



**KURAKLIK STRESİNİN BUĞDAYDA
(*Triticum aestivum*) MEYDANA GETİRMİŞ
OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ
ÜZERİNE SELENYUMUN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Seba TURHAN

Yüksek Lisans Tezi

**Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı**

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KURAKLIK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*)
MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPOZON
POLİMORFİZMİ ÜZERİNE SELENYUMUN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Seba TURHAN

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KURAKLIK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*) MEYDANA
GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE
SELENYUMUN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR danışmanlığında, Seba TURHAN tarafından hazırlanan bu çalışma 20.../06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Dalı – Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Güleray AĞAR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

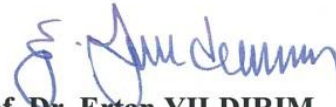
İmza : 

Üye : Yrd.Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 30/06/2016 tarih ve 27.../...30 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

KURAKLIK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*) MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE SELENYUMUN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

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

Danışman: Doç. Dr. M.Sinan TAŞPINAR

IRAP ve REMAP retrotranspozon temelli markırlardır. Bu çalışmada *Triticum aestivum* kırık buğday çeşidinde IRAP ve REMAP markırları kullanılarak retrotranspozon kaynaklı polimorfizm üzerine selenyum (0, 6, 8, 10 μM) ve PEG 8000 (-4, -6, -8 bar) ile oluşturulan kuraklık stresinin etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda kuraklık stresi retrotranspozon polimorfizminde artışa GTS (Genomik Kalıp Kararlılığı) oranında ise azalışa neden olmuştur. Ancak kuraklık stresinde 10 μM hariç selenyumun 6 ve 8 μM konsantrasyonu retrotranspozon polimorfizminde azalışa ve GTS oranında ise bir artışa sebep olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre selenyumun iz miktarlarda kuraklık etmenine karşı olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.

2016, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, Kuraklık Stresi, Selenyum, IRAP, REMAP, Retrotranspozon

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF EFFECTS OF SELENIUM ON RETROTRANSPOSON POLYMORPHISM CAUSED BY DROUGHT STRESS ON WHEAT (*Triticum aestivum L.*)

Seba TURHAN

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

Supervisor: Doç. Dr. M.Sinan TAŞPINAR

IRAP and REMAP are retrotransposon-based molecular markers. In this study, effects of drought stress formed with PEG 8000 (-4, -6, -8 bar) and selenium (Na_2SeO_4) treatments (0, 6, 8 and 10 μM) on retrotransposon induced polymorphism were investigated in *Triticum aestivum* cv Kırık by using IRAP and REMAP markers. In result of the study, it was determined that drought caused an increase in retrotransposon polymorphism and a decrease in GTS (Genomic Template Stability) value. But 6 and 8 μM concentrations of selenium except for 10 μM caused a increase in retrotransposon polymorphism and an decrease in GTS value under drought stress. These trace amounts of selenium were determined according to the results show a positive effect against drought factors.

2016, 64 pages

Keywords: Wheat, Drought stress, Selenium, IRAP, REMAP and Retrotransposon

TEŞEKKÜR

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

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR'a destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde bilgi ve deneyimleriyle eğitime katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a, deneysel çalışmalarımdaki desteklerinden dolayı Sayın Arş. Gör. Esra ARSLAN'a tezimde geçen yardım ve desteğinden dolayı Sayın Esmay İĞİDER'e ve Sayın Burcu SİĞMAZ'a teşekkür ederim.

Her zaman ve her konuda yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Seba TURHAN

Haziran, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	10
2.1. Stres.....	10
2.2. Kuraklık Stresi.....	13
2.3. Selenyum.....	15
2.3.1. Kimyası ve biyokimyası.....	15
2.3.2. İhtiyacı ve kaynakları.....	16
2.3.3. Metabolizması.....	16
2.4. Transpozonlar.....	18
2.4.1. Transpozonların biyolojik önemleri ve fonksiyonları.....	19
2.4.2. Transpozonların sınıflandırılması.....	20
2.4.2.a. Sınıf-I Retrotranspozonlar.....	20
2.4.2.b. Sınıf-II transpozonlar.....	21
2.4.3. Retrotranspozon temelli moleküler markırlar.....	21
2.4.3.a. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism).....	22
2.4.3.b. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism).....	22
2.4.3.c. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism).....	23
2.4.3.d. RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms).....	24
2.4.3.e. IPBS (Inter Primer Binding Site).....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal.....	26
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	26

3.1.3. Çözelti ve solüsyonlar	27
3.1.3.a. Polietilenglikol (PEG 8000) çözeltileri	27
3.1.3.b. Na ₂ O ₄ Se stok çözeltisi	27
3.1.3.c. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler	27
3.1.3.d. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler	29
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Selenyum ve kuraklık (PEG) çözeltilerinin bitkiye uygulanması	30
3.2.2. DNA izolasyonu	30
3.2.3 IRAP	31
3.2.3.a. IRAP primerleri	31
3.2.4. REMAP	33
3.2.4.a. REMAP primerleri	33
3.2.4.b. REMAP-PCR protokolü	34
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	35
3.2.6. IRAP, REMAP analizleri ve genomik kararlılık sabitliğinin (%GTS) belirlenmesi	36
3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1. IRAP Analizleri ve Genomik Kalıp Kararlılığı (Genomik Template Stability; GTS%)	37
4.2. REMAP Analizleri ve Genomik Kalıp Kararlılığı (Genomik Template Stability; GTS%)	
4.3. Irap-Remap Jel Görüntüleri	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik Asit
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
CO ₂	Karbondioksit
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
Cys	Sistein
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik Asit
FAO	Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
g	Gram
GA	Giberellik Asit
GAA	Glasiyel Asetik Asit
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatton Peroksidaz
GTS	Genomik Kararlılık Sabiti
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IAA	İndol Asetik Asit
IRAP	Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism Polymorphism (İç-Retrotranspozon Çoğaltma Polimorfizmi)
LEA	Geç Embriyogenez Bağımlı Proteinler
LINE	Long Interspersed Nucleotide Elements (Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elementler)
LTR	Long Terminal Sequence (Uzun Uç Tekrarlar)
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NA	Nükleik Asit

Na ₂ O ₄ Se	Sodyum Selenat
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
O ₂	Singlet Oksijen
O ₂ (-)	Süperoksit Anyonu
OH(-)	Hidroksil Radikali
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PEG	Polietilen Glikol
REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltma Polimorfizmi)
RIBP	Retrotansposon Based İnsertional Polymorphism (Retrotranspozon Temelli İnsersiyonel Polimorfizm)
RNA	Riboz Nükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SeCys	Selenosisteyin
SelMet	Selenometionin
SINE	Short İnterspersed Nucleotide Elements (Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Elementler)
SOD	Süperoksit Dismutaz
S-SAP	Sequence-Spesific Amplified Polymorphism
TBE	Tris-borat-EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole Işın
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selenometionin, selenosistein ve metiloselenosistein formları	18
Şekil 2.2. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)	22
Şekil 2.3. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)	23
Şekil 2.4. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism)	23
Şekil 2.5. RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms)	24
Şekil 2.6. IPBS (Inter Primer Binding Site).....	25
Şekil 4.1. E2647 - IRAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	43
Şekil 4.2. Sikkula - IRAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	43
Şekil 4.3. Wltr2105 - IRAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	44
Şekil 4.4. N57-8081 - REMAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	45
Şekil 4.5. N57-8082 - REMAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	46
Şekil 4.6. E2647-8081 - REMAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya tahıl bilgileri (bin ton)	2
Çizelge 1.2. Dünya buğday verileri (bin ton)	3
Çizelge 2.1. Abiyotik ve Biyotik stres etmenleri	11
Çizelge 2.2. Kuraklık koşulları altında bitki fizyolojisinde ortaya çıkan etkiler	14
Çizelge 3.1. IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri	32
Çizelge 3.2. IRAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları	32
Çizelge 3.3. REMAP-PCR’da kullanılan primer dizileri.....	34
Çizelge 3.4. REMAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	35
Çizelge 4.1. Kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarında IRAP markırında kontrolle göre değişen bantların moleküler ağırlıkları (bp).....	39
Çizelge 4.2. IRAP markırında kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarına göre GTS oranları (%)	40
Çizelge 4.3. Kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarında REMAP markırında kontrolle göre değişen bantların moleküler ağırlıkları (bp).....	41
Çizelge 4.4. REMAP markırında kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarına göre GTS oranları (%)	42

1. GİRİŞ

Tarım, yaşadığımız coğrafyada hayati görevlerimizi sürdürebilmemiz için gerekli olan besin maddelerini üretme görevini üstlenmiştir. Her ülke içerisinde barındırdığı canlıların ihtiyaçlarını giderebilme maksadı ile beslenme açısından önemli ürünlerde kendine göre asgari bir yeterlilik derecesi sağlama çabası içerisinde. İstenilen bu amaç doğrultusunda da kendine yeterliliğin sağlanabilmesi, ürün harfiyatı verilmeden yurtiçi arzın gereksinimi karşılama gerektirir (Eraktan 2001).

Şuan dünyada nüfus hızlı bir şekilde artmaya devam ettiği için gereksinim duyulan besin ihtiyacı da aynı oranda artmaktadır ve bu da yaklaşık olarak tarımın başladığı 10.000 yıl öncesinden bu güne kadar üretilen gıdanın iki katından daha fazlasına ihtiyaç duyulması anlamına gelmektedir (Hoisington *et al.* 2002). Bu hızlı artışa aynı şekilde cevap verilmeli ve beslenme sorunlarının çözümünde, sınırlı olan tarım alanlarındaki bitkisel besin kaynağı üretiminin maksimum verimlilikte elde edilmesi gerekmektedir (Süzer 1992). Tarım ticari sektörde yeterince ilerlemiş ülkeler için, hem temel bir gelir kaynağı hem de oldukça önemli bir politik güçtür. Bizim ülkemizde bitki biyoçeşitliliği ve genetik kaynakları bakımından oldukça zengin olduğu için tarım oldukça önemli bir alanı kapsamaktadır (Güner 2000).

Ülke tarımı için önemi oldukça fazla olan tahıl (hububat) grubu *Gramineae* familyasına dahil edilmekte ve yine bu familyaya ait meyveleri, tohumları ya da tanelerini içermektedir. Ekiliş alanı ve üretim kapasitesi bakımından en yüksek tarımsal ürün grubu tahıllar olup işlenen toprakların yaklaşık yarısında tahıl üretimi yapılmaktadır (Köksel *et al.* 2000). Tahıl işleme sanayi grubu gıda sektöründe kurulu işletme sayısı ve üretim değeri açısından başta gelmektedir (Köksel and Kıymaz 2007).

Ülkemizde 2013 verilerine göre 11.5 milyon ha'lık bir alanda tahıl üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu alanın yaklaşık %67.8'inde buğday üretimi gerçekleştirilirken, %23.6'sında arpa, %5.7'sinde mısır üretimi yapılmaktadır. Bu

ürünleri sırasıyla çavdar (%1.2), çeltik (%0.9), yulaf (%0.8) ve tritikale (%0.3) üretimi takip etmektedir (TÜİK 2013).

Tahıllar, insan ve hayvan varlığının beslenmesinde büyük bir öneme sahiptir. Bu öneminin yanı sıra tarımsal, ekolojik ve sosyo-ekonomik nedenlerden dolayı ülkemiz tarımında vazgeçilmez ürünler grubunu oluşturur. Türkiye’de tahıl grubu üretimi, hem tarım sektörünün hemde genel ekonominin temelini oluşturmaktadır. Elde edilen verilere göre Türkiye’de tahıl üretiminin tarımsal gelire katkısı bitkisel ürün türleri içerisinde en yüksek düzeydedir. Tahıl ürünlerinin mülle gelire olan katkısı da oldukça fazladır. Tahıllar dünyada da en çok tüketilen ürün grubunu oluşturduğu için ihracat yönünden de önem taşımaktadır (Kızılaslan 2004).

Çizelge 1.1. Dünya tahıl bilgileri (bin ton) (TÜİK 2013)

	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014
Üretim	2.244.747	2.242.958	2.200.539	2.317.520	2.252.695	2.428.930
Tüketim	2.152.157	2.190.920	2.226.852	2.280.735	2.299.634	2.386.883
İhracat	286.401	290.833	284.276	343.495	298.553	326.761
İthalat	275.462	276.808	280.326	312.939	305.964	316.389
Baş. Stok	374.362	456.013	494.026	463.763	469.992	430.464
Bit. Stok	456.013	494.026	463.763	469.992	430.464	462.139

Bugün tüm dünyada, buğday yapısı itibariyle iyi bir besin hammaddesi olarak kabul edilmiştir. Bu tarım ürününün önemli bir özelliğide adaptasyon yeteneğinin geniş olmasıdır. Buğday aynı zamanda ticari maksatlı üretiminde gerek üretiminin sade oluşu, gerekse taşınma, depolanma ve işlenme kolaylığı gibi nedenlerden dolayı dünya nüfusunun yaklaşık %35’inin temel besinini oluşturmuş durumdadır. Bir buğday tanesinin yapı olarak içerdiği besin ürünleri ise %65–75 nişasta, %8–15 protein, %1–5 yağ, %1.5–3 şeker, %1–2 kül, %11–13 nem olarak gruplandırılabilir. Ayrıca buğday tanesinin yapı olarak bileşimin de karbonhidrat, yağ ve protein ve hatta insan ve hayvan beslenmesinde de önemi azımsanmayacak derece de fazla olan vitaminler de yer almaktadır (Kün 1988). Buğdayın bu özelliklerinin yanında hammadde olarak

seçilmesinin nedeninde yapısında bulunan gluten proteinleridir. Gıda sanayinde buğday ekmek, erişte, bulgur, makarna, kuskus bisküvi, kraker, gofret, kek gibi ürünlerin üretiminde vazgeçilemez bir yere sahiptir (Hoseney 1994). Dünyada ve Türkiye’de yaygın olarak *Triticum aestivum* (ekmeklik), *Triticum durum* (makarnalık) ve *Triticum compactum* (bisküvilik, topbaş) buğdayları yetiştirilip üretimi yapılmaktadır (Bushuk 1998).

Son verilere göre dünyada son yıllarda buğday üretimi yıllık 580-630 milyon ton olup bu miktar Türkiye’de 17-19 milyon ton arasında değişim göstermiştir (Anonim 2006, 2007). 2008/2009 PY’nda 684 milyon ton olan dünya buğday üretimi, 2011/2012 PY’nda %2 artışla 697 milyon ton civarına yükselmiştir (FAO 2013). 2013 Dünya tahıl verileri Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Dünya buğday verileri (bin ton) (TÜİK 2013)

	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014
Üretim	683.659	686.743	652.285	697.155	655.270	705.378
Tüketim	637.097	650.488	653.620	688.270	686.727	702.040
İhracat	144.617	136.938	133.170	157.830	138.714	154.007
İthalat	137.931	133.644	131.948	149.332	145.022	149.233
Baş. Stok	128.904	168.780	201.741	199.184	199.571	174.422
Bit. Stok	168.780	201.741	199.184	199.571	174.422	172.986

Bugün dünya genelinde buğday cinsinin üretimi ve dolayısıyla verimliliğini etkileyen faktörün kuraklık olduğu bilinmektedir. Kuraklık kavramı toprağın genel yapısı içerisinde mevcut bulunan su kapasitesinin bitkilerin büyüme ve gelişmesi için yetersiz kalmasına bunun beraberinde bitki türlerinin gelişmelerinde gözle görülür bir azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız döneme verilen isimdir. Bu hallerde ortaya çıkan kuraklık faktörü toprağın su tutma kapasitesi ve beraberinde evapo-transpirasyon hızına da bağlıdır (Levitt 1980). Kuraklık diğer bir tanım olarak da, topraktaki nem miktarının solma noktasında bulunması olarak açıklanmaktadır. Kuraklık genel ilkeler

içerisinde, ağır kuraklık (iveğen, akut), sürekli kuraklık (kronik) ve fizyolojik kuraklık şeklinde üçe ayrılabilir (Eriş 1990).

Kuraklık stresi en önemli tarımsal problemlerden biri olarak düşünülmektedir. Bitkilerin kurak şartlardan etkilenme olasılığının şimdiye nazaran gelecekte daha fazla olması düşünülmektedir. Dolayısıyla kuraklık gelecekte bitki büyüme ve gelişmesini daha fazla etkileyecektir (Chaves *et al.* 2002). Bitkisel yapılar hareket yetenekleri olmadıklarından etraflarında değişen fiziksel çevre koşullarına ayak uyduramaz ve olumsuz şartlardan en fazla etkilenen canlı grubuna dahil olmaktadır. Tüm yaşamları boyunca karşı karşıya kaldıkları tuzluluk, kuraklık, yağış, sıcaklık gibi stres koşulları bitkisel yapının büyüme ve gelişimine olumsuz bir yönde etkilemektedir (Taiz ve Zeiger 2010). Bu bitkisel yapıların uğradıkları olumsuz çevre koşulları esnetilebilir ve yeni ortamlarına adapte olmaları sağlanabilmektedir. Bu bağlamda aynı türe ait bitkilerin iklim yapıları farklılık gösteren bölgelerdeki dağılımları çok farklı olan çevresel şartlara adapte olabildiklerinin göstergesi olarak nitelendirilebilmektedir (Dolferus 2014). Bitkiler kuraklık stresi ile karşı karşıya kaldıklarında fizyolojik ve metabolik anlamda değişiklikler meydana getirirler.

Bitkilerin büyümesini önemli derecede etkileyen kuraklık su sıkıntısının yaşandığı süreyle doğrudan ilişkilidir. Kuraklığın başladığı ilk zaman diliminde bitkisel yapı ihtiyacı olan suya erişim sağlamak için gövde uzamasını yavaşlatıp kök yapısının gelişimini tetiklemektedir. Bu olay itibari ile kurak koşulların bitkide hasara yol açabilecek derecede uzaması durumunda bitkisel yapının kök ve gövde gelişimi durup yaprak alanı ve sayısında azalmaktadır (Anjum *et al.* 2011).

Kuraklık etmeni bitkilerin su potansiyeli olarak nitelendirilen turgor basıncında değiştirmektedir. Bitkisel yapılar kuraklık stresi oluşumunu algıladıklarında hücrelerin de ozmolit olarak nitelendirilen ve hücrenin turgor dengesinin korunmasını sağlayan bu maddeyi sentezler ve biriktirirler. Bu yapılar ise asparajin, prolin, karbonhidrat gibi gruplardan oluşmaktadır. Ozmolit yapılar stoma iletkenliğini artırıp kuraklığı önlemeye yardımcı olmaktadır (Anjum *et al.* 2011).

Kurak şartlar altında bitkilerde gerçekleşen en önemli biyokimyasal değişiklik ise süper oksit anyonu, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen bileşiklerinin oluşmasıdır (Bhargava and Sawant 2013). Aslında bu bileşikler hücre metabolizmasının doğal bir yan ürünü olup sinyal iletim mekanizmasında önemli derecede rol oynarlar (Anjum *et al.* 2011; Cabello *et al.* 2014). Bu yapıların hücrede fazla oluşması durumunda ise lipit peroksidasyonu, protein indirgenmesini ve DNA yapı parçalanmasını indükleyerek hücresel yapının ölümüne neden olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı kurak şartlar sırasında oluşan reaktif oksijen bileşiklerinin indirgenmesi ve birikimlerinin engellenmesi stres ile karşı karşıya olan bitkilerin stres ile mücadelelerinde önemli bir etken olmaktadır. ROS (Reaktif Oksijen Türleri) yapıların birikimi durumunda oluşan oksidatif stres ile mücadelede bitkiler süperoksit dismutaz, katalaz veya glutatyon, tokoferol askorbat gibi moleküller kullanmaktadırlar (Farooq *et al.* 2009; Anjum *et al.* 2011). Kuraklık faktörü bitkisel yapıların fizyolojik ve morfolojik yapılarına etki ederken aynı zamanda moleküler düzeydede etkiler oluşturmaktadır.

Bitkisel yapılarda istenilen ortam şartlarının uygun olmaması durumunda ortaya çıkan stres faktörleri DNA metilasyonu olarak ifade edilen stres yanıtı ve gen ifadesini düzenlenmesinde rol oynayan mekanizma ile de ilişkilidir. DNA metilasyonu kavramı bitkilerin fenotipik temel mekanizmalarında geçici olarak bir değişim sağlayan kuramdır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde bu kavram yetkindir ve hücre farklılaşması ile birlikte genomik açıdanda oldukça önemli bir kavramdır (Jaligot *et al.* 2004; Suzuki and Bird 2008; Baranek *et al.* 2010). DNA metilasyonunun temeli DNA'da meydana gelen bir kimyasal değişimdir. Bu kimyasal yapıda DNA'daki bir metil grubu eksilmektedir. Ortaya çıkan bu olay dizileri kalıtsal olup sonradan ilk dizi geri gelecek şekilde çıkartılabilir. Metilasyon bu özelliği nedeniyle epigenetik koda aittir ve en iyi karakterize edilmiş epigenetik mekanizmadır (Zilberman *et al.* 2007).

DNA metilasyonu, kromatin yapının şekillenmesinde kompleksin etkinliğini yönetebilmektedir (Zilberman *et al.* 2007). Stres kavramı ile ilişki içerisinde olan genlerin genetik düzeyde ifade edilmeleri, gen lokuslarında meydana gelen DNA metilasyonundaki azalışla ilişkilidir. Bu şartlar altında da doğal stres koşullarında stresle

ilgili olarak gen ifadesi için özel dizi sekanslarının DNA demetilasyonu gerektirebileceği öne sürülmektedir. Hipometilasyon olayına uğramakta olan lokuslar genomik olarak yeniden düzenlemeye olduğundan daha fazla eğilimlidirler. Dolayısı ile bu şartlar altında stresle indüklenen DNA metilasyonundaki artışın stres şartları altında ki genomun yeniden düzenlenmesini sınırlayan bir savunma yanıtını gösterdiğini söylemek mümkündür (Boyko and Kovalchuk 2010). DNA metilasyonu funguslarda, bitkilerde ve hayvanlarda ortaya çıkmıştır ve bunlar programın geliştirilmesinde önemli bir rol üstlenmişlerdir (Teyssier *et al.* 2008). Sitozin metilasyonu gen ifadesinin düzenlenmesinde de transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede önemli rol oynamaktadır (Paszowski and Whitham 2001). Transposal element yapıları transpozonların geniş transkript reaksiyonları ve DNA'nın metilasyonu için geniş kapsamlıdır (Zhang 2008). Ayrıca çevresel uyarıcılar alüminyum, ağır metaller ve su stresi gibi etmenler metilasyonu genom boyunca değiştirirler (Lukens 2007). Kuraklık stresi DNA metilasyonunun varyasyonuna sebep olmaktadır (Wang *et al.* 2011).

Kuraklık stresinin gen yapıları üzerine etkilerini gösteren parametreler ise retrotranspozon mekanizmalarıdır. Bitkilerin kuraklık sonucu uğradıkları değişimi genetik düzeyinde DNA'larına bakarak görmemiz mümkündür. Genom retrotranspozonları transposon unsurların en bol sınıfı ve ökaryotik genomlarındaki genleri sayıca en üstün olanıdır (Feschotte *et al.* 2002; Sabot and Schulman 2006). Bugünkü araştırmalar gösteriyor ki ökaryotik genomların büyük çoğunluğu transposal elementleri içermektedir. Örneğin bitkilerde *Arabidopsis thaliana* da nükleer DNA'nın %15'ini, çim otu genlerinin %50-80'ini, *Liliaceae* türünün ise %90'ını içermektedir (Feschotte *et al.* 2002; Sabot and Schulman 2006). Çoğu aktif retrotranspozon aileleri birkaç üye içerir ve bunlar genom boyunca dağılırlar (Hagan and Rudin 2002; Cheng *et al.* 2006). Farklı retrotranspozon aileleri özel stres değişikliklerine farklı cevap verebilir (Beguiristain *et al.* 2001).

Transpozal elementlerin çoğu ökaryotik organizmaların önemli genomik bileşenleridir. Bitki genomundaki yapısal evrimde önemli bir genomik bileşen olarak yer alırlar (Jurka 2004). Retrotranspozonlar ökaryotik genomun transpozol elementlerinin iki büyük

grubundan biridir ve bu onların kendi yayılma moduna göre tanımlanır. Sınıf 1 gruba dahil olan retrotranspozonlar RNA aradizileri yoluyla transible olurlar. Retrotranspozonlar gen ekspresyonunu değiştirerek genom evriminde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bunlar genlerin transkripsiyonun da değişiklikler meydana getirerek bu olayı gerçekleştirmektedirler (Henikoff and Comai 1998; Leprince *et al.* 2001; Kobayashi *et al.* 2004; Hernández-Pinzón *et al.* 2009; Butellí *et al.* 2012). Bazı durumlar da elde edilen polipeptitlerin yapısal ya da gen ifadelerinin mekânsal ya da zamansal modellerini değiştirdiği belirlenmiştir. Retrotranspozonların gen ifadesi de epigenetik düzenlemeleri etkileyebilir. Sonuç olarak, retrotranspozonlar bitkinin fenotipik çeşitliliğinde önemli bir doğal kaynak temsil ediyor olup mutasyonlara neden olarak genomu yeniden yapılanma ve mutagenез olarak görev yapmaktadırlar (Grandbastien *et al.* 2005). Retrotranspozonların yüksek bir kopya sayısı ve genom boyunca genel dağılımı, aynı zamanda bunların girişinin sebep olduğu, büyük yerel değişiklik markır sistemlerinin geliştirilmesi için ideal bir temel sağlar (Alzohairy *et al.* 2014). Bunlara ilaveten retrotranspozonların çok sayıda genomik lokusun içine girebildiğini ve bununla birlikte mutasyonları dolayısıyla yeni özellikleri içeren bireyler arasında insersiyonel polimorfizm oluşturmaktadırlar (Kumar and Bennetzen 1999). Ortaya çıkan bu durum yaralanma, melezleme, protoplast izolasyonu ve yahut *in vitro* hücre veya doku kültürü gibi faktörler tarafından uyarılmaktadır (Grandbastien *et al.* 2005).

Retrotranspozon yapılarının bu özelliklerine bağlı olarak Hirochika and Hirochika (1993) doku kültürü şartlarında meydana gelen yaralanmalara bağlı olarak oluşan *Tto1*, *Tto2* ve *Tnt1* retrotranspozonlarının hareket etme vasıtasıyla genom üzerinde yeni yerlere lokalize olduklarını ve böylelikle mutajenik etkiye sebep olduğunu göstermiştir.

Transpozonların çalışma alanları ökaryotik canlılarda insersiyon mutasyonları, gen klonlama çalışmaları, transgenik organizmaların elde edilmesi ve haritalama çalışmaları olup prokaryotlarda ise klasik antibiyotik-direnç markırı gibi amaçlarla yaygın olarak moleküler genetik çalışmalarında kullanılmaktadırlar (Bergman and Quesneville 2007).

Transpozon yapılarına ek olarak bazı elementlerde stres şartlarının bitkiler üzerindeki hareketlerine etki edebilmektedirler. Buna istinaden selenyum doğal yapısı itibarı ile mutlak gerekli bir bitki besin elementi değildir, fakat şimdiye kadar kabul görmüş dünyada bilinen en önemli anti-oksidan maddelerden birisidir (Çakmak *et al.* 2009). Selenyum insanlar ve hayvanlar için gerekli bir besin elementi iken (Tapiero *et al.* 2003) bitkiler için ise tam bir netlik kazanmamıştır (Hartikainen 2000). Selenyum içeriğinde kimyasal yapı itibarı ile kükürtle benzerlik göstermektedir (Nowak *et al.* 2004). Aynı zamanda selenyum yüksek bitkilerde olumlu biyolojik görevlerde yer alabilmektedir (Germ *et al.* 2005). Bitkisel temelli yapılarda UV radyasyon temeli kaynaklı oksidatif stres yapısına karşı bitkilerin toleransını artırabilir yaşlanmayı geciktirme ve fide büyümesini teşvik edebilir (Hartikainen and Xue 2001). Ayrıca selenyumun uygun dozları uygulandığında, organlarda ve dokulardaki lipid peroksidazın ve hidrojen peroksidazın birikimini engelleyen selenoenzimlerin etkinliğini uyararak organizmadaki oksidatif zararı önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Hartikainen and Piironen 2000; Xue *et al.* 2001; Turakainen and Seppänen 2004; Hartikainen 2005).

Selenyum oksidatif stres şartları altında koruyucu yapıda olan glutatyonun (GSH) etkinliğini arttırıp, yüksek bitkilerde ise lipid peroksidasyonunu azaltma yolu ile oksidatif strese karşı koruduğu bilinmektedir (Hartikainen 2005). Selenyum sitozolik enzim yapısında rol oynar ve bu durum GSH-Px yapısında gerçekleşir bu rolü de ilk olarak 1973 yılında belirlenmiştir. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), görev olarak hücre membran bütünlüğünün bozulmasını engelleyici rodedir (Eriksson 2001).

Kuraklık stresi ile birlikte selenyum uygulaması bitkilerde birçok etki yapabilir. Bitki büyüme ve gelişmesine olumlu etki yapabildiği gibi olumsuz etkide meydana getirebileceği bildirilmiştir. (Tadina *et al.* 2007; Ren *et al.* 2007).

Selenyum miktarınca fazla olan bir ortamda yetiştirilen bazı bitki türlerinin bir takım stres faktörlerine karşı özellikle kuraklık (Kuznetsov *et al.* 2003; Germ *et al.* 2007; Yao *et al.* 2009), tuzluluk (Kong *et al.* 2005; Djanaguiraman *et al.* 2005; Hawrylak-Nowak

2009) ve ağır metal (Srivastava *et al.* 2009; Cartes *et al.* 2010) gibi faktörlere direnç geliştirdiği gösterilmiştir.

Kong *et al.* (2005) ve Rios *et al.* (2009), selenyumun bitkisel yapılarda antioksidan kapasitesini artırmak suretiyle stres toleransı ve dolayısı ile büyüme üzerinde yararlı etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Seppanen (2003), patates üzerinde yapmış olduğu çalışmada sodyum selenatın oksidatif stres etmenine karşı kurak şartlar altında kloroplastı koruduğu belirtilmiştir.

Hartikainen (2005), yüksek bitkiler ile birlikte yeşil alglerde (*Chlamydomonas reinhardtii*) de (Yokota 1988) lipid peroksidasyonunda düzenli azalmaya neden olarak koruyucu rol oynadığını bildirmiştir.

Xiaoqin and Chu (2010), UV-B radyoaktif stresi şartlarına maruz bırakılan buğday tohumlarında, selenyum uygulanmasının ile süperoksit radikal üretim oranı ve MDA miktarının önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir.

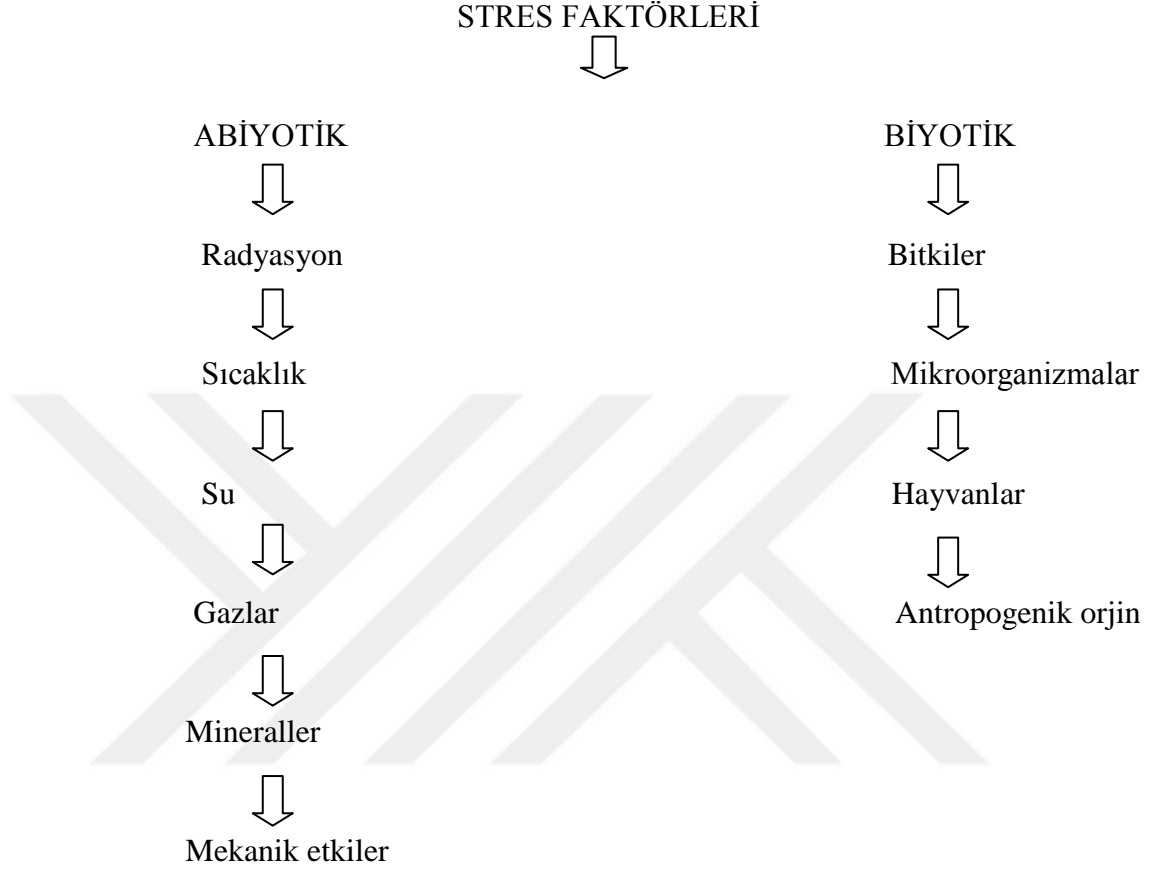
Dolayısı ile bu tez kapsamında kuraklık stresinin meydana getirmiş olduğu genomik kararsızlık ve retrotranspozon polimorfizmi üzerine selenyumun etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Stres

Canlılar doğa yapıları itibarı ile dış çevre adı altında yaşadıkları ortamda sürekli bir ilişki içerisinde dirler. İçerisinde buldukları bu yapıda istenmeyen durumların oluşması durumunda ise adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalırlar. Stres durumu altında adaptasyon koşulları değişime uğrayan bitki normal gelişmesini devam ettiremez ve stres hali ortaya çıkar. Stres faktörü bitki üzerinde negatif etkileri olan dış faktörler olarak tanımlanır. Birçok durumda, stres bitkinin canlılığını devam ettirebilmesi, ürün verimliliği, biyokütle birikimi ve özümleme ile ilişki kurarak açıklanması gereken bir kavram olarak ifade edilebilmektedir (Büyük 2012).

Stres faktörü bitkilerin hayatları boyunca karşılaşılabilecekleri bir faktördür. Stres faktörleri Çizelge 2.1’de belirtildiği üzere biyotik ve abiyotik stres etmenleri olarak 2 gruba ayrılmaktadır (Kaçar 2006).

Çizelge 2.1. Abiyotik ve Biyotik stres etmenleri (Kaçar 2006)

Stres etmenleri bitkilerin normal işleyiş yapısındaki tolerans ve alışkın oldukları doğal yaşam ortamlarının bozulmasına göre değişiklikler göstermektedir (Kadioğlu 2004; Madhova 2005). Bitkiler tüm yaşamları süresince doğada birçok stres faktörü ile karşılaştıklarından stresle ilişkili çalışma mekanizmalarının aydınlatılması ve toleranslı tür ve çeşitlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bitkiler stres koşullarına karşı bazı moleküler cevap mekanizmaları oluşturmuşlardır. Bunlar; makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi, koruyucu moleküllerin sentezi ve reaktif oksijen türleri olarak sınıflandırılmaktadır (Zhu 2000; Munns 2002). Makromoleküller karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit gibi dört büyük gruptan ibarettirler. Olası stres koşulları altında bu yapılar kendi metabolizmalarını koruma eğilimine girerler. Önemli abiyotik stres etmenlerinden olan tuzluluk, kuraklık, sıcaklık gibi faktörler sahip oldukları yapı itibarı ile ozmotik bir yapı içerirler. Bu faktörler hücrel dehidrasyona yol açarak homeostazı

adı verilen iç dengeyi bozarlar. Bitkiler bu durumda dehidrasyona uğrarlar gösterdikleri yanıt mekanizması ise aquaporin olarak adlandırılan suyun iletimi ve iyon dengesinin kontrolünü sağlayan hidrofilitik yapının ve iyon taşıma sistemlerinin aktive olmasını yahut inaktive edilmesi şeklindedir (Zhu 2000; Munns 2002). Bitkilerde uygun olmayan çevre şartlarında ortaya çıkan strese karşı verilen cevaplar düşük moleküler ağırlıklı çözünen maddeler veya ozmolit yapılı şekerler, polioller prolin gibi bazı aminoasitler, ısı şoku proteinleri (Heatshock) ve LEA proteinleri (geç embriyogenez bağımlı proteinler) gibi farklı özel proteinlere dayanmaktadır. Ozmolit kavramı turgorun devamını sağlayan ozmotik düzenlemede kullanılan bir yapı olarak ifade edilir. Ozmolit yapılar, koruyucu molekül sınıfına dahillerdir. Ayrıca bu yapılar stres tarafından oluşturulan ROS'un temizlenmesinde görev yapmaktadırlar. Diğer bir görevi ise ozmotik ayarlayıcı olması ve ozmoprotektan olarak rol oynamasıdır. (Smirnoff 1989). Isı şoku proteinleri intraselüler protein yapısındadırlar ve bu yapılarından dolayı önemli bir yere sahiptirler. Temel görevleri stres şartları altında hücre-içi proteinlerin parçalanması ile ortaya çıkan artıkların temizlenmesinde şaperon rolleri mevcuttur. Protein katlanması, hücresel düzenlenme ve yapı olarak ilgili olmayan proteinlerin hücrede birikiminin önlenmesi gibi birçok konuda işlevsel konumdadırlar ve proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesini sağlarlar. (Henle 1999). LEA proteinleri düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Çevresel strese karşı özellikle kuraklık stresine karşı bitkileri korumakla görevlidirler. İlk olarak tohum embriyolarında tanımlanmışlardır (Holmberg 1998). Stres koşullarını ortaya çıkması durumun da LEA genleri tarafından ifade edilen hidrofilitik LEA proteinleri suyu bağlama kapasitesine sahip olduklarından su eksikliği etkilerini azaltmada ve hücresel bütünlüğün korunmasında etkin rol oynamaktadırlar (Sairam 2004).

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH)'dir. Bu yapılar dokularda meydana gelirler ve önemli yapılara DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. ROS yapıları tanım olarak bitkilerde kloroplastlarda cereyan eden fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre

duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşan en yoğun serbest radikallerdir (Van *et al.* 1998; Van and Dat 2006). ROS'lar çevresel stres etmenlerini karşısında ikincil etmenler olarak gruplandırılmışlardır. Bazı durumlarda ROS ların üretim alanları artmaktadır. Bunlar kuraklık, soğuk, tuzluluk, metal toksisitesi olarak gruplandırılabilir. Hücrel ROS konsantrasyonunun şiddetli bir şekilde artması antioksidan savunma sistemleri ve ROS üretimi arasındaki dengenin bozulmasıyla ilgilidir. Devam eden bu zincirleme reaksiyonlar ile de organizmada ROS artışı sonucu bitkiler oksidatif strese girmektedir. Stres koşulları altında ROS üretiminin artış göstermesi lipidlerin peroksidasyonuna, nükleik asit yapısında hasara, proteinlerin oksidasyonuna, enzim yapısının da inhibisyona, programlı hücre ölümü adı verilen apoptozis aktivasyonuna dolayısıyla da hücrelerin ölümüne kadar birçok hasara yol açabilir (Smirnoff 1993; Sgherry *et al.* 1996).

2.2. Kuraklık Stresi

Kuraklık stresi, bitkilerin gelişimini olumsuz yönde etkileyerek zarar verebilen en önemli abiyotik stres faktörlerinden bir tanesidir. Bu yapı bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler olayları etkiler ve buna bağlı olarak da bitkiler, sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak tolerans mekanizmaları geliştirebilmektedirler (Kalefetoğlu and Ekmekçi 2005). Kuraklık koşulları bitki hücrelerinin bölünmesini ve büyümesini azaltarak bitki gelişimini engellemektedir. Ayrıca bununla beraber turgor basıncında azalma meydana gelmesi ve transpirasyonun olumsuz etkilenmesi mineral madde alımını engellemektedir. Bu koşullar altında da büyüme ve gelişmede azalmaya neden olabilmektedir. Bu nedenle kuraklık, tarımsal üretim için en önemli sınırlayıcı faktörler arasında yer almaktadır (Capell *et al.* 2004). Kuraklık stresinin dünya üzerindeki mevcut yüzde olarak payı %26'lık bir kısımdır. Bunun dışında ise %20'lik pay mineral stresi, %15'lik pay soğuk ve don stresi, %29'luk kısmı kalan tüm stresler doldurmaktadır. Stres faktörün görülmediği kısım ise yalnızca %10'luk bir alanı kapsamaktadır (Yediyıldız 2008). Ayrıca kuraklık stresi bitki üzerinde mekanik, metabolik ve oksidatif etkiler de göstermektedir. Bitkiler de su kaybı oluşmaya başladığı an turgor basıncında da bir azalma meydana gelir ve bu durum

kuraklığın mekanik etkisi olarak tanımlanır (Levitt 1980). Hücreden su kaybı oluşunca membran yapısı da değişikliğe uğrar ve oluşan bu yapıda ise membran lipidleri yapı olarak sıvı-katı fazında olduğundan daha az kinetik enerji ile birlikte lateral ve rotasyonel hareket göstermektedir. Ortaya çıkan bu su kaybı ile hücre hacim kaybeder devamında plazmoliz olayı gerçekleşmektedir. Plazma membranı bu şartlar altında gergin yapıda olduğu için tonoplastta çökme ve yırtılma gibi zararlar oluşturabilmektedir. Ortaya çıkan bu zarar normal hücre metabolizmasını kalıcı olarak bozabilmektedir (McKersie and Leshem 1994). Oksidatif etkide ise su stresi oluşması durumunda bitki vejetatif dokularında ortaya stres faktörü çıkar. Oksidatif stresin en yaygın nedeni, kloroplastın yapısında oluşan ışık-klorofil etkileşimleridir. Bulunulan ortamda su kısıtlı ya da bitki gelişimi için yetersiz ise var olan suyu bitki organları kaybetmemek için stomalarını kapatırlar. Bu şartlar altında fotosentezle fiksasyon olayı için gerekli CO₂'nin alınımı kısıtlanır. Kurak şartlarda bitkinin O₂ oluşum hızı arttığından lipid yapısı peroksidasyona uğrar ve dolayısıyla membran yapı bütünüyle zarar görür (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Diğer bir etki olan metabolik etkidede hücreden olası bir kaybı durumunda, bitki normal işleyişine devam edemez sahip olduğu metabolik yapı bozunuma uğrar. Gerçekleşen bu su kaybı durumunda protein yapısında bozulmalar meydana gelir ve hücre zarara uğrayabilmektedir. Su kaybı ile birlikte proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik aminoasitlerin de su ile etkileşimleri bozulmaktadır. Sonuç olarak protein denatürasyonu meydana gelir ve DNA ve RNA da bozunuma uğrar (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Çizelge 2.2. Kuraklık koşulları altında bitki fizyolojisinde ortaya çıkan etkiler (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

a. Osmotik Düzenleme
b. Stoma Hareketleri
c. Protein Metabolizmasındaki Bozukluk
d. Nitrat İndirgenme Aktivitesi
e. Hormonal Dengenin Değişmesi
f. Fotosentezin Azalması

2.3. Selenyum

2.3.1. Kimyası ve biyokimyası

Selenyum periyodik cetvelde yer itibari ile VIA grubunda bulunmaktadır. Bu elementin atom numarası 34 tür ve 78.9 atom ağırlığına sahiptir (Sunde *et al.* 1997). İlk olarak keşfi 1817 yılında kimyager Swedish ve Jöns Jakob Berzelius tarafından tarafından gerçekleştirilmiştir (Kim 2003; Kieliszek 2013). Bu yapı sahip olduğu içerik itibariyle hem metalik hem de metalik olmayan özellikler gösterdiği için metalloid olarak sınıflandırılmaktadır. Elementin selenid (-2), Se (0), selenit ya da selenious asid (+4) ve selenat ya da selenik asit (+6) gibi bazı formları oksidatif halde bulunmaktadır (Kim 2003).

Doğada 6 adet sabit izotopa sahip olan selenyum kükürtlede benzerlik göstermektedir ve sahip olduğu bu izotoplarının %73'den fazlası 78Se ve 80Sdir (Gowdy 2004). Canlı sistemlerde birçok yerde görev almakta olan bu yapı oksijen ve nitrojen gibi serbest radikallerin hücreye olası bir zarar vermeleri durumunda hücreyi korumak için görevli enzim sisteminin bir parçasıdır. Bununla birlikte spermatozoa fonksiyonu, tiroid hormonların aktive edilmesi, enerji metabolizması ve bağışıklığın düzenlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca selenyum esansiyel bir element özelliğine sahiptir ve inorganik selenyum formlarında selenyum esansiyel bir rol oynamazken organik selenyum bileşiklerinde selenyum önemli bir esansiyel rol üstlenmektedir (Gowdy 2004). Selenyum bazı yağlı gıdalarda tohum türevlerinde ve çeşitli otlarda, selenometionin ve selenosistein gibi protein ve aminoasitlere bağlıdır. Aminoasit yapısında bulunan serin aminoasitinin selenyum içeren türevlerine selenosistein (SeCys), adı verilmektedir. Protein yapısında olup içeriğinde bir ya da daha fazla selenosistein içeren yapılara ise "selenoproteinler" adı verilmektedir. Bir selenoprotein molekülü, selenosistein aminoasit dizisi içermektedir. Hücre plazmasında en bol bulunan selenoprotein ise selenoprotein P'dir (Berry 2002).

2.3.2. İhtiyacı ve kaynakları

Selenyum, canlı yapılarda çok küçük miktarlarda ihtiyaç duyulan esansiyel bir iz element olarak adlandırılmaktadır (Goldhaber 2003; Thomson 2004). Birçok dünya ülkesinde de bitkisel ürünler, insan ve hayvanlar için başlıca selenyum kaynağı durumundadır. Toprağın selenyum içeriği bakımından doygun olup olmaması ise toprak üzerinde yetişen bitkilerin ve yetişen bu bitkileri tüketen hayvanlardan elde edilecek ürünlerin selenyum içeriklerini de önemli ölçüde etkilemektedir. Selenyumun bir formu olan Selenometiyonin, tahıl danelerinde, pirinç ve soya fasülyesi gibi türlerde oldukça önemli miktarda orana sahiptir. Bu bitkilerdeki toplam selenyumun %45.5-86.5'ini oluşturmaktadır (Yang *et al.* 1997). Selenometiyonin, en fazla Hint hardalı bitkisi, ayçiçeği ve beyaz bakladan ekstrakte edilmektedir (Ximenez-Embun *et al.* 2004).

2.3.3. Metabolizması

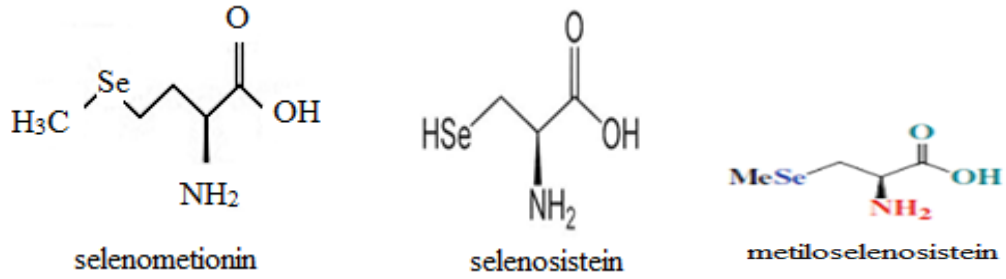
Selenyumun en önemli özelliklerinden biri enzim aktivitesinin korunması amacıyla serbest radikallere karşı koruyucu bir madde özelliği taşımasıdır. Selenyumun yapısı organik ve inorganik tabanlıdır. İnorganik tabanlı olan selenyum formları selenat ve selenit şeklindedir, organik tabanlılar ise selenosistein ve selenometiyonin şeklinde bulunur. Selenometiyonin formu insanlarda ve hayvanlarda bulunmaz ve tamamen bitkisel kaynaklıdır. Bu formu selenyum deposu olarak vücutta görev yapmaktadır. Selenyum ihtiyacı durumunda dışardan selenyum alınmadığı takdirde selenometiyonin vücudun ihtiyaç duyulan selenyum gereğini karşılamaktadır (Neyzi and Ertuğrul 2002; Gao *et al.* 2012).

Selenosistein formu DNA tarafından şifrelenmiş yapıdadır. Bu form yirmi birinci aminoasit olan sisteinin selenyum içeren organıdır. Selenosisteinin hücre içinde etkin bir rol oynar. Bu yapının en önemli görevi yükseltme ve indirgenme reaksiyonlarında yer alan enzimlerin biyolojik olarak etkin kısmını oluşturmasıdır (Tunç 2006). Selenosistein formu hayvansal kaynaklıdır. Ayrıca selenosistein bazı selenoprotein

yapısında yer almaktadır (glutatyon peroksidaz, selenoprotein W, selenoprotein) (Tunç 2006; Şimşir and Özgen 2010).

Selenyum bileşiği antioksidan gruba dahildir. Bazı enzimlerin bileşeni konumundadır (glutatyon peroksidaz ve iyodotiroinin deiyodinaz) (Gül 2000). Glutatyon peroksidaz enzimin aktif kısmını oluşturur (Onat 1996) ve E vitamini ile birleşerek lipid peroksidasyonuna karşı vücudun savunma mekanizmasının bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu yapı dört farklı izoforma sahiptir. Bunlar GSHPx-1, GSHPx-2, GSHPx-3, GSHPx-4 tür. Bunlar sırasıyla kırmızı hücrelerde, gastrointestinal mukozada kan plazmasında ve hücre zarının merkezinde bulunur. Bu enzimin aktive edilebilmesi için selenosistein forma gereksinim duyulmaktadır (Kılınç *et al.* 2010). Birçok yapıda bulunan selenyum formları absorbe edilirkende farklı şekilde absorblanırlar. Bununla birlikte form yapılarının önce selenid forma dönüştürülmesi daha sonra selenoprotein yapıya katılmaları gerekmektedir. Bazı durumlarda metiyonin form eksik olabilir ve böyle durumlarda selenometiyonin proteini metiyonin olarak görev alabilir. Selenometiyonin katalize edilebilmesi için iki yol izlenir. İlkinde selenometiyonin katalizlenir ve selenosistein elde edilir sonrasında ise dekarboksilasyon olayıyla hidrojen selenide indirgenir (Beilstein and Whanger 1992). Diğer yol ise transaminasyon ve dekarboksilasyon olaylarını gerektirmektedir (Mitchell and Benevenga 1978).

Selenyumun yapısının inorganik formlarından olan selenit (+4) ve selenat (+6) bitkiler aracılığıyla topraktan emilirler bunlar daha sonra bir dizi işlem ile organik formları olan SelMet ve SelCys'e dönüştürülürler (Bitterli *et al.* 2010). Bunların her birinin biyolojik etkileri ve toksisiteleri de birbirlerinden farklıdır (Hoefig 2011). Diğer formları, hayvansal yapılı ürünlerde baskın olarak yer alır ki insanlar selenyumun bu formlarını kullanırlar. İnsanlarda doğal selenyum bileşiği, proteinlere bağlanarak ve SelCys aminoasitlerine katılarak dönüşüm gerçekleştirirler (Kieliszek and Blazejak 2013). Selenometiyonin canlılarda çok fazla sentezlenemez bununla beraber (Schrauzer 2003) omurgalı canlılarda selenosisteinden selenometionin sentezleyememektedirler (Gowdy 2004).



Şekil 2.1. Selenometionin, selenosistein ve metiloselenosistein formları (Schrauzer 2003)

Selenyum antioksidan özellik gösterdiğinden yapılarında eksik olma durumunda canlıda total antioksidan sistemi etkilenmektedir. Çünkü mineral yapıda olan elementler inorganik formda pro-oksitan (Edens 2002), organik formda antioksidan olabilmektedirler (Sies and Arteel 2000). Antioksidan korumadaki eksiklik ortaya çıkması halinde oksidatif stres artmakta ve redoks sinyallerinin değişimine neden olabilmektedir (Gladyshev *et al.* 1999).

Kayanoki *et al.* (1996) selenyum bileşiminin eksikliği bulunan epitel hücrelerin, selenyum takviyesi yapılan hücrelere kıyasla, hidrojen perokside olan duyarlılığın daha yüksek ve apoptozun daha fazla olduğunu çalışmalarında göstermişlerdir. Bu çalışmalar göstermiştir ki selenyum eksikliğini durumu, hücre hasar konusu ve apoptoz durumu itibariyle zararlı olduğu hipotezini desteklemektedir.

2.4. Transpozonlar

Transpozonlar hareketli element yapısı olarak adlandırılan DNA parçalarıdır. Bu hareketleri yapıları sayesinde genomda insersiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları uyarabilirler ve sonuçta yeni gen alellerinin oluşmasına yol açabilirler. Bu sebepler doğrultusunda transpozon mekanizmaların evrimsel süreçte yeni türlerin oluşmasında etkili bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Loning and Seadler 1997; Fedoroff 2000; Kidwell and Lisch 2000; Kazazian 2004; Feschotte and Pritham 2007).

Transpozon konusunda bilimsel olarak çalışmış ilk bilim insanları, 1914'te mısır genetikçisi Rollins Adams Emerson (Emerson 1914 ve 1941'de), sitogenetikçi Marcus Morton Rhoades (Rhoades 1941) olmuştur. Bu konuda çalışan iki araştırmacı mısırdaki transpozonların sebep olduğu fenotipik varyasyonların arkasındaki genetik mekanizmaları araştırmışlar fakat görülen bu varyasyonların transpozonlardan kaynaklandığını anlayamamışlardır (Federoff 2001).

Transpozon yapısı terim olarak 1948 yılında Barbara McClintock (McClintock 1950), tarafından keşfedilmiştir. Ancak bunlar başlangıçta mısır tanelerindeki farklı pigment yapılarına neden olan elementler olarak anlaşılmışlardır (Feschotte *et al.* 2002).

Mc Clintock bulduğu bu mekanizmaya başta “kontrol elementleri” adını vermiştir. Ancak o dönemde bu anlam pek değer görmemiş ve kabul edilmemiştir. İlerleyen yıllarda ise genetik yapıları ve temel özellikleri kanıtlandıktan sonra 1983 yılında McClintock tıp Nobel ödülüne layık görülmüştür (McClintock 1984; Feschotte *et al.* 2002).

Transpozonlar hareketlilik olarak aktif transpozonlar ve inaktif transpozonlar olarak iki gruptan oluşmaktadırlar. Yapısal olarak transpozonlar iki temel özellik taşımaktadırlar. Birincisi, genom içerisinde bir yerden bir yere hareket edebilme özelliği (transpozisyon), ikincisi ise genomdaki kopya sayılarını arttırabilme (replikasyon) özelliğidir (Bennetzen 2000).

2.4.1. Transpozonların biyolojik önemleri ve fonksiyonları

Transpozonlar, uygulamada başta moleküler biyologlar olmak üzere çoğu araştırmacı tarafından ve birçok amaçla kullanılmaktadırlar. Transpozon yapılarının sebebiyet verdiği insersiyon polimorfizmleri ilerlemiş olan moleküler teknikler kullanılarak belirlenmektedir. Bu yüzden transpozon yapıları DNA parmakizi çalışmaları ile, çeşitlilik ve filogenik araştırmaları, genetik haritalamaya yönelik olarak birer markır olarak kullanılmaktadırlar. Transpozon yapıları ayrıca transgenik organizmaların eldesi,

gen klonlama çalışmaları, mutasyon aracı ve algıyıcısı olarak kullanılmaktadırlar. Bir diğer önemli kullanım yeri ise prokaryot yapılarda klasik antibiyotik–direnc markırı olarak kullanımı bunun yanı sıra plazmit vektörler kullanılarak bakteri transformasyonunda kullanılabilir. Transpozol yapıların gen izolasyon çalışmalarında kullanılması mutant fenotipik karakterden istenilen genin izole edilmesi için de oldukça önemlidir. (Grzebelus 2006; Bergman and Quesneville 2007; Moran and Malik 2009).

2.4.2. Transpozonların sınıflandırılması

Bu yapıdaki ilk sınıflandırma David J. Finnegan tarafından 1989 yılında yapılmıştır, şuan kullanılan sınıflandırmanın da temelini bu grup oluşturmaktadır. Bu sınıflandırma, transpozol yapıları kullandıkları transpozisyon araçlarına göre ikiye ayırmaktadır. Bunlar Sınıf-1 transpozon (retrotranspozon) ve Sınıf-2 transpozonlardır (Finnegan 1989).

2.4.2.a. Sınıf-I Retrotranspozonlar

RNA temelli transpozon sınıfı olup transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanır. Diğer bir deyişle retrotranspozon olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanizmada ilk olarak RNA polimeraz enzimi aracılığı ile transpozonun mRNA'ya transkripsiyonu yapılır sonraki adım ise ters transkriptaz aracılığı ile bu mRNA'nın, cDNA'ya dönüştürülmesidir. Elde edilen cDNA genom bulunan bölgeye yerleşir ve yeni konumunu alır. Kopyala ve yapıştır olarak adlandırılan bu transpozisyon çeşidinde kopya sayısı fazlalaşır ve sonuç olarak da genom büyüklüğü artar (Marco and Marin 2005; Wicker *et al.* 2007; Huang *et al.* 2009). Retrotranspozonlar genel olarak beş alt sınıfa ayrılabilir ve yaygın sınıflandırma LINE (long interspersed elements) ve SINE (short interspersed elements) olmak üzere iki tanedir (Evgen'ev and Arkhipova 2005). LINE dizileri diğer yapılara göre daha yaygın olarak bulunur. Bu yapılar LTR dizileri içermeyen yapılardır. Bunların diğer bir adlandırması otonom elementlerdir bunun açılımı ise hareket için gerekli dizilere sahip olma olarak nitelendirilmektedir. Bu dizinin önemli bir özelliğide

insan genomunun yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. SINE dizileri diğer dizinin aksine otonom değildir ve otonom olmayan retrotranspozonlar olarak ifade edilirler. SINE dizileri, bir iç promotöre sahiptir ve bu yapı genellikle poly (A) ucunda bulunan kısa elementlerdir. Bu yapıların hareket etme durumları diğer genlere bağlıdır çünkü bunlar kodlama yapma kabiliyetine sahip değildirler. Tam aksine LINE dizileri ise kendi hareketlerini yürütebilmektedirler. Ayrıca LINE yapıları SINE dizilerinin genom içine girişleri için gerekli olan proteinleri de sağlarlar. LTR'li yani uzun uç dizilerine sahip olan retrotranspozonlar, LTR dizilerinde promotörleri ve retrotranspozisyon için gerekli olan en az iki enzimin genlerini de bünyelerinde bulundurmaktadırlar. Sahip olunan yapı itibari ile birlikte transpozisyon mekanizması açısından da retrovirüslere çok benzerler. En büyük farkları ise virüs olarak paketlenmelerini sağlayan env “envelope” genine sahip olmamalarıdır. Virüs benzeri olan bu yapılar paketlenemedikleri için başka hücrelere de bulaşamazlar (Feschotte *et al.* 2002; Marco and Marin 2005; Wicker *et al.* 2007).

2.4.2.b. Sınıf-II transpozonlar

Bu yapılar transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanmazlar. Temelleri DNA ya bağlıdır. Bunlar yer değiştirme yeteneğine sahiptir. Bu diziler kendilerini kromozomal bölgeden kesip çıkartarak hedef bölgeye bağlanmaktadır. Bu yapı genel olarak kes-yapıştır mekanizması olarak bilinmektedir (Huang *et al.* 2009; Wicker *et al.* 2007).

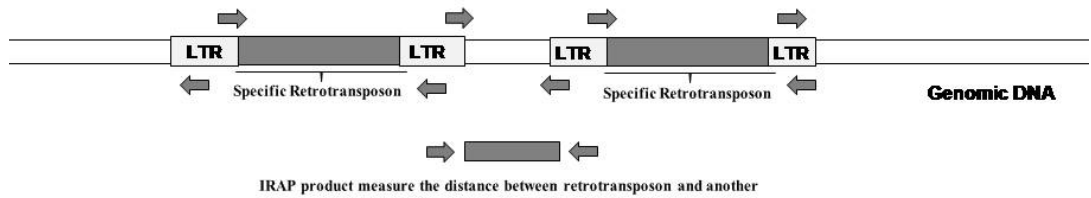
2.4.3. Retrotranspozon temelli moleküler markırlar

Retrotranspozon yapıya dayalı markırların ortaya çıkışı hem bitki türünde tespit edilmeleri hemde aktivitelerinin bulunmasına dayalıdır. Bu yapılar markır destekli seçim, tür tanımlama, haritalama gibi alanlarda moleküler markır sistemi oluşturmak amacı ile denenmiş olağan üstü araçlardır. Retrotranspozonlar yapıların temelini çoğu PCR temellidir. Buna bağlı olarak da çoklu ürünler üreten birçok PCR temelli yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin tümünde retrotranspozona bağlanan (genel olarak LTR'ye) bir primer kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra ikinci primerin bağlanma

bölgeleri farklılık göstermektedir. Retrotransposon ilk olarak arpada uygulanmıştır markır çeşidi olarakta S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) yöntemi kullanılmıştır (Grandbastien *et al.* 1989).

2.4.3.a. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)

Tekniğin temeli iki retroelement arasında ki DNA bölgesinin çoğaltılması olarak nitelendirilir ve bu teknik retrotranspozon polimorfizimlerini belirlenmesini sağlamaktadır. İlk olarak Kalendar (1999) tarafından tespit edilmiş olup amaç DNA parmak izi oluşturmaktır. Bu teknikte uzun uç tekrarlara sahip yapıların dış kısmından itibaren ilerleyen bir ve ya iki primer kullanılır. Zaten temelde yöntemin esası bu iki primer arasındaki bölgenin çoğaltılmasına dayanmaktadır. Kullanılacak olan bu iki primer aynı retrotranspozon element ailesinden ya da farklı ailelerden olabilir. Uzun uç tekrar (LTR) bölgeleri tasarlanan primerler aynı PCR'da kullanılır (Kalendar *et al.* 1999). Hedeflenen bu sınıf I elemanları, iki yönde de gerçekleşebilen (5'-3' veya 3'-5') kopyala-yapıştır transpozisyon metodunu kullanırlar.

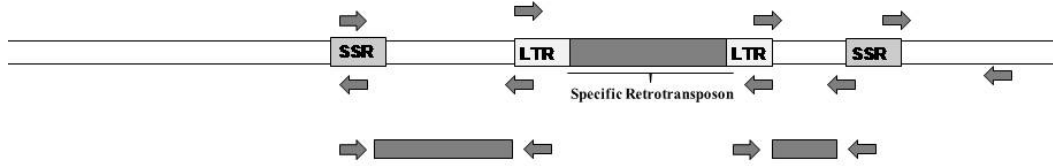


Şekil 2.2. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Kalendar *et al.* 1999)

2.4.3.b. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)

Bu yöntem diğer bir teknik olan IRAP tekniğine benzerliğiyle bilinmektedir. Yöntemin esası ise bir uzun uç tekrar (LTR) dizisi ve bununla birlikte bir mikrosatellite bağlanan primerler arasında ki bölgenin çoğaltımına dayanmaktadır. Önemli derecede bulunan ve genomda yer alan mikrosatellitler retrotranspozonlar ile ilişkili içerisindedirler. Kısacası

bu teknikte LTR sekansı bununla beraber adaptör takılmış tek dizi tekrar yapıları arasında çoğaltılmış bölgeler içindeki polimorfizm kullanılmaktadır. REMAP ve IRAP tekniklerini her ikisi de bitki çeşitlerinde yüksek bant profili oluşturduklarından güvenilir yöntemler olarak kullanılmaktadırlar (Kalendar and Schulman 2006)

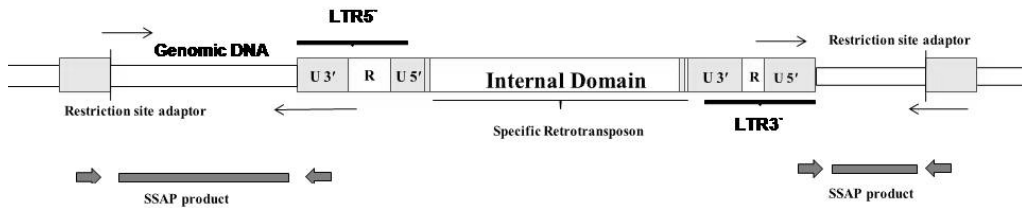


REMAP product measure the distance between retrotransposon and microsatellite

Şekil 2.3. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) (Kalendar and Schulman 2006)

2.4.3.c. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism)

Bu yöntem kesme görevi üstlenmiş bir restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA'ya ligasyon yapısıyla bağlanan bir restriksiyon adaptörüne ve bununla birlikte bir LTR'ye bağlanan primerler arasındaki bölgenin çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. Bu tekniğin belirlenmesi ilk olarak arpa'da keşfedilmiş olup amaç *BARE-1* retrotranspozonunun yerini incelemektir. Waugt *et al.* (1997) tarafından bilim dünyasına katılan bir tekniktir. Teknik AFLP yöntemine benzemektedir fakat ondan daha yüksek seviyede polimorfizm gösteren bir yapıdır (Kalendar and Schulman 2006).

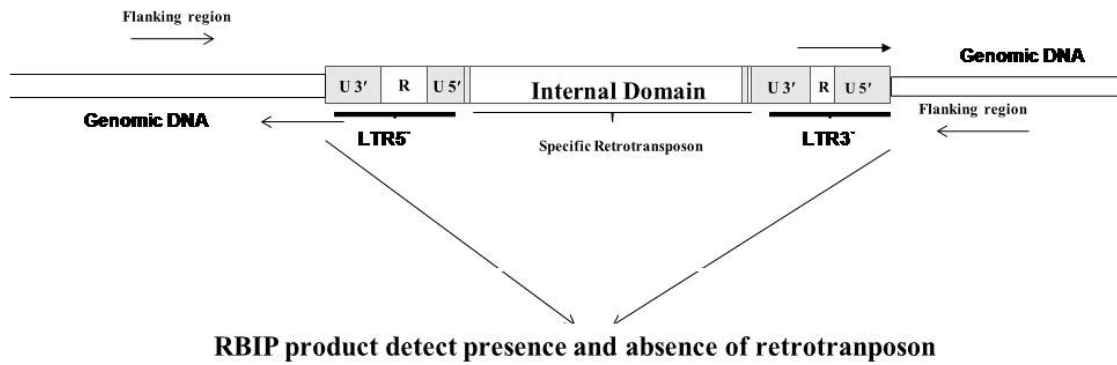


SSAP products measure the distance between transposon and restriction site

Şekil 2.4. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism) (Kalendar and Schulman 2006)

2.4.3.d. RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms)

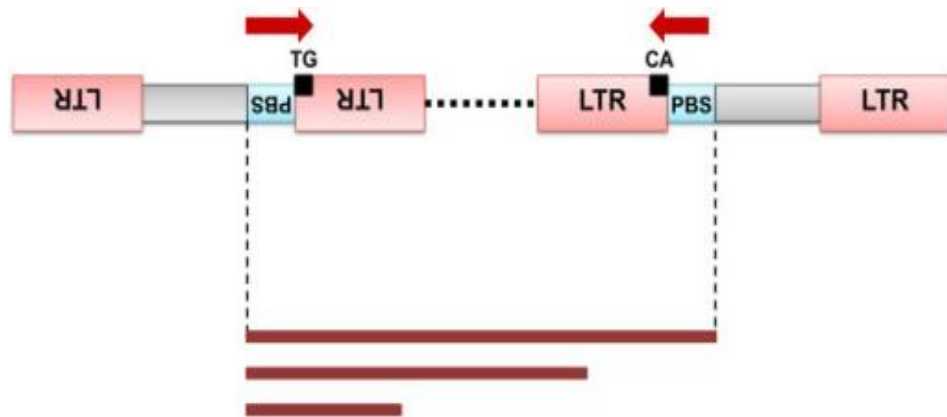
RBIP tekniği ilk olarak Flavell *et al.* (1998) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknikte özgün olan bir lokus değerlendirilir. Bu yüzden retrotranspozon insersiyonuna komşu özgün dizi bilgisini gerektirmektedir. Yöntemin temelini oluşturan RBIP markırlarının geliştirilebilmesi için insersiyon bölgesinde dizi bilgisine ya da büyük genomik veri tabanına gereksinim duyulmaktadır. Bu yöntemde kodominantlığın belirlenebilmesi en büyük avantajdır. Bu teknik de retrotranspozon yapıya sahip olan bölgeler, bir LTR primeri ve tek-kopyalı DNA'yı sınırlayan bir primer ile çoğaltılabilmektedir. Bu yöntemin dez avantajı ise çok pahalı ve karmaşık bir yöntem olmasıdır.



şekil 2.5. RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms)

2.4.3.e. IPBS (Inter Primer Binding Site)

IPBS tekniğinde retrotranpozonlar içerisinde buldukları konumları ile iç içe geçmiş, ters dönmüş veya kesilmiş durumda bulunmaktadır. Bu yapıda mevcut bulunan iç kısımlar ile birlikte LTR dizileri sıklıkla bir diğer retrotranspozonun yanına yerleşmiştir. Bu dizide, PBS dizileri sıklıkla diğer PBS'nin yanında yer almaktadır. Genom yapısında retrotranspozon varlığının fazla olduğu bölgelerde, diğer retrotranspozon yapıları ile birlikte bulunma ihtimaliden dolayı PBS dizileri kullanılabilmektedir (Kalendar *et al.* 2010). Bu yöntemin güvenilirliği IRAP ve REMAP teknikleri kadar fazladır.



Şekil 2.6. IPBS (Inter Primer Binding Site) (Kalendar *et al.* 2010)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak; Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen ekmeklik kırık çeşidi kullanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesi ile birlikte elde edilen bitkilerden yararlanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma sırasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı:

- Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf, GERMANY)
- PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
- Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
- Santrifüj (Hettich, GERMANY, EBA-20)
- Otoklav (Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00)
- Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
- Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
- Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
- Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)
- Spektrofotometre (Cecil, CE 5502)
- pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
- Derin Dondurucu (Nuarie, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)
- Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)
- Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)

- Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE, MD 592)
- Kar makinesi (Scotsman, U.S.A., AH 19828 5)

3.1.3. Çözelti ve solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıdaki gibidir:

3.1.3.a. Polietilenglikol (PEG 8000) çözeltileri

Osmotik potansiyeller PEG 8000 kullanılarak sağlanmıştır.

-4 Bar	175,1 g/lt PEG
-6 Bar	218,2 g/lt PEG
-8 Bar	254,57g/lt PEG

3.1.3.b. Na₂O₄Se stok çözeltisi

1000 ml'lik 10 mM Na₂O₄Se hazırlamak için 1.8894 g Na₂O₄Se tartılarak 1000 ml saf suya eklenmiştir. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.c. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

1M Tris-HCl (1000 ml): 121.1 g Tris-base kimyasalı 700 ml dH₂O, 42 mL yoğunlaştırılmış HCl (%37.2-12.1 M) beraberinde 700 mL su içerisine 121.1g Tris-base karıştırıldı. Devamında üzerine 42 mL yoğunlaştırılmış HCl eklenip toplam hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlama işlemi gerçekleştirildi.

0.5 M EDTA pH: 0.8 (1000 ml): Bu çözeltinin hazırlanmasında 186.1g EDTA, 20 g NaOH ve 800 ml dH₂O kullanılmıştır. Çözelti için 800 mL su içerisine 136.1g EDTA eritilerek, üzerine ise 20 g NaOH eklenip pH: 8.0 olarak ayarlanmıştır. Filtreden geçirilerek ve otoklav yapıldı.

5 M NaCl (500 ml): Çözelti için 146.1g NaCl, 450 mL dH₂O, 146.1g NaCl 450 mL suda eritilmiştir. Sonrasında toplam hacim 500 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı (otoklav yapılmadı).

10X TE Buffer (1000 ml): Buffer çözeltisi 100 mL 1M Tris-HCl pH: 8.0, 20 mL 0.5M EDTA, 880 mL dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır.

1X TE Buffer (1000 ml): 10X TE Buffer çözeltisinden 100 mL alınarak 900 mL saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. (DNA 1X TE'de çözülür.)

3 M Sodyum Asetat (pH: 5.2)(100 ml): 40.8 g Sodyum Asetat bileşiği (C₂H₃NaO₂) 80 mL ultra saf su içerisinde tamamen eritilir ve pH 5.2 oluncaya kadar Glasiyel Asetik Asit (GAA) eklenir ve son olarak toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.

10 M Amonyum Asetat: Çözeltinin hazırlanmasında 77g Amonyum asetat, 800 mL dH₂O kullanılmıştır. İşlem için 77g Amonyum asetat 800 mL distile su içerisinde çözülür. Distile su kullanımı ile hacmi 1 litreye tamamlanıp stok hazırlandı. Yapılan çalışmada ise 250 mM olacak şekilde seyreltilerek +4°C'de muhafaza edildi.

DNA ekstraksiyon tamponu (25 örnek için): 0.5g toz CTAB (Setil trimetil amonyum bromür), 0.25g (%0,1) Sodyum bisüfit (NaHS₃ ve Na₂S₂O₅ karışımı)(Sigma, 243973), 2.5 mL Tris-HCl (1M), 7 mL NaCl (5M), 1 mL EDTA (0.5 M), 0.05 mL (%0.2) β-merkaptotanol (v/v).

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

2-propanol (izopropanol): Hazır olarak kullanıldı (Sigma, I9516).

Proteinaz K: Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlandı (Sigma, P2308).

Ribonükleaz (RNaz): Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlandı (Sigma, R6513).

%70'lik Etil Alkol: 70 mL saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

Etidyum Bromür Çözeltisi: Çözelti için 500 mL 0,5X TBE tamponu içine 300 µL Etidyum Bromür ek edilerek hazırlandı. Devamında karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Bromfenol Blue Çözeltisi: 0.25g Bromfenol blue ile birlikte 30 mL gliserol'ün toplam hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Sonrasında çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi.

10X TBE tamponu: Çözeltinin hazırlanması için 108g Tris-base, 55g Borik asit, 40 mL 0.5 M EDTA, 700 mL dH₂O kullanılmıştır. Başlangıçta 700 mL distile su içerisinde 108g Tris-base, 55g Borik asit ve 40 mL 0.5 M EDTA çözülüp devamında toplam hacim 1000 mL'ye tamamlanarak ve otoklavlandı.

0.5X TBE tamponu: Araştırma için kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak hazırlandı ve seyreltilerek (50 mL 10X TBE Tamponu + 950 ml saf su) 0.5X TBE tamponu hazırlandı.

Primerlerin Hazırlanması: Çalışmamızda kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarlarda sulandırılarak stok solüsyonu hazırlandı ve devamında uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Selenyum ve kuraklık (PEG) çözeltilerinin bitkiye uygulanması

Her uygulama için rastgele olarak seçilmiş 20-25 adet buğday tohumu Hoogland çözeltisi için sıvı ortamda (pH=5.8) çimlendirmeye alınmış, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık 8 saat karanlık şartlarda 14 gün süreyle büyütülmüştür. 14 günün sonun da sodyum selenat çözeltilisinin ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$) 0, 6, 8 ve 10 µM'lık dozları yapraktan uygulanmıştır. Selenyum uygulamasını mütakiben iki gün sonra PEG 8000 ile hazırlanan 4,-6,-8 barlık ozmotik potansiyelde yine aynı şartlarda 14 gün süreyle kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonun da bitki örnekleri alınarak -80°C 'de çalışma yapılacağı güne kadar bekletilmiştir.

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- İlk olarak yeni hazırlanmış DNA Ekstraksiyon tamponu önceden 70°C 'ye ısıtılmış su banyosunda bekletilmiştir. Bitki materyalin üzerine eklenmeden önce ekstraksiyon tamponuna %0.05 (v/v) oranında β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.
- Önceden sıvı azotta parçalanıp 2 mL'lik tüplere alınan 0.3g bitki materyali üzerine 1000 µL DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmış ve önceden 70°C 'ye ısıtılmış su banyosunda her 10 dk'da alt üst edilip karıştırılarak 60 dk. bekletilmiştir.
- Su banyosu aşamasından sonra 10 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır ve bu süre sonunda her örneğe 750 µL fenol kloroform eklenip tüm örnekler 15 dk. yavaşça alt üst ederek karıştırılmıştır.

- d) 14000 rpm ve 24°C'de 20 dk. santrifüjlendirilip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- e) Çıkarılan oranda tekrar kloroform izoamil alkol eklenmiştir.
- f) 14000 rpm ve 4°C'de 20 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- g) Üst faza 2,5 µL RNaz ve 8 µL proteinaz K eklenmiş ve 45 dk. 37°C'de bekletilmiştir.
- h) DNA'yı çöktürmek için her tüpe 100 µL amonyum asetat (10M), 100 µL sodyum asetat (3M), 800 µL soğuk izopropanol eklenmiştir.
- i) Yavaşça alt üst edildikten sonra 14000 rpm ve 4°C'de 20 dk. santrifüjlenip üst faz atılmıştır.
- j) Tüpler santrifüje yerleştirilerek 1 dk daha santrifüj yapılmıştır.
- k) Tüpler kâğıt havlu üzerinde ters çevrilip bir müddet beklenmiştir.
- l) Tüpler 37°C lik etüvde 15 dk bekletildikten sonra üzerlerine 100 µl 1xTE eklenmiştir ve sonrasında fingerprint yapılmıştır.
- m) 24 saat +4°C'de dinlendirildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3 IRAP

3.2.3.a. IRAP primerleri

Çalışmada 5 IRAP primeri (Metabion International AG Lena-Christ-Strasse 44/I D-82152 Martinsried, Deutschland) kullanılmıştır. Bu primerlerin baz dizileri Çizelge 3.1'de IRAP-PCR protokolü verilmiştir.

3.2.3.b. IRAP-PCR Protokolü

Çizelge 3.1. IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri

No	Primer adı	Rta	Tm	Dizisi (5’ 3’)→	Kaynak
1	WLTR2105	WLTR	61.0	(ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA)	Alavi <i>et al.</i> 2008
2	Nikita-57 (N57)	Nikita	60.0	(CGCATTGTCAAGCCTAAACC)	Alavi <i>et al.</i> 2008
3	Sukkula	Sukkula	71.0	(GATAGGGTCGCATCTGGGCGTGAC)	Alavi <i>et al.</i> 2008
4	Nikita-E2647	Nikita	62.0	(ACCCCTCTAGGCGACATCC)	Alavi <i>et al.</i> 2008
5	Bare1(0)	Bare 1	53.0	(CTAGGGCATAATCCAACA)	Evrensel <i>et al.</i> 2011
6	Stowaway	Stowaway	62.0	(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT)	Baunel <i>et al.</i> 2002
7	5’LTR	Bare 1	63.0	(ATCATTGCCCTCTAGGGCATAATTC)	Alavi <i>et al.</i> 2008
8	6149	Bare 1	61.0	(CTCGCTCGCCACTACATCAACCGCGTTTATT)	Alavi <i>et al.</i> 2008
9	6150	Bare 1	62.0	(CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA)	Alavi <i>et al.</i> 2008
10	LTR7286	Bare 1	66.0	(GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC)	Kalender <i>et al.</i> 1999

IRAP-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. IRAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşenin Adı	Miktarı (µL)	20 örnek için son konsantrasyonu
Steril distile su	13 µL	260 µL
10X PCR tamponu (MgCl ₂ içermeyen)	2 µL	40 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL	40 µL
5 µM primer	1 µL	20 µL
10 mM Dntp	0.5 µL	10 µL
50 ng/µl Kalıp DNA	0.25 µL	5 µL
1 U/µl <i>Taq</i> -DNA polimeraz (Sigma, D7058)	1 µL	1 µL
Toplam	20 µL	376 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 REMAP 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 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. REMAP-PCR’da kullanılan primer dizileri

No	Primer adı	Dizisi (5' → 3')
1	WLTR2105 + ISSR 8082	(ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA + CTCTCTCTCTCTCTCTG)
2	<i>Nikita-57(N57)</i> + ISSR 8081	(CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC + GAGAGAGAGAGAGAGAGAC)
3	Sukkula + ISSR 8081	(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC + GAGAGAGAGAGAGAGAGAC)
4	<i>Nikita-E2647</i> + ISSR 8081	(ACCCCTCTAGGCGACATCC + GAGAGAGAGAGAGAGAGAC)
5	<i>Nikita-57(N57)</i> + ISSR 8082	(CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC + CTCTCTCTCTCTCTCTG)
6	<i>Stowaway</i> + 8082	(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT + CTCTCTCTCTCTCTCTG)
7	<i>Sukkula</i> + 8082	(GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC + CTCTCTCTCTCTCTCTG)
8	<i>Nikita-E2647</i> + 8082	(ACCCCTCTAGGCGACATCC + CTCTCTCTCTCTCTCTG)
9	WLTR2105 + 8081	(ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA + GAGAGAGAGAGAGAGAGAC)
10	<i>Stowaway</i> + 8081	(CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT + GAGAGAGAGAGAGAGAGAC)

3.2.4.b. REMAP-PCR protokolü

REMAP-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.4’de verilmiştir. Ayrıca IRAP tekniğinde uygulana PCR döngü aşamaları REMAP tekniğinde de aynıdır.

Çizelge 3.4. REMAP-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşenin Adı	Miktarı (µL)	20 örnek için Son konsantrasyonu
Steril distile su	13 µL	240 µL
10X PCR tamponu (MgCl ₂ içermeyen)	2 µL	40 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL	40 µL
5 µM primer (REMAP ve ISSR)	1 µL	40 µL
10 mM Dntp	0.5 µL	10 µL
50 ng/µl Kalıp DNA	0.25 µL	5 µL
1 U/µl <i>Taq</i> -DNA polimeraz (Sigma, D7058)	1 µL	1 µL
Toplam	20 µL	376 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 agaroz kimyasalının konsantrasyonu %2.0 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp sonrasında 0,5X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5X 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 60 V–180 dk. süre ile PCR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiştir.
- 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

Çalışmada kullanılan her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol IRAP ve REMAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar temin edilmiş olan agaroz jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Ortaya çıkan bu jel görüntüleri TotalLab TL120 programı ile değerlendirilmiştir. GTS değerleri yani genomik kararlılık sabitliliği (%) her bir primer ürünü için Atienzar (1999)'a göre $100-(100*a/n)$ formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki a her bir uygulama örneği için tespit edilen IRAP ve REMAP polimorfik profillerinin ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bantı sayısını göstermektedir. Uygulama gruplarına ait IRAP ve REMAP profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bantın ortaya çıkması veya mevcut bir bantın kaybolmasını kapsamıştır.

3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi aşamasında her bir bireyde her primer için bantların varlığı (1) ya da yokluğu (0) şeklinde ifade edilmiştir. Oluşan bu bantlara göre de primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bantların var olması durumu primerlerin hibridize olduğu anlamına Değerlendirme aşaması TotalLab TL120 kullanılarak tamamlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

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

Selenyumun ve PEG 8000 kullanılarak oluşturulan kuraklık şartlarında Kırık ekmeçlik buğday genomundaki retrotranspozon hareketini ve etkisini belirlemek için yürütülen bu araştırmada 10 IRAP primeri denenmiş (Wltr 2105, Nikita E-2647, Nikita N-57, Sukkula, Bare1(0), Stowaway, 5'LTR, 6149, 6150, LTR 7286) ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren 5 (Wltr 2105, Nikita E-2647, Nikita N-57, Sukkula ve Bare1(0)) primer seçilerek GTS için değerlendirilmeye alınmıştır. Polimorfizm oranı PEG konsantrasyonunun artan dozlarına bağlı olarak artış göstermiştir. Ancak Na₂O₄Se'ın 6, 8 µM dozları ile birlikte uygulanan PEG -4, -6 ve -8 bar dozları polimorfizmde bir azalış sağlamış ancak 10 µM dozu ise polimorfizmde bir artış sağlamıştır. IRAP marker sonuçlarına göre en yüksek polimorfizm oranı -8 bar ve 10 µM Na₂O₄Se sonucu oluşan %52.6 en düşük oran ise -4 bar 8 µM Na₂O₄Se %25.4 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar çizelge 4.2 de verilmiştir. Araştırmamızda monomorfik ve polimorfik bant sayıları ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu değerler IRAP primerlerine göre şöyledir. WLTR 2105 primeri monomorfik bant sayısı 2 polimorfik bant sayısı 15, Sukkula primeri monomorfik bant sayısı 0, polimorfik bant sayısı 25, E 2647 primeri monomorfik bant sayısı 3, polimorfik bant sayısı 29, N-57 primeri monomorfik bant sayısı 1, polimorfik bant sayısı 11, Bare 1(0) primeri monomorfik bant sayısı 2, polimorfik bant sayısı 17 dir.

4.2. REMAP Analizleri ve Genomik Kalıp Kararlılığı (Genomik Template Stability; GTS%)

Retrotranspozona dayalı bir yöntem olan REMAP tekniğinde yine 10 primer (Wltr2105+8082, Nikita N-57+8081, Sukkula+8081, Nikita E-2647+8081, Stowaway+8082, Nikita N-57+8082, Sukkula+8082, Nikita E2647+8082, Wltr 2105+8081, Stowaway+8081) ISSR primerleriyle kombinlenerek denenmiş bunlar

içindende en iyi sonuç veren beş (Wltr2105+8082, Nikita N-57+8081, Sukkula+8081, Nikita E-2647+8081, Nikita N-57+8082) primer kombini seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Kuraklık dozuna bağlı olarak GTS oranında azalma ve polimorfizm oranında artış tespit edilmiştir. Ancak kuraklıkla birlikte selenyumun üç dozu (6, 8, 10 μM $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$) uygulandığında ilk iki dozun kuraklık stresinin oluşturduğu polimorfizmi azalttığı ve GTS oranını artırırken son dozun selenyum uygulamasının ise GTS oranını düşürdüğü ve polimorfizm ise artırdığı yani toksik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. REMAP sonuçlarına göre en yüksek polimorfizm -8 bar 0 μM $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ %58.3 en düşük polimorfizm olarak da -4 bar 6 μM $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ %31.0 olarak hesaplanmıştır. REMAP primerlerine göre monomorfik ve polimorfik bant sayıları da şöyledir. N 57 + 8081 primerleri monomorfik bant sayısı 1, polimorfik bant sayısı 14, WLTR 2105 + 8082 primerleri monomorfik bant sayısı 2, polimorfik bant sayısı 16, Sukkula + 8081 primerleri monomorfik bant sayısı 1, polimorfik bant sayısı 21, E2647 + 8081 primerleri monomorfik bant sayısı 2, polimorfik bant sayısı 30, N-57 + 8082 monomorfik bant sayısı 1, polimorfik bant sayısı 13 olarak hesaplanmıştır.

REMAP ve IRAP uygulamalarının verdiği GTS oranları karşılaştırılınca REMAP tekniğinde GTS oranı düşük ve polimorfizmin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi ise REMAP'ta polimorfizmin yüksek olmasının nedeni ise bu teknikte hem retotranstranzpozonların hareketi hem de DNA zararının hesaplanmaya alınmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. Kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarında IRAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlıkları (bp)

Primer	Kontro 1	+/ -	- 4 PEG				- 6 PEG				- 8 PEG			
			0 µM	6 µM	8 µM	10 µM	0 µM	6 µM	8 µM	10 µM	0 µM	6 µM	8 µM	10 µM
SUKKULA	8	+	-	-	-	720	1064	1172	1194	890	977 638	890 612	1677 638	1665 963 638
		-	1709 1117 950 921	1117	921	1117 863 451	1117 451	518 1117	1117 451	451	1117 921	518 771	518	518
WLTR210 5	9	+	-	624	-	-	1105	1119	647	1105	893	1079	-	-
		-	928	912	989 870	928 829	989 969	989 969	989 928	989	989 912 789	989 912	989 928	989 928
E2647	7	+	-	-	1500	-	2483 2210	1907 1027	1595 1027	2000 1675 1044 2413	1352 1990	2010 1675 1063 1925	1960 1352 953	1567 1449 1012 496
		-	2381 2120 1854	2381 2120 1854	-	2381 2120 1854	2381 2120	-	-	2381	2381 2120	1854	-	705
N57	6	+	-	-	-	-	-	2450 1813	-	-	-	-	2450 1550	-
		-	400	1121 400	1121 400	400	899 400	-	400	859 494 400	400	-	400	899 400
Bare 1 (0)	7	+	-	-	1050 989 702	-	702	722	-	696	1054 995 742	-	772	1050 995 442 690
		-	630 592	630 592	-	630 592	374	483	483 374	483	483 374	592 483 431	374	592 483

Çizelge 4.2. IRAP markırında kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarına göre GTS oranları (%)

Primer	Kontrol	- 4 PEG				- 6 PEG				- 8 PEG			
		Na ₂ O ₄ Se				Na ₂ O ₄ Se				Na ₂ O ₄ Se			
		0 μM	6 μM	8 μM	10 μM	0 μM	6 μM	8 μM	10 μM	0 μM	6 μM	8 μM	10 μM
Sukkula	0	50	12.5	12.5	50	37.5	37.5	37.5	25	50	50	37.5	50
Wltr2105	0	11.2	22.3	22.3	22.3	33.4	33.4	33.4	22.3	44.5	33.4	22.3	22.3
E2647	0	42.9	42.9	14.3	42.9	57.2	28.6	28.6	71.5	57.2	71.5	57.1	71.5
N57	0	16.7	33.4	33.4	16.7	33.4	33.4	16.7	50	16.7	0	50	33.4
Bare1 (0)	0	28.6	28.6	42.9	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	71.5	42.9	28.6	85.8
%Pol.	0	29.9	28.0	25.4	32.1	38.1	32.3	29.0	39.5	48.0	39.6	36.3	52.6
GTS	100	70.1	72.0	74.6	68.9	62.9	67.7	71.0	60.5	52.0	60.4	63.7	47.4

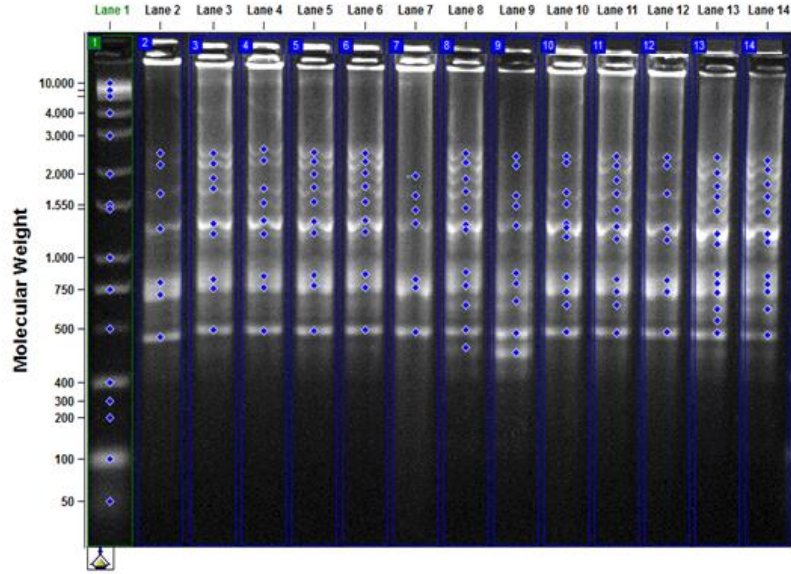
Çizelge 4.3. Kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarında REMAP markırında kontrole göre değişen bantların moleküler ağırlıkları (bp)

Primer	Kontrol	+/-	4 PEG				6 PEG				8 PEG			
			0 µM	6 µM	8 µM	10 µM	0 µM	6 µM	8 µM	10 µM	0 µM	6 µM	8 µM	10 µM
WLTR2105 8082	6	+	1000	946	-	1064	1400	-	285	862 604	-	1020	565	-
		-	1159	1491 1159 750	-	1159 325	-	325	750	750 325	750 325	1159	325	-
N57 8081	7	+	1176	1071	-	-	1017	687	670	1071	-	1106	-	1089 670
		-	1612 1466 1258 896	1612 1466 1258 896	1612 1466 896	1612 1466 896	1612 1258 896	1612 896 400	896 551	1612 1258 896	1612 1466 896	1258 896	1612 1466 896	1612 1258 896 400
SUKKULA 8081	5	+	-	-	1222 762	724	892 775 675	1000 663	1222 916	1222 1000 663	1222 699	854 675	775 608	1222 867 712
		-	-	-	432	-	550	479	1111	1111 479	479	479	479	1111 479
E2647 8081	6	+	575 458	-	-	569 453	446 251	515	632 447	443	599 196 441	612 442	593 511	471
			275	741	848 275	227	848	-	848	848	848 275	848	848	848
N578082	7	+	-	-	1431	-	542	-	-	-	1442 1116	-	760	542
		-	1000	-	1315 400	867	663 400	663 244	663 244	663 244	1315 400 1000	663 244	663 867	1315 867 663 244

Çizelge 4.4. REMAP markırında kuraklık stresi ve selenyum uygulamalarına göre GTS oranları (%)

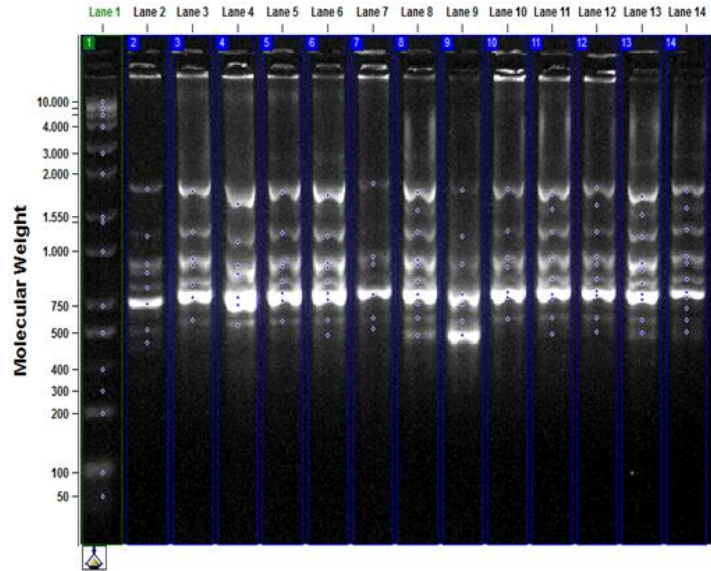
Primer	Kontrol	- 4 PEG				- 6 PEG				- 8 PEG			
		0µM	6µM	8µM	10µM	0µM	6µM	8µM	10µM	0µM	6µM	8µM	10µM
Wltr21058082	100	100	33.3	66.6	50	83.3	83.3	66.6	33.3	66.6	66.6	66.6	100
N578081	100	57.1	28.5	28.5	57.1	42.8	42.8	57.1	42.8	57.1	57.1	57.1	14.2
Sukkula 8081	100	40	100	100	80	20	40	40	0	40	40	40	0
E2647 8081	100	66.6	83.3	50	50	50	83.3	50	66.6	16.6	50	50	66.6
N57 8082	100	57.1	100	85.7	85.7	57.1	71.4	71.4	71.4	28.5	71.4	57.1	28.5
%Pol.	0	35.9	31.0	33.9	35.5	49.4	35.9	43.0	57.2	58.3	43.0	45.9	58.2
GTS	100	64.1	69.0	66.1	64.5	50.6	64.1	57.0	42.8	41.7	57.0	54.1	41.8

4.2. Irap-Remap Jel Görüntüleri



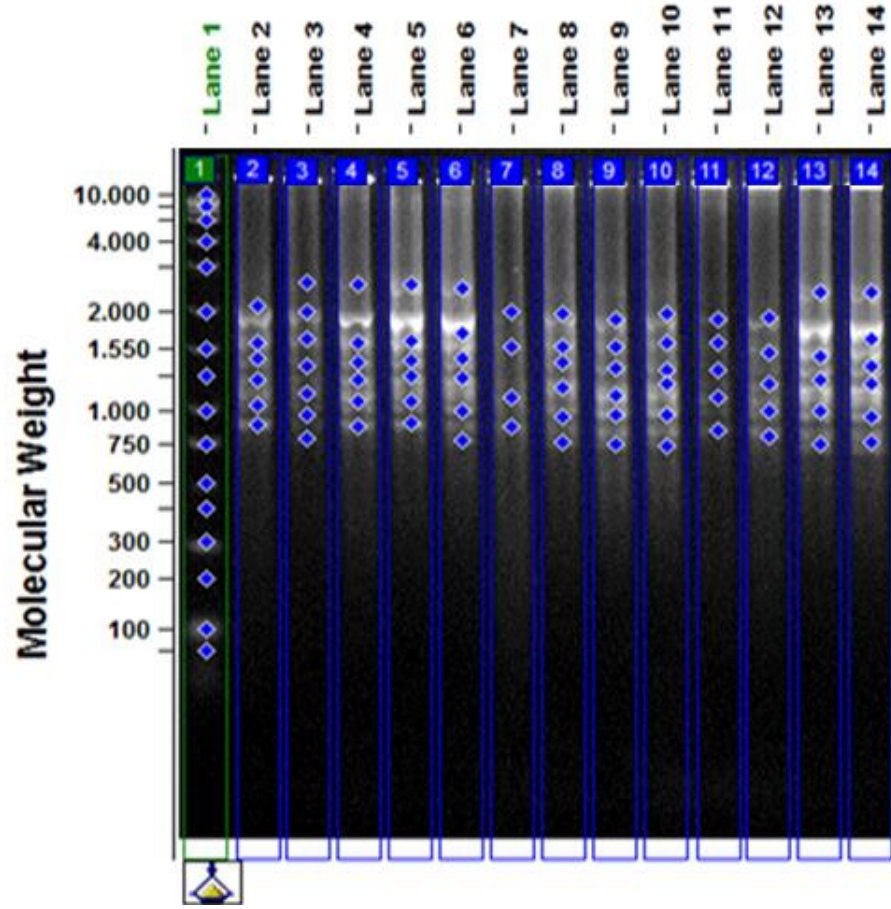
Şekil 4.1. E2647 - IRAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

Line1:D7058, Line2: kontrol, Line3:4 PEG 0 Na₂O₄Se, Line4: 4 PEG 6 Na₂O₄Se, Line5: 4 PEG 8 Na₂O₄Se, Line6: 4 PEG 10 Na₂O₄Se, Line7: 6 PEG 0 Na₂O₄Se, Line8: 6 PEG 6 Na₂O₄Se, Line9: 6 PEG 8 Na₂O₄Se, Line10: 6 PEG 10 Na₂O₄Se, Line11: 8 PEG 0 Na₂O₄Se, Line12: 8 PEG 6 Na₂O₄Se, Line13: 8 PEG 8 Na₂O₄Se, Line14: 8 PEG 10 Na₂O₄Se



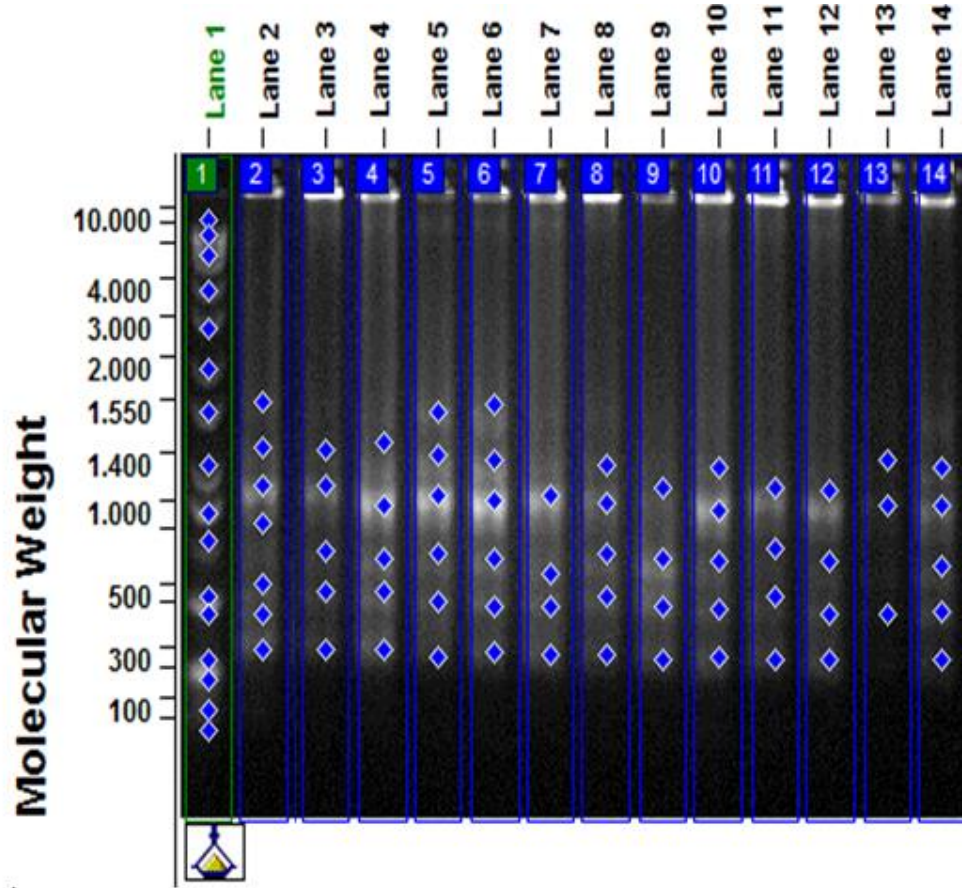
Şekil 4.2. Sukkula - IRAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

Line1:D7058, Line2: kontrol, Line3: 4 PEG 0 Na₂O₄Se, Line4: 4 PEG 6 Na₂O₄Se, Line5: 4 PEG 8 Na₂O₄Se, Line6: 4 PEG 10 Na₂O₄Se, Line7: 6 PEG 0 Na₂O₄Se, Line8: 6 PEG 6 Na₂O₄Se, Line9: 6 PEG 8 Na₂O₄Se, Line10: 6 PEG 10 Na₂O₄Se, Line11: 8 PEG 0 Na₂O₄Se, Line12: 8 PEG 6 Na₂O₄Se, Line13: 8 PEG 8 Na₂O₄Se, Line14: 8 PEG 10 Na₂O₄Se



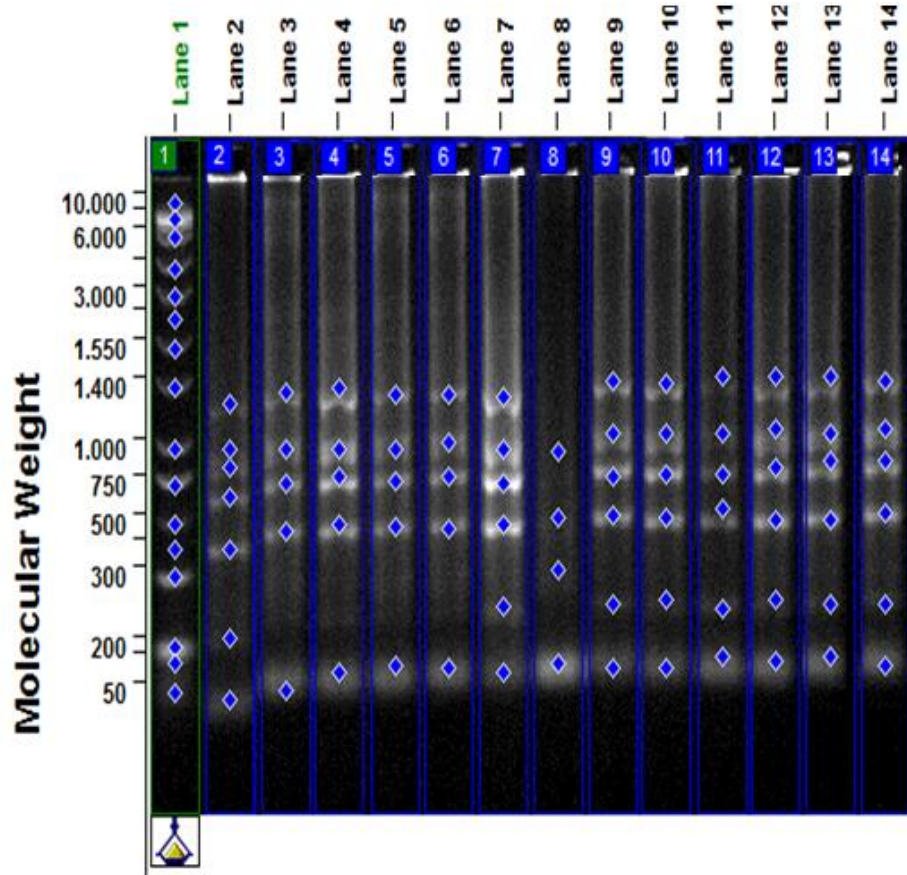
Şekil 4.3. Wltr2105 - IRAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

Line1:D7058, Line2: kontrol, Line3:4 PEG 0 Na₂O₄Se, Line4: 4 PEG 6 Na₂O₄Se, Line5: 4 PEG 8 Na₂O₄Se, Line6: 4 PEG 10 Na₂O₄Se, Line7: 6 PEG 0 Na₂O₄Se, Line8: 6 PEG 6 Na₂O₄Se, Line9: 6 PEG 8 Na₂O₄Se, Line10: 6 PEG 10 Na₂O₄Se, Line11: 8 PEG 0 Na₂O₄Se, Line12: 8 PEG 6 Na₂O₄Se, Line13: 8 PEG 8 Na₂O₄Se, Line14: 8 PEG 10 Na₂O₄Se,



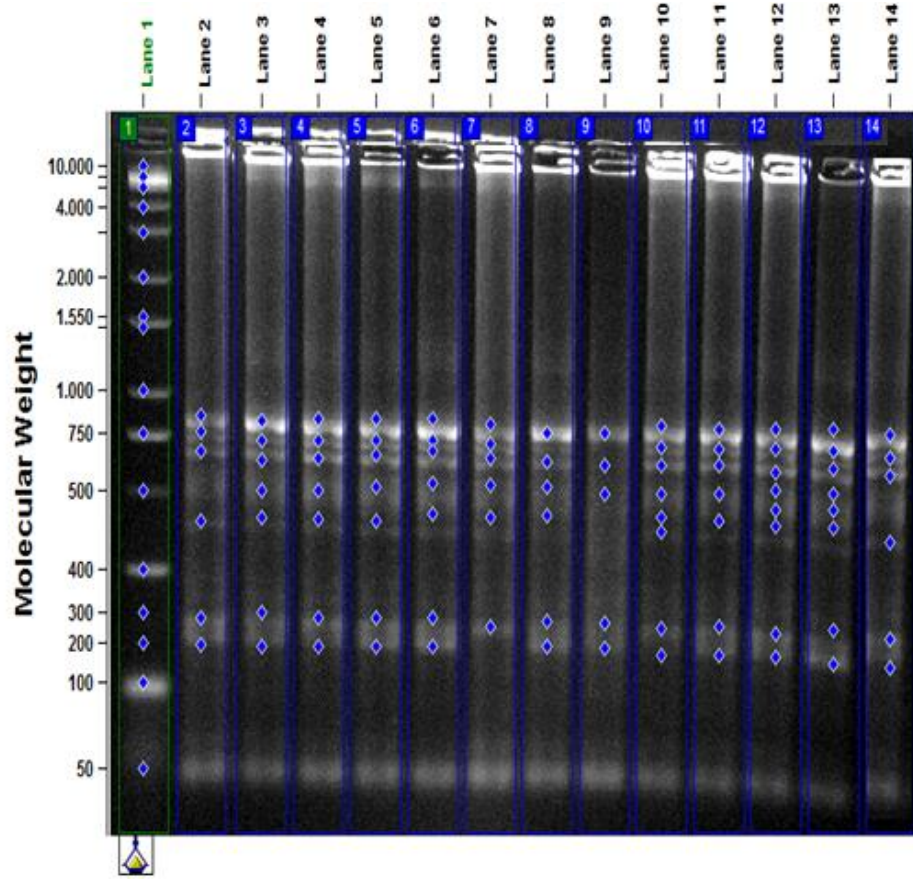
Şekil 4.4. N57-8081 - REMAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

Line1:D7058, Line2: kontrol, Line3:4 PEG 0 Na₂O₄Se, Line4: 4 PEG 6 Na₂O₄Se, Line5: 4 PEG 8 Na₂O₄Se, Line6: 4 PEG 10 Na₂O₄Se, Line7: 6 PEG 0 Na₂O₄Se, Line8: 6 PEG 6 Na₂O₄Se, Line9: 6 PEG 8 Na₂O₄Se, Line10: 6 PEG 10 Na₂O₄Se, Line11: 8 PEG 0 Na₂O₄Se, Line12: 8 PEG 6 Na₂O₄Se, Line13: 8 PEG 8 Na₂O₄Se, Line14: 8 PEG 10 Na₂O₄Se



Şekil 4.5. N57-8082 - REMAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

Line1:D7058, Line2: kontrol, Line3:4 PEG 0 Na₂O₄Se, Line4: 4 PEG 6 Na₂O₄Se, Line5: 4 PEG 8 Na₂O₄Se, Line6: 4 PEG 10 Na₂O₄Se, Line7: 6 PEG 0 Na₂O₄Se, Line8: 6 PEG 6 Na₂O₄Se, Line9: 6 PEG 8 Na₂O₄Se, Line10: 6 PEG 10 Na₂O₄Se, Line11: 8 PEG 0 Na₂O₄Se, Line12: 8 PEG 6 Na₂O₄Se, Line13: 8 PEG 8 Na₂O₄Se, Line14: 8 PEG 10 Na₂O₄Se



Şekil 4.6. E2647-8081 - REMAP primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

Line1:D7058, Line2: kontrol, Line3:4 PEG 0 Na₂O₄Se, Line4: 4 PEG 6 Na₂O₄Se, Line5: 4 PEG 8 Na₂O₄Se, Line6: 4 PEG 10 Na₂O₄Se, Line7: 6 PEG 0 Na₂O₄Se, Line8: 6 PEG 6 Na₂O₄Se, Line9: 6 PEG 8 Na₂O₄Se, Line10: 6 PEG 10 Na₂O₄Se, Line11: 8 PEG 0 Na₂O₄Se, Line12: 8 PEG 6 Na₂O₄Se, Line13: 8 PEG 8 Na₂O₄Se, Line14: 8 PEG 10 Na₂O₄Se

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerin içerisinde bulunup maruz kaldıkları çevre şartları en önemli özelliklerden olan kalite ve verimlilik gibi yapılar üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Özellikle kalite ve verim konusunda bitkileri etkileyen bu iklim faktörlerini, toprak faktörleri, doğal olmayan kirleticiler, hayvanlar ve diğer bitkiler ile rekabet şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Bitkisel yapıların istenilen şekilde elde edilebilmesi, maksimum üretimin sağlanabilmesi için bu faktörlerin en iyi şekilde optimize olması gerekmektedir. Kısacası istenilen derecede verimli bir yetiştiricilik için bitkilerin en uygun çevre isteklerinin karşılanması gerekmektedir. Bu optimum isteklerde meydana gelen her türlü sapma o bitki için stresi meydana getirir. Biyologlar ise canlı organizmalara elverişli olmayan herhangi bir çevre faktörü için “stres” terimini benimsemişler, çol elverişli olmayan bir çevre faktörüne karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine ise “stres drenci” adını vermişlerdir (Levitt 1980).

Bitki gelişimini önemli derecede azaltabilen stres etmenlerinden biri kuraklık etmenidir. Kuraklık faktörü üzerine yıllık yağış toplamlarından çok, aylar içindeki dağılışı etkilidir (Gedik 1997). Tanım olarak yıllık içerisindeki yağış düzeyinin 400 mm altında olması durumunda ya da hızlı bir şekilde gelişimini sürdüren bitkinin yağış bakımından yetersiz kalmasına neden olan toprakta nemin solma noktasında bulunduğu yerlere kurak bölge adı verilir. Kuraklık faktörü pek çok araştırmacı tarafından (meteorolojist, hidrolojist, ekonomist ve klimatolojistler gibi) farklı şekillerde tanımlanmış olup agronomistlere göre kuraklık terimi kısaca toprakta bulunan nem miktarının bitkinin solma noktasında bulunması olarak nitelendirilmiştir (Eriş 1990). Kurak şartlar oluşması durumunda bitkisel yapıda birtakım değişimler meydana gelir. Kuraklıkta hücre duvarı, protein ve klorofil sentezinde bununla birlikte çimlenme olayı ve stoma açıklığında bununla birlikte CO₂ asimilasyonunda, solunumda azalışta, ABA sentezinde, prolin birikiminde artış göstererek fizyolojik yanıt vermektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Kurak stres etmenine karşı bitki yanıtının en önemli düzenleyicisi olan ABA, bitkisel yapılarda kökten ksilem mekanizma yolu ile bekçi hücrelerine taşınır. Daha sonra hipotetik ABA reseptörüne bağlanma sağlayarak stomaların kapanmasına neden olmaktadır. Bu şartlar altında ABA etkisiyle stomaların kapanma mekanizması, transpirasyon olayı ile oluşacak su kaybını dolayısıyla stomaların kapanmasıyla karbon metabolizmasını, elektron taşınım aktivitesini de engellenmektedir. Stomaların kapanmasının amacı bitkilerdeki su kaybını azaltmak olup dolayısıyla CO₂ gazının girişi engellenmesini sağlamaktır. Bunun sonucu olarak CO₂ fiksasyonu azalmaktadır. (Brugnoli and Lauteri 1990).

Bir bitkide stres faktörü oluşunca temel amaç genom bütünlüğünün korunmasıdır. Çünkü bu şartlar bitkisel yapılarda genotoksik etkiler yaratmaktadır. Ortaya çıkan genotoksik etki serbest radikal metabolizmasında oluşan değişimlerle ilişkilidir. Reaktif oksijen türevleri radyasyon, fazla oranda oksijen basıncı, kimyasalların ve stres şartlarının etkisiyle artarak oksidatif strese yol açarlar. Bunlar hücrenin karbonhidrat, protein, lipid, enzim gibi temel yapılarında zarar verip aynı zamanda proteinlerin sülfidril gruplarını ve diğer aminoasitleri okside ederek yıkımları yoluyla nükleer ve mitokondrial zar da zarar oluşturmaktadırlar ve bu etkileri DNA tek ve çift zincir kırılmalarına, apirimidinik ve apürinik alanların oluşmasına neden olarak oksidatif DNA hasarına yol açmaktadır (Gökbulut 2010).

Bitki yapılarında oluşturulan oksidatif stres ile ABA'nın artış göstermesine bağlı olarak epigenetiksel mekanizmalardan DNA metilasyonunun olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bitkilerde stres olarak niteledirilen biyotik ve abiyotik şartlar ABA konsantrasyonunun artışına sebep olmaktadır. Böylelikle artış gösteren ABA miktarı epigenetiksel gen işleyişi ile birlikte histon modifikasyonları akabinde DNA metilasyonu (hipo/hipermetilasyonu) ve siRNA mekanizmasıyla kontrol etmektedir (Chinnusamy *et al.* 2008).

Steward *et al.* (2002) Çalışmada soğukluk stresine maruz kalmış mısır bitkisinde artan ABA kontrasyonuna bağlı ve paralel olarak demetilasyon meydana geldiğini

bildirmiştir. Aynı şekilde bir başka çalışmada ise tütün bitkisi hücre süspansiyon kültürlerinde tuz ile birlikte osmotik basınç stresinin hipermetilasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Kovarik *et al.* 1997).

Çalışmamızdaki kuraklık stresi uygulamasında IRAP ve REMAP sonuçlarındaki polimorfizmin yüksek olup GTS değerinin düşük olmasının sebebi DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilip bu hasara üretilmiş olan ROT'ların aktif hale gelerek sebep olduğu sonucuna varılmaktadır. Bunun yanında bazı araştırmalarda uygun olmayan çevresel koşullar altında bitkilerde ROT'ların üretiminin önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir (Mittler *et al.* 2004; Verma and Mishra 2005). Ancak kuraklık stresi durumunda yani ROS yapılarının birikimi durumunda oluşan oksidatif stres ile mücadelede bitkiler süperoksit dismutaz, katalaz veya glutatyon, tokoferol askorbat gibi moleküller kullanarak strese karşı koyabilmektedirler. (Farooq *et al.* 2009; Anjum *et al.* 2011). Ek olarak strese yanıtta çeşitli sinyal yolu ara ürünleri ile birlikte transkripsiyon faktörleri (örneğin çinko-parmak kopyalama faktörü gibi), transkripsiyonel olarak osmotik olarak ayarlı genlerin promotörleri ile etkileşim yoluyla efektörleri aktive ederek kuraklık stresinde bitkiye yardımcı olmaktadır (Gong *et al.* 2001). Transpozon elementleri bitki genomlarının önemli bir bölümünü oluşturup DNA metilasyonu ile inaktive durumda tutulan transpozon elementleri, DNA demetilasyon yoluyla çevresel faktörler tarafından aktive edilebilmektedirler (Chinnusamy and Zhu 2009).

Çeşitli çevresel stres faktörleri ile tetiklenen retrotranspozisyonun kısıtlanması için transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası epigenetik kontrolün oldukça öneme sahip olduğu açıktır (Grandbastien *et al.* 1989). Bununla yanı sıra bazı stres faktörlerinin retrotranspozonları hareket ettirdiği bilinmektedir. Salazar *et al.* (2007) *TLC1.1* retrotranspozonları salisilik asit, absisik asit gibi stresle ilgili çeşitli moleküller tarafından aktive olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız bu çalışmada IRAP ve REMAP retrotranspozonları kullanılarak PEG 8000 (-4, -6, -8 bar) ile oluşturulan kuraklık stresinin LTR retrotranspozon polimorfizmi ve genetik değişimde selenyumun (0 μ M, 6 μ M, 8 μ M, 10 μ M) etkileri araştırılmıştır. Buğdayda kuraklık şartlarında *Nikita-E2647*,

Sukkula, WLTR2105, BARE 1(0) ve Nikita-57 (N57) üzerine LTR retrotranspozonlarının polimorfizmi belirlenmiştir. Çalışmada kuraklık stresine karşı uygulanan selenyumun 6 ve 8 μM dozları kuraklık stresine karşı olumlu sonuç verirken aynı zamanda 10 μM dozu negatif etki oluşturduğu gözlemlenmiştir.

IRAP ve REMAP gibi retrotranspozol yapılarda stres şartlarına karşılık transpozon etkinliği meydana gelmesi transpozon lokuslarında DNA metilasyonundaki azalış oluşmasıyla ilişkilidir. Bir takım çevresel etkinlikler DNA demetilasyonu boyunca transpozonların aktif hale gelmesini sağlayabilir. Woodrow *et al.* (2010) yaptığı deneyde makarnalık buğday çeşidinde (*Triticum durum*) tuz ve ışık stresi uygulaması durumunda *Ttd1a* retrotranspozon hareketini arttırdığı ve tuz stresinin insersiyonel polimorfizmi arttırdığını göstermiştir.

Hashida *et al.* (2006) Aslanağzı (*Antirrhinum majus*) bitkisinde yaptığı çalışmada soğuk stresinin ve hipometilasyon olayının Tam-3 transpozonun transpozisyonunu indüklediğini belirtmiştir. Literatürde stres koşullarının, epigenetik mekanizmalarda değişimler meydana getirdiğini açıklayan araştırmalar mevcuttur.

Soğuk stres şartlarına maruz bırakılan mısır bitkisinin köklerinde hipometilasyon olayının meydana geldiği (Steward 2002), bununla birlikte tütün bitkisinde alüminyum, tuz ve soğuk etmeni gibi stres faktörlerinin DNA demetilasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Choi and Sano 2007). Yine soğuk stresi durumunda da, hücre duvarını koruyan ve lignin biyosentezin aşamasında görevli enzimi hedefleyen bazı miRNA genlerinin ekspresyonunda azalma görülmüştür (Zhang 2009).

ROT yapılarının temizlenmesinde öncelikli olarak antioksidan savunma sistemleri ve enzim yapıları görev yapmaktadır (Gökbulut 2010). Çalışmamızda uygulanan kuraklık stresinin bitkisel yapıya verdiği zararın DNA, enzimler ve lipit yapılarına etki eden ROT artışıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Smirnov 2000). Bununla birlikte kuraklık stresinin, CAT ve POD etkinliği ile birlikte prolin miktarını ayrıca kök etkinliğini artırdığı ve dolayısıyla buğdayın gelişimini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir

(Xiaoqin *et al.* 2009), devamında bitkide H₂O₂ birikimine yol açarak oksidatif strese neden olduğu ve kuraklık stresinin SOD aktivitesinde aşamalı artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Wang *et al.* 2011).

Bununla birlikte son yıllarda bazı araştırmalar selenyumun bileşiğinin de kuraklık, soğuk, ultraviyole ışınlar, tuzluluk gibi çevresel stres faktörlerinin de neden olduğu fazla miktarda ROT birikimi ile birlikte ortaya çıkan oksidatif stres etmenine karşı bitkisel yapıların toleransını artırdığını belirtmektedir (Vaalkama *et al.* 2003; Djanaguiraman *et al.* 2005).

Esasında bitkisel yapıları canlılarda ana bir element olarak düşünülmemesine rağmen selenyum, düşük konsantrasyonlarda büyümeyi desteklemektedir (Xue and Hartikainen 2001; Agar *et al.* 2013). Bunun yanı sıra selenyum uygulamaları sonucunda, organ ve dokularda lipid peroksidaz ve hidrojen peroksidaz gibi yapıların birikimini engelleyen selenoenzimlerin etkinliği uyarılarak organizmada oksidatif zarar azalmaktadır (Hartikainen and Piironen 2000; Xue and Piironen 2001; Turakainen and Seppänen 2004; Hartikainen 2005). GSH-PX yapısı glutasyonu elektron donör olarak kullanması ile organik hidroperoksitleri ve H₂O₂ indirgenmesini katalizlemektedir. Bunun lipid peroksidasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Gajewska and Skłodowska 2006). Ek olarak genç bitkilerde selenyumun antioksidan etkisinin GSH-Px ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Hartikainen *et al.* 2001).

Hartikainen *et al.* (2000), çim tohumları üzerine uyguladığı farklı dozda selenyumun uygulamasının GSH-Px etkinliğini artırmış olduğunu belirlemiştir. Bunun yanında selenyum varlığında enzim aktivitesindeki artışın oksidatif stresin etkisinin azalmasında eşsiz bir rol oynadığı belirtilmiştir.

Bazı araştırmaların sonuçlarında, selenyumun serbest radikallerin direkt temizleyicisi olan glutasyon (GSH) etkinliğini artırdığı ve yüksek bitkilerde lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu görülmüştür (Hartikainen 2005; Djanaguiraman *et al.* 2010).

Xiaoqin *et al.* (2009), kuraklık stresi altındaki buğday tohumlarında selenyum miktarındaki dolaylı artışın antioksidan kapasiteyi ve devamında stres şartlarındaki tohumlar için ekolojik adaptasyon sağlayan CAT, POD etkinliğinde dolayısı ile serbest prolin miktarında önemli artış sağladığını ve tohumlarda MDA miktarını azalttığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda selenyumun koruyucu etkisi ortaya çıkmıştır. Ancak esasında selenyum iz miktarda gereksinim duyulan bir elementtir. Kuraklık çalışmalarında ise uygulanan doza bağlı olarak olumlu ya da olumsuz yani toksik etki gösterebilmektedir. Selenyumun iyileştirici özellikte olması şu yapılarla açıklanabilir. Endoplazmik retikulum yapısı içerisinde protein katlanmasının kontrolünün sağlanması bunun yanı sıra serbest radikallerin indirgenmesi gibi birçok hücrel metabolik süreçte doğal antioksidan olarak etkili yapı gösterdiği belirlenmiş olan selenoprotein yapılarının oluşması özellikle metabolizmada metilasyon süreci sonucu ile uçucu forma dönüşüp miktarının azalması ve bununla beraber negatif sonuçlar olmaksızın SelCys ve SeMet formları aracılığı ile hücreler arası konsantrasyonda azalmaya neden olmasıyla da açıklanabilir (Navarro-Alarcon *et al.* 2008).

Wang *et al.* (2011) kurak şartlarda oluşturulan çalışmada bitkide selenyumun askorbat-glutasyon metabolik yapısı üzerine etkisini belirledikleri araştırma sonuçları, oksiredüktaz enzim sınıfının, antioksidan özelliğinden dolayı selenyuma çok duyarlı olabildiğini belirleyen diğer araştırmaları (Brown 1982; Fu *et al.* 2002; Vaalkama *et al.* 2003) destekler niteliktedir (Wang 2011).

Yapılan araştırma sonuçlarımıza göre selenyumun yüksek dozda toksik etkisi; selenyum bileşiğinin sülfidril gruplarını katalitik olarak oksitlemesine bununla beraber selenyum aracılı tiyol oksidasyonun ROT yapısı üretebilmesine ve beraberinde tiyollerin oksidasyonundan dolayı proteinlerin yapı fonksiyon bozukluğuna yol açarak tiyol bulunan redoks sistemlerine ayrıca proteinlerin redoks regülasyonlarına doğrudan saldırmasına, sonuç olarak hücrede çeşitli şekilde metabolize olan selenatın selenit

formunda nüklear DNA ile bağlanma suretiyle zincir kırılmalarına neden olabilmesine bağlanabilir (Wang 2011).

Xue and Hartikainen'in (2001) yüksek miktarlı selenyum kimyasalı uygulamasının bitkide büyüme gelişmeyi engellediğini ve beraberinde klorosis oluşumuna neden olduğunu, oksidatif stresi artırdığını belirten araştırma sonuçlarını ve yüksek dozda selenyumun toksik özelliği ile genom instabilitesine yönelten oksidatif zarara yol açtığını belirleyen diğer araştırma sonuçlarını destekler niteliktedir (El-Bayoumy 2001; Agar *et al.* 2013).

Sonuç olarak çalışmamızda kullanılan 6 ve 8 μM dozları kurak şartlardan bitkiyi korurken 10 μM dozu bitki için toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kuraklık şartları altında selenyum uygulamasının uygun dozlar uygulandığında kuraklığın genetik ve epigenetik değişiklikleri LTR retrotranspozonları aracılığıyla tespit edilebileceği ortaya konmuştur. Kuraklıkla birlikte uygulanan selenyum dozlarının ise GTS değerlerini yükselttiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda selenyumun iyileştirici özelliğiyle birlikte kuraklık ortamına ilave edilen en yüksek selenyum dozuna karşı da GTS değerlerindeki azalış göstermesi selenyumun uygulanan doza bağlı olarak toksik etkiye sahip olmasıyla ilişkilendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Agar, G., Alpsoy, L., Bozari, S., Aygun, F. E., Yildirim, N., 2013. Determination of protective role of selenium against aflatoxin B₁-induced DNA damage. *Toxicol Ind Health*, 29(5), 396-403.
- Alavi, S., *et al.* "analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *crocus* genus of iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. *biotechnol.& biotechnol. eq.* 22.3(2008)
- Alzohairy A.M., Gyulai G., Ramadan M.F., Edris S., Sabir J.S.M., Jansen R.K., Eissa H.F., Bahieldin A., 2014. Retrotransposon-based molecular markers for assessment of genomic diversity. *Funct. Plant Biol.* 41, 781–789.
- Anjum SA, Xie X, Wang L, Saleem MF, Man C, Lei W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agric. Res.*, 6: 2026-2032.
- Anonim, 2006. Agricultural Statistics (FAO). <http://faostat.fao.org>.
- Anonim, 2007. Hububat Raporu - 2007. Toprak Mahsulleri Ofisi, Ankara. 8.9.10 tokat Mehmet koyuncu.
- Anonim 2013, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Verileri
- Anonim 2013, Food and Agriculture Organization (FAO) Verileri
- Baranek M., Krizan B., Ondrusikova E., Pidra M., 2010. DNAmethylation changes in grapevine somaclones following in vitro cultures and thermotherapy. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:11–22.
- Baumel, Alex, *et al.* "Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* CE Hubbard (Poaceae)." *Molecular Biology and Evolution* 19.8 (2002): 1218-1227.
- Beguiristain T., Grandbastien MA., Puigdomènech P., and Casacuberta JM., 2001. Three Tnt1 Subfamilies Show Different Stress-Associated Patterns of Expression in Tobacco. Consequences for Retrotransposon Control and Evolution in Plants. *Plant Physiol.* 127: 212-221.
- Beilstein, M.A. and Whanger P.D., 1992. Selenium Metabolism and Glutathione Peroxidase Activity in Cultured Human Lymphoblasts. Effects of Transsulfuration Defects and Pyridoxal Phosphate. *Biological Trace Element Research*, 35:105-118.
- Bennetzen, J.L., 2000. Transposable Elements Contributions to Plant Gene and Genome Evolution, *Plant Molecular Biology*, 42(1), 251-269.
- Bergman, C.M. and Quesneville, H., 2007, Discovering And Detecting Transposable Elements in Genome Sequences, *Briefings in Bioinformatics*, 8 (6), 382-392.
- Berry, M.J., 2002. Selenocysteine Insertion Sequence Element Characterization and Selenoprotein Expression. *Methods Enzymol.*, 347, 17-24.
- Bhargava S, Sawant K. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breed.*, 132: 21-32.
- Bitterli C., Banuelos G.S., Schulin R., 2010. Use of Transfer Factors to Characterize Uptake of Selenium by Plants. *J Geochem Explor.*, 107, 206–16.
- Boyko A. and Kovalchuk I., 2010. Transgenerational Response to Stress in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Signal Behav*, 5(8), 995-8.

- Brown TA., 1982. Selenium toxicity and tolerance in higher plants. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 57, 59-84.
- Brugnoli E, Lauteri M (1990) An evaluation of the effect of salinity on photosynthesis. In M Baltscheffsky ed, *Current Research in Photosynthesis*, Vol IV. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 741-744
- Bushuk, W., 1998. Wheat Breeding for End-Product Use. *Euphytica*, 100, 137-145.
- Butellí E., Licciardello C., Zhang Y., Liu J., Mackay S., Bailey P., Reforgiato-Recupero G., Martin C., 2012. Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation Of Anthocyanins In Blood Oranges. *Plant Cell* 24, 1242–1255.
- Büyük İ, Soydam-Aydın S, Aras S.. 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 69(2): 97-110.
- Cabello JV, Lodeyro AF, Zurbriggen M. 2014. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotech.*, 26: 62-70.
- Capell T., Bassie L., Christou P., 2004. Modulation of The polyamine Biosynthetic Pathway in Transgenic Rice Confers Tolerant Drought Stress. *Pnas*, 101 (26): 9909-9914.
- Cartes, P., Jara, A.A., Pinilla, L., Rosas, A., Mora, M.L. 2010. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Ann. Appl. Biol.* 156: 297–307.
- Chaves Mm., Pereira Js., Maroco J., Rodrigues Ml., Ricardo Cpp., Osorio Ml., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C., 2002. How Plants Cope With Water Stress in The Field. *Photosynthesis and Growth. Ann Bot (Lond)* 89: 907–916.
- Cheng C., Daigen M., Hirochika H., 2006. Epigenetic Regulation of the Rice Retrotransposon Tos17. *Mol Genet Genomic* 276(4): 378-390.
- Chinnusamy, V., Gong, Z., 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., and Zhu, J.K., 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12, 133-139.
- 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. *Mol Genet Genomics*, 277(5), 589-600.
- Çakmak İ., Öztürk L., Başağa H., Cekic C., Taner S., Irmak S., Geren H., Kılıç H., Aydın N., Avcı M., Gezgin S., 2009. Türkiye’de Seçilmiş Bölgelerde Buğdayların ve Toprakların Selenyum Konsantrasyonunun Araştırılması, Selenyum Gübrelemesine Buğdayın Reaksiyonu ve Selenyumca Zengin Genotiplerin Fizyolojik Olarak Karakterizasyonu, Tübitak Projesi Sonuç Raporu. 178 S.
- Djanaguiraman M., Devi D.D., Shanker A.K., Sheeba A., Bangarusamy U., 2005. Selenium-An Antioxidative Protectant in Soybean During Senescence. *Plant Soil.* 272: 77–86.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Seppanen, M. 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol. Bioch.* 48, 999-1007.
- Dolferus R. 2014. To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Sci.*, 2229: 247-261.

- Edens F.W., 2002. Practical Applications for Selenomethionine: Broiler Breeder Reproduction. In: *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the 18 Th Alltech'S Annual Symposium*, Edited by Lions, T.P. And Jacques, K.A., *Nottingham University Pres*, Nottingham, Uk 29-42.
- Emerson R.A., 1914. The Inheritance Of A Recurring Somatic Variation in Variegated Ears of Maize, *The American Naturalist*, 48, 87-115. 107.
- Eraktan G., 2001. Tarım Politikası Temelleri ve Türkiye'de Tarımsal Destekleme Politikası, Uzel Yayınları, Isbn 975-8437-01-1, İstanbul.
- Eriksson J., 2001. Concentrations of 61 Trace Elements in Sewage Sludge, Farmyard Manure, Mineral Fertilizer, Recipitation and İn Oil and Crops, Report 5159, The Swedish Environmental Protection Agency.
- Eriş A., 1990. Bahçe Bitkileri Fizyolojisi. U.Ü.Z.F. Yay. Ders Notları No: 11, Bursa.
- Evgen'ev M.B., Arkhipova I.R., 2005. Penelope-Like Elements-A New Class of Retroelements: Distribution, Function And Possible Evolutionary Significance, *Cytogenetic and Genome Research*, 110 (1-4), 510-521.
- Evrensel, C., *et al.* "Variations in BARE-1 insertion patterns in barley callus cultures." *enet Mol Res* 10.2 (2011): 980-987.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.*, 29: 185-212.
- Federoff N., 2001. How Jumping Genes Were Discovered, *Nature Structural Biology*, 8 (4), 300-301.
- Fedoroff N., 2000. Transposons and Genome Evolution In Plants, *Proceedings of the National Academy of Sciencies of the United States of America*. Vol.97, No.13.
- Feschotte C., Jiang N. and Wessler S.R., 2002. Plant Transposable Elements: Where Genetics Meets Genomics. *Nat. Rev. Genet.* 3: 329-341.
- Feschotte C. and Pritham E.J., 2007. Dna Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review Of Genetics*, 41: 331-368.
- Finnegan D.J., 1989. Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution, *Trends In Genetics*, 5, 103-107.
- Flavell A.J., Knox M.R., Pearce S.R. and Ellis T.H.N., 1998. Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms (Rbip) For High Throughput Marker Analysis. *Plant J*, 16 (5), 643-650.
- Flora Sj., 2007. Role of Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease. *Cell Mol. Biol* 53: 1-2.
- Fu, L.H., 2002. A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J Biol Chem.*, 277(29), 25983-91.
- Gajewska E, Skłodowska M, Słaba M, Mazur J. 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biol Plant* (in press).
- Gao S., Jin Y., Unverzagt Fw., Liang C., Hall Ks., Cao J., Ma F., Murrell Jr., Chang Y., Li P., Bian J., Hendrie Hc., 2012. Selenium Level And Depressive Symptomps In A Rural Elderly Chinese Cohort. *Bmc Psychiatry*, 12:72.
- Gedik A., 1997. Meteoroloji Ders Kitabı. O.M.Ü.Z.F. Yay. , No: 10, Samsun.
- Germ M., Kreft I., and Osvald J., 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory

- potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol. Biochem*, vol. 43, pp. 445-448
- Germ, M., Stibilj, V., Osvald, J., Kreft, I. 2007. Effect of Selenium Foliar Application On Chicory (*Cichorium Intybus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55: 795–798.
- Gladyshev V. N., Stadtman T.C., Hatfield D.L. and Jeang K.T., 1999. Levels Of Major Selenoproteins In T-Cells Decrease During Hiv Infection And Low Molecular Mass Selenium Compounds Increase. *Proceedings Of The National Academy Of Science Of United States Of America*, 96:835-839.
- Goldhaber S.B., 2003. Trace Element Risk Assessment: Essentiality Vs. Toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38:232-242.
- Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda, S., Matsumoto, T.K., Zhu, J., Cushman, J.C., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M., 2001. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiology* 126, 363-375
- Gowdy K.M., 2004. Selenium Supplementation and Antioxidan Protection in Broiler Chickens. A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.
- Gökbulut, T., 2010. Bazı buğday çeşitlerinde selenyum birikimi ve selenyum toksisitesinin antioksidan enzim aktivitesine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Grandbastien M-A., Spielmann A., Caboche M., 1989. Tnt1, Amobile Retroviral-Like Transposable Element of Tobacco Isolated by Plant Cell Genetics. *Nature*. Vol.337, P.376–380.
- Grandbastien Ma., 2004. Stress Activation and Genomic Impact of Plant Retrotransposons. *J Soc Biol.* 198(4): 425-32.
- Grandbastien M., Audeon A., Bonnivard C.E., Casacuberta J.M., Chalhoub B., Costa A.P., Le Q.H., Melayah D., Petit M., Poncet C., Tam S.M., Van Sluys M.A., Mhiri C., 2005. Stress Activation and Genomic Impact of Tnt1 Retrotransposons In Solanaceae. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 229–241.
- Grzebelus, D., 2006. Transposon Insertion Polymorphism As A New Source of Molecular Markers, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14 (1), 21-29.
- Gül G., 2000. Nms National Medical Series for Indepent Study. *Biyokimya Mikromineraler*. Nobel Tıp Kitabevleri, 16.
- Güner A., 2000. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 10 (Suplement 2), 29-41, Edinburgh At The Universty Press, Edinburgh.
- Hagan Cr. and Rudin Cm., 2002. Mobile Genetic Element Activation and Genotoxic Cancer Therapy: Potential Clinical Implications. *Am. J. Pharmacogenomics.* 2(1): 25-35.
- Hartikainen, H., Xue, T., 1999. The Promotive Effect of Selenium on Plant Growth as Triggered by Ultraviolet Irradiation.
- Hartikainen H. and Piironen V., 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil*, 225, 193-200.
- Hartikainen H. and Xue T., 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing Lettuce. *Plant and Soil*, 237, 55–61.

- Hartikainen H., 2005. Biogeochemistry of Selenium and Its Impact on Food Chain Quality and Human Health. *J Trace Elem Med Biol.*, 18(4), 309-18.
- Hashida, S.N., Uchiyama, T., Martin, C., Kishima, Y., Sano, Y., Mikami, T., 2006. The temperature-dependent change in methylation of the Antirrhinum transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *Plant Cell.*, 18, 104-118.
- Hawrylak- Nowak, B., 2009. Beneficial Effects Of Exogenous Selenium In Cucumber Seedlings Subjected To Salt Stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 132: 259–269.
- Henikoff S. and Comai L., 1998. Trans-Sensing Effects: The Ups And Downs Of Being Together. *Cell* 93, 329–332.
- Henle KJ., Jethmalani Sm., Nagle Wa., 1999. Stress Proteins And Glycoproteins. *Int Mol Med*, (1): 25-32.
- Hernández-Pinzón, I., De Jesús, E., Santiago, N., Casacuberta, J.M., 2009. The Frequent Transcriptional Read Through Of the Tobacco Tnt1 Retrotransposon And Its Possible Implications For The Control Of Resistance Genes. *J. Mol. Evol.* 68, 269–278.
- Hirochika, H., 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *The EMBO Journal*, 12 (6), 2521-2528.
- Hoefig C.S., 2011. Comparison of Different Selenocompounds With Respect to Nutritional Value Vs. Toxicity Using Liver Cells In Culture. *J Nutr Biochem.*, 22(10), 945-55.
- Hoisington D., Bohorova N., Fennell S., Khairallah M., Pellegrineschi A., Ribaut, J. M., 2012. The Application of Biotechnology To Wheat Improvement. *Fao Corporate Document Repository*, [Http://www.fao.org](http://www.fao.org).
- Holmberg N. and Bülow L., 1998. Improving Stress Tolerance in Plants by Gene Transfer. *Trends Plant Sci*, 3(2): 61-6.
- Hoseney, R.C., 1994. Principles of Cereal Science and Technology (2nd ed.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Huang, J., Zhang, K., Shen, Y., Huang, Z., Li, M., Tang, D., Gu, M., Cheng, Z., 2009. Identification of A High Frequency Transposon Induced by Tissue Culture, Ndaiz, A Member of The Hat Family in Rice, *Genomics*, 93 (3), 274-281.
- Jaligot E., Beule T., Baurens Fc., Billotte N., Rival A., 2004. Search for Methylation-Sensitive Amplification Polymorphisms Associated With The ‘‘Mantled’’ Variant Phenotype In Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.). *Genome* 47:224–228
- Jurka J (2004): Evolutionary impact of human Alu repetitive elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 603-608
- Kaçar B., Öztürk Ş. (2006). *Bitki Fizyolojisi*. Nobel Yayın, Ankara.
- Kadioğlu A.(2004). *Bitki Fizyolojisi*. Trabzon: Lokman Yayın, 453.
- Kalefetoğlu T. ve Ekmekçi Y., 2005. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri ve Dayanıklılık Mekanizmaları, *G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Derg.* 18(4): 723-740. *İ. Kutlu/Derleme Dergisi*, 3(1): 35-41, 2010
- Kalefetoğlu T. and Ekmekçi Y., 2005. The Effect of Drought On Plant Salt Tolerance Mechanisms. *G. U. Journal Of Science*, 18 (4): 723- 740.
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A. and Schulman A., 1999. Irap And Remap: Two New Retrotransposon-Based Dna Fingerprinting Techniques. *Theor Appl Genet.*, 98, 704-711.
- Kalendar R. and Schulman A.H. 2006. Irap And Remap For Retrotransposonbased Genotyping And Fingerprinting. *Nature Protocols*. Vol.1, No.5.

- Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A.H., 2010. *İpbs: A Universal Method For Dna Fingerprinting and Retrotransposon Isolation, Theoretical And Applied Genetics*. Vol.121, P.1419-1430.
- Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H.N., Sjakste T., Moisy C., and Schulman A.H., 2011. Analysis of Plant Diversity With Retrotransposon-Based Molecular Markers. *Heredity*, 106, 520-530
- Kayanoki, Y., Fujii J., Islam K.N., Suzuki K., Kawata S., Matsuzawa Y., Taniguchi N., 1996, The Protective Role Of Glutathione Peroxidase In Apostosis Induced By Reactive Oxygen Species. *Journal Of Biochemistry (Tokyo)*, 119:817-822.
- Kazazian H.H. Jr., 2004. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*. Vol.303, No.5664.
- Kılınç M., Coskun A., Bilge F., İmrek SS., Atli Y., 2010. Serum reference levels of selenium zinc and copper in healthy pregnant women at a prenatal screening program in southeastern mediterranean region of Turkey. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 152-156.
- Kızılaslan H., 2004. Dünya’da ve Türkiye’de Buğday Üretimi ve Uygulanan Politikaların Karşılaştırılması, *Goü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (2), 23–38.
- Kidwell M.G., Lisch D.R., 2000. Transposable Elements and Host Genome Evolution, *Trends In Ecology And Evolution*, 15 (3), 95-99.
- Kieliszek M. and Stanis B., 2013. Selenium: Significance, and Outlook for Supplementation Nutrition, 29, 713–718.
- Kim Yy. and M.D., 2003. Biological Aspects of Selenium in Farm Animals. *Asian Aust. J Anim Sci.*, 16, 435-444.
- Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H., 2004. Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science* 304, 982.
- Kovarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M., Opatrny, Z., 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 301-306.
- Köksel H. Ve Kıymaz T., 2007. Hububat İşleyen Sanayii-Sorunlar ve Çözüm Önerileri, 5. Gıda Mühendisliği Kongresi Bildiri Kitabı, 1-4.
- Köksel H., Sivri D., Özboy Ö., Başman A., Karacan H., 2000. Hububat Laboratuvarı El Kitabı, Ceylan Matbaası, Ankara.
- Kong L., Wang M., Bi D. 2005. Selenium Mo Dulates the Activities of Antioxidant Enzymes, Osmotic Homeostasis And Promotes The Growth of Sorrel Seedlings Under Salt Stress. *Plant Growth Regul.* 45: 155–163.
- Kumar, A. and Bennetzen, J.L., 1999. Plant retrotransposons. *Ann. Rev. Genet.*, 33, 479-532.
- Kuznetsov V.V., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V., Yagodin B.A., 2003. Selenium Regulates The Water Status Of Plants Exposed To Drought. *Dokl. Biol. Sci.* 390: 266-268
- Kün E., 1988. Serin İklim Tahılları. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 1032. 322 S., Ankara.
- Leprince A.S., Grandbastien M.A., Meyer C., 2001. Retrotransposons of the Tnt1b Family Aremobile In Nicotiana Plumbaginifolia Andcaninduce Alternative Splicing of the Host Gene Upon Insertion. *Plant Mol. Biol.* 475, 33–541.
- Levitt J., 1980. Response of Plants to Environmental Stresses. Academic Pres. Orlando.

- Loning W.E. and Seadler H., 1997, Plant Transposons: Contributors To Evolution?, *Gene*, 205 (1-2), 245-253.
- Lukens L.N., Zhan S.H., 2007. The plant genome's methylation status and response to stress, implications for plant improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:317e322. [17] Y.
- Madhova Rao KV., Raghavendra AS., Janardhan Reddy K., 2005. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Netherlands: Springer, 345.
- Marco A. and Marin I., 2005. Retrovirus-Like Elements In Plants, *Recent Research Development Plant Sciences*, 3, 15-24.
- Mcclintock B., 1950. The Origin and Behavior of Mutable Loci In Maize, *Proceedings of the National Academy of Science*, 36, 344-355.
- Mcclintock B., 1984. The Significance of Responses of the Genome to Challenge, *Science Journal*, 226, 792.
- Mckersie Bd. and Leshem Y., 1994. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Mitchell A.D. and Benevenga N.J., 1978. The Role of Transamination in Methionine Oxidation in The Rat. *Journal of Nutrition*, 108:67-78.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Moran J.V. and Malik H.S., 2009. Diamonds And Rust: How Transposable Elements Influence Mammalian Genomes, *European Molecular Biology Organization Reports*, 10, 1306-1310.
- Munns R., 2002. Comparative Physiology of Salt And Water Stress. *Plant Cell Environ*, 25: 239-50.
- Navarro-Alarcon, M., and Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ.*, 400(1-3), 115-41.
- Neyzi O. ve Ertuğrul T., 2002. *Pediatric* 13. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, 177. 99 60.
- Nowak J., Kaklewski K., Ligocki M., 2004. Influence of Selenium on Oxidoreductive Enzymes Activity In Soil And In Plants. *Soil Biol. Biochem*, Vol. 36, Pp.1553-1558.
- Onat T., 1996. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları*, Eksen Yayınları; 124
- Paszkowski J. and Whitham S.A., 2001. Gene Silencing and DNA Methylation Processes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:123-129.
- Ren J., Dai WR., Xuan ZY., Yao YA., Helena K., Li CY., 2007. The Effect of Drought and Enhanced UV-B Radiation on the Growth and Physiological Traits of two Contrasting Poplar Species. *For Ecol Manag* 239:112–119.10.1016
- Rhoades M.M., 1941. The Genetic Control of Mutability in Maize, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9, 138-144.
- Rios, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M., Rosales, M.A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J.M. 2009. Production and Detoxification of H₂O₂ in Lettuce Plants Exposed to Selenium. *Ann. Appl. Biol.* 154: 107–116.
- Sabot F. and Schulman A.H., 2006. Parasitism and the Retrotransposon Life Cycle in Plants: Hitchhik-26 er's guide to the genome. *Heredity* 97: 381–388.
- Sairam RK. and Tyagi A., 2004. Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants. *Curr Sci*, 86: 407–21.

- Salazar M, González E, Casaretto JA, Casacuberta JM and Ruiz-Lara S. The promoter of the TLC1.1 retrotransposon from *Solanum chilense* is activated by multiple stress-related signaling molecules. *Plant Cell Rep.* 26(10): 1861-1868, 2007.
- Schrauzer G.N., 2003. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 73-112
- Seppänen M., Turakainen M., Hartikainen H., 2003. Selenium Effects On Oxidative Stress In Potato, *Plant Sci.* 165-311
- Sgherry CLM., Pinzino C., Navari-Izzo F., 1996. Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O₂-production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiol Plant*, 96: 446-52.
- Sies, H. and Arteel G.E., 2000. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione mimics. *Free Radical Biology & Medicine*, 28:1451-1455.
- Smirnoff N. and Cumbes QJ., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-60.
- Smirnoff N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*, 125: 27-58.
- Smirnoff N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.*, 3(3), 229-35.
- Srivastava M., Maa L.Q., Rathinasabapathib B., Srivastava P., 2009. Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresour. Technol.*
- Steward, N., 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J Biol Chem.*, 277(40), 37741-6.
- Sunde R.S., Thompson B.M., Palm M.N., Weiss S.L., Thompson K.M. and Evenson J.K., 1997, Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animal and transfected cho cells. *Biomedical and Environmental Sciences*, 10:346-355.
- Suzuki MM. and Bird A., 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9:465-476
- Süzer S., 1992. Buğday Tarımında Yüksek Verim Almanın Yolları, 51(5-7), Marmara'da Tarım Dergisi.
- Şimşir İY. ve Özgen AG., 2010. Tiroid ve selenyum olgu sunumu. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, (14): 76-79.
- Tadina N., Germ M., Kreft I., Breznik B., Gaberscik A., 2007. Effects of water deficit and selenium on common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) plants. *Photosynthetica* 45: 472-476. doi:10.1007/s11099-007-0080-7
- Taiz L, Zeiger E. 2010. Responses and adaptations to abiotic stress. In: *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. pp. 755-778. ISBN 978-0-87893-866-7.
- Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D., 2003. Dossier: Oxidative Stress Pathologies and Antioxidants: The Antioxidant Role of Selenium and Seleno-Compounds. *Biomed. Pharmacoth*, Vol. 57, Pp. 134-144
- Teyssier E., Bernacchia G., Maury S., How Kit A., Stammitti-Bert L., Rolin D., Gallusci P., 2008. Tissue Dependent Variations of Dna Methylation And Endoreduplication Levels During Tomato Fruit Development and Ripening. *Planta* 228-391e399.

- Thomson C.D., 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58:391-402.
- Tunç M., 2006. Biyolojik sıvılarda bazı eser elementlerin tayini ve metot geliştirme. Yüksek Lisans Tezi İstanbul.
- Turakainen, M., H.H., Seppänen, MM., 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *J Agric Food Chem.*, 52, 5378-5382.
- Vaalkama, E.K., Hartikainen, H., Wulff, A., 2003. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria 9 ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agric For Meteorol.*, 120, 267-278.
- Van Breusegem F. and Dat JF., 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol*, 141: 384-90.
- Van Camp W., Van Montagu M., Inze D., 1998. H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci*, 3: 330-4.
- Verma, S. and S.M., Mishra., 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *J. Plant Physiol.* 162: 669-677.
- Wang, C., Tao Liu, H.J., 2011. Effect of Selenium on Ascorbate–Glutathione Metabolism During PEG-induced Water Deficit in *Trifolium repens* L. *J. Plant Growth Regul.*, 30, 436-444.
- Wang W.S., Pan Y.J., Zhao X.Q., Dwivedi D., Zhu L.H., Ali J., Fu B.Y., Li Z.K., 2011. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot.*, 62, 1951-1960.
- Wang, C-Q., 2011. Water-stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, College of Life Sciences Shandong University of Technology, 174, 276-282.
- Waugh R., McLean K., Flavell A. J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.T. and Powell W., 1997. Genetic distribution of *BARE-1* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. Gen. Genomics*, 253 (6), 687-694.
- Wicker T., Sabot F., Hua-Van, A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., Sanmiguel P. and Schulman A.H., 2007. A Unified Classified Classification System For Eukaryotic Transposable Elements, *Nature Reviews Genetics*, 8, 973-982.
- Woodrow P, Pontecorvo G, Fantaccione S *et al.* (2010) Polymorphism of a new Ty-1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 311–322
- Xiaoqin Y., Chu J., Wang G., 2009. Effects of Selenium on Wheat Seedlings Under Drought Stress. *Biol Trace Elem Res.*, 130(3), 283-90.
- Xiaoqin Y., Chu J., Wang G., Chu J., Ba C., 2010. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. *Biol Trace Elem Res.*, 136(1), 96-105.
- Ximenez-Embun P., Alonso I., Madrid-Albarran Y. and Camara C., 2004. Establishment of Selenium Uptake and Species Distribution in Lupine, Indian Mustard, and Sunflower Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 832-838.

- Xue T.L., Hartikainen H., Piironen V., 2001. Antioxidative and growthpromoting effects of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil*, vol. 237, pp. 55-61.
- Yang X., Tian Y., Ha P. and Gu L., 1997. Determination of the Selenomethionine Content in Grain and Human Blood. *Wei Sheng Yan Jiu*, 26, 113-116.
- Yao X., Chu J., Wang G. 2009. Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 130: 283–290.
- Yediyıldız A.G., 2008. Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulanan Buğday (*Triticum aestivum*) Çeşitlerinde Antioksidan Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Yokota A., 1988. Selenium as Inducer of Glutathione Peroxidase in low-CO₂-Grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 86(3), 649-51.
- Zhang SH., 2008. The epigenetic landscape of plants. *Science* 320-489e492.
- Zhu JK., 2000. Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124: 941-8.
- Zhu Wm., Liu M., Wu Dq., 2000. Isolation and Characterization of A New Bacteriocin from *Lactobacillus Gasseri* Kt7. *J Appl Microbiol*, 88: 877–886.
- Zilberman D., Gehring M., Tran R., Ballinger T., Steven H., 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, 39(1), 61-94.
- Zhang, J., 2008-2009. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10, 449.
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., Ruan, K., Jin, Y., 2007. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *BMC Plant Biology*, 354, 585-590.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum'da doğdu. İlkokul eğitimini Erzurum'da tamamladı. Lise eğitimini ise Balıkesir'de tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalında lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nın Bitkisel Biyoteknoloji Bilim dalında yüksek lisansına başladı. 2015 yılında yüksek lisansını tamamlayarak mezun olmuştur.

