare 1(0)       | CTAGGGCATAATTCCAACA       | 53.0              |
| 4  | Nikita-57 N(57) | CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC    | 60.0              |
| 5  | Nikita E2647    | ACCCCTCTAGGCGACATCC       | 62.0              |
| 6  | WLTR2105        | ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA   | 61.0              |

#### 3.2.3.b. IRAP-PCR protokolü

IRAP-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** IRAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

| Bileşenin adı                                 | Miktarı (µL) | 50 örnek için son konsantrasyon |
|---|--------------|---------------------------------|
| Steril distile su                             | 13 µL        | 650 µL                          |
| 10X PCR tamponu (MgCl <sub>2</sub> içermeyen) | 2 µL         | 100 µL                          |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                       | 2 µL         | 100 µL                          |
| 5 µM primer                                   | 1 µL         | 50 µL                           |

**Çizelge 3.3.** (devam)

|   |               |              |
|---|---------------|--------------|
| 10 mM Dntp                                      | <b>0.5 µL</b> | <b>25 µL</b> |
| 50 ng/µl Kalıp DNA                              | 0.25 µL       | 12,5 µL      |
| 1 U/µl <i>Taq</i> -DNA polimeraz (Sigma, D7058) | 1 µL          | 1 µL         |
| <b>Toplam</b>                                   | 20 µL         |              |

Yukarıda verilen standart değerlere göre her bir örnekten izole edilen genomik DNA ve Çizelge 3.2’de verilen IRAP primerleri ile her bir örnek için ayrı PCR tüpü hazırlanmıştır.

Bu işlemlerin ardından örnekler PCR otomatik termodöngü aletine (Corbatt Mastercycler Gradient Authorized Thermal Cycle) yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

- 1) PCR aleti otomatik olarak 5 dakika 95°C tutmuş,
- 2) 42 döngü olacak şekilde sırasıyla,
  - a. 1 dakika 94°C
  - b. 1 dakika bağlanma sıcaklığı (Değişken)
  - c. 2 dakika 72°C
- 3) 15 dakika 72°C
- 4) Son olarak 10 dakika 4°C tutulmuş, PCR aletinden çıkarılan örnekler +4°C’de saklanmıştır.

### 3.2.4. REMAP

#### 3.2.4.a. REMAP primerleri

Çalışmada 4 adet IRAP primeri (Metabion International AG Lena-Christ-Strasse 44/I D-82152 Martinsried, Deutschland) ISSR primerleri (8081-8082) ile kombinlenerek kullanılmıştır. Bu primerlerin baz dizileri (Çizelge 3.4) verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** REMAP-PCR’da kullanılan primer dizileri

| No | Primer adı                         | Dizisi 5'→ 3'                                    |
|----|------------------------------------|--|
| 1  | <i>Nikita-E2647</i> +<br>ISSR 8081 | ACCCCTCTAGGCGACATCC<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC         |
| 2  | <i>Nikita-E2647</i> +<br>ISSR 8082 | ACCCCTCTAGGCGACATCC<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG         |
| 3  | <i>Stowaway</i> +<br>ISSR 8081     | CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT<br>GAGAGAGAGAGAGAGAGAC  |
| 4  | <i>Stowaway</i> +<br>ISSR 8082     | CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG    |
| 5  | <i>Sukkula</i> + ISSR<br>8081      | GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC<br>GAGAGAGAGAGAGAGAGAC |
| 6  | <i>Sukkula</i> + ISSR<br>8082      | GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG   |
| 7  | <i>Bare 1(0)</i> + ISSR<br>8081    | CTAGGGCATAATTCCAACA<br>GAGAGAGAGAGAGAGAGAC       |
| 8  | <i>Bare 1(0)</i> + ISSR<br>8082    | CTAGGGCATAATTCCAACA<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG         |

#### 3.2.4.b. REMAP-PCR protokolü

REMAP-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları (Çizelge 3.5.) verilmiştir. Ayrıca IRAP tekniğinde uygulanan PCR döngü aşamaları REMAP tekniğinde de aynıdır.



**Çizelge 3.5.** REMAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

| Bileşenin adı                                   | Miktarı (µL) | 50 örnek için son konsantrasyon |
|---|--------------|---------------------------------|
| Steril distile su                               | 13 µL        | 600 µL                          |
| 10X PCR tamponu (MgCl <sub>2</sub> içermeyen)   | 2 µL         | 100 µL                          |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                         | 2 µL         | 100 µL                          |
| 5 µM primer (IRAP + REMAP)                      | 1 µL         | 100 µL                          |
| 10 mM Dntp                                      | 0.5 µL       | 25 µL                           |
| 50 ng/µl Kalıp DNA                              | 0.25 µL      | 12,5 µL                         |
| 1 U/µl <i>Taq</i> -DNA polimeraz (Sigma, D7058) | 1 µL         | 1 µL                            |
| <b>Toplam</b>                                   | 20 µL        |                                 |

### 3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

PCR işlemi tamamlandıktan sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- Jel içerisinde agarozun konsantrasyonu %2,0 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp sonrasında 0,5 X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5 X TBE + agaroz çözeltisi içerisinde 1.0 µg/mL olacak miktarda etidyum bromür eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3 µL bromfenol mavisi + 5 µL PCR ürünü) yüklenmiştir.
- Elektrik akımı verilerek 60V–180 dk. süre ile PCR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiştir.

f. Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve değerlendirilmek üzere fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.2.6. IRAP, REMAP analizleri ve genomik kararlılık sabitliğinin (%GTS) belirlenmesi**

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, kontrol grubunun IRAP ve REMAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar temin edilmiş olan agaroz jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Elde edilen jel görüntüleri TotalLab TL120 programı ile değerlendirilmiştir. Genomik kararlılık sabitliliği (%) her bir primer ürünü için Atienzar (1999)'a göre  $100 - \left(100 \times \frac{a}{n}\right)$  formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki  $a$  her bir uygulama örneği için tespit edilen IRAP ve REMAP polimorfik profillerini,  $n$  ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bant sayısını göstermektedir. Uygulama gruplarına ait IRAP ve REMAP profillerinde gözlenen polimorfizm kontrol grubuna göre yeni bir bandın ortaya çıkması, mevcut bir bandın kaybolmasını veya bant yoğunluğunun farklılığını kapsamıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. IRAP, REMAP Analizleri ve Genomik Kalıp Kararlılığı (Genomik Template Stability; %GTS)

Araştırmada humik asit ve demir, mangan, kobalt, çinko ağır metallerinin farklı konsantrasyonları *Zea mays* L. tohumlarına uygulanarak genom üzerinde ortaya çıkan retrotranspozon polimorfizmini belirlemek için 10 IRAP primeri [ (WLTR2105, Nikita E-2647, Nikita N-57, Sukkula, Bare1(0), Stowaway, 5'LTR, 6149, 6150, LTR 7286) ] denenmiş olup bunlar arasında en iyi amplifikasyon gösteren 6 IRAP primeri [Nikita-57 N(57), Bare 1(0), Sukkula, Stowaway, Nikita E2647, WLTR2105] seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Retrotranspozona dayalı bir yöntem olan REMAP tekniğinde retrotranspozon primerleri ile ISSR primerleri kombinasyonundan olan 8 primerin [(Bare1 (0) + ISSR8081, Bare1 (0) + ISSR8082, Sukkula + ISSR8081, Nikita-E2647 + ISSR8081, Stowaway + ISSR8082, Sukkula + ISSR8082, Nikita-E2647 + ISSR8082, Stowaway + ISSR8081] sonuçları değerlendirilmeye alınmıştır.

Bu değişimler yeni bantların ortaya çıkışı, normal bantların kaybı ve bant yoğunluğu farklılığıyla belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan bütün primerler için oluşan polimorfik bantlar kontrol grubuyla uygulama grubu altında ki bitkilerle kıyaslanmıştır. Ağır metalleri ayrı ayrı değerlendirmeye alırsak;

Mangan için 5 IRAP primeri [ (Nikita-57 N(57), Bare 1(0), Sukkula, Stowaway, Nikita E2647)] ve REMAP tekniğinde 8 ISSR+IRAP primeri [Bare1(0) + ISSR8081, Bare1(0) + ISSR8082, Sukkula + ISSR8081, Nikita E2647 + ISSR8081, Stowaway + ISSR8082, Sukkula + ISSR8082, Nikita-E2647 + ISSR8082, Stowaway + ISSR8081] değerlendirilmiştir.

Mangan ve humik asit uygulamasında IRAP ve REMAP yöntemlerinde meydana gelen bantların moleküler boyutu sırasıyla 310 bç [BARE1 (0) + 1500 ppm HA] ile 12 800 bç

(Stowaway + 1500 ppm HA) ve 128 bç (Nikita-E2647 + ISSR8081) ile 10 400 bç (Nikita- E2647+ ISSR8082) aralığında ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

IRAP sonuçlarına göre mısır bitkisinde manganın tüm dozları retrotranspozon kaynaklı polimorfizme neden olmuştur. Bu oran 20 mM'da %22,7, 40 mM'da %31,1 ve 60 mM'da %39,6 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3). Buna ilaveten mangan ile birlikte uygulanan humik asit, retrotranspozon kaynaklı polimorfizm oranında azalmalara ve aynı zamanda %GTS oranında artışa neden olmuştur. 20 mM'da oluşan %22,7'lik polimorfizm değeri humik asit uygulandıktan sonra %12,4'e, 40mM'da %31,1'de %20,7'ye ve 60 mM'da ise %39,6'dan %25,5'e kadar düştüğü görülmüştür. Yine IRAP sonuçlarına göre ağır metal konsantrasyonu arttıkça %GTS oranı en yüksek %77,3 iken %60,4'e kadar düşmüştür. Humik asit uygulamasıyla bu değer 20 mM dozda %77,3'den %87,6'a kadar, 40 mM dozda %68,9'dan 79,3'e ve 60 mM dozda %60,4'den %74,4'e kadar arttığı görülmüştür (Çizelge 4.3).

IRAP sonuçlarında olduğu gibi REMAP sonuçları manganın retrotranspozonları aktive ettiğini ve DNA hasarına yol açtığını göstermiştir. REMAP sonuçlarına göre polimorfizm oranları 20, 40 ve 60 mM için sırasıyla %25,9, %37,8, %42,0 olarak belirlenmiştir. Humik asit uygulamasından sonra ise yine sırasıyla 20, 40 ve 60 mM mangan dozlarında polimorfizm oranlarının %16,3, %17,6, %20,1'e kadar azaldığı görülmüştür. Mangan konsantrasyonuna bağlı olarak %GTS değerinde 20, 40 ve 60 mM dozda sırasıyla %74,1, %62,2 ve %58,0' a kadar azalmalar görülürken bu etki humik asit uygulamasından sonra yine sırasıyla %83,7, %82,3 ve %79,8'e yükseldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Manganın tek başına uygulamasında IRAP profilinde en düşük %GTS oranı Nikita-(N57) primerinde görülürken, en yüksek %GTS oranı Stowaway primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Yine REMAP profillerinde en düşük %GTS oranı Stowaway + 8082'de görülürken en yüksek Stowaway + 8081 primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Mangan ve humik asit uygulamasında ise IRAP yönteminde en düşük %GTS oranı Nikita-(N57) primerinde görülürken en yüksek %GTS oranı Stowaway

primerinde görülmüştür (Çizelge 4.3) mangan ve humik asit uygulamasının REMAP profilinde ise en düşük %GTS oranı Stowaway + 8082 primerinde görülürken en yüksek GTS oranı Stowaway + 8081 primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Kobalt ağır metalinde 5 IRAP primeri [(Nikita-57 N(57), Bare 1(0), Sukkula, Stowaway, Nikita-E2647)] ve REMAP tekniğinde 8 ISSR+IRAP primeri (Bare1(0) + ISSR8081, Bare1(0)+ ISSR8082, Sukkula + ISSR8081, Nikita-E2647 + ISSR8081, Stowaway + ISSR8082, Sukkula + ISSR8082, Nikita-E2647 + ISSR8082, Stowaway + ISSR8081) değerlendirilmiştir.

Kobalt ve humik asit uygulamasında IRAP ve REMAP yöntemlerinde meydana gelen bantların moleküler boyutu sırasıyla 395 bç [Nikita-E2647] ile 12 800 bç [Stowaway] ve 200 bç [Sukkula + ISSR 8081] ile 12 000 bç [Nikita-E2647 + ISSR8082 +1500 ppm HA] aralığında ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

IRAP sonuçlarına göre mısır bitkisinde kobaltın tüm dozları retrotranspozon kaynaklı polimorfizme neden olmuştur. Polimorfizm oranı 10 mM'da %26,6, 20 mM'da %28,2 ve 40 mM'da %35,6 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.7). Buna ilaveten kobalt ile birlikte uygulanan humik asit, retrotranspozon kaynaklı polimorfizm oranında azalmalara ve aynı zamanda %GTS oranında artışa neden olmuştur. 10 mM'da oluşan %26,6'lık polimorfizm değeri humik asit uygulandıktan sonra %17,8'e, 20mM'da %28,2'den %21,5'e ve 40mM'da %35,6'dan %23,4'e kadar düştüğü görülmüştür. Yine IRAP sonuçlarına göre ağır metal konsantrasyonu arttıkça %GTS oranı en yüksek %73,4 iken %64,3'e kadar düşmüştür. Humik asit uygulamasıyla bu değer 10 mM dozda %73,4' den %82,1'e kadar, 20mM dozda %71,8'den %78,5'e kadar ve 40mM dozda %64,3'den %76,6'ya kadar arttığı görülmüştür (Çizelge 4.7)

IRAP sonuçlarında olduğu gibi REMAP sonuçlarıda kobaltın retrotranspozonları aktive ettiğini ve DNA hasarına yol açtığını göstermiştir. REMAP sonuçlarına göre polimorfizm oranları 10, 20, 40 mM için sırasıyla %27,8, %33,4, %41,8 olarak belirlenmiştir. Humik asit uygulamasından sonra ise yine sırasıyla 10, 20, 40 mM

dozlarda polimorfizm oranının %19,1, %21,2, %26,8'e kadar düştüğü görülmüştür. Kobalt konsantrasyonuna bağlı olarak %GTS değerinde 10, 20 ve 40 mM sırasıyla %72,2, %66,3 ve %58,1'e kadar azalmalar görülürken humik asit uygulamasından sonra %GTS oranının yine sırasıyla %80,8, %78,8 ve %73,1'e kadar yükseldiği görülmüştür (Çizelge 4.8).

Kobaltın tek başına uygulamasında IRAP profilinde en düşük %GTS oranı Bare 1(0) primerinde görülürken, en yüksek %GTS oranı Nikita-E2647 primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Yine REMAP primerinde en düşük %GTS oranı Nikita E2647 + ISSR8082 primer kombininde görülürken en yüksek %GTS oranı Sukkula + ISSR8082 primer kombinasyonunda görülmüştür (Çizelge 4.8). Kobalt ve humik asit uygulamasında ise IRAP yönteminde düşük %GTS oranı Bare 1(0) +1500 ppm HA 'de görülürken en yüksek %GTS oranı Nikita-(N57) primerinde görülmüştür (Çizelge 4.7) Kobalt ve humik asit uygulamasının REMAP profilinde ise en düşük %GTS oranı Nikita-E2647 + ISSR8082 primerinde görülürken en yüksek %GTS oranı Sukkula + ISSR8082 primerinde görülmüştür (Çizelge 4.8).

Çinko için 5 IRAP primeri [Nikita-N (57), Sukkula, Stowaway, Nikita-E2647, WLTR2105] ve REMAP tekniğinde 6 ISSR+IRAP primeri [Nikita-E2647 + ISSR8081, Stowaway + ISSR8081, Nikita-E2647 + ISSR8082, Sukkula +ISSR8082, Sukkula + ISSR8081, Stowaway + ISSR8082] değerlendirilmiştir.

Çinko ve humik asit uygulamasında IRAP ve REMAP yöntemlerinde meydana gelen bantların moleküler boyutu 20 bç [Nikita E2647] ile 4404 bç [WLTR2105] ve 83 bç [Stowaway+ ISSR8082] ile 4704 bç [Nikita-E2647+ ISSR8081] aralığında ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10).

IRAP sonuçlarına göre mısır bitkisinde çinkonun tüm dozları retrotranspozon kaynaklı polimorfizme neden olmuştur. Polimorfizm oranı 20mM'da %37,4, 40mM'da %41,8 ve 60 mM'da %48,2 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Buna ilaveten çinko ile birlikte uygulanan humik asit retrotranspozon kaynaklı polimorfizm oranında azalmalara ve

aynı zamanda %GTS oranında ise artışa neden olmuştur. 20mM'da oluşan %37,4'lük polimorfizm değeri humik asit uygulandıktan sonra %18,8'e, 40 mM'da %41,8'den %17,9'a ve 60 mM'da ise %48,2'den %16,9'a kadar düştüğü görülmüştür. Yine IRAP sonuçlarına göre ağır metal konsantrasyonu arttıkça %GTS oranının yüksek %62,6 iken %51,8'e kadar düşmüştür. Humik asit uygulamasıyla bu değer 20 mM dozda %62,6'dan %81,2'ye, 40 mM dozda %58,2'den %82,1'e ve 60 mM dozda %51,8'den %83,0'e kadar arttığı görülmüştür (Çizelge 4.11).

IRAP sonuçlarında olduğu gibi REMAP sonuçları çinkonun retrotranspozonları aktive ettiğini göstermiştir. REMAP sonuçlarına göre polimorfizm oranları 20,40 ve 60 mM'lık dozlar için sırasıyla %25,7, %30,6, %42,0 olarak belirlenmiştir. Humik asit uygulamasından sonra ise yine sırasıyla 20, 40 ve 60 mM dozlarda polimorfizm oranlarının %15,5, %17,1, %22,5'e kadar azaldığı görülmüştür. Çinko konsantrasyonlarına bağlı olarak %GTS değerinde 20, 40 ve 60 mM dozda sırasıyla %74,3, %69,4, %58,0'a kadar azalmalar görülürken humik asit uygulamasından sonra %GTS oranının yine sırasıyla %84,5, %82,9 ve %77,5'e kadar yükseldiği görülmüştür (Çizelge 4.12).

Çinkonun tek başına uygulamasında IRAP profilinde en düşük %GTS oranı Stowaway primerinde görülürken, en yüksek %GTS oranı WLTR2105 primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Yine REMAP profillerinde en düşük %GTS oranı Sukkula + ISSR8082 primerinde görülürken en yüksek Stowaway + 8081 primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.12). çinko ve humik asit uygulamasında ise IRAP yönteminde en düşük %GTS oranı Nikita-(N57) primerinde görülürken en yüksek %GTS oranı Sukkula primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.11). çinko ve humik asit uygulamasının REMAP profilinde ise en düşük %GTS oranı Sukkula + ISSR8082 primerinde görülürken en yüksek %GTS oranı Stowaway + ISSR8082 primerinde görülmüştür (Çizelge 4.12).

Demir için 5 IRAP primeri [Nikita-N (57), Sukkula, Stowaway, Nikita-E2647, and WLTR2105] ve REMAP tekniğinde 6 ISSR+IRAP primeri [Nikita-E2647 + ISSR8081,

Stowaway + ISSR8081, Nikita-E2647 + ISSR8082, Sukkula + ISSR8082, Sukkula + ISSR8081, Stowaway+ ISSR8082] değerlendirilmiştir.

Demir ve humik asit uygulamasında IRAP ve REMAP yöntemlerinde meydana gelen bantların moleküler boyutu 76 bç (Nikita-(N57) ile 4404 bç (WLTR2105) ve 189 bç (Sukkula + ISSR8082) ile 4704 bç (Nikita-E2647 + ISSR8081) aralığında ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14).

IRAP sonuçlarına göre mısır bitkisinde demirin tüm dozları retrotranspozon kaynaklı polimorfizme neden olmuştur. Bu oran 20 mM'da %22,9, 40 mM'da %29,5 ve 60 mM'da %36,4 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.15) Buna ilaveten demir ile birlikte uygulanan humik asit retrotranspozon kaynaklı polimorfizm oranında azalmalara ve aynı zamanda %GTS oranında artışa neden olmuştur. 20 mM'da oluşan %22,9'luk polimorfizm değeri humik asit uygulandıktan sonra %8,2'ye, 40 mM'da %29,5'den %15,9'a ve 60 mM'da %36,4'den %20,3'e kadar düştüğü görülmüştür. Yine IRAP sonuçlarına göre ağır metal konsantrasyonu arttıkça %GTS oranı en yüksek %77,1 iken %63,6'ya kadar düşmüştür. Humik asit uygulamasıyla bu değer 20 mM dozda %77,1'den %91,8'e kadar, 40 mM dozda %70,5'den %84,1'e kadar ve 60 mM dozda %63,6'dan %79,7'e kadar arttığı görülmüştür (Çizelge 4.15).

IRAP sonuçlarında olduğu gibi REMAP sonuçları demirin retrotranspozonları aktive ettiğini ve DNA hasarına yol açtığını göstermiştir. REMAP sonuçlarına göre polimorfizm oranları 20, 40 ve 60 mM için sırasıyla %12,4, %21,4, %34,6 olarak belirlenmiştir. Humik asit uygulamasından sonra ise yine sırasıyla 20,40 ve 60 mM dozlarda polimorfizm oranının %4,4, %12,2 ve %20,1'e kadar azaldığı görülmüştür. demir konsantrasyonuna bağlı olarak %GTS değerinde 20, 40, ve 60 mM'da sırasıyla %87,6, %78,6, %65,4'e kadar azalmalar görülürken humik asit uygulamasından sonra %GTS oranının yine sırasıyla %95,6, %87,8, 79,9'a yükseldiği görülmüştür (Çizelge 4.16).



Demirin tek başına uygulamasında IRAP profilinde en düşük %GTS oranı WLTR2105 primerinde görülürken, en yüksek %GTS oranı Sukkula primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Yine REMAP profilinde en düşük %GTS oranı Sukkula + ISSR8082'de görülürken, en yüksek %GTS oranı Stowaway+8081 primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Demir ve humik asit uygulamasında ise IRAP yönteminde en düşük %GTS oranı Nikita-E2647 primerinde görülürken en yüksek GTS oranı Sukkula primerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Demir ve humik asit uygulamasının REMAP profilinde ise en düşük %GTS oranı Nikita-E2647 + ISSR8081 primerinde görülürken en yüksek GTS oranı Stowaway + ISSR8081 primerinde görülmüştür (Çizelge 4.16).

Elde edilen bu sonuçlara göre ağır metallerin yüksek dozlarının hem IRAP hemde REMAP analizi sonuçlarında toksik etki yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Ağır metal uygulamasının dozuna bağlı olarak %GTS oranları azalmıştır. REMAP analizlerinde polimorfizm oranının fazla olduğu görülmüştür bunun sebebinin ise bu teknikte hem retrotraspozon polimorfizminin hemde DNA hasarının değerlendirilmeye alınmasıyla açıklanabilir. Ağır metallerin toksik etkilerinin humik asit uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Mn ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| IRAP Primerleri<br>(5'→3')                    | +/- | K  | Mangan         |                |                    | Mangan + 1500 ppm Humik Asit |           |           |
|---|-----|----|----------------|----------------|--------------------|------------------------------|-----------|-----------|
|   |     |    | 20mM           | 40mM           | 60mM               | 20mM                         | 40mM      | 60mM      |
| <b>Stowaway</b><br>(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT) | +   | 11 | 12400          | 11200;931      | 12000              | 12800                        | 12800     | 11600     |
|   | -   |    | 10400          | 508            | 10400;1349         |                              | 10400     | 725       |
| <b>N57-(Nikita)</b><br>(CGCATTGTCAAGCCTAAACC) | +   | 7  | 1275           | 1314;1276;1013 | 1286;1276;1074;846 | 1295                         | 1290;1276 | 1295;1276 |
|   | -   |    | 691            | -              | -                  | -                            | -         | 691       |
| <b>Sukkula</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC) | +   | 12 | -              | 441            | 447                | -                            | -         | -         |
|   | -   |    | 8461;1363      | 8461;1363      | 8461;1363;854      | 8461                         | 8461;1363 | 8461;1363 |
| <b>Nikita-E2647</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC)  | +   | 10 | 1371           | 1156;894       | 882                | 984                          | 1261      | 1261      |
|   | -   |    | 1419           | 1091           | 1091;496           | -                            | -         | -         |
| <b>Bare 1(0)</b><br>(CTAGGGCATAATTCCAACA)     | +   | 10 | -              | -              | 368                | -                            | -         | 310       |
|   | -   |    | 1206;1178;1069 | 1206;1178;1069 | 1206;1178;1069;681 | 1206;1178                    | 1206;1178 | 1206;1178 |

**Çizelge 4.2.** Mn ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| REMAP Primerleri<br>(5'→3')   | +/- | K  | Mangan      |                 |                        | Mangan + 1500 ppm Humik Asit |             |             |
|---|-----|----|-------------|-----------------|------------------------|------------------------------|-------------|-------------|
|   |     |    | 20 mM       | 40 mM           | 60 mM                  | 20mM                         | 40mM        | 40mM        |
| <b>Nikita-E2647 + 8081</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC)  | +   | 15 | -           | 351;303         | 410;128                | 703                          | 729;370;355 | 374         |
|   | -   |    | 935;306     | 935;193;184     | 935;306;193;184        | -                            | -           | 935;658;193 |
| <b>Stowaway + 8081</b><br>(CTTATATTAGGAACGGAGGGAGT +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC)  | +   | 13 | 682         | 839;670;302     | 1113;831               | 951                          | 747         | 974         |
|   | -   |    | 1200        | -               | 1200                   | -                            | 297         | -           |
| <b>Nikita-E2647 + 8082</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC<br>+CTCTCTCTCTCTCTCTG)   | +   | 8  | 10000       | 10800           | 1200                   | -                            | -           | -           |
|   | -   |    | 10400;1211  | 10400;1211      | 10400;1211;921         | 10400;1211                   | 10400;1211  | 10400       |
| <b>Bare 1(0) +8082</b><br>(CTAGGGCATAAATTCCAACA+CTCTCTCTCTCT<br>CTCTCTG)    | +   | 8  | -           | -               | -                      | -                            | -           | -           |
|   | -   |    | 1074;859    | 1074;859        | 1074;859               | 1074                         | 1074        | 1074        |
| <b>Sukkula + 8082</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC +<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG) | +   | 10 | -           | 1155            | 371;853                | 853                          | 655         | 660         |
|   | -   |    | 281;592;719 | 1086;769;719    | 1086;7149;444          | 1086                         | 1086;719    | 1086;719    |
| <b>Sukkula + 8081</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC) | +   | 10 | 626         | -               | 337                    | 341                          | 300         | -           |
|   | -   |    | 517;249     | 800;517;249;200 | 800;295;200            | 800                          | 800         | 800;200;185 |
| <b>Stowaway + 8082</b><br>(CTTATATTAGGAACGGAGGGAGT<br>+CTCTCTCTCTCTCTCTG)   | +   | 7  | 1342        | 1801;1141;927   | 1801;1517;1191;7<br>00 | -                            | -           | 1517        |
|   | -   |    | 1414        | -               | 1414                   | -                            | -           | 1414        |
| <b>Bare 1(0) +8081</b><br>(CTAGGGCATAAATTCCAACA<br>+GAGAGAGAGAGAGAGAC)      | +   | 11 | -           | -               | -                      | -                            | -           | -           |
|   | -   |    | 669;575;429 | 669;575;528;429 | 669;575;528;429        | 508;429                      | 528;429     | 575;528;429 |

**Çizelge 4.3.** IRAP markırında Mn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| IRAP Primerleri<br>(5'→3') | KONTROL    | Mangan      |             |             | Mangan + 1500 ppp Humik Asit |             |             |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|-------------|-------------|
|                            |            | 20 mM       | 40mM        | 60mM        | 20mM                         | 40mM        | 60mM        |
| <b>Stowaway</b>            | 100        | 81,8        | 72,7        | 72,7        | 90,9                         | 81,8        | 81,8        |
| <b>N57-(Nikita)</b>        | 100        | 71,4        | 57,1        | 42,8        | 85,7                         | 71,4        | 57,1        |
| <b>Sukkula</b>             | 100        | 83,3        | 75          | 66,6        | 91,6                         | 83,3        | 83,3        |
| <b>Nikita-E2647</b>        | 100        | 80          | 70          | 70          | 90                           | 90          | 90          |
| <b>Bare 1(0)</b>           | 100        | 70          | 70          | 60          | 80                           | 80          | 70          |
| <b>%Pol.</b>               | <b>0,0</b> | <b>22,7</b> | <b>31,1</b> | <b>39,6</b> | <b>12,4</b>                  | <b>20,7</b> | <b>25,5</b> |
| <b>%GTS</b>                | <b>100</b> | <b>77,3</b> | <b>68,9</b> | <b>60,4</b> | <b>87,6</b>                  | <b>79,3</b> | <b>74,4</b> |

**Çizelge 4.4.** REMAP markırında Mn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| REMAP Primerleri<br>(5'→3') | Kontrol    | Mangan      |             |             | Mangan +1500 ppm Humik Asit |             |             |
|-----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                             |            | 20mM        | 40mM        | 60mM        | 20mM                        | 40mM        | 60mM        |
| <i>Nikita-E2647</i> +8081   | 100        | 86,6        | 66,6        | 60          | 93,3                        | 80          | 73,3        |
| <i>Stowaway</i> + 8081      | 100        | 84,6        | 76,9        | 76,9        | 92,3                        | 84,6        | 92,3        |
| <i>Nikita-E2647</i> +8082   | 100        | 62,5        | 62,5        | 50          | 75                          | 75          | 87,5        |
| <i>Bare 1(0)</i> +8082      | 100        | 75          | 75          | 75          | 87,5                        | 87,5        | 87,5        |
| <i>Sukkula</i> + 8082       | 100        | 70          | 60          | 50          | 80                          | 70          | 70          |
| <i>Sukkula</i> + 8081       | 100        | 70          | 60          | 60          | 80                          | 80          | 70          |
| <i>Stowaway</i> + 8082      | 100        | 71,4        | 57,1        | 28,5        | 100                         | 100         | 71,4        |
| <i>Bare 1(0)</i> +8081      | 100        | 72,7        | 63,6        | 63,6        | 81,8                        | 81,8        | 72,7        |
| <b>%Pol</b>                 | <b>0,0</b> | <b>25,9</b> | <b>37,8</b> | <b>42,0</b> | <b>16,3</b>                 | <b>17,6</b> | <b>20,1</b> |
| <b>%GTS</b>                 | <b>100</b> | <b>74,1</b> | <b>62,2</b> | <b>58,0</b> | <b>83,7</b>                 | <b>82,3</b> | <b>79,8</b> |

**Çizelge 4.5.** Co ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| IRAP Primerleri<br>(5'→3')                      | +/- | C  | Kobalt                 |                        |                            | Kobalt +1500 ppm Humik Asit |                   |                    |
|---|-----|----|------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
|   |     |    | 10mM                   | 20mM                   | 40mM                       | 10mM                        | 20mM              | 40mM               |
| <b>Stowaway</b><br>(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT)   | +   | 11 | 12800                  | 12400;1549             | 12800;1433                 | 12800                       | 14000             | 12800;1517         |
|   | -   |    | 10400;508              | 508                    | 10400;1349                 | 10400                       | 10400             | 10400              |
| <b>N57-(Nikita)</b><br>(CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC) | +   | 7  | 1353;1276              | 1276                   | 1276                       | 1058                        | 1042              | 1027               |
|   | -   |    | -                      | 691                    | 691                        | -                           | -                 | -                  |
| <b>Sukkula</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC)   | +   | 12 | -                      | 800                    | 6000;492                   | 6970                        | 8000              | 6460               |
|   | -   |    | 8461;854               | 8461;854               | 8461; 854                  | 8461                        | 8461;1363         | 8461;1363          |
| <b>Nikita-E2647</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC)    | +   | 10 | -                      | -                      | 705                        | -                           | 1336              | 612                |
|   | -   |    | 1091;395               | 1091;395               | 1091;395                   | 1091                        | 1091              | 1091               |
| <b>Bare 1(0)</b><br>(CTAGGGCATAATTCCAACA)       | +   | 10 | -                      | -                      | -                          | -                           | -                 | -                  |
|   | -   |    | 1206;1178;<br>1069;884 | 1206;1178;<br>1069;839 | 1206;1178;<br>1069;839;415 | 1206;1178;<br>1069          | 1206;1178;<br>839 | 1206;1178;<br>1069 |

**Çizelge 4.6.** Co ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| REMAP Primerleri<br>(5'→3')   | +/<br>- | C  | Kobalt                  |                             |                                     | Kobalt +1500 ppm Humik Asit |              |                 |
|---|---------|----|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------|-----------------|
|   |         |    | 10 mM                   | 20 mM                       | 40mM                                | 10mM                        | 20mM         | 40mM            |
| <b>Nikita-E2647 + 8081</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC)  | +       | 15 | -                       | -                           | -                                   | 1011                        | 1011;892;592 | 1016;750        |
|   | -       |    | 935;658;512;44<br>1;321 | 935;658;512;441;<br>321;147 | 935;658;512;441;3<br>21;306;193;147 | 935;441;306                 | 935;441      | 935;658;193;184 |
| <b>Stowaway + 8081</b><br>(CTTATATTAGGAACGGAGGGAGT +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC)  | +       | 13 | 1298;974;784;5<br>69    | 1322;1140;962;68<br>2;579   | 1336;792;584                        | 1336;974                    | 1387         | 1351;987        |
|   | -       |    | -                       | -                           | 1255;890;439                        | 1069                        | 1069;974     | 1069;712        |
| <b>Nikita-E2647 + 8082</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC<br>+CTCTCTCTCTCTCTG)     | +       | 8  | -                       | -                           | 592;691                             | 12000                       | 11600        | 760             |
|   | -       |    | 10400;1211;106<br>4     | 10400;1211;1064             | 10400;1211;830                      | 10400;1211                  | 10400;1211   | 10400;1211;830  |
| <b>Bare 1(0) +8082</b><br>(CTAGGGCATAATTCCAACA+CTCTCTCTCTC<br>TCTCTCTG)     | +       | 8  | 690                     | 618                         | -                                   | -                           | -            | -               |
|   | -       |    | 1074;859                | 1074;859                    | 1074;859;610                        | 1074                        | 1074         | 1074            |
| <b>Sukkula + 8082</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC +<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG) | +       | 10 | 815                     | 822                         | 807                                 | 1135                        | 1155         | 1164            |
|   | -       |    | 281                     | 719                         | 719;281                             | -                           | -            | -               |
| <b>Sukkula + 8081</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC) | +       | 10 | 577;346                 | 369                         | 341                                 | 479                         | 382          | 378             |
|   | -       |    | 800                     | 800;517;295                 | 800;295;200                         | 800                         | 800          | 800;295         |
| <b>Stowaway + 8082</b><br>(CTTATATTAGGAACGGAGGGAGT<br>+CTCTCTCTCTCTCTCTG)   | +       | 7  | 1616                    | 1130                        | 1130                                | 1548                        | 1653         | 1548            |
|   | -       |    | -                       | 867                         | 550                                 | -                           | -            | -               |
| <b>Bare 1(0) +8081</b><br>(CTAGGGCATAATTCCAACA<br>+GAGAGAGAGAGAGAGAC)       | +       | 11 | 575                     | 270                         | -                                   | -                           | -            | -               |
|   | -       |    | 379                     | 774;528                     | 575;528;379;344                     | 774                         | 774;528      | 669;575;528     |

**Çizelge 4.7.** IRAP markırında Co ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| IRAP Primerleri<br>(5'→3') | KONTROL | Kobalt |      |      | Kobalt + 1500 ppp Humik Asit |      |      |
|----------------------------|---------|--------|------|------|------------------------------|------|------|
|                            |         | 10 mM  | 20mM | 40mM | 10mM                         | 20mM | 40mM |
| Stowaway                   | 100     | 72,7   | 72,7 | 63,6 | 81,8                         | 81,8 | 72,7 |
| N57-(Nikita)               | 100     | 71,4   | 71,4 | 71,4 | 85,7                         | 85,7 | 85,7 |
| Sukkula                    | 100     | 83,3   | 75   | 66,6 | 83,3                         | 75   | 75   |
| Nikita-E2647               | 100     | 80     | 80   | 70   | 90                           | 80   | 80   |
| Bare 1(0)                  | 100     | 60     | 60   | 50   | 70                           | 70   | 70   |
| %Pol.                      | 0,0     | 26,6   | 28,2 | 35,6 | 17,8                         | 21,5 | 23,4 |
| %GTS                       | 100     | 73,4   | 71,8 | 64,3 | 82,1                         | 78,5 | 76,6 |



**Çizelge 4.8.** REMAP markırında Co ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| REMAP Primerleri<br>(5'→3') | Kontrol    | Kobalt      |             |             | Kobalt +1500 ppm Humik asit |             |             |
|-----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                             |            | 10mM        | 20mM        | 40mM        | 10mM                        | 20mM        | 40mM        |
| <i>Nikita-E2647 +8081</i>   | 100        | 66          | 60          | 46          | 73,3                        | 66          | 60          |
| <i>Stowaway + 8081</i>      | 100        | 69,2        | 61,5        | 53,8        | 76,9                        | 76,9        | 69,2        |
| <i>Nikita-E2647 +8082</i>   | 100        | 62,5        | 62,5        | 37,5        | 62,5                        | 62,5        | 50          |
| <b>Bare 1(0) +8082</b>      | 100        | 62,5        | 62,5        | 62,5        | 87,5                        | 87,5        | 87,5        |
| <b>Sukkula + 8082</b>       | 100        | 80          | 80          | 70          | 90                          | 90          | 90          |
| <b>Sukkula + 8081</b>       | 100        | 70          | 60          | 60          | 80                          | 80          | 70          |
| <b>Stowaway + 8082</b>      | 100        | 85,7        | 71,4        | 71,4        | 85,7                        | 85,7        | 85,7        |
| <b>Bare 1(0) +8081</b>      | 100        | 81,8        | 72,7        | 63,6        | 90,9                        | 81,8        | 72,7        |
| <b>%Pol</b>                 | <b>0,0</b> | <b>27,8</b> | <b>33,4</b> | <b>41,8</b> | <b>19,1</b>                 | <b>21,2</b> | <b>26,8</b> |
| <b>%GTS</b>                 | <b>100</b> | <b>72,2</b> | <b>66,3</b> | <b>58,1</b> | <b>80,8</b>                 | <b>78,8</b> | <b>73,1</b> |

**Çizelge 4.9.** Zn ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| IRAP Primerleri<br>(5'→3')                      | +/<br>- | K  | Çinko          |               |                 | Çinko + 1500 ppm Humik Asit |         |           |
|---|---------|----|----------------|---------------|-----------------|-----------------------------|---------|-----------|
|   |         |    | 20mM           | 40mM          | 60mM            | 20mM                        | 40mM    | 60mM      |
| <b>Stowaway</b><br>(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT)   | +       | 6  | 1443;1717;3103 | 1400;3199     | 2417;3000       | 3102                        | 3000    | -         |
|   | -       |    | 2091           | 1264;2655     | 1264;2091;2655  | 2091                        | -       | -         |
| <b>N57-(Nikita)</b><br>(CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC) | +       | 13 | 526;913;1764   | 488;1633      | 540;1714        | 512;853                     | 1602    | -         |
|   | -       |    | 34;1450        | 34;1450       | 34;173;706;1714 | 34;274                      | 34;1450 | -         |
| <b>Sukkula</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC)   | +       | 10 | -              | -             | -               | -                           | 611;781 | -         |
|   | -       |    | 436;1540;2212  | 854;1540;2212 | 403;1540;2212   | -                           | -       | 282       |
| <b>Nikita-E2647</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC)    | +       | 13 | 1811           | 486;1811      | 1778            | 1746                        | 1746    | 1689      |
|   | -       |    | 186;223        | 20;717;1371   | 20;266;717;1371 | 186                         | 1371    | 223;1371  |
| <b>WLTR2105</b><br>(ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA)    | +       | 10 | -              | 2544          | 3783            | 2441                        | 1440    | 1374;2441 |
|   | -       |    | 463;750        | 463;1881      | 463;4404        | -                           | -       | -         |

**Çizelge 4.10.** Zn ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| REMAP Primerleri<br>(5'→3')   | +/<br>- | C  | Çinko          |                            |                                | Çinko + 1500 ppm Humik Asit |          |          |
|---|---------|----|----------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------|----------|
|   |         |    | 20 mM          | 40 mM                      | 60 mM                          | 20mM                        | 40mM     | 40mM     |
| <b>Nikita-E2647 + 8081</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC + GAGAGAGAGAGAGAGAC)     | +       | 11 | -              | -                          | -                              | 390                         | -        | -        |
|   | -       |    | 2957;3444;4704 | 454;717;2957;<br>3444;4704 | 104;454;717;2957;3<br>444;4704 | 3444                        | 454;3444 | 454;3444 |
| <b>Stowaway + 8081</b><br>(CTTATATTAGGAACGGAGGGAGT +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC)  | +       | 9  | -              | 947                        | 972;1515                       | -                           | -        | -        |
|   | -       |    | 2564           | 849                        | 849;1373                       | -                           | -        | 417      |
| <b>Nikita-E2647 + 8082</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC +CTCTCTCTCTCTCTCTG)      | +       | 7  | 443;1239       | -                          | 700                            | -                           | -        | -        |
|   | -       |    | -              | 1379                       | 1379                           | 1379                        | -        | 412;901  |
| <b>Sukkula + 8082</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC +<br>CTCTCTCTCTCTCTCTG) | +       | 6  | 1375;2464      | 1786;2464                  | -                              | 2218                        | 452;2085 | 855      |
|   | -       |    | -              | 189                        | 2270;1710                      | 189                         | 189      | 189;284  |
| <b>Sukkula + 8081</b><br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC +<br>GAGAGAGAGAGAGAGAC) | +       | 14 | -              | 2161                       | 3132                           | -                           | 2204     | -        |
|   | -       |    | 218;309        | 309;1331                   | 52;248;357;677;<br>1598        | 248                         | 357      | 309      |
| <b>Stowaway + 8082</b><br>(CTTATATTAGGAACGGAGGGAGT<br>+CTCTCTCTCTCTCTCTG)   | +       | 10 | 583            | -                          | 321                            | -                           | 2619     | 2619     |
|   | -       |    | 83;843         | 83;1343;1531               | 83;109;1531                    | 83;372                      | 1531     | 1531     |

**Çizelge 4.11.** IRAP markırında Zn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| IRAP Primerleri<br>(5'→3') | KONTROL    | Çinko       |             |             | Çinko + 1500 ppp Humik Asit |             |             |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                            |            | 20mM        | 40mM        | 60mM        | 20mM                        | 40mM        | 60mM        |
| <b>Stowaway</b>            | 100        | 33,3        | 33,3        | 16,6        | 66,6                        | 83,3        | 81,8        |
| <b>N57-(Nikita)</b>        | 100        | 61,5        | 69,2        | 53,8        | 69,2                        | 69,2        | 57,1        |
| <b>Sukkula</b>             | 100        | 70          | 70          | 70          | 100                         | 80          | 83,3        |
| <b>Nikita-E2647</b>        | 100        | 69,2        | 61,5        | 61,5        | 84,6                        | 84,6        | 90          |
| <b>WLTR2105</b>            | 100        | 80          | 70          | 70          | 90                          | 90          | 70          |
| <b>%Pol.</b>               | <b>0,0</b> | <b>37,4</b> | <b>41,8</b> | <b>48,2</b> | <b>18,8</b>                 | <b>17,9</b> | <b>16,9</b> |
| <b>%GTS</b>                | <b>100</b> | <b>62,6</b> | <b>58,2</b> | <b>51,8</b> | <b>81,2</b>                 | <b>82,1</b> | <b>83,1</b> |

**Çizelge 4.12.** REMAP markırında Zn ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| REMAP Primers<br>(5'→3')  | Kontrol    | Çinko       |             |             | Çinko +1500 ppm Humik asit |             |             |
|---------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|-------------|-------------|
|                           |            | 20mM        | 40mM        | 60mM        | 20mM                       | 40mM        | 60mM        |
| <i>Nikita-E2647 +8081</i> | 100        | 72,7        | 54,5        | 60          | 93,3                       | 80          | 73,3        |
| <i>Stowaway + 8081</i>    | 100        | 88,8        | 77,7        | 76,9        | 92,3                       | 84,6        | 92,3        |
| <i>Nikita-E2647 +8082</i> | 100        | 71,4        | 85,7        | 50          | 75                         | 75          | 87,5        |
| <i>Sukkula + 8082</i>     | 100        | 66,6        | 50          | 50          | 80                         | 70          | 70          |
| <i>Sukkula + 8081</i>     | 100        | 85,7        | 78,5        | 60          | 80                         | 80          | 70          |
| <i>Stowaway + 8082</i>    | 100        | 70          | 70          | 28,5        | 100                        | 100         | 71,4        |
| <b>%Pol</b>               | <b>0,0</b> | <b>25,7</b> | <b>30,6</b> | <b>42,0</b> | <b>15,5</b>                | <b>17,1</b> | <b>22,5</b> |
| <b>%GTS</b>               | <b>100</b> | <b>74,3</b> | <b>69,4</b> | <b>58,0</b> | <b>84,5</b>                | <b>82,9</b> | <b>77,5</b> |

**Çizelge 4.13.** Fe ve HA uygulamasında IRAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| IRAP Primerler<br>(5'→3')                       | +/- | K  | Demir     |                |                   | Demir +1500 ppm Humik asit |              |               |
|---|-----|----|-----------|----------------|-------------------|----------------------------|--------------|---------------|
|   |     |    | 20mM      | 40mM           | 60mM              | 20mM                       | 40mM         | 60mM          |
| <b>Stowaway</b><br>(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT)   | +   | 6  | 911;1692  | 911            | -                 | -                          | 1727         | -             |
|   | -   |    | -         | -              | 1244;1581         | -                          | -            | 1581          |
| <b>N57-(Nikita)</b><br>(CGCATTGTTC AAGCCTAAACC) | +   | 13 | -         | -              | -                 | -                          | -            | -             |
|   | -   |    | 76;706    | 274;706        | 274;706;1450;1537 | 219                        | 706          | 173;1450;1537 |
| Sukkula<br>(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC)          | +   | 10 | -         | -              | 515               | 515                        | -            | -             |
|   | -   |    | -         | 1540;2192      | 132;180           | -                          | 1540         | 2212          |
| <b>Nikita-E2647</b><br>(ACCCCTCTAGGCGACATCC)    | +   | 13 | 1811      | 1504;1645      | -                 | 1746                       | 1919         | -             |
|   | -   |    | 80;717    | 266;717;1371   | 223;717;1371;1579 | 266;1371                   | 186;717;1371 | 717;1371;1579 |
| <b>WLTR2105</b><br>(ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA)    | +   | 7  | 2185;3412 | 2544;3412;6408 | 2441              | -                          | -            | 2594          |
|   | -   |    | 463       | 463;1881       | 463;1881;4404     | -                          | 463          | 463           |

**Çizelge 4.14.** Fe ve HA uygulamasında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlığı (bp)

| REMAP Primers (5'→3')   | +/- | C  | Demir     |                |                         | Demir +1500 ppm Humik asit |                    |                        |
|---|-----|----|-----------|----------------|-------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------|
|   |     |    | 20 mM     | 40 mM          | 60mM                    | 20mM                       | 40mM               | 60mM                   |
| <i>Nikita-E2647 + 8081</i><br>( <i>ACCCCTCTAGGCGACATCC + GAGAGAGAGAGAGAGAC</i> )  | +   | 11 | -         | -              | -                       | -                          | -                  | -                      |
|   | -   |    | 454       | 2957;3444;4704 | 454;1170;2957;3444;4704 | 3444                       | 717;2957;3444;4704 | 454;717;2957;3444;4704 |
| <i>Stowaway + 8081</i><br>( <i>CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT + GAGAGAGAGAGAGAGAC</i> ) | +   | 9  | -         | -              | -                       | -                          | -                  | -                      |
|   | -   |    | -         | -              | 849;2564                | -                          | -                  | -                      |
| <i>Nikita-E2647 + 8082</i><br>( <i>ACCCCTCTAGGCGACATCC +CTCTCTCTCTCTCTCTG</i> )   | +   | 7  | 380       | 378            | 356                     | -                          | -                  | -                      |
|   | -   |    | -         | -              | 514                     | -                          | -                  | 1379                   |
| <i>Sukkula + 8082</i><br>( <i>GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC + CTCTCTCTCTCTCTCTG</i> ) | +   | 6  | -         | -              | -                       | -                          | -                  | 309                    |
|   | -   |    | 189       | 189;1121       | 189;229;1121            | -                          | 1121               | 1121;189               |
| <i>Sukkula + 8081</i> ( <i>GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC + GAGAGAGAGAGAGAGAC</i> )    | +   | 14 | -         | -              | -                       | -                          | -                  | 309                    |
|   | -   |    | 309;218   | 677;309        | 677;309;248             | 417                        | -                  | -                      |
| <i>Stowaway + 8082</i><br>( <i>CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT +CTCTCTCTCTCTCTCTG</i> )  | +   | 10 | -         | -              | 511                     | -                          | -                  | -                      |
|   | -   |    | 1531;1343 | 843;1343;1531  | 1343;1531;1695          | 1343                       | 1531;1343          | 1531;1343              |

**Çizelge 4.15.** IRAP markırında Fe ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

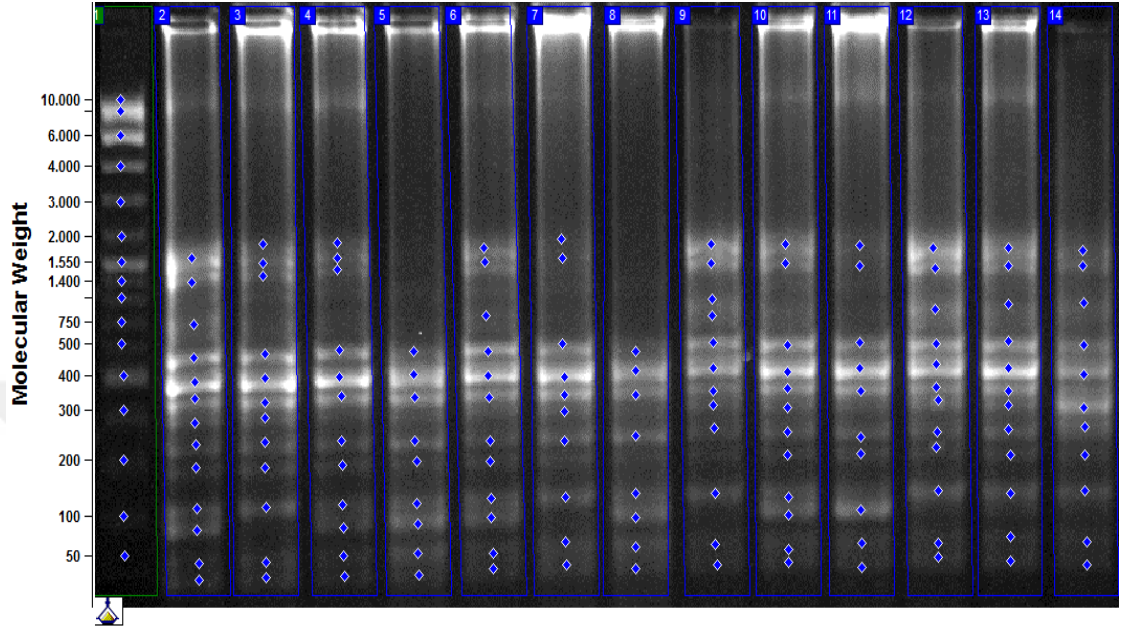
| IRAP Primers<br>(5'→3') | KONTROL    | Demir       |             |             | Demir + 1500 ppp Humik asit |             |             |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                         |            | 20mM        | 40mM        | 60mM        | 20mM                        | 40mM        | 60mM        |
| <b>Stowaway</b>         | 100        | 66,6        | 83,3        | 66,6        | 100                         | 83,3        | 83,3        |
| <b>N57-(Nikita)</b>     | 100        | 84,6        | 84,6        | 69,23       | 92,3                        | 92,3        | 76,9        |
| <b>Sukkula</b>          | 100        | 100         | 80          | 70          | 90                          | 90          | 90          |
| <b>Nikita-E2647</b>     | 100        | 76,9        | 61,53       | 69,23       | 76,9                        | 69,23       | 76,9        |
| <b>WLTR2105</b>         | 100        | 57,14       | 28,57       | 42,85       | 100                         | 85,7        | 71,42       |
| <b>%Pol.</b>            | <b>0,0</b> | <b>22,9</b> | <b>29,5</b> | <b>36,4</b> | <b>8,2</b>                  | <b>15,9</b> | <b>20,3</b> |
| <b>%GTS</b>             | <b>100</b> | <b>77,1</b> | <b>70,5</b> | <b>63,6</b> | <b>91,8</b>                 | <b>84,1</b> | <b>79,7</b> |



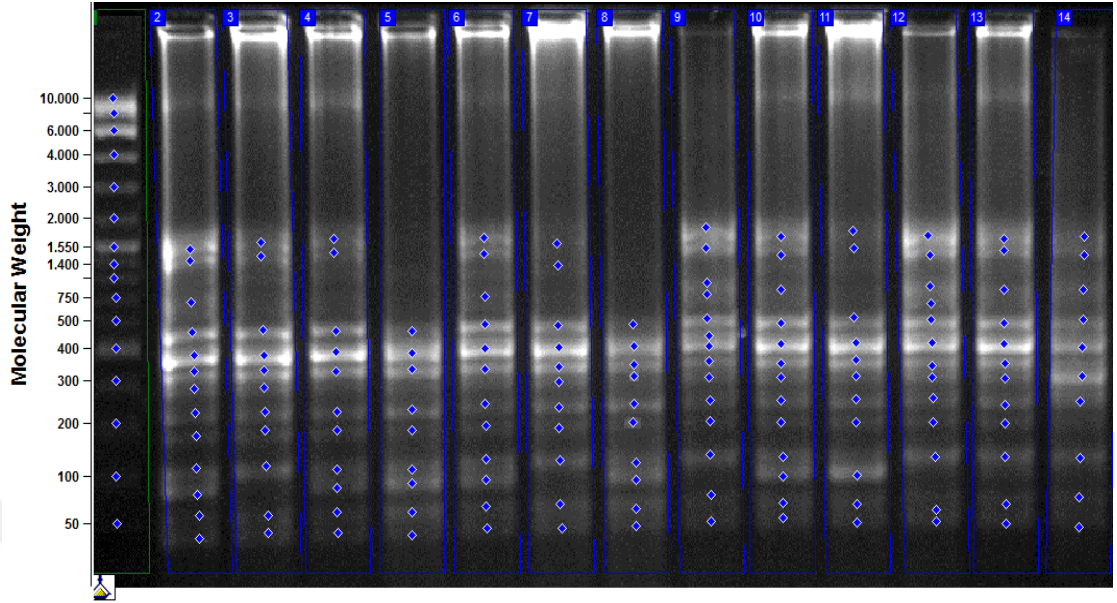
**Çizelge 4.16.** REMAP markırında Fe ve HA uygulamasına göre genomik kararlılık sabitliliği oranları (%GTS)

| REMAP Primers<br>(5'→3') | Kontrol    | Demir       |             |             | Demir+1500 ppm Humik asit |             |             |
|--------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------|-------------|
|                          |            | 20mM        | 40mM        | 60mM        | 20mM                      | 40mM        | 60mM        |
| <i>Nikita-E2647+8081</i> | 100        | 90          | 72,7        | 54,5        | 90                        | 63,6        | 54,54       |
| <b>Stowaway+8081</b>     | 100        | 100         | 100         | 77,7        | 100                       | 100         | 100         |
| <i>Nikita-E2647+8082</i> | 100        | 85,7        | 85,7        | 71,42       | 100                       | 100         | 85,7        |
| <b>Sukkula+8082</b>      | 100        | 83,3        | 66,6        | 50          | 100                       | 83,3        | 50          |
| <b>Sukkula+8081</b>      | 100        | 85,7        | 85,71       | 78,57       | 92,85                     | 100         | 92,85       |
| <b>Stowaway+8082</b>     | 100        | 80          | 70          | 60          | 90                        | 80          | 80          |
| <b>%Pol</b>              | <b>0,0</b> | <b>12,4</b> | <b>21,4</b> | <b>34,6</b> | <b>4,4</b>                | <b>12,2</b> | <b>20,1</b> |
| <b>%GTS</b>              | <b>100</b> | <b>87,6</b> | <b>78,6</b> | <b>65,4</b> | <b>95,6</b>               | <b>87,8</b> | <b>79,9</b> |

#### 4.2. IRAP-REMAP Jel Görüntüleri

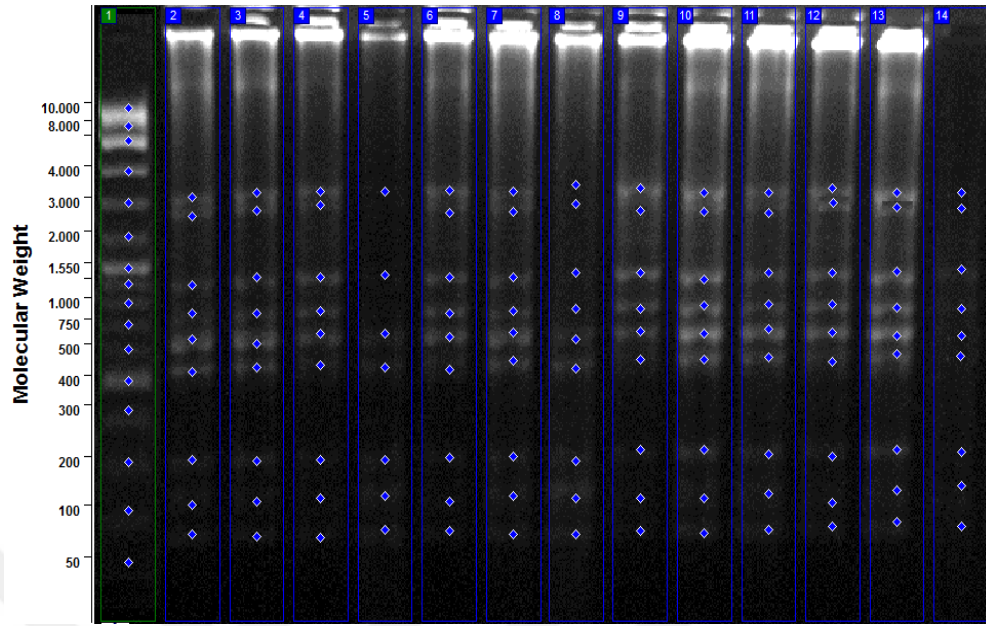


**Şekil 4.1.** E2647-IRAP primerine karşı oluşan (Demir-Çinko) amplifikasyon ürünleri  
 1;Markır D7058, 2;Kontrol 3;Demir 20 mM, 4;Demir 40 mM, 5;Demir 60 mM, 6;Demir 20 mM + Humik Asit 1500 ppm, 7; Demir 40 mM + Humik Asit 1500 ppm, 8; Demir 60 mM + Humik Asit 1500 ppm 9; Çinko 20 mM 10; Çinko 40 mM, 11; Çinko 60 mM, 12; Çinko 20 mM + Humik Asit 1500 ppm, 13; Çinko 40 mM + Humik Asit 1500 ppm, 14; Çinko 60 mM + Humik Asit 1500 ppm



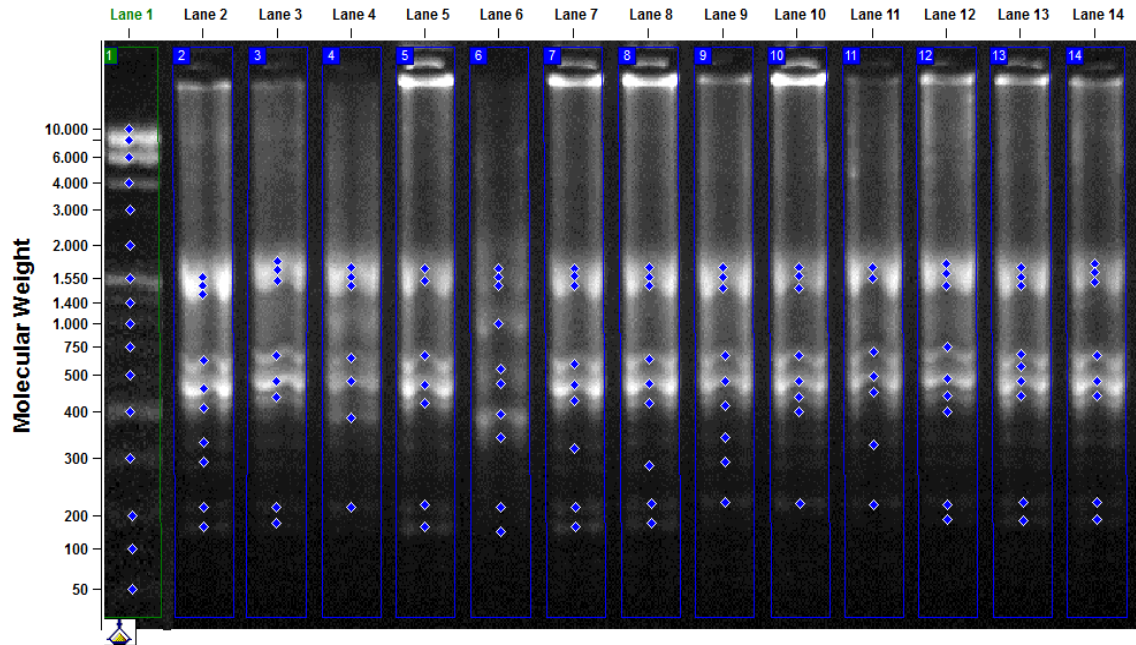
**Şekil 4.2.** Nikita-N57-IRAP primerine karşı oluşan (Demir-Çinko) amplifikasyon ürünleri

1;Markır D7058, 2;Kontrol 3;Demir 20 mM, 4;Demir 40 mM, 5;Demir 60 mM, 6;Demir 20 mM + Humik Asit 1500 ppm, 7; Demir 40 mM + Humik Asit 1500 ppm, 8; Demir 60 mM + Humik Asit 1500 ppm 9; Çinko 20 mM 10; Çinko 40 mM, 11; Çinko 60 mM, 12; Çinko 20 mM + Humik Asit 1500 ppm, 13; Çinko 40 mM + Humik Asit 1500 ppm, 14; Çinko 60 mM + Humik Asit 1500 ppm



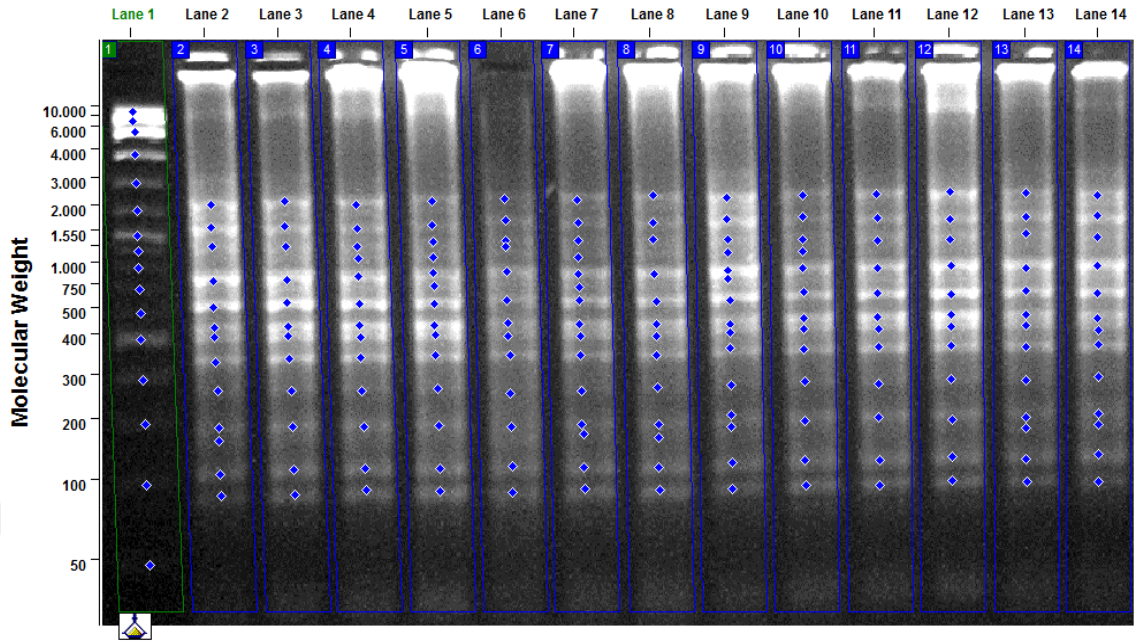
**Şekil 4.3.** Stowaway+8081-REMAP primerine karşı oluşan (Demir-Çinko) amplifikasyon ürünleri

1;Markır D7058, 2;Kontrol 3;Demir 20 mM, 4;Demir 40 mM, 5;Demir 60 mM, 6;Demir 20 mM + Humik Asit 1500 ppm, 7; Demir 40 mM + Humik Asit 1500 ppm, 8; Demir 60 mM + Humik Asit 1500 ppm 9; Çinko 20 mM 10; Çinko 40 mM, 11; Çinko 60 mM, 12; Çinko 20 mM + Humik Asit 1500 ppm, 13; Çinko 40 mM + Humik Asit 1500 ppm, 14; Çinko 60 mM + Humik Asit 1500 ppm



**Şekil 4.4.** E2647-IRAP primerine karşı oluşan (Mangan-Kobalt) amplifikasyon ürünleri

1;Markır D7058, 2;Kontrol 3;Mangan 20 mM, 4; Mangan 40 mM, 5; Mangan 60 mM, 6; Mangan 20 mM + Humik Asit 1500ppm, 7; Mangan 40 mM + Humik asit 1500 ppm, 8; Mangan 60 mM + Humik Asit 1500 ppm 9; Kobalt 10 mM 10; Kobalt 20 mM, 11; Kobalt 40 mM, 12; Kobalt 10 mM + Humik Asit 1500 ppm, 13; Kobalt 20 mM + Humik asit 1500 ppm, 14; Kobalt 40 mM+ Humik Asit 1500 ppm



**Şekil 4.5.** Stowaway+8081-REMAP primerine karşı oluşan (Mangan- Kobalt) amplifikasyon ürünleri

1; Markır D7058, 2;Kontrol 3;Mangan 20 mM, 4; Mangan 40 mM, 5; Mangan 60 mM, 6; Mangan 20 mM + Humik Asit 1500ppm, 7; Mangan 40 mM + Humik asit 1500 ppm, 8; Mangan 60 mM + Humik Asit 1500 ppm 9; Kobalt 10 Mm 10; Kobalt 20 mM, 11; Kobalt 40 mM, 12; Kobalt 10 mM + Humik Asit 1500 ppm, 13; Kobalt 20 mM + Humik asit 1500 ppm, 14; Kobalt 40 mM + Humik Asit 1500 ppm

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel aktiviteler, tarımda gübre ve pestisit kullanımı, şehir atıkları, volkanik aktiviteler, madencilik, maden eritme (döküm) ve arıtma çamurunun atılması ile ortamda biriken ağır metaller özellikle bitkiler olmak üzere bütün canlı organizmaları tehdit etmektedir. Bu etkiler ortamda çevre kirliliğini ortaya çıkarmakta ve bitkiler için biyotik ve abiyotik stres koşullarına neden olmaktadır. Toprakta düşük dozda bulunan esansiyel mikroelementler bitkilerin gelişimi için gereklidirler ve ortamda bulunma oranı aşılırsa bitkiler için büyüme ve canlılıkta azalma gibi streslere neden olurlar (Zengin 2006). Bazı ağır metaller ise (kadmiyum, kurşun, civa, arsenik vd.) bitkiler için gerekli değildir ve varlıklarında bitki üzerine yüksek derecede toksik etki yaparlar. Bu elementler toprakta bulunduğu geniş alanda zararlı olabilir bitkileri etkileyerek gıda zincirinde hayvan ve insanları olumsuz şekilde etkilemektedirler.

Ağır metallerin dokuda fazla miktarda bulunması bitkide stresi ortaya çıkararak ve çimlenme, enzim aktivitesi, transpirasyon, mineral besin alımı, stoma hareketleri, fotosentez, nükleik asit yapısı, su absorpsiyonu, protein sentezi, membran stabilitesi ve hormonal denge bozuklukları gibi birçok metabolik olayın bozulmasına neden olmaktadır (Kennedy and Gonsalves 1987).

Kobalt elementi genellikle bitkiler için faydalı olarak tanımlanır fakat tarımsal kirleticilerden dolayı toksik olabilir. Kobaltın fitotoksitesisi üzerine birçok çalışma mevcuttur. Arpa, kolza ve domateste kobaltın fitotoksitesisi üzerine yapılan çalışmalarda bitki büyümesini ve biyokütleyi etkilediği görülmüştür (Li *et al.* 2009). Kobaltın bir diğer fitotoksik etkisi ise transpirasyon oranı ve su potansiyelini azaltmasıdır (Chatterjee and Chatterjee 2000).

Çinko uygun konsantrasyonlarda protein ve enzimlerin yapısal ve katalitik bileşenleri ve bitkinin normal büyüme ve gelişmesinde temel kofaktör olarak gereklidir (Moustakas 1994). Çinko mikrobesein elementinin ortamda birikimi artarsa bitki

büyümesine ve bitkinin canlılığını azalmasına yol açarak fitotoksositeye neden olur. Ortamda fazla miktarda çinko biriktiğinde bitkilerin kök ve sürgün büyümesi azalır, kökler incilir, genç yapraklar kıvrılır ve klorosis görülür, hücre büyümesi ve uzaması engellenir, hücre organelleri parçalanır ve klorofil sentezi azalır (Roat and Das 2003). Çinko çeşitli bitki türlerinde oksidatif hasarı başlatır ve metabolizma, gelişme ve büyümeyi azaltarak toksik etkisini gösterir (Nagojyati *et al.* 2010).

Mangan bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için esansiyeldir. Manganın aşırı miktarda birikimi yapraklarda fotosentez olayında azalmalara neden olmuştur. Mangan fitotoksitesinin en büyük etkisi dokularda kahverengi lekelerin oluşmasıdır (Nagojyati *et al.* 2010).

Demir bütün bitkiler için temel besin elementlerindedir ve birçok metabolik süreçte önemli bir rol oynar. Klorofil sentezi, kloroplast gelişimi ve fotosentez gibi hücresel olaylarda oldukça önemlidir. Demir aynı zamanda SOD, akonitaz, ferrodoksini içeren demir-sülfür proteinleri ve leghemoglobin, peroksidaz, katalaz, sitokromları içeren hemi proteinler gibi hücre redoks sistemlerinin ana bileşenidir (Higuchi *et al.* 1995). Bitkilerde demir toksitesinin ortaya çıkışı terleme akışı, yapraklardan transpirasyon yoluyla ve köklerden yüksek demir alımıyla ilgilidir (Arora *et al.* 2002; De Dorlodot *et al.* 2005). Metaller çimlenme oranında azalmalara yol açarak proteinlere zarar vermektedir (Nanda *et al.* 2016).

Diğer abiyotik stres faktörleri gibi ağır metallerde bitkilerin genetik materyalleri üzerine olumsuz etki yaparlar. Genetik hasarlar çeşitli kimyasal olaylarla devam eder ve sonunda ağır metal stresi oksidatif stresi oluşturur ve bu stres sonucunda DNA'da mutasyonla sonuçlanacak hasarlar meydana gelir (Blokina *et al.* 2003; Kasprzak 1995). Oksidatif stres sonucu oluşan hidroksil radikali DNA'yı etkiler serbest bazların oluşumuna, ipliklerin kırılmasına, genomun yeniden düzenlenmesine, depürinasyonlar hem apürinik hemde apimidinik bölgelerin oluşmasına ve çapraz bağlantının ortaya çıkmasına neden olur. Çift zincirdeki kırılmalar homolog rekombinasyon tarafından kısmen onarılabilir. Homolog rekombinasyonun ve nokta mutasyonların sıklığı ağır

metaller tarafından oluşturulan DNA hasarının düzeyini yansıtır (Kovalchuk *et al.* 2001). Bu mutasyonlar allelik DNA varyasyonunu etkileyebilir ve allellerin ifadesi ebeveynlerden döllere aktarılabilen fenotipik varyasyon yaratabilir (Grativol *et al.* 2012). Bitkilerde kromatinlerin durumları small RNA'ların mekanizmaları ve kromatinlerin yeniden şekillenmesi için N-terminal histon kuyruklarının metilasyonu, asetilasyonu, DNA metiltransferaz tarafından sitozinde metil gruplarının sokulmasıyla geri çevrilebilir ve hızlıca modifiye edilebilir. Bu tip modifikasyonlarda temel nükleotid yapısı değişmeksizin DNA aktivitesi değişir bu durum ise epigenetik değişiklik olarak ifade edilir. Epigenetik mekanizmalar siRNA, DNA metilasyonu ve demetilasyonu ve histon modifikasyonları içerir. Epigenetik modifikasyonlar genomun baskılanmasında, paramutasyonda, transpozonların çoğalmasına karşı savunmada ve transkripsiyonel gen susturmada önemli rol oynar (Chinnusamy *et al.* 2004). Transposon elementleri gelişim boyunca gen ifadelerini düzenlemek için uyumlu şekilde transpoze olabilirler ve birçok stres koşulları altında genomun yeniden yapılandırılmasında işlev görürler (Cui and Cao 2014)

Ağır metal stresi bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevapları başlatmakta ve bitkiler uygun olmayan çevre koşullarında evrim sürecinde geliştirdikleri çeşitli adaptasyon mekanizmaları yoluyla hayatta kalmaya çalışırlar (Kalefetoğlu and Ekmekci 2005). Bitkiler stress koşulları altında oluşan strese karşı moleküler seviyede cevap mekanizmaları oluşturabilir ve bunun sonucunda bitkide strese karşı bazı genler aktif hale geçebilir (Bartels and Sunkar 2005). Bu genlerin ifade ettikleri ürünler hücrenin iç ve dış ortamla iletişimde (signaling) transkripsiyonel olarak genlerin kontrol edilmesinde, hücre zarı ve proteinlerin korunmasında, serbest radikallerin ve toksinlerin temizlemede işlev görmektedir (Wang *et al.* 2003). Moleküler düzeyde ağır matellere karşı direnç genlerinin aktifleştirilmesinin yanı sıra organizmanın normal gelişim dönemlerinde inaktif halde bulunan farklı stres etmenleriyle aktif hale gelen bitki retrotranspozonlarının hareketi ortaya çıkmaktadır. Bitkilerin gelişiminde ve biyotik ve abiyotik strese cevap mekanizmasında miRNA ve siRNA çok önemli rol oynarlar. Soğuk, sıcaklık, patojenler, ağır metal gibi stres şartlarında bitki cevaplarının miRNA ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Grativol *et al.*



2012). DNA metilasyonu, histon deasetilasyonu, histone H3 lizin-9 metilasyon (H3mK9) ve RNAi (RNA interferas) transpozonların hareketiyle ilişkilidirler (Lippman *et al.* 2003). Ağır metaller toksik etkilerini direkt olarak DNA'ya bağlanarak ya da protein denatürasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonları ve serbest oksijen radikalleri (ROS), serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürerek (oksidatif stres) ya da DNA metilasyonunda değişikliğe neden olarak indirekt yolla gösterdikleri belirtilmiştir (Bai *et al.* 2003). Ancak, biyotik ve abiyotik strese neden olan bazı çevresel nedenler DNA demetilasyonu yoluyla transpozonları harekete geçirmektedir (Grandbastien 2005).

Mısır genomunun neredeyse %70'den fazlasını retrotranspozonlar oluşturur (Bennetzen 2000). Retrotranspozonların en bol sınıfı olan LTR retrotranspozonları bitki genomlarının çeşitliliğine önemli ölçüde katkı sağlar ve bazı durumlarda neredeyse genomun yarısını teşkil ederler (San Miguel *et al.* 1996; Kumar and Bennetzen 1999; Schulman and Kalendar 2005; Vitte and Panaud 2005). Ağır metal stresinin retrotranspozonlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Retrotranspozonların çoğunluğu bitkide normal şartlarda büyüme ve gelişme boyunca inaktif halde olup biyotik ve abiyotik stress koşulları altında aktif şekle geçmektedir ve böylece bitkilerde genetik çeşitlilik ortaya çıkmaktadır (Kumar and Bennetzen 1999). Farklı stres şartlarının da bitki retrotranspozonlarını etkilediği bilinir. Örneğin; donma, enfeksiyon, mekanik hasar, *in vitro* rejenerasyon, hibridizasyon gibi biyotik ve abiyotik stres faktörleri aktif LTR retrotranspozonlarının çeşitli transkripsiyonel ekspresyonunu artırmıştır (Mansour 2007). Bitki retrotranspozonlarında transkripsiyon basamakları dokuya özel ortaya çıkmaktadır. örneğin; tütünde (Pouteau *et al.* 1991, 1994; Hirochika 1993; Moreau-Mhiri *et al.* 1996; Grandbastien *et al.* 1997) Tto1 ve Tnt1 elementleri ve pirinçte (Hirochika *et al.* 1996) Tos elementlerinde farklı stress koşulları altında büyük oranda artış görülmüştür (Tapia *et al.* 2005). Domates ve Arabidopsis gibi heterolog türlerde Tnt1 promotörünün donma, yaralanma ve salisilik asit, CuCl<sub>2</sub> stresi, oksidatif stres gibi diğer abiyotik faktörler tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (Mhiri *et al.* 1997).

Woodrow *et al.* (2010) yapmış oldukları bir çalışmada *Triticum durum* L. bitkisinden Ttd1a olarak adlandırılan Ty1-copia benzeri retrotranspozon izole etmiş ve bu genin stres altında hareketini incelemişlerdir. Stres altında Ttd1a' nın insersiyon polimorfizmi taranmıştır ve bu taramada direnç geninin yakınlarında yeni eklemeler olduğu görülmüştür. Ttd1a' nın aktivasyonu ve hareketi tuz ve ışık stresi ile kontrol edildiği ve çevresel strese cevap olarak bitkide önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir.

Bu bilgilerle hareketle çalışmamızda toprakta ve bitki dokusunda fazla miktarda bulunduğu toksik etkiye neden olan ağır metaller (çinko, mangan, kobalt, mangan ve demir) in *Zea mays* L. tohumlarında meydana getirmiş olduğu retrotranspozon uyarıcı polimorfizm ve DNA hasarının belirlenmesi ve ortaya çıkan polimorfizm ve DNA hasarı üzerine humik asitin koruyucu rolü araştırmamızda ağır metallerin mısır tohumlarında retrotranspozon polimorfizmi ve DNA hasarını neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu polimorfizmler yeni bantların ortaya çıkışı, var olan bantların kaybolması ve bant yoğunluğundaki değişiklikler olarak ortaya çıkmıştır. Genomik kararlılık sabitliliği (GTS) farklı ajanların genotoksik etkisini ve DNA tamiri ve replikasyon etkinliğini belirlemek için kullanılan nicel bir ölçümdür. Çalışmamızda kullanılan tüm ağır metallerin IRAP ve REMAP profilinde ortaya çıkardığı polimorfizmin artışı ve GTS oranlarında doz artışına bağlı olarak azaldığı fakat humik asit uygulamasından sonra polimorfizmin azalmış ve GTS oranlarında artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.7, Çizelge 4.8, Çizelge 4.11, çizelge 4.12, Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16).

IRAP ve REMAP profillerinde ki bantların polimorfizm sebebi retrotranspozon hareketliliği ve DNA hasarı olarak açıklanabilir. Ağır metaller bitki genomlarında mutasyonla sonuçlanacak değişikliklere neden olurlar. Genomda ortaya çıkan bu mutasyonlar IRAP ve REMAP primerlerinin bu bölgeler ile eşleşmesini engelleyecek ve bu bölgeler çoğaltılamayacaktır. Ağır metaller aynı zamanda DNA da tek yada çift zincirde kırıklara neden olur ve bu bölgeler çoğaltılamaz hale gelir buda bant kayıplarına neden olur. Yeni bantların oluşması ise DNA üzerinde meydana gelen baz mutasyonları yeni bağlanma bölgeleri oluşturur. Ağır metal uygulamasının artan

konsantrasyonlarına bağlı olarak azalan GTS oranının ise DNA'da oluşan hasara ve DNA replikasyonu ve tamir mekanizmasında ki aksaklıklardan dolayı olduğu bildirilmiştir. Yüksek GTS oranının DNA' nın değişikliklere daha az eğimli olduğunu, düşük GTS oranının ise DNA'daki değişikliklerin daha fazla olduğunu göstermektedir. Organizmada hasar onarım sistemlerinin varlığında yüksek DNA hasarı yerine yüksek GTS oranı görülebilir fakat DNA hasarının fazla olması onarım ve replikasyonu inhibe edebilir (Pal and Kundu 2015). Ağır metal stresine bağlı olarak genomik kararlılık sabitliliği reaktif oksijen türlerinin artmasıyla DNA'da ortaya çıkan hasardan dolayı ortaya çıkmasına bağlanılabilir (Yıldırım *et al.* 2014).

Son yıllarda moleküler biyolojide gelişmelere bağlı olarak ağır metallerin retrotranspozonlar üzerindeki etkisini belirlemek için çok hassas retrotranspozon kaynaklı moleküler markırlar kullanılmaktadır. Retrotranspozonlara bağlı olarak ortaya çıkan polimorfizm belirlenmesinde IRAP (Inter-Retrotransposons amplified polymorphisms), REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), RIBP (Retrotransposon Based İnsertional Polymorphism), ve S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism) gibi moleküler markırlar yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Kalendar *et al.* 2011).

Manganın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak polimorfizm oranının giderek arttığı görülürken GTS oranının ise artan doza bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Bitki dokularında manganın fazlalığı hüresel DNA replikasyonunu ve protein sentezini ciddi oranda etkiler (El-Jaoual and Cox 1998; Foy *et al.* 1978). DNA metilasyonu transpozon çoğalmasını sınırlar ve DNA demetilasyonu ise retrotranspozon harekete geçirir. IRAP ve REMAP tekniğinde oluşan yüksek derecede retrotranspozon hareketinin DNA demetilasyondan kaynakladığı sylenabilir.

Çinko uygulamasında doz artışına bağlı olarak GTS oranının giderek azaldığı ve aksine polimorfizm oranının giderek arttığı görülmüştür. Çinko DNA replikasyonu, protein sentezi ve transkripsiyon için gereklidir bu nedenle organizmada çinko dengesindeki herhangi bir bozukluk organizmanın büyümesini ve morfolojisini etkileyebilir. Yüksek

Çinko seviyesi metabolik fonksiyonları engeller. Hem kök hemde filizlenme oranını azaltır. Yüksek miktarda çinko'nun DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. (Augustyniak *et al.* 2006). Çinko, kadmiyum, kurşun, nikel ve bakır gibi ağır metallerin homolog rekombinasyonu güçlü olarak etkilediği ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak mutasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Kovalchuk *et al.* 2001). Çinkonun retrotranspozon polimorfizmini artırması artan doza bağlı olarak DNA metil transferaz aktivitesini azaltarak hipometilasyona sebep olmasıyla açıklanabilir.

Uygulamada kobalt dozlarında da diğer iki ağır metalle aynı sonuçlar gözlemlenmiş ve polimorfizm oranı artan doza bağlı olarak artarken GTS oranı giderek azalmıştır. GTS oranının azalması kobaltın bitkilerin büyümesini ve metabolik fonksiyonlarını ciddi bir şekilde etkilediği ve hücre zarı, bitki hücresi ve önemli metabolik maddelere geri dönüşümsüz olarak zarar vermesi ve oksidatif DNA hasarına, reaktif oksijen türlerinin artmasına ve DNA onarım mekanizmasının inhibisyonuna yol aması ile açıklanabilir (Simonsen *et al.* 2012; İmtiyaz *et al.* 2014). Kobalt klorid ve bakır sülfat metallerinin toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada artan reaktif oksijen türleri ve serbest radikal aktivitenin artmasına bağlı olarak DNA hasarı ortaya çıkmıştır (Yıldız *et al.* 2009). Karnabahar yapraklarında kobaltın seviyesinin artması protein, klorofil ve katalaz aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Yadav 2010).

Demir hücresel olaylar için gereklidir ancak miktarı aşıldığı zaman toksisiteye neden olur. Demir radikal reaksiyonlarda katalitik rol oynar. Demirin dokuda dengesinin bozulması hücresel lipit, nükleik asit, protein ve karbonhidratlar gibi hücresel hasara neden olur buda hücresel fonksiyonların ve hücresel bütünlüğün bozulması ile sonuçlanır (Britton *et al.* 2002). Uygulamamız da demirin artan dozuna bağlı olarak polimorfizm oranının giderek arttığı ve GTS oranının ise azaldığı görülmektedir. Demirin GTS oranını azaltması DNA hasarına neden olmasıyla açıklanabilir. Demir ve manganın birikmesi sonucu biyokimyasal ve genotoksik etkisinin olduğu ve bu etki sonucunda ciddi oranda reaktif oksijen türlerini uyardığı bildirilmiştir (Da Silva Veronez *et al.* 2016).

Ağır metallerin GTS oranını etkilemesi ile ilgili birçok araştırma mevcuttur. Tüm canlı organizmalarda ağır metal stresinin oksidatif strese neden olduğu bilinir. Ağır metallerin ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  ve  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) birikiminin mineral besin dengesizliği, toplam antioksidan seviyesi ve DNA hasarı üzerine etkilerinin araştırmak için *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinde yapılan bir çalışmada metal içeriği, eşleşmiş plazma - atomik emisyon spektrometresi (ICP-AES), toplam antioksidan seviye değerlendirmesi Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) ve DNA hasarını belirlemek için rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi kullanılmıştır. Ağır metale bağlı olarak GTS değerlerinde kontrole göre yeni bantların ortaya çıktığı ve normal bantların kaybolduğu, antioksidan seviyesinin artmasıyla sonuçlandırıldığı belirlenmiştir (Gjorgieva *et al.* 2013).

Kadmiyum ve kromun DNA hasarı ve genotoksik etkisi üzerine bir test yapılmış ve bu etki RAPD tekniğiyle belirlenmiştir. GTS oranında kadmiyum ve krom artan dozuna bağlı olarak azalmalar görüldüğü belirtilmiştir (Pal and Kundu 2015).

Yine kadmiyum ile kirlenen topraklardan arpa bitkisi üzerine yapılan çalışmada kadmiyumun üç dozu kullanılmış ( $10, 20, 40 \text{ mg}^{-1}$ ) ve kontrol ile kıyaslandığında yeni oluşan ve ortadan kaybolan bantlar gözlemlenmiştir. Bantlar RAPD tekniğiyle analiz edildiğinde polimorfizm oranının yüksek konsantrasyonlarda en fazla olduğu ve GTS oranının artan doza bağlı olarak düştüğü görülmüştür (Liu *et al.* 2009).

Yine bu konuyla ilgili yapılan başka bir çalışmada ise kadmiyum pirinç bitkisi üzerine verdiği hasar araştırılmış ve bu hasar SRAP yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuç göstermiştir ki GTS oranı kadmiyum artan dozuna bağlı olarak azalmış ve pirinç tohumlarının köklerinde hassaslık ortaya çıktığı görülmüştür (Zhang *et al.* 2015). Cencki *et al.* (2010) *Brassica rapa* L. üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada Pb'nin 0,5, 1, 3, 5 mM konsantrasyonunu kullanmış ve kurşunun artan konsantrasyonuna bağlı olarak GTS değerinde azalma gözlemlenmiştir.

Son zamanlarda artan çevre kirliliğinden dolayı oluşan ağır metal birikiminin bitki üzerine olumsuz etkisinin azaltılması adına yeni araştırmalar ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri olan humik maddeler toprakta ölü biotanın kimyasal bozulmasının ve mikrobiyal ayrışmasının son ürünüdür. Yeryüzünde doğal olarak oluşan organik moleküllerin en çok bulunan türüdür ve toprağın organik madde miktarının bol kısmını oluşturur. Humik maddeler, atmosfer ile toprak arasında oksijen ve karbon değişimi, besin maddelerinin kullanılabilirliğinin kontrolü ve toksik kimyasalların taşınımı ve dönüşümü üzerine hem toprak hemde bitkiler için son derece önemlidir (Calvo *et al.* 2014). Ayrıca humik asit iz elementlerin ya da ağır metal kirliliğine neden olan metallerin çevrede hareketini ve davranışlarını kontrol etmede önemli bir rol oynar (Livens 1991). Humik maddeler toprağın pH özelliğine göre katyonlarla metal kompleksler oluşturarak bitki besin elementlerini alınmaz formlara dönüştürür. Bunun sebebi humik asitin üzerinde bulunan fonksiyonel gruplardır (Stevenson 1994). Böylece humik asit ağır metallerin bitki bünyesine girişini minimum düzeye indirebilir (Pujola *et al.* 1992). Humik asitler metallere bağlanıp ve metallerin biyoyararlılığını etkileyerek toksik etkisini azaltabilir. Humik asitin etkileşim halinde olduğu metaller iki grupta sınıflandırılabilir. İlk sınıf değerlik elektronlarının düşük iyonizasyon potansiyellerinden dolayı oldukça elektropozitifdir ve bu gruptaki metaller alkali metallerdir (lityum, sodyum, potasyum, rubidium ve sezyum) ve ikinci sınıf elementler berilyum, magnezyum, kalsiyum, baryum, radyum, stronsiyum olup bu metaller asidik organik gruplarla etkileşime girer (Livens 1991).

Çalışmamızda ağır metallere ilaveten humik asit uygulaması sonucu ortaya çıkan polimorfizm oranlarının azaldığı görülmüştür humik asitin bu koruyucu etkisinin, oksijen radikalleri tarafından oluşan zarardan DNA ve diğer hücresel bileşenleri koruduğu bilinen GSH ile bağlantılı olduğu bilinir (Concheri *et al.* 1994). Bunun yanı sıra humik asitin bu koruyucu etkisi antioksidan özelliğinden ve enzimatik aktivasyon eylemleri üzerine etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Yildirim *et al.* 2014). Koukal *et al.* (2003) *Pseudokirchneriella subcapitata*'da akutik metal [çinko (390 µg/L) ve kadmiyum (200 µg/L)] toksisitesi üzerine humik asit (1 ve 5 mg/L) etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, humik asitin çinko ve kadmiyum stresini iki

farklı yolla azalttığı belirtilmiştir. Bunlardan birincisi humik asitin serbest metal iyonlarının miktarını azaltmıştır. Humik asitin varlığında büyük molekül ağırlıklı Metal-Humik asit kompleksi oluşmakta ve metallerin kullanılabilirliği azalmaktadır. İkinci bir yol ise Humik asit alg yüzeyleri üzerine adsorbe olarak serbest çinko ve kadmiyum iyonlarından korumuştur. *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinde yapılan çalışmada dikamba ya bağlı olarak oluşan DNA metilasyonu ve DNA hasarı üzerine humik asitin koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Araştırmada dikambanın artan dozuna bağlı olarak %GTS oranı düştüğü ancak, humik asit uygulamasından sonra %GTS oranının arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak humik asit koruyucu rolü olduğu görülmüştür (Yildirim *et al.* 2014). Yine başka bir çalışmada kabuklu *Daphnia pulex* üzerine kadmiyum, krom ve bu ağır metallerle ilaveten 0,5'den 50 mg/L'e kadar humik asit uygulanmış ve humik asitin koruyucu etkisi incelenmiştir. Kadmiyum toksisitesinin humik asitin konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı görülürken krom toksisitesinin humik asitin bağlı olmadığı belirlenmiştir (Stackhouse and Benson 1989).

Yaptığımız çalışmada IRAP tekniğinde ortaya çıkan bant profilleri değerlendirilmiş ve ağır metallerin kobalt, demir, çinko ve mangan 40 mM +1500 ppm humik asit dozunun ortaya çıkarmış olduğu polimorfizm oranlarına bağlı olarak humik asitin ağır metalleri tutma sırası demir > çinko > mangan > kobalt olarak belirlenmiştir. Ortaya çıkan bu sonuç Yonebayashi *et al.* (1994) yaptığı bir çalışmada yüksek pH değerinde humik maddelerin şelatlama etkisinin daha yüksek olduğunu ve bu etkiyle topraktaki ağır metallerin bitkiler tarafından alınmaz formlara dönüştüğünü saptayarak, humik maddelerin metalleri adsorbe gücünü bakır > demir > çinko > mangan olarak belirlediği çalışmasıyla desteklenmiştir.

Ayrıca araştırmamızda retrotranspozon kaynaklı polimorfizmi belirlemede IRAP ve REMAP tekniğinin başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir. REMAP metodu IRAP metoduyla benzerdir fakat primerlerinden dolayı farklılık gösterir. Bu teknik mikrosatelit diziler ve LTR dizileri arasındaki DNA bölgelerinin amplifikasyonuna dayanır. REMAP tekniğinde amplifikasyon sonucunda birden fazla bant oluşur. IRAP ve REMAP tekniği güvenilir ve tekrarlanabilir bant profilleri oluşturdukları için birçok

bitki cinsinde genetik çeşitliliği belirlemede kombine ya da ayrı ayrı kullanılabilmektedir (Poczai *et al.* 2012; Poczai *et al.* 2013).

IRAP ve REMAP tekniğinin genetik çeşitlilik ve populasyonun genetik yapısının belirlenmesine yönelik çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Benzer şekilde Mandoulakani *et al.* (2012) *M. Sativa* genomundaki retrotranspozonları çalışmak için IRAP ve REMAP tekniğini başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Adonis *vernalis* L. bitkisinde genetik çeşitliliği belirlemek ve DNA polimorfizmini belirlemek için IRAP yöntemi kullanılmıştır (Boronnikova and Kalendar 2010).

Guo *et al.* (2006), bazı *Diospyros kaki* Thunb. arasında ki genetik ilişkiyi açıklamak için IRAP ve REMAP teknikleri başarılı bir şekilde kullanmışlardır.

Yine bir araştırmada arpada IRAP yöntemi ile somoklonal varyasyon belirlenmiştir (Campbell *et al.* 2011). Sıcak stresi ve böcek hasarından sonra *Pinus sylvestris* bitkisinden farklı şekilde ifade edilen retrotranspozonların tahmini LTR bölgelerinden 9 markır geliştirilmiş ve 150 ağacın genetik çeşitliliği bu geliştirilen markırlar ile IRAP yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Varonova and Rungnis 2013).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da ağır metaller kontrole kıyasla gözle görülür bir şekilde bitki çimlenmesini etkilemiş ve bunun yanında yapılan moleküler analizlerden sonra retrotranspozon düzeyinde polimorfizmlere ve DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Humik asit uygulamasından sonra retrotranspozon polimorfizmi ve DNA hasarında azalmalar ortaya çıkmıştır. Ağır metal stresin de ortaya çıkan retrotranspozonların nedenini ve humik asitin koruyucu etkisi hakkında çok sayıda araştırma olmasına rağmen tam mekanizmanın anlaşılması için ek araştırmalara ihtiyaç vardır.



**KAYNAKLAR**

- Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K., 2006. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 (31), 11796-11801.
- Algan, F. ve Bilen, S., 2005. Toprak Kirlenmesi ve Biyolojik Çevre. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36 (1), 83-88.
- Alleman, M., Sidorenko, L., McGinnis, K., Seshadri, V., Dorweiler, J.E., White, J., Sikkink, K. and Chandler, V.L., 2006. An RNA-dependent RNA Polymerase is Required for Paramutation in Maize. Nature, 442 (7100), 295-298.
- Apak, R. ve Hizal, J., 2012. Hümik Asitler Varlığında Ağır Metal Adsorpsiyonunun Temel Özellikleri, Modelleme İlkeleri ve Çevresel Boyutları. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi, 47-62.
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science-Bangalore, 82(10), 1227-1238.
- Arumuganathan, K. and Earle, E., 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter, 9 (3), 229-241.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology, 141 (2), 391-396.
- Asri, F.Ö. ve Sönmez, S., 2006. Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. Derim, 23 (2), 36-45.
- Assunção, A., Martins, P., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. and Aarts, M., 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell & Environment, 24 (2), 217-226.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N. and Depledge, M.H., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry, 18 (10), 2275-2282.
- Augustyniak, M., Juchimiuk, J., Przybyłowicz, W. J., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Babczyńska, A. and Migula, P. 2006. Zinc-induced DNA damage and the distribution of metals in the brain of grasshoppers by the comet assay and micro-PIXE. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 144(3), 242-251.
- Aydın, A., Kant, C. and Turan, M., 2012. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. African Journal of Agricultural Research, 7 (7), 1073-1086.
- Bai, H., Gu, L., Zhou, J. and Deng, D., 2003. p16 hypermethylation during gastric carcinogenesis of wistar rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 535 (1), 73-78.
- Baker, A.J. and Walker, P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary Aspects, 2, 155-165.
- Bakırcıoğlu, D., 2009. Toprakta makro ve mikro element tayini. (Doktora Tezi), Tekirdağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

- Bal, R., Türk, G., Tuzcu, M., Yilmaz, O., Ozercan, I., Kuloglu, T., Gür, S., Nedzvetsky, V.S., Tykhomyrov, A.A. and Andrievsky, G.V., 2011. Protective effects of nanostructures of hydrated C 60 fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology*, 282 (3), 69-81.
- Bartels, D. and Sunkar, R., 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (1), 23-58.
- Bennetzen, J.L., 2000. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42 (1), 251-269.
- Berbara, R.L. and García, A.C., 2014. Humic substances and plant defense metabolism. Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment. Springer, 297-319.
- Beyaztaş, T., Aras, S., ve Duman, D. C., 2008. Likenlerde Ağır Metal Birikiminin DNA Üzerindeki Etkileri. *Türk bilimsel derlemeler dergisi*, 1 (2), 37-43.
- Beyersmann, D. and Hartwig, A., 1992. The genetic toxicology of cobalt. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115 (1), 137-145.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91 (2), 179-194.
- Boronnikova, S. and Kalendar, R., 2010. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. *Russian Journal of Genetics*, 46 (1), 36-42.
- Boscaiu, M., Lull, C., Lidon, A., Bautista, I., Donat, P., Mayoral, O. and Vicente, O., 2008. Plant responses to abiotic stress in their natural habitats. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture*, 65 (1), 53-58.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D. and Asada, K., 1994. Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13 (3), 199-218.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E., 2000. Responses to Abiotic Stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 11581249.
- Britton, R. S., Leicester, K. L. and Bacon, B. R., 2002. Iron toxicity and chelation therapy. *International journal of hematology*, 76(3), 219-228.
- Bureau, T.E., Ronald, P.C. and Wessler, S.R., 1996. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (16), 8524-8529.
- Büyük, İ., Aydın, S.S. ve Aras, S., 2012. Bitkilerin stres koşullarında verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (2), 97-110.
- Büyükkeskin, T., Akinci, Ş. and Eroğlu, A.E., 2015. Effects of humic acid on root development and nutrient uptake of *Vicia faba* L. (broad bean) seedlings grown under aluminum toxicity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46 (3), 277-292.
- Calvo, P., Nelson, L. and Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383 (1-2), 3-41.
- Campbell, B.C., LeMare, S., Piperidis, G. and Godwin, I.D., 2011. IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. *Molecular Breeding*, 27 (2), 193-206.

- Camporeale, G., Zemleni, J. and Eissenberg, J.C., 2007. Susceptibility to heat stress and aberrant gene expression patterns in holocarboxylase synthetase-deficient *Drosophila melanogaster* are caused by decreased biotinylation of histones, not of carboxylases. *The Journal of Nutrition*, 137 (4), 885-889.
- Castiglione, S., Franchin, C., Fossati, T., Lingua, G., Torrigiani, P. and Biondi, S., 2007. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba L. cv. Villafranca*). *Chemosphere*, 67 (6), 1117-1126.
- Çaylak, E., 2011. Hayvanlar ve Bitkilerde Oksidatif Stres ile Antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1).
- Cenkci, S., Ciğerci, İ.H., Yıldız, M., Özay, C., Bozdağ, A. and Terzi, H., 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa L.* *Environmental and Experimental Botany*, 67 (3), 467-473.
- Çepel, N., 1997. Toprak kirliliği erozyon ve çevreye verdiği zararlar. *TEMA*.
- Chatterjee, J. and Chatterjee, C. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, 109(1), 69-74.
- Chen, Y. and Aviad, T., 1990. Effects of humic substances on plant growth. *Humic substances in soil and crop sciences. Selected Readings (Humicsubstances)*, 161-186.
- Cheng, C., Daigen, M. and Hirochika, H., 2006. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17. *Molecular Genetics and Genomics*, 276 (4), 378-390.
- Chinnusamy, V., Gong, Z. and Zhu, J.K., 2008. Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (10), 1187-1195.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu, J.K., 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55 (395), 225-236.
- Choi, C.S. and Sano, H., 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277 (5), 589-600.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E. and Fischer, R.L., 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*, 110 (1), 33-42.
- Cohen, C.K., Fox, T.C., Garvin, D.F. and Kochian, L.V., 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology*, 116 (3), 1063-1072.
- Concheri, G., Nardi, S., Piccolo, A., Rascio, N. and Dell'Agnola, G., 1994. Effects of humic fractions on morphological changes related to invertase and peroxidase activities in wheat seedlings. *Humic substances in the global environment and implications on human health. Elsevier*, 257-262.
- Cui, X. and Cao, X., 2014. Epigenetic regulation and functional exaptation of transposable elements in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 83-88.
- Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., Nele, H., Nathalie, V., Yves, G. and Jan, C., 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium

- and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 168 (4), 309-316.
- Çimrin, K.M., Türkmen, Ö., Turan, M. and Tuncer, B., 2013. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling. *African Journal of Biotechnology*, 9 (36).
- Da Silva Veronez, A. C., Salla, R. V., Baroni, V. D., Barcarolli, I. F., Bianchini, A., dos Reis Martinez, C. B. and Chippari-Gomes, A. R. 2016. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquatic Toxicology*, 174, 101-108.
- Dat, J., Vandenberghe, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57 (5), 779-795.
- De Dorlodot, S., Lutts, S. and Bertin, P. 2005. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *Journal of plant nutrition*, 28(1), 1-20.
- De Flora, S., Bennicelli, C., and Bagnasco, M. (1994). Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 317(1), 57-79.
- De Oliveira Jucoski, G., Cambraia, J., Ribeiro, C., De Oliveira Jucoski, A., de Paula, S.O. and Oliva, M.A., 2013. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (5), 1645-1657.
- Demir, E. ve Çimrin, K.M., 2011. Arıtma çamuru ve humik asit uygulamalarının mısırın (*Zea mays* L.) gelişimi, besin elementi ve ağır metal içerikleri ile bazı toprak özelliklerine etkileri. *Journal of Agriculture Sciences*, 17, 204-216.
- Döring, H.P. and Starlinger, P., 1984. Barbara McClintock's controlling elements: now at the DNA level. *Cell*, 39 (2), 253-259.
- Doskočil, L., Grasset, L., Válková, D. and Pekař, M., 2014. Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite. *Fuel*, 134, 406-413.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (11), 5624-5628.
- El-Jaoual, T. and Cox, D. A. 1998. Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353-386.
- Eldem, V., Okay, S. and Ünver, T., 2013. Plant microRNAs: New players in functional genomics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37 (1), 1-21.
- Ellneskog-Staam, P., Henry Loaisiga, C. and Merker, A., 2007. Chromosome C-banding of the teosinte *Zea nicaraguensis* and comparison to other zea species. *Hereditas*, 144 (3), 96-101.
- El-Nemr, M., El-Desuki, M., El-Bassiony, A. and Fawzy, Z., 2012. Response of growth and yield of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) to different foliar applications of humic acid and bio-stimulators. *Australian Journal of Basic Applied Sciences*, 6, 630-637.
- El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P.L., Roeder, R.G., Cooper, M.E. and Brownlee, M., 2008. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 205 (10), 2409-2417.

- Ergen, N.Z. and Budak, H., 2009. Sequencing over 13.000 expressed sequence tags from six subtractive cDNA libraries of wild and modern wheats following slow drought stress. *Plant Cell & Environment*, 32 (3), 220-236.
- Erturk, F.A., Ay, H., Nardemir, G. and Agar, G., 2013. Molecular determination of genotoxic effects of cobalt and nickel on maize (*Zea mays* L.) by RAPD and protein analyses. *Toxicology and Industrial Health*, 29 (7), 662-671.
- Esau, K., 1977. The leaf variations in structure. *Anatomy of Seed Plants*, 19, 257-294
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J. and Morard, P., 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*, 99 (10), 4206-4212.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Databases, [www.fao.org](http://www.fao.org) (31.05.2015).
- Farnham, D., Benson, G., Pearce, R., White, P. and Johnson, L., 2003. Corn perspective and culture. *Corn: Chemistry and Technology*, 1-33.
- Fedoroff, N., 2000. Transposons and genome evolution in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (13), 7002-7007.
- Feil, R. and Berger, F., 2007. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends in Genetics*, 23 (4), 192-199.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S.R., 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics*, 3 (5), 329-341.
- Finatto, T., De Oliveira, A.C., Chaparro, C., Da Maia, L.C., Farias, D.R., Woyann, L.G., Mistura, C.C., Soares-Bresolin, A.P., Llauro, C. and Panaud, O., 2015. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. *Rice*, 8 (1), 13.
- Foy, C., Chaney, R.T. and White, M., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29 (1), 511-566.
- Foyer, C.H., Harbinson, J. and Mullineaux, P., 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, 1-42.
- Gao, L., McCarthy, E.M., Ganko, E.W. and McDonald, J.F., 2004. Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences. *Bmc Genomics*, 5 (1), 1.
- García-Martínez, J. and Martínez-Izquierdo, J.A., 2003. Study on the evolution of the Grande retrotransposon in the *Zea* genus. *Molecular Biology and Evolution*, 20 (5), 831-841.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. and Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37 (3), 263-285.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J. and Demnerová, K. 2006. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 65(3), 420-426.
- Gjorgieva, D., Panovska, T. K., Ruskovska, T., Bačeva, K. and Stafilov, T. 2013. Mineral nutrient imbalance, total antioxidants level and DNA damage in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) exposed to heavy metals. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(4), 499-507.

- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K., 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, 111 (6), 803-814.
- Grandbastien, M. A., Lucas, H., Morel, J. B., Mhiri, C., Vernhettes, S. and Casacuberta, J. M. 1997. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica*, 100(1-3), 241-252.
- Grandbastien, M.A., Audeon, C., Bonnivard, E., Casacuberta, J., Chalhoub, B., Costa, A.P., Le, Q., Melayah, D., Petit, M. and Poncet, C., 2005. Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. *Cytogenetic and Genome Research*, 110 (1-4), 229-241.
- Grativol, C., Hemerly, A.S. and Ferreira, P.C.G., 2012. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (2), 176-185.
- Gülser, E., Tüfenkçi, Ş. ve Demir, S., 2009. Domateste potasyum, salisilik asit ve humik asit uygulamalarının fide çıkışı ve *Fusarium solgunluğuna (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici)* etkileri. *Bitki Koruma Kongresi*, 15-18.
- Guo, D., Zhang, H. and Luo, Z., 2006. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Science*, 170 (3), 528-533.
- Hake, S. and Walbot, V., 1980. The genome of *Zea mays*, its organization and homology to related grasses. *Chromosoma*, 79 (3), 251-270.
- Haktanır, K. ve Arcak, S., 1998. Çevre Kirliliği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. 1503, 457.
- Hall, J. and Williams, L.E., 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 54 (393), 2601-2613.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology*, 51 (1), 463-499.
- Henle, K.J., Jethmalani, S.M. and Nagle, W.A., 1998. Stress proteins and glycoproteins (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 1 (1), 25-57.
- Higuchi, K., Nishizawa, N. K., Yamaguchi, H., Römheld, V., Marschner, H. and Mori, S. 1995. Short Communication: Response of nicotianamine synthase activity to Fe-deficiency in tobacco plants as compared with barley. *Journal of experimental botany*, 46(8), 1061-1063.
- Hirochika, H. 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *The EMBO journal*, 12(6), 2521.
- Hirochika, H., 1995. Activation of retrotransposons by stress. *Plant and Cell Physiology*, 36, 2.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H. and Kanda, M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7783-7788.
- Houben, A., Demidov, D., Caperta, A.D., Karimi, R., Agueci, F. and Vlasenko, L., 2007. Phosphorylation of histone H3 in plants—a dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1769 (5), 308-315.

- Hu, Z. and Wenjiao, Z., 2015. Effects of zinc stress on growth and antioxidant enzyme responses of *Kandelia obovata* seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97 (9), 1190-1201.
- Huang, S., Wu, S., Ding, J., Lin, J., Wei, L., Gu, J. and He, X., 2010. MicroRNA-181a modulates gene expression of zinc finger family members by directly targeting their coding regions. *Nucleic Acids Research*, 564.
- Imtiyaz, S., Agnihotri, R.K., Ganie, S.A. and Sharma, R., 2014. Biochemical Response of *Glycine max L. Merr.* to Cobalt and Lead stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10 (3).
- Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I. and Paszkowski, J., 2011. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 472 (7341), 115-119.
- İzmirli, M., Tufan, T. and Alptekin, D., 2012. DNA Methylation. *Archives Medical Review Journal*, 21 (4), 274-282.
- Jones, H., Lister, D.L., Bower, M.A., Leigh, F.J., Smith, L.M. and Jones, M.K., 2008. Approaches and constraints of using existing landrace and extant plant material to understand agricultural spread in prehistory. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 6 (02), 98-112.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review Plant Biology*., 57, 19-53.
- Kalefetoğlu, T. and Ekmekci, Y., 2005. The Effects Of Drought On Plants And Tolerance Mechanisms (Review). *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740.
- Kalendar, R. and Schulman, A.H., 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*, 1(5), 2478-2484.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P. and Schulman, A.H., 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(8), 1419-1430.
- Kalendar, R., Flavell, A., Ellis, T., Sjakste, T., Moisy, C. and Schulman, A.H., 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106(4), 520-530.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. and Schulman, A., 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(5), 704-711.
- Kartal-Alacam, G., Yilmaz, S., Marakli, S. and Gozukirmizi, N., 2014. Sukkula retrotransposon insertion polymorphisms in barley. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61 (6), 828-833.
- Kasprzak, K. S. 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer investigation*, 13(4), 411-430.
- Kennedy, C. and Gonsalves, F., 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup>, efflux of excised roots. *Journal of Experimental Botany*, 38 (5), 800-817.
- Kerndorff, H. and Schnitzer, M., 1980. Sorption of metals on humic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44 (11), 1701-1708.
- Khorasanizadeh, S., 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116 (2), 259-272.

- Kiran, S., Özkay, F., Şebnem, K. and Şebnem, E., 2014. The effect of humic acid applications on some morphological, physiological and biochemical characteristics of eggplants irrigated with water contained heavy metals in high concentration. *Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 2 (6).
- Koca, Y., Turgut, I. and Ereku, O., 2010. The determination of performance at the first and second crop productions in maize grain cultivation. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47 (2), 181-190.
- Kouhi, S.M.M., Lahouti, M., Ganjeali, A. and Entezari, M.H., 2015. Comparative effects of ZnO nanoparticles, ZnO Bulk Particles, and Zn<sup>+2</sup> on *Brassica napus* after long-term exposure: Changes in growth, biochemical compounds, antioxidant enzyme activities, and Zn bioaccumulation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226 (11), 1-11.
- Koukal, B., Gueguen, C., Pardos, M. and Dominik, J., 2003. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, 53 (8), 953-961.
- Kovalchuk, O., Titov, V., Hohn, B. and Kovalchuk, I. 2001. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nature biotechnology*, 19(6), 568-572.
- Kulikova, N., Stepanova, E. and Koroleva, O., 2005. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. Springer, 285-309.
- Kumar, A. and Bennetzen, J.L., 1999. Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33 (1), 479-532.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M. and FitzHugh, W., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822), 860-921.
- Larcher, W., 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media. 513.
- Lauria, M., Piccinini, S., Pirona, R., Lund, G., Viotti, A. and Motto, M., 2014. Epigenetic variation, inheritance, and parent-of-origin effects of cytosine methylation in maize (*Zea mays*). *Genetics*, 196 (3), 653-666.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, 2.
- Li, H.F., Gray, C., Mico, C., Zhao, F.J. and McGrath, S.P., 2009. Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils. *Chemosphere*, 75 (7), 979-986.
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T. and Martienssen, R., 2003. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biology*, 1 (3), 67.
- Liu, W., Yang, Y., Li, P., Zhou, Q., 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 Materials*, 161 (2), 878-883.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.H. and Ma, L., 2007. AG protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*, 315 (5819), 1712-1716.



- Livens, F.R., 1991. Chemical reactions of metals with humic material. *Environmental Pollution*, 70 (3), 183-208.
- Lombi, E., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.J., Hawkesford, M.J. and McGrath, S.P., 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 128 (4), 1359-1367.
- Luis, A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M. and Barroso, J.B., 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1255-1272.
- Makarevitch, I., Stupar, R.M., Iniguez, A.L., Haun, W.J., Barbazuk, W.B., Kaeppler, S.M. and Springer, N.M., 2007. Natural variation for alleles under epigenetic control by the maize chromomethylase *zmet2*. *Genetics*, 177 (2), 749-760.
- Mallick, S., Sinam, G., Mishra, R.K. and Sinha, S., 2010. Interactive effects of Cr and Fe treatments on plants growth, nutrition and oxidative status in *Zea mays* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73 (5), 987-995.
- Mandoulakani, B.A., Piri, Y., Darvishzadeh, R., Bernoosi, I. and Jafari, M., 2012. Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30 (2), 286-296.
- Mansour, A., 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6 (2), 99-107.
- Mansour, A., 2008. Utilization of genomic retrotransposons as cladistic markers. *Journal Cell Molecular Biology*, 7, 17-28.
- Marino, P., Castellano, G., Raimondo, F. and Spadaro, V., 2012. *Pyrus ciancioi* (Rosaceae), a new species from Sicily. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146 (3), 654-657.
- Marova, I., Kucerik, J., Duronova, K., Mikulcova, A. and Vlckova, Z., 2011. Antimutagenic and/or genotoxic effects of processed humic acids as tested upon *S. cerevisiae* D7. *Environmental Chemistry Letters*, 9 (2), 229-233.
- Mateuca, R., Aka, P., De Boeck, M., Hauspie, R., Kirsch-Volders, M. and Lison, D., 2005. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicology Letters*, 156 (2), 277-288.
- McClintock, B. 1948. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst Wash Year Book*, 47, 155-169.
- McClintock, B., 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36 (6), 344-355.
- McClintock, B., 1956. Controlling elements and the gene, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 197-216.
- Mhiri, C., Morel, J.B., Vernhettes, S., Casacuberta, J.M., Lucas, H. and Grandbastien, M.A., 1997. The promoter of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Molecular Biology*, 33 (2), 257-266.
- Micó, C., Li, H., Zhao, F. and McGrath, S., 2008. Use of Co speciation and soil properties to explain variation in Co toxicity to root growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) in different soils. *Environmental Pollution*, 156 (3), 883-890.

- Mignouna, H., Ellis, N., Knox, M., Asiedu, R. and Ng, Q.N., 1998. Analysis of genetic diversity in Guinea yams (*Dioscorea* spp.) using AFLP fingerprinting. *Tropical Agriculture-London Then Trinidad*, 75, 224-229.
- Miser-Salihoglu, E., Akaydin, G., Caliskan-Can, E., Yardim-Akaydin, S., Tatiparthi, R., Duraiswamy, D., Bannooh, C.K., Özdamar, E.D., Eke, B.C. and Gökbulut, A., 2010. Evaluation of Antioxidant Activity of Various Herbal Folk Evaluation Medicine. *FABAD Jotnal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 59-67.
- Mithöfer, A., Schulze, B. and Boland, W., 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, 566 (1-3), 1-5.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9), 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9 (10), 490-498.
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E. and Magel, E., 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 112 (2), 121-129.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M. and García-Mina, J.M., 2010. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, 167 (8), 633-642.
- Moreau-Mhiri, C., Morel, J. B., Audeon, C., Ferault, M., Grandbastien, M. A. and Lucas, H. 1996. Regulation of expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in heterologous species following pathogen-related stresses. *The Plant Journal*, 9(3), 409-419.
- Morris, J., 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293 (5532), 1103-1105.
- Moustakas, M. T., Lanaras, L., Symeonidis, L. and Karataglis, S. 1994. Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica*, 30, 389-396.
- Munzuroglu, O. and Geckil, H., 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43 (2), 203-213.
- Nagajyoti, P., Cha, S.J., Yang, I.J., Sreekanth, T., Kim, K.J. and Shin, H.M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 146, 10-17.
- Nagajyoti, P., Lee, K. and Sreekanth, T., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8 (3), 199-216.
- Nagy, E.D., Molnár, I., Schneider, A., Kovács, G. and Molnár-Láng, M., 2006. Characterization of chromosome-specific S-SAP markers and their use in studying genetic diversity in *Aegilops* species. *Genome*, 49 (4), 289-296.
- Nanda, R. and Agrawal, V., 2016. Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. *Environmental and Experimental Botany*, 125, 31-41.

- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D. and Muscolo, A., 2009. Biological activities of humic substances. *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter In Environmental Systems*, 2, 309-335.
- Norwood, W., Borgmann, U. and Dixon, D., 2007. Chronic toxicity of arsenic, cobalt, chromium and manganese to *Hyalella azteca* in relation to exposure and bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 147 (1), 262-272.
- OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (maize). Environment directorate:organisation for Economic Co-operation and Development Paris, France. Report no:27.
- Oerke, E., Dehne, H.W, Schönbeck, E. and Weber, A., 2012. Crop production and crop protection. Elsevier, 14, 9.
- Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M. ve Pehlivan, M., 2009. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri/the effects of heavy metals on plants. *Alınları Zirai Bilimler Dergisi*, 17 (2).
- Özcan, S., 2009. Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2 (2), 01-34.
- Pal, S. and Kundu, R., 2015. Heavy Metal induced Genotoxicity Detection by RAPD in Alligator Weed. *International Journal of Engineering Technology Science and Research*, 9 (2) 2394-3386.
- Paliwal, R.L., Granados, G., Lafitte, H.R., Violic, A.D. and Marathée, J.P., 2000. Hybrid maize breeding. *Tropical maize: improvement and production*, 363
- Palmgren, M.G. and Axelsen, K.B., 1998. Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1365 (1), 37-45.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (9), 4956-4960.
- Persans, M.W., Nieman, K. and Salt, D.E., 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (17), 9995-10000.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A., 2004. Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14 (14), 546-551.
- Petit, M., Lim, K.Y., Julio, E., Poncet, C., De Borne, F.D., Kovarik, A., Leitch, A.R., Grandbastien, M.A. and Mhiri, C., 2007. Differential impact of retrotransposon populations on the genome of allotetraploid tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Molecular Genetics and Genomics*, 278 (1), 1-15.
- Piccolo, A. and Spiteller, M., 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 377 (6), 1047-1059.
- Piperno, D.R. and Flannery, K.V., 2001. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (4), 2101-2103.
- Poczai, P., Varga, I., Hyvonen, J. and Bell, N.E., 2012. Genomics meets biodiversity: advances in molecular marker development and their applications in plant

- genetic diversity assessment. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, 30.
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J.P.T. and Hyvonen, J., 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*, 9.
- Porceddu, A., Albertini, E., Barcaccia, G., Marconi, G., Bertoli, F. and Veronesi, F., 2002. Development of S-SAP markers based on an LTR-like sequence from *Medicago sativa* L. *Molecular Genetics and Genomics*, 267 (1), 107-114.
- Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA, Caboche M. 1991. Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. *EMBO J* 10: 1911–1918
- Pujola, M., Sana, J., Senesi, N. and Miano, T., 1992. Effects of organic fertilizer on functional groups of humic acid in soil, humic substances in the global environment and implications on human health. *Proceedings of the 6 th International Meeting of the International Humic Substances Society*, 695-700.
- Queen, R., Gribbon, B., James, C., Jack, P. and Flavell, A., 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 271 (1), 91-97.
- Rancelis, V., Cesniene, T., Kleizaite, V., Zvingila, D. and Balciuniene, L., 2012. Influence of cobalt uptake by *Vicia faba* seeds on chlorophyll morphosis induction, SOD polymorphism, and DNA methylation. *Environmental Toxicology*, 27 (1), 32-41.
- Rao, S. and Shekhawat, G., 2014. Toxicity of ZnO engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2 (1), 105-114.
- Rausser, W.E. and Dumbroff, E.B., 1981. Effects of excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and experimental botany*, 21 (2), 249-255.
- Razem, F.A., Baron, K. and Hill, R.D., 2006. Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (5), 454-459.
- Reeves, R.D. and Baker, A.J., 2000. Metal-accumulating plants. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley, New York, 193-229.
- Rellán-Álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Álvarez-Fernández, A., del Campo, F.F. and Hernández, L.E., 2006. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant and Soil*, 279 (1-2), 41-50.
- Roat, G. and Das, P., 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism, I. Zinc, 3-11.
- Rodecap, K.D., Tingey, D.T. and Lee, E.H., 1994. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Journal of Environmental Quality*, 23 (2), 239-246.
- Rubin, E., Rodriguez, P., Herrero, R., Cremades, J., Barbara, I., de Vicente, S. and Manuel, E., 2005. Removal of methylene blue from aqueous solutions using as biosorbent *Sargassum muticum*: an invasive macroalga in Europe. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80 (3), 291-298.
- Sabot, F. and Schulman, A., 2006. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. *Heredity*, 97 (6), 381-388.

- Şahin, S., 2001. Türkiyede Mısır Ekim Alanlarının Dağılışı Ve Mısır Üretimi. Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 21 (1).
- Sairam, R. and Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science-Bangalore, 86 (3), 407-421.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I., 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Nature Biotechnology, 13 (5), 468-474.
- Sánchez-Sánchez, A., Sánchez-Andreu, J., Juárez, M., Jordá, J. and Bermúdez, D., 2006. Improvement of iron uptake in table grape by addition of humic substances. Journal of Plant Nutrition, 29 (2), 259-272.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M. and Avramova, Z., 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. Science, 274 (5288), 765-768.
- Sanz, A.M., Gonzalez, S.G., Syed, N.H., Suso, M.J., Saldaña, C.C. and Flavell, A.J., 2007. Genetic diversity analysis in Vicia species using retrotransposon-based SSAP markers. Molecular Genetics and Genomics, 278 (4), 433-441.
- Schulman, A.H. and Kalendar, R., 2005. A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics. Cytogenetic and Genome Research, 110 (1-4), 598-605.
- Schützendübel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany, 53 (372), 1351-1365.
- Seibt, K.M., Wenke, T., Wollrab, C., Junghans, H., Muders, K., Dehmer, K.J., Diekmann, K. and Schmidt, T., 2012. Development and application of SINE-based markers for genotyping of potato varieties. Theoretical and Applied Genetics, 125 (1), 185-196.
- Sergieiev, I., Todorova, D., Moskova, I., Georgieva, N., Nikolova, A., Simova, S. and Alexieva, V. 2013. Protective effect of humic acids against heavy metal stress in triticale. Compt Rend Acad Bulg Sci, 66, 53-60.
- Sharma, V. and Nandineni, M.R., 2014. Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems. Molecular Phylogenetics and Evolution, 73, 10-17.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng, C.-C., Yu, X.C. and Zhu, S.Y., 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. Nature, 443 (7113), 823-826.
- Sheng, H., Zeng, J., Yan, F., Wang, X., Wang, Y., Kang, H., Fan, X., Sha, L., Zhang, H. and Zhou, Y., 2015. Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, mineral nutrients translocation and antioxidative system in polish wheat (*Triticum polonicum* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 37 (2), 1-11.
- Simonsen, L. O., Harbak, H. and Bennekou, P. 2012. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. Science of the Total Environment, 432, 210-215.
- Simpson, A.J., Kingery, W.L., Hayes, M.H., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M. and Hofmann, M., 2002. Molecular structures

- and associations of humic substances in the terrestrial environment, *Naturwissenschaften*, 89 (2), 84-88.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdžić, M., Becker, J.D., Feijó, J.A. and Martienssen, R.A., 2009. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 136 (3), 461-472.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28 (4), 1057-1060.
- Smýkal, P., Hýbl, M., Corander, J., Jarkovský, J., Flavell, A.J. and Griga, M., 2008. Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 117 (3), 413-424.
- Soydam-Aydın, S., Büyük, İ., Çelikkol, P. and Aras, S., 2013. A role of catalase (CAT) in detoxification of reactive oxygen species (ROS) in tomato (*Lycopersicon esculentum*) contaminated with manganese ( $Mn^{+2}$ ). *Biological Diversity and Conservation*, 6 (3), 140-145.
- Sridhar, V.V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Zhu, J.K., 2007. Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*, 447 (7145), 735-738.
- Stackhouse, R.A. and Benson, W.H., 1989. The effect of humic acid on the toxicity and bioavailability of trivalent chromium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 17 (1), 105-111.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons.
- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H., 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (40), 37741-37746.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.K., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*, 12 (7), 301-309.
- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18 (8), 2051-2065.
- Syed, N.H., Sørensen, A.P., Antonise, R., van de Wiel, C., van der Linden, C.G., van't Westende, W., Hooftman, D.A., den Nijs, H.C. and Flavell, A.J., 2006. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (3), 517-527.
- Tahir, M., Khurshid, M., Khan, M., Abbasi, M. and Kazmi, M., 2011. Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. *Pedosphere*, 21 (1), 124-131.
- Tam, S.M., Mhiri, C., Vogelaar, A., Kerkveld, M., Pearce, S.R. and Grandbastien, M.A., 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics*, 110 (5), 819-831.
- Tapia, G., Verdugo, I., Yañez, M., Ahumada, I., Theoduloz, C., Cordero, C., ... & Ruiz-Lara, S. 2005. Involvement of ethylene in stress-induced expression of the

- TLC1. 1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Physiology*, 138(4), 2075-2086.
- TEPGE, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, [www.arastirma.gov.tr](http://www.arastirma.gov.tr) (29.03.2015).
- Tipping, E., 2002. Cation binding by humic substances. Cambridge University Press, 12.
- Tito, C., Poggio, L. and Naranjo, C., 1991. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 83 (1), 58-64.
- Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A. and Kakutani, T., 2009. Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. *Nature*, 461 (7262), 423-426.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr) (10.12.2015).
- USDA, United States Department of Agriculture 2005, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl> (14.3.2015).
- Vaillant, I. and Paszkowski, J., 2007. Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (5), 528-533.
- Van Der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonnens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A. and Hooykaas, P.J., 1999. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*, 119 (3), 1047-1056.
- Vaucheret, H., Béclin, C. and Fagard, M., 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, 114 (17), 3083-3091.
- Venturi, S., Dondini, L., Donini, P. and Sansavini, S., 2006. Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (3), 440-444.
- Vitte, C. and Panaud, O., 2005. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenetic and Genome Research*, 110 (1-4), 91-107.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218 (1), 1-14.
- Wang, X., He, M., Xi, J. and Lu, X., 2011. Antimony distribution and mobility in rivers around the world's largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China. *Microchemical Journal*, 97 (1), 4-11.
- Waugh, R., Bonar, N., Baird, E., Thomas, B., Graner, A., Hayes, P. and Powell, W., 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Molecular and General Genetics MGG*, 255 (3), 311-321.
- Woodrow, P., Pontecorvo, G., Fantaccione, S., Fuggi, A., Kafantaris, I., Parisi, D. and Carillo, P., 2010. Polymorphism of a new Ty1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 121 (2), 311-322.
- Xiong, Y. and Eickbush, T.H., 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *The EMBO Journal*, 9 (10), 3353.
- Yadav, S. K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179.

- Yamashita, H. and Tahara, M., 2006. A LINE-type retrotransposon active in meristem stem cells causes heritable transpositions in the sweet potato genome. *Plant Molecular Biology*, 61 (1-2), 79-84.
- Yıldırım, N., Agar, G., Taspınar, M.S., Turan, M., Aydın, M. and Arslan, E., 2014. Protective role of humic acids against dicamba-induced genotoxicity and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil & Plant Science*, 64 (2), 141-148.
- Yıldız, M., Cığerci, İ. H., Konuk, M., Fidan, A. F. and Terzi, H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75(7), 934-938.
- Yılmaz, F., Özdemir, N., Demirak, A. and Tuna, A.L., 2007. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry*, 100 (2), 830-835.
- Yonebayashi, K., Pechayapisit, J., Vijarnsorn, P., Zahari, A.B. and Kyuma, K., 1994. Chemical alterations of tropical peat soils determined by Waksman's proximate analysis and properties of humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*, 40 (3), 435-444.
- Yu, G.-X. and Wise, R.P., 2000. An anchored AFLP-and retrotransposon-based map of diploid *Avena*. *Genome*, 43 (5), 736-749.
- Zengin, F.K. and Kirbag, S., 2007. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Journal of Environmental Biology*, 28 (3), 561.
- Zengin, F. K. and Munzuroğlu, Ö., 2005. Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin ( $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) etkileri. *FÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 164-172.
- Zengin, F. K. 2006. The effects of  $\text{Co}^{+2}$  and  $\text{Zn}^{+2}$  on the contents of protein, abscisic acid, proline and chlorophyll in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings. *Journal of Environmental Biology*, 27(2), 441.
- Zhang, X. and Ervin, E., 2004. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Science*, 44 (5), 1737-1745.
- Zhang, J., Ni, Y., Ding, T., & Zhang, C. 2014. The role of humic acid in the toxicity of arsenite to the diatom *Navicula* sp. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4366-4375.
- Zhang, X., Chen, H., Jiang, H., Lu, W., Pan, J., Qian, Q. and Xue, D. 2015. Measuring the damage of heavy metal cadmium in rice seedlings by SRAP analysis combined with physiological and biochemical parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2292-2298.
- Zhou, Z.S., Huang, S.Q. and Yang, Z.M., 2008. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374 (3), 538-542.
- Zhu, J.K., 2008. Epigenome sequencing comes of age. *Cell*, 133 (3), 395-397.



## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzurumda doğdu. İlköğretim, ortaöğretim ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalında lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

