

**KURAKLIK STRESİNE MARUZ KALAN  
BUĞDAYDA(*Triticum aestivum*)  
GENETİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE  
PUTRESİNİN ETKİSİNİN  
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ**

**Esra ARSLAN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Güleray AĞAR  
2012  
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KURAKLIK STRESİNE MARUZ KALAN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*)  
GENETİK ve EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE PUTRESİNİN  
ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ**

**Esra ARSLAN**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2012**

**Her Hakkı Saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KURAKLIK STRESİNE MARUZ KALAN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*) GENETİK  
ve EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE PUTRESİNİN ETKİSİNİN  
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Esra ARSLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 14 /08/ 2012 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. M. Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**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 STRESİNE MARUZ KALAN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum*) GENETİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE PUTRESİNİN ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ**

Esra ARSLAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Çalışmamızda, *Triticum aestivum* cv. Karasu 90 çeşidine PEG6000 ve Putresinin birlikte verilerek bitki genomunda oluşturdukları genetiksel ve epigenetiksel etkiler RAPD ve CRED-RA teknikleri ile araştırılmıştır. Kuraklık stresine maruz kalan 3 farklı konsantrasyonda ki (-2,-4,-6 bar PEG6000) deney gruplarının RAPD profillerindeki DNA değişimleri, DNA hasarları ve mutasyonlar (örneğin, nokta mutasyonları ve kromozomal düzenlemeler) hakkında nitel bilgi vermiştir. Her bir konsantrasyonun genomik kalıp sabitesi (%GTS) hesaplanmış, PEG6000 uygulanan dozlarda genomik kararsızlık yüksek iken PEG6000 ile birlikte uygulanan putresin dozlarında genomik kararsızlığın oldukça azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, DNA metilasyonlarını tespit edebilmek için bitkilerde kullanılan moleküler markırlardan CRED-RA yöntemi uygulanmıştır. Uygulama sonucunda tüm konsantrasyonların polimorfik yüzdesi hesaplanmıştır. PEG6000 uygulanan dozlarda DNA metilasyonu yüksek iken PEG6000 ile birlikte uygulanan putresin dozlarında metilasyonun indirgendiği gözlemlenmiştir.

**2012, 72 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Buğday, PEG6000, Kuraklık Stresi, Putresin, RAPD, CRED-RA ve Epigenetik

## ABSTRACT

Master Thesis

### IDENTIFICATION OF EFFECTS OF PUTRESCINE ON GENETICAL AND EPIGENETICAL CHANGES ON WHEAT (*Triticum aestivum*) WHICH IS EXPOSED TO DROUGHT STRESS WITH MOLECULAR METHODS

Esra ARSLAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AGAR

In this study, genetical and epigenetical effects on the genome which is consisted by carrying out PEG6000 and putrescine together to Karasu 90 which is one of the genus of *Triticum aestivum* have been investigated with the methods of RAPD and CRED-RA. Each of three concentrations which is exposed to drought stress (-2,-4,-6 bar PEG6000), the band changes on RAPD profiles gave qualitative data about DNA alterations, DNA damages and mutations (point mutations and chromosomal rearrangements). Moreover, the effect of each of doses of drought stress on % GTS is evaluated and it is determined that genomic instability of doses which are carried out with PEG6000 increases. But it was observed that genomic instability mostly decreases in three doses of putrescine (0,01mM, 0,1mM, 1mM) which is carried out with PEG6000. In addition, it is observed that DNA methylation on the doses which are carried out with PEG6000.

**2012, 72 pages**

**Keywords:** Wheat, PEG6000, Drought stress, Putrescine, RAPD, CRED-RA and Epigenetic

## TEŞEKKÜR

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

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca değerli yardım ve katkılarıyla bana yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a ve Sayın Uzm. Biyolog Gökçe NARDEMİR'e ayrıca Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda çalışan hocalarım ve arkadaşlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teőekkürler.

Esra ARSLAN

Ağustos 2012

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	ii
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>13</b>
2.1. Stres .....	13
2.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Mekanizmaları.....	15
2.3. Poliaminler .....	20
2.4. Poliamin Biyosentez Mekanizması .....	21
2.5. Epigenetik.....	22
2.6. DNA metilasyonu.....	22
2.7. Restriksiyon Endonükleazlar.....	26
2.7.1. <i>Hpa</i> II .....	27
2.7.2. <i>Msp</i> I.....	27
2.8. Genetiksel ve Epigenetiksel Değişiklikleri Belirlemede Kullanılan Moleküler Markırlar.....	28
2.8.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) .....	29
2.8.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	30
2.8.3. CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification) .	31
2.8.4. MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism).....	31
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal .....	33
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	33
3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar .....	34
3.1.3.a. Kullanılan Polietilenglikol (PEG6000) çözeltilerinin hazırlanışı.....	34

3.1.3.b. Kullanılan Putresin (Put) çözeltilerinin hazırlanışı .....	34
3.1.3.c. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler .....	35
3.1.3.d. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler .....	36
3.1.3.e. Sterilizasyon İşlemleri İçin Kullanılan Çözeltiler .....	37
3.2. Yöntem .....	37
3.2.1. Putresin ve PEG6000 çözeltilerinin bitkiye uygulanması .....	37
3.2.3. DNA izolasyonu .....	38
3.2.4. RAPD .....	39
3.2.4.a. RAPD primerleri .....	39
3.2.4.b. PCR protokolü .....	40
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi .....	41
3.2.6. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (%GTS) belirlenmesi .....	41
3.2.7. CRED-RA .....	42
3.2.7.a. DNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi .....	42
3.2.7.b. CRED-RA primerleri .....	42
3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi .....	43
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>44</b>
4.1. RAPD Analizleri ve Genomik Kalıp Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%) .....	44
4.2. CRED-RA Analizleri ve % Polimorfizm .....	49
4.4. RAPD ve CRED-RA Jel Görüntüleri .....	56
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>58</b>
5.1. Öneriler .....	65
KAYNAKLAR .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	73



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik asit
ADC	Arnitin dekarboksilaz
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi)
BR	Brassinosteroid
BSA	Bovin serum albumin
Cad	Kadaverin
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CpG	Guanozin tarafından takip edilen metillenen sitozin bölgesi
CRED-RA	Coupled restriction enzyme digestion-random amplification (Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım)
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
DRE	Dehydration responsive elements (Dehidrasyondan sorumlu elementler)
dSAM	Dekarboksile S-adenosil metiyonin
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
Et-Br	Etidium bromid
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HTFs	<i>Hpa II</i> tiny fragments
JA	Jasmonik asit
m <sup>5</sup> C	5-metilsitozin
MBD	Metil-CpG'ye bağlanıcı bölge proteinleri
ml	Mililitre
MSAP	Methylation-sensitive amplified polymorphism (Metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi)

mg	Miligram
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
O <sub>2</sub>	Oksijen
OD	Okuma değeri
ODC	Ornitin dekarboksilaz
PA	Poliamin
PAO	Poliamin oksidaz
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
Put	Putresin
PVP	Polivinilpirolidon
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA (Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RdDM	RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu
RE	Restriksiyon enzimi
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
rRNA	Ribozomal RNA
SAM	S-adenosil metiyonin
SAMDC	S-adenosil metiyonin dekarboksilaz
SAT	Spermidin/Spermin N-asetiltransferaz
Spd	Spermidin
Spdsentaz	Spermidin sentaz
Spm	Spermin
Spmsentaz	Spermin sentaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
TBE	Tris-borat-EDTA tamponu

TE	Tris-EDTA tamponu
TRIA	Triakontanol
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yüksek bitkilerde kuraklık stresine fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıtlar .....	14
Şekil 2.2. Başlangıç stres sinyallerinin etki ettiği mekanizmalar.....	17
Şekil 2.3. ABA bağımlı- ABA bağımsız genlerin mekanizması .....	18
Şekil 2.4. ABA sinyal mekanizması .....	19
Şekil 2.5. Poliaminlerin sentez mekanizması.....	21
Şekil 2.6. DNA metilasyon mekanizması .....	24
Şekil 2.7. Restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri .....	28
Şekil 4.1. OPH_19 RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	56
Şekil 4.2. OPW_13 RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	56
Şekil 4.3. OPY_15 CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Abiyotik ve biyotik stres faktörleri.....	13
Çizelge 3.1. RAPD primerleri.....	39
Çizelge 3.2. CRED-RA primerleri.....	42
Çizelge 4.1. Put ve PEG6000 farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltinin buğday tohumlarının üzerine etkisi ile değişen bantların moleküler ağırlığı.....	45
Çizelge 4.2. Put ve PEG6000 genomik kalıp sabitliliği (%GTS).....	48
Çizelge 4.3. K1, K2, K3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm...	51
Çizelge 4.4. P1, P2, P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm.....	52
Çizelge 4.5. K1+P1, K1+P2, K1+P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm.....	53
Çizelge 4.6. K2+P1, K2+P2, K2+P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm.....	54
Çizelge 4.7. K3+P1, K3+P2, K3+P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm.....	55

## 1. GİRİŞ

Doğadaki çeşitli çevre etmenleri bitkileri yaşamlarının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak etkilemekte ve stres kavramını oluşturmaktadır. Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyen, üründe verim ve kalite kaybına ve bitkinin veya organlarının ölümüne neden olan durum veya madde olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir deyişle stres, bitkilerin biyolojik sistemlerine ya da fonksiyonlarına zarar veren bir güçtür (Mahajan and Tuteja 2005).

Bitkilerde stres faktörleri abiyotik veya biyotik kökenli olabilir. Patojenler, böcekler çeşitli mikroorganizmalar biyotik stres kaynağı iken, pestisitler, toksik maddeler, hava kirliliği, kuraklık, ışık, radyasyon, sıcaklık gibi pek çok etken de bitki yaşamında olumsuzluğa yol açan abiyotik faktörler arasında yerini almaktadır.

Canlıların yaşam sürecini etkileyen bu stres faktörlerine karşı kalıtsal değişiklikleri gerçekleştirebilmiş bitkiler, bu özelliklerini dölden döle aktararak türlerinin devamını sağlamışlardır. Doğanın kendi dinamikleri içinde kabul edebileceğimiz bu faktörler çoğunlukla canlıların adaptasyon geçirmelerine fırsat verecek ölçüde olup, evrimsel sürecin işleyişinin birer parçası olarak görülmelidirler (Ayhan 2006). Bu zor şartlara dayanıklılık gösteremeyen bitkiler ise yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Özellikle gıda maddesi olarak en çok tüketilen bitki grubundan olan tahıllar stres şartlarına karşı yeterli direnci gösteremedikleri takdirde gelecek yıllarda insanlığı tehdit eden açlık sorununa yol açacaklardır.

Hızla artan dünya nüfusunu karşılayacak besin ihtiyacı, tahminlere göre gelecek 50 yıl içerisinde tükenecek ve tarımın başladığı 10000 yıl öncesinden bu güne kadar üretilen gıdanın iki katından daha fazlasına ihtiyaç duyulacaktır (Hoisington *et al.* 2002). Şüphesiz ki buğday üretilecek olan gıda maddeleri arasında ilk sırada yer alacaktır.

İnsan beslenmesinde dünyada en çok kullanılan kültür bitkileri içerisinde yer alan buğday, tarımı ve depolanmasının oldukça kolay olması, kışlık ve yazlık üretilebilmesi, besin değerinin yüksek olması nedeniyle dünyada en geniş ekim alanına sahip bir kültür bitkisi olup ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde temel besin maddelerinin esasını oluşturmaktadır (Reçber 2011). Dünyadaki buğday verimi ve ürün kalitesi iklim koşullarına bağlı olarak yıldan yıla önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılığın ortaya çıkışında çeşidin genetik yapısı, iklim koşulları, toprak yapısı, topraktaki azot miktarı, topraktaki azotun kullanılabilirlik etkinliği ve uygulanan yetiştirme teknikleri büyük rol oynamaktadır.

2011 yılı verilerine göre dünya buğday ekim alanı 221,1 milyon ha, üretimi 695,5 milyon tondur. Türkiye’de buğdayın üretim alanı yaklaşık olarak 8 milyon hektar, üretimi ise 18,8 milyon ton olup dünyada buğday üreten ilk on ülke içerisinde yer almaktadır (FAOSTAT 2011). Ancak, mevcut verim, potansiyel verimin oldukça altında bulunmaktadır. Verimin istenilen düzeye çıkarılması için bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi ve çevresel faktörlerin daha iyi kombine edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda yeni teknoloji adı verilen, moleküler genetik, doku kültürü ve rekombinant DNA teknolojisi gibi konuları kapsayan teknikler ile yeni olanaklar sağlanmıştır (Özgen vd 2000). Ancak bu yöntemlerle üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilip, insanoğlunun hizmetine sunulmasına karşın, bazı abiyotik faktörlere karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç tam olarak alınamamıştır (Aydın 2006).

Yıllardır üzerinde yoğun olarak çalışılan ve başarılı sonuçlar alınan biyotik stres faktörleri, insanoğlunun ekosisteme verdiği zararlar neticesinde ortaya çıkan ve yeni bir araştırma konusu oluşturan abiyotik stres faktörleri üzerinde çalışmaya bırakmıştır. İstatistiksel verilere göre dünya üzerindeki kullanılabilir alanlardan %26’sı kuraklık stresine maruz kalarak en büyük dilimi oluştururken, bunu %20’lik payla mineral stresi, %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. %29’u ise bunların dışında kalan tüm stres faktörlerine maruz kalırken sadece %10’luk bir alan abiyotik stres faktörlerinden etkilenmemektedir (Blum and Jordan 1985; Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Bu durumda kuraklık stresi, bitki metabolizmasını etkileyen en önemli stres faktörü olarak

kabul edilmektedir. Küresel ısınmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan kuraklık stresi özellikle su kaynaklarının zayıflaması, kuraklık ve çölleşme ile buna bağlı ekolojik bozulmalara neden olarak tarımsal verimliliğin azalmasıyla sonuçlanmaktadır.

Kuraklık stresi bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkileri başlatmakta, buna bağlı olarak bitkiler de strese cevap niteliğinde değişen çevre şartlarına uyum sağlayabilecek adaptasyon mekanizmaları geliştirmektedirler (Arora *et al.* 2002; Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Organizmaların strese verdikleri yanıtlar genetik yapılarına bağlı olarak değişmektedir. Bitkiler stresin algılanmasıyla başlayan ve hedef genlerin ifadesiyle sonlanan olaylar ağı ve art arda tetikleyiciler tarafından strese alışmaktadır. Bunlar stres uyarıları, taşıyıcılar, transkripsiyon düzenleyicileri, hedef genler ve stres tepkileridir. Bunların etkisiyle bitkide fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişimler meydana gelmektedir. Mevcut çalışmalar stresten sorumlu genlerin genom içerisinde hangi kromozom üzerinde bulunduğu hakkında yeterli bilgi vermese de stres esnasında hangi genlerin aktif olduğu ve bu aktivitenin nelere yol açtığı hususunda bilim dünyasını aydınlatmaktadır. Nitekim pirinç köklerinde keşfedilen *Drt1* geninin kök uzamasında, pigmentasyonunda ve saçak köklerin oluşmasında ki etkisinin yanında kuraklığa dirençlilik göstererek pleiotropik etki gösterdiği kaydedilmiştir (Mitra 2001). Çevresel koşullarda meydana gelen değişiklik, stresin algılanması sonrası sinyal iletim mekanizmalarının devreye girmesiyle çok sayıda transkripsiyon faktör ve regülatörlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu aktivasyon transkriptomun, dolayısıyla da proteom ve metalonomun yeniden yapılandırılmasını sağlar. Yapılan çok sayıda transkriptomik ve proteomik çalışmalar moleküler, hücresel ve fizyolojik olarak değişimlere yol açan abiyotik stres cevabının oldukça kompleks olduğunu ve tüm bu değişimlere yol açan mekanizmaların birbiriyle etkileşim içinde olduklarını ortaya koymuştur (Ergen ve Budak 2009). Bu mekanizmaların merkezinde fonksiyonları henüz tam olarak bilinmeyen fakat strese karşı dayanıklılığı arttırdığı ya da stresin etkilerini yavaşlattığı düşünülen bir takım proteinlerin sentezlendiği bilinmektedir. Ancak proteinlerden ziyade bu mekanizmaların temelinde hormonal dengenin değişimi kilit rol oynamaktadır. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde bazı bitki hormonlarının seviyelerinin değiştiği ve bitkiyi kuraklığa



karşı korudukları bilinmektedir (Çeçen 2004). Bu hormonlardan özellikle absisik asitin (ABA) stres mekanizmasında rolü büyüktür (Arora *et al.* 2002).

Absisik asit tohum çimlenmesi ve gelişimi, lateral kök gelişimi, tohum dormansisi, vejetatif ve generatif organların gelişimi, meyve büyümesi gibi pek çok olayda engelleyici rolü olan bir bitki büyüme inhibitörüdür (Chinnusamy *et al.* 2008). Vejetatif dokularda özellikle kuraklık stresine yanıt olarak sentezlenen ABA bitkilerin abiyotik strese yanıtında en önemli düzenleyicidir. Bu nedenle ABA stres hormonu olarak adlandırılmaktadır (Taylor *et al.* 2000). Stressiz koşullarda bitki hücrelerinde ABA en düşük düzeylerde bulunmaktadır. Bitkinin normal gelişimi için bu düzey yeterlidir. Stres sırasında ise bitkilerde ABA miktarının arttığına dair pek çok çalışma mevcuttur. Nitekim Cassava bitkisinde yapılan bir çalışmada (Alves and Setter 2000) uygulanan kuraklık stresinin yapraklardaki ABA konsantrasyonunu arttırdığını, daha sonra bitkiye yapılan sulama ile ABA konsantrasyonunun birkaç saat içerisinde aynı seviyeye indiğini göstermişlerdir. Benzer bir çalışmada ise kuraklık stresi koşullarında yapraklardaki ABA düzeyinin 4 ile 8 saat içinde 50 kat arttığı, su verildiğinde ise aynı süre içerisinde önceki seviyesine ulaştığı kaydedilmiştir (Desikan *et al.* 2003).

ABA'nın kuraklık stresinin yanı sıra soğuk, donma, ağır metal ve tuz stresi gibi farklı abiyotik streslerde de koruyuculuk özelliği rapor edilmiştir (Hsu *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2006; Etehadnia *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2008).

ABA'nın kuraklık stresi esnasında bitkiler üzerinde fizyolojik ve moleküler düzeyde etki gösterdiği bilinmektedir.

Fizyolojik olarak en önemli işlevi yapraklardan daha fazla su kaybını önlemek için stoma bekçi hücrelerini uyararak stomaları kapatmaya zorlamasıdır. Böylece yapraklardaki içsel karbon dioksit (CO<sub>2</sub>) konsantrasyonu düşerek fotosentez hızı azalmaktadır. Biyosentetik reaksiyonların yavaşlaması ve ATP' ye duyulan ihtiyacın azalması sonucunda mitokondri ve kloroplastlardaki elektron taşınım sistemlerinde elektron fazlalığı oluşabilmektedir. Fotosentez esnasında absorblanan ışık enerjisinin

etkisiyle açığa çıkan elektronlar, hem yaprak dokularındaki CO<sub>2</sub> yetersizliğinden hem de CO<sub>2</sub>' nin indirgenme hızının azalmasından dolayı uygun şekilde kullanılamadığı için moleküler oksijenin (O<sub>2</sub>) aktivasyonuna neden olmaktadır. Yani fotosentez kaynaklı elektronlar CO<sub>2</sub> yerine O<sub>2</sub>' ye aktarılmaktadır (Ecem 2010). Bunun sonucunda yapraklarda serbest oksijen radikalleri ve bir takım zararlı oksijen türleri [süperoksit molekülü (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), singlet oksijen (\*O), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikalleri (OH<sup>-</sup>)] açığa çıkmaktadır (Mitler 2002). Aerobik metabolizma sırasında elektron taşıma zincirinden ayrılan elektronlar O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek bu reaktif oksijen türlerini (ROT) meydana getirirler. Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır. Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein denatürasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA ve nükleotid hasarlar, programlı hücre ölümü (apoptozis) gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Koca ve Karadeniz 2003). Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R<sup>•</sup>), peroksit radikalleri (ROO<sup>•</sup>), alkoksi radikalleri (RO<sup>•</sup>), tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>), sülfenil radikalleri (RSO<sup>•</sup>), tiyil peroksit radikalleri (RSO<sub>2</sub><sup>•</sup>) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu serbest radikallere karşı üretilen antioksidan savunma sistemleri çeşitli etki mekanizmaları geliştirerek ROT'ların zararlı etkilerine karşı hücreyi korumaktadırlar.

ABA'nın fizyolojik etkisinin yanı sıra moleküler düzeyde de bir takım hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Stres altında transpozonların ve psödogenlerin ifadesinin daha fazla arttığına dair çalışmalar mevcuttur (Zeller *et al.* 2009). ABA'nın RNA'ların parçalanmasını sağlayan Ribonükleaz enziminin faaliyetini artırdığı, böylece enzimin bağlı durumdan serbest duruma geçmesini sağlayarak protein sentezini durdurma özelliği gösterdiği bilinmektedir.

Kuraklık stresinin polietilenglikol ile oluşturulduğu bir çalışmada (Dasgupta and Bewley 1984) -1MPa'lık osmotik potansiyelde arpa fidelerinin primer yapraklardaki protein sentezinin kontrol grubuna göre yaklaşık %88 civarında azaldığını göstermiştir.

Kuraklık stresi ile yapılan başka bir çalışmada ise *L.chilense* bitkilerine 6 gün boyunca uygulanan kuraklık stresi, protein sentezinde herhangi bir indirgenmeye sebep olmamıştır. Bu sonuçlardaki farklılıklar çalışılan bitkilerin genotiplerinin farklı olmasından ya da su kaybının oranındaki farklılardan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Gülcü 1997).

ABA ve diğer bitki hormonlarının bitkilerde total RNA sentezini kontrol ettiği ve RNA polimeraz aktivitesini düzenlediği uzun süredir bilinmektedir. Total hücre RNA'sının büyük bir kısmını Ribozomal RNA'lar (rRNA) oluşturduğundan, fitohormonların rRNA'nın transkripsiyon aşamasında düzenleme yapması beklenir. Bu konuyla ilgili olarak bazı bitki hormonlarıyla çalışmalar yapılmış olmasına karşın, ABA'nın rRNA'ların transkripsiyonu üzerindeki etkileri üzerine çok az çalışma mevcuttur. Stres esnasında miktarı artan ABA'nın bazı genleri uyardığı bilinmektedir. Su kaybının hücre tarafından algılanması sonrasında bir sinyal mekanizması ile özel genler aktive edilir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997). Bazı genler kuraklık stresine oldukça hızlı yanıt verirken, bazıları da ABA birikiminden sonra yavaş bir şekilde uyarılır. Yapılan araştırmalarda dışarıdan uygulanan ABA'nın bazı genleri uyardığı bazı genlerin ise etkilenmediği gözlenmiştir. Bu bulgular kuraklık stresinin başlangıç sinyali ile özel genlerin ifade edilmesi arasında "ABA bağımlı" ve "ABA bağımsız" olmak üzere iki sinyal iletim yolunun varlığını göstermektedir (Bray 1993, 1997). Su kaybı, ABA üretimini tetiklemekte ve sentezlenen ABA, çeşitli genlerin ifadesinin artmasına neden olmaktadır. ABA sinyalleme ve RNA işlenmesi arasında doğrudan bir bağlantı söz konusudur. Bu bağlantılar, ABA sinyallemesinin gen ifadesinin postranskripsiyonel düzenlenmesinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Kuraklık stresi altında uyarılan genler, sadece önemli metabolik proteinlerin üretimi yoluyla hücreleri korumakla kalmayıp, aynı zamanda kuraklık stresine verilen yanıtta sinyal iletim genlerinin düzenlenmesinde de görev almaktadır (Zhang *et al.* 2006).

Stresin bitkiler üzerindeki etkisinin başka bir boyutu da moleküler düzeyde gen ekspresyonu üzerinedir. Gen ekspresyonu, DNA metilasyonu ve histonlardaki posttranslasyonel modifikasyonlar gibi kromatin yapısında meydana gelen epigenetiksel değişikliklerden etkilenmektedir. Epigenetik DNA nükleotid dizilerinde bir değişiklik olmadan, gen anlatımındaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. DNA metilasyonu, gen anlatımını ve dolaylı olarak da hücre işlevlerini değiştiren, hücre bölünmesi ile nesilden nesile geçebilen epigenetik bir mekanizmadır. DNA metilasyonu ökaryotlarda CpG veya CpNG dizilerindeki sitozinde meydana gelir. Sitozin metilasyonu hem transkripsiyonel hem de postranskripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Çevresel stres etmenleri tüm genomda sitozin metilasyonunda önemli değişikliklere neden olmaktadır. Bitkiler bu koşullara uyum sağlamak zorunda olduğundan DNA nükleotid dizisinde herhangi bir değişim olmadan metilasyona uğrayarak genomik plastisitesini korumaktadırlar (Tan 2010).

Çeşitli abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde oluşturduğu genetiksel ve epigenetiksel değişikliklere ait çalışmalar mevcuttur.

Kumar *et al.* (2011), 60 buğday genotipine kuraklık stresi uygulanmasıyla oluşan genetik varyasyonları belirlemek için RAPD tekniğinden yararlanmışlardır.

Lu *et al.* (2007), tuzluluk stresine maruz bırakılan *Brassica napus* bitkilerinde yaptıkları bir çalışmada genetiksel ve epigenetiksel değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Bu değişimlerin belirlenebilmesi için moleküler markır teknikleri kullanmışlardır. Araştırmada mutasyonlar AFLP tekniği ile belirlenirken, DNA metilasyon değişimleri MSAP yöntemiyle saptanmıştır.

Tütün bitkisinde kuraklık stresinin, CpNG dizilerinde metilasyona yol açtığı ve bunun geri dönüşümlü olduğu kaydedilmiştir (Kovarik *et al.* 1997).

Başka bir çalışmada düşük sıcaklık stresine maruz bırakılan mısır filizlerinin kök hücrelerinde DNA metilasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (Steward *et al.* 2002).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada (Lira-Medeiros *et al.* 2010) ise tuz içermeyen topraklarda yetişen mangrovların tuzlu ortama alındıklarında hipometilasyonun gerçekleştiği belirtilmiştir.

Sharma *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada tuz stresinin pirince uygulanmasıyla sitozin DNA metiltransferazların ifadesinde değişimler meydana getirdiği ve stresin monokotil bitkilerin genomlarında da epigenetik değişikliklere sebep olduğu ifade edilmiştir.

Kuraklık, ağır metal, alüminyum gibi stres faktörlerinin ekzojenik uygulamalarının genom boyunca ve spesifik lokuslarda sitozin metilasyonunda artış ya da azalış şeklinde değişikliğe neden olduğu saptanmıştır (Labra *et al.* 2002; Aina *et al.* 2004; Choi and Sano 2007).

DNA ve histonlarda meydana gelen modifikasyonlar sonucu bir türün fenotipleri arasında epigenetiksel farklılıkların oluştuğu bilinmektedir. Bu bakımdan strese maruz kalan bir habitatta bitki popülasyonlarında strese bağlı olarak oluşan epigenetiksel değişimlerin ve stres koşullarına uyum sağlamak için oluşturulan adaptasyon mekanizmalarının bitkilerde stres hafızası oluşturduğu ve bunu nesilden nesile aktardığı bilinmektedir (Golldack *et al.* 2011). Literatürde “Transgenerational memory” (Yeni jenerasyonlara aktarılabilen hafıza) olarak tanımlanan bu durum epigenetik değişikliklerle açıklanmakla birlikte stres altındaki bitkilerde epigenetiksel düzenlemelerin tam olarak nasıl gerçekleştiği konusunda yeterli bilginin mevcut olmaması literatüre çok az sayıda çalışma katmasına sebebiyet vermiştir (Bruce *et al.* 2007; Chinnusamy and Zhu 2009).

Farklı habitatlarda yaşayan aynı iki türün epigenetik yapılarının değişip değişmediği üzerine yapılan bir çalışmada (Lira- Medeiros *et al.* 2010) aynı genetik yapıya sahip bu

türlerin epigenetik profillerinin farklı olmasını çevre koşullarına dayandırmışlardır. Bu çalışmada fenotipik varyasyonlara şekil veren genetik değişikliklerin evrimsel olarak DNA metilasyonundan bağımsız olduğu ispatlanmıştır.

Histon metilasyonları, asetilasyon, fosforilasyon ayrıca übikitinasyon, biyotinilasyon ve sümoilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarda çevresel stresin hücrede değiştirdiği gen ekspresyonu üzerine etkilidirler.

Ekstrem kuraklık şartlarına oldukça dayanıklı olduğu bilinen bir çöl bitkisi olan *Zygophyllum dumosum* üzerine yapılan bir çalışmada bitki normal florasında iken H3 histonu posttranslasyonel metilasyona uğrarken, kuraklık stresinin oluşturulmasıyla gen ekspresyonunun posttranslasyonel düzenlenmesinde metilasyonun azaldığı ispatlanmıştır (Granot *et al.* 2009).

*Arabidopsis thaliana* ve tütün üzerine yapılan çalışmalar H3 histonunda fosforilasyonun yanı sıra fosfoasetilasyonun, H4 histonunda ise asetilasyonun tuzluluk, soğuk ve ABA uygulamalarıyla birlikte değiştiği kaydedilmiştir (Sokol *et al.* 2007).

Zhang *et al.* (2011), tohum çimlenmesi esnasında histon asetiltransferaz ve histon deasetilaz enzimlerinin ifadesi ile birlikte H3 histonunun arttığını tespit etmişlerdir. Tohumlara dışarıdan uygulanan ABA'nın bu enzimlerin ifadesini baskıladığı ve histon asetilasyonunu geciktirdiği kaydedilmiştir.

ABA'nın stres mekanizmasındaki bir diğer etkisi bitkideki diğer hormonlar ve bitki büyüme düzenleyicileri ile etkileşime girerek abiyotik strese karşı bitkide koruyucu rolü üstlenmesidir. **Giberellin**, sitokinin, etilen gibi geleneksel fakat konumunu koruyan hormonların yanı sıra son yıllarda bulunan ve bitki büyüme ve gelişme olaylarında etkili oldukları bilinen triakontanol (TRIA), brassinosteroidler (BR'ler), jasmonik asit (JA) ve poliaminlerin (PA) stres koşullarında bitkide çeşitli adaptasyon mekanizmaları oluşturdukları bilinmektedir. Son çalışmalar özellikle poliaminlerin stres ile ilişkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Stres içsel poliamin seviyesinde değişikliğe yol açmaktadır.

Bunu diğerk moleküllerle konjugasyon geçirerek, transferini sağlayarak, yıkımına uğratarak ya da ABA ile etkileşime girerek yapmaktadır (Kovacs, 2010).

Keşfinin 1800'lü yıllara dayandığı bilinen poliaminler; putresin, spermidin, spermin ve kadaverin hormon gruplarından oluşmaktadır. Bu hormonların organogenesis, embriyogenesis, çiçek oluşumu, hücre bölünmesi gibi pek çok olayda rolü olduğu bilinmektedir. Hücrede poliamin biyosentezinin engellenmesiyle içsel poliamin miktarındaki düşüşün bitki metabolizmasında ne gibi hasarlara yol açabileceği üzerine yapılan bir çalışmada, bitki büyüme ve gelişmesinde önemli eksikliklerin olduğu rapor edilmiştir. Bu eksikliklerden yola çıkarak poliaminlerin membran stabilitesinin korunmasında, serbest radikallerin uzaklaştırılmasında, nükleik asit ve protein sentezinde, RNaz, proteaz ve diğerk enzim aktivitelerinde ayrıca fitokrom, etilen gibi çeşitli hormonların biyosentezinde önemli rollerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bütün bu etkilerinden dolayı poliaminlerin bitki büyüme ve gelişmesinde esas rollerinin ne olduğu üzerine henüz net bir bilgi açıklığa kavuşturulamamıştır (Kaur-Sawhney *et al.* 2003). Dışarıdan bitkiye ekzojen olarak uygulandığında pek çok fizyolojik değişikliğe sebep olan poliaminlerin çimlenme ve büyüme üzerinde yapmış oldukları esas etkiyi açıklayabilmek için mevcut çalışmaların çoğu daha çok içsel poliamin analizleri üzerine yapılmıştır.

Yer elması üzerine yapılan bir çalışmada, dormant haldeki yer elması tuberlerinde eser miktarda bulunan poliaminlerin gövdenin büyümeye başlaması ile miktarlarının yaklaşık 10-20 kat arttığı bilinmektedir (Bagni 1986).

Hücre bölünmesinde poliaminlerin rolü tam olarak açıklanamamıştır. Bazı araştırmacılar hücre bölünmesinin, PA sentezindeki artışın bir sonucu olduğunu ileri sürerken bazı araştırmacılar ise dışarıdan uygulanan PA'lerin hücre bölünmesi üzerinde engelleyici etki yaptığını bildirmişlerdir (Biasi *et al.* 1988; De Agazio *et al.* 1992).

Bagni (1970), *Phaseolus vulgaris*'in çimlenme süresince protein ve RNA miktarı ile birlikte poliamin seviyesinde da bir artışın olduğunu kaydetmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda poliaminlerin biyotik ve abiyotik stres mekanizmasında da önemli fonksiyonlarının oldukları kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar farklı bitki gruplarına çeşitli abiyotik streslerin (kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, soğuk, ağır metal, ozon, radyasyon, herbisit) uygulanması poliamin seviyesinin yükselmesine sebep olduğunu göstermiştir. Ancak bu artışın, stres sonrası bitkinin zarar görmesiyle mi arttığı yoksa bitkinin kendini koruma içgüdüleriyle strese cevap niteliğinde mi bu hormonu arttırdığı hususunda net bir bilgiye ulaşılamamıştır (Alcazar *et al.* 2010).

Potasyum eksikliğinde, düşük pH'larda ya da herbisit uygulamalarında milimolardan mikromolara kadar değişen aralıklarda putresin seviyesinde bir artış gözlenirken, aynı şartlarda spermidin ve spermin miktarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Benavides *et al.* 1997).

Poliaminlerin hücre içerisinde en önemli yeteneklerinden biri de polikatyonik yapısından ötürü nükleik asitlere kolaylıkla bağlanabilmeleridir. *Escherichia coli*'de spermidinlerin %90'ı RNA'ya, %5'i DNA'ya bağlanırken sadece %0,8' lik bir kısmı membran lipitlerine bağlanmaktadır. Buradaki amaç RNA'nın ribozomlardan ayrılmasını önleyerek stabilitesini sağlamak, DNA'yı enzimatik parçalanmalara, X ışınlarına, mekanik yıkımlara ve oksidatif hasarlara karşı korumaktır. *İn vivo* çalışmalarda biyosentetik enzimlerin inhibitörleri kullanılarak DNA replikasyonundaki rolleri tespit edilmiştir. *İn vitro* çalışmalarda ise DNA ve RNA sentezini uyararak translasyonu arttırdığı kaydedilmiştir (Ruiz- herrera *et al.* 1995).

Son zamanlarda poliaminlerin moleküler düzeyde bitkileri nasıl etkilediğine dair yapılan çalışmalarda poliaminlerin DNA metilasyonu üzerine de etkili oldukları saptanmıştır. Bu etkileşimin her ikisinde dSAM (S-adenosil metiyonin dekarboksilaz) ürününün oluştuğu metabolik yolu kullanmaları ile olabileceği öne sürülmüştür. Nitekim yapılan araştırmalar bu kanıyı doğrulamıştır. *Pinus radiata*'da yaşlanmaya bağlı olarak dSAM seviyesinde bir düşüş görülürken DNA metiltransferaz aktivitesinde ise artış gözlenmiştir. dSAM, DNA metiltransferaz'ın yarışmalı inhibitörüdür.



Dolayısıyla dSAM seviyesinin azalmasıyla DNA metiltransferaz'ın aktivitesi artmış ve metilasyon oranında buna paralel olarak yükselmiştir. Bu sonuca dayanarak dSAM seviyesinin poliamin miktarıyla ve DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu kanısına varılmıştır (Noceda 2009).

1995 yılında yapılan *in vivo* çalışmada poliaminlerin bazı genlerin ifadesine izin vererek DNA metilasyonunu engellediği saptanmıştır (Ruiz- herrera *et al.* 1995).

Başka bir çalışmada ise putresinin analogu (E)-1,4-diaminobut-2-ene adlı sentetik fungusitin bitkilerde patojenik bir fungus olan *Pyrenophora avenae*'ye uygulanmasıyla DNA metilasyonunu engellediği bulunmuştur. Burada poliaminlerin sitozin DNA metiltransferazın etkinliğini inhibe ederek ve bazı özel genlerin ifadesini artırarak metilasyonu önlediği sonucuna varılmıştır. Ancak bu özel genlerin ne olduğu hakkında net bir bilgiye ulaşılamamıştır (Walters 1997).

Literatürde bitkisel organizmaların genetik ve epigenetik mekanizmalarının poliaminlerle olan ilişkisi hakkında pek çok çalışma bulunmakla birlikte stres faktörlerine maruz bırakılan bitkisel organizmaların poliaminlerle etkileşmesi sonucu moleküler yapılarında ne gibi değişikliklerin oluştuğuna dair çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu çalışmada kuraklığa karşı hassas olduğu bilinen ve bölgemizde sulu koşullar için önerilen Karasu-90 buğday çeşidinde PEG6000 ile oluşturulan kuraklık stresinin meydana getirdiği genetik, epigenetik değişiklikler ve bu değişikliklere karşı poliaminlerin etkisinin moleküler yöntemlerden RAPD ve CRED-RA ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

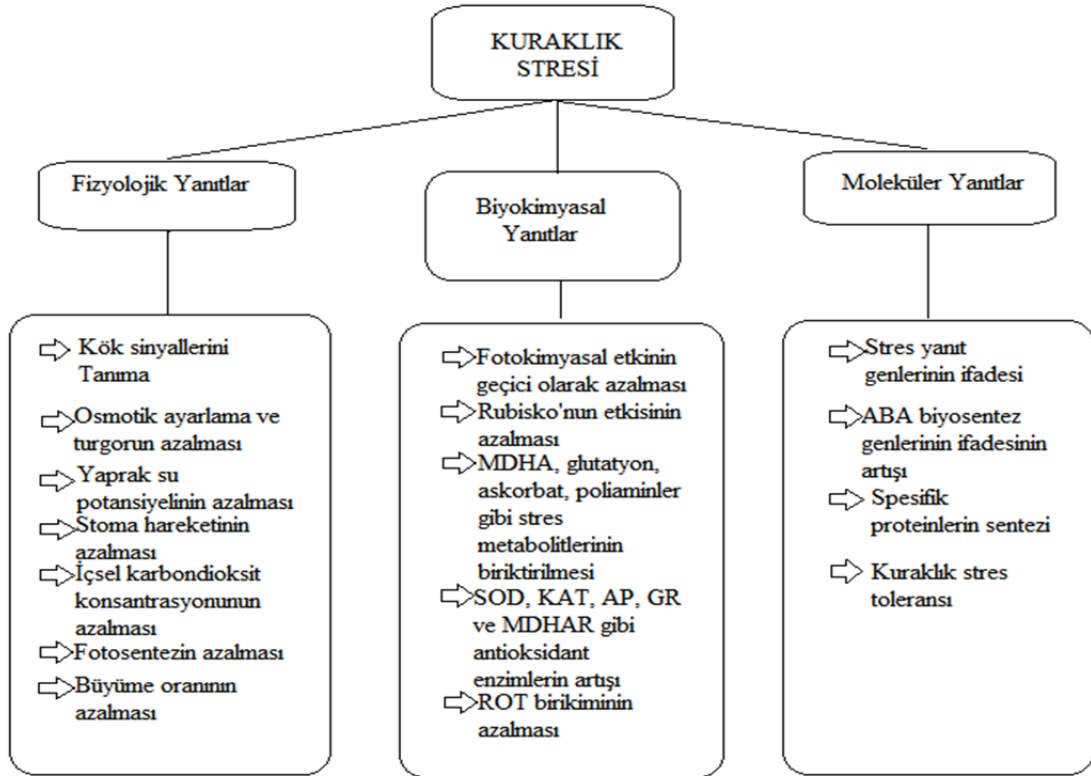
### 2.1. Stres

Bir çevrede devamlı olarak ya da belirli aralıklarla meydana gelen ve hemen öldürücü olmayan koşullar stres olarak tanımlanmaktadır. Bir başka yaklaşımla; bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir durum ya da madde stres olarak kabul edilmektedir (Lichtenhaler 1996). Bitkiler yaşamları süresince birçok stres faktörü ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu faktörleri Çizelge 2.1’de belirtildiği üzere biyotik ve abiyotik olmak üzere sınıflandırmak mümkündür.

**Çizelge 2.1.** Abiyotik ve biyotik stres faktörleri (Kocaçalışkan 2005)

Abiyotik Faktörler		Biyotik Faktörler
Fiziksel	Kimyasal	Hastalık etmenleri (Patojenler)
Kuraklık	Hava kirliliği	Yabani bitkiler
Sıcaklık	Tuzluluk	Böcekler
Radyasyon	Bitki besin maddeleri	Mikroorganizmalar
Işık	Pestisitler	Hayvanlar
Su baskını	Herbisitler	İnsan Tahribi
Mekanik etkiler (Rüzgar, kar, buz örtüsü)	Toksinler	
	Toprak pH’sı	

Bitki türlerinin gerek hayatta kalmak için geliştirdikleri adaptasyon mekanizmalarıyla, gerekse insanoğlunun hem türlerin devamlılığını sağlamak hem de ürün kaybında olası bir azalmanın önüne geçmek için zararlılarla verdikleri mücadele neticesinde biyotik faktörlerle başa çıkmak mümkün hale gelmişken, son yıllarda insanoğlunun doğaya verdiği zararlar sonucu ortaya çıkan abiyotik faktörlere karşı yeterli önlemlerin alınmaması, ciddi boyutlarda ürün kaybına yol açarken aynı zamanda bilim dünyasında önemli bir araştırma konusu olmasına sebebiyet vermiştir. İstatistiksel verilere bakıldığında %26'lık payıyla diğer abiyotik faktörlere oranla en büyük payı alan kuraklık stresi; atmosfere verilen gazların sera etkisi yaratması sonucunda, dünya atmosferi ve okyanuslarının ortalama sıcaklıklarında belirlenen artışla ortaya çıkan küresel ısınmanın bir sonucu olarak devamında yeryüzü sularının azalmasıyla bitkilerin susuz kalmasına sebep olmaktadır. Bu durumda bitkiler dokularındaki su kaybını tolere edebilmek veya su kaybını azaltmak için Şekil 2.1'de belirtildiği üzere fizyolojik, morfolojik ve metabolik değişiklikler göstermektedirler (Anami *et al.* 2009).



**Şekil 2.1.** Yüksek bitkilerde kuraklık stresine fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıtlar (Güzel 2006)

## 2.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Mekanizmaları

Bitkiler çevresel su sıkıntısında hayatta kalmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Genetik anlamda kuraklığa dayanıklılık mekanizmaları Levitt (1980) tarafından kuraklıktan kaçma, kuraklıktan sakınma ve kuraklığa tolerans olarak üç grupta sınıflandırılmıştır. Bu mekanizmalardan kuraklıktan kaçma mekanizması bitkiler tarafından en sık olarak kullanılandır (Mitra 2001).

Kuraklıktan kaçma; toprakta ve bitkinin yapısında ciddi su eksikliği oluşmadan önce bitkinin hayat döngüsünü tamamlayabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Bu mekanizma hızlı fenolojik gelişim (erken çiçeklenme ve erken olgunlaşma) ve gelişim esnekliği (su eksikliğinin derecesine bağlı olarak büyüme periyodunun süresinde değişiklik) gibi süreçleri kapsamaktadır (Mitra 2001). Ayrıca bitki hayatta kalmak için kutikulanın gelişmesi, fiziksel ve kimyasal destek elemanlarının gelişmesi, stomaların büyüklüğünün, dağılımının ve yerleşiminin değişimi, oransal su içeriğinin artışı, kuraklığa vejetatif dokuların adaptasyonu, kuraklığa vasküler dokuların adaptasyonu, kurak ortamda üreme ve dölleme stratejilerinin gelişmesi, üretken hücrelerin korunması, su ileten ksilemin trakeidlerinin ligninleşmesi ve benzeri değişiklikler geçirerek yaşamını ve üretkenliğini korur.

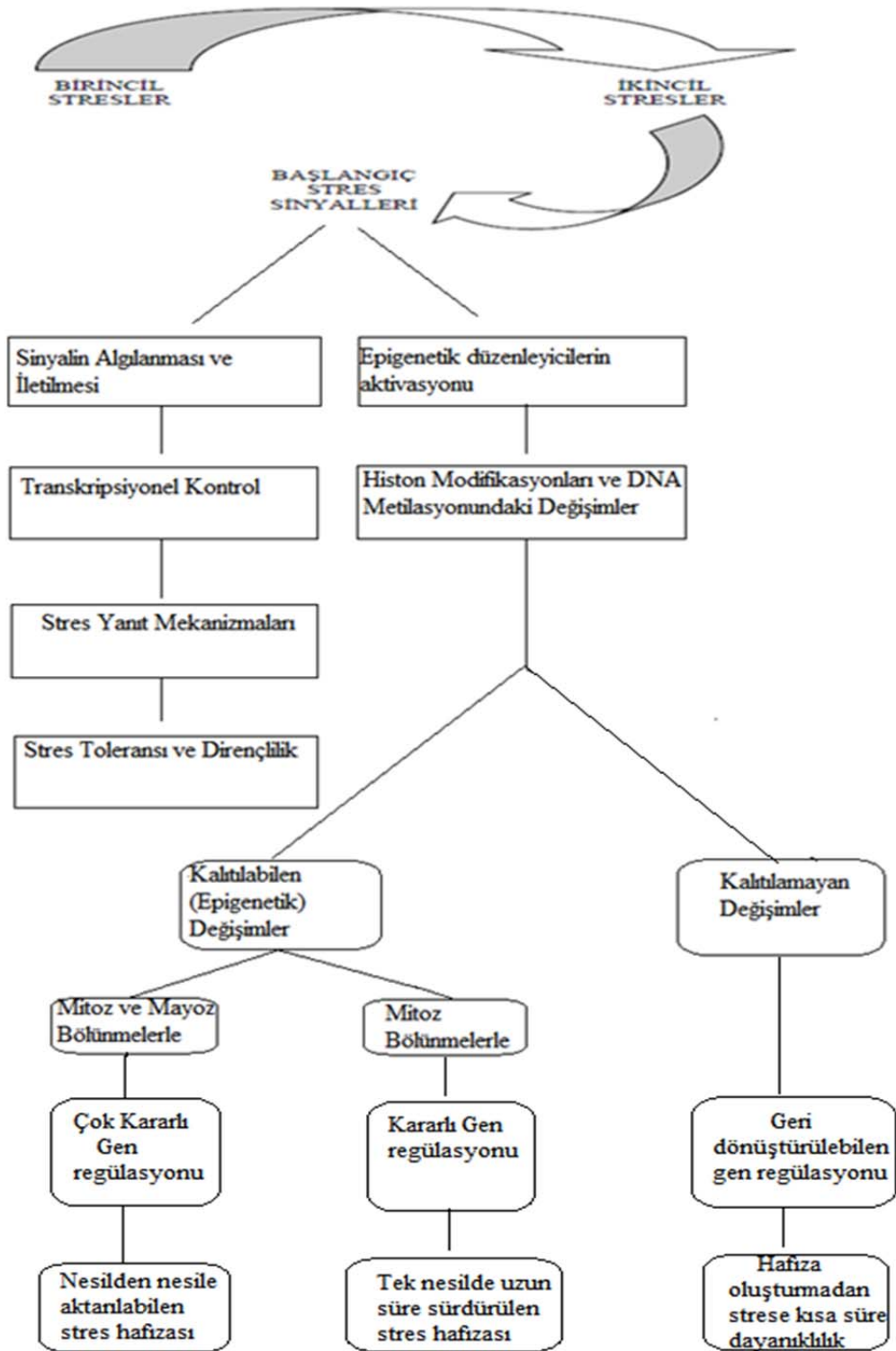
Kuraklıktan sakınma; toprakta nem yetersizliği durumunda bitkide yüksek su potansiyelinin devam ettirilmesine yardımcı olan bir mekanizmadır.

Kuraklık toleransı, düşük su potansiyeline sahip bitki dokularının su eksikliğine dayanabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Mitra 2001). Bitkilerin kuraklık toleransında en önemli unsurlardan biri şeker ve diğer çözünen maddelerin kullanılmasını gerektiren osmotik düzenleme ile su potansiyelinin korunmasıdır. Kuraklık toleransı, bitkilerin normal metabolik aktivitelerini devam ettirmelerini sağlamakta aynı zamanda uzun süreli kuraklığın neden olduğu hasarın etkisini sınırlayan mekanizmaları içermektedir (Courtois *et al.* 2000). Bitkilerin kuraklığa toleransının, hücrelerin hem mekanik zararlara dayanıklılığına hem de membran ve

sitoplazmanın protein denatürasyonuna dayanma kabiliyetine bağlı olduğu kaydedilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla geleceği tehdit eden küresel ısınmanın yol açtığı kuraklığın bitkiler üzerinde oluşturduğu stresin etkisini minimal düzeye indiren başka bir deyişle kuraklığa toleranslı bitkilerin yetiştirilmesi hız kazanmıştır.

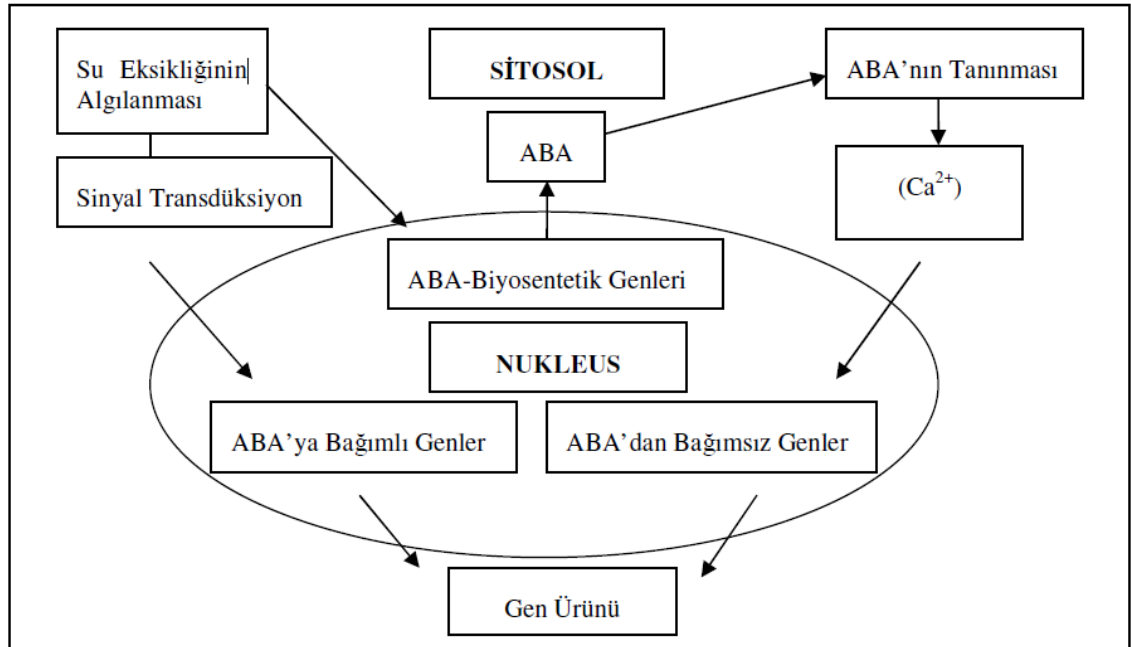
Bitkiler hayatta kalmak için her ne kadar çeşitli mekanizmalar geliştirseler de stresin oluşturduğu hasardan tam anlamıyla kurtulamazlar. Verimliliği anormal derecede etkileyen abiyotik stres faktörleri bitkiler için birincil stres faktörleri olarak kabul edilmektedirler. Bu faktörler; osmotik stres, oksidatif stres ve iyonik stres gibi ikincil stres faktörlerini tetiklemektedir. İkincil stres faktörleri hücrede osmotik ve iyonik dengenin bozulmasına, yapısal ve işlevsel proteinlerde ve hücre zarında hasara, dolayısıyla hücre zarı akışkanlığında değişikliğe yol açar. Hücrede oluşan bu olumsuzluklar başlangıç stres sinyalleri olarak ifade edilmektedir. Başlangıç stres sinyalleri; hücrede bozulan dengenin geri kazanılması, hücre zarında meydana gelen hasarların onarılması ve proteinlerin korunmasında işlevsel olan stres yanıt mekanizmalarını aktive eden sinyal sürecini ve transkripsiyonun kontrolünü uyarır. Bu şekilde bitkide stres toleransı sağlanmış olur.

Başlangıç stres sinyallerinin etki ettiği bir diğer mekanizma Şekil 2.2’de belirtildiği üzere epigenetik düzenlemeler üzerinedir. Stres mitoz ya da mayoz yoluyla kalıtılan epigenetik düzenleyicilerin ifadesinin değişmesine yol açarak gen regülasyonunun kararlı olmasını ve nesilden nesile aktarılan stres hafızasının oluşmasını sağlar (Chinnusamy and Zhu 2009).



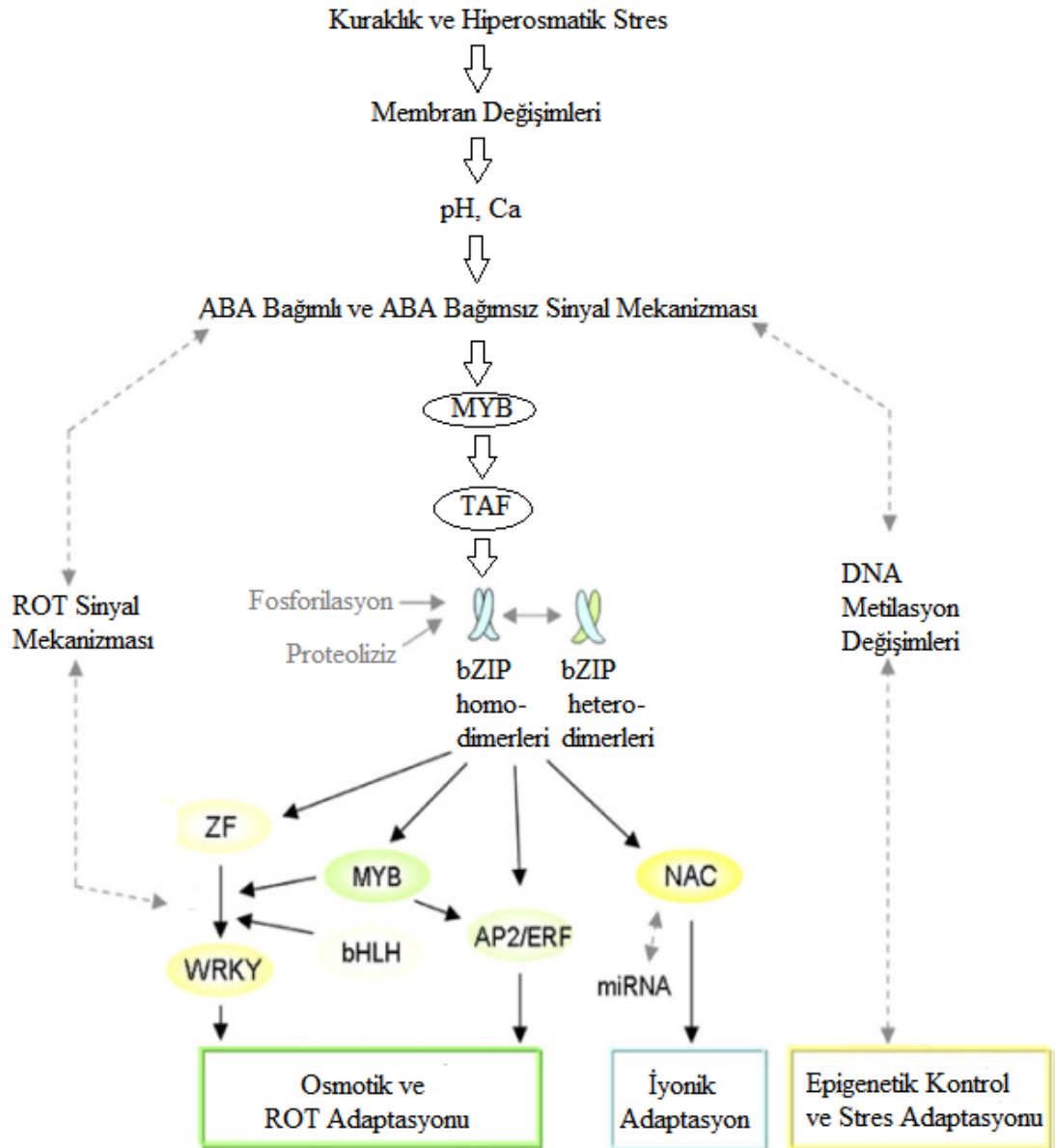
Şekil 2.2. Başlangıç stres sinyallerinin etki ettiği mekanizmalar (Chinnusamy and Zhu 2009)

Başlangıç stres sinyallerinin algılanması sonucu stres mekanizmasının devreye girmesiyle spesifik genler aktive edilmektedir. Bazı genler kuraklık stresine oldukça hızlı cevap verirken; bazıları hücre içerisindeki ABA birikiminden sonra, yavaş bir şekilde indüklenmektedir. Kuraklık stresine yanıt olarak sentezlenen ABA bitkilerin abiyotik strese yanıtında en önemli düzenleyicidir. Su kaybı ABA üretimini tetikler ve sentezlenen ABA çeşitli genlerin indüklenmesini uyarır. Su stresi ile indüklenen birçok gen dışarıdan yapılan ABA uygulamalarına karşı duyarsız kalmakla birlikte, bazısının ABA uygulamalarına karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu da, hem ABA'ya bağımlı hem de ABA'dan bağımsız sinyallerin varlığını öngörmektedir (Şekil 2.3.) (Bray, 1993, 1997; Chinnusamy *et al.* 2004). *Arabidopsis*'te ABA yoksun mutantlarında stres altında hücresel faaliyetlerde görülen aksaklıklar hücrenin ABA'ya bağımlı olduğunu göstermektedir. Ancak 1994 yılında yayınlanan bir çalışmada DRE (dehydration responsive element) dizisinin tanımlanması ve bu dizinin ABA tarafından aktive edilmeden kuraklık stresine karşı bitkide osmotik dengeyi ayarladığının bulunması hücrenin ABA'dan bağımsız olduğunun kanıtıdır (Zhu 2002).



**Şekil 2.3.** ABA bağımlı- ABA bağımsız genlerin ekspresyon mekanizması

ABA sinyal mekanizmasının Şekil 2.4'te gösterildiği üzere transkripsiyon faktörleri aracılığıyla hem ROT mekanizmasını aktive ederek osmotik ve iyonik adaptasyonu sağladığı, hem de DNA metilasyonunda değişimlere yol açarak stres adaptasyonunun epigenetiksel düzenlemesini yaptığı bilinmektedir.



Şekil 2.4. ABA sinyal mekanizması (Golldack *et al.* 2011)



### 2.3. Poliaminler

İlk kez 300 yıldan daha eski bir zamanda insan spermatozoasında keşfedilen poliaminler en köklü biyokimyasal gruplardan biridir (Alcazar *et al.* 2010). Poliaminler bütün canlı organizmalarda bulunan, prokaryot ve ökaryotlarda büyüme ve gelişme olaylarında önemli rolleri oldukları bilinen düşük moleküler ağırlıklı maddelerdir. Hücre içerisinde tek başlarına bulunabildikleri gibi, fenolik asit gibi düşük molekül ağırlıklı bileşenlerle veya protein ya da nükleik asit gibi makromoleküllerle birlikte de bulunabilirler. Genç dokularda hücre bölünmesi ve büyümesine aracılık ettiği, yaşlı bitkilerde senesensi durdurma ya da geciktirmede önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Bu etkilerin poliaminlerin nükleik asit ve membranlarla yaptığı elektrostatik bağlarla bağlanmasıyla oluştuğu düşünülmektedir (Saruhan 2002). Katyonik yapılarından ötürü çevresel stres koşullarında ve çeşitli fungal infeksiyonlarda büyüme ve gelişme üzerine gösterdikleri bir takım fizyolojik etkilerin yanı sıra, DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon olaylarını da stimüle ettikleri bilinmektedir. Poliaminlerin ve bunların biyosentetik enzimlerinin bitkileri strese karşı korumaya yönelik olarak hücre bölünmesinden organogeneze kadar değişen geniş bir metabolik olaylar zincirinde yer aldığı ortaya konmuştur.

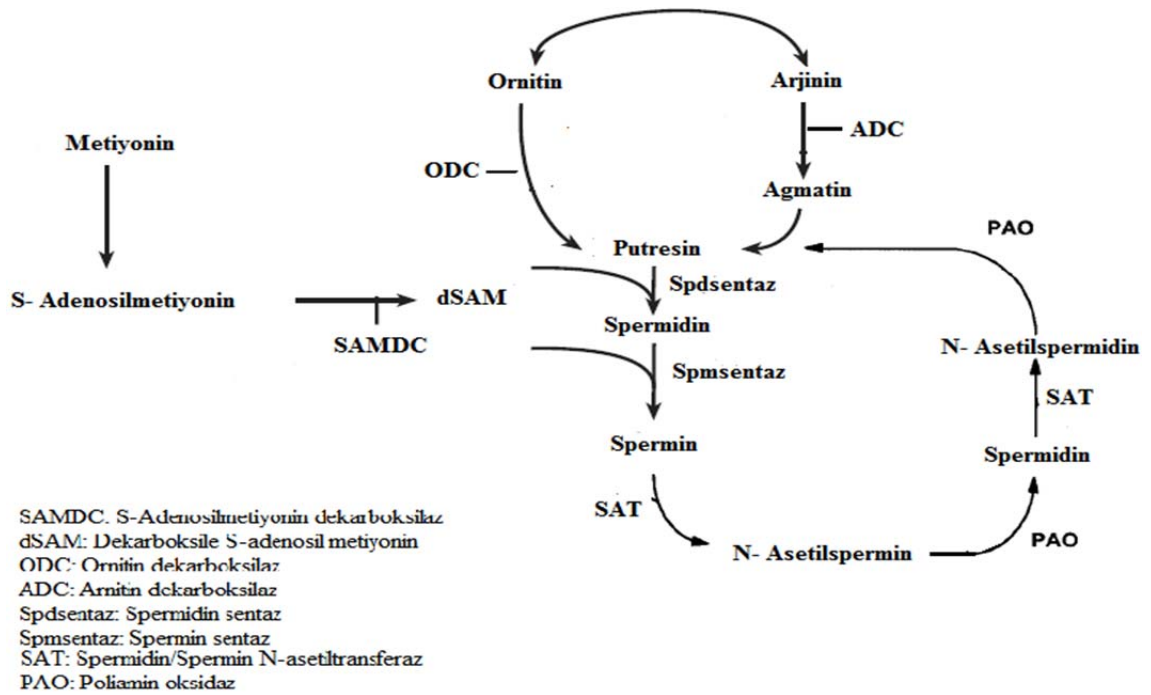
Bir aminoasit türevidir olan poliaminlerin Putresin (Put.), Kadaverin (Cad), Spermidin (Spd.) ve Spermin (Spm.) olmak üzere 4 tipi bulunmaktadır. Bunlardan Putresin ve Kadaverin bir Diamin, Spermidin Triamin ve Spermin ise Tetraamindir (Liu *et al.* 2000). Putresin içlerinde en yüksek oranda bulunandır. Yapılan çalışmalarda portakal, portakal suyu, mandalin, greyfurt suyu, ketçap, donmuş yeşil bezelye ve fermente soya sosu gibi test edilen besinlerin kilogramında 40 mg. putresin bulunmuştur. Spermidin'e ise sperminden daha yüksek oranda rastlanmıştır. Baklagiller, armut, soya, karnabahar ve brokoli gibi besinlerde spermidin kilogramda 30 mg olarak bulunmuştur (Kalac and Krausava 2005).

Genel olarak poliamin miktarı meristematik ve aktif büyüme özelliğindeki dokularda yüksek oranda bulunurken senesensli dokularda düşük oranda bulunmaktadır (Neves *et*

al. 2002). Poliaminlerin hücre içerisindeki seviyelerindeki artış özellikle, su eksikliği, tuz stresi, asit stresi, potasyum eksikliği, oksijensizlik ve çevresel streslere karşı yanıt olarak ortaya çıkmaktadır (Flores ve ark. 1989).

#### 2.4. Poliamin Biyosentez Mekanizması

Poliaminler doğrudan ornitin dekarboksilaz tarafından ornitinden veya dolaylı olarak arjinin dekarboksilaz tarafından arjininden sentezlenmektedir (Şekil 2.5.) (Sannazzaro *et al.* 2004). İlk sentezlenen poliamin putresindir. Putresin önce spermidin sentaz tarafından spermidine, daha sonra spermin sentaz tarafından spermine dönüşmektedir. Bu dönüşümler esnasında sadece enzimler görev almazlar. S- adenosil metiyonin dekarboksilaz (SAMDC) tarafından S-adenosil metiyonin (SAM)'den türevlenen dekarboksile S-adenosil metiyonin (dSAM)' de bu enzimler tarafından katalizlenerek reaksiyona katılır. Ancak bu geri dönüşümlü bir reaksiyondur. Yani enzimatik reaksiyonlar sonucu spermin tekrar spermidine, spermidin ise putresine dönüşebilmektedir (Kaur- Sawhney *et al.* 2003).



Şekil 2.5. Poliaminlerin biyosentez mekanizması (Siu *et al.* 2002)

## 2.5. Epigenetik

Epigenetik terimi, 1940'da Conrad Waddington tarafından ilk kez genlerin çevreleriyle etkileşimi ile fenotipe yansması olarak tanımlanmıştır (Waddington 1942). Hücre farklılaşması ve gelişmesi sırasında gen düzenlenmesinde takip eden araştırmalarda epigenetik temeliyle ilgili sorular artmıştır. İlk epigenetik çalışmalarda, heterokromatin geç replike olan, tekrarlanan satelit elementlerini içeren, düşük gen yoğunluklu genom bölgeleri olarak açıklanmıştır. Daha sonra, heterokromatin ve ökromatinin; belli gen aktivitesi bölgeleriyle ilişkili histon modifikasyonu örnekleri olduğu ve farklı DNA metilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu olay, gen ifade eden kararlı kromatin bölgelerine epigenetik kod denilmesine yol açmıştır (Jenuwein and Allis 2001; Wang *et al.* 2004). Gen ifadesinde kalıtsal farklılıklar; bitkilerde paramutasyondan dolayı gen susturulması, memelilerde X-inaktivasyonu ve genetik imprinting gibi gen düzenlenmesi karmaşıklığı öne çıkarılmıştır. Bu yüzden günümüzde epigenetik, nükleotit sekans farklılıklarından kaynaklanmayan gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler gibi tanımlanır. Metilasyon değişiklikleri ve hücre hatlarında katlanan ifade gibi geleneksel genomik kaynaklar, birincil dokulardan pek çok hücre tipi meydana getirebilir. Ayrıca epigenetik değişiklikler yaş ve beslenme gibi dış faktörlerin bir sonucu olarak da meydana gelebilir.

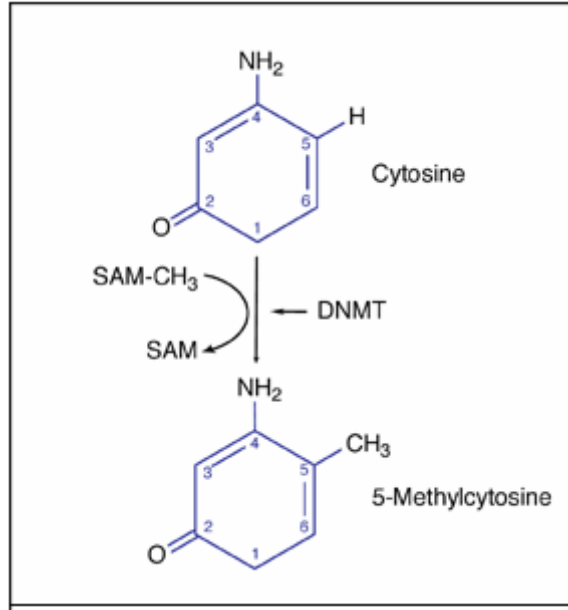
Bütün genomun metilasyon analizleri için, anahtar parametreler, metilasyon seviyesinin sayısal olup olmadığı ve pek çok gende birden çok CpG'lerin analiz edilip edilmediği gibi yöntemler kullanılır. DNA metilasyonu analiz yöntemleri; ya PCR temelli ya da metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri temelli yöntemler olarak sunulabilir (Murrell 2005).

## 2.6. DNA metilasyonu

60 yıl önce gelişmiş bitkilerin DNA'sına dört temel baz olan (G,A,T,C)'e ek olarak 5-metilsitozin ( $m^5C$ ) içeriği bulunmuştur (Wyatt 1950). Ayrıca, bitki DNA'larında  $m^5C$  içeriği bazı taksonomik öneme sahip bir özellik olarak kabul edilmiştir. Çünkü çiçekli

bitkilerin DNA'larında arkegonatların DNA'sından daha fazla m<sup>5</sup>C içerdiği tespit edilmiştir. Daha sonra, yüksek bitki DNA'sında N<sup>6</sup>-metiladenin bulunabileceği gözlenmiştir (Vanyushin *et al.* 1971). Uzun bir süre, DNA'da bulunan metillenmiş bazların kökeni bilinmemiştir. Çeşitli bitkilerde yapılan *in vivo* deneylerinde DNA'daki nükleozidlerin veya radyoaktif m<sup>5</sup>C katılımlarının bulmak için yapılan girişimler başarısız olmuştur (Sulimova *et al.* 1978). Kromatin konformasyonundaki değişiklikler, gen ifadesinin düzenlenmesine yardım eden yollardan biri olduğu kanıtlanmıştır.

Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli olaylardan biri de, DNA bazlarına metil grubunun eklenmesi ya da bu bazlardan metil grubunun çıkarılmasıyla ortaya çıkan kimyasal bir değişikliktir (Kass *et al.* 1997). Birçok ökaryotik organizmanın DNA'sı, metil gruplarının enzim (DNA metiltransferaz) aracılığıyla bazlara eklenmesiyle replikasyondan sonra değiştirilir. Metillenme, DNA'daki CG çiftleri halinde bulunan sitozinlerde ve genellikle de her iki zincirde birden olur. Metilasyon, DNA dizisindeki guaninin önünde yerleşmiş sitozinlerin (CpG) 5. konumundaki karbonuna metil grubu bağlanması ile gerçekleşmekte ve bölgesel hipermetilasyon, promotor bölgede bulunan CpG adacıklarını etkileyerek genin aktivitesini durdurmaktadır (Şekil 2.6.) (Delgado *et al.* 1998). CpG adacıkları, genellikle hedef noktalarıdır ve 1–2 kb uzunluğundadır. Genin içinde ya da genin promotor bölgesi yakınında ve genlerin 1.ekzon bölgelerinde yer alırlar. CpG adalarının genomda görülme sıklığı %5–10 arasındadır. DNA metilasyonu 1948 yılında Hotchkiss tarafından ilk olarak keşfedilen epigenetik marker olmuştur (Patel 2003). Bazların metillenmesi genellikle sitozinden olur ve belirli herhangi bir ökaryotik organizmanın sitozinlerinin yaklaşık %5'i metillenir. Ancak, metilasyon derecesi dokuya özgüdür ve %2'den %7'nin üzerine çıkacak şekilde değişiklik gösterir. Baz metilasyonunun gen ifadesini değiştirdiğinin ortaya çıkarılması, *E. coli*'nin *lac* operonu ile yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Operatör bölgedeki DNA'da tek bir sitozinin metillenmesi bile, reseptörün operatöre olan ilgisinde fark edilebilir bir değişiklik meydana getirebilir. Sitozin 5' ucundan metillenir, böylece metil grubu DNA sarmalının büyük oluğundan dışarı çıkıntı yapar ve proteinlerin DNA'ya bağlanmasını etkiler (Michalowsky and Jones 1989).



**Şekil 2.6.** DNA metilasyon mekanizması

1963 yılında metil gruplarının varlığında DNA'da metillenmiş adenin ve sitozini tanıyabilen spesifik enzimler, ökaryotlarda ve bakterilerde bulunmuştur (Hausmann and Gold 1966). Uzun bir süre, *Drosophila melanogaster*'in genomunda m<sup>5</sup>C bazı belirlenememiştir. Bu yüzden bu durum bilim adamlarına DNA modifikasyonlarının ökaryotik organizmaların yaşamında esas rolü olmadığını düşündürmüştür. Son zamanlarda ise, *Drosophila* DNA'sının metillendiği ve bu DNA modifikasyonun normal böcek gelişimi için esas olduğu görülmüştür (Gowher *et al.* 2000). Bitkilerde sitozinler hem simetrik (CpG veya CpNpG) hem de asimetrik (CpNpNp) olarak metillenebilir. DNA metilasyonu gen transkripsiyonunu iki şekilde etkileyebilir. Birincisi, DNA'nın metillenmesi transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyebilir, ikincisi metillenmiş DNA metil-CpG'ye bağlanıcı bölge proteinleri (MBD) tarafından bağlanır. MBD proteinleri, histon deasetilazlar ve histonları modifiye edebilen kromatin şekillendirici proteinleri teşvik ederek sessiz kromatin olarak adlandırılan kompakt ve inaktif bir kromatin yapısı oluşmasını sağlar. Bitkilerde, özellikle model organizma *Arabidopsis thaliana*'da, DNA metilasyonunun anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmiştir. Memelilerde metilasyonun CpG dizilerindeki sitozinde metillenmesine karşın, bitkilerde sitozin CpG, CpNpG ve

CpNpN dizilerinde de metillenir. DNA metilasyonunda görev alan metiltransferaz enzimlerin iki sınıfı vardır: DNMT'ların C terminal bölgesi katalitik aktiviteden sorumlu iken, N terminal bölgesi düzenleyici fonksiyona sahiptir.

1.si DNA'da yeni metil grupları ekleyen *de novo* sınıfı

2.si DNA replikasyonu sırasında ana moleküldeki metil gruplarını tanıyıp yavru ipliklerde aynı konumlarda metil grupları ekleyen sürdürücü sınıfıdır (Martin and Zhang 2007).

Şu ana kadar memelilerde 5 farklı DNA metiltransferaz (DNMT) saptanmıştır; DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L şeklindedir. DNMT1; DNA replikasyonundan sonra oluşan yeni DNA zincirindeki metilasyondan sorumludur. DNMT1 özellikle hemimetilasyon ile DNA'ya afinite göstermektedir. Yapılan fare deneylerinde DNMT1'in kaybının ölümcül olduğu gösterilmiştir. DNMT1'den yoksun fare embriyoları gastrulasyon aşamasından sonra genom genelindeki demetilasyona bağlı olarak öldükleri tespit edilmiştir. Bunun yanında enzimin aşırı ekspresyonunun kanser hücre hatlarında *de novo* metilasyona neden olduğu gösterilmiştir. DNMT1'in çift DNA bağlanma bölgesi vardır. C terminal ucundaki bölge metile olmayan DNA'ya bağlanırken, N terminal ucundaki bölge metile DNA'ya bağlanmaktadır.

DNMT3a ve DNMT3b erken gelişim döneminde gözlenen *de novo* metilasyonu gerçekleştirmektedir. DNMT3L gametogenez sırasında eksprese edilir; DNMT3a ve DNMT3b ile benzer homolojiyi paylaşırsa da ağırlıklı olarak maternal genomik imprintlenmede rolü bulunmaktadır. DNMT3a ve DNMT3b'den yoksun farelerde morfolojik bozukluklar gözlenmekte ve bu fareler erken gelişim evrelerinde ölmektedir. DNMT3b, DNMT3a'dan farklı olarak sentromerik minör satellit tekrarlarının metillenmesi için gereklidir. DNMT2, metiltransferazlara ait klasik sekans motiflerini taşısa da şu ana kadar DNA metilasyonundaki rolü saptanamamıştır.

Bitkilerdeki DNA metiltransferazlar memelilerden farklılıklar göstermektedir. *Arabidopsis*'teki esas DNA metiltransferaz enzimleri DRM2, MET1 ve CMT3'dür.

DRM2 ve MET1 proteinleri memeli metiltransferazları olan, sırasıyla DNMT3 ve DNMT1 ile önemli derecede homoloji gösterirler. CMT3 ise bitki âlemine özgü bir enzimdir. DRM2, *de novo* DNA metiltransferaz olan tek enzimdir. Ayrıca DRM2, MET1 ve CMT3 ile birlikte DNA replikasyonu sırasında metilasyonun korunmasını sağladığı da görülmüştür.

Bitkilerde başka DNA metiltransferazlar da ifade edilmektedir ama işlevleri ve *novo* metilasyon yerlerinin nasıl belirlendiği bilinmemektedir. Çoğu durumda RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) olduğuna dair bulgular vardır. RdDM'de spesifik RNA transkriptleri çift iplikli yapılar oluştururlar. İki iplikli RNA'lar, RNA'yı üreten orijinal genom bölgesi için *de novo* DNA metilasyonunu yönlendirirler. Bu mekanizmanın RNA virüslerine veya transpozonlara karşı hücrel savunmada önemli olduğu düşünülmektedir. Çünkü bunların her ikisi de konak genomda mutasyonlara yol açabilecek çift iplikli RNA oluştururlar. Henüz iyi anlaşılamayan bir mekanizmayla bu zararlı bölgelerin metillenmesi sonucu, genlerin ifadesi sonlandırılır ve mutajenik etkilerden korunmuş olunur (Vanyushin and Ashapkin 2011).

Çeşitli çalışmalarda bitkilerde DNA metilasyonlarının replikasyon ve postreplikasyondaki farklılıkları araştırılmıştır. Metilasyonun DNA replikasyonu ve transkripsiyon kontrolünü sağladığı önerilir. Atasal ipliklerle yavru iplikçikler karşılaştırıldığında düşük metilasyon seviyesi bu ürünlerde asimetric bir şekilde metillenen DNA dubleks replikasyon sonuçları olarak kabul edilir. Bu asimetric iplikçikler yeni DNA replikasyonu başlamadan önce hücre siklusunun sonuna doğru yavaş yavaş azalır ve sonunda tamamen kaybolur. Bölünen hücrelerde asimetric metillenen DNA moleküllerinin replikasyonu epigenetik işaretlerin kaybına yol açacağı için her nasılsa yasaklandığı önerilmiştir (Vanyushin and Ashapkin 2011).

## 2.7. Restriksiyon Endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazları olarak bilinen restriksiyon enzimleri kısa uzunluktaki spesifik DNA sekansına sahip enzimlerdir. Bu enzimler bakteriler tarafından yabancı

DNA'ların kesilmesi için savunma amaçlı üretildiği düşünülen enzimler olarak bilinmektedirler. Bakteri, kendi DNA'sını metilleyerek kendi ürettiği enzimin kesimine karşı koruma mekanizması geliştirdiği bilinmektedir. Restriksiyon enzimleri çift zincirli DNA üzerinde tanıdıkları spesifik alanlara tutunurlar. Pek çok restriksiyon enzimi tanıdıkları bölgede tek veya çift zincirde metillenme oluştuğunda DNA'yı kesemeyecekleri gözlemlenmiştir. Her restriksiyon endonükleazların uygun aktivite oluşturmaları için kendilerine özgü gereksinimleri vardır. İdeal saklanma ve test koşulları belirli enzim fonksiyonlarında en yüksek doğruluk ve aktiviteye sahip olurlar. Sıcaklık, pH, enzim kofaktörü, tuz bileşimi ve iyonik gücü gibi koşullar enzim aktivitesini ve sabitesini etkileyecektir. Çalışmamızda metilasyona duyarlı olan *Hpa* II ve *Msp* I restriksiyon enzimleri kullanılmıştır.

### 2.7.1. *Hpa* II

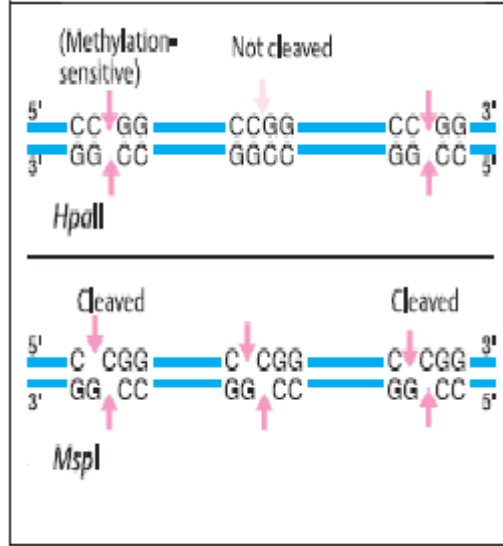
Restriksiyon enzimi olan *Hpa* II ile genomik kesimler oluşturulmaktadır. *Hpa* II enzimi, *Hemophilus parainfluenzae* bakterisinden izole edilmiştir. *Hpa* II, DNA metilasyonu ile inhibe olur ve C<sub>m</sub>CGG sekansını kesemedikleri bilinmektedir. Genom, metilasyonun olmadığı bölgede bölünür ve CpG'lerin metillendiği yerlerde bölünür. Büyük fragmentin *Hpa* II kesiminden oluştuğu düşünülür. Küçük fragmentlerin ise bu olaydan oluştuğu düşünülmemektedir. Onlara *Hpa* II tiny fragments (HTFs) denilir. Bunları içeren bölgeler de HTF adacıkları diye adlandırılmıştır. HTF adaları, genlerin yanında yerleşime eğilimlidir, genellikle genlerin 5' kenarındadır. G+C çok zengindir. HTF adalarında CpG sekansları metillenmemiştir. Eğer buralarda metillenme yoksa mutasyon ile CpG'nin ileri kaybı olmamalı ve böylece bu sekans sıklığı G+C içeriğini yansıtmalıdır.

### 2.7.2. *Msp* I

Genomik kesimlerin yapıldığı bir restriksiyon enzimidir. *Msp* I enzimi, *Moraxella* cinsi bakteriden izole edilmiştir. *Msp* I enzim ampikonları 5'<sup>m</sup>CGG3' tanıma bölgesinden



keser ve her alt grup için farklı DNA parçaları oluşturur. Böylece iç sitozinde metillenme olduğunda aktif oldukları bilinmektedir.



Şekil 2.7. Restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri

## 2.8. Genetiksel ve Epigenetiksel Değişiklikleri Belirlemede Kullanılan Moleküler Markırlar

Genom üzerinde belli bir bölgeyi tanılamak için kullanılan genetik işaretlerdir, DNA'nın geniş bir kısmının veya tek bir spesifik nükleotidin simgesi olabilirler. Son yıllarda bitki araştırmacıları tarafından çok yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lardan aldıkları için, bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilir (Gülşen ve Mutlu 2005). Bu markırlar yardımıyla araştırmacılar morfolojik olarak çok benzerlik gösteren tür, çeşit veya tipler ve ebeveynleri hakkında kesin bilgiler elde edebilmektedirler (Karaca vd 2002). Moleküler markırlardan genel olarak seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde ve genetik toksikolojide yararlanılmaktadır (Bilgin ve Korkut 2005).

Moleküler markırlar çeşitli avantajlara sahiptir. Bunlar; **1)** çevre faktörlerinden etkilenmezler, **2)** çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir, **3)** genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofikdir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi), **4)** her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orjini tespit edilebilir, **5)** sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir. DNA markırlarında amaç, bireyler (çeşit, hat, tür vb.) arasındaki DNA seviyesinde farklılığın ortaya çıkarılmasıdır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. DNA seviyesinde bunu yapmanın başlıca avantajı, herhangi bir DNA zincirinin iki birey arasındaki allelik farklılığı gösterebilmesidir. Bunun için o DNA dizisinin herhangi bir proteini kodlayıp kodlamadığını bilmeye gerek yoktur (Gülşen ve Mutlu 2005).

Genetik markırlardaki (varlık, yokluk veya sekans değişimiyle) varyasyonun genlerdeki varyasyonu temsil ettiği bilgisinden hareketle bu markırların genetik araştırmalarda kullanımı fikri doğmuştur. DNA seviyesindeki farklılıkları saptamak üzere geliştirilmiş ve genetik toksikolojide kullanılan moleküler markırlardan bazıları şunlardır; RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism), CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification) teknikleridir.

### **2.8.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA/ Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA)**

RAPD' in temeli yaklaşık 10bp uzunluğunda ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanır (Williams *et al.* 1990). Bu primerler tasarlanırken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha fazla olmasına dikkat edilir (Gregor *et al.* 1994). Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir primer kullanılır, ancak bu primer her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılır. Dolayısıyla kullanılan primerler genomun birden fazla bölgesine yapışır ve genel olarak yöntem şu aşamaları içermektedir; Primerleri içeren PCR reaksiyonlarıyla hedef bölgeler

kopyalanır, spesifik DNA zincirleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra Et-Br veya gümüş nitrat ile tespit edilir. Teknik, çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, daha az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kaliteli DNA ile çalışılabilmesi gibi bir takım avantajlara sahiptir (Yıldırım ve Kandemir 2001; Karaca vd 2002; Temizkan ve Arda 2004). Ayrıca polimorfizm oranı diğer tekniklerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (Whitkus 1994). Ancak RAPD markırlarının bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri, dominant özellikte markır vermesi, diğeri de RAPD markırlarının tekrarlanabilirliğinin, PCR ve DNA tespiti sırasında şartların tam olarak kontrol edilememesi nedeniyle düşük olmasıdır (Dos Santos *et al.* 1994; Harris 1999). RAPD verilerinin tekrarlanabilirliği için amplifikasyon reaksiyonlarının her bir basamağının dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gerekir (Michelia and Bova 1997).

### **2.8.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/ Çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi)**

RFLP ve RAPD kombinasyonu ile oluşturulmuş hibrit bir tekniktir. Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmentlerinin adaptör DNA ile birleştirilmesinden sonra arka arkaya yapılan iki PCR reaksiyonu ve bu reaksiyonlarda seçici primer kullanılmasıyla yürütülür (Zabeau and Vos 1993). Bu markır sisteminin temeli, PCR'la daha önceden iki enzimle kesilip uygun adaptörler bağlanmış DNA fragmentlerinden bir kısmının klonlanması ve tespitidir. Adaptörün ve onun bağlandığı restriksiyon dizini, DNA primerlerinin bağlanma yeri olarak görev yapar. Seçici baz primerin 3' ucuna eklenir. Her iki primer çiftinin sonundaki seçici bazlar değiştirilerek veya değişik kombinasyonlarda kullanarak her seferinde yeni fragmentler klonlanır ve bu yolla yeni polimorfizm elde edilir ki bu özellik yöntemin en büyük avantajını oluşturur (Gülşen ve Mutlu 2005). Son amplifikasyon ürünleri poliakrilamid jelde yürütülür ve farklı genotiplere ait, farklılık gösteren bantlar gümüş boyama ve radyoaktif işaretli primerlerle tespit edilir. Polimorfizm oranı oldukça yüksektir (Yıldırım ve Kandemir 2001). Az miktarda ve daha saf DNA gerektirir. Farklı primer kombinasyonları

kullanılarak sınırsız sayıda marker geliştirilebilir. Bu amaçla, bitki moleküler biyolojisinde genetik haritalandırma çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **2.8.3. CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification/ Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım)**

Epigenetik varyasyonların temel sebeplerinden biri olan DNA metilasyonunu belirleyen bir metottur. Metilasyona duyarlı enzimler ile DNA kesildikten sonra gelişimin farklı aşamalarında veya farklı dokular arasındaki metilasyon değişikliklerini belirlemede kullanılır. Bu teknik, diziler ve türler arasındaki varyasyon çalışmaları için kullanılmış olabilir. Genom metilasyonu *Msp* I ve *Hpa* II restriksiyon enzimleri kullanılarak analiz edilir. Her iki enzimde CCGG sekansını tanır. Fakat *Hpa* II yalnızca sitozinler metillenmediğinde aktiftir. Oysaki *Msp* I dış sitozin metillendiğinde DNA'ya yapışamaz. Önce DNA RAPD yöntemi ile PCR'da çoğaltılır. Sonra restriksiyon enzimleriyle DNA kesilir ve tekrar PCR çoğaltılarak değerlendirmeler yapılır.

### **2.8.4. MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism/ Metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi)**

MSAP; AFLP nin modifiye edilmiş halidir. MSAP sabit genotiplerde sitozin metilasyonundaki değişimleri bulmak için etkili bir metot olarak kanıtlanmıştır. Bu metodda bir çift metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri kullanılır. Bunlar *Hpa* II ve *Msp* I (bunlar bir çift izoşizomerlerdir) 4 nükleotidli CCGG bölgelerini tanırlar. Fakat bunlar iç veya dış sitozindeki metilasyona farklı duyarlılıktadır. Çünkü MSAP'deki yaygın restriksiyon enzimleri sadece uygun boyuttaki dizileri üretmek için DNA tamamen parçalanmasını sağlamakta kullanılır. *Eco*RI+*Hpa*II ve *Eco*RI+*Msp*I arasında fark yoktur. *Hpa* II eğer bir ya da tüm sitozinler tamamen metillenmiş ise inaktiftir. Fakat *Msp* I yarı metillenmiş sekansları keser. C5mCCGG bölgesini keser ama 5mCCGG'yi kesemez. Kesilen parçalar T4 DNA ligaz ile adaptörlere bağlanılır. Sonra PCR reaksiyonuna bırakılır. Yaygın olan kriter puanlamasına (1,0 yöntemi) rağmen doğal bitki populasyonlarındaki DNA metilasyonlarında polimorfizmin bir değişimine

izin verilmez. Orada farklı genotiplerle ilgilidir. Doğal bitki populasyonlarında metilasyon değerlendirilmesinin MSAP ile vermek için burada genetik varyasyonlarının karıştırıcı etkileri nedeniyle kriter puanlama değiştirilerek kullanılmıştır. Özellikle her iki enzimin bulunduğu H/M (1/1), sadece biri bulunduğu H/M (1/0) veya H/M (0/1) eğer bant yoksa H/M (0/0) şeklinde değerlendirme yapılır. Polimorfik lokusların yüzdesiyle epigenetik uzaklıklar hesaplanır.

### **3. MATERİYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

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

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen ve kuraklığa hassas olduğu bilinen *Triticum aestivum* cv. Karasu 90 çeşidi kullanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen kök, gövde ve yapraklardan yararlanılmıştır.

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

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı:

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 (Nuairie, U.S.A. , -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)

Hassas Terazî (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)

### **3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar**

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıda verilmiştir:

#### **3.1.3.a. Kullanılan Polietilenglikol (PEG6000) çözeltilerinin hazırlanışı**

Osmotik potansiyeller Michel and Kaufmann (1973)'a göre PEG6000 kullanılarak sağlanmıştır.

0 Bar	1000 ml Saf su
-2 Bar	119,6 g/lit PEG6000
-4 Bar	178,5 g/lit PEG6000
-6 Bar	223,8 g/lit PEG6000

#### **3.1.3.b. Kullanılan Putresin (Put) çözeltilerinin hazırlanışı**

0 mM	1000 ml Saf su
1 mM	88,15 mg Put
0,1 mM	8,815 mg Put
0,01 mM	0,8815 mg Put

### 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	$\beta$ -merkaptoetanol	(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 kullanıldı (Sigma, 77617).

#### Kloroform: İzoamil alkol:

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

#### TE tamponu:

10mM	Tris-HCl	(pH 8,0)
1mM	EDTA	(pH 8,0)



**%70'lik Etil Alkol:**

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

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

500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300 µl etidyum bromür ilave edilerek hazırlandı. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi.

**Bovin Serum Albumin:**

1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovin serum albumin olacak şekilde hazırlandı. -20<sup>0</sup>C'de muhafaza edildi.

**Bromfenol Blue Çözeltisi:**

0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4<sup>0</sup>C'de muhafaza edildi.

**0,5X TBE tamponu:**

Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak satın alındı ve 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlandı.

**Primerlerin Hazırlanması:**

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlandı.

**3.1.3.e. Sterilizasyon İşlemleri İçin Kullanılan Çözeltiler****%1'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit):**

%5 NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari *Domestos®* marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

**%75'lik Etil Alkol:**

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

**3.2. Yöntem****3.2.1. Putresin ve PEG6000 çözeltilerinin bitkiye uygulanması**

Eşit boyutlarda seçilen *Triticum aestivum* cv. Karasu 90 çeşidine ait tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %75'lik etil alkolde 5 dk karıştırılıp steril saf sudan geçirilmiş ardından %1'lik NaOCl'de 10 dakika steril edilmiştir. Tohumlar dört kez saf su ile durulanmış ve steril filtre kağıdı ile kurutulmuştur. Eşit olarak 5'e bölüştürülen steril tohumlar sırasıyla 0, 0.01, 0.1 ve 1 mM Putresin (Put) içeren çözeltilerde 24 saat bekletilmiştir. Sırasıyla seçilen 15 tohum dört kat steril whatman 1 numaralı filtre kağıdı konulmuş 15 cm çaplı petri kaplarına çimlendirilmek üzere alınmıştır. Petrilere Put gruplarının her birine ayrı ayrı olacak şekilde; 0, -2, -4 ve -6 Bar PEG6000 içeren çözeltiler eklenmiştir. Petriler 25<sup>0</sup>C'de karanlıkta çimlendirilmek üzere 10 gün

bekletilmiştir. Bu süre sonunda uygulama yapılan petrilere ve kontrol grubundan bitki örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 3.2.3. 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 1000 $\mu\text{l}$  DNA ekstraksiyon tamponu eklendi ve alt üst ederek karıştırıldı ve önceden  $65^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmış su banyosunda 10–60 dk. bekletilmiştir.
- b. 12000 g ve  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk. santrifüjlenip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- c. 1000 $\mu\text{l}$  Fenol: Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst ederek karıştırılmıştır. 12000 g ve  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- d. Üst faza 1/10 hacim CTAB/NaCl çözeltisinden eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmıştır.
- e. 1000 $\mu\text{l}$  Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12000 g ve  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- f. DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk. bekletilmiştir.
- g. 12000 g ve  $4^{\circ}\text{C}$ '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 100 $\mu\text{l}$  TE tamponunda çözülmesi sağlanmıştır.
- k. Kullanılmaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA 250 kat (3 $\mu\text{l}$  DNA + 747 $\mu\text{l}$  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.

### 3.2.4. RAPD

#### 3.2.4.a. RAPD primerleri

Çalışmada 13 RAPD primeri (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** RAPD primerleri

Primer Adı	Baz Dizilimi 5’ → 3’
OPA_4	AATCGGGCTG
OPA_12	TCGGCGATAG
OPH_16	TCTCAGCTGG
OPH_18	GAATCGGCCA
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

### 3.2.4.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' de verilen RAPD primerleri ile her bir birey için ayrı PCR tüpü hazırlanmıştır.

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

- 1) PCR aleti otomatik olarak 5 dakika 94<sup>0</sup>C tutmuş,
- 2) 4 döngü olacak şekilde sırasıyla,
  - a. 1 dakika 30 saniye 94<sup>0</sup>C
  - b. 1 dakika 30 saniye 37<sup>0</sup>C
  - c. 3 dakika 72<sup>0</sup>C'de tutmuş,
- 3) 41 döngü olacak şekilde sırasıyla,
  - a. 1 dakika 94<sup>0</sup>C
  - b. 1 dakika 36<sup>0</sup>C
  - c. 1 dakika 42<sup>0</sup>C
  - d. 3 dakika 72<sup>0</sup>C'de tutmuş,
- 4) Son olarak 7 dakika 72<sup>0</sup>C tutarak süreç tamamlanmıştır.
- 5) PCR aletinden çıkarılan örnekler 4<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### 3.2.5. 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 agarozun 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.

### 3.2.6. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliğinin (%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 bantın ortaya çıkması veya mevcut bir bantın kaybolmasını kapsamıştır.

### 3.2.7. CRED-RA

#### 3.2.7.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<sup>0</sup>C'deki etüvde 4 saat inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesini durdurmak için etüvde 65<sup>0</sup>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.

#### 3.2.7.b. CRED-RA primerleri

Çizelge 3.2'de CRED-RA primerleri ve baz dizilimleri verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** CRED-RA primerleri

Primer Adı	Baz Dizilimi (5'→3')
OPA_4	AATCGGGCTG
OPB_10	CTGCTGGGAC
OPH_18	GAATCGGCCA
OPY_1	GTGGCATCTC
OPY_13	GGGTCTCGGT
OPY_15	AGTCGCCCTT
OPW_4	CAGAAGCGGA
OPW_13	CACAGCGACA

### **3.2.8. 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%)

Putresin ve PEG6000 konsantrasyonları *Triticum aestivum* cv. Karasu 90 çeşidine uygulanarak genomu üzerindeki genetiksel etkilerini test etmek için hesaplanan GTS değerleri için toplam 32 RAPD primeri denenmiş ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren 13 primer seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır. GTS oranı üzerine dozların ana etkileri karşılaştırıldığında PEG6000 dozuna bağlı olarak bir azalış söz konusu iken, putresin uygulaması antagonistik bir etki oluşturmuş ve GTS oranında artışa sebep olmuştur. Çizelge 4.2.' de gösterildiği üzere Put uygulamasında en yüksek GTS oranı (%75,4) 1mM dozunda (P3) iken doz azaldıkça GTS oranının düştüğü görülmüştür. PEG6000 uygulamasında ise en yüksek GTS oranı (%33) -2 bar dozunda (K1) iken bu kez doz artışına bağlı olarak GTS oranının düştüğü belirlenmiştir. Her iki uygulamanın birlikte verildiği dozlarda ise PEG6000 uygulamasının en düşük ve put uygulamasının en yüksek olduğu dozda (K1+P3) GTS oranı en yüksek iken (%60,3), PEG6000 uygulamasının en yüksek ve put uygulamasının en düşük olduğu dozda ise (K3+P1) GTS oranı en düşüktür (%43,5).

**Çizelge 4.1.** Put ve PEG6000 farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltinin buğday tohumlarının üzerine etkisi ile değişen bantların moleküler ağırlığı

Primer	C	P1	P2	P3	K1	K2	K3	K1+P1	K1+P2	K1+P3	K2+P1	K2+P2	K2+P3	K3+P1	K3+P2	K3+P3
OPA-4	6	...	-980, -740,	-980, -740, -443	-980, -537, -443, -388	-980, -537, +524, -443, -388	-980, -537, +524, -443, -388	+769, -800	-800, +757	+447, +407	-1047, +358	-1047, -635, +506, +368	...	-556, -431, -378	-612, -524, -431	-556, -378, +400
OPA-12	6	-1208, -1102, -919, -745, -500	-1208, -1102,	-1208, +613, -500, +423, -140	-745, +579	-1208, -919, +392	-1208, -566, +500, +362	-1500, -945, -457, -159	-1500, -945, -457, -159	-1500, +763, -579	+1145, +684, -530	-530, -392, -138	...	-745, -112	+987, -112	-1075, -362
OPH-16	5	+2432, +1720, +311, -725	+2303, +1490, +582, -631	-745, -651, +325	+1820, +1470, +1332, +964, +800, +289	+1322, +892, +509, +292, +207	+1035, +576, +465, +236	-1132, -800	-964, -749, -800, -611	-964, -749, -289	-738, +473, -207, +176	-728, -509	...	-964, -236	+913, -667, -236, +509	-1085, +690
OPH-18	7	-1654, +1458, -1373, -723, +688	-1654, -1373, +628, -517	-1654, +1458, -1373	-1654, -1237, -723, +688, +379	+2202, -1654, -1373, -1237	-1654, -1373, -1237, -723, +836	-1303, +1200	-1303, +1165	-1303, +1237	-2202, -756, +400, -635	-2202, -943, +579	+836, +465	+1526, +983, +863	+1526, +991	+993, +600
OPH-19	10	+2062, +1363, +1166, +465, -97	+2000, +1174, -561, -97	-1684, -918	-1684, +1352, -918, +881, +463, -97	+1319, +1315, -918, +746, +503, -97	+1980, -1684, -918, +782, +629, -300, -172, -97	-1352, -1200, -881, -392	-1200, +590, +458	-1352, -881, +586, +104	+649, -746, -503, -382	-1980, -1319, -382	...	+500	-629, +586, +489	+489

**Çizelge 4.1 (devam)**

<b>OPB-10</b>	6	-1017, -836, -727, -491	-1017, -836, -727	-1017, -836, -727, -491	-1017, -836, -727, -491	+619, -563, -491	-1017, -836, -727, -491	-593, -370	-593, -370	-593, -370	-823	-504	-984, -823, -504	+633, -581	+633, -581	-1017, -963, -383
<b>OPY-1</b>	7	-1083, -888, -353	-353	-353, +500	-1083, +1123, -353, -231, -70	-353, -231, +446, +191, -70	+955, -888,+500, -353, -231,+191, -70	+204	-518, +452	+506, -452	...	-1109, +274, -191	-1109, +245, -191	+1265, -955, +841, -677	+446, +311, -269	+430, +322, -269
<b>OPY-7</b>	6	-917, -681, -476, -337	-476, -200	-476, -200, +709	-917, +864, -681, -337	+2046, +1544, -1065, -979, -337, +834, -200	+1940, +1544, -979,+888, -337, -200	...	+727, -864, -586, +165	-864, +337, +136, -286	+1028, +935, -979	-900, +625, +170	-900, +653, +186	-1940, -1544, -888, -625, -315	+2454, +993, +181	-1940, -1544, -888, -625
<b>OPY-13</b>	6	-1152, +823, -754, -115	+1691, -115	+1500, -115	-507, +496, -200, -115	-754, +676, +541, -115	-904,+844, +473, -507, -115	-942, +890	+213	+526, -496	+1500, +700, -541	-1231, -918, +187, +127	-12312, -918, +488, -515, +300, +123	-1030, -844, +181, +109	...	-1030, -844, +791
<b>OPW-4</b>	9	+1022, -237	+1053, -237	+1526, -237	-2439, -1279, +813, -775, -516, -169	-2439, -1279, +864, -775, -516, -169	-1761, -1279, +841, -775- 516, -389, -237,-169	+2000	+900, +583, -225	+930, +605, -334, -225	+2098, +442, -362	+1354, +684, +503, -362, -229	+520, -362, -229	-2023, +1121, +568, +500, -202	...	-2023, +583, +492, +209
<b>OPW-6</b>	8	-1829, -1555, -400, -218	-1829, -1555, -400, -218	-1829, -1555, -400, -218	-1829, -1555,-500, -400,-218	-1829, -1555, +900, +543, -500, -400, -218	-1829, -1555,-757, +718, +432,-500	-777	-777	+547	-770	-1077, -900, -543	-1077, -900, -543	...	-718, -432, -207	-718, -432, -207

**Çizelge 4.1 (devam)**

<b>OPW-13</b>	9	-1973, -1567, -1280, -920, -714	-1973, -1567, -714	-1973, -1567, +469	+2254, -1973, -1567, -1567, +544, -500, -63	-1973, -1567, -920, -714, +576, -507, +437, -138	-1973, -1567, -714, +576, -507, -138, -63	-2254, +647, -770, -1275, +673, -570, -507, -330	-2254, -770, -345, -155, -155, +50	-2254, -770, -770, +469, -155, +53	+764, +673, -437, +127	+1426, -570, -507, -330	+1458, +770, -570, -330	+783, +338, +70	+66	+63
<b>OPW-18</b>	7	-1479, -1248, -726, -420	-1479, -1248, -726, -420	-1479, -1248, -726, -420	-1248, -726, -420, -372, -205	-621, -420, -372, -205	621, -420, -372, -205	-1420, -1329	+437, +396	+709	+1983, +448	+1225, +407	+1448	...	-1448, +416	-1448

\*(C (Kontrol): 0 put+ 0 PEG6000, **P1**: 0.01 mM Put, **P2**: 0.1 mM Put, **P3**: 1mM Put, **K1**: -2 Bar PEG6000, **K2**: -4 Bar PEG6000, **K3**: -6 Bar PEG6000, **K1+P1**: -2 Bar PEG6000+ 0.01 mM Put, **K1+P2**: -2 Bar PEG6000+0.1 mM Put, **K1+P3**: -2 Bar PEG6000+1 mM Put **K2+P1**: -4 Bar PEG6000+Put 0.01 mM Put , **K2+P2**: -4 Bar PEG6000+0.1 mM Put, **K2+P3**: -4 Bar PEG6000+1 mM Put, **K3+P1**: -6 Bar PEG6000+0.01 mM Put, **K3+P2**: -6 Bar PEG6000+0.1 mM Put+, **K3+P3**: -6 Bar PEG6000+1 mM Put)

**Çizelge 4.2.** Put ve PEG6000 genomik kalıp sabitliliği (%GTS)

Primer	C	P1	P2	P3	K1	K2	K3	K1+P3	K1+P2	K1+P1	K2+P3	K2+P2	K2+P1	K3+P3	K3+P2	K3+P1
OPA_4	100	100	66,6	50	33,3	16,6	16,6	50	50	50	100	20	60	0	0	0
OPA_12	100	16,6	66,6	50	66,6	50	33,3	66,6	66,6	66,6	100	50	50	50	33,3	33,3
OPH_16	100	20	100	100	0	0	0	66,6	33,3	66,6	0	71,4	42,8	62,5	50	75
OPH_18	100	28,5	42,8	57,1	28,5	42,8	28,5	60	60	40	60	40	20	66,6	66,6	66,6
OPH_19	100	50	60	80	40	40	20	87,5	62,5	87,5	0	75	66,6	63,6	72,7	63,6
OPB_10	100	100	50	100	33,3	50	33,3	60	60	40	83,3	83,3	50	50	50	50
OPY_1	100	71,4	85,7	57,1	28,5	28,5	0	20	40	40	100	40	40	75	50	50
OPY_7	100	100	66,6	100	33,3	0	0	28,5	57,1	42,8	57,1	57,1	57,1	100	0	0
OPY_13	100	66,6	66,6	100	33,3	33,3	16,6	20	100	40	50	33,3	0	60	80	60
OPW_4	100	77,7	77,7	100	33,3	33,3	11,1	100	100	0	40	0	40	80	40	20
OPW_6	100	100	100	100	37,5	12,5	25	100	40	40	80	40	40	66,6	66,6	66,6
OPW_13	100	66,6	66,6	44,4	33,3	22,2	22,2	25	75	75	42,8	42,8	42,8	28,5	28,5	14,2
OPW_18	100	42,8	42,8	42,8	28,5	42,8	42,8	100	33,3	66,6	33,3	33,3	66,6	33,3	33,3	66,6
Ortalama	100	64,6	68,6	75,4	33	28,6	19,1	60,3	59,8	50,3	57,4	45	44,3	56,6	43,9	43,5

\*(C (Kontrol): 0 put+ 0 PEG6000, P1: 0.01 mM Put, P2: 0.1 mM Put, P3: 1mM Put, K1: -2 Bar PEG6000, K2: -4 Bar PEG6000, K3: -6 Bar PEG6000, K1+P1: -2 Bar PEG6000+ 0.01 mM Put, K1+P2: -2 Bar PEG6000+0.1 mM Put, K1+P3: -2 Bar PEG6000+1 mM Put K2+P1: -4 Bar PEG6000+Put 0.01 mM Put , K2+P2: -4 Bar PEG6000+0.1 mM Put, K2+P3: -4 Bar PEG6000+1 mM Put, K3+P1: -6 Bar PEG6000+0.01 mM Put, K3+P2: -6 Bar PEG6000+0.1 mM Put, K3+P3: -6 Bar PEG6000+1 mM Put)

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

Putresin ve PEG6000 konsantrasyonları *Triticum aestivum* cv. Karasu 90 çeşidine uygulanarak genomu üzerindeki epigenetiksel etkilerini test etmek için CRED-RA yöntemi için 16 primer denenmiş ve bunlar arasından en iyi amplifikasyon veren 8 primer seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Her doz için % polimorfizm değerleri hesaplanmış ve ortalamaları alınmıştır. % polimorfizm değerini hesaplamak için;  $100 \cdot a/n$  formülü kullanılmıştır. Bu oranlar üzerine kuraklık uygulamalarının tüm dozlarında DNA metilasyonunun meydana geldiği gözlemlenmiştir. *Msp I* enziminin metilasyonun görüldüğü yerden kesim yapması ve *Hpa II* enziminin metilasyon görülmediği zaman kesim yapması bilgisinden hareketle alınan sonuçlara göre;

Tek başına PEG6000 uygulaması en düşük dozda en %47,3 en yüksek dozda ise %72,9 oranında metilasyon oluştururken (Çizelge 4.3.), tek başına put uygulaması en düşük dozda %18,5 en yüksek dozda ise sadece %4,1'lik metilasyon oluşturmuştur (Çizelge 4.4.).

En düşük PEG6000 dozu olan K1 ile birlikte verilen putresin dozlarında oluşturulan polimorfizm yüzdesi sırasıyla %24,5, %21,8 ve %16,3'tür. Bu oranlar bize artan putresin uygulamasının stresin oluşturduğu metilasyon oranını azalttığını göstermektedir (Çizelge 4.5.).

PEG6000 uygulamasının biraz daha arttığı K2 dozunda ise artan putresin uygulamasının %33,7, %25,3 ve %17,8 oranlarıyla metilasyonu azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6.).

En yüksek PEG6000 uygulaması olan K3 ile birlikte verilen P1, P2, P3 hormon dozlarında oluşturulan %37, %28 ve %20,7 oranları ise bize, diğer gruplarla kıyaslandığında metilasyon oranının stresin artışına bağlı olarak arttığını fakat yine de tek başına PEG6000'in oluşturduğu metilasyon oranından(%72,9) oldukça düşük olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.3. K1, K2, K3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm

Primer	Kontrol Bant Sayısı		<i>HpaII</i> Toplam Bant Sayısı			<i>MspI</i> Toplam Bant Sayısı			Toplam Polimorfik Bant Sayısı						% Polimorfizm					
	C H	C M	K1	K2	K3	K1	K2	K3	<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>			<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>		
									K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3
OPA_4	7	7	7	3	6	8	4	3	2	4	4	3	4	5	28,5	100	66,6	37,5	100	100
OPB_10	5	6	8	5	8	6	6	8	5	5	6	5	6	8	62,5	100	75	100	100	100
OPH_18	4	5	4	5	5	6	5	5	1	2	2	2	3	4	25	40	40	33,3	60	80
OPY_1	5	6	5	6	5	6	6	6	1	3	3	1	1	2	20	50	60	16,6	16,6	33,3
OPY_13	6	6	6	6	5	6	5	5	2	4	5	4	3	3	33,3	66,6	100	66,6	50	50
OPY_15	4	5	5	4	5	4	5	5	3	1	4	1	2	3	60	25	80	25	40	60
OPW_4	3	3	3	3	6	3	3	5	2	4	4	2	2	4	66,6	100	66,6	66,6	66,6	80
OPW_13	7	7	1	7	5	6	5	5	6	4	5	2	5	4	100	57,1	100	33,3	100	80
Ortalama	5	6	5	5	6	6	5	5	3	3	3	2	3	4	49,4	67,3	73,5	47,3	66,6	72,9

\*(CH (*Hpa II* ile kesilen kontrol): 0 put+ 0 PEG6000, CM (*Msp I* ile kesilen kontrol): 0 put+ 0 PEG6000, K1: -2 Bar PEG6000, K2: -4 Bar PEG6000, K3: -6 Bar PEG6000)

Çizelge 4.4. P1, P2, P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm

Primer	Kontrol Bant Sayısı		<i>HpaII</i> Toplam Bant Sayısı			<i>MspI</i> Toplam Bant Sayısı			Toplam Polimorfik Bant Sayısı						% Polimorfizm					
	C H	C M	P1	P2	P3	P1	P2	P3	<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>			<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>		
									P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
OPA_4	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	14,2	0	0
OPB_10	5	6	7	7	7	8	7	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	14,2	0	0
OPH_18	4	5	5	5	4	5	5	6	2	2	1	1	1	1	40	40	25	20	20	16,6
OPY_1	5	6	5	6	5	6	6	6	3	3	1	2	1	1	60	50	20	33,3	16,6	16,6
OPY_13	6	6	4	5	6	6	6	6	2	1	0	1	1	0	50	20	0	16,6	16,6	0
OPY_15	4	5	4	4	3	3	4	3	2	1	1	1	0	0	50	25	33,3	33,3	0	0
OPW_4	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPW_13	7	7	7	7	7	6	7	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	16,6	0	0
Ortalama	5	6	5	5	5	6	6	6	1	0,8	0,3	1	0,3	0,6	25	16,8	9,7	18,5	6,6	4,1

\*(CH (*Hpa II* ile kesilen kontrol): 0 put+ 0 PEG6000, CM (*Msp I* ile kesilen kontrol): 0 put+ 0 PEG6000, P1: 0.01 mM Put, P2: 0.1 mM Put, P3: 1mM Put)



**Çizelge 4.5.** K1+P1, K1+P2, K1+P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm

Primer	Kontrol Bant Sayısı		<i>HpaII</i> Toplam Bant Sayısı			<i>MspI</i> Toplam Bant Sayısı			Toplam Polimorfik Bant Sayısı						% Polimorfizm					
	K1P0 H	K1P0 M	K1 P1	K1 P2	K1 P3	K1 P1	K1 P2	K1 P3	<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>			<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>		
									K1 P1	K1 P2	K1 P3	K1 P1	K1 P2	K1 P3	K1 P1	K1 P2	K1 P3	K1 P1	K1 P2	K1 P3
OPA_4	7	8	9	8	8	9	7	8	4	2	2	2	1	0	44,4	25	25	44,4	14,2	0
OPB_10	8	6	9	8	8	9	9	9	3	6	4	3	3	3	33,3	75	50	66,6	66,6	33,3
OPH_18	6	6	6	7	5	7	7	6	1	1	1	1	1	2	16,6	14,2	20	14,2	14,2	33,3
OPY_1	5	5	5	5	4	5	5	6	2	2	1	2	1	1	40	40	25	40	20	16,6
OPY_13	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPY_15	5	4	6	6	5	6	6	7	2	2	1	1	1	1	33,3	33,3	20	16,6	16,6	14,2
OPW_4	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPW_13	6	6	6	7	6	7	7	7	1	1	0	1	3	0	16,6	14,2	0	14,2	42,8	33,3
<b>Ortalama</b>	6	6	6	6	6	7	6	7	2	2	1	1,2	1,2	0,8	23	17,5	17,5	24,5	21,8	16,3

\*( **K1+P0 H** (*Hpa II* ile kesilen kontrol), **K1+P0 M** (*Msp I* ile kesilen kontrol): -2 Bar PEG6000+ 0 mM Put, **K1+P1**: -2 Bar PEG6000+ 0.01 mM Put, **K1+P2**: -2 Bar PEG6000+ 0.1 mM Put, **K1+P3**: -2 Bar PEG6000+ 1 mM Put)

**Çizelge 4.6.** K2+P1, K2+P2, K2+P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm

Primer	Kontrol Bant Sayısı		<i>HpaII</i> Toplam Bant Sayısı			<i>MspI</i> Toplam Bant Sayısı			Toplam Polimorfik Bant Sayısı						% Polimorfizm					
	K2P0 H	K2P0 M	K2 P1	K2 P2	K2 P3	K2 P1	K2 P2	K2 P3	<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>			<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>		
									K2 P1	K2 P2	K2 P3	K2 P3	K2 P2	K2 P1	K2 P1	K2 P2	K2 P3	K2 P1	K2 P2	K2 P3
OPA_4	3	4	3	5	4	3	5	5	2	1	0	2	1	1	66,6	20	0	66,6	20	20
OPB_10	5	6	5	4	7	7	4	7	4	3	1	3	1	1	80	75	14,2	42,8	25	14,2
OPH_18	6	6	7	6	6	4	3	5	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	66,6	25
OPY_1	4	5	5	4	4	6	6	6	0	0	2	1	1	1	0	0	50	16,6	16,6	16,6
OPY_13	6	5	4	5	5	5	5	5	2	1	1	0	0	0	50	20	20	0	0	0
OPY_15	4	5	7	3	3	5	6	4	2	2	1	2	1	1	28,5	66,6	33,3	40	16,6	25
OPW_4	3	3	3	3	4	3	4	4	2	1	1	2	1	1	66,6	33,3	25	66,6	25	25
OPW_13	7	5	7	6	7	8	6	6	2	2	1	3	2	1	28,5	33,3	14,2	37,5	33,3	16,6
<b>Ortalama</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	1,7	1,2	0,8	1,6	1,1	0,8	40	31	19,5	33,7	25,3	17,8

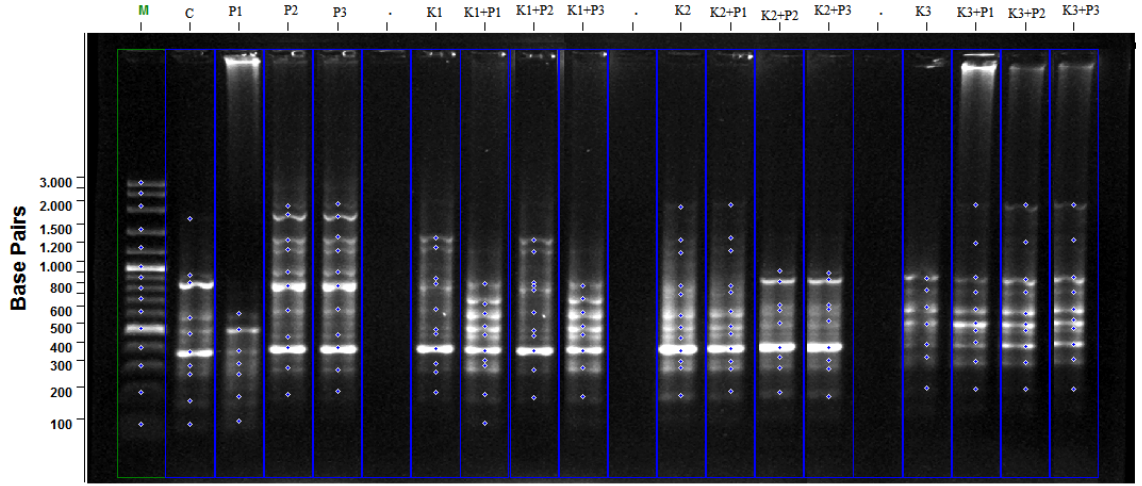
\*(K2+P0 H (*Hpa II* ile kesilen kontrol), K2+P0 M (*Msp I* ile kesilen kontrol): -4 Bar PEG6000+ 0 mM Put, K2+P1: -4 Bar PEG6000+0.01 mM Put, K2+P2: -4 Bar PEG6000+0.1 mM Put, K2+P3: -4 Bar PEG6000+1 mM Put)

Çizelge 4.7. K3+P1, K3+P2, K3+P3 konsantrasyonları CRED-RA bant sayıları % polimorfizm

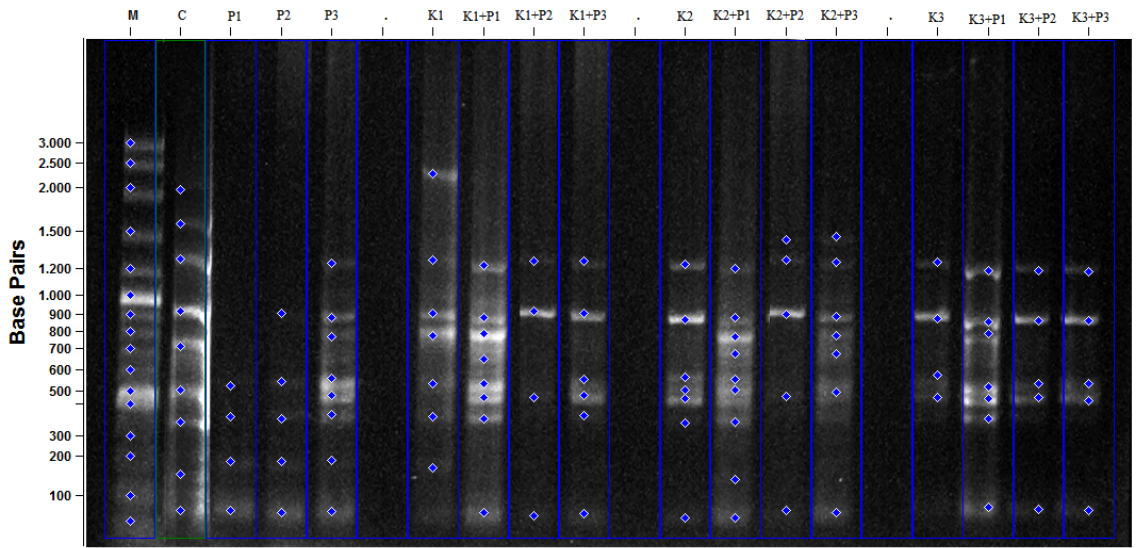
Primer	Kontrol Bant Sayısı		<i>HpaII</i> Toplam Bant Sayısı			<i>MspI</i> Toplam Bant Sayısı			Toplam Polimorfik Bant Sayısı						% Polimorfizm					
	K3P0 H	K3P0 M	K3 P1	K3 P2	K3 P3	K3 P1	K3 P2	K3 P3	<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>			<i>Hpa II</i>			<i>Msp I</i>		
	K3P0 H	K3P0 M	K3 P1	K3 P2	K3 P3	K3 P1	K3 P2	K3 P3	K3 P3	K3 P2	K3 P1	K3 P1	K3 P2	K3 P3	K3 P1	K3 P2	K3 P3	K3 P1	K3 P2	K3 P3
OPA_4	3	3	4	5	4	5	5	5	3	4	2	4	3	2	75	80	50	80	60	40
OPB_10	8	8	7	8	9	6	8	8	1	0	1	3	2	1	14,2	0	11,1	50	25	12,5
OPH_18	6	6	6	6	6	6	6	5	3	2	2	1	1	2	50	33,3	33,3	16,6	16,6	40
OPY_1	5	6	5	6	6	6	6	5	1	2	2	1	1	2	20	33,3	33,3	16,6	16,6	40
OPY_13	5	5	3	3	5	4	3	5	2	2	0	2	1	0	66,6	66,6	0	50	33,3	0
OPY_15	5	5	5	4	4	6	6	6	1	0	2	1	1	1	20	0	50	16,6	16,6	16,6
OPW_4	6	5	6	6	5	6	6	3	2	2	1	1	1	0	33,3	33,3	0	16,6	16,6	0
OPW_13	5	5	6	6	5	6	5	6	3	2	0	3	2	1	50	33,3	0	50	40	16,6
<b>Ortalama</b>	5	5	5	6	6	6	6	5	2	1,7	1,2	2	1,5	1,1	41,1	34,9	22,2	37	28	20,7

\*( K3+P0 H (*Hpa II* ile kesilen kontrol), K3+P0 M (*Msp I* ile kesilen kontrol): -6 Bar PEG6000+ 0 mM Put, K3+P1: -6 Bar PEG6000+0.01 mM Put, K3+P2: -6 Bar PEG6000+0.1 mM Put, K3+P3: -6 Bar PEG6000+1 mM Put)

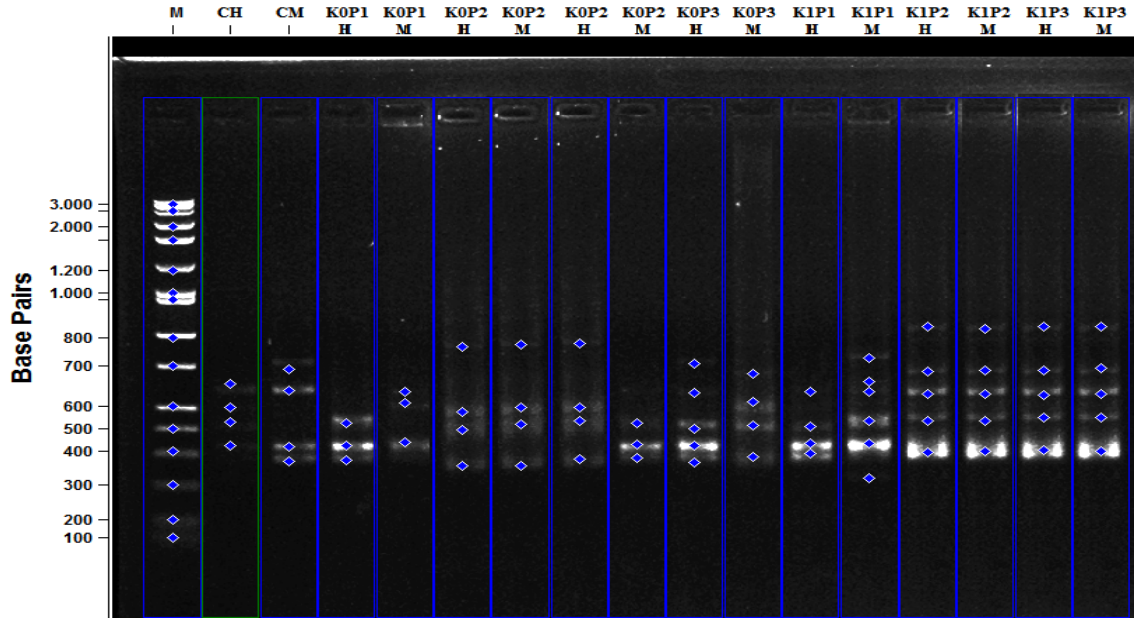
#### 4.4. RAPD ve CRED-RA Jel Görüntüleri



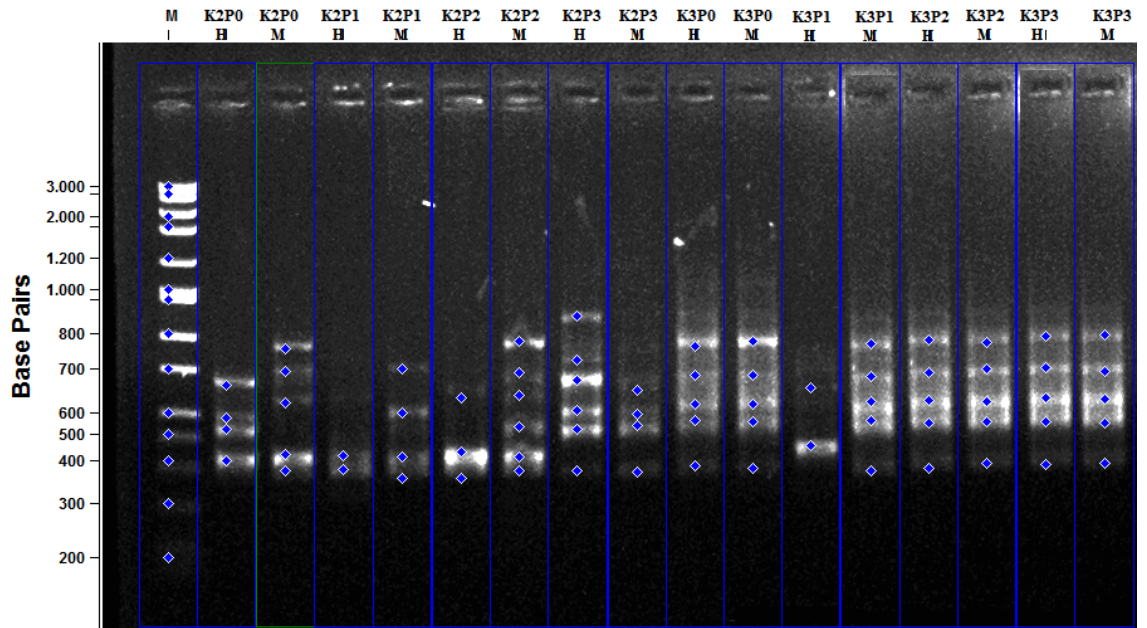
Şekil. 4.1. OPH\_19 RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri



Şekil. 4.2. OPW\_13 RAPD primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri



Şekil. 4.3. OPY\_15 CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri



Şekil. 4.3. (devam) OPY\_15 CRED-RA primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yetiştikleri ortamlardaki iklim ve çevre şartları bitkilerin gelişmesine imkan verdiği gibi, hayatta kalmalarını zorlaştıran çok aşırı uçlarda da olabilir. Bitkiler yaşamları boyunca zaman zaman onları strese sokan zorlu koşullara maruz kalırlar. Bu koşullar abiyotik ya da biyotik kökenli olabilir. Patojenlerin, yabancı bitkilerin veya hayvanların sebep olduğu biyotik stres faktörleriyle başa çıkmak bitkiler için daha kolay iken, yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk veya kimyasal toksisite gibi abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılıkta bitkiler daha çaresiz kalmaktadırlar. Bu noktada gıda olarak tüketilen özellikle tahıl grubu bitkilerin sadece dayanıklı olması yetmemekte aynı zamanda stresin ürün veriminde olası bir kayıp yaşatmaması da beklenmektedir. Bitkilerin ortalama veriminin %50'den fazla azalmasına neden olan abiyotik stres faktörleri, dünyadaki tarımsal ürün kaybının birincil nedenidir (Mahajan and Tuteja 2005). Bu faktörlerden kuraklığın sebep olduğu stresin, yeryüzünde bitki yetişebilen sahaların dağılımı göz önüne alındığında, bitkiler üzerinde diğer stres türlerine nazaran daha etkili olduğu görülebilir.

Kuraklık, uzun zaman yağmur yağmamasını ifade eden meteorolojik bir olaydır. Kuraklığın sebep olduğu su kayıplarının bitkiler üzerindeki doğrudan tesirleri; genel olarak bitki hücrelerinde dokuların su kaybetmeye başlaması (turgor basınçlarının kaybolması), hücre bölünmesinin yavaşlaması-durması, çeşitli metabolik faaliyetlerin azalıp durma noktasına gelmesi, hücre çeperlerinde mekanik bozulmaların ortaya çıkması olarak sayılabilir. Kuraklığın dolaylı zararları ise; stomaların kapanması sebebiyle azalan CO<sub>2</sub> yoğunluğuna paralel olarak, fotosentez yoluyla madde üretiminin azalması, birçok enzimin aktif olmaması, fosfor gibi çeşitli besin maddelerinin hücre içerisine alınımının yavaşlaması ve proteinlerin ayrışmaya başlaması olarak özetlenebilir.

Bitkiler, kuraklık stresinin bu zararlı etkilerine karşı, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede birçok uyum mekanizması geliştirmişlerdir.

Fizyolojik olarak yaprak yüzeyinde tüy ve kalın bir mum tabakası olan kutikulanın oluşturulması ve kuraklık tesiri ile yaprak yüzey alanında küçülme meydana getirilerek su kaybının azaltılması sağlanmıştır. Ayrıca bazı bitki köklerinin büyümesi hızlandırılarak, onların toprağın daha derin kısımlarından su Emilimi yapmalarına olanak verilmiştir. Böylece toprağın derinliklerinden gönderilen besin maddeleri ve su ile bitkilerin hayatlarını idame ettirmeleri sağlanmıştır.

Biyokimyasal yönden vejetatif dokularda kuraklık stresine yanıt olarak ABA sentezlenmektedir. Stres hormonu olarak adlandırılan ABA'nın bu ekstrem koşullarda bitkiye dayanıklılık sağladığı düşünülmektedir. ABA'nın stomaların kapanmasına yol açtığı ve böylece transpirasyonla su kaybını azalttığı bilinmektedir (Kocaçalışkan 2005). Stomaların kapanmasıyla birlikte yapraklardaki içsel karbon dioksit (CO<sub>2</sub>) konsantrasyonu azalmaktadır. Fotosentez esnasında absorblanan ışık enerjisinin etkisiyle açığa çıkan elektronlar, hem yaprak dokularındaki CO<sub>2</sub> yetersizliğinden hem de CO<sub>2</sub>'nin indirgenme hızının azalmasından dolayı uygun şekilde kullanılmadığı için O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türleri (ROT)'ni meydana getirmektedirler. Aslında ROT'lar bitkilerde aerobik metabolizma sonucu belirli düzeylerde oluşturulmaktadır. Ancak stres altındaki bitkilerde aşırı miktarda biriken bu reaktif oksijen türleri hücre içerisinde protein denatürasyonu, lipid peroksidasyonu gibi pek çok hasara sebep olup en önemli etkisini DNA ve nükleotidde degradasyonlara yol açarak göstermektedir (Koca ve Karadeniz 2003). 2011 yılında yapılan bir çalışmada stresin etkisiyle artan ABA'nın stoma bekçi hücrelerini uyardığı ve *cat1* ve *cat3* genlerinde oluşan mutasyonların katalaz enzim aktivitesini azaltarak ortamda ABA'nın etkisiyle oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in parçalanmasını engelleyerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışa sebep olduğu kaydedilmiştir (Jannat *et al.* 2011).

Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkisinin başka bir boyutu da moleküler düzeyde gen ekspresyonu üzerinedir. Kuraklık stresi gen ekspresyonu, DNA metilasyonu ve histonlardaki posttranslasyonel modifikasyonlar gibi kromatin yapısında meydana gelen epigenetiksel değişikliklerle moleküler düzeyde bitkileri etkilemektedir. Bunuda yaparken yine ABA'nın bu konuda yardımcı olduğu söylenebilir. Stres altında ABA'nın

bitkilerde total RNA sentezini kontrol ettiği ve RNA polimeraz aktivitesini dzenlediği, transpozonların ve psödogenlerin ifadesinin daha fazla arttığına dair çalışmalar mevcuttur (Zeller *et al.* 2009).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, kuraklık stresinin poliaminlerden putresin ile birlikte oluşturduğu genetik varyasyonlar ve epigenetiksel etkiler ilk kez araştırılmıştır. RAPD ve CRED-RA analizleri kuraklık stresi ile birlikte verilen putresinin hem genetik varyasyonları hem de DNA metilasyonu üzerine etkisini belirlemek üzere kullanılmıştır.

RAPD sonuçlarına göre PEG6000 uygulamasının arttığı dozlarda RAPD bantlarında değişiklik ve GTS oranının azalması yani genomik kararsızlığın artması stresin DNA'nın yapısında hasarlara yol atığının göstergesidir. Buna ilaveten CRED-RA sonuçlarına göre ise; PEG6000 uygulamasının metilasyon oranında artışa sebep olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar strese bağlı olarak oluşan hasarları ABA'nın su kaybını önlemek için stomaları kapatmaya zorlamasıyla başlayan olaylar zincirinin devamında miktarları artan ROT'ların nokta mutasyonlar, genetik ve kromozomal yeniden dzenlenmeler, delesyon ve insersiyon gibi genomik DNA hasarları oluşturmasına bağlanabilir. Ayrıca stresin oluşturduğu DNA hasarlarını açıklayan diğer bir mekanizma, retrotranspozonların stresin etkisiyle yer değiştirerek hem gen ifadesindeki epigenetiksel değişikliklere yol açması hem de insersiyon, inversiyon, duplikasyon gibi olayları teşvik ederek mutasyonlara yol amaları üzerine yapılan araştırmalar çalışmamızın sonucunu sadece ROT'lara dayandırmaktan ziyade retrotranspozonların hareketiyle de açıklamamıza sebebiyet vermiştir.

Lu *et al.* (2007), kanola bitkisine uyguladıkları NaCl'n bitki metabolizmasında oluşturduğu genetik ve epigenetik değişimleri AFLP, SRAP ve MSAP tekniklerini kullanarak gözlemlemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre 500mM NaCl konsantrasyonunda genetik varyasyon en fazla gözlenirken daha yüksek konsantrasyonlarda aksine bir azalışın görülmesini bitkinin bu noktadan sonra ölmesi ile açıklamışlardır. Kontrol grubunda CCGG bölgelerinde metilasyon %26,6 iken NaCl uygulamalarında bu oran %44,2'ye kadar çıktığını göstermişlerdir. Bu sonuca bakılarak



tuz stresinin hipermetilasyona sebep olduğunu, düşük NaCl uygulamalarında ise hipometilasyonun gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçları; bitkinin normal gelişimi için Na ve Cl iyonları gerekli iken fazlasının lipidlerde, proteinlerde ve nükleik asitlerde degradasyonlara yol açarak bitkide stres cevabının oluşmasına neden olması, tuz stresinin bitkide su eksikliği oluşturarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) açığa çıkmasını indüklemesi, bu zararlı radikallerin bazlara bağlanarak çift iplikçikli DNA'nın şeker fosfat bağlarının kopmasına ve dolayısıyla mutasyonlara neden olması ile açıklamışlardır.

Benzer bir çalışma Labra ve arkadaşları tarafından yine kanola bitkisine krom ağır metalinin uygulanmasıyla yapılmıştır. Artan dozlara bağlı olarak genetik varyasyonların arttığı ancak belirli bir noktadan sonra bitkinin öldüğü kaydedilmiştir (Labra *et al.* 2002).

Stresin oluşturduğu genetik varyasyonları ve epigenetiksel değişimleri siRNA'lar yoluyla ve transpozonların yer değiştirme hareketleriyle açıklayan çalışmalar da mevcuttur. Small RNA'ların fonksiyonlarının keşfedilmesiyle bitkilerin abiyotik strese verdikleri kompleks cevap mekanizmalarından biride aydınlatılmıştır. SiRNA'ların bu mekanizmada görevleri gen ifadesini düzenlemektir. Strese maruz kalan *Arabidopsis*'te siRNA düzeyinin değişmesi bu mekanizmada onların görev yaptığının göstergesidir. Yapılan çalışmalar 7000' den fazla transkripsiyon biriminin siRNA üretme kabiliyeti olduğunu kanıtlamıştır. Abiyotik stres siRNA kaynaklı transpozonların ve pseudogenlerin birikimine yol açmaktadır. Buda siRNA' lara hem gen ifadesini düzenleme yoluyla hem de transpozonlar yoluyla abiyotik stres mekanizmasında önemli bir görev üstlendirmiştir (Hirayama and Shinozaki 2010).

Bitki genomunda %50-90 oranında bulunan transpozonlar; kromozom üzerinde yeni yerleşim noktasına hareket eden DNA parçalarıdır. Kromozomlarda yeni yerleştikleri yerlerdeki genlerin anlatımlarında önemli değişikliklere neden olurlar. En önemli etkileri ise insersiyon, inversiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları teşvik ederek mutasyonlara yol açmalarıdır. Özellikle retrotranspozonlar gen ifadesinde değişikliklere

yol açan, mutasyonları uyaran ve genomun büyümesine neden olan en önemli epigenetiksel değişimlerden biri olarak görülmektedir. Epigenetik mekanizmalar, bazı koşullar altında sessiz transpozonları aktive ederler. Bunun en güzel örneği gelişim sürecinde sessiz olup, hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarında etkin hale geçen bitki retrotranspozonlarıdır (Evrensel 2010).

UV ışınları, sıcaklık, radyasyon, yaralanma, hücre kültürü, patojenlerle enfeksiyon gibi pek çok stres faktörünün retrotranspozonların hareketini kolaylaştırdığı bilinmektedir. Tütünde doku kültürü oluşturulması esnasında meydana gelen yaralanmalara bağlı olarak oluşan stresle ilk kez 1993 yılında Hirochika *Tto1*, *Tto2* ve *Tnt1* retrotranspozonlarının hareket ederek genom üzerinde yer değiştirerek yeni yerlere lokalize olduklarını ve mutajenik etkiye sebep olduğunu göstermiştir (Hirochika 1993).

Beguiristain *et al.* (2001), patojenlerin oluşturduğu stresinde retrotranspozonların hareket etmesine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Hashida *et al.* (2006), *Antirrhinum majus* bitkisinde *Tam3* transpozonunun 15°C'de hareketli olduğunu ve bu sıcaklıkta *Tam3* transposase (TPase)'in transpozonun subterminal bölgesine bağlanarak metilasyon oranını düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Fakat sıcaklığın 25°C'ye çıkarılmasıyla oluşturulan stres ile transpozonun hareketinin baskılandığını ve hipometilasyon olduğunu gözlemlemiş, bunu metilsitozinlerin TPase'nin bağlanmasına engel olması ile açıklamışlardır.

Mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada soğuk stresinin metilasyon oranını düşürerek hipometilasyona yol açtığı gösterilmiştir. Bu durum *Ac/Ds* retrotranspozonun yaralanma, patojen enfeksiyonu, doku kültürü gibi stres etmenleriyle strese bağlı olarak aktive olması, soğuk stresinin DNA metiltransferazı baskılayarak transpozonda hipometilasyona yol açması ile açıklanmıştır. Bitkinin gelişim sürecinde aktive olmayan bu transpozon aktivite kazanmaktadır. Bu tarz bir demetilasyon sadece mısır köklerinde bu transpozona özgüdür ve metilasyon oranı soğuk stresiyle birlikte azaldığı gözlenmiştir (Steward *et al.* 2002).

Mısır bitkisi ile MSAP tekniği kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise uygulanan NaCl'ün oluşturduğu osmotik stresin retrotranspozonların metillenmesine yol açtığı tespit edilmiştir.(Tan 2010).

Bitki sistemlerinde oluşturulan oksidatif stres ve ABA'nın artışına bağlı olarak epigenetiksel mekanizmalardan DNA metilasyonunun meydana geldiği bilinmektedir. Bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler ABA konsantrasyonunun artışına sebep olmaktadır. Artan ABA miktarı epigenetiksel gen işleyişini histon modifikasyonları, DNA metilasyonu (hipo/hipermetilasyonu) ve siRNA mekanizmasıyla kontrol etmektedir (Chinnusamy *et al.* 2008). Soğuk stresine maruz kalmış mısır bitkisinde artan ABA kontrasyonuna bağlı olarak demetilasyon meydana geldiği görülmüştür (Steward *et al.* 2002). Buna ilaveten tütün bitkisi hücre süspansiyon kültürlerinde tuz ve osmotik basınç stresinin hipermetilasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Kovarik *et al.* 1997). Çalışmamızla paralellik gösteren başka bir çalışma ise bezelye bitkisinde yapılmış ve kuraklık stresinin DNA spesifik sitozin (CCGG) hipermetilasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir (Labra *et al.* 2002). Fakat bu çalışmalarda ABA birikiminin ve abiyotik stres altında ABA'nın gen işleyişindeki rolünün bilinmesine rağmen, gen ekspresyonuna bağlı olarak DNA hipo ve hipermetilasyonunda ABA'nın rolü açıklanamamıştır (Chinnusamy *et al.* 2008).

Buna ilaveten alışmamızda PEG6000 ile birlikte putresinin verildiği üç farklı dozda oran arttıka genomik kararlılığın korunmasının arttığı ve kuraklık stresinin meydana getirdiği hipermetilasyon oranının ise azaldığı tespit edilmiştir. Bu, putresinin strese karşı iyileştirici etkisinin olduğunun kanıtıdır. Çalışmamıza benzer bir çalışma bulunmadığından ötürü paralel bir çalışmayı referans gsterememekle birlikte her iki uygulamanın ayrı ayrı verildiği çalışmaların bulgularımızla benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Polikatyonik yapıda olan poliaminlerin bitki metabolizmasında hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, somatik embriyogenez, senesens gibi pek çok fonksiyonunun yanı sıra abiyotik stres esnasında da görev yaptığı bilinmektedir (Noceda *et al.* 2009).

Poliaminlerin strese maruz kalan bitkilerde miktarlarının arttığına dair çok sayıda çalışma da ABA'nın artışta rolünün olduğunu düşündürmüştür. Nitekim, nohut bitkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada dışarıdan uygulanan ABA'nın put ve cad miktarını ilk 24 saat içerisinde arttırdığı bulunmuştur (Bueno and Matilla, 2008).

UV ışınları uygulanmış bitkilerde DNA mutasyonlarının arttığı fakat UV ile beraber poliaminlerin verilmesiyle UV ışınlarının meydana getirdiği bu etkinin ortadan kaktığı gözlenmiştir. Bu sonuç ise pozitif yüklü poliaminlerin negatif yüklü DNA, RNA, protein, fosfolipid gibi makromoleküllerle etkileşime girerek veya DNA'ya bağlanarak DNA'yı enzimatik yıkımlardan, mekanik parçalanmalardan ve oksidatif hasarlardan koruması ile açıklanmıştır (Herrera *et al.* 1995; Kovacs *et al.* 2010). Bu noktada poliaminlerin nükleik asitlerin stabilizasyonunu sağlayarak olası bir mutasyona imkan vermedikleri düşünülebilir.

Son çalışmalarda bitki gelişimi boyunca miktarı artan poliaminlerin bazı spesifik genlerin ekspresyonunu sağlayarak DNA metilasyonunu önledikleri saptanmıştır (Walters 1997). Poliaminlerin DNA'nın A formundaki major oluklardan taşınıp B formundaki metilasyonun az görüldüğü minör oluklara yerleşmeleri de yine metilasyonu önlediklerinin ispatıdır (Herrera *et al.* 1995).

Poliaminlerin metilasyonu önlediğinin bir başka ispatı Heby tarafından verilmiştir. Heby fare genomunda DNA metilasyonunun poliaminler tarafından azaltıldığını gözlemlemiş bunu S- adenosilmetiyonin (SAM ya da AdoMET) aktivitesine bağlamıştır (Heby 1995).

DNA metilasyonu ve poliamin sentez mekanizması karşılaştırıldığında her ikiside AdoMET ürününün olduğu metabolik yolu kullanmaktadırlar. Nitekim yapılan çalışmalar poliamin seviyesindeki değişikliklerin DNA metilasyonunu etkilediğini kanıtlamıştır. Poliamin sentezinde ilk basamak bloke edildiğinde hücreler çok miktarda dekarboksile AdoMET biriktirirler. Yani ortamda dekarboksile AdoMET miktarı fazla ise poliamin miktarıda fazla demektir. Bu moleköl metil grubu içermesine rağmen DNA

metilasyonunda metil verici olarak görev yapmamaktadır. Aksine DNA metiltransferazın aktivitesini engellemektedir. Buda DNA'da hipometilasyona sebep olmaktadır. Buda poliaminların miktarının ortamda bol bulunduğu DNA replikasyonu süresince bile metilasyon gerçekleşmediği anlamına gelmektedir (Heby 1995).

Sonuç olarak bu çalışmada kuraklık stresinin genetik ve epigenetiksel mekanizmalardan DNA hipermetilasyonuna sebep olduğu ve poliaminlerin ise kuraklık stresinin bu etkileri iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Fakat kuraklık stresinin meydana getirdiği genetik polimorfizm ve hipermetilasyon ile poliaminlerin antagonistik etkisinin moleküler mekanizmasının temeli açıklanamamıştır.

### **5.1. Öneriler**

Biyotik ve abiyotik stresin bitkilerde meydana getirdiği bu genetik ve epigenetik değişiklikler poliamin uygulaması ile giderilebilir. Fakat kuraklık stresi altındaki bitkilerde ABA birikiminin ölçülmesine, buna bağlı mutasyonun ROT'lara veya retrotranspozonlara bağlı olarak mı meydana geldiğinin araştırılmasına, abiyotik stres altında ABA'nın gen işleyişindeki rolü bilinmesine rağmen, gen ekspresyonuna bağlı olarak DNA hipo ve hipermetilasyonunda ABA'nın rolünün açıklanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca poliaminlerin kuraklık stresinin meydana getirdiği bu etkilerden koruyucu rolünün literatür bilgileri ışığında DNA'ya bağlanarak DNA'yı enzimatik yıkımlardan koruması, DNA metiltransferaz aktivitesini engellemesi, bazı spesifik genlerin ekspresyonunu sağlayarak DNA metilasyonunu engellemesi, A formundaki major oluklardan taşınıp B formundaki metilasyonun az görüldüğü minör oluklara yerleşmeleri mekanizmalarından hangisinin etkili olduğunun araştırılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aina, R., Sgorbati, S., Santagostino, A., Labra, M., Ghiani, A., Citterio, S., 2004. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiologia Plantarum*, 121, 472-480.
- Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Konez, C., Carrasco, P., Tiburcio, A.F., 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231, 1237-1249.
- Alves, A.A.C., Setter, T.L., 2000. Response of cassava to water deficit: leaf area growth and abscisic acid. *Crop Sci.* 40, 131-137.
- Anami, S., De-Block, M., Machuka, J., Lijsebettens, M.V., 2009. Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. *Critical Reviews in Plant Science*, 28, 16-35.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science*, 82 (10), 1227–1238.
- Aydın, M., 2006. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) olgun embriyo kaynaklı kallus oluşumunu ve rejenerasyon kapasitesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi. Yüksek lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ayhan, B., 2006. Mısır (*Zea mays* L.)'ın bazı çeşitlerinde ağır metal (Cd, Pb) stresinin etkilerinin belirlenmesi. Yüksek lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bagni, N., 1986. The Function and Metabolism of Polyamines in Plant, *Acta Hort.*, 179, 95-103.
- Bagni, N., 1970. Metabolic changes in polyamines during the germination of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.*, 9, 159–164.
- Barış, Ö., 2004. Doğu Anadolu bölgesinde yetişen bazı *Salvia* türlerinin biyolojik aktivite ve genetik profillerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Benavides, M.P., Aizencang, G., Tomaro, M.L., 1997. Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. *J. Plant Growth Regul.*, 16, 205-211.
- Biasi, R., Bagni, N., Costa, G., 1988. Endogenous polyamines in apple and their relationship to fruit set and fruit growth. *Physiologia Plantarum*, 73 (2), 201-205.
- Bilgin, O. and Korkut K.Z., 2005. Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (3).
- Blum, A., Jordan, W.R., 1985. Breeding crop varieties for stress environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2 (3), 199-237.
- Bray, E.A., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, 103, 1035-1040.
- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.*, 2, 48-54.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A., 2007. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173, 603–608.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K., 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55 (395), 225–236.

- Chinnusamy, V., Gong, Z., Zhu, J.K., 2008. Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (10), 1187-1195.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K., 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 1-7.
- Cho, D., Shin, D., Jeon, W.B., Kwak, J.M., 2009. ROS-mediated ABA signaling. *Journal of Plant Biology*, 52 (2), 102-113.
- Choi, C.S., Sano, H., 2007. Abiotic-stress induced demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 589-600.
- Claxton, L.D., Umbuzeiro, G.A., DeMarini, D.M., 2010. The Salmonella mutagenicity assay: The stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ Health Perspect*, 118, 1515-1522.
- Courtois, B., McLaren, G., Sinha, P.K., Prasad, K., Yadav, R., Shen, L., 2000. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Molecular Breeding*, 6, 55-66.
- Çeçen, Ö., 2004. Kuraklık stresine maruz bırakılan mısır bitkisine ekzojen olarak uygulanan naftalen asetik asit (NAA), Absisik asit (ABA) ve Jasmonik asitin (JA) etkilerinin belirlenmesi. Yüksek lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Dasgupta, J., Bawley, J.D., 1984. Variations in protein synthesis in different regions of greening barley seedling and effect of imposed water stress. *Journal of Experimental Botany*, 35, 1450-1459.
- De Agazio, M., Federico, R., Angelini, R., De Cesare, F., Grego, S., 1992. Spermidine pretreatment or root tip removal in maize seedlings: effect on K<sup>+</sup> uptake and tissues modifications. *J. Plant Physiol.*, 140, 741-746.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A., Antequera, F., 1998. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO journal*, 17 (8), 2426-2435.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2003. Oxidative stress signaling. *Topics in Current Genetics*, 4, 121-149.
- Dos Santos, J.B., Nienhuis, J. P., Skroch, J., Tivang and M.K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87, 909-915.
- Ecem, N., 2010. Farklı mısır (*Zea mays* l.) çeşit ve hatlarında kuraklık stresi etkilerinin fizyolojik olarak incelenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Ergen, Z.N., Budak, H., 2009. Sequencing over 13000 expressed sequence tags from six subtractive cDNA libraries of wild and modern wheats following slow drought stress. *Plant Cell and Environment*, 32, 220-236.
- Etehadnia, M., Waterer, D., De Jong, H., Tanino, K.K., 2008. Scion and rootstock effects on ABA-mediated plant growth regulation and salt tolerance of acclimated and unacclimated potato genotypes. *J Plant Growth Regul.*, 27, 125-140.
- Evrensel, C., 2010. Arpa (*Hordeum vulgare* l.) doku kültürlerinde transpozon analizi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Databases, [www.fao.org](http://www.fao.org) (10.06.2011).

- Flores, H.E., Galston, A.W., 1989. Osmotic stress induced polyamine accumulation in cereal leaves. *Plant Physiol.*, 75, 102-109.
- Golldack, D., Lüking, I., Yang, O., 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.*, 30, 1383–1391.
- Gowher, H., Leismann, O., Jeltsch, A., 2000. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *The EMBO Journal*, 19, 6918-6923.
- Granot, G., Sikron-Persi, N., Gaspan, O., Florentin, A., Talwara, S., Paul, L.K., Morgenstern, Y., Granot, Y., Grafi, G., 2009. Histone modifications associated with drought tolerance in the desert plant *Zygophyllum dumosum* boiss. *Planta*, 231, 27–34.
- Gregor, D., Hartmann W. And Stosser R., 1994. Cultivar Identification in *Prunus domestica* using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Acta Horticulturae*, 359.
- Gülcü, M., 1997. Buğday varyetelerinde kuraklığa dayanıklılık derecesinin tayini ve kuraklık stresinin genomda meydana getirdiği değişikliklerin incelenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Gülşen, O., Mutlu N., 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. *Alatırım*, 4 (2), 27–37.
- Güzel, A., 2006. Kuraklık stresine maruz bırakılan domates bitkilerinde bazı fizyolojik ve büyüme parametreleri üzerine absisik asit (ABA) ve kalsiyumun ( $Ca^{2+}$ ) etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Harris, S.A., 1999. RAPD in systematics-a useful methodology? In; Hollingsworth, P.M., Bateman R.M., Gornall R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, 211–228 p, London.
- Hashida, S.N., Uchiyama, T., Martin, C., Kishima, Y., Sano, Y., Mikamia, T., 2006. The temperature-dependent change in methylation of the antirrhinum transposon tam3 is controlled by the activity of its transposase. *The Plant Cell*, 18, 104–118.
- Hausmann, R., Gold, M., 1966. The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. IX. Deoxyribonucleic acid methylase in bacteriophage-infected *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 241 (9), 1985-1994.
- Heby, O., 1995. DNA methylation and polyamines in embryonic development and cancer. *International journal of developmental biology*, 39 (5), 737-757.
- Hirayama, T., Shinozaki, K., 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*, 61, 1041-1052.
- Hirochika, H., 1993. Activation of Tobacco Retrotransposons During Tissue Culture. *The EMBO Journal*, 12 (6), 2521-2528.
- Hoisington, D., Bohorova, N., Fennell, S., Khairallah, M., Pellegrineschi, A., Ribaut, J. M., 2002. The application of biotechnology to wheat improvement. *FAO Corporate Document Repository*, <http://www.fao.org>. (12.06.2012).
- Hsu, Y.T., Kuo, M.C. Kao, C.H., 2006. Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid. *Plant Soil*, 287, 267-277.
- Jannat, R., Uraji, M., Morofuji, M., Islam, M.M., Bloom, R.E., Nakamura, Y., McClung, R.C., Schroeder, J.I., Mori, I.C., Murata, Y., 2011. Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1919– 1926.



- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080.
- Kakkar, R.K., Rai, K.V., 1993. Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *The International Journal of Plant Biochemistry*, 33 (6), 1281-1288.
- Kalac, P., Krausova, P., 2005. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-230.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y., 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.U. Journal of Science*, 18(4), 723-740.
- Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J.N., Lang, D.J., 2002. Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting. *Crop Science*, 42, 2118-2127.
- Kass, S.U., Pruss, D., Wolffe, A.P., 1997. How does DNA methylation repress transcription?. *Trends in genetics*, 13(11), 444-449.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Altabella, T., Galston, A.W., 2003. Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2, 1-12.
- Koca, N., Karadeniz, F., 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda mühendisliği dergisi*, 16, 32-38.
- Kocaçalışkan, D., 2005. Bitki Fizyolojisi. Dumlupınar Üniversitesi Yayınları, Kütahya.
- Kovacs, Z., Sarkadi, S.L., Szücs, A., Kocsy, G., 2010. Differential effects of cold, osmotic stress and abscisic acid on polyamine accumulation in wheat. *Amino acids*, 38 (2), 623-631.
- Kovarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M., Opatrný, Z., 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 301-306.
- Kumar, S., Kaur, G., Nayyar, H., 2008. Exogenous application of abscisic acid improves cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Agronomy and Crop Science*, 194, 449-456.
- Labra, M., Ghiani, 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 Biology*, 4, 694-699.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, 607s, New York.
- Lichtenthaler, H.K., 1996. Vegetation Stress: An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148 (1-2), 4-14.
- Lira-Medeiros, C.F., Parisod, C., Fernandes, R.A., Mata, C.S., Cardoso, M.A., Ferreira, P.C.G., 2010. Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *Plos One*, 5, 1-8.
- Liu, K., Fu, H., Bei, Q., Luan, S., 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology*, 124, 1315-1325.
- Lu, G., Wu, X., Chen, B., Gao, G., Xu, K., 2007. Evaluation of genetic and epigenetic modification in rapeseed (*Brassica napus*) induced by salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (11), 1599-1607.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Martin, C., Zhang, Y., 2007. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current Opinion in Cell Biology*. 19, 266-272.

- Michel, B.E., Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.*, 51, 914-916.
- Michelia, M.R., Bova R., 1997. *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*. Springer, Berlin.
- Michalowsky, L.A., Jones, P.A., 1989. DNA methylation and differentiation. *Environmental Health Perspectives*, 80, 189-197.
- Mitra, J., 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, 80 (6), 758-764.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9), 405-410.
- Murrell, A., Rakyan, V.K., Beck, S., 2005. From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics*, 14 (1), R3-R10.
- Nardemir, G., 2012. Malathion ve glifosatın *Triticum aestivum* (buğday) üzerindeki genetik ve epigenetik etkilerinin moleküler yöntemler ile belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Neves, C., Santos, H., Luis, V.B., Amancio, S., 2002. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting micropropagated cork oak and grapevine shoots. *Plant Physiol. and Biochem.*, 40 (12), 1071-1080.
- Noceda, C., Salaj, T., Perez, M., Viejo, M., Canal, M.J., Salaj, J., Rodriguez, R., 2009. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees*, 23 (6), 1285-1293.
- Özgen, M., Adak, S., Söylemezoğlu, G., Ulukan, H., 2000. Bitki genetik kaynaklarının korunma ve kullanımında yeni yaklaşımlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi, Ankara.
- Patel, A., Groopman, J.D., Umar, A., 2003. DNA methylation as a cancer-specific biomarker-from molecules to populations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 983, 286-297.
- Reçber, A., 2011. İleri ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) hatlarının bazı agronomik ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ruiz-Herrera, J., Ruiz-Medrano, R., Dominguez, A., 1995. Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines. *FEBS Letters*, 357, 192-196.
- Sannazzaro, I.A., Alvarez, L.C., Menendez, B.A., Pieckenstain, L.F., Alberto, O.E., Ruiz, A.O., 2004. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters*, 230, 115-121.
- Saruhan, N., 2002. Poliaminlerin yaprak kıvrılmasına etkisinin biyokimyasal seviyede araştırılması. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sharma, R., Mohan-Singh, R.K., Malik, G., Deveshwar, P., Tyagi, A.K., Kapoor, S., Kapoor, M., 2009. Rice cytosine DNA methyltransferases-gene expression profiling during reproductive development and abiotic stress. *The FEBS Journal*, 276, 6301-6311.
- Siu, L.L., Rowinsky, E.K., Hammond, L.A., Weiss, G.R., Hidalgo, M., Clark G.M., Moczygemba, J., Choi, L., Ron, L., Barbet, N.C., Sklenar, I.T., Capdeville, R., Gan, G., Porter, C.W., Hoff, D.D.V., Eckhardt, S.G., 2002. A phase I and pharmacokinetic study of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor,

- administered on a dailytimes- five every-three-week schedule in patients with advanced solid malignancies. *Clinical Cancer Research*, 8, 2157-2166.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, 115, 327-334.
- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A., Prymakowska-Bosak, M., 2007. Up-regulation of stress-inducible 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.
- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H., 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by enviromental stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (40), 37741–37746.
- Sulimova, G.E., Vanyushin, B.F., Chvojka, L.A., Friedrich, A., Bulgakov, P., Cerny, B., 1978. On the impossibility of incorporation of 5-methylcytosine and its nucleosides intoDNA of higher plants, *Biokhimiya Moscow*, 43,240–245.
- Tan, M., 2010. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stres based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 21-26.
- Taylor, I.B., Burbidge, A., Thompson, A.J., 2000. Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 51 (350), 1563-1574.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler ( 2. baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, 345 s, İstanbul.
- Vanyushin, B.F., Kadyrova, D.K., Karimov, K.K., Belozersky, A.N., 1971. Minor bases in the DNA of higher plants, *Biokhimiya Moscow*, 36, 1251–1258.
- Vanyushin, B.F., Ashapkin, V.V., 2011. DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809, 360–368.
- Waddington, C., 1942. The Epigenotype. *Endeavour*, 1, 18-20.
- Walters, D.R., 1997. The putrescine analogue (E)-1,4-diaminobut-2-ene reduces DNA methylation in the plant pathogenic fungus *Pyrenophora avenae*. *FEMS Microbiology Letters*, 154, 215-218.
- Wang, Y., Fischle, W., Cheung, W., Jacobs, S., Khorasanizadeh, S. and Allis, C.D., 2004. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found. Symp.*, 259, 3-17.
- Waters, M.D., Auletta A. 1981. The GENE-TOX program: genetic activity evaluation. *J Chem Inf Comput Sci*, 21, 35-38.
- Whitkus, R., Doebley J., Wendel J.F., 1994. DNA-based markers in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Williams, j.G.K., Kubelik A.R., Livak R.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.*, 18, 6531-6535.
- Wyatt, G.R., 1950. Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids, *Nature*, 166, 237-238.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Bitki Biyoteknolojisi (eds. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.). Bölüm 23, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, 334-363. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s, Konya.
- Zabeau, M., Vos P., 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprints. *European Patent Aplication. Publ.*, 0534858A1.

- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ Mol Mutagen*, 44, 363-371.
- Zeller, G., Henz, H.R., Widmer, C.K., Sachsenberg, T., Ratsch, G., Weigell, D., Laubinger, S., 2009. Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *The Plant Journal*, 58, 1068–1082.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., Ismail, A.M., 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97, 111-119.
- Zhang, L., Qiu, Z., Hu, Y., Yang, F., Yan, S., Zhao, L., Li, B., He, S., Huang, M., Li, J., Li, L., 2011. ABA treatment of germinating maize seeds induces VP1 gene expression and selective promoter-associated histone acetylation. *Physiologia Plantarum*, 143, 287-296.
- Zhou, B., Guo, Z., Lin, L., 2006. Effects of abscisic acid application on photosynthesis and photochemistry of *Stylosanthes guianensis* under chilling stress. *Plant Growth Regulation*, 48, 195–199.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247-273.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi kadrosunda göreve başladı. Halen bu göreve devam etmektedir.