

T.C.  
ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TERMİK SANTRAL KAYNAKLI AĞIR METALLERİN MISIR VE  
EKMEKLİK BUĞDAYDA MEYDANA GETİRDİĞİ MOLEKÜLER  
ETKİLERİN BELİRLENMESİ

Hüseyin BULUT

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

2018

Her Hakkı Saklıdır.

## Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN danışmanlığında, Hüseyin BULUT tarafından hazırlanan bu çalışma 30/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza:

Danışman : Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza:

Üye : Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza:

Üye : Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Serap SUNAR

İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 13 / 04 / 2018 tarih ve 14 / 1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Paşa YALÇIN  
Enstitü Müdürü

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

## Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Termik Santral Kaynaklı Ağır Metallerin Mısır ve Ekmeklik Buğdayda Meydana Getirdiği Moleküler Etkilerin Belirlenmesi” isimli “Doktora” tezime tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 30/03/2018



**Hüseyin BULUT**

## ÖZET

Doktora Tezi

### TERMİK SANTRAL KAYNAKLI AĞIR METALLERİN MISIR VE EKMEKLİK BUĞDAYDA MEYDANA GETİRDİĞİ MOLEKÜLER ETKİLERİN BELİRLENMESİ

Hüseyin BULUT

Erzincan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Ağır metal kirliliğine neden olan termik santral çevresinde yetiştirilen *Triticum aestivum* L. (ekmeklik buğday) ve *Zea mays* L. (mısır) tahıllarında meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler RAPD, IRAP ve gen ekspresyon analizi ile incelenmiş ayrıca yetiştirilen fidelerin yapısında bulunan ağır metallerin türü ve miktarı ICP-MS ile analiz edilmiştir. Konumları termik santrale yakınlıklarına bağlı olarak ekmeklik buğday ve mısır bitkileri üzerinde ağır metallerin oluşturduğu stresin genom profillerinde meydana getirdiği değişimler analiz edilmiştir. Bu değişimlerin polimorfizmde artışa ve GTS değerinde azalmaya neden olduğu RAPD ve IRAP teknikleri ile tespit edilmiştir. Bitki savunma mekanizmasında yer alan ve stres koşullarında ekspresyon düzeyinde artış meydana gelen 14-3-3 protein ailesinin ekspresyon düzeyi RT-PCR ile analiz edilmiş ve  $\beta$ -actin geni ile karşılaştırılmıştır. Yapısında yoğun miktarda ağır metal barındıran örneklerde 14-3-3 gen ekspresyon düzeyinin baskılandığı tespit edilmiştir. Bitkiler için ağır metal kirliliğine neden olan kaynak arasındaki mesafenin önemi anlaşılmıştır.

**2018, 113 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal, Epigenetik, Gen ekspresyonu, Genotoksisite, IRAP, RAPD

## ABSTRACT

Doctorate Thesis

### THE DETERMINATION OF THE MOLECULAR EFFECT IN CORN AND BREAD WHEAT CAUSED BY HEAVY METALS RELEASED THROUGH COAL-FIRED THERMAL POWER PLANTS

Hüseyin BULUT

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

Supervisor: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

The genetic and epigenetic changes in *Triticum aestivum* L. (bread wheat) and *Zea mays* L. (maize) grown around the thermal power plant causing heavy metal pollution were investigated by RAPD, IRAP and gene expression analysis and also the type and amount of heavy metals in the structure of the grown is analyzed by ICP-MS. Depending on their proximity to the thermal plant, changes in the genomes of the stressed genomes of heavy metals on bread wheat and corn plants have been analyzed. These changes were determined by RAPD and IRAP techniques, which resulted in an increase in polymorphism and a decrease in GTS. The expression level of the 14-3-3 protein family involved in the plant defense mechanism and the increase in expression level under stress conditions were analyzed by RT-PCR and compared with the  $\beta$ -actin gene. It has been determined that the 14-3-3 gene expression level of excessive amount of heavy metal-containing samples is inhibited. As a result, it is determined that the distinction between the source causing the heavy metal pollution and plant sowing distance is important.

**2018, 113 Pages**

**Keywords:** Epigenetic, Gene expression, Genotoxicity, Heavy metal, IRAP, RAPD

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başladığım günden beri, derin bilgi ve birikimini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her konuda desteğini eksik etmeyen, akademik hayatım için her anlamda bana model olan, çok saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN'a tüm özverisi için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her dönem kıymetli vakitlerini ayırarak beni dinleyen, tez ile ilgili önerilerini esirgemeyen, saygıdeğer tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Murat ÇANKAYA ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Serap SUNAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarında tecrübe ve bilgileri ile rehberlik eden Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR hocama, laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman desteğini gördüğüm sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan hiçbir zaman sevgi ve desteklerini esirgemeyen eşim Çiğdem, oğullarım Kaan, Oğuzhan, Kürşat ve bütün aileme sonsuz teşekkürler.

FDK-2017-445 no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri yönetimine teşekkür ederim.

Hüseyin BULUT

Mart, 2018

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>13</b>
2.1. Ekmeklik Buğday ve Mısırın Genom Bilgisi.....	13
2.2. Bitkilerde Stres Kavramı .....	13
2.3. Termik Santrallerden Yayılan Ağır Metaller.....	14
2.4. Transpozonlar.....	18
2.4.1. Transpozonların türleri.....	19
2.4.1.a. Retrotranspozon.....	19
2.4.1.b. DNA transpozonu.....	20
2.4.2. Transpozonların epigenetikteki rolü.....	21
2.4.2.a. DNA metilasyonu.....	22
2.4.2.b. Histon modifikasyonları.....	23
2.4.2.c. RNA yönlendirmeli sessizleştirme.....	23
2.5. Gen İfadesi.....	24
2.6. Moleküler Genetik ve Epigenetik İncelemelerde Kullanılan Yöntemler .....	27
2.6.1. Real Time PCR.....	28
2.6.2. RAPD (Random amplified polymorphic DNA-rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA).....	29
2.6.3. AFLP (Amplified fragment length polymorphism-çoğaltılmış dizi uzunluk polimorfizmi).....	29
2.6.4. MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism-metilasyona duyarlı çoğaltılmış polimorfizm).....	30

2.6.5. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion-random amplification- çift restriksiyon enzimli sindirim-rastgele çoğaltma).....	30
2.6.6. SSR (Simple sequence repeat-basit dizi tekrarları ) .....	31
2.6.7. ISSR (Inter simple sequence repeats-basit dizi tekrarı arası bölgeler)...	31
2.6.8. iPBS (Inter retrotransposon binding site-ara primer bağlanma bölgesi çoğaltım polimorfizmi).....	32
2.6.9. IRAP (Inter retrotransposon amplified polymorphism- retrotranspozonlar arası bölge çoğaltım polimorfizmi).....	32
2.6.10. REMAP (Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi).....	32
2.6.11. SSAP (Sequence specific amplified polymorphism-dizi spesifik çoğaltım polimorfizmi).....	33
2.6.12. RBIP (Retrotransposon-based insertion polymorphisms- retrotranspo zon insersiyon sekans temelli polimorfizm).....	33
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>34</b>
3.1. Materyal .....	34
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal.....	34
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	34
3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	36
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve solüsyonlar.....	37
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve ekimi.....	39
3.2.2. ICP-MS ile ağır metal analizi.....	39
3.2.3. DNA izolasyonu.....	40
3.2.4. RAPD analizi.....	41
3.2.5. IRAP analizi.....	43
3.2.6. RAPD ve IRAP elektroforez protokolü.....	44
3.2.7. RAPD-IRAP analizleri ve GTS değerlerinin hesaplanması.....	45
3.2.8. Gen ekspresyon analizi.....	45
3.2.8.a. RNA izolasyonu.....	45
3.2.8.b. RNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi.....	46
3.2.8.c. cDNA sentezi.....	46
3.2.8.d. Gen ekspresyonunun tespiti için RT-PCR analizi.....	47
3.2.8.e. DATA analiz.....	49
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>50</b>



<b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>51</b>
5.1. Sonuç.....	51
5.1.1. ICP-MS analiz sonuçları.....	51
5.1.2. RAPD analiz sonuçları.....	54
5.1.3. IRAP analiz sonuçları.....	62
5.1.4. Gen ekspresyonu analiz sonuçları.....	70
5.1.5. Ekmeklik buğday ve mısır örneklerinin ICP-MS, IRAP, RAPD ve Gen İfadesi Analizleri nin Kombinasyonu.....	77
5.2. Tartışma.....	80
<b>6. ÖNERİLER.....</b>	<b>87</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>88</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>110</b>
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar.....	110
Ek-2. Gen Ekspresyonu İçin Primer Dizaynındaki Blastlar.....	112
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>114</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1. Ağır metal kirliliğine neden olan faktörler .....	3
Şekil 1.2. Ülkemizde enerji üretiminde kullanılan kaynakların dağılımı.....	3
Şekil 1.3. 2011-2015 yılları arasında ülkemizde yetiştirilen buğdayın verileri.....	10
Şekil 1.4. 2011-2015 yılları arasında ülkemizde yetiştirilen mısırın verileri.....	11
Şekil 5.1. Ekmeklik buğdayda RAPD analizi ile elde edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin grafiği .....	56
Şekil 5.2. Ekmeklik buğday RAPD analizinde kullanılan OPK 19 primeri jel görüntüsü.	57
Şekil 5.3. Mısırdaki RAPD analizi ile elde edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin grafiği.....	60
Şekil 5.4. Mısır RAPD analizinde kullanılan OPY 15 primeri jel görüntüsü .....	61
Şekil 5.5. Ekmeklik buğdayda IRAP analizi ile elde edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin grafiği.....	64
Şekil 5.6. Ekmeklik buğday Sukkula retrotranspozona ait jel görüntüsü .....	65
Şekil 5.7. Mısırdaki IRAP analizi ile elde edilen polimorfizm ve GTS değerleri grafiği ..	68
Şekil 5.8. Mısır 3LTR5 transpozona ait bant görüntüsü .....	69
Şekil 5.9. Ekmeklik buğday Ta14S1 geni melting curve grafiği .....	70
Şekil 5.10. Ekmeklik buğday Ta14S2 geni melting curve grafiği.....	71
Şekil 5.11. Ekmeklik buğday gen analizinde kullanılan $\beta$ -actin geni melting curve grafiği.....	71
Şekil 5.12. Ta14S1 ve $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	72
Şekil 5.13. Ta14S2 ve $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	73
Şekil 5.14. Mısır ZmGF14-4 geni melting curve grafiği .....	74
Şekil 5.15. Mısır ZmGF14-6 geni melting curve grafiği .....	74
Şekil 5.16. Mısır gen analizinde kullanılan $\beta$ -actin geni melting curve grafiği .....	75
Şekil 5.17. ZmGf14-4 ve $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	76

Şekil 5.18. ZmGf14-4 ve  $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri..... 77



## TABLolar LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 2.1. Bitkilerin maruz kaldığı stres faktörleri .....	14
Tablo 3.1. Sterilizasyon, öğütme ve DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar .....	34
Tablo 3.2. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi ve RT-PCR’da kullanılan kimyasallar ...	35
Tablo 3.3. RAPD, IRAP PCR ve UV görüntülemeye kullanılan kimyasallar .....	35
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve modelleri.....	36
Tablo 3.5. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler.....	41
Tablo 3.6. RAPD analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	42
Tablo 3.7. RAPD PCR döngü protokolü.....	42
Tablo 3.8. IRAP-PCR analizinde kullanılan primerler.....	43
Tablo 3.9. IRAP analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	43
Tablo 3.10. IRAP-PCR döngü protokolü.....	44
Tablo 3.11. RNA’dan cDNA sentezinin ilk aşaması için hazırlanan master karışımı....	47
Tablo 3.12. cDNA sentezi için hazırlanan ikinci master karışımının bileşenleri ve miktarları.....	47
Tablo 3.13. Gen ekspresyon analizinde kullanılan primerler ve sekans bilgileri.....	48
Tablo 3.14. Gen ekspresyonu için yapılan RT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	49
Tablo 3.15. RT-PCR sıcaklık döngü protokolü.....	49
Tablo 5.1. Ekmeklik buğday örneklerinin ağır metal içerik analizi sonuçları.....	52
Tablo 5.2. Mısır örneklerinin ağır metal içerik analizi sonuçları.....	53
Tablo 5.3. Ekmeklik Buğday örneklerinin RAPD analiz sonuçları.....	55
Tablo 5.4. Mısır örneklerinin RAPD analiz sonuçları.....	59
Tablo 5.5. Ekmeklik buğday örneklerinin IRAP analiz sonuçları.....	63
Tablo 5.6. Mısır örneklerinin IRAP analiz sonuçları.....	67
Tablo 5.7. Ekmeklik buğday örneklerinden elde edilen gen ekspresyonu, ICP-MS analizi ile IRAP ve RAPD analiz sonuçları.....	78
Tablo 5.8. Mısır örneklerinden elde edilen gen ekspresyonu, ICP-MS analizi, IRAP ve RAPD sonuçları.....	79

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat derece
β	Beta
Δ	Delta
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

### Kısaltmalar

ABA	Absisik asit
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Belirsiz Bağlanma PCR
bç	Baz çifti
BME	Beta merkaptoetanol
BSA	Bovin serum albumin
Btep	Bin ton eşdeğer petrol
Cd	Kadmiyum
Co	Kobalt
Cr	Krom
CRED-RA	Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification
Cu	Bakır
Ct	Eşik döngüsü
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ÇŞB	Çevre ve Şehircilik Bakanlığı
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksिनükleotit fosfatlar
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Fe	Demir
g	Gram

GTS	Genomik Kalıp Stabilitesi
HCl	Hidroklorik asit
Hg	Civa
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer
IRAP	Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
K	Potasyum
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MSAP	Methylation Sensitive Amplified Polymorphism
N	Normal
NaCl	Sodyum klorid
NaOCl	Sodyum hipoklorit
ng	Nanogram
Ni	Nikel
OD260	260nm’de Okuma Değeri
OD280	280nm’de Okuma Değeri
P	Fosfat
Pb	Kurşun
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pmol	Pikomol
ppm	Milyonda Bir Birim
PVPP	Polivinilpolipirilidon
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REMAP	Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism
RBIP	Retrotransposon-based insertion polymorphisms
RNA	Ribo Nükleik Asit

ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SCAR	Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölge
sn	Saniye
SSR	Basit Dizi Tekrarları
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Trizma Base
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means
UV	Ultraviyole
V	Volt
Zn	Çinko

## 1. GİRİŞ

Canlı metabolizmaların hayatları boyunca etkileşim içinde buldukları ortam çevre olarak ifade edilmektedir. Hava, su, toprak çevrenin fiziksel unsurlarını, üreticiler (bitkiler), tüketiciler (hayvanlar), ayrıştırıcılar (bakteri ve mantarlar) ise biyolojik unsurlarını oluşturmaktadır (ÇŞB, 2006).

Dünyanın son yüzyıldaki en önemli sorunlardan birisi durumunda bulunan çevre kirliliği, metabolizmaların sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek yabancı maddelerin; hava, su ve toprağa yoğun bir şekilde karışması olayıdır (Bayar, 2009). İnsan aktiviteleri neticesinde çevreye atılan kirletici maddeler gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde geniş alanların kirlenmesine sebep olmaktadır (Memon ve Schröder, 2009).

Teknoloji devrimi ile birlikte sanayileşme hızının artması, hayat standartlarının yükselmesi, buna paralel olarak dünya nüfusunun oldukça artış göstermesi çevre kirliliğini de beraberinde getirmiştir. Çevre kirliliğinin boyutları sanayileşmedeki hız ile orantılı olarak giderek artmaktadır. Durdurulamayan bu artış çevrenin dengelerini altüst ederken aynı zamanda canlılar üzerinde de çeşitli olumsuzluklara neden olmaktadır. Bu etki ekosistemlerin sabit konumlu, üretici metabolizmaları olan bitkiler için daha fazladır (Munzuroğlu ve Gür, 2000).

Son on yılda kentsel büyüme ile paralel olarak çevre sorunları da artmaya devam etmiştir. Hızlı kentleşme, sanayileşme ve insan faaliyetlerine bağlı olarak araç trafiğinin ve endüstriyel faaliyetlerin artmasıyla birlikte ulaşım ve enerji ihtiyacı da artmaktadır (Grigoratos vd., 2014). Bu ihtiyaçların karşılanabilmesi için gerçekleştirilen faaliyetler neticesinde ortaya çıkan ağır metallerin yayılması, çevredeki en önemli sorunlardan biridir (Sawidis vd., 2011). Bu kirleticilerin etkileri, kentsel büyümeyle bağlantılı olarak ortaya çıkan olumsuz sağlık etkileri açısından önemlidir (Kampa ve Castanas, 2008; Kelepertzis, 2014).

Günümüzde, ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi temel yapıtaşlarının yapısında çeşitli yollardan ulaşarak yoğunluğunu arttıran ağır metaller, tüm canlılar için hayati önem taşıyan bir çevre sorunu halini almıştır (Stresty ve Madhava, 1999). Ağır metaller sahip



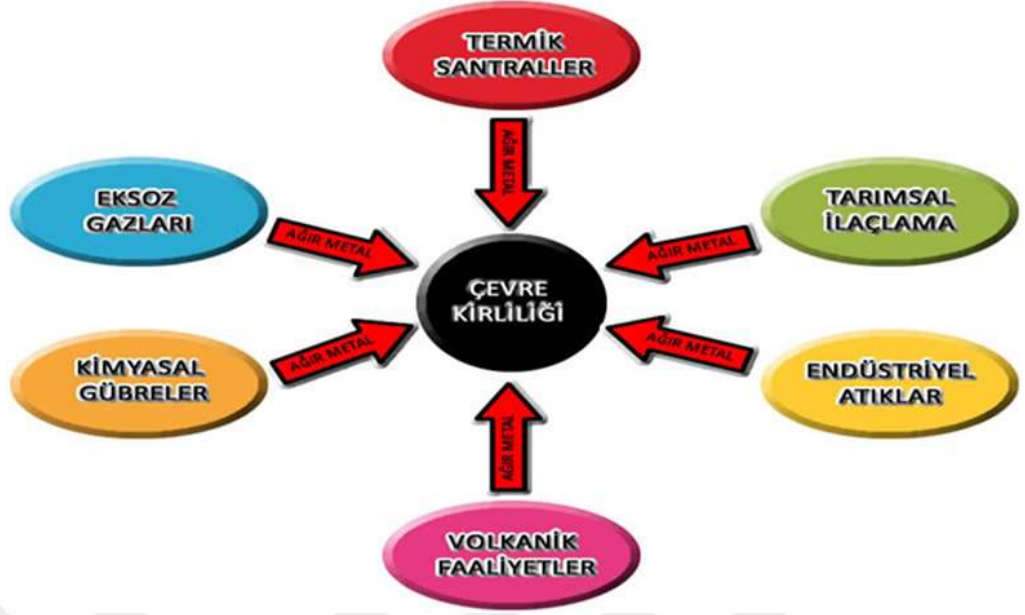
oldukları toksisite ve ortamdaki dirençleri nedeniyle en tehlikeli kirleticiler olarak sınıflandırılmaktadır (Öztürk, 2009).

Çevre kirliliğinin başlıca etkenlerden birisi olan ‘ağır metal’ tanımı bilim dünyasına çevre kirliliği ile birlikte adını yazdırmıştır. Ağır metaller, dünyanın doğal yapısında yer alan, değişmeyen ve yoğunluğu 5 g/cm<sup>3</sup>’ten büyük olan metaller olarak bilinmektedir. Endüstriyel üretimin hızla gelişmesiyle, ağır metaller çevre kirliliğinin ana kaynaklarından biri olmaya başlamıştır (Jomova ve Valko, 2011). Özellikle çevre kirliliği ve canlı metabolizmalara etkileri açısından demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), mobilden (Mo), kobalt (Co), nikel (Ni), krom (Cr), kurşun (Pb), berilyum (Be), cadmium (Cd), talyum (Tl), antimon (Sb), kalay (Sn), gümüş (Ag), arsenik (As), civa (Hg) ve alüminyum (Al) ağır metallerinin neden olduğu kirliliğe dikkat edilmelidir (Martin ve Coughtrey, 1985).

Canlılar, normal yaşamsal aktivitelerini devam ettirebilmek için ortamda bulunan bazı ağır metallere düşük konsantrasyonlarda ihtiyaç duyarlar. Örneğin, Mn, Fe, Co ve Ni gibi ağır metaller bitkisel metabolizmanın düzenli bir şekilde cereyanı için gerekli mikro elementlerdendir ve mevcut birçok çalışmada belirli miktarlarının bitkilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal gelişimi için önemli olduğu tespit edilmiştir (Nedelkoska ve Doran, 2000; Kupper vd., 2001; Tewari vd., 2002).

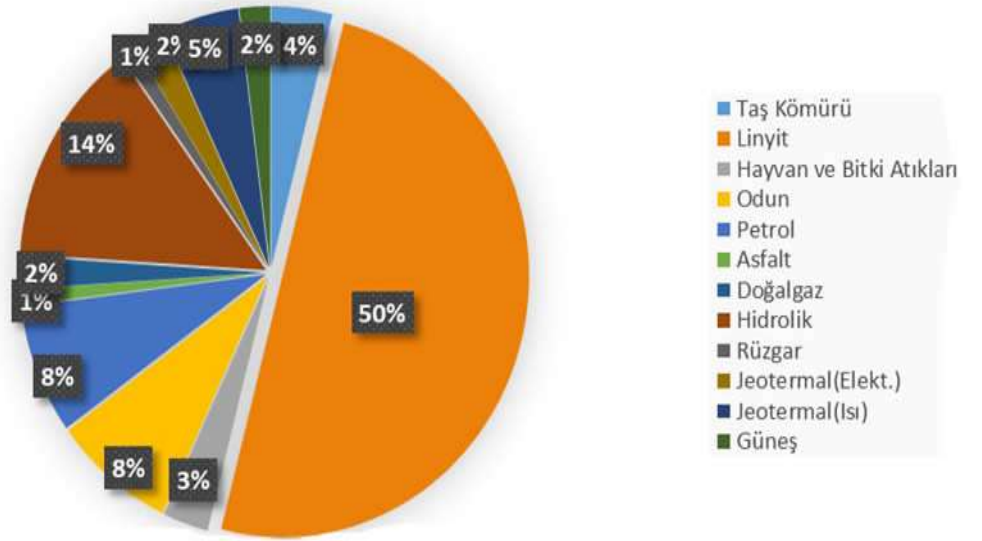
Ağır metallerin kolayca hareket edebilmesi, yayılması ve bir dereceye kadar toksik etki üretebilmesi bitki büyümesinin engellenmesine ve veriminde düşüşe neden olabilir. Hücresel düzeyde aşırı miktarda toksik ağır metal birikimi membranlar, proteinler ve DNA gibi farklı hücre bileşenleri için çeşitli stres tepkilerine ve hasara neden olmaktadır (Waisberg vd., 2003). Çevre kirliliğine ve ekolojik yapının tahribatına neden olan ağır metallerden Pb, Zn, Cu, Co, Cd, Cr, Ni gibi metal iyonları, kalıcılıklarından dolayı canlı sistemleri ve çevre sağlığı yönünden önem taşımaktadır. Bu iyonların yoğunlukları belirli bir seviyenin üzerine çıktığı zaman canlılar için toksik olabilmektedir (Sağlam ve Cihangir, 1995).

Ekosisteme giriş yolları dikkatlice incelendiğinde farklı faaliyet alanlarından ağır metallerin çevreye yayıldığı görülmektedir (Kahvecioğlu vd., 2007). Doğadaki ağır metal kirliliğine neden olan etmenler Şekil 1.1.’ de gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.** Ağır metal kirliliğine neden olan faktörler

Dünyada ve ülkemizde nüfus artışı ve teknolojik gelişmelerden kaynaklı olarak gün geçtikçe enerji ihtiyacı artmaktadır. 2011 yılı istatistiklerine göre ülkemizde enerji üretimi 32.229 Btep (bin ton eşdeğer petrol) olarak gerçekleşmiştir. Enerji üretiminin kaynaklar bazındaki dağılımı sırasıyla; linyit kömürü (%50), hidroelektrik santralleri (%14), odun (%8), petrol ve türevleri (%8), jeotermal-ısı (%5) ve taşkömürü (%4) şeklindedir (Koç ve Şenel, 2013) (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Ülkemizde enerji üretiminde kullanılan kaynakların dağılımı (Koç ve Şenel, 2013)

Dünyada ihtiyaç duyulan elektrik enerjisinin büyük bir kısmı fosil yakıtlardan sağlanmakta olup (Hardin, 2013), bu enerjinin yaklaşık %41'i kömürden elde edilmektedir (Ruth ve Tian, 2014). Ülkemizde enerji talebinin karşılanmasında ilk sırada yer alan termik santraller fosil yakıtların yakılması ile elektrik enerjisinin üretildiği tesislerdir. Yapım maliyetinin düşüklüğü, kolay kurulumu, kalori değeri düşük ve yüzeye yakın kömürün kullanılmasından dolayı işletme sayısı fazladır (Karaca vd., 2009).

Ülkemizin en büyük enerji kaynağını 9,3 milyar ton rezervi ile linyit oluşturmakta olup linyit kömürü kullanılarak elektrik enerjisi üreten aktif 24 adet termik santral bulunmaktadır. Ayrıca projesi hazırlanan ya da yapım aşamasında olan 30 termik santralin daha faaliyete geçirilmesi planlanmaktadır (EA, 2018).

Çalışmamızın kapsamını oluşturan Afşin-Elbistan enerji sahası ucuz, kaliteli ve enerji talebinin temini açısından kritik bir öneme sahiptir. Ülkemizin linyit rezervinin 4,5 milyar tonluk bölümünün Afşin-Elbistan'da olduğu düşünüldüğünde, sahanın enerji açısından değeri daha iyi anlaşılacaktır (Direskeneli, 2014). Afşin-Elbistan enerji sahasında, 1984 yılında 1.355 MW'lık Afşin-Elbistan A Termik Santrali ve 2004 yılında da 1440 MW'lık B Termik Santrali faaliyete geçmiştir. Planlanan C- D- E termik santral ünitelerinde hayata geçirilmesiyle birlikte bu enerji sahası Türkiye'nin en büyük enerji üretim merkezi olacaktır (Tamzok, 2014).

Linyit ve taş kömürü kullanan termik santraller tehlikeli çevresel kirlenici olarak kabul edilmekte ve ağır metallerin çevreye yayılmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Öztürk, 2009). Afşin-Elbistan termik santrallerinde enerji elde edilmesi sırasında linyitin yakılmasıyla ortaya çıkan baca gazları, baca külleri, kömür ve kül stok sahasındaki küller, açık kömür işletme sahaları, dekapaj sahaları, kömür nakil yolları, kömür ve küllerin bantlarla taşınması ve su kullanımı nedeniyle çevre olumsuz yönde etkilenmektedir (Kadıoğlu ve Telliöglü, 1996).

Kömür sektöründe tehlikeli atıklara maruz kalmanın temel yolu çıkarma, taşıma-öğütme ve yanma faaliyetleri sırasında ortaya çıkan kömür tozu parçalarının teneffüs edilmesidir. Birçok çalışmada kömür ve parçacıklarının, birçok solunum yolu hastalıklarını tetiklediği, akciğer hasarına neden olduğu ve kan hücrelerinde DNA hasarına yol açtığı tespit edilmiştir (Cohen vd., 2008; Santo Tomas, 2011).

Termik santrallerden ortaya çıkan ağır metallerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olduğu ve bundan dolayı DNA hasarını, DNA onarım mekanizmalarını ve enzimlerin gen ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir (Jomova ve Valko, 2011; IARC, 2012). ROS'un DNA iplikçik kırılmasını tetiklediği, DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olduğu, ara ve iplikçik içi çapraz bağların oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Jena, 2012). Bundan dolayı kömürün işlenmesi ve yakılması, canlı organizmalar için önemli çevresel ve potansiyel tehlikelere neden olmaktadır (Teixeira vd., 2009; León-Mejía vd., 2011). Bu etkilerinden dolayı insanlar, bitkiler ve farklı hayvansal metabolizmalar üzerinde kömür ürünlerinin etkilerinin tespiti için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Termik santrallerde çalışan işçilerin sağlık riskleri ile ilgili yapılan çalışmada, yüksek miktarda ve uzun süreli kömür külüne maruz kalmanın, akciğer fonksiyonlarında bozulma ve solunum semptomlarına neden olduğu tespit edilmiştir (Schilling vd., 1988; Oxman vd., 1993).

İngiltere'de termik santral işçilerinde yapılan 29 yıllık bir takip çalışmasında plevral kansere bağlı ölümlerin önemli oranda artış gösterdiği tespit edilmiştir (Nichols ve Sorahan, 2005).

Örneğin Afşin-Elbistan A santrali çalışanlarında olası genotoksik risklerin araştırıldığı çalışmada, periferik kan lenfositlerinde comet assay, poliploidi, yapısal kromozom bozukluğu ve mikro nükleus sıklığı analiz edilmiştir. Bu dört belirteçten elde edilen hasar seviyelerinin kontrol grubundan çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çelik vd., 2007).

Kömür yakma ürünlerine maruz kalan işçiler üzerinde comet assay analizi ile olası genotoksik risklerin araştırıldığı çalışmada Venöz kan örnekleri sigara, tütün çiğneme veya alkol tüketim alışkanlığı olmayan işçilerden toplanmıştır. Sonuçlar, bilinen herhangi bir genotoksik ajana maruz kalmayan kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve araştırma sonuçlarında gruplar arasında DNA hasar düzeyleri açısından anlamlı farklar tespit edilmiştir (Durmaz vd., 2008).

Kömür ve uçucu kül maruziyetinin genotoksik etkilerinin tespit edilmesi için comet assay ve mikro nükleus testleri ile fareler üzerinde yapılan araştırmada kimyasal ajanların ve oksidatif stres mekanizmalarının DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir (Matzenbacher vd., 2017).

Kahraman (2011) tarafından Afşin-Elbistan termik santralinde oluşan küllerin tarım alanlarında yararlanma olanakları incelenmiş ve uygulanan külün bitki bünyesinde yüksek oranda ağır metal birikimine neden olduğu belirlenmiştir.

Kenger (2014)'in yaptığı çalışmada Afşin-Elbistan termik santralinden elde edilen küller ile toprak karışımında mısır yetiştiriciliği denenmiş ve en düşük kül dozu uygulamasında dahi mısır bitkisinin bitki boyu, gövde, yaprak ve kök ağırlığının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.

Bozyel (2011) Çanakkale ili Çan termik santralinden kaynaklanan toz atığın mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde büyüme üzerindeki etkilerini anatomik olarak incelenmesini gerçekleştirmiştir. Toz atık uygulamalarının, çimlenme oranının, klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının, yaprak üst ve alt yüzey stoma indeksinin, yaprak iletim demetleri ve bulliform hücreleride enine ve boyuna gelişimini artırmasına rağmen bitkinin genel gelişimini engellediğini belirlemiştir.

Muğla'da bulunan Yatağan termik santralinden kaynaklanan uçucu külün mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde büyüme, mineral beslenme ve ağır metal içeriği üzerine olan etkisi incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda yüksek orandaki uçucu kül uygulamasının kuru madde, gövde çapı, yaprak alanı ve toplam klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu, düşük orandaki kül uygulamasının ise, büyüme parametreleri ve mineral beslenmeyi olumlu etkilediği tespit edilmiştir (Tuna ve Girgin, 2005).

Termik santrallerden yayılan ağır metallerin neden olduğu kirliliğin ölçülmesinde likenlerin biyoindikatör olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Yatağan termik santrali çevresinden toplanan *Xanthoria parietina* türü likenleri biyoindikatör olarak kullanılıp, bünyelerinde ölçülen ağır metal yoğunluğunun hava kirliliği ve çevreye etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla bazı ağır metallerin (Hg, Ni, Pb, Cu ve Fe) analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar haritalanarak önceki çalışmalarla

karşılaştırılmıştır. Ağır metal yoğunluğunun en fazla santralin yakın çevresindeki alanda olduğu tespit edilmiştir (Ölgen ve Gür, 2012).

Termik santrallerin çevreye ve canlılara olan etkileri hakkında dünya çevresinde de farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin Menezes vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, kömür madenciliği faaliyetleri nedeniyle tahrip olan topraklarda kolayca yetişen, yaygın bir bitki olan *Baccharis trimera* üzerindeki etkileri incelenmiştir. Comet assay yöntemi ile yapılan değerlendirmelerde kontrol gurubu örnekler ile karşılaştırıldığında mutajenik etkiler gözlenmiştir. Ayrıca DNA hasarının emilen kömür atıklarınca indüklendiği tespit edilmiştir.

Manosij vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada kömür yakımı sonucu oluşan uçucu küllerin *Brassica* türlerinde oluşturduğu genotoksik etki, kontrol örnekleriyle karşılaştırılmış ve DNA hasarında belirgin bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda Jana vd. (2017)'nin yaptığı çalışma sonucunda kömür yakılması sonucu açığa çıkan uçucu kül içerisinde yetiştirilen *Allium cepa*'da önemli oranda DNA hasarının meydana geldiği vurgulanmıştır.

Termik santralden savrulan küllerin değerlendirilebilmesi ve geri dönüşüme kazandırılabilmesi için farklı bilim dallarında da çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Tulga (2017) tarafından yapılan çalışmada Çanakkale Biga Bekirli termik santralinin uçucu külünün betonun mekanik özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Basınca dayanıklı beton ürünlerinin elde edilmesinin amaçlandığı çalışmada olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Can Alas (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Kangal termik santralinden atılan uçucu kül beton yapımı uygulamalarında kullanılmış ve üretilen blokların basınç dayanımı, su emme, kılcal su emme, yoğunluk, boşluk miktarı ve ısı iletkenlik değerleri belirlenerek blok üretilebileceğini göstermiştir.

Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn ve benzeri ağır metallerin neden olduğu çevre kirliliği tüm canlı metabolizmalar için önemli bir tehdittir. Termik santrallerden savrulan kül oranındaki artış ile çevreye salınan ağır metal miktarındaki artış doğru orantılı olup çevreye salınan uçucu küllerin genotoksik ve mutajenik maddeler içerdiği saptanmıştır

(Leonard vd., 1984; Constantine vd., 2004; Çelik vd., 2006). Birçok çalışma ağır metallerin bitki büyümesini, fizyolojisini, biyokimyasal ve moleküler yapısını etkilediğini göstermiştir. Örneğin Gangwar vd. (2011) farklı dozlarda Cr uyguladıkları *Pisum sativum* L. fidelerinde Cr toksik etkisinden dolayı büyümede azalma ve azot emiliminde düşüş tespit etmişlerdir. Kumar vd. (2012) Pb 'nun meydana getirdiği toksik etkiyi belirlemek için yaptıkları çalışmada farklı dozlar ile muamele ettikleri ıspanakta hücre ölümüne kadar varan hücresel lezyonlar tespit etmişlerdir.

Liu vd. (2009) arpada Cd 'un genotoksik etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada doz arttıkça RAPD bant profillerinde değişim tespit etmişlerdir. Cd 'un en yüksek dozunda RAPD polimorfizm oranı %53,4 olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada Cd varlığının kök uzamasını azalttığı belirtilmiştir.

Cenkçi vd. (2009) fasulye fidelerinin Cr ve Zn ağır metallerine maruziyeti sonucunda RAPD profillerinde kontrol gurubuna kıyasla %25-30 aralığında polimorfizm meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Ağır metaller metabolizmaların moleküler yapısını etkilerken bu durum hareketli gen parçaları olan transpozonlara yansımaktadır (Kiefer, 2007; Hamad-Mecbur vd., 2014). Yiğider vd. (2016) Mn ağır metaline maruz bırakılarak çimlendirilen mısırdaki artan doza bağlı olarak retrotranspozon polimorfizminde artış olduğunu tespit etmişlerdir. IRAP analizi sonuçlarına göre retrotranspozon polimorfizmi en yüksek Mn dozunda % 42,00 olarak bulunurken GTS değeri aynı örneklerde %58,00 olarak tespit edilmiştir. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum*) tuz stresinin retrotranspozon hareketini, insersiyonel polimorfizmi arttırdığı IRAP analizleri sonucu belirlenmiştir (Woodrow vd., 2010). Grandbastien vd. (1997) tütün bitkisinde CuCl<sub>2</sub>, tuz ve çeşitli abiyotik streslerin Tto1 ve Tnt1 retrotranspozonlarının ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Tuz stresi altında çimlendirilen *Triticum aestivum* örneklerinde kullanılan IRAP primerlerinde %37,6 ile %47,3 arasında LTR retrotranspozon polimorfizmlerinin varlığı tespit edilmiştir (Sığmaz vd, 2015).

Gen ekspresyonunun bilgi kaynağı DNA'dır. Metabolizmanın sahip olduğu DNA'dan kodlanan bilgiler, fenotipin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Epigenetik mekanizmalar ise çevresel etkiler ve çeşitli etkenlerin katkısıyla epigenotip adı verilen bir yapı oluşturur

(Bora ve Yurter, 2007; Güneş ve Kulaç, 2013). Epigenetik mekanizmanın önemli bir unsuru olan DNA metilasyon motifleri metabolizmanın beslenme rejimindeki farklılık, meydana gelen genetik polimorfizmler ve maruz kalınan kimyasallara bağlı olarak farklılaşma gösterebilir. Ağır metaller ya da aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel ajanlar da hücre metabolizmasını etkileyerek epigenetik motiflerde değişikliklere neden olabilir. DNA'daki aşırı metillenme gen ifadesinde bozukluğa ya da kromozomal düzensizliklere (kromozomların yeniden düzenlenmesi) yol açabilir (Orcan, 2006).

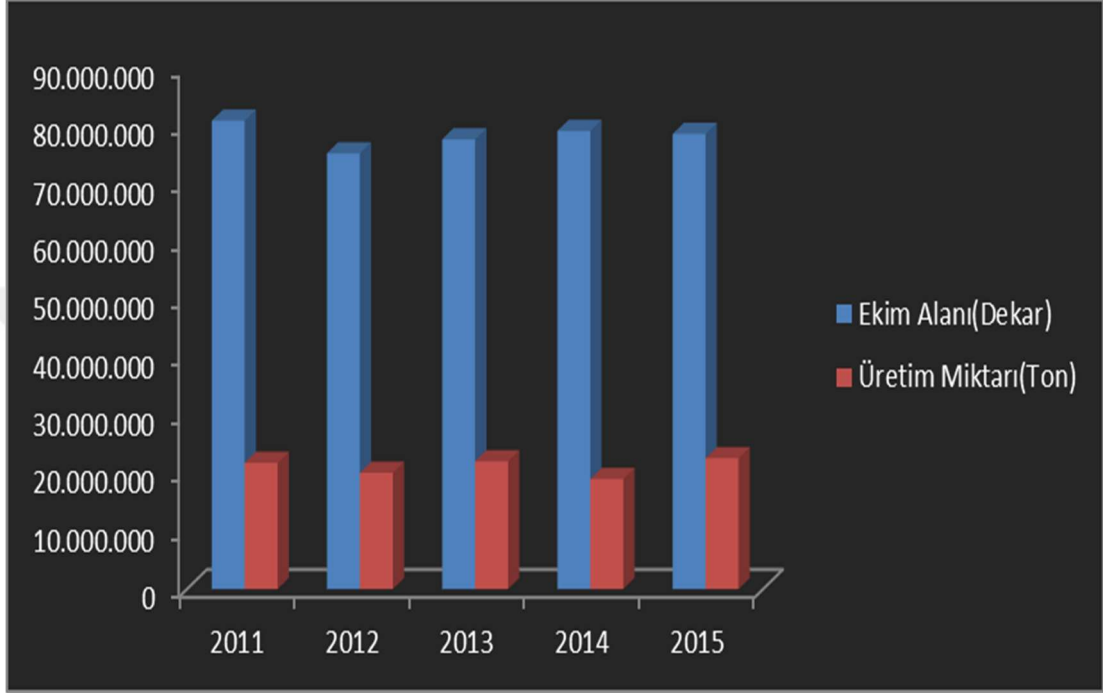
Canlı metabolizmalara etkisi açısından önemli bir ağır metal olan Pb'nun gen ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek için Gao vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada mısır köklerinde türe bağlı olarak aşırı Pb birikiminin olduğu ve bu durumda türlerde anlamlı ekspresyon değişikliklerine neden olduğu bildirilmiştir. Dalyan (2012) tarafından hardal bitkisi üzerinde farklı dozlarla uygulanan Pb ve Cd ağır metallerinin gen ekspresyonuna etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada aynı bitkinin kök ve yaprakları arasında dahi mRNA ekspresyon seviyelerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Erkan (2014), arpa ve buğday fidelerinde ağır metal stresinin gen ekspresyonu üzerine etkisini incelemiş ve uygulama dozlarındaki artışla ters orantılı olarak gen ekspresyonunda azalma tespit etmiştir.

Dünyada üretim miktarı ve ekim alanı büyüklüğü dikkate alınır en fazla tercih edilen tarımsal ürün gurubunun tahıllar olduğu görülmektedir. Günümüzde işlenen toprakların yaklaşık yarısında tahıl üretimi yapılmaktadır (Köksel vd., 2000). Dünyada ve ülkemizde en çok üretimi gerçekleştirilen tahıl ürünü buğdaydır. Buğday ve buğday ürünleri günlük beslenmede alınan karbonhidratın temelini oluşturmakta ve günlük enerjinin büyük kısmını karşılamaktadır. Buğday, nişasta ve lif gibi karmaşık karbonhidratların en iyi ve en ekonomik kaynaklarının başında gelir. Dünyada gelişen 94 ülkede 4,5 milyar insanın protein ihtiyacının yüzde 20'si buğday ürünleri tarafından karşılanmaktadır (Brenchley vd., 2012). Türkiye, dünyada en fazla buğday ve buğday ürünü tüketen ülkelerden biridir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) istatistiklerine göre, Türkiye'de kişi başına yıllık tüketim miktarı 173,5 kg iken Avrupa Birliği ülkelerinde kişi başına düşen yıllık buğday ürünü tüketimi ise 102,9 kg'dır. Ülkemizde 2016 verilerine göre 11,6 milyon hektarlık bir alanda tahıl üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu alanın yaklaşık %65,3'ünde buğday üretimi gerçekleştirilirken, %24,1'inde arpa, %6,3'ünde mısır



üretimi yapılmaktadır. Bu ürünleri sırasıyla çavdar (%1,2), çeltik (%0,9), yulaf (%0,8) ve tritikale (%0,3) üretimi takip etmektedir (TÜİK, 2016).

TÜİK (2016) verilerine göre buğday türlerinin ülkemizdeki son beş yıldaki üretim miktarı ve ekim alanının büyüklüğüne ait detaylar Şekil 1.3.'de verilmiştir.

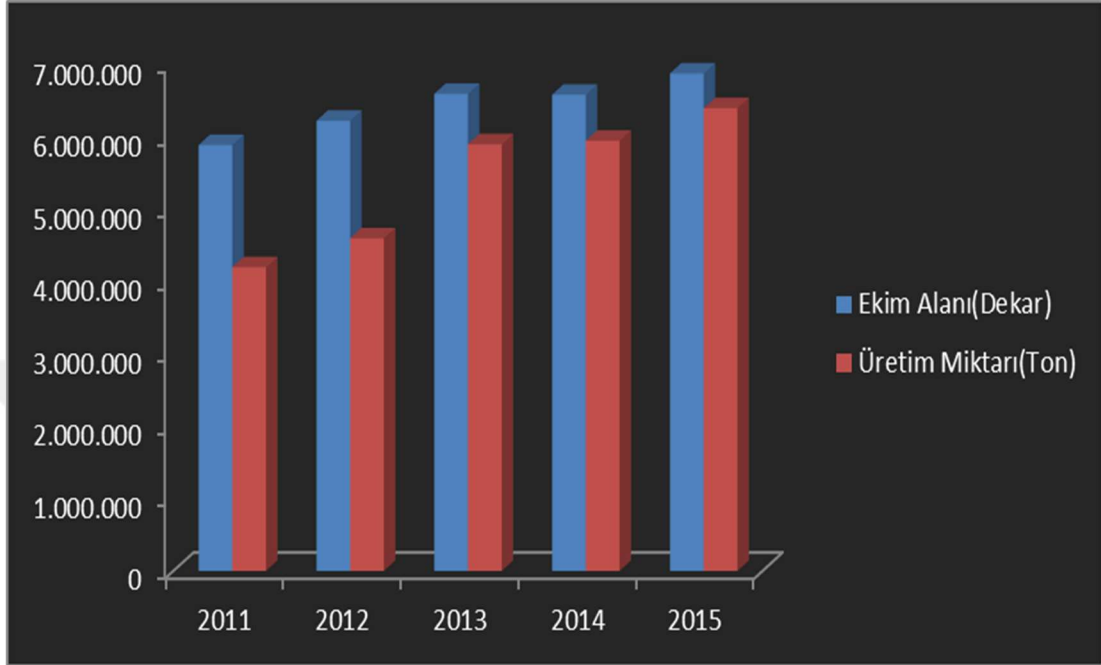


Şekil 1.3. 2011-2015 yılları arasında ülkemizde yetiştirilen buğdaya ait veriler

Bir diğer önemli tahıl ürünü olan mısır, dünyada genel olarak insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Dünyada toplam 1,5 milyar hektar tarım alanının yaklaşık 712 milyon hektarında tahıl ekimi yapılırken, bu alanın 183 milyon hektarında mısır yetiştirilmektedir. Mısırın tahıl ekiliş alanı içindeki payı %25,7'dir. Yeryüzünde yıllık toplam 2,7 milyar ton tahıl üretimi gerçekleştirilirken, bu üretimin 1.038.281 bin tonu mısırdır. Mısırın toplam tahıl üretimi içindeki payı %38,1'dir.

Dünya'da ekiliş alanı bakımından buğday ve çeltikten sonra üçüncü sırada gelen mısır, üretim miktarı açısından birinci sıradadır (FAO, 2014). Dünya genelinde ve ülkemizde bitkisel kaynaklı protein ihtiyacının karşılanması bakımından mısır üretimi büyük bir öneme sahiptir (Süzer, 2004).

TÜİK (2016) verilerine göre ülkemizde ekimi yapılan mısır türlerinin son beş yıldaki üretim miktarı ve bu ekimin gerçekleştirildiği ekim alanının büyüklüğüne ait detaylar Şekil 1.4.' de verilmiştir.



Şekil 1.4. 2011-2015 yılları arasında ülkemizde yetiştirilen mısıra ait veriler

Bitkiler sabit konumlarından dolayı çevre kirliliğinin meydana getirdiği genetik toksisitenin tespitinde kullanılan biyoindikatör durumundadırlar (Krystofova vd., 2009). Bu durumdan dolayı *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* ve *Arabidopsis thaliana* gibi farklı bitki türleri araştırmacılar tarafından son yıllarda genotoksik etkinin tespiti için model organizma olarak kullanılmaktadır (Liu vd., 2005). Buğday ile mısırın canlıların beslenme ihtiyaçlarını karşılamada yoğun kullanımı ve çevre kirliliğinin neden olduğu toksisitenin tespitinde tercih edilmeleri bizi bu tahıl ürünleri üzerinde çalışmaya sevk etmiştir.

Bu araştırmada, ağır metallerin *Triticum aestivum* L. (ekmeklik buğday) ve *Zea mays* L. (mısır) tahıllarının retrotranspozon hareketliliğine ve gen ekspresyon düzeyine etkisi ile oluşabilecek genetik ve epigenetik değişikliklerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmanın kapsamını, Kahramanmaraş İli Afşin ve Elbistan İlçeleri sınırları içerisinde yer alan Afşin-Elbistan Termik santralinden linyit kömürünün yakılması sonucunda

Çevreye yayılan ağır metallerin tahıllar üzerindeki genotoksik etki düzeyinin tespiti oluşturmuştur.

Tezin materyal ve yöntem bölümünde; araştırmada kullanılan bitkisel materyalin temini, kullanılan zelteler ve oranları, moleküler incelemelerde kullanılan kimyasallar ve reaksiyonlar hakkında bilgilendirme yapılmıştır. Ayrıca moleküler incelemelerde kullanılan RAPD, IRAP, gen ifadesi yöntemlerinin aşamaları hakkında ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

Bulgular kısmında çalışma esnasında elde edilen verilere yer verilmiştir.

Sonuç ve tartışma bölümünde; araştırmada elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve literatür araştırmalar ile karşılaştırılması yapılmıştır.

neriler bölümünde ise elde ettiğimiz veriler ve literatür çalışmalarının ışığında ağır metal kirliliğinin etkilerinin azaltılması amacıyla öneriler getirilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Ekmeklik Buğday ve Mısırın Genom Bilgisi

Buğday ilk kez Linnaeus tarafından 1753 yılında sınıflandırılmıştır. 1918'de Sakamura, buğdayı genom yapısına göre üç gruba ayırmış ve bunları diploidler 14 ( $n = 7$ ), tetraploidler 28 ( $n = 14$ ) ve hexaploidler 42 ( $n = 21$ ) şeklinde ifade etmiştir. Ekmeklik buğday *Triticum aestivum* olup, *Triticum durum* ve *Triticum compactum* diğer önemli türlerdir (Briggle, 1967). *Triticum aestivum* L. DNA'sı 17 milyar baz çifti ve 94-96 bin gen sayısı ile insandan beş kat daha geniş genom boyutuna sahiptir. *Triticum aestivum* L. genomu *Arabidopsis thaliana* genomundan 100, çeltik genomundan 40 ve mısır genomundan ise 6 kat daha büyüktür (Bennett ve Smith, 1976; Amuruganathan ve Earle, 1991). Ekmeklik buğday genomunun % 80' inden fazlasının tekrarlayan DNA dizilimlerinden oluştuğu tespit edilmiştir (Smith ve Flavell, 1974).

Haploid kromozom sayısı  $n = 10$  olan *Zea mays* L. yaklaşık 2,4 milyar baz çiftinden oluşan geniş bir genoma sahiptir (Zhang vd., 2009). Barbara McClintock tarafından transpoze elementlerin keşfini sağlayan mısır genomunun % 66' sının tekrar eden elementlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca mısır genomu insandan daha çok gen barındırmaktadır. Mısır yaklaşık 42.000-56.000 arası gene sahip bir tahıldır (George vd., 2005).

### 2.2. Bitkilerde Stres Kavramı

Canlılar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için çevre ile sürekli etkileşim halindedirler. Etkileşim içerisinde bulunan çevre şartlarının bitkinin doğal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde bitkide meydana gelen duruma stres denir. Başka bir ifade ile bitki bünyesine negatif etkileri olan dış faktörler olarak tanımlanır (Levitt, 1972). Ayrıca ekolojik stres; bitki doğal yaşam alanı içinde metabolik iç dengeyi değiştiren veya bozan, büyüme durumundaki herhangi bir değişiklik olarak tanımlanmıştır (Shulaeva vd., 2008).

Stres faktörleri temelde biyotik ve abiyotik stres faktörleri şeklinde iki başlık altında sınıflandırılabilir. Bitkilerin maruz kaldığı abiyotik ve biyotik stres faktörleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Bitkilerin maruz kaldığı stres faktörleri

<b>Stres Faktörleri</b>	
<b>Abiyotik faktörler</b>	<b>Biyotik faktörler</b>
Radyasyon	Bitki ilişkileri
Mineral dengesi	Mikroorganizmalar
Mekanik etkiler	Hayvansal etkiler
Su miktarı	Antropojenik etkenler
Sıcaklık	
Ultraviyole Işık	
Ağır Metaller	
Oksijen Yetersizliği	

Bitkilerin strese olan cevabı stresin yoğunluğuna ve süresine bağlı olarak değişen dinamik bir süreçtir (Kosová vd., 2011). Çünkü bitkiler aktif hareket edememelerinden dolayı yaşadıkları çevre koşullarındaki değişikliklerden diğer organizmalara göre çok daha fazla etkilenmektedirler (Taiz ve Zeiger, 2010). Abiyotik streslere karşı tolerans oluşumu ise tüm organizma ve hücresele seviyelerde oldukça karmaşıktır. Çünkü bitkiler üzerindeki stres faktörlerinin derecesi ve bitkilerin bu etkenlere karşı geliştirdiği cevaplar, bitki yaşamında değişik boyutlarda, iç içe faktörler ve cevaplar olarak ortaya çıkar (Ashraf ve Foolad, 2007).

### **2.3. Termik Santrallerden Yayılan Ağır Metaller**

Sözcük anlamı ile toksik "zehir", toksikoloji ise "zehir bilimi" demektir. Toksik maddeler "canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde" şeklinde tanımlanabilir. Toksikolojinin bir alt dalı olan genotoksikoloji ise istenmeyen kalıtsal değişikliklere ve epigenetik fenomenlere neden olabilen, mutasyonları da içine alan DNA'nın yapısını

etkileyen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri inceleyen bilim dalı olarak adlandırılır (Vural, 2005).

Ekosistem içerisinde yer alan sanayi atıkları, UV ve X ışınları, ağır metaller, gıdalara dayanıklılık ve görsellik veren katkıları, tarımsal ilaçlar gibi çok çeşitli kimyasal ve biyolojik maddeler canlılar üzerinde toksik etkilere neden olabilmektedir (Alam ve Jones, 2014). Genotoksik etkiye sahip olan bu maddeler DNA'nın yapısını veya gen ifadesini geri dönüşümü olmayacak bir biçimde değiştirebilirler. Bundan dolayı genotoksinler aynı zamanda mutajenik maddelerdir (Vural, 1996).

Günümüzde enerji ihtiyacı toplumun önemli önceliklerinden birini oluşturmaktadır. Termik santrallerde bu ihtiyacı karşılamada önemli bir yer tutmaktadır. Termik santrallerde enerji üretimi için linyit kömürü yakılmaktadır. Linyit kömürünün yakılması sonucunda kül ile çevreye Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Mn, Fe ağır metalleri salınmakta olup ekosistem ve besin zinciri döngüsü yoluyla toprak, üreticiler ve tüketiciler arasında geçiş yapabilmektedir (Kahvecioğlu vd., 2004).

Bu ağır metallere Cu, özkütlesi 8,96 g/cm<sup>3</sup> olan 1B grubu geçiş elementidir. Cu, yoğunlaştığı dokunun barındırdığı hücrelerin nükleusuna tutunur. Nükleus, sahip olduğu nükleik asit ve proteinlerin varlığı Cu'nun depolanmasında önemli yere sahiptir. Hücre bünyesindeki Cu'nun geneli bazı proteinlerin yapısına katılır. Bu durum Cu'nun teratojenik etkilerinden başka mutajenik ve karsinojenik etkilere sahip olabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır (Bhattacharya vd., 2013).

Su mercimeği (*Lemna minör Linneaus 1753*) farklı konsantrasyonlardaki Cu, Cr ve Pb ağır metal karışımlarına maruz bırakılmış ve bu ağır metallerin toksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Üçüncü, 2011). Başka bir çalışmada enginar (*Cynara scolymus L.*) bitkisine farklı dozlarda Cu ağır metali uygulanmış ve RAPD analizlerinde bant kazancı ve/veya kaybı değişikliklerine neden olduğu gözlenmiştir (Burak Batır, 2014). Aksoy ve Aras (2009) farklı dozlarda Cu uyguladıkları patlıcanda (*Solanum melongena*) RAPD analizi sonucunda doz artışına bağlı olarak DNA profillerindeki değişim tespit edilmiştir. *Pseudevernia furfuracea L.* Zopf liken türünde ağır metallere Cu'nun DNA üzerindeki olası etkileri RAPD analizi kullanılarak incelenmiş ve DNA hasarı tespit edilmiştir (Vardar, 2011). Xiufang Ou (2012) yaptığı çalışmada Cu ağır metalinin stresi altında

çeltik fidelerinde TEs (Transpozonal Elementler) ve protein kodlayan genlerin sitozin metilasyonu desenlerinin önemli ölçüde değiştiğini saptamıştır.

Zn, özkütlesi  $7,2 \text{ g/cm}^3$  olan periyodik tablonun geçiş elementlerindedir. Aşırı Zn maruziyeti organizmalarda zararlı etkilere sahip reaktif oksijen türleri (ROS) üretilmesine neden olabilmektedir. Zn tarafından üretilen serbest radikaller DNA da dâhil olmak üzere, hemen hemen tüm hücre makromoleküllerine zarar verebilmektedir. DNA hasarları örneğin metilasyonu, alkilasyonu, oksidasyonu, baz silme, pirimidin dimerlerini, çapraz bağlantıları, DNA zinciri kırılmalarını ve baz değişikliğini indükler. Bunun sonucunda fotosentetik protein sentezinde azalma, hücre zarının yok edilmesi gibi çeşitli fizyolojik etkileri oluşarak tüm organizmanın büyüme ve gelişmesini etkiler (Tuteja vd., 2009; Ertürk vd., 2013).

Ak (2011) yaptığı çalışmada buğday çeşitlerinin ağır metallere karşı toleransını incelemiş, Zn ağır metal uygulamalarının sonucunda buğday çeşitlerinin mitotik indeksinde azalmaya neden olduğu ve bununla birlikte kromozomal anormalliklerine (düzensiz dağılım, yapışık metafaz, kromozom kırığı ve köprüsü gibi) neden olduğu tespit etmiştir. Ertürk vd. (2015) yaptıkları çalışmada *Zea mays* L. de yüksek dozda Zn'nun metil transferaz aktivitesinde azalmaya ve bazı özel gen bölgelerinde hipometilasyona neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Pb, yoğunluğu  $11,3 \text{ g/cm}^3$  olan 4 A gurubu elementidir. Pb'nun toprak ve hava arasındaki sirkülasyonu çeşitli şekillerde olabilmektedir. Bu hareketlilik sanayi kuruluşlarındaki atıklar, araç eksozlarından verilen gazlar, kimyasal ve boya sanayi faaliyetleri, pestisitler ile gerçekleşebilmektedir (Kalinowska, 1984; Aksoy, 1995; Saygıdeğer, 1995; Mark ve Hendershot, 1997). Domates (*Lycopersicum esculentum* L.) tohumlarının farklı konsantrasyonlardaki  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  solüsyonu içerisinde çimlendirilmesi ile yapılan çalışmada Pb'nun RAPD ile genotoksik etkisi belirlenmiştir (Soydam Aydın vd, 2015). Ayrıca başka bir çalışmada comet assay tekniği ile marul (*Lactuca sativa*)'da yüksek dozlarda uygulanan Pb'nun etkisi ile oluşan DNA hasarı ve mikronükleus varlığı tespit edilmiştir (Silva vd., 2017).

Cd, özkütlesi  $8,65 \text{ g/cm}^3$  olan periyodik tablonun 2B gurubu geçiş elementlerindedir. Cd başlıca endüstriyel işlemler veya gübre uygulamasından çevreye katılır ve bitki

alımıyla gıda zinciriyle aktarılabilen insanlar, hayvanlar ve bitkiler için toksik bir ağır metaldir (Wagner, 1993). Bitki metabolizması için tehlikeli olan Cd; sulama sistem parçaları, fosil yakıtların tüketimi, bitki yetiştiriciliğinde tohum ve üretim sırasında kullanılan kimyasal gübreler ve fabrika gazlarından genellikle çevreye verilmektedir (Kahvecioğlu vd., 2007). Diğer hububatlara kıyasla, buğdayda kök yoluyla daha fazla Cd alınarak buğday tanelerinde birikir (Greger ve Löfstedt, 2004; Jafarnejadi vd., 2011). Bu nedenle, buğday türevi ürünler insanların Cd alımının ana kaynağıdır. Cd toksisitesinin aynı zamanda bitkilerde oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırdığı belirtilmiştir (Chen vd., 2014; Poghosyan vd., 2014; Tauqeer vd., 2016). Liu vd. (2007) Cd ağır metaline maruz kalan arpa (*Hordeum vulgare*) fidelerinde genetik sapmaların ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Aslam vd. (2014) çalışmalarında Cd'un toksitesini *Capsicum annuum* L. üzerinde kromozom anormalliği ve mitotik indeks testleri ile incelemişler ve hasara neden olduğu sonucuna varmışlardır. Neelima ve Reddy (2003), yaptıkları çalışmada patlıcan tohumlarında Cd'un belirli bir yoğunluğun üzerine çıktığında toksik etki yaptığını, Lin vd. de (2007) *Vicia faba* için toksik bir ağır metal olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında Cd tarafından uyarılma sonrasında bitkide oluşan toksisiteden dolayı meydana gelen DNA hasarı comet assay yöntemi ile tespit edilmiştir.

Cr, özkütlesi  $7,65 \text{ g/cm}^3$  olan periyodik tablonun 6B gurubu geçiş metallere aittir. Maria Nilza vd. (2016) Cr'un genotoksik etkisini kanalizasyon suyu ile yetiştirilen *Allium cepa* L. üzerinde mitotik indeks ve kromozom anormallikleri testleri ile belirlerken, farklı dozda Cr'un *Evernia prunastri*'de DNA hasarına neden olduğunu tespit edilmiştir (Ünal, 2008).

Ni, özkütlesi  $8,9 \text{ g/cm}^3$  olan periyodik tablonun 8B gurubu geçiş metallere aittir. Ni fosil yakıt kullanılan tesisler, çelik fabrikaları, alaşım ve galvaniz üretim tesislerinde yoğunlukla kullanılan bir metal olup üreaz gibi enzimlerin yapısına katılmaktadır (Kacar ve Katkat, 2006). Yücel (2013) tarafından yapılan çalışmada *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *invictus* çeşitinde Ni ağır metal uygulamalarının genotoksik ve enzimatik düzeyde etkileri araştırılmış ve kromozom anormalliklerine yol açtığı tespit edilmiştir.

Mn, özkütlesi  $7,43 \text{ g/cm}^3$  olan periyodik tablonun 7B geçiş metallere aittir. Mn bitki büyüme ve gelişmesi için mikro besin maddesidir. Ancak aşırı Mn'nin bitki ve hayvan



organizmalarında DNA hasarı ile transkripsiyonu ve translasyonu etkilediği tespit edilmiştir (Nicosia vd., 2014; Zhu vd., 2014; Sheshadri vd., 2015). Son yıllarda, bitki metabolizması üzerindeki Mn toksik etkilerini ortaya çıkarmak için birçok araştırma yapılmıştır (Doroftei vd., 2010; Ertürk vd., 2012a, 2012b). *Phaseolus vulgaris*'de yapılan çalışmada Mn'nin mikronükleus oluşumuna neden olduğu ve kromozom anormalliklerine yol açtığı tespit edilmiştir (Mohamed, 2010). Ertürk, (2013) yapmış olduğu çalışma sonucunda Mn'nin artan dozuna bağlı olarak mısır fidelerinde hipermetilasyonun meydana geldiğini bildirmiştir.

Fe, özkütlesi 7,87 g/cm<sup>3</sup> olan 8B geçiş metallerindedir. Bitkilerde fotosentezden sorumlu yapı olan klorofilin sentez aşamasında katalizör rolünü üstlenmiştir. Başta solunum enzimleri olmak üzere birden fazla enzimin yapısında yer alır. Akinboro vd. (2007) yaptıkları çalışmada *Allium cepa*'nın kök hücrelerinde Fe fazlalığına bağlı olarak kardeş kromozom anormalliklerinin oluşumunu tespit etmişlerdir. Qualhato vd. (2017) yaptıkları çalışmada *Poecilia reticulata* üzerinde Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in genotoksik ve mutajenik etkisini belirtmişlerdir.

#### **2.4. Transpozonlar**

Transpozonlar ilk olarak, 1948 yılında Barbara McClintock tarafından, mutant mısır (*Zea mays* L.) tanelerdeki farklı pigment yapılarına sebep olan elementler olarak keşfedilmişlerdir. Barbara McClintock'ın kontrol elementleri adını verdiği transpozonların, mısır tanelerinin pigmentasyonu için gerekli olan genlere insersiyon yaparak bu genleri inaktive ettiğini tespit etmiştir (Federoff, 2001; Feschotte vd., 2002). İlerleyen yıllarda bütün ökaryotik organizmalarda transpozonların varlığı tespit edilmiş ve genomun yapısal bütünlüğü içerisindeki önemli öğelerden biri oldukları gösterilmiştir (Alzohairy vd., 2014; Bennetzen ve Wang, 2014; Grandbastien, 2015).

Transpozonlar, organizmanın genomu içinde kendilerini bir konumdan başka bir konuma aktarma yeteneğine (transpozisyon) sahip olan DNA dizileridir. Bu hareketleri sonucunda genomda insersiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları uyarabilir ve yeni gen alellerinin oluşmasına yol açabilirler (Federoff, 2001; Feschotte vd., 2002). Bu nedenle transpozonların, evrimsel süreçte yeni türlerin oluşmasında etkili bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Lönnig ve Seadler, 1997; Federoff, 2000; Kidwell ve Lisch, 2000;

Kazazian, 2004; Feschotte ve Pritham, 2007). Bu amaçla yapılan çalışmaların sonuçları transpoze olabilen elementlerin yeni genlerin oluşumuna, gen fonksiyonlarında meydana gelen değişimlere ve büyük genomik düzenlenmelerin ortaya çıkması gibi önemli bir genetik değişim kaynağı olduğunu doğrulamaktadır (Vansant ve Reynolds, 1995; Fadool vd., 1998; Polak ve Domany, 2006; Cui vd., 2011).

Bu durumun sonucunda alternatif gen ürünleri oluşabileceği gibi, gen ürünü olan protein oluşmayabilir ve bu durum ciddi fenotipik değişikliklere sebep olabilir. Bunun yanı sıra replikatif transpozisyonla hareket eden transpozonlar, genom boyutunun büyümesine neden olmaktadır. Transpozonlar gen fonksiyonunu, yapısını ve aktivitesini değiştirebilmektedir. Aynı zamanda genom ve kromozom yapılarının da ciddi boyutlarda değişmesini de sağlayabilmektedirler (Bennetzen, 2000; Federoff, 2000; Wicker vd., 2007).

Retroelement olarak adlandırılan transpozonlar, bitki genomlarının ortalama %50-90, hayvan genomlarının da %3-45'ini oluşturmaktadır (Bowen ve Jordan, 2002; Schulman ve Kalendar, 2005; Mansour, 2007; Wicker vd., 2007; Roberts vd., 2008; Lerat, 2009; Wessler, 2009). Transpozonlar, transpozisyon mekanizmaları sayesinde içinde buldukları genoma akışkanlık kazandırarak genomik varyasyon oluşturan diziler olarak da tanımlanabilirler (Schulman, 2013).

#### **2.4.1. Transpozonların türleri**

Transpozonların sınıflandırmasına yönelik çalışma ilk kez Finnegan (1989) tarafından yapılmış olup günümüzde kullanılan sınıflandırmanın temelini oluşturmaktadır. Bu sınıflandırma sistemine göre transpozonlar, kullandıkları transpozisyon biçimine göre ikiye ayrılmaktadır (Wicker vd., 2007). Bunlar RNA transpozonu (Retrotranspozon) ve DNA transpozonudur.

##### **2.4.1.a. Retrotranspozon**

Sınıf I transpozonları da denilen retrotranspozonlar, transpozisyon aracı olarak RNA'yi kullanan RNA transpozonlarıdır. Bir RNA polimeraz enzimi aracılığı ile transpozonun mRNA'ya transkripsiyonu yapılır ve ardından ters transkriptaz aracılığı ile bu mRNA, cDNA'ya dönüştürülür. Sentezlenen cDNA genomdaki hedef bölgeye yerleşerek yeni

konumunu alır. Retrotranspozonların bu hareket biçimi genel olarak '*kopyala-yapıştır*' mekanizması olarak adlandırılır.

Retrotranspozonların bir gen bölgesinden kopyalanarak başka bir bölgeye kopyasının eklenmesi genom boyutunu, genom bilgi akışını ve dolayısıyla sentezlenen molekülleri değiştirmektedir. Transpozonların bu hareketliliği ve genoma derinlik kazandırması genomdaki farklılaşmayı kaçınılmaz kılacaktır (Marco ve Marin, 2005; Wicker vd., 2007; Huang vd., 2009).

#### **2.4.1.b. DNA transpozonu**

Sınıf II transpozonlar olarak adlandırılan DNA transpozonları, transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanmazlar. Genomda yer değiştirme yeteneğine sahip bu DNA dizileri, kendilerini buldukları kromozomal bölgeden keserek çıkartırlar ve hedef bölgeye insersiyon yaparlar. DNA transpozonlarının bu şekilde yaptıkları yer değiştirme mekanizmasına '*kes-yapıştır*' mekanizması denir. DNA transpozonları genomdaki bir bölgeden başka bir bölgeye kes yapıştır mekanizması ile taşındığından genomun okunuşunu etkileyecektir. Bir gen bölgesinin ifade edilmesi transkripsiyon ve bunu takip eden translasyon ile mümkün olduğundan protein ürünlerinde oluşmama, yarıda kalma veya farklı ürün oluşumu söz konusu olacaktır (Wicker vd., 2007; Huang vd., 2009).

Retrotranspozonlar, Uzun Uç Tekrarı (LTR-Long Terminal Repeat) dizileri ile sınırlandırılırken, DNA transpozonlarının uç kısımlarında Uç Ters Tekrar (TIR- Terminal Inverted Repeat) dizileri bulunur. LTR ve TIR dizileri transpozonların genomda meydana getirdikleri transpozisyonda önemli işlevlere sahiptirler (Voytas ve Boeke, 2002).

LTR-retrotranspozonlar çevresel streslerin etkisiyle transkribe olabilirler. Transpozisyon sayesinde gerçekleştirdikleri gen duplikasyonları ve insersiyon ile yeni düzenleyici gen bölgelerinin oluşumuna sebep olabilirler (Bennetzen ve Wang, 2014; Grandbastien, 2015). Retrotranspozonların genom üzerindeki etkisi ile organizmaların değişen çevresel şartlara uyum sağlayabilmesine ve türleşmesine neden olabilir (Biemont ve Vieira, 2006; Kalendar vd., 2011).

LTR retrotranspozonların hareketliliği ile ilgili birçok çalışma vardır. Çevresel etkenler (UV, abiyotik stresler) ve bitki doku kültürü koşullarında aktivasyonları farklı bitki türleri

ve farklı stres koşullarında ayrıntılı olarak incelenmiştir. Örneğin *Avena sativa*'da yaralanma, mantar istilası ve UV ışık etkisi (Kimura vd., 2001), *Triticum durum*'da farklı biyotik ve abiyotik stres şartları (Sabot vd., 2006), *Oryza sativa*'da tuz ve kuraklık stresi (Jiao ve Deng, 2007), *Arabidopsis thaliana*'da arsenik stresi ve fosfat eksikliği (Castrillo vd., 2013), *Pinus sylvestris*'de sıcak stresi ve salisilik asite tepki (Voronova vd., 2014), *Zea mays* fidelerinde su eksikliğine verilen tepkiler (Lu vd., 2011) detaylı olarak incelenmiştir.

#### **2.4.2. Transpozonların epigenetikteki rolü**

İlk kez literatüre 1942'de Conrad Waddington tarafından kazandırılan ‘‘Epigenetik’’ terimi fenotipik ifadeye izin veren genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimler olarak tanımlanmıştır (Waddington, 1942). Bugün bu terimin tanımının pek çok çeşitinin olmasına rağmen, bir fikir birliği olarak epigenetik, primer DNA sekansından bağımsız olarak ortaya çıkan, süreçlere bağlı olarak fenotipteki kolektif kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (Chong, 2004; Liu, 2008).

Epigenetik mekanizma ile meydana gelen düzenleme, DNA'nın yapısındaki nükleotidlerde eksilme veya fazlalaşma şeklinde bir değişikliğe yol açmadan mitoz veya / ve mayoz bölünme ile aktarılabilen, genlerin ne zaman, nerede ve ne kadar aktif olacağını belirlemektedir (Kürtüncü ve Eraksoy, 2008; İzmirli vd., 2012; Güneş ve Kulaç, 2013). Bir metabolizmanın sahip olduğu her hücrenin DNA dizisi aynıdır (Bora ve Yurter, 2007; Karaçay, 2009), ancak DNA'dan protein sentezlenmesi sırasında gerçekleşen replikasyon, transkripsiyon ve translasyon aşamalarının zamanı, yeri ve süresi hücreden hücreye farklılık gösterebilmektedir (Güneş ve Kulaç, 2013; İzmirli, 2013).

Epigenetik bilginin kalıtsallığı uzun yıllar boyunca yalnızca hücresel bölünme ile sınırlı kaldığı düşünülmekteydi. Bununla birlikte, artık epigenetik süreçlerin organizmalarda bir nesilden diğerine aktarılabilceği açıktır (Chong, 2004; Liu, 2008). Bu fenomen ilk olarak bitkilerde (Brink, 1968) tespit edilmiş sonraları maya, *Drosophila*, fare ve insanları içerecek şekilde genişletilmiştir (Cavalli, 1999; Racyan, 2002). Günümüzde epigenetik mekanizmalar, prokaryotik ve ökaryotik birçok organizmada gelişimsel, fizyolojik, nörolojik, sitogenetik, kalıtsal, evrimsel, patolojik ve tıbbi alanlarda araştırılmaktadır (Bird, 2007; Kiefer, 2007; Martin ve Zhang, 2007; Van Vliet vd., 2007).

Epigenetik mekanizmalar canlı gelişim programlarını, yaşlanmayı, hastalıkları, Mendel dışı kalıtımın çeşitli biçimlerini, stres tepkileri ve bunları uyarlamayı düzenler. Epigenetik olaylar kromozom sayısındaki değişiklikler ve transpoze edilebilir elementlerin muazzam varlığı gibi bitkilerin biyotik, abiyotik ve genom streslerine dayanma yeteneğine ek olarak bitki hücrelerinin totipotansını yani bir organizmada genetik olarak kendi potansiyellerini oluşturmak üzere farklılaşmış bir hücredeki kapasitesini, bitki genomlarının esnekliğini yansıtır ve onları mükemmel bir sistem haline getirir. Epigenetik fenomende çalışan ana moleküler mekanizmalar "epigenetiğin üç direği" olarak adlandırılan DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve genellikle RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) temelli mekanizmalardır (Grant-Downton ve Dickinson, 2005).

#### **2.4.2.a. DNA metilasyonu**

Son dönemlerde üzerinde çok çalışılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, kovalent bir modifikasyondur ve sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH<sub>3</sub>) bağlanmasıyla 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterize edilir (Bird, 2002). Sitozin halkasında gerçekleşen metillenmenin, türe ve dokuya özgü olduğu (Vanyushin vd., 1973), hormonlar tarafından düzenlendiği (Vanyushin ve Kirnos, 1988) ve yaşa bağlı olarak değişkenlik gösterdiği anlaşılmıştır (Berdushev vd., 1967).

Bitki (Bennetzen, 1996) ve memeli (Yoder vd., 1997) genomlarında bulunan metillenmiş sitozinin büyük bir kısmı transpozonların içindedir. Sitozin metillenmelerinin, transpozon hareketleri ile doğrudan ilişkili oluşu (Chomet vd., 1987; Banks vd., 1988), doku kültüründe gerçekleşen metillenmedeki azalmanın, transpozonların aktivitesini arttırabileceğini düşündürmüştür (Kaepler vd., 2000).

Metillenme, ökaryotlarda genomun transpozonlardan korunmasını sağlayan bir gen sessizleştirme mekanizması (Martienssen ve Colot, 2001) ve transpozonların susturulması ile ilişkili epigenetik bir işaret olduğu düşünülmektedir (Kazazian, 2004). Transpozonların geçiş yapma potansiyelleri konakçı genomuna önemli zararlar verebilir. Sonuç olarak, ökaryotlar genetik istilacılara tepki vermek ve faaliyetlerini bastırmak için RNAi aracılı kromatin değişiklikleri de dâhil olmak üzere epigenetik mekanizmaları geliştirmişlerdir. Transpozonları sessiz tutmak için ilk bilinen mekanizmalar arasında,

yapısal heterokromatin alanlarındaki tutulmalarıdır (Kloc vd., 2008). Tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerdeki CpG dizilerinde ise, DNA metilasyon oranı yüksektir. Bu bölgelerin metillenmiş durumda olması ile transkripsiyon durdurulmakta ve bu elementlerin genom içi hareketi kısıtlandığından dolayı kromozomun kararlı yapıda kalması sağlanmış olmaktadır (Takai ve Jones, 2002; Smith ve Meissner, 2013).

DNA metilasyonu, susturulmuş durumlarla ilişkili histon modifikasyonları, yoğunlaştırılmış kromatin paketlemesi, ökaryotik kromozomların sentromerleri ve telomerlerinde bulunan heterokromatinin karakteristik özellikleridir. Genom bütünlüğü için gerekli olan bölgelerde transpozonların birikimi, transpozonların aktivitesinin susturulmasının doğru kromozom fonksiyonu için kritik önem taşıdığını düşündürür.

Öte yandan, önemli hücresel işlevlerde TE'lerin kullanılması, ökaryotların sadece sessizliği değil, TE varlığının avantajlarından yararlanmayı "öğrendiğini" göstermektedir (Kloc vd., 2008). TE'ler ayrıca konak tarafından, kromatin yapısı, gen aktivitesi, fenotipik çeşitlilik, paramutasyon ve baskının kontrol edilmesi için kullanılabilen bir genetik ve epigenetik materyal kaynağıdır (Tollefsbol, 2011).

#### **2.4.2.b. Histon modifikasyonları**

Histon değişimleri, kromatinin durumunu ve ifade edilebilirliğini etkilediği için epigenetik düzenleme mekanizması olarak adlandırılmaktadır. Modifikasyonlar, histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirmektedir. Histon-DNA, histon-histon etkileşimlerinde DNA'nın paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen anlatımının düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olayı kontrol edebilmektedir (Ho ve Crabtree, 2010). Belli başlı histon modifikasyonları; asetillenme, deasetillenme, metilasyon ve fosforillenmedir. Asetillenmiş histonların "+" yükü azalır ve histonların DNA ile olan ilişkileri zayıflar. Gevşek paketlenme olur ve kromatin açılır, transkripsiyon aktif hale geçer. Histonların deasetillenmesi histon deasetilazlar (HDAC) tarafından asetil gruplarının uzaklaştırılması ile gerçekleşir. Deasetillenme ile histonlardaki "+" yük artar. Bu da "-" yüklü DNA ile "+" yüklü histonların ilişkisini arttırır; histonlar sıkıca paketlenir ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşması engellenir (Szyf, 2005).

#### 2.4.2.c. RNA yönlendirmeli sessizleştirme

RNA ile indüklenen sessizleşmede (RNA-induced silencing), bazı özel RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için tetikleyici olduğu; heterokromatin bölgenin oluşumuna katkı sağlayarak kalıtsal olarak sessizleşmesini sağladığı düşünülmektedir. Kodlama yapmayan RNA (non-coding RNA) adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir. (Mattick, 2012; Minkovsky vd., 2012).

Epigenetik mekanizmalarda transpozizyon yapabilen dizilerin çok önemli etkileri ve önemli rolleri vardır (Banks vd., 1988). Transpozonların etkisi ile genomda epigenetik değişimler meydana gelirken, transpozonlarda epigenetik mekanizmaların etkisi ile susturulmakta veya aktifleştirilebilmektedir (Slotkin ve Martienssen, 2007).

Transpozonlar büyük oranda inaktiftir ve bu inaktivite epigenetik nedenlerle veya transpozon içi delesyon sayesinde gerçekleşmiş olabilir. Epigenetik olarak aktivitesini ve hareket yeteneğini kaybetmiş transpozonlara 'örtülü element' adı verilmektedir. Örtülü elementler, kromozomun temel yapısında yer alan sentromer ve telomer gibi genomun heterokromatik bölgelerini oluşturmaktadır (Weil ve Martienssen, 2008).

Epigenetik mekanizmalar, çevredeki farklı uyarımların etkisi ile sessiz transpozonların aktifleştirilmesinde önemli görevler üstlenir. Buna örnek olarak, gelişim sürecinde sessiz olup hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarında etkin hale geçen bitki retrotranspozonları verilebilir. Epigenetik olarak aktive edilen bu LTR'li retrotranspozonlar, buldukları yerdeki komşu genlerin de anlatımını epigenetik yollarla etkiler (Mansour, 2007). Epigenetik düzenleme aynı zamanda transpozonların olası zararlı etkilerini durdurucu bir mekanizma olarak işlem görmektedir (Slotkin ve Martienssen, 2007; Weil ve Martienssen, 2008).

#### 2.5. Gen İfadesi

Gen ekspresyonunda protein sentezlenirken kalıp görevini doğrudan DNA görmez. Transkripsiyonda RNA sentezi için DNA zinciri kullanılır. Böylece DNA'da bulunan genetik bilgi mRNA'ya aktarılmış olur. Bir hücredeki mRNA moleküllerinin miktarı ve türü bu hücrenin işlevini yansıtır. RNA transkripsiyonu verimli bir kontrol noktasını

oluşturur, çünkü pek çok protein tek bir mRNA molekülünden yapılabilir. Transkript işlemleri, ökaryotlar için ek bir düzenleme düzeyi sağlar ve bir çekirdeğin varlığı bunu mümkün kılar. Bununla birlikte, ökaryotlarda, transkriptler translasyonun gerçekleşmesi için sitoplazmaya çıkarılmadan önce çekirdekte modifiye edilir (Klug vd., 2011).

Gen ifade düzeyleri, canlının çevreden aldığı uyarıya bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Ancak çok hücreli organizmalarda gen kontrolünün en karakteristik ve biyolojik olarak en kapsamlı amacı embriyolojik gelişimin gerçekleşmesini sağlayan genetik programın uygulanmasıdır (Lodish vd., 2011).

Ökaryotik hücreler gen ifadesi kontrolünü sağlayabilmek için çekirdekte yüksek derecede kontrol edilen, dinamik ve karmaşık bir yapı olan kromatini kullanırlar. DNA'nın çok sıkı paketlenmiş formu olan kromatin yapının DNA replikasyonu sırasında açılmasıyla, kalıp zincirde var olan yapısal ve kimyasal modifikasyonlar, diğer bir deyişle "epigenetik işaretler" yeni sentezlenen zincirlere aktarılır ve bu şekilde her bir replikasyon sırasında hücreden hücreye korunur (Jiang vd., 2004). Kromatin yapısı üzerinde meydana gelen epigenetik modifikasyonların genlerin ifadelerini etkilemesi, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (Rodenhiser ve Mann, 2006). Bu üç mekanizmanın ortak etkisi ile gen ifadesinde kalıtsal çeşitlilikler oluşmaktadır. Bu mekanizmalardan birisinde meydana gelecek bir hata, gen anlatım düzeyinin aşırı artışına veya gen ifadesinin engellenerek epigenetik bozukluklara yol açmaktadır (Dawson ve Kouzarides, 2012).

Bitkilerin etkin direnci spesifik stresle ilişkili genlerin indüksiyonuna ve buna bağlı olarak ilgili proteinlerin sentezlenmesine bağlıdır (Vinocur ve Altman, 2005). Bitkiler abiyotik ve biyotik stresleri algılamak ve bunlara cevap vermek için mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bitkilerin algıladıkları streslere doğru tepki vermesi ve bu tepkinin bitkinin tüm süreçlerine dâhil olması gerekir (Campo vd., 2012; Zwack ve Rashotte, 2015).

Çalışmamızda gen ifade düzeyini kontrol ettiğimiz 14-3-3 proteinleri (14-3-3s), ökaryotik olarak benzersiz şekilde korunmuş ve bir fosforilasyona bağlı protein-protein etkileşim tarzında işlev gördüğü bilinen düzenleyici proteinlerdir (Oecking ve Jaspert, 2009). Bu moleküller yaklaşık 30 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip küçük asidik çözünür



proteinlerdir (Jones vd., 1995; Boer vd., 2013). Bitki 14-3-3'ler geniş bir hedef protein dizisi ile etkileşime girmelerinden dolayı, sinyal yollarında düğüm olarak düşünülebilirler (Oecking ve Jaspert, 2009). Bu protein grubu bitki gelişimi ve metabolizmasını kontrol etmektedir (Obidiegwu, 2015). Bunun yanında hücrelerin biyotik ve abiyotik streslerden dolayı zarar görmesini engelleyen moleküler ağlara katılmakta ve savunma yanıtında önemli rol oynamaktadırlar (Chelysheva vd., 1999; Roberts vd., 2002; Chen vd., 2006; Denison vd., 2011). Bu özelliklerinden dolayı 14-3-3 protein ailesi ve ortologlarının bitkilerdeki fizyolojik fonksiyonu önemli araştırmaların odak noktası olmuştur.

Gen ekspresyon düzeyinin ifade edilmesinde kullanılan eşik döngü değeri (Threshold Cycle, Ct) Real Time PCR için önemli bir değerlendirme parametresini oluşturmaktadır. Reaksiyonun floresan ışımının eşik noktasına ulaştığı andaki döngü sayısı olarak geçmektedir. Başka bir ifadeyle, reaksiyondaki ilk anlamlı artışın olduğu döngü sayısıdır. Ct değeri örnekteki nükleik asidin miktarıyla ters orantılıdır. Yani örnekteki nükleik asidin miktarı ne kadar fazla ise Ct'nin değeri o oranda azalacaktır. Dolayısıyla başlangıç DNA konsantrasyonu Ct değerini belirlemede önemlidir (Arya vd., 2005; Womg ve Medrano, 2005).

Kantitatif verilerin analizinde iki farklı yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden ilki absolute (mutlak) veya standart, diğeri ise relatif (karşılaştırmalı veya göreceli) kantifikasyon olmaktadır (Arya vd., 2005).

Absolute (Mutlak) kantitasyon yönteminde kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile miktarı bilinmeyen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir (Yüzbaşıoğlu, 2008).

Göreceli veya karşılaştırmalı kantitasyon mRNA ifade düzeylerindeki oransal değişimleri ölçmektedir. Birden fazla örnek arasında bir genin kararlı mRNA düzeylerindeki değişimleri belirlemektedir. Göreceli kantitasyonda konsantrasyonu bilinen kalibrasyon eğrisi veya standartlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Bunların yerine referans olarak dizisi

bilinen herhangi bir transkript olabilmektedir. Gen ifade düzeyindeki küçük fizyolojik değişimleri belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Sürekli olarak ifade olan referans genler, referans olarak seçilmektedir. Bu genlere housekeeping gen (HKG) denmektedir. İfade düzeylerini belirlemede eşik eğrisi döngü noktasındaki farklılıklar kullanılarak ölçümler yapılabilmektedir (Pfaffl, 2006). Livak ve Schmittgen (2001)'e göre hedef gen ile referans gen arasında karşılaştırma hesapları yapılabilmektedir.

Real time kantitatif PCR deneylerinde spesifik hatalar; başlangıç RNA miktarında, RNA'nın kalitesinde, cDNA sentez aşamasında veya PCR amplifikasyonundaki küçük farklılıklardan dolayı olabilmektedir. Bu hataları azaltmak ve örnekler arasındaki farklılıkları düzeltmek için normalizasyon yapılması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli koşullar altında ifade düzeyinin değişmediği bilinen veya en az etkilenen bir referans gene ihtiyaç duyulmaktadır. Housekeeping genler hücrelerde daima ifade edilen, ifade düzeyi dokudan dokuya dahi değişmeyen genlerdir. Bu genler hücrelerin temel yaşamsal aktivitelerinin gerçekleştirilmesinde rol oynarlar. Nükleik asit ve protein sentezi, besin taşınımı ve kullanımı, hücre iskelet elemanları ve organellerin biyotentezi gibi hayati öneme sahip sentezlerde görev alırlar.  $\beta$ -actin geni hücrenin hareket ve sağlamlığında rol alan bir housekeeping bir genidir. Bu özelliklerinden dolayı stres şartlarındaki metabolizmaların hedef geninin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin ifade düzeyi ile karşılaştırılarak ifade düzeyi tespit edilmektedir (Arya vd., 2005; Pfaffl, 2006; Yüzbaşıoğlu, 2008).

## **2.6. Moleküler Genetik ve Epigenetik İncelemelerde Kullanılan Yöntemler**

Teknoloji ve bilimsel uygulamalardaki gelişmeler sonucunda birçok moleküler markır sistemi kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler markırlar tür içi ve türler arası genetik çeşitlilik, sınıflandırmalar, abiyotik ve biyotik stres kaynaklı meydana gelen varyasyonlar, ekolojik faktörlerin değerlendirilmesi, akraba tayini, suçlar ile mücadele gibi farklı alanlarda kullanılabilir. Bu yöntemler ile gen ifadesindeki değişimler, metilasyon ve modifikasyon düzeyleri, transpozabl genlerin aktiviteleri gibi moleküler mekanizmalardan faydalanılmaktadır. Bu yöntemler PCR uygulaması ile gerçekleştirilmektedir.

PCR, karakterize edilmek istenen bireylere uygun primerler kullanarak, primerlerin bağlanma bölgeleri arasında kalan genomik DNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu teknik düşük miktarda genomik DNA ihtiyacı ve düşük bütçeler ile gen kaynaklarının karakterizasyonunu mümkün hale getirmiştir. Kullanılan primerler ve hedef bölgelerin çeşitliliğine göre farklı teknikler geliştirilmiştir (Parveen vd., 2016).

### 2.6.1. Real Time PCR

Real Time PCR nükleik asit amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak incelenmesine olanak veren bir PCR tekniğidir. Real Time PCR’da çoğaltılan ürünlerin miktarı floresan ışığa yapan bir molekül (SYBR Green boyası gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan probalar (TaqMan probu gibi) kullanılarak ölçülmektedir. Her bir PCR döngüsü bitiminde tüpte oluşan çift zincirli nükleik asit ürününün miktarının ölçülmesini ve kantitatif analizlerinin yapılmasına olanak sağlar (Arya vd., 2005).

Çoğaltılan ürünün (amplikonun) belirlenebilmesi için genel olarak 2 farklı kimyasal uygulanmaktadır. Bunlar DNA’ya bağlanan boyalar ve floresan problemlerdir. DNA’ya bağlanan boyalar olarak SYBR Green I veya etidyum bromid (EtBr) kullanılmaktadır. Bu yöntem uygulamada çok kolay ve amplikona özgül etiketli hibridizasyon problemleri istenmediği için maliyet olarak çok ucuzdur. SYBR Green I sadece dsDNA’nın arasında girerek ışığa yapar. Bununla birlikte floresan sinyalinin yoğunluğu reaksiyonda dsDNA varlığının miktarına bağlıdır.

Bu metodun en önemli dezavantajı PCR reaksiyonu süresince oluşan tüm dsDNA’ya özgül olmayan PCR ürünleri ve primer dimerlerinin bağlanmasıdır (Arya ve vd., 2005). Bu yöntemde en önemli nokta PCR primerlerinin özgül cDNA’ya bağlanması, özgül olmayan amplikon üretmemesi veya primer dimeri oluşturmamasıdır (Yüzbaşıoğlu, 2008).

Primer tasarlama aşamasında özgül bir amplifikasyon elde etmek için cDNA dizisinin uygun bölgelerinden seçilmesi ve amplikon uzunluğunun 100–250 baz çifti uzunluğunda olması gerekmektedir (Wang ve Seed, 2006). Ayrıca RNA izolasyon aşamasında genomik DNA bulaşığının olması SYBR Green I’in uygulanmasını engelleyen bir diğer unsurdur (Yüzbaşıoğlu, 2008).

SYBR Green I yönteminde özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin ve primer dimerlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezinden yararlanılmaktadır. Ayrıca bu sorunların tespiti için başka bir analiz daha yapılabilmektedir. Melting curve (Erime eğrisi) analizinde her çift zincirli DNA kendine özgü bir erime sıcaklığına (melting temperature, Tm) sahiptir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra sıcaklığı belli aralıklarla ve belli oranda yükseltilerek floresan miktarı belirlenmektedir. Çift zincirli DNA ayrışmaya başladığında araya girmiş olan boya serbest hale geçerek floresan ışımaya yarar. Bu ışımının miktarından elde edilen erime eğrisinden faydalanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenmektedir. Tm değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevinde faydalanılmaktadır (Yüzbaşıoğlu, 2008).

### **2.6.2. RAPD (Random amplified polymorphic DNA-rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)**

RAPD tekniği, gDNA'ya rastgele bir şekilde bağlanan primerlerin arasında kalan bölgenin çoğaltılarak, türler arasındaki benzerlik veya farklılıklar tespit edilebilmesi esasına dayanmaktadır (Williams vd., 1990). Bu tekniğin en önemli özellikleri düşük maliyeti, kullanılacak canlı yelpazesinin çokluğu, aynı anda birçok lokusu karakterize edebilmesi ve genom üzerinde geniş bir dağılıma sahip olmasıdır.

Dominant bir belirteç sistemi olan RAPD heterozigot genotipleri ayırt edememekte ve düşük miktarda genomik DNA'ya gereksinim göstermesi nedeniyle de RFLP tekniğindeki olumsuzlukları ortadan kaldırılabilmektedir. Ancak primerlerin düşük bağlanma sıcaklıklarına sahip olması ve rastgele bağlanma örüntüsü yüzünden, yeniden tekrarlanabilirlik açısından dezavantajlıdır.

RAPD yöntemi ile genotoksik etkenin tespiti, uygulama ve kontrol gurubu örneklerden elde edilen DNA profillerin karşılaştırılmasıyla yapılır. Polimorfizm değeri, bantların bireylerde "var" ya da "yok" olma durumlarına göre belirlenir (Parveen vd., 2016).

### **2.6.3. AFLP (Amplified fragment length polymorphism-çoğaltılmış dizi uzunluk polimorfizmi)**

AFLP tekniği genel olarak, RFLP ve PCR temelli belirteç sistemlerinin bir birleşimidir. İki temel aşamadan oluşur: genomik DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi ve

nükleotid dizilerinin uçlarına bağlanan adaptörler yardımıyla seçici bir PCR gerçekleştirilmesidir. Bu aşamalar sonucunda elde edilen ürünler poliakrilamid jel elektroforezi ile yürütülüp gümüş boyama ile analiz edilmektedir (Vos vd., 1995).

AFLP' nin en önemli özellikleri yüksek bir tekrarlanabilirlik göstermesi, otomatik dizileycilere adapte edilebilmesi ve yüksek oranda polimorfizm sağlaması örnek gösterebilir. Ancak farklı dizi bilgisine sahip ancak boyut açısından homoloji gösteren bantların varlığı bu tekniğin en önemli dezavantajlarından biridir.

#### **2.6.4. MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism-metilasyona duyarlı çoğaltılmış polimorfizm)**

MSAP, bir organizmanın DNA metilasyon durumunu incelemek ve dolayısıyla diferansiyel kesim modeliyle belirlenen DNA metilasyon durumuna dayalı olarak iki gen bölgesini ayırmak için kullanılan bir tekniktir (Labra vd., 2002). Bu nedenle, bu teknik, DNA metilasyon haritalaması ve farklı şekilde metillenmiş genlerin konumsal klonlanması için yararlı bir yöntemdir.

Bu teknikte, genomik DNA önce HpaII gibi metilasyona duyarlı bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve daha sonra DNA parçaları amplifikasyonunu kolaylaştırmak için adaptörlere bağlanır. HpaII, metilasyona duyarsız bir izoşizomer MspI kullanarak kesilerek, bir yükleme kontrolü olarak paralel bir kesim reaksiyonunda kullanılır. Daha sonra, bu parçalar flüoresan etiketli primerler ile seçici olarak çoğaltılır (Schulz vd., 2013).

#### **2.6.5. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion-random amplification-çift restriksiyon enzimli sindirim-rastgele çoğaltma)**

CRED-RA, genom metilasyon durumunun incelenmesi için kullanılan güçlü bir tekniktir (Cai vd., 1996). Bu teknik, RAPD tekniğinin bir modifikasyonudur ve metilasyona duyarlı enzimler HpaII ve MspI sık sık DNA kesici olarak kullanılır.

Bu teknikte RAPD analizleri yapılan DNA modelleri HpaII ve MspI restriksiyon enzimleri ile kesilir. Bu enzimler metillenen bölgelere duyarlı olarak genomu keser. Oluşan DNA modelleri arasındaki farklılık ile metilasyon düzeyleri arasındaki farklılık tespit edilebilir.

Restriksiyon enzimleri rekombinant DNA'nın elde edilmesi, DNA haritası çıkarılması, polimorfizmlerin belirlenmesi, problemlerin hazırlanması, DNA modifikasyon durumlarının analizi için kullanılmaktadır.

#### **2.6.6. SSR (Simple sequence repeat-basit dizi tekrarları)**

Basit dizi tekrarları, çoğunlukla ökaryotik genomlarda bulunan ve 1 ile 5' li nükleotid tekrarlarına sahip bölgelerdir (Powell vd., 1996). İşlevleri tam olarak aydınlatılmasa da, yüksek derecede çeşitliliğe sahip olmaları, heterozigot genotipleri göstermeleri, düşük genomik DNA ihtiyacına sahip olmaları ve yeniden tekrarlanabilme olanağı gibi özellikleri yüzünden türler arası benzerlik ve farklılıkların tespit edilmesinde, özellikle populasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu belirteç sistemleri dizi bilgisine bağımlı oldukları için geliştirilmeleri biraz pahalıdır (Parveen vd., 2016).

#### **2.6.7. ISSR (Inter simple sequence repeats-basit dizi tekrarları arası bölgeler)**

ISSR tekniği, basit dizi tekrarları (SSR) arasında yer alan 100-3000 bp uzunluktaki nükleotid dizileridir (Zietkiewicz vd., 1994). Basit dizi tekrar bölgelerini hedefleyen 16-18 bp' lik primerler kullanılarak gerçekleştirilen ISSR tekniği, düşük oranda genomik DNA kullanılması ve dizi bilgisi gerektirmemesi gibi nedenlerle tercih edilen dominant bir belirteç sistemidir (Parveen vd., 2016).

Retrotranspozonlar genom içerisinde dağınık halde bulunmaları, ortak yapısal özelliklere sahip dizilerinin olması, genom çapında düzenlemelere katılmaları gibi özellikleri yüzünden moleküler belirteç olarak kullanılmaya uygundur. Bu bakış açısıyla, retrotranspozonların farklı yapısal bölgeleri kullanılarak üç farklı PCR tabanlı retrotranspozon belirteç sistemi geliştirilmiştir.

Bu sistemler çoğunlukla retrotranspozonlar arasındaki LTR bölgelerinin veya bir retrotranspozon ile bir basit dizi tekrarları (SSR) arasındaki bölgenin PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır (Kalendar ve Schulman, 2006; Kalendar vd., 2010; Kalendar vd., 2011; Kalendar ve Schulman, 2014).

#### **2.6.8. iPBS (Inter retrotransposon binding site- primer arası bağlanma bölgesi)**

PBS bölgeleri hedef alınan bu belirteç sisteminde, 5' uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki farklı retrotranspozonun arasındaki bölgenin çoğaltılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda PBS bölgesinin sahip olduğu kısıtlı sayıdaki tRNA bağlanma bölgeleri sayesinde, retrotranspozonlar için korunmuş LTR bölgelerinin çoğaltılması ve dizilerek yeni retrotranspozonal dizilerin elde edilmesini olanaklı kılmaktadır (Kalendar vd., 2010).

iPBS belirteç sistemi ile izlenen stratejide primerler PBS bölgesine uygun bir şekilde tasarlanarak 5' uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki retrotranspozonun arasındaki bölge çoğaltılmaktadır.

#### **2.6.9. IRAP (Inter retrotransposon amplified polymorphism- retrotranspozon arası çoğaltılmış polimorfizm)**

IRAP, PCR verisine ihtiyaç duymadan polimorfizm düzeyini tespit eden, markör verileri oluşturmak için ligasyon veya prob hibridizasyonuna ihtiyaç duymayan, böylece testin güvenilirliğini ve sağlamlığını arttıran bir PCR bazlı tekniktir. Retrotranspozon, prensip olarak genom içerisine yönlendirme ile bütünleşebilir. Bu teknikte iki tane retrotranspozon arasında kalan bölge çoğaltılmaktadır. Bundan dolayı bir retrotranspozon ailesinin herhangi iki üyesi, kafa kafaya, kuyruktan kuyruğa veya kafa ile kuyruk yönlerine sahip olabilir. İlk iki durum için, tek bir primer, IRAP yönteminde birbirine yeterince yakın olan elemanlardan PCR ürünleri üretmek için yeterlidir. Kafadan kuyruğa yönelimde elementler için araya giren genomik DNA'yı yükseltmek için, hem 5' hem de 3' LTR primerleri kullanılmalı ve böylece diğer yönlerden de bantlar üretilmektedir. Primerler iPBS belirteç sisteminde olduğu gibi 5' uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki farklı retrotranspozonun LTR bölgelerine uygun olarak tasarlanmaktadır (Kalendar vd., 1999).

#### **2.6.10. REMAP (Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism- retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi)**

Retrotranspozonların çoğunlukla SSR gibi yüksek sayıda tekrara sahip olan dizilerle benzer genomik bölgelerde bulunması, bu dizilerin birlikte incelenmesini olanaklı

kılmaktadır. Hem LTR bölgesine özgü hem de SSR bölgelerine özgü dizilere sahip olan primerlerin birlikte kullanılması sonucunda, belirli bir retrotranspozon ile bir SSR bölgesi arasında kalan dizi çoğaltılabilmektedir (Kalendar vd., 1999). Primerler retrotranspozonların LTR ve genomik DNA' nın SSR bölgelerine uygun bir şekilde tasarlanarak SSR ve retrotranspozonal bölge arasındaki DNA dizisi çoğaltılmaktadır.

#### **2.6.11. SSAP (Sequence specific amplified polymorphism- dizilim spesifik çoğaltım polimorfizm)**

AFLP belirteç sistemine benzer bir strateji izlenen SSAP' ta temel yöntem iki farklı restriksiyon enzimleri ile kesilen genomik DNA parçalarına adaptörler eklenmekte ve LTR bölgeleri ile adaptörlerin arasındaki kısmın çoğaltılması hedeflenmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajlarından birisi ise AFLP' ye oranla daha yüksek seviyede polimorfizm ve ko-dominansi göstermesidir (Waugh vd., 1997).

#### **2.6.12. RBIP (Retrotransposon-based insertion polymorphisms- retrotranspozon temelli insersiyon polimorfizm)**

RBIP tekniği, retrotranspozon insersiyonlarının basit bir PCR işlemine dayandırılarak genomun kendi insersiyonundan primerler ve insersiyon bölgelerine yakın primerler arasındaki bölgelerin, tespit edilmesine dayanmaktadır. Temel RBIP metodu elektroforez jelin yerini filtre hibridizasyonu ile alarak gelişmiş uygulamalar için geliştirilmiştir (Flavell vd., 1998). Bu teknik tespit edilmek istenen gen bölgesinin tüm sekans bilgisine ihtiyaç duyduğu için diğer tekniklerden daha pahalı ve karmaşıktır (Kalendar vd., 2011).



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal

Çalışmamızda kullanılan saf *Triticum aestivum* L. ve *Zea mays* L. tohumları Erzurum Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler Tablo 3.1., Tablo 3.2., ve Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Sterilizasyon, öğütme ve DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar

Sodyum hipoklorit (NaOCl)	Sterilizasyon
Sıvı Azot	Öğütme
TRIS (Trizma base)	
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate)	
CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)	
NaCl (Sodyum klorid)	
2-Mercaptoethanol	
Amonyum asetat	
Sodyum asetat	
Sodyum bisülfid	
2-Propanol (İsopropanol)	
Hidroklorik asit	
Sodyum hidroksit	
Saf su	
Kloroform	
Amil alkol	
TE (Tris-EDTA) buffer	

**DNA  
İzolasyon  
Bileşenleri**

**Tablo 3.2.** RNA izolasyonu ve cDNA sentezi ve RT-PCR’da kullanılan kimyasallar

RPL buffer	<b>RNA İzolasyon Bileşenleri</b>
RBW buffer	
RNW buffer	
Dnase	
RNase free water	
%70’lik etanol	
10x RTase reaction buffer	<b>cDNA Sentez Bileşenleri</b>
HyperScript™ reverse transcriptase (200 U/μℓ)	
ZymAll™ RNase inhibitor	
dNTP	
Primer	
0,1 M DTT	<b>RT-PCR Bileşenleri</b>
2X SYBR master mix	
Forward primer (F)	
Revers primer (R)	
ROX	
Ultra saf su	

**Tablo 3.3.** RAPD, IRAP PCR ve UV görüntülemeye kullanılan kimyasallar

Taq DNA polimeraz	<b>RAPD ve IRAP Analiz Bileşenleri</b>
dNTP (Deoxynucleotide mix)	
10 X Buffer without MgCl <sub>2</sub>	
MgCl <sub>2</sub>	
Ultra saf su	
Primer	

**Tablo 3.3.**'ün devamı

Borik Asit	
TBE (Tris/Borate/EDTA)	
Agaroz	<b>UV Görüntüleme</b>
Ethidium Bromide	<b>Bileşenleri</b>
Jel Loading Solution	
1 KB DNA Ladder	

### 3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.4.' de verilmiştir.

**Tablo 3.4.** Çalışmada kullanılan cihazlar ve modelleri

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Markası</b>
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
Floresans mikroskopu	: Olympus BX63
Çalkalamalı inkübatör (8-60 °C)	: Shellab SSI5
Soğutmalı santrifüj	: Hanil Smart R17
Spektrofotometre	: Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Hassas terazi	: Shimadzu ATX 120
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart
Saf su cihazı	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: Thermo EC 300 XL
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	: Haier
Ultra-low dondurucu (-85 °C)	: Haier, New Brunswick U410

**Tablo 3.4.**'ün devam

---

Mikrodalga fırın	:	Arzum
Otoklav	:	Sümer SM3
Jel görüntüleme cihazı	:	Vilber Lourmat Quantum ST5
Real-time PCR cihazı	:	Qiagen Rotor Gene6flex
ICP-MS cihazı	:	Agilent Technologies SPS 4 Autosamples
pH metre	:	Radiometer meterlab PHM 210
Elektroforez tankı	:	Thermo Owl Easycast B2-BP

---

### **3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve solüsyonlar**

#### **Ekstraksiyon çözeltisi**

##### **1 M Tris-HCl**

- 121,1 g Tris base
- 700 ml distile su
- 42 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M)

##### **5 M NaCl**

- 146,1 g NaCl
- Toplam hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

##### **0,5 M EDTA**

- 136,1 g EDTA
- 20 g NaOH
- Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

##### **%2 CTAB**

##### **%0,2 $\beta$ -merkaptolanol**

%0,1 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile hazırlanmıştır.

### **10 x TBE**

- 100 g Tris-base
- 55 g Borik asit
- 4,65 g EDTA
- pH 8 olacak şekilde HCl eklenir.
- Toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklenmiştir.

### **Kloroform: İzoamil alkol**

- 24 ml kloroform
- 1 ml izoamil alkol eklenerek toplam hacim 25 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

### **10 x TE Tamponu**

- 100 ml 10 M Tris-HCl pH 8
- 20 ml 0,5 M EDTA
- 880 ml ultra saf su ile toplam hacim 1000 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

### **1 x TE Tamponu**

- 100 ml 10 x TE tamponu
- 900 ml saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

### **3 M Sodyum asetat**

- 40,8 g Sodyum asetat
- pH 5,2 olacak şekilde asetik asit eklenmiş

- Toplam hacim 100 ml'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır.

### **10 M Amonyum asetat**

- 7,7 g Amonyum Asetat
- Toplam hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

### **Ethidium bromür çözeltisi**

500 ml 0,5 x TBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **Primerlerin hazırlanması**

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda 1xTE ile sulandırılarak stok solüsyonu için diyolifize edilmiştir. Çalışma solüsyonları 5µl diyolifize primer + 20 µl TE oranlarında hazırlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve ekimi**

Eşit büyüklükte seçilen saf *Triticum aestivum* L. ve *Zea mays* L. tohumları %5' lik Sodyum hipoklorit (NaOCl)'de 10 dk. bekletilerek yüzeysel sterilizasyonları sağlanmış ve ardından saf su ile yıkanıp kurutulmuştur. Tohumlar Afşin-Elbistan Termik Santrali A ünitesinin batı-doğu doğrultusunda oluşturulan düzlemde hakim rüzgarın etkili olduğu doğu yönünde mart ayında 500'er metre mesafe ile 50'şer adet 20 noktaya ekilmiştir. Ekilen tohumların çimlenip, 40 günlük vejetasyon sürecini tamamlamalarının ardından dörder yapraklı fideler toplanmıştır. Fidler saf su ile yıkanarak dış kirlilikten arındırılmış ve moleküler incelemeler için hazır hale getirilmiştir. Çalışmanın kontrol gurubunu oluşturan örnekler ise santralin etki alanı dışında 30 km mesafede aynı iklim şartları altında çimlendirilerek yetiştirilmiştir.

### **3.2.2. ICP-MS ile ağır metal analizi**

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, ucuz, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-

niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan ileri teknoloji ürünü bir analiz tekniğidir. Termik santralden savrulan ağır metallerin yetiştirilen fidelerin bünyesindeki ağır metal türlerinin ve miktarlarının tespiti için kullanılmıştır. Analiz için örneklere 8 ml HNO<sub>3</sub> + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerisinde Ethos Up Milestone Connect marka mikrodalga cihazında yakma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra numuneler 50 ml' ye seyreltilmiştir. Seyreltilen çözeltilerden her birinden 15 ml alınarak Agilent Technologies 7800 (Agilent Technologies SPS 4 Autosamples) markalı cihazda ICP-MS analizi yapılmıştır.

### 3.2.3. DNA izolasyonu

RAPD ve IRAP analizleri ile değerlendirmenin yapılabilmesi için bitki örneklerinden genomik DNA'nın izolasyonu Shagai-Marroof ve arkadaşlarının (1984) protokolünde küçük değişiklikler yapılmış ve aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

- İzolasyon tamponu 50 ml hazırlanmış ve 70°C ye kadar su banyosunda ısıtılarak içerisine 100 µl β-mercaptoethanol [Merck ®] eklenmiştir.
- Örnekler hassas terazide 0,3 gr tartılmış ve sıvı azot kullanılarak havan yardımıyla öğütülmüştür.
- Öğütülen örnekler 2,0 ml'lik eppendorf tüplerine bırakılmıştır.
- Örnekler 1000 µl izolasyon tampon çözeltisi eklenmiş ve 70 °C'deki su banyosuna bırakılmıştır. Yaklaşık 60 dk. inkübasyona tabi tutulan örnekler, her 10 dk. da bir alt üst edilmiştir.
- Örneklerin üzerine 750 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenerek hafifçe alt üst edilmiştir.
- Karışımı yapılan örnekler 24 °C'de 20 dk. 14000 RPM' de santrifüj edilmiştir. Oluşan üç katmanın en üstteki katmanı (süpernatant) pipet yardımıyla alınmış ve yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
- Süpernatant oranında tekrar kloroform: izoamilalkol eklenmiş ve 4 °C'de 20 dk. 14000 RPM' de santrifüj edilmiştir.
- Üst faz yeni eppendorf tüplerine aktararak üzerine 100 µl 10 M amonyum asetat ve 100 µl 3 M sodyum asetat eklenmiştir.
- Oluşan karışımın 2,5 katı isopropanol (-20 °C) ilave edilerek hafifçe alt üst edilmiştir. Bu esnada DNA peletinin oluşumu gözlenmiştir.

- Daha sonra 4 °C’de 20 dk. 14000 RPM’ de santrifüj edilmiştir.
- Tüplerden sıvı kısım uzaklaştırılarak süpernatant elde edilmiştir.
- Tekrar tüpler 4 °C’de 1 dk. 14000 RPM’ de santrifüj edilmiş ve 37 °C’de 15 dk. etüvde kurumaya bırakılmıştır.
- Örneklerden elde edilen genomik DNA’lara 100 µl TE tamponu eklenmiş ve +4 °C’ de stoklanmıştır.

DNA örneklerinin saflığını ölçmek için 4 µl DNA + 996 µl TE tamponuna eklenerek spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri okunmuştur. 260/280 değeri 1,1-1,8 arasında olan DNA örnekleri saf DNA olarak etiketlenmiştir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme katsayısı) x OD 260 (260nm’de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA miktarı hesaplanmış ve stok DNA’dan 50 ng/1 DNA içeren çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

#### 3.2.4. RAPD analizi

RAPD analizleri ile değerlendirilmesinde 8 primer kullanılmıştır. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler ve bu primerlerin baz dizilimleri, Tablo 3.5.’de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Dizilimi 5’→3’	Erime Sıcaklığı (°C)
OPK 19	CACAGGCGGA	34
B 20	GGACCCTTAC	34
OPY 1	GTGGCATCTC	32
OPY 15	AGTCGCCCTT	32
OPA13	CAGCACCCAC	32
OPB 10	CTGCTGGGAC	34
OPH 16	TCTCAGCTGG	32
OPH 10	CCTACGTCAG	32

RAPD-PCR analizi için hazırlanan master karışımlarının bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları Tablo 3.6.’ de verilmiştir. Bu master karışımı her bir primer uygulaması için aynı oranlarda hazırlanmıştır.



**Tablo 3.6.** RAPD analiz bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
10 x PCR buffer	2
dNTPs (10 nM)	0,5
Magnezyum clorid (25 mM)	1,25
RAPD primer (5 mM)	1
Taq DNA polimeraz	1
Ultra saf su	13,25
Genomik DNA	1
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>

Buğday ve mısır örneklerinden elde genomik DNA'ların RAPD-PCR ile amplifikasyonu için hazırlanan master karışımları her bir örneğin üzerine eklenmiştir. PCR tüplerinde 1 µl genomik DNA + 1 µl RAPD primer + 18 µl master karışımı ile elde PCR reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Bu karışımlar her bir primerin bağlanma sıcaklığına uygun olarak Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazında Tablo 3.7.' de verilen sıcaklık döngü protokolüne tabi tutulmuştur.

**Tablo 3.7.** RAPD PCR döngü protokolü

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95 °C	2 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	2
Primer Bağlanma	37 °C	1 dk.	1
Uzama	72 °C	2 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	41
Primer Bağlanma	35 °C	1 dk.	1
Uzama	72 °C	2 dk.	1
Son Uzama	72 °C	5 dk.	1
Bekleme	4 °C	∞	1

### 3.2.5. IRAP analizi

IRAP analizlerinde 6 primer ile PCR yapılmıştır. Kullanılan primerlerin adı, sekansları ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.8.'da verilmiştir.

**Tablo 3.8.** IRAP-PCR analizinde kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Dizilimi 5'→3'	Erime Sıcaklığı (°C)
SUKKULA	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	63.3
3LTR-5	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA	64.6
LTR 6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA	64.4
NIKITA E2647-	ACCCCTCTAGGCGACATCC	58.7
5LTR1	TTGCCTCTAGGGCATATTTTCCAACA	58.4
LTR 6149 -5	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	65.9

Retrotranspozon hareketliliğinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan IRAP-PCR analizi için master karışımı Tablo 3.9.'de verilen değerlerde hazırlanmıştır. Bu master karışımları 6 primeri için gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.9.** IRAP-PCR master karışımı içerik ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
10 x PCR buffer	2
dNTPs (10 nM)	0,5
Magnezyum Clorid (25 mM)	1,25
IRAP primer (5 mM)	1
Taq DNA polimeraz	1
Ultra saf su	13,25
Genomik DNA	1
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>

Buğday ve mısır örneklerinden elde genomik DNA'ların IRAP-PCR ile amplifikasyonu için hazırlanan master karışımları her bir örneğin üzerine eklenmiştir. PCR tüplerinde 1 µl genomik DNA + 1 µl IRAP primer + 18 µl master karışımı ile elde PCR reaksiyon

karışımı oluşturulmuştur. Bu karışımlar her bir primerin bağlanma sıcaklığına uygun olarak Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazında Tablo 3.10.' de verilen sıcaklık döngü protokolüne tabi tutulmuştur.

**Tablo 3.10.** IRAP-PCR döngü protokolü

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95 °C	2 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	2
Primer Bağlanma	* °C	1 dk.	1
Uzama	72 °C	2 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	41
Primer Bağlanma	35 °C	1 dk.	1
Uzama	72 °C	2 dk.	1
Son Uzama	72 °C	5 dk.	1
Bekleme	4 °C	∞	1

\*IRAP primerinin bağlanma sıcaklığı

### 3.2.6. RAPD ve IRAP elektroforez protokolü

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için 0,7 gr agaroz 10 ml TBE (Tris / Borate / EDTA, pH 8) eklenip saf su ile 100 ml ye tamamlanarak mikrodalga fırında ısıtılmış ve sıcaklığı 58 °C ye düştüğünde 2 µl ethidium bromür eklenmiştir.

Elektroforez içine kuyucukları oluşturacak taraklar eklenerek jel dökümü yapılmıştır. Yaklaşık 40 dakika sonra taraklar çıkarılmış ve PCR ürünleri gel loading solution 6 x ile yüklenmiştir. Yüklemede 5 µl PCR ürünü 1 µl gel loading solution pipetaj ile karıştırılarak kuyulara yüklenmiştir. Kuyulardan birinci sıralara 100-10.000 bç büyüklüğünde marker yüklemesi yine gel loading solution ile aynı oranda gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin jel kuyucuklarına yükleme işleminden sonra elektroforez işlemi için yürütme tamponu hazırlanmıştır. TBE (pH 8)'den 60 ml alınarak saf su ile 600 ml ye tamamlanmış ve elektroforez havuzuna ilave edilmiştir. Örnekler 100 dakika 90 voltta yürütülmüş ve

yürütülen örnekler görüntüleme cihazında 256 nm ultra viyole ışık altında görüntülenmiştir.

### 3.2.7. RAPD-IRAP analizleri ve GTS değerlerinin hesaplanması

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol RAPD ve IRAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar görüntüleme cihazı ve Total LAB TL 120 (Nonlinear Dynamics) yazılımıyla belirlenmiştir.

Genomik kalıp sabitliliği (%) tüm primer ürünleri için  $100 \times 1-a/b$  formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki;

$a$ ; her bir uygulama örneği için tespit edilen RAPD ve IRAP polimorfik profillerini,

$n$ ; ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam band sayısı olarak seçilmiştir. Uygulama gruplarına ait RAPD ve IRAP profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bandın ortaya çıkması veya mevcut bir bandın kaybolmasını kapsamıştır.

### 3.2.8. Gen ekspresyon analizi

Buğday ve mısır fidelerinin gen ekspresyon düzeylerinin hesaplanabilmesi ve karşılaştırmalı analizin yapılabilmesi için RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.8.a. RNA izolasyonu

*Triticum aestivum* L. ve *Zea mays* L. örneklerinden RNA izolasyonu Ribospin Plant 307-150 kit ile yapılmıştır. İzolasyon aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

- Bitki örnekleri 0,1 gr olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve havan içerisinde sıvı azot ile toz haline gelene kadar öğütülmüştür.
- Öğütülen örnekler 1,5 ml'lik eppendorf tüpleri içerisine alınmıştır.
- Üzerine 350 µl RPL Buffer eklenmiş ve 10 sn. vortekslenmiştir.
- Karışım 3 dk. oda sıcaklığında bekletilmiş ve EzPure kolona aktarılmıştır.
- 13000 RPM' de 30 sn. santrifüj edilmiştir.

- Santrifüjün sonunda kolon atılmıştır.
- Süpernatantın üzerine kalan süpernatant hacmi kadar %70 etanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- Daha sonra bu karışım mavi kapaklı kolona aktarılmıştır.
- 13000 RPM' de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
- Üzerine 500 µl RBW Buffer eklenmiş ve 13000 RPM' de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
- Kolonun tam merkezine gelecek şekilde; 70 µl Dnase 1 eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir.
- Daha sonra üzerine 500 µl RBW Buffer eklenmiştir.
- 2 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 13000 RPM' de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
- Altta ki sıvı boşaltılır ve üzerine 500 µl RNW Buffer eklenmiş ve 13000 RPM' de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
- Alttaki sıvı boşaltılmış ve üzerine 500 µl RNW Buffer eklenmiş ve 13000 RPM' de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılmış ve 13000 RPM' de 1,5 dk. santrifüj edilmiştir.
- Kolonlar 1,5 ml'lik tüplere alınmış üzerlerine 50 µl RNase free water eklenmiş ve 2 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 13000 RPM' de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen RNA ürünleri -4 °C'de stoklanmıştır.

### **3.2.8.b. RNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi**

Toplam RNA konsantrasyonları ACTGene Spektrofotometre (ACTGene UVIS- 99, NJ, USA) ölçümleri yapılarak A260/280 O.D. değerindeki veriler alınmıştır. Bu sonuçlara göre tüm örneklerin toplam RNA'ları 0,5 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

### **3.2.8.c. cDNA sentezi**

Buğday ve mısır örneklerinden elde edilen RNA'lardan cDNA sentezinin gerçekleştirilebilmesinin birinci basamağı için master karışımı Tablo 3.11.'da verilen değerlerde her bir numune için hazırlanmıştır.

**Tablo 3.11.** RNA'dan cDNA sentezinin ilk aşaması için hazırlanan master karışımı

Bileşen	Miktar (µl)
RNA	2
Primer	1
Ultra Saf Su	11
<b>Toplam Hacim</b>	<b>14</b>

Bu master karışımındaki örnekler 65°C'de 5 dk. inkübasyona bırakılmış ve daha sonra buz üzerine alınmıştır.

cDNA sentezinin birinci basamağını takiben ikinci master karışımı Tablo 3.12.'da verilen bileşen ve miktarlarda hazırlanmıştır. Bu hazırlanan ikinci master karışımından inkübeye bırakılmış örneklerin her birinin üzerine 6 µl eklenmiştir.

**Tablo 3.12.** cDNA sentezi için hazırlanan ikinci master karışımının bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
10 x RTase reaction buffer	2
0,1 M DTT	2
HyperScript™ Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1
ZymoAll™ RNase Inhibitor	1
<b>Toplam Hacim</b>	<b>6</b>

İkinci master karışımı eklenen örnekler sırasıyla 55 °C'de 60 dk. ve 85 °C'de 5 dk. inkübasyona bırakılmıştır.

#### 3.2.8.d. Gen ekspresyonunun tespiti için RT-PCR analizi

Gen ekspresyon analizleri için 14-3-3 protein ailesi ve kontrol geni (housekeeping) olarak kullanılan β-actin geni için NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBANK veritabanındaki dizilimlerine göre primer dizaynları yapılmıştır. Primer dizaynlarında Wang ve arkadaşlarının (2016) primer dizaynından yararlanılmıştır. Primer dizaynında şu hususlara dikkat edildi;

- Seçilecek forward ve reverse primerler hedef gen bölgesinin dışında, genomun diğer sekanslarıyla hiçbir benzerlik içermeyen dizilimde olmasına,
- Real-time PCR’da çoğaltılacak bölge maksimum 250 bp olmasına,
- Dizayn edilen primerlerin 3’ ucunda GC stabilitesine (max: 2 G veya C),
- Primerler, toplam GC oranı %55’i geçmeyecek bir şekilde olmasına,
- Primerlerin son nükleotidi -eğer mümkünse- G veya C’nin olmasına,
- Primerlerin uzunluğu minimum 20, maksimum 24 bp olmasına,
- Primerlerin Tm (erime sıcaklığı) değerleri arasında maksimum 5 °C olmasına dikkat edildi. RT-PCR analizinde kullanılan primerlere ait detaylar Tablo 3.13.’ de verilmiştir.

**Tablo 3.13.** Gen ekspresyon analizinde kullanılan primerler ve sekans bilgileri

Primer Adı	Baz Dizilişi 5’→ 3’	Erime Sıcaklığı (°C)
ZmGF14-4F	GAACCTCTTATCTGTTGCCT	50
ZmGF14-4R	GATGACTAGATGCCAGTTCC	52
ZmGF14-6F	GCATGCAGAAGGGTTGAGCA	56
ZmGF14-6R	TCAGGGCTCATCTAGCTGGTCCTG	61
Ta14S-F1	ACGACTCAAGCGAGGGGCA	55
Ta14S-R1	CGCCTGCTACGCTACAAGGAC	58
Ta14S-F2	GTCAATGACCGTTGCAATGTG	52
Ta14S-R2	GCCACCACCACCACTGTATG	56
β-actin-F	TTTGAAGAGTCGGTGAAGGG	52
β-actin-R	TTTCATACAGCAGGCAAGCA	50

Tüm real-time PCR örnekleri 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. RT-PCR analizinde, bitki RNA’larından sentezlenen cDNA’lar kalıp olarak kullanılmıştır. RT-PCR master karışımının bileşenleri ve miktarları Tablo 3.14.’de verilmiştir. Tüm reaksiyonlar Bioneer Exicycler96® (Bioneer, South Korea) cihazında gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.14.** Gen ekspresyonu için yapılan RT-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
2X SYBR master mix	10
F (Forward) (10pm) primer	0,8
R (Reverse) (10pm) primer	0,8
ROX	2
cDNA	4
Ultra saf su	2,4
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>

RT-PCR için kuyucuklara yüklenen master karışımı daha sonra Tablo 3.15.'de verilen sıcaklık döngü protokolüne göre yürütülmüştür.

**Tablo 3.15.** RT-PCR sıcaklık döngü protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95°C	10 dk.	1
95 °C	15 sn.	45
60 °C	1 dk.	45
4	∞	1

#### 4.2.8.e. DATA analiz

RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde eşik döngü değeri parametresinden yararlanılmıştır. Eşik döngü değerinin göreceli veya karşılaştırmalı kantitasyon sonuçlarından elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri ile gen ifade düzeyleri hesaplanmıştır (Rao vd., 2013). Her bir örneğin gen ekspresyon düzeyini ifade eden  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri  $2^{-((a-b) - (c-d))}$  eşitliğe göre hesaplanmıştır.

Ct değerini hesaplamada kullanılan eşitlikdeki;

a, her bir örnek için kullanılan genden elde edilen Ct değerini,

b; kontrol gurubu için kullanılan genden elde edilen Ct değerini,

c; her bir örneğe ait  $\beta$ -actin geninden elde edilen Ct değerini,

d; kontrol gurubunun  $\beta$ -actin geninden elde edilen Ct değerini ifade etmektedir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Termik santral çevresinde yetişen tahıl ürünlerinde ağır metallerin neden olduğu genotoksik etkinin incelendiği çalışmamızda yapılan analizlerde elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

Buğday ve mısır örneklerinin yapısında ICP-MS analizleri sonucunda termik santralden savrulan, küllerin taşınması, depolanması gibi nedenlerden dolayı çevreye yayılan ağır metallerin varlığı tespit edilmiştir. Cr, Ni, Mn, Fe, Cd, Zn, Pb ve Cu ağır metalleri bitki örneklerinde tespit edilmiştir. Bu ağır metallerin bitki örneklerindeki çeşidi ve miktarının termik santrale yakınlık durumuna göre farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Sonuçlar termik santrale yaklaşık 6-6,5 km mesafeye kadar ağır metal varlığı tespit edilmiştir. Bu durumda termik santralden çeşitli yollarla savrulan ağır metallerin 6-6,5 km mesafeye kadar etkili olduğunu göstermiştir.

Ağır metallerin neden olduğu stres neticesinde genomda meydana gelen farklılaşmanın tespitinde kullandığımız RAPD ve IRAP analizleri ile yaklaşık 5 km mesafeye kadarki örneklerde polimorfizmler tespit edilmiştir. Meydana gelen polimorfizmler stres neticesinde genomda meydana gelen değişimler sonucunda oluşmaktadır. Böylece genomda primer bağlanma noktaları değişmekte ve gen farklılık tespitinde yararlandığımız bantlar oluşmamakta ve/ veya fazladan bant oluşumu söz konusu olmaktadır. Ayrıca bu mesafeye kadarki örneklerin genetik kararlılıklarında düşüşler söz konusudur.

Gen ekspresyonu analizlerinde ise yoğun miktarda ve çok çeşitli ağır metal stresine maruz kalan buğday ve mısır örneklerinin savunma sisteminde görev alarak devreye giren 14-3-3 protein indüksiyonunun baskılandığı belirlenmiştir. Yapısında ağır metal yoğunluğu az olan örneklerde ise bu genin ekspresyonunun yapılabildiği anlaşılmıştır.

Termik santral gibi ağır metal kirliliğine neden olan tesislerin çevresinde tahılların ekiminde bu etki mesafesinin (6-6,5 km) dikkate alınması bitkilerde oluşabilecek genotoksik etkinin azaltılmasında önemli rol oynayacağı açıkça anlaşılmaktadır.

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

### 5.1. Sonuç

#### 5.1.1. ICP-MS analiz sonuçları

ICP-MS ile ekmeçlik buğday ve mısır örneklerinin yapısında yer alan ağır metallerin türü ve miktarının tespiti için içerik analizi yapılmıştır. Ekmeçlik buğday ve mısır örneklerinin ağır metal kalibrasyonlarının sağlanması için kontrol örneklerinde tespit edilen mikro besin elementlerinin miktarı örneklerin değerlerinden çıkarılmıştır. Bu analiz ve işlem neticesinde elde edilen ağır metallerin miktarları Tablo 5.1. ve Tablo 5.2.'de verilmiştir.

Ekmeçlik buğday ve mısır örneklerinin yapısında Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd ve Pb ağır metallerinin varlığı tespit edilmiştir. Ağır metal kirliliğine neden olan termik santrale en yakın konumda yetiştirilen buğdayın yapısında 8 tür ağır metalin bulunduğu tespit edilmiştir. Bitkilerin yetiştirildiği konum ile ağır metal kaynağı arasındaki mesafe arttıkça bitkilerdeki tespit edilen ağır metallerin çeşidi ve miktarı azalma göstermektedir. Beşinci noktadaki örnekten itibaren ağır metal miktarında ve çeşitinde bariz miktarda azalma görülmüştür. Ağır metal kaynağına uzaklık olarak onikinci noktada yer alan örnekte sadece Ni, Cu ve Zn ağır metalleri tespit edilmiştir.

Mısır örneklerinin ICP-MS içerik analiz sonuçları ağır metal kaynağına en yakın ilk iki örneğin yapısında 8 ağır metalin varlığını da göstermiştir. Ağır metal kaynağı ile bitki ekim noktaları arasındaki mesafe arttıkça yapılarındaki ağır metal miktarı ve çeşiti azalma göstermektedir. Beşinci noktadaki örnekten itibaren ağır metal türlerinde gözle görülür bir azalma söz konusudur. Örneğin dördüncü örneğin yapısında Mn ve Fe hariç diğer 6 ağır metal mevcutken, beşinci örnekte Cr, Mn, Fe ve Cd elementlerine rastlanılmamıştır. Ağır metal kaynağına uzaklık olarak on ikinci noktada yer alan örnekte sadece Cu ağır metaline rastlanılmıştır.

Analiz sonuçlarına bakıldığında ekmeçlik ekmeçlik buğday ve mısır bitki örneklerinde aynı ağır metallerin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca termik santrale yakınlığa bağlı olarak bitki örneklerindeki ağır metallerin miktarları değişkenlik göstermektedir. Konum olarak termik santralden uzakta yetiştirilen örneklerin yapısında ağır metal tespit edilmemiştir.

**Tablo 5.1.** Ekmeklik buğday örneklerinin ağır metal içerik analizi sonuçları

<b>Buğday</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>
	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>
<b>1</b>	4.550.431	21.681	1.685.785	4.355.505	595.354	819.313	1.394.939	711.671
<b>2</b>	2.807.387	<0.000	852.909	3.401.970	508.402	625.720	759.010	891.303
<b>3</b>	549.397	<0.000	333.629	2.255.238	388.870	220.284	341.806	638.463
<b>4</b>	509.533	<0.000	206.937	1.771.025	382.728	231.422	<0.000	829.115
<b>5</b>	5.974.818	<0.000	<0.000	1.605.373	258.217	213.068	<0.000	632.376
<b>6</b>	2.178.164	<0.000	<0.000	272.817	275.040	192.192	<0.000	340.042
<b>7</b>	<0.000	<0.000	<0.000	186.499	18.189	200.399	<0.000	263.366
<b>8</b>	<0.000	<0.000	<0.000	26.684	9.308	396.382	<0.000	175.521
<b>9</b>	<0.000	<0.000	<0.000	29.959	8.824	76.049	<0.000	120.824
<b>10</b>	<0.000	<0.000	<0.000	83.612	7.793	144.707	<0.000	98.944
<b>11</b>	<0.000	<0.000	<0.000	5.819	227	14.277	<0.000	<0.000
<b>12</b>	<0.000	<0.000	<0.000	90.102	7.611	14.245	<0.000	<0.000
<b>13</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>14</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>15</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>16</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>17</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>18</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>19</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>20</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>Kontrol</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000

**Tablo 5.2.** Mısır örneklerinin ağır metal içerik analizi sonuçları

<b>Mısır</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>
	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>
<b>1</b>	3.019.772	13.141	532.315	1.293.552	324.704	760.491	32.156	611.794
<b>2</b>	1.046.604	9.856	455.483	1.282.304	323.604	733.846	29.875	557.562
<b>3</b>	4.399.28	6.217	<0.000	1.071.248	275.040	439.264	13.686	275.521
<b>4</b>	2.159.30	<0.000	<0.000	1.050.320	249.465	371.668	11.242	265.238
<b>5</b>	<0.000	<0.000	<0.000	1.012.014	193.667	307.795	<0.000	201.980
<b>6</b>	<0.000	<0.000	<0.000	1.021.629	180.271	302.151	9.054	164.000
<b>7</b>	<0.000	<0.000	<0.000	837.189	152.661	290.776	<0.000	127.869
<b>8</b>	<0.000	<0.000	<0.000	420.641	149.145	153.515	<0.000	109.645
<b>9</b>	<0.000	<0.000	<0.000	37.365	153.614	90.891	<0.000	97.372
<b>10</b>	<0.000	<0.000	<0.000	12.359	45.584	3.123	<0.000	<0.000
<b>11</b>	<0.000	<0.000	<0.000	4.646	579	687	<0.000	<0.000
<b>12</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	621	<0.000	<0.000	<0.000
<b>13</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>14</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>15</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>16</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>17</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>18</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>19</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>20</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
<b>Kontrol</b>	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000

### 5.1.2. RAPD analiz sonuçları

Ekmeklik buğday RAPD analizi sonucunda oluşan bantların dağılımı, polimorfizm oranları ve GTS değerleri detaylı olarak Tablo 5.3.'de verilmiştir.

Ekmeklik buğday örneklerinde RAPD analizi için uygulanan 8 primerden toplam 761 bant oluşmuştur. Meydana gelen bantların büyüklüğü 259 bp ile 2385 bp aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Kullanılan tüm primerlerde polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm 11 örnekte tespit edilmiş olup %2,94 ile %55,88 değerleri arasında değişkenlik göstermektedir. En yüksek polimorfizm +2 ve -2 bant oluşumu/kaybolması şeklinde 4 polimorfik bant ile B 20 primerinde meydana geldiği tespit edilmiştir. En düşük polimorfizmin OPA 13 primerinde olduğu tespit edilmiştir.

Örneklerin kontrol gurubu referans alınarak yapılan değerlendirmesinde en yüksek polimorfizm oranı ağır metal kaynağına en yakın noktadaki örnekte tespit edilmiştir. Bu noktadaki polimorfizm oranı %55,88'dir. Bu örnekte kullanılan tüm primerlerden toplam 19 polimorfik bant elde edilmiştir. Bunlardan 14'si bant oluşumu, 5 tanesi ise bantın kaybolması şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

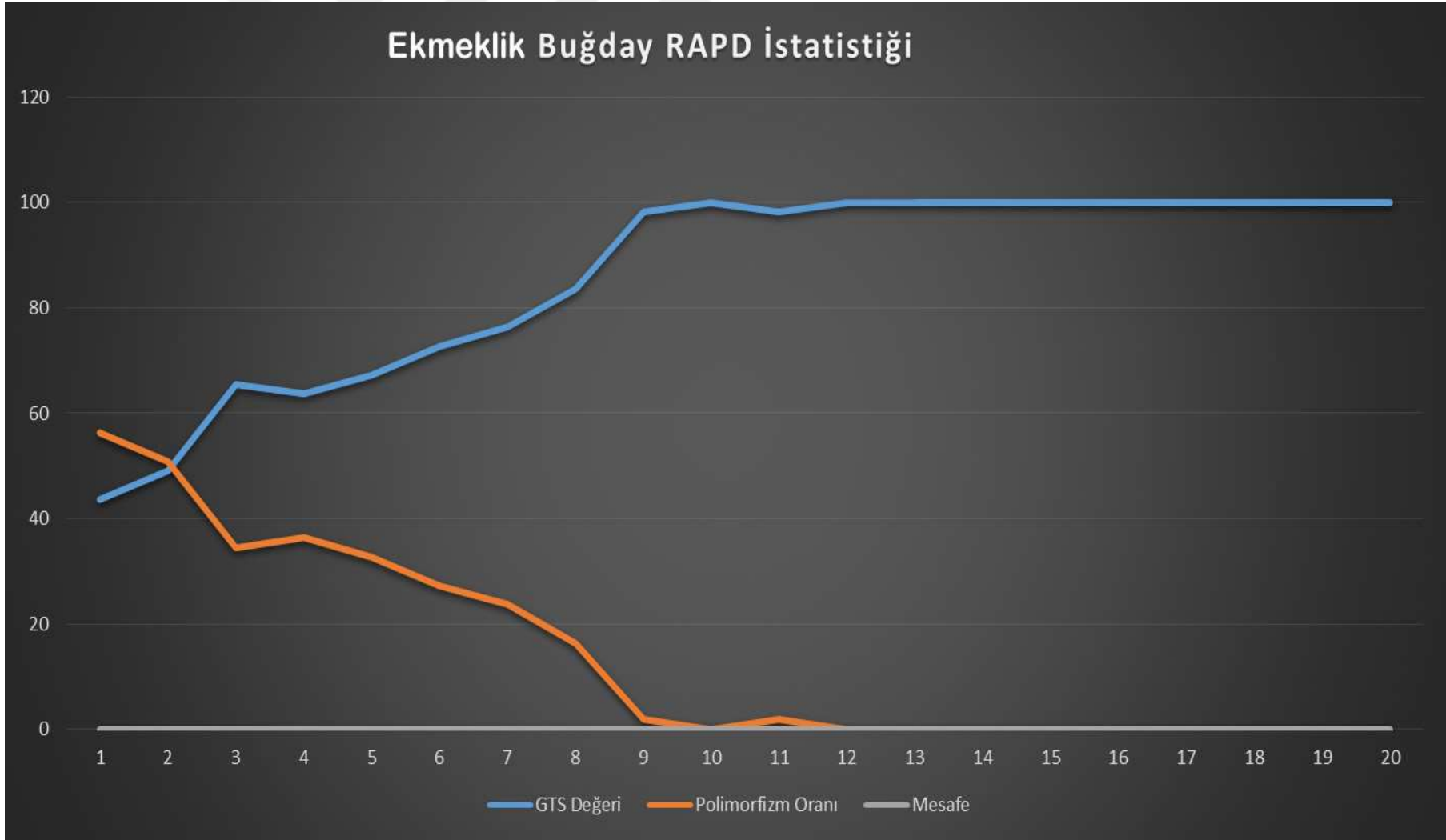
Ağır metal kaynağına yakınlık olarak on ikinci noktadan yirminci noktaya kadar olan örneklerde herhangi bir polimorfizm tespit edilmemiştir.

Örneklerin GTS değerlerinde ağır metal kaynağına yakınlıkları ile ters orantılı olarak artma gözlenmiştir. İlk 11 örneğin elde edilen GTS değerleri %44,12 ve %97,6 arasında değişkenlik göstermiştir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak on ikinci noktadan yirminci noktaya kadar olan örneklerin GTS değeri %100 olarak tespit edilmiştir.

Ekmeklik buğday örneklerinde RAPD analizi ile tespit edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin ekim mesafesine göre sonuçları Şekil 5.1.'de verilmiştir.

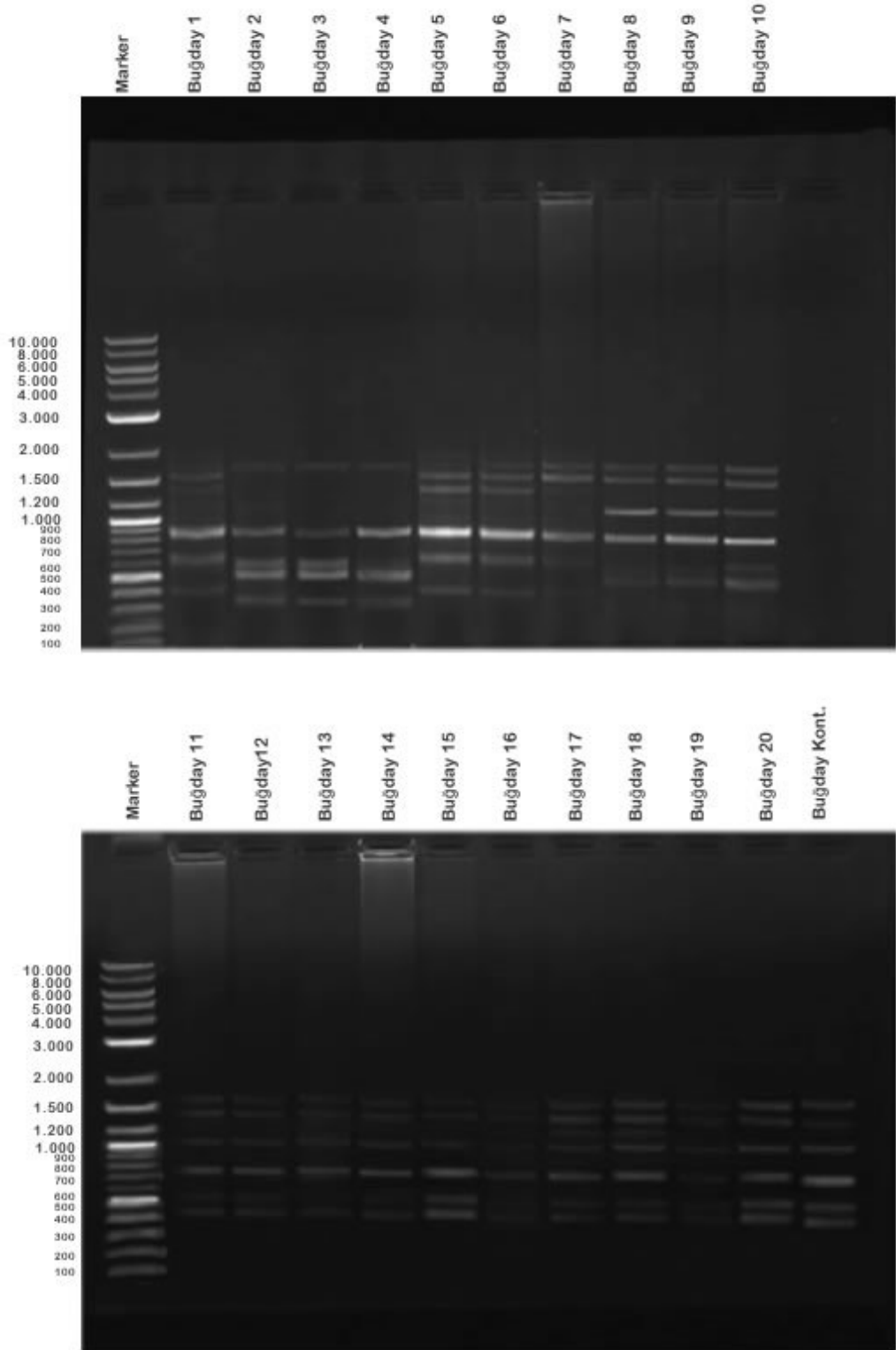
**Tablo 5.3.** Ekmeklik buğday örneklerinin RAPD analiz sonuçları

Primer	Kontrol	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	
OPK 19	6	+1.599	+528	+355	+355	+1.900	+1.916	+460	+1.916	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		+411	+349	-2.143	-2.143	+444	+438	-605	-2.143													
		-732	-2.143	-1.733	-1.733	-605			-732													
B 20	6	+1.787	+1.846	+1.826	+1.749	+1.826	+1.846	+1.713	+1.713	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		+456	+467	+450	+473	+444	+456	+450	+438													
		-2.201	+410	-2.201	-2.201																	
OPY 1	4	+1.822	+1.927	+1.904	+561	+879	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		+572	+616	+600	+388	+567																
		+325	+388	+340		+360																
OPY 15	4	+2.385	+2.347	+2.385	+2.385	+2.347	+2.385	-705	-705	-705	-552	-552	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		-705	-705	-705	+1.216																	
OPA 13	5	+706	+706	+719	+732	+732	+732	+725	+732	+732	+725	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
OPB 10	3	+1.335	+1.335	+571	+571	+565	+565	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		+484	+578																			
OPH 16	4	-1.329	-1.329	+440	+461	+494	+433	+488	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		+412	+419	-1.329		-1.329																
OPH 10	2	+1.583	+824	+824	+832	+815	+815	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
		+832	-659	-659	-659	-659	-659															
		-659																				
Bant Sayısı	34	19	18	17	14	15	10	7	7	2	2	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Polimorfizm Oranı		55,88	52,94	50,0	41,17	44,11	29,41	20,58	20,58	5,88	5,88	2,94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GTS Değeri		44,12	47,06	50,0	58,83	55,89	70,59	79,42	79,42	94,12	94,12	97,06	100	100	100	100	100	100	100	100	100	



**Şekil 5.1.** RAPD analizi ile ekmeklik buğday örneklerinde elde edilen polimorfizm oranları ve GTS değerleri grafiği

RAPD analizinde kullanılan OPK 19 primerinin Şekil 5.2.'de bant oluşumlarını gösteren jel görüntüsü verilmiştir.



**Şekil 5.2.** Ekmeklik buğday RAPD analizinde kullanılan OPK 19 primerine ait jel görüntüsü



Mısır RAPD primerlerinin analizi sonucunda oluşan bantların dağılımı, polimorfizm oranları ve GTS değerlerinin detayları Tablo 5.4.'de verilmiştir

Mısır örneklerinde ağır metallerin etkisinden kaynaklı oluşabilecek genetik varyasyonların analizinde kullanılan 8 RAPD primerden toplam 1153 bant oluşumu ve meydana gelen bantların büyüklüğünün 81 bp ile 2225 bp aralığında olduğu tespit edilmiştir. Analizde kullanılan tüm primerlerde polimorfizm tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre on noktada polimorfizm meydana geldiğini göstermektedir. Elde edilen polimorfizm değerleri %1,81 ile %56,36 arasında değişkenlik göstermektedir.

En yüksek polimorfizm ağır metal kaynağına yakınlık olarak ilk sırada bulunan örnekten OPY 1 primerinin analizinde tespit edilmiştir. Burada kaybolan/mejdana gelen bant polimorfizmi sayısı 6'dır.

En yüksek polimorfizm ağır metal kaynağına en yakın noktadaki örnekte tespit edilmiştir. Bu noktadaki polimorfizm %56,36'dır. Bu örnekte kullanılan tüm primerlerden toplam 31 polimorfik bant elde edilmiştir.

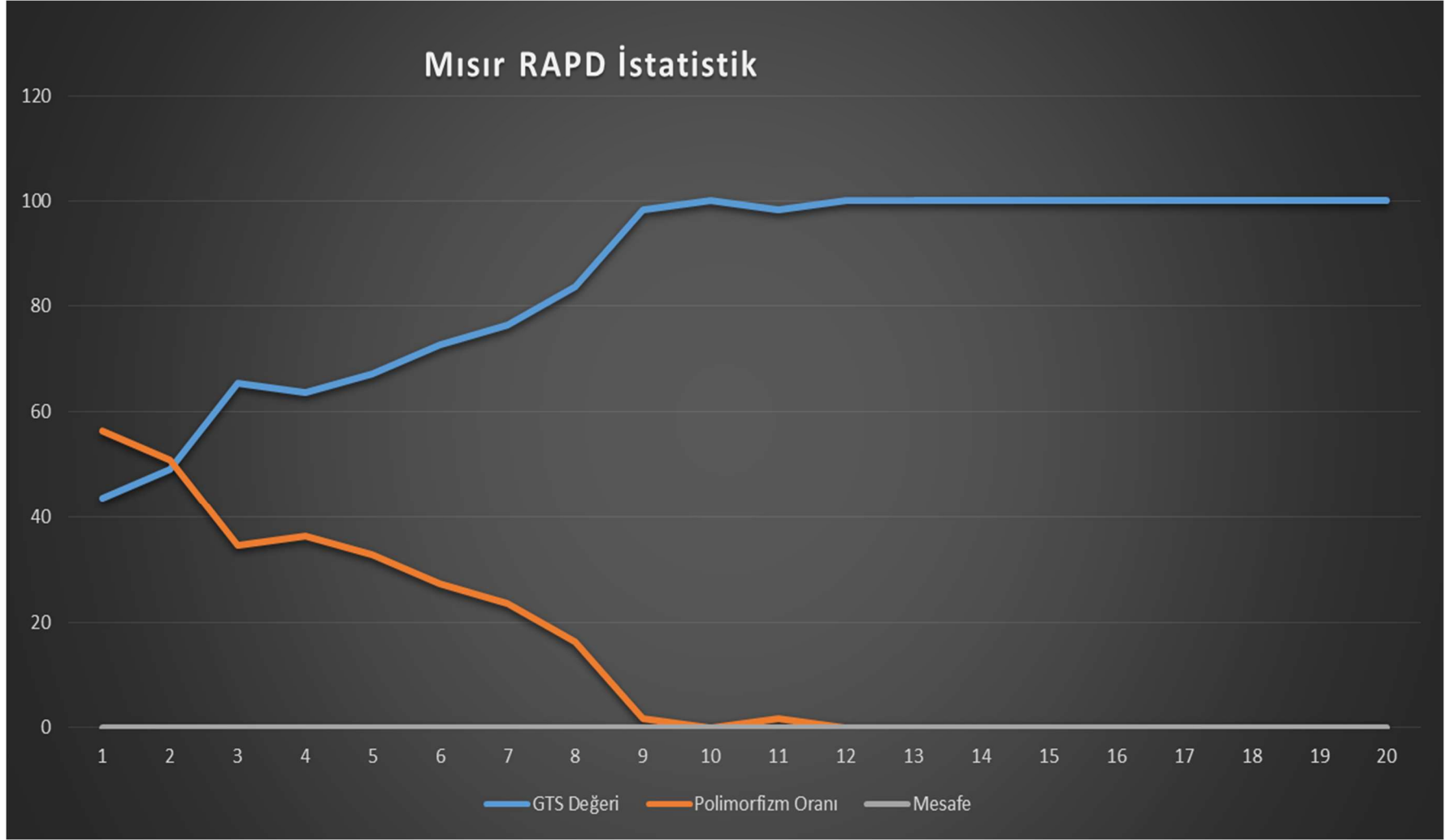
Ağır metal kaynağına yakınlık olarak onuncu nokta ile on ikinci noktadan yirminci noktaya kadar olan örneklerde herhangi bir polimorfizm tespit edilmemiştir.

Örneklerin GTS değerlerinde ağır metal kaynağına yakınlıkları ile ters orantılı olarak artma gözlenmiştir. Elde edilen GTS değerler %43,64 ile %98,19 aralığında değişkenlik göstermektedir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak onuncu nokta ile on ikinci noktadan yirminci noktaya kadar olan örneklerin GTS değeri %100 olarak tespit edilmiştir.

Mısır örneklerinde tespit edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin ekim mesafesine göre sonuçları Şekil 5.3.'de verilmiştir.

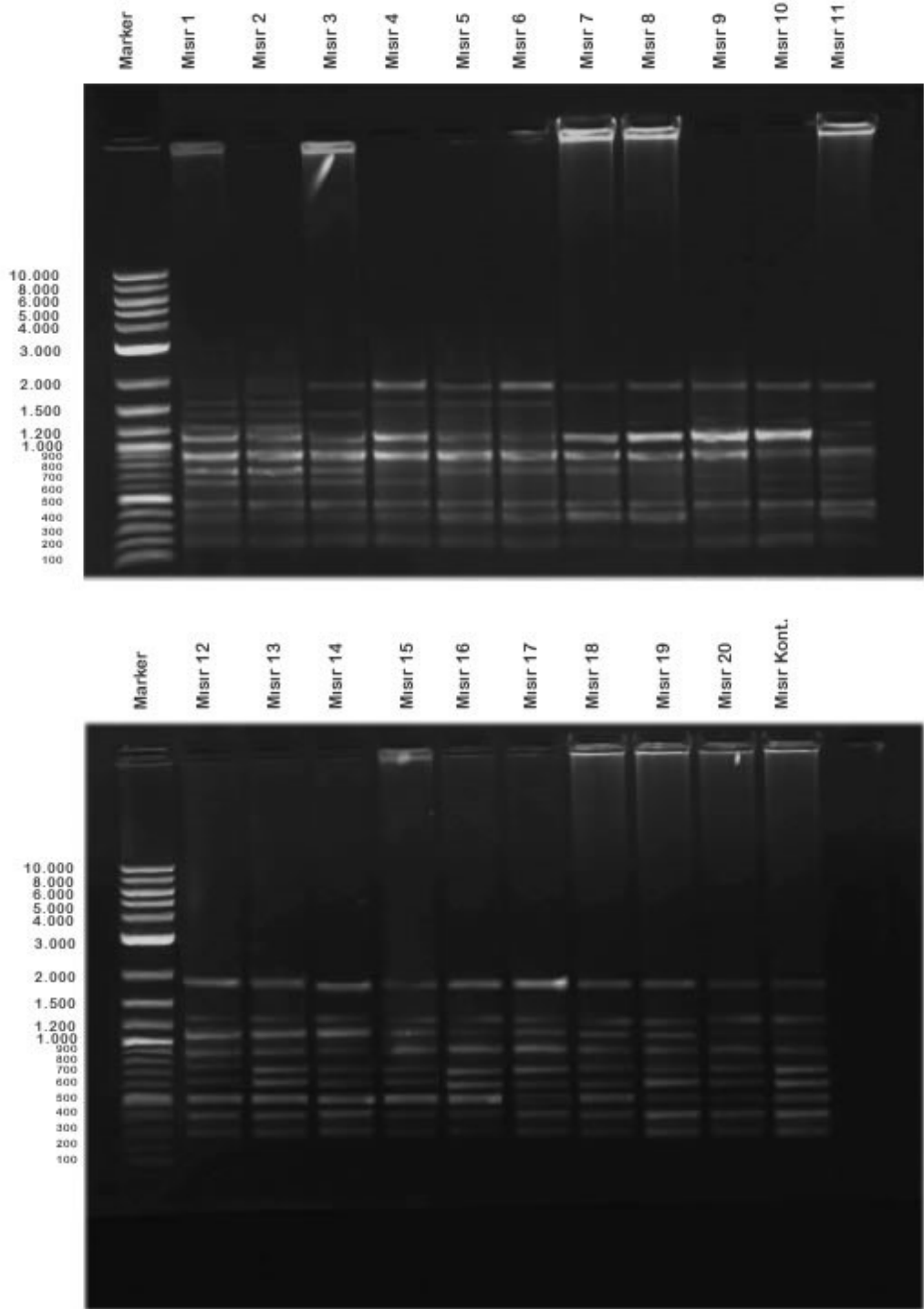
**Tablo 5.4. Mısır örneklerinin RAPD analiz sonuçları**

Primer	Kontrol	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20		
OPK 19	9	-1.867	-1.555	-1.867	-1.867	+2.000	+2.017	-1.379	-1.379	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....		
		-1.211	-1.379	-1.555	-1.555	-1.015	-1.211	-1.015	-629	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-1.015	-1.211	-1.379	-1.379	-532	-532	-532	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		+746	-1.015	-1.211	-1.211	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-532	+344	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
B 20	8	+2.230	+2.149	+2.097	+1.022	-700	-700	+989	+980	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-1.614	-700	-1.614	-700	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-866	+247	-700	+381	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
OPY 1	7	+180	+381	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+1.976	+1.813	-525	+953	+962	+944	+1.225	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-759	-1.057	+927	-525	-525	-759	+373	+323	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-525	-846	+249	-416	-416	-416	+312	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-416	-759	+146	+205	+261	+249	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
OPY 15	9	+293	-416	+114	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+103	+150	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		+1.632	+1.632	+1.452	+1.618	+1.646	+1.632	-1.273	-606	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
OPA 13	6	+1.440	+1.440	-1.273	-1.273	-1.273	-1.273	-606	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-1.855	-284	-729	-606	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-284	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
OPB 10	6	-1.855	+1.254	+752	+648	+1.373	+752	-1855	+776	+677	-	+832	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+1.265	+745	+648	+752	+752	+752	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		+745	+648	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
OPH 16	5	+641	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-276	-276	-	+1.978	-428	-	-395	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		+177	+149	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
OPH 10	5	+1.011	+1.022	-900	-	-900	-361	+165	+165	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+733	-361	+791	+121	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		+88	+121	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
Bant Sayısı	55	+919	+879	+456	-558	+431	+412	-249	-781	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+456	-781	-249	+456	-249	-249	-249	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-249	+456	-249	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
Polimorfizm Oranı		56,36	50,90	34,54	36,36	32,72	27,27	23,63	16,36	1,81	0	1,81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GTS Değeri		43,64	49,10	65,46	63,64	67,28	72,73	76,37	83,64	98,19	100	98,19	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	



Şekil 5.3. RAPD analizi ile mısır örneklerinde elde edilen polimorfizm oranları ve GTS değerleri grafiği

RAPD analizinde kullanılan OPY 15 primerinin Şekil 5.4.'de bant oluşumlarını gösteren jel görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.4. Mısır RAPD analizinde kullanılan OPY 15 primerine ait jel görüntüsü

### 5.1.3. IRAP analiz sonuçları

Ekmeklik buğday örneklerinde IRAP analizi sonucu oluşan bantların dağılımı, polimorfizm oranları ve GTS değerleri Tablo 5.5.'de verilmiştir.

Ekmeklik buğday örneklerine uygulanan 6 IRAP primerinde toplam 487 bant oluşmuştur. Meydana gelen bantların büyüklüğü 73 bp ile 2446 bp aralığında olduğu tespit edilmiştir. 5LTR1 Primerinde herhangi bir polimorfizm meydana gelmediği görülmüştür. En yüksek polimorfizm Sukkula ve LTR 6149-5 primerinde görülmüştür.

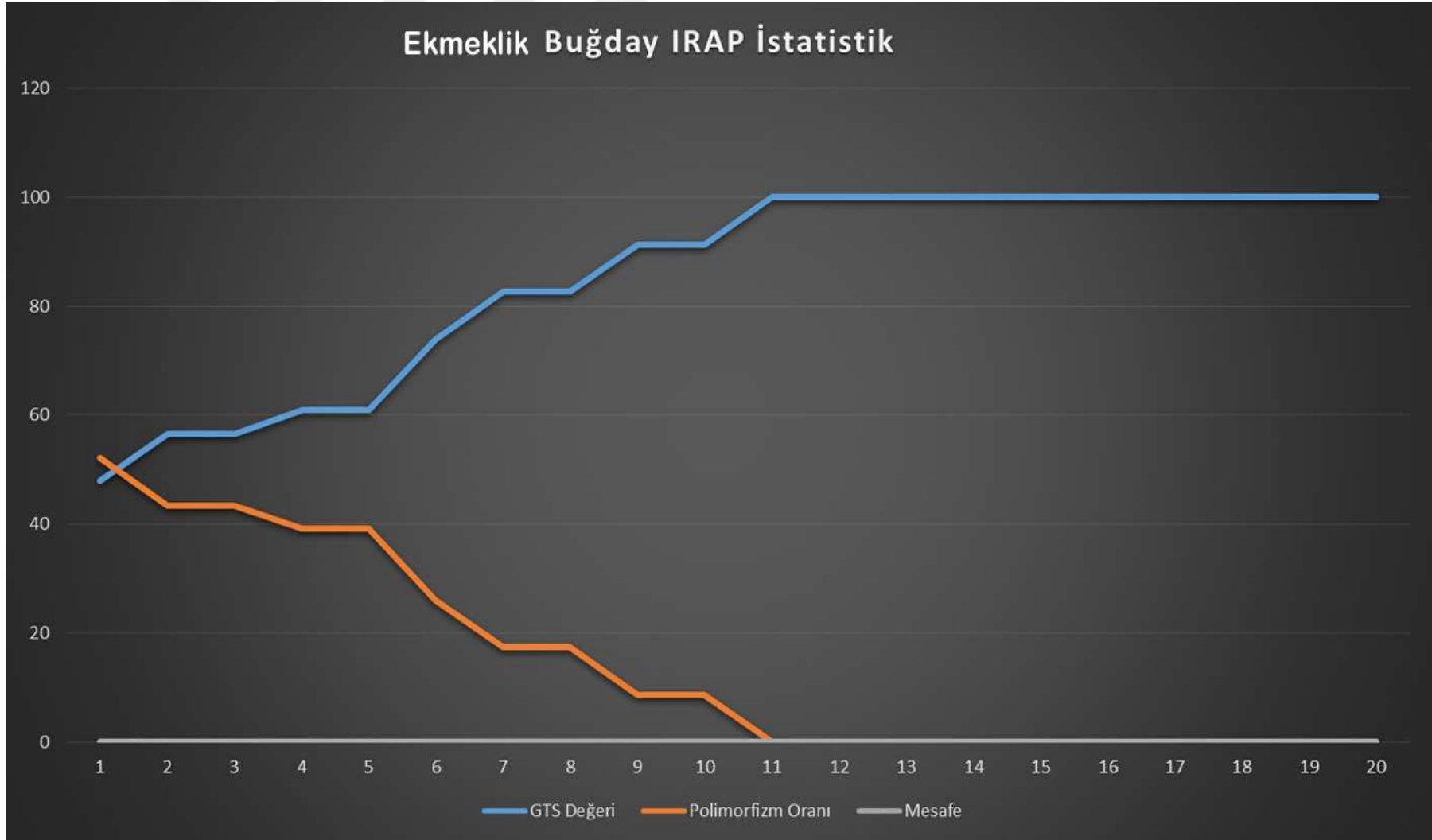
Analiz sonuçlarına göre on örnekte polimorfizm tespit edilmiştir. Oluşan polimorfizm değerleri %8,69 ile %52,17 aralığında değişkenlik göstermektedir. En yüksek polimorfizm ağır metal kaynağına en yakın noktadan alınan örneklerde tespit edilmiştir. Bu noktadaki polimorfizm oranı %52,17'dir. Bu örnekte toplam 12 polimorfik bant varlığı veya eksikliğinin olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm on birinci noktadan yirminci noktaya kadarki örneklerde tespit edilmemiştir.

Örneklerin GTS oranında termik santrale yakınlıkları ile ters orantılı olarak artış olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm tespit edilen on örneğin GTS değerleri %47,88 ile %91,31 aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak on birinci noktadan yirminci noktaya kadar olan örneklerin GTS değeri %100 olarak tespit edilmiştir.

Ekmeklik buğday örneklerinde IRAP analizi ile tespit edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin ekim mesafesine göre sonuçları Şekil 5.5.'de verilmiştir

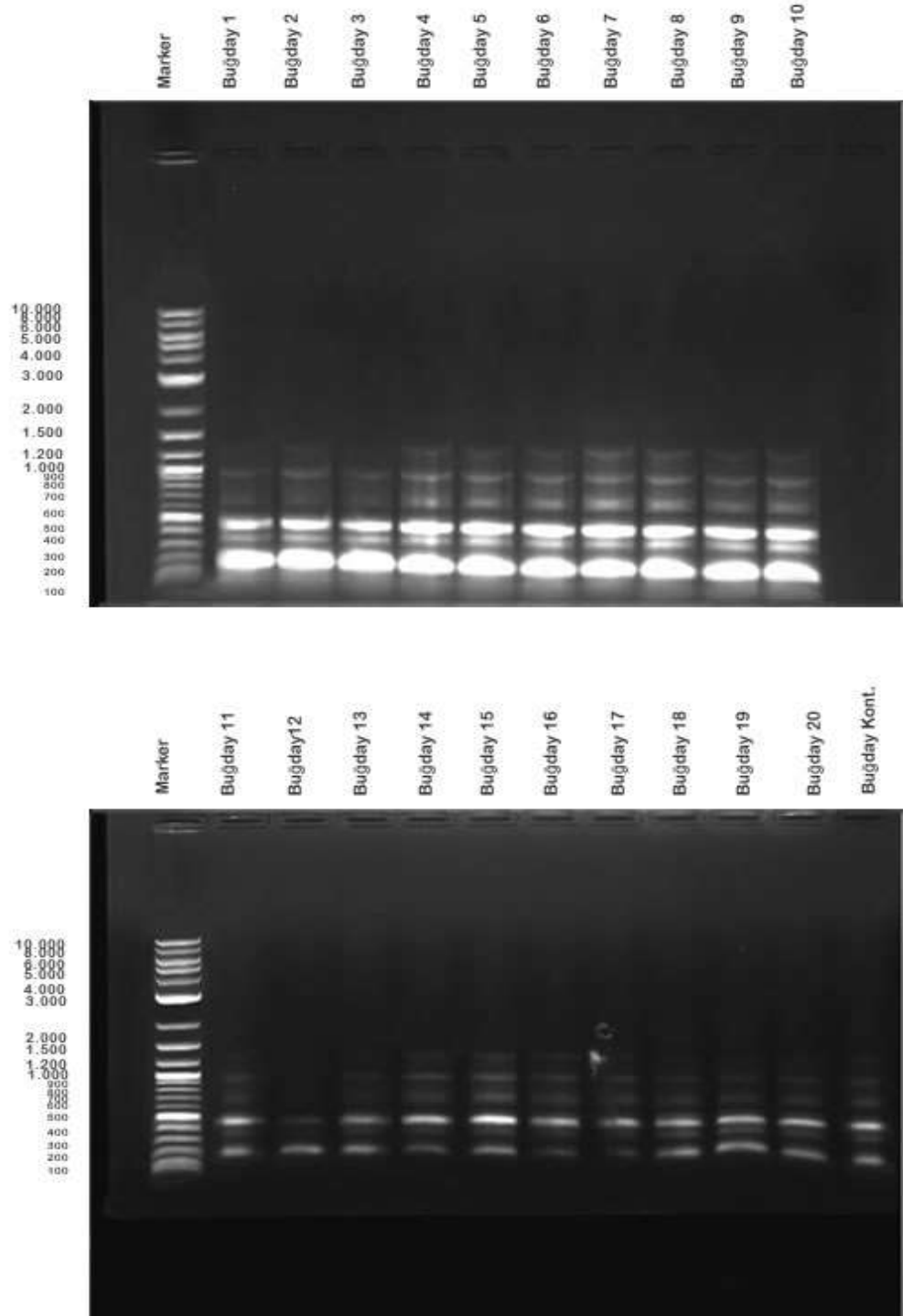
**Tablo 5.5.** Buğday örneklerinin IRAP analiz sonuçları

Primer	Kontrol	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	
<b>SUKKULA</b>	<b>6</b>	+1.222	+1.211	+1.188	+1.165	+1.153	+1.105	+1.117	+1.105	+89	+73	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+238	+260	+249	+227	+220	+208															
		-166	-166	-166																		
<b>LTR6150</b>	<b>5</b>	+918	+726	-1.429	-1.429	-706	-713	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+726																				
<b>3LTR-5</b>	<b>2</b>	+527	+571	+475	+613	+586	+223	+557	+542	+185	+162	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+223	+247	+214	+256	+275		+247	+228													
<b>NIKITA-E2647-</b>	<b>6</b>	-820	-820	-820	-820	-820	....	-820	-820	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-479	-479	-479	-479	-479																
<b>5LTR1</b>	<b>1</b>	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-2.034	-2.034	-2.034	-1.500	-1.500	-2.034	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
		-1.500	-528	-528	-528	-528	-528															
<b>LTR6149-5</b>	<b>3</b>	-528																				
<b>Bant Sayısı</b>	<b>23</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
<b>Polimorfizm Oranı</b>		<b>52,17</b>	<b>43,47</b>	<b>43,47</b>	<b>39,13</b>	<b>39,13</b>	<b>26,08</b>	<b>17,39</b>	<b>17,39</b>	<b>8,69</b>	<b>8,69</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>GTS Değeri</b>		<b>47,88</b>	<b>56,53</b>	<b>56,53</b>	<b>60,87</b>	<b>60,87</b>	<b>73,92</b>	<b>82,61</b>	<b>82,61</b>	<b>91,31</b>	<b>91,31</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	



Şekil 5.5. IRAP analizi ile Ekmeklik buğday örneklerinde elde edilen polimorfizm oranları ve GTS değerleri grafiği

IRAP analizinde kullanılan Sukkula primerinin Şekil 5.6.'da bant oluşumlarını gösteren jel görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.6. Ekmeklik buğday fidelerinde uygulanan Sukkula retrotranspozona ait jel görüntüsü



Mısır örneklerinde IRAP primerlerinin analizi ile elde edilen bant dağılımı, polimorfizm oranı ve GTS değerleri Tablo 5.6.'da verilmiştir.

Mısır örneklerine uygulanan 6 IRAP primerinde toplam 851 bant oluşumu tespit edilmiştir. Meydana gelen bantların büyüklüğü 79 bp ile 2433 bp aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Analizde kullanılan tüm primerlerde polimorfizm tespit edilmiştir. En yüksek polimorfizm ağır metal kaynağına yakınlık olarak ilk sırada bulunan örneklerde Sukkula, Nikita-E2647-, 3LTR5 primerinde tespit edilmiştir. İlk on noktadaki örneklerde polimorfizm meydana geldiği tespit edilmiştir.

Örneklerde tespit edilen polimorfizm değerleri %12,50 ile %52,50 aralığında değişkenlik göstermektedir. Polimorfizm on birinci noktadan yirminci noktaya kadarki örneklerde tespit edilmemiştir.

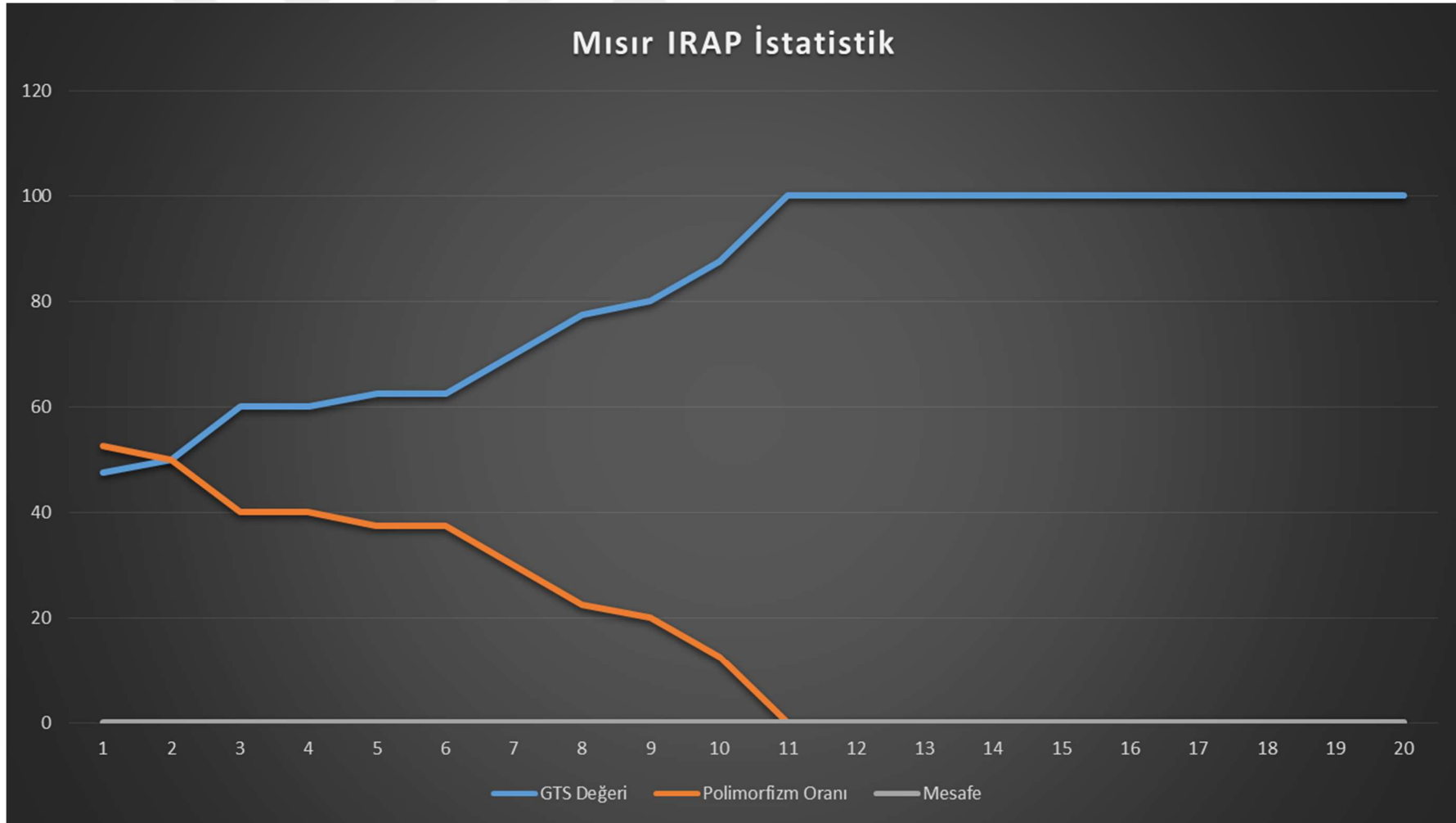
En yüksek polimorfizm oranı termik santrale en yakın noktada yetiştirilen örneklerde tespit edilmiştir. Bu noktadaki polimorfizm oranı %52,50' dir. Bu örnekte toplam 21 polimorfik bant oluşumu tespit edilmiştir.

Örneklerin GTS oranında termik santrale yakınlıkları ile ters orantılı olarak artış olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm tespit edilen örneklerin GTS değerlerinin %47,50 ile %87,50 aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak on birinci noktadan yirminci noktaya kadar olan örneklerin GTS değerinin sabit kaldığı ve %100 olduğu tespit edilmiştir.

Mısır örneklerinde IRAP analizi ile tespit edilen polimorfizm ve GTS değerlerinin ekim mesafesine göre sonuçları Şekil 5.7.'de verilmiştir.

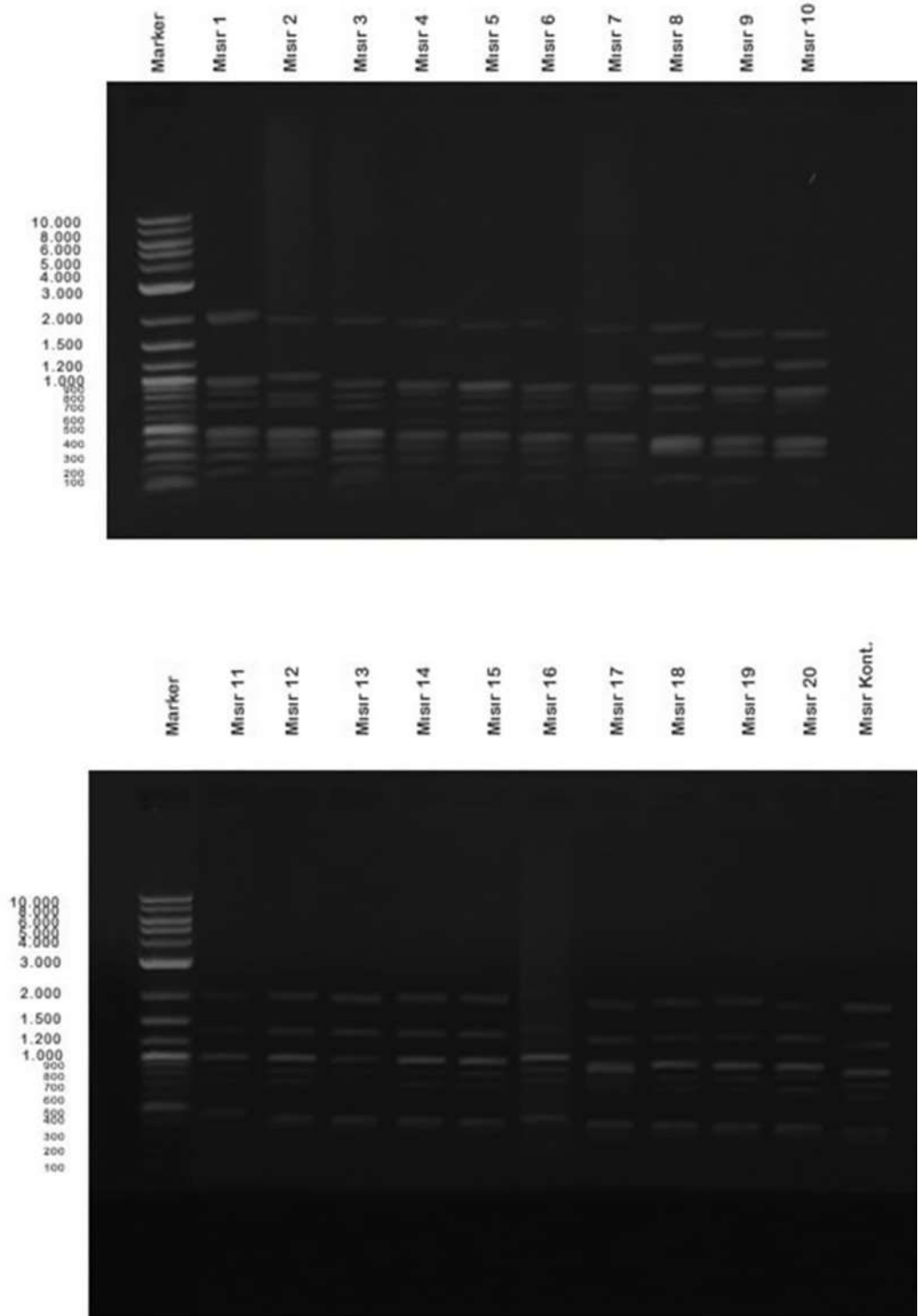
**Tablo 5.6.** Mısır örneklerinin IRAP analiz sonuçları

Primer	Kontrol	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	
SUKKULA	8	-1.064	-1.064	-1.064	-736	-736	-736	-736	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-736	-736	-736	-685	-685	-685	-685														
		-685	-685	-685																		
		-217	-217	-217																		
LTR6150	7	+2.433	-1.514	+468	-1.953	-1.514	-1.514	-1.514	-1.514	-1.514	-1.514	-1.514	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-1.953	+788	+175	-1.514	+1.268	+1.200	+1.211	+1.302													
		+800	+175		+79	+183		+739														
		+195																				
3LTR-5	8	+2.146	+2.360	+2.305	+2.305	+2.251	+2.121	-1.448	+1.000	+1.008	+162	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+1.000	+1.058	+1.000	+1.008	+1.000	+1.008	+1.000	-650	-650												
		-1.448	-1.448	-1.448	-1.448	-1.448	-1.448	-1.448	+892													
		-650	-650																			
NIKITA-E2647-	10	-1.417	+2.527	-1.232	-2.215	-1.884	-2.215	-2.215	-1.884	-1.884	-1.884	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-1.884	-1.884	+1.010	-1.884	+549	-900	+146	+250	+250												
		+1.625	+1.582	+300	+128	+224	+275															
		+128	+117																			
5LTR1	4	+1.513	+1.460	+935	-438	+1.539	+1.552	+1.552	+1.592	+1.539	+1.513	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		-1.220	-1.220	+191	+177	-438	-438															
		+217	+184		+105	+191	+246															
LTR6149-5	3	+1.395	+1.434	+1.211	+839	+1.370	+1.471	+1.421	+1.408	+1.421	+1.383	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
		+670	+313	+749	-542	-542	-355			-542	-542											
Bant Sayısı	40	21	20	16	16	15	15	12	9	8	5	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	
Polimorfizm Oranı		52,50	50,00	40,00	40,00	37,50	37,50	30,00	22,50	20,00	12,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GTS Değeri		47,50	50,00	60,00	60,00	62,50	62,50	70,00	77,50	80,00	87,50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	



Şekil 5.7. IRAP analizi ile mısır örneklerinde elde edilen polimorfizm oranları ve GTS değerleri grafiği

IRAP analizinde kullanılan 3LTR5 primerinin Şekil 5.8’de bant oluşumu görülmektedir.



Şekil 5.8. Mısır IRAP analizinde kullanılan 3LTR5 transpozona ait bant görüntüsü

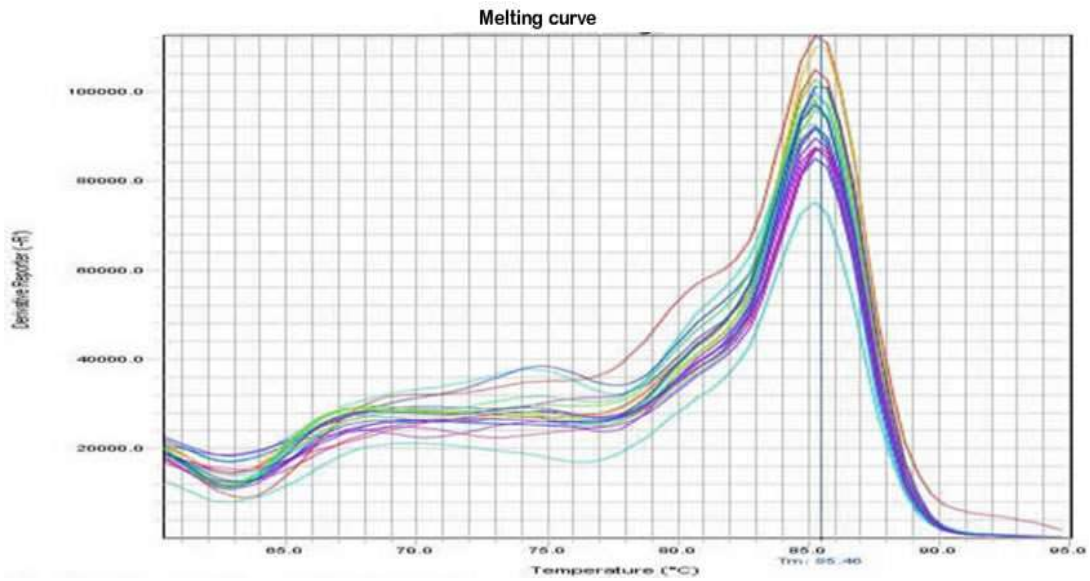
#### 5.1.4. Gen ekspresyon analiz sonuçları

Abiyotik stres kaynağı ağır metallerin buğday gen ekspresyonundaki etki düzeyinin tespit edilmesi için deney ve kontrol örneklerinin Ct değerlerinin tespiti yapılmıştır. Ct değerinin elde edilebilmesi için buğday örneklerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak housekeeping ve hedef gen primerleri ile 3 tekerrürlü olarak RT-PCR yapılmıştır.

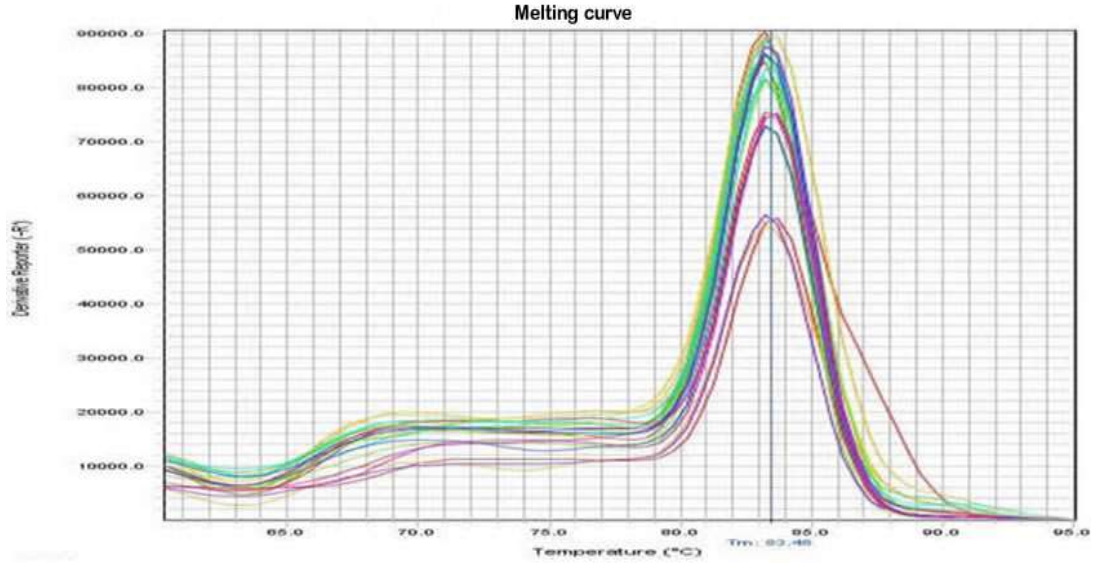
Yüksek primer konsantrasyonları primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır. Primer-dimerler, küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirleriyle bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotitleri, kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır. Bu bantların oluşumu elde edilecek olan ekspresyon düzeyinde yanılgıya neden olabileceğinden primerlerdeki dimer oluşumunun kontrolü için melting curve analizi yapılmıştır. Melting curve analizi DNA çift zincirinin açılması ile floresan ışımaya arasındaki ilişki ile tespit etme durumudur.

Yapılan melting curve analizleri sonucunda primerlerin dimer oluşturmadıkları tespit edilmiştir.

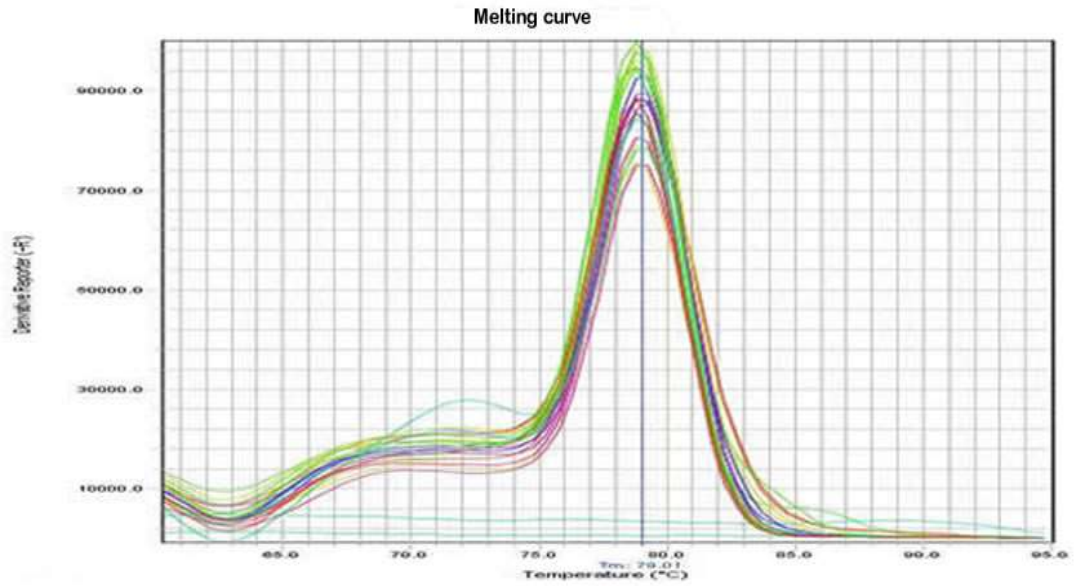
Şekil 5.9.'da Ta14S1 gen primerinin, Şekil 5.10.'da Ta14S2 gen primerinin ve Şekil 5.11.'de  $\beta$ -actin gen primerinin melting curve analiz sonuçları verilmiştir.



Şekil 5.9. Ta14S1 gen primerine ait melting curve grafiği



**Şekil 5.10.** Ta14S2 gen primerine ait melting curve grafiği



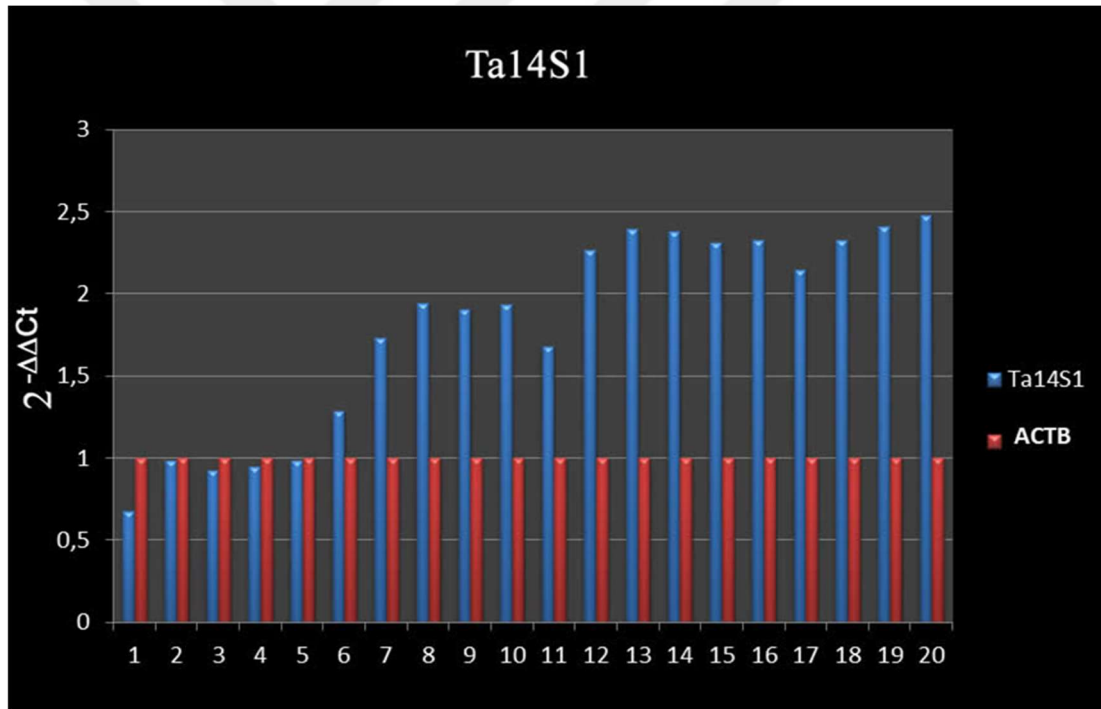
**Şekil 5.11.**  $\beta$ -actin gen primerine ait melting curve grafiği

Gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı analizi için buğday örneklerinin eşik döngü (Ct) değerleri tespit edilmiştir. Deneysel örneklerin Ta14S1 primerinden elde edilen Ct değeri 27,97 ile 29,12 aralığında değişkenlik gösterdiği, kontrol örneğinin Ct değerinin ise 29,83 olduğu tespit edilmiştir. Deneysel örneklerin  $\beta$ -actin primerinden elde edilen Ct değerlerinin 27,95 ile 28,08 arasında değişkenlik gösterdiği, kontrol grubu örneğinin Ct değerinin ise 28,88 olduğu tespit edilmiştir. Primerlerin RT-PCR tekniği ile

elde edilen Ct değerleri kullanılarak örneklerin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen ekspresyon düzeyleri Şekil 5.12.'de verilmiştir.

Buğday Ta14S1 ve  $\beta$ -actin primerinin Ct değerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerinin 0,673 ile 2,479 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Marker olarak kullanılan  $\beta$ -actin primerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri 1 olarak kabul edilmiş ve ekspresyon düzeylerinin karşılaştırması yapılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ağır metal kaynağına en yakın beş buğday örneğinin Ta14S1 gen ekspresyon düzeyinin housekeeping gen olan  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyinin altında kaldığı tespit edilmiştir.

Ağır metal kaynağına yakınlık olarak altıncı noktadaki örneklerden itibaren yirminci noktaya kadarki örneklerin tamamında Ta14S1 gen ekspresyon düzeyinin  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyine eşit veya daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



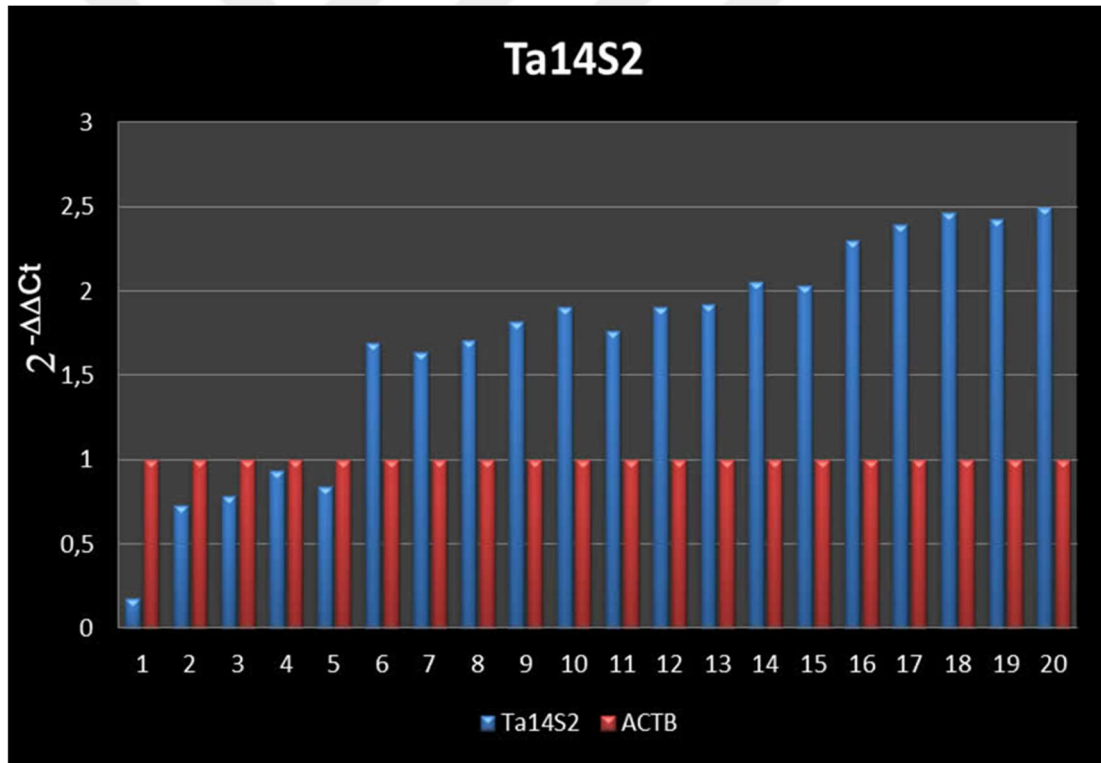
Şekil 5.12. Ta14S1 ve  $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

Deney gurubu örneklerin Ta14S2 primerinden elde edilen Ct değeri 31,20 ile 34,47 aralığında değişkenlik gösterdiği, kontrol örneğinin Ct değerinin ise 30,14 olduğu tespit edilmiştir. Deney gurubu örneklerin  $\beta$ -actin primerinden elde edilen Ct değerlerinin 27,91 ile 28,31 arasında değişkenlik gösterdiği, kontrol gurubu örneğinin Ct değerinin ise 28,88 olduğu tespit edilmiştir. Primerlerin RT-PCR tekniği ile elde edilen Ct değerleri

kullanılarak örneklerin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen ekspresyon düzeyleri Şekil 5.13.'da verilmiştir.

Buğday Ta14S2 ve  $\beta$ -actin primerinin Ct değerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerinin 0,176 ile 2,496 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Marker olarak kullanılan  $\beta$ -actin primerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri ile Ta14S2 gen primerine ait ekspresyon düzeylerinin karşılaştırması yapılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ağır metal kaynağına en yakın beş buğday örneğinin Ta14S2 gen ekspresyon düzeyinin housekeeping gen olan  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyinin altında kaldığı tespit edilmiştir.

Ağır metal kaynağına yakınlık olarak altıncı noktadaki örneklerden itibaren yirminci noktadaki son örneğe kadarki örneklerin tamamında Ta14S2 gen ekspresyon düzeyinin  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyine eşit veya daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

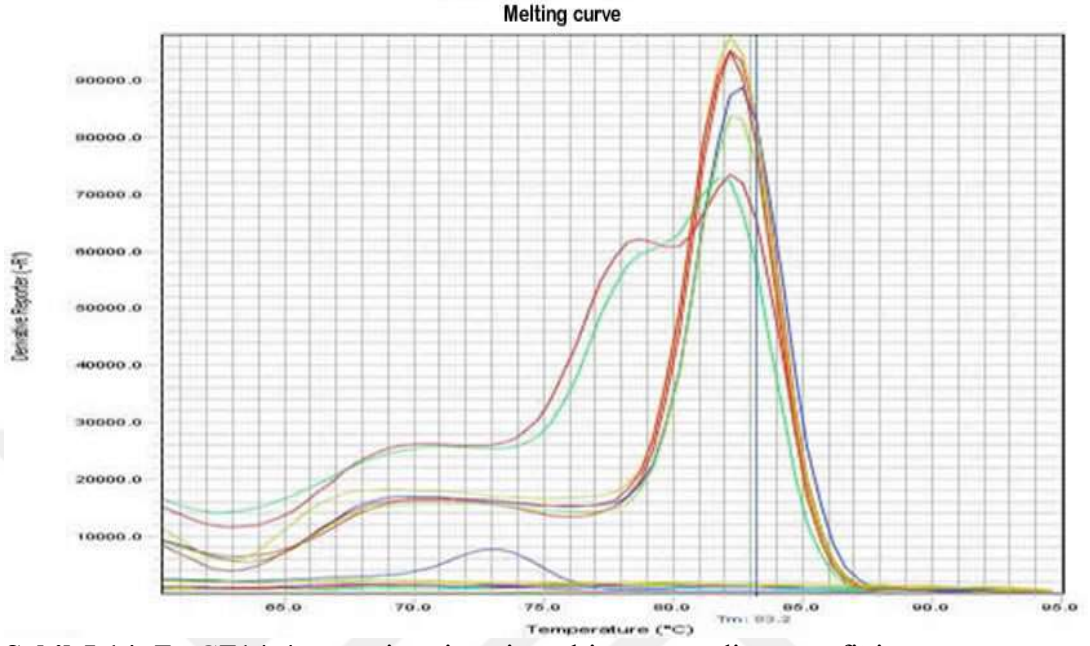


Şekil 5.13. Ta14S2 ve  $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri

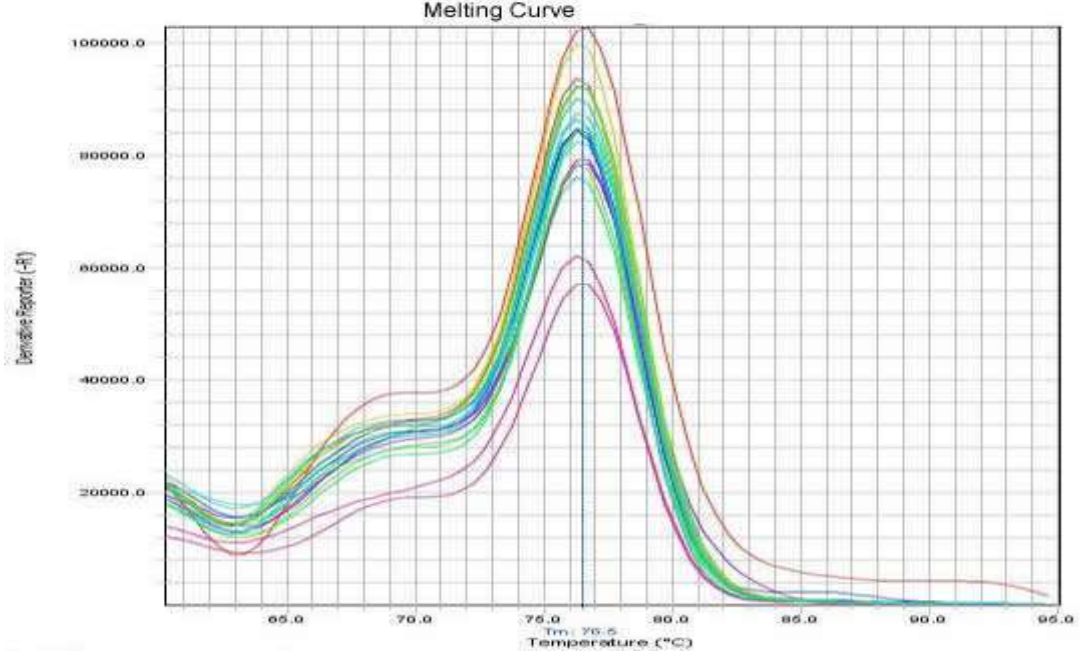
Mısır örneklerine uygulanan gen primerlerinin dimer oluşumunu kontrol etmek için melting curve analizi yapılmış ve analiz sonucunda primerlerin dimer oluşturmadıkları tespit edilmiştir. Şekil 5.14.'de ZmGf14-4 primerinin, Şekil 5.15.'de ZmGf14-6



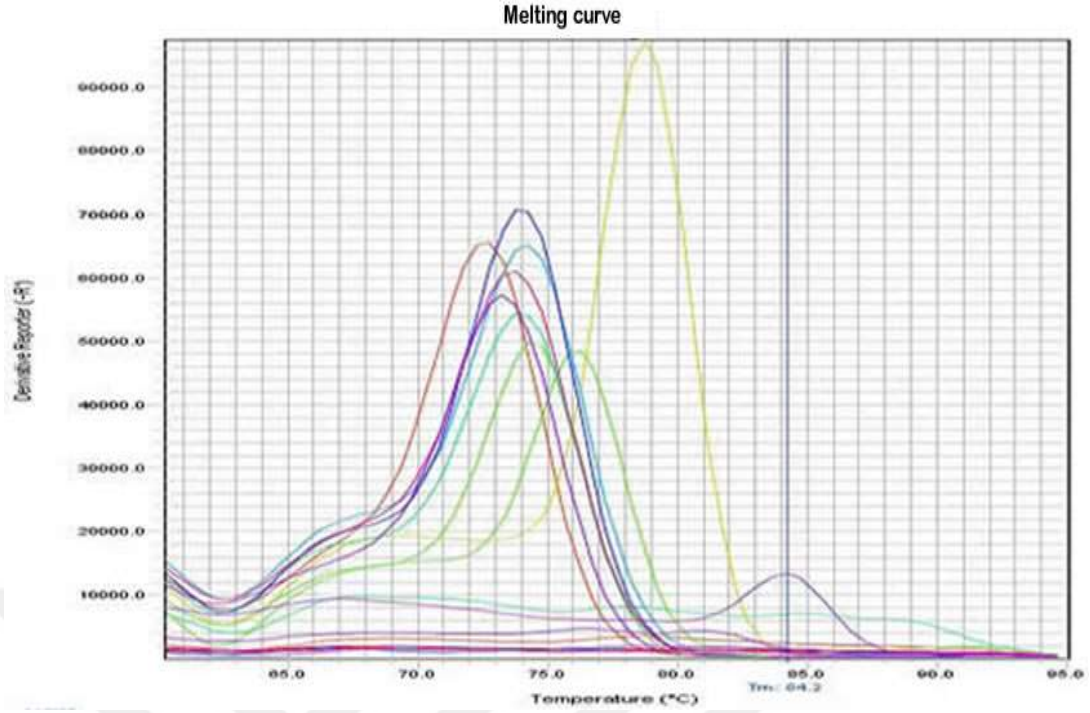
primerinin ve Şekil 5.16.'de  $\beta$ -actin gen primerinin melting curve analiz sonuçları verilmiştir.



Şekil 5.14. ZmGF14-4 gen primerine ait melting curve dimer grafiği



Şekil 5.15. ZmGF14-6 gen primerine ait melting curve dimer grafiği

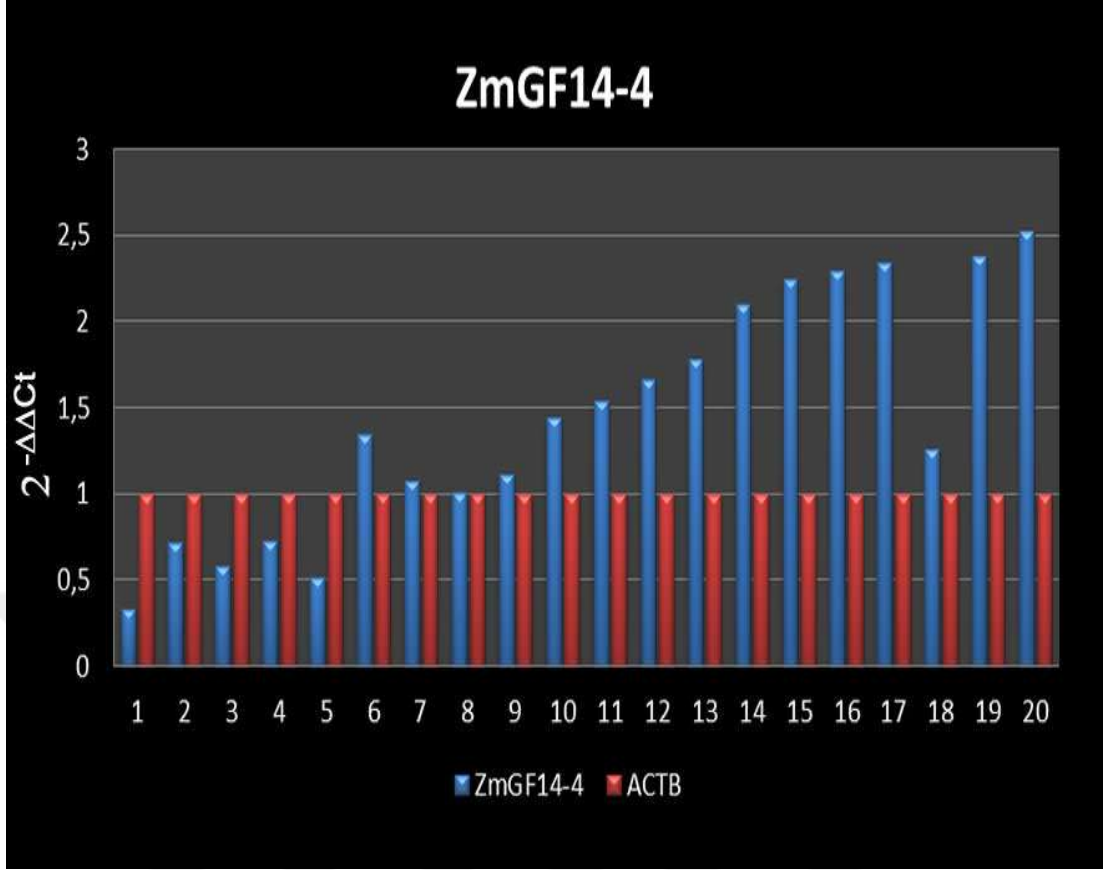


**Şekil 5.16.**  $\beta$ -actin gen primerine ait melting curve dimer grafiği

Gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı analizi için mısır örneklerinin eşik döngü (Ct) değerleri tespit edilmiştir. Deney gurubu örneklerin ZmGf14-4 primerinden elde edilen Ct değeri 23,14 ile 29,7 aralığında değişkenlik gösterdiği, kontrol örneğinin Ct değerinin ise 23,82 olduğu tespit edilmiştir.

Deney gurubu örneklerin  $\beta$ -actin primerinden elde edilen Ct değerlerinin 28,19 ile 29,2 arasında değişkenlik gösterdiği, kontrol gurubu örneğinin Ct değerinin ise 27,61 olduğu tespit edilmiştir. Primerlerin RT-PCR tekniği ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak örneklerin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen ekspresyon düzeyleri Şekil 5.17.'de verilmiştir.

Mısır ZmGf14-4 ve  $\beta$ -actin primerinin Ct değerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerinin 0,334 ile 2,531 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Marker olarak kullanılan  $\beta$ -actin ve ZmGf14-4 gen primerine ait  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri karşılaştırması yapılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ağır metal kaynağına en yakın beş mısır örneğinin ZmGf14-4 gen ekspresyon düzeyinin  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyinin altında kaldığı tespit edilmiştir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak altıncı noktadaki örneklerden itibaren yirminci noktaya kadarki örneklerin tamamında ZmGf14-4 gen ekspresyon düzeyinin  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyine eşit veya daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

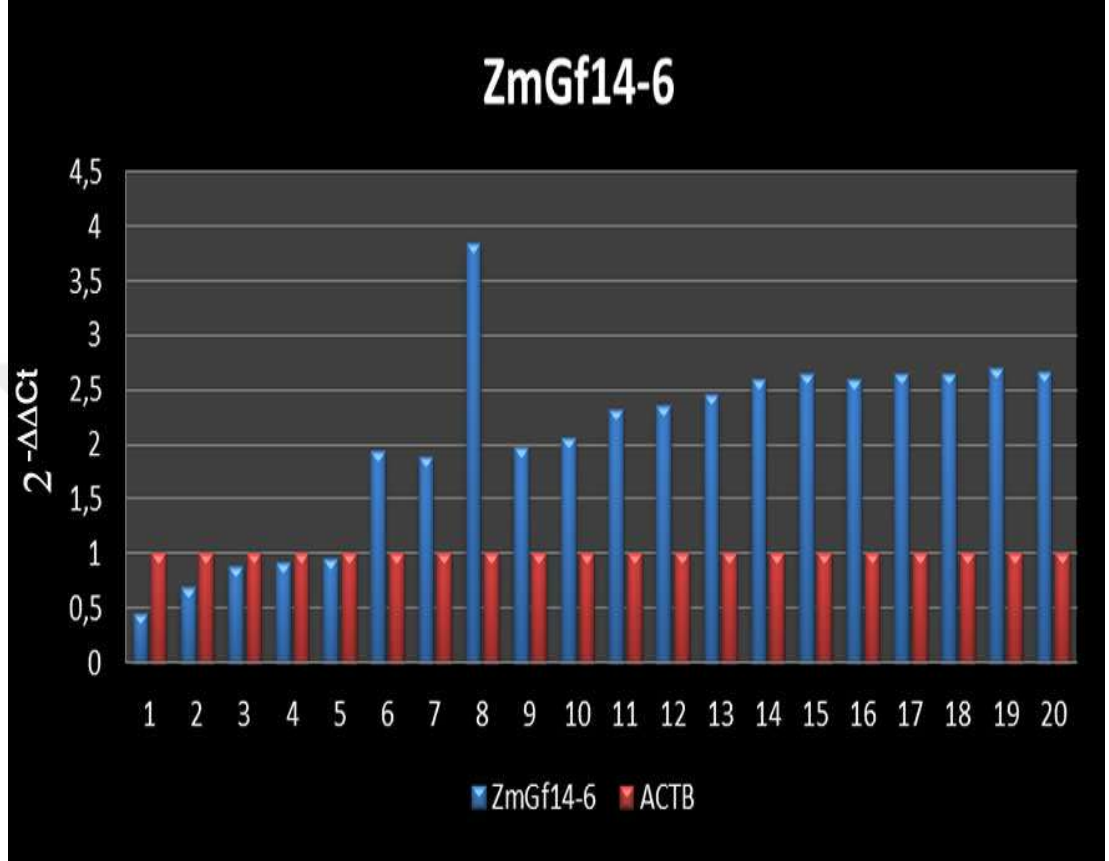


Şekil 5.17. ZmGf14-4 ve β-actin gen primerlerinden elde edilen 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerleri

Mısır bitkisi deney gurubu örneklerinin RT-PCR analizi ile ZmGf14-6 primerinden elde edilen Ct değeri 28,13 ile 29,16 aralığında değişkenlik gösterdiği, kontrol örneğinin Ct değerinin ise 29,36 olduğu tespit edilmiştir. Deney gurubu örneklerin β-actin primerinden elde edilen Ct değerlerinin 26,9 ile 27,45 arasında değişkenlik gösterdiği, kontrol gurubu örneğin Ct değerinin ise 27,59 olduğu tespit edilmiştir. Bu Ct değerleri kullanılarak örneklerin 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen ekspresyon düzeyleri Şekil 5.18.'de verilmiştir.

Mısır ZmGf14-6 ve β-actin primerinin Ct değerlerinden elde edilen 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerlerinin 0,456 ile 3,837 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Marker olarak kullanılan β-actin ve ZmGf14-6 gen primerine ait 2<sup>-ΔΔCt</sup> değerinin karşılaştırması yapılarak gen ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. Bu karşılaştırma sonucunda ağır metal kaynağına en yakın beş mısır örneğinin ZmGf14-6 gen ekspresyon düzeyinin β-actin gen ekspresyon düzeyinin altında kaldığı tespit edilmiştir.

Ağır metal kaynağına yakınlık olarak altıncı noktadaki örneklerden itibaren yirminci noktaya kadarki örneklerin tamamında ZmGf14-6 gen ekspresyon düzeyinin  $\beta$ -actin gen ekspresyon düzeyine eşit veya daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.18. ZmGf14-6 ve  $\beta$ -actin gen primerlerinden elde edilen  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerleri

#### 5.1.5. Buğday ve mısır örneklerinin ICP-MS, IRAP, RAPD ve gen ifadesi analizlerinden elde edilen sonuçların kombinasyonları

Ağır metal maruziyeti ile yetiştirilen ekmeçlik buğday örneklerinden elde edilen gen ekspresyon düzeyi değerleri, ICP-MS analizi ile elde edilen ağır metal türleri ile IRAP ve RAPD moleküler yöntemleri ile elde edilen DNA hasarının boyutunu, tamir mekanizmalarında meydana gelen aksaklıkların göstergesi olan polimorfizm oranları ve GTS değerleri Tablo 5.7.'de birlikte verilmiştir.

**Tablo 5.7.** Ekmeklik buğday örneklerinden elde edilen gen ekspresyon düzeyi, ICP-MS analizi, IRAP ve RAPD sonuçları

Ö R N E K	Buğday Veri Kombinasyonu								Yapısındaki Ağır							
	IRAP		RAPD		Gen İfadesi				Metaller							
	Pol. Değ. (%)	GTS Değ. (%)	Pol. Değ. (%)	GTS Değ. (%)	Ta14S1		Ta14S2		C	M	F	N	C	Z	C	P
					2 <sup>-ΔΔct</sup> Değ.	Eks. Düz.	2 <sup>-ΔΔct</sup> Değ.	Eks. Düz.								
1	52,17	47,83	55,88	44,12	0,673	Düşük	0,176	Düşük	+	+	+	+	+	+	+	+
2	43,47	56,53	52,94	47,06	0,986	Düşük	0,726	Düşük	+	-	+	+	+	+	+	+
3	43,47	56,53	50,00	50,00	0,926	Düşük	0,784	Düşük	+	-	+	+	+	+	+	+
4	39,13	60,87	41,17	58,83	0,946	Düşük	0,933	Düşük	+	-	+	+	+	+	-	+
5	39,13	60,87	41,17	58,83	0,986	Düşük	0,840	Düşük	+	-	-	+	+	+	-	+
6	26,08	73,92	29,41	70,59	1,283	Yüksek	1,693	Yüksek	+	-	-	+	+	+	-	+
7	17,39	82,61	20,58	79,42	1,729	Yüksek	1,635	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
8	17,39	82,61	14,70	85,30	1,945	Yüksek	1,705	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
9	8,69	91,31	5,88	94,12	1,905	Yüksek	1,815	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
10	8,69	91,31	5,88	94,12	1,931	Yüksek	1,905	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
11	0,00	100	2,94	97,06	1,681	Yüksek	1,765	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	-
12	0,00	100	0,00	100	2,265	Yüksek	1,905	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	-
13	0,00	100	0,00	100	2,394	Yüksek	1,918	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,00	100	0,00	100	2,378	Yüksek	2,056	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,00	100	0,00	100	2,313	Yüksek	2,027	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0,00	100	0,00	100	2,329	Yüksek	2,297	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,00	100	0,00	100	2,143	Yüksek	2,394	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0,00	100	0,00	100	2,329	Yüksek	2,462	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0,00	100	0,00	100	2,411	Yüksek	2,428	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0,00	100	0,00	100	2,479	Yüksek	2,496	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 5.8’ de mısır örneklerinden elde edilen gen ekspresyon düzeyi, ICP-MS analiz sonuçları, IRAP ve RAPD analiz sonuçları birlikte verilmiştir.

**Tablo 5.8.** Mısır örneklerinden elde edilen gen ekspresyon düzeyi, ICP-MS analizi, IRAP ve RAPD sonuçları

Ö R N E K	Mısır Veri Kombinasyonu								Yapısındaki Ağır Metaller							
	IRAP		RAPD		Gen İfadesi											
	Pol. Değ. (%)	GTS Değ. (%)	Pol. Değ. (%)	GTS Değ. (%)	Ta14S1		Ta14S2		C	M	F	N	C	Z	C	P
					2 <sup>-ΔΔct</sup> Değ.	Eks. Düz.	2 <sup>-ΔΔct</sup> Değ.	Eks. Düz.								
1	52,17	47,83	55,88	44,12	0,334	Düşük	0,176	Düşük	+	+	+	+	+	+	+	+
2	43,47	56,53	52,94	47,06	0,716	Düşük	0,726	Düşük	+	-	+	+	+	+	+	+
3	43,47	56,53	50,00	50,00	0,582	Düşük	0,784	Düşük	+	-	+	+	+	+	+	+
4	39,13	60,87	41,17	58,83	0,726	Düşük	0,933	Düşük	+	-	+	+	+	+	-	+
5	39,13	60,87	41,17	58,83	0,517	Düşük	0,840	Düşük	+	-	-	+	+	+	-	+
6	26,08	73,92	29,41	70,59	1,347	Yüksek	1,693	Yüksek	+	-	-	+	+	+	-	+
7	17,39	82,61	20,58	79,42	1,729	Yüksek	1,635	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
8	17,39	82,61	14,70	85,30	1,945	Yüksek	1,705	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
9	8,69	91,31	5,88	94,12	1,905	Yüksek	1,815	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
10	8,69	91,31	5,88	94,12	1,931	Yüksek	1,905	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	+
11	0,00	100	2,94	97,06	1,681	Yüksek	1,765	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	-
12	0,00	100	0,00	100	2,265	Yüksek	1,905	Yüksek	-	-	-	+	+	+	-	-
13	0,00	100	0,00	100	2,394	Yüksek	1,918	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,00	100	0,00	100	2,099	Yüksek	2,602	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,00	100	0,00	100	2,250	Yüksek	2,657	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0,00	100	0,00	100	2,297	Yüksek	2,602	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,00	100	0,00	100	2,345	Yüksek	2,657	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0,00	100	0,00	100	1,257	Yüksek	2,657	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0,00	100	0,00	100	2,378	Yüksek	2,694	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0,00	100	0,00	100	2,531	Yüksek	2,675	Yüksek	-	-	-	-	-	-	-	-

## 5.2. Tartışma

Ağır metallerin varlığı doğal yollardan veya insan eylemlerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Dünya nüfusundaki artış ile doğru orantılı olarak araç trafiğindeki yoğunluk, endüstriyel üretim, sanayileşme ve enerji ihtiyacı her geçen gün artmaktadır (Grigoratos vd., 2014). Bu ihtiyacın karşılanabilmesi için yapılan faaliyetler neticesinde ortaya çıkan ağır metal kirliliği, çevremizdeki en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir (Sawidis vd., 2011). Sanayi devriminden bu yana, ağır metallerin miktarı ve çeşiti giderek artmış ve zamanla organizmalar için toksik etkiye neden olan değerlere ulaşmıştır (Toxic Substances and Disease Registry, 2007; Nagajyoti vd., 2010). Topraktaki ağır metal kontaminasyonu, tarım ilaçları, maden kaynaklarının işlenmesi, kömür gibi fosil kaynaklarının yakılması, pil atıkları ve kirliliğe maruz kalmış akarsular ile sulama gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır (Vousta vd., 1996; Sharma vd., 2007; Qishlaqi vd., 2008; Zhang vd., 2013).

Önceki çalışmalarda ağır metallerin, DNA hasarını arttırdığı, serbest radikal üretimini arttırmasından dolayı nokta mutasyonlarına, canlılarda oksidatif strese ve zincir kırılmalarına neden olduğu tespit edilmiştir (Costa vd., 1994; Koppen ve Verschaeve, 1996; Liu ve Dixon, 1996; Ariza ve Williams, 1999; Kovalchuk vd., 2001; Bal ve Kasprzak, 2002; Cenkçi vd., 2009). Bitkilerde ağır metallerin neden olduğu genotoksik etki ile oluşan DNA hasarının boyutunun tespitinde kromozom sapmaları (Souguir vd., 2008), comet assay (Angelis vd., 2000), mikronükleus testleri (Steinkelln vd., 1998) gibi yöntemlerden faydalanılmıştır. Teknolojik imkanların artması ile daha spesifik ve hassas teknikler kullanılmaya başlanmıştır. MSAP, CRED-RA, SSR, RFLP, AFLP, IRAP, RAPD ve gen ekspresyonu gibi moleküler teknikler bitkilerde ağır metallerin ve diğer organik/inorganik genotoksinlerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde oldukça etkili olarak kullanılmaktadır (Atienzar vd., 1999; Labra vd., 2003; Enan 2006; Liu vd., 2007). Bu teknikler sayesinde artış gösteren reaktif oksijen türlerinin etkileri, tek ve çift zincir kırıkları, gen okuma çerçevesindeki kaymalar, nükleotit anormallik modifikasyonları gibi DNA hasarları tespit edilebilmektedir.

Çalışmamızda termik santrallerden linyit kömürünün yakılması sonucu çevreye yayılan ağır metallerin ekmeklik buğday ve mısır bitkilerinde meydana getirdiği genetik ve

epigenetik değişiklikler RAPD, IRAP ve gen ekspresyon analizleriyle belirlenmiş, ayrıca bitkilerin yapısındaki ağır metaller ile ilgili veriler elde edilmiştir.

RAPD yöntemi moleküler biyoloji alanında ağır metal stresi gibi çevresel etkilerin DNA'da meydana getirdiği değişikliklerin tespit edilmesinde çok sık olarak tercih edilmektedir (Conte vd., 1998; Atienzar vd., 2001; Muller vd., 2004; Lui vd., 2005; Mengoni vd., 2009). RAPD profilinde meydana gelen polimorfizmler nokta mutasyonları, delesyon, insersiyon, genetik ve kromozomal yeniden düzenlemeler gibi genomik DNA zincirinde meydana gelen hasarların bir göstergesi olarak ifade edilir (Atienzar vd., 2002; Wolf vd., 2004). RAPD profillerindeki değişimlerden elde edilen GTS değerindeki azalma ise DNA'daki hasar seviyesi, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmalarında meydana gelen aksaklıklar ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Atienzar vd., 1999, 2000; Liu vd., 2005; Cenkçi vd., 2010).

RAPD tekniği ile yaptığımız analizler sonucunda en yüksek polimorfizm değerlerinin ağır metal kirliliğine neden olan termik santrale en yakın noktalarda yetişen mısır ve ekmeklik buğday fidelerinde tespit edilmiştir. Termik santral ile bitkilerin ekim noktaları arasındaki mesafe arttıkça meydana gelen polimorfizm değerleri de düşüş göstermiştir. Bu durum ağır metal kaynağına yakın noktadaki bitkilerde toksik etkinin dolayısıyla DNA hasarının yüksek olduğunu göstermektedir. Polimorfizm değerleri fazla olan örneklerin ICP-MS sonuçları termik santrale yakın noktalarda yetişen örneklerde ağır metal çeşidi ve miktarının fazlalığını göstermektedir. Ağır metal kaynağından uzaklaştıkça bitki bünyesindeki ağır metal oranı ve çeşidi giderek azalma göstermektedir. Buna bağlı olarak DNA hasarında azalma olmakta bu da düşük polimorfizm değeri ile kendini göstermektedir. Mısır ve ekmeklik buğday örneklerinin yetiştiği nokta ile termik santral arasındaki mesafe arttıkça bitkilerin GTS değerlerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ağır metal stresi azaldıkça yani ağır metal kaynağından uzaklaştıkça DNA hasarında azalma göstermiştir. Yapısında ağır metal tespit edilmeyen veya eser miktarda bulunan örneklerin GTS değerinin %100 olduğu belirlenmiştir.

Mevcut literatür çalışmalarında da RAPD analizleri ile ağır metallerin bitkiler üzerindeki toksik etkisi ve bu etki sonucunda genom profilinde meydana gelen değişimler başarılı şekilde tespit edilmiştir. Aras ve arkadaşları (2010) Kayseri'de yaptıkları çalışmada ağır metal kirliliğine neden olan cam ve çelik fabrikası çevresinde toplanan *Pseudevernia*



*furfuracea* L. örneklerinde DNA hasarı ile DNA profillerinde meydana gelen değişimleri RAPD yöntemiyle tespit etmişlerdir. Cansaran-Duman ve arkadaşları (2011) *Evernia prunastri* liken türünde Karabük Demir Çelik fabrikasından yayılan ağır metallerin DNA üzerindeki etkisini RAPD analizi ile değerlendirmişler ve çalışma sonuçları ağır metal kirliliğinin neden olduğu genotoksik etkinin fabrikaya en yakın noktalarda alınan liken örneklerinde yüksek seviyede olduğunu tespit etmişlerdir. Aslam ve arkadaşları (2014) farklı konsantrasyonda  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 'a maruz bıraktıkları biber (*Capsicum annuum* L.)'de meydana gelen genotoksik etki düzeyini RAPD ile incelemişler ve yüksek düzeyde polimorfizmin tespit edildiğini ifade etmişlerdir. Farklı dozlarda Zn ve Cu ağır metallerine maruz bırakılarak çimlendirilen salatalık (*Cucumis sativus* L.) tohumlarında genotoksik etki düzeyi RAPD ile analiz edilmiş ve bu ağır metallerin fidelerde genetik şablon kararlılığında azalmaya neden olduğu vurgulanmıştır (Soydam Aydın vd, 2012). Başka bir çalışmada ise patlıcan (*Solanum melongena* L.) tohumları Cu ağır metalinin farklı konsantrasyonları ile çimlendirilerek genotoksik etki düzeyi RAPD markırı ile değerlendirilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak oluşan genotoksik etkiye bağlı olarak polimorfizmler tespit edilmiştir (Aksoy Körpe ve Aras, 2011).

Transpozonlar organizmaların genomları içerisinde yer alan, tekrarlı ve hareketli DNA dizileridir. Buldukları konumu değiştirebilme kapasitesine sahip olduklarından dolayı konak organizmayı olumlu veya olumsuz şekillerde etkileyebilmektedirler. Çevresel koşulların değişmesi veya stres faktörleri bu genomik elementlerin aktifliğine etki eden epigenetik yapılanmayı değiştirebilmektedirler (Wessler, 2009).

Transpozonlar, transpozisyonları sonucu genomun birçok farklı bölgelerine insersiyon yapabilmektedirler. Özellikle eksonlara veya gen yakınındaki bölgelere yerleştiklerinde; nokta mutasyonu, çerçeve-kayma mutasyonu, delesyon, duplikasyon, insersiyon gibi birçok mutasyonlara yol açmaktadırlar. Bu mutasyonların sonucunda genlerin okuma çerçevesinde kaymalara, alternatif gen ürünlerinin oluşumuna, gen ürünü proteinlerin sentezlenememesine sebep olabilir. Gen fonksiyonunu, yapısını ve aktivitesini değiştirebilmesinden dolayı genom ve kromozom yapılarının değişmesini de sağlayabilmektedirler (Bennetzen, 2000; Federoff, 2000; Wicker vd., 2007).

Genomun yapısını ve boyutunu etkileme konusunda önemli potansiyele sahip retrotranspozonlara termik santralden yayılan ağır metallerin neden olduğu stres düzeyi

ekmeklik buğday ve mısır örneklerinde IRAP analizleri ile incelenmiştir. Analizlerde kullanılan Sukkula, 3LTR-5, LTR 6150, Nikita E2647-, 5LTR1, LTR 6149-5 LTR retrotranspozonlarının hareketliliğinden kaynaklı olarak DNA zincirinde meydana gelen değişimler ve hasarlar polimorfizmler olarak tespit edilmiştir. Ağır metal kirliliğine neden olan termik santrale yakın noktalarda yetiştirilen ekmeklik buğday ve mısır örneklerinde hasar düzeyinin dolayısıyla polimorfizm değerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Retrotranspozonların bu hareketliliğinin bitkilerde genomik kalıp sabitliğini de olumsuz yönde etkilediği anlaşılmıştır. Çünkü en düşük GTS değerleri termik santrale en yakın örneklerde tespit edilmiştir. Polimorfizm değeri yüksek çıkan örneklerin yapısında daha çok çeşit ve miktarda ağır metal varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bitki bünyesine alınan ağır metallerin miktar ve çeşitindeki artış ile retrotranspozon hareketliliğindeki artışın doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Retrotranspozonların bu hareketliliği primer bağlanma noktalarını ve genom profilindeki meydana gelen değişimler DNA zincirinde değişimi etkilemiş olabilir.

Retrotranspozon hareketlilik düzeyinin araştırılması amacıyla farklı stress koşulları altında farklı metabolizmalarda IRAP analizi ile yapılmış literatür çalışmaları mevcuttur (Alavi-Kia vd., 2008; Belyayev vd., 2010; Carvalho vd., 2010; Bayram vd., 2012; Hamad-Mecbur vd., 2012; Temel ve Gözükırmızı, 2013). Tuz stresinin buğday (*Triticum aestivum* L.) üzerinde retrotranspozon hareketliliğine etkisinin incelendiği çalışmada uygulanan farklı tuz konsantrasyonuna bağlı olarak retrotranspozon hareketinin arttığı ve buna bağlı olarak GTS oranının azaldığı gözlenmiştir (Yağcı, 2015). Farklı dozlardaki Mn ağır metalinin mısır (*Zea mays* L.) üzerinde meydana getirdiği genotoksik etki IRAP tekniği ile analiz edilmiş ve değişen oranlarda polimorfizmler tespit edilmiştir. Ayrıca Mn doz artışına bağlı olarak GTS değerlerinde düşüş meydana geldiği vurgulanmıştır (Yiğider vd, 2016).

Ağır metallerin ekmeklik buğday ve mısır bitkileri üzerindeki genotoksik etkileri sonucunda genom şablonunda meydana gelen farklılaşma RAPD ve IRAP analizleri ile tespit edilmiş olup, bu durum polimorfizmler ve GTS değişimleri ile kendini göstermiştir.

Ağır metal stresinin gen ekspresyonu, DNA metilasyonu ve histonlardaki modifikasyonlar gibi kromatin yapısında meydana gelen epigenetik değişikliklerle bitkileri etkilediği bilinmektedir (Labra vd., 2002; Grativol vd., 2012). Çevresel stres

etmenleri tüm genomda özellikle sitozin metilasyonunda önemli değişikliklere neden olmaktadır. Sitozin metilasyonu hem transkripsiyonel hem de postranskripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Labra vd., 2002; Filek vd., 2008; Peng ve Zhang, 2009). Ağır metallerin neden olduğu DNA hasarından dolayı transkripsiyon ve translasyonun etkilendiği yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Zhu vd., 2014; Nicosia vd., 2015; Sheshadri vd., 2015). Bitkilerdeki ağır metal maruziyetinin en yaygın stres sonuçlarından birisinin ROS'un üretimi olduğu bilinmektedir (Choudhury vd., 2016). Oksidatif stres proteinlerin yapısında bozulmaya ve DNA hasarına yol açarken ( Malar vd., 2014a, 2014b; Manikandan vd., 2015, 2016), aynı zamanda DNA tamir sistemini inhibe edebilmektedir (Kumar vd., 2012).

Bitkilerin etkin direnci stresle ilişkili genlerin indüksiyonuna ve proteinlerin savunma rolleri ile sentezlenmesine bağlıdır (Vinocur ve Altman, 2005). Bitkiler kuraklık, tuzluluk, olumsuz sıcaklık, ağır metal toksisitesi, besin yetersizliği gibi çeşitli abiyotik ve biyotik stresleri algılama ve bunlara cevap vermek için karmaşık mekanizmalar geliştirmişlerdir (Campo vd., 2012; Zwack ve Rashotte, 2015). 14-3-3 protein grubu bitki gelişimi ve metabolizmasını kontrol etmenin yanında (Obidiegwu, 2015), bitki hücrelerinin biyotik ve abiyotik streslerden koruyan moleküler ağlara karıştığı ve bitki savunma yanıtında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Chelysheva vd., 1999; Roberts vd., 2002; Chen vd., 2006; Denison vd., 2011).

Bitki gelişimi ve savunması için önemli role sahip bu protein gurubunun ağır metal stresi altındaki ekmeklik buğday ve mısır bitkilerindeki gen ekspresyon düzeyleri tespit edilerek, ağır metallerin neden olduğu stresin boyutu analiz edilmiştir. Bunun için örneklerden elde edilen eşik döngü değeri kullanılarak gen ifade düzeyinin hesaplanmasında etkili bir parametre olan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerini hesaplanmıştır. Ağır metale maruz bırakılarak yetiştirilen örnekler ile kontrol gurubu örneklerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri  $\beta$ -actin geni ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları ağır metal kirliliğinin yoğun olduğu noktalarda yetişen bitkilerin stres etkisi ile gen ifade düzeylerinin değiştiği sonucunu vermektedir. Özellikle ağır metal kirliliğine yol açan termik santrale yakın noktalarda yetiştirilen bitkilerin gen ekspresyonunun  $\beta$ -actin geni ekspresyonundan düşük kaldığı tespit edilmiştir. Ancak bitkinin yetiştiği nokta ile termik

santral arasındaki mesafe arttıkça ekspresyon düzeyi  $\beta$ -actin geninin ekspresyon düzeyine eşit veya daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ağır metallerin bitkilerde gen ekspresyonuna etkisinin tespiti için farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin Xie ve arkadaşları (2017) *Coprinus atramentarius* üzerinde yaptıkları çalışmada 14-3-3 gen ekspresyon düzeyinin Cd yoğunluğuna bağlı olduğunu ve Cd maruziyeti ile 14-3-3 transkripsiyonel regülasyonu arasında bir korelasyon bulunduğunu ifade etmişlerdir. Owen ve arkadaşları (2012) farklı dozlarda Cu'a maruz kalan deniz yosunlarında hızlı bir 14-3-3 indüksiyonu olduğu saptamış, ayrıca 14-3-3'lerin Cu toleransında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Hall ve Williams, 2003; Chen vd., 2015). 14-3-3 transkripsiyonel regülasyonunda Cu'nun rolünün tespiti için yapılan çalışmada patates (*Solanum tuberosum*)'te farklı yoğunluklara bağlı olarak gen ekspresyon seviyelerinde değişimin söz konusu olduğu vurgulanmıştır (Aksamit vd., 2005). Pb ağır metal stresine maruz bırakılan *Coprinus atramentarius* 'da üzerinde 14-3-3 proteini ekspresyonunda yüksek miktarda artış tespit edilmiştir (Wei vd., 2016).

Elde ettiğimiz bulgular ağır metal stresinin bitki savunma mekanizmasını oluşturan 14-3-3 protein ailesinin ekspresyon seviyesini arttırdığını göstermektedir. Ancak aşırı yoğunluktaki ağır metal ve/veya türünün varlığı gen ekspresyonunu baskılamış olabilir. Nitekim, Owen vd. (2012), bitki bünyesindeki engellenemeyen Cu artışının, geri dönüşümsüz DNA hasarı oluşturduğunu ve 14-3-3 ekspresyon seviyesini etkilediğini vurgulamışlardır. Çalışmamızın aksine, literatür çalışmalarında metabolizmaların stres koşullarına maruz kaldıklarında 14-3-3 proteinlerinin gen indüksiyonundaki artış belirtilmiştir (Pozuelo-Rubio, 2012). Bazı araştırmacılar, 14-3-3'ün V-ATPaz'ın veya plazma membranı H<sup>+</sup>-ATPase ile etkileşime girdiğini (Chen vd., 2015) ve böylece 14-3-3 proteinlerinin ağır metal toleransında önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir (Hall ve Williams, 2003; Chen vd., 2015).

Çalışmamızda ağır metallerin neden olduğu abiyotik stresin bitkilerde meydana getirdiği DNA hasarı, retrotranspozon hareketliliği ve gen ekspresyonunda oluşan değişiklikler moleküler markırlar ile değerlendirilmiştir.

Bulgularımız ağır metallerin ekmeçlik buğday ve mısır tahıllarında neden olduğu stresin LTR retrotranspozonların mobilizasyonunu indüklediğini göstermiştir. LTR

retrotranspozonların hareketliliği neticesinde genomun okuma bölgelerindeki farklılaşmanın gen ekspresyonunu, genomik stabiliteyi etkilediği anlaşılmıştır. Ancak retrotranspozonların hareket boyutu ile gen ekspresyon düzeyi arasında doğru orantı söz konusu değildir. Bu durum muhtemelen metabolizmaların belirli orandaki genomik farklılaşmayı tolere edebilmelerinin sonucudur. Ayrıca tüm retrotranspozon hareketliliğinin genomdaki heterokromatin bölgede meydana gelmediğini işaret etmektedir. Gen ekspresyonu ile retrotranspozonlar arasındaki ilişkinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması, stres koşulları altındaki bitkilerin uyum gücünün aydınlatılmasına ve stres durumlarında oluşturdukları tepkilerinin anlaşılmasında önemli bir rol oynayacaktır.

Çalışmamızda termik santral çevresinde yetiştirilen tahıllarda bulunan ağır metallerin genotoksik etkilerine odaklanılmış olsada termik santrallerden sadece ağır metal atılımı söz konusu değildir. Termik santrallerden kömür yakılması sonucu önemli miktarda karbondioksit (CO<sub>2</sub>), karbonmonoksit (CO), azot oksitler (NO<sub>x</sub>), uçucu organik bileşikler, kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>), metan (CH<sub>4</sub>) gibi gazlar ve partikül maddelerde yayılmaktadır (Kır, 2008). Bu etkenlerin çalışmamızın sonuçlarını etkilemesi muhtemeldir. Bundan dolayı bu etkenlerin etki düzeylerinin tespiti önemli bir çalışma konusunu oluşturmaktadır.

Araştırmamızda kullandığımız RAPD, IRAP ve RT-PCR analizlerinin ağır metallerin neden olduğu stresin düzeyini ve genomda meydana gelen hasar boyutunun tespitinde kullanışlı birer teknik oldukları ifade edilebilir.

## 6. ÖNERİLER

Ağır metallerin genotoksik etkisi üzerine yapılan çalışmalar genellikle ağır metallerin tek tek ve farklı dozlarda uygulanması prensibine dayanmaktadır. Ancak ağır metallerin doğaya salınmasına neden olan faktörler incelendiğinde aynı anda birden fazla ağır metalin birlikte hareket ederek doğaya karıştığı görülmektedir. Bu nedenle canlılar yalnızca tek bir metale değil aynı anda birden fazla metale maruz kalır. Bundan dolayı aynı kaynaktan yayılan ağır metallerin etkisinin birlikte incelenmesi daha uygun olacaktır.

Günümüzde sürekli teknolojik gelişmeler yaşanmakta bu durumda enerji talebini doğrudan etkilemektedir. Enerji ihtiyacının karşılanmasında kullanılan linyit kömürü bakımından ülkemiz zengin kaynaklara sahiptir. Ağır metal kirliliğine neden olan termik santral ve diğer tüm sanayi kuruluşlarının çevresinde akümülatör bitkiler ile zenginleştirilmesi ağır metal kirliliğini azaltacağı kanaatini taşımaktayız.

Ağır metallerin bitkilerde genotoksik etki yaptığı literatürde belirtilmiş, çalışmamızda da tespit edilmiştir. Bu durum göz önüne alınacak olursa yoğun biçimde ağır metal kirliliğine neden olan tesislerin çevresine ağır metal toleransı yüksek tahıl türlerinin tespit edilerek, bu türlerin ekilmesinin daha uygun olacağı kanaatini taşımaktayız.

## KAYNAKLAR

- Ak, A. (2011) ‘‘Buğday çeşitlerinde ağır metal stresinin hücre bölünmesi ve antioksidan enzim seviyeleri üzerine ekotoksikolojik etkileri’’, Yayınlanmamış Doktora Tezi, *Anadolu üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir,73-79.
- Akinboro, A. and Bakare, A.A. (2007) ‘‘Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn’’, *Journal of Ethnopharmacology*, 112 (3), 470-475.
- Aksamit, A., Korobczak, A., Skala, J., Lukaszewicz, M., Szopa, J. (2005) ‘‘The 14-3-3 Gene Expression Specificity in Response to Stress is Promoter-Dependent’’, *Plant and Cell Physiology*, 46 (10), 1635-1645.
- Aksoy, D. ve Aras, S. (2009) ‘‘Evaluation of copper-induced stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at the molecular and population levels by use of various biomarkers’’, *Mutation Research*, DOI: 10.1016/j.mrgentox. 2010.10.003.
- Aksoy, D. (2009) ‘‘Patlıcan (*Solanum melongena*) Tohumlarında Bakır (Cu) Stresi İle Oluşan Dna Değişikliklerinin Belirlenmesi’’, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 43-51.
- Aksoy, A. (1995) ‘‘Kayseri-Kırşehir Karayolu Kenarında Yetişen Bitkilerde Ağır Metal Kirlenmesi’’, *II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Programı*, Kayseri.
- Alavi-Kia, S.S., Mohammadi, S.A., Harizad, S.A., Oghaddam, M.M. (2008) ‘‘Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in Crocus genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism’’, *Biotechnology*, Biotechnological Equipment 22, 795-800.
- Alzohairy, A. M., Gyulai, G., Ramadan, M.F., Edris, S., Sabir, J.S.M., Jansen, R.K., Bahieldin, A. (2014) ‘‘Retrotransposon-based molecular markers for assessment of genomic diversity’’, *Functional Plant Biology*, 41 (8), 781-788.
- Amuruganathan, K. and Earle, E.D. (1991) ‘‘Nuclear DNA content of some important plant species’’, *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 208-218.
- Angelis, K.J., Monika, M., Merten, M. and Ingo, S. (2000) ‘‘Adaptation to Alkylation Damage in DNA Measured by the Comet Assay’’ *Environmental and Molecular Mutagenesis* 36, 146-150.
- Aras, S., Kanlıtepe, C., Cansaran-Duman, D., Halıcı, M.G. and Beyaztaş, T. (2010) ‘‘Assessment of air pollution genotoxicity by molecular markers in the exposed samples of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in the province of Kayseri (Central Anatolia)’’ *Journal of Environmental Monitoring*, 12 (2), 536-543.

- Ariza, M.E., Williams, M.V. (1999) "Lead and mercury mutagenesis: type of mutation dependent upon metal concentration", *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 13(2), 107-112.
- Arya, M., Iqbal, S.S., Magali, W., Lyndon, G., Neehar, A. and Hitendra, R.H. P. (2005) "Basic principles of real-time quantitative PCR", *Expert Review of Molecular Diagnostic*, 5 (2), 209-219.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007) "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance", *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
- Aslam Rumana, M.Y.K., Ansari, S., Choudhary, T., Mohsin, B., Nusrat, J. (2014) "Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annuum* L. – An important spice crop of India", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21 (5), 465-472.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N. and Depledge, M.H. (1999) "Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene" *Environmental Toxicology Chemster*, 18, 2275-2282.
- Atienzar, F., Cordi, B. and Donkin, M.E. (2000) "Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palnaria palnata*", *Aquatic Toxicology*, 50, 1-12.
- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N. and Depledge, M.H. (2001) "Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia manga*", *Toxicology Sciencess*, 59, 241-250.
- Atienzar, F.A., Billinghamurst, Z. and Depledge, M.H. (2002) "4-*n*-Nonylphenol and estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae", *Environ. Pollut*, 120, 735-738.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry) (2007) "*Toxicological Profile for Lead U.S. department of health and human services*", Atlanta, Georgia.
- Bal, W., Kasprzak, K.S. (2002) "Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals", *Toxicol Letter*, 127(1-3), 55-62.
- Banks, J.A., Masson, P. and Fedoroff, N. (1988) "Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize supressor-mutator transposable element", *Genes and Development*, 2, 1364-1380.
- Bayar, E. (2009) "Erzurum Şehir Merkezindeki Bazı Kavşaklarda Bitki (*Sarıçam*, *Pinus sylvestris* L. var. *hamata* Steven) ve Toprakların Ağır Metal (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd,



Pb ve Ni ) Kontaminasyon Durumunun Belirlenmesi” Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 29-59.

- Bennett M.D., Smith J.B. (1976) “Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London”, *Biological Sciences*, 274, 227-274.
- Bennetzen, J.L. and Wang, H. (2014) “The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes”, *Annu Revive Plant Biology*, 65, 505-530.
- Bennetzen, J.L. (2000) “Transposable elements contributions to plant gene and genome evolution”, *Plant Molecular Biology*, 42, 251-269.
- Bennetzen, J.L. (1996) “The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution”, *Trends in Microbiology*, 4(9), 347-353.
- Berdushev, G.D., Korotaev, G.K., Boyarskikh, G.V., Vanyushin, B.F. (1967) “Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of Pink Salmon and its changes in the course of spawning”, *Biokhimiya*, 32, 988-993.
- Biemont, C. and Vieira, C. (2006) “Genetics: Junk DNA as an evolutionary force”, *Nature*, 443 (7111), 521-524.
- Bird, A. (2002) “DNA methylation patterns and epigenetic memory”, *Genes and Development*, 16, 6-21.
- Boer de, A.H., Van Kleeff, P.J., Gao, J. (2013) “Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation”, *Protoplasma*, 250, 425-440.
- Bora, G. ve Yurter, H.E. (2007) “Epigenetik Hastalıklar ve Tedavi Yaklaşımları”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 48-54.
- Bowen, N.J. and Jordan, K.I. (2002) “Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity”, *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 65-76.
- Bozyel, M.E. (2011) “Termik santral toz atığının mısır (*Zea mays* L.) büyümesi üzerine etkisinin anatomik olarak incelenmesi”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çanakkale, 63-69.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Hall, N. (2012) “Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing”, *Nature*, 491, 705-710.
- Briggle, L.W., Cox, E.L. and Hayes, R.M. (1967) “Performance of a spring wheat hybrid, F2, F3, and parent varieties at five population levels”, *Crop Sciences*, 7, 465-470.

- Brink, R.A., Styles, E.D., Axtell, J.D. (1968) “Paramutation: directed genetic change. Paramutation occurs in somatic cells and heritably alters the functional state of a locus”, *Science*; 159,161-70.
- Burak Batir, M., Candan, F., Büyük, İ. (2016) “Determination of the DNA changes in the artichoke seedlings (*Cynara scolymus* L.) subjected to lead and copper stresses”, *Plant Soil Environmental*, 62 (3), 143-149.
- Cai, Q., Guy, C.L., Moore, G.A. (1996) “Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of Citrus”, *Genome*, 39, 235-242.
- Campbell, N.A. and Reece, J.B. (2014) “Campbell Biology 10th ed”, Unit 3:21, 436-461 Pearson Benjamin Cummings, 1301 Sansome St., San Francisco, CA 94111.
- Campo, M.T., Fouad, H., Solís-Bravo, M.M., Sánchez-Uriz, M.A., Mahillo-Fernández, I., Esteban, J. (2012) “Cost-effectiveness of different screening strategies (single or dual) for the diagnosis of tuberculosis infection in healthcare workers”, *Infect Control Hosp Epidemiology*, 33(12), 1226-1234.
- Can Alas, M. (2017) “Normal ve hidrate olmuş uçucu kül atığından yığma yapı blokları üretimi”, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, *Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Şanlıurfa, 18-19.
- Cansaran-Duman, D., Beyaztaş, T., Atakol, O., Aras, S. (2011) “Assesment of the air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. Province of Iron-Steel Factory in Karabük, Turkey”, *Journal Environmental Sciences*, 23(7), 1171-1178.
- Cavalli, G. and Paro, R. (1999) “Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator”, *Science*, 286, 955-968.
- Castrillo, G., Sánchez-Bermejo, E., de Lorenzo, L., Crevillén, P., Fraile-Escanciano, A., Tc, M., Mouriz, A., Catarecha, P., Sobrino-Plata, J., Olsson, S., Leo Del Puerto, Y., Mateos, I., Rojo, E., Hernández, L.E., Jarillo, J.A., Piñeiro, M., Paz-Ares, J., Leyva, A. (2006) “WRKY6 Transcription Factor Restricts Arsenate Uptake and Transposon Activation in *Arabidopsis*”, *The Plant Cell*, DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114009>.
- Cenkci, S., Yildiz, M., Ciğerci, I.H., Konuk, M., Bozdağ, A. (2009) “Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings”, *Chemosphere*, 76, 900-906.
- Cenkci, S., Ciğerci, G.H., Yıldız, M., Ozay, C., Bozdağ, A., Terzi, H. (2010) “Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L.”, *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 467-473.
- Chan, M.A., Rebecca, S.M.C., David, R., Underwood, E.C., Daily, G.C. (2006) “Conservation Planning for Ecosystem Services”, *Plos Biology*, doi.org/10.1371/journal.pbio. 0040379.

- Chelysheva, V.V., Smolenskaya, I.N., Trofimova, M.C., Babakov, A.V., Muromtsev, G.S. (1999) “Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress”, *FEBS Letters*, 456, 22-26.
- Chen, J., Li, X., Wang, D., Li, L., Zhou, H., Liu, Z., Wu, J., Wang, P., Jiang, X., Fabrice, M.R., Zhang, S., Wu, J. (2015) “Identification and testing of reference genes for gene expression analysis in pollen of *Pyrus bretschneideri*”, *Scientia Horticulturae*, 190:43–56.
- Chen, Y., Mo, H.Z., Zheng, M.Y., Xian, M., Qi, Z.Q., Li, Y.Q., Hu, L.B., Chen, J., Yang, L.F. (2014) “Selenium inhibits root elongation by repressing the generation of endogenous hydrogen sulfide in *Brassica rapa*”, *Plos one***9**, e110904 10.1371/journal.pone.0110904.
- Chen, F., Li, Q., Sun, L., He, Z. (2006) “The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress”, *DNA Research*, 13, 53-63.
- Chomet, P.S., Wessler, S., Dellaporta, S.L. (1987) “Inactivation of the maize transposable element *Activator(Ac)* is associated with its DNA modification”, *The EMBO Journal*, 6 (2), 295-302.
- Chong, S. and Whitelaw, E. (2004) “Epigenetic germline inheritance”, *Genetic Development*, 14, 692-706.
- Choudhury Feroza, K., Rivero, R. M., Blumwald, E., Mittler, R. (2016) “Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination”, *The Plant Journal*, DOI: 10.1111/tbj.13299.
- Cohen, R.A., Patel, A., Green, F.H. (2008) “Lung disease caused by exposure to coalmine and silica dust”, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 29, 651–661. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1101275>.
- Constantine, D.S., Constantina, I.C. and George, A.P. (2004) “Enrichment of PAHs and heavy metals in soils in the vicinity of the lignitr-fired power plants of West Macedonia(Greece)”, *The Science of the Total Environment*, 204, 135-146.
- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regna, G., Maestri, E. and Marmiroli, N. (1998) “DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of the heavy metals pollution”, *Chemosphere*, 37 (14-15), 2739-2749.
- Costa, M.R., Wilson, E.T., Wieschaus, E. (1994) “A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation”, *Cell*, 76 (6), 1075-1089.
- Cui, J. and Holmes, E.C. (2011) “Endogenous RNA Viruses of Plants in Insect Genomes”, *Virology*, 427, 77-79.

- Çam, N.F., Yaprak, G., Gür, F., Candan, O., Bayram, A., Onat, B., Tanıl, H., Mert, A. (2006) "Batı Anadolu'daki Termik Santraller Çevresindeki Doğal Radyonüklid (226Ra, 232Th, 40K ve 210Pb) Emisyonundan Kaynaklanan Radyoaktif Kirliliğin İncelenmesi ve Radyolojik Risk Tahmini ", *Tübitak, Çaydag* 103Y057.
- Çelik, M., Donbak Ünal, F., Yüzbasıoğlu, D., Aksoy, H., Yılmaz, S. (2007) "Cyto genetic Damage in Workers From a Coal-Fired Power Plant", *Mutation Research*, 627, 158-163.
- ÇŞB (2016) Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2872 sayılı Çevre Kanunu - Mevzuat Bilgi Sistemi, [www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.5.2872.doc](http://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.5.2872.doc) Son Erişim Tarihi 12.08.2017.
- Dalyan, E. (2012) "Brassica Juncea Var. P78 Bitkisine Bazı Ağır Metallerin Uygulanmasıyla Anlatımı Değişen Genlerin Tanımlanması ve Belirlenmesi", Yayınlanmış Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 93-98.
- Dawson, M.A. and Kouzarides, T. (2012) "Cancer epigenetics: from mechanism to therapy", *Cell*, 150(1), 12-27.
- Denison Fiona, C., Anna-Lisa, P., Agata, K.Z., Robert, J.F. (2011) "14-3-3 proteins in plant physiology", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 22 (7), 720-727.
- Direskeneli, H. (2014) "Enerji, İthal Kömür, Afşin-Elbistan ve Rüzgâr Santralleri Üzerine Bir İnceleme", <http://www.emo.org.tr/ekler/1160f.pdf> Son Erişim Tarihi: 23.01.2018.
- Doroftci, E., Antofie, M.M., Sava, D., Arcus, M. (2010) "Cytogenetic effects induced by manganese and lead microelements on germination at *Allium cepa*", *Botany Serbica*, 34, 115-121.
- Durmaz, E., Donbak, L., Kir, T., Ulutas, O. K., Cok, I. (2008) "Investigation of possible genotoxic risks in furnace operating workers from Afsin-Elbistan thermal power plant, by comet assay", *Toxicology Letters*, 180, 30-37.
- EA (Enerji Atlası) (2018), <http://www.enerjiatlası.com/komur/> Kömür ve Linyit Yakıtlı Termik Santraller, Son Erişim Tarihi: 18 Ocak 2018.
- Enan, M.R. (2006) "Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43, 147-154.
- Erkan, İ.E. (2014) "Bor stresi altındaki arpa ve buğdayda silikon varlığının bitki fizyolojisi ile hücre zarı bor ve silikon taşıyıcıları üzerindeki etkisi", Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 56-61.

- Ertürk, F.A., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G., Bozari, S. (2012a) “Molecular determination of genotoxic effects of manganese (Mn) on maize (*Zea mays* L.) by RAPD”, *Journal Biotechnology*, 161, 31-37.
- Ertürk, F.A., Ay, H., Nardemir, G., Agar, G. (2012b) “Molecular determination of genotoxic effects of cobalt and nickel on maize (*Zea mays* L.) by RAPD and protein analyses”, *Toxicology Indiana Health*, 29, 662-671.
- Ertürk, F.A., Nardemir, G., Ay, H., Arslan, E., Agar, G. (2013) “Determination of genotoxic effects of boron and zinc on *Zea mays* L. by using protein and RAPD analyses”, *Toxicology Indiana Health*, doi:10.1177/0748233713485888.
- Ertürk, F.A., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G. (2015) “Analysis of genetic and epigenetic effects of maize seeds in response to heavy metal (Zn) stress”, *Environ Sciences Pollution Research*, 22, 10291–10297.
- Fadool, J.M., Daniel, L., Hartl, S., and John, E.D. (1998) “Transposition of the mariner element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish”, *The National Academy of Sciences*, 95 (9), 5182-5186.
- Federoff, N. (2000) “Transposons and Genome Evolutions in Plants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (13), 7002-7007.
- Feschotte, C. and Pritham, E.J. (2007) “DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes”, *Annual Review Of Genetics*, 41, 331-368.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S.R. (2002) “Plant Transposable Elements: Where Genetics Meets Genomics”, *Nature*, 3, 329-341.
- Finnegan, D.J. (1989) “Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution”, *Trends in Genetics*, 5, 103-107.
- Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z., Golda, A. (2008) “The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress”, *Journal Plant Physiology*, 165, 833-844.
- Flavell, A.J., Knox, M.R., Pearce, S.R., Ellis, T.H.N. (1998) “Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis”, *Plant Journal*, 16, 643-650.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)(2013) “Wheat report in the world”, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> , Son Erişim Tarihi: 15.02.2018.
- Gangwar, S. and Singh, V.P. (2011) “Indole acetic acid differently changes growth and nitrogen metabolism in *Pisum sativum* L. seedlings under chromium (VI) phytotoxicity: Implication of oxidative stress”, *Scientia Horticulturae*, 129 (2), 321-328.

- Gao, J., Zhang, Y., Lu, C., Peng, H., Luo, M., Li, G., Shen, Y., Ding, H., Zhang, Z., Pan, G., Lin, H. (2015) “The development dynamics of the maize root transcriptome responsive to heavy metal Pb pollution”, *Biochem Biophys Research Communite*, 458 (2), 287-293.
- Georg, H., Sarah, Y., Arvind, K. B., Heidrun, G., Christina, R., Galina, F., Ed, B., Rod, A. W., Steve, R., Bruce, B., Chad, N., Klaus, F.X. M. and Joachim, M. (2005) “Structure and Architecture of the Maize Genome”, *Plant Physiology*, 139(4), 1612-1624.
- Grandbastien, M.A. (2015) “LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response”, *Biochim Biophys Acta*, 1849 (4), 403-416.
- Grant-Downton, R.T. and Dickinson, H.G. (2005) “Epigenetics and its implications for plant biology. The epigenetic network in plants”, *Annals of botany*, 96, 1143-1164.
- Grativol, C., Hemerly, A.S., Ferreira, P.C.G. (2012) “Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations Biochim”, *Biochimica et biophysica acta*, 1819, 176-185.
- Greger, M. and Löfstedt, M. (2004) “Comparison of Uptake and Distribution of Cadmium in Different Cultivars of Bread and Durum Wheat”, *Crop Science*, 44 (2), 501-507.
- Grigoratos, T. and Martini, G. (2014) “Brake wear particle emissions: a review”, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (4), 2491-2504.
- Güneş, S. ve Kulaç, T. (2013) “Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü”, *Turkish Journal of Urology*, 39(3), 181-187.
- Hall, J.L. and Williams, L.E. (2003) “Transition metal transporters in plants”, *Journal Explorer Botany*, 54(393), 2601-2613.
- Hamad-Mecbur, H., Yilmaz, S., Temel, A., Sahin, K., Gozukirmizi, N. (2014) “Effects of epirubicin on barley seedlings”, *Toxicology Indiana Health*, 30, 52-59.
- Hardin, G. (2013) “Nonrenewable energy sources”, in: D.D. Chiras (Ed.), *Environmental Science*, ninth edition, Jones and Bartlett Learning, Burlington, 275-312.
- Ho, L. and Crabtree, G.R. (2010) “Chromatin remodelling during development”, *Nature*, 463, 474-484.
- Huang, J., Zhang, K., Shen, Y., Huang, Z., Li, M., Tang, D., Gu, M., Cheng, Z. (2009) “Identification of a High Frequency Transposon Induced by Tissue Culture *nDaiz*, a Member of the *hAT* Family in Rice”, *Genomics*, 93, 274-281.
- International Agency for Research on Cancer – IARC (2012), *Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*, 100C, IARC, Lyon.

- İzmirli, M. (2013) “Epigenetik Mekanizmalar ve Kansere Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar”, *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51.
- İzmirli, M., Tufan, T., Alptekin, D. (2012) “DNA Methylation”, *Archives Medical Review Journal*, 21(4), 274-282.
- Jafarnejadi, A.R., Mehdi, H., Gholamabbas, S. and Mohammad, B. (2011) “Large Scale Spatial Variability of Accumulated Cadmium in the Wheat Farm Grains”, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 20 (1), 98-113.
- Jana, A., Ghosh, M., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Mukherjee, A. (2017) “Hazard identification of coal fly ash leachate using a battery of cyto-genotoxic and biochemical tests in *Allium cepa*”, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63 (10), 1443-1453.
- Jena, N.R. (2012) “DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair”, *Journal Biosciences*, 37, 503-517.
- Jiang, Y., Bressler, J., Beaudet, L.A. (2004) “Epigenetics and human disease”, *Annu Revive Genetics*, 5, 479-510.
- Jiao, Y. and Deng, X.W. (2007) “A genome-wide transcriptional activity survey of rice transposable element-related genes”, *Genome Biology*, 8.R28.
- Jomova, K. and Valko, M. (2011) “Advances in metal-induced oxidative stress and human disease”, *Toxicology*, 283 (2-3), 65-87.
- Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A. (1995) “Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins”, *FEBS Letter*, 368, 55-58.
- Kaçar, B. ve Katkat, V. (2006) “*Bitki Besleme*”, Nobel Yayın No: 849, Ankara.
- Kadıoğlu, S. ve Tellioglu, Z. (1996) “Enerji Kaynaklarının Kullanımı ve Çevreye Etkileri”, *1. Enerji Sempozyumu*, TMMOB, 55-67, Ankara.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. and Rhee, Y. (2000) “Epigenetic aspects of somaclonal variations in plants”, *Plant Molecular Biology*, 43, 179-188.
- Kahraman, Y. (2011) “Afşin-Elbistan termik santrali küllerinin tarımda kullanım olanakları”, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kahramanmaraş, 68-72.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S. (2007) “Metallerin Çevresel Etkileri –I.”, [www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136\\_4753.pdf](http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf), Son Erişim Tarihi: 13.05.20016.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P., Schulman, A.H. (2010) “iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation”, *Theoretical Applied and Genetics*, 121 (8), 1419-1430.

- Kalendar, R., Flavell, A.J., Ellis, T. H. N., Sjakste, T., Moisy, C., Schulman, A. H. (2011) "Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers", *Heredity*, 106 (4), 520-530.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A. H. (1999) "IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques", *Theoretical Applied and Genetics*, 98, 704-711.
- Kalendar, R., Schulman, A.H. (2006) "IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting", *Nature Protocols*, 1 (5), 2478-2484.
- Kalendar, R., Schulman, A.H. (2014) "Transposon-Based Tagging: IRAP, REMAP, and iPBS", *Methods in Molecular Biology*, 1115, 233-255.
- Kalinowska, A. (1984) "Lead Concentration in the slug *Arion rufus* from sites at the different distances from a tourist road", *Ecological Bulletins*, 36, 46-49.
- Kampa, M., Castanas, E. (2008) "Human health effects of air pollution", *Environmental Pollution*, 151 (2), 362-367.
- Karaca, A., Türkmen, C., Arcaç, S., Haktanır, K., Topçuoğlu, B., Yıldız, H. (2009) "Çayırhan Termik Santral Emisyonlarının Yöre Topraklarının Bazı Ağır Metal ve Kükürt Kapsamlarına Etkilerinin Belirlenmesi", *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 1 (1), 25-41.
- Karaçay, B. (2009) "Kalıtımın Yeni Boyutu: Epigenetik", *Bilim Teknik*, Aralık: 32-37.
- Kazazian, H.H. (2004) "Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution", *Science*, 303 (5664), 1626-1632.
- Kelepertzis, E. (2014) "Accumulation of heavy metals in agricultural soils of Mediterranean: Insights from Argolida basin, Peloponnese, Greece", *Geoderma* 221 (222), 82-90.
- Kenger, M. (2014) "Afşin-Elbistan Termik Santrali küllerinin mısır tarımında kullanılabilirliğinin belirlenmesi", Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kahramanmaraş, 68-70.
- Kiefer, J.C. (2007) "Epigenetics in Development", *Developmental Dynamics*, 236, 1144-1156.
- Kidwell, M.G., Lisch, D.R. (2000) "Transposable Elements and Host Genome Evolution", *Trends In Ecology And Evolution*, 15 (3), 95-99.
- Kimura, M., Yoshizumi, T., Manabe, K., Yamamoto, Y.Y., Matsui, M. (2001) "Arabidopsis transcriptional regulation by light stress via hydrogen peroxide-dependent and independent pathways", *Genes Cells*, 6, 607-617.
- Kır, T. (2008) "Afşin-Elbistan A Termik Santralinde Çalışan Kazan İşletmecilerinin Genotoksik Risklerinin Saptanması", Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi,



*Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*  
Kahramanmaraş, 63-68.

- Kloc, A., Zaratiegui, M., Nora, E., Martienssen, R. (2008) “RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication”, *Current Biology*, 18, 490-495.
- Klug William, S., Cummings, M.R. (2011) “*Genetik kavramlar*”, Nobel Yayınları, Ankara.
- Koç, E., Şenel, M.C. (2013), “Dünyada ve Türkiye’de Enerji Durumu-Genel Değerlendirme,” *Mühendis ve Makina*, 54 (639), 32-44.
- Koppen, G., Verschaeve, L. (1996) “The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells”, *Mutation Research*, 360 (3), 193-200.
- Kosová, K., Vítámvása, P., Prášila, I.T., Renaut, J. (2011) “Plant proteome changes under abiotic stress-Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response”, *Journal of Proteomics*, 74, 1301-1322.
- Kovalchuk, O., Titov, V., Hohn, B., Kovalchuk, I. (2001) “A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment”, *Natural Biotechnol*, 19, 568-572.
- Köksel, H., Sivri, D., Özboy, Ö., Başman, A., Karacan, H. (2000) “*Hububat Laboratuvarı El Kitabı*”, Ceylan Matbaası, Ankara.
- Körpe Aras, S., Kanlıtepe, C., Cansaran-Duman, D., Halıcı, M.G. and Beyaztaş, T. (2010) “Assessment of air pollution genotoxicity by molecular markers in the exposed samples of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in the province of Kayseri (Central Anatolia)”, *Journal of Environmental Monitoring*, 12 (2), 536-543.
- Krystofova, O., Shestivska, V., Galiova, M., Novotny, K., Kaiser, J., Zehnalek, J., Babula, P., et al (2009) “Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions”, *Sensors*, 9(7), 5040-5058.
- Kumar, M., Bijo, A.J., Baghel, R.S., Reddy, C.R.K., Jha, B. (2012) “Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation”, *Plant Physiol Biochem*, 51, 129-138.
- Kupper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G. and McGrat, S.P. (2001) “Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*”, *Journal of Experimental Botany*, 52 (365), 2291-2300.
- Kürtüncü, M., Eraksoy, M. (2008) “Multipl Skleroz: Epigenetik Bir Hastalık Olabilir mi?”, *Nöropsikiyatri Arşivi*, 45, 15-20.

- Labra, M., Failla, O., Forni, G., Ghiani, A., Scienza, A., Sala, F. (2002) “Microsatellite analysis to define genetic diversity of grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in Central and Western Mediterranean countries”, *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 36 (1), 11-20.
- Labra, T.D., Fabio, F.G. (2003) “AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants”, *Chemosphere*, 52, 1183-1188.
- Lerat, E. (2009) “Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: How to find your way through the dense forest of programs”, *Heredity*, 104, 520-523.
- León-Mejía, G., Espitia-Pérez, L., Hoyos-Giraldo, L.S., Da Silva, J., Hartmann, A., Henriques, J.A., Quintana, M. (2011) “Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay”, *Sciences Total Environmental*, 409, 686-691.
- Leonard, W.J., Depper, J.M., Waldmann, T.A. and Greene, W.C. (1984) “*In Receptors and Recognition*”, 17, 45-66.
- Levitt, J. (1972) “Responses of plants to environmental stresses”, *Academic Press*, New York.
- Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M., Cao, Q. (2007) “Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation”, *Journal Environmental Sciences*, 19, 596-602.
- Liu, L., Li, Y., Tollefsbol, T.O. (2008) “Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases”, *Molecular Biology*, 10, 25-36.
- Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L., Seyfang, A., Blasco, M.A., Keefe, D.L. (2007) “Telomere lengthening early in development”, *Nature Cell Biology*, 9(12), 1436-1441.
- Liu, L., Wang, Y.X., Zhou, J., Long, F., Sun, H.W., Liu, Y., Chen, Y.Z., Jiang, C.L. (2005) “Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation”, *Inflamm Research*, 54(1), 37-41.
- Liu, S., Dixon, K. (1996) “Induction of mutagenic DNA damage by chromium (VI) and glutathione”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 28 (2), 71-90.
- Liu, W., Li, P., Qi, X., Zhou, Q., Sun, T. and Yang, Y. (2005) “DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis”, *Chemosphere*, 61, 158-167.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. and Sun, T. (2007) “Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers”, *Chemosphere*, 67, 1155-1163.

- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P., Zhou, Q., Xie, L., Han, Y. (2009) “Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices”, *Journal of Hazardous Materials*, 161, 878-883.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method”, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G., Chen, C.Z. (2011) “Micromanagement of the immune system by microRNAs”, *Nature Reviews Immunology*, 8, 120-130.
- Loning, W.E. and Seadler, H. (1997) “Plant Transposons: Contributors To Evolution?”, *Gene*, 205 (1-2), 245-253.
- Lu, Y., Hao, Z., Xie, C., Jose, C., Jose, L.A., Shibin, G., Bindiganavile, S.V., et al (2011) “Large-scale screening for maize drought resistance using multiple selection criteria evaluated under water-stressed and well-watered environments”, *Field Crops Research*, 124 (1), 37-45.
- Malar, S., Manikandan, R., Paulo, J.C.F., Shivendra, V.S., Perumal, V. (2014b) “Effect of lead on phytotoxicity, growth, biochemical alterations and its role on genomic template stability in *Sesbania grandiflora*: A potential plant for phytoremediation”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 10, 249-257.
- Malar, S., Vikram, S.S., Paulo, J.C.F. and Perumal, V. (2014 a) “Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]”, *Botanical Studies*, 55, 54-65.
- Manosij, G., Jana, A., Arpita, D., Sonali, S., Manivannan, J., Mukherjee, A. (2017) “Comprehensive analysis of fly ash induced changes in physiological/growth parameters, DNA damage and oxidative stress over the life cycle of *Brassica juncea* and *Brassica alba*”, *Chemosphere*, 186, 616-624.
- Mansour, A. (2007) “Epigenetic activation of genomic retrotransposons”, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6 (2), 99-107.
- Marco, A. and Marin, I. (2005) “Retrovirus-Like Elements in Plants”, *Recent Research Development Plant Sciences*, 81-7736-245-3.
- Maria Nilza, C.M., Ventura de Souza V. and Souza T.S. (2016) “Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*,” *Chemosphere*, 148, 481-486.
- Mark, K.F. and Hendershot, H. (1997) “Trace Metals in Montreal Urban Soils and the Leaves of *Taraxacum officinale*”, *Canadian Journal Soil Science*, 79, 385-387.
- Martienssen, R.A. and Colot, V. (2001) “DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi”, *Science*, 293, 1070-1074.

- Martin, C. and Zhang, Y. (2007) “Mechanisms of Epigenetic Inheritance”, *Cell Biology*, 19, 266-272.
- Martin, M.H. and Coughtrey, P.J. (1985) “Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution”, *Land and Air Applied Science Publishers*, 475, England.
- Mattick, J.S. (2012) “RNA driving the epigenetic bus”, *The EMBO Journal*, 31, 515-516.
- Matzenbacher, C. A., Garcia, H., Santos, M., Nicolau, C., Premoli, S., Corrêa, D., Souza, C., Niekraszewicz, L., Dias, J., Delgado, T., Kalkreuth, W., Grivicich, I., Silva, J. (2017) “DNA damage induced by coal dust, fly and bottom ash from coal combustion evaluated using the micronucleus test and comet assay in vitro”, *Journal of Hazardous Materials*, 324, 781-788.
- Memon, A.R, and Schröder, P. (2009) “Implications of Metal Accumulation Mechanisms to Phytoremediation”, *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 162-175.
- Menezes, A.P,S., Silva, J.D., Rossato, R.R., Santos, M.S. (2015) “Genotoxic and biochemical changes in *Baccharis trimerain* induced by coal contamination”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 9-16.
- Mengoni, A., Gori, A. and Bazzicalupo, M. (2000) “Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*”, *Plant Breeding*, 119, 311-317.
- Minkovsky, A., Patel, S., Plath, K. (2012) “Pluripotency and the transcriptional inactivation of the female mammalian X chromosome”, *Stem Cells*, 30, 48-54.
- Mohamed, H., Bashandy, S.R., Schnell, S. (2010) “Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, the Causal Agent of Common Bacterial Blight Disease, on Seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Upper Egypt”, *PubMed*, 55(1), 47-52.
- Morris, M.L. (2002) “Impacts of International Maize Breeding Research in Developing Countries”, *International Maize And Wheat Improvement Center (CIMMYT)*, Mexico, 54.
- Munzuroğlu, Ö. ve Gür, N. (2000) “Ağır Metallerin Elma (*Malus sylvestris* Miller cv. *Golden*)’da Polen Çimlenmesi ve Polen Tüpü Gelişimi Üzerine Etkileri”, *Tübitak Turk Journal Biology*, 24, 677-684.
- Müller, H.M., Kenny, E.E., Sternberg, P.W. (2004) “Textpresso: an ontology-based information retrieval and extraction system for biological literature”, *PLoS Biology*, 2(11), e309.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. (2010) “Sreekanth Heavy metals, occurrence and toxicity for plants”, *Environmental Chemistry Letters*, 8 (3), 199-216.

- Nedelkoska, T.V. and Doran, P.M. (2000) “Characteristics of heavy metal uptake by plants species with potential for phytoremediation and phytomining”, *Minerals Engineering*, 13, 549-561.
- Neelima, P. and Reddy, K.J. (2003) “Differential effect of cadmium and mercury on growth and metabolism of *Solanum melongena* L.”, *Journal of Environmental Biology*, 24, 453-460.
- Nichols, L., Sorahan, T. (2005) “Mortality of UK electricity generation and transmission workers”, 1973-2002, *Occupational Medicine*, 55, 541-548.
- Nicosia, A., Salamone, M., Mazzola, S., Cuttitta, A. (2015) “Transcriptional and biochemical effects of cadmium and manganese on the defense system of *Octopus vulgaris* paralarvae”, *BioMed Research International*, 1-11, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/437328>.
- Obidiegwu, J.E., Glenn, J.B., Hamlyn, G.J. and Ankush, P. (2015) “Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement”, *Front Plant Science*, 6, 542, doi: 10.3389/fpls.2015.00542.
- Oecking, C., Jaspert, N. (2009) “Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs”, *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 760-765.
- Orcan, S. (2006) “Epigenetik ve Epigenom”, <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/depigenetik.pdf>, Son Erişim Tarihi 29.07.2016.
- Oxman, A.D., Muir, D.C., Shannon, H.S., Stock, S.R.T., Hnizdo, E., Lanfe, H.J. (1993) “Occupational dust exposure and chronic obstructive pulmonary disease”, *American Review of Respiratory Disease*, 148, 38-48.
- Owen, J.R., Morris, C.A., Nicolaus, B., Harwood, J.L., Kille, P. (2012) “Induction of expression of a 14-3-3 gene in response to copper exposure in the marine alga, *Fucus vesiculosus*”, *Ecotoxicology*, 21 (1), 124-138.
- Ölgen, M.K. ve Gür, F. (2012) “Yatağan Termik Santrali Çevresinden Toplanan Likenlerde (*Xanthoria parietina*) Saptanan Ağır Metal Kirliliğinin Coğrafi Dağılışı”, *Türk Coğrafya Dergisi*, 57, 43-54.
- Öztürk, M. (2009) “*Kül Dağları ve Toksik Metal Kirliliği*”, <http://www.mozturk.net/Upload/kuldaglariveagirmetal.pdf>, Son Erişim Tarihi 01.09.2016.
- Parveen, S., Shahzad, A., Yadav, V. (2016) “Molecular Markers and Their Application in Plant Biotechnology.”, *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*, 16, 389-413.
- Peng, H. and Zhang, J. (2009) “Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding”, *Progress in Natural Science*, 19 (9), 1037-1045.

- Pfaffl, M.W. (2006) “Relative quantification. Real-time PCR”, Published by International University Line (Editor: T. Dorak), 63-82. <http://gene-quantification.de/pfaffl-rel-quant-book-ch3.pdf>, Son Erişim Tarihi 12.04.2017.
- Poghosyan, G.H., Zhanna, H.M., Poghos, H.V. (2014) “Influence of Cadmium Ions on Growth and Antioxidant System Activity of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Seedlings”, *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 2 (10), 371-378.
- Polak, P. and Domany, E. (2006) “Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes”, *Genomics*, 7:133, doi 10.1186/1471-2164-7-133.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. (1996) “Polymorphism revealed by simple sequence repeats”, *Trends in Plant Science*, 1 (7), 215-222.
- Pozuelo-Rubio, M. (2012) “14-3-3 Proteins are Regulators of Autophagy”, *Cells*, 1(4), 754-773.
- Qishlaqi, A., Moore, F. and Forghani, G. (2008) “Impact of untreated wastewater irrigation on soils and crops in Shiraz suburban area, SW Iran”, *Environmental Monitoring and Assessment*, 141, 257-273.
- Qualhato, G., Thiago, L., Rocha. (2017) “Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*”, *Chemosphere*, 183, 305-314.
- Racyan, V.K., Blewitt, M.E., Druker, R., Preis, J.I., Whitelaw, E. (2002) “Metastable epialleles in mammals”, *Trends in Genetics*, 18, 348-351.
- Rao, X., Xuelin, H., Zhicheng, Z. and Xin, L. (2013) “An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis”, *Biostat Bioinforma Biomath*, 3 (3), 71–85.
- Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Smith, J., Summers, A.O., Tsuda, M., Berg, D.E. (2008) “Revised Nomenclature for Transposable Genetic Elements”, *Plasmid*, 60, 167-173.
- Roberts, M.R., Salinas, J., Collinge, D.B. (2002) “14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress”, *Plant Molecular Biology*, 50 (6), 1031-1039.
- Rodenheiser, D., Mann, M. (2006) “Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications”, *CMAJ*, 174 (3), 341-348.
- Ruth, N. E. H. and, Tian, X. (2014) “Energy related CO<sub>2</sub> emissions and the progress on CCS projects”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 368-385.
- Sabot, F., Sourdille, P., Chantret, N. and Bernard, M. (2006) “Morgane, a new LTR retrotransposon group, and its subfamilies in wheats”, *Genetica*, 128 (1-3), 439-447.

- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. (1984) “Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics”, *Proceedings of the National Academy Sciences*, 81, 8014-8019.
- Sağlam, N., Cihangir, N. (1995) “Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları”, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 11, 157-161.
- Santo Tomas, L.H. (2011) “Emphysema and chronic obstructive pulmonary disease in coal Miners”, *Current Opinional Pulmonary Medicine*, 17, 123-125.
- Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Tsigaridas, K. (2011) “Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities”, *Environmental Pollution*, 159 (12), 3560-3570.
- Saygıdeğer, S. (1995) “*Lycopersicum esculentum* L. Bitkisinin çimlenmesi ve gelişimi üzerine kurşunun etkileri”, *2. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi*, Ankara, 588-597.
- Schilling, C.J., Tams, I.P., Schilling, R.S.F., Nevitt, A., Rossiter, C.E., Wilkinson, B. (1988) “A survey into the respiratory effects of prolonged exposure to pulverised fuel ash”, *British Journal of Industrial Medicine*, 45, 810-817.
- Schulman, A.H., Kalendar, R. (2005) “*Cytogenetic and Genome Research*”, 110, 598-605.
- Schulman, A.H. (2013) “Retrotransposon replication in plants”, *Current Opinion in Virology*, 3 (6), 604-614.
- Schulz, D., Schwalb, B., Kiesel, A., Baejen, C., Torkler, P., Gagneur, J., Soeding, J., Cramer, P. (2013) “Transcriptome surveillance by selective termination of noncoding RNA synthesis”, *Cell*, 155(5), 1075-1087.
- Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A. (2010) “Epigenetics in cancer”, *Carcinogenesis*, 31 (1), 27-36.
- Sheshadri, P., Ashwini, A., Jahnavi, S., Bhonde, R., Prasanna, J., Kumar, A. (2015) “Novel role of mitochondrial manganese superoxide dismutase in STAT3 dependent pluripotency of mouse embryonic stem”, *Cells Sciences*, doi:10.1038/srep09516.
- Shulaeva, V., Cortesa, D., Miller, G., Mittler, R. (2008) “Metabolomics for plant stress response”, *Physiologia Plantarum*, 132, 199-208.
- Sigmaz, B., Agar, G., Arslan, E., Aydin, M. and Taspınar, M.S. (2015) “The role of putrescine against the long terminal repeat (LTR) retrotransposon polymorphisms induced by salinity stress in *Triticum aestivum*”, *Acta Physiol Plant*, 37,251, DOI: 10.1007/s11738-015-2002-9.

- Silva, S., Silva, P., et al (2017) “Pb low doses induced genotoxicity in *Lactuca sativa* plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 109-116.
- Slotkin, R.K., Martienssen, R. (2007) “Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome”, *Nature Reviews Genetics*, Apr 8(4), 272-285.
- Smith, D.B. and Flavell, R.B. (1974) “The relatedness and evolution of repeated nucleotide sequences in the genomes of some Gramineae species”, *Biochemical genetics*, 12(3), 243-256.
- Smith, Z.D., Meissner, A. (2013) “DNA methylation: roles in mammalian development”, *Nat Rev Genetics*, 14, 204-220.
- Souguir, D., Ferjani, E., Ledoigt, G. and Goupil, P. (2008) “Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity”, *Protoplasma*, 233, 203-207.
- Soydam Aydin, S., Gökçe, E., Büyük, İ., Aras, S. (2012) “Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746 (1), 49-55.
- Steinkellner, H., Kassie, F. and Knasmüller, S. (1999) “Tradescantia-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426, 113-116.
- Stresty, T.V.S. and Madhava, R.K.V. (1999) “Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea”, *Environmental and Experimental Botany*, 41, 3-13.
- Süzer, S. (2004) “Mısır Tarımı”, *Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü*, Edirne.
- Szyf, M. (2005) “DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy”, *Biochemistry*, 70, 533-549.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2010) “Plant Physiology”, Fifth Edition, *Sinauer Associates*, Sunderland.
- Takai, D., Jones, P.A. (2002) “Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22” *Proceeding of the National Academy Sciences*, 99 (6), 3740-3745.
- Tamzok, N. (2014) “Kaza'nın Ardından Afşin-Elbistan Havzası'nın Hazin Tarihi”, <http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/97>, Son Erişim Tarihi: 24.01.2018.
- Tauqeer, H.M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Saeed, R., Iftikhar, U., Ahmad, R., Farida, M., Abbasid, G.H. (2016) “Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 138-146.



- Teixeira, E.C., Meira, L., Santana, E., Ramos, R., Wiegand, F. (2009) “Chemical composition of PM10 and PM2.5 and seasonal variation in south Brazil”, *Water Air Soil Pollution*, 199, 261-275.
- Temel, A., Gözükirmizi, N. (2013) “Analysis of retrotransposition and DNA methylation in barley callus culture”, *Acta Biologica Hungarica*, 64 (1), 86-95.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N. and Bisht, S.S. (2002) “Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt”, *Plant Science*, 162, 381-388.
- Tollefsbol, T. (2011) “*Handbook of Epigenetics*”, The New Molecular and Medical Genetics Department of Biology University of Alabama at Birmingham, AL, 35294-1170, Birmingham, USA.
- Tulga, İ. (2017) “Endüstriyel atıkların çimento yerine ikame edilmesi ile oluşturulan beton numunelerinin mühendislik özelliklerindeki değişimin incelenmesi”, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, *Kırklareli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırklareli, 62-64.
- Tuna, A.L. ve Girgin, A.L. (2005) “Mısır da (*Zea mays* L.) Gelişme Mineral Beslenme ve ağır metal içeriği üzerine termik santral uçucu küllerin etkisi”, *Ekoloji Dergisi*, 14 (57), 7-15.
- Tuteja, N., Ahmad, P., Brahma, B.P., Tuteja, R. (2009) “Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases”, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681 (2-3), 134-149.
- Türk İstatistik Enstitüsü (2016) “<http://www.turkstat.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>”, Son Erişim Tarihi 12.08.2017.
- Üçüncü, E. (2011) “Su mercimeği (*Lemna minor* Linneaus 1753) kullanarak farklı konsantrasyonlardaki ağır metal (Cu, Cr, Pb) karışımlarının laboratuvar ortamında biyoremediasyonu”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 48-51.
- Ünal, D., Sukatar, A., Pirintsos, S. (2008) “*Evernia prunastri* türünde ağır metal stresinin fotosentez üzerine etkisi ve DNA hasarının tespiti”, Yayınlanmış Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 73-78.
- Van, V.E.A., Costa Araújo, S., Redeker, S., Van Schaik, R., Aronica, E., Gorter, J.A. (2007) “Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy”, *Brain a Journal of Neurology*, 130 (2), 521-534.
- Vansant, G. and Reynolds, W.F. (1995) “The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element”, *The National Academy of Sciences*, 92 (18), 8229-8233.
- Vanyushin, B.F., Kirnos, M.D. (1988) “DNA methylation in plants”, *Gene*, 74, 117-121.

- Vardar, Ç., Basaran, E., Cansaran-Duman, D., Aras, S. (2011) "Air-quality biomonitoring: Assessment of genotoxicity of air pollution in the Province of Kayseri (Central Anatolia) by use of the lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf and amplified fragment-length polymorphism markers", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 759, 43-50.
- Vinocur, B., Altman, A. (2005) "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations", *Biotechnology*, 16 (2), 123-132.
- Voronova, A., Belevich, V., Jansons, A., Rungis, D. (2014) "Stress-induced transcriptional activation of retrotransposon-like sequences in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) genome", *Tree Genetics and Genomes*, 10 (4), 937-951.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de, L., Hornes, M. (1995) "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407-4414.
- Vousta, D., Gramanis, A., Samara, C. (1996) "Trace elements in vegetables grown in an industrial area in relation to soil and air particulate matter", *Environmental Pollution*, 94, 325-335.
- Voytas, D.F., Boeke, J.D. (2002) "**Ty1 and Ty5 of *Saccharomyces cerevisiae*, In Mobile Dna**", Edited By Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.L., ASM Press, 631-662, Washington DC.
- Vural, N. (1996) "**Toksikoloji. Metalik zehirler**", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları: 3, 659 s, Ankara.
- Vural, N. (2005) "Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 320s, <http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/291.pdf>, Son Erişim Tarihi: 12.10.2017, Ankara.
- Waddington, C.H. (1942), *Endeavour*, 1, 18-20.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. and Beyersmann, D. (2003) "Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis", *Toxicology*, 192, 95-117.
- Wagner, G.J. (1993) "Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health", *Advances in Agronomy*, 51, 173-212.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T. (1997) "Genetic distribution of BARE-1- like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP)", *Molecular and General Genetics*, 253, 687-694.
- Wei, J., Zhang, Y., Yu, T.Y., Sadre-Bazzaz, K., Rudolph, M.J., Amodeo, G.A., Symington, L.S., Walz, T., Tong, L. (2016) "A unified molecular mechanism for the regulation of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation", *Cell Discovery*, 2:16044, doi: 10.1038/celldisc.2016.44.

- Weil, C. and Martienssen, R. (2008) ‘‘Epigenetic interactions between transposons and genes: lessons from plants’’, *Current Opinion in Genetics and Development*, 18, 188-192.
- Wessler, S.R. (2009) ‘‘The Implicit Genome [online], Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks’’, [http://www.plantbio.uga.edu/wesslerlab/The\\_Implicit\\_Genome.pdf](http://www.plantbio.uga.edu/wesslerlab/The_Implicit_Genome.pdf), Son Erişim Tarihi: 10.03.2017.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., et al (2007) ‘‘A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements’’, *Nature Genetics*, 8, 973-982.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) ‘‘DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers’’, *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531-6535.
- Wolf, H., Blust, R. and Backeljau, T. (2004) ‘‘The use of RAPD in ecotoxicology’’, *Mutation Research*, 566, 249-262.
- Woodrow, P., Pontecorvo, G., Fantaccione, S., Fuggi, A., Kafantaris, I. and Carillo, P. (2010) ‘‘Polymorphism of a new Tyl1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses’’, *Theor Applied Genetic*, 121 (2), 311-322.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F. (2005) ‘‘Review: Real Time PCR for mRNA quantitation’’, *Biotechniques*, 39 (1), 75-85
- Xie, C., Liuji, H., Yongzhu, Y., Dunxiu, L., Xingyong, Y. (2017) ‘‘Accumulation and tolerance to cadmium heavy metal ions and induction of 14-3-3 gene expression in response to cadmium exposure in *Coprinus atramentarius*’’, *Microbiological Research*, 196, 1-6.
- Xiufang, Ou., Yunhong, Z., Chunming X., Xiuyun L., Qi Z., Tingting Z., Lili J., Diter von W., Bao L. (2012) ‘‘Transgenerational Inheritance of Modified DNA Methylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (*Oryza sativa* L.)’’, *Plos*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041143>.
- Yağcı, S. (2015) ‘‘Tuzluluk Stresinin Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Meydana Getirmiş Olduğu Retrotranspozon Polimorfizmi Üzerine B-Östradiol’ün Etkisinin Belirlenmesi’’, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 31-34.
- Yediyıldız, A.G., Toprak, G., Özcan, S. (2008) ‘‘Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulanan Buğday (*Triticum aestivum*) Çeşitlerinde Antioksidan Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Belirlenmesi’’, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon, Türkiye. PB076, 352.
- Yigider, E., Taspinar, M.S., Sigmaz, B., Aydın, M., Agar, G. (2016) ‘‘Humic acids protective activity against manganese induced LTR (long terminal repeat) retrotransposon polymorphism and genomic instability effects in *Zea mays*’’, *Plant Gene*, 6, 13-17.

- Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H. (1997) “Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites”, *Trends in Genetics*, 13 (8), 335-340.
- Yüzbaşıoğlu, A. (2008) “Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara, 42-47.
- Yücel, G. (2013) “In vivo olarak yetiştirilen *Lycopersicum esculentum* Mill. cv. *invictus* çeşidinde nikel (Ni), kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ağır metal uygulamalarının genotoksik ve enzimatik düzeyde etkilerinin araştırılması”, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çanakkale, 67-69.
- Zhang, L., Chia, J.M., Kumari, S., Stein, J.C., Liu, Z., Narechania, A., Maher, C.A., Guill, K., McMullen, M.D., Ware, D. (2009) “A genome-wide characterization of microRNA genes in maize”, *PLoS Genetics*, 5:e1000716.
- Zhang, L., Zhang, L., Liu, N., Ma, X., Jiang, L. (2013) “The transcriptional control machinery as well as the cell wall integrity and its regulation are involved in the detoxification of the organic solvent dimethyl sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS Yeast Research*, 13 (2), 200-218.
- Zhu, N., Gao, H.R., Wang, H.X., Xu, M.Y., Li, X.Z. (2014) “Synthesis, crystal structures, and DNA cleavage activities of manganese (II) complexes: a good example of the synergy between metal ions prompting DNA cleavage Eur. J. Inorg”, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 14, 2396-2405.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) “Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification”, *Genomics*, 20 (2), 176-183.
- Zwack, P.J. and Rashotte, A.M. (2015) “Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses”, *Journal Explorer Botany*, 66, 4863-4871.

## **EKLER**

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

### **A. SCI indekslerine giren dergilerdeki makaleler:**

1. Bulut, H. and Yıldırım Doğan, N. (2018) ‘‘Determination by molecular methods of genetic and epigenetic changes caused by heavy metals released from thermal power plants’’, *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 189-196.
2. Yıldırım Doğan, N. and Bulut, H. (2018) ‘‘Determination by Molecular Methods of DNA Damage Caused by Heavy Metals in Grains’’, *FEB - Fresenius Environmental Bulletin*, Accepted, March 18, 2018.

### **B. Uluslararası hakemli dergilerdeki makaleler:**

1. Yıldırım Doğan, N. and Bulut, H. (2017) ‘‘Determination by Molecular Methods of Genetic and Epigenetic Changes Caused by Heavy Metals in Ashes Discharged from Thermal Power Plants’’, *Research Journal of Agricultural Sciences*, 10(2), 38-43.
2. Bulut, H. ve Gürbüz, H. (2017) ‘‘Evaluation of the Success Effect of 7E Constructive Approach Teaching Model in High School Biology Course’’, *Ines Journal*, No.1369, 10, 94-114, <http://dx.doi.org/10.16991/INES JOURNAL.1369>.

### **C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:**

1. Yıldırım Doğan, N., Bulut, H., Korkmaz, M. (2017) ‘‘Detection of genetic diversity among *Tanacetum* species by RAPD’’, *International INES Academic Researches Congress 18- 21 October 2017- INES 2017*, pages 473-473, Antalya.
2. Yıldırım Doğan, N., Bulut, H., Akgün, Ü. (2017) ‘‘Determination of DNA methylation level in wheat exposed to Uv-C by Cred-Ra’’, *International INES Academic Researches Congress 18 - 21 October 2017 - INES 2017*, pages 470-470, Antalya.

3. Yıldırım Doğan, N., Bulut, H., Akgün, Ü. (2017) ‘‘DNA methylation in wheat exposed to Uv-C’’, *Ecology 2017 International Symposium*, pages 517-517, Kayseri.

4. Sunar, S., Korkmaz, M., Sığmaz, B., Ağar, G., Bulut, H. (2017) ‘‘Determination of Genetic Relationships Among *Salvia* Species by RAPD Analyses’’, *Ecology 2017 International Symposium*, pages 498-498, Kayseri.

5. Yıldırım Doğan, N., Korkmaz, M., Kandemir, A., Bulut, H. (2017) ‘‘Genetic Diversity Detected by ISSR Analysis Among *Tanacetum* Species Growing Around Erzincan’’, *Ecology 2017 International Symposium*, pages 599-599, Kayseri.

#### D. Sertifika

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı 81 Saat, *Ankara Üniversitesi, Sürekli Eğitim Merkezi*, Belge No: 6377, Kurs Tarihleri 28.09.2016-10.10.2016, Ankara.

#### E. Proje

1. **Araştırmacı:** Erzincan Üniversitesi BAP koordinatörlüğü (2017-2018) ‘‘Termik santrallerden çevreye salınan ağır metallerin neden olduğu genotoksik etkinin tahıl ürünleri üzerinde meydana getirdiği genetik ve epigenetik değişikliklerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi’’, Proje ID:445, Proje Kodu: FDK-2017-445, Proje Gurubu: Fen ve Mühendislik.

2. **Araştırmacı:** Erzincan Üniversitesi BAP koordinatörlüğü (2013-2016) ‘‘Erzincan Çevresinde Doğal Yayılış Gösteren Rosa Taksonlarının Ekolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Genetik Çeşitliliklerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması’’, Proje ID: 114, Proje Kodu: FEN-A-180713-0035, Proje Gurubu: Fen ve Mühendislik.

## Ek-2. Gen Ekspresyonu İçin Primer Dizaynındaki Blastlar

**Input PCR template** none  
**Specificity of primers** Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Embryophyta)  
**Other reports** [Search Summary](#)

### Detailed primer reports

**Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACGACTCAAGCGAGGGGCA	19	63.82	63.16	3.00	0.00
Reverse primer	CGCCTGCTACGCTACAAGGAC	21	63.36	61.90	4.00	2.00

**Products on target templates**

>XM\_020313382.1 PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii 14-3-3-like protein GF14-B (LOC109754477), transcript variant X2, mRNA

product length = 199  
 Forward primer 1 ACGACTCAAGCGAGGGGCA 19  
 Template 984 ..... 1002

Reverse primer 1 CGCCTGCTACGCTACAAGGAC 21  
 Template 1182 .....C.. 1162

>XM\_020313381.1 PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii 14-3-3-like protein GF14-B (LOC109754477), transcript variant X1, mRNA

product length = 199  
 Forward primer 1 ACGACTCAAGCGAGGGGCA 19  
 Template 1092 ..... 1110

Reverse primer 1 CGCCTGCTACGCTACAAGGAC 21  
 Template 1290 .....C.. 1270

**Input PCR template** none  
**Specificity of primers** Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Zea mays)  
**Other reports** [Search Summary](#)

### Detailed primer reports

**Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAACTCTTATCTGTTCCT	20	54.75	45.00	3.00	0.00
Reverse primer	GATGAGTAGATGCCAGTTCC	20	55.33	50.00	3.00	1.00

**Products on target templates**

>XM\_008650605.2 PREDICTED: Zea mays 14-3-3-like protein GF14-C (LOC103629503), mRNA

product length = 377  
 Forward primer 1 GAACTCTTATCTGTTCCT 20  
 Template 159 ..... 178

Reverse primer 1 GATGAGTAGATGCCAGTTCC 20  
 Template 535 ..... 516

>XM\_008667437.2 PREDICTED: Zea mays 14-3-3-like protein GF14-C (LOC103644240), partial mRNA

product length = 377  
 Forward primer 1 GAACTCTTATCTGTTCCT 20  
 Template 24 ..... 43

Reverse primer 1 GATGAGTAGATGCCAGTTCC 20  
 Template 400 ..... 381

**Input PCR template** none  
**Specificity of primers** Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Zea mays)  
**Other reports** [Search Summary](#)

## Detailed primer reports

### Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCATGGCAGAAGGGTTGAGCA	21	63.54	57.14	4.00	2.00
Reverse primer	TCAGGGCTCATCTAGCTGGTCCTG	24	65.37	58.33	10.00	10.00

#### Products on target templates

>[XM\\_008872136.2](#) PREDICTED: Zea mays uncharacterized LOC103647624 (LOC103647624), mRNA

```

product length = 382
Forward primer 1 GCATGGCAGAAGGGTTGAGCA 21
Template       312 .....T..A..... 292

Reverse primer 1 TCAGGGCTCATCTAGCTGGTCCTG 24
Template       11 ..T.....A.....T.....A 34
  
```

>[NM\\_001149111.1](#) Zea mays uncharacterized LOC100274847 (c63011\_1(700)), mRNA

```

product length = 288
Forward primer 1 GCATGGCAGAAGGGTTGAGCA 21
Template       900 .....C..T.GG..... 520

Forward primer 1 GCATGGCAGAAGGGTTGAGCA 21
Template       707 .....T.CTT..... 687
  
```



## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elbistan’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 1997 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünden 2001 yılında mezun oldu. Aynı yıl Erzincan ilinde Fen ve Teknoloji öğretmeni olarak göreve başladı. 2003 Yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı. 2012 Yılında yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde doktora öğrenimine 2014 yılında başladı. Evli ve üç erkek çocuk babasıdır.

