

**KURAKLIK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*)  
IN VITRO ŞARTLARDA MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU  
GENETİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER  
ÜZERİNE SELENYUMUN ETKİSİ**

**Zehra ŞAHİN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı  
Prof. Dr. Güleray AĞAR  
2014  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KURAKLIK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*)  
IN VITRO ŞARTLARDA MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU  
GENETİK VE EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE  
SELENYUMUN ETKİSİ**

Zehra ŞAHİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MOLOKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

*In vitro* şartlarda buğdayda (*Triticum aestivum*) kuraklık stresinin meydana getirmiş olduğu genetik ve epigenetik değişiklikler üzerine selenyumun etkisi

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Zehra ŞAHİN tarafından hazırlanan bu çalışma 20/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Rahmi DURLUPINAR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç:

Enstitü Yönetim Kurulu 08.07.2014 . tarih ve 27/891 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
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*) IN VITRO ŞARTLARDA MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU GENETİK VE EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE SELENYUMUN ETKİSİ**

Zehra ŞAHİN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Çalışmamızda, *in vitro* koşullar altında kuraklık stresinin buğday (*Triticum aestivum*) genomunda yaptığı genetiksel ve epigenetiksel değişimler üzerine selenyumun etkileri araştırılmıştır. Tohumlardan elde edilen olgun embriyolar, PEG 6000 ile oluşturulan 4 farklı osmotik potansiyelde (0, %5, %10, %15) ve Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>'ün 4 farklı konsantrasyonunu içeren (0, 2, 4 ve 6 µM) MS ortamında kültüre alınmıştır. Deney gruplarının RAPD profillerindeki DNA değişimleri, DNA hasarları ve mutasyonlar ile ilgili bilgi verirken CRED-RA yöntemi DNA metilasyonunu hakkında bilgi vermiştir. Sonuç olarak, kuraklık stresinin DNA hasarlarına ve GTS (Genomic template stability) değerinin düşmesine neden olduğu ve DNA hipermetilasyonu oluşturduğu gözlenmiştir. Kuraklık ile beraber uygulanan selenyumun, DNA hipometilasyonuna yol açtığı ve düşük dozlarının (2, 4 µM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) kuraklık sonucu oluşan GTS değerlerini yükselttiği, yüksek dozunun ise (6 µM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) GTS değerlerini azalttığı gözlenmiştir.

**2014, 74 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksik, RAPD, CRED-RA, DNA metilasyonu

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION EFFECT OF SELENIUM ON GENETIC AND EPIGENETIC CHANGES IN *TRITICUM AESTIVUM* EXPOSED TO DROUGHT STRESS *IN VITRO* CONDITIONS

Zehra ŞAHİN

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

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AGAR

In our study, the effect of selenium on genetic (RAPD) and epigenetic changes (CRED-RA) in wheat (*Triticum aestivum*) exposed to drought stress *in vitro* conditions were investigated. The embryos obtained from seeds were cultured on medium (MS) consisting of 0, 5%, 10%, 15% PEG 6000 and 0, 2, 4 ve 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ . DNA changes of RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) profiles in the experimental group exhibited DNA damage and mutations (eg, point mutations and chromosomal arrangements) and CRED-RA method was performed to determine the changes of DNA methylation. In conclusion, drought stress caused DNA damage by reducing in the values of the GTS (Genomic template stability) and DNA hipermethylation. When selenium was applied against drought stress, selenium ameliorated the effect of drought. The low doses of selenium (2, 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) increased reduction of GTS values caused by drought, whereas the high dose of selenium (6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) decrease in the GTS of wheat genome exposed to drought.

**2014, 74 pages**

**Keywords:** Genotoxic, RAPD, CRED-RA, DNA methylation

## TEŞEKKÜR

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

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan ve beni hep destekleyen danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a her türlü destek ve yardımından dolayı şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde Ziraat Fakültesi, Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bölümü'nde aldığım dersler aracılığıyla eğitimime katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na, bilgi, deneyim ve önerileri ile yanımda olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a, deneysel çalışmalar eğitim sürecinde yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Selçuk KODAZ'a, tez çalışmamda teknik konularda desteği için Sayın Arş. Gör. Gökçe KARADAYI'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca sabrını, zamanını esirgmeden yanımda yer alarak beni destekleyen Sayın Arş. Gör. Dr. Derya YANMIŞ'a ve sevgili dostlarım Sayın Derya TEZCAN AYDIN'a, Sayın Uzm. Biyolog Yeliz YÖNYÜL'e, yoluma ışık olan çok değerli hocam Sayın İngilizce Öğr. Filiz ÜNAL'a, güvenini, her konuda varlığını ve desteğini her zaman hissettiğim babama ve anneme teşekkürü bir borç bilirim.

**Zehra ŞAHİN**

**Mayıs, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>11</b>
2.1. Kuraklık.....	11
2.2. Selenyum .....	16
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>26</b>
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal .....	26
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	26
3.1.3. Çözelti ve solüsyonlar .....	27
3.1.3.a. Polietilenglikol (PEG 6000) çözeltileri .....	27
3.1.3.b. Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 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 .....	28
3.2. Yöntem .....	29
3.2.1. Doku kültürü.....	29
3.2.1.a. Tohum sterilizasyonu .....	29
3.2.1.b. Besiyeri ve Kültürleme Koşulları.....	29
3.2.2. DNA izolasyonu .....	31
3.2.3. RAPD .....	32
3.2.3.a. RAPD primerleri.....	32
3.2.3.b. PCR protokolü.....	33
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	34
3.2.5. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (%GTS) belirlenmesi .....	34

3.2.6. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion-random amplification).....	35
3.2.6.a. DNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.....	35
3.2.6.b. CRED-RA primerleri .....	35
3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi.....	36
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>37</b>
4.1. RAPD Analizleri ve Genomik Kalıp Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%) .....	37
4.2. CRED-RA Analizleri ve %Polimorfizm .....	41
4.4. RAPD ve CRED-RA Jel Görüntüleri.....	45
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>49</b>
5.1. Öneriler.....	61
KAYNAKLAR .....	62
ÖZGEÇMİŞ .....	75



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APX	Askorbat peroksidaz
BSA	Bovin serum albumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
CAT	Katalaz
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Kobalt klorür heksahidrat
CRED-RA	Coupled restriction enzyme digestion-random amplification (Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Bakır sülfat pentahidrat
CuZnSOD	Bakır çinko süperoksit dismutaz
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
Cys	Sistein
DMeSe	Selenyumun dimetil formu
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
Et-Br	Ethidium bromid
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Demir sülfat heptahidrat
g	Gram
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GST	Guaiacol peroksidaz
GSH	Glutatyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borik asit
HTFs	Hpa II tiny fragments
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum difosfat

KNO <sub>3</sub>	Potasyum nitrat
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
MDA	Melondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Mangan sülfat monohidrat
MnSOD	Manganazsperoksit dismutaz
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sodyum molibdat
NaCl	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Se	Sodyum Selenat
ng	Nanogram
O <sub>2</sub>	Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit radikali
•OH	Hidroksil radikali
OD	Okuma değeri
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
POD	Peroksidaz
PVP	Polivinilpirolidon
RdDM	RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu
RD	Dehidrasyon yanıt
RE	Restriksiyon enzimi
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
SeCys	Selenosistein
SeIP	Selenoprotein P
SeIS	Selenoprotein S
SelMet	Selenometionin

SOD	Süperoksit dismutaz
TBE	Tris-borat-EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
TMeSe	Trimetil
TRxR	Trioredoksin reduktaz
TRs	Thioredoksin reduktaz
UV	Ultra viyole
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Çinkosülfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyotik ve abiyotik stres etmenleri .....	11
Şekil 2.2. Stres toleransının epigenetiksel düzenlenmesi .....	15
Şekil 2.3. a-serin (Ser), b-sistein (Cys), c-selenosistein (Sec).....	16
Şekil 2.4. Ökaryotik selenoprotein mRNA, SECIS (SEleno Cysteine Insertion Sequence) .....	17
Şekil 2.5. Selenosistein biyosentez yolu; SPS2, selenofosfat sentaz; PSTK, fosforil-tRNA kinaz .....	17
Şekil 2.6. Organo-selenyum bileşiklerinin kimyasal yapıları.....	20
Şekil 4.1. OPW 13- RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	45
Şekil 4.2. OPW 6- RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	46
Şekil 4.3. OPW 13- CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	47
Şekil 4.4. OPB 10 -CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> <i>Triticum aestivum</i> doku kültürü için kullanılan MS temelli besiyerlerinin kimyasal içeriği .....	30
<b>Çizelge 3.2.</b> RAPD primerleri.....	32
<b>Çizelge 3.3.</b> CRED-RA primerleri.....	35
<b>Çizelge 4.1.</b> RAPD profillerinde değişen bantların moleküler ağırlıkları (bp) ve genomik kalıp sabitliği.....	38
<b>Çizelge 4.2.</b> CRED-RA-%polimorfizm .....	42
<b>Çizelge 4.3.</b> MspI Toplam Bant Sayısı .....	43
<b>Çizelge 4.4.</b> Toplam Polimorfik Bant Sayısı .....	44

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması ile nüfusun beslenme ihtiyacının karşılanması bakımından tarım alanlarındaki bitkisel besin kaynaklarının maksimum verimlilikte elde edilmesi, tüm dünya için olduğu kadar bitki biyoçeşitliliği ve genetik kaynakları bakımından dünyadaki en zengin ülkelerden biri olan ülkemiz (Babu *et al.* 1999) için de oldukça önemlidir (Arora *et al.* 2002). Tarla bitkileri ekim alanı içinde önemli yere sahip olan tahıllar, ülkemiz ve tüm dünya için ekim ve üretim açısından başta gelen ürün grubudur (Süzer 1992). İnsanoğlu, gereksinim duyduğu protein ve kalorinin %50'sini tahıllardan sağlamaktadır. Bu nedenle insan nüfusunun ihtiyacı olan miktar ve kalitede tahıl üretimi günümüzde olduğu gibi gelecekte de dünya uluslarının en önemli gündem maddesini oluşturacaktır (Altıntaş vd 2005). Dünya üzerinde yılda yaklaşık olarak 675 milyon ton (FAOSTAT 2013) üretimi yapılan tahıl ürünü olan buğdayın, insan besin kaynakları arasında geniş adaptasyon kabiliyeti, besleme değeri taşıması, depolama ve işlenmesindeki kolaylık ve ekmeğin ham maddesi olan unun elde edilmesi yönüyle önemli yeri olmasından dolayı, hem tarımsal üretimde sürdürülebilirliğini hem de dünya besin güvencesini tehdit etmesi yönüyle buğday veriminin azalmasını engellemek, olumsuz koşullara dayanıklılığı artırmak hedefiyle buğday üzerine gerçekleştirilen bilimsel araştırmalar oldukça yoğundur (Kün 1983; Atlı 1999).

Dünya tarım alanlarının büyük bir bölümünde büyümeyi ve bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli çevresel streslerden biri kuraklıktır ve tüm dünyada ekim alanları içinde meydana gelen stres faktörleri içinde %26'lık pay ile en büyük dilimi oluşturmaktadır. Bitki, stresin şiddetine, süresine, diğer stres türleri ile etkileşimlerine, genotipine ve gelişim basamağına bağlı olarak sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak tolerans mekanizmalarını indüklemektedir (Arora *et al.* 2002; Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Bitkilerde kuraklık stresi mekanik, metabolik ve oksidatif etkiler oluşturabilmektedir. Hücredeki su kaybı ile beraber membran yapısı değişikliğe uğramaktadır. Gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen çökme, yırtılmalara yol

açmaktadır ve normal hücrel metabolizmayı genelde kalıcı olarak bozan, kuraklığın mekanik etkisini ortaya çıkarmaktadır. Kuraklık stresi, su kaybı ile protein denatürasyonlarına ve enzim inhibisyonlarına neden olması yanında (Bray 1997), DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin degradasyonuna da sebep olmaktadır. Nükleik asitlerin yıkımı üzerine diğer etkisi ise serbest radikaller aracılığıyla oksidatif etki oluşturmaktan kaynaklanmaktadır (Kessler 1961).

Genom bütünlüğünün sağlanması, strese yanıtın önemli bir unsurudur. Çeşitli içsel ve dışsal stres bitki genom stabilitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Bray 1997). Bu stres şartlarının genotoksik etkileri, genellikle serbest radikal metabolizmasında doğrudan ya da dolaylı şekilde indüklenen değişimlerle ilişkilidir. Reaktif oksijen türlerinin (ROT), birçok çeşidi aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak *in vivo*'da oluşmaktadır. ROT'lar peroksizomlar ve lizozomlar gibi metabolik aktivitenin yüksek olduğu organeller kadar hücrel solunum ve fotosentez sürecinde; mitokondride, kloroplastlarda elektron taşıma zincirinde üretilmektedirler. Bunların çoğu DNA ve diğer biyomoleküllere zarar verebilen güçlü oksidasyon ajanları olarak davranmaktadır. Organizmada ROT oluşumu; radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek oksijen basıncı ve kimyasal maddeler etkisi ile artabilmektedir. Diğer taraftan ısı ve soğuk, kuraklık ve kuruma, tuzluluk, UV ve ağır metallere maruz kalma hava kirliliği, besin eksikliği ve patojen saldırıları gibi abiyotik stresler ROT'ların hızla birikmesine yol açmaktadırlar (Grafı *et al.* 2013).

Sonuç olarak; hücrelerin karbonhidrat, enzim, lipid, protein gibi yapıları ve DNA zarar görmektedir (Onat vd 2002; Gökbulut 2010). Sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatan ROT etkisi ile membran permeabilitesi artmaktadır. Nükleer membranda oluşan zarar yoluyla DNA hasarı oluşturmaktadır (Uysal 1998; Dündar ve Aslan 2000; Gökbulut 2010). Bu radikallerin, proteinlerin sistein sülfidril grupları ve diğer aminoasitleri okside olarak yıkılmaları sonucu, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olmaktadır (Aksoy 2000; Onat vd 2002; Gökbulut 2010). Bu nedenle oksidatif DNA hasarı, mutasyonla sonuçlanabilmektedir (Blokhina *et al.* 2003). Örneğin; hidroksil radikali, DNA protein

çapraz bağlantının oluşumuna ve DNA'dan serbest bazların açığa çıkmasına ve DNA tek ve çift iplik kırılmaları, apürinik ve apirimidinik alanların meydana gelmesine neden olmaktadır (Gökbulut 2010).

ROT'ların ortadan kaldırılmasında, antioksidan savunma sistemleri (antioksidanlar) ve enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon s-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPX) görev yapmaktadır (Gong 2005; Raza 2006; Gökbulut 2010). Hücresel savunma mekanizması yoluyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT oluşumu da oksidatif stres olarak ifade edilmektedir (Erdei 2002). Bitkilerde neredeyse tüm stres şartları hızlı yanıt olarak oksidatif stresi başlatmaktadır (Blokhina *et al.* 2003). Oksidatif stres, hücre enzimatik reaksiyonlarında enzimlerin aktif alanlarında sürekli olarak serbest radikaller oluşturur ve bu ürünler enzimlerin aktif alanlarından sızarak moleküler oksijen ile etkileşerek serbest oksijen radikallerini meydana getirmektedirler (Bouyoucos 1951; Gökbulut 2010). Oksidatif stres, singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ) ile temsil edilen reaktif oksijen türleri olarak karakterize edilmektedir (Foyer and Noctor 2003).

Çevresel stresler, fotosentetik parametrelerde azalma, lipid membranda hasar ve gelişimin engellenmesiyle sonuçlanan ROT birikmesine sebep olarak antioksidan ve ROT üretimi arasındaki dengeyi bozmaktadırlar (Kong *et al.* 2005; Chen *et al.* 2011). Sadece buğdayda değil birçok bitki türünde kuraklık stresi, oksidatif zararı indüklemektedir ve antioksidan enzim aktivitesini değiştirmektedir. Kuraklık stresi altındaki bitkilerin kloroplastlarında ROT ürünleri yapraklarda oksidatif zarardan sorumlu majör faktör olarak bilinmektedirler (Foyer and Noctor 2003). Kuraklık stresinin, bitkide ROT oluşumu üzerine etkisini belirleyen araştırma sonuçlarına göre, kuraklık stresinin bitkiye verdiği zarar DNA, enzimler ve lipitlerde etki gösteren ROT artışıyla yakından ilişkilidir (Smirnoff 2000). Kuraklık stresinin, protein denatürasyonu, membran hasarını engellemek için bir hidroksil radikal temizleyici olarak etki gösteren CAT ve POD etkinliğini, kuraklık stresi altındaki bitkide yaygın bir yanıt olan prolin miktarını, ayrıca kök etkinliğini artırmasına rağmen, buğdayın gelişimini önemli derece



azalttığı belirlenmiştir (Xiaoqin *et al.* 2009). Diğer bir araştırma sonucuna göre kuraklık stresinin *Trifolium repens* yapraklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi ile oksidatif stres meydana getirdiği ve SOD aktivitesinde aşamalı artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Wang *et al.* 2011).

Son yıllarda bazı araştırmalarda, selenyumun kuraklık, soğuk, UV-B, tuzluluk ve ışık stresi gibi çevresel stres faktörlerine karşı bitki toleransını artırdığı gösterilmiştir (Vaalkama *et al.* 2003; Seppänen and Hartikainen 2003). Kimyasal açıdan kükürte benzerliği nedeniyle proteinlerin yapısına katılmakta olan ve hayati öneme sahip işlevsel, yapısal proteinlerin üç boyutlu yapılarında farklılıklara neden olabilen selenyumun, sülfür aminoasitler, glutatyon peroksidaz ve koenzim A gibi sülfidril gruplar içeren bileşiklerde kükürtün yerini alabildiği bilinmektedir (Wang *et al.* 2011).

Selenyum, bitkilerde temel bir element olarak düşünülmemesine rağmen, düşük konsantrasyonlarda büyümeyi desteklemektedir. Bunun yanı sıra selenyum uygulamaları sonucunda, organ ve dokularda lipid peroksidaz ve hidrojen peroksidaz birikimini engelleyen selenoenzimlerin etkinliği uyarılarak organizmada oksidatif zarar azaldığı belirlenmiştir (Hartikainen and Piironen 2000; Xue and Piironen 2001; Turakainen and Seppänen 2004; Hartikainen 2005). Diğer araştırma sonuçları da selenyumun, oksidatif strese karşı savunmada önemli bir bileşik olan glutatyon (GSH) etkinliğini arttırarak ve yüksek bitkilerde lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif strese karşı koruduğunu bildirmiştir (Hartikainen 2005; Djanaguiraman *et al.* 2010). Ayrıca fungal enfeksiyona karşı bitkiyi koruduğu bilinen (Hanson *et al.* 2004) selenyumun yaşlanan tohumda çimlenmeyi artırıcı etkisi olmakla birlikte (Hartikainen 2005), oksidoredüktaz enzim aktivitesi değişimlerine karşı etkisi, buğday (Nowak *et al.* 2004), soya fasulyesi (Djanaguiraman and Shanker 2005) ve kahve hücre süspansiyon kültürlerinde (Gomes-Junior *et al.* 2007) gösterilmiştir.

Kuraklık stresi nedeniyle bitkide meydana gelen fizyolojik özelliklere ve büyüme-gelişme yönündeki değişimlere selenyumun etkisini belirleyen birçok araştırma mevcuttur.

Xiaoqin *et al.* (2009) araştırmaları sonucuna göre kuraklık stresi altında selenyum miktarındaki artışın iyi sulama şartları altındaki buğday tohumları için avantajlı ortam sağladığı, antioksidan kapasiteyi artırdığı, fakat bu artışın biomass miktarında kuraklığın etkisini yok etmediği bildirilmiştir.

Yine aynı araştırcıların yönettiği diğer bir araştırmada ise kuraklık stresine maruz bırakılan buğday tohumlarında farklı konsantrasyonlarda selenyumun stres şartlarındaki tohumlar için ekolojik adaptasyon sağlayan CAT, POD etkinliğinde, serbest prolin miktarında önemli artış sağladığını ve tohumlarda melondialdehit (MDA) miktarını azalttığını, MDA miktarındaki azalışın ise lipid peroksidasyonunda azalış sağladığını belirtmiştirler (Xiaoqin *et al.* 2009),

Xiaoqin *et al.* (2012), kuraklık stresi sonrası selenyum ile birlikte sulamanın ardından meydana gelmiş olan  $O_2^-$  miktarındaki azalışın, kuraklık stresi sonrasında buğday tohumlarının sulanması sonucunda  $O_2^-$  üretimindeki azalmadan daha fazla olduğu göstermişlerdir ve bu durumu, selenyumun buğday tohumlarında oksidatif stresi daha fazla azaltması, daha dşuk membran hasarı oluşturması ve lipid peroksidasyonunu azaltması ile açıklamışlardır.

Ayrıca selenyumun, yüksek bitkilerde (Hartikainen 2005) ve yeşil alglerde (*Chlamydomonas reinhardtii*) de (Yokota 1988) lipid peroksidasyon azalışı ile oksidatif strese karşı koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir.

*Trifolium repens* (Ak uğl) yapraklarında, kuraklık stresi etkisiyle  $H_2O_2$ 'in birikimiyle lipid peroksidasyonu meydana gelmiştir ve selenyum uygulanması kuraklığın bu olumsuz etkisini azaltmıştır. Bununla birlikte kuraklık stresi SOD etkinliğinde kademeli artış meydana getirirken selenyum uygulaması ise SOD etkinliğini daha fazla artırmıştır (Wang *et al.* 2011).

Selenyum, sitosol ve kloroplastta yer alan APX,  $H_2O_2$ 'i uzaklaştırabilmektedir (Asada *et al.* 1987). Glutatyon redüktaz (GR), hüresel antioksidan/prooksidan oranını

düzeltilmede önemli bir rol oynamaktadır. Kuraklık stresi GR etkinliğini artmasına neden olmasına karşın selenyum uygulaması, GR etkinliğini daha fazla artırmıştır. Bu sonuçlar göstermiştir ki kuraklık stresi altında selenyum antioksidan enzim etkinliği geliştirilerek oksidatif stresi azaltmıştır (Wang *et al.* 2011).

Selenyumun, kuraklık dışındaki çeşitli stres koşulları üzerine etkisini belirleyen araştırmalar da mevcuttur.

Xiaoqin and Chu (2010), UV-B stresine maruz bırakılan buğday tohumlarında, selenyum uygulanması ile süperoksit radikal üretim oranı ve MDA miktarının önemli derecede azaldığını belirlemiştirler. Bu sonuçlar, çeşitli stres şartlarında kuzukulağı, patates, soya fasulyesi ve buğday için belirtilen önceki araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir ( Seppänen and Hartikainen 2003; Kong *et al.* 2005; Djanaguiraman and Shanker 2005; Xiaoqin *et al.* 2009).

Bitkide önemli antioksidan olan flavonoidlerin, UV-B stresine genel yanıt olduğu ve yaprak dokuları boyunca UV ışınlarının iletimini azaltarak radyasyona karşı bitkiyi koruyabildiği görülmüştür (Smith and Bannister 2000). Xiaoqin and Chu (2010) çalışmaları sonucunda doza bağlı olarak selenyum uygulamasının, fotooksidatif zararı azaltmaya yardımcı antioksidan bileşenler olarak davranabilen antosiyanin ve fenolik bileşik miktarını önemli derecede artırdığını bildirmişlerdir (Xiaoqin and Chu 2010).

Liang *et al.* (2008), buğday tohumlarında soğuk stresinin oksidatif stresi arttırdığını, Liu *et al.* (2006) ise düşük sıcaklığın buğday tohumlarında MDA miktarını yükselttiğini bildirmişlerdir. Ayrıca soğuk stresine maruz kalan buğday tohumlarına selenyum uygulanmasının ise MDA miktarını ve  $O_2^-$  üretim oranını, tohumlarda oksidatif stres ve membran lipid peroksidaz oluşumunu azalttığı, ayrıca antosiyanin, flavonoid ve fenolik bileşiklerin miktarında önemli derecede artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Chu *et al.* 2010). Kuraklık ve tuzluluk stresi altındaki buğday ve salatalık tohumlarında ise selenyum uygulamasının peroksidatif sürece karşı bitki hücrelerini koruyabilen (Saradhi

and Prasad 1995) prolin miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Kaplan 2004; Chu *et al.* 2010).

Chu *et al.* (2010) araştırma sonuçları da selenyumun, antioksidan enzim etkinliği ve antioksidan bileşik miktarının artışı ile stres şartları altındaki genç tohumlar için ekolojik adaptasyon sağlayabildiğini desteklemektedir.

Bitkiler, uzun ve kronik stresle başa çıkabilmek için antioksidan savunma sistemi dışında uzun süreli yanıt sistemi ve savunma sistemlerine de sahiptirler. Şüphesiz ki fizyolojik esneklik, yalnızca gen ifadesindeki değişimlerin düzenlenmesiyle ve kısa sürede meydana gelen metabolik bileşimlerle gerçekleştirilebilir (Shinozaki *et al.* 2003; Kaplan 2004; Cook 2004; Lee *et al.* 2005; Oono 2006; Sung and Amasino 2004). Diğer bir ifadeyle bu durum genetik bilginin değişmesi değildir. Ancak epigenetik düzenleme aracılığıyla gen havuzu ifadesindeki değişimler yeni büyüme şartları için adaptasyonu ve stres şartlarında hayatta kalabilmeyi sağlamaktadır (Grafi *et al.* 2013).

Bitkide strese yanıtın temel gücü hızlıca homeostazı değiştirebilme yeteneğidir. Bu yeteneğin gözlenmesi için üretilen metabolitlerin de novo'da sentezi ve bölümlere ayrılması kadar miktarı ve sayısındaki büyük değişimlerin, protein sentezinin ve mRNA'da dinamik değişimlerin ve tuz konsantrasyonu, pH, hormon seviyesi dengesinin izlenmesi gerekmektedir. Bu olayların çoğu nükleer matrikste histon olmayan ve histon-kromatin bağlama proteinlerinin yeniden konumlanması kadar histon modifikasyonları ve DNA metilasyonundaki değişimleri kapsayan somatik hücrelerde epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (Grafi *et al.* 2013).

DNA metilasyonu, stres yanıtı ve gen ifadesinin düzenlenmesinde en çok çalışılan epigenetik mekanizma olmanın yanı sıra çeşitli gelişimsel ve çevresel faktörlere oldukça duyarlı olan kompleks moleküler mekanizmadır. DNA metilasyonu, kromatinin yeniden şekillenmesinde kompleksin etkinliğini yönetebilmektedir (Zilberman *et al.* 2007). Stresle ilgili genlerin ifade edilmeleri, lokuslarında DNA metilasyonundaki azalışla ilişkilidir. Bu yüzden doğal stres şartları altında stresle ilgili gen ifadesi için özel

sekansların DNA demetilasyonu gerektirebileceği öne sürülmektedir. Hipometilasyona uğramış lokuslar genomik yeniden düzenlemeye daha eğilimli olduğundan stresle indüklenen DNA metilasyonundaki artışın stres şartları altında genomun yeniden düzenlenmesini sınırlayan bir savunma yanıtı gösterdiğini öne sürmek mümkündür (Boyko and Kovalchuk 2010).

Mısır köklerinin soğuk stresine maruz bırakılmasıyla nükleozom çekirdeğinde meydana gelmiş olan hipometilasyonun, 7 gün normal şartlara bırakıldığında bazal seviyeye, eski duruma geri dönüş gerçekleştirmediği yapılan araştırmalar arasında yer almaktadır (Steward 2002).

Choi and Sano (2007), tütün bitkisinde abiyotik stres koşullarının DNA metilasyonu üzerine olan etkilerini belirlemek için yapmış oldukları çalışma sonucunda, alüminyum, tuz ve soğuk stresinin DNA demetilasyonuna neden olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, osmotik stresin tütün bitkisinde iki heterokromatik alanda geçici DNA hipermetilasyonuna (Kovarik *et al.* 1997), kuraklık stresinin ise bezelyede DNA hipermetilasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir (Labra *et al.* 2007).

DNA metilasyonu, genom stabilitesinin önlenmesi ve transpozon hareketlerinin sınırlandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Strese yanıtta transpozon etkinliği transpozon lokuslarında DNA metilasyonundaki azalışla ilişkilidir. Transpozonlar araya girdiği yeni alanlarda, komşu genlerin strese karşı transkripsiyonel duyarlılığı sebebi ile transkripsiyonel kontrol uygulayabilmektedirler ve yeni fenotiplerin oluşumuna neden olabilmektedirler. Çevresel faktörler, DNA demetilasyonu sayesinde transpozonları aktive edebilirler. *Antirrhinum majus* (Aslanağzı) bitkisinde soğuk stresi, hipometilasyonu ve Tam-3 transpozonunun tranpozisyonunu indüklemiştir (Hashida *et al.* 2006).

Ayrıca, siRNA'lar RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) olarak bilinen siRNA'lara komplementer DNA sekanslarının metilasyonunu yönetmektedirler.

miRNA'lar da gen sessizleşmesi ile sonuçlanan translasyonel baskılama ve mRNA degradasyonu boyunca post transkripsiyonel düzeyde görev almalarına ek olarak DNA metilasyonunda rol oynamaktadırlar (Grafı *et al.* 2013).

Endojen siRNA'lar abiyotik stresle düzenlenmektedir. Stres denetimli siRNA'lar, histon modifikasyonlarına ve DNA metilasyonuna yol açabilmektedirler. *Arabidopsis*'te, abiyotik stres ve ABA, RdDM yolunu olumsuz yönde etkileyen genlerin ifadesini etkilemektedir (Chinnusamy and Zhu 2009).

Strese yanıt çeşitli genomik lokuslarda baskılama ve transkripsiyonel aktivasyonu içerdiğinden dolayı kromatin yapısındaki değişimler bu süreçte en önemli rolü oynamaktadırlar. Kromatinin açılması; sitozin metilasyonundaki değişimleri, histon varyantlarının ifadesini, histonların kovalent modifikasyonlarını ve ATP bağımlı komplekslerin etkinliğini kapsamaktadır. Çoğu epigenetik histon işaretlerinin genomda geniş ifadeleri önemli düzenleme görevine sahiptirler (Grafı *et al.* 2013).

Nükleozom çekirdek kompleksinin histonlarında N-terminal alanlarında post transkripsiyonel değişimler gerçekleşmektedir. Bunlardan asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon transkripsiyonu artırırken (Zhang 2007), biotinilasyon ve sümoylasyon gen ifadesini baskılamaktadırlar (Nathan 2006; Camporeale 2007).

Kuraklık stresine duyarlı, dehidrasyon yanıt (RD) genlerinin stres koşulları altında, H3K23 ve H3K27 asetilasyonu ile ifadelerinin artmış olduğu bilinmektedir (Kim 2008).

*Arabidopsis*'te, yüksek tuzluluk ve soğuk stresi, ABA, H4 asetilasyonun hızlı ve geçici artışına neden olmuştur (Sokol *et al.* 2007).

Stres ile oluşan histon modifikasyonları aynı zamanda DNA metilasyonunu etkileyebilir. *Arabidopsis*'te, histon modifikasyonlarının DNA metilasyonlarına aracı olduğu gösterilmiştir (Zhu 2008). Bu da histon modifikasyonlarının daha kararlı olan DNA metilasyonuna dönüşebildiğini göstermektedir.

Jasmonik asit ve etilen, *Arabidopsis*'te histon deasetilazı (HDA6) ve RdDM yolunu uyararak transkripsiyonel gen susturulmasını etkilemektedirler (Chinnusamy and Zhu 2009).

Aşırı suya maruz kalmış pirinçte, H3K4 trimetilasyonu ve H3 asetilasyonu alkol dehidrogenaz 1 (ADH1) ve pirüvat dekarboksilaz 1 (PDG1) genlerinin ifadesini arttırmıştır (Tsuji 2006).

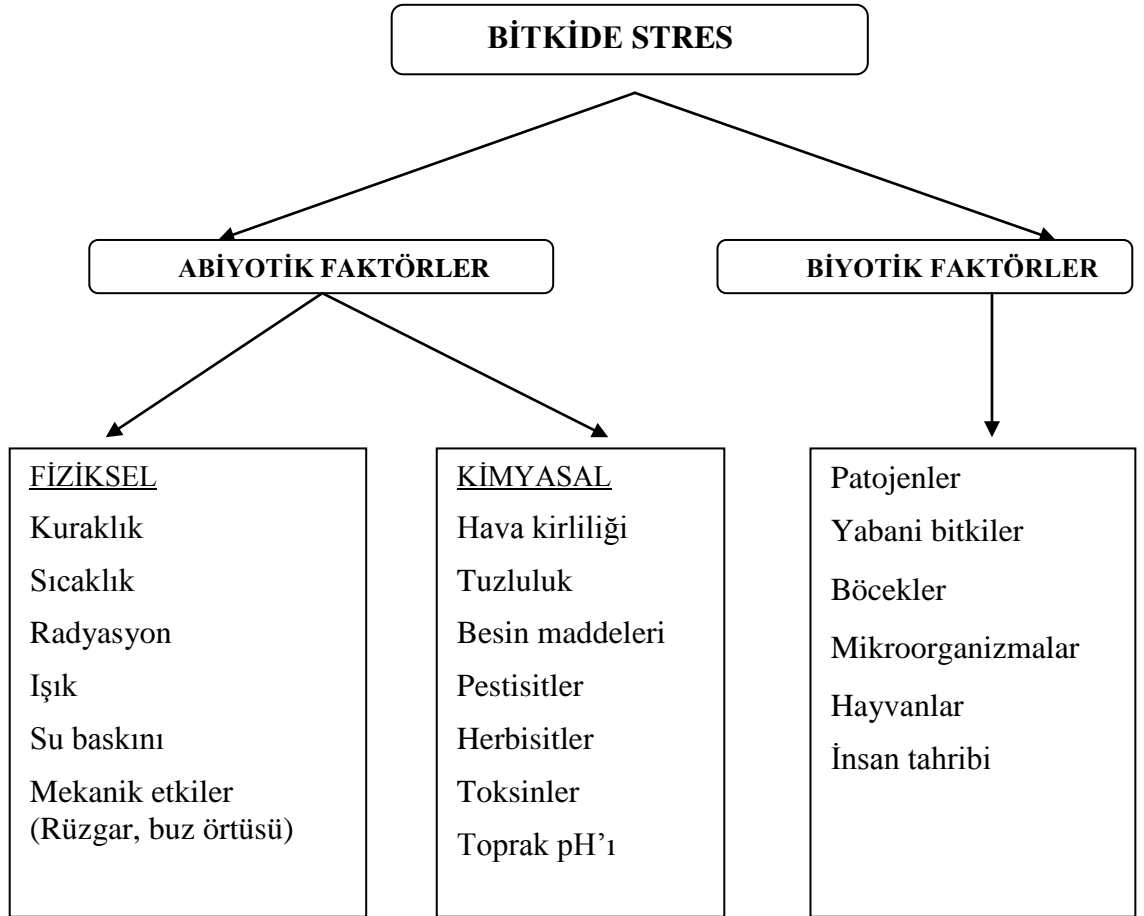
Bitkide stres, gen ekspresyonu, DNA metilasyonu ve histonlardaki post-translasyonel modifikasyonlar gibi kromatin yapısında meydana gelen epigenetiksel değişiklikler ile moleküler düzeyde bitkiyi etkilemektedir. Bitkide kuraklık stresiyle oluşan oksidatif stresi azaltabildiği bilinen selenyumun, yüksek dozda toksik etkisinin yanında, oksidatif stres etmenlerine maruz kalan bitkide olumlu etkisi bilinmekle birlikte, kuraklık stresi şartlarının oluşturduğu epigenetik ve genetik değişiklikler üzerine etkisini açıklayan benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle bu çalışmada, *in vitro* şartlarda buğday tohumlarından elde edilen olgun embriyolar kullanılarak kuraklık stresi şartlarının meydana getirdiği genetik ve epigenetik değişimler üzerine selenyumun etkisi ilk kez araştırılması yönüyle bilimsel bir boşluğun doldurulması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Kuraklık

Bitkiler yaşamları sürecinde, çeşitli stres koşullarına maruz kalmaktadır. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri nedeniyle bitkide ortaya çıkan değişimler stres olarak ifade edilmektedir. Stres, çeşitli metabolik ve fizyolojik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemektedir, üründe nitelik ve nicelik kaybına sebep olmaktadır ve bitkinin, bitki organlarının canlılığını yitirmesine neden olabilmektedir (Kaçar 2006). Stres faktörleri, Şekil 2.1’de belirtildiği üzere abiyotik ve biyotik olarak gruplandırılmaktadır.



Şekil 2.1. Biyotik ve abiyotik stres etmenleri (Kaçar 2006)



Doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi, dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar arasında %26'lık payıyla en büyük dilimde yer alırken, %20'lik payı mineral stresi, %15'lik kısmı soğuk ve don stresi, %29'luk kısmı kalan tüm stresler doldururken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Yediyıldız 2008). Büyüme ve verimi etkileyen en yaygın çevresel streslerden biri olan kuraklık stresi bitki üzerinde mekanik, metabolik ve oksidatif etki göstermektedir.

Mekanik etki, bitkide belirgin su yitimiyle birlikte turgor kaybı meydana gelmesi sonucu görülen birincil strestir (Levitt 1980). Hücredeki su kaybı, membran yapısı değişimine neden olmaktadır. Su kaybına bağlı olarak hücre hacminin azalması, gerilim altındaki plazma membranında ve tonoplastlarda oluşan çökme, yırtılmalara yol açabilmektedir. Bu durum, zarlar üzerinde yer alan hidrolitik enzimlerin serbest kalması nedeniyle sitoplazma otoliziyle sonuçlanabilmektedir (McKersie and Leshem 1994).

Hücre içeriğinin büyük kısmını oluşturan su, tüm hücrel reaksiyonlarda rol oynamaktadır. Hücredeki su kaybına bağlı olarak meydana gelen iyon birikimi membran bütünlüğü ve protein yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar vermektedir. Proteinlerin yapısında yer alan hidrofilik ve hidrofobik aminoasitlerin su ile etkileşiminin bozulması, protein denatürasyonuna ve enzim inhibisyonuna yol açmaktadır (Campbell 1991). Kuraklık stresi şartlarında, enzimin bağlı durumdan serbest duruma geçmesi sonucu RNAaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. Kuraklığın bir başka etkisi de DNA ve RNA'nın degradasyonuna sebep olmasıdır (Onat vd 2002; Gökbulut 2010).

Kuraklığın oksidatif etkisi, nükleik asitlerin yıkımından sorumlu diğer moleküller olan serbest radikallerin oluşumuyla görülmektedir. Stres şartlarının genotoksik etkileri, genellikle serbest radikal metabolizmasında doğrudan ya da dolaylı şekilde indüklenen değişimlerle ilişkilidir. ROT'lar etkilerini, DNA ve hücrelerin karbonhidrat, enzim, lipid, protein gibi yapılarına zarar verebilen güçlü oksidasyon ajanlar olarak göstermektedirler (Onat vd 2002; Gökbulut 2010).

Kuraklık stresi bitkilerde sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı indüklemektedir (Arora *et al.* 2002). Bitkinin kuraklık stresine karşı fizyolojik yanıtında, hücre duvarı, protein ve klorofil sentezinde, çimlenmede, stoma açıklığında, CO<sub>2</sub> asimilasyonunda, solunumda azalış, ABA sentezi ve prolin birikiminde artış görülmektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Kuraklık stresi koşullarında bitkide meydana gelen moleküler yanıt mekanizmasında ise makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, koruyucu moleküllerin sentezi, ROT'ların oluşumu gerçekleşmektedir (Büyük vd 2012).

Makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, bitkilerin dehidrasyona karşı olan temel cevap mekanizması olarak, su iletimi ve iyon dengesinin kontrolü ile su geçişinde rol oynayan hidrofilik transmembran kanallar olan aquaporinlerin ve iyon taşıma sistemlerinin aktivasyonunu/inaktivasyonunu kapsamaktadır (Wang and Altman 2003).

ROT'ların temizlenmesinde rol oynayan ozmoprotektan olarak davranan ozmolitler (şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler) strese moleküler yanıt olarak artmaktadır. Böylece suyun, sodyumun apoplast ve vakuollerde tutulması kolaylaştırılmaktadır (Smirnoff 1989). Diğer bir koruyucu molekül olan ısı şoku proteinlerinin artışı, hasara uğramış ve yanlış katlanmış polipeptitleri bağlama potansiyeline sahip olmaları ile bu polipeptitlerin yıkımını önleyerek potansiyel olarak hücreyi strese karşı korumada rol oynamaktadır (Iba 2002; Chiba *et al.* 2006).

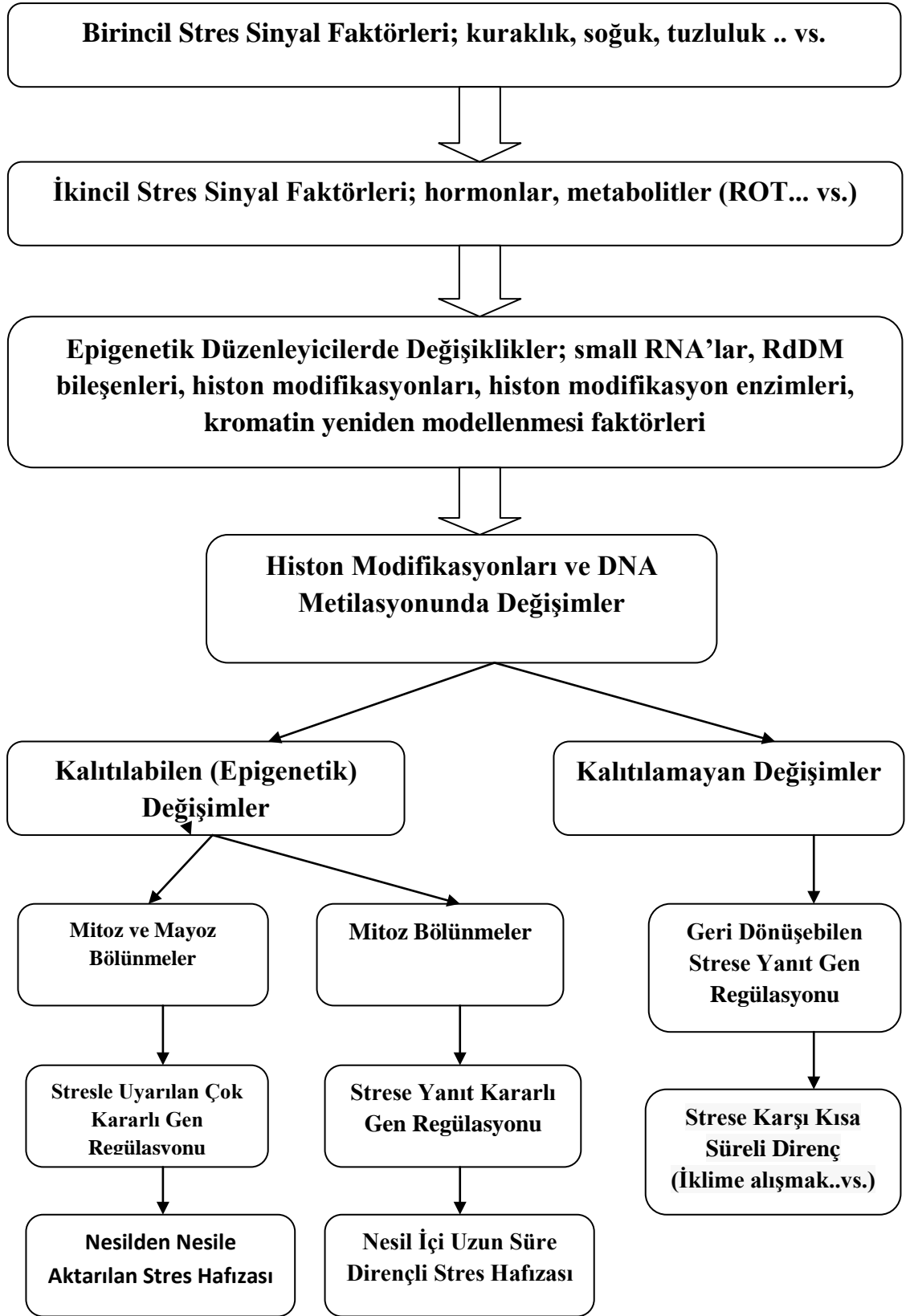
Kuraklık stresine karşı oluşan cevaplar, bitkinin türüne, yaşına, organ ve hücre tipine, kuraklık şiddeti ve uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Bray 1997). Strese yanıtta fosforilasyon derecesinde yanıt birkaç saniyede gerçekleşebilirken, gen ifadesinde meydana gelecek olan değişimler dakikalar veya saatler sürebilmektedir. Strese yanıtta yer alan genler iki tiptir. Bunlardan erken yanıt genleri, çok hızlı ve geçici indüklenmektedir, tüm sinyal bileşenleri önceden mevcut olduğu için indüklenmelerinde yeni protein sentezine gereksinim duymamaktadırlar. Geç yanıt

genleri ise strese karşı daha yavaş indüklenmektedir ve ifadeleri devamlı olan genlerdir (Zhu 2002).

Strese yanıtın ilk basamağı olan stresin algılanmasının ardından hücredeki su kaybı, hücresel sinyal iletim yolunu tetiklemektedir. Bu durum spesifik genlerin aktive edilmesine yol açmaktadır. Su kaybına karşı bitki yanıtının en önemli düzenleyicisi olan ABA, çevresel strese özellikle de kuraklığa maruz kalan bitkilerde köklerden transpirasyon ile bekçi hücrelerine taşınır ve buradaki hipotetik ABA reseptörüne bağlanarak stomaların kapanmasına neden olur (Hartung *et al.* 1998; Teiz 1998; Thompson *et al.* 2000). ABA, tohumlarda dormansiyi teşvik etmesinin yanısıra RNA, protein sentezi (Ananieva 1997) ve fide büyümesi üzerinde de engelleyici etki yapmaktadır (Khan 1968; Trewavas 1991; Munns *et al.* 1996). Kuraklık etkisi altında sentezlenen ABA, çeşitli genlerin indüklenmesini uyarmaktadır. Ayrıca, su stresi ile indüklenen birçok gen dışarıdan uygulanan ABA'ya yanıt vermemektedir. Bu bulgular, kuraklığın, başlangıç sinyali ve özel genlerin ifadesi arasında ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız olmak üzere iki yol ile varlığını göstermektedir (Shinozaki 1996).

Bitkinin sağlayacağı fizyolojik esneklik, gen ifadesindeki değişimlerin düzenlenmesiyle ve kısa sürede meydana gelen metabolik bileşimlerle sağlanabilmektedir (Shinozaki *et al.* 2003; Cook *et al.* 2004; Kaplan *et al.* 2004; Sung and Amasino 2004; Lee *et al.* 2005; Oono *et al.* 2006). Bu durum genetik bilginin değişmesi anlamına gelmemekle birlikte, epigenetik düzenleme aracılığıyla gen havuzunun ifadesindeki değişimler ile yeni büyüme şartları için adaptasyonu ve stres şartlarında hayatta kalabilmeyi sağlamaktadır (Graf *et al.* 2013).

Strese toleransın epigenetiksel düzenlenmesinde, birincil stres sinyal faktörleri Şekil 2.2'de görüldüğü üzere ikincil stres sinyal etmenlerini oluşturmaktadır, bu sinyal faktörlerinin epigenetik düzenleyicilerin etkinliğine ya da gen ifadesinde değişimlere yol açması ile geçici kromatin modifikasyonları hafıza oluşturmeyen strese yanıt oluştururken, kalıtılan epigenetik modifikasyonlar ise nesiller arası stres hafıza oluşturmaktadır (Chinnusamy and Zhu 2009).

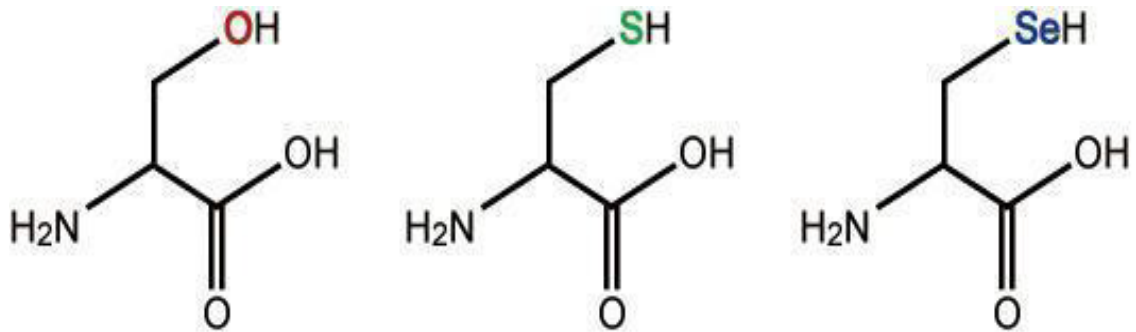


Şekil 2.2. Stres toleransının epigenetiksel düzenlenmesi (Chinnusamy and Zhu 2009)

## 2.2. Selenyum

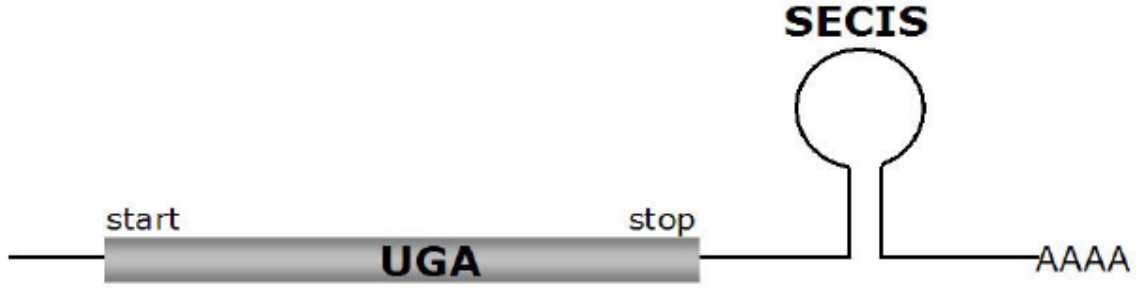
Selenyum 1817 yılında kimyager Swedish ve Jöns Jakob Berzelius tarafından keşfedilmiştir (Kim 2003; Kieliszek 2013). Selenyum, atom numarası 34, atom ağırlığı 78,96 g olan ve Se simgesiyle ifade edilen 6A grubu bir elementtir.

Selenyumun en önemli biyolojik önemi birçok enzim ve proteinin aktif alanlarında bulunmasıyla ilişkilidir. Atom çekirdeği kükürttten ( $S^{+2}$ ) büyük olan selenyum, kimyasal özellikleri açısından kükürtle benzerlik göstermektedir, bu benzerliği nedeni ile proteinlerin yapısına katılmaktadır ve hayati öneme sahip işlevsel ve yapısal proteinlerin üç boyutlu yapılarında farklılıklara neden olabilmektedir (Terry 2000). Serin aminoasitinin selenyum içeren türevlerine selenosistein (SeCys) denilmektedir. Şekil 2.3'te görüldüğü gibi SeCys, kükürt atomunun yerini alan bir Se atomu sayesinde sisteine benzer yapıya sahiptir.



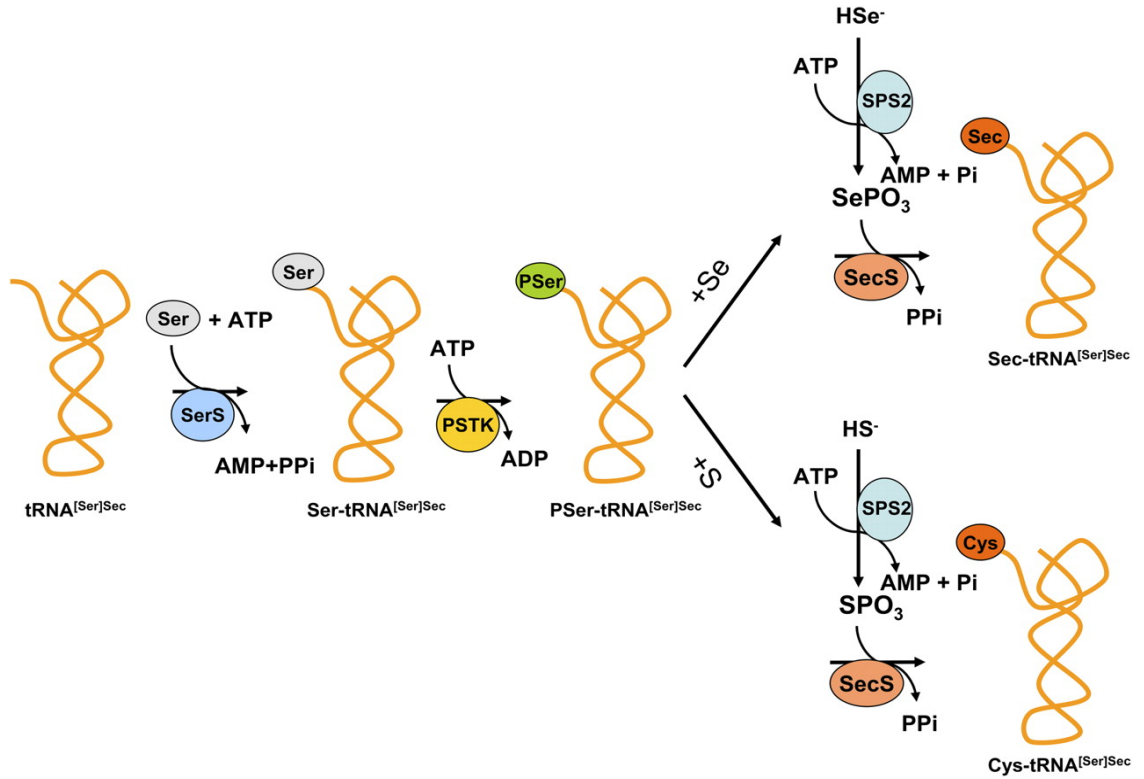
**Şekil 2.3.** a-serin (Ser), b-sistein (Cys), c-selenosistein (Sec)

Şekil 2.5'te gösterildiği gibi selenosistein biyosentez yolunda, translasyonda durdurucu kodon olan UGA ile baz eşleşmesi yapan özel tRNA molekülü seril-tRNA sentetaz tarafından serin yüklenerek serin enzimatik olarak selenosisteine dönüştürülmektedir.



**Şekil 2.4.** Ökaryotik selenoprotein mRNA, **SECIS** (SEleno Cysteine Insertion Sequence) (Castellano 2008)

UGA normalde durdurucu (stop) kodon olmasına rağmen UGA'nın selenosistein için kullanıldığı proteinlerin mRNA'sı farklıdır. Şekil 2.4 'te gösterilen mRNA molekülünde yer alan sap ve ilmek yapısındaki diziler (SECIS-SElenoCysteine Insertion Sequence), selenosisteinin polipeptit zincire katılacağı UGA kodonunu işaret etmektedir (Squires and Berry 2008; Çakır 2011).



**Şekil 2.5.** Selenosistein biyosentez yolu; SPS2, selenofosfat sentaz; PSTK, fosforil-tRNA kinaz (Anton *et al.* 2011)

Bir veya birden daha çok selenosistein içeren proteinlere selenoproteinler adı verilir. İlk selenoprotein 1973 yılında keşfedilmiştir. Bunlar, *Clostridium sticlandii* bakteri hücresinde glisin redüktaz ve *Clostridium thermoaceticum* bakteri hücresinde format dehidrogenaz'dır (Rayman 2000). Selenyum, insanlar ve hayvanlar için temel bir bileşendir (Schrauzer 2003; Wasowicz *et al.* 2003; Zhan 2011; Hoefig 2011; Liu *et al.* 2011) ve maya hücrelerinde 12, insanlarda ise yaygın olarak bulunan 25 selenoproteinde yer almaktadır (Letavayova 2008; Rosen and Liu 2009; Lenz 2009; Fairweather-Tait *et al.* 2010).

Bir selenoprotein, Se-Cys aminoasit rezidüsü içermektedir. Selenoprotein P, plazmada bulunan en yaygın selenoproteindir (Berry 2002). İnsanda, 10 Se-Cys rezidüsü içerir ve bunlar da 2 domaine ayrılır. Uzun bir N- terminal domain 1 SeCys ve kısa C-terminal domain 9 SeCys içermektedir. Uzun N-terminal domainin enzimatik domain olarak davrandığı görülmektedir. Aksine, kısa C-terminal domain, vücutta yüksek reaktif Se atomunun taşınmasında bir mekanizma sağlamaktadır.

Glutasyon peroksidaz, tioredoksin redüktaz gibi bazı enzimlerde, bazı hidrojenaz enzimlerde ve diğer birçok proteinde bulunan selenoproteinlerin çeşitli fonksiyonları belirlenmiştir; selenyum taşıyan selenoprotein P, antioksidan/redoks özellikte glutasyon peroksidaz (GPx), tioredoksin redüktaz (TRs) ve anti-inflamatori özellikte olan selenoprotein S (SeIS) bunlara örnektir (Ferguson 2012). Selenoproteinler, endoplazmik retikulum içinde protein katlanması kontrolü, tiroid hormonu olgunlaşması, serbest radikal indirgenmesi gibi birçok hücrel metabolik süreçte önemli rol oynamaktadır (Çakır 2011).

Moleküler ağırlığı 85 kDa olan GPx (selenoperoksidaz), Flohé *et al.* (1973) tarafından izole edilmiştir. Peptit zincirinde SelCys formunda selenyum, GPx aktif alanları olarak belirlenmiştir (Kim 2003; Wang *et al.* 2007). GPx, aktif alanlarında SelCys içeren enzim olması nedeni ile bu süreçteki rolü (vitamin E) tokoferole benzemektedir. Beş farklı insan GPx enzimi, organik (ROOH) ve inorganik (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peroksitleri azaltabilen enzim ailesini oluşturmaktadır (Berry *et al.* 1991; Combs *et al.* 2001; Encinar *et al.*

2003; Zeng and Combs 2008). GPx'in hücre zarı lipid peroksidasyonuna karşı temel koruyucu rolü vardır ve hidrojen peroksit degradasyonunda anahtar enzimlerden biri olarak dikkate alınmaktadır (Kim 2003; Wang *et al.* 2007). Fizyolojik şartlarda SelCys (pK<sup>-5</sup>) tamamen ayrışmakta olup hidroperoksitleri alkole ayrıştırmaktadır (Kieliszek and Blazejak 2013).

Thioredoksin redüktaz (TRxR), Tamura ve Stadtman tarafından tanımlanan selenyum bağımlı flavoproteindir (Tamura and Stadtman 1996). Okside thioredoksini azaltmaktadır. Thioredoksinler, thioredoksin peroksidaz ve ribonükleotid redüktazın bulunduğu indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimler için güçlü elektron vericisidir. Thioredoksin, hidroperoksit indirgenmesini katalizleyen bir enzim, apoptosis inhibitörü, büyüme faktörü olarak etkinlik göstermektedir. Ayrıca TRxR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipid peroksit, vitamin K, okside glutasyon gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikleri indirgemektedir (Kieliszek and Blazejak 2013).

Bitkilerde, üç tip thioredoksin bulunmaktadır. Bunlardan biri fotosentetik etkinliğiyle kloroplastlarda diğer ikisi endoplazmik retikulum ve sitosolde yer almaktadır (Marcus *et al.* 1991). NADP/thioredoksin sistem, intramoleküler disülfid bağları içeren buğday amilaz/tripsin inhibitörleri, buğday depo proteinleri; glutenin, gliadinler, soya fasulyesi tripsin inhibitörleri gibi proteinleri indirgemektedir (Kobrehel *et al.* 1991,1992). Hem kalsiyum hem de thioredoksin bağımlı serin proteaz, gliadinlerin ve gliadinlerin indirgenen formlarının degradasyonunu katalizlemektedir (Besse *et al.* 1996).

Thioredoksin, *Arabidopsis*'te cis-acting promotor element olan TEF-1 kutusunun organizasyonuna katılan enzimlerin inhibitörlerini indirgemektedir (Curie *et al.* 1991). TEF-1 kutusu, glutasyon S-transferaz gibi oksidatif strese karşı koruyucu sürece katılan diğer bitki genlerinde olduğu gibi tütünde ve pirinçte thioredoksin kodlayan genlerin promotorlerinde yer almaktadır (Regad *et al.* 1995).

Selenyumun biyo yararlılığı, hangi formda olduğuna bağlıdır. Selenit (IV), selenat(VI), selenometionin (SelMet), SelCys ve selenyum bileşiklerinin amino grupları en iyi

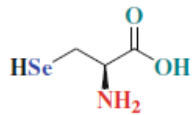


asimilasyonu göstermektedir. Selenyumun inorganik formu olan selenit (+4) ve selenat (+6) bitkiler tarafından topraktan emilir ve organik formu olan SelMet ve SelCys'e dönüştürülür (Bitterli *et al.* 2010). Her birinin biyolojik etkileri ve toksisiteleri farklıdır (Hoefig 2011). Diğer formları, hayvansal ürünlerde baskın olarak yer alır ki insanlar selenyumun bu formlarını kullanırlar. İnsanda selenyum, proteinlere bağlanarak ve SelCys aminoasitlerine katılarak dönüşüm gerçekleştirir (Kieliszek and Blazzejak 2013).

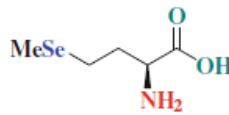
Canlılarda, selenyum bileşikleri iki yol ile metabolize olmaktadır (Fairweather-Tait *et al.* 2010). Birinci yol; metilasyon ile selenyumun indirgenmesidir. Selenat (+6), selenite (+4), selenyuma ( $\pm 0$ ) ve selenide (-2) indirgenebilir, selenat (+6), glutatyon varlığında selenite indirgenmektedir (Kieliszek and Blazzejak 2013).

Metillenmemiş selenyum, monometil, dimetil, trimetil formlarına dönüşebilir. Trimetil selenyum boşaltım yoluyla idrar ile atılabilmektedir. Selenyumun dimetil formu ise (DMeSe), trimetil (TMeSe)'den daha fazla oluştuğunda solunumla uzaklaştırılan ara üründür (Fairweather-Tait *et al.* 2010). MMeSe (monometil) formu, genellikle SelMet metabolizmasıyla atılmaktadır. Diğer selenyum bileşikleriyle karşılaştırıldığında DMeSe, TMeSe'den az tehlikeli olduğundan dolayı biyometilasyon süreci organizmayı detoksifikasyona yöneltmektedir (Pyrzynska 1996).

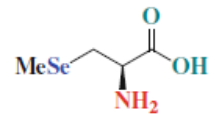
Doğada selenyum, hayvan ve insan sistemlerine selenit ve selenometionin olarak katılmaktadır (Naithani 2008; Kohrle and Gartner 2009). Selenit, bu sistemlerde yaygın olarak yer almaktadır (Suzuki 2008).



a) selenosistein



b) selenometiyonin



c) metilselenosistein

**Şekil 2.6.** Organo-selenyum bileşiklerinin kimyasal yapıları

Selenyumda etkin form, SelCys ve SelMet'in biyolojik kullanımı için metilselenoldür (Combs *et al.* 2001). Selenyumun organik ya da inorganik formu, aynı ara ürüne selenide dönüşmektedir. Hidrojen selenid, (Hücrede tüm selenyum formlarının dönüşümleri boyunca oluşan ara üründür.) selenoprotein sentezi için ya da metilasyon sürecinde metabolize olmak için kullanılabilir (Suzuki *et al.* 2006). SeMet sentezlendikten sonra, metil grubu eklenerek dimetil selenid'e (DMSe) dönüştürülebilir (Lewis *et al.* 1974). Bu bileşik selenyum biriktirmeyen bitkilerde en sık oluşan uçucu bileşiktir. Bitkiler ayrıca metilselenosisteini, gaz halindeki dimetildiselenide dönüştürebilir (Çakır 2011).

İkinci metabolik yolda ise selenyum, metiyonin ve sistein aminoasitlerinde sülfürle yer değiştirerek proteinlere bağlanmaktadır. Selenyum ve sülfürün antagonistik ilişkisi bir organizmada selenyum eksikliğini ve toksisitesini azaltabilmektedir (Kieliszek and Blazzejak 2013).

Selenyum bitkiler tarafından topraktan alınarak besin zincirine dahil olmaktadır. Yüksek selenyumlu topraklarda yetişen, selenyum biriktirmeyen bitkiler, yapraklarında 25 µg/g kuru ağırlığından daha az selenyum içermektedir (Bell *et al.* 1992). Selenyum miktarınca zengin topraklarda yetişen sınırlı sayıda özel tür ise yapraklarında yüksek oranda selenyum içerebilmektedir. Bu türler primer biriktiriciler ve sekonder biriktiriciler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Ayırıcı katsayısı, [DCi: Ayırım Katsayısı,  $DCi = \frac{(Se/S)_{bitki}}{(Se/S)_{agar \text{ veya } solusyon}}$  (Ellis and Salt 2003) ] 1'den büyük olanlar primer biriktiriciler, 1'den küçük olanlar ise sekonder biriktiricilerdir. Primer biriktiriciler grubunda Fabaceae üyelerinden çeşitli *Astragalus* türleri, *Stanleya pinnata* türü ve Brassicaceae üyeleri, sekonder biriktiriciler grubunda ise *Aster*, *Atriplex* ve *Melilotus* türleri yer almaktadır (Banuelos 1990; Guo and Wu 1998).

Çoğu bitki için fazla miktarda selenyum birikimi mümkün değildir. Konsantrasyon 100 µg/g'ı nadiren aşmaktadır. Ayrıca, bazı bitki türleri sarımsak (*Allium sativum*), hardal yaprakları (*Brassica juncea*), kolza (*B. Napus*) ve bazı mantarlar selenyum bağlayabilme özelliğiyle karakterize edilmektedir (Dumont *et al.* 2006). Biriken

selenyum miktarının, negatif sonuçlar olmaksızın 1000 µg/kg'ı aşabildiği de görülmüştür. Bu durum, SelCys ve SeMet formları aracılığıyla selenyumun hücreler arası konsantrasyonunda azalmaya neden olmaktadır (Navarro-Alarcon *et al.* 2008).

Selenyum, eksikliği ya da toksik miktarına göre karakterize edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yetişkinler için günlük diyetlerinde 30-40 µg selenyum önermekle birlikte 400 µg/d selenyum dozunun zararsız olduğunu vurgulamaktadır. Günlük 100 - 200 µg selenyum miktarı genetik hasarı önlediği bildirilmiştir (Kieliszek and Blazejak 2013). 400 µg/d 700 µg/d üzerindeki selenyum dozları ise toksik etki göstermektedir (Rayman and Rayman 2002; Tapiero *et al.* 2003; Perez-Coron *et al.* 2011). Ayrıca, aşırı selenyum miktarı, genom instabilitesine yol açan oksidatif zarara neden olabilmektedir (El-Bayoumy 2001).

Selenyum ve selenoproteinler ROT'ların biyolojik etkisini azaltan antioksidan etkiye sahiptir. Endojen oluşumlarına ek olarak, insan diyeti de hidrojen peroksidaz ve lipit peroksidazı kapsayan çeşitli prooksidanları içermektedir (Halliwell 2009; Philpott *et al.* 2009). Hava kirliliği, radyasyon, sigara dumanının da dahil olduğu çevresel birçok faktör aracılığıyla ROT'lara maruz kalındığında yüksek düzeyde ROT, hidroksil radikal (OH<sup>-</sup>) türlerle DNA'nın doğrudan oksidatif zararı ile kanser gelişimini arttırabilmektedir. Ayrıca, ROT'ların diğer etkileri de p53, hücre proliferasyonu ve yayılması üzerine etkileriyle kanser oluşumunda önemli olabildiği açığa çıkarılmıştır (Halliwell 2011). Oksidatif stres, kronik hastalıkları hazırlayan kronik inflamasyona yönlendirebilmektedir (Ferguson and Laing 2010; Ferguson 2010). Glutasyon peroksidazın, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi ROT'ların uzaklaştırıldığı reaksiyonları katalizleyebilme özelliği selenyumun ROT'ları yok edebilmesine dayalıdır.

Mitokondrial bağımlı yolda ROT oluşumuyla apoptosisin selenyum ile tetiklendiği düşünülmektedir (Rudolf *et al.* 2008; Xiang 2008). Rudolf *et al.* (2008), Hela Hep-2 hücre hattında kanser hücrelerinde sodyum selenit ile uyarılan hücre ölümü mekanizması üzerine yaptıkları araştırmada; 5 ve 50 µmol/L konsantrasyonda selenit, DNA sentezini zaman ve doza bağlı baskılama gerçekleştirmiştir ve histon H2a.X.

fosforilasyonu ile sonuçlanan DNA hasarını uyarır. DNA hasarı sonrasında selenit, tedavi edilen hücrelerde p21 birikimi ve fosforile edilen p53'ün varlığıyla kanıtlanmış, p53 bağımlı yolu aktive etmiştir. p38 ve p53 bağımlı yolun sinyal vermesi, Bax proteinin birikmesine neden olmaktadır ki bu etki p38 ve p53 özel inhibitörleri ile engellenebilmektedir. Hücre selenit tedavisinde mitokondri, dinamiklerini değiştirmektedir ve kaspaz bağımsız apoptosisi başlatmaktadır.

Rudolf *et al.* (2008), selenitin p53, p38 yolunun ROT ile aktivasyonu ile servikal kanser hücrelerinde kaspaz bağımsız apoptosisi uyardığını belirtmişlerdir.

Xiang *et al.* (2009) da, prostat kanser hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada, selenitin süperoksit radikal üretimi aracılığıyla kanser hücrelerinin ölümü ve apoptosisi uyardığını ve selenitle uyarılmış süperoksit üretimi, hücre ölümü ve apoptosisi bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD), CAT, GPX1 ile değil, manganazsüperoksit dismutaz (MnSOD) ekspresyonu ile inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, selenitin tedavi edici rolü, mitokondri membran potansiyelinde azalma, kaspaz Q ve 3'ün etkinliğinin ve sitosolde sitokrom C'nin açığa çıkması ile açıklanmaktadır.

Benzer olarak, Hu *et al.* (2006) LNCap hücre hattında apoptosiz üzerine sodyum selenitin etkisini araştırmaları sonucunda, selenitin p53 aktivasyonu ve süperoksit oluşumunu uyardığını belirtmişlerdir.

Selenyum, hepatit B ve C virüsleriyle enfekte olmuş insanlarda koruyucu etki göstermiştir. Son yıllardaki araştırmalarda, diyabetin önlenmesinde selenyum önemli rol oynamaktadır (Lenz 2009). Selenyum eksikliği sadece yetersiz beslenmenin değil aynı zamanda anormal selenyum taşıyımını ve genetik olarak dengesiz selenoprotein sentezinin sonucudur (Kieliszek and Blazejak 2013).

Yeni Zelanda'da yüksek düzeyde prostat kanser riski taşıyan bir grup üzerinde yapılan çalışmada, bu kişilerin serum selenyum seviyeleri, (serum selenyum seviyesi  $97,8 \pm 16,6$  mg/ml ve populasyonun yarısının bu değerin altında olduğu belirlenmiştir)

antioksidan enzim ve DNA hasarı ölçümleriyle ilişki göstermiştir (Karunasinqhe *et al.* 2009). Sonuçlardaki düşük selenyum seviyesi artan DNA hasarıyla ilişkilendirilmiştir ve populasyonun yarısında selenyum birikiminin, DNA hasarının yeterli onarımı için marjinal olduğu ve populasyona selenyum eklenmesinden yararlanabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Selenyumun bazı formlarının insan ve hayvan doku kültüründe eksojen kanserojenlerle kromozom kaybı ya da kazanımlarına karşı koruyucu özellikte olduğu gösterilmiştir. Ueda *et al.* (1997), Çin hamsteri V79 hücrelerini kullanarak dimetilarsinik asit (DMA) ile tetraploid etkileşimi üzerine ve DMA sitotoksitesisi üzerine farklı selenyum bileşiklerinin etkisini belirlemek için yaptıkları araştırmada; sodyum selenit ve trimetilselenonium iodid (TMSeI) olarak iki selenyum bileşeni test etmişler. TMSeI, selenit metabolizmasının ekstretuar ürünüdür. DMA'nın sitotoksitesisi, TMSeI'ninki kadar olmasına rağmen, sodyum selenitin sitotoksitesisi, TMSeI'den 1000 kat büyüktür. DMA uygulaması için mitotik indeks, Se bileşikleri ile düşük konsantrasyonlarda artış, yüksek konsantrasyonda ise azalış göstermiştir. DMA için tetraploid indeks, selenyum konsantrasyonu artıkça azalmıştır.

Yang *et al.* (2007), zengin selenyum ve selenit içeren bitkilerin (sarımsak, kırmızı ve yeşil kale, brokoli) mide kanseri üzerine koruyucu etkilerini belirledikleri araştırmada; selenyumun, bu bitkilerin tümünde selenitten daha düşük toksisite ile mide kanserinin önlenmesinde aynı yüksek etkiye sahip olduğunu belirtmişler.

Telomeraz, hücre ölümsüzlüğün önemli basamağıdır. Telomeraz, çoğu somatik hücrede saptanabilir olmasına rağmen insanda kanserin %85'i ve germ hücre hattında çok aktiftir. Bu nedenle, telomerazın antikanser ajanı için seçici hedef potansiyali olduğu düşünülmektedir. Diammineplatinum ile selenit birleşimi potansiyel antikanser ilacıdır. İlacın 5-30 mM dozu, tümör örneklerinden türevlendirilen endometrial kanser hücreleri DNA'sında oluşan doza bağlı hasarı indüklemiştir ve elde edilen sonuçlara göre, bu bileşik endometrial kanser hücrelerinde telomeraz etkisini inhibe etmiştir (Blasiak 2002).

Yu *et al.* (2009), 2,5; 5; 10  $\mu\text{mol/kg}$  konsantrasyonlarda selenyum kullanılarak fare hepatositlerinde, selenyum ile uyarılan telomeraz revers transkriptaz (TERT) ekspresyonunu ve telomeraz etkinliğinin araştırılması üzerine yaptıkları araştırmada; selenyumun kullanılan dozlarında doza bağlı apoptosisi uyardığı ve uygulanan 10  $\mu\text{mol/kg}$  dozda p53 mRNA ifadesini artırmış olduğu belirtilmiştir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal**

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen Ekmeklik Kırık buğday çeşidi kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar**

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır:

Otoklav (Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00)

Santrifüj (Hettich, GERMANY, EBA-20)

PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)

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)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Otomatik Pipetler (Eppendorf, GERMANY)

Spektrofotometre (Cecil, CE 5502)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

Derin Dondurucu (Nuarie, U.S.A. , -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)

Hassas Terazi (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE, MD 592)

Kar makinesi (Scotsman, U.S.A. , AH 19828 5)

Bitki büyütme kabini (Heracaus, Vötsch, No: 440/0026/86)

### 3.1.3. Çözelti ve solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıdaki gibidir:

#### 3.1.3.a. Polietilenglikol (PEG 6000) çözeltileri

Osmotik potansiyeller PEG 6000 kullanılarak sağlanmıştır.

%0	1000 ml MS
%50	50 g/lt PEG
%100	100 g/lt PEG
%150	150 g/lt PEG

#### 3.1.3.b. Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se stok çözeltisi

100 ml'lik 1mM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se hazırlamak için 0, 019 g. Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se tartılarak 100 ml saf suya eklenmiştir. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklanmıştır.

#### 3.1.3.c. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

##### DNA ekstraksiyon tamponu:

100mM	Tris-HCl	(pH 8.0)
50mM	EDTA	(pH 8.0)
500mM	NaCl	
%2	SDS	(w/v)



%2  $\beta$ -mercaptoethanol (v/v)

%1 PVP (w/v)

**CTAB/NaCl:**

%10 CTAB ( Setil trimetil amonyum bromür)

0,7 M NaCl

**Fenol: Kloroform: İzoamil alkol:**

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

**Kloroform: İzoamil alkol:**

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

**TE tamponu:**

10mM Tris-HCl (pH 8,0)

1mM EDTA (pH 8,0)

**%70'lik Etil Alkol:**

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

**3.1.3.d. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler**

**Ethidium Bromür Çözeltisi:** 500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300  $\mu$ l ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

**0,5X TBE tamponu:** Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak satın alınmış ve 0,5 birim 10X TBE tampon +9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

**Primerlerin Hazırlanması:** Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Doku kültürü**

#### **3.2.1.a. Tohum sterilizasyonu**

*Triticum aestivum* yüzey sterilizasyonu için tohumlar %70'lik etil alkolde 3 dakika çalkalanmıştır, steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Sonra %100'lük Sodyum hipoklorit (NaOCl)'de 15 dakika tutulmuştur ve steril saf su ile 3 kez yıkanmasının ardından 3 saat oda sıcaklığında steril su içerisinde bekletilmiştir.

#### **3.2.1.b. Besiyeri ve Kültürleme Koşulları**

Bitki materyali olarak Ekmeklik Kırık çeşidinin tohumlarından elde edilen embriyolar, doku kültürü koşullarında PEG 6000 ile oluşturulan 4 farklı osmotik potansiyelde (%0, %5, %10, %15) ve Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se'ün 4 farklı (0, 2, 4 ve 6 µM) konsantrasyonunu içeren MS ortamında 16:8 saat ışık: karanlık fotoperyotta 22±1°C'de 14 gün süre ile kültüre alınmıştır.

Doku kültürü için kullanılan MS (Murashige ve Skoog,1962) temelli besiyerlerinin içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir. 4.3 g'lık MS tuzları 900'er ml distile su kullanılarak tamamen çözündürüldükten sonra bu çözeltilere 30 g sakkaroz ilave edilmiş ve distile

su ile hacim 950 ml'e tamamlanmıştır. Çözeltilerin pH'ları 0.1 ve 1 N NaOH ile pH metre yardımıyla 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. Kültür ortamında jel yapıcı madde olarak phytigel (%0,2) kullanılmıştır.

Hazırlanan katı besiyerleri otoklavda (121°C, 1.2 atmosfer basınçta, 20 dakika) steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri çözeltileri 60-65°C'e kadar soğutulmuştur ve 0.22 µm por açıklığına sahip Millipore (Millex-GS) filtre ile steril edilmiş olan MS vitamin (Sigma M-3900) stok solüsyonundan (1000x), 10 ml'lik (9 ml saf su+ 1ml MS vitamin) 1 ml olacak şekilde solüsyon eklenmiştir.

**Çizelge 3.1.** *Triticum aestivum* doku kültürü için kullanılan MS temelli besiyerlerinin kimyasal içeriği (besiyerlerinin pH'ları 5.8'dir)

<b>KİMYASAL BİLEŞİMİ</b>	<b>Miktarı (mg/l)</b>
<b>Makro elementler</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub>	332,2
MgSO <sub>4</sub>	180,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Mikro elementler</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,26
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Vitaminler</b>	
Glisin	2
<i>Myo</i> -inositol	100
Nikotonik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Tiamin-HCl	0,1

### 3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü olarak Nardemir (2012) esas alınmış ve birkaç maddesinde değişikliğe gidilmiştir.

- a. Önceden sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınan bitki materyali üzerine 1000µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiştir ve alt üst ederek karıştırılmıştır ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda 10–60 dk. bekletilmiştir.
- b. 12000 g ve 4°C'de 10 dk. santrifüjlenip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- c. 1000µl Fenol: Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst ederek karıştırılmıştır. 12000 g ve 4°C'de 5 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- d. Üst faza 1/10 hacim CTAB/NaCl çözeltisinden eklenmiştir ve alt üst ederek karıştırılmıştır.
- e. 1000µl Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12000 g ve 4°C'de 5 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- f. DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenerek –20°C'de 10 dk. bekletilmiştir.
- g. 12000 g ve 4°C'de 10 dk. santrifüjlenip üst faz atılmıştır.
- h. Pelet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- i. Yıkanan pelet bir gece bekletilerek kurutulmuştur.
- j. Kurutulan DNA 100µl TE tamponunda çözülmüştür.
- k. Kullanılincaya kadar –20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA 250 kat (3µl DNA+747µl TE tamponu) seyreltilerek spektrofotometrede 260nm ve 280nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri okunmuştur. OD (okuma değeri) 260/280 değeri 1,1–1,8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme katsayısı) x OD<sub>260</sub> (260nm'de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA

miktarı hesaplanmıştır. Stok DNA'dan 50ng/μl DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

### 3.2.3. RAPD

#### 3.2.3.a. RAPD primerleri

Çalışmada 14 RAPD primeri (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** RAPD primerleri

Primerin Adı	Baz Dizilimi 5' → 3'
OPA_4	AATCGGGCTG
OPA_12	TCGGCGATAG
OPH_19	CTGACCAGCC
OPB_10	CTGCTGGGAC
OPY_1	GTGGCATCTC
OPY_7	AGAGCCGTCA
OPY_13	GGGTCTCGGT
OPW_4	CAGAAGCGGA
OPW_6	AGGCCCGATG
OPW_13	CACAGCGACA
OPW_18	TTCAGGGCAC
OPY_11	AGACGATGGG
OPY_15	AGTCGCCCTT
OPY_8	AGGCAGAGCA

### 3.2.3.b. PCR protokolü

PCR işlemi için şu protokol izlenmiştir; 0,2 ml'lik tüpe 3µl 10X PCR tamponu, 1,8µl BSA (10mg/ml), 1,2µl dNTP (10mM), 1,2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 3µl DNA (100ng/µl), 1,2µl primer (5µM), 0,4µl 5Unit/µl *Taq* DNA polimeraz (Sigma, D6677) ve 17,4µl saf su ilave edilerek hacim 30µl'ye tamamlanmıştır.

Yukarıda verilen standart değerlere göre her bir örnekten izole edilen genomik DNA ve Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilen RAPD primerleri ile her bir birey için ayrı PCR tüpü hazırlanmıştır.

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

1) PCR aleti otomatik olarak 5 dakika 94°C tutmuş,

2) 4 döngü olacak şekilde sırasıyla,

a. 1 dakika 30 saniye 94°C

b. 1 dakika 30 saniye 37°C

c. 3 dakika 72°C'de tutmuş,

3) 41 döngü olacak şekilde sırasıyla,

a. 1 dakika 94°C

b. 1 dakika 36°C

c. 1 dakika 42°C

d. 3 dakika 72°C'de tutmuş,

4) Son olarak 7 dakika 72°C tutarak süreç tamamlanmıştır.

5) PCR aletinden çıkarılan örnekler 4°C'de saklanmıştır.

### 3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

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

a. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1.5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.

b. Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5X TBE+agaroz çözeltisi içerisine 0,5µg/ml olacak miktarda Et-Br eklenmiştir.

c. Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.

d. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3µl bromfenol mavisi + 7µl PCR ürünü) yüklenmiştir.

e. Elektrik akımı verilerek 70V–150 dk. süre ile PCR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. İki saat sonunda elektrik akımı kesilmiştir.

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

### 3.2.5. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (%GTS) belirlenmesi

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol RAPD profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar temin edilecek olan agaroz jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Genomik kalıp sabitliliği (%) her bir primer ürünü için Ateizar (1999)'a göre  $100 - (100 - a/n)$  formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki  $a$  her bir uygulama örneği için tespit edilen RAPD polimorfik profillerini,  $n$  ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bantı sayısını göstermektedir. Uygulama gruplarına ait RAPD

profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bandın ortaya çıkması veya mevcut bir bandın kaybolmasını kapsamıştır.

### 3.2.6. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion-random amplification)

#### 3.2.6.a. DNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

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

#### 3.2.6.b. CRED-RA primerleri

Çizelge 3.3'de CRED-RA primerleri ve baz dizilimleri verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** CRED-RA primerleri

Primer Adı	Baz Dizilimi (5'→3')
OPA_4	AATCGGGCTG
OPB_10	CTGCTGGGAC
OPW_18	TTCAGGGCAC
OPY_1	GTGGCATCTC
OPW_4	CAGAAGCGGA
OPW_13	CACAGCGACA



### **3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi ve istatiksels analizi**

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

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. RAPD Analizleri ve Genomik Kalıp Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%)

Selenyum ve PEG 6000 konsantrasyonları *Triticum aestivum* cv. Kırık çeşidine uygulanarak buğday genomu üzerindeki genetiksel etkilerini test etmek için hesaplanan GTS değerleri için toplam 32 RAPD primeri denenmiş ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren 14 primer seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Kuraklık dozuna bağlı olarak GTS oranında azalma ve polimorfizm oranında artış tespit edilmiştir. Fakat kuraklıkla beraber selenyumun üç dozu (2, 4, 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ ) uygulandığında ilk iki dozun kuraklık stresinin oluşturduğu polimorfizmi azalttığı ve GTS oranını artırırken son doz selenyum uygulamasının ise GTS oranını düşürdüğü ve polimorfizm ise artırdığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere; PEG 6000 uygulamaları arasında en yüksek GTS oranı %5’lik PEG 6000 dozunda belirlenmiştir, en düşük GTS oranı ise %15’lik PEG 6000 dozunda %41,2 olarak belirlenmiştir. Kuraklık dozları ile selenyum uygulanmasının sonucu olarak; ilk iki selenyum dozunda (2, 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ ) en yüksek GTS oranı %57.2 ve 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$  uygulanması sonucunda en düşük GTS oranı %32.3 olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** RAPD profillerinde değişen bantların moleküler ağırlıkları (bp) ve genomik kalıp sabitliği (GTS) (+: varolan / -: kaybolan)

Primers	Control	+/-	%0 PEG				%5 PEG				%10 PEG				%15 PEG			
			2	4	6		0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
OPW_13	4	+	-	-	-	-	849;541	-	707	953;553	798;455	-	553	849	-	849;441	849;468	
		-	4272	4272	4272	4272; 638	4272;638	4272	638	-	-	4272; 638	4272; 638	4272; 638	4272; 638	638	-	
OPW_18	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OPA_4	6	+	-	679	714	-	445	-	1000;419	1176	1055; 428	-	706	697	-	1000;419	1055;601	
		-	-	1362	801	801	-	801	1362;801	801	1362; 801	1362; 801	801	1362; 801	1362; 801	1362;801	1362;801	
OPA_12	2	+	-	-	734	734	591	734	500	636	546	591	734	514	620	522	-	
		-	-	-	958	958	958	958;698	958	958	-	-	958	958	958;698	958	958	958;698
OPY_11	5	+	-	-	705	1093	-	655	-	1093	-	-	-	-	908	-	-	
		-	1281; 860	1281; 860	1281;860; 0;500	-	1281;860	500	-	-	860	1281	1281; 860; 158;162	1281; 860;500; 162;158	1281; 1058; 860	1281;860; 1062;158	1281;860	
OPY_13	3	+	457;961; 463	463	463	-	-	-	896	518	-	-	-	890	476	-	-	
		-	-	-	-	-	-	-	1334	-	-	-	1334;1014; 14;788	1014	-	-	1334;1014; 78	

Çizelge 4.1 (devam)

		+	719	2297; 719	10000; 2385; 783	10000; 2276; 818; 1195	10000	2408; 10000	10000; 965	10000; 750	10000; 2728; 855	-	855	10000; 2857; 855	719	10000; 2891;892	2432;719
OPY_7	7	-	591; 1195; 3334; 1320; 8219; 4911	591; 8219	591; 8219	4911; 8219	8219	591; 8219	4911; 2759; 1195;595	4911; 591	1195; 855;591	8219;9 91;119 5	1195; 591	8219; 4911; 591	591	8219;591	
OPH_19	3	+	3027	-	-	-	3000	-	3012; 2147	3019	3012	3012	-	2401	-	2299	2548
		-	1340	2340	-	-	-	-	1340	-	-	-	1340	1340	1340	1340	1340
OPY_1	5	+	-	2380	2438	-	2552	2715	2608	2715	-	-	-	1417	2000	-	
		-	1487	-	-	1162	1162	-	1162	1162	1362; 1162	1162	1362; 1486; 1487; 1162; 1537	1162	1362	1537; 1162	1362;1486; 1487;1162; 1537
OPY_8	8	+	910	-	1532	950	1038;849	1538	-	896	1511; 881	832	881	-	1227; 793	-	700
		-	4391; 3789	1365; 3789; 4391	4391; 3789; 500	4391; 3789; 500	4391; 3789;500	3789; 500; 1038	4391; 3789; 500; 1038	4391; 3789;500	4391; 3789	4391; 3789;50	4391; 3789;1 365	4391; 3789; 1038; 772	4391; 3789; 500	4391; 3789;500; 1038	4391;3789; 500;1038; 1365;1641; 1457;2383
OPY_15	2	+	898;726	730	730	1808; 871;717	1768	730	2815;17 28	927	1788; 699	907;717	730	755	927	1728;704	1808;768
		-	-	-	-	-	-	-	-	1616	-	-	-	-	1616	-	-

**Çizelge 4.1 (devam)**

OPW_6	5	+	558	-	-	2086	-	-	-	515	-	-	1638; 583	465	-	-	-
		-	-	968	604	604	-	-	604	839	988;839; 788;604-	988;839; 788;604	-	604	988; 604	-	-
OPW_4	3	+	-	780	-	-	-	-	-	1561	1253	-	-	-	-	-	-
		-	2726; 1923	1923	1923	1923	2726	1923	2726	1923	2726	1923	2726; 1923	2726; 1923-	1923; 2726	2726	2726;1923
OPB_10	3	+	1447; 1324	1427; 1295	1479; 1243	1324	1418; 1324; 1130	1472; 1353; 1152-	1402; 465; 1387; 1173; 10000; 700	1257	1227; 1152-	1472; 1243	-	1056	-	1295; 1056	-
		-	-	-	-	297	-	-	-	1476;297	-	-	1500; 1453; 297	297	297	-	1500; 1453;297
<b>GTS %</b>	<b>4</b>		<b>54,1</b>	<b>65,5</b>	<b>65,5</b>	<b>56,9</b>	<b>57,2</b>	<b>57,2</b>	<b>39,2</b>	<b>48,4</b>	<b>48,9</b>	<b>55</b>	<b>36,7</b>	<b>41,2</b>	<b>43,1</b>	<b>44,8</b>	<b>32,3</b>

#### 4.2. CRED-RA Analizleri ve %Polimorfizm

PEG 6000 ve selenyum konsantrasyonları buğday genomu üzerindeki epigenetiksel etkilerini test etmek için CRED-RA yöntemi için 14 primer denenmiş ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren sırasıyla 6 primer seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Her doz için %polimorfizm değerleri hesaplanmış ve ortalamaları alınmıştır. Bu oranlar üzerine kuraklık ve selenyum uygulamalarının tek başlarına ve birlikte uygulanmasıyla DNA metilasyonunun meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2'de gösterildiği üzere; uygulanan PEG 6000 dozları ile kontrol kıyaslandığında DNA metilasyon artışı gözlenirken, PEG 6000 dozları arasında (%5, %10, %15) kıyaslama yapıldığında en yüksek polimorfizm yüzdesi %5'lik PEG 6000 uygulaması sonucu %59,2 olarak belirlenmiştir. PEG 6000 dozu artıkça (%15) polimorfizm yüzdesinin azalarak %52,2 olduğu görülmüştür. Se ve PEG 6000'in birlikte uygulanması sonucu ise en düşük polimorfizm yüzdesinin %15'lik PEG 6000 ile 6µM selenyumun uygulandığı dozlarda %28 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** CRED-RA -% polimorfizm

Primers	PEG	0 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$		2 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$		4 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$		6 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$	
		H	M	H	M	H	M	H	M
OPW_13	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	25	100	50	100	0	100	25	100
	10	50	0	25	50	25	100	25	50
	15	50	100	25	100	25	100	25	50
OPA_4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0	50	0	0	50	50	0	50
	10	100	50	100	0	0	14,2	50	50
	15	33,3	28,5	40	0	0	25	20	42,8
OPW_18	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	28,50	50	42,8	50	0	16,6	0	0
	10	42,8	83,3	57,1	33,3	14,2	16,6	57,1	50
	15	28,5	16,6	28,5	16,6	14,2	16,6	0	16,6
OPY_1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	50	100	50	50	50	100	50	100
	10	100	100	50	100	50	100	50	0
	15	50	100	50	0	50	100	50	0
OPW_4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	100	37,5	100	25	33,3	25	0	25
	10	66,6	37,5	66,6	50	66,6	37,5	66,6	37,5
	15	16,6	50	50	50	50	25	16,6	50
OPB_10	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	10	18,1	40	27,2	50	18,1	40	18,1
	10	30	18,1	20	45,4	0	18,1	20	18,1
	15	20	18,1	10	18,1	0	9	0	9
ORTALAMA	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	35,5	59,2	47,1	42	30,5	51,6	10,8	48,85
	10	64,9	48	53,14	46,4	25,9	47,7	36,4	34,2
	15	33	52,2	33,9	30,7	23,2	46	10,2	28

**Çizelge 4.3.** MspI toplam bant sayısı

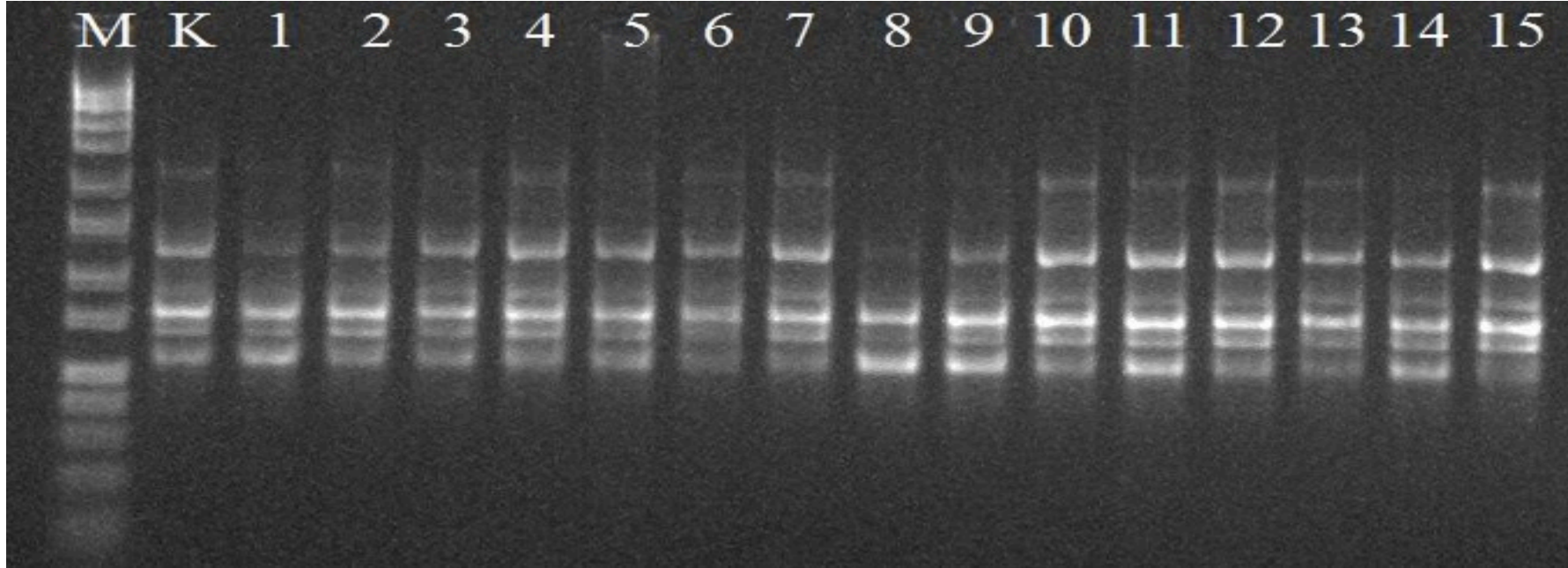
	%0 PEG				%5 PEG				%10 PEG				%15 PEG			
	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM
Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Se	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM
OPW_13	2	3	2	4	4	3	4	4	2	3	4	3	4	4	4	3
OPA_4	2	3	2	4	3	2	3	3	3	5	4	3	4	3	4	5
OPW_18	6	9	8	9	9	9	6	6	11	8	9	9	7	7	6	7
OPY_1	2	4	4	4	4	4	4	5	6	4	4	2	4	2	4	2
OPW_4	8	12	10	8	11	10	10	10	11	12	10	11	12	12	10	12
OPB_10	11	13	13	12	13	11	12	13	14	15	12	13	13	13	16	12
ORTALAMA	5,1	7,3	6,5	6,8	7,6	6,5	6,5	6,8	7,8	7,8	7,1	6,8	7,3	7,3	7,3	6,8



**Çizelge 4.4.** Toplam polimorfik bant sayısı

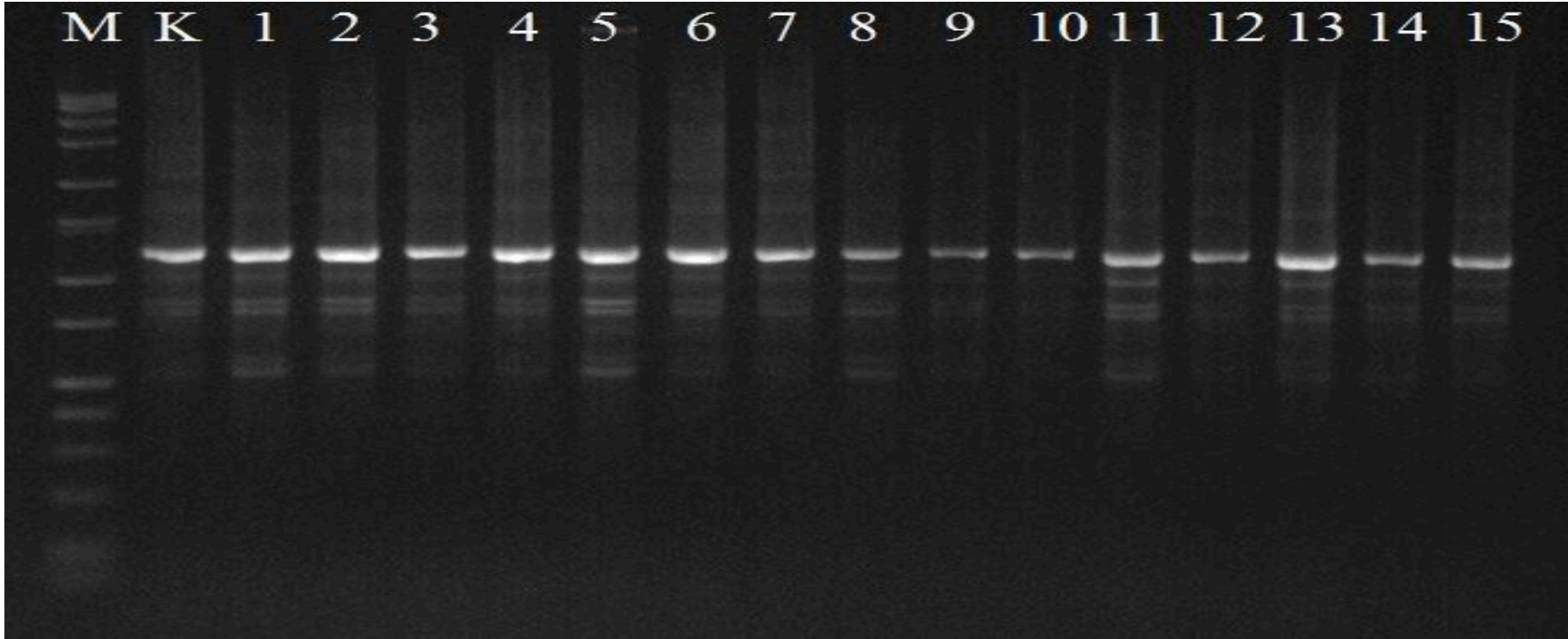
	%0 PEG				%5 PEG				%10 PEG				%15 PEG			
	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM
<b>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se</b>	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM	0	2µM	4µM	6µM
OPW_13	-	1	0	2	2	1	2	2	0	1	2	1	2	2	2	1
OPA_4	-	1	0	2	1	0	1	1	1	3	2	1	3	1	2	3
OPW_18	-	3	2	3	3	3	1	0	5	2	1	3	1	1	1	1
OPY_1	-	2	2	2	2	2	3	3	4	2	2	0	2	0	4	0
OPW_4	-	4	2	0	3	2	2	2	3	4	2	3	4	4	3	4
OPB_10	-	2	2	1	2	0	2	2	2	5	1	2	2	2	5	1

#### 4.4. RAPD ve CRED-RA Jel Görüntüleri



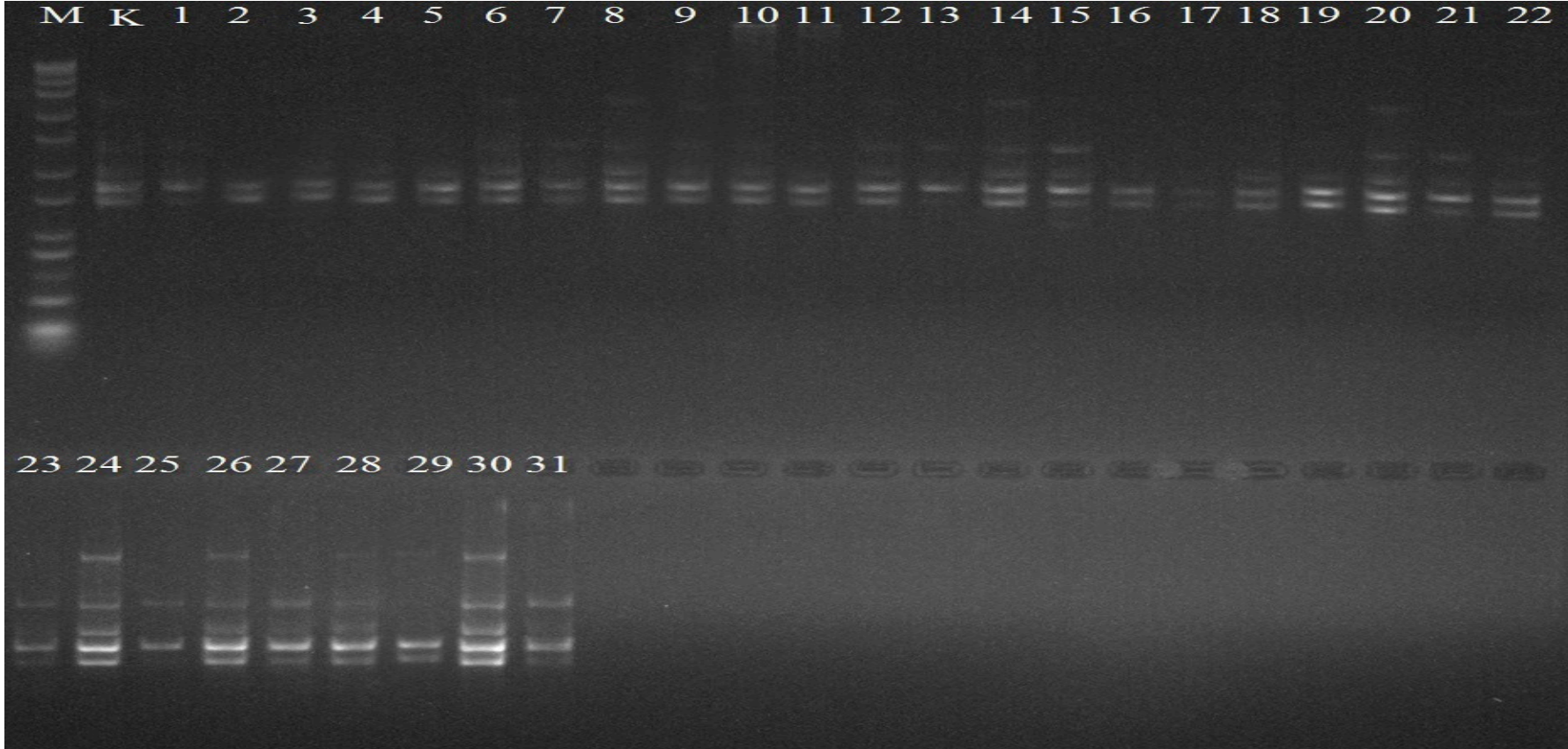
**Şekil 4.1.** OPW 13- RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

\*(**K** (Kontrol): 0 PEG 6000+ 0 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **1**: 2 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **2**: 4 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **3**: 6 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **4**:%5 PEG 6000, **5**: %5 PEG 6000+ 2 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **6**: %5 PEG 6000+ 4 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **7**: %5 PEG 6000+ 6μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **8**: %10 PEG 6000, **9**: %10 PEG 6000+2 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **10**: %10 PEG 6000+ 4 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **11**: %10 PEG 6000+ 6 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **12**: %15 PEG 6000, **13**: %15 PEG 6000+ 2 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **14**: %15 PEG 6000+ 4 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, **15**: %15 PEG 6000+ 6 μM Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se



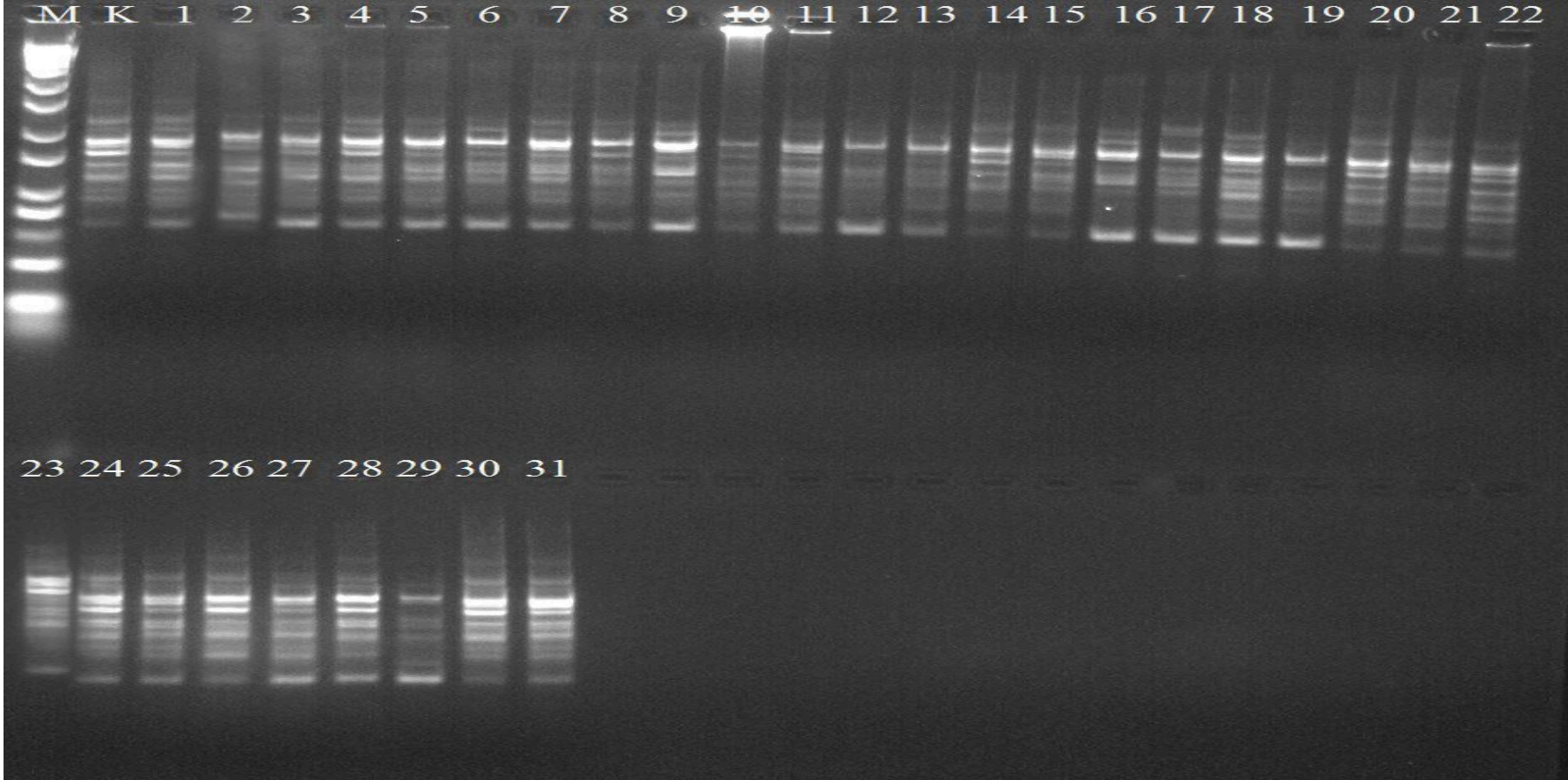
**Şekil 4.2.** OPW 6- RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

\*(**K** (Kontrol): 0 PEG 6000+ 0  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **1**: 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **2**: 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **3**: 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **4**:%5 PEG 6000, **5**: %5 PEG 6000+ 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **6**: %5 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **7**: %5 PEG 6000+ 6 $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **8**: %10 PEG 6000, **9**: %10 PEG 6000+2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **10**: %10 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **11**: %10 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **12**: %15 PEG 6000, **13**: %15 PEG 6000+ 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **14**: %15 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **15**: %15 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ )



**Şekil 4.3.** OPW 13- CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

\***(K (Kontrol):** 0 PEG 6000+ 0  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **1:** 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **2:** 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **3:** 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **4:** %5 PEG 6000, **5:** %5 PEG 6000+ 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **6:** %5 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **7:** %5 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **8:** %10 PEG 6000, **9:** %10 PEG 6000+2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **10:** %10 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **11:** %10 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **12:** %15 PEG 6000, **13:** %15 PEG 6000+ 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **14:** %15 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **15:** %15 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$



**Şekil 4.4.** OPB 10 -CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

\*(**K** (Kontrol): 0 PEG 6000+ 0  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **1**: 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **2**: 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **3**: 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **4**:%5 PEG 6000, **5**: %5 PEG 6000+ 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **6**: %5 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **7**: %5 PEG 6000+ 6 $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **8**: %10 PEG 6000, **9**: %10 PEG 6000+2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **10**: %10 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **11**: %10 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **12**: %15 PEG 6000, **13**: %15 PEG 6000+ 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **14**: %15 PEG 6000+ 4  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ , **15**: %15 PEG 6000+ 6  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler, hem tarımsal alanlarda hem de doğal koşullar altında çevresel strese maruz kalmaktadır. Çevresel etmenlerden hava sıcaklığı, birkaç dakikalığına stres oluştururken toprak su içeriği gibi diğer faktörlerin etkileri günlerce, toprak mineral eksikliği aylarca stres oluşturabilmektedir. Stres, bitki türlerinin yaşadığı iklim koşulları ve toprak yapısının sınırlandırılmasında önemli olmakla birlikte çevresel streslere adaptasyonun ve alışma mekanizmalarının altında yer alan fizyolojik işlemlerin anlaşılması yönüyle tarım açısından da önem taşımaktadır (Taiz 2008).

Çoğunlukla, bitki üzerinde olumsuz etki meydana getiren bir etken olarak tanımlanan stres, bitkinin hayatta kalabilirliğine, verimliliğine, büyüme (biyolojik kütle birikimi) ve özümleme işlemlerine ( $CO_2$  ve mineral alınımı) dayanılarak ölçülmektedir.

Bitkinin uygunsuz ortam koşulları ile başa çıkma potansiyeli olan stres toleransı, bitkinin strese önceden maruz kalması sonucu artmış ise bu durum bitki direncinin artmış olması olarak ifade edilirken, adaptasyon; genellikle pek çok nesil boyunca seçim sonrası kazanılmış genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyini belirlemektedir (Taiz 2008).

Çevresel strese adaptasyon ve alışma, fizyolojik, morfolojik, hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde birbirine bağlı olaylar sonucu oluşmaktadır. Hücre döngüsü ve bölünmesi, iç zar sistemi, vakuol oluşumu ve hücre çeper yapısındaki değişimler, strese karşı toleransı artıran hücresel düzeyde verilen yanıtlardır.

Bitkilerde, büyümeyi ve verimi etkileyen en yaygın çevresel streslerden biri olan kuraklık stresi, metabolik, mekanik ve oksidatif birçok değişikliğe neden olmaktadır. Kuraklık stresinin bitkideki etkileri, hücredeki su kaybıyla beraber membran yapısının değişikliğe uğramasında, gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen çökme ve yırtılmalarda, protein denatürasyonları ve enzim inhibisyonlarında, DNA ve

RNA gibi nükleik asitlerin degradasyonunda, ayrıca serbest radikaller aracılığıyla oksidatif etki oluşmasında görülmektedir (Kessler 1961; Bray 1997).

Kuraklık; stresin şiddetine, süresine, diğer stres türleri ile etkileşimlerine, strese maruz kalan bitkinin genotipine ve gelişim basamağına bağlı olarak, bitkilerde sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı indüklemektedir.

Bitki, kuraklık stresi altında hücre duvarı, protein ve klorofil sentezinde, çimlenmede, stoma açıklığında, CO<sub>2</sub> asimilasyonunda, solunumda azalışta, ABA sentezinde, prolin birikiminde artış göstererek fizyolojik yanıt vermektedir. Ayrıca makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, koruyucu moleküllerin sentezi, ROT oluşumu gerçekleştirerek moleküler yanıt mekanizması oluşturmaktadır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Kuraklık stresine karşı bitki yanıtının en önemli düzenleyicisi olan ABA, bitkilerde köklerden ksilem yolu ile bekçi hücrelerine taşınmaktadır ve buradaki hipotetik ABA reseptörüne bağlanarak stomaların kapanmasına neden olmaktadır.

Kuraklık şartları altında ABA etkisiyle stomaların kapanması, transpirasyon ile meydana gelecek olan su kaybını ve stomaların kapanmasıyla karbon metabolizmasını, elektron taşınım aktivitesini de engellenmektedir (Sreenivasulu vd 2000). Bitkiler su kaybını azaltmak için stomalarını kapatmakta, böylece CO<sub>2</sub> gazının girişi engellenmektedirler. Bunun sonucu olarak CO<sub>2</sub> fiksasyonu azalmaktadır. Karbondioksit fiksasyonunda kullanılmayan elektronların absorbe edilen ışık enerjisi O<sub>2</sub>'in aktivasyonunda, yani serbest radikallerin sentezlenmesinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Brugnoli and Lauteri 1991).

Bitkinin, stres koşullarına verdiği yanıtın en önemli ögesi genom bütünlüğünü korumasıdır. Stres koşulları, serbest radikal metabolizmasında doğrudan ya da dolaylı şekilde indüklenen değişimlerle ilişkili olarak bitki üzerinde genotoksik etki göstermektedir. Radyasyon, normalin üstünde oksijen basıncı, kimyasalların ve stres

şartlarının etkisiyle artarak oksidatif strese yol açan reaktif oksijen türevleri, hücrenin lipid, karbonhidrat, protein, enzim gibi yapılarına zarar vermesinin yanında 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 (Uysal 1998; Aksoy 2000; Onat vd 2002; Foyer and Noctor 2003; Gökbulut 2010).

Çalışmamızda ilk kez *in vitro* şartlarda PEG 6000 ile oluşturulan farklı kuraklık stresi dozlarının bitki genomunda meydana getirdiği genetik değişimler ve bu değişiklikler üzerine selenyumun etkisi RAPD analizleri kullanılarak belirlenmiştir.

Araştırmamız sonucu elde edilen RAPD analizlerine göre, PEG 6000 dozlarının artmasıyla RAPD bantlarında değişimin artışı ve GTS oranlarında azalma kuraklık stresi şartlarının DNA yapısında hasara yol açtığını göstermektedir. RAPD bantlarında belirlenen değişimler, kuraklık stresinin artan şiddetine bağlı olarak oluşan ROT artışıyla meydana gelen oksidatif stresin tetiklediği nokta mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlemeler, delesyon, insersiyon gibi genomik DNA hasarı oluştuğunu ortaya koymaktadır.

Kuraklık stresinin bitkiye verdiği zararın DNA, enzimler ve lipitlere etki eden ROT artışıyla yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Smirnoff 2000). Ayrıca, kuraklık stresinin, CAT ve POD etkinliğini, prolin miktarını ayrıca kök etkinliğini artırdığı, buğdayın gelişimini önemli derecede azalttığı (Xiaoqin *et al.* 2009), bitkide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimine yol açarak oksidatif strese neden olduğu ve kuraklık stresinin SOD aktivitesinde aşamalı artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Wang *et al.* 2011).

Kuraklıkla beraber selenyum uygulaması ise GTS değerlerini yükseltmektedir. Bu sonuçlar selenyumun iyileştirici özellikte olduğunun göstergesi olmakla birlikte kuraklık ortamına ilave edilen en yüksek selenyum dozuna karşı GTS değerlerindeki azalış ise selenyumun doza bağlı olarak toksik etkiye sahip olmasıyla ilişkilendirilebilir.



Selenyumun belirlenen iyileştirici etkisi endoplazmik retikulum içinde protein katlanması kontrolü, serbest radikal indirgenmesi gibi birçok hücrel metabolik süreçte doğal antioksidan olarak etki gösterdiği belirlenmiş olan selenoproteinlerin oluşması, metabolizmada metilasyon süreci sonucunda uçucu forma dönüşerek miktarının azalması ve negatif sonuçlar olmaksızın SelCys ve SeMet formları aracılığı ile hücreler arası konsantrasyonda azalmaya neden olmasıyla da açıklanabilir (Navarro-Alarcon *et al.* 2008).

Kükürte olan benzerliğinden dolayı, sülfürlü aminoasitler, glutatyon peroksidaz ve koenzim A gibi sülfidril gruplar içeren bileşiklerde kükürtün yerini alabilen selenyumun bir antioksidan olarak bitkideki rolü araştırılmış olmasına rağmen, kuraklık stresine maruz kalmış bitkide ASC-GSH döngüsündeki rolü henüz bilinmemektedir (Wang and Xu 2011).

ROT'ların temizlenmesinde, antioksidan savunma sistemleri ve enzimler görev yapmaktadır (Gong 2005; Mustafa 2005; Raza 2006; Gökbulut 2010). Buna ilaveten son yıllarda bazı araştırmalar işlevsel ve yapısal proteinlerin üç boyutlu yapısında değişikliğe sebep olan selenyumun da kuraklık, soğuk, UV-B, tuzluluk ve ışık stresi gibi çevresel stres faktörlerinin sebep olduğu aşırı ROT birikimi sonucu ortaya çıkan oksidatif strese karşı bitki toleransını artırdığını belirtmektedir (Vaalkama *et al.* 2003; Seppänen *et al.* 2005; Djanaguiraman *et al.* 2005).

Bitkilerde temel bir element olarak düşünülmemesine rağmen selenyum, düşük konsantrasyonlarda büyümeyi desteklemektedir (Xue and Hartikainen 1999, 2000, 2001; Agar vd 2013). Bunun yanı sıra selenyum uygulamaları sonucunda, organ ve dokularda lipid peroksidaz ve hidrojen peroksidaz 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, glutasyonu elektron donör olarak kullanması ile organik hidroperoksitleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indirgenmesini katalizlemektedir. Lipit peroksidasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Gajewska and Skłodowska 2007). Genç bitkilerde selenyumun antioksidan etkisinin GSH-Px ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Hartikainen *et al.* 2001).

Selenyum varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, APX ve CAT yerine GSH-Px ile yok edildiğini belirten araştırmalar da mevcuttur (Takeda *et al.* 1997). Hartikainen *et al.* (2000), çim tohumlarına farklı dozda selenyumun uygulamasının GSH-Px etkinliğini artırmış olduğunu belirlemiştirler. Selenyum uygulaması ile GSH-Px etkinliği, Cd stresinde kolza tohumlarında (Filek *et al.* 2008), tuzluluk ve kuraklık stresinde (Hasanuzzaman *et al.* 2011; Hasanuzzaman and Fujita 2011), Cd stresinde kırmızı alglerde ve soya fasulyesinde (Djanaguiraman *et al.* 2005), yüksek sıcaklık stresinde süpürge darısında (Djanaguiraman *et al.* 2010) araştırılmıştır. Selenyum varlığında enzim aktivitesindeki artışın oksidatif stresin etkisinin azalmasında eşsiz bir rol oynadığı belirtilmiştir (Fenga *et al.* 2013).

Bazı araştırmaların sonuçlarında, selenyumun serbest radikallerin direkt temizleyicisi olan glutasyon (GSH) etkinliğini artırdığı ve yüksek bitkilerde lipit 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 artışın antioksidan kapasiteyi ve stres şartlarındaki tohumlar için ekolojik adaptasyon sağlayan CAT, POD etkinliğinde, serbest prolin miktarında önemli artış sağladığını ve tohumlarda MDA miktarını azalttığını bildirmişlerdir.

Araştırma sonuçlarında, antioksidan enzimler üzerine (ASC-GSH) selenyumun etkisinden sorumlu fizyolojik mekanizmalar aydınlatılamamış olmasına rağmen, 5µM selenyum, lipid peroksidasyon azalması ve oksidoredüktazların etkinliği boyunca *T.repens*'de antioksidan yanıtı neden olduğu ve bunun nedeninin ise selenyumun sülfür

bileşiklerinde analog form oluşturması, proteinlerde Se-Se bağlarıyla S-S bağlarının yer değiştirmesi olabileceği belirtilmektedir (Brown 1982; Fu *et al.* 2002; Vaalkama *et al.* 2003).

Wang *et al.* (2011) kuraklık stresi altındaki bitkide selenyumun askorbat-glutasyon metabolizması üzerine etkisini belirledikleri araştırma sonuçları, oksiredüktaz sınıfı enzimlerin, antioksidan özelliğinden dolayı selenyuma çok duyarlı olabildiğini belirleyen diğer araştırmaları (Brown 1982; Fu *et al.* 2002; Vaalkama *et al.* 2003) destekler niteliktedir (Wang 2011).

Bitkilerde yapılan araştırmaların yanı sıra hayvan hücreleri üzerindeki araştırma sonuçları da tüm bilinen selenoproteinlerin üçte birinden fazlasının doğal antioksidan olduğunu göstermektedirler (Zhang 2011).

Rudolf *et al.* (2008), kanser hücrelerinde sodyum selenit ile uyarılan hücre ölümü mekanizması üzerine yaptıkları araştırmada, 5 ve 50 µmol/L konsantrasyonda selenitin, DNA hasarı sonrasında tedavi edilen hücrelerde p21 birikimi ve fosforile edilen p53 bağımlı yolu aktive ettiğini açıklamışlardır.

Klinik çalışmalar da selenyumun aynı zamanda prostatik kansere karşı koruyucu etkisinin temelde antioksidan etkisiyle ilişkili olduğunu göstermiş ve Neoplasmas'a karşı savunmada anti-serbest radikal mekanizmanın etkisinin yanı sıra doğal savunma hücrelerinin sitotoksik etkinliğinde bu elementin büyük etkisi olduğu belirtilmiş, ancak mekanizma tamamen açıklanamamıştır (Alaejos *et al.* 2000; Lenz 2009; Angstwurm 2007).

UV ile uyarılmış DNA hasarına karşı, 30 nM sodyum selenitin (düşük dozlarda) fare fibroblast kültür ortamında ve insan meme hücrelerinde, hücre hattını koruduğu, UV ile uyarılan gen mutasyonunun azalmasında etkili olduğu, antioksidan etkiye sahip olan GPx-1'in ifadesinin arttığı ve mikronukleus oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (Baliga 2007).

Oksiredüktaz sınıfı enzimler, elementlerin antioksidan özelliğinden dolayı selenyuma çok duyarlı olabilmektedirler. Selenyum, enzimlerde sülfürle yerdeğiştirdiğinde, onların biyolojik özellikleri ve yapılarında değişimlere yol açarak daha az stabil olan Se-Se bağlarıyla yerdeğiştiren S-S bağları oluşumuna neden olabilir (Brown 1982; Fu *et al.* 2002; Vaalkama *et al.* 2003). Ayrıca, Hartikainen *et al.* (2000), selenyumun antioksidan etkisinin, yalnızca belirlenen  $\alpha$ -tokoferol artışıyla değil enzim etkinliği artışıyla ilgili olduğunu belirlemiştirler.

Araştırma sonuçlarımıza göre selenyumun yüksek dozda toksik etkisi; selenyumun sülfidril gruplarını katalitik olarak oksitlemesine, selenyum aracılı tiyol oksidasyonun ROT üretebilmesine ve tiyollerin oksidasyonundan dolayı proteinlerin fonksiyon bozukluğuna yol açarak tiyol bulunan redoks sistemlerine ve proteinlerin redoks regülasyonlarına doğrudan saldırmasına, hücrede metabolize olan selenatın selenit formunda nükleer DNA ile bağlanarak zincir kırılmalarına neden olabilmesine bağlanabilir.

Bu sonuçlar, Xue and Hartikainen'in (2001) yüksek konsantrasyonda selenyumun bitkide büyüme gelişmeyi engellediğini ve 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 (Xue and Hartikainen 1999, 2000, 2001; El-Bayoumy 2001; Agar vd 2013).

Selenyumun, metabolize yolunda farklı değerlikli formlarına indirgenmesi, selenatın selenite dönüşüm sürecinde  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  birikimi ve selenitin elemental selenyuma (Se) indirgenirken glutatyon kullanması oksidatif stresi yönlendirmesinde etkili olmaktadır (Raspor 2003). Oksidatif stresin indüklenmesi, selenyum bileşiklerinin redoks etkinliğinde major sitotoksik yolağı olarak dikkate alınır. Ayrıca, selenyumun buradaki rolünün endojen tiyollerin oksidasyonu ile ilişkili olduğu (Painter 1941), benzer olarak, selenitin sülfidril gruplarını katalitik olarak oksitlediği belirtilmiştir (Tsen and Tappel 1958). Son yıllarda, selenyum aracılı tiyol oksidasyonun ROT üretebildiği öne

sürülmüştür (Seko *et al.* 1989; Kitahara *et al.* 1993; Spallholz 1994; Davis and Spallholz 1996; Spallholz *et al.* 2004; Chen *et al.* 2007; Plano *et al.* 2010).

Buna ilaveten, organo-monoselenidin, tiyol gruplarını okside eden selenoksidazlar oluşturacak olan monooksijenaz aracılığıyla tiyollerin selenooksidasyonuna sebep olabildiği rapor edilmiştir (Cristina and João 2011). Selenyum bileşikleri; tiyollerin oksidasyonundan dolayı proteinlerin fonksiyon bozukluğuna yol açarak tiyol bulunan redoks sistemlerine ve proteinlerin redoks regülasyonlarına doğrudan saldırmaktadırlar (Galluzzi *et al.* 2012).

Selenyum bileşiklerinin alt yapılarındaki değişimlere bağlı olarak hücredeki farklı intrasellüler bölgeleri hedeflediği düşünülmektedir. Selenit, nükleer DNA ile kıyaslandığında mitokondrial DNA'nın yoğunlaşmasını daha çok tetiklemektedir ve GS-Se-SG (selenodiglutatyon) nükleer DNA ile etkileşime girebilmektedir (Wallenberg *et al.* 2014). Bu etki daha sonra genomik DNA'da tek zincir kırılmalarına neden olmaktadır. DNA'ya bağlanmış selenyumun ölçümü hem selenitin hem de GS-Se-SG'nin geçen zamanla birlikte daha çok selenyumun DNA'ya bağlandığını göstermektedir. MMP'nin (mitokondrial membran potansiyali) ölçümü sonucunda, selenitin GS-Se-SG uygulamasıyla karşılaştırıldığında mitokondriyi daha erken etkilediği ve mitokondrinin daha fazla hipopolarize olmasını indüklediği gözlenmiştir (Vandenabeele *et al.* 2010; Christofferson *et al.* 2010). Hem selenit hem de GS-Se-SG selenide metabolize olurlar. Selenid ile kıyaslandığında aktive olmak için sadece tek bir elektrona ihtiyaç duyan GS-Se-SG daha güçlü bir oksidanttır (Björnstedt *et al.* 1992).

Bitkiler, strese karşı adaptasyon sürecini artırabilmek için antioksidan savunma sistemi dışında başka bir savunma sistemine ihtiyaç duymaktadır. Burada istenen fizyolojik esneklik, genetik bilgede değişimi ifade etmeyen fakat gen ifadesinde değişimleri belirten düzenlenmelerle gerçekleşebilmektedir. Antioksidan savunma sistemi dışında strese adaptasyon sağlamanın diğer yolu, ancak epigenetiksel düzenleme yoluyla gen havuzunun ifadesinde değişimler sağlayabilmektir (Grafi *et al.* 2013).

*Triticum aestivum* tohumlarından elde ettiğimiz embriyoların kullanıldığı doku kültürü koşullarında, kontrol ile kıyaslandığında PEG 6000 ile oluşturulan osmotik potansiyellerin her birinin DNA metilasyonunda artışa sebep olduğu, fakat PEG 6000 dozları kendi aralarında kıyaslandığında ise DNA metilasyonunda azalma olduğu belirlenmiştir. DNA metilasyonundaki azalış, dehidrasyon şartları altındaki buğdayda azalan siRNA miktarına bağlı olarak RNA yönlendirmeli DNA metilasyonunun azaltmasına bağlanabileceği gibi bazı stres şartlarının farklı miRNA'ların artışı ile DNA metilazların azalmasına neden olabilmesi, doku kültürü koşullarının da DNA metilasyon oranını azaltan diğer bir etken olabilmesi ayrıca bazı stres koşulları altında DNA metilasyon süreci sonucu artan transpozon etkinliği ile açıklanabilir.

Literatürde stres koşullarının, epigenetik mekanizmalarda değişimler meydana getirdiğini açıklayan araştırmalar mevcuttur.

Soğuk stresine maruz bırakılan mısır köklerinde hipometilasyonun meydana geldiği (Steward 2002), tütün bitkisinde alüminyum, tuz ve soğuk stresinin DNA demetilasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Choi and Sano 2007).

Osmotik stresin tütün bitkisinde iki heterokromatik alanda geçici DNA hipermetilasyonuna sebep olduğu (Kovarik *et al.* 1997), kuraklık stresinin ise, bezelyede DNA hipermetilasyonu ile sonuçlandığı yapılan araştırmaların arasında yer almaktadır (Labra *et al.* 2002). Ayrıca, DNA metilasyonu değişimlerinin kuraklık şartlarına adaptasyona yol açan stres yanıtında rol oynayan genlerin etkinliği ya da etkisizleştirilmesinde, dehidrasyon koşullarına yanıtta rol oynadığı belirtilmiştir (Wang 2011).

Abiyotik stresle düzenlenebilen endojen siRNAlar, histon modifikasyonlarına ve DNA metilasyonuna yol açabilmektedir. siRNA'lar RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) olarak bilinen siRNAlara komplementer DNA sekanslarının metilasyonunu yöneterek DNA metilasyonunu değiştirebilir ve miRNAlar da mRNA sekanslarının parçalanmasını sağlayabilir (Grafı *et al.* 2013). *Arabidopsis*'te floral epigenom,

transkriptom birleşmesi ve miRNA profilleri ile ilgili çalışmalar miRNA oluşumu için gen dizileri yeterliği ile DNA metilasyonu arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır (Lister 2008). Ayrıca, abiyotik stresin RdDM yolunu olumsuz yönde etkileyen genlerin ifadesini etkilediği belirlenmiştir (Chinnusamy and Zhu 2009).

Soğuk stresi altında, hücre duvarını koruyan ve lignin biyosentezinde görevli enzimi hedefleyen bazı miRNA genlerinin ekspresyonunda azalma görülmüştür (Zhang 2009).

Pirinçte kuraklık ve tuzluluk stresinin miRNA'ları uyardığı ve kuraklık stresiyle kök ve sürgünlerde iki dehidrasyon duyarlı element içeren miR169 ifadesinin artışı microarray analizleri ile belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2007).

Ayrıca, kuraklık stresinin; mısırdaki miR528, miR167 ve miR169 azalışına bağlı olarak, hedef genler (Bu genlerin ABA ile uyarılan stomal hareket ve antioksidan savunmaya katılmakta olan ABA duyarlı element içerdiği bilinmektedir.) olan MAPK (mitogen activated protein kinase), POD (peroksidaz), PLD (fosfolipaz D) ekspresyonlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Wei *et al.* 2009).

*Arabidopsis*'te miRNA393, miRNA397b ve miRNA402 genlerinin ifadesinin yüksek olduğu bitkiler yüksek tuzluluk, kuraklık soğuk stresine maruz bırakılmış, sonuç olarak DNA metilaz transkriptlerinde azalma görülmüştür. Bu da DNA metilazların azalan ifadesinde miRNA'ların rehber olduğunu düşündürmüştür (Kim 2010).

Ayrıca, sıcaklık, tuzluluk ve dehidrasyon şartlarının buğdayda siRNA miktarında azalma, soğuk stresi şartlarının ise siRNA ifadesinde artışı yol açtığı belirlenmiştir (Xiaoqin *et al.* 2009).

Ayrıca, strese yanıtta transpozon etkinliği transpozon lokuslarında DNA metilasyonundaki azalışla ilişkilidir. Çevresel faktörler DNA demetilasyonu boyunca transpozonları aktive edebilir. *Antirrhinum majus* (Aslanağzı) bitkisinde soğuk stresi,

hipometilasyonu ve Tam-3 transpozonun tranpozisyonunu indüklemiştir (Hashida *et al.* 2006).

Bitki doku kültürü koşullarının da metillenme düzeylerini sıklıkla etkilemekte olduğu (Brown *et al.* 1990; Kaeppler and Phillips 1993a,b) bilinmekle birlikte metillenme değişimleri, rejenere olan pirinç (Brown *et al.* 1990) ve mısır bitkilerinde gözlenmiştir ve bu değişimlerin birkaç nesil boyunca devam ettiği gösterilmiştir (Brown *et al.* 1991).

Doku kültüründe kullanılan hormon ve büyüme düzenleyicilerin metillenme düzeylerini etkilediği; 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) gibi oksinlerin metillenmeyi arttırdığı (LoSchiavo *et al.* 1989; Phillips *et al.* 1994) kinetin gibi sitokininlerin ise etkilemediği (LoSchiavo *et al.* 1989) belirlenmiştir (Temel 2011).

Kaeppler *et al.* 2000 araştırmalarına göre, sitozin metillenmelerinin, transpozon hareketleri ile doğrudan ilişkili olması nedeniyle (Chomet *et al.* 1987; Banks *et al.* 1988), doku kültüründe gerçekleşen metillenmedeki azalma transpozonların aktivitesini arttırabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Brettell and Dennis (1991) araştırmaları sonucunda, kültüre alınan bitkilerin, *Activator* elementinin inaktif formunu taşıdıklarını, kültürde rejenere olan bitkilerde metillenme düzeyinin azaldığını ve elementin aktif hale geçtiğini belirtmişlerdir.

Retrotranspozonları aktifleştirdiği düşünülen stres ve doku kültürünün (Wessler 1996; Grandbastien 1998) etkileri mısır (Peschke *et al.* 1987), pirinç (Hirochika *et al.* 1996) ve tütünde (Hirochika 1993; Takeda *et al.* 1998) araştırılmıştır.

Araştırmamız sonuçlarına göre, stres koşulları altında bitkiye uygulanan selenyumun, kuraklık stresinin ortaya çıkardığı metilasyon sonuçlarına karşı iyileştirici etki göstermesi, sitozine bağlanarak DNA metilasyonunu engellemesiyle ilgili olabileceği gibi SeMet metilasyonu sonucu uçucu selenyum formuyla bitkiden uzaklaşmış olabileceğiyle de açıklanabilir.



Filek (2008) sonuçlarına göre, yüksek konsantrasyonda kadmiyum iyonu, kanola tohumlarının özel lokuslarında demetilasyonu stimüle etmiştir ve selenyum eklenmesi ise hayvan hücrelerinde de görüldüğü gibi DNA demetilasyon sürecini önlemiştir. DNA metilasyonunun stabilizasyonunda selenyumun bu koruyucu rolü; metabolik süreçte aktif olan enzimlerden, kadmiyumun eliminasyonu ile ilişkilendirilerek kadmiyum eliminasyonu bu alanlarda kadmiyumun tekrar yer değiştirmesinden ve metalotioneinlerle selenyumun bağlanmasıyla açıklanmıştır. Ayrıca kadmiyum ve selenyum iyonlarının DNA sitozinine bağlanarak DNA metilasyonunu doğrudan değiştirmiş olması ve bitkiler tarafından üretilen oksijen türlerinin kaldırılması ile bağlantılı olabileceği belirtilmiştir (Skowierski *et al.* 1997; Filek 2008).

Ayrıca, hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda da selenyumun DNA metilasyonu değişimlerine sebep olduğunu kanıtlar niteliktedir. Selenitin prostat kanser hücrelerinde, histonları düzenleyebildiğini ve sessiz genleri tekrar etkinleştirebildiğini, kısmi promotor DNA demetilasyonu ve DNMT1'in mRNA seviyesinde azalışa sebep olduğunu, histon deasetilaz aktivitesinin ise H3-K9 metilasyonu seviyesinin azalmasına rağmen H3K9 asetilasyon miktarının artmasıyla ilişkili olarak azaldığını belirleyen araştırma göstermiştir ki; selenyum, metilasyon ile sessizleştirilen genleri etkinleştirmek için DNA histonları düzenleyebilmektedir (Xiang *et al.* 2008).

Selenyum eksikliğinde hem karaciğer hem de kolon mukozosundaki DNA'da p53 geninde metilasyon seviyesinde önemli artış gözlenmesine karşı, karaciğer genomik DNA'sında global metilasyonda önemli derecede azalma gözlenmiştir (Zeng *et al.* 2011).

Sonuç olarak bu çalışmada kuraklık stresinin epigenetiksel mekanizmalardan DNA hipermetilasyonu oluşturduğu ve kuraklık stresi için uygulanan dozlar kendi aralarında kıyaslandığında DNA metilasyonunda azalmaya yönelim meydana geldiği, selenyum dozlarının ise kuraklık stresinin neden olduğu DNA metilasyon oranını düşürdüğü belirlenmiştir.

## 5.1. Öneriler

Selenyum uygulaması ile biyotik ve abiyotik stresin bitkilerdeki olumsuz etkileri genetik ve epigenetik değişiklikler yoluyla giderilebilir. Fakat kuraklık stresi sonucu oluşan mutasyonun, ROT'lara veya retrotranspozonlara bağlı olarak mı meydana geldiğinin araştırılmasına, abiyotik stres altında ABA gen işleyişindeki rolü bilinmesine rağmen, gen ekspresyonuna bağlı olarak DNA hipo ve hipermetilasyonunda ABA'nın rolünün, siRNA ve miRNA miktarına bağlı olarak RdDM yolu ve DNA metilaz miktarındaki değişikliklerin, doku kültürü ve stres koşulları etkisiyle değişen transpozon hareketinden hangisinin etkili olduğunun araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Ayrıca selenyumun kuraklık stresinin meydana getirdiği bu etkilere karşı koruyucu rolünün antioksidan etki göstermesi ile açıklanmasına rağmen, toksik etkisini selenyumun sülfidril gruplarını katalitik olarak oksitlemesine, selenyum aracılı tiyol oksidasyonun ROT üretebilmesine ve tiyollerin oksidasyonundan dolayı proteinlerin fonksiyon bozukluğuna yol açarak tiyol bulunan redoks sistemlerine ve proteinlerin redoks regülasyonlarına doğrudan saldırmasına, hücrede metabolize olan selenatın selenit formunda nükleer DNA ile bağlanarak zincir kırılmalarına neden olarak gösterdiği bilinmekle birlikte bu mekanizmaların hangisinin etkili olduğunun araştırılmasına ihtiyaç vardır. DNA metilasyonundaki rolünün ise DNA'ya bağlanarak ya da metabolizmada metiltürevleri oluşumuna katılarak DNA metilasyonunu önlediği belirlenmesine rağmen bu mekanizmalardan hangisinin etkili olduğunun araştırılması gerekmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Agar, G., Alpsoy, L., Bozari, S., Aygun, F. E., Yildirim, N., 2013. Determination of protective role of selenium against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA damage. *Toxicol Ind Health*, 29(5), 396-403.
- Aksoy, M., 2000. Beslenme Biyokimyası, Ankara, Hatiboğlu Basın ve Yayın San.
- Alaejos, M.S., Diaz Romero, F.J., and Diaz Romero, C., 2000. Selenium and cancer: some nutritional aspects. *Nutrition*, 16(5), 376-83.
- Altıntaş, S., Hatipoğlu, R., Genç, İ., 2005. Donor bitkilerin yetiştirme koşulları ve anterlere farklı sürelerle soğuk uygulamasının ekmeklik buğdayda haploid bitki rejenerasyonuna etkileri üzerinde bir araştırma. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya.
- Ananieva, K.a.A., E.D., 1997. Comparative study of the effects of methyl jasmonate and abscisic acid on RNA and protein synthesis in excised cotyledons of *Cucurbita pepo* L. (Zucchini), *Bulg. J. Plant Physiol.*, 23(3-4), 80-90.
- Anathy, V., Aesif, S.W., Guala, A.S., 2009. Redox amplification of apoptosis by aspartate-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas. *J Cell Biol.*, 184, 241–52.
- Anathy, V., Roberson, E.C., Guala, A.S., 2012. Redox-based regulation of apoptosis: S-glutathionylation as a regulatory mechanism to control cell death. *Antioxid Redox Signal*, 16, 496–505.
- Angstwurm, M.W., 2007. Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med.*, 35(1), 118-26.
- Anton, A., Xu, T. X.M., Bradley, A., Carlson, M.H., Vadim, N., Dolph, L.H., 2011. Biosynthesis of Selenocysteine, the 21st Amino Acid in the Genetic Code, and a Novel Pathway for Cysteine Biosynthesis. *Adv. Nutr.*, 2, 122–128,
- Arora, A., Sairam R.K., Srivastava G.C., 2002. Oxidative Stress and Antioxidative Systems in Plants. *Curr. Sci.*, 82, 1227-1238.
- Asada, K., Takahashi, M., Photo-inhibition. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *J. Biol. Trace Elem.*, 70, 227-287.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*, *Mutat. Res.*, 552,125–140.
- Atlı, A., 1999. Kışlık Tahıl Üretim Bölgelerimizde Yetiştirilen Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Kaliteleri ve Kalitelerinin Stabilitesi Üzerine Araştırmalar. Türkiye Tahıl Simpozyumu, Bursa.
- Babu, C.R., Blum, A., Nguyen, H.T., 1999. Comparison of Measurement Methods of Osmotic Adjustment in Rice Cultivars. *Crop Sci.*, 39, 150-158.
- Baliga, M.S., 2007. Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biol Trace Elem Res.*, 115(3), 227-42.
- Banks, J.A., Masson, P., Federoff, N., 1988. Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize Suppressormutator transposable element, *Genes and Dev.*, 2, 1364-1380.

- Banuelos, M.D., 1990. Accumulation of selenium in plants grown on selenium-treated soil. *J Environ Qual.*, 19, 772-777.
- Bell, P.F., Page, A.L., 1992. Contrasting selenate sulfate interactions in selenium accumulating and nonaccumulating plant species. *Soil Sci Soc Am J.*, 56, 1818-1824.
- Berry, M.J., 2002. Selenocysteine insertion sequence element characterization and selenoprotein expression. *Methods Enzymol.*, 347, 17-24.
- Berry, M.J., Banu, L., Larsen, P.R., 1991. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*, 349(6308), 438-40.
- Bitterli, C., Banuelos, G.S., Schulin, R., 2010. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. *J Geochem Explo.*, 107, 206-16.
- Björnstedt, M., Kumar, S., Holmgren, A., 1992. Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem.*, 267, 8030-8034.
- Blasiak, J., 2002. Inhibition of telomerase activity in endometrial cancer cells by selenium-cisplatin conjugate despite suppression of its DNA-damaging activity by sodium ascorbate. *Teratog Carcinog Mutagen*, 22(1), 73-82.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot.*, 91, 179-94.
- Blum, A., 1986. Breeding Crop Varieties for Stress Environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199-237.
- Borsani, O., 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123(7), 1279-91.
- Bouyoucos, G.J., 1951. Recalibration of the Hydrometer for Marking Mechanical Analysis of Soil. *Argon, J.*, 43, 433-437.
- Boyko, A., and Kovalchuk, I., 2010. Transgenerational response to stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, 5(8), 995-8.
- Bray, E.A., 1997. Plant Responses to Water Deficit. *Trends Plant Sci.*, 2, 48-54.
- Brettell, R.I.S., Dennis, E.S., 1991, Reactivation of a silent Ac following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern, *Mol. Gen. Genet.*, 229, 365-372.
- Brettell, R.I.S., Dennis, E.S., Scowcroft, W.R., Peacock, W.J., 1986. Molecular analysis of a somaclonal variant of alcohol dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.*, 202, 335-344.
- Brigelius-Flohe, R., and Kipp, A., 2009. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.*, 1790(11), 1555-68.
- Brown TA., 1982. Selenium toxicity and tolerance in higher plants. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 57, 59-84.
- Brown, P.T.H., Kyojuka, J., Sukekiyo, Y., Kimura, Y., Shimamoto, K., Lorz, H., 1990. Molecular changes in protoplast-derived rice plants, *Mol. Gen. Genet.*, 223, 324-328.
- Brown, TA., 1982. Selenium toxicity and tolerance in higher plants. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 57, 59-84.
- Brugnoli, E., Lauteri, M., 1991. Effects of Salinity on Stomatal Conductance, Photosynthetic Capacity, and Carbon Isotope Discrimination of Salt-Tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and Salt-Sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 Non-Halophytes. *Plant Physiol.*, 95, 628-635.

- Büyük, İ., Soydam, S., Sümer, A., 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69, 97-100.
- Çakır, Ö., 2011. *Astragalus chrysochlorus*'da Selenyum Birikimine İlişkin Moleküler Çalışmalar in Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi. İstanbul.
- Campbell, M.K., 1991. *Biochemistry*, Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, Fort Worth, USA.
- Camporeale, G., 2007. K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells. *J Nutr Biochem.*, 18(11), 760-8.
- Castellano, S., Gladyshev, N.V., Guigó, R., Berry, J.M., 2008. SelenoDB 1.0: a database of selenoprotein genes, proteins and SECIS elements. *Nucleic Acids Research*, 1-7.
- Chen, B., *et al.*, 2011. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Lett.*, 309(1), 37-45.
- Chen, T., Wong, Y.S., 2010. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. *Int J Biochem Cell Biol.*, 41, 666-676.
- Chiba, S.Y.S., Yonekuva, K., Tanaka, S., Furuyama, H., Kubota, H., 2006. Auto antibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebro spinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.*, 241(1-2), 39-43.
- Chinnusamy, V., and Zhu, J.K., 2009. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Sci China C Life Sci.*, 52(4), 331-43.
- Chinnusamy, V., and Zhu, J.K., 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12(2), 133-9.
- 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.
- Chomet, P.S., Wessler, W., Dellaporta, S.L., 1987. Inactivation of the maize transposable element Activator (Ac) associated with DNA modification, *EMBO J.*, 6, 295-302.
- Christofferson, D.E., Yuan, J., 2010. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.*, 22, 263-8.
- Chu, J., Yao, X., Zhang, Z., 2010. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biol Trace Elem Res.*, 136(3), 355-63.
- Combs, G.F., Clark, L.C., Turnbull, B.W., 2001. An analysis of cancer prevention by selenium. *Biofactors*, 14(1-4), 153-9.
- Cook, D., 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci., U.S.A.*, 101(42), 15243-8.
- Cristina, W.N., João, B.T., 2011. Rocha Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol.*, 85, 1313-1359.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H., Scott, I. M., 1998. Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant. Physiol.*, 116, 1351-1357.

- Davis, R.L., Spallholz, J.E., 1996. Inhibition of selenite-catalyzed superoxide generation and formation of elemental selenium (Se degrees) by copper, zinc, and aurintricarboxylic acid (ATA). *Biochem Pharmacol.*, 51, 1015–1020.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V., Seppanen, M., 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol Biochem.*, 48(12), 999-1007.
- Djanaguiraman, M.D., Shanker, AK., 2005. Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil.*, 272, 77-86.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., and Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem.*, 385(7), 1304-23.
- Dündar, Y., Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, U. Ajans, 1.baskı, Ankara. 4-11.
- Dursun, N., 2011. Selenium-mediated cardioprotection against adriamycin-induced mitochondrial damage. *Drug Chem Toxicol.*, 34(2), 199-207.
- El-Bayoumy, K., 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res.*, 475(1-2), 123-39.
- Elkahoui, S., 2004. Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions. *Phytochemistry*, 65(13), 1911-7.
- Ellis, D.R. Salt, D.E., 2003. Plants, selenium and human health, *Current Opinion in plant Biology*, 6 (3), 273–279.
- Encinar, JR, S.-K.n.M., Polatajko, A., Vacchina, V., Szpunar, J., 2003. Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Anal Chim Acta.*, 500, 171–83.
- Erdei, S., Hegedüs, A., 2002. Heavy Metal Induced Physiological Changes In The Antioxidative Response System. *Acta Biologica Szegediensis*, 46, 89-90.
- Fairweather-Tait, S.J., Collings, R., Hurst, R., 2010. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr.*, 91(5), 1484-1491.
- Ferguson, L.R. 2012. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res.*, 733(1-2), 100-10.
- Ferguson, L.R., 2010. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res.*, 690(1-2), 3-11.
- Ferguson, L.R., and Laing, W.A., 2010. Chronic inflammation, mutation and human disease. *Mutat Res.*, 690(1-2), 1-2.
- Filek, M., 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol.*, 165(8), 833-44.
- Flohe, L., Gunzler, W.A., Schock, H.H., 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 32(1), 132-4.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.*, 119, 355-364.
- 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.
- 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., 2007. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals.*, 20, 27-36.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, 19, 107–20.
- Garcarrubio, A., Legaria, J.P. and Covarrubias, A.A., 2003. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta*, 2, 182-187.
- Gökbulut, T., 2010. Bazı Buğday Çeşitlerinde Selenyum Birikimi ve Selenyum Toksisitesinin Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Gomes-Junior, R.A., Gaziola, S.A., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2007. Selenium- induced oxidative stress in coffee. *Funct Plant Biol.*, 34, 449-456.
- Gong, H., 2005. Silicon Alleviates Oxidative Damage of Wheat Plants in pots under drought. *Plant Science*, 169, 313-321.
- Grafi Gideon, N.O., 2013. Epigenetic Memory and Control in Plants. New York, London.
- Grandbastien, M.A., 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions, *Trends Plant Sci.*, 3, 181-187.
- Guo, X., and Wu, L., 1998. Distribution of free seleno-amino acids in plant tissue of *Melilotus indica* L. grown in selenium-laden soils. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 39(3), 207-14.
- Halliwell, B., 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.*, 46(5), 531-42.
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.*, 32(3), 125-30.
- Halliwell, B., John, M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246(2), 501–514.
- Hanson, B., Lindblom, D., Loeffler, M. L., Pilon-Smits, E.A.H., 2004. Selenium protects plants from phloem-feeding aphids due to both deterrence and toxicity. *New Phytol.*, 162, 655–662.
- Hartikainen, H, X.T., Piironen, V., 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil*, 225, 193-200.
- 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.
- Hartikainen, H., Xue, T., 1999. The Promotive Effect of Selenium on Plant Growth as Triggered by Ultraviolet Irradiation.
- Hartikainen, H., Xue, T., 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing Lettuce. *Plant and Soil*, 237, 55–61.
- Hartung, W., Wilkinson, S., and Davies, W., 1998. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at guard cell. *J. Exp. Bot.*, 49, 361-367.
- Hashida, S.N., 2006. The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *Plant Cell*, 18(1), 104-18.

- 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.
- Hatfield, D., 1992. Selenocysteyl-tRNAs recognize UGA in *Beta vulgaris*, a higher plant, and in *Gliocladium virens*, a filamentous fungus. *Biochem Biophys Res Commun*, 184(1), 254-9.
- Hirochika, H., 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture, *EMBO J.*, 12, 2521-2528.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M., 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93. 7783-7788.
- 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.
- Hu, H., 2006. Inorganic selenium sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through superoxide/p53/Bax-mediated activation of mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther.*, 5(7), 1873-82.
- Iba, K., 2002. Acclimative responses to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 225-245.
- Kaçar, B., Öztürk, Ş., 2006. *Bitki Fizyolojisi*. Nobel yayın, Ankara.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y., 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, *Plant Mol. Biol.*, 43, 179-188.
- Kaeppler, S.M., Phillips, R.L., 1993a. DNA methylation and tissue culture induced variation in plants, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29, 125-130.
- Kaeppler, S.M., Phillips, R.L., 1993b. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8773-8776.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y., 2005. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri ve Dayanıklılık Mekanizmaları. *G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Derg.* 18(4), 723-740.
- Kaplan, F., 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 136(4), 4159-68.
- Karunasinghe, N., 2004. DNA stability and serum selenium levels in a high-risk group for prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 13(3), 391-7.
- Kessler, B., 1961. Nucleic acids as factors in drought resistance of higher plants. *Recent Advan. Bot.*, 1153-1159.
- Khan, A.A.a.D., 1968. Cytokinin reversal of abscisic acid inhibition of growth and  $\alpha$ -amylase synthesis in barley seed, *Plant Physiol.*, 21, 1301-1307.
- Kieliszek, M., and Blazejak, S., 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29(5), 713-8.
- Kieliszek, M., Stanis, B., 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation *Nutrition*, 29, 713-718.
- Kim, E.H., Sohn, S., Kwon, H.J., Kim, S., Kim, M.J., Lee, S.J., Choi, K.S., 2007. Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Can Res.*, 67, 6314-6324.



- Kim, J.M., 2008. Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 49(10), 1580-8.
- Kim, J.Y., 2010. MicroRNA402 affects seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions via targeting DEMETER-LIKE Protein3 mRNA. *Plant Cell Physiol.*, 51(6), 1079-83.
- Kim, YY, M.D., 2003. Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian Aust. J Anim Sci.*, 16, 435-444.
- Kitahara, J., Seko, Y., Imura, N., 1993.. Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol.*, 67, 497–501.
- Kohrle, J., Gartner, R., 2009. Selenium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 23(6), 815-27.
- Kong, L.G., Wang, M., and Bi, D.L, 2005. Selenium Modulates the Activities of Antioxidant Enzymes, Osmotic Homeostasis and Promotes the Growth of Sorrel Seedlings under Salt Stress. *Plant Growth Regul.*, 45, 155–163.
- Kovarik, A, K.B., Bezdek, M., Opatrn, Z., 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theor Appl Genet.*, 95, 301-306.
- Kün, E., 1983. Serin İklim Tahılları. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayını, Ankara.
- Labra, M, G.A., Citterio, S., Sgorbati, S., Sala, F., Vannini, C., Ruffini-Castiglione, M., Bracale, M., 2002. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biol.*, 4, 694–699.
- Lauteri, M., Brugnoli, E., 1991. Effects of Salinity on Stomatal Conductance, Photosynthetic Capacity, and Carbon Isotope Discrimination of Salt-Tolerant (*Gossypium hirsutum*L.) and Salt-Sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C<sub>3</sub> Non-Halophytes. *Plant Physiology*, 95(2), 628-635.
- Lee, B.H., Henderson,D.A., Zhu, J.K., 2005.The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17(11), 3155-75.
- Lenz, M, L.P., 2009. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. . *Sci Total Environ.*, 1, 3620-33.
- Letavayova, L., 2008. Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.*, 638 (1-2), 1-10.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York. 1.
- Lewis, B.G., Johnson, C.M., Broyer, T.C., 1974. Volatile selenium in higherplants – production of dimethyl selenide in cabbage leaves by enzymatic cleavage of S-methyl selenomethionine selenonium salt. *Plant Soil.*, 40, 107–118.
- Liang, YC, Z.J., Li, ZJ., 2008. Role of silicon in enhancing resistance to freezing stress in two contrasting winter wheat cultivars. *Environ Exper Bot.*, 64, 286-294.
- Lister, R., 2008. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133(3), 523-36.
- Liu, K.Z.Y., Chen, F., Gu, Z., Bu, G., 2011. Enhanced glutathione peroxidases (GPx) activity in young barley seedlings enriched with selenium. *Afr J Biotechnol.*, 10, 11483–7.
- Liu, YY, L.J., Chen, L., 2006. Effects of low temperature stress on peroxidation product of membrane lipids and activity of related enzymes in wheat seedling leaves. *J.Triticeae Crops*, 26, 70-73.

- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M., 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs, *Theor. Appl. Genet.*, 77, 325-331.
- Lynnette, R., Ferguson, N., Shuotun, Z., Alice, H.W., 2012. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutation Research*, 733, 100–110.
- Marita, W., Sougat, M., Agata, M., Cristina, Mç, Mikael, Bç, Valentina, G., Aristi, P., 2014. Selenium induces a multi-targeted cell death process in addition to ROS formation. *J. Cell. Mol. Med.*, 18(4), 671-684.
- Mishra, V, S.G., Prasad, SM., 2009. Antioxidant response of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seedlings to interactive effect of dimethoate and UV-B irradiation. *Sci Hort.*, 120, 373-378.
- Muller, M., 2010. Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. *Genes Nutr.*, 5(4), 297-307.
- Munns, R., Cramer, R., , 1996. Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid? . *Plant and Soil*, 185, 33-49.
- Naithani, R., 2008. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. *Mini Rev Med Chem.*, 8(7), 657-68.
- Nakamuro, K., Okuno, T.H.T., 2000. Metabolism of selenoamino acids and contribution of selenium methylation to their toxicity, *J. Health Sci.*, 46, 418–421.
- Nathan, D., 2006. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.*, 20(8), 966-76.
- 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.
- Nowak, J, K.K., Ligocki, M., 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol Biochem.*, 36, 1553–1558.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., 2002. *İnsan Biyokimyası*, Ankara, Palme Yayıncılık.
- Oono, Y., 2006. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics*, 6(3), 212-34.
- Painter E.P., 1941. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem Rev.*, 28, 179–213.
- Perez-Corona, MT., Valderrama, MJ., Rodriguez, ME., Camara, C., Madrid. Y., 2011. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: laboratory-scale experiments. *Food Chem.*, 124, 1050-5.
- Peschke, V.M., Phillips, R.L., Gengenbach, B.G., 1987. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science*, 238, 804-807.
- Philpott, M., Lim, C.C., Ferguson, L.R., 2009. Dietary protection against free radicals: a case for multiple testing to establish structure-activity relationships for antioxidant potential of anthocyanic plant species. *Int J Mol Sci.*, 10(3), 1081-103.
- Plano, D., Baquedano, Y., Ibanez, E., Jimenez, I., Palop, J.A., Spallholz, J.E., Sanmartin, C., 2010. Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound. *Molecules*, 15, 7292–7312.

- Pyrzynska, K., 1996. Speciation analysis of some organic selenium compounds. A review. *Analyst.*, 121,77–83.
- Raspor, P., Fujs, S., Banzky, L., Maraz, A., Batic, M., 2003. The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 63 (1), 89–95.
- Ravoori, S., Srinivasan, C., Pereg, D., Robertson, L.W., Ayotte, P., Gupta, R.C., 2010. Protective effects of selenium against DNA adduct formation in Inuit environmentally exposed to PCBs. *Environ. Int.*, 36, 980–986.
- Rayman, M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356 (9225), 233-41.
- Rayman, M.P., and Rayman, M.P., 2002. The argument for increasing selenium intake. *Proc Nutr Soc.*, 61(2), 203-15.
- Raza, H.S., 2006. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 368-376.
- Rosen, B.P., Liu, Z., 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ Int.*, 35(3), 512-5.
- Rudolf, E., Rudolf, K., and Cervinka, M., 2008. Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol.*, 24(2), 123-41.
- Saradhi, PP, A.S., Prasad, KV., 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 209, 1–5.
- Schrauzer, G.N., 2003. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Adv Food Nutr Res.*, 47, 73-112.
- Schutzendubel, A., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol.*, 127(3), 887-98.
- Seko, Y., Saito, Y., Kitahara, J., Imura, N., 1989. Selenium in biology and medicine. In: Wendel A (ed) Springer, Berlin, 70–73.
- Seppänen, M., Hartikainen H., 2003. Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Sci.*, 165, 311-319.
- Shen, .CL., Song, W., Pence, B.C., 2001. Interactions of selenium compounds with other antioxidants in DNA damage and apoptosis in human normal keratinocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 10, 385–390.
- Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki,M., 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol.*, 6(5), 410-7.
- Shinozaki, K.a.Y.-S.K., 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol*, 7, 161-167.
- Shpiler, L., Blum, A., 1986. Heat tolerance for yield and its components in different wheat cultivars. *Euphytica*, 51, 257-263.
- Skowerski, M, K.J., Czechowicz, K., Głowacka, M., 1997. Effects of interaction between cadmium and selenium on hepatic metabolism in mice. *Med Sci Monit*, 3, 642–7.

- Smirnoff, N, C.Q., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057-60.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.*, 3(3), 229-35.
- Smith, JL, B.D., Bannister, P., 2000. Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B-absorbing compounds as indicators of plant's sensitivity to UV-B radiation. *Ann Bot.*, 86, 1057-1063.
- Sokol, A, K.A., Jerzmanowski, A., Prymakowska-Bosak, M., 2007. Up-regulation of stressinducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta*. 227, 245-254.
- Spallholz, J.E., 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Rad Biol Med.*, 17,45–64.
- Spallholz, J.E., Palace, V.P., Reid, T.W., 2004. Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. *Biochem Pharmacol.*, 67,547–554.
- Squires, J.E.,and Berry, M.J., 2008. Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. *IUBMB Life*, 60(4), 232-5.
- Sreenivasulu, N., Grimm B., Wobus, U., Weschke, W., 2000. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum*, 109 (4),435–442.
- Steward, N., 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J Biol Chem.*, 277(40), 37741-6.
- Sung, S., and Amasino, R.M., 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol.*, 7(1), 4-10.
- Süzer, S., 1992. Buğday Tarımında Yüksek Verim Almanın Yolları. *Marmara'da Tarım Dergisi*, 51, 5-7.
- Suzuki, KT, Ogawa, S., Suzuki, N., 2006. Metabolic transformation of methylseleninic acid through key selenium intermediate selenide. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 215, 189-97.
- Suzuki, T., 2008. Deletion of the selenocysteine tRNA gene in macrophages and liver results in compensatory gene induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *J Biol Chem.*, 283(4), 2021-30.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H., Hirochika, H., 1998. Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon Tto1 by wounding and methyl jasmonate, *Plant Mol. Biol.*, 36, 365-376.
- Tamura, T., Stadtman, T.C., 1996. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93(3), 1006-11.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., and Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother*, 57(3-4), 34-44.
- Taspinar, M.S., Agar, G., Yildirim, N., Sunar, S., Aksakal, O., Bozari, S., 2009. Evaluation of selenium effect on cadmium genotoxicity in *Vicia faba* using RAPD. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(3-4), 857-860.

- Teiz, L.a.Z., 1998. University of California, Los Angles Sinauer Associates,Inc., Publisher. Plant Physiology,726-735.
- Temel, A., 2011. Arpa Doku Kùltürlerinde Genetik ve Epigenetik Varyasyonlar. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi. İstanbul.
- Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., Tarun, A.S., 2000. Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology., 51, 401–432.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A., Taylor, I.B., 2000. Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. Plant Molecular Biology, 42, 833-845.
- Trewavas, A.J.a.J., H.G., 1991. An assessment of the role of ABA in plant development. Physiology and Biochemistry, 169-188.
- Tsen, C.C., Tappel, A.L.,1958. Catalytic oxidation of glutathione and other sulfhydryl compounds by selenite. J Biol Chem., 233, 1230– 1232.
- Tsuji, H., 2006. Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. Plant Cell Physiol., 47(7), 995-1003.
- 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.
- Ueda, H., Kuroda, K., and Endo, G., 1997. The inhibitory effect of selenium on induction of tetraploidy by dimethylarsinic acid in Chinese hamster cells. Anticancer Res., 17(3C), 1939-43.
- Uysal, M., 1998. Serbest radikaller, Lipid Peroksitleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. Klinik Gelişim. 11, 336-341.
- 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.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden, B.T., 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol., 11, 700–14.
- 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.
- 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.
- 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, H., Zhang, J., Yu, H., 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. Free Radic Biol Med., 42(10), 1524-33.
- Wang, V.B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218,1-14.

- 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.
- Wasowicz, W.G.J., Rydzynski, K., Tomczak, J., 2003. Selenium status of low-selenium area residents. Polish experience. *Toxicol Lett.*, 31, 95–101.
- Wei, L., Zhang, D., Xiang, F., Zhang, Z., 2009. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *International Journal of Plant Sciences*, 170, 979-989.
- Wessler, S.R., 1996. Turned on by stress. *Plant retrotransposons*, *Curr. Biol.*, 6, 959-961.
- Xiang, N., Zhao, R., and Zhong, W., 2009. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(2), 351-62.
- Xiang, N., Zhao, R., Song, G., Zhong, W., 2008. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells, *Carcinogenesis*, 29, 2175–2181.
- Xiang, Nç, Zhao, R., Zhong, W.X., 2009. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Can Chem Pharmacol.*, 63, 351–362.
- 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., Geng, L., Lia, W.J., Houa Russian, G., 2012. Selenium Improves Recovery of Wheat eedlings at Rewatering after Drought Stress. *Journal of Plant Physiology*, 59, 701-707.
- Xiaoqin, Y., Chu, J., Wang, G., J. Chu, Ba, C., 2010. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. *Biol Trace Elem Res.*, 136(1), 96-105.
- Xue, T., H.H., Piironen, V., 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. *Plant Soil*, 27, 55–61.
- Yang, W., 2007. Preventive effects of 4 Se-enriched plants on rat stomach cancer induced by MNNG--1. inhibitory effects of different selenium resources on rat aneuploid cell incidence in mucosal epithelium of gastric antrum. *Wei Sheng Yan Jiu*, 36(5), 612-4.
- Yao, XQ., 2007. Changes in photosynthesis and antioxidant defenses of *Picea asperata* seedlings to enhanced ultraviolet-B and to nitrogen supply. *Physiol Plant*, 129, 364-374.
- Yao, Y., Ni, Z., Peng, H., Sun, F., Xin, M., Sunkar, R., Zhu, J.-K. & Sun, Q., 2010. Noncoding small RNAs responsive to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional Integrative Genomics*, 10, 187-190.
- Yediyıldız, A.G., 2008. Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulanan Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşitlerinde Antioksidan Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi. Kayseri.
- Yokota, A., 1988. Selenium as Inducer of Glutathione Peroxidase in low-CO(2)-Grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 86(3), 649-51.
- Yu, R.A., 2009. Telomerase activity and telomerase reverse transcriptase expression induced by selenium in rat hepatocytes. *Biomed Environ Sci.*, 22(4), 311-7.

- Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Kornas, A., Miszalski, Z., Hartikainen, H., 2010. Effect of Selenium on Macro and Microelements Distribution and Physiological Parameters of Rape and Wheat Seedlings Exposed to Cadmium Stress. *Plant Soil*, 329, 457-468.
- Zeng, H., Combs, G.F., 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem.*, 19(1), 1-7.
- Zeng, H., Yan, L., Cheng, W.H., Uthus, E.O., 2011. Dietary selenomethionine increases exon-specific DNA methylation of the p53 gene in rat liver and colon mucosa, *J. Nutr.*, 141,1464–1468.
- Zhan, X., 2011. Selenomethionine: an effective selenium source for sow to improve Se distribution, antioxidant status, and growth performance of pig offspring. *Biol Trace Elem Res.*, 142(3), 481-91.
- Zhang, J., 2009. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10, 449.
- Zhang, J., 2011. Mouse prostate proteomes are differentially altered by supranutritional intake of four selenium compounds. *Nutr Cancer*, 63(5), 778-89.
- Zhang, K., 2007. Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2(11), 1210.
- 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.
- Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W.X., Lida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S., Zhu, J.K., 2008. ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 455, 1259-1262.
- Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., Wu, K., 2005. Histone Deacetylase 19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(4), 1196-204.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev.Plant Biol.*, 53, 247-273.
- Zhu, J.K., 2008. Epigenome sequencing comes of age. *Cell*, 133(3), 395-7.
- 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.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında İstanbul'da doğdu. Lise öğrenimini Beyoğlu Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında başladığı, Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı'ndan 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.