



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arabidopsis thaliana'DA ABİYOTİK STRES KOŞULLARINDA
GENOMİK DNA METİLASYONU ANALİZLERİ

Burcu ARIKAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Aralık, 2016

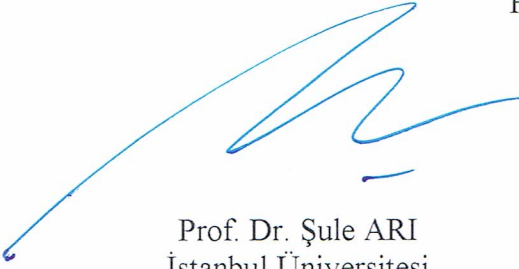
İSTANBUL

Bu çalışma 16.12.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



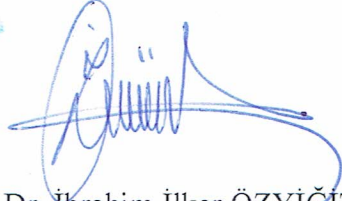
Doç. Dr. Neslihan TURGUT-KARA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



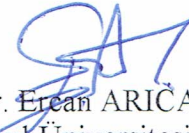
Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 59005 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatım ve tez çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, her türlü bilgi ve tecrübesi ile bana sonsuz destekte ve yardımda bulunan, bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim, çok büyük sevgi ve saygı duyduğum danışman hocam Doç Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında bana laboratuvarlarını açarak HPLC analizlerimi yapmama olanak sağlayan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek analizlerimin her aşamasında bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç Dr. Sibel ÖZDEN'e teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatım ve tez çalışmalarım boyunca bana her zaman yardımda bulunan ve değerli öneriler veren Arş. Gör. Dr. Özgür ÇAKIR'a ve morfolojik analizlerimde yardımda bulunan Arş. Gör. Dr. Cüneyt UÇARLI'ya teşekkür ederim.

Lisans hayatımdan bu yana her zaman desteğini hissettiğim ve çalışmalarım için her türlü imkanı sağlayan başta Bölüm Başkanı Prof. Dr. Nazlı ARDA olmak üzere tüm İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olan, bana her türlü manevi desteği veren ve tez çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım ve meslektaşım Aslıhan ŞENGELEN'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bana yardım eden ve destek olan Yunus AKSÜT, Gizem Gökçen YILMAZ ve tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca hep arkamda olan, her türlü desteği sağlayan ve bana her türlü imkanı sunan annem FİGEN ARIKAN ve babam ATILLA ARIKAN başta olmak üzere bütün aileme çok teşekkür ederim.

Aralık 2016

Burcu ARIKAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. MODEL ORGANİZMALAR	4
2.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
2.2. BİTKİLERDE STRES	7
2.2.1. Biyotik Stres	11
2.2.2. Abiyotik Stres.....	11
2.2.2.1. <i>Tuzluluk Stresi</i>	12
2.2.2.2. <i>Absisik Asit Stresi</i>	13
2.3. EPİGENETİK.....	14
2.3.1. Metilasyon.....	16
2.3.1.1. <i>Bitkilerde Metilasyon</i>	17
2.3.1.2. <i>Metilasyon Belirleme Yöntemleri</i>	20
2.4. HPLC.....	21
2.5. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ	23
2.5.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
3. MALZEME VE YÖNTEM	28
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	28
3.2. BESİYERİ VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI.....	28
3.3. TOHURLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ	29
3.4. KALLUS KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI	29

3.5. STRES UYGULANMASI	29
3.5.1. Tuz Uygulaması	29
3.5.2. Absisik Asit Uygulaması.....	30
3.6. MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ANALİZLER.....	30
3.6.1. Bitki Yaprak Sayısı, Yaprak Yüzey Alanı ve Kök Boyunun Belirlenmesi .	30
3.6.2. Klorofil Miktar Tayini.....	30
3.7. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ.....	31
3.7.1. DNA İZOLASYONU	31
3.7.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları.....	31
3.7.1.2. DNA İzolasyonu	32
3.7.2. DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	33
3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	33
3.7.4. HPLC Öncesi RNaz Uygulaması	34
3.7.5. HPLC Öncesi DNA'ların Saflaştırılması	34
3.7.6. DNA Hidrolizi.....	34
3.7.7. Örneklerin HPLC ile Analizi.....	35
3.7.8. HPLC Standartlarının Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi.....	36
3.7.9. HPLC Sonuçlarının Değerlendirilmesi	36
3.7.10. HPLC Solüsyonlarının Hazırlanması	36
3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	37
3.8.1. Gen Anlatımları Analiz Edilen Genler ve Özellikleri.....	38
3.8.2. RNA İZOLASYONU.....	39
3.8.3. cDNA SENTEZİ	40
3.8.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	40
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	41
4. BULGULAR	42
4.1. TOHURLARIN ÇİMLENMESİ VE KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	42
4.2. STRES UYGULAMASININ MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ ..	44
4.2.1. Tuz Uygulaması	44
4.2.2. Absisik Asit (ABA) Uygulaması.....	48
4.3. HPLC İLE GENOM DÜZEYİNDE METİLASYONUN BELİRLENMESİ	53
4.3.1. DNA İzolasyonu.....	53
4.3.2. HPLC Analizleri.....	54
4.4. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ	56

4.4.1. RNA İzolasyonu.....	57
4.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	62
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ.....	79



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Arabidopsis thaliana</i> (Farmer, 2013).....	5
Şekil 2.2: <i>Arabidopsis thaliana</i> genomundaki genlerin sınıflandırılması (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).....	6
Şekil 2.3: Bitki hücrelerinin strese karşı verdiği cevabın moleküler şeması (Mahajan ve Tuteja, 2005).....	10
Şekil 2.4: Epigenetik mekanizmaların genel şeması (Tarhan ve Turgut-Kara, 2016).....	15
Şekil 2.5: Sitozine metil grubu eklenmesi ile 5-metilsitozin bazı oluşumu.	17
Şekil 2.6: HPLC akış şeması.	22
Şekil 2.7: GZ PZR reaksiyonunun genel olarak özeti, floresan ışımının arka plan ışımını geçmesi sonucu C_t değerine ulaşılması, floresan miktarının sabit değere ulaşmasıyla plato fazına girilmesi, grafikte A örneği B örneğinde daha fazla miktarda ürün içermektedir (Kubista ve diğ, 2006).....	25
Şekil 2.8: GZ PZR reaksiyonu sonucu ürünlerin saptanmasında kullanılan SYBR Green boyası işleyişinin genel özeti (Bio-Resource, 2013).	26
Şekil 2.9: GZ PZR reaksiyonunda hedef diziden farklı bir kalıp olup olmadığı erime eğrisi ile kontrol edilebilir. Şekildeki gibi hedef DNA dizisinden başka kalıp olduğu durumlarda birden fazla tepe noktası elde edilir (Cheow ve diğ., 2015).	27
Şekil 4.1: MS besiyerinde büyüyen 30 günlük <i>A. thaliana</i> bitkileri.	42
Şekil 4.2: 1 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi katkılı MS besiyerinde yaralanan <i>A. thaliana</i> bitki eksplantlarından kallus oluşumu.	43
Şekil 4.3: 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde <i>in vitro</i> kültürlenmiş <i>A. thaliana</i> kallusları.....	43
Şekil 4.4: Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda tuza maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkileri. A, 0 mM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen bitkileri; B, 100 mM konsantrasyonda yetişen bitkileri; C, 150 mM konsantrasyonda yetişen bitkileri; D, 200 mM konsantrasyonda yetişen bitkileri temsil etmektedir.....	44

- Şekil 4.5:** Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda tuza maruz kalan *A. thaliana* kallusları. A, 0 mM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen kallusları; B, 100 mM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; C, 150 mM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; D, 200 mM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları temsil etmektedir.....46
- Şekil 4.6:** *A. thaliana* tüm bitkisine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimler. A; yaprak sayısındaki değişimleri; B, yaprak yüzey alanındaki değişimleri; C, kök uzunluğundaki değişimleri; D, klorofil miktarlarındaki değişimleri göstermektedir.47
- Şekil 4.7:** Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda ABA'ya maruz kalan *A. thaliana* bitkileri. A, 0 µM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen bitkileri; B, 5 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri; C, 15 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri; D, 25 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri; E, 35 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri temsil etmektedir.49
- Şekil 4.8:** Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda ABA'ya maruz kalan *A. thaliana* kallusları. A, 0 µM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen kallusları; B, 5 µM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; C, 15 µM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; D, 25 µM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; E, 35 µM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları temsil etmektedir.....50
- Şekil 4.9:** *A. thaliana* tüm bitkisine farklı konsantrasyonlarda ABA uygulanması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimler. A; yaprak sayısındaki değişimleri; B, yaprak yüzey alanındaki değişimleri; C, kök uzunluğundaki değişimleri; D, klorofil miktarlarındaki değişimleri göstermektedir.52
- Şekil 4.10:** NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....53
- Şekil 4.11:** NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* kalluslarından izole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....54
- Şekil 4.12:** NaCl ve ABA uygulaması yapılan Arabidopsis bitki ve kalluslarında genomik DNA metilasyonu değişiminin gösterilmesi.55
- Şekil 4.13:** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 5-mdC standartlarının kalibrasyon eğrisi.56
- Şekil 4.14:** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 2-dG standartlarının kalibrasyon eğrisi.56
- Şekil 4.15:** NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....57
- Şekil 4.16:** NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* kalluslarından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....57

- Şekil 4.17:** GZ-PZR analizleri sonucunda *MET1* ve *Pol IV* genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım düzeylerinin değişiminin grafiksel olarak gösterimi.58
- Şekil 4.18:** GZ-PZR analizleri sonucunda *Pol V* ve *DRM2* genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım düzeylerinin değişiminin grafiksel olarak gösterimi.59



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Abiyotik ve biyotik stres koşulları.....	8
Tablo 3.1: Deoksiribonükleozidlerin analizi için kullanılan kromatografik koşullar. ...	35
Tablo 3.2: Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan genler ve özellikleri.	38
Tablo 3.3: Gen anlatımı analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri (Naydenov ve diğ., 2015).	39
Tablo 3.4: cDNA sentez reaksiyonunun bileşenleri.....	40
Tablo 3.5: cDNA sentez reaksiyonunun koşulları.	40
Tablo 3.6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri.	41
Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.....	41
Tablo 4.1: Farklı NaCl konsantrasyonlarının morfolojik olarak etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.....	48
Tablo 4.2: Farklı ABA konsantrasyonlarının morfolojik olarak etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.....	53
Tablo 4.3: Arabidopsis bitki ve kalluslarına NaCl uygulaması sonrasında <i>MET1</i> , <i>Pol IV</i> , <i>Pol V</i> ve <i>DRM2</i> genlerinin anlatımlarındaki değişimlerin aktin genine göre rölatif katsayıları.	60
Tablo 4.4: Arabidopsis bitki ve kalluslarına ABA uygulaması sonrasında <i>MET1</i> , <i>Pol IV</i> , <i>Pol V</i> ve <i>DRM2</i> genlerinin anlatımlarındaki değişimlerin aktin genine göre rölatif	60

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
C ₂ H ₄ O ₂	: Asetik Asit
CH ₃ COONa	: Susuz Sodyum Asetat, “Sodium Acetate Anhydrous”
CO ₃	: Karbonat
cm	: Santimetre
g	: Gram
H	: Hidrojen
HCl	: Hidroklorik Asit
K	: Potasyum
KH ₂ PO ₄	: Monopotasyum fosfat
L	: Litre
M	: Molar
Mb	: Megabaz
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
NaAc	: Sodyum Asetat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
Se	: Selenyum

SO₄	: Sülfat
U	: Ünite
V	: Volt
ZnCl₂	: Çinko Klorür

Kısaltmalar	Açıklama
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik Asit
5-mdC	: 5-metil-deoksisitidin
ABA	: Absisik Asit
CMT3	: Kromometilaz3
CTAB	: “Cetyltrimethylammonium Bromide”
DAG	: Diaçilgliserol ya da digliserid
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dnmt1	: DNA (sitozin-5-) metiltransferaz 1
dNTP	: Deoksinükleotid
DRM	: “Domains Rearranged Methylase”
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
EtOH	: Etil Alkol
g	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
HPLC	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi, “High Pressured Liquid Chromatography”
InsP	: İnositol Fosfat
IP₃	: İnositol Trifosfat
LC	: Sıvı Kromatografisi, “Liquid Chromatography”,
MET1	: Metiltransferaz 1
MS	: Murashige ve Skoog
MSAP	: Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLC	: Fosfolipaz C
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
Pol IV	: RNA Polimeraz IV
Pol V	: RNA Polimeraz V
RdDM	: RNA-aracılı DNA Metilasyonu

RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı, 'Rotation per minute'
TAE	: Tris-asetat EDTA
TE	: Tris-EDTA
UV	: Ultra Viyole
yy	: Yüzyıl



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arabidopsis thaliana'DA ABİYOTİK STRES KOŞULLARINDA GENOMİK DNA METİLASYONU ANALİZLERİ

Burcu ARIKAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Bitkiler doğada sıklıkla abiyotik strese maruz kalır. Bu durum bitki gelişimini ve verimini büyük ölçüde etkiler. Özellikle tuzluluk gün geçtikçe tarım arazilerini kullanılamaz hale getirmektedir. Bu durum hızla artan dünya nüfusuna karşılık açlık tehdidi oluşturmaktadır. Bu nedenle, bitkilerin değişen çevre koşullarına ve strese verdikleri cevapların moleküler mekanizmalarının anlaşılması ile strese dayanıklı bitkiler geliştirilerek tarımın sürdürülebilirliği sağlanmalıdır.

Bu tez çalışmasında, *Arabidopsis thaliana* bitki ve kalluslarına *in vitro* koşullarda NaCl ve ABA uygulaması yapılmış, bitki ve kallusların verdiği morfolojik, fizyolojik ve moleküler cevaplar incelenmiştir. NaCl ve ABA'nın global DNA metilasyonu ve stres sonucu epigenetik modifikasyonlarda önemli olduğu bilinen *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatım düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

NaCl ve ABA uygulaması sonucunda *Arabidopsis* bitkilerinin morfolojik olarak etkilendiği gözlenirken, kalluslarda morfolojik bir değişim gözlenmemiştir. Bitkilerin yaprak sayıları, yaprak yüzey alanları, kök boyları ve klorofil miktarları da incelenmiş ve stres koşullarının bitki gelişimini etkileyerek bütün parametre değerlerinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerde stres koşulları altındaki fenotipik değişimlerin DNA dizi varyantlarına ek olarak DNA metilasyonu, kromatin modifikasyonları ve siRNA aracılı mekanizmalar gibi epigenetik modifikasyonlara da bağlı olduğu bilinmektedir. Bu alışmada NaCl ve ABA uygulaması sonucunda bitki ve kalluslardan izole edilen DNA'ların hidroliz edilmesiyle oluşan deoksiribonkleozidler HPLC ile analiz edilmiştir. HPLC analizleri sonucunda NaCl uygulamasının bitki ve kalluslarda hipometilasyona neden olduğu belirlenirken; ABA uygulamasının genomik metilasyonda bir değişim yaratmadığı görülmüştür.

NaCl ve ABA uygulaması sonucunda epigenetik mekanizmalarla ilişkili oldukları bilinen *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatımları gerçek zamanlı PZR ile incelenmiştir. NaCl ve ABA'nın gen anlatımı üzerindeki etkileri arasında anlamlı farklılık yoktur. En belirgin farklılık hem bitki hem de kallus örneklerinde NaCl uygulamasında *Pol IV* anlatımında artış, *DRM2* geni için ise ABA uygulamasında bitki örneklerinde artıştır.

ABA ve NaCl uygulaması sonucunda bitki ve kalluslardaki morfolojik, fizyolojik ve moleküler analizlerden elde edilen bilgilerin epigenetik temelli stres mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Aralık 2016, 95 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, NaCl, ABA, HPLC, gen anlatımı.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ANALYSIS OF GENOMIC DNA METHYLATION ON *Arabidopsis thaliana* UNDER THE ABIOTIC STRESS CONDITIONS

Burcu ARIKAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

In nature, plants are frequently exposed to abiotic stress. This situation greatly affects plant growth and yield. Especially, salinity makes the agricultural lands unavailable day by day. This poses a hunger threat contrary to rapidly increasing world population. For this reason, the sustainability of agriculture should be ensured by developing stress-tolerant plants with the understanding of molecular mechanisms of the responses given to diverse environmental conditions and stress.

In this thesis study, after application of NaCl and ABA *in vitro* to *Arabidopsis thaliana* plants and calli, the morphological, physiological and molecular responses were investigated. The effects of NaCl and ABA on the expression levels of *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* and *DRM2* genes, which are known to be important in global DNA methylation and stress-related epigenetic modifications, have been studied.

While *Arabidopsis* plants were morphologically affected as a consequence of NaCl and ABA application, it was observed that there was no morphological change in calli. Leaf numbers, leaf surface areas, root lengths and chlorophyll contents of the plants were analysed and it was determined that stress conditions caused all parameters to decrease by affecting plant development.

It is known that, phenotypic changes under stress conditions in plants are also dependent on epigenetic modifications such as DNA methylation, chromatin modifications and siRNA mediated mechanisms in addition to DNA sequence variants. In this study, deoxyribonucleosides formed by the hydrolysis of DNA isolated from plants and calli exposed to NaCl and ABA were analysed by HPLC. As a result of HPLC analysis, it was determined that while NaCl application caused hypomethylation in plants, ABA application did not make a change in genomic methylation.

After application of NaCl and ABA, expressions of *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* and *DRM2* genes that are known to be related with epigenetic mechanisms, have been investigated by real time PCR. There is no significant difference between the effects of NaCl and ABA on gene expression. The most obvious difference is the increase in expression of *Pol IV* after NaCl application in both plant and calli samples and for the *DRM2* gene is the increase in plant samples after ABA application.

Informations obtained from morphological, physiological and molecular analysis in plants and calli as consequence of NaCl and ABA application, are considered to help understanding of epigenetic-based stress mechanisms.

December 2016, 95 pages.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, NaCl, ABA, HPLC, gene expression.

1. GİRİŞ

Bitkiler hareketsiz canlılar oldukları için doğada maruz kaldıkları tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak gibi abiyotik stres koşullarından ya da patojen enfeksiyonu ve herbivorlar gibi biyotik stres koşullarından kaçamazlar (Suzuki ve diğ., 2014). Hızla artan dünya nüfusuna karşılık kuraklık ve tuzluluk gibi olumsuz çevre şartları da çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olarak bitki gelişimini ve ürün verimini önemli ölçüde etkilemektedir (Wang ve diğ., 2001; Ngara ve Ndimba, 2014). Tuzluluk bitkilerin doğada en çok maruz kaldığı stres çeşididir ve bu sebeple 15 yıl içinde tarım arazilerinin %30'unun ekilemez hale geleceği tahmin edilmektedir (Heidari ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2003).

Model organizmalar dünyadaki biyoçeşitliliğin çok küçük bir kısmını oluşturmalarına rağmen onlarla yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular sahip olduğumuz temel biyoloji bilgisinin oluşmasını sağlamıştır. Günümüzde insan hastalıklarının araştırılmasında *Mus musculus*, *Danio rerio* ve *Drosophila melanogaster* yaygın olarak kullanılırken; bitkilerde ise *Arabidopsis thaliana* (Fare kulağı teresi), *Zea mays* (Mısır), *Medicago truncatula* (Yonca), *Oryza sativa* (Çeltik), *Nicotiana tabacum* (Tütün) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, diğer bitkilerle karşılaştırıldığında genetik mühendisliği uygulamalarının daha kolay uygulanabildiği *Arabidopsis thaliana* model organizması kullanılmıştır.

Epigenetik değişimler, DNA'da ve DNA ile etkileşim halinde olan proteinlerde gerçekleşen geri dönüşümlü kimyasal modifikasyonlardır. Bu değişimler, DNA baz dizisinde herhangi bir değişim yapmadan organizmanın fenotipini değiştirebilir (Hirsch ve diğ., 2012). Epigenetik mekanizmalar gen anlatımını doğrudan ya da dolaylı yollar ile etkileyebilirler. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin düzenlenmesi ve küçük RNA'lar başlıca epigenetik modifikasyonlardır. Bu epigenetik mekanizmalar sadece genomun kodlama yapan bölgesini değil kodlama yapmayan DNA dizilerini de kontrol ederler; böylece genom kararlılığı sağlanır (Dupont ve diğ., 2009). DNA metilasyonu en yaygın epigenetik modifikasyondur. Bitki genomlarının diğer ökaryotik

genomlara göre çok daha fazla metilasyona uğradığı bilinmektedir. Bitki genomlarındaki tüm sitozinlerin %6 ila 25'i metillenmiş durumdadır; ancak bitkilerdeki sitozin metilasyonu sabit değildir (Sahu ve diğ., 2013). Metilasyon, gelişim aşamasında ya da çevre koşullarına bağlı olarak değişebilir (Grant-Downton ve Dickinson, 2005). Genel olarak sitozin metilasyonunda yer alan enzimler üç ana gruba ayrılır: Metiltransferaz1 (MET1), kromometilaz3 (CMT3) ve DRM ("Domains Rearranged Methylase"). DNA metilasyonu aynı zamanda RNA aracılı ("RNA-directed DNA Methylation", RdDM) olarak da gerçekleşebilir. RdDM yolağında RNA Polimeraz IV (Pol IV) ve RNA Polimeraz V (Pol V) enzimleri görev alır.

Global metilasyon, genomik DNA'da bulunan metillenmiş sitozinlerin oranı olarak tanımlanmaktadır ve çeşitli organizmaların çevresel değişimlere verdiği cevapların ortaya konmasında epigenetik değişimlerin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Santoyo ve diğ., 2011). Yapılan çalışmalar sonucunda RNA-aracılı DNA metilasyonunun, özellikle bitkilerde abiyotik strese cevapla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Chinnusamy ve Zhu, 2009a). Günümüzde DNA metilasyonunun saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlara; yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), metilasyon-duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP), bisülfid dizileme, kapiller elektroforez, sıvı kromatografisi (LC) ve kütle spektrometrisinin (MS) beraber kullanımı örnek olarak verilebilir (Wagner ve Capesius, 1981; Hajkova ve diğ., 2002; Lu ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2013). HPLC yöntemi, DNA metilasyonu belirlenmesinde en güvenilir ve hassas tekniklerden biridir. Bu yöntem; DNA'nın nükleotidlere, nükleozidlere ve bazlara kadar parçalanmasını ve ayrılmasını içerir.

Hücredeki ya da organizmanın çevresindeki koşulların değişmesi genlerin anlatımlarının değişmesine de neden olur. Genlerin ne kadar anlatım yaptığının belirlenmesi, hücrede hangi metabolik yolların ne kadar çalıştığını yorumlayabilmemize olanak sağlar. Gen anlatımının belirlenmesinde Northern melezleme, gerçek zamanlı PZR, DNA mikrodizilimi, yeni nesil dizileme gibi yöntemler kullanılabilir. GZ PZR, çok hassas bir tekniktir; her PZR döngüsü sonucunda çoğalan hedef DNA miktarı anlık olarak belirlenir.

Bu tez çalışmasında öncelikle Arabidopsis bitki ve kalluslarına NaCl ve ABA uygulaması yapılarak morfolojik ve fizyolojik değişimler incelenmiştir. Bunun için bir haftalık Arabidopsis bitkilerine ve kallus kültürlerine 7 gün boyunca 0, 100, 150 ve 200 mM NaCl

ile 0, 5, 15, 25 ve 35 μ M ABA uygulanmıştır. Morfolojik ve fizyolojik deneyler sonucunda belirlenen NaCl ve ABA konsantrasyonları genomik DNA metilasyonu ve gen anlatımı analizlerinde kullanılmıştır. NaCl ve ABA uygulamasının bitki ve kalluslarda genomik DNA metilasyonu üzerindeki etkisi 5-metilsitozin içeriğinin HPLC ile analizi sonucu belirlenmiştir. Metilasyon çalışmalarına ek olarak bitkilerde metilasyon mekanizmalarında yer aldıkları bilinen *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatımları gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. Elde edilen bütün sonuçlar birbiri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz kalan bitkiler genetik potansiyellerine ulaşamadıkları için verimleri de istenilen düzeyde olmaz. Bitkilerin ekin verimini üst düzeye çıkarabilmek için, strese karşı oluşturdukları moleküler cevaplar belirlenerek bitkiler bu koşullara dayanıklı hale getirilmelidir. Epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasının ekin miktar ve kalitesinin arttırılmasında önemli genlerin düzenlenmesi için alternatif bir biyoteknolojik araç olarak hizmet edeceği düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MODEL ORGANİZMALAR

Araştırmacılar, uzun yıllardır yaşamın kökeni ve çok hücreli yaşamın gelişimi hakkında bilgi sahibi olmak için çalışmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, model organizmalar çok uzun yıllardır biyolojik olayların aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Model organizmalar dünyadaki biyoçeşitliliğin sadece küçük bir kısmını temsil etmesine rağmen, sahip olduğumuz biyolojik bilginin oluşmasını sağlamış ve sağlamaya devam etmektedir (Hedges, 2002). Model organizmaların laboratuvar ortamında kolaylıkla üretilebilmesi ve yetiştirilebilmesi, kısa yaşam döngüsüne sahip olmaları, çok sayıda döl vermeleri, genomlarında kolaylıkla genetik değişimler yapılabilmesi tercih edilme nedenlerindedir. Model organizmalardan elde edilen bilgiler, temel biyoloji bilgileri ile temel hücre moleküler mekanizmalarının anlaşılmasını ve genomlarının aydınlatılmasını kolaylaştırmaktadır. Son yıllarda birçok model organizmanın genom dizisinin açıklanması araştırmacılara farklı türler arasında karşılaştırma yapabilme olanağı sağlamıştır (Hedges ve Kumar, 2002).

Günümüzde, model organizmalar biyolojik ve klinik araştırmaların vazgeçilmez öğeleri haline gelmiştir. Özellikle insan hastalıklarının araştırılmasında *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* model organizmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tarım ve sanayi alanlarındaki gelişmeler de model organizmalardan elde edilen temel bilgilerin uygulanması ile mümkün olmaktadır. Bitkilerde de model organizma olarak; *Arabidopsis thaliana* (Fare kulağı teresi), *Zea mays* (Mısır), *Medicago truncatula* (Yonca), *Oryza sativa* (Çeltik), *Nicotiana tabacum* (Tütün) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu türler aynı zamanda çoğu insan popülasyonu tarafından besin olarak da tüketildiği için ayrı bir öneme sahiptir.

2.1.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana 16. yüzyılda botanikçi Johannes Thal tarafından Harz dağlarında (Almanya) keşfedilmiştir ve ilk olarak *Pilosella siliquosa* olarak isimlendirilmiştir.

Birkaç isim değişikliğine uğradıktan sonra bugünkü adını almıştır. Model organizma olarak kullanılabilceğini 90'ların ortalarında ilk ortaya koyan araştırmacı ise Friedrich Laibach olmuştur (Laibach, 1907, Meyerowitz, 2001).



Şekil 2.1: *Arabidopsis thaliana* (Farmer, 2013).

Arabidopsis thaliana, *Brassicaceae* veya hardal ailesinin bir üyesi olan küçük, dikotil bir bitkidir (Şekil 2.1). Turp, lahana, brokoli ve kanola gibi ekonomik olarak önemli bitkilerle yakından akraba olmasına rağmen *A. thaliana* ekonomik önemi olan bir bitki değildir ("The National Science Foundation", 2002). Buna rağmen; 40 yılı aşkın bir süredir genetik, biyokimya ve fizyoloji çalışmalarının ilgi odağı olmuştur. *Arabidopsis*, basit besiyerinde ya da toprakta kolaylıkla yetiştirilebilir. 6-8 haftalık kısa bir yaşam döngüsüne sahiptir ve 6 hafta sonunda tohumu toplanabilir. Aynı zamanda çok sayıda döl verir ve farklı ırklar arasında çaprazlamalara olanak sağlar. *Arabidopsis*'in aynı zamanda çok sayıda mutanı vardır, bu yüzden genlerin ve hücredeki yolların işlevlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Arabidopsis thaliana genomu dizilenen ilk bitkidir. 125 Mb boyutundaki genomunda; haritalandırılmış 5 kromozomu, yaklaşık 27.000 geni vardır. Yapılan dizi analizleri sonucunda genlerinin yaklaşık %50'sinin diğer organizmalarla ortak olduğu belirlenmiştir. *A. thaliana*'nın sahip olduğu genlerin sınıflandırılmasını gösteren grafik Şekil 2.2'de verilmiştir. *Arabidopsis*, aynı zamanda *Agrobacterium tumefaciens* ile gen

çalışma sonucunda gen kodlanan bölgelerin metilasyon adayı olabileceği ortaya konmuştur (Zhang ve diğ., 2006). Ek olarak kodlanan bölgelerde metillenmiş ve sürekli anlatım yapan bazı genlerin daha yüksek düzeyde anlatım yapabildiği belirlenmiştir. Farklı Arabidopsis ekotiplerinde protein kodlayan genlerde metilasyon polimorfiktir (Vaughn ve diğ., 2007). Bu veriler, kodlama yapan bölgelerdeki metilasyonun doğrudan gen anlatımı ile ilgili olmadığını ortaya koymaktadır. Örneğin; promotörlerdeki DNA metilasyonu gen anlatım seviyesini etkileyebilir ve bitki gelişimi için çok önemlidir (Chen ve diğ., 2010). Arabidopsis'in yabani tiplerinden ve siRNA yolağı mutantlarından 21-24 nükleotid uzunluğunda pekçok siRNA klonlanarak dizilenmiştir (Zhang, 2008). Ayrıca Arabidopsis ile yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerdeki genomik damgalamanın ("imprinting") DNA demetilasyonu ile desteklendiği ortaya konmuştur (Hsieh ve diğ., 2009). Arabidopsis'te benzer işlevlere sahip üç farklı metilasyon yolağı karakterize edilmiştir: CpG dizilerinde DNA metilasyonu sağlayan MET1, CpNpG dizilerinde DNA metilasyonu sağlayan bitkilere özel CMT3 ve CpNpN dizilerinde DNA metilasyonu sağlayan DRM1/2 (Zhang, 2008).

2.2. BİTKİLERDE STRES

Bitkilerin büyümesini, gelişimini ve üretkenliğini azaltan her türlü etki bitkilerde stres olarak tanımlanmaktadır (Osmond ve diğ., 1987). Bitkiler doğada tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak, ağır metal gibi abiyotik; patojen (bakteri, mantar ve virüs) enfeksiyonu ve herbivorlar gibi biyotik stres koşullarına maruz kalmaktadır (Suzuki ve diğ., 2014). Abiyotik ve biyotik stres koşulları Tablo 2.1'de listelenmiştir (Mahajan ve Tuteja, 2005).

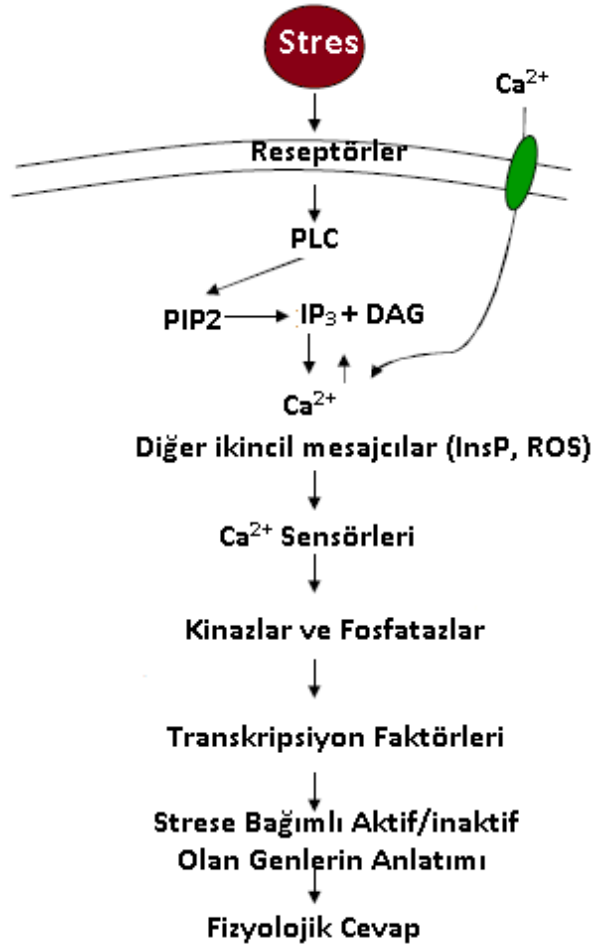
Tablo 2.1: Abiyotik ve biyotik stres koşulları.

Abiyotik Stres
Soğuk (aşırı soğuk ve don)
Yüksek sıcaklık
Tuzluluk
Kuraklık
Sel
Radyasyon (UV ve görünür ışık)
Kimyasallar ve kirlenici maddeler (ağır metaller, pestisitler)
Oksidatif stres (reaktif oksijen türleri)
Rüzgar (rüzgardaki kum ve toz parçaları)
Topraktaki besin eksikliği
Biyotik Stres
Patojenler (virüsler, bakteriler, mantarlar)
Böcekler
Herbivorlar
Kemirgenler

Dünya nüfusunun endişe verici bir hızda artmasıyla 2050 yılı sonuna kadar 9,7 milyarı bulacağı düşünülmektedir (UN DESA, 2015). Hızla artan dünya nüfusuna karşılık kuraklık ve tuzluluk gibi olumsuz koşullar bitki gelişimini kısıtlamakta ve ürün verimini önemli ölçüde düşürmektedir (Ngara ve Ndimba, 2014). 2050 yılına kadar ekilebilir toprak arazilerinin yarısından fazlasının tuzluluktan olumsuz şekilde etkileneceği öngörülmektedir (Wang ve diğ., 2003). Buna ek olarak, abiyotik stres her yıl yüzlerce milyon dolar zarara neden olmakta ve tarım endüstrisinin sürdürülebilirliğini tehlikeye sokmaktadır (Mahajan ve Tuteja, 2005). Artan insan popülasyonunun besin ihtiyacının karşılanması ve tarım endüstrisinin sürdürülebilmesi için olumsuz çevre koşullarına adapte olmuş bitkiler geliştirilmelidir (Vinocur ve Altman, 2005). Bu bağlamda da ilk adım bitkilerin stres koşullarına verdikleri cevapların anlaşılmasıdır.

Bitkiler strese karşı, hüresel olarak cevap verirler, ancak bütün hücrelerin eş zamanlı olarak aynı cevabı vermesi ile organizma düzeyinde yanıt oluşumu sağlanır. Bitkilerin

strese verdiği cevap Şekil 2.3'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Bitkilerde herhangi bir stres altında ilk gerçekleşen olay stres sinyallerinin membran reseptörleri tarafından algılanmasıdır. Hücreye iletilen sinyal; kalsiyum, reaktif oksijen türleri ("reactive oxygen species", ROS) ve inositol fosfatı içeren ikincil mesajcı moleküllerin oluşmasını sağlar. Bu mesajcılar da sitosolik Ca^{2+} seviyesini düzenler. Sitosolik Ca^{2+} seviyesindeki değişim, Ca^{2+} sensörleri tarafından algılanarak fosforilasyon kaskatı oluşur ve stresten sorumlu genler ya da bu genleri kontrol eden transkripsiyon faktörleri hedeflenir. Oluşan ürünler, bitkinin strese karşı dayanıklı hale gelmesini sağlar (Mahajan ve Tuteja, 2005). Aynı zamanda strese bağlı gen anlatımındaki değişimler sonucu ABA, salisilik asit ve etilen gibi hormonların üretimi de gerçekleşebilir. Bu moleküller de strese karşı oluşturulan ilk sinyalin çoğalmasını sağlayarak tekrar ikincil bir sinyal kaskatı başlatırlar.



Şekil 2.3: Bitki hücrelerinin strese karşı verdiği cevabın moleküler şeması (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Bitkilerde stres ile ilgili genleri temel olarak erken ve geç uyarılmış genler olarak ikiye ayırabiliriz. Erken genler, bitkilerin strese karşı oluşturduğu sinyali algıladıktan dakikalar sonra uyarılırken, geç genler sinyali algıladıktan saatler sonra aktif hale gelir. Çeşitli transkripsiyon faktörlerini erken gen grubunda iken; stres cevabından sorumlu genler geç gen grubundadır (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Bitkilerin doğada maruz kaldığı biyotik ve abiyotik stres koşulları genetik potansiyellerine ulaşmalarını engellemekte ve ekin üretkenliğinin kısıtlamaktadır. Bitkilerin stres koşullarına verdikleri moleküler cevapların belirlenmesi ve elde edilen bilgiler doğrultusunda ekin bitkilerinin stres koşullarına karşı dayanıklı hale getirilerek stres koşulları altında ürün veriminin artırılması mümkün olabilecektir.

2.2.1. Biyotik Stres

Bitkiler doğada abiyotik stres kadar bakteri, mantar, virüs gibi patojenler ya da herbivorlar tarafından biyotik strese de maruz kalmaktadır (Atkinson ve Urwin, 2012). Bu durum ürün veriminin düşmesine ve hasattan sonra dağıtım esnasında ürün kaybına neden olmaktadır (Strange ve Scott, 2005; Flood, 2010; Bebbler ve Gurr, 2015). Bitkiler hareketsiz canlılar oldukları ve stres koşullarından uzaklaşamadıkları için çeşitli hormonlar ve metabolitler üreterek kendilerini savunurlar. Yüksek yapılı bitkilerde abiyotik strese karşı sentezlenen sekonder metabolitler sıklıkla biyotik strese karşı da sentezlenmektedir (Mithöfer ve diğ., 2004). Ancak, bitkilerin biyotik strese verdiği cevaplar abiyotik strese oranla daha az anlaşılabilmiştir. Çünkü; ışık, sıcaklık, su gibi abiyotik stres faktörleri kolayca kontrol altına alınabilirken, bitkilere biyotik stres uygulanması ve kontrole alınarak takip edilmesi çok zordur. Ayrıca bitkilerin biyotik strese verdikleri fizyolojik cevaplar da değişkenlik göstermektedir (Balachandran ve diğ., 1997).

2.2.2. Abiyotik Stres

Tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak, ağır metaller ve oksidatif stres bitkilerin doğada en sık maruz kaldığı abiyotik stres koşullarıdır. Bu stres koşulları tarım için çok ciddi tehdit oluşturmakta ve aynı zamanda doğayı da tahrip etmektedir. Dünya çapında ekin kaybının en temel nedeni en başta tuzluluk ve kuraklık olmak üzere abiyotik strestir. Abiyotik stres bitkilerde, çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olarak bitki gelişimini ve üretkenliğini ciddi ölçüde etkiler (Wang ve diğ., 2001). Tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak ve kimyasal kirlilik birincil abiyotik stres olarak değerlendirilirken; oksidatif ve osmotik stres ise ikincil abiyotik stres olarak değerlendirilmektedir (Wang ve diğ., 2003). Tuzluluk, kuraklık, aşırı sıcaklıklar ve oksidatif stres genelde birbiriyle bağlantılıdır ve hücrede iyon dengesini bozarak hücre hasarının ortaya çıkmasına neden olabilir (Zhu, 2001).

Bitkilerin abiyotik strese karşı cevabı stres ile ilgili özel genlerin anlatımlarının düzenlenmesine ya da aktive edilmesine bağlıdır. Bu genler, sinyal iletimi, transkripsiyonel kontrol, membran ve proteinlerin korunması ile serbest radikal ve toksik maddelerin uzaklaştırılmasına kadar stres ile ilgili tüm aşamalarda yer alır. Osmotik, iyonik etkiler, sıcaklık ya da hücre membranındaki değişimler, hücrede ilk

stres sinyalleri olarak algılanır ve hücre homeostasisinin tekrar sağlanabilmesi, hasar görmüş membranın ve proteinlerin onarılması ve korunması için stres cevabının aktifleştirilmesinde görevli sinyal ağının işlemlerini sağlar. Gen anlatımının aktifleştirilmesinde ya da sinyal iletiminde yetersiz cevap verildiği takdirde hücredeki işlevsel ve yapısal proteinler, membranlar geri dönüşümü olmayan şekilde zarar görekerek hücreyi ölüme sürükler (Wang ve diğ., 2003).

Bitkiler, gelişmeye devam edebilmek ve üretkenliklerini sürdürebilmek için stres koşullarına adapte olarak stres tolerans mekanizmaları geliştirmelidir. Stres ile ilgili genlerin anlatımlarının değiştirilmesi ile abiyotik strese karşı daha toleranslı bitkiler geliştirilebilir. Bitkilerin stres toleransının artırılmasında, genel olarak hücre bileşenlerinin yapısını ve işlevini koruması hedef alınır. Ancak pestisit ve herbisitlere direnç gibi monogenik özelliklerin bitkilere aktarılması daha kolay olurken; abiyotik stres gibi genetik olarak karışık cevapların kontrol edilmesi ve düzenlenmesi daha zordur. Günümüzde abiyotik strese karşı yapılan çalışmalar, sinyal iletiminde ya düzenleyici yollarda görevli bir ya da birkaç gen; ya da stres toleransı sağlayan proteinleri kodlayan genler, işlevsel veya yapısal koruyucuların sentezini sağlayan enzimleri kodlayan genlerin aktarılmasına dayanmaktadır. Bitki üretkenliğinin artırılmasında abiyotik stres sinyal iletimi de anlaşılması gereken önemli bir çalışma alanıdır. Ayrıca bu genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde görevli transkripsiyon faktörlerinin ve çeşitli sinyal molekülleri arasındaki iletişimin moleküler mekanizmalarının araştırılması yeni çalışma alanlarının oluşmasını sağlamıştır (Mahajan ve Tuteja, 2005).

2.2.2.1. Tuzluluk Stresi

Tuzluluk bitkilerin doğada en sık maruz kaldığı stres koşullarındandır ve ekin üretimini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Topraktaki tuzluluk suda çözünebilir tuzların katyonlarından (Na^+ , Ca^+ , Mg^{+2}) ve anyonlarından (Cl^- , SO_4^{-2} , CO_3^{-2}) oluşur. Bu çözünebilir tuzların %50-80'ini NaCl oluşturur (Rengasamy, 2010). 15 yıl içinde ekilebilir arazilerin %30'unun artan tuzluluk yüzünden ekilemez hale geleceği tahmin edilmektedir (Wang ve diğ., 2003; Mahajan ve Tuteja, 2005; Heidari ve diğ., 2011). Tarımsal öneme sahip çeltik (*Oryza sativa*), mısır (*Zea mays*), soya fasulyesi (*Glycine max*) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) tuzluluğa karşı oldukça hassas bitkilerdir ve fazla

tuzdan oldukça etkilenirler (Mahajan ve Tuteja, 2005). Hücrede tuzluluk stresi sonucunda Na^+ , K^+ , H^+ ve Ca^+ iyonları arasındaki etkileşim sonucu hücre homeostasisi korunur. Bitki hücrelerinin tuza maruz kalması ile osmotik stres ortaya çıkar; uzun süre tuza maruz kalan bitki hücrelerinde iyonik stres oluşması sonucunda iyonik denge bozulur. Tuza maruz kalan her bitki çevreden Na^+ alır ve diğer hücrelerine, doku ve organlarına iletir (Maathuis ve diğ., 2014). Na^+ akışı membran potansiyelini bozar. Fazla Na^+ hücre metabolizmasına toksik etki yapar, hücrede bazı enzimler çalışamaz hale gelir. Yüksek konsantrasyonlarda Na^+ osmotik dengenin bozulmasına neden olur; bunun sonucunda hücre bölünmesi engellenir ve bitki büyümesi yavaşlar. Aynı zamanda, fotosentezde ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde de azalma gerçekleşir (Niu ve diğ., 1995; Yeo, 1998). Na^+ un bitki gelişimi için zararlı etkisinin aksine; K^+ bitki gelişimi için esansiyel elementler arasındadır. K^+ , stomaların açılıp kapanmasında iş görür, birçok enzimin kofaktörüdür ve ayrıca osmotik dengenin sürdürülebilmesi için gereklidir. Birçok hücre normal koşullarda sitosolünde nispeten yüksek konsantrasyonda K^+ ve düşük konsantrasyonda Na^+ içerir. Birçok K^+ taşıyıcı sistem aynı zamanda Na^+ için de ilgi gösterir ve Na^+ ve K^+ hücre içine girmek için birbirleri ile yarışır. Bu yüzden, hücre dışındaki Na^+ içeriye K^+ alınmasını olumsuz olarak etkiler (Amtmann ve Sanders, 1998; Blumwald ve diğ., 2000).

2.2.2.2. Absisik Asit Stresi

Bitki gelişimi ve büyümesi hormonlar, endojen sinyaller ve dış çevre koşulları tarafından düzenlenir. Absisik asit (ABA), tohum depo protein ve yağlarının sentezlenmesi gibi bitki gelişiminin tarımsal olarak önemli birçok aşamasında önemli bir yere sahip olan; tohum olgunlaşmasından, çimlenmesinden, stomaların açılıp kapanmasından ve aynı zamanda bitkilerin abiyotik strese karşı verdiği yanıtların düzenlenmesinden sorumlu lipofilik bitki hormonudur (Rock, 2000; Finkelstein ve diğ., 2002; Xiong ve Zhu, 2003). ABA, bitkide endojen sinyal molekülü olarak görev yapar ve bekçi hücrelerdeki iyon akışını hızlıca değiştirerek stomaların kapanmasını sağlar. ABA, tohumların sadece uygun koşullarda çimlenmesini sağlayarak stres altında çimlenmeyi engeller. Ayrıca, hücrede stres koşullarına cevaptan sorumlu genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde de görev alır (Leung ve Giraudat, 1998; Finkelstein ve diğ., 2002; Xiong ve Zhu, 2003).

ABA'nın başlıca görevi bitkideki su dengesini ve osmotik stres toleransını düzenlemektir (Zhu, 2002). Özellikle, kuraklık, tuzluluk ve soğuk stresine karşı bitkinin cevap vermesinde ve tolerans göstermesinde ABA'nın önemli olduğu bildirilmiştir. ABA'nın önemi mutantları ile yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Arabidopsis'in *aba1*, *aba2* ve *aba3* isimli mutantları bulunurken; tütün, mısır ve domates bitkilerinin de ABA geni eksik mutantları bulunmaktadır (Koorneef ve diğ., 1998; Liotenberg ve diğ., 1999). Çeşitli ABA mutantları ile yapılan çalışmalar sonucunda ABA geni eksik olan mutantlarda bitkiler stres koşullarından çok daha fazla etkilenmiş, ABA genine sahip bitkilere göre çok daha az gelişim göstermiş ya da ölmüşlerdir (Llorente ve diğ., 2000; Xiong ve diğ., 2001).

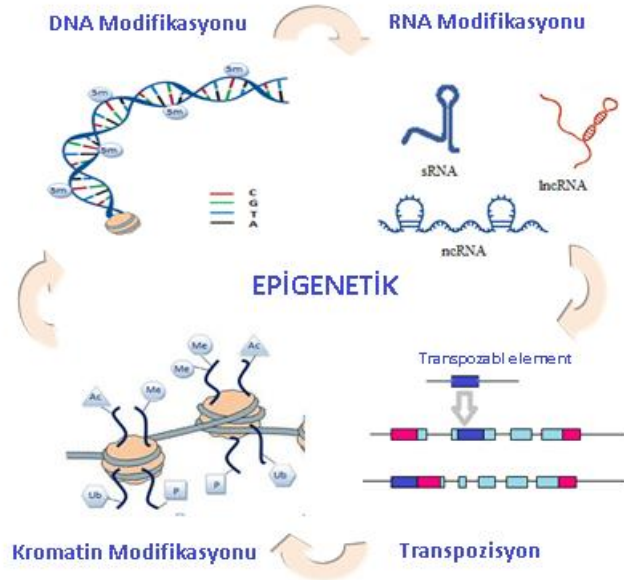
Normal koşullarda bitki hücrelerinde ABA hormonu düşük seviyelerde bulunmaktadır (Xiong ve Zhu, 2003). Bitkiler tuz, kuraklık ve düşük sıcaklık stresine maruz kaldığında ABA biyosentezinde görevli genlerin anlatımları ve sonuç olarak ABA seviyesi artmaktadır. Stres sonucu oluşan sinyaller ve ABA'nın ortak elementlere sahip olması sayesinde bu elementler hücrenin iç dengesini sağlamak için karşılıklı olarak etkileşime girerler (Leung ve Giraudat, 1998). Bitkilere ABA uygulanması stres koşulu etkilerinin oluşumunu sağlayarak sinyal iletimini başlatır. Bu sayede, dışarıdan ABA stresi uygulaması ile tuzluluk, kuraklık ve düşük sıcaklığa karşı bitkinin verdiği moleküler cevap, gen anlatımının değişimi belirlenebilir.

2.3. EPİGENETİK

Epigenetik terimi ilk olarak 1940'lı yılların başlarında Conrad Waddington tarafından ortaya konmuştur. Waddington (1942), epigenetiği 'Genler ve fenotipi oluşturan gen ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri araştıran biyoloji dalı' olarak tanımlamıştır. Daha sonra Griffith ve Mahler (1969) tarafından epigenetik modifikasyonların gen anlatımını düzenlediği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda bir organizmanın fenotipinin belirlenmesinde sadece DNA dizisinin yeterli olmadığı ortaya konmuştur. Organizmanın fenotipinin oluşumunda DNA dizisi ile birlikte epigenetik mekanizmalar da rol almaktadır. Epigenetik değişimler, DNA'da ve DNA ile etkileşim halinde olan proteinlerde gerçekleşen geri dönüşümlü kimyasal

modifikasyonlardır. Epigenetik değişimler, DNA baz dizisinde herhangi bir değişim yapmadan organizmanın fenotipini değiştirebilir (Hirsch ve diğ., 2012).

DNA modifikasyonları, kromatin modifikasyonları ve posttranskripsiyonel mekanizmaları içeren epigenetik mekanizmalar; ökaryotlarda farklılaşma, gelişim ve hücrel homeostasinin sağlanmasında temel oluşturur (Su ve diğ., 2011). Epigenetik mekanizmalar gen anlatımını doğrudan ya da dolaylı yollar ile etkileyebilirler ve transkripsiyon, replikasyon, DNA tamiri, gen transpozisyonu ve hücre farklılaşmasını da içeren neredeyse bütün genetik işlevleri düzenlerler. Çevresel değişimler de epigenetik değişimlere neden olabilir. Epigenetik bilginin nesiller arasında aktarıldığı ve çevresel strese karşı hafıza oluşturduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Bond ve diğ., 2007; Gravitol ve diğ., 2012). Epigenetik modifikasyonlar; Şekil 2.4'te genel olarak gösterildiği gibi temel olarak DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin düzenlenmesi, küçük RNA'lar ve transpozabl elementler tarafından ("transposable elements",TE) kontrol edilir. Epigenetik mekanizmalar sadece kodlama yapan bölgeyi değil, aynı zamanda kodlama yapmayan DNA dizilerini de kontrol ederler. Böylece genom kararlılığını devam ettirilebilir (Dupont ve diğ., 2009).



Şekil 2.4: Epigenetik mekanizmaların genel şeması (Tarhan ve Turgut-Kara, 2016).

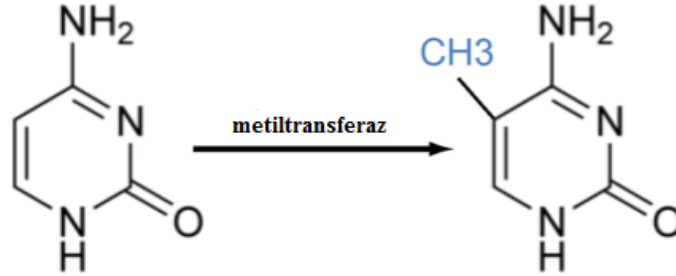
DNA metilasyonu, en yaygın epigenetik modifikasyonlardandır ve gen anlatımının düzenlenmesini sağlar (Bird, 2002). DNA'daki sitozinin 5' konumundaki karbonunun metilasyonu önemli bir epigenetik mekanizmadır. Bitkilerde bu metilasyon genomik kararlılığı, gen anlatımının düzenlenmesini, hücre farklılaşmasını ve bitkilerin strese karşı cevabını etkiler (Finnegan ve diğ., 1998; Chinnusamy ve Zhu, 2009b).

Epigenetik düzenlenme kromatin düzeyinde de gerçekleşir. Kromatin, DNA ve histon oktamerlerinden oluşur. DNA molekülünün histon proteinleri etrafında sarılarak paketlenmesi DNA'nın bazı bölgelerine erişimi engeller; böylece transkripsiyon gerçekleşemez. Histonların N- uçlarında bulunan kuyruk bölgelerinde asetilasyon, metilasyon, demetilasyon, sumolasyon, ubikitinasyon, biyotinilasyon gibi modifikasyonlar gerçekleşir (Chen ve diğ., 2010). Genel olarak asetilasyon, fosforilasyon ve ubikitinasyon gen anlatımının artmasını sağlarken; demetilasyon, biyotinilasyon ve sumolasyon gibi modifikasyonlar ise gen anlatımını baskılamaktadır (Vaillant ve Paszkowski, 2007; Chen ve diğ., 2010). Histon modifikasyonlarının bitki gelişimi ve bitki savunma mekanizmalarındaki önemi yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (Wagner, 2003; Sokol ve diğ., 2007, Chen ve diğ., 2010). Yüksek konsantrasyonlarda NaCl uygulanan soya fasülyelerinde strese karşı cevap verilmesinde histon modifikasyonları ve DNA metilasyonun etkileri belirlenmiştir (Song ve diğ., 2012).

2.3.1. Metilasyon

DNA dizisinde adenin ya da sitozin bakiyelerine metil grubu eklenebilir. DNA'nın bu kimyasal modifikasyonu protein-DNA ilişkilerini etkiler (Finnegan ve diğ., 1998). Bitki ve hayvanlardaki en yaygın DNA modifikasyonlarından biri sitozin bakiyesine metil grubunun eklenmesi ile 5-metil-deoksisitidin (5-mdC) oluşumudur (Şekil 2.5). Bu modifikasyon, nükleotid dizilimini değiştirmeden genetik bilgiye erişime olanak sağlar ya da erişimi sınırlandırır. Metilasyon ile DNA'da meydana gelen değişimler mitotik hücre bölünmesi ile aktarılır (Holliday, 1990). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilir. DNA'nın demetilasyonu ise aktif ya da pasif olarak gerçekleşebilir. DNA demetilasyonu pasif olarak; *de novo* metilasyonun inhibisyonu ya da hücre bölünmesi sırasında genomik damgalamanın aktarılamaması

ile oluşabilir. Aktif demetilasyon ise; DNA'dan metilsitozinlerin glikozilaz aktivitesi ile kaldırılması sonucu meydana gelir (Sahu ve diğ., 2013).



Şekil 2.5: Sitozine metil grubu eklenmesi ile 5-metilsitozin bazı oluşumu.

DNA metilasyonu ilk defa 1963 yılında, bakterilerde gösterilmiş, daha sonra ökaryotlarda gözlemlenmiştir (Gold ve Hurwitz, 1964). Önceleri, *Drosophila melanogaster* genomunda metillenmiş sitozin saptanamadığı için DNA modifikasyonunun ökaryotik organizmaların yaşamında önemli bir yeri olmadığı düşünülüyordu. Günümüzde *Drosophila* DNA'sının da metillenmiş olduğu ve normal gelişimi için gerekli olduğu bilinmektedir (Lyko ve diğ., 2000).

DNA metilasyonu, stres, gelişim, adaptasyon ve morfogenez gibi biyolojik süreçlerde gen anlatımının düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Genom dizileme analizleri sonucunda ökaryotik genomların çoğunda transpozonların ve diğer tekrarlı dizilerin genomun büyük bir kısmını oluşturduğu belirlenmiştir. Aktif halde bulunan transpozonlar protein kodlayan bölgelere girerek normal genomik işlevin yapılmasını engelleyebilir. Ökaryotik organizmalar bu duruma karşı RNA müdahalesi ya da DNA metilasyon mekanizmalarıyla transpozonları susturarak ve hareketsiz hale getirerek cevap verirler (Chen ve diğ., 2010).

2.3.1.1. Bitkilerde Metilasyon

Genom, türlerin özelliklerini ve biyolojik davranışlarını belirleyen ana genetik bilgiyi içerdiğinden kararlı olmalıdır. Genetik rekombinasyon, çevresel dirence karşı organizmanın direncini arttıran yeni gen kombinasyonlarının oluşmasını sağlasa da çevredeki değişim ile aynı hızda olamaz (Boyko ve Kovalchuk, 2008). Bitkiler ise

çevredeki stres koşullarına karşı, kendilerini savunmak için genomlarında epigenetik modifikasyon mekanizmalarını kullanırlar. Bitki genomunda en sık meydana gelen modifikasyonlardan biri de metilasyondur. Bitki genomlarının diğer ökaryotik genomlara göre çok daha fazla metilasyona uğradığı bilinmektedir. Bitki genomlarındaki tüm sitozinlerin %6 ila 25'i metillenmiş durumdadır; ancak bitkilerdeki sitozin metilasyonu sabit değildir (Sahu ve diğ., 2013). Metilasyon, gelişim aşamasında ya da çevre koşullarına bağlı olarak değişebilir (Grant-Downton ve Dickinson, 2005). Stres koşulları altında metiltransferazlar tarafından DNA'nın metilasyonu, genomik DNA'nın değişime uğramasına neden olur (Boyko ve Kovalchuk, 2008). Bitki ve hayvanlarda sitozin öncelikle CpG dizisinde metilasyona uğrarken bitkilerde metilasyonun bu diziler ile sınırlı olmadığı belirlenmiştir (Gruenbaum ve diğ., 1981). Bitkilerde DNA metilasyonu diğer organizmalara göre daha karmaşıktır. DNA metilasyonu, metillenen sitozinlerin 'simetrik' ya da 'asimetrik' bölgelerde olmasına bağlı olarak gruplandırılabilir. CpG ve CpNpG dizileri (N, herhangi bir nükleotid) simetrik metilasyonun gerçekleştiği bölgelerdir. CpNpN dizileri ise asimetrik metilasyonun gerçekleştiği bölgelerdir. Asimetrik metilasyon bölgeleri bitkilerde simetrik metilasyon bölgeleri kadar sık bulunmamaktadır. Genel olarak sitozin metilasyonunda yer alan enzimler üç ana gruba ayrılabilir: Metiltransferaz1 (MET1), kromometilaz3 (CMT3) ve DRM ('Domains Rearranged Methylase'). MET1 enzimi, memelilerdeki Dnmt1 [DNA (sitozin-5-)-metiltransferaz 1] enzimi ile homologdur ve özellikle sentromerik tekrarlar ve transpozonlarda bulunan CpG dizilerinin metillenmesinden sorumludur (Kankel ve diğ., 2003; Chan ve diğ., 2005). CMT3 enzimi, bitkilere özel bir enzimdir ve CpNpG dizilerinin metilasyonunu sağlar. DRM enzimi ise siRNA'larla beraber asimetrik CpNpN dizilerinin metilasyonundan sorumludur (Cao ve Jacobsen, 2002; Zhang, 2008; Sahu ve diğ., 2013).

DNA metilasyonu aynı zamanda RNA aracılı ("RNA-directed DNA Methylation", RdDM) olarak da gerçekleşebilir. RdDM ilk olarak viroidlerle enfekte olmuş tütünde gözlemlenmiştir (Wassenegger ve diğ., 1994). RdDM yoluyla ilgili yapılan çalışmalar sonucunda diğer ökaryotlarda bulunan Pol II ve Pol III'ün aksine bitkilerin Pol IV ve Pol V enzimlerine sahip olduğu ve bu enzimlerin siRNA ile susturma mekanizmalarında yer aldığı belirlenmiştir (Herr ve diğ., 2005; Kanno ve diğ., 2005;

Onodera ve diğ., 2005; Pontier ve diğ., 2005). Pol IV, siRNA üretimi için gerekmektedir; Pol V ise argonat proteini 4'ün (AGO4) kromatine yönlendirilmesine yardımcı olur (Wierzbicki ve diğ., 2008; Wierzbicki ve diğ., 2009).

Global metilasyon, genomik DNA'da bulunan metillenmiş sitozinlerin oranı olarak tanımlanmaktadır ve çeşitli organizmaların çevresel değişimlere verdiği cevapların ortaya konmasında epigenetik değişimlerin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Santoyo ve diğ., 2011). Arabidopsis, ayrıntılı sitozin metilasyon genom haritası oluşturulan ilk organizmadır. Öncelikle metilom, metilsitozin immuno-çöktürmesi (mCIP) ve kutucuklama dizin melezleme yöntemi (“tiling array hybridization method”) ile oluşturulmuştur (Zhang ve diğ., 2006). Hem yabancı tip *Arabidopsis thaliana* genomundaki hem de metilasyon-yetersiz *met1*, *drm1*, *drm2* ve *cmt3* mutantlarının genomlarındaki metillenmiş diziler 35 bp çözünürlükte haritalanmıştır. Haritalama çalışmaları sonucunda bütün genomun %18.9'unun metillendiği belirlenmiştir. Heterokromatin, sentromerik ve perisentromerik bölgelerde yoğun DNA metilasyonu olduğu gözlemlenmiştir (Vanyushin ve Ashapkin, 2011). Daha sonra Arabidopsis genomunda metillenmiş sitozinlerin daha ayrıntılı olarak analizi DNA bisülfid dizileme (BS-Seq, “DNA bisulfite modification”) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sırasıyla CpG, CpNpG ve CpNpN bölgelerindeki genom metilasyon oranları %24, %6.7 ve %1.7 olarak bulunmuştur (Cokus ve diğ., 2008). Üç metilasyon çeşidi de dizi tekrarı zengin olan perisentromerik bölgelerde bulunmaktadır. Ayrıca *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* ve *Zea mays* genomlarında yapılan yüksek ölçekli DNA metilasyon dizilemeleri sonucunda gen kodlayan bölgelerin de metilasyon için aday olabileceği belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2006; Cokus ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2008, Wang ve diğ., 2009a).

Bitki genlerinin promotör bölgelerinin düzenlenme mekanizmalarından biri DNA metilasyonu yolu ile dir. Bu promotör bölgelerindeki metilasyon genellikle CpG bölgelerinde MET1 ve DRM2 enzimlerine bağlı olarak gerçekleşir (Zhang ve diğ., 2006; Berdasco ve diğ., 2008). Pirinç genomundaki metilasyon analizleri sonucunda Arabidopsis promotörlerine oranla pirinç promotörlerinin daha çok metillendiği belirlenmiştir (Li ve diğ., 2008). DNA metilasyonunun genellikle genlerin susturulması ile ilişkili olduğu düşünülürken; Zhang ve diğ. (2006) kodlama yapan

bölgelerdeki metillenmiş devamlı anlatım yapan genlerin (“house-keeping”) daha yüksek seviyede anlatım yaptığını belirtmişlerdir.

Genomda bulunan sitozinlerin metillenmesi, transpozonların susturularak genlerin anlatım yapması ile sonuçlanabilir. Bu durum, bitkilerin çevresel değişimlere verdiği ana epigenetik mekanizmalardandır (Alonso ve diğ., 2016). Yapılan çalışmalar sonucunda RNA-aracılı DNA metilasyonunun, özellikle bitkilerde abiyotik strese cevapla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Chinnusamy ve Zhu, 2009a). Kanamisine maruz bırakılmış *Arabidopsis thaliana* kallusları ile yapılan çalışma, bu kalluslarda çok fazla metilasyon değişimi olduğunu göstermiştir (Bardini ve diğ., 2003). *Lepidium sativum* bitkisi, farklı konsantrasyonlarda Cd (II) (kadmium) ve Se (IV) (Selenyum) abiyotik stres koşullarına maruz bırakılarak global DNA metilasyonu analizleri yapılmış ve belirli konsantrasyona kadar metilasyonun arttığı ancak; belirli konsantrasyondan sonra DNA metilasyonunun azaldığı gözlenmiştir (Yanez ve diğ., 2013).

Bitkilerdeki epigenetik düzenleyiciler hem bitki gelişiminde hem de stres cevaplarının düzenlenmesinde yer aldıkları için farklı ve karmaşıktırlar. Epigenetik alanındaki çalışmalar, epigenetik mekanizmalarla gen anlatımının bitki gelişimi ve stres toleransını nasıl düzenlediğini daha ayrıntılı bir şekilde anlamamızı sağlayacağı öngörülmektedir (Chen ve diğ., 2010). Ayrıca, epigenetik mekanizmaların aydınlatılması ekin miktar ve kalitesinin artırılmasında önemli genlerin düzenlenmesi için alternatif bir biyoteknolojik araç olarak hizmet edeceği düşünülmektedir. (Vanyushin ve Ashapkin, 2011; Graviton ve diğ., 2012).

2.3.1.2. Metilasyon Belirleme Yöntemleri

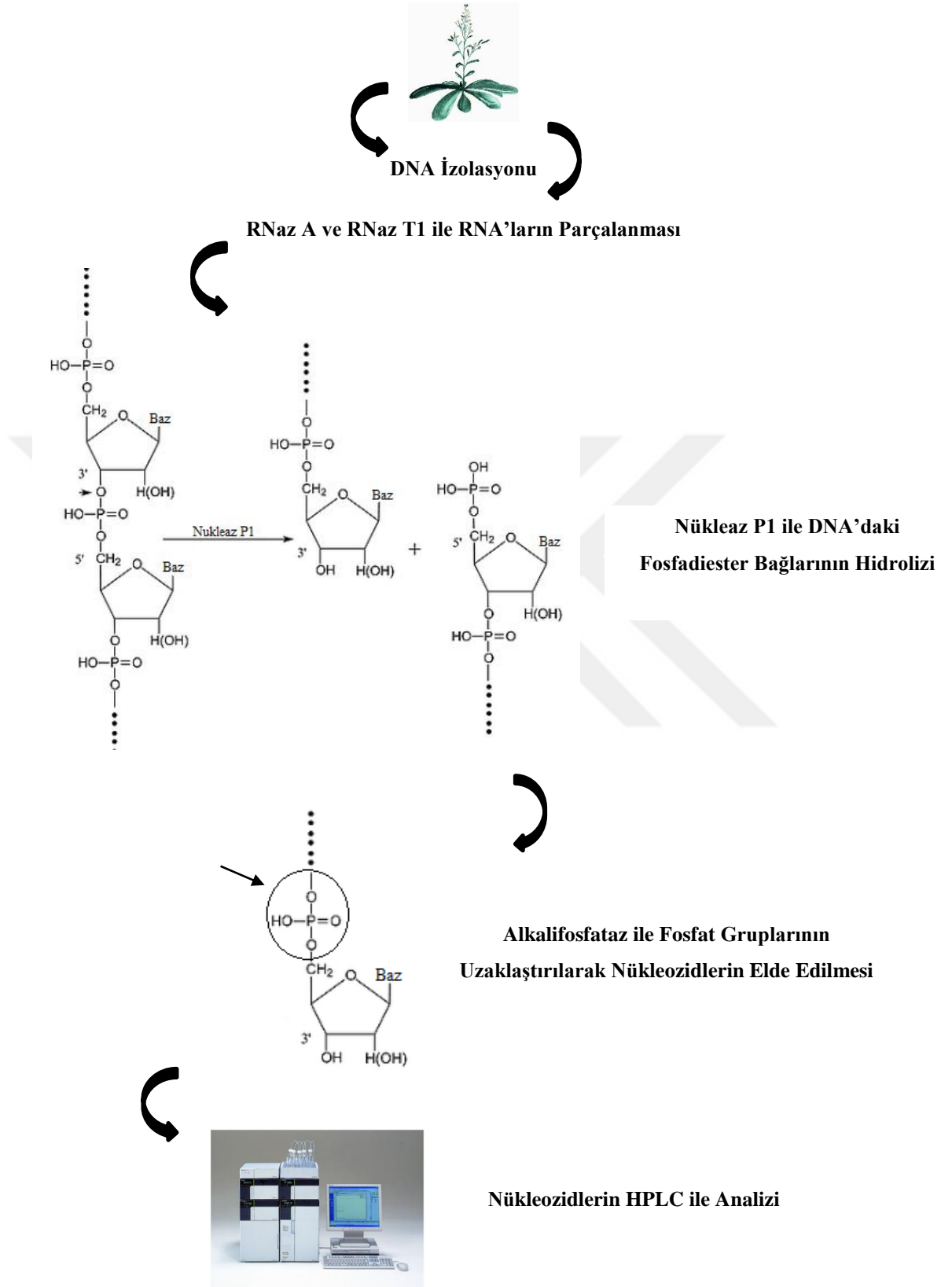
DNA metilasyonu, gen anlatımının düzenlenmesinde önemli bir modifikasyondur; strese cevap, morfogenez, gelişim ve adaptasyon gibi biyolojik süreçlerde önemlidir (Chan ve diğ., 2005; Chen ve diğ., 2013). Günümüzde DNA metilasyonunun saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), metilasyon-duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP), bisülfid dizileme, kapiller elektroforez, LC ve MS'in beraber kullanımı, RNA dizileme, metillenmiş DNA'nın immunoçöktürmesi (“Methylated DNA immunoprecipitation”,

MeDIP) yöntemleridir (Wagner ve Capesius, 1981; Hajkova ve diğ., 2002; Lu ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2013).

2.4. HPLC

DNA metilasyonunun saptanması için kullanılan yöntemlerin bazıları ölçüm yapabilmek için çok fazla DNA'ya ihtiyaç duyar (Ramsahoye, 2002). Bu durumda, küçük doku örneklerinde ya da DNA izolasyonunun iyi yapılamadığı durumlarda yöntem uygulanamaz. Aksine HPLC ile çok daha az miktarda DNA ile sonuç almak mümkündür (Armstrong ve diğ., 2011).

HPLC yöntemi, DNA metilasyonunun belirlenmesinde en güvenilir ve hassas tekniklerden biridir. Bu yöntem; DNA'nın nükleotidlere, nükleozidlere ve bazlara kadar parçalanmasını ve ayrılmasını içerir. Bunun için genomik DNA önce hidrolize edilerek deoksiribonükleozidlere ayrılmalıdır (Şekil 2.6). Bunun amaçla, genomik DNA önce nükleaz P1 daha sonra alkali fosfataz enzimi ile muamele edilir. Ardından serbest nükleozidler HPLC ile analiz edilir (Armstrong ve diğ., 2011). HPLC yöntemi ile 5-metilsitozin dışında biyolojik öneme sahip modifiye olmuş diğer bazlar da belirlenebilmektedir (Wagner ve Capesius, 1981; Johnston ve diğ., 2005). Bu yöntem, memeliler ve mikrobiyal DNA'lar için optimize edilmiş olmasına rağmen bitkilerde bu alandaki çalışmalar açısından az sayıda örnek bulunmaktadır (Wagner ve Capesius, 1981; Ramsahoye, 2002; Johnston ve diğ., 2005). Bitkilerde DNA metilasyonu seviyesinin belirlenmesinde HPLC analizleri gelişim, büyüme ve stres koşulları altında bitkide gerçekleşen epigenetik değişimler belirlenebilmesi açısından son derece önemlidir. Farklı hormon konsantrasyonları uygulanarak kültürlenmiş *Brassica napus* bitki eksplantları ile yapılan bir çalışma sonucunda, metilasyon seviyelerinin değişimleri HPLC yöntemi kullanılarak gözlemlenmiş ve hipokotillerin kültürlenmesi süresince metilasyon seviyelerinin değiştiği belirlenmiştir (Gao ve diğ., 2014). *Glycine max* (soya fasulyesi) bitkisinde 6-benzialminopürin (6-BA) uygulamasının *Agrobacterium* ile enfeksiyon süresine ve sürgün uyarımı süresine etkisini inceleyen araştırmacılar, elde ettikleri fenotipik sonuçları HPLC ile genom metilasyonu analizi yaparak da doğrulamışlardır (Jiang ve diğ., 2016).



Şekil 2.6: HPLC akış şeması.

2.5. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

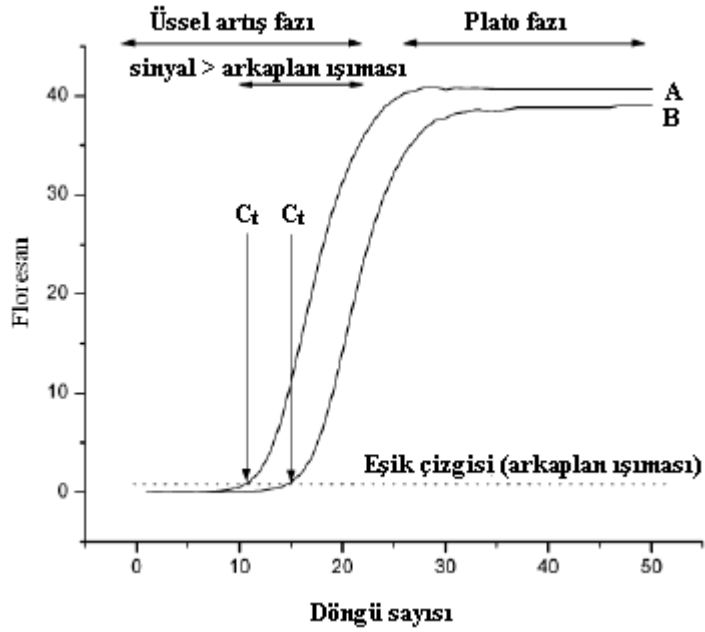
DNA'daki kalıtsal bilginin, belirli bir zaman ve koşulda nasıl kullanıldığıının belirlenmesi tüm sistemin nasıl işlediğinin anlaşılması için çok önemlidir. Hücredeki ya da organizmanın çevresindeki koşulların değişmesi genlerin anlatımlarının değişmesine de neden olur. Gen anlatımı ile beraber protein-protein, DNA-protein ve RNA-RNA etkileşimlerinin belirlenmesi hücrede hangi metabolik yolların ne kadar çalıştığını yorumlayabilmemize olanak sağlar (Tarhan, 2009). Günümüzde gen anlatımının belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan Northern melezleme ("Northern blotting"), RNA örneklerinin agaroz jel üzerinde ayrılarak problarla işaretlenmesi tekniğine dayanır. Ancak bu yöntem fazla miktarda RNA gerektirmektedir ve miktar belirlemesi jeldeki bantların analizine dayandığı için kesin sonuç alınamayabilir. Gen anlatımının belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem gerçek zamanlı PZR ("Real-time PCR")'dir. GZ-PZR analizinde, melezleme problemleri ya da DNA moleküllerinin arasında giren boyalar tarafından floresan emilimi ile DNA'nın çoğalmasındaki değişimler belirlenebilir. Çok fazla genin ve örneğin analizi için ise gen anlatımının seri analizi ("serial analysis of gene expression", SAGE), DNA mikrodizilim ("DNA microarray"), farklılık gösterimi ("Differential Display") yöntemleri ya da yeni nesil dizileme ("Next-generation sequencing", NGS) ile RNA dizileme analizi yapılabilir (Ding ve Cantor, 2004; Wang ve diğ., 2009b). Mikrodizilim ve RNA dizileme yöntemleri tek seferde binlerce genin anlatımını incelenmesine olanak sağlar; ancak pahalı teknikler oldukları için araştırmacılar tarafından her zaman tercih edilmezler. Gen anlatımı için kullanılan bütün tekniklerin kendine göre olumlu tarafları ya da eksik yönleri vardır; bu yüzden gen anlatımının belirlenmesinde kullanılacak yöntem yapılan çalışmaya göre seçilmelidir.

2.5.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk defa 1992 yılında Higuchi ve diğ. (1992) tarafından geliştirilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR) yöntemi, kinetik tabanlı bir miktar belirleme tekniğidir (Ding ve Cantor, 2004). Klasik PZR reaksiyonunda farklı koşullardan elde edilerek kullanılan DNA moleküllerinden hemen hemen aynı miktarda ürün oluşması nicel değerlendirme yapılamamasına neden olmaktadır. Ancak, GZ PZR yönteminde hedef DNA dizisinin çoğaltılmasına dair bilgi reaksiyon boyunca

gözelemlenebilmektedir ve reaksiyon bitiminde ürünlerin nicel değerlendirmesi yapılabilmektedir. GZ PZR yöntemi aynı zamanda mikrodizilim sonuçlarının doğrulanmasında da kullanılmaktadır. Başlangıç materyali çok az olduğu ve yüksek hassasiyet arandığı durumlarda da bu yöntem oldukça yararlıdır (Ding ve Cantor, 2004). Gen anlatım analizlerine ek olarak; GDO analizleri, patojen saptanması, tek nükleotid polimorfizmi (“single nucleotide polymorphism”, SNP) çalışmalarında da tercih edilen bir yöntemdir (Kubista ve diğ., 2006).

GZ PZR’nda, her PZR döngüsü sonucunda çoğalan hedef DNA miktarı belirlenir. PZR reaksiyonu sonucunda oluşan ürün miktarı, prob ya da boyanın oluşan ürüne bağlanması sonucu yaptığı floresan ışımının izlenmesi ile saptanır (Kubista ve diğ., 2006). İlk 10-15 PZR döngüsünde floresan ışması daha yeni oluşmaya başlar, arka plan ışmasını geçemez. Hedef DNA dizisinin neden olduğu floresan ışımının arka planı ışmasını geçtiği döngü eşik döngüsü (“cycle treshold”, C_t) olarak adlandırılır ve bu döngü hedef DNA dizisinin çoğaltıldığı ilk döngüdür. C_t değerinin düşük ya da yüksek olması başlangıçtaki DNA miktarına bağlıdır, başlangıçtaki DNA dizisinin miktarı ne kadar fazla ise floresan ışımındaki artış o kadar hızlı olur ve düşük C_t değeri elde edilir. PZR reaksiyonu devam ettikçe ürün miktarı ve bunun sonucunda da floresan ışıma artar. Bir süre sonra PZR bileşenleri sınırlı hale gelir ve floresan yoğunluğu da artık hesaplama için uygun değildir. Şekil 2.7’de gösterildiği gibi reaksiyonda ulaşılan bu faza plato fazı denir (Wong ve Medrano, 2005).



Şekil 2.7: GZ PZR reaksiyonunun genel olarak özeti, floresan ışımının arka plan ışınmasını geçmesi sonucu C_t değerine ulaşılması, floresan miktarının sabit değere ulaşmasıyla plato fazına girilmesi, grafikte A örneği B örneğinde daha fazla miktarda ürün içermektedir (Kubista ve diğ., 2006).

PZR ürünlerinin miktarının saptanmasında diziye özgü problemler ya da spesifik olmayan boyalar kullanılmaktadır. Floresan boyalar herhangi bir çift zincirli DNA'ya bağlanırken; diziye özgü DNA problemleri floresan özellikli boyalarla etiketlidir ve tamamlayıcı dizi ile melezlemeden sonra floresan ışımaya saptanmaya olanak vermektedir. PZR ürünlerinin saptanmasında genellikle işleyiş mekanizması Şekil 2.8'de verilen SYBR Green boyası ya da Taqman probu kullanılmaktadır.

SYBR GREEN

SYBR Green boyası çift zincirli DNA'ya bağlandığında ışımaya yapar.



DNA denatüre olduğu zaman SYBR Green boyası serbest kalır ve ışımada azalma gözlemlenir.



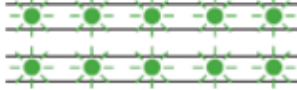
Uzama sırasında PZR ürünleri oluşturulur.

Forward primer



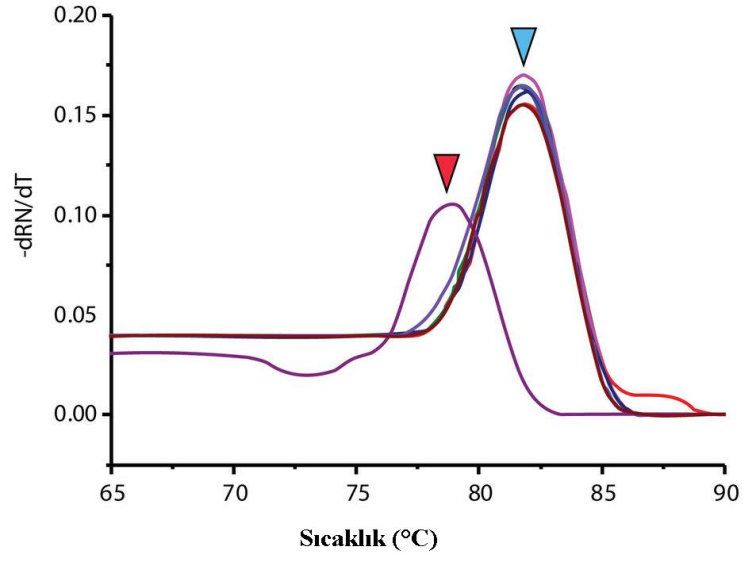
Reverse primer

Polimerizasyon bittiği zaman SYBR Green oluşan çift zincirli PZR ürününe bağlanır ve floresan ışımada artma gözlemlenir.



Şekil 2.8: GZ PZR reaksiyonu sonucu ürünlerin saptanmasında kullanılan SYBR Green boyası işleyişinin genel özeti (Bio-Resource, 2013).

SYBR Green gibi çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan boyalar, her döngüden sonra oluşan PZR ürünlerine bağlanarak floresan ışımaya yaparlar; ancak bu boyalar herhangi bir özgünlük göstermeden çoğalan herhangi bir DNA dizisine bağlanabildiğinden elde edilen ışımının hedef diziden oluşup oluşmadığı kontrol edilmelidir. Bu yüzden; ayrışma eğrileri (“dissociation curves”) oluşturularak (erime noktası “melting curve” analizleri) hedef DNA'nın çoğaltımı kontrol edilmelidir. Eğer reaksiyon karışımında yalnızca hedef DNA üretiliyorsa sadece bir tane erime eğrisi oluşur; ancak reaksiyon karışımında yabancı DNA varsa Şekil 2.9'da gösterildiği gibi birden fazla erime eğrisi oluşur.



Şekil 2.9: GZ PZR reaksiyonunda hedef diziden farklı bir kalıp olup olmadığı erime eğrisi ile kontrol edilebilir. Şekildeki gibi hedef DNA dizisinden başka kalıp olduğu durumlarda birden fazla tepe noktası elde edilir (Cheow ve diğ., 2015).

Gen anlatım analizleri için hedefe özgünlük bakımından probler daha uygun olsa da maliyetleri yüksektir; bu yüzden genellikle SYBR Green boyasının kullanıldığı PZR reaksiyonları tercih edilmektedir (Lekanne Deprez ve diğ., 2002).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada kullanılan *Arabidopsis thaliana* tohumları *Columbia (Col-0)*, Bielefeld Üniversitesi, Biyoteknoloji Merkezi, Genom Araştırma Bölümü'nden Dr. Ralf Stracke'den temin edilmiştir.

Familiya: *Brassicaceae*

Cins: *Arabidopsis*

Tür: *Arabidopsis thaliana*

3.2. BESİYERİ VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI

Arabidopsis thaliana bitki ve kalluslarının doku kültürü çalışmalarında Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri kullanıldı. Besiyerlerinin hazırlanmasında toz halindeki MS mikro ve makro element karışımı (Sigma, M5519), sukroz (Sigma, 84097) ve agar (Sigma, A1296) kullanıldı. 250 ml MS besiyeri için, yaklaşık 200 ml distile suda 1.1 g MS tozu çözdürüldükten sonra 7.5 g sukroz ilave edildi ve karıştırılarak tamamen çözüldürüldü. Çözeltinin pH'sı 1 ve 5 N NaOH (Merck, 1.06462.1000) ile 5.7-5.8'e ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. MS besiyerlerinin katı olması için çözeltiye 2.25 g agar ilave edilerek, hazırlanan besiyerleri otoklavda (Nüve, OT 012) (121°C'de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dakika) steril edildi. Steril edilmiş besiyerleri 50-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra MS vitamin çözeltisinden (Sigma, M3900) 250 µl ilave edildi. Kallus kültürü çalışmalarında kullanılan MS besiyerlerine, ek olarak etil alkolde (EtOH) (Sigma, 32221) çözdürülerek hazırlanan ve 0.22 µm por açıklığına sahip Millipore (Millex-GS) filtre ile steril edilen 1 mg/ml derişiminde bitki büyüme düzenleyicisi 2,4-D'den (2,4-diklorofenoksiasetik asit) (Sigma,D-4517) eklendi.

Çimlendirme, bitki ve kallus doku kültürü ve stres uygulaması çalışmaları için bitki büyüme kabini [25±2°C, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux (Sanyo, MLR-352H)] kullanıldı. Doku kültürü çalışmaları laminar hava akımlı steril kabinde (Telstar Bio II Advance, EN-12469) yapıldı.

3.3. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ

Tohumların yüzey sterilizasyonu için 5 mg tohuma 3 kez 1 ml %70'lik etil alkol eklenerek 2 dakika 600 rpm'de (ScanSpeed Mini) ile etil alkol uzaklaştırıldı. Ardından 1 ml %100'lük etil alkol eklenerek santrifüj ile etil alkol uzaklaştırıldı. Steril edilen tohumlar, laminar hava akımlı steril kabinde 15-20 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan steril tohumlar, MS besiyeri içeren 9 cm çaplı Petri kaplarına ekilerek parafilm ile sarıldı ve hava alması engellendi. MS besiyerine ekimi yapılan tohumlar bitki büyüme kabininde çimlenmeye bırakıldı.

3.4. KALLUS KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI

In vitro kültürlenmiş 30 günlük *A. thaliana* bitkileri kallus kültürlerinin elde edilmesi için kullanıldı. Kallus kültürlerinin oluşturulmasında, bitkilerin hipokotil ve kök kısımları eksplant olarak kullanıldı. Bitki eksplantları 1'er cm'lik parçalar halinde kesilerek, kallus oluşumunu teşvik etmek için 1 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerlerine ekildi ve eksplantlar üzerinde elde edilen kalluslar 0.5 mg/l 2,4-D içeren yeni MS besiyerlerine aktarıldı. Kallusların kültürü 3 haftada bir alt kültürlenerek devam ettirildi.

3.5. STRES UYGULANMASI

3.5.1. Tuz Uygulaması

MS besiyerinde çimlenen 7 günlük *A. thaliana* bitkileri 0, 100, 150 ve 200 mM NaCl (Multicell, 600-082-LG) içeren MS besiyerlerine aktarıldı. Bitkiler bir hafta boyunca bitki büyüme kabininde tutuldu ve bir hafta sonunda toplanan bitki örnekleri morfolojik ve fizyolojik analizler için kullanıldı. Moleküler analizler için toplanan tüm bitki örnekleri sıvı nitrojende dondurularak kullanılacakları zamana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Benzer şekilde *A. thaliana* kallus kültürleri 0.5 mg/l 2,4-D'ye ilave olarak 0, 100 ve 150 mM NaCl içeren MS besiyerlerine aktarıldı. Kalluslar bir hafta boyunca bitki büyüme kabininde tutuldu ve bir hafta sonunda toplanan kallus örnekleri sıvı nitrojende dondurularak kullanılacakları zamana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Absisik Asit Uygulaması

MS besiyerinde çimlenen *A. thaliana* bitkileri 7 günlük oldukları zaman 0, 5, 15, 25 ve 35 µM absisik asit (ABA) (Sigma, A1049) içeren MS besiyerlerine aktarıldı. Bitkiler bir hafta boyunca bitki büyüme kabininde tutuldu ve bir hafta sonunda toplanan bitki örnekleri morfolojik ve fizyolojik analizler için kullanıldı. Moleküler analizler için toplanan bitki örnekleri sıvı nitrojende dondurularak kullanılacakları zamana kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Benzer şekilde *A. thaliana* kallus kültürleri de 0.5 mg/l 2,4-D’ye ilave olarak 0, 5, 15, 25 ve 35 µM ABA içeren MS besiyerlerine aktarıldı. Kalluslar bir hafta boyunca bitki büyüme kabininde tutuldu ve bir hafta sonunda toplanan kallus örnekleri sıvı nitrojende dondurularak kullanılacakları zamana kadar -80°C’de muhafaza edildi.

3.6. MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ANALİZLER

3.6.1. Bitki Yaprak Sayısı, Yaprak Yüzey Alanı ve Kök Boyunun Belirlenmesi

NaCl ve ABA stresine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinin bir hafta sonunda yaprak sayısı, yaprak yüzey alanı ve kök boyları belirlenerek morfolojik olarak karşılaştırıldı ve kontrol grubu ile stres koşuluna maruz kalmış bitkiler arasındaki morfolojik değişimler belirlendi. Yaprakların yüzey alanları Carus ve Çatal (2005) tarafından kullanılan Denklem 3.1 ile hesaplandı.

$$y.y. = (\pi r + 2 r) * \lambda \quad (\text{Denklem 3.1})$$

y.y.= yaprak yüzeyi, r= yaprağın yarıçapı, λ= yaprağın uzunluğu

3.6.2. Klorofil Miktar Tayini

Fizyolojik analiz kapsamında NaCl ve ABA stresine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinin klorofil miktarları Wiedemann ve diğ.’nin (2007) belirttiği gibi aşağıda verilen yöntemle göre hesaplanarak karşılaştırıldı.

Klorofil miktarının belirlenmesinde farklı stres koşullarına maruz kalmış bitki örneklerinden 100 mg kullanıldı. 100 mg bitki sıvı nitrojen ile homojenize edilerek üzerine 2 ml %80 (v/v) aseton (Sigma, 24201) eklendi. Elde edilen çözelti 2 ml’lik

Eppendorf tüplere aktarıldı ve hücre debrisini uzaklaştırmak için 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvılardan 200’er µl’si 96 kuyucuklu plakalara (Sarstedt, 83.3924) konularak 645 ve 663 nm dalga boyundaki absorbans değerleri Eon (BioTek) spektrofotometre cihazı ile belirlendi. Ölçümler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Santrifüj sonrasında elde edilen pelletler 105°C’de (WiseTherm, HB-48P) 2 saat boyunca kurumaya bırakıldı ve pelletlerin kuru ağırlıkları (Shimadzu, ATX224) tartıldı. İşlemler sonucunda klorofil miktarları (mg klorofil / g kuru ağırlık) aşağıda verilen Denklem 3.2’ye göre hesaplandı.

$$T = [(A663) \times (0.00802) + (A645) \times (0.0202)] \times 2 / \text{g kuru ağırlık} \quad (\text{Denklem 3.2})$$

T : Total klorofil miktarı

3.7. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ

Metilasyonun belirlenmesi amacı ile, farklı konsantrasyonlarda stres koşulları uygulanmış *A. thaliana* bitki ve kalluslarından DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen DNA’lar hidrolize edilerek HPLC analizi için hazırlandı. DNA’daki 5-metil-deoksisitidin’in (5-mdC) kantitatif tayini, hidrolize DNA’daki serbest deoksiribonükleozidlerin HPLC-UV-DAD (Shimadzu LC-20A) sisteminde analizi ile gerçekleştirildi.

3.7.1. DNA İZOLASYONU

Toplanan bitki ve kallus örneklerinden DNA izole etmek için modifiye edilmiş CTAB DNA izolasyonu yöntemi kullanıldı (Dellaporta ve diğ., 1983; Jobses ve diğ., 1995). CTAB DNA izolasyonu yönteminde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları Bölüm 3.7.1.1.’de ayrıntılı olarak anlatıldı.

3.7.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları

DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar (2X CTAB tamponu hariç) hazırlandıktan sonra otoklavda (121°C’de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dakika) steril edildi.

2X CTAB Tamponu: 2X CTAB tamponu Hu’nun (2002) önerdiği şekilde hazırlandı. Son konsantrasyonu %2 (w/v) CTAB olacak şekilde 2 g CTAB (Biomatik, A2317) tartılarak 40 ml ddH₂O’da çözdürüldü. Ardından son konsantrasyonları 100 mM Tris, 10 mM EDTA ve 1.4 M NaCl olacak şekilde; 10 ml 1 M Tris (pH 8.0) (Multicell,

600127-LG), 4 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Merck, 324503) ve 28 ml 5 M NaCl çözeltilerinden eklenerek iyice karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı HCl (Merck, 100317) ile 5.0'e ayarlanarak son hacmi ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.22 µm por açıklığına sahip Millipore filtre ile steril edildi. DNA izolasyonunda kullanılmadan önce 2X CTAB tamponuna %0.2 β-merkaptoetanol (Sigma, M 3148) ve %0,5 PVP (Sigma, P 6755) ilave edildi.

Tris-EDTA (TE) Tamponu: Son konsantrasyonları 10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde 0.5 ml 1 M Tris-HCl (Multicell, 600126-LG) (pH 8.0) ve 100 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) çözeltileri 49 ml ddH₂O'ya eklenerek iyice karıştırıldı ve pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra son hacmi ddH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

5 M NaCl Solüsyonu: 29.22 g NaCl tuzu 90 ml ddH₂O'da çözdürüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

1 M Tris Base Solüsyonu: 12.11 g Tris Base 80 ml ddH₂O'da çözdürüldükten sonra pH'sı HCl ile 8.0'e ayarlandı ve hacmi ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

3 M Sodyum Asetat (NaAc) Solüsyonu (pH 5.2): 24.6 g CH₃COONa (susuz sodyum asetat) (Sigma, S2889) 80 ml ddH₂O'da çözdürüldükten sonra pH'sı glasiyel asetik asit (Merck) ile 5.2'ye ayarlandı ve hacmi ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.7.1.2. DNA İzolasyonu

Yaklaşık 100 mg bitki/kallus örneği önceden soğutulmuş havanda sıvı nitrojen ile parçalandı. Parçalanmış dokuların üzerine 15 ml/g olacak şekilde 2X CTAB tamponu eklenerek 2 ml'lik Eppendorf tüplere aktarıldı ve 65°C'de 1 saat bekletildi. 10 dakika oda sıcaklığına gelmesi beklenen örnekler eşit hacimde kloroform (Sigma, C2432) eklenerek 1 dakika altüst yapılarak karıştırıldı ve 4°C'de 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yeni Eppendorf tüplere aktarılarak 0.7/1.0 hacminde izopropanol (Sigma, 24137) eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 4°C'de 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek elde edilen pelletler 100 µl TE tamponunda çözdürüldü. Örnekler, su banyosunda (Termal Laboratuvar Aletleri) 37°C'de 40 dakika pellet tamamen çözünene kadar tutuldu ve 0.5 µl RNase (Thermo Fisher, 10 mg/ml) eklenerek su banyosunda 37°C'de 20 dakika daha tutularak RNA'ların parçalanması sağlandı. Daha sonra 100 µl kloroform/izoamilalkol (24:1) eklenerek 1

dakika altüst edilerek karıştırıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak 1/10 hacminde 3 M NaAc solüsyonundan eklendi. Ardından 0.7 hacminde izopropanol eklendi ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Pellet %70'lik soğuk etanolle yıkandı ve oda sıcaklığında 10-15 dakika kurutuldu. Ardından DNA pelleti 40 µl TE tamponu eklenerek çözdürüldü ve 4°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın tamamen çözünmesi sağlandı.

3.7.2. DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

DNA örnekleri TE tamponunda tamamen çözdürüldükten sonra nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific, nanodrop 2000) cihazı ile 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülerek miktar ve saflıkları belirlendi. DNA konsantrasyonları (µg/ml) temelde aşağıda verilen Denklem 3.3'e göre cihaz tarafından hesaplandı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım katsayısı} \times 50 \quad \text{(Denklem 3.3)}$$

DNA örneklerinin saflıklarının kontrolü için ise A_{260}/A_{280} oranı kullanıldı. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 1.8 olan DNA'lar saf olarak kabul edildi.

3.7.3. Agaroz Jel Elektrofrez

DNA örneklerinin miktar ve saflıkları belirlendikten sonra bütünlüklerinin değerlendirildiği kalitatif analizler için % 0.8 agaroz jel elektrofrezinden yararlanıldı. DNA'nın jelde yürümesi için 5X TAE tamponunun distile su ile seyreltilmesi sonucu elde edilen 1X TAE tamponu kullanıldı. 5X/1 L konsantrasyonunda TAE tamponu hazırlamak için 242 g Tris-base (Sigma, T-8524) 600 ml ddH₂O'da çözdürüldükten sonra 57.1 ml glasiyel asetik asit (Merck, 101830) ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Merck, 324503) eklenerek son hacim ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Agaroz jel, Maniatis ve diğ. (1982) tarafından belirttiği şekilde hazırlandı. 40 ml 1X TAE tamponu için 0.32 g agaroz (Sigma, A5073) tartılarak mikrodalga fırında eritildi ve çözeltinin 50-60°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra üzerine 3 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi. 6x9 cm boyutlarına sahip jel kasetine (Thermo, EC 320) jel karışımı dökülerek polimerize olması için soğumaya bırakıldı.

Polimerize olan jel içinde 1X TAE yürütme tamponu bulunan tanka yerleştirildi ve DNA örnekleri (5µl) 1µl 6X yükleme tamponu (Thermo Fisher, R0611) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. DNA örnekleri 90 V sabit güçte 20 dakika boyunca jelde yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde (Avegene-Xlite 30R) jelin görüntüsü alındı.

3.7.4. HPLC Öncesi RNaz Uygulaması

İzole edilen DNA'lar hiçbir RNA kalıntısı kalmaması amacı ile RNaz A ve RNaz T₁ ile tekrar muamele edildi. 10 µg DNA alınarak son hacmi dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. Her bir örnek için 0.5 µl RNaz A (Thermo Fisher, 10 mg/ml) ve 100 U/µl konsantrasyonunda 1 µl RNaz T₁ (Thermo Fisher, 1000 U/ µl) eklendi ve su banyosunda 37°C'de 1 saat bekletildi. Enzimlerin aktivitelerinin durdurulması için örnekler su banyosunda 70°C'de 15 dakika bekletildi.

3.7.5. HPLC Öncesi DNA'ların Saflaştırılması

RNaz uygulaması yapılan DNA örneklerine 1 hacim (50 µl) kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenerek 1 dakika boyunca altüst edilerek karıştırıldı. 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj sonucunda oluşan üst sıvı yeni bir Eppendorf tüpe alındı ve üzerlerine 0.1 hacim 3 M NaAc (pH 6.0) tamponu ile 2 hacim soğuk absolü etanol eklendi. Örnekler -80°C'de 1 saat bekletilmelerinin ardından 4°C'de 10.000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda oluşan üst sıvı atılarak DNA pelletleri %70'lik soğuk etanol ile yıkandı ve oda sıcaklığında 10-15 dakika kurutuldu. DNA pelletleri 50 µl nükleaz içermeyen suda çözündürüldü.

DNA hidrolizine geçilmeden hemen önce, DNA örnekleri 100°C'de 3 dakika tutularak denatüre edildi ve renatürasyon gerçekleşmemesi için hemen buza alındı. Bu aşamalar bittikten sonra DNA hidrolizine geçildi.

3.7.6. DNA Hidrolizi

Hidrolize etmek amacıyla DNA örneklerine, 1.25 µl 1 M amonyum asetat, 45 mM çinko klorür (pH 5.1) çözeltisinden ve 5 µl Nükleaz P₁ (1 ünite/µl) enziminden eklenerek su banyosunda 37°C'de yaklaşık 17 saat (gece boyu) bekletildi. Daha sonra

5 µl 1.5 M tris base (pH 8.0) ve 5 µl alkali fosfataz enzimi eklenerek çözelti su banyosunda 37°C’de 2 saat bekletildi.

Hidrolize edilmiş DNA örnekleri 0.5 ml’lik Millipore-Amicon® Ultra Santrifüj Filtre ünitesi kullanılarak saflaştırıldı. Örnekler 4°C’de 14.000 x g’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra filtre ünitesi ters çevrilerek tekrar 1.000 x g’de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda elde edilen DNA hidrolizatı HPLC analizlerinde kullanılana kadar -20°C’de muhafaza edildi

3.7.7. Örneklerin HPLC ile Analizi

DNA hidrolizatlarının hacmi ddH₂O ile 100 µl’ye tamamlanarak cam viallere konuldu ve bunlardan 50’şer µl HPLC cihazına enjekte edildi. Deoksiribonükleozidlerin HPLC sisteminde analizi için Ramsohoye (2002) ve Demirel (2012) tarafından uygulanmış mobil faz sistemleri modifiye edilerek kullanıldı. Deoksiribonükleozidlerin analizinde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.1: Deoksiribonükleozidlerin analizi için kullanılan kromatografik koşullar.

Kolon	Phenomenex, Synergi Polar RP C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, 4 µm, 80 Å		
Koruyucu Kolon	Phenomenex, C ₁₅ 5 µm, 4 mm Lx3.0 mm ID		
Mobil Faz	50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,1 (A), Metanol (B)		
Gradient Sistem	Süre (dk)	A	B
	0	97.5	2.5
	15	97.5	2.5
	20	90	10
	30	90	10
	31	97.5	2.5
	40	97.5	2.5
Akış Hızı	1 ml/dk		
Enjeksiyon Hacmi	50 µl		
Kolon Sıcaklığı	35°C		
Pompa Basıncı	Minimum 0 bar, maksimum 300 bar		
Detektör Dalgaboyu	UV-DAD (278 nm)		
Alınma Zamanı (dakika)	dC:4.9		
	5-mDC:6.8		
	dG:11.1		
	T:12.3		
	dA:22.7		

3.7.8. HPLC Standartlarının Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

Detektörün cevabının farklı konsantrasyonlar arasındaki doğrusallığını belirlemek için deoksiribonükleozidlerin standart çözeltileri hazırlandı. Bu amaçla dC, dG, dT ve dA için 1, 2.5, 5, 10 ve 15 µM konsantrasyonlarında; 5-mdC için ise 0.04, 0.1, 0.2, 0.4 ve 0.6 µM konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Her çözeltilerden 4'er kez HPLC cihazına enjekte edilerek standartların oluşturduğu pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.7.9. HPLC Sonuçlarının Değerlendirilmesi

%5-mdC miktarı aşağıda verilen Denklem 3.4'e göre hesaplandı. dG miktarının dC ile eşdeğer olduğu düşünülerek %5-mdC miktarı ile dG miktarı oranlandı ve sonuçların doğruluğu kontrol edildi.

$$\%5\text{-mdC} = \frac{5\text{-mdC} \times 100}{5\text{-mdC} + dC} \quad \text{(Denklem 3.4)}$$

3.7.10. HPLC Solüsyonlarının Hazırlanması

1 M Amonyum asetat, 45 mM Çinko klorür, pH 5.1: Son konsantrasyonları 1 M ve 45 mM olacak şekilde 1.927 g amonyum asetat ve 0.1533 g çinko klorür tartılarak 23 ml ddH₂O'da çözdürüldü. Asetik asit (C₂H₄O₂) ile pH 5.1'e ayarlanarak çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 25 ml'ye tamamlandı.

1.5 M Tris Baz: Son konsantrasyonu 1.5 M olacak şekilde 4.543 g tris base tartılarak 23 ml ddH₂O'da çözdürüldü. %25 amonyak ile pH 8.0'e ayarlanarak çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 25 ml'ye tamamlandı.

25 mM Amonyum asetat, 1 mM Çinko klorür, pH 5.1: Son konsantrasyonları 25 mM ve 1 mM olacak şekilde 0.048 g amonyum asetat ve 3.407 mg çinko klorür tartılarak 23 ml ddH₂O'da çözdürüldü. Asetik asit (C₂H₄O₂) ile pH 5.1'e ayarlanarak çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti nükleaz P1 enzim çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

100 mM Amonyum bikarbonat, pH 8.0: Son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 0.198 g amonyum bikarbonat tartılarak 23 ml ddH₂O'da çözdürüldü. %25 amonyak ile pH 8.0'e ayarlanarak çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti alkali fosfataz enzim çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

Alkali fosfataz enzim çözeltisi, pH 7.0: Son konsantrasyonu 1 ünite/ μ l olacak şekilde 10 ml alkali fosfataz enzim çözeltisinin hazırlanması için; %50 gliserin (v/v), 50 μ l 1 M Tris, 2 ml 25 mM $MgCl_2$ ve 100 μ l 10 mM $ZnCl_2$ karıştırılarak son hacmi ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı.

Nükleaz P1 Enzim Çözeltisi (1 ünite/ μ l): Nükleaz P1 enzimi, 336 ünite enzim içermektedir. 336 μ l '25 mM amonyum aseetat, 1 mM çinko klorür, pH 5.1' çözeltisi içinde çözülerek nükleaz P1 enzimi 1 ünite/ μ l konsantrasyonuna getirildi ve küçük porsiyonlara ayrılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

Mobil Faz Tampon Çözeltisi (50 mM KH_2PO_4 çözeltisi, pH 4,1): Son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde 6.804 g KH_2PO_4 tartılarak 950 ml ddH₂O'da çözdürüldü. 1M ortofosforik asit çözeltisi ile pH'sı 4.1'e ayarlandıktan sonra son hacmi ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı. 0.22 μ m por açıklığına sahip Millipore filtre ile steril edildikten sonra, çözelti ultrasonik su banyosunda degaze edildi.

Deoksiribonükleozid Standart Çözeltileri: 5-metil-deoksisitidin (5-mdC), 2-deoksisitidin (dC), 2-deoksiguanozin (dG), 2-deoksiadenozin (dA), 2-deoksitimidin (dT) standart çözeltileri 5 mM konsantrasyonda olacak şekilde ddH₂O ile hazırlandı. Daha sonra kalibrasyon eğrisi için standart çözeltileri dC, dG, dT, dA standartları için 100 μ M; 5-mdC standartı için 4 μ M olacak şekilde mobil faz içinde hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltileri analizlerde kullanılabilecek kadar cam vial içinde -20°C'de muhafaza edildi.

3 M Sodyum Asetat (NaAc) Solüsyonu (pH 6.0): Son konsantrasyonu 3 M olacak şekilde 12.3 g CH_3COONa 40 ml ddH₂O'da çözdürüldükten sonra pH'sı glasiyel asetik asit ile 6.0'ya ayarlandı ve son hacmi ddH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile seçilen stres genlerinin anlatım analizleri gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle Bölüm 3.5'te belirtilen stres koşullarında yetiştirilen *A. thaliana* bitki ve kalluslarından RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilerek RT-PCR analizlerinde kullanıldı.

3.8.1. Gen Anlatımları Analiz Edilen Genler ve Özellikleri

Bitkilerde stres koşulları altında metilasyon mekanizmaları ile ilişkileri olduğu bilinen ve Naydenov ve diğ. (2015) tarafından da sıcaklık stresi sonucu anlatımları çalışılmış *MET1*, *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genleri seçildi. Referans gen olarak ise aktin geni seçildi. Seçilen genlerin özellikleri aşağıda Tablo 3.2’de ayrıntılı olarak verildi. Bu genlerin anlatımlarının analizinde kullanılan primer dizileri ise Tablo 3.3’te verildi.

Tablo 3.2: Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan genler ve özellikleri.

Genler	Özellikleri	Referans
<i>Aktin</i>	Bütün ökaryotik hücrelerde bulunur. Mikrofilament oluşumunda yer alarak hücre iskeletinin oluşumu için gereklidir. Evrim boyunca en çok korunan genlerden biridir.	Deeks ve Hussey, 2009; Gunning ve diğ., 2015
<i>MET1</i>	Memelilerdeki DNA Metiltransferaz 1 (<i>Dnmt1</i>)’in bitkilerdeki homologudur. CpG bölgelerinde metilasyon sağlar.	Kankel ve diğ., 2003
<i>DRM2</i>	<i>De novo</i> DNA Metiltransferazdır. CpNpN bölgelerinde siRNA ile beraber bitkilere özgü metilasyon sağlar.	Zhang, 2008
<i>Pol IV</i>	Bitkilere özel RNA Polimerazdır. siRNA üretimi gerçekleştirir. Transpozonların ve tekrar dizilerinin RdDM ile susturulmasını sağlar.	Herr ve diğ., 2005
<i>Pol V</i>	Birden çok altüniteye sahip, bitkilere özel RNA polimereazdır. Pol IV ile birlikte siRNA’ların normal biyogenezi ve işlevinin devamı için gereklidir. Ayrıca, argonat proteini 4’ün (AGO4) kromatine yönlendirilmesine yardımcı olur	Wierzbicki ve diğ., 2008 Wierzbicki ve diğ., 2009

Tablo 3.3: Gen anlatımı analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri (Naydenov ve diğ., 2015).

	Primer	Dizi
<i>MET1</i>	Forward	5'CAAACACAGCTGAGCGCCAC3'
	Reverse	5'GGAAACCCCTGAGATCGGGC3'
<i>Pol IV</i>	Forward	5'GAAACGCATTCTCCACAGTTAC3'
	Reverse	5'GCGACCCGGATTCTTTGAC3'
<i>Pol V</i>	Forward	5'CATCCGTCTGCGTACCCTG3'
	Reverse	5'TCAACCGTGATGAAGTCAACG3'
<i>DRM2</i>	Forward	5'AAACAAAGCTGCCCACTCG3'
	Reverse	5'ATACGCCACAGTATCAACCTG3'
<i>Aktin</i>	Forward	5' TGCTGACCGTATGAGCAAA3'
	Reverse	5'CTCCGATCCAGACACTGTA3'

3.8.2. RNA İZOLASYONU

A. thaliana bitkilerinden ve kallus kültürlerinden TRIzol® (Invitrogen, 15596026) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Yaklaşık 100 mg bitki ve kallus örnekleri sıvı azot yardımı ile önceden soğutulmuş havanda parçalanarak toz haline getirildi. Toz haline gelen örneklerin üzerine 1 ml TRIzol® eklenerek Eppendorf tüplere aktarıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Her bir örneğe 200 µl kloroform eklenerek tüpler 10-15 saniye altüst edilerek karıştırıldı. Örnekler 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4°C'de ve 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında renksiz üst sıvı yeni Eppendorf tüplere alınarak her 1 ml TRIzol® için 500 µl izopropanol eklendi. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4°C'de ve 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst sıvı atılarak pelletler 1 ml %75 EtOH ile yıkanarak 4°C'de ve 7.500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında etanol dökülerek RNA pelletleri 55-60°C'de ısıtıcı blokta (Biosan, TS-100C) kurumaya bırakıldı. Kuruyan RNA pelletlerinin üzerine 20-50 µl nükleaz içermeyen dH₂O ilave edildi. Tüpler 55-60°C'de ısıtıcı blokta 10-15 dakika tutularak RNA'ların tamamen çözünmesi sağlandı.

İzole edilen RNA'ların bütünlüğü Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı gibi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. 1X TAE ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde örnekler 90 V'ta 20 dakika yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde jelin görüntüsü alındı. İzole

edilen RNA'ların saflıkları ve miktarları ise Bölüm 3.7.2'de hesaplandığı gibi 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülerek belirlendi. Bu ölçüm, nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific, nanodrop 2000) cihazında yapıldı. Formülde çift zincirli DNA için 50 olan katsayı tek zincirli RNA için 40 olarak kullanıldı.

3.8.3. cDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA'lardan ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kiti kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre cDNA sentezlendi. Sentez reaksiyonunun bileşenleri Tablo 3.4'te, koşulları ise Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.4: cDNA sentez reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Hacim
Primer (10 µM)	4 µl
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	20 µl
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	4 µl
Kalıp RNA	1000 ng
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	40 µl'ye tamamlanır

Tablo 3.5: cDNA sentez reaksiyonunun koşulları.

Sıcaklık	Zaman
25°C	5'
42°C	60'
80°C	5'

3.8.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gen anlatımı analizleri için seçilen genlerin primerleri için optimum bağlanma koşulları ön denemelerle belirlendikten sonra analizler gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

analizlerinin reaksiyon bileşenleri Tablo 3.6’da, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.7’de verildi.

Tablo 3.6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Hacim
Primer (10 μ M)	0.5 μ l
SYBR Green Master Mix	12.5 μ l
cDNA	3 μ l
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	25 μ l’ye tamamlanır

Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

Sıcaklık	Zaman
50°C	1’
94°C	30’’
57°C (Aktin, PolIV ve MET1)	30’’
59°C (PolIV ve DRM2)	30’’
72°C	30’’
40°C	30’

40 döngü

GZ PZR analizleri, Roche LightCycler Nano cihazı ile yapıldı ve elde edilen Ct değerleri $\Delta\Delta$ Ct yöntemi ile rölatif olarak değerlendirilerek anlatım katsayıları belirlendi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

A. thaliana bitki ve kallusları ile yapılan morfolojik deneyler, HPLC sonuçlarının değerlendirilmesi ve gen anlatımı analizleri istatistiksel olarak GraphPad Prism[®] 5.01 bilgisayar programı kullanılarak tek yönlü ANOVA (“One-Way-AVOVA”) Tukey testi ve iki yönlü ANOVA (“Two-Way-AVOVA”) ile değerlendirildi. $P < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi. Morfolojik ve fizyolojik deneyler 5 biyolojik tekrarlı, HPLC ve gen anlatımı analizleri ise 3 biyolojik, 2 teknik tekrarlı olarak yapıldı.

4. BULGULAR

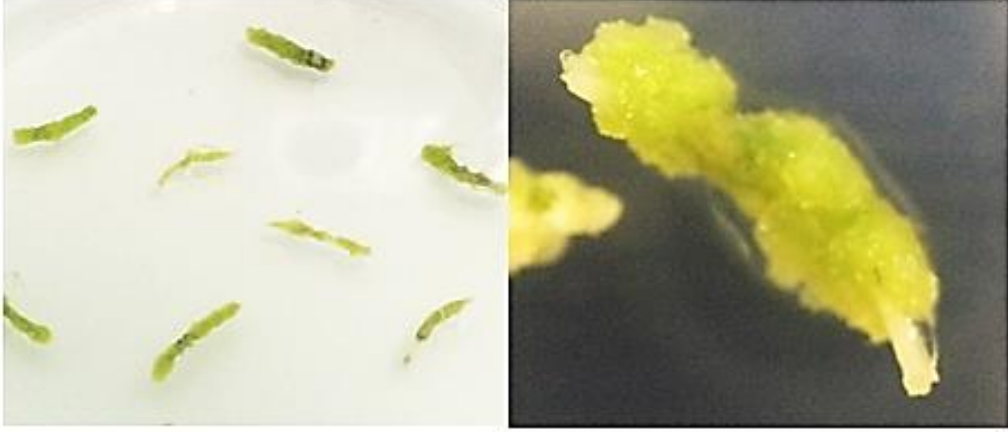
4.1. TOHUMLARIN ÇİMLENMESİ VE KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ELDE EDİLMESİ

Arabidopsis thaliana tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra MS besiyeri içeren Petri kaplarına ekildi ve bitki büyüme kabininde çimlendirildi. Tohumlar ekimleri yapıldıktan üç gün sonra çimlenmeye başladı.

MS besiyeri içeren Petri kaplarında çimlendirilen *A. thaliana* bitkileri 10 günlük olduktan sonra MS besiyeri içeren cam tüplere aktarılarak 30 günlük olana kadar bitki büyüme kabininde tutuldu. Şekil 4.1’de verilen 30 günlük *A. thaliana* bitkileri, steril hava akımlı laminar kabinde 1’er cm’lik parçalar halinde kesildi. Bitki eksplantları kallus oluşumunu teşvik etmek üzere 1 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi katkılı MS besiyeri içeren Petri kaplarına aktarıldı. Birkaç gün sonra eksplantların yara bölgelerinde kallus oluşumu Şekil 4.2’de gösterildiği gibi gerçekleşti.

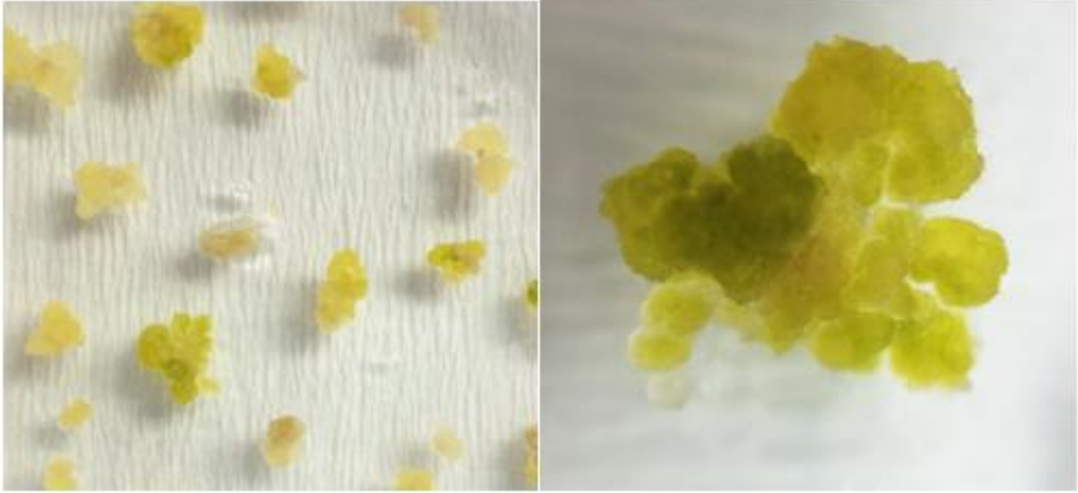


Şekil 4.1: MS besiyerinde büyüyen 30 günlük *A. thaliana* bitkileri.



Şekil 4.2: 1 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi katkılı MS besiyerinde yaralanan *A. thaliana* bitki eksplantlarından kallus oluşumu.

Kallus oluşumu gerçekleştikten sonra, *A. thaliana* kallusları üç haftada bir 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerlerine aktarılarak altkültürlendi. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi *in vitro* olarak kültürlenен kalluslar 4 defa altkültürlendikten sonra deneyler için yeterli miktara ulaşıldı.

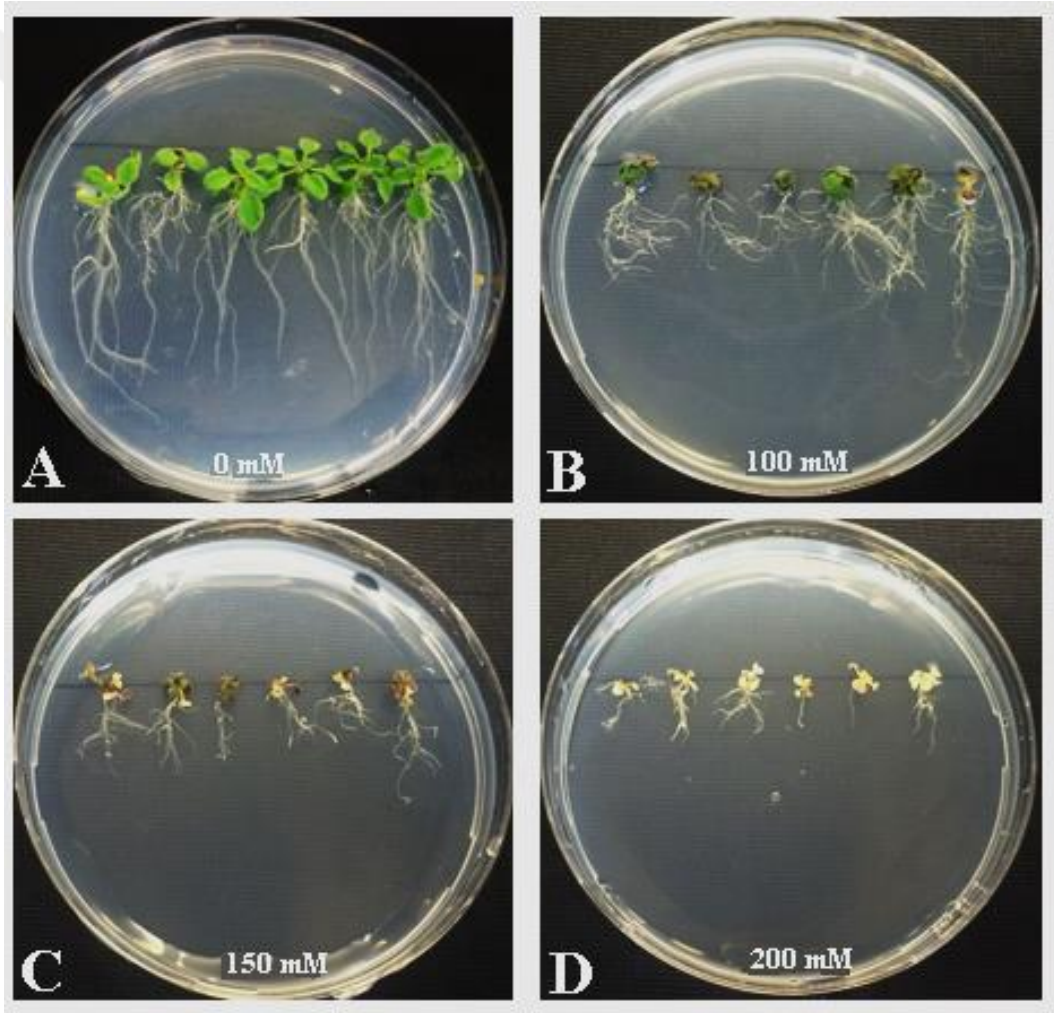


Şekil 4.3: 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde *in vitro* kültürlenен *A. thaliana* kallusları.

4.2. STRES UYGULAMASININ MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ

4.2.1. Tuz Uygulaması

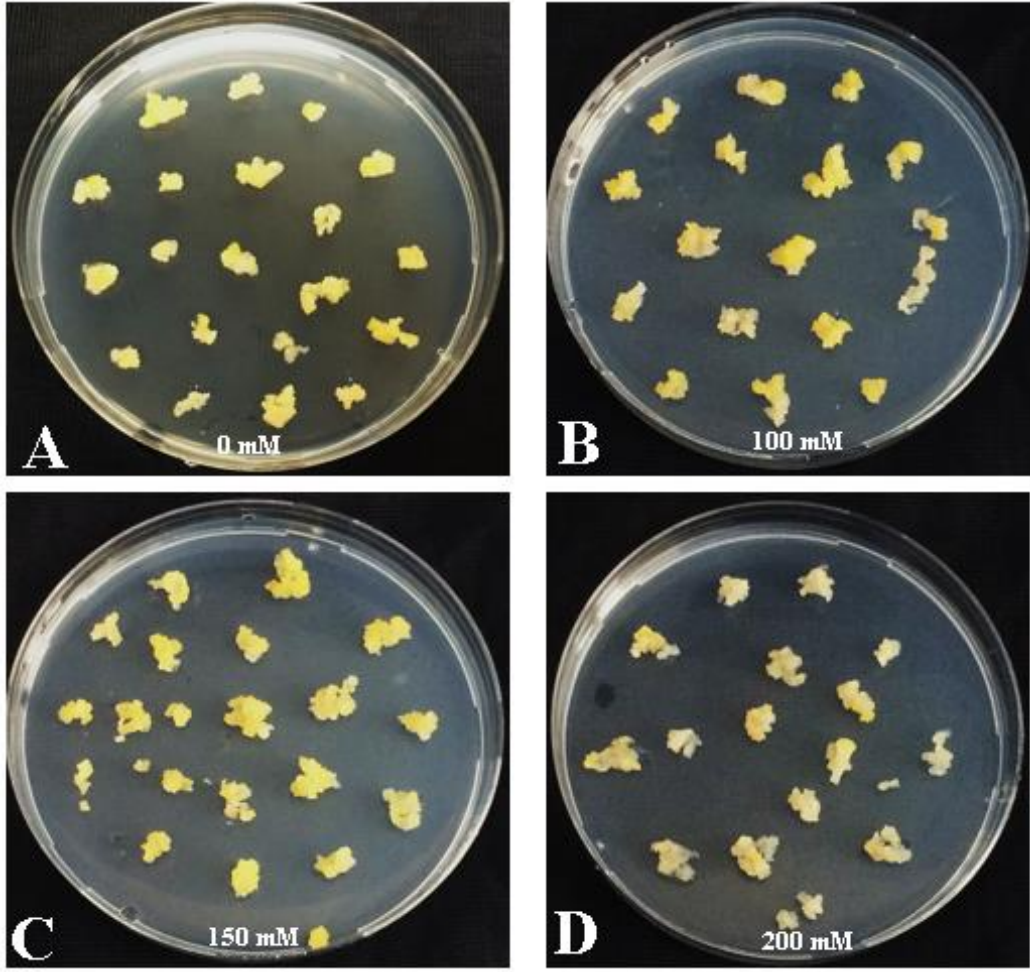
Bir hafta sonunda 200 mM konsantrasyonunda NaCl içeren besiyerine aktarılan bitkilerin % 71'i ölüyordu, diğerleri çalışmaya uygun görüldü. 0, 100, 150 mM konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerinde büyüyen bitkiler morfolojik ve fizyolojik olarak değerlendirilerek klorofil miktarları, yaprak sayısı, yaprak yüzey alanı, kök boyu değerlendirildi. Tuz uygulaması sonrasında bitkilerin genel görünümü Şekil 4.4'te verildi.



Şekil 4.4: Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda tuza maruz kalan *A. thaliana* bitkileri. A, 0 mM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen bitkileri; B, 100 mM konsantrasyonda yetişen bitkileri; C, 150 mM konsantrasyonda yetişen bitkileri; D, 200 mM konsantrasyonda yetişen bitkileri temsil etmektedir.

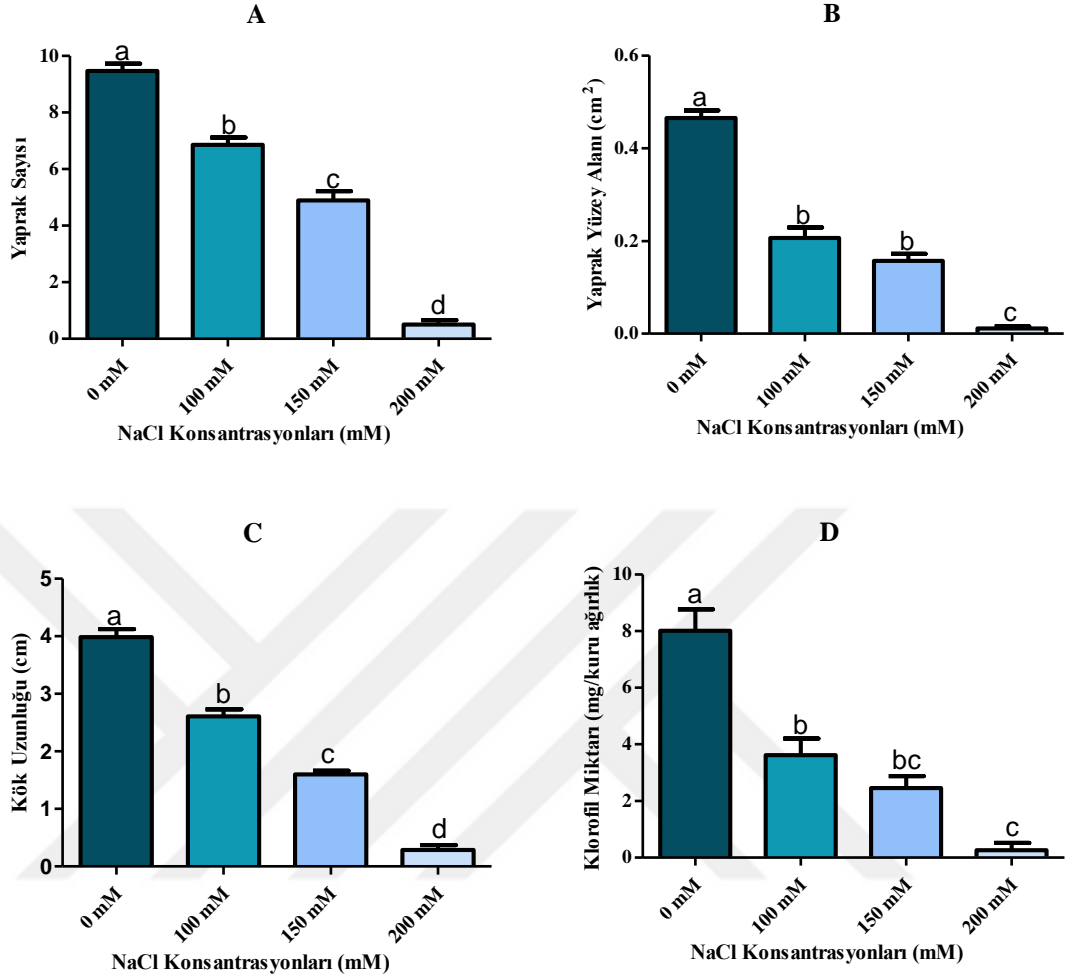
Şekil 4.4'te NaCl ile muamele edilen Arabidopsis bitkilerinin morfolojik olarak gelişimlerinin etkilendiği çok belirgin bir şekilde görülmektedir. 200 mM konsantrasyona maruz kalmış Arabidopsis bitkilerinin %71'i ölmüştür. Morfolojik analizler sonucunda bitkilerin yaprak sayılarının bütün gruplar arasında anlamlı olarak azaldığı, yaprak yüzey alanlarının 100 ve 150 mM NaCl arasında anlamlı olarak küçülmediği ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde küçüldüğü, köklerin uzunluğunun bütün gruplar arasında konsantrasyon artışına paralel olarak anlamlı bir şekilde kısaldığı; klorofil miktarlarının ise 0 ile 100 mM, 0 ile 150 mM, 0 ile 200 mM, 100 ile 200 mM arasında anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde kallus kültürleri de 0.5 mg/l 2,4-D'ye ek olarak 0, 100, 150 ve 200 mM konsantrasyonlarında NaCl içeren MS besiyerlerine aktarılarak bir hafta bitki büyüme kabininde tutuldu. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi kallusların morfolojisinde herhangi bir değişim gözlemlenmedi.



Şekil 4.5: Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda tuza maruz kalan *A. thaliana* kallusları. A, 0 mM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen kallusları; B, 100 mM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; C, 150 mM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları; D, 200 mM konsantrasyonda kültürlenmiş kallusları temsil etmektedir.

Arabidopsis thaliana bitkilerine uygulanan NaCl uygulaması sonrasında morfolojik değişimleri belirlemek üzere yaprak sayıları, yaprak yüzey alanları, kök boyları ve klorofil miktarları değerlendirildi. GraphPad Prism® 5.01 bilgisayar programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ('One-Way-AVOVA', tek yönlü varyans analizi) ve Tukey testi ile istatistiksel analizler yapıldı ve Şekil 4.6'da verilen grafik çizildi. $P < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.6: *A. thaliana* tüm bitkisine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimler. A; yaprak sayısındaki değişimleri; B, yaprak yüzey alanındaki değişimleri; C, kök uzunluğundaki değişimleri; D, klorofil miktarlarındaki değişimleri göstermektedir.

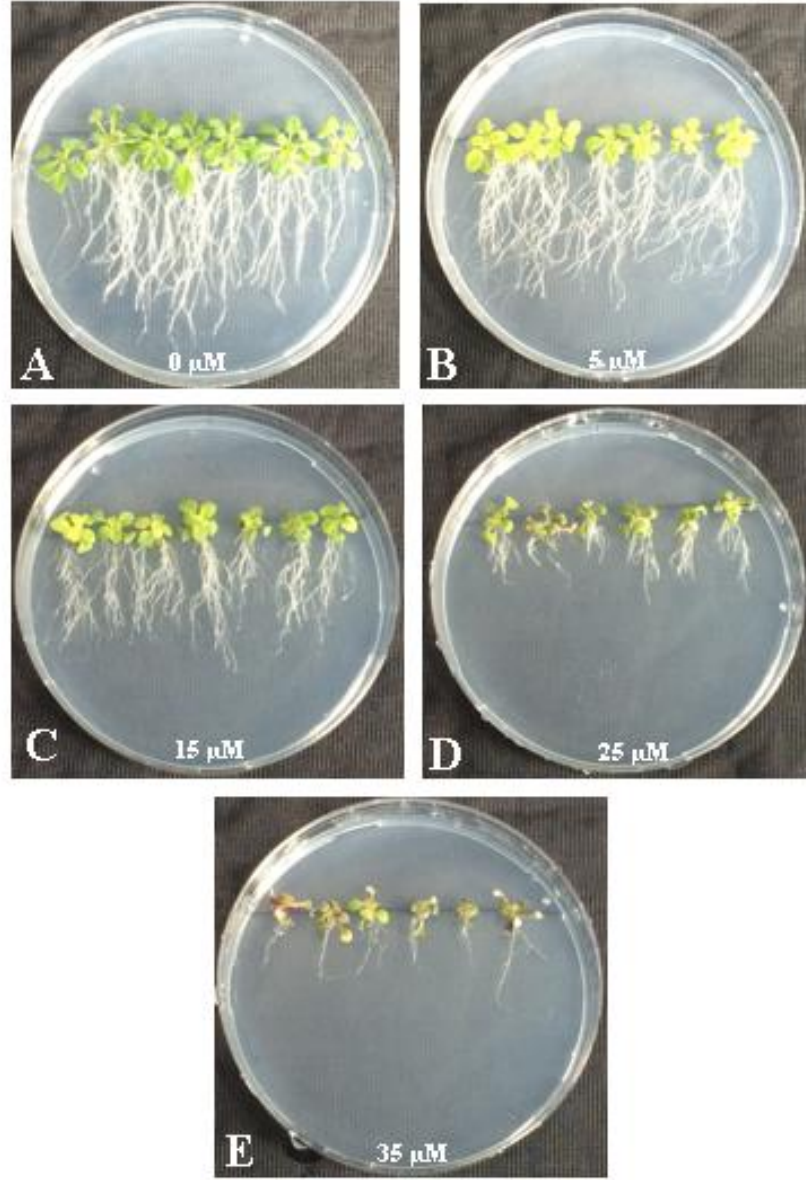
Grafik verilerine ek olarak yapılan morfolojik analizlerin değerlerinin ortalamaları ve standart hataları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Farklı NaCl konsantrasyonlarının morfolojik olarak etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

NaCl (mM)	Yaprak Sayısı	Yaprak Yüzeý Hacimi (cm ²)	Kök Uzunluğu (cm)	Klorofil Miktarı (mg/kuru ağırlık)
0	9,472 \pm 0,25	0,4652 \pm 0,01	3,983 \pm 0,13	8,011 \pm 0,75
100	6,861 \pm 0,25	0,2064 \pm 0,02	2,611 \pm 0,11	3,620 \pm 0,58
150	4,889 \pm 0,32	0,1569 \pm 0,01	1,603 \pm 0,06	2,457 \pm 0,42
200	0,500 \pm 0,15	0,01113 \pm 0,00	0,2867 \pm 0,08	0,2590 \pm 0,25

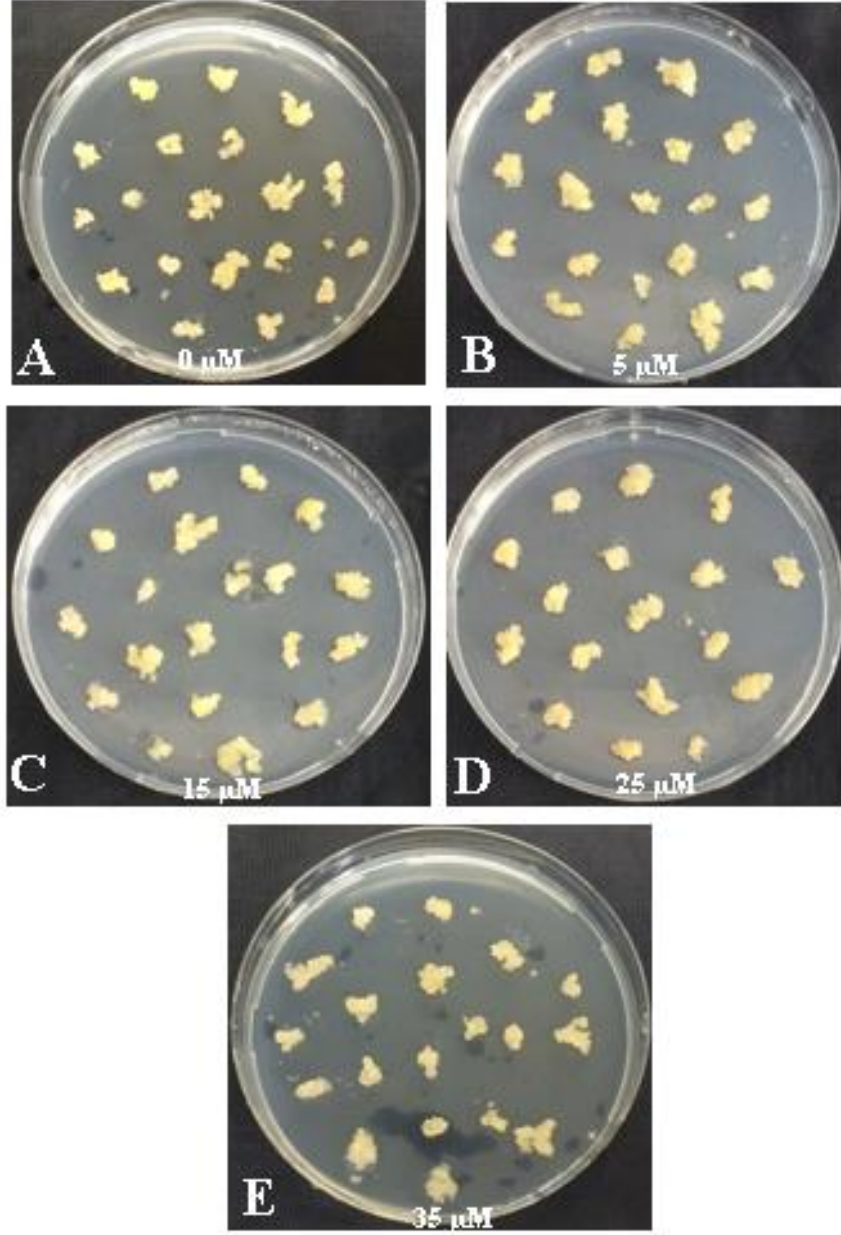
4.2.2. Absisik Asit (ABA) Uygulaması

Bir hafta sonunda bitkilerin ABA uygulanmasından etkilenmesi NaCl çalışmalarına paralel olarak değerlendirildi ve gen anlatım çalışmaları ve metilasyon analizleri için 0, 5, 15 μ M konsantrasyonları ile devam etmeye; morfolojik ve fizyolojik analizler için ise 0, 5, 15, 25 ve 35 μ M konsantrasyonları ile çalışılmaya karar verildi. 0, 5, 15, 25 ve 35 μ M konsantrasyonlarında ABA içeren besiyerinde büyüyen bitkiler morfolojik ve fizyolojik olarak değerlendirilerek klorofil miktarları, yaprak sayısı, yaprak yüzeý alanı, kök boyu değerlendirildi. ABA uygulaması sonrasında bitkilerin genel görünümü Őekil 4.7’de verildi.



Şekil 4.7: Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda ABA'ya maruz kalan *A. thaliana* bitkileri. A, 0 µM konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen bitkileri; B, 5 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri; C, 15 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri; D, 25 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri; E, 35 µM konsantrasyonda yetişen bitkileri temsil etmektedir.

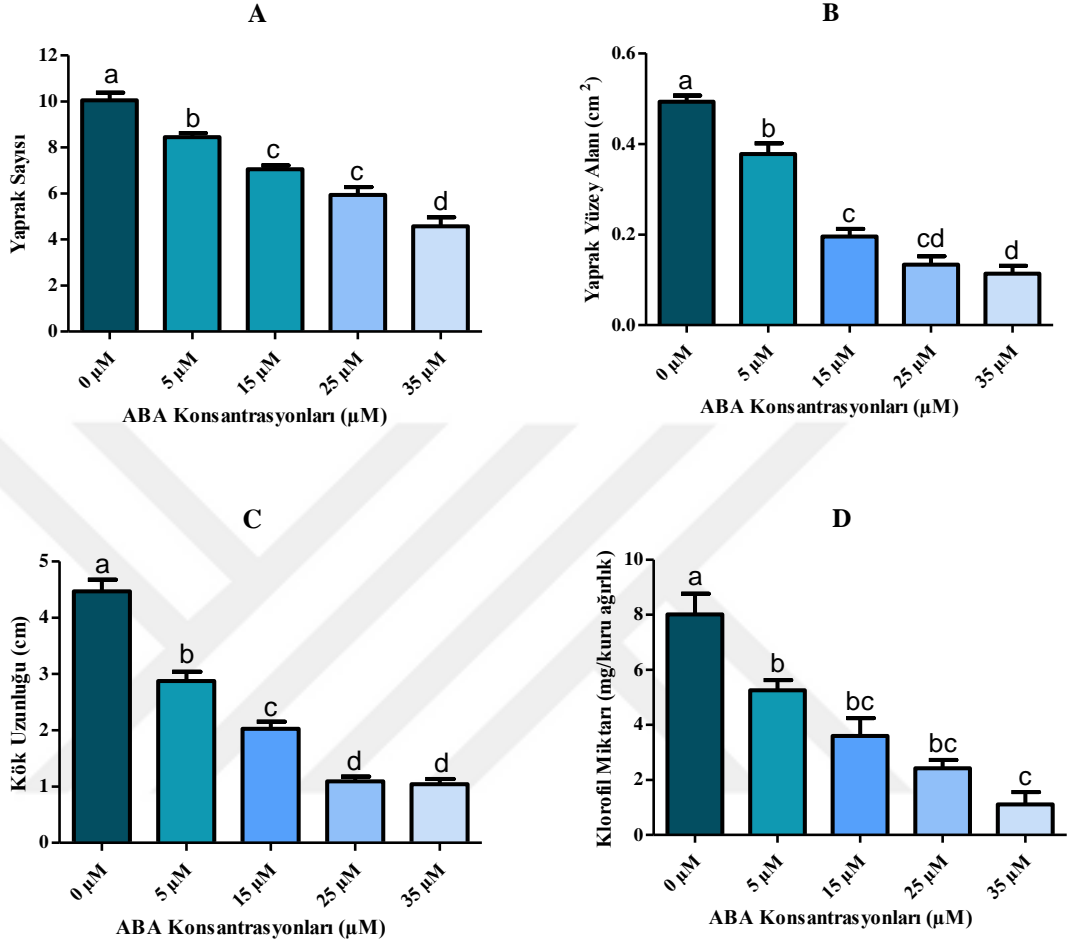
Benzer şekilde kallus kültürleri de 0.5 mg/l 2,4-D'ye ek olarak 0, 5, 15, 25 ve 35 µM konsantrasyonlarında ABA içeren MS besiyerlerine aktarılarak bir hafta bitki büyüme kabininde tutuldu. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi kallusların morfolojisinde herhangi bir değişim gözlemlenmedi.



Şekil 4.8: Bir hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda ABA'ya maruz kalan *A. thaliana* kallusları. A, 0 μ M konsantrasyonda yetişen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen kallusları; B, 5 μ M konsantrasyonda kültürlen kallusları; C, 15 μ M konsantrasyonda kültürlen kallusları; D, 25 μ M konsantrasyonda kültürlen kallusları; E, 35 μ M konsantrasyonda kültürlen kallusları temsil etmektedir.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi uygulanan ABA konsantrasyonu arttıkça bitkinin gelişiminin önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. ABA uygulaması yapılan bitkilerde 15 ile 25 μM grupları arasındaki karşılaştırmalar hariç bütün gruplar arasında yaprak sayısı anlamlı olarak azalmıştır. Yaprak yüzey alanları, 15 ile 25 μM ve 25 ile 35 μM grupları arasındaki karşılaştırmalar hariç anlamlı olarak azalmıştır. Kök uzunlukları ise, 25 ve 35 μM grupları arasındaki karşılaştırmalar hariç bütün gruplar arasında anlamlı ölçüde kısalmıştır. Klorofil miktarları ise; 0 ile 5, 15, 25, 35 μM ve 5 ile 35 μM grupları arasında anlamlı diğer gruplar arasında anlamsız olarak düşüş göstermiştir.

Arabidopsis thaliana bitkilerine uygulanan ABA uygulaması sonrasında morfolojik ve fizyolojik değişimleri belirlemek üzere yaprak sayıları, yaprak yüzey alanları, kök boyları ve klorofil miktarları değerlendirildi. GraphPad Prism® 5.01 bilgisayar programı kullanılarak tek yönlü ANOVA (‘One-Way-AVOVA’, tek yönlü varyans analizi) ve Tukey testi ile istatistiksel analizler yapıldı ve Şekil 4.9’da verilen grafik çizildi. $P < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.9: *A. thaliana* tüm bitkisine farklı konsantrasyonlarda ABA uygulanması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimler. A; yaprak sayısındaki değişimleri; B, yaprak yüzey alanındaki değişimleri; C, kök uzunluğundaki değişimleri; D, klorofil miktarlarındaki değişimleri göstermektedir.

Grafik verilerine ek olarak yapılan morfolojik analizlerin değerlerinin ortalamaları ve standart hataları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: Farklı ABA konsantrasyonlarının morfolojik olarak etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

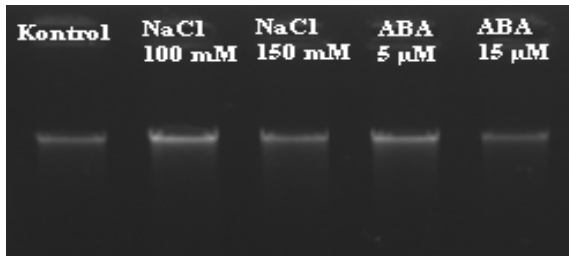
ABA (μ M)	Yaprak Sayısı	Yaprak YüzeY Hacimi (cm^2)	Kök Uzunluğu (cm)	Klorofil Miktarı (mg/kuru ağırlık)
0	10,05 \pm 0,33	0,4932 \pm 0,01	4,469 \pm 0,20	8,011 \pm 0,75
5	8,442 \pm 0,18	0,3777 \pm 0,02	2,877 \pm 0,16	5,257 \pm 0,37
15	7,049 \pm 0,17	0,1955 \pm 0,01	2,026 \pm 0,12	3,599 \pm 0,64
25	5,939 \pm 0,33	0,1331 \pm 0,01	1,096 \pm 0,08	2,421 \pm 0,30
35	4,571 \pm 0,39	0,1139 \pm 0,01	1,043 \pm 0,09	1,113 \pm 0,44

NaCl ve ABA uygulaması sonrasında yapılan morfolojik analizler ile 150 mM NaCl ve 15 μ M ABA konsantrasyonlarından sonra bitkilerin öldürücü derecelerde etkilendiği ve bu dozların yaşamla bağdaşmadığı belirlendi. Metilasyon ve gen anlatımı analizlerinde kullanılmak üzere yeterli miktarda DNA ve parçalanmamış RNA izole edilemediği için çalışmalara 100, 150 mM NaCl ve 5, 15 μ M ABA ile devam edilmesine karar verildi.

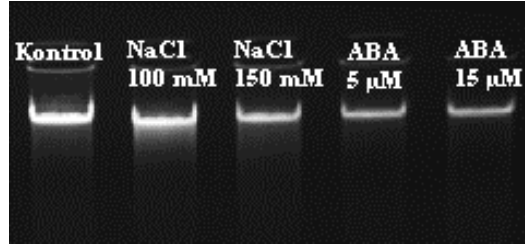
4.3. HPLC İLE GENOM DÜZEYİNDE METİLYASYONUN BELİRLENMESİ

4.3.1. DNA İzolasyonu

HPLC ile metilasyon düzeylerinin belirlenebilmesi için NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* bitki ve kalluslarından DNA izolasyonu yapılarak bütünlükleri Şekil 4.10 ve 4.11'de gösterildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. A_{260}/A_{280} oranı \approx 1.8 olan DNA'lar saf olarak kabul edildi ve deneylerde kullanıldı.



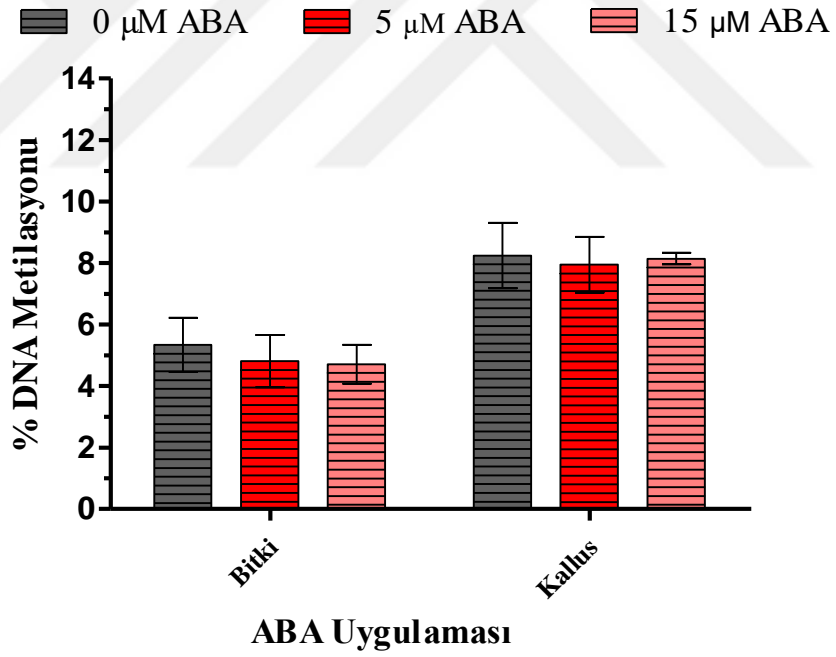
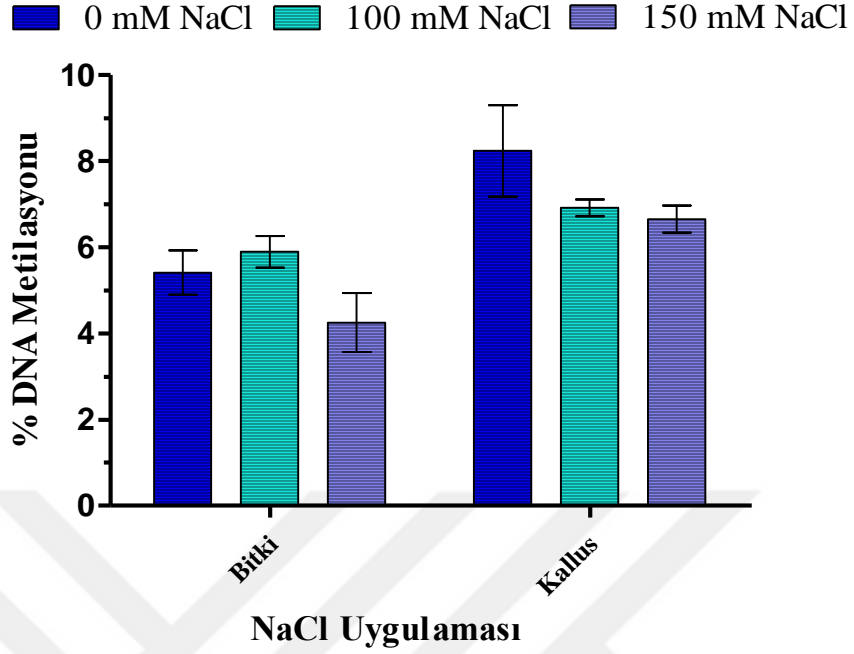
Şekil 4.10: NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.



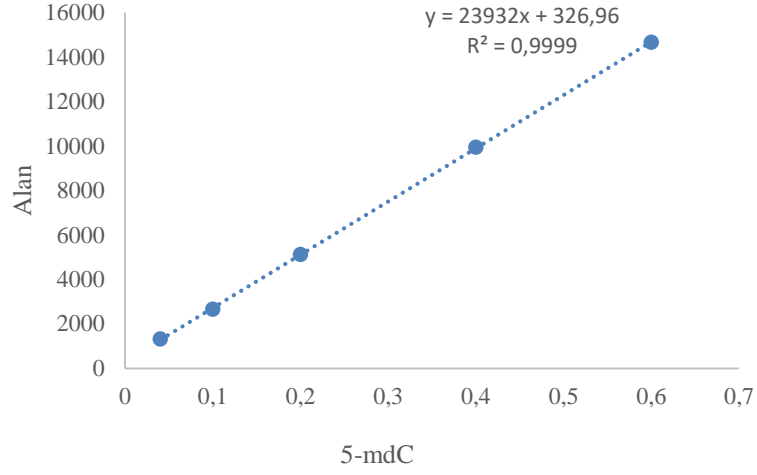
Şekil 4.11: NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* kalluslarından izole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

4.3.2. HPLC Analizleri

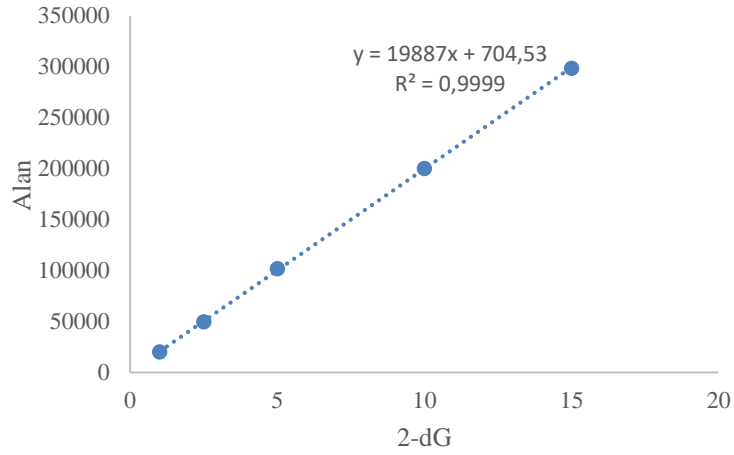
İzole edilen bitki ve kallus DNA'ları RNaz uygulamasının ardından hidroliz edilerek DNA deoksiribonükleozidlere ayrıldı ve HPLC ile analiz edildi. HPLC analizleri sonucunda belirlenen metilasyon değişimleri Şekil 4.12'deki grafiklerde gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucunda NaCl uygulaması yapılan Arabidopsis bitki ve kalluslarında hipometilasyon görülürken; ABA uygulaması yapılan Arabidopsis bitki ve kalluslarında metilasyon düzeyinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Bu analizlerde kullanılan 5-mdC ve 2-dG standartlarının kalibrasyon eğrileri ise Şekil 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.12: NaCl ve ABA uygulaması yapılan Arabidopsis bitki ve kalluslarında genomik DNA metilasyonu değışiminin gösterilmesi.



Şekil 4.13: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 5-mdC standartlarının kalibrasyon eğrisi.



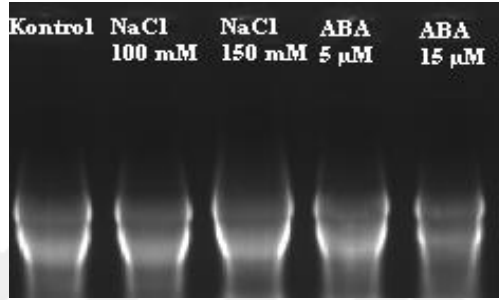
Şekil 4.14: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 2-dG standartlarının kalibrasyon eğrisi.

4.4. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

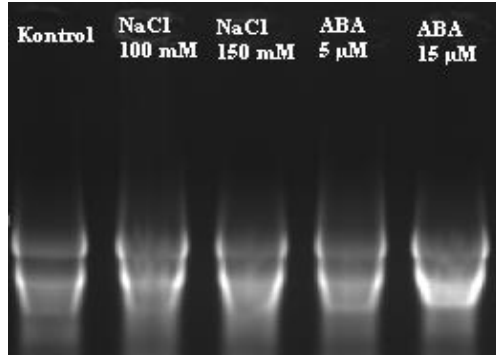
Genomik metilasyon analizleri gerçekleştirilen *A. thaliana* bitki ve kallus kültürleri epigenetik mekanizmalarda yer aldıkları bilinen *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin stres koşullarındaki anlatım düzeyleri için de analiz edildi.

4.4.1. RNA İzolasyonu

Gen anlatım düzeylerinin belirlenebilmesi için NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* bitki ve kalluslarından RNA izolasyonu yapılarak bütünlükleri Şekil 4.15 ve 4.16'da gösterildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi ve deneylerde kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi ile bütünlükleri kontrol edilen RNA'lardan GZ-PZR reaksiyonlarında kalıp olmak üzere cDNA sentezlendi.



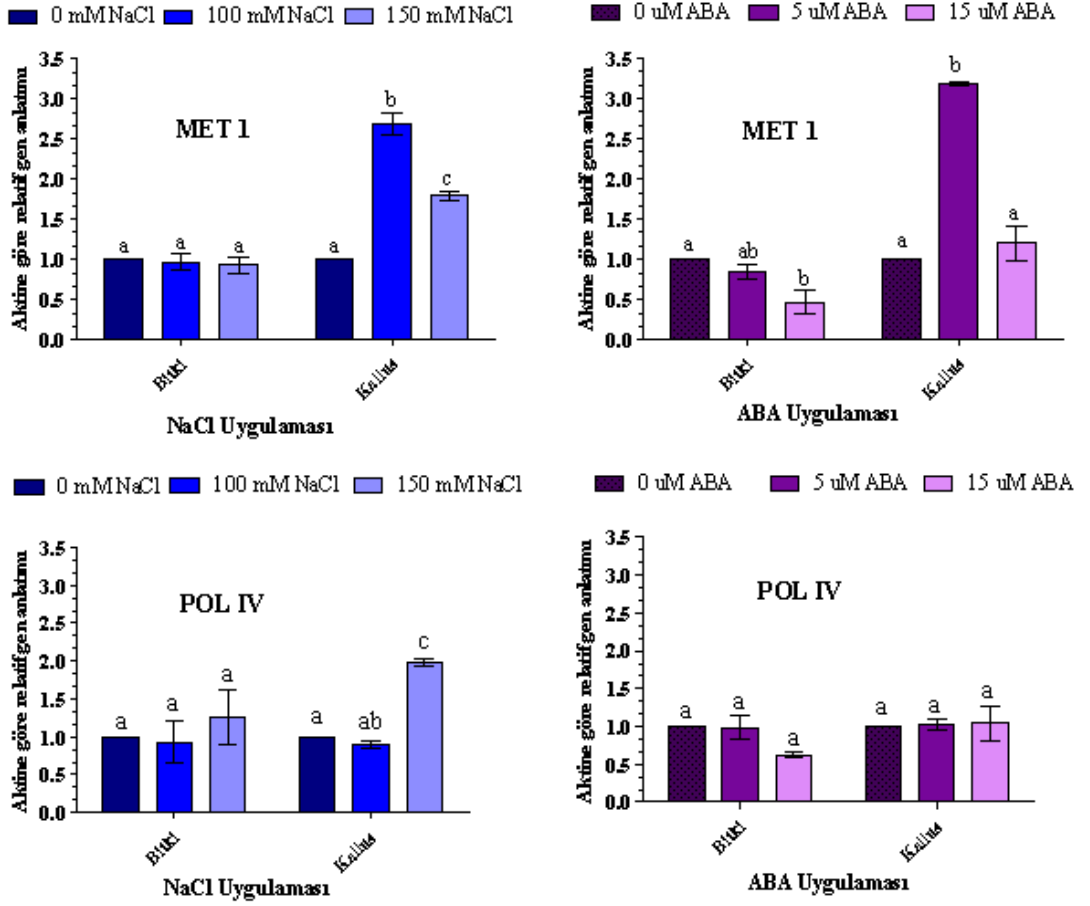
Şekil 4.15: NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.



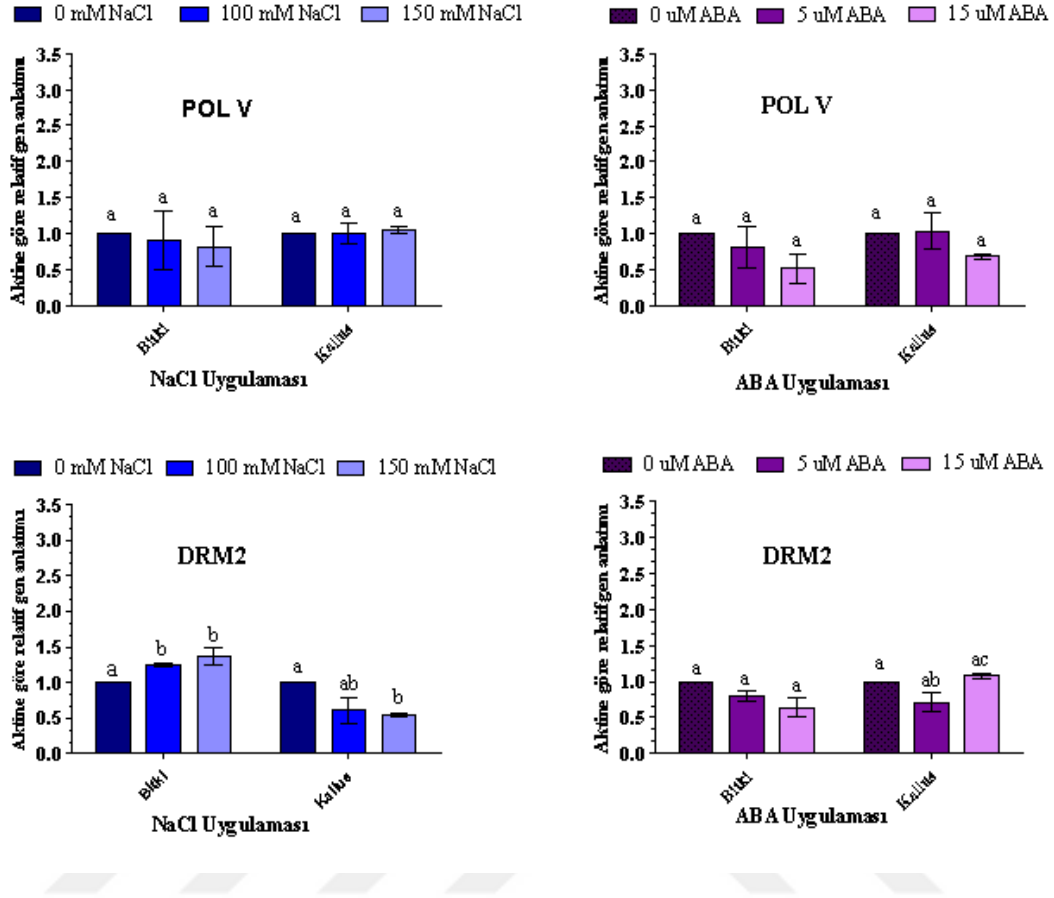
Şekil 4.16: NaCl ve ABA uygulaması yapılan *A. thaliana* kalluslarından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

4.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

NaCl ve ABA stresine maruz bırakılmış *A. thaliana* bitki ve kalluslarında seçilen *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatım düzeyleri GZ-PZR reaksiyonu ile analiz edildi. Gen anlatımlarının değişimi Şekil 4.17 ve 4.18'de verilen grafiklerde özetlenmiştir.



Şekil 4.17: GZ-PZR analizleri sonucunda *MET1* ve *Pol IV* genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım düzeylerinin değişiminin grafiksel olarak gösterimi.



Şekil 4.18: GZ-PZR analizleri sonucunda *Pol V* ve *DRM2* genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım düzeylerinin değişiminin grafiksel olarak gösterimi.

NaCl uygulamasının aktin genine göre gen anlatım değişiminin katsayıları Tablo 4.3'te özetlenmiştir. Bitkilere NaCl uygulaması sonucunda *MET1* anlatımının değişmediği; ancak kalluslara NaCl uygulaması sonucunda 100 mM NaCl uygulamasının hücrede sürekli anlatım yapan aktine göre 2.68 kat, 150 mM NaCl uygulamasının ise yaklaşık 1.79 kat anlatımı arttırdığı belirlenmiştir. NaCl uygulamasının bitkilerde 100 mM konsantrasyonun *Pol IV* ve *Pol V* anlatımını değiştirmedeği; 150 mM konsantrasyonunu ise *Pol IV* anlatımını 1.26 kat arttırırken, *Pol V* anlatımını 0.82 kat azalttığı belirlenmiştir. NaCl uygulaması kalluslarda ise *Pol V* anlatımında herhangi bir değişim yapmazken; *Pol IV* anlatımını 150 mM konsantrasyonda 1.99 kat arttırmıştır. NaCl uygulamasının bitkilerde *DRM2* anlatımını 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında sırasıyla 1.24 ve 1.36 kat

arttırdığı, kalluslarda ise 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında sırasıyla 0.60 ve 0.54 kat azalttığı belirlenmiştir.

Tablo 4.3: Arabidopsis bitki ve kalluslarına NaCl uygulaması sonrasında *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatımlarındaki değişimlerin aktin genine göre rölatif katsayıları.

NaCl (mM)	<i>MET1</i>		<i>Pol IV</i>		<i>Pol V</i>		<i>DRM2</i>	
	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus
0 (Kontrol)	1	1	1	1	1	1	1	1
100	0.97	2.68	0.93	0.89	0.91	0.99	1.24	0.60
150	0.93	1.79	1.26	1.99	0.82	1.06	1.36	0.54

Tablo 4.4: Arabidopsis bitki ve kalluslarına ABA uygulaması sonrasında *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatımlarındaki değişimlerin aktin genine göre rölatif katsayıları.

ABA (μ M)	<i>MET1</i>		<i>Pol IV</i>		<i>Pol V</i>		<i>DRM2</i>	
	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus
0 (Kontrol)	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0.84	3.18	0.99	1.02	0.82	1.04	0.79	0.71
15	0.46	1.20	0.63	1.04	0.52	0.68	0.64	1.07

ABA uygulamasının aktin genine göre gen anlatım değişiminin katsayıları Tablo 4.4'te özetlenmiştir. ABA uygulaması bitkilerde *MET1* anlatımını 5 μ M için 0.84, 15 μ M için ise 0.46 kat düşürürken; kalluslarda ise 5 μ M konsantrasyonda 3.18 kat arttırırken, 15 μ M konsantrasyonda ise 1.20 kata kadar arttırdığı belirlenmiştir. ABA uygulaması bitkilerde 5 μ M konsantrasyonda *Pol IV* anlatımını etkilemezken, *Pol V* anlatımını 0.82 kat azaltmıştır. 15 μ M ABA uygulaması ise bitkilerde *Pol IV* ve *Pol V* anlatımını sırasıyla 0.63 ve 0.52 kat azaltmıştır. Kalluslarda ise ABA uygulaması *Pol IV* üzerinde bir etki göstermezken, 15 μ M ABA uygulaması *Pol V* anlatımını 0.68 kat azaltmıştır. ABA uygulaması bitkilerde *DRM2* anlatımını 5 ve 15 μ M için sırasıyla 0.79 ve 0.64 kat

azaltırken, kalluslarda da 5 μM konsantrasyonda gen anlatımında 0.71 katlık azalma gösterirken 15 μM konsantrasyonda ise bir etki göstermemiştir.

NaCl ve ABA'nın gen anlatımı üzerindeki etkileri arasında yüksek oranda farklılık olmamasına rağmen belirgin farklılığın hem bitki hem de kallus örneklerinde NaCl etkisinde yalnızca *Pol IV* anlatımında artış şeklinde olduğu, *DRM2* geni açısından ise ABA etkisinden farklı olarak bitki örneklerinde artış eğiliminde olduğu gözlenmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler toprağa bağımlı canlılar oldukları için değişen çevre koşullarından ya da maruz kaldıkları stresten kaçamazlar. Bu yüzden; anatomik, morfolojik, hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde çeşitli mekanizmalar geliştirerek hayatta kalmak için bu koşullara karşı cevap vermeye ve adapte olmaya çalışırlar (Gravitol ve diğ., 2012). Başta kuraklık ve tuzluluk olmak üzere olumsuz çevre koşulları bitkilerin gelişimini ve verimini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Buna karşılık dünya nüfusu da endişe verici bir hızla artmaktadır. Bu durum tarım endüstrisinin sürdürülebilirliğini ve sonuç olarak insanların besin ihtiyacının karşılanmasını tehlikeye sokmaktadır (Mahajen ve Tuteja, 2005). Tüm sorunların üstesinden gelebilmek için olumsuz çevre koşullarına adapte olmuş, verimi yüksek bitkiler geliştirilmelidir. Bu bağlamda da ilk adım bitkilerin değişen çevre koşullarına ve strese verdikleri cevapların moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıdır.

Arabidopsis thaliana, genomu dizilenen ilk bitki olmasının yanı sıra genetik mühendisliği uygulamalarına elverişli olduğu için önemli bir model organizmadır. Şu ana kadar *Arabidopsis* ile yapılan çalışmalar pek çok hücresel sürecin aydınlatılmasına olanak sağlamıştır ve sağlamaya da devam etmektedir. Model organizmalardan elde edilen bilgiler ışığında, daha kısa sürede ve daha az maliyetle ekonomik ve tarımsal öneme sahip bitkiler geliştirilebilir.

Günümüzde ek olarak DNA metilasyonu, kromatin modifikasyonları ve siRNA aracılı mekanizmalar gibi epigenetik modifikasyonların da fenotipin oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Gravitol ve diğ., 2012).

Bu tez çalışmasında da *Arabidopsis thaliana* bitki ve kallus kültürleri kullanılarak NaCl ve ABA uygulamasının genomik DNA metilasyonu ve stres sonucu epigenetik modifikasyonlarda önemli olduğu bilinen *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Tuzluluk bitkilerin doğada en sık maruz kaldığı stres koşullarındandır ve bitki gelişimini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Hücrede tuzluluk stresi sonucunda Na⁺, K⁺, H⁺ ve Ca⁺

iyonları arasındaki etkileşim sonucu hücre homeostasisi korunur. Bitki hücrelerinin tuza maruz kalması ile osmotik stres ortaya çıkar; uzun süre tuza maruz kalan bitki hücrelerinde iyonik stres oluşması sonucunda iyonik denge bozulur. Tuza maruz kalan her bitki çevreden Na^+ alır ve diğer hücrelerine, doku ve organlarına iletir (Maathuis ve diğ., 2014). Yüksek konsantrasyonlarda Na^+ osmotik dengenin bozulmasına neden olur; bunun sonucunda hücre bölünmesi engellenir ve bitki büyümesi yavaşlar. Aynı zamanda, fotosentezde ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde de azalma gerçekleşir (Niu ve diğ., 1995; Yeo, 1998). *Gossypium davidsonii* (pamuk) bitkisine tuz stresi uygulayan Zhang ve diğ. (2016), yaptıkları çalışmalar sonucunda, tuz stresinin fotosentetik yolları ve hücre homeostasisini etkileyerek bitki gelişimini kısıtladığını ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında, bir haftalık Arabidopsis bitkileri ve kallus kültürleri 7 gün boyunca 0, 100, 150 ve 200 mM konsantrasyonlarında NaCl'ye maruz bırakılarak morfolojik etkileri incelenmiştir. NaCl'ye maruz kalan Arabidopsis bitkilerinin morfolojik olarak gelişimlerinin etkilendiği çok belirgin bir şekilde görülmektedir. 200 mM konsantrasyona maruz kalmış Arabidopsis bitkilerinin %71'i ölmüştür. Yapılan morfolojik analizler sonucunda bitkilerin yaprak sayılarının bütün gruplar arasında anlamlı olarak azaldığı, yaprak boyutlarının 100 ve 150 mM NaCl arasında anlamlı olarak küçülmediği ancak diğer gruplar arasında anlamlı olarak küçüldüğü, köklerin uzunluğunun bütün gruplar arasında konsantrasyon artışına paralel anlamlı olarak kısaldığı; klorofil miktarlarının ise 0 ile 100 mM, 0 ile 150 mM, 0 ile 200 mM, 100 ile 200 mM arasında anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bütün morfolojik analizler istatistiksel olarak değerlendirilerek $P < 0.05$ seviyesinde anlamlı oldukları belirlenmiştir. Buna karşılık; Arabidopsis kallus kültürlerinde belirgin bir morfolojik değişim belirlenmemiştir. Mısırda 0, 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl uygulanmasının ardından da benzer şekilde kök ve sürgün gelişiminin kısıtlandığı bildirilmiştir (Li ve diğ., 2014). *Solanum nigrum* ile yapılan bir çalışmada da 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulamasının sürgün ve kök gelişimini kısıtladığı ve ayrıca karotenoid ve flavonoid metabolizmalarını da etkilediği belirlenmiştir (Ben Abdallah ve diğ., 2016).

ABA, tohum depo protein ve yağlarının sentezlenmesi gibi tarımsal olarak önemli birçok aşamasında önemli birçok özellik açısından ve tohum olgunlaşması, çimlenmesinden, stomaların açılıp kapanması ve abiyotik strese karşı yanıtların düzenlenmesinden sorumlu

lipofilik bir bitki hormonudur (Rock, 2000; Finkelstein ve diğ., 2002; Xiong ve Zhu, 2003). ABA bitki hücrelerinde endojen sinyal molekülü olarak görev yaptığı için bitkilere dışarıdan ABA uygulanması stres koşulu etkilerinin oluşumunu sağlar ve bitkinin stres koşullarına karşı verdiği moleküler cevap, gen anlatımının değişimi şeklinde belirlenebilir. Bu etkiyi yaratmak için bir haftalık Arabidopsis bitkilerine ve kallus kültürleri bir hafta boyunca 0, 5, 15, 25 ve 35 μM konsantrasyonlarında ABA'ya maruz bırakıldı. Bir hafta sonunda ABA konsantrasyonu arttıkça bitkinin gelişiminin önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. ABA uygulaması yapılan bitkilerde 15 ile 25 μM grupları arasındaki karşılaştırmalar hariç bütün gruplar arasında yaprak sayısı anlamlı olarak azalmıştır. Yaprak yüzey alanları, 15 ile 25 μM ve 25 ile 35 μM grupları arasındaki karşılaştırmalar hariç anlamlı olarak azalmıştır. Kök uzunlukları ise, 25 ve 35 μM grupları arasındaki karşılaştırmalar hariç bütün gruplar arasında anlamlı ölçüde kısalmıştır. Klorofil miktarları ise; 0 ile 5, 15, 25, 35 μM ve 5 ile 35 μM grupları arasında anlamlı diğer gruplar arasında anlamsız olarak düşüş göstermiştir. Singh ve Khurana (2016) da Arabidopsis tohumlarında 0.5, 1 ve 2 μM ABA'nın çimlenmeyi azalttığını göstermişlerdir. İki farklı *Malus* türü ile yapılan çalışma sonucunda da, bitkilere ABA uygulaması sonucunda bitki uzamasının, toplam biyokütlenin, yaprak alanının ve fotosentezin belirgin olarak azaldığı belirlenmiştir (Ma ve diğ., 2008).

Bitkilerin abiyotik strese karşı cevabı strese özel genlerin anlatımlarının düzenlenmesine bağlıdır. Eğer gen anlatımının düzenlenmesinde ya da sinyal iletiminde cevap yetersiz kalırsa hücredeki işlevsel ve yapısal proteinler geri dönüşümü olmaksızın hasar görür ve hücre ölüme sürüklenir (Wang ve diğ., 2003). Gen anlatımının düzenlenmesinde DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve siRNA mekanizmalarını içeren epigenetik modifikasyonlar yer almaktadır. Epigenetik mekanizmalar kodlama yapan bölgeyi değil aynı zamanda kodlama yapmayan bölgedeki DNA dizilerini de kontrol ederler; böylece genomik kararlılık devam ettirilebilir (Dupont ve diğ., 2009). DNA metilasyonu en yaygın epigenetik modifikasyonlardandır ve bitkilerin strese karşı cevap oluşturmasında ve genomik kararlılığın sağlanmasında önemlidir. Bitki genomlarının diğer ökaryotik genomlara göre çok daha fazla metilasyona uğradığı bilinmektedir (Sahu ve diğ., 2013). Global metilasyon, genomik DNA'da bulunan metillenmiş sitozinlerin oranı olarak tanımlanmaktadır ve çeşitli organizmaların çevresel değişimlere verdiği cevapların ortaya konmasında epigenetik değişimlerin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Santoyo ve diğ.,

2011). Strese maruz kalan bitkiler genomik bölgelere bağlı olarak DNA metilasyonunda artma ya da azalma gösterebilir. Gen anlatımında artmaya neden olabilen hipometilasyonun strese karşı daha yaygın bir cevap olduğu görülmektedir (Bilichak ve diğ., 2012). Farklı hormon konsantrasyonları uygulanarak kültürlenmiş *Brassica napus* bitki eksplantları ile yapılan bir çalışma sonucunda, metilasyon seviyelerinin değişimleri HPLC yöntemi kullanılarak gözlemlenmiş ve hipokotillerin kültürlenmesi süresince metilasyon seviyelerinin değiştiği belirlenmiştir (Gao ve diğ., 2014).

Bu tez çalışmasının kapsamında NaCl ve ABA uygulamasının genomik DNA metilasyon düzeyine etkileri bitki ve kalluslarda araştırılmıştır. HPLC analizleri sonucunda bitki ve kalluslara ABA uygulamasının anlamlı bir değişim yaratmadığı; NaCl uygulamasının ise bitki ve kalluslarda hipometilasyona neden olduğu belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada, biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz bırakılmış tütün ile yapılan bir araştırma sonucunda hipometilasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir (Wada ve diğ., 2003; Choi ve Sano, 2007). Migicovsky ve diğ. (2014) Arabidopsis'e sıcaklık stresi uygulanması sonucunda NaCl etkisine benzer olarak global DNA hipometilasyonu gerçekleştiğini belirlemiştir.

Genel olarak bitkilerde sitozin metilasyonu MET1, CMT3 ve DRM enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu tez çalışmasında, CpG dizilerinin metillenmesinden sorumlu olduğu bilinen MET1 enziminin stres koşulları altındaki anlatım düzeyi bitki ve kallus kültürlerinde incelenmiştir. Bitkilere NaCl uygulaması sonucunda *MET1* anlatımının değişmediği; ancak kalluslara 100 mM NaCl uygulamasının *MET1* gen anlatımını 3 kat, 150 mM NaCl uygulamasının ise yaklaşık 2 kat arttırdığı belirlenmiştir. ABA uygulaması ise bitkilerde *MET1* anlatımını 0.5 kata kadar düşürürken; kalluslarda ise 5 µM konsantrasyonda 3 kat arttırmış, 15 µM konsantrasyonda ise en fazla 1.25 kata kadar arttırdığı belirlenmiştir. Naydenov ve diğ. (2015) 6, 24 ve 48 saat sıcaklık stresi uyguladıkları Arabidopsis bitkilerinde yaptıkları gen anlatımı analizleri sonucunda *MET1* anlatımının 6 saatlik uygulamada arttığını, 24 ve 48 saat sonucunda ise azaldığını belirlemişlerdir.

DRM2 enzimi ise bitkilerde siRNA'larla beraber asimetric CpNpNp dizilerinin metilasyonundan sorumludur (Zhang, 2008). Bu çalışmasında DRM2 enziminin stres koşulları altındaki anlatım düzeyi bitki ve kallus kültürlerinde incelenmiştir. NaCl

uygulamasının bitkilerde *DRM2* anlatımını arttırdığı, kalluslarda ise 0.5 kata kadar azalttığı belirlenmiştir. ABA uygulaması ise bitkilerde *DRM2* anlatımını azaltırken; kalluslarda da 5 μ M konsantrasyonda gen anlatımında azalma göstermiş, 15 μ M konsantrasyonda ise anlamlı bir etki göstermemiştir. Naydenov ve diğ. (2015) 6, 24 ve 48 saat sıcaklık stresi uyguladıkları Arabidopsis bitkilerinde yaptıkları gen anlatımı analizleri sonucunda *DRM2* anlatımının 6, 24 ve 48 saat saatlik uygulamada arttığını, ancak artışın en çok 6 saatlik uygulama sonucunda gözlemlendiğini belirlemiştir.

DNA metilasyonu RNA aracılı olarak da gerçekleştirilebilir. Bitkilerde Pol IV ve Pol V enzimleri RNA aracılı DNA metilasyonunda (RdDM) rol oynamaktadır. Bitkilerde Pol IV, siRNA üretimi için gerekmektedir; Pol V ise argonat proteini 4'ün (AGO4) kromatine yönlendirilmesine yardımcı olur (Wierzbicki ve diğ., 2008; Wierzbicki ve diğ., 2009). Stres koşulları altında bu mekanizmaların aktif olup olmadığını anlamak için bu mekanizmalarda yer alan *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatım düzeyleri araştırılmıştır. NaCl uygulamasının bitkilerde 100 mM konsantrasyonun *Pol IV* ve *Pol V* anlatımını azalttığı; 150 mM konsantrasyonunu ise *Pol IV* anlatımını yaklaşık 1.3 kat arttırırken, *Pol V* anlatımını 0.7 kat azalttığı belirlenmiştir. NaCl uygulaması kalluslarda ise *Pol V* anlatımında herhangi bir değişim yapmazken; 150 mM NaCl uygulaması *Pol IV* anlatımını yaklaşık 2 kat arttırmıştır. ABA uygulaması bitkilerde 5 μ M konsantrasyonda *Pol IV* anlatımını etkilemezken, *Pol V* anlatımını azaltmıştır. 15 μ M ABA uygulaması ise bitkilerde hem *Pol IV* hem de *Pol V* anlatımını yaklaşık 0.5 kat azaltmıştır. Kalluslarda ise ABA uygulaması *Pol IV* üzerinde bir etki göstermezken, 15 μ M ABA uygulaması *Pol V* anlatımını yaklaşık 0.6 kat azaltmıştır.

DNA metiltransferaz ve histon metiltransferaz mutantları ile yapılan analizler sonucunda DNA metilasyonu ve posttranslasyonel histon modifikasyonları arasında güçlü bir bağlantının olduğu ortaya konmuştur (Bilichak ve diğ., 2012). Histon modifikasyonları arasından histon asetilasyonu DNA'ya doğrudan ulaşım sağlayarak transkripsiyonel aktifleşme sağlar. Histon metilasyonu ise gen anlatımını azaltıcı ya da arttırıcı etki yaratabilir. Lang-Mladek ve diğ. (2010) sıcaklık stresi uyguladıkları somatik Arabidopsis dokularında yaptıkları analizler sonucunda gen anlatımı ve histon asetilasyonu arasında pozitif bağlantı bulurken; gen anlatımı ve metilasyon arasında herhangi bir bağlantı gözlemlenmemişlerdir. Ancak Bilichak ve diğ. (2012) abiyotik ve biyotik stres koşulları

altında DNA metilasyon değişimine bağlı olarak, DNA metilasyonu ile ilişkili enzim genlerinde de paralel değişimleri destekleyen pek çok bulgunun olduğunu bildirmektedir.

Bu tez çalışmasında da NaCl ve ABA uygulanmış Arabidopsis bitki ve kalluslarında genomik DNA metilasyonu ve epigenetik mekanizmalarda görevli *MET1*, *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* genlerinin anlatımları analiz edilmiştir. NaCl uygulaması sonucunda bitki ve kalluslarda genomik hipometilasyon görülürken, ABA uygulaması sonucu metilasyon düzeyinde herhangi bir değişim saptanmamıştır.

Naydevov ve diğ. (2015) Arabidopsis'te sıcaklık uygulaması sonucunda DNA metilasyonunda görev alan DNA metiltransferazların, DNA demetilaz *ROS1* ve RdDM mekanizmasında görevli *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımını incelemiş ve sonuç olarak sıcaklık stresi altında *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* anlatımının arttığını, buna bağlı olarak da göreceli DNA metilasyonunda artış olduğunu gözlemiştir. Ancak promotör metilasyonu ve gen anlatımı arasında da bağlantı görmemişlerdir. Bu sonuç *Pol IV* ve *Pol V*'in stres koşulları altında gen anlatımını sadece RdDM mekanizması ile düzenlemediğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında ise benzer olarak NaCl uygulaması sonucunda *Pol IV* ve *DRM2* anlatımının bitki örneklerinde artış gösterdiği, ABA uygulamasının ise *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* anlatımlarında genel olarak azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, gerek NaCl uygulaması sonucunda meydana gelen hipometilasyon, gerekse ABA uygulaması ile metilasyon düzeyinin değişmemesinin *Pol IV*, *Pol V* ve *DRM2* anlatımına bağımlı RdDM'ye bağlı olmadığını düşündürmektedir.

Bitkilere NaCl uygulaması sonucunda *MET1* anlatımı değişmezken, kalluslara NaCl uygulaması *MET1* anlatımını arttırmıştır ve hem bitkilerde hem de kalluslarda genomik hipometilasyon gözlenmiştir. Bu bulgular, hipometilasyonun *MET1* tarafından gerçekleştirilen CpG metilasyonu ile doğrudan ilişkili olmadığını düşündürmektedir. ABA uygulaması ise bitkilerde *MET1* anlatımını düşürürken NaCl uygulaması ile benzer şekilde kalluslarda anlatımı arttırmıştır; ancak genomik metilasyonda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. ABA uygulamasının bitki ve kallusdaki *MET1* geni anlatımı üzerinde ters etki yaratması ve genomik metilasyonda bir değişim gözlenmemesi, genomik metilasyonun oluşmasında bilinen başka mekanizmaların varlığını kanıtlar niteliktedir. *DRM2* geni tek başına değerlendirildiğinde, NaCl uygulaması bitkilerde *DRM2* anlatımını arttırırken, kalluslarda tam tersi *DRM2* anlatımını düşürmüştür. CpN

dizilerinin metillenmesinden sorumlu *DRM2* anlatımının kalluslarda azalması ve aynı zamanda hipometilasyon gözlemlenmesi bu durumun CpN dizilerinin hipometilasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. ABA uygulamasının ise bitki ve kalluslarda *DRM2* geni anlatımını düşürücü etki yapması, ABA stresinde farklı dokularda benzer yolların görev aldığını düşündürmektedir. Özetle, NaCl ve ABA stresi uygulanmış farklı *Arabidopsis* dokularında yapılan DNA metilasyon analizi ve anlatım değişimi araştırılan metilasyon ile ilişkili enzim genlerinin düzenlenmesinin doğrudan RdDM ve CpG metilasyonu ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Bulgular yalnızca NaCl uygulamasında *DRM2* anlatım profilinin CpN dizilerinin hipometilasyonunda rol oynadığını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, bitki genomlarında metilasyon düzeyini kontrol eden enzimlerin ve dahil oldukları mekanizmaların belirlenmesi strese dayanıklı, verimi yüksek bitkilerin yetiştirilebilmesi için önemlidir. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bilgilerin de epigenetik temelli stres mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Medrano, M., Herrera, C.M., 2016, MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild growing species, *Molecular Ecology Resources*, 16 (1), 80-90.
- Amtmann, A., Snaders, D., 1998, Mechanism of Na⁺ uptake by plant cells, *Advances in Botanical Research*, 29, 75-112.
- Arabidopsis* Genome Initiative, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 408 (6814), 796-815.
- Armstrong, K.M., Bermingham, E.N., Bassett, S.A., Treolar, B.P., Roy, N.C., Barnett, M.P., 2011, Global DNA methylation by HPLC using low amounts of DNA, *Biotechnology Journal*, 6 (1), 113-117.
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012, The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, *Journal of Experimental Botany*, 63 (10), 3523-3543.
- Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R., Sims, D.A., 1997, Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis, *Physiologia Plantarum*, 100 (2), 203-213.
- Bardini, M., Labra, M., Winfield, M., Sala F., 2003, Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72 (2), 157-162.
- Bebber, D.P., Gurr, S.J., 2015, Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security, *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62-64.
- Ben Abdallah, S., Aung, B., Amyot, L., Lalin, I., Lachaal, M., Karray-Bouraoui, N., 2016, Salt stress (NaCl) affects plant growth and branch pathways of carotenoid and flavonoid biosyntheses in *Solanum nigrum*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 72.
- Berdasco, M., Alcazar, R., Garcia-Ortiz, M.V., Ballestar, E., Fernandez, A.F., Roldan-Arjona, T., Tiburcio, A.F., Altabella, T., Buisine, N., Quesneville, H., Baudry, A., Lepiniec, L., Alaminos, M., Rodriguez, R., Lloyd, A., Colot, V., Bender, J., Canal, M.J., Esteller, M., Fraga, M.F., 2008, Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells, *PloS One*, 3 (10), e3306.
- Bio-Resource, 2013, *TaqMan Assay Vs SYBR Green Assay*, http://technologyinscience.blogspot.com.tr/2013_05_01_archive.html#WCobcdWLTIU, [Ziyaret tarihi: 14 Kasım 2016].
- Bilichak, A., Inytsky, Y., Hollunder, J., Kovalchuk, I., 2012, The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression, *PLoS One*, 7 (1), e30515.

- Bird, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes & Development*, 16 (1), 6-21.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P., 2000, Sodium transport in plant cells, *Biochimica Biophysica Acta*, 1465 (1-2), 140-151.
- Bond, DM., Finnegan, EJ., 2007, Passing the message on: inheritance of epigenetic traits, *Trends in Plant Science*, 12 (5), 211-216.
- Boyko, A., Kovalchuk, I., 2008, Epigenetik control of plant stress response, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49 (1), 61-72.
- Cao, X., Jacobsen, S.E., 2002, Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes, *Proceedings of The National Academy of Sciences U S A*, 99 (4), 16491-16498.
- Carus, S., Çakal, Y., 2005, Yaprak Yüzeyinin Karaçam (*Pinus Nigra* Arnold) Ve Toros Sediri (*Cedrus Libani* A. Rich.) Fidanlarında Dip Çap Ve Boy Artımı Üzerindeki Etkileri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2 (1302-7085), 52-61.
- Chan, S.W., Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., 2005, Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*., *Nature Reviews Genetics*, 6 (5) 351-360.
- Cheow, L.F., Quake, S.R., Burkholder, W.F., Messerschmidt, D.M., 2015, Multiplexed locus-specific analysis of DNA methylation in single cells, *Nature Protocols*, 10 (4), 619-631.
- Chen, M., Lv, S., Meng, Y., 2010, Epigenetic performers in plants, *Development Growth and Differentiation*, 52 (6), 555-566.
- Chen, Q., Tao, S., Bi, X., Xu, X., Wang, L., Li, X., 2013, Research of total levels on DNA methylation based on HPLC analysis, *American Journal of Molecular Biology*, 3, 98-101.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K., 2009a, RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants, *Science China Life Science*, 52 (4), 331-343.
- Chinnusamy, V., Zhu, JK., 2009b, Epigenetic regulation of stress responses in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (2), 133-139.
- Choi, C.S., Sano, H., 2007, Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants, *Molecular Genetics and Genomics*, 277 (5), 589-600.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., 2008, Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning, *Nature*, 452 (7184), 215-219.

- Deeks, M.J., Hussey, P.J., 2009, Plant Actin Biology, *ELS*, DOI: 10.1002/9780470015902.a0021255.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983, A plant DNA miniprep: Version II, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19-21.
- Demirel, G., 2012, *Fumonisin B1'in Toksisitesinde Epigenetik Değişikliklerin Rolünün Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Ding, C., Cantor, C.R., 2004, Quantitative Analysis of Nucleic Acids - the Last Few Years of Progress, *Journal of Biochemical and Molecular Biology*, 37 (1), 1-10.
- Dupont, C.D., Armant, D.R., Brenner, C.A 2009, Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective, *Seminars in Reproductive Medicine*, 27 (5), 351-357.
- Farmer, C., 2013, *West Highland Flora Thale Cress Arabidopsis thaliana*, <http://www.plant-identification.co.uk/skye/cruciferae/arabidopsis-thaliana.htm>, [Ziyaret Tarihi: 17 Kasım 2016].
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., Rock, C.D., 2002, Abscisic acid signaling in seeds and seedlings, *Plant Cell*, 15-45.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J., Dennis, ES., 1998, DNA methylation in plants, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 223-247.
- Flood, J., 2010, The importance of plant health to food security, *Food Security*, 2 (3), 215-231.
- Gao, Y., Ran, L., Kong, Y., Jiang, J., Sokolov, V., Wang, Y., 2014, Assessment of DNA methylation changes in tissue culture of *Brassica napus*, *Russian Journal of Genetics*, 50 (11), 1186-1191.
- Grant-Downton, R.T., Dickinson, H.G., 2005, Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants, *Annals of Botany*, 96 (7), 1143-1164.
- Gravitol, C., Hemerly, AS., Ferreira, PC., 2012, Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819 (2), 176-185.
- Griffith, J.S., Mahler, H.R., 1969, DNA ticketing theory of memory, *Nature*, 223 (5206), 580-582.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Manly, T., Cedar, H., Razin, A., 1981, Sequence specificity of methylation in higher plant DNA, *Nature*, 292 (5826), 860-862.
- Gold, M., Hurwitz, J., 1964, The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid-methylating activity of *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 3858-3865.

- Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., Robinson, R.C., 2015, The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments, *Journal of Cell Science*, 128 (11), 2009-2019.
- Hajkova, P., el-Maari, O., Engemann, S., Oswald, J., Olek, A., Walter, J., 2002, DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method, *Methods in Molecular Biology*, 200, 143-154.
- Hedges, S.B., 2002, The origin and evolution of model organisms, *Nature Reviews Genetics*, 3 (11), 838-49.
- Hedges, S.B., Kumar, S., 2002, Genomics. Vertebrate genomes compared, *Science*, 297 (5585), 1283-1285.
- Heidari, A., Toorchi, M., Bandehagh, A., Shabika, M. R., 2011, Effect of NaCl Stress on Growth, Water Relations, Organic and Inorganic Osmolytes Accumulation in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Lines, *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 1 (3), 351-362.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., Baulcombe, D.C., 2005, RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA, *Science*, 308 (5718), 118-120.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences, *Biotechnology (New York)*, 10 (4), 413-417.
- Hirsch, S., Baumberger, R., Grossniklaus, U., 2012, Epigenetic variation, inheritance and selection in plant populations, *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology*, 77, 97-104.
- Holliday, R., 1990, DNA methylation and epigenetic inheritance, *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B Biological Science*, 326 (1235), 329-338.
- Hsieh, T.F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., Zilberman, D., 2009, Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm, *Science*, 324 (5933), 1451-1454.
- Hu, J.M., 2002, [online], *Standard DNA extraction protocol*, <http://homepage.ntu.edu.tw/~jmhu/hulab/protocols/CTAB%20DNA%20isolationNEW.pdf> [Ziyaret Tarihi: 09.11.2016].
- Jiang, J., Wing, V., Xiet, T., Shi, X., Wang, Y.P., Sokolov, V., 2016, DNA METHYLATION ANALYSIS DURING THE OPTIMIZATION OF Agrobacterium-MEDIATED TRANSFORMATION OF SOYBEAN, *Genetika*, 52 (1), 66-73.
- Jobs, D.V., Hurley, D.L., Thien, L.B., 1995, Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA, *Taxon*, 44 (3), 379-386.

- Johnston, J.W., Harding, K., Bremner, D.H., Souch, G., Green, J., Lynch, P.T., Grout, B., Benson, E.E., 2005, HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (9), 844-853.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L., Richards, E.J., 2003, *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants, *Genetics*, 163 (3), 1109-1122.
- Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M., Matzke, A.J., 2005, Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation, *Nature Genetics*, 37 (7), 761-765.
- Koornneef, M., Leon-Kloosterziel, K.M., Schwartz, S.H., Zeevaart J.A.D., 1998, The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 83-89.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3), 95-125.
- Laibach, F., 1907, *Botanischen Centralblatt Beihefte*, 1 (22): 191–210.
- Lang-Mladek, C., Popova, O., Kiok, K., Berlinger, M., Rakic, B., Aufsatz, W., Jonak, C., Hauser, M.T., Luschning, C., 2010, Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*, *Molecular Plant*, 3 (3), 594-602.
- Lekanne Deprez, R.H., Fijnvandraat, A.C., Ruijter, J.M., Moorman, A.F., 2002, Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions, *Analytical Biochemistry*, 307 (1), 63-69.
- Leung, J., Giraudat, J., 1998, ABSCISIC ACID SIGNAL TRANSDUCTION, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 199-222.
- Li, X., Wang, X., He, K., Ma, Y., Su, N., He, H., Stolc, V., Tongprasit, W., Jin, W., Jiang, J., Terzaghi, W., Li, S., Deng, X.W., 2008, High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression, *Plant Cell*, 20 (2), 259-276.
- Li, H., Yan, S., Zhao, L., Tan, J., Zhang, Q., Gao, F., Wang, P., Hou, H., Li, L., 2014, Histone acetylation associated up-regulation of the cell wall related genes is involved in salt stress induced maize root swelling, *BMC Plant Biology*, 14, 105.
- Liotenberg, S., North, H., Marion-Poll, A., 1999, Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (5), 341-350.
- Llorente, F., Oliveros, J.C., Martinez-Zapater, J.M., Salinas, J., 2000, A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele, *Planta*, 211 (5), 648-655.

- Lu, Y., Rong, T., Cao, M., 2008, Analysis of DNA methylation in different maize tissues, *Journal of Genetics and Genomics*, 35 (1), 41-48.
- Lyko, F., Ramsahoye, B.H., Jaenisch, R., 2000, DNA methylation in *Drosophila melanogaster*, *Nature*, 408 (6812), 538-540.
- Ma, X., Ma, F., Mi, Y., Ma, Y., Shu, H., 2008, Morphological and physiological responses of two contrasting *Malus* species to exogenous abscisic acid application, *Plant Growth Regulators*, 56, 77.
- Maathuis, F.J.M., Ahmad, I., Patishtan, J., 2014, Regulation of Na⁺ fluxes in plants, *Frontiers in Plant Science*, 5, 467.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 (2), 139-158.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Meyerowitz, E.M., 2001, Prehistory and history of Arabidopsis research, *Plant Physiology*, 125 (1), 15-19.
- Migicovsky, Z., Yao, Y., Kovalchuk, I., 2014, Transgenerational phenotypic and epigenetic changes in response to heat stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Signalling and Behavior*, 9 (2), e27971.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W., 2004, Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals, *FEBS Letters*, 566 (1-3), 1-5.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Naydenov, M., Baev, V., Apostolova, E., Gospodinova, N., Sablok, G., Gozmanova, M., Yahubyan, G., 2015, High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in Arabidopsis, *Plant Physiology and Biochemistry*, 87, 102-108.
- Ngara, R., Ndimba, B.K., 2014, Understanding the complex nature of salinity and drought-stress response in cereals using proteomics technologies, *Proteomics*, 14 (4-5), 611-621.
- Niu, X., Bressan R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M., 1995, Ion homeostasis in NaCl stress environments, *Plant Physiology*, 109 (3), 735-742.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., Pikaard, C.S., 2005, Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation, *Cell*, 120 (5), 613-622.

- Osmond, C.B., Austin, M.P., Berry, J.A., Billings, W.D., Boyer, J.S., Dacey, J.W.H., Nobel, P.S., Smith, S.D., Winner, W.E., 1987, Stress physiology and the distribution of plants, *BioScience*, 37 (1), 38-48.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V., Lagrange, T., 2005, Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis, *Genes & development*, 19 (17), 2030-2040.
- Ramsahoye, B.H., 2002, Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Methods*, 27 (2), 156-161.
- Rengasamy, P., 2010, Soil processes affecting crop production in salt-affected soils, *Australian Journal of Soil Research*, 37, 613-620.
- Rock, C.D., 2000, Pathways to abscisic acid-regulated gene expression, *New Phytologist*, 148, 357-396.
- Sahu, P.P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., Prasad, M., 2013, Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation, *Plant Cell Reports*, 32 (8), 1151-1159.
- Santoyo, M.M., Flores, C.R., Torres, A.L., Wrobel, K., Wrobel, K., 2011, Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments, *Environmental Pollution*, 159 (10), 2387-2392.
- Singh, A., Khurana, P., 2016, Molecular and Functional Characterization of a Wheat B2 Protein Imparting Adverse Temperature Tolerance and Influencing Plant Growth, *Frontiers in Plant Science*, 7, 642.
- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A., Prymakowska-Bosak, M., 2007, Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications, *Planta*, 227 (1), 245-254.
- Song, Y., Ji, D., Li, S., Wang, P., Li, Q., Xiang, F., 2012, The Dynamic Changes of DNA Methylation and Histone Modifications of Salt Responsive Transcription Factor Genes in Soybean, *PLoS One*, 7 (7), e41274.
- Strange, R.N., Scott, P.R., 2005, Plant disease: a threat to global food security, *Annual Review of Phytopathology*, 43, 83-116.
- Su, Z., Han, L., Zhao, Z., 2011, Conservation and divergence of DNA methylation in eukaryotes: new insights from single base-resolution DNA methylomes, *Epigenetics*, 6 (2), 134-140.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., 2014, Abiotic and biotic stress combinations, *New Phytologist*, 203 (1), 32-43.

- Tarhan, Ç., 2009, Mayada Ağır Metal Stresine Bağlı Olarak Anlatım Yapan Genlerin Karakterizasyonu, Doktora, İstanbul Üniversitesi.
- Tarhan, Ç., Turgut-Kara, N., 2016, *Epigenetics and Applications in Plants*, Plant Omics: Trends and Applications, In: Hakeem, K.R., Tombuloğlu, H., Tombuloğlu, G. (ed.), Chapter 10, Springer, ISBN: 978-3-319-31701-4, 255-270.
- The National Science Foundation, 2002, [online], *Arabidopsis: The Model Plant*, <http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm> [Ziyaret Tarihi: 26.09.2016].
- UN DESA, 2015, *World Population Prospects: The 2015 Revision*, <http://www.un.org/en/development/desa/news/population/2015.report.html>, [Ziyaret Tarihi: 17 Kasım 2016].
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J.K., 2001, The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression, *Plant Cell*, 13 (9), 2063-2083.
- Xiong, L., Zhu, J.K., 2003, Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis, *Plant Physiology*, 133 (1), 29-36.
- Vaillant, I., Paszkowski, J., 2007, Role of histone and DNA methylation in gene regulation, *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (5), 528-533.
- Vanyushin, B.F., Ashapkin, V.V., 2011, DNA methylation in higher plants: past, present and future, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809 (8), 360-368.
- Vaughn, M.W., Tanurdzic, M., Lippman, Z., Jiang, H., Carrasquillo, R., Rabinowicz, P.D., Dedhia, N., McCombie, W.R., Agier, N., Bulski, A., Colot, V., Doerge, R.W., Martienssen, R.A., 2007, Epigenetic natural variation in Arabidopsis thaliana, *PLoS Biology*, 5 (7), e174.
- Vinocur, B., Altman, A., 2005, Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (2), 123-132.
- Wada, Y., Ohya, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H., 2003, Preferential de novo methylation of cytosine residues in non-CpG sequences by a domains rearranged DNA methyltransferase from tobacco plants, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (43), 42386-42393.
- Waddington, C.H., 1942, The epigenotype, *Endeavour*, 1, 18-20.
- Wagner, I., Capesius, I., 1981, Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography, *Biochimica et Biophysica Acta*, 654 (1), 52-56.
- Wagner, D., 2003, Chromatin regulation of plant development, *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (1), 20-28.

- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2001, Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations, *Acta Horticulturae*, 560, 285-292.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*, 218 (1), 1-14.
- Wang, X., Elling, A.A., Li, X., Li, N., Peng, Z., He, G., Sun, H., Qi, Y., Liu, X.S., Deng, X.W., 2009a, Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize, *Plant Cell*, 21 (4), 1053-1069.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009b, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nature Reviews Genetics*, 10 (1), 57-63.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., Sanger, H.L., 1994, RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants, *Cell*, 76 (3), 567-576.
- Wiedemann, G., Koprivova, A., Schneider, M., Herschbach, C., Reski, R., Kopriva, S., 2007, The role of the novel adenosine 50-phosphosulfate reductase in regulation of sulfate assimilation of *Physcomitrella patens*, *Plant Molecular Biology*, 65 (5), 667-676.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., Pikaard, C.S., 2008, Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb / Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes, *Cell*, 135 (4), 635-648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., Pikaard, C.S., 2009, RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin, *Nature Genetics*, 41 (5), 630-634.
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005, Real-Time PCR for mRNA Quantitation, *Biotechniques*, 39 (1), 75-85.
- Yanez-Barrientos, E., Wrobel, K., Lopez-Torres, A., Gutierrez-Corona F., Wrobel K., 2013, Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for simultaneous assessment of global DNA and total RNA methylation in *Lepidium sativum*: effect of plant exposure to Cd (II) and Se (IV), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (7), 2397-2404.
- Yeo, A., 1998, Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology, *Journal of Experimental Botany*, 49 (323), 915-929.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sunderasan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Ecker, J.R., 2006, Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis, *Cell*, 126 (6), 1189-1201.
- Zhang, X., 2008, The epigenetic landscape of plants, *Science*, 320 (5875), 489-492.

Zhang, F., Zhu, G., Du, L., Shang, X., Cheng, C., Yang, B., Hu, Y., Cai, C., Guo, W., 2016, Genetic regulation of salt stress tolerance revealed by RNA-Seq in cotton diploid wild species, *Gossypium davidsonii*, *Scientific Reports*, 6, 20582.

Zhu, J.K., 2001, Plant salt tolerance, *Trends in Plant Science*, 6 (2), 66-71.

Zhu, J.K., 2002, Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants, *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247-273.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Burcu Arıkan
Doğum Yeri	Çorlu/TEKİRDAĞ
Doğum Tarihi	03.06.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0536 856 6336
E-Posta Adresi	burcuarikan91@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	18.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Mezuniyet Tarihi	16.12.2016

Makale ve Bildiriler	
<p>Arıkan, B., Çakır, Ö., Turgut-Kara, N., 2016, Molecular cloning of cDNA encoding WD40 repeat sequences from Legume Species, <i>MOLBIGEN</i>, ISSN, 2149-7141.</p> <p>Arıkan, B., Turgut-Kara, N., 2016, Abiyotik Stres Koşullarında Genomik Metilasyon Değişimleri, Bitki Islahı Proje Pazarı, 8 Ekim 2016 Antalya.</p>	