



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ÇEŞİTLİ VÜCUT SIVILARINA MARUZ KALMIŞ ÇİM BİTKİSİNDE β -ACTİN
GEN İFADESİNDEKİ FARKLILIKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökçe ONGUN

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER
ADLİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ
Prof Dr. E. Sümer ARAS**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ VÜCUT SIVILARINA MARUZ KALMIŞ ÇİM BİTKİSİNDE β -ACTİN
GEN İFADESİNDEKİ FARKLILIKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökçe ONGUN

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER
ADLİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. E. Sümer ARAS**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “ÇEŞİTLİ VÜCUT SIVILARINA MARUZ KALMIŞ ÇİM BİTKİSİNDE β -ACTİN GEN İFADESİNDEKİ FARKLILIKLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak yazılmıştır. Tezimin fikri tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar ve araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gökçe ONGUN

Tarih: 24.06.2019

İmza:



KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalında
Adli Genetik Tezli Yüksek Lisans Programında
Gökçe Ongun tarafından hazırlanan
“Çeşitli Vücut Sıvılarına Maruz Kalmış Çim Bitkisinde β -aktin Gen İfadesindeki
Farklılıkların Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ OY
ÇOKLUĞU ile kabul/red edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2019

Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Tahir ATICI
Gazi Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
KABUL VE ONAY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	ix
1. GİRİŞ	1
1.2 LİTERATÜR ÖZETİ	3
1.2.1 Adli Botaniğin Tarihçesi ve Kullanım Alanları	3
1.2.1 Adli Çalışmalarda Çim Bitkisi	5
1.2.3 <i>Lolium perenne</i> (Top gun)	5
1.2.4 <i>Festuca arundinacea</i> (Jaguar)	6
1.2.5 Aktin Proteininin Bitkilerdeki Görevleri ve Kodladığı Genler	6
1.2.6 Farklı Vücut Sıvılarının Özellikleri	9
1.2.7 Gerçek Zamanlı (RT-PCR) PCR	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1.Çalışılacak Bitkilerin Belirlenmesi ve Bitki Örneklerinin Temin Edilmesi	12
2.2.Kullanılacak Vücut Sıvılarının Temini	12
2.3 Bitkilerin Yetiştirilmesi	13
2.4 RNA İzolasyonu;	15
2.5 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	16
2.6 qRT-PCR Çalışmaları ve Sonuçların Değerlendirilmesi	16
3. BULGULAR	17
3.1 Farklı Vücut Sıvılarına Maruz Kalmış Bitkilerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	17
3.2 RNA İzolasyonu ve Ürünlerin Kalitesi	17
3.3 qRT PCR Sonuçları ve Sonuçların Değerlendirilmesi	19
4. TARTIŞMA	23

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	25
ÖZET	27
SUMMARY	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	33



ÖNSÖZ

Türkiye’de en geniş yayılım gösteren *Lolium perenne* L. ve *Festuca arundinacea* Schreb. türleri olay yerlerinde karşılaşma ihtimali en yüksek olan bitkilerdir. Olası bir olay yerinde, vücuttan çıkacak her türlü sıvı ortamın florasını hem morfolojik olarak hem de genetik olarak etkileyecektir. Bu çalışmada bitkilerde mikrofilamentlerin üretilmesinde önemli bir role sahip olan aktin proteinini sentezleyen ve housekeeping gen olan β -actin geninin, farklı vücut sıvılarına (idrar, kan, safra öz suyu) maruz bırakılmış yaprak dokularında, gen ifadesi farklılıkları karşılaştırmalı olarak qRT-PCR ile incelenmiştir Multidisipliner bir alan olan adli botanik biliminde adli olaylara, olay yerindeki bitki açısından ve moleküler açıdan bir bakış açısı sunulmasının yanı sıra, farklı vücut sıvılarının bitkinin dejenerasyon ve apoptosis sürecinde etkili olup olmadığı belirlenmiştir. Literatürde benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca emeklerini ve desteğini eksik etmeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ahmet Altındağ ve Prof. Dr. E. Sümer ARAS’a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez konusu seçiminde ve çalışmasında büyük yardımları dokunan, gece gündüz demeden, psikolojik desteğini ve arkadaşlığını esirgemeyen, sabırlı, güler yüzlü ve güzel kalpli arkadaşım Dr. F. Şeyma GÖKDEMİR’e teşekkürü borç bilirim.

Her zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen annem Nilüfer ACUN’a ve ablam Deniz Ongun’a ve çok kıymetli arkadaşım Hamza GÜMÜŞ’e sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µl	mikrolitre
C	Santigrat
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
ml	Mililitre
ng	nanogram
°	Derece
PMI	Ölüm zamanı (Postmortem interval)
RNA	Ribonükleik asit

ŞEKİLLER

- Şekil 1.2.5.1** Genel bir bitki aktin geninin şematik yapısı. Kalın siyah bir çizgi düzenleyici bölgeyi belirtir. L ve Li sırasıyla lider ekson ve lider introndur. 1-4 sayıları ekzondur ve 1i – 3i sayıları introndur. 8
- Şekil 2.2.1** Kullanılan vücut sıvıları. (Kan örnekleri, safra tuzu) 13
- Şekil 2.3.1** Bitkiler kan, idrar, safra öz suyu içerisinde 24 saat bekletildi. 14
- Şekil 3.2.1** Örneklerin Agaroz jel görüntüsü 18
- Şekil 3.3.1** Cq ifadesi alınan örneklerin erime pikleri ve eğrileri 20
- Şekil 3.3.2** β -Aktin geni Cq sonuçları 21

ÇİZELGELER

Çizelge 2.3.1 Çalışmada kullanılan çalışma grupları	14
Çizelge 3.2.1 NanoDrop RNA Saflık Miktarları	18
Çizelge 3.3.1 qRT PCR reaksiyonlarında kullanılan miktarlar	29
Çizelge 3.3.2 Ortalama C _q (Quantification Cycle) Değerleri	21



1. GİRİŞ

Bitkilerin adli bilimlerdeki yeri ve önemi her ne kadar sonradan anlaşılrsa da, teknolojinin gelişmesiyle birlikte artmıştır ve hala yeni çalışmalar ile gelişmektedir. Olay yerinden, şüpheliden ya da mağdurdan toplanan bitkisel materyallerin incelenmesi ile suçu çözmeye yardımcı veya destekleyici kanıtlar sağlanması adli botaniğin temel amacıdır. Olay yerinden elde edilen bitki örneklerinin anatomik, fizyolojik, sistematik ve genetik özellikleri incelenerek; suçun muhtemel zaman dilimi, cesedin taşınma ihtimali ve olay yerinin belirlenmesi sağlanır. Böylelikle şüpheli, olay yeri ve maktul üçgeninin ilişkisi sağlanır. Çim bitkisiyle gerek ülkemizde gerekse dünyada yapılan çalışmalara, adli çerçeveden yaklaşım çok kısıtlıdır. Yeryüzünde en çok yayılış gösteren bitkiler çim bitkileri olduğu için olay yerlerinde en çok rastlanabilecek bitkiler de çim çeşitleridir. Bu nedenle; adli botanik biliminin gelişmesi katkı sağlamak amacıyla, araştırmaların bu bitkiler üzerinde yoğunlaşması gerekmektedir.

Çok yıllık çim bitkisi (*Lolium perenne* L.) daha çok ABD ve Avrupa'da olmak üzere dünyanın ılıman koşullarında çim ve yem amacıyla kullanılmaktadır. Japonya, Avustralya ve Yeni Zelanda'da yem bitkisi olarak kullanımı yaygın iken Avrupa'nın ılıman bölgelerinde ise çim amaçlı kullanımı yaygındır (Thorogood 2003). Poaceae familyasına ve alt familya Festucoideae'ye ait önemli bir serin mevsim çok yıllık yem otu türüdür. Doğu Orta ve Güneydoğu ABD, Güney Avrupa ve dünyanın diğer birçok bölgesinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Uzun boylu çayır otları meralarda, spor sahalarında, otoyollarda ve yol kenarlarında yaygın olarak kullanılır (Barnes, 1990). Ülkemizde ise; *Lolium perenne* yüksek nem ve su ihtiyacından dolayı kıyı kesimlerde daha yaygındır. *Festuca arundinacea* Schreb. ise dayanıklılığı ve çevresel koşullara karşı göstermiş olduğu geniş adaptasyonu ile iç kıraç alanlarda yaygın olarak görülmektedir (Anonim 2019).

Çim bitkisi kanıt aramalarında en fazla karşılaşılan bitki türleri arasındadır ve olay yeri ile başka yerler arasında bağlantılar kurma, bir maddeyi şüpheli ile ilişkilendirme, şüphelilerin suç mahallinden başka yerde olduğu iddiasının doğruluğunu sağlama potansiyeline sahiptir (Carroll ve ark. 1983). Ancak olası bir olay yerinde bir cesetten açığa çıkacak sıvıların bitki morfolojisini ve bitki gen ifadesini nasıl etkileyeceği bilinmemektedir.

Aktin proteini bitkilerde; bir gen ailesi tarafından kodlanan, bitki sitoiskeletinin fonksiyonu ve yapısı için hayati önem taşıyan bir proteindir (Šljajčeroová ve ark. 2012). Bitkide bir dejenerasyon söz konusu olduğunda, aktin proteinlerinin yıkılması ve bitki iskelet bütünlüğünün bozulacağı düşünülmektedir. Farklı vücut sıvıları olan, kan, idrar ve safra öz suyu gibi bileşenler, bitki bütünlüğünde bir dejenerasyon meydana getirebilir. Bu çalışmada; bu hipotezden yola çıkılarak; kan, idrar ve safra öz suyuna maruz bırakılan, yaygın çim çeşitlerinin dejenerasyon süreçleri morfolojik olarak ve gen ifadesi düzeyinde incelenmiştir. Bu çalışma adli olaylarda; botanik bilimine, bitkiler açısından bir bakış açısı sunma özelliği nedeni ile ilerleyen çalışmalar için bir referans özelliği taşıyacaktır.

1.2 LİTERATÜR ÖZETİ

1.2.1. Adli Botaniğin Tarihçesi ve Kullanım Alanları

Adli botanik, suçu çözmek için botanik bilgisinin uygulandığı disiplinler arası bir alandır. İnsan varlığının başlangıcından bu yana bitkiler, medeniyetlerinde önemli rol oynamıştır. Hem silah hem de koruyucu olarak kullanılmıştır. Bitkiler ceza davalarının çözümü için kanıt olarak rol oynasa da nispeten yeni bir alandır. Bitkilerin ilk kez bir davada kanıt olarak kullanımı, Charles ve Anne Morrow Lindbergh'in oğlunun kaçırıldığı ve öldürüldüğü 1930'ların ünlü Lindbergh kaçırma davasıyla ilgilidir. Botanikçi Arthur Koehler tarafından sağlanan kanıtlarla Bruno Hauptmann 1935'te mahkum edilmiştir. Koehler, kaçırma davasında kullanılan merdivenin, kısmen Hauptmanns'ın ikamet ettiği çatı katından alınan tahtadan yapıldığını göstermiştir (Tippo ve Stern 1977; Baden 1983; Haag 1983; Lane ve ark. 1990; Graham 1997). Koehler'in kanıtları, ahşabın anatomik özelliklere dayanarak tanımlanması, yıllık büyüme halkalarının eşleştirilmesi ve kereste bahçesinde planya ve bir el düzlemi içeren aletlerle ahşabın üzerine yapılmış benzersiz işaretler içermesidir. Koehler'in sağladığı kanıtların bariz değerleri, gelecekteki adli tıp amaçlı kullanımlara zemin hazırlamıştır. Bu dava, adli botaniğin doğuşuna sebep olmuştur. Adli terminolojide, latince “forensis” kelimesi “mahkeme veya mahkeme için” anlamına gelir. Adli bilim, genellikle adalet amaçlı bilimsel yöntem ve tekniklerin uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Adli bilim, çeşitli başlıklara ayrılmıştır: adli biyoloji, adli antropoloji, adli kimya, adli fizik, adli botanik, adli entomoloji, adli seroloji vb. Adli botanik, mahkemede bitki kanıtlarının kullanılması olarak tanımlanmaktadır. Başka bir deyişle, bir olay yerinde toplanan bitki materyallerinin veya kalıntıların incelenmesi ve bunların suçları veya diğer yasal problemleri çözmek için kullanılması “Adli Botanik” olarak adlandırılabilir. Adli botanik ceza soruşturmasında değerli bir rol oynamaktadır, ancak ceza soruşturmasında yer alan çoğu kişi arasındaki botanik bilgisi eksikliği nedeniyle kullanılmamıştır. Adli botanik yıllar boyunca cezai soruşturmalarda kullanılmamasına rağmen, becerikli

araştırmacılar ve insiyatif sahibi bilim insanları bunu değiştirmeye başlamıştır. Adli botanik, bitki taksonomisi, palinoloji, bitki ekolojisi, limnoloji ve daha yakın zamanda moleküler bitki biyolojisi gibi çeşitli alanlara ayrılmıştır (Lipscomb ve Diggs 1998; Dengler 2002; Aquila 2014).

Adli botanik cinayet kurbanlarında mide içeriğinin incelenmesinde de faydalıdır. Bir kurbanın son yemeğinin içeriğini veya kurbanın yerini belirlemeye yardımcı olabilir. Ölüm zamanının belirlenmesini, cinayet ya da intihar şüphesinin kesinleşmesini sağlayabilir. Bir mağdurun ölüm yerinden taşınması durumunda, bitki analizi, vücuttaki bitki kalıntılarının vücudun bulunduğu bitki örtüsünün veya kurbanın öldürüldüğü başka bir yerin özelliği olup olmadığını belirleyebilir. Gizli mezarların bulunması veya doğadaki bir olay yerinin, yerel ve sıra dışı bitki örtüsünün bilinmesi, olayın gerçekleştiği ortamı tanıyan bitki bilimcilerin uzmanlığını gerektirir (Lipscomb ve Diggs 1998).

Son zamanlarda, bitki biyoteknolojisi, bitki bilimlerinin heyecan verici bir alanı olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji ile çeşitli biyolojik manipülasyon ve yorumlamalar yapılabilir (Chawla, 2002). DNA parmak izi, DNA barkodlama, moleküler markerler gibi teknikler bugünlerde adli vakaları zmek için araştırmacılar tarafından yoğun olarak kullanılmaktadır. Adli botanikte temel olarak tür tespiti, söz konusu bitkinin endemizmi için kullanılır (Chandra ve Sharma, 2014).

Ancak; yapılan literatür taraması göstermiştir ki, günümüzde adli olaylarda bitkiler gibi çevresel faktörler açısından bir değerlendirilme söz konusu değildir veya çok sınırlıdır. Yani; bir olay yerinin çevresel koşulları değerlendirildiğinde; meydana gelen tüm değerlendirmeler ceset bazlı yapılmaktadır. Oysaki olayın çevresinde meydana gelen her parametre değerlendirilmeli ve olayların zm için alternatif bakışlar aranmalıdır.

1.2.2. Adli Çalışmalarda Çim Bitkisi

Adli çalışmalarda botanik biliminin gelişmesi ve çim bitkisiyle yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında Türkiye’de yaygın yayılış gösteren *Lolium perenne* ve *Festuca arundinacea* çim çeşitleri kullanılmıştır.

1.2.3. *Lolium perenne* (Top gun)

Lolium perenne Asya ılıman bölgeleri ile Kuzey Afrika’ya ait bir bitki türüdür. Ülkemiz dahil dünyanın farklı bölgelerinde de görülmektedir. Serin iklim çim türü olmakla birlikte ılıman bölgelerde iyi gelişim gösterir. Gölgeye dayanımı zayıftır. Ekstrem sıcak, soğuk ve kurak ortamlara dayanıksızdır. Nötr ve hafif asidik topraklarda iyi gelişir (pH 5,1- 8,4) (Açıkgöz 1994, Hannaway ve ark., 1999)

Lolium perenne’nin genel özellikleri şunlardır: Çabuk çimlenir ve hızlı yapılanır, alanı kısa sürede kaplar ve yabancı otların gelişmesini önler, yüksek kaliteli, sık dokulu, orta yeşil renkli ve orta derecede ince dokuludur. Renk derecesi 1-9 (1 en düşük, 9 en yüksek) ölçeğinde 6,6 dır. Özellikle yaz ve sonbaharda doku sıklığı oldukça iyidir. Yıl boyu sürdürebildiği adaptasyon yeteneği toprak yüzeyini kaplayan yaşayan bitki sayısı yüzdesi testinden aldığı yüksek notlarla da ispat edilmiştir. Kahverengi yama hastalığı, fusarium yaması, dolar spot ve red thread’in de aralarında bulunduğu pek çok hastalığa karşı en iyi performans gösteren çeşitlerden biridir (Anonim 2019).

1.2.4. *Festuca arundinacea* (Jaguar)

Serin iklim çim türü olan *Festuca arundinacea*; Doğu Orta ve Güneydoğu ABD, Güney Avrupa ve ülkemiz dahil dünyanın bir çok farklı bölgelerinde yetişmektedir. Gölgeye adaptasyonu vardır. Ekstrem sıcak, soğuk ve kurak ortamlara adaptasyon gösterir. pH 3,6-7,7 değerleri arasında gelişebilir (Burton ve Robinson 1952, Açıkgöz 1991).

Festuca arundinacea çiminin özellikleri şunlardır: Sıcağa, kuraklığa, susuzluğa, tuzluluğa ve yıpranmaya karşı çok dayanıklıdır. Yaprak dokusu ince ve koyu yeşil renklidir. Az- Orta -Yüksek, her türlü bakım programına uyum sağlar. En iyi 3,75 cm ile 7,5 cm arasındaki biçim yüksekliğinde performans gösterir. Yavaş boylanır. Çok sık biçim gerektirmez. Hem sıcak hem de serin iklim şartlarına adaptasyonu yüksektir. Tam güneş alan ve parçalı gölge olan alanlar için idealdir. Parçalı gölge alanlarda doku sıklığını korur. Derin kök yapısı sayesinde toprağın alt kesimlerindeki nemli alanlardan faydalanır. Böylece diğer çim türleri kuraklıkla beraber sararırken, Jaguar 4G kurak koşullarda dahi yeşil aksamını uzun süre korur. Kötü topraklara ve hastalıklara karşı toleransı yüksektir (Anonim 2019).

1.2.5. Aktin Proteininin Bitkilerdeki Görevleri ve Kodlandığı Genler

Aktin hücre iskeleti endositoz, hareketlilik, sitokinez, sinyal-cevap bağlanması, organel ve vezikül trafiği dahil olmak üzere hücre fonksiyonlarının bir çoğunda önemli bir rol oynar. Aktinin bu işlemlere tahsis edilmesi, filamentlerin bağlanması-sökülmesi sistemleri, aktin bağlama ve düzenleyici moleküllerin yelpazesinde bulunan plastisiteyi yansıtmaktadır. Sağlıklı bir hücrede, aktin filamentleri, hızlıca büyüyen veya dikenli uçlara tercihen eklenmiş ATP bağlı aktin monomerleri ile polarize bir şekilde birleştirilir. Aktin zayıf bir içsel ATPaz aktivitesine sahiptir ve ATP'nin ADP + Pi'ye hidrolizine, aktin filamentini stabilize eden ve yavaş büyüyen

veya sivri uçtan monomer ayrışmasını teşvik eden bir yapısal değişiklik eşlik eder. Serbest bırakılan ADP'ye bağlı aktin monomerleri daha sonra ABP'ler (aktin bağlayan proteinler) tarafından kolaylaştırılan nükleotid değişimine tabi tutulur ve yeniden şarj edilmiş ATP bobin aktininin sık sık 'koşu bandı' adı verilen döngüsel işleme yeniden girmesini sağlar. Filament demetleme, kopma, kapatma, çapraz bağlama ve monomer sekestrasyonunda korunmuş fonksiyonlara sahip diğer ABP örnekleri bu incelemenin kapsamı dışındadır. Aktin düzeneğinin ve sökme işleminin düzenlenmesi, dış sinyalleri yeniden şekillenme olaylarına bağlayan karmaşık sinyalizasyon sistemlerinin kontrolü altındadır; bu, hücre şeklini veya davranışını yeni çevresel koşullara uyacak şekilde değiştiren hücresel faaliyetlerle sonuçlanır. Son on yılda, aktinin apoptozis/programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar ortaya çıkmıştır (Franklin-Tong ve Gourlay 2008).

Protein seviyesinde bitki aktin izotipleri arasındaki farklar daha yüksektir ve amino asit residüleri, hayvan aktinlerindekiinden daha sıktır ve bu durum, tek tek aktin izotiplerinin bitki dokularında spesifik rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir. İfade analizi, aynı şekilde vejetatif ve üreme aktinlerinin varlığını da ortaya koymuştur (Huang ve ark. 1997).

Moleküler çalışmalar, genel olarak bir vejetatif ve üreme kanadına bölünmüş olan anjiyoperm aktin gen ailesinin yüksek karmaşıklığını ortaya çıkarmıştır. Filogenetik analiz, bitkisel aktinlerin, eğrelti aktinlerle ortak ataları paylaşan daha ilkel bir aktin grubunu temsil ettiğini göstermiştir. Üreme aktin grubunun muhtemelen vejetatif aktinlerden geliştiği, belki de yeni gelişen yapılarda yeni fonksiyonların gerekliliğini yansıttığı öne sürülmüştür (An ve ark., 1999). Bireysel aktin izotiplerinin ayrılma momenti, aktin genlerinin sekanslarındaki karakter ve değişiklik sayısına göre tahmin edilebilir. *Arabidopsis* aktinlerinin filogenetik analizi, vejetatif ve üreme aktin gen gruplarının yaklaşık 350-400 milyon yıl (MY) önce farklılaştığını göstermiştir (Gilliland ve ark., 1998). Bu, bitkilerin su ortamını terk edip karaya çıkıp üreme yapıları geliştirdiği zamana karşılık gelir. ACT11, ilkel ve ileri jimnospermlerin ayrıldığı yaklaşık 220 MY önce üreme izotiplerinin geri

kalanından ayrıldığı öngörülmektedir (Kandasamy ve ark., 1999). Diğer alt sınıfların ise yaklaşık 200 MY önce ayrıldığı düşünülmektedir (An ve ark., 1996a; Gilliland ve ark., 1998; Kandasamy ve ark., 2009). 130-177 MY önce ortaya çıkan çiçekli bitkilerin evrimi ile çakışmaktadır (Specht ve Bartlett, 2009; Smith ve ark., 2010). Bu veriler yeni aktin izotiplerinin rastgele gelişmediğini, kökenlerinin yeni protein ve fonksiyonlara olan ihtiyacı yansıttığını göstermektedir. Aktin gen ailesinin bitki türlerinin birbirleriyle olan farklılaşması ile çakışması benzer şekilde *Populus* (kavak)'ta da izlenebilir (Zhang ve ark., 2010).

Bitki aktin genlerinin sayısı doku karmaşıklığının artmasıyla birlikte arttığından, karmaşık dokulara sahip daha karmaşık bitki organizmalarının daha fazla çeşitlendirilmiş aktinlere ihtiyaç duyduğu varsayılabilir (Bhattacharya ve ark., 2000).



Şekil 1.2.5.1 Genel bir bitki aktin geninin şematik yapısı. Yatay kalın siyah çizgi düzenleyici bölgeyi belirtir. L ve Li sırasıyla lider ekson ve lider introndur. 1-4 sayıları ekzondur ve 1i – 3i sayıları introndur (Šljajčeroová ve ark., 2012).

Bitkilerin aktin hücre iskeletini çevreyi izlemek için biyosensör olarak kullandığına ve bunu polimerizasyon durumundaki değişikliklere dönüştürdüğüne ve bunun morfogenezde değişikliklere neden olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Bitkiler muhtemelen stresi izlemek için bir sensör olarak aktin kullanır, bunu polimerizasyon durumundaki değişikliklere dönüştürür, yeterince büyük ve yeterince uzun bir süre boyunca tutulursa, PCD (programmed cell death/programlı hücre ölümü)'yi tetikler. ROS (Reaktif oksijen türleri) ve aktinin bitkilerde PCD'de anahtar rol oynadığına dair geniş bir kanıt olmasına rağmen, maya ve hayvan hücrelerinde kesin olduğu düşünülen bu bağlantıya zıt olarak, literatürde ROS (reaktif oksijen türleri) arasında olası bir ilişki olduğunu gösteren kanıt

bulunmamıştır Orrenius (2007), Bethke ve Jones (2001), Torres ve ark., (2006), Madeo ve ark. (1999), Eisenberg ve ark., (2007), Franklin-Tong ve Gourlay (2008).

1.2.6. Farklı Vücut Sıvılarının Özellikleri

Bu çalışmada; farklı vücut sıvıları olarak kan, idrar ve safra öz suyu çözeltisi kullanılmıştır.

i. İdrar

Asidik bir sıvı olan idrar; vücutta mineral ve diğer maddelerin dengesinin sağlanmasında etkilidir. Vücutta olması gerekenden fazla olan veya vücuda zararlı olan maddeler idrar yolu ile dışarı atılır. İdrar, içinde erimiş ya da süspansiyon durumunda bulunan birçok maddeyi uzaklaştırır. Aynı zamanda idrar (alınan besine bağlı olarak) 5,0 – 8,0 pH değerliği arasındadır (<https://www.florence.com.tr/normal-tam-idrar-testi-tit-degerleri-nedir>).

ii. Kan

Kan; plazma ve kan hücrelerinden oluşan temel bir vücut sıvısıdır. Plazma, kanın hacminin %55'ini oluşturmaktadır. Plazmanın %90'ı sudan oluşur ve geriye kalan bölümü organik ve inorganik maddeler olan plazma proteinleri, aminoasitler, karbonhidratlar, yağlar, hormonlar, üre, ürik asit, laktik asit, enzimler, antikorlar, sodyum, potasyum, iyot, demir, bikarbonat gibi elementlerden oluşmaktadır (<http://www.hematoloji.org.tr/content.php?gid=20#1>).

iii. Safra

Pankreatik çözelti, laboratuvar ortamında hazırlanmış içeriğinde karaciğerden salgılanan enzimler ve safra tuzu bulunan karaciğerden oniki parmak bağırsağına boşaltılan salgiya yakın bir sıvıdır (Kağan Üçok ve ark., 2010).

1.2.7. Gerçek Zamanlı (RT-PCR) PCR

Gerçek zamanlı PCR analizinde hedef DNA parçasının çoğaltılması sırasında floresan boya ile birleşmesi sonucu yaptığı ışıma sayesinde gerçek zamanlı olarak gözlenebilmesi esasına dayanır (Günel 2007, Gibson ve ark., 1996).

Gerçek zamanlı PCR analizinde çoğalan gen bölgesini belirleyebilmek için çeşitli floresan işaretli proplar kullanılır. Bunlardan birkaçı SYBR Green I TaqMan, Light-up, Moleküler boncuktur. Bu propların kullanılması sayesinde PCR çoğaltımı görünür kılınır ve tüm analiz monitörize edilebilmiş olunur (Günel 2007).

Gerçek zamanlı PCR'da floresan boya olarak 'SYBR Green I' kullanılır. SYBR Green I, reaksiyon aşamasında çift zincirli DNA'ya bağlanabilir. DNA tek zincirli hale geldiğinde 'SYBR Green' DNA'dan uzaklaşır. Gerçek zamanlı PCR analizi başlangıcındaki malzemeler DNA molekülü, primerler ve SYBR Green I boyasıdır. Analiz sürecinde primerler bağlanıp uzama başladığında floresan boyanın çift zincirli DNA'ya bağlanması sonucu ışıma yapmaya başlar. Gerçek zamanlı PCR başladığında ışıma zayıftır ancak reaksiyon devamında ise oluşan ürün miktarı ile floresan boyanın DNA zincirine bağlanması sonucunda oluşan ışıma doğru orantılıdır (Günel 2007, Kubista ve ark. 2006).

Gerçek zamanlı PCR yöntemi kapalı tüplü bir sistemde gerçekleştirilir ve numunenin PCR sonrası manipülasyonunu gerektirmez. Bu nedenle, laboratuvarında PCR kontaminasyonu potansiyeli azalır, çünkü yükseltilmiş ürünler reaksiyon tüpleri açılmadan analiz edilebilir ve atılabilir. Bu yöntem, nicel gerçek zamanlı PCR kontrolleri için nicel PCR veya housekeeping genleri için normalleştirme geninin (β -

aktin) kullanımını destekler (Heid ve ark. 1996). Bu yöntem, gen kopyalarının çok doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde nicel ölçümünü sağlar (Günel 2007).

Diğer kantitatif PCR yöntemlerinden farklı olarak, gerçek zamanlı PCR, PCR sonrası örnek işleme gerektirmez, potansiyel PCR ürününün kontaminasyonunu önler ve çok daha hızlı ve daha yüksek verim ile sonuçlanır. Gerçek zamanlı PCR yöntemi, çok geniş bir dinamik başlangıç hedef molekül belirleme aralığına sahiptir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR, son derece kesindir ve mevcut kantitatif PCR yöntemlerinden daha az emek gerektirir (Günel 2007).

Gerçek zamanlı PCR uygulama alanlarına; stres çalışmaları, gen ifadesi çalışmaları, SNP analizleri, metilasyon tespiti çalışmaları, DNA hasar belirleme çalışmaları, tek nokta mutasyon belirlemesi ve patojen saptanması çalışmaları örnek verilebilir (Günel 2007).

"Gen ifadesi" terimi, olgun proteinin, fonksiyonunu yerine getirmek ve hücre fenotipinin ifadesine katkıda bulunmak için, meydana gelen gen aktivasyonundan oluşur. İfade çalışmaları, genel olarak spesifik bir genin haberci RNA (mRNA) seviyelerini saptamaya ve ölçmeye yöneliktir. RNA-bazlı gen ifadesi çalışmalarının geliştirilmesi, birbirinden bağımsız bir şekilde Gall, Pardue, John ve ark., 1969'da, Alwine ve ark. 1977'de; in situ hibridizasyon ile başlamıştır. Ancak bu teknik 1986 yılında Coghlan tarafından uygulanana kadar mRNA'yı tespit etmek için kullanılmamıştır. Günümüzde, RNA'nın miktarının ölçülmesi için daha fazla bilgi sağlayan ve etkinliği yüksek başka teknikler kullanılmaktadır. Günümüzde en yaygın olarak uygulanan teknikler, transkriptom analizi için qPCR, ekspresyon mikrodizileri ve RNAseq'dir (Segundo ve ark., 2016).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışılacak Bitkilerin Belirlenmesi ve Bitki Örneklerinin Temin Edilmesi

Türkiye de geniş yayılım gösteren çim bitkilerinin belirlenebilmesi için, özel tohumculuk firmaları ve merkez araştırma enstitüleri ile irtibata geçilmiştir. En son Ulusoy Tohumculuk'tan; Türkiye'nin kıyı kesimlerinde yaygın olarak görülen *Lolium perenne* türüne ait Top gun çeşidi tohum ile *Festuca arundinacea* türüne ait Jaguar 4G çeşidi tohumlar temin edilmiştir. Tohumlar, oda sıcaklığında, karanlıkta bez torbalarda muhafaza edilmiştir.

2.2. Kullanılacak Vücut Sıvılarının Temini

Dejenerasyona sebep olabileceği düşünülen, vücut sıvılarından en kolay ulaşılabilecek olanlar kan, idrar ve safra öz suyudur. Gazi Üniversitesi Hastanesi, Kan merkezinden, nakil tarihleri geçmiş veya geçmek üzere olan donör kanlarından 500 ml'lik 2 ünite kan temin edilmiştir (Şekil 3.1). İdrar örneği için ise; Gazi Üniversitesi Biyokimya Merkez Laboratuvarından, 12 saatlik bazal metabolizma halindeki idrar örneklerinden alınmıştır. İdrar donörünün; son 6 ay içerisinde enfeksiyon, ateşli hastalık, cerrahi operasyon geçirmemiş, son 15 gün içerisinde antibiyotik, ağrı kesici vb. ilaçlar kullanmamış, sigara ve alkol kullanmayan, kalıtsal bir hastalığı olmayan sağlıklı bir birey olmasına dikkat edilmiştir.

Toz halinde bulunan safra tuzu in vitro ortamda, ddH₂O içerisinde çözülerek kullanılmıştır. Süspanse edilen peptik çözelti, safra öz suyu ile özdeş bir konsantrasyona sahiptir.



Şekil 2.2.1 Kullanılan vücut sıvıları. (Kan örnekleri, safra tuzu)

2.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Bitki yetiştirilmesi doğal ortama en yakın düzeyde gerçekleştirilmiştir. Tarla toprağı, yanmış çiftlik gübresi ve kum 5:1:1 oranında karıştırılarak saksılara konulmuş ve her bir bitki grubu için dörder teknik tekrar olacak şekilde tohumlar toprak yüzeyinden 1 cm derinliğe viyollere ekilmiştir. Microtest bitki büyütme kabininde optimum koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Üç günlük periyotlarla çeşme suyu ile sulanmıştır. Her örneklem grubu için dört teknik tekrar olacak şekilde, her bir viyole ortalama 10 ile 15 tohum ekilmiştir. Bir viyol bir teknik tekrar olarak düşünülmüştür. Çim bitkisinin büyümesi için optimum koşullar; 16 saatlik gündüz periyodunda; 24 °C ve %70 nispi nem, 8 saatlik gece periyodunda 18 °C'dir. 10 ile 15 günlük yetiştirme sürecinin ardından; vücut sıvılarının uygulanması nedeniyle bitkiler farklı kaplara aktarılmıştır. Oluşturulan çalışma grupları **Çizelge 2.3.1**'de verilmiştir.

Çizelge 2.3.1 Çalışmada kullanılan çalışma grupları

Çalışma Grupları	Bitki sayısı	Bitki Çeşitleri	
Kontrol	4 viyolde 4x10	<i>F. arundinacea</i> Jaguar (K)	<i>L. perenne</i> Top Gun (K)
İdrar	4 viyolde 4x10	<i>F. arundinacea</i> Jaguar (1)	<i>L. perenne</i> Top Gun (1)
Kan	4 viyolde 4x10	<i>F. arundinacea</i> Jaguar (2)	<i>L. perenne</i> Top Gun (2)
Karaciğer salgısı	4 viyolde 4x10	<i>F. arundinacea</i> Jaguar (3)	<i>L. perenne</i> Top Gun (3)

Yetiştirilen bitkiler; kan, idrar ve safra öz suyu olan kaplara aktarılmış ve 24 saat boyunca bu sıvılar içerisinde bekletilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda; bitki örnekleri sıvılarda çıkarılarak, yıkanmış, morfolojik gözlemleri yapılmış ve Korkmaz (2002)'a göre hasar indeksleri çıkarılmıştır. Sonrasında sıvı nitrojen ile muamele edilen bitki örnekleri ezilmiş ve RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 2.3.1 Kan, idrar, safra öz suyu içerisinde 24 saat bekletilen örnekler

2.4. RNA İzolasyonu;

Bitkilerin aktin gen ifadesinde bir değişim olup olmadığını; inceleyebilmemiz için ilk adım olarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu Trizol yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir; Trizol yöntemine göre;

- 1) 80°C’de bulunan bitki örneklerinden 100 mg alınarak üzerine 700 ml trizol reagent çözeltisinden eklenmiş ve ara sıra tüp ters düz edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
- 2) RNA izolasyon Protokolü uygulanmıştır.
 - i. 50-100 mg doku üzerine 1 ml Genezol eklendi ve pipetaj yapıldı.
 - ii. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
 - iii. 200 µl Kloroform eklendi ve 10 saniye dikkatlice sallandı.
 - iv. 15.000 rpm 4 °C’ de, 15 dakika santrifüj yapıldı.
 - v. Üst süpernatant yeni tüplere aktarıldı.
 - vi. 1:1 oranında iso-propanol eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı.
 - vii. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
 - viii. 15.000 rpm, 10 dakika, 4 °C’ de santrifüj edildi.
 - ix. Üst süpernatant alındı.
 - x. %70’lik 1 ml etanol eklendi.
 - xi. 15.000 rpm 4 °C’ de, 5 dakika santrifüj yapıldı.
 - xii. Pellete temas etmeden EtOH uzaklaştırıldı, daha sonra 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
 - xiii. 40-60 µl RNaz içermeyen su eklendi.
 - xiv. 55-60 °C’de 10-15 dakika inkübe edildi.
 - xv. Nanodrop ile ölçüm yapıldı.

2.5. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi için cDNA sentez kiti (Biorad RNA örneklerinden cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit) uygulandı. Kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından son hacim 10 µl olacak şekilde her bir örnek için 2 µl alınarak, 4 µl ddH₂O ve yaklaşık 500 ng (~100ng/µl) RNA ile beraber 1 ml'lik ependorf tüplerine eklendi ve Thermo Termalcyler PCR cihazında reaksiyon koşulları 25 °C'de 5 dakika, 46 °C'de 20 dakika ve 95 °C'de 1 dakika olacak şekilde sentezlendi. Sentezlenen cDNA'ların üzerine 90 µl su ddH₂O su eklenerek 1/10 oranında seyreltme yapıldı.

2.6. qRT-PCR Çalışmaları ve Sonuçların Değerlendirilmesi

β-aktin ile qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR analizleri SYBR Green içerikli Thermo master mix kullanılarak Roche Light Cycler Nano cihazında yapılmıştır. Reaksiyonların kalitesi Erime Eğrisi Analizi aracılığıyla da ayrıca değerlendirilmiştir. Çalışma iki tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen verilerde ortalama cq değerleri kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Farklı Vücut Sıvılarına Maruz Kalmış Bitkilerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

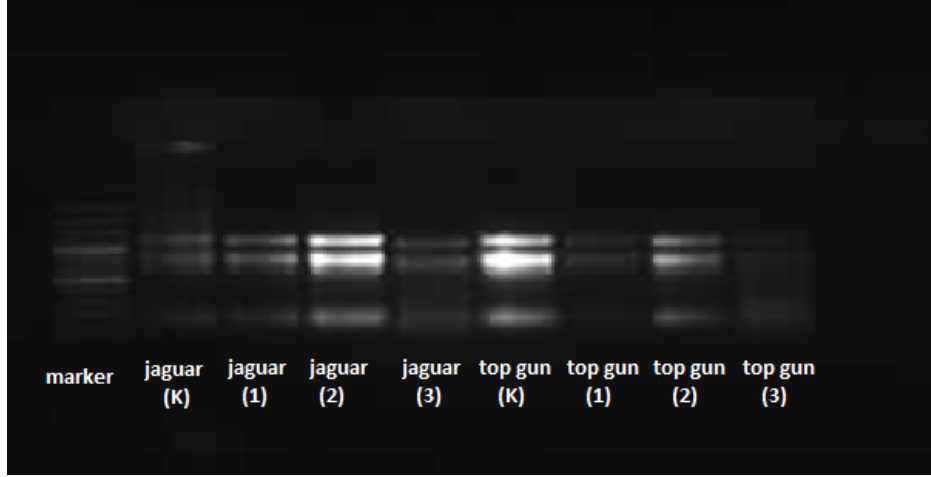
Hasar indekslerine ve morfolojik gözlemlere göre; kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; idrara maruz kalmış *Lolium perenne* (top gun) bitkisinde, renk kaybı ve bitki dokusunda bir yumuşama söz konusudur. *Festuca arundinacea* (jaguar 4g) ise renk kaybı ve doku yumuşaması *Lolium perenne* (top gun) bitkisine oranla daha azdır.

Kana maruz bırakılmış *Lolium perenne* (top gun) bitkisinde; yaprak renginin, daha canlı ve yaprak dokusunun daha sert olduğu gözlenmiştir. *Festuca arundinacea*'de ise kontrol grubundan farklı bir renk değişimi söz konusu olmadığı ancak yaprak sertliği kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kan içeriğindeki bileşenler nedeniyle, yaprak yüzeylerinde sertleşme meydana getirmiştir.

Safra öz suyuna maruz kalan bitkilerde bir renk değişimi gözlenmemiştir. Ancak, yaprak dokusunun yumuşaması ve kırılabilirliği söz konusudur.

3.2. RNA İzolasyonu ve Ürünlerin Kalitesi

İzole edilen RNA örnekleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 30 dakika boyunca yürütülmüş ve Uv-Transilimünatör tarafından görüntülenmiş **Şekil 3.2.1**'deki jel görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 3.2.1 Örneklerin Agaroz jel görüntüsü

RNA'ların agaroz jel üzerinde çift bant olarak gözükmesi RNA kalitesi bakımından beklenen bir durumdur. Bantlardan üstte kalan 28S rRNA'yı, altta kalan 18S rRNA'yı göstermektedir. 8 örneğin jel görüntülerine göre, RNA kalitelerinin iyi ve yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.2.1 NanoDrop RNA Saflık Miktarları

	Örneklerin isimleri	Örnek miktarı (ng/µl)	Saflık miktarı (A260/A280)
1. <i>Festuca arundinacea</i> Jaguar	Jaguar (K)	309,4 ng/µl	2,07
	Jaguar (1)	359,2 ng/µl	2,04
	Jaguar (2)	707,7 ng/µl	2,00
	Jaguar (3)	361,6 ng/µl	1,99
2. <i>Lolium perenne</i> Top gun	Top Gun (K)	1309,2 ng/µl	2,08
	Top Gun (1)	265,1 ng/µl	2,07
	Top Gun (2)	583,8 ng/µl	2,10
	Top Gun (3)	222,1 ng/µl	2,09

RNA örneklerinin kantitatif olarak da miktar ve kalitesini belirlemek için Thermo UV vis nanospektrometer 2000 cihazı kullanılmış ve örneklerin miktarları (ng/ μ l) ve A260/A280 optik dansitesinden elde edilen saflık dereceleri Çizelge 3.'te verilmiştir. Sonuçlara göre; örneklerin RNA miktarları 222,1 ile 1309,2 ng/ μ l arasında değişim göstermektedir. Saflık derecelerine ait sonu ise RNA'da olması gerektiği gibi 1,99 ile 2,10 arasında değişim göstermektedir.

RNA'ların kantitatif ve kantitatif olarak kaliteli olduğundan emin olunduktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinden cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Biorad RNA örneklerinden cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından son hacim 10 μ l olacak şekilde her bir örnek için 2 μ l alınarak, 4 μ l ddH₂O ve yaklaşık 500 ng (~100ng/ μ l) RNA ile beraber 1 ml'lik ependorf tüpleri içerisine eklenmiş ve Thermo Termalcyler PCR cihazında reaksiyon koşulları 25 °C'de 5 dakika, 46 °C'de 20 dakika ve 95 °C'de 1 dakika olacak şekilde sentezlenmiştir. Sentelenen cDNA'ların üzerine 90 μ l su ddH₂O su eklenerek 1/10 oranında seyreltilmiştir.

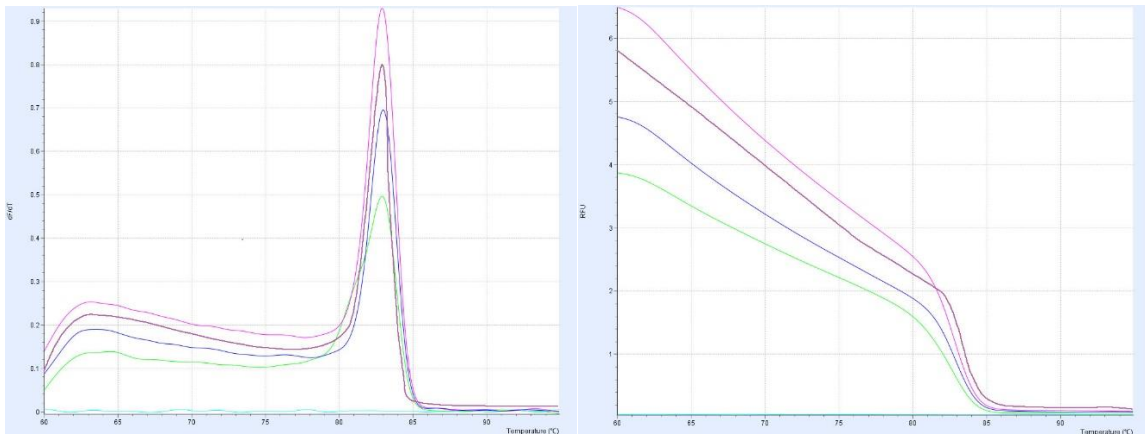
3.3. qRT PCR Sonuçları ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen cDNA'lar ile qRTPCR sentezi Roche Lightcycler Nano cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Promega SYBR Green boyası içerikli master miks kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon koşulları **Çizelge 3.3.1'**de verilmiştir.

Çizelge 3.3.1 qRT PCR reaksiyonlarında kullanılan miktarlar

Bileşen	Konsantrasyon
Thermo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(1X)	5 µl
İleri Primer	0,7 µM
Geri Primer	0,7 µM
cDNA	~200ng/µl
ddH ₂ O	1,6 µl
Toplam hacim 10 µl'dir.	

Reaksiyon koşullarında aktin için optimize edilmiş olan; 95 ° C'de 600 saniye boyunca denatürasyon, 45 döngü boyunca 60 ile 72 ° C aralığında amplifikasyon ve son olarak 60 ile 95 ° C aralığında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değerleri **Çizelge 4.3'** de verilmiştir. Reaksiyon iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçları takiben elde edilen Cq değerlerinin ortalaması alınmıştır.



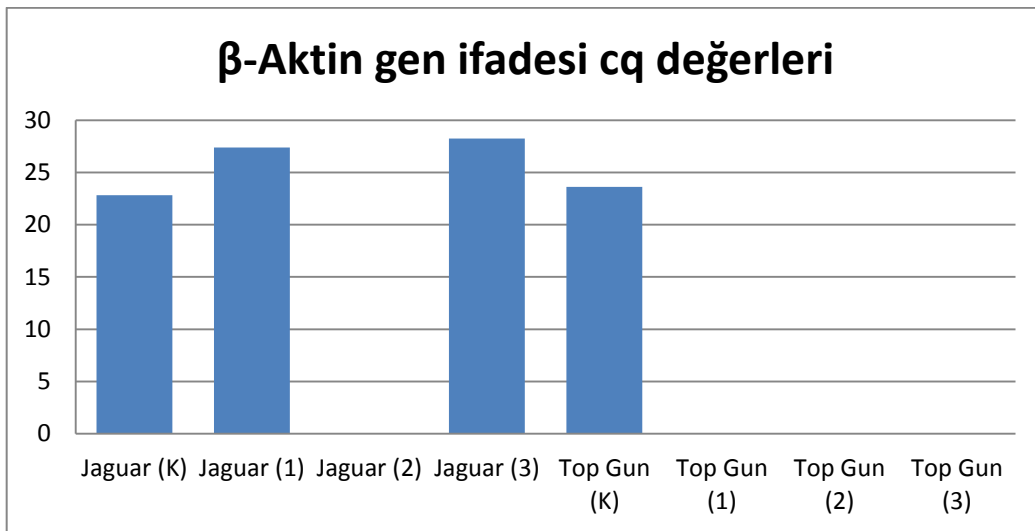
Şekil 3.3.1 Cq ifadesi alınan örneklerin erime pikleri ve eğrileri

qRT-PCR sonucunda elde edilen cq değerleri çizelgede verilmiştir. Jaguar rneklelerinde aktin geni ifadesi bulunduğu anlaşılmış, top gun çeşidinde ise kontrol grubu dışında gen ifadesine rastlanılmamıştır.

Çizelge 3.3.2: Ortalama Cq (Quantification Cycle) Değerleri

Kullanılan rnekleler	B-aktin cq değerleri
Jaguar (K)	22,812
Jaguar (1)	27,381
Jaguar (2)	-
Jaguar (3)	28,241
Top Gun (K)	23,615
Top Gun (1)	-
Top Gun (2)	-
Top Gun (3)	-

Ortalama cq değerleri sonrasında elde edilen grafik aşağıdaki gibidir;



şekil 3.3.2 β-Aktin geni cq sonuçları

Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında; ifade olan örneklerin, gen ifadelerinin düştüğü ve bazı örneklerin hiç ifade göstermediği gözlemlenmiştir. Şekil 3.3.2 incelendiğinde; Jaguar kontrol ve Top gun kontrol olarak adlandırılan örneklerin C_q değerlerinin sırasıyla 22,812 ve 23,615 olduğu görülmektedir. Diğer örneklerden kana maruz kalmış Jaguar bitkisinde gen ifade değeri, 27,381'dir. Idrara maruz kalan jaguar çeşidinde gen ifadesi alınmamışken, safraya maruz kalan örneğin ifade değeri 28,241 olarak tespit edilmiştir. Top gun örneklerinin β -aktin mRNA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubu dışındaki örneklerde gen ifadesi bulunmadığı gözlenmiştir (**Şekil 3.3.2**).



4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Türkiye florasında yaygın olarak görülen çim çeşitlerinden *Lolium perenne* L. ve *Festuca arundinacea* Schreb. bitkilerinin, farklı vücut sıvılarında β -aktin gen ifadesi değişimleri incelenmiştir. β -aktin bitkilerde mikro filamentlerin ve fibrillerin oluşumunda rol oynayan bir proteindir ve bu proteini kodlayan genlerin genel adıdır. Farklı vücut sıvıları (kan, idrar, safra öz suyu) bitkinin hücresel yapısında bir bozunma meydana getirebilir. Bu dejenerasyon sürecinde aktin iplikçiklerinin bozunması ve dolayısıyla gen ifadesinin de bu durumda değişikliğe uğrayabileceği düşünülmüştür. Böylelikle adli yorumlamalarda kullanılmak üzere, hem adli botanik bilimine katkı sağlanması hem de adli botanik biliminde moleküler düzeyden bir bakış açısının kazandırılması hedeflenmiştir.

Farklı vücut sıvılarının kimyasal yapılarından dolayı, bitkide dejenerasyon meydana getirebileceği ve/veya apoptozisi başlatabileceği hipotezinden yola çıkarak, 24 saatli kan, idrar ve safra öz suyu muamelesinden sonra çim bitkileri, morfolojik olarak incelenmiştir ve hasar indeksleri çıkarılmıştır. Hasar indekslerinde Korkmaz (2002) renk değişimi ve yaprak sertliği gibi gözlemlenebilir özellikler değerlendirilmiştir. Yapılan gözlemlere göre; kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; idrara maruz kalmış *Lolium perenne* (top gun) bitkisinde, renk kaybı ve bitki dokusunda bir yumuşama görülmüştür. *Festuca arundinacea* (jaguar 4g) ise renk kaybı ve doku yumuşaması *Lolium perenne* (top gun) bitkisine oranla daha az görülmüştür. Kana maruz bırakılmış *Lolium perenne* (top gun) bitkisinde; yaprak renginin, daha canlı ve yaprak dokusunun daha sert olduğu gözlenmiştir. *Festuca arundinacea*'de ise kontrol grubundan farklı bir renk değişimi söz konusu olmadığı ancak yaprak sertliği kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kan içeriğindeki bileşenler nedeniyle, yaprak yüzeylerinde sertleşme meydana getirmiştir. Ayrıca kanda bekletilmiş örneklerin renkleri, idrar ve safra öz suyuna maruz çim örneklerinden daha parlak olarak değerlendirilmiştir. Bu parlaklığın nedeni de kan içeriğinde bulunan Fe, Mg gibi elementlerin yaprak dokusuna

geçebilmesinden kaynaklanabilir. Safra öz suyuna maruz kalan bitkilerde bir renk değişimi gözlenmemiştir. Ancak, yaprak dokusunun yumuşaması ve kırılabilirliği söz konusudur. Çünkü, kullanılan safra öz suyu *in-vitro* koşullarda hazırlanmış olsa da memeli karaciğerinden salgılanan sıvıyla eş değer özelliklere sahiptir. İlgili sıvı da sindirim enzimleri ve salgıları içerdiğinden bitki yüzeyinde çok düşük düzeyde bir sindirim gerçekleşebilir.

Gen ifadesi çalışmalarına başlamadan önce, gerçekleştirilen RNA sentezi ve cDNA sentezi başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Ancak, *Act* primeri ile yapılan rRT-PCR çalışmalarında, *Festuca arundinacea* türünde gen ifadesi alınırken, *Lolium perenne*'de kontrol grubu haricinde bir gen ifadesi alınamamıştır. Bu durumun nedeni dört şekilde açıklanabilir;

i. Literatürde de belirtildiği gibi, *Festuca arundinacea*'nin, *Lolium perenne* türünden daha dayanıklı olduğunun göstergesi olabilir (Eraşık 2014).

ii. Kan, idrar ve safra öz suyu *Lolium perenne* üzerinde daha fazla dejenerasyon etkisi yaratmış olabilir.

iii. *Lolium perenne* bitkisinin *Festuca arundinacea*'ya göre daha fazla suya gereksinim duymasının bir sonucu olduğu düşünülebilir (Volterrani ve Magni 2004).

iv. Son olarak; kullanılan *act* primeri, *Festuca arundinacea* için uygun gen olmayabilir. Ancak bu hipotezin doğru olabilmesi için kontrol grubunda da gen ifadesi alınmaması gerekirdi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kurulan hipotez doğrultusunda; yaygın görülen iki farklı çim bitkisine, 24 saat boyunca kan, idrar ve safra öz suyu uygulaması yapılmıştır. 24. saatin sonunda bitkiler morfolojik olarak incelendiğinde Top gun olarak isinlendirilen çim çeşidinin daha kırılğan ve hassas olduğu, sıvılardan daha fazla etkilendiği görülmüştür. Literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında, top gun çeşidinin jaguara göre daha hassas olduğu görüşünü desteklemektedir (Eraşık 2014). Bitki çeşitlerini morfolojik olarak en çok etkileyen sıvı asidik yapısından dolayı idrar olarak belirlenmiştir. İdrara maruz kalan her iki türe ait bitki de de yapraklarda dejenerasyon ve renk kaybına rastlanılmıştır.

Safra öz suyuna maruz kalmış çeşitler de ise, bitki dokusunda bir yumuşama söz konusudur ancak, renk kaybı görülmemiştir. Kan ise bitki yaprak yüzeyinde bir sertleşme meydana getirmiştir. Kanda bekleyen örneklerde renk olarak bir parlaklık söz konusudur. Bu durum, kanın yapısında bulunan Mg, Fe gibi elementlerin yaprak dokusuna geçmesinden dolayı olabileceği düşünülmüştür.

Gen ifadesi düzeyinde iki tekrarlı olarak yapılan qRT-PCR sonucunda elde edilen ortalama c_q değerlerine göre, kontrol gruplarında elde edilen c_q değerlerinin beklenen düzeyde olduğu görülmüştür. Diğer bitki örneklerinden kanlı ve safralı jaguar bitkisinde kontrol grubuna göre daha düşük bir gen ifadesi alınmıştır. Top gun bitkisinde ise kontrol grubu hariç hiçbir örnekte gen ifadesi alınamamıştır. Jaguar çeşidinin top gun'a göre daha dirençli bir tür olduğu göz önünde bulundurularak, en çok idrarın bitki dejenerasyonunda etkili olduğu söylenebilir. Morfolojik gözlemler ve gen ifade çalışmaları birbirini desteklemektedir.

Bu çalışmanın gelecekteki çalışmalar için bir ön çalışma olabileceği düşünülmektedir. İlerideki çalışmalar, β -aktin geni dışında dejenerasyonda daha

etkili olabilecek genler ile tekrarlanmalıdır. Örnekleme saatinin 24 saatten daha fazla bir zaman periyoduna çıkarılması, bitkide dejenerasyonun yanısıra apoptozise de neden olabilir. Bu nedenle, bitki dejenerasyonu ve adli olayların yanı sıra, bitki apoptozisi ile de ilgili genler araştırılarak ifade çalışmaları tekrarlanabilir.

İlerleyen çalışmalarda bu yönde bir çalışmanın yapılacak olması adli olayların aydınlatılması bakımından ve bitki doku dejenerasyonu ve apoptozunda vücut sıvılarının etkisinin tam olarak anlaşılmasını sağlayacaktır. Böylelikle, olası bir olay yerinde, cesetten çıkabilecek, kan, idrar, mide öz suyu, safra öz suyu gibi vücutsal sıvıların, olay yerindeki bitkilerde, nasıl bir değişim meydana getirebileceği ön görülebilecek ve olay yeri incelemelerde gerek ölüm zamanı tayini (PMI) gerekse çevresel faktörlerinde değerlendirilmesi için adli botanik açısından farklı bir pencere açacaktır.

ÖZET

Çeşitli Vücut Sıvılarına Maruz Kalmış Çim Bitkisinde β -Actin Gen İfadesindeki Farklılıkların Değerlendirilmesi

Türkiye’de en geniş yayılım gösteren *Lolium perenne* ve *Festuca arundinacea* türleri olay yerlerinde karşılaşma ihtimali en yüksek olan bitkilerdir. Olası bir olay yerinde, vücuttan çıkacak her türlü sıvı ortamın florasını hem morfolojik olarak hem de genetik olarak etkileyecektir. Bu çalışmada bitkilerde mikrofilamentlerin üretilmesinde önemli bir role sahip olan aktin proteinini sentezleyen ve housekeeping gen olan β -actin geninin farklı vücut sıvılarına (idrara, kan, mide öz suyu) maruz bırakılmış yaprak dokularında karşılaştırmalı olarak gen ifadesi farklılıkları qRT-PCR ile incelenmiştir. Multidisipliner bir alan olan adli botanik bilimine, olay yerindeki bitkiler ve moleküler biyoloji perspektifinden bir bakış açısı sunulan bu çalışmada farklı vücut sıvılarının bitkinin dejenerasyon ve apoptosis sürecinde etkili olup olmadığı da incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adli botanik, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*, β -aktin.

SUMMARY

Evaluation Of Differences Of β -Actin Gene Expression in Grass Exposed to Various Body Fluids.

Lolium perenne L. and *Festuca arundinacea* Schreb. are the grass species that have the highest possibility to be encountered at a crime scene as they are the most widespread species found in Turkey. At a probable crime location any fluid that is secreted from a body will have an impact on both morphology and genetics flora of the environment. In this study, the differences in expression levels of B-actin, a housekeeping gene which has important roles in the production of microfilaments in plants, were analysed in leaf tissues exposed to different body fluids (urine, blood, gastric juice, pancreatic solution) by qRT-PCR. The study, which aims to present a different perspective to the multidisciplinary science of forensic botany in respect to the plants around the crime scene and molecular biology, has also focused on the effects of different body fluids during degeneration and apoptosis period on the plant.

Keywords: *Festuca arundinacea*, Forensic botany, *Lolium perenne*, β -actine.

KAYNAKLAR

- AÇIKGÖZ, E (1991). Yem bitkileri. Uludağ Üniversitesi Yayınları, 456s, Bursa.
- AÇIKGÖZ, E (1994). Çim Alanlar Yapım ve Bakım Tekniği Çevre Ltd. Şti. Yayınları:4 Bursa, 1-24.
- ALWINE JC, KEMP DJ, STARK GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12), 5350-5354.
- ANONİM (05.04.2019) <http://ulusoyseed.com.tr/urunler/cim-tohumu-cesitleri/festuca-arundinacea>
- ANONİM (05.04.2019) <http://ulusoyseed.com.tr/urunler/cim-tohumu-cesitleri/lolium-perenne>
- AN YQ, HUAN SR, MCDOWELL JM, MCKINNEY EC, MEAGHER RB (1996a) Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. Plant Cell 8, 15–30
- AQUILA I, AUSANIA F, DI NUNZIO C, SERRA A, BOCA S, CAPELLI A, RICCI P (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: case report and review of literature. Journal of forensic sciences, 59(3), 820-824.
- BADEN MM (1983). Plenary session: The Lindbergh kidnapping revisited: Forensic sci- ences then and now. J. Forensic Sci. 8:1035-1037
- BARNES R F (1990). Importance and problems of tall fescue. In: Kasperbauer, M. J., ed. Biotechnology in tall fescue improvement. Boca Raton, FL; CRC:1–12.
- BETHKE PC, JONES RL (2001) Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. Plant J. 25, 19–29
- BHATTACHARYA D, AUBRY J, TWAIT E C, JURK S. (2000). Actin gene duplication and the evolution of morphological complexity in land plants. J. Phycol. 36, 813–820.

- BURTON GW, ROBINSON, BB (1952). "Tifton" Bermudagrass for Lawns, Athletic Fields and Parks. Georgia Coastal Plain Experiment Station Mimeograph Paper, 78, 1-3.
- CHANDRA R, SHARMA V (2014). Forensic botany: an emerging discipline of plant sciences. Indian Botanists Blog-o-Journal, 1-8.
- CHAWLA HS (2002). Introduction to Plant Biotechnology (2nd edition). New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt Ltd.
- DENGLER N G (2002). An integral part of botany. American Journal of Botany, 89(2), 369-373.
- DJ CARROLL, M CABBELL, JW THORPE, J ROBERTSON (1983). The potential use of isoelectric focusing for the identification and discrimination of grass species on the basis of their seed proteins, J. For. Sci. Socy. 23 297–305.
- EISENBERG T, BUTTNER S, KROEMER G, MADEO F (2007) The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. Apoptosis 12, 1011–1023
- ERAŞIK T. (2014) Yeni Kamışsı Yumak (*Festuca arundinacea*) Çeşitlerinin Akdeniz Ekolojisindeki Çim Kaliteleri Üzerinde Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 62s.
- FRANKLIN-TONG VE, GOURLAY CW (2008). A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. Biochemical Journal, 413(3), 389-404.
- GIBSON UE, HEID CA, WILLIAMS PM. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 6:995- 1001.
- GILLILAND LU, McKinney EC, Asmussen MA, Meagher RB (1998). Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual Arabidopsis actin genes. Genetics 149, 717–725
- GÜNEL T (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 27(5), 763-767.
- GRAHAM S A (1997). Anatomy of the Lindbergh kidnapping. J. Forensic Si. 42:368-377
- HAAG LC (1983). The investigation of the Lindbergh kidnapping case. J. Forensic Sci. 8:1044-1048.
- HANNAWAY DB, FRANSEN S, COOPER J, TEEL M, CHANEY M, GRIGGS T, HALSE R, HART J, CHEEKE P, HANSEN D, KLINGER R, LANE W

- (1999). Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Pacific Northwest Extension Publications: Oregon State University, USA.
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- HUANG SR, AN YQ, MCDOWELL JM, MCKINNEY EC, MEAGHER RB (1997). The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Mol. Biol.* 33, 125–139.
- KANDASAMY MK, McKinney EC, Meagher RB (1999). The late pollen-specific actins in angiosperms. *Plant J.* 18, 681–691
- KORKMAZ A (2002). Amelioration of chilling injuries in watermelon seedlings by abscisic acid. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26: 17-20.
- KUBISTA M, ANDRADE JM, BENGTSSON M, FOROOTAN A, JONAK J, LIND K (2006) The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 27:95-125.
- LANE MA, LC ANDERSON, TM BARKLEY, JH BOCK, EM GIFFORD, DW HALL, DO NORRIS, TL ROST, WL STERN (1990). Forensic botany. *Bioscience* 40:34-39. Lewis, W.H. 1997. Pollen composition in a crashed plane's engine. *J. Forensic Sci.* 42:387- 390
- LIPSCOMB BL, DIGGS JR GM (1998). The use of animal-dispersed seeds and fruits in forensic botany. *SIDA, Contributions to Botany*, 335-346.
- MADEO F, FROHLICH E, LIGR M, GREY M, SIGRIST SJ, WOLF DH, FROHLICH KU (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 145, 757–767
- ORRENIUS S (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab. Rev.* 39, 443–455
- PARDUE ML, GALL JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64(2), 600-604.
- SAN SEGUNDO-VAL I, SANZ-LOZANO CS (2016). Introduction to the Gene Expression Analysis. In *Molecular Genetics of Asthma* (pp. 29-43). Humana Press, New York, NY.

ŠLAJCHEROVA K, FIŠEROVA J, FISCHER L, SCHWARZEROVA K (2012). Multiple actin isoforms in plants: diverse genes for diverse roles?. *Frontiers in plant science*, 3, 226.

SMITH SA, BEAULIEU JM, DONOGHUE MJ (2010) An uncorrelated relaxed-clock analysis suggests an earlier origin for flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5897–5902

SPECHT CD, BARTLETT ME (2009) Flower evolution: the origin and subsequent diversification of the angiosperm flower. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 217–243

THOROGOOD D (2003). *Turfgrass Biology, Genetics and Breeding*, Edited by Michael D. Casler and Ronny R. Duncan, John Wiley and Sons, Inc, USA, 75-100.

TIPPO O, STERN WL (1977). *Humanistic botany*. W.W. Norton & Co., New York.

TORRES MA, JONES JDG, DANGL JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378

ÜÇÖK K, MOLLAOĞLU H, GENÇ A, AKKAYA M, ŞENER Ü (2010) *Safra Sistemi Fizyolojisi Cerrahi Sanatlar Dergisi* ISSN: 1308-0709

VOLTERRANI M, MAGNI S (2004) Species And Growing Media For Sports Turfs In Mediterranean Area. I International Conference on Turfgrass Management and Science for Sports Fields, *ISHS Acta Horticulturae* 661.

ZHANG DQ, DU QZ, XU BH, ZHANG ZY, LI BL (2010) The actin multigene family in *Populus*: organization, expression and phylogenetic analysis. *Mol. Genet. Genomics* 284, 105–119

<https://www.florence.com.tr/normal-tam-idrar-testi-tit-degerleri-nedir> (11.03.2019)

<http://www.hematoloji.org.tr/content.php?gid=20#1> (11.03.2019)

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Gökçe Ogun
Doğum yeri ve tarihi : 02.08.1992 Trabzon
Uyuşu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekar
Yabancı Dil : İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

Lise : Adnan Menderes Lisesi (2010)

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2014)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Disiplinler Arası Adli Bilimler Anabilim Dalı Adli Genetik (2019)

III- Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı Prof. Dr. Sümer Aras, lisans dönemi 2 senelik laboratuvar eğitimi ve çalışması (2011-2013)

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü (2012)

IV- Bilimsel İlgi Alanları Yayınları: (ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

Hacettepe Üniversitesi 4. Ulusal Çevre ve Ekoloji Öğrenci Kongresi (2013) ‘Ağır metal, kuraklık ve UV radyasyonunun bitkiler üzerindeki etkilerinin fizyolojik parametreler ve DNA düzeyinde incelemesi’ poster sunumu

Ankara Üniversitesi Biyoloji Sergisi (2014) ‘Nanobakteri (*Nanobacterium sanguineum*) ve sebep olduğu hastalıklar’ poster sunumu