



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ SÜLFAMETAZİNİN  
STRİGOLAKTONLARIN BİYOSENTEZİNE KATILAN GEN  
ANLATIMLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN**

**İNCELENMESİ**

**Özge EROĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ SÜLFAMETAZİNİN**  
**STRİGOLAKTONLARIN BİYOSENTEZİNE KATILAN GEN**  
**ANLATIMLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**Özge EROĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih:25/08/2017**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN**

**ÇANAKKALE**

Özge EROĞLU tarafından Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN yönetiminde hazırlanan ve 25/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**DNA Metiltransferaz İnhibitörü Sülfametazinin Strigolaktonların Biyosentezine Katılan Gen Anlatımları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

.....

**Başkan**

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

.....

**Üye**

Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ

.....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Özge EROĞLU

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi için bana bu fırsatı tanıyan, bilgi ve tecrübesi ile her zaman desteğini gördüğüm sevgili danışman hocam Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN'a jüri üyelerim Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e ve Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgilerinden faydalandığım karşılaşmış olduğum zorluklarda her zaman bana yardımcı olan, sabırları ile bana destek olan hocalarım Dr. Kaan HÜRKAN, Dr. Fatih SEZER ve Arş. Gör. Aslıhan ÖZBİLEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük katkısı olan, eğitim dönemim boyunca ve yaşamımın her döneminde yanımda olan canım ailem annem Vildan EROĞLU ile babam Sadettin EROĞLU'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca her zaman arkamda duran manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dayılarım İbrahim AVCI ve Mustafa AVCI'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında bana her daim yardımcı olan ekip arkadaşlarım İrem KILIÇ ve Uğur SAPMAZ'a, değerli arkadaşlarım Sabina BİNALİ, Gülsüm AKKUŞ ve Ozan Barış KÜRTÜR'e teşekkürlerimi sunarım.

Özge EROĞLU

Çanakkale, Ağustos 2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| µl   | Mikrolitre                          |
| µg   | Mikrogram                           |
| ng   | Nanogram                            |
| cDNA | Komplementer Deoksiribonükleik Asit |
| DNA  | Deoksiribonükleik Asit              |
| RNA  | Ribonükleik Asit                    |
| PZR  | Polimeraz Zincir Reaksiyonu         |
| bç   | Baz çifti                           |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate                |
| DMSO | Dimetil sülfoksit                   |
| MS   | Murashige ve Skoog                  |
| SMZ  | Sülfametazin                        |
| SLs  | Strigolakton                        |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik asit       |
| UV.  | Ultra Viyole                        |
| mRNA | Mesajcı Ribonükleik Asit            |

## ÖZET

### DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ SÜLFAMETAZİNİN STRİGOLAKTONLARIN BİYOSENTEZİNE KATILAN GEN ANLATIMLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Özge EROĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

25/08/2017, 41

Bu tezde, *Arabidopsis thaliana* türünde Strigolakton (SLs) biyosentezi ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki DNA metiltransferaz inhibitörü olan Sülfametazin (SMZ) aracılığı ile araştırılmıştır. SLs sürgün ve kök dallanmasını düzenleyerek bitki mimarisini kontrol eden yeni keşfedilmiş karotenoid kökenli bir bitki hormonudur. *A. thaliana* türünde SLs biyosentezinden bir beta-karoten izomerase (ATD27), iki karotenoid cleavage enzimi (MAX3 ve MAX4) ve bir sitokrom P450 monooxygenase (MAX1) enzimi sorumludur. SLs ilk kez simbiyotik ve parazitik etkileşimler ile ilgili çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. DNA metilasyonu, bir metil grubunun sitozin nükleotidine eklenmesi sonucunda meydana gelen epigenetik bir değişimdir. Sülfametazin (SMZ) bir çeşit DNA metilasyon inhibitörüdür. Çalışmada, SMZ ile muamele edilmiş bitkilerde SLs biyosentezinde görevli MAX4 ve sinyal iletiminden sorumlu D14 genlerinin anlatımları araştırılmıştır. Bitkiler içerisinde 50 µM SMZ ilave edilmiş veya hiçbir katkı yapılmamış Murashige Skoog (1962) besin ortamlarında yetiştirilmiştir. Bu çalışma ile ilk kez, SLs biyosentezi ve algılanmasında epigenetik süreçlerin etkileri incelenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Strigolaktonlar, Sülfametazin (SMZ), DNA Metilasyonu

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SULFAMETHAZINE, DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITORS, ON THE EXPRESSION LEVELS OF GENES INVOLVED IN STRIGOLACTONES BIOSYNTHESIS

Özge EROĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor : Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

25/08/2017, 41

In this thesis, the relationship between Strigolactones (SLs) biosynthesis and DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* have been investigated using SMZ as DNA methyltransferase inhibitor. SLs are recently discovered carotenoid derived plant hormones that control plant architecture by coordinating root and shoot branching. In *A. thaliana*, a beta carotene isomerase (AtD27), two carotenoid cleavage (MAX3 and MAX4) and a cytochrome P450 monooxygenase (MAX1) enzymes are responsible for SLs biosynthesis. SLs have been revealed with studies on symbiotic and parasitic interactions for the first time. DNA methylation is an epigenetic modification as a result of a methyl group addition to a cytosine in DNA helix. Sulfamethazine (SMZ) is a kind of DNA methylation inhibitor. In the study, the gene expression levels of *D14* and *MAX4* responsible for signaling and biosynthesis of SLs respectively, were investigated in SMZ treated plants. Plants were cultured in Murashige Skoog (1962) medium with or without 50 µM SMZ. With this study, the effects of epigenetic processes on SLs biosynthesis and perception were examined for the first time.

**Keywords:** Strigolactones, Sulfamethazine (SMZ), DNA Methylation

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....                                       | ii  |
| İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....                               | iii |
| TEŞEKKÜR.....                                                     | iv  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                     | v   |
| ÖZET .....                                                        | vi  |
| ABSTRACT.....                                                     | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                             | x   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                            | xi  |
| BÖLÜM 1 .....                                                     | 1   |
| GİRİŞ .....                                                       | 1   |
| 1.1. Strigolaktonlar .....                                        | 1   |
| 1.2. DNA Metilasyonu .....                                        | 6   |
| 1.3. Sülfametazin (SMZ) .....                                     | 7   |
| BÖLÜM 2 .....                                                     | 8   |
| ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                           | 8   |
| BÖLÜM 3 .....                                                     | 13  |
| MATERYAL VE METOT .....                                           | 13  |
| 3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....                      | 13  |
| 3.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması .....                        | 13  |
| 3.3. Bitki Ekimi ve Çimlenmesi .....                              | 13  |
| 3.3. RNA İzolasyonu.....                                          | 14  |
| 3.4. cDNA Sentezi.....                                            | 15  |
| 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....                       | 16  |
| 3.6. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar .....       | 17  |
| 3.6.1. 10X TAE Tamponu .....                                      | 17  |
| 3.6.2. 1X TAE Tamponu .....                                       | 17  |
| 3.6.3. Ethidium Bromide Stok Çözeltisi.....                       | 17  |
| 3.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....                                | 17  |
| 3.8. SMZ'nin Bitki Gelişimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ..... | 18  |
| 3.9. Gerçek Zamanlı PZR Deneyleri.....                            | 19  |
| BÖLÜM 4 .....                                                     | 20  |
| ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....                             | 20  |

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....      | 20 |
| 4.2. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....          | 21 |
| 4.4. Gen Anlatım Çalışmaları.....                 | 25 |
| 4.5. SMZ'nin Bitki Gelişimi Üzerine Etkileri..... | 28 |
| BÖLÜM 5 .....                                     | 30 |
| SONUÇ VE ÖNERİLER.....                            | 30 |
| KAYNAKLAR .....                                   | 33 |
| ÖZGEÇMİş .....                                    | I  |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Strigol tip SLs .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 3  |
| Şekil 1.2. SLs biyosentez yolağı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 5  |
| Şekil 1.3. SLs algılama .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 6  |
| Şekil 1.4. SMZ'nin kimyasal formülü .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 7  |
| Şekil 3.1. Karanlık ve ışık ortamındaki deney düzeneği. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 14 |
| Şekil 3.4. Elektroforezde kullanılan 1 kb olan ladder .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 18 |
| Şekil 4.1. MS0 besin ortamında 5 gün çimlenmeden sonra 7 gün boyunca karanlıkta bekletilen <i>A. thaliana</i> fideleri .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 21 |
| Şekil 4.2. MS0 besin ortamında 5 gün çimlenmeden sonra 50 µM SMZ içeren 7 gün boyunca karanlıkta bekletilen <i>A. thaliana</i> fideleri .....                                                                                                                                                                                                                                              | 21 |
| Şekil 4.3. Karanlıktaki MS0 ve SMZ 50 µM bitkilere ait RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-çimlenmenin kontrolü, 3-6. saat, 4-12. saat, 5-24. saat, 6-48. saat ve 7-72. saat). Kuyucuk 8-13 SMZ'li grup (8-6 saat, 9-12. saat, 10-DNA Ladder, 11-24. saat, 12-48. saat ve 13-72. saat) ..... | 22 |
| Şekil 4.4. Işıktaki MS0 bitkilerine ait RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-karanlıktaki 96. saat, 3-6. saat, 4-12. saat, 5-24. saat, 6-48. saat ve -72. saat) .....                                                                                                                         | 22 |
| Şekil 4.5. Işıktaki yetiştirilen ve 50 µM SMZ uygulanmış bitkilere ait RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 SMZ'li grup (1-DNA Ladder, 2-karanlıktaki 96. saat, 3-6. saat, 4-12. saat, 5-24. saat, 6-48. saat ve 7-72. saat) .....                                                                                 | 23 |
| Şekil 4.6. Karanlıkta yetiştirilen MS0 bitkisine ait <i>ACTIN2</i> PZR jel görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-kontrol, 3-6. saat, 4-12. saat, 5-24. Saat, 6-48. saat ve 7-72. saat).. ....                                                                                                                                    | 24 |
| Şekil 4.7. Karanlıkta yetiştirilen ve 50 µM SMZ uygulanmış bitkilere ait <i>ACTIN2</i> PZR jel görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 SMZ'li grup (1-DNA Ladder, 2-kontrol, 3-6. saat, 4-12. saat, 5-24. Saat, 6-48. saat ve 7-72. saat) .....                                                                                                         | 24 |
| Şekil 4.8. Işıktaki yetiştirilen MS0 bitkisine ait <i>ACTIN2</i> PZR jel görüntüsü. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 25 |
| Şekil 4.9. Işıktaki yetiştirilen 50 µM SMZ bitkisine ait <i>ACTIN2</i> PZR jel görüntüsü.....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 25 |
| Şekil 4.10. <i>MAX4</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 26 |
| Şekil 4.11. <i>D14</i> geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 27 |
| Şekil 4.12. A: <i>A. thaliana</i> MS0, B: <i>A. thaliana</i> 50 µM SMZ (15 günlük fideler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 29 |
| Şekil 4.13. <i>A. thaliana</i> bitkisine SMZ uygulamasının kök boylarına etkisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 29 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Strigolaktonların biyosentezinde ve sinyalinde rol alan genlerin protein adı ve <i>A. thaliana</i> bitkisine ait lokus numaraları ..... | 3  |
| Çizelge 3.1. DNaz uygulamasındaki reaksiyon bileşikleri .....                                                                                        | 16 |
| Çizelge 3.2. cDNA sentez programı .....                                                                                                              | 16 |
| Çizelge 3.3. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları .....                                                                                              | 17 |
| Çizelge 3.4. <i>ACTIN2</i> genine ait PZR programı .....                                                                                             | 17 |
| Çizelge 3.5. Taqman prob yöntemi ile PZR çalışmalarında kullanılan örnek plate düzeni .....                                                          | 19 |
| Çizelge 4.1. RNA izolasyonu yapılan karanlıktaki dokulara ait RNA miktarları .....                                                                   | 23 |
| Çizelge 4.2. RNA izolasyonu yapılan ışıktaki dokulara ait RNA miktarları.....                                                                        | 23 |



# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Bitki hormonları, bitkilerde büyüme, gelişme, olgunlaşma ve yaşlanma gibi fiziksel olayları düzenleyen moleküllerdir. Bitkiler çevrelerinde bulunan faydalı ve parazit organizmalar ile etkileşim halindedirler. Bu etkileşimlerde Strigolaktonlar(SLs) önemli bir role sahiptir. Son zamanlarda keşfedilmiş, bitkilerdeki kök ve gövde gelişimini kontrol eden yeni bir bitki hormonu olarak tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2013). SLs biyosentezinden sorumlu ve algılanmasında görevli olan genler ilk olarak *Arabidopsis thaliana*, bezelye, petunya ve çeltik bitkilerinde tanımlanmıştır (Lin ve ark., 2009; Zhou ve ark.,2013).

*A. thaliana Brassicaceae* (hardalgiller) ailesinin üyesi olup, bitki biyolojisinde yaygın olarak kullanılan genom bilgisimevcut model organizmadır. *A. thaliana*, şalgam, lahana ve brokoli gibi ekonomik bakımdan önemli tarımsal bitkiler ile yakın akraba olmasına rağmen tarımsal açıdan değeri yoktur. *A. thaliana* büyüme odasında yetiştirilebilir, hızlı bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bu nedenlerden dolayı genetik ve moleküler biyoloji alanındaki temel araştırmalar için önemli avantajlar sunmaktadır.

### 1.1. Strigolaktonlar

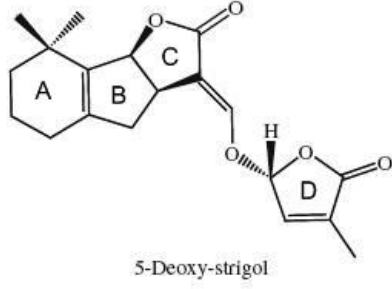
SLs bitkilerde sürgün ve kök dallanmasını düzenleyerek bitki mimarisini kontrol eden karotenoid kökenli bir bitki hormonudur (Brewer ve ark., 2013). İlk kez bitki parazit ve simbiyoz ilişkilerini inceleyen çalışmalarda ortaya çıkarılmış olup, *Striga lutea* adı verilen cadıotu tohumlarının çimlenme faktörü olarak 1966 yılındapamuk köklerinde keşfedilmiştir (Cook ve ark., 1966). Kimyasal yapısı ise 1972 yılında ortaya çıkarılmıştır (Cook ve ark., 1972). *Striga*, *Orobanchaceae* familyasına ait parazit bir bitkidir. Parazit bitkiler tarımda çok büyük ürün kaybına sebep olurlar. Strigolakton molekülünün SLs adı ile bitki hormonu olarak tanımlanması ise 2008 yılında yapılan çalışmalar ile gerçekleşmiştir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008) SLs ilk olarak *Striga*, *Orobanche* ve *Phelipanche* gibi parazitik bitki türlerinde tanımlanmıştır. Bunlar çimlenme uyarıcı olarak tarif edilmişlerdir (Cook ve ark., 1972; Bouwmeester ve ark., 2003). *Striga* tohumlarının çimlenmesi SLs tarafından gerçekleşmektedir. Bitki hormonu olarak SLs kök ve gövde gelişimini düzenler. Bitkinin köklerinde sentezlenmektedir. Kök ve sürgün arasındaki mesafenin uzamasını sağlar ve aynı zamanda oksin ile zıt çalışarak yaprak yaşlanmasını düzenler, yaprak uzamasını ve şeklini de kontrol eder (Yamada ve ark., 2014). Gövde üzerinde koltuk altı tomurcuklarının gelişimini kontrol etmektedir.

Bitki köklerinde üretilen SLs koltuk altı tomurcuğuna geçer burada tomurcuğun gelişimini baskılayarak bitkilerde dallanmayı baskılamış olur (Shinohara ve ark., 2013). SLs lateral kök oluşumu, kök tüyü uzaması, adventif köklenme, yaprak yaşlanması, sürgün dallanması, kuraklık ve tuz stresi gibi rollerde de görev yapmaktadır. SLs'nin bitkilerde sürgün dallanmasını inhibe ettiği bilinmektedir (Kapulnik ve ark., 2011).

Karotenoidler, tüm fotosentez yapan organizmalar ve birçok heterotrofik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen pigmentlerdir. Fotosentez için çok önemlidirler. Bu yüzden karotenoidler bitkilerin plastitlerinde birikirler (Howitt ve Pogson 2006). Karotenoidlerden sentezlenen SLs fitohormon olup endojen ve eksojen sinyal molekülü olarak görev yapar (Pandey ve ark., 2016). Eksojen olarak SLs arbusküler mikoriza(AM) simbiyozu esnasında hibrit dallanmasını uyarır ve parazit otların çimlenmesini sağlar.

SLs, bitki mimarisini korumak için AM mantarlar ile birlikte ışık, besin ve sıcaklık olmak üzere çeşitli dış uyaranlara karşı yanıt verir (Pandey ve ark., 2016). Konakçı bitki rizosfere SLs salgılar. SLs arbusküler mikorizal mantarlar ile simbiyotik ilişki sağlar. AM mantarların metabolizmasını ve hifal dallanmayı artırır. Mantar bitkiye fosfat gibi bileşikler sağlarken bitki sayesinde beslenmiş olur. Bu nedenle fosfat eksikliğinde köklerden SLs salınımı artar ve dolayısı ile AM uyarılır. SLs bitkiye topraktan besinlerin alınmasında da yardımcıdır (Lopez-Raez ve ark., 2008; Ruyter-Spira ve ark., 2011; Mayzlish-Gati ve ark., 2012). Bitkiler besin sıkıntısının yaşandığı yerlerde AM'yı arttırarak besin ihtiyaçlarını karşılarlar. *A. thaliana* dahil olmak üzere mısır, çeltik, petunya, bezelye ve domates gibi birçok monokotil ve dikotil bitki köklerinden SLs izole edilmiştir (Xie ve ark., 2009; Akiyama ve ark., 2010; Kohlen ve ark., 2011). Bitkilerde bir veya birden fazla SLs türevi sentezlenmektedir (Cardoso ve ark., 2011). SLs türevleri parazit bitkilerin verebileceği zararda tarım uygulamaları için çok önemlidir.

SLs kimyasal olarak enol-eter bağı ile bağlı trisiklik laktona (ABC halkası) bir metil butenoloid (D halkası) parçasının eklenmesiyle fonksiyonlarındaki değişimi gösteren dört (A-D) halkalı bileşiklerdir (Şekil 1.1) (Akiyama ve ark., 2010; Boyer ve ark., 2012). A halkası aromatik yapıldığında GR24 adında bir bileşik oluşur. GR24 günümüzde yaygın olarak kullanılan sentetik bir strigolaktondur (Thuring ve ark., 1997).



Şekil 1.1. Strigol tip SLs

*A. thaliana*, mısır, sorgum ve nohut bitkilerinde SLs biyosentezinde görev alan genler belirlenmiştir (Matusova ve ark., 2005). *A. thaliana* bitkisinde SLs biyosentezinden bir beta-karoten izomeraz (AtD27), iki karotenoid cleavage dioxygenase CCD7 (More Axillary Shoot3; MAX3) ve CCD8 (More Axillary Shoot4; MAX4) ve bir sitokrom P450 monooksijenaz (More Axillary Shoot1; MAX1) enzimi sorumludur (Şekil1.2). SLs sinyalinde ise; alfa/beta hidrolaz (DWARF14; D14)ve F kutusu proteinini kodlayan bir enzim (More Axillary Shoot2; MAX2) sorumludur. AtD27 AT1G03055, MAX4 AT4G32810, MAX3 AT2G44990, MAX1 AT2G26170, D14 AT3G03990 ve MAX2 AT2G42620 genleri tarafından kodlanmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1.Strigolaktonların biyosentezinde ve sinyalinde rol alan genlerin protein adı ve *A. thaliana* bitkisine ait lokus numaraları.

| Proteinin rolü  | Protein adı                               | <i>A. thaliana</i> gen adı-lokus numaraları |
|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Biyosentez      | 9 cis/all trans- $\beta$ Karoten izomeraz | D27-AT1G03055                               |
|                 | Karotenoid bölünme enzimi 7 (CCD7)        | MAX3-AT2G44990                              |
|                 | Karotenoid bölünme enzimi 8 (CCD8)        | MAX4-AT4G32810                              |
|                 | Sitokrom P450 (CYP711)                    | MAX1-AT2G26170                              |
| Sinyal/Algılama | $\alpha/\beta$ - Hidrolaz                 | D14-AT3G03990                               |
|                 | F kutusu Protein                          | MAX2-AT2G42620                              |

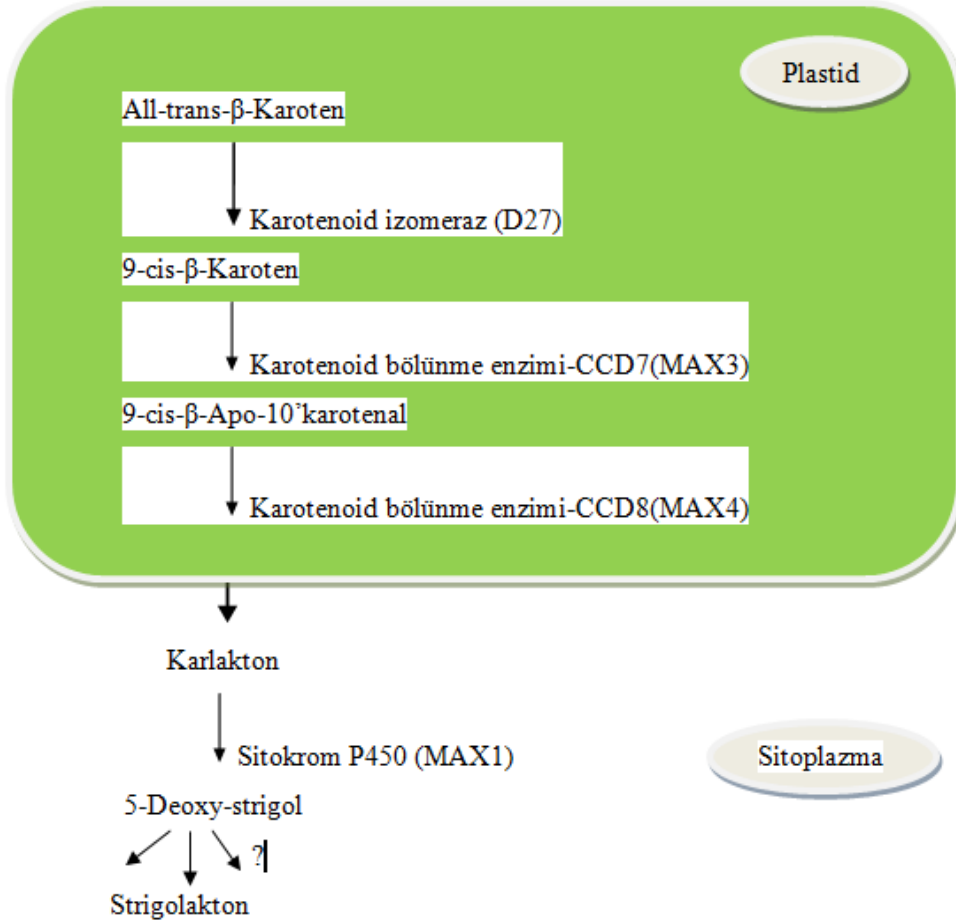
D27enzimi SLs biyosentezinin ilk basamağında görev alır (Lin ve ark., 2009). D27 sentezinden sorumlu gen ilk olarak çeltik bitkisinde keşfedilmiştir (Lin ve ark., 2009). Daha sonra *A.thaliana* ve bezelye gibi diğer birçok bitki türünde de bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Lin ve ark., 2009; Waters ve ark., 2012). D27 çeltik bitkisinde demir içerenve kloroplastta yer alan bir protein kodlar ve bitkinin başlıca sürgün ve köklerdeki vasküler

hücrelerinde ifade edilmektedir (Lin ve ark., 2009). *CCD7/MAX3* ve *CCD8/MAX4* genleri ise bitkilerin kök ucunda, korteksinde ve hipokotilinde ifade olurlar. *CCD8/MAX4* geni iki tür tepkimeyi katalize eden bir karotenoid cleavage enzimi kodlar (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). *MAX1* geni, *A. thaliana* bitkisinde tanımlanmış olup bir sitokrom P450 enzimini kodlamaktadır. *MAX1* tüm dokularda anlatıma uğramaktadır. *MAX1* proteini sitoplazmada bulunur ve SLs biyosentez yolağında *MAX3* ve *MAX4* enzimlerinden sonra rol alır (Booker ve ark., 2005). *MAX1* en çok kambiyum ve ksilem parankimasında anlatıma uğrar. *MAX2* bir F kutusu protein kodlar ve bu protein SLs sinyal iletiminde rol alır (Zhao ve ark., 2013). *MAX2* SLs biyosentezi için gerekli değildir, ışık algılama ve çimlenme ile ilgili diğer bazı süreçlerde rol alır (Flemattive ark., 2004; Booker ve ark., 2005). Çeltik bitkisinde tanımlanan *D14* geni ise,  $\alpha/\beta$ - Hidrolaz süper ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılan 318 amino asitten oluşan bir proteini kodlamaktadır. SLs için bir sinyal bileşenidir ve bir sinyal görevi yapar. *D14* geninde meydana gelen mutasyonlar çeltik bitkisinde sürgün dallanmasını inhibe ettiği görülmüştür (Arite ve ark., 2009).

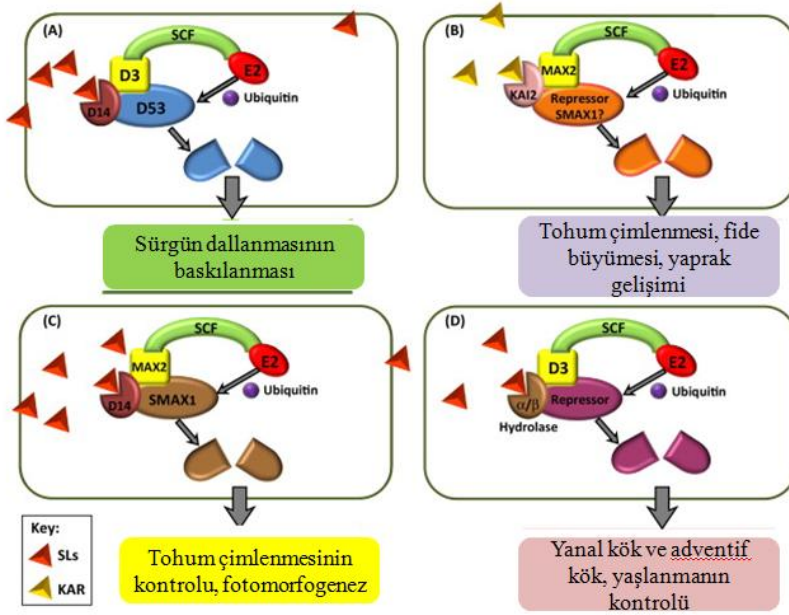
SLs tek ve çift çeneklilerde korunmuş bir protein kümesi ile  $\beta$ -karotenden sentezlenir. SLs biyosentezi bitki hücrelerinde plastid ve sitozol olmak üzere iki ayrı bölümde gerçekleşir. Bu yolun ilk aşamasında *D27* geni all-trans- $\beta$ -karoteni 9-cis- $\beta$ -karoten'e dönüştüren bir izomeraz kodlamaktadır (Lin ve ark., 2009; Waters ve ark., 2012). Daha sonra, sırasıyla *CCD7/MAX3* ve *CCD8/MAX4* enzimleri bir ara bileşik olan karlakton üretirler ve bu işlem plastidte gerçekleşir. SLs biyosentezinde rol alan dördüncü gen ise sitokrom P450 monooksijenaz enzimini kodlayan *MAX1* genidir (Şekil 1.2).

Diğer bitki hormonları gibi SLs'de belirli bir reseptör sistemleri aracılığı ile bitkiler tarafından algılanırlar. Bu sistem ise F kutusu proteinleri olarak tanımlanan *MAX2/DWARF (D3)*, *RAMOSUS (RMS4)* proteinleridir. Bu proteinin Skp, Cullin, F-box (SCF)-E2 içeren komplekse bağlanabileceği ileri sürülmüştür. SCF kompleksi, proteazomal bozunum için belirlenmiş proteinlerin ubiquitasyonunu katalizleyen bir protein grubudur (Ishikawa ve ark., 2005; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). (A) SLs bir bitki hücresine girdiklerinde  $\alpha/\beta$ - Hidrolaz süper ailesinin üyesi olan *D14* ile bağlanırlar. Bu bağlanma, bir sınıf I Clp ATPazı olan *D53*'ü etiketleyen F-kutusu proteini *D3-SCF-E2* kompleksi etkileşimler için *D14*'te bir konformasyonel bir geçiş meydana getirir. Bu etiketleme, ubiquitin-proteazom yolu ile *D53*'ün bozunumuna ve SLs salınımına yönlendirilir ve sonunda sürgün dallanmasının bastırılmasına yol açar. (B) Karrikinler hücreye girdiklerinde *D14* benzeri bir protein olan *KAI2*'ye bağlanırlar. Bu bağlanma, *D3-*

SCF-E2 kompleksli etkileşimler için KAI2'de SMAX1 polivübitizasyonu ile bir geçiş oluşur. Reseptör parçalanması, tohum çimlenmesi, fide büyümesi. (C) Bir D53 homoloğu olan SMAX1'in D14 / MAX2 / SCF kompleksi tarafından bozunması ile tohum çimlenmesi ve fide fotomorfogenezi üzerine SLs aktivitesine neden olur. (D) D14 benzeri ve D53 proteinleri yanal veya adventif kök oluşumu ve yaşlanmanın kontrolü üzerine SLs aktivitesine neden olmaktadır (Şekil 1.3) (Koltai 2014).



Şekil 1.2. SLs biyosentez yolağı



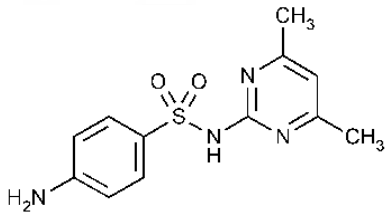
Şekil 1.3. SLs algılama (Koltai 2014)

## 1.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu bir metil grubunun DNA'daki sitozin nükleotidinde eklenmesi ile meydana gelen epigenetik bir düzenlenmedir. DNA metilasyonu, Guanini (G) takip eden Sitozin (C) bazını etkilemektedir. Bu yüzden CpG adacıklarında gerçekleşir. Epigenetik değişiklikler fenotipik varyasyon, kromozom kırılma olayları, genomik etiketleme, X-kromozomunun deaktive edilmesine yol açar (Jenuwein ve Allis, 2001; Rice ve Allis 2001). Bitkilerde ise DNA metilasyonu, bitki morfolojisi ve çiçeklenme zamanının kontrolü gibi çeşitli gelişim süreçlerinde rol oynamaktadır (Finnegan ve ark., 2000). Sitozin metilasyonu protein-kromatin etkileşimlerini etkileyerek transkripsiyonu baskılar (Zhang ve Zhu, 2011). Bitki genomunda simetrik (CpG ve CpNpG) ve asimetrik (CpNpN) sitozin metilasyonları DNA metiltransferazlar ile gerçekleşmektedir. Bitkilerde Methyltransferase1 (*MET1*), Chromomethylase3 (*CMT3*) ve Domain Rearranged Methyltransferase 1 ve 2 (*DRM1*, *DRM2*) olmak üzere 3 tip DNA Metiltransferaz vardır (Finnegan ve Kovac, 2000). Metiltransferazlar DNA, RNA, histonlar ve diğer proteinleri metillemek için bir metil vericisi olan S-adenozin metionini (SAM) kullanırlar (Loenen, 2006). DNA metiltransferazları inhibe eden trikostatinaA (TSA), 5-aza-2'-deoksisitidin (5-adC) ve Sülfametazin (SMZ) gibi küçük moleküller, epigenetik değişikliklere yol açan kimyasallardır (Monneret, 2005; Patra ve Bettuzzi, 2009). Adenozin gibi küçük moleküller DNA metilasyon seviyelerini düşürmek için SAM sentezini hedeflerler (Kloor ve Osswald, 2004).

### 1.3. Sülfametazin (SMZ)

SMZ gastrointestinal, solunum ve idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkları tedavi etmek için antibakteriyel bir bileşik olarak kullanılan bir sulfonamiddir (Zayas-Blanco ve ark., 2004). Sulfonamidler dihidropteroat sentezini inhibe ederler. Bunun sonucunda bakteri nükleotiti ve DNA sentezi azalır. DNA metilasyonunda gözlemlenen azalmanın sebebi ise SMZ'nin folat sentezinde kullanılan metil kaynağını azaltmasıdır. Folatadaya C1 metabolizması SAM üretir. SAM DNA, RNA, histonlar ve diğer proteinleri metilleyen birçok metiltransferaz enzimi tarafından metil vericisi olarak kullanılır (Loenen ve ark., 2006). SMZ DNA metilasyonunu düşürmek için SAM sentezini hedefler (Kloor ve Osswald, 2004).



Şekil 1.4. SMZ'nin kimyasal formülü

Bu çalışmanın amacı, *A. thaliana* bitkisinde SLs biyosentezi ve DNA metilasyonu arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Bu amaçla çalışmada bir DNA metilasyon inhibitörü olan Sülfametazin (SMZ) kullanılmıştır. SLs biyosentezi ve algılanmasında görevli *MAX4* ve *D14* gen anlatımları üzerine SMZ'nin etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Literatürde SLs biyosentezi ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki ile ilgili bir çalışma henüz yer almamaktadır. Karotenoid biyosentezi ışığa bağlıdır (Cazzonelli ve ark., 2009b; Mayzlish-Gati ve ark., 2012). Bu nedenle bitkiler çimlenme sonrasında ilk olarak 7 gün boyunca karanlıkta bekletilmiş, daha sonra ışığa alınarak eş zamanlı karotenoid biyosentezine başlamaları sağlanmıştır. Bitkilerden doku örnekleri gelişimlerinin farklı dönemlerinde hasat edilmiş ve *MAX4* ve *D14* genlerinin anlatımları incelenmiştir.

## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

*Orobanch* (Canavar otu) ve *Striga* (Cadı otu bitkisi) tarımda ürün kaybına sebep olan parazitik bitkilerdir. SLs konakçı bitkinin köklerinde sentezlenip dışarı salınarak *Striga* tohumlarının çimlenmesini başlatır. İlk keşfedilen çimlenme faktörü *Striga* köklerinden izole edilen strigol olmuştur (Cook ve ark., 1972; Bouwmeester ve ark., 2003). Daha sonraki çalışmalarda *Sorghum bicolor* ve *Zea mays* gibi bitkilerden de izolasyon yapılmış (Hauck ve ark., 1992) ve strigol benzeri bu bileşiklerin isimleri SLs olarak değiştirilmiştir (Butler, 1995). SLs'nin simbiyotik mikoriza hiflerinin dallanmasında da rol aldığı ileriki yıllarda ortaya çıkarılmıştır (Peret ve ark., 2009). SLs'nin yanal kök gelişimi üzerinde de etkili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmalar SLs'nin kök mimarisinde dahil olmak üzere bitki gelişiminin çeşitli yönlerini kontrol ettiği anlaşılmıştır (Brewer ve ark., 2013). SLs'nin bitki köklerindeki hareketi ve kök gelişimini etkileyen SLs'ye özgü sinyal bileşenleri araştırılmıştır (Saint Germain ve ark., 2013; Yamada ve ark., 2014). SLs ile ilgili yapılan çalışmalarda sürgün ve kök dallanmasının yanı sıra, tohum çimlenmesi, hipokotil uzama, üreme, gelişim ve yaprak yaşlanması gibi çeşitli süreçlerde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2012). Daha sonra bitkilerin faydalı ve parazit organizmalar ile etkileşimlerinde SLs'nin işlevleri ve çevresel uyarılara verdikleri cevaplar araştırılmıştır. Örneğin ışık, bitkiler üzerinde etkili olan en değişken parametrelerden biri olarak tohum çimlenmesi, hipokotil uzaması ve sürgün dallanması gibi birçok süreçlerde rol aldığı bilinmektedir. Işıkla ilgili genlerin anlatımı arttırılarak ışığın bitki verimine olumlu etkileri ortaya çıkarılmıştır (Liu ve ark., 2012). Işıқта ifade edilen genler *A. thaliana* ve domates bitkilerinde tanımlanmıştır (Mayzlish-Gati ve ark., 2010; Tsuchiya ve ark., 2010). Işık altında *A. thaliana* bitkisinde SLs'nin yanal kök gelişimini inhibe ettiği ve bunun sonucunda kök boyunda uzama olduğu görülmüştür (De Simone ve ark., 2000). Domates bitkisinin köklerinde yapılan bir çalışmada da farklı ışık yoğunluğunun SLs sentezini nasıl etkilediği araştırılmıştır. SLs sinyal yolları ve ışık birbiri ile ilişkilidir (Koltai ve Kapulnik, 2011). Domates bitkisinde biyosentez geni olan *SI-CCD7* ışıkta ifade edilmiştir. Bitkiler 4 hafta ışıkta geliştirilmiş, sonrasında 10 gün süreliğine karanlığa alınmıştır. Daha sonra sürekli ışığa transfer edilen bitkilerin köklerindeki SLs miktarı incelenmiştir. Işıқта büyütülen domates köklerindeki SLs miktarlarının karanlıkta yetiştirilenlere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi ise, ışığın SLs miktarı üzerinde pozitif bir etki göstermesidir. Bu da SLs biyosentezi ile ilişkilidir. Işık altında

bitki köklerindeki SLs seviyeleri zamana bağlı olarak artmaktadır. Böylece ışığın SLs sentezinde pozitif düzenleyici olduğu sonucuna varılmıştır (Mayzlish-Gati ve ark., 2010; Tsuchiya ve ark., 2010). Işık, karotenoid biyosentezini uyararak plastid yapılarının gelişimini düzenlemektedir. *A. thaliana* fideleri ışık sayesinde gelişirler. Fideler ışığa çıkarıldığında fotosentetik gelişim ile birlikte karotenoid biyosentezini düzenleyen moleküler mekanizmalar ortaya çıkarılmıştır. Bu mekanizmalardan bazıları, domates bitkisinde meyve olgunlaşması ile ilişkilidir. Işık çoğu durumda karotenoid üretimini olumlu etkilerken, ışığa alınmış havuç köklerinde toplam karotenoid seviyelerini düşürmüştür. Karotenoid üretimi sonucunda gen anlatım seviyeleri artmıştır (Welsch ve ark., 2000). Domates bitkisinde CRY2 geninin aşırı ifadesi karotenoid seviyelerini arttırmıştır. Işık ayrıca karotenoidlerin sentezlendiği organellerin plastid gelişimlerinde de etkili olmuştur.

Cazzonelli ve arkadaşları 2009a yılında yapmış oldukları bir çalışmada, *A. thaliana* kromatin modifikasyonundan sorumlu enzim Histon metiltransferaz şifreleyen *Domain Group 8 (SDG8)* geninde mutasyon elde etmişlerdir. Mutant bitkilerde karotenoid biyosentezinde görevli olan *CRTISO* geni kromatin yapısında H3K4 trimetilasyon miktarı azalmış olup, bunun sonucunda bitkilerdeki lutein miktarı da azalmıştır. Çalışmada, SLs biyosentezinde görev alan gen anlatımlarının *SDG8* mutasyonundan etkilenmedikleri bildirilmiştir.

DNA metilasyonunun dinamik bir şekilde düzenlenen epigenetik işaretler olduğu bilinmektedir. SMZ'nin, DNA metilasyon seviyelerini düşürerek epigenetik susturmayı ortadan kaldıran bir kimyasal olduğu anlaşılmıştır (Zhang ve ark., 2012). DNA metilasyon seviyelerinin düşmesinin nedeni, SMZ'nin folat sentezinde kullanılan metil kaynağını azaltmasıdır. Bu yüzden sulfonamidlerin bitkilerde folat sentezini inhibe edip etmediğini epigenetik düzenlemeler incelenerek araştırılmıştır. SMZ uygulanması transgenlerin yanı sıra endojen transpozonların ve diğer tekrar elementlerin aktif olmasına da yol açmıştır. Bitkilere SMZ uygulanması DNA metilasyonu ve histon H3 Lys9 demetilasyon seviyesini azaltırken, heterokromatik siRNA düzeylerini etkilememiştir. SMZ, bitkideki folik asit miktarını azalttığı ve metil eksikliğine neden olduğu gibi S-adenozin metionin düzeylerini ve DNA metilasyonunu azalttığını da göstermiştir. Aynı zamanda bitkilerde morfolojik olarak sararmalar ve kök boylarında azalma da gözlemlenmiştir.

SLs karotenoidlerden karotenoid cleavage enzimleri (CCD7/MAX3 ve CCD8/MAX4) ve demir bağlayıcı protein D27'yi içeren bir yol aracılığıyla üretilir. D27 geninin, all-trans- $\beta$ -karoteni, 9-cis- $\beta$ -karoten'e dönüştürdüğü ve bir  $\beta$ -karoten izomeraz

kodladığı görülmüştür. CCD8, 9-cis- $\beta$ -apo-10'-karoten ile üç oksijen birleştirir. Karotenoidleri SLs ile bağlayan ve SLs benzeri biyolojik aktiviteler ile bir bileşik olan karlakton molekülünü üretirler (Alder ve ark., 2012).

SLs'nin *A. thaliana* ve bezelye bitkilerinde adventif kök oluşumunu baskıladığı görülmüştür (Rasmussen ve ark., 2012). Adventif kökler, bitkilerde gövde ve yaprak gibi kök olmayan dokulardan gelişir. Adventif kök oluşumunda oksin ve sitokinler ile SLs etkileşimini açıklayan bir model sunulmuştur. *MAX4* ve *MAX3* genlerinin anlatım çalışmasında, çimlenmeden 5 gün sonra ışığa aktarılmış ve karanlıkta yetişen hipokotiller incelenmiştir. Bu genlerin ışığa transferinden sonra farklı zamanlarda gen anlatımları incelenmiştir. Adventif kök oluşumu için etiolasyon önemlidir. Çünkü karanlıkta yetişen bitkilerde kloroplast ve klorofil bulunmamasından dolayı sararmalar gerçekleşmektedir. Bu çalışmada, *MAX4* ve *MAX3* genlerinin anlatımları ışık tarafından uyarılmış, karanlıkta yetişen bitkilerde ise herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Fosfat açlığı ve kök parazitliliği ile ilgili bir çalışmada; bitkiler fosfat açlığına bırakılmış ve parazit organizmalar ile arasındaki ilişki incelenmiştir (Kohlen ve ark., 2011). *Orabanche* tohumlarının çimlenme oranlarının fosfat açlığına bırakılan bitkiler varlığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bitkilerde fosfat açlığı, dallardaki sürgün sayısının azalmasına ve kök sistemindeki değişikliklere neden olmaktadır. *Phelipanche (Orobanche) ramosa* bitkisinin tohumları ile çimlenme deneyleri yapılmıştır (Joel 2009). Fosfat eksikliğinde bitkilerdeki SLs seviyeleri, sürgün değişiklikleri, SLs benzeri bileşiklerin rolü, SLs biyosentezinde ve sinyal iletiminde rol alan *MAX1*, *MAX2*, *MAX4* genleri araştırılmıştır. SLs üretimindeki artış fosfat eksikliğine bağlı olarak dallanma değişikliği göstermektedir. Yapılan analizlerde *A.thaliana* bitkisinde 3 tane SLs analogu tanımlanmıştır (orobanchol, orobanchyl asetat ve 5-deoxystrigol). SLs biyosentezinde *MAX1* ve *MAX4* genlerinin anlatımlarının yüksek olduğu, sinyal iletiminde *MAX4* geninin anlatımında azalma olduğu görülmüştür. Köklerden salınan maddelerde SLs benzeri bileşikler saptanmamış fakat ksileme tespit edilmiştir. Bu da ksileme taşıyan SLs'nin fosfat sınırlamasına rağmen sürgün düzenlemesine katkıda bulunduğunu gösterir (Nagahashi ve Douds 2000).

*A. thaliana* bitkisinde azot eksikliğinin SLs biyosentezi ve algılanmasına olan etkileri araştırılmıştır (Ito ve ark., 2016). Azot miktarındaki değişiklikler SLs biyosentez genlerinin (*MAX3* ve *MAX4*) anlatımını değiştirmiştir. Azot eksikliğinde SLs sinyali ve sinyal yolağı arasında bir ilişki olduğu anlaşılmıştır. Azot eksikliği bitkilerde büyümeyi, yaprak yaşlanmasını ve bitki ağırlığını etkilemiştir. *A. thaliana* bitkileri öncelikle 7 gün boyunca

kontrol ortamında yetiştirilmiş, daha sonra bir kısmı azotlu ortama transfer edilmiş ve iki hafta sonra köklerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak, SLs biyosentezinden sorumlu genlerin RT-PCR ile analizleri yapılmıştır. SLs biyosentezi ve algılamada rol alan genlerin anlatımları, bitkilerin morfolojik değişiklikleri azot varlığında ve eksikliğinde incelenmiştir. Azot eksikliğinde SLs biyosentez genlerinin anlatımlarında artış görülmüştür (Yoneyama ve ark., 2013).

AM simbiyozu, bitkilerde kuraklık stresini azaltır (Ruiz-Lozano ve ark., 2016). AM ve AM olmayan bitkilerde kuraklığın marul ve domates bitkileri üzerindeki verim ve hormon seviyelerine olan etkileri araştırılmıştır. Kuraklıkta AM bitkileri AM olmayan bitkilerden daha fazla büyüme hızı ve fotosistem II verimliliği göstermiştir. AM simbiyozunun, konukçu bitkide bitki fizyolojisini etkilediği ve hormonları değiştirerek kuraklık stresini azalttığı görülmüştür. AM kök birlikteliğinin, SLs seviyeleri ve kuraklık şiddeti arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir; olumsuz koşullarda, bitkiler stresi önleyebilmek amacıyla ortak yaşamın oluşması için SLs seviyelerini arttırmışlardır. *A. thaliana* bitkisinde kuraklık ve tuzluluğun SLs ile pozitif düzenlendiği görülmüştür (Mishra ve ark., 2017). Bunun kök ile ilişkili özelliklerden ziyade sürgün ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. *MAX3* ve *MAX4* genlerinin mutantları kuraklık ve tuzluluk stresine karşı duyarlıdır. AM simbiyozu bitkilerde kuraklık stresini azaltır. SLs'nin fazla olması simbiyozu etkiler ve böylece stresle baş etmeye yardımcı olur (Ruiz-Lozano ve ark., 2016). SLs bitkilere abiyotik ve biyotik strese karşı direnç kazandırır. Bitkilerde azot ve fosfor yetersizliği durumunda SLs sentezi artarak AM gelişimine yol açar. Biyotik strese karşı SLs tolerans sağlamıştır. Büyüme ve gelişimdeki rollerinin yanı sıra SLs patojenlere karşı direnç sağlamada da rol almıştır (Marzec, 2016). *Rhodococcus fascians*, *Pectobacterium carotovorum* ve *Pseudomonas syringae* gibi bakterilerin enfeksiyona karşı direncinde de SLs'nin rol oynadığı görülmüştür (Stes ve ark., 2015). Sonuç olarak, stres direkt olarak SLs biyosentezini ve SLs sinyal iletimini veya diğer bitki hormonları, özellikle ABA ile olan ilişkisini etkiler.

*D14* geninin çeltik bitkisinde SLs'nin sürgün dallanmasını inhibe ettiği görülmüştür (Arite ve ark., 2009). *D14* mutantlarında sürgün dallanması artmıştır. *D14*'ün alfa/beta hidrolaz süper ailesinin bir proteinini kodladığı ortaya çıkarılmıştır, bazı üyeleri bitki hormonlarının metabolizmasında veya sinyal iletiminde rol oynamaktadır. *D14* geninin RT-PCR analizi ile tüm bitki dokusunda anlatımları incelenmiş ve *D14* geninin SLs yolunda çalıştığı onaylanmıştır. Çeltik bitkisinde SLs sinyal yolağı; alfa/beta hidrolaz reseptörü (*D14*), F kutusu protein, SCF kompleksi (*D3*), ve ClpATPaz (*D53*)

bileşenlerinden oluşur (Pandey ve ark., 2016). Bu bileşenler transkripsiyon faktörlerini kontrol ederek gen ifadesini düzenlerler. Stres kaynaklı bitki kaybı probleminin üstesinden gelebilmek için SLs sinyali mekanizmalarının detaylarının anlaşılması gerekmektedir. Bunun için SLs sinyali yolağında görev alan genler ile çalışılmıştır. Ayrıca tümör hücrelerinde hücre döngüsü, hücresel stres ve apoptoz indüklenerek anti-kanser tedavisinde de SLs'nin kullanılabileceği gösterilmiş olup, SLs'nin anti-kanser tedavisi için faydalı olabileceği bildirilmiştir (Pollock ve ark., 2014).

SLs algılama ve sinyal iletim bileşenleri, çeltik ve *A. thaliana* bitkilerinde tanımlanmıştır (Arite ve ark., 2009; Umehara ve ark., 2008). *A. thaliana*, petunya ve bezelye bitkilerinde *D14* gen ortologlarındaki mutasyonlar, tomurcuk büyümesinin artırılmasına sebep olur (Gao ve ark., 2009; Hoffmann ve ark., 2014; Saint Germain ve ark., 2016; Waters ve ark., 2012). *D14* genine benzer bir şekilde *A. thaliana* bitkisinde *MAX2*, çeltik bitkisinde *D3* ve bezelyede *RMS4* genlerindeki mutasyonlar, tomurcuk büyümesini teşvik ederler. SLs algılama ile sinyal yolağı için bir çalışma modeli önerilmiştir. SLs belirli bir reseptör sistemi ile bitkiler tarafından algılanmaktadır. Bu sistem ise F kutusu proteinleri olarak tanımlanmıştır. Bu protein Skp, Cullin, F-box (SCF)-E2 içeren komplekse bağlanabileceği ileri sürülmüştür (Ishikawa ve ark., 2005; Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008).

*D14* geni ve gen ailesinin başka bir üyesi olan *D14 Like (D14L)* geni çeltik bitkisinde incelenmiştir (Kameoka ve Kyojima 2015). *D14* geni SLs sinyali iletiminde görevlidir. *D14L* geninin mezokotil büyümesindeki rolü araştırılmıştır. SLs'nin ışıklı ortamda hipokotil uzamayı baskıladığı görülmüştür (Scaffidi ve ark., 2014). Daha önceki çalışmalarda *D14* geninin karanlık ortamda mezokotil büyümesini düzenlediği bildirilmiştir (Hu ve ark., 2010).

## **BÖLÜM 3**

### **MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi**

Çalışmada bitki materyali olarak yabancı tip *A. thaliana* Columbia ekotipi kullanılmıştır. Tohumlar, % 1 BactoAgarTM içeren 1/2 Murashige ve Skoog (Sigma M-5519) (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı içerisinde çimlendirilmiştir. Tüm işlemler steril kabin içerisinde yürütülmüştür.

#### **3.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması**

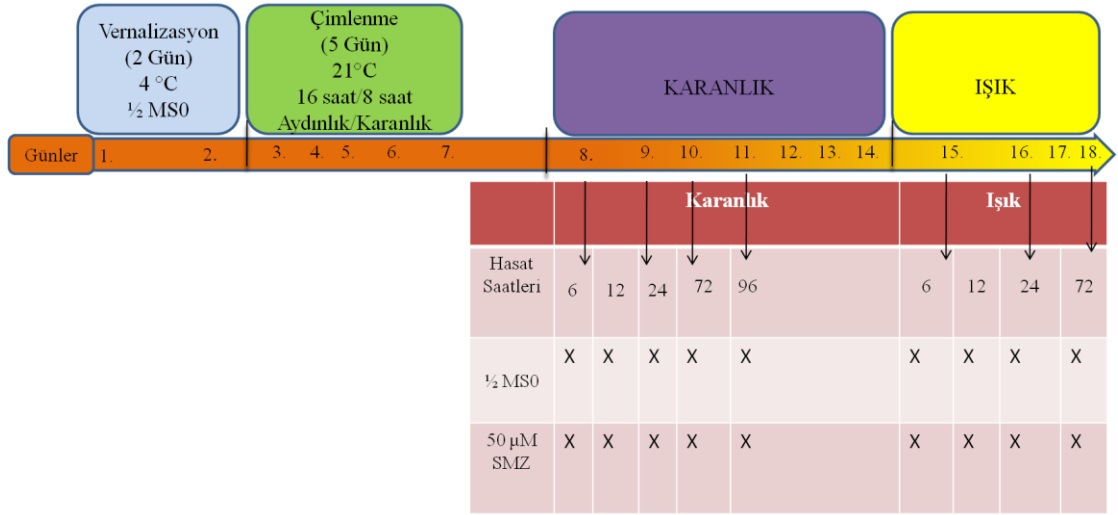
Çalışmada 1/2 MS0 ve 50µM Sülfametazin (SMZ) içeren besin ortamı hazırlanmıştır. MS besin ortamı için 4,31 g MS (Sigma M-5519) ve 10 g süktroz 1,8 L distile su içerisinde çözülmüş ve 1M NaOH kullanılarak pH5.7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra hacim 2 L'ye tamamlanarak agar (10 g/l) ilave edilmiştir. Son olarak MS besin ortamı 121 °C'de 15 dk süre ile otoklav ile steril edilmiş ve 55°C'ye kadar soğutularak steril petri kaplarına dökülmüştür. Daha sonra çalışmada, aseptik koşullarda çimlendirilmiş bitkilerin bir grubuna DNA metilasyon inhibitörü olan 50 µM SMZ (sigma S6256) uygulanmıştır.

SMZ stok solüsyon hazırlanarak kullanılmıştır. Çözücü olarak Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Moleküler ağırlığı 278,33 gr/mol olan SMZ hassas terazide 0,969 g tartılıp 5ml DMSO ile çözülmüştür. Böylece 50 µM SMZ stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu solüsyon steril kabin içerisinde enjektör ile 25 mm çapındaki steril filtreden geçirilip ependorf tüplerine aktarılmıştır ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. 50 µM stok çözelti besin ortamlarına besin ortamı donmadan hemen önce steril pipet yardımıyla eklenmiştir. Sonrasında steril petri kaplarına dökülmüştür.

#### **3.3. Bitki Ekimi ve Çimlenmesi**

Tohumların yüzey sterilizasyonu, % 6'lık ticari sodyum hipoklorit içerisinde 10dk süre ile vorteks ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından tohumlar steril distile su ile üç defa yıkanarak sodyum hipoklorit uzaklaştırılmış ve içerisinde bir miktar steril distile su eklenerek MS besin ortamı içeren petrilere aktarılmıştır. Tohumlar steril petrilere içerisinde dormansiye kırmak amacıyla 2 gün süreyle +4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra 21°C'de, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık olan iklimlendirme kabininde 5 gün süreyle çimlenmesi sağlanmıştır.

Aseptik koşullarda çimlendirilen 7 günlük bitkilerin bir grubu 8. günde 50  $\mu$ M SMZ içeren MS besin ortamlarının bulunduğu petri kaplarına transfer edilmiştir. Sonrasında alüminyum folyo ile sarılı bir şekilde karanlığa alınmıştır. Bu bitkilerden bazıları karanlığa alınmalarını takip eden 6, 12, 24, 72 ve 96. saatlerde 100 adet olacak şekilde toplanmış ve sıvı azot içerisinde dondurularak -86°C’de saklanmıştır. Geriye kalan bitkiler ise 7 gün boyunca karanlıkta bekletilmiş olup, kültürün 15. gününden itibaren aydınlığa alınmıştır. Bu bitkilerden ise örnekler, yine 6, 12, 24 ve 72.saatlerde 100 adet olacak şekilde toplanmış ve sıvı azot içerisinde dondurularak -86°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Karanlık ve ışık ortamındaki deney düzeneği.

### 3.3. RNA İzolasyonu

Dokular RNA degradasyonunu önlemek amacıyla sıvı azot içerisinde dondurulup RNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar -86 °C’de depolanmıştır. RNA izolasyon çalışmalarında kullanılan havan, havan eli ve pensler bir gün öncesinden % 1’lik DEPC (Applchem-A0881,0100) içeren suda bekletilmiş ve daha sonra 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır.

1. Bitki dokuları -86 °C’den çıkarılıp hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde havan ve havan eli ile ezilmiştir.
2. Toz şekline gelen dokular mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve Trizol (Ambion–15596018) yardımı ile kit (PureLink ® RNA Mini Kit (Invitrogen 12183018A)) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.
3. Homojenize edilmiş mikrosantrifüj tüplerindeki homojenata 1ml Trizol ilave edilmiş, alt üst edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

4. Sonrasında tüplerin her birine 200 µl kloroform ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 3 dakikabekletilmiştir. Ardından 12.000 rpm'de 15 dk süre ile tüpler santrifüj yapılmıştır.
5. Santrifüjden sonra 400 µl üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ardından eşit miktarda (400 µl) %70 etanol ilave edilip vortex yardımıyla karıştırılmıştır.
6. Filtreli kolona 700 µl aktarılmış ve 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapılmıştır.
7. Daha sonra altta kalan sıvı uzaklaştırılmış ve tüplere 700 µl yıkama solüsyonu I ilave edilmiştir.
8. 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj işleminin ardından filtreli kolon toplama tüpünden ayrılmış ve yeni bir tüpe yerleştirilmiştir.
9. 500 µl yıkama solüsyonu II ilave edilmiş tüpler 15 saniye 12.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Ardından altta biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2kere tekrar edilmiştir.
10. Ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtreli kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
11. Filtreli kolonuna 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilmiş ve 3 dakika oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
12. Tüpler 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj işleminden sonra filtreli kolon atılmış ve RNA'ları içeren mikrosantrifüj tüpleri kullanılıncaya kadar -86°C'de depolanmıştır.
13. İzolasyonun ardından RNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve içerdiği RNA miktarı florometrik yöntem ile belirlenmiştir.

RNA miktarları Qubit® 2.0 florometre cihazı (Invitrogen, Q32866) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 199 µl reaksiyon tamponu ile 1 µl RNA Reagent (Invitrogen, Q10210) karıştırılarak çalışma solüsyonu elde edilmiş, vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Sonrasında 2 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilen örnekler Qubit® 2.0 florometre cihazında okutulmuştur.

### **3.4. cDNA Sentezi**

Tez çalışmasında cDNA sentezi 'High-Capacity' cDNA Revers Transcription Kiti(4368814; Applied Biosystems) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon kurulurken steril pipet uçları ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tüpleri kullanılmıştır. Öncelikle

dokulardan izole edilmiş olan total RNA örneklerinde DNA kalıntılarını uzaklaştırmak için DNaz uygulanmıştır. Hazırlanan reaksiyon tüplere eklenerek termal döngü cihazında 37°C’de 30 dk süre ile inkübe edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1.DNaz uygulamasındaki reaksiyon bileşikleri

| Bileşen               | Miktar     | Final Konsantrasyonu |
|-----------------------|------------|----------------------|
| 10X Reaksiyon tamponu | 1 µl       | 1x                   |
| Kalıp RNA             | 1000 µg/µl | 100 µg/µl            |
| DNase                 | 1 µl       | 0,1µ/µl              |

DNaz uygulaması sonrasında, tüplere cDNA reaksiyon bileşikleri eklenmiştir.DNaz enziminin inaktivasyonu amacıyla 65°C’de 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından, bu bileşenlerin bulunduğu tüplere 10X reaksiyon tamponu (2 µl), Nuclease- free water (3,2 µl) ve son olarak Revers transkriptaz enzimi (1 µl) ilave edilmiştir. Toplam hacim 20 µl’ye tamamlanmış ve tüpler bir thermal cyler cihazında inkübe edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. cDNA sentez programı

| İşlem sırası | Sıcaklık (°C ) | Zaman (dk) |
|--------------|----------------|------------|
| 1            | 25             | 10         |
| 2            | 37             | 120        |
| 3            | 85             | 5          |
| 4            | 4              | Sonsuz (∞) |

### 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tez çalışmasında cDNA sentezinden sonra kalıp olarak kullanılan cDNA’ların sağlamlılığı PZR ile kontrol edilmiştir. Bunun için bitkinin tüm dokularında sürekli ifade olduğu bilinen *ACTIN2* geni primerleri ile PZR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon kurulurken tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda 270 bp’lik DNA bandı oluşması beklenmiştir. Tüm reaksiyonlar, bir tüp içinde master mix olarak hazırlanıp tüplere eşit miktarda dağıtılmıştır. Tüm tüplere kalıp olarak eş miktarda cDNA eklenmiş ve son olarak Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, 11615-010) ilave edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları

| Bileşen                   | Miktar    | Final konsantrasyonu |
|---------------------------|-----------|----------------------|
| 10X PZR tampon            | 2,5       | 1X                   |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>   | 2         | 2 mM                 |
| 25X dNTP karışımı         | 0,5       | 0,2 mM               |
| 10pmol/ µl Reverse Primer | 10,4 pmol |                      |
| 10pmol/ µl Forward Primer | 10,4 pmol |                      |
| Kalıp cDNA                | 1         |                      |
| Nuclease Free water       | 16,75     |                      |
| Taq Polimeraz             | 0,25      |                      |
| Toplam                    | 25 µl     |                      |

Çizelge 3.4. *ACTIN2* genine ait PZR programı

| Segment                | Sıcaklık (°C) | Zaman(dk) | Döngü sayısı |
|------------------------|---------------|-----------|--------------|
| İlk Denatürasyon       | 94            | 3         | 1            |
| Denatürasyon           | 95            | 1         |              |
| Primerlerin Bağlanması | 59            | 1,5       | 35           |
| Uzama                  | 72            | 3         |              |
| Final uzama            | 72            | 10        | 1            |

### 3.6. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar

#### 3.6.1. 10X TAE Tamponu

48,4 gr M Tris base, 3,72 gr EDTA 900 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonraasetik asit (12 ml) ile pH'ı 8,0 olarak ayarlanmıştır. Son hacmi dH<sub>2</sub>O ile 1 l'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

#### 3.6.2. 1X TAE Tamponu

Hazırlanmış olan 10X TAE tamponundan 100 ml ve 900 ml dH<sub>2</sub>O ile birlikte hacmi 1 l'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

#### 3.6.3. Ethidium Bromide Stok Çözeltisi

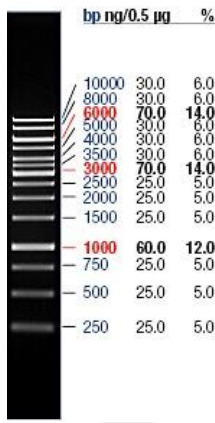
0,1 g ethidium bromide 10 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüştür. Solüsyonun bulunduğu kap alüminyum folyo ile kaplanıp karanlıkta oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### 3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

RNA örnekleri ve PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile

görüntülenmiştir. 0,5 gr Agaroz (Sigma 094509R) 50 ml 1X TAE tampon içerisinde istikrarlı olarak çözümüştür. Ardından 3 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml) ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Daha sonra bu jel tarak yerleştirilmiş olan jel tepsisine dökülmüş ve 30 dk jelin katılaşması beklenmiştir.

PCR ürünleri ve ladder 6X yükleme boyası ile birlikte karıştırılmış ve kuyucuklara sırası ile yüklenmiştir. Jelin yürütülmesi için geçen zaman 6,5 V/ cm’de 80 dk’dır. PCR ürünlerinin resimleri ultra violet (UV) transilluminator tablasında Olympus C-5060 markalı fotoğraf makinesi sayesinde görüntülenmiştir. Elektroforez için 1 kb ladder (Fermentas DNA Ladder SM0633) kullanılmıştır (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. Elektroforezde kullanılan 1 kb olan ladder

### 3.8. SMZ'nin Bitki Gelişimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Çalışmada, 50 µM SMZ uygulanmış bitkilerin gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla aseptik koşullarda bitkiler yetiştirilmiştir. Birinci grup MS0 kontrol grubu, ikinci grup ise 50 µM SMZ uygulanmış grup olmak üzere *A. thaliana* Columbia ekotipine ait tohumların petri kaplarına tek sıra halinde ekimleri yapılmıştır. MS0 ve 50 µM SMZ içeren besin ortamlarına ekilen tohumlar 2 gün süreyle +4 °C’de bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar 21°C’de, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık olan iklimlendirme kabineine bırakılarak çimlenmesi sağlanmıştır. 15 gün süreyle çimlendirilmişlerdir. Çimlenme sonrasında dallanma şekilleri incelenmiş ve kök boyları dijital bir kumpas ile ölçülmüş, yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. Bitkilerdeki kök boyu sonuçları, kontrol ve 50 µM SMZ uygulanmış iki grup bitkideki ortalama farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirmek için T testi kullanılmıştır.

### 3.9. Gerçek Zamanlı PZR Deneyleri

SLs biyosentezinde ve algılanmasında görevli olan genlerin anlatımlarının karşılaştırılması için Taqman problemleri ve kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır. Gen anlatım çalışması için genlere özgü *MAX4* (AT02248793-g1), *D14* (AT0222998-g1) ve *Casein KinaseII* (AT02222831-g1) Taqman problemleri kullanılmıştır.

Gen anlatım çalışmaları kantitatif PZR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. PZR deneylerinin gerçekleştirilmesi amacıyla 96 kuyucuklu plakeler kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 µL (50 ng/ µL) cDNA, 5 µL master mix, 0,5 µL TaqmanProb (AB applied biosystems) ve 3,5 µL nükleaz içermeyen su eklenmiştir. DNA ve RNA kontaminasyonunun kontrol edilmesi amacı ile negatif ters transkriptaz kontrolü ve negatif kontrol reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Pozitif kontrol geni olarak *Casein KinaseII* (AT4G17640) geni kullanılmıştır (Rasmussen ve ark., 2012). Çalışmada her bir gen için 3 teknik tekrar yapılmıştır. Gen anlatımlarının kıyaslanmasında karşılaştırmalı Ct yöntemi kullanılmıştır. Applied Biosystem 7500 cihazı ile okumalar yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Taqman prob yöntemi ile PZR çalışmalarında kullanılan örnek plate düzeni

|   |                  |                  |                   |                   |                   |              |                |                |                |             |            |            |
|---|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|-------------|------------|------------|
| A | 0 kontrol MAX4   | 0 kontrol MAX4   | 0 kontrol MAX4    |                   |                   |              | 0 kontrol D14  | 0 kontrol D14  | 0 kontrol D14  |             |            |            |
| B | 6 kontrol MAX4   | 6 kontrol MAX4   | 6 kontrol MAX4    | 6 SMZ MAX4        | 6 SMZ MAX4        | 6 SMZ MAX4   | 6 kontrol D14  | 6 kontrol D14  | 6 kontrol D14  | 6 SMZ D14   | 6 SMZ D14  | 6 SMZ D14  |
| C | 12 kontrol MAX4  | 12 kontrol MAX4  | 12 kontrol MAX4   | 12 SMZ MAX4       | 12 SMZ MAX4       | 12 SMZ MAX4  | 12 kontrol D14 | 12 kontrol D14 | 12 kontrol D14 | 12 SMZ D14  | 12 SMZ D14 | 12 SMZ D14 |
| D | 24 kontrol MAX4  | 24 kontrol MAX4  | 24 kontrol MAX4   | 24 SMZ MAX4       | 24 SMZ MAX4       | 24 SMZ MAX4  | 24 kontrol D14 | 24 kontrol D14 | 24 kontrol D14 | 24 SMZ D14  | 24 SMZ D14 | 24 SMZ D14 |
| E | 72 kontrol MAX4  | 72 kontrol MAX4  | 72 kontrol MAX4   | 72 SMZ MAX4       | 72 SMZ MAX4       | 72 SMZ MAX4  | 72 kontrol D14 | 72 kontrol D14 | 72 kontrol D14 | 72 SMZ D14  | 72 SMZ D14 | 72 SMZ D14 |
| F | 0 kontrol CASEIN | 6 kontrol CASEIN | 12 kontrol CASEIN | 24 kontrol CASEIN | 72 kontrol CASEIN | 6 SMZ CASEIN | 12 SMZ CASEIN  | 24 SMZ CASEIN  | 72 SMZ CASEIN  | N CASEIN su | RT CASEIN  |            |
| G | 0 kontrol CASEIN | 6 kontrol CASEIN | 12 kontrol CASEIN | 24 kontrol CASEIN | 72 kontrol CASEIN | 6 SMZ CASEIN | 12 SMZ CASEIN  | 24 SMZ CASEIN  | 72 SMZ CASEIN  | N CASEIN su | RT CASEIN  |            |
| H | 0 kontrol CASEIN | 6 kontrol CASEIN | 12 kontrol CASEIN | 24 kontrol CASEIN | 72 kontrol CASEIN | 6 SMZ CASEIN | 12 SMZ CASEIN  | 24 SMZ CASEIN  | 72 SMZ CASEIN  | N CASEIN su | RT CASEIN  |            |

## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Çalışma için gerekli olan yabancı tip *A. thaliana* Columbia ekotipine ait tohumlar Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek yetiştirilmiştir.

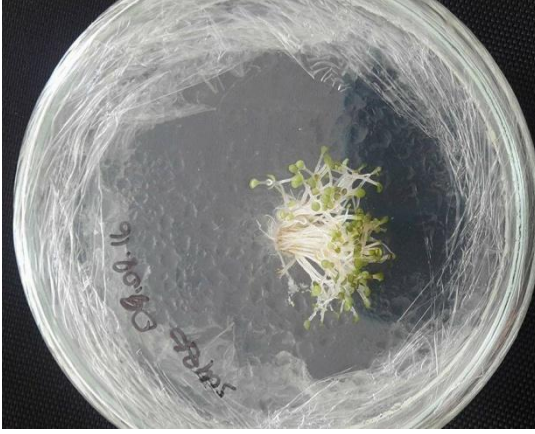
Tohumlar yüzey sterilizasyonu sonrasında 2 gün süre ile +4 °C’de bekletilmiştir. Bu sürede dormansi kırılarak çimlenme teşvik edilmiştir. Daha sonra tohumlar 21 °C’de, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık olan bitki iklimlendirme kabineye koyularak çimlenmeleri sağlanmıştır. Çimlenme tohumların kabine alınmalarını takip eden 2. günde başlamıştır. Tohumların tamamı 4 gün sonrasında çimlenmiştir. Bu aşamada bitkiler kotiledon yaprak ve kökler oluşturmuştur.

Çalışmada bitkiler kültürün 8. gününden itibaren iki farklı besin ortamında, içerisinde hiçbir eklem yapılmamış (MS0) ve içerisine 50 µM SMZ eklenmiş MS besin ortamlarında karanlığa alınmıştır. Bitkiler bu ortamlarda 7 gün süre ile bekletilmiş ve farklı zamanlarda petrilerden örnekler toplanmıştır. Hasat edilen bitkilerin gövde ve kök boylarının uzadığı ve gerçek yaprak oluşturdıkları görülmüştür.

Karotenoid biyosentezinin karanlık şartlarda yetiştirilen bitkilerde durduğu rapor edilmiştir (Cazzonelli ve ark., 2009b; Maylish-Gati ve ark., 2012) bu nedenle çalışmada bitkiler çimlenmeden 5 gün sonra karanlığa alınmış, böylece karotenoid biyosentezinin durdurulması sağlanmıştır. Daha sonra ise bitkiler ışığa alınarak SLs biyosentezine eş zamanlı başlamaları sağlanmıştır. Çalışmada, karanlıkta bekletilen *A. thaliana* bitkilerinin boy ve kotiledon yaprakları uzayarak sararmış, gerçek yaprakların ise zayıf kaldıkları görülmüştür (Şekil 4.1-4.2). Bitkilerin ışığa alınmalarından sonra hipokotildeki hücrelerin kökleri uyararak SLs biyosentezini başlattığı bilinmektedir (Rasmussen ve ark., 2012). Ayrıca, karanlıkta bekletilen çeltik bitkilerinde SLs sentezlenemediği için sürgün sayısında artışlar bildirilmiştir (Arite ve ark., 2009; Lin ve ark., 2009). Domates bitkisi ile yapılan bir çalışmada ise üretilen SLs biyosentezinin karotenoidlerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (López-Ráez ve ark., 2008).



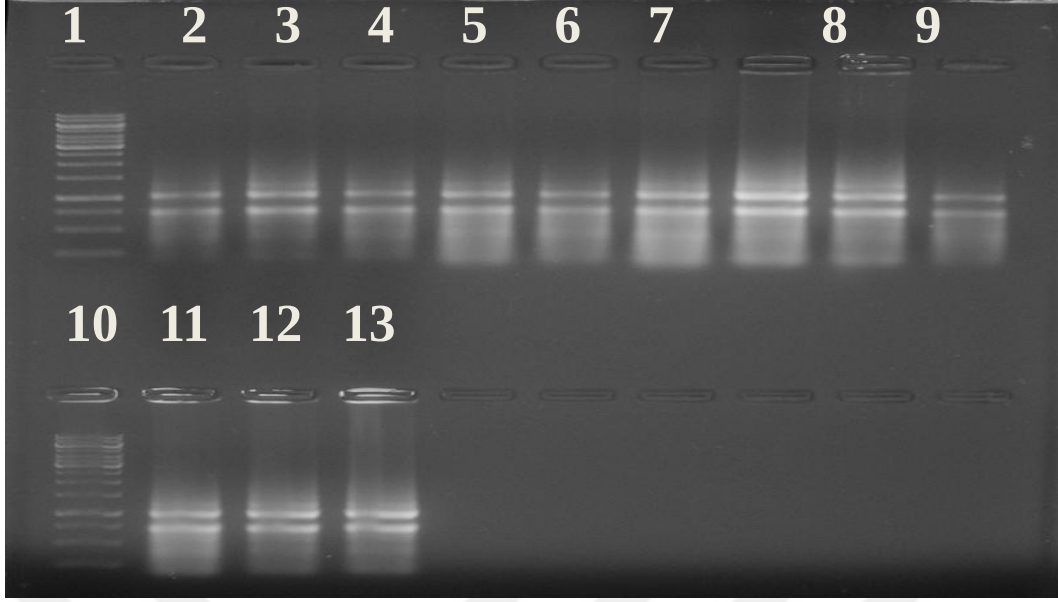
Şekil 4.1. MS0 besin ortamında 5 gün çimlenmeden sonra 7 gün boyunca karanlıkta bekletilen *A. thaliana* fideleri



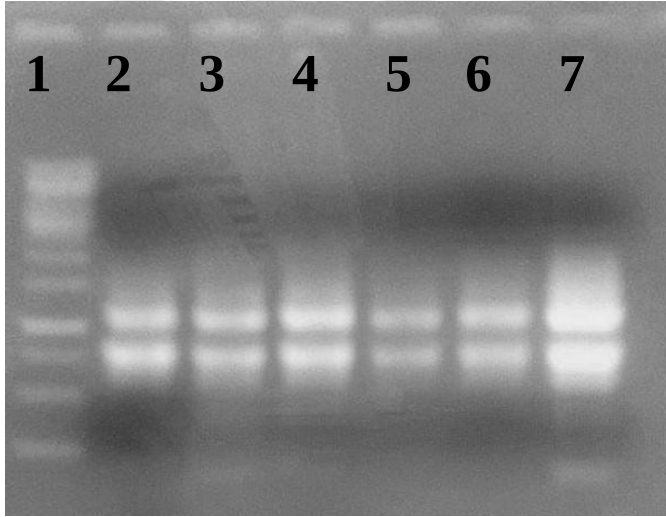
Şekil 4.2. MS0 besin ortamında 5 gün çimlenmeden sonra 50  $\mu$ M SMZ içeren 7 gün boyunca karanlıkta bekletilen *A. thaliana* fideleri

#### 4.2. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

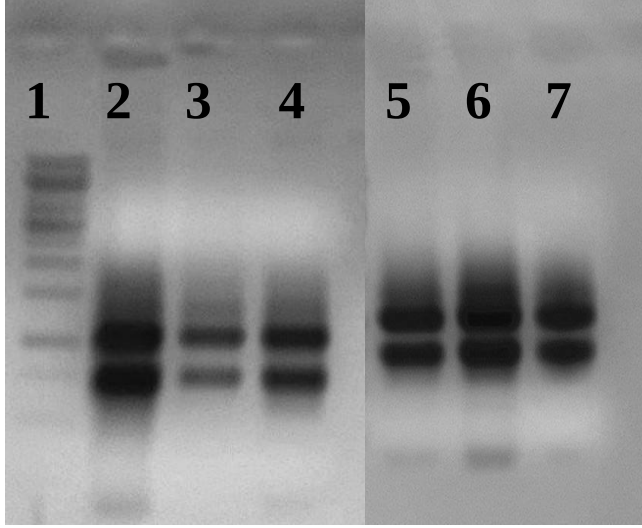
Çalışmada, MS0 ve 50  $\mu$ M SMZ içeren besin ortamlarında kültüre alınmış *A. thaliana* bitki fidesine ait dokulardan RNA izolasyonları yapılmıştır (Şekil 3.1). Bitkiler önceden soğutulmuş steril pens yardımıyla porselen havanlara aktarılmış ve total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada RNA miktarları flourometrik yöntem ile belirlenmiş ve 300 ile 1710 ng/ $\mu$ l arasında olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.1-4.2). İzole edilen RNA'ların kalitesi ise agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildiğinde 18S ve 28S RNA bantlarını içerdiği için örneklerin sağlam olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.3-4.4 ve 4.5).



Şekil 4.3. Karanlıktaki MS0 ve SMZ 50  $\mu$ M bitkilere ait RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-çimlenmenin kontrolü, 3-6. saat, 4 -12. saat, 5- 24. saat, 6-48. saat ve 7-72. saat). Kuyucuk 8-13 SMZ'li grup ( 8- 6. saat, 9 -12. saat, 10 - DNA Ladder, 11-24. saat, ve 12-48. saat ve 13-72. saat)



Şekil 4.4. Işıktaki MS0 bitkilerine ait RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-karanlıktaki 96. saat, 3-6. saat, 4 -12. saat, 5- 24. saat, 6- 48. saat ve 7-72. saat)



Şekil 4.5. Işıktaki yetiştirilen ve 50 µM SMZ uygulanmış bitkilere ait RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 SMZ' li grup (1-DNA Ladder, 2-karanlıktaki 96. saat, 3 -6. saat, 4- 12. saat, 5-24. saat, 6-48. Saat ve 7-72. saat)

Çizelge 4.1. RNA izolasyonu yapılan karanlıktaki dokulara ait RNA miktarları

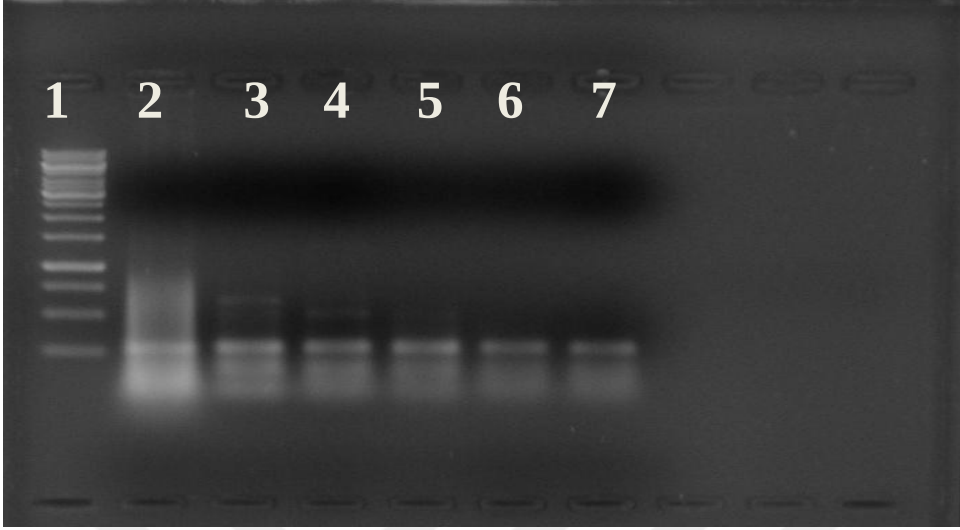
| Saat | MS0 (ng/ µl) | SMZ (ng/ µl) |
|------|--------------|--------------|
| 6    | 300          | 712          |
| 12   | 870          | 426          |
| 24   | 676          | 670          |
| 72   | 750          | 380          |
| 96   | 462          | 1710         |

Çizelge 4.2. RNA izolasyonu yapılan ışıktaki dokulara ait RNA miktarları

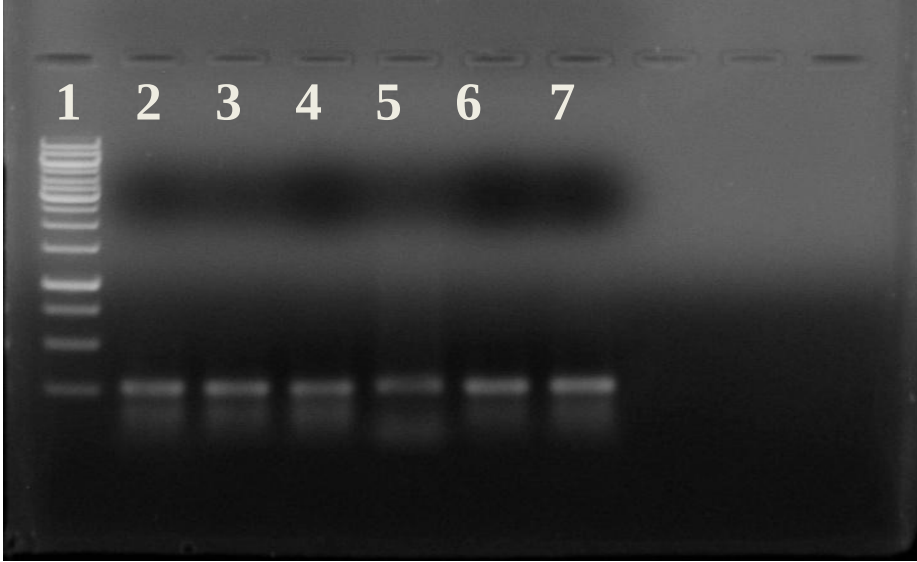
| Saat    | MS0 (ng/ µl) | SMZ (ng/ µl) |
|---------|--------------|--------------|
| Kontrol | 495          |              |
| 6       | 340          | 406          |
| 12      | 980          | 705          |
| 24      | 600          | 1080         |
| 72      | 830          | 720          |

RNA izolasyonu çalışmalarından sonra ise, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Burada, cDNA kalitesini kontrol etmek için *ACTIN2* (AT3G18780) primerleri kullanılmıştır. Bu PCR reaksiyonunda her bir örnekte 270 baz çifti uzunluğunda PCR

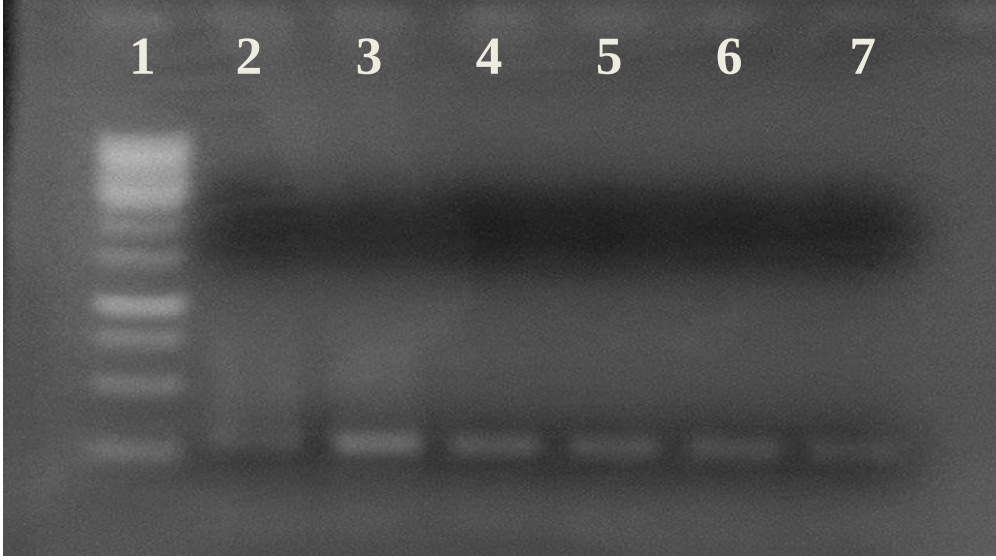
ürünü meydana gelmiştir (Şekil 4.5-4.6). *ACTIN2* primeri ile kurulan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.



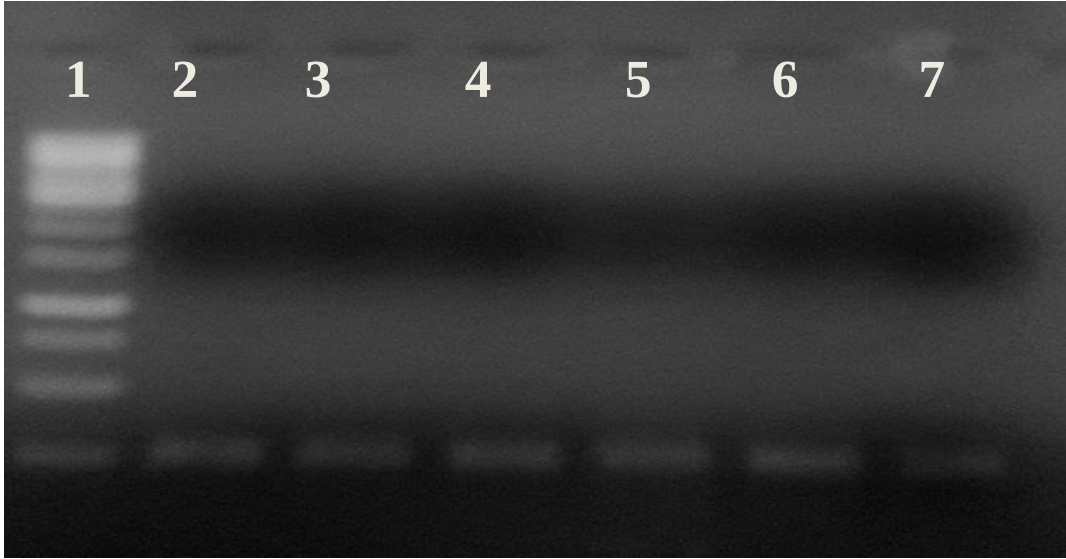
Şekil 4.6. Karanlıkta yetiştirilen MS0 bitkisine ait *ACTIN2* PZR jel görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-kontrol, 3-6. saat, 4 -12. saat, 5- 24. saat, 6-48. saat ve 7-72. saat)



Şekil 4.7. Karanlıkta yetiştirilen ve 50  $\mu$ M SMZ uygulanmış bitkilere ait *ACTIN2* PZR jel görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 SMZ' li grup (1-DNA Ladder, 2- kontrol, 3-6. saat, 4 -12. saat, 5- 24. saat, 6-48. saat ve 7-72. saat)



Şekil 4.8. Işıktaki yetiştirilen MS0 bitkisine ait *ACTIN2* PZR jel görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 MS0 (1-DNA Ladder, 2-karanlıktaki 96. saat, 3-6. saat, 4 -12. saat, 5- 24. saat, 6-48. saat ve 7-72. saat)

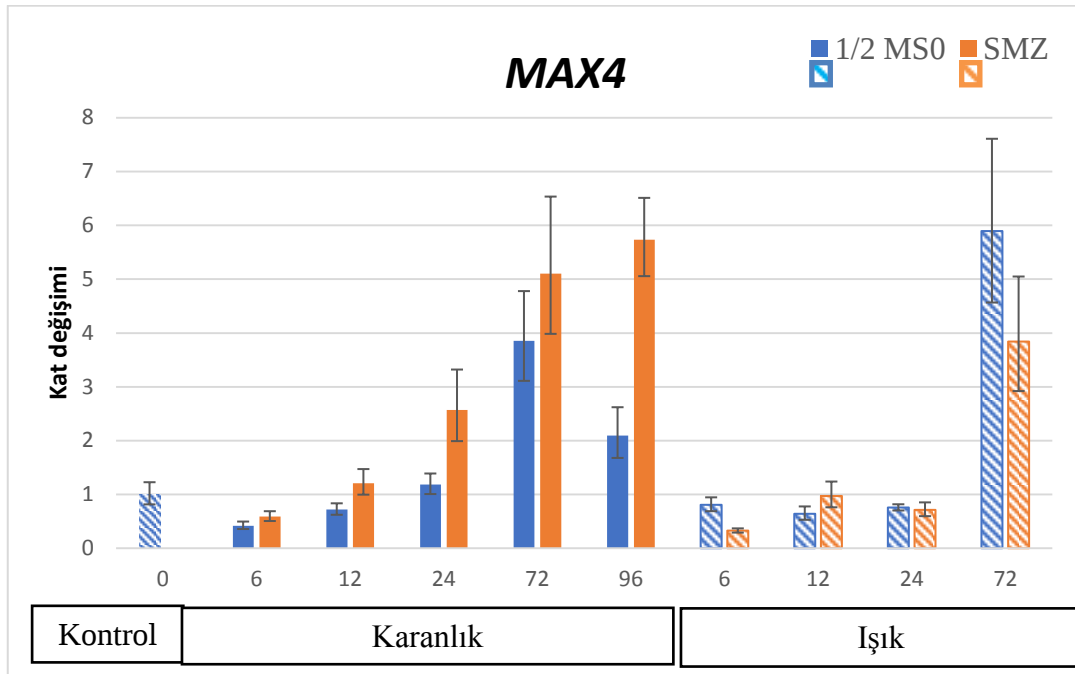


Şekil 4.9. Işıktaki yetiştirilen 50 µM SMZ bitkisine ait *ACTIN2* PZR jel görüntüsü. Her bir kuyucuk numarası resim üzerine yazılmıştır. Kuyucuk 2-7 SMZ'li grup (1-DNA Ladder, 2-karanlıktaki 96. saat, 3-6. saat, 4 -12. saat, 5- 24. Saat, 6-48. saat ve 7-72. saat).

#### 4.4. Gen Anlatım Çalışmaları

Çalışmada, SLs biyosentezinde görevli *MAX4* ve SLs algılamasında görevli *D14* gen anlatımları üzerine DNA metilasyonun etkisi araştırılmıştır. *MAX4* bitkilerin kök ucunda ve korteksinde anlatıma uğrayan bir karotenoid cleavage enzimidir (Gomez-Roldan ve ark., 2008; Umehara ve ark., 2008). *D14* geni ise  $\alpha/\beta$ - Hidrolaz süper ailesinin bir üyesi

olup reseptör görevi yapar (Arite ve ark., 2009). SLs biyosentezinde ve sinyalinde görevli olan bu genlerin anlatımlarının incelenmesi için Taqman problemleri ile kantitatif PZR kurulmuştur. Çalışmada bitkiler MS0 ve 50  $\mu$ M SMZ ilave edilmiş MS besin ortamlarında yetiştirilmiş olup, SLs biyosentezi ışık ile kontrol edilmiştir. Çalışmada bitkilere DNA metilasyonunu inhibe edecek miktarda SMZ uygulanmıştır (Zhang ve ark., 2012). Gen anlatım çalışmalarına 48. saat istatistiksel açıdan güvenilir olmadığı için dahil edilmemiştir.



Şekil 4.10. MAX4 geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları

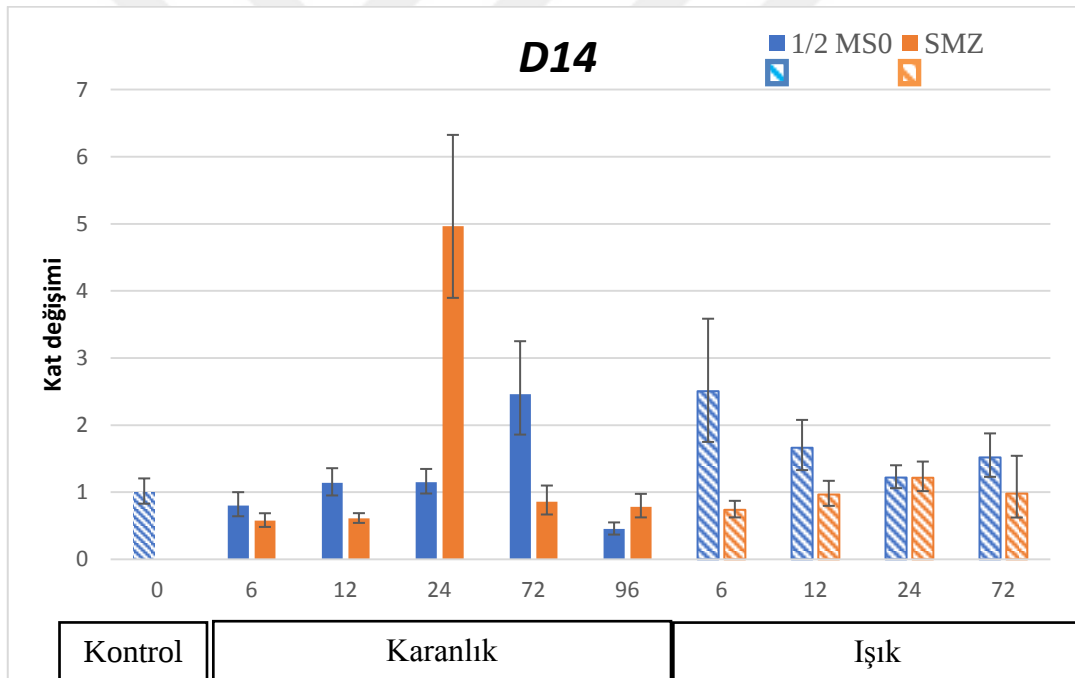
MAX4 geninin *A. thaliana* bitkisinde karanlıkta ve ışııkta kalan farklı saat diliminde gen anlatımı incelenmiştir. Çalışmada *A. thaliana* bitkileri MS0 besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınmıştır. Daha sonra, kültürün 6, 12, 24, 72 ve 96. saatlerinde örnekler toplanmıştır. MS0 besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınan bitkilerde MAX4 gen anlatımı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilk 24 saat boyunca sabit kalmıştır. Bu genin anlatımı 72. saatte yükselmiş, fakat 96. saatte ise düşmüştür (Şekil 4.10). İçerisine 50  $\mu$ M SMZ eklenmiş MS besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınmış bitkilerde ise MAX4 geninin anlatımı bitkilerin karanlığa alınmalarından 24 saat sonra artmış olup, 96. saatte en yüksek seviyelere ulaşmıştır (Şekil 4.10).

Çalışmada MAX4 gen anlatımı üzerine ışığın ilk 24 saat içerisinde bir etkisinin olmadığı bu genin anlatımının düşük kaldığı görülmüştür. Fakat her iki besin ortamında

kültüre alınan bitkilerde ışık uygulamasının 72. saatinde *MAX4* gen anlatımının aniden yükseldiği bulunmuştur (Şekil 4.10).

Liu ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları bir çalışmada ışık altında *A. thaliana* bitkisinde SLs'nin yanal kök gelişimini inhibe ettiği ve bunun sonucunda kök uzamasında artış olduğu görülmüştür ve köklerde olan bu artışın fazla SLs birikimine neden olduğu anlaşılmıştır. Böylece ışığın SLs seviyeleri üzerinde pozitif bir etki gösterdiği bildirilmiştir (De Simone ve ark., 2000).

*MAX4* geni bitkilerde sürgün dallanmasını kontrol eder. Rasmussen ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları bir çalışmada çimlenmeden 5 gün sonra ışığa aktarılan hipokotillerdeki hücrelerin kökleri uyararak SLs biyosentezini başlattığı bilinmektedir. SLs biyosentez geni olan *MAX4* geninin ifadesinde artış olduğu görülmüştür ve bu genin ışık hassasiyetine sahip olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.11. *D14* geninin gerçek zamanlı PZR sonuçları

*D14* geninin *A. thaliana* bitkisinde karanlıkta ve ışıktaki farklı saat diliminde gen anlatımı incelenmiştir. Karanlıkta kalan MS0 ve SMZ içeren besin ortamlarında geliştirilen bitkilerden 6, 12, 24, 72 ve 96. saatlerde örnekler toplanmıştır.

MS0 besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınan bitkilerde *D14* gen anlatımı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilk 24 saat boyunca sabit kalmış olup, bu genin anlatımı 72. saatte yükselmiş 96. saatte ise tekrar düşmüştür (Şekil 4.11). İçerisine 50  $\mu$ M SMZ

eklenmiş MS besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınmış bitkilerde ise ilk 12 saatte *D14* gen anlatımı sabit kalmış olup, 24. saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

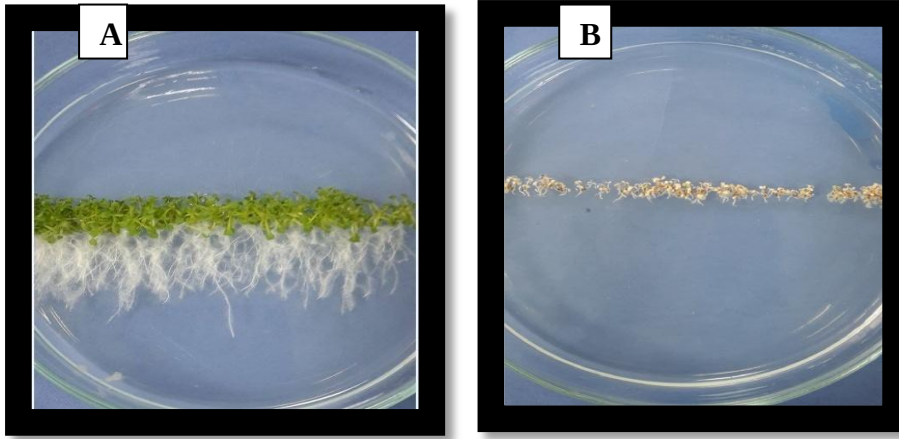
Çalışmada bitkiler çimlenme sonrasında 7 gün boyunca karanlıkta bekletilmiş olup daha sonra ışığa alınmıştır. MS0 besin ortamlarında kültüre alınan bitkilerin ışığa transferleri sonrasında *D14* gen anlatımının 6. saatte yüksek olduğu, fakat sonraki saatlerde anlatımın düşerek sabit kaldığı görülmüştür. Her iki besin ortamında kültüre alınan bitkilerde ışık uygulamasının 12, 24 ve 72. saatlerinde *D14* gen anlatımının sürekli sabit kaldığı ve değişmediği bulunmuştur.

*D14* genin çeltik bitkisinde sürgün dallanmasını inhibe ettiği görülmüştür. Karanlıkta bekletilen çeltik bitkisinde sürgün sayısında artışlar gözlenmiştir. Bu yüzden SLs sentezleyemediği veya algılama ve sinyalizasyonda mutasyonlar meydana geldiği görülmüştür (Arite ve ark., 2009; Lin ve ark., 2009).

*A. thaliana* bitkisinin yapraklarında ve yaprak saplarında *D14* gen anlatımının yüksek olduğu fakat koltuk altı tomurcuklarında ve köklerde ise anlatımının düşük olduğu görülmüştür. Koltuk altı tomurcuklarının yüksek ışık koşullarında *D14* geninin anlatımı incelenmiştir. Tomurcuk gelişiminin durdurulmasında SLs geninin anlatımının yüksek olduğu gösterilmiş ve buda SLs sinyal iletiminde değişikliklere yol açmıştır. *D14* geni SLs sinyal iletiminde bir baskılayıcı olarak işlev görür ve bozunması tomurcuk büyümesini baskılar. SLs tomurcuğun fazla büyümesini inhibe etmektedir. Tomurcuk gelişiminin düşük olmasında SLs geninin anlatımının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Chevalier ve ark., 2014).

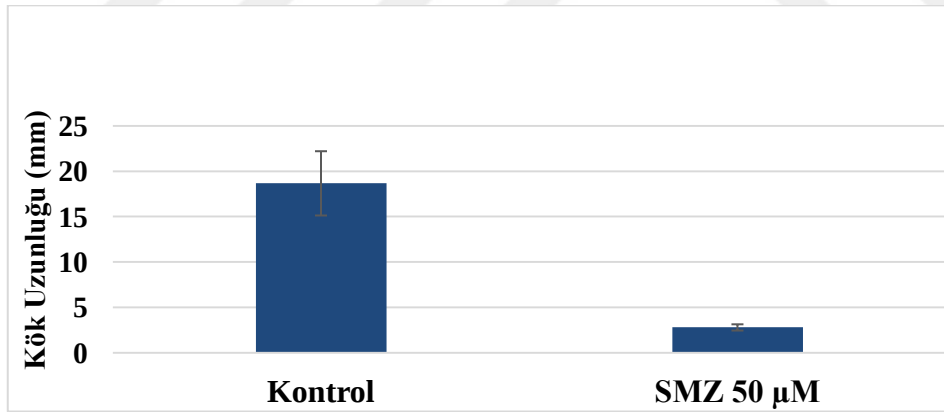
#### **4.5. SMZ'nin Bitki Gelişimi Üzerine Etkileri**

Tohumlar 21°C' de, fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan büyüme kabininde bırakılarak 5 gün içinde çimlenmesi sağlanmıştır. Bitkilerin 15 gün içerisinde gelişimleri incelenmiş ve 15 günlük fidelerin kök boyları dijital bir kumpas ile ölçülmüş ve yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. MS0 ve 50 µM SMZ ortamlarına ekimi yapılan 50 bitkinin kök boylarının ölçümü ve 100 bitkinin yaş ağırlıkları istatistiksel olarak incelenmiştir.



Şekil 4.12.A: *A. thaliana* MS0, B: *A. thaliana* 50µM SMZ (15 günlük fideler)

SMZ'nin bitki gelişimi üzerine etkileri incelenmiş olup petri kaplarındaki bitkilerin kök gelişimleri incelenmiştir. Petri kaplarındaki bitkilerin sürgün ve yaprakları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50 µM SMZ'nin gelişime engel olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte yaprak renginde sararmalar meydana gelmiştir. Bitkilerin kök boyları da benzer şekilde SMZ'nin etkisi ile azalmıştır. Bu sonuçlar 50 µM SMZ'nin toksik etki göstermesinden dolayı bitki gelişiminin yavaşladığını işaret etmiştir.



Şekil 4.13.A. *thaliana* bitkisine SMZ uygulamasının kök boylarına etkisi

Bitkilerdeki kök boylarının sonuçları, kontrol ve 50 µM SMZ uygulanmış bitkilerdeki kök boylarına ait ölçümlere T testi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görülmüştür.  $P = 3E-35$  (Şekil 4.13).

*A. thaliana* bitkisinde 50 bitkinin kök boyları karşılaştırıldığında kontrol grubu ile 50 µM SMZ içeren bitki grubunun istatistiksel analizi sonucunda bulunan P değeri  $P \leq 0,05$  olduğu belirlenmiştir. Yaş ağırlıkları ise sırası ile 0,659 g ve 0,025 g olarak kaydedilmiştir.

## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkilerde sürgün ve kök dallanmasını düzenleyerek bitki mimarisini kontrol eden SLs, kimyasal yapısı karotenoid kökenli terpenoid laktonlardan olanyeni keşfedilmiş bir bitki hormonudur (Brewer ve ark., 2013).

Bu çalışmada, *A. thaliana* bitkisinde SLs biyosentezinde görevli *MAX4* ve sinyal iletiminden sorumlu *D14* genlerinin anlatımları üzerine bir DNA metilasyon inhibitörü olan SMZ'nin etkisi ortaya çıkarılmıştır. Buna göre, bu genlerin DNA Metilasyonu varlığında ve yokluğunda farklı saat dilimlerinde hasat edilen bitkilerin anlatımları Real Time PZR ile incelenmiştir.

Bitkilere ait tohumlar ilk olarak +4 °C'de 2 gün süre ile bekletilmiş ve ardından çimlenmeleri için büyüme kabinine aktarılmıştır. Büyüme kabininde 5 gün çimlenmeden sonra, karotenoid biyosentezini durdurmak için bitkiler karanlığa alınarak 7 gün süre ile etiyole edilmiştir. Karotenoid biyosentezi ışığa bağlı olduğu öncesinde bildirilmiştir (Cazzonelli ve ark., 2009b; Mayzlish-Gati ve ark., 2012). Çalışmada kültürün 8. gününden itibaren bitkiler farklı besin ortamlarında ışığa transfer edilmiş ve böylece SLs biyosentezine eş zamanlı olarak başlamaları sağlanmıştır.

MS0 besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınan bitkilerde *MAX4* gen anlatımının 72. saatte en yüksek seviyede olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 kat arttığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.10). En düşük gen anlatımının ise bitkilerin karanlığa alındığı ilk 6. saatte olduğu anlaşılmıştır. SMZ uygulaması ile karanlıkta kültüre alınan bu bitkilerde *MAX4* gen anlatımı 96. saatte en yüksek seviyede olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 kat fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.10).

Çalışmada bitkiler karotenoid biyosentezini durdurmak için 7 gün boyunca karanlıkta bekletilmiş olup daha sonra ışığa transfer edildiklerinde; *MAX4* geni MS0 besin ortamlarında kültüre alınan bitkilerde 72. saatte kontrole göre 6 kat artarken, içerisinde 50 µM SMZ içeren besin ortamlarındaki bitkilerde kontrole göre 4 kat arttığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.10).

Çalışmada, karanlıkta kültüre alınan bitkilerde *MAX4* gen anlatımının SMZ uygulaması ile arttığı ortaya çıkarılmıştır. Metilasyon yokluğunda gen anlatımı yükselmiştir. Böylece DNA metilasyonunun SLs biyosentezi üzerine etki gösterdiği anlaşılmıştır. Işığa transfer edildiklerinde ise, ışığın etkisi SMZ'yi baskılamıştır.

Karanlıkta SLs biyosentezi durduğu için anlatımın durması beklenmiştir fakat

SMZ'nin etkisi ile anlatım artmaya devam etmiştir. Böylece bitkiler karanlıkta durduğu sürece SMZ'nin biyosenteze pozitif etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

*D14* geni, SLs için bir sinyal bileşenidir ve bir reseptör görevi yapar. MS0 besin ortamlarında karanlıkta kültüre alınan bitkilerde *D14* gen anlatımının 72. saatte en yüksek seviyede olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1,5 kat arttığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.10). En düşük gen anlatımı ise 96. saatte olduğu görülmüştür. SMZ uygulanmış bitkilerde *D14* gen anlatımı 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 kat fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.11).

Çalışmada bitkiler karotenoid biyosentezini durdurmak için 7 gün boyunca karanlıkta bekletilmiş olup daha sonra ışığa transfer edildiklerinde; *D14* geni MS0 besin ortamlarında kültüre alınan bu bitkilerde 6. saatte kontrole göre 1,5 kat artarken, içerisinde 50  $\mu$ M SMZ içeren besin ortamlarındaki bitkilerde kontrol ile aynı seviyelerde kaldığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.11). *D14* gen anlatımı üzerine ilk 6. saatte ışığın etkili olup gen anlatımının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bitkilerin ışığa ilk transferinde sinyal iletiminin artmış olduğu düşünülmektedir, sonrasında ise sabit kalmıştır.

Çalışmada, karanlıkta kültüre alınan bitkilerde *D14* gen anlatımının SMZ'nin etkisi ile 24. saatte en yüksek seviyede olduğu sonucuna varılmıştır. *D14* geninin algılama için ilk 24 saatin yeterli olunabileceği düşünülmüştür.

SMZ'nin sinyal iletimini arttırarak pozitif etki gösterdiği ve bundan dolayı da DNA metilasyonunu SLs sinyali üzerine etki gösterdiği anlaşılmıştır.

İçerisine 50  $\mu$ M SMZ eklenmiş ve karanlıkta kültüre alınan bitkilerde *MAX4* ve *D14* genlerinin anlatımlarının daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. *MAX4* ve *D14* genlerinin her ikisinde de ışığın etkisi SMZ'yi baskılamıştır. DNA metilasyonunun olmaması ışığın pozitif etkisini kaldırmıştır. SMZ'nin, DNA metilasyon seviyelerini düşürerek epigenetik susturmayı ortadan kaldıran bir kimyasal olduğu bilinmektedir (Zhang ve ark., 2012). DNA metilasyon seviyelerinin düşmesinin nedeni, SMZ'nin folat sentezinde kullanılan metil kaynağını azaltmasıdır. SMZ uygulandığında DNA metilasyonu ortadan kalkmıştır. DNA metilasyonu olmadığında *MAX4* ve *D14* genlerinin anlatımı daha yüksektir. Bu sonuçlara göre SMZ'nin SLs biyosentezi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır.

Çalışma sonucunda, SLs biyosentezini kontrol eden mekanizmalar hakkında bilgi sahibi olunmuştur. SLs biyosentezinin DNA metilasyon inhibitörü olan SMZ ile kontrol edilmesi sayesinde ise bitki yetiştirme açısından yeni yaklaşımların getirilmesine olanak sağlanacaktır. SMZ bitkilere uygulandığında bitkilerin dallanma ve kök gelişimlerinde olumsuz etkiler yarattığı, DNA metilasyonunun ortadan kalkması ile bitki

gelişimini yavaşlattığı görülmüştür. SLs sinyal yolağı bahçecilik uygulamaları için modifiye edilebilecektir. Çalışmanın SLs üreten bitkilerin gelişimlerinin incelenmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Akiyama K., Ogasawara S., Ito S., Hayashi H., 2010. Structural Requirements of Strigolactones for Hyphal Branching in AM Fungi. *Plant and Cell Physiology*, 51 (7): 1104-1117.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S., 2012. The Path from  $\beta$ -carotene to Carlactone, a Strigolactone-like Plant Hormone. *Science*, pp. 1348-1351.
- Arite T., Umehara, M., Ishikawa, S., Hanada, A., Maekawa, M., Yamaguchi, S., Kyozuka, J., 2009. D14, A Strigolactone-Insensitive Mutant Of Rice, Shows an Accelerated Out Growth Of Fillers. *Plant Cell Physiol.* 50: 1416-1424.
- Booker J., Auldridge M., Wills S., McCarty D., Klee H., Leyser O., 2004. MAX3/CCD7 is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a novel Plant Signaling Molecule. *Current. Biology*. 14:1232–1238.
- Booker J., Sieberer T., Wright W., Williamson L., Willet B., Strinberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P., Leyser O., 2005. MAX1 Encodes a Cytochrome P450 Family Member that Acts Downstream of MAX3/4 to Produce a Carotenoid-Derived Branch-Inhibiting Hormone, *Developmental Cell*, 8: 443–449.
- Bouwmeester H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., and Beale, M.H., 2003. Secondary Metabolite Signalling in Host-parasitic Plant Interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 358–364.
- Boyer F.D., de Saint Germain A., Pillot J.P., Pouvreau J.B., Chen V.X., Ramos S., Stévenin A., Simier P., Delavault P., Beau J.M., Rameau C., 2012. Structure-activity Relationship Studies of Strigolactone-related Molecules for Branching Inhibition in Garden Pea: Molecule Design for Shoot Branching. *Plant Physiol.*, 159: 1524–1544.
- Brewer P.B., Koltai H., Beveridge C.A., 2013. Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development, *Molecular Plant*, 6 (1): 18-28.
- Butler L.G., 1995. Chemical Communication between the Parasitic weed *Striga* and its crop host. A new dimension in Allelochemistry. In K Inderjit, FA Einhellig, eds, *Insights into Allelopathy*, ACS Symposium Series. ACS Books, Washington,

DC.,pp. 158–168.

- Cardoso C., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H.J., 2011. Strigolactones and Root Infestation by Plant-parasitic *Striga*, *Orobanchaceae* and *Phelipanche* spp. *Plant Sci.*, 180 (3):414–420.
- Cazzonelli C.I., Cuttriss A.J., Cossetto S.B., Pye W., Crisp P., Whelan J., Finnegan E.J., Turnbull C., Pogson B.J., 2009. Regulation of Carotenoid Composition and Shoot Branching in *Arabidopsis* by a Chromatin Modifying Histone Methyltransferase, SDG8. *The Plant Cell Online*, 21 (1): 39-53.
- Cazzonelli C.I., Yin K., Pogson B.J., 2009b. Potential Implications for Epigenetic Regulation of Carotenoid Biosynthesis During Root and Shoot Development, *Plant Signaling & Behavior*, 4 (4): 339-341.
- Chevalier F., Nieminen K., Sanchez-Ferrero J.C., Rodriguez M.L., Chagoyen M., Hardtke C.S., Cubas P., 2014. Strigolactone Promotes Degradation of DWARF14, an  $\alpha/\beta$  Hydrolase Essential for Strigolactone Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26 (3): 1134-1150.
- Cook C.E., Whichard L.P., Wall M.E., Egley G.H., Coggon P., Luhan, P. A., McPhail A.T., 1972. Germination Stimulants. II. Structure of *Strigol*, a Potent Seed Germination Stimulant for witchweed (*Striga lutea*). *Journal American Chemical Society*. 94: 6198–6199.
- Cook C.E., Whichard L.P., Turner B., Wall M.E., Egley G.H., 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*. 154: 1189–1190.
- De Saint Germain A., Clavé G., Badet-Denisot M.A., Pillot J.P, Cornu D., Le Caer J.P., Burger M., Pelissier F., Retailleau P., Turnbull C., Bonhomme S., Chory J., Rameu C., Boyer F.D., 2016. An Histidine Covalent Receptor and Butenolide Complex Mediates Strigolactone Perception. *Nat Chem Biol.*, 12:787-794.
- De Simone S., Oka Y., Inoue Y., 2000. Effect of Light on Root Hair Formation in *Arabidopsis thaliana* Phytochrome Deficient Mutants. *J Plant Res.* 113(1109):63-69.
- Finnegan E.J., Peacock W.J., Dennis E.S., 2000. DNA Methylation, a Key Regulator of Plant Development and Other Processes. *Current Opinion in Genetics*

- &Development, 10 (2): 217-223.
- Finnegan E.J., Kovac K.A., 2000. Plant DNA Methyltransferases. *Plant Mol. Biol.*,43:189-201.
- Flematti G.R., Ghisalberti E.L., Dixon K.W., Trengove R.D., 2004. A Compound from Smoke that Promotes Seed Germination. *Science*, 305 (5686): 977-977.
- Gao Z., Qian Q., Liu X., Yan M., Feng Q., Dong G., Liu J., Han B. 2009. Dwarf 88, a Novel Putative Esterase Gene Affecting Architecture of Rice Plant. *Plant Mol. Biol.*,71: 265–276.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P.B., Puech-Pagès V., Dun E.A., Pillot J.P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Shukla Portais J.C., Bouwmeester H., Becard G., Beveridge C.A., Rameu C., Rochange S.F., 2008. Strigolactone Inhibition of Shoot Branching. *Nature*455: 189–194.
- Hanson A.D., and Gregory III, J.F., 2011. Folate Biosynthesis, Turn Over, and Transport in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62: 105–125.
- Hauck C., Muller S., Schildknecht H., 1992. A Germination Stimulant for Parasitic Flowering Plants from Sorghum-Bicolor, a Genuine Host Plant , *Journal of Plant Physiology*, 139 (4): 474-478.
- Hoffmann B., Proust H., Belcram K., Labrune C., Boyer F-D., Rameau C., Bonhomme S., 2014. Strigolactones Inhibit Caulonema Elongation and Cell Division in the moss *Physcomitrella Patens*. *PLoS ONE* 9 (6): 99-206.
- Howitt C.A., Pogson B.J., 2006. Carotenoid Accumulation and Function in Seeds and non-green Tissues.*Plant Cell Environ.* 29:435–445
- Hu Z., Yan H., Yang J., Yamaguchi S., Maekawa M., Takamure I., Tsutsumi N., Kyojuka J., Nakazono M., 2010. Strigolactones Negatively Regulate Mesocotyl Elongation in Rice During Germination and Growth in Darkness. *Plant Cell Physiol.* 51: 1136-1142.
- Ishikawa S., Maekawa M., Arite T., Onishi K., Takamure I.,Kyojuka J., 2005. Suppression of Tiller Bud Activity in Tillering Dwarf Mutants of Rice. *Plant Cell Physiol.* 46:79–86.

- Ito S., Ito K., Abeta N., Takahashi R., Sasaki Y., Yajima S., 2016. Effects of Strigolactone Signaling on *Arabidopsis* Growth under Nitrogen Deficient Stress Condition. *Plant Signal. Behav.* 11:e1126031.
- Jenuwein T., Allis C.D., 2001. Translating the Histone Code. *Science*, 293 (5532): 1074-1080.
- Joel D.M., 2009. The New Nomenclature of *Orobanch* and *Phelipanche*. *Weed Res.*, 49: 6–7.
- Kameoka H., Kyoizuka J., 2015. Down Regulation of Rice DWARF 14 LIKE Suppress Mesocotyl Elongation via a Strigolactone Independent Pathway in the Dark. *Journal of Genetics and Genomics*. 42: 119-124.
- Kapulnik Y., Delaux P.M., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Wininger S., Bhattacharya C., Sejalón-Delmas N., Combier J.P., Becard G., Belausov E., Beeckman T., Dor E., Hershenhorn J., Koltai H., 2011. Strigolactones Affect Lateral Root Formation and Root-hair Elongation in *Arabidopsis*. *Planta*. 233 (1): 209-216.
- Kloor D., Osswald, H., 2004. S-Adenosyl Homocysteine Hydrolase as a Target for Intracellular Adenosine Action. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25: 294–297.
- Kohlen W., Charnikhova T., Liu Q., Bours R., Domagalska M.A., Beguerie S., Verstappen F., Leyser O., Bouwmeester H., Ruyter-Spira C., 2011. Strigolactones Are Transported through the Xylem and Play a Key Role in Shoot Architectural Response to Phosphate Deficiency in Nonarbuscular Mycorrhizal Host *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 155 (2): 974-987.
- Koltai H., Kapulnik Y., 2011. Strigolactones as Mediators of Plant Growth Responses to Environmental Conditions. *Plant Signal Behav.* 6, 37–41.
- Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J., Wang Y., 2009. DWARF27, an Iron-containing Protein Required for the Biosynthesis of Strigolactones, Regulates Rice Tiller Bud out Growth, *Plant Cell*, 21 (5): 1512-1525.
- Liu J., Lovisolo C., Schubert A., Cardinale F., 2012. Department of Agriculture, Forestry and Food Sciences, University of Turin, via Leonardo da Vinci 44-10095.
- Liu J., Lovisolo C., Schubert A., Cardinale F., 2013. Signaling role of Strigolactones at the

- interface between Plants, (micro) Organisms, and a Changing Environment. *Journal of Plant Interactions*, 8 (1):17-33.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (4): 402-408.
- Lopez-Bucio J., Herna'ndez-Abreu E., Sa'nchez-Caldero'n L., Nieto-Jacobo M.F., Simpson J., Herrera-Estrella L., 2002. Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiol* 129: 244–256.
- Loenen W.A., 2006. S-adenosylmethionine: Jack of all trades and master of everything? *Biochem. Soc. Trans.* 34: 330–333.
- Lopez-Raez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., Gomez-Roldan V., Matusova R., Kohlen W., De Vos R., Verstappen F., Puech-Pages V., Becard G., Mulder P., Bouwmeester H., 2008. Tomato Strigolactones are Derived from Carotenoids and their Biosynthesis is Promoted by Phosphate Starvation. *New Phytol.* 178 (4): 863–874.
- Marzec M., 2016. Strigolactones as Part of the Plant Defence System. *Trends Plant Sci.* 16: 30121–30122.
- Matusova R., Rani K., Verstappen F.W.A., Franssen M.C.R., Beale M.H., Bouwmeester H.J., 2005. The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiology*, 139 (2): 920-934.
- Mayzlish-Gati E., De-Cuyper C., Goormachtig S., Beeckman T., Vuylsteke M., Brewer P.B., Beveridge C.A., Yermiyahu U., Kaplan Y., Enzer Y., Wininger S., Resnick N., Cohen M., Kapulnik Y., Koltai H., 2012. Strigolactones Are Involved in Root Response to Low Phosphate Conditions in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 160 (3): 1329-1341.
- Mayzlish-Gati E., Lekkala S.P., Resnick N., Wininger S., Bhattacharya C., Lemcoff J.H., Kapulnik Y., Koltai H., 2010. Strigolactones are Positive Regulators of Light Harvesting Genes in Tomato. *Journal of Experimental Botany*, 61 (11):312-936.
- Mishra S., Upadhyay S., Shukla R.K., 2017. The Role of Strigolactones and Their

- Potential Cross-talk under Hostile Ecological Conditions in Plants. *Front. Physiol.* 7:691.
- Monneret C., 2005. Histone Deacetylase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 40: 1–13.
- Nagahashi G., Douds D.D. Partial Separation of Root Exudate Compounds and their Effects upon the Growth of Germinated Spores of AM fungi. *Mycol. Res.* 2000;104:1453–1464.
- Pandey A., Sharma M., Girdhar K., 2016. Emerging Roles of Strigolactones in Plant Responses to Stress and Development. Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi, New Delhi, India *Plant Sci.*, 7:434.
- Patra S.K., and Bettuzzi, S. 2009. Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5 Aza-29-deoxycytidine and DNA-demethylation. *Biochemistry (Mosc.)* 74: 613–619.
- Peret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., Beeckman T., Bennett M.J., 2009. *Arabidopsis* Lateral Root Development: an emerging story. *Trends in Plant Science.* 14: 399–408.
- Pollock C. B., McDonough S., Wang V. S., Lee H., Ringer L., Li X., Prandi C., Lee R.J., Feldman A.S., Koltai H., Kapulnik Y., Rodriguez O.C., Schlegel R., Albanese C., Yarden R.I., 2014. Strigolactone Analogues Induce Apoptosis Through Activation of p38 and the Stress Response Pathway in Cancer Cell Lines and in Conditionally Reprogrammed Primary Prostate Cancer Lines and in Conditionally Reprogrammed Primary Prostate cancer cells. *Oncotarget* 5: 1683–1698.
- Rasmussen A., Mason M.G., De Cuyper C., Brewer P.B., Herold S., Agusti J., Geelen D., Greb T., Goormachtig S., Beeckman T., Beveridge C.A., 2012. Strigolactones Suppress Adventitious Rooting in *Arabidopsis* and *Pea*, *Plant Physiology*, 158 (4): 1976-1987.
- Rice J.C., Allis C.D., 2001. Gene Regulation - Code of Silence. *Nature*, 414 (6861): 258-261.
- Ruiz-Lozano J.M., Aroca R., Zamarreño A.M., Molina S., Andreo-Jiménez B., Porcell R., García-Mina J.M., Ruyter-Spira C., López-Ráez J.A., 2016. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Induces Strigolactone Biosynthesis Under Drought and Improves Drought Tolerance in Lettuce and Tomato. *Plant, Cell and Environment* 39: 441–452.

- Ruyter-Spira C., Kohlen W., Charnikhova T., Van Zeijl A., Van Bezouwen L., de Rujiter N., Cardoso C., Lopez-Raez J.A., Matusova R., Bours R., Vertappen F., Bouwmeester H., 2011. Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol.* 155(2):721-734.
- Saint Germain A., Clavé G., Badet-Denisot M.A., Pillot J.P, Cornu D., Le Caer J.P., Burger M., Pelissier F., Retailleau P., Turnbull C., Bonhomme S., Chory J., Rameu C., Boyer F.D., 2016. An Histidine Covalent Receptor and Butenolide Complex Mediates Strigolactone Perception. *Nat Chem Biol.* 12:787-794.
- Scaffidi A., Waters M.T., Sun Y.K., Skelton B.W., Dixon K.W., Ghisalberti E.L., Flematti G.R., Smith S.M., 2014. Strigolactone Hormones and their Stereoisomers Signal Through Two Related Receptor Proteins to Induce Different Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 165: 1221-1232.
- Schmittgen T.D., Livak K.J., 2008. Analyzing real-time PCR Data by the Comparative C(T) method, *Nature protocols.* 3 (6): 1101-1108.
- Shinohara N., Taylor, C. and Leyser, O. 2013. Strigolactone can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *PLoS Biol.*, 11 (1): 100-1474.
- Simons J.L., Napoli C.A., Janssen B.J., Plummer K.M., Snowden K.C., 2007. Analysis of the Decreased Apical Dominance Genes of *Petunia* in the Control of Axillary Branching. *Plant Physiol.* 143: 697–706.
- Sorefan K., Booker J., Haurogné K., Goussot M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward S., Beveridge C., Rameau C., Leyser O., 2003. MAX4 and RMS1 are Orthologous Dioxygenase Like Genes that Regulate Shoot Branching in *Arabidopsis* and *Pea*. *Genes Dev.* 17: 1469–1474.
- Stes E., Depuydt S., De Keyser, A., Matthys C., Audenaert K., Yoneyama K., 2015. Strigolactones as an Auxiliary Hormonal Defence Mechanism against leafy gall syndrome in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botanic.*, 66: 5123–5134.
- Thuring J.W.J.F., Nefkens G.H.L., Zwanenburg B., 1997. Asymmetric Synthesis of all Stereoisomers of the *Strigol* Analogue GR24. Dependence of Absolute Configuration

- on Stimulatory Activity of *Striga hermonthica* and *Orobancha crenata* Seed Germination. J. Agric. Food Chem.;45:2278–2283.
- Tsuchiya Y., Vidaurre D., Toh S., Hanada A., Nambara E., Kamiya Y., Yamaguchi S., McCourt P., 2010. A Small-molecules Screen Identifies New Functions for the Plant Hormone Strigolactone. *Nature Chemical Biology*, 6: 741–749.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kozuka J., Yamaguchi S., 2008. Inhibition of Shoot Branching by New Terpenoid Plant Hormones. *Nature* 455: 195–200.
- Waters M.T., Nelson D.C., Scaffidi A., Flematti G.R., Sun Y.K., Dixon K.W., Smith S.M., 2012. Specialisation within the DWARF14 Protein Family Confers Distinct Responses to Karrikins and Strigolactones in *Arabidopsis*. *Development* 139:1285–1295.
- Welsch R., Beyer P., Hugueney P., Kleinig H, von Lintig J., 2000. Regulation and Activation of Phytoene Synthase, a Key Enzyme in Carotenoid Biosynthesis, During Photomorphogenesis. *Planta*. 211:846-854.
- Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Akiyama K., Asami T., Yoneyama K., 2015. Strigolactones are Transported from Roots to Shoots, Although not Through the Xylem. *J. Pestic. Sci.* 40 (4): 214–216.
- Xie X.N., Yoneyama K., Harada Y., Fusegi N., Yamada Y., Ito S., Yokota T., Takeuchi Y., Yoneyama K., 2009. Flabacyl Acetate, a Germination Stimulant for Root Parasitic Plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 70 (2): 211-215.
- Yamada Y., Furusawa S., Nagasaka S., Shimomura K., Yamaguchi S., Umehara M., 2014. Strigolactone Signaling Regulates Rice Leaf Senescence in Response to a Phosphate Deficiency. *Planta*. 240: 399-408.
- Yoneyama K., Kisugi T., Xie X., Yoneyama K., 2013. Chemistry of Strigolactones: Why and How do Plants Produce so Many Strigolactones?, In FJ de Bruijn ed *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*: NJ, pp. 373-379.
- Zayas-Blanco F, García-Falcón MS, Simal-Gándara J., 2004. *Food Control* 15:375.

- Zhang H., Deng X., Miki D., Cutler S., La H., Hou Y.J., Oh J., Zhu J.K., 2012. Sulfamethazine Suppresses Epigenetic Silencing in *Arabidopsis* by Impairing Folate Synthesis, *Plant Cell*, 24 (3): 1230-1241.
- Zhang H., Zhu J.K., 2011. RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 142-147.
- Zhang Y., Van Dijk A.D., Scaffidi A., Flematti G.R., Hofmann M., Charnikhova, T., Vertappen F., Hepworth J., van der Krol S., Leyser O., Smith S.M., Zwanenburg B., Al-Babili S., Ruyter-Spira C., Bouwmester H.J., 2014. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nature Chemical Biology*. 10: 1028–1033.
- Zhao L.H., Zhou X.E., Wu Z.S., Yi W., Xu Y., Li S.L., Xu T.H., Liu Y., Chen R.Z., Kovach A., Kang Y.Y., Hou L., He Y.Z., Xie C., Song W.L., Zhong D.F., Xu Y.C., Wang Y.H., Li J.Y., Zhang C.H., Melcher K., Xu H.E., 2013. Crystal Structures of two Phytohormone Signal-transducing  $\alpha/\beta$  Hydrolases: Karrikin-signaling KAI2 and Strigolactone-signaling DWARF14, *Cell Res*, 23 (3): 436-439.
- Zhou F., Lin Q., Zhu L., Ren Y., Zhou K., Shabek N., Wu F., Mao H., Dong W., Gan L., Ma W., Gao H., Chen J., Yang C., Wang D., Tan J., Zhang X., Guo X., Wang J., Jiang L., Liu X., Chen W., Chu J., Yan C., Ueno K., Ito S., Asami T., Cheng Z., Wang J., Lei L., Zhai H., Wu L., Wang H., Zheng N., Wan J., 2013. D14-SCF (D3)-Dependent Degradation of D53 Regulates Strigolactone Signalling. *Nature*, 504: 406-410.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Özge EROĞLU

Doğum Yeri: Çanakkale

Doğum Tarihi: 24/05/1991

## EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,

Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2014-2017).

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

## BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Eroğlu Ö., Taşkın K.M., 2017.Strigolakton Biyosentezi Üzerine DNA Metilasyonunun Etkilerinin İncelenmesi II. Yaşam Bilimleri Kongresi 23-25 Şubat, 2017. Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye (Poster).

Eroğlu Ö., Taşkın K.M.,Özbilen A., 2015. Apomikt ve Seksüel *Boechera* Türleri Genomlarında SUVH Histon Metiltransferaz Genlerinin Karakterize Edilmesi18. Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık, 2015. Dedeman Hoteli, Konya, Türkiye (Poster).

## İLETİŞİM

E-posta Adresi: ozge\_\_eroglu@hotmail.com