

**SEÇİLMİŞ YEREL BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ VE
ÇİNKO UYGULAMASININ BAZI ENZİM GENLERİNİN
İFADE DÜZEYİNE OLAN ETKİSİ**

**COMPARATIVE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF
SELECTED LOCAL WHEAT VARIETIES AND EFFECTS
OF ZINC TREATMENT ON EXPRESSION LEVELS OF
SOME ENZYME GENES**

AYŞEGÜL BİLGE UĞUZ

PROF. DR. REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

SEÇİLMİŞ YEREL BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ VE ÇİNKO UYGULAMASININ BAZI ENZİM GENLERİNİN İFADE DÜZEYİNE OLAN ETKİSİ

Ayşegül Bilge UĞUZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Eş Danışman: Dr. Ayten SALANTUR

Nisan 2022, 115 sayfa

Buğday, tarımı kolay, verimi yüksek bir tahıl ürünüdür ve değişik iklim ve toprak şartlarına uyum sağlayabilmesi nedeni ile dünyada pek çok yerde yetiştirilmektedir. Artan nüfus talebini karşılamak için diğer bitkisel ürünlerde olduğu gibi buğday üretimi de artmak durumundadır. Bununla birlikte, son yıllarda “sağlıklı gıda” eğiliminin oluşması nedeniyle buğday çeşitlerinde antioksidan ve flavonoid biyosentezinin moleküler temelini anlaşılmaması önem arz etmektedir. İlgili biyosentez mekanizmasını anlamak için genomik, transkriptomik gibi omik teknolojiler kullanılarak araştırma yaklaşımı desteklenmektedir.

Dünya genelinde iki milyardan fazla insanda "gizli açlık" görülmektedir. Gizli açlık için önemli olan mikro gıda bileşenleri, hem bitki hem de insan gelişimi için gerekli olan temel mineral elementlerdir. Günümüzde özellikle gelişmekte olan ülkelerde görülen gizli açlıkla mücadele edebilmek için, kolay erişilebilir olan ve günlük diyetin büyük çoğunluğunu oluşturan pirinç, buğday ve mısır gibi temel gıdaların üretimi sırasında fortifikasyon ve/veya biyofortifikasyon uygulamaları yapılmaktadır. Çinko (Zn)

eksikliği, bitkilerde verim ve besin kalitesinin düşmesine neden olan iyi bilinen bir sorundur. Zn arzında bir kıtlıkla karşı karşıya kalındığında, bitkiler Zn alımını artırarak iklime uyum sağlar. Son yıllarda, Zn eksikliğine karşı bitki direncinin daha iyi anlaşılması söz konusu olmakla birlikte, bitkilerin Zn kullanım verimliliğindeki genotipik varyasyonlar ve antioksidan ve flavonoid biyosentezine etkisi konusu önemli görünmektedir.

Bu tez çalışması ile seçilen yerel buğday genotiplerinde antioksidan enzim genleri Süperoksit Dismutaz (*SOD*) ve Katalaz (*CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genleri Fenilalanin Amonyum Liyaz (*PAL*) ve Kalkon Sentaz (*CHS*)'ın ifade düzeyleri ve ayrıca bu anahtar enzim genlerinin aynı örneklerde yapraktan çinko biyofortifikasyonu ile ifade düzeylerindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle yerel buğday genotipleri belirlenmiş ve bu genotiplerin antioksidan kapasiteleri daha önceki çalışmalarda QUENCER (QUick, Easy, New, CHEap ve Reproducible) hızlı antioksidan testlerinden olan ABTS testi ile belirlenmiştir. Daha sonra yerel buğday genotipleri çimlendirilerek iki farklı saksı denemesi kurulmuş, bir saksı denemesinde yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmıştır. Buğday yaprakları yirmi günlük yetişkinliğe ulaştıklarında hasat edilerek ivedilikle RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri ileri gen ifade analizlerinde kullanılmıştır. Bunun için öncelikle ticari buğday çeşitleri (Demir 2000 ve Eminbey)'den elde edilen cDNA örnekleri ve antioksidan enzim genleri (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genleri (*PAL* ve *CHS*) kullanılarak RT-PCR analizleri için optimizasyon gerçekleştirilmiş ve standart eğriler elde edilmiştir. Bu aşamanın ardından seçilen bütün buğday genotiplerinde RT-PCR analizleri ile gen ifade düzeyleri ölçülmüştür. Bundan sonra istatistiksel analizler ile karşılaştırmalı değerlendirmeler verilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada transkriptomik analiz yaklaşımı ile yerel çeşit buğday genotiplerinde antioksidan enzim ve flavonoid biyosentez enzim genlerinde genotip farklılığına bağlı olarak aktivite değişiklikleri ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, yapraktan Zn uygulaması ile söz konusu genlerin ifade profilindeki değişimin dağılımı ortaya konmuştur. Çalışma, daha önce antioksidan kapasitesi ve ilgili genlerin ifade düzeyleri üzerine sıklıkla çalışmalar yapılmış olan *Triticum aestivum* genotiplerinin yanı sıra yerel *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum*, *Triticum durum* ve *Triticum*

spelta genotiplerini de içermesi sebebiyle önem taşımakta ve belirtilen genotiplerde yapılacak ileri çalışmalar için kaynak oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Buğday, Gen ifadesi, Flavonoid biyosentez enzim genleri, Antioksidan enzim genleri, Çinko biyofortifikasyonu



ABSTRACT

COMPARATIVE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF SELECTED LOCAL WHEAT VARIETIES AND EFFECTS OF ZINC TREATMENT ON EXPRESSION LEVELS OF SOME ENZYME GENES

Ayşegül Bilge UĞUZ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Co- Supervisor: Dr. Ayten SALANTUR

April 2022, 115 pages

Wheat is an easy-to-cultivate, high-yielding cereal product and is grown in many places in the world due to its adaptability to different climatic and soil conditions. In order to meet the increasing population demand, wheat production has to increase as in other plant products. However, it is important to understand the molecular basis of antioxidant and flavonoid biosynthesis in wheat varieties due to the "healthy food" trend in recent years. The research approach is supported by using omics technologies such as genomics and transcriptomics to understand the relevant biosynthesis mechanism.

More than two billion people worldwide suffer from "hidden hunger". Micronutrient components which are important for hidden hunger are essential mineral elements necessary for both plant and human development. Fortification and/or biofortification applications are made during the production of basic foods such as rice, wheat and corn, which are easily accessible and make up the majority of the daily diet, in order to combat the hidden hunger seen especially in developing countries today. Zinc (Zn)

deficiency is a well-known problem that causes reduced yield and nutritional quality in plants. When faced with a shortage of Zn supply, plants adapt to the climate by increasing their Zn uptake. In recent years, although there has been a better understanding of plant resistance to Zn deficiency, genotypic variations in plants' Zn utilization efficiency and its effect on antioxidant and flavonoid biosynthesis seem important.

In this study, it was aimed to investigate the expression levels of the antioxidant enzyme genes Superoxide Dismutase (*SOD*) and Catalase (*CAT*) and the flavonoid biosynthesis enzyme genes Phenylalanine Ammonium Lyase (*PAL*) and Chalcone Synthase (*CHS*) in the local wheat genotypes selected. In addition, it was aimed to investigate the changes in the expression levels of these key enzyme genes in the same samples by foliar zinc biofortification. For this purpose, first of all, local wheat genotypes were determined and the antioxidant capacities of these genotypes were analyzed by ABTS test, which is one of the rapid antioxidant tests of QUENCER (Quick, Easy, New, CHEap and Reproducible). Then, local wheat genotypes were germinated and two different pot trials were established, and foliar zinc biofortification was applied in one pot trial. Wheat leaves were harvested 20 days after planting, and RNA isolation and cDNA synthesis were performed immediately. Obtained cDNA samples were used in further gene expression analysis. For this, first of all, cDNA samples obtained from commercial wheat varieties (Demir 2000 and Eminbey) and antioxidant enzyme genes (*SOD* and *CAT*) and flavonoid biosynthesis enzyme genes (*PAL* and *CHS*) were used for optimization for RT-PCR analyzes and standard curves were obtained. After this step, gene expression levels were analyzed by RT-PCR analyzes in all selected wheat genotypes. After that, statistical analyzes and comparative evaluations are given.

As a result, in this study, activity changes in antioxidant enzyme and flavonoid biosynthesis enzyme genes in local wheat genotypes were revealed for the first time with the transcriptomic analysis approach, depending on the genotype difference. In addition, the distribution of the change in the expression profile of these genes with foliar Zn application was revealed. The study is important because it includes the local *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum*, *Triticum durum* and *Triticum spelta* genotypes, as well as the *Triticum aestivum* genotypes, which have been frequently

studied on the antioxidant capacity and expression levels of the related genes, and constitutes a source for further studies to be made in the specified genotypes.

Keywords: Wheat, Gene expression, Flavonoid biosynthesis enzyme genes, Antioxidant enzyme genes, Zinc biofortification



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana farklı bakış açıları kazandıran, daha büyük sorumluluklar alıp kendime daha çok güvenmemi sağlayan, bir görevi yerine getirmenin ve bir işi analiz etmenin bütün inceliklerini bana öğreten, karşılaştığım sorunlarda bana yol gösteren ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren, eğitim hayatının yanı sıra fikir ve bakış açıları ile ufkumu açan, öğrencisi olduğum için büyük mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a ve yine engin bilgilerini benimle paylaşan, çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen, bana yol gösteren, her zaman yanımda olduğunu hissettiren, öğrencisi olduğum için büyük mutluluk duyduğum değerli eş danışman hocam Dr. Ayten SALANTUR'a,

Erasmus+ Dünya Uluslararası Kredi Hareketliliği Programı (KA107) kapsamında "Seçilen Yerel Buğday (*Triticum* spp.) Çeşitlerinde Bazı Biyoaktif Bileşenlerin Tanımlanması ve Karakterizasyonu" başlıklı Mevlana projesinin bir parçası olarak çalışmalarımızı yürütmek üzere ikinci ders dönemimde gittiğim Michigan State Üniversitesinde danışmanım olan, engin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve tez konumun belirlenmesi sürecinde destek olan Prof. Dr. Muraleedharan NAIR'e

Yüksek lisans sürecimde bana desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ümran UYGUN'a,

Tez sürecim boyunca bilgi birikimlerini ve ekipmanlarını bizimle paylaşan Humen CEBBARI başta olmak üzere BMLab çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, yardımcı olmak için vaktini ayıran ve her durumda kendilerine rahatça danışabileceğimi hissettiren Prof. Dr. Metin ERDOĞAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresine sağladığı manevi ve teknik destekten dolayı Uz. Meltem YILDIRIM'a,

Güzel arkadaşlıklarını ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, tez çalışmaları süresince yaşadığım zorluklarda bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum ekip arkadaşlarım Muhammad Usman AKRAM, Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI, Sena ÇAKIR, Elif Bircan MUYANLI, Yeşim TAŞKIN ve Beyza SAYMAN'a ve dönem arkadaşım Fatma SAZAK'a,

Yaşadığım her hayat deneyiminde seçtiğim her yolda yanımda olan ve yanımda olacağını hissettiren, beni her adımında destekleyen, sevgilerini ve desteklerini sık sık sözcüklerle ifade etmekten çekinmeyen, her geçen gün varlıklarının, sevgilerinin, ilgilerinin, cümlelerinin ve bana olan güvenlerinin ne kadar değerli olduğunu daha çok anladığım, bugünlere ulaşmamda ve bu dereceyi almamda büyük emekleri olan, bir üyesi olduğum için mutluluk duyduğum ailem; canım anneciğim Selvinaz UĞUZ'a ve canım babacığım Cevdet UĞUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması FUK-2019-17752 numaralı projenin bir parçası olarak gerçekleştirilmiştir ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül Bilge UĞUZ
Nisan 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Buğday Hakkında Genel Bilgi	3
2.2. Buğdayda Bulunan Sağlığa Faydalı Bileşenler	4
2.2.1. Buğdayda Antioksidan Aktivitesi	6
2.2.2 Buğdayda Flavonoid Biyosentezi	8
2.4. Malnütrisyon, Gizli Açlık, Biyofortifikasyon ve Uygulamaları.....	13
2.5. Bitkilerde Gen Ekspresyon Analizi	17
2.5.1. Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	18
2.6. Çalışmanın Amacı.....	19
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Buğday Örnekleri.....	21
3.1.2. Ekipmanlar	21
3.1.3. Kimyasallar	22
3.1.4. Sarf Malzemeler.....	23
3.1.5. Primerler	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Materyalin analizler için hazırlanması.....	24
3.2.2. Buğday Genotiplerinin Toplam Antioksidan Kapasitesilerinin (TAK) Belirlenmesi.....	24

3.2.3. Yerel Buğday Genotiplerinde Antioksidan ve Flavonoid Biyosentez Enzim Genlerinin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	25
3.2.4. Veri Analizi	35
4. BULGULAR	37
4.1. Çalışmada kullanılan yerel buğday genotipleri	37
4.2. Yerel Buğday Genotiplerinin Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi	45
4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi.....	48
4.3.1. Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA İzolasyon Sonuçları	48
4.3.2. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Uygulanmış Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA İzolasyon Sonuçları.....	52
4.3.3. Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA'lerden Sentezlenen cDNA Sonuçları	56
4.3.4. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Uygulanmış Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA'lerden Sentezlenen cDNA Sonuçları	59
4.4. RT-PCR Optimizasyonu ve Standart Eğrilerin eldesi.....	62
4.4.1. Standart Eğri Eldesi.....	62
4.4.2. Yerel Buğday Çeşitlerinin qPCR Analizi.....	71
4.5. Gen İfade Analizi	75
4.5.1. Yerel Buğday Çeşitlerinde <i>SOD</i> Geni İfadesi.....	75
4.5.2. Yerel Buğday Çeşitlerinde <i>CAT</i> Geni İfadesi	81
4.5.3. Yerel Buğday Çeşitlerinde <i>PAL</i> Geni İfadesi	87
4.5.4. Yerel Buğday Çeşitlerinde <i>CHS</i> Geni İfadesi	93
5. YORUM.....	100
7. KAYNAKLAR.....	104
EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	113
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	114
ÖZGEÇMİŞ	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitkilerde antioksidan savunma mekanizmasının özeti- antioksidan enzimlerinin ROS'u detoksifiye etme mekanizması [44]	7
Şekil 2.2. Sekonder bitki metabolitlerinin sınıflandırılması[54]	9
Şekil 2.3. Fenol grubu. Tek bir hidroksi ikamesi taşıyan benzenden oluşan organik bir hidroksi bileşiği (CHEBI:15882) [56]	10
Şekil 2.4. Bir flavonoid sınıfı olan flavonların kimyasal yapısı (CHEBI:16243) [58]...	11
Şekil 2.5. Buğdayda flavonoid biyosentez yolağı [59]	12
Şekil 2.6. Demir eksikliğinin 128 ülkede görülme seviyesi [66].....	14
Şekil 2.7. Vitamin A eksikliğinin 128 ülkede görülme seviyesi [66]	15
Şekil 2.8. Çinko eksikliğinin 128 ülkede görülme seviyesi [66]	16
Şekil 2.9. DNA tespiti için temel adımları [84]	19
Şekil 3.1. Gen ifade analizi işlem akım şeması	26
Şekil 3.2. Petri kaplarına ekilmiş buğday örnekleri	27
Şekil 3.3. Işık almayan, 18-20°C ortam koşullarında bekletilen buğday örnekleri	27
Şekil.3.4. Işık almayan, 18-20°C ortam koşullarında iki gün boyunca tutulan buğday örneklerinin aydınlık ortama alındığındaki görüntüsü.....	28
Şekil.3.5. Yirmi günlük yetişkinliğe ulaşan buğday yaprağı örnekleri	28
Şekil 3.6. a)Buğday yapraklarına yapılan spreyl çinko gübreleme uygulaması b)Çinko gübresi ile tamamen ıslanmış buğday yaprakları.....	29
Şekil 3.7. EURX RNA extracol kitinin bitki dokusu için RNA ekstraksiyon protokolü	30
Şekil.3.8. EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis Kit protokolü	31
Şekil.3.9. Absolut kantifikasyon gen ifade miktarı (Cq: Kantifikasyon döngüsü, b: Standart eğride y eksenini kesen nokta, m: Standart eğri eğimi)	36
Şekil 4.1. Standart TROLOX konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ABTS radikali için kalibrasyon eğrisi.	46
Şekil 4.2. ABTS radikal kullanarak analiz edilmiş yerel buğday çeşitlerinin toplam antioksidan kapasite değerleri.....	47
Şekil 4.3. RT-PCR % Verim hesabı için kullanılan eşitlik.....	63
Şekil 4.4. SOD geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	63

Şekil 4.5. SOD geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	64
Şekil 4.6. CAT geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	65
Şekil 4.7. CAT geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	66
Şekil 4.8. PAL geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	67
Şekil 4.9. PAL geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	68
Şekil 4.10. CHS geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	69
Şekil 4.11. CHS geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.....	70
Şekil 4.12. Bazı yerel buğday genotiplerinin SOD genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	71
Şekil 4.13. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin SOD genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri.....	72
Şekil 4.14. Bazı yerel buğday genotiplerinin CAT genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	72
Şekil 4.15. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin CAT genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	73
Şekil 4.16. Bazı yerel buğday genotiplerinin PAL genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	73
Şekil 4.17. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin PAL genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	74
Şekil 4.18. Bazı yerel buğday genotiplerinin CHS genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	74
Şekil 4.19. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin CHS genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri	75
Şekil 4.20. Bazı yerel buğday genotiplerinin SOD geni ifade değerleri.	76
Şekil 4.21. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası SOD geni ifade değerleri.	78

Şekil 4.22. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında <i>SOD</i> geni ifade değerleri.....	80
Şekil 4.23. Bazı yerel buğday genotiplerinin <i>CAT</i> geni ifade değerleri..	82
Şekil 4.24. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası <i>CAT</i> geni ifade değerleri.	84
Şekil 4.25. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında <i>CAT</i> geni ifade değerleri.	86
Şekil 4.26. Bazı yerel buğday genotiplerinin <i>PAL</i> geni ifade değerleri..	88
Şekil 4.27. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası <i>PAL</i> geni ifade değerleri.	90
Şekil 4.28. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında <i>PAL</i> geni ifade değerleri.	92
Şekil 4.29. Bazı yerel buğday genotiplerinin <i>CHS</i> geni ifade değerleri.	94
Şekil 4.30. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası <i>CHS</i> geni ifade değerleri.....	96
Şekil 4.31. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında <i>CHS</i> geni ifade değerleri.	98
Şekil 5.1. Yerel buğday çeşitlerinin ABTS değerleri, Yerel buğday çeşitlerinin ve bunlara uygulanan yapraktan çinko biyofortifikasyonundan sonra <i>SOD</i> , <i>CAT</i> ve <i>PAL</i> , <i>CHS</i> gen ifade düzeylerinin korelasyonuna dayalı ısı haritası (heatmap) ile analizi.....	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. UniProt Bilgi Bankası'nda <i>SOD</i> , <i>CAT</i> , <i>PAL</i> ve <i>CHS</i> genleri için yer alan temel veriler [35-39].....	6
Çizelge 3.1. Araştırma için kullanılan buğday genotip listesi.....	21
Çizelge 3.2. <i>SOD</i> , <i>CAT</i> ve <i>PAL</i> genleri için Ma ve arkadaşlarının çalışmasında [33] tasarlanan primer listesi.....	24
Çizelge 3.3. <i>CHS</i> geni için Ahmed ve arkadaşlarının çalışmasında [91] tasarlanan primer listesi.....	24
Çizelge 3.4. Ma ve arkadaşlarının çalışmasında [33] tasarlanmış primerler için reaksiyon başına son hacim/konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı ..	32
Çizelge 3.5. Ma ve arkadaşlarının çalışmasında [33] tasarlanmış primerler için qPCR döngü programı	33
Çizelge 3.6. <i>SOD</i> , <i>CAT</i> , <i>PAL</i> ve <i>CHS</i> primerleri için reaksiyon başına son hacim/konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı.....	33
Çizelge 3.7. <i>SOD</i> primeri için qPCR döngü programı	34
Çizelge 3.8. <i>CAT</i> primeri için qPCR döngü programı	34
Çizelge 3.9. <i>PAL</i> primeri için qPCR döngü programı.....	34
Çizelge 3.10. <i>CHS</i> primeri için qPCR döngü programı	35
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan yerel buğday genotipleri ve bazı morfolojik özellikleri ile tane görüntüsü.	38
Çizelge 4.2. Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA izolasyon sonuçları	49
Çizelge 4.3. Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA'lara ait varyasyon katsayısı sonuçları.....	51
Çizelge 4.4. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Yapılmış Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA izolasyon sonuçları	53
Çizelge 4.5. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Uygulanmış Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA'lara ait varyasyon katsayısı sonuçları.....	55
Çizelge 4.6. Yerel buğday çeşitlerine ait cDNA sentez sonuçları	57
Çizelge 4.7. Yerel buğday çeşitlerine ait cDNA varyasyon katsayısı sonuçları	58
Çizelge 4.8. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait cDNA sentez sonuçları.....	60

Çizelge 4.9. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait cDNA varyasyon katsayısı.....	61
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mg	Miligram
kg	Kilogram
g	Gram
nm	Nanometre
mmol	Milimol
μl	Mikrolitre

Kısaltmalar

Zn	Çinko
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
PAL	Fenilalanin Amonyum Liyaz
CHS	Kalkon Sentaz
QENCHER	Quick, Easy, New, CHeap, Reproducible)
RNA	Ribonükleik asid
cDNA	Tamamlayıcı DNA
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
AsA	Askorbik asit
DHA	Dehidro askorbat
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfid
O ₂ ⁻	Oksijen radikali
O ₂	Oksijen
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
APX	Askorbat Peroksidaz
MDHA	Mono dehidroaskorbat
MDHAR	Monodehidroaskorbat Redüktaz
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	DHA

GR	Glutasyon Redüktaz
DAR	Dehidroaskorbat redüktaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
TEAK	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
qPCR	Kuantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA	Komplementer deoksiribo nükleik asit
Cq	Eşik Döngüsü
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
MPSS	Massively Parallel Signature Sequencing
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
dsDNA	Çift Sarmallı DNA
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

1. GİRİŞ

İnsanın gıda üretimi sürecinde, M.Ö. 8000 yılında tarıma geçişin başlamasından günümüze dek buğday, pirinç, mısır, arpa ve çavdar gibi tahılların üretiminin önemli bir yeri vardır. Söz konusu tahıllar arasında buğday, tarımı kolay ve verimi yüksek olması bakımından farklıdır. Buğday değişik toprak ve iklim şartlarına uyum sağlayabilmesi nedeni ile dünyada pek çok yerde yetiştirilmektedir. Öte yandan Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 10 milyara yakın olacağına işaret etmektedir. Artan gıda talebini karşılamak için diğer bitkisel ürünlerde olduğu gibi temel besin maddesi olan buğdayın da üretiminin artırılması gerekmektedir. Bununla birlikte, tüketicilerin “sağlıklı gıda” eğiliminin oluşması nedeniyle buğday çeşitlerinde antioksidan ve flavonoid biyosentezinin moleküler temelini anlaşılmaması önem arz etmektedir. Bu konudaki araştırmalar, aynı zamanda, yerel buğday çeşitleri, renkli taneler ve organik olarak yetiştirilen buğdaydan elde edilen ürünlerde sağlıklı gıda arayışı eğilimine karşılık verecektir. Bunun yanı sıra, moleküler yöntemlerdeki gelişmeler, ilgili biyosentez mekanizmasını anlamada genomik, transkriptomik gibi omik teknolojiler kullanılan araştırma yaklaşımı ile de desteklenmektedir.

Dünya genelinde iki milyardan fazla insanda "gizli açlık" görülmekte, gizli açlık olan popülasyonlarda bağışıklık sistemi zayıflamakta ve genel hastalık yükü artmaktadır. Gizli açlık için önemli olan mikro gıda bileşenleri, hem bitki hem de insan gelişimi için gerekli olan temel mineral elementlerdir. Mikro bileşenler, genellikle toprakta, bitkide ve gıdada eksiktir. Günümüzde özellikle gelişmekte olan ülkelerde görülen gizli açlıkla mücadele edebilmek için, kolay erişilebilir olan ve günlük diyetin büyük çoğunluğunu oluşturan pirinç, buğday ve mısır gibi temel gıdaların üretimi sırasında fortifikasyon ve/veya biyofortifikasyon uygulamaları yapılmaktadır. Çinko (Zn) eksikliği, bitkilerde verim ve besin kalitesinin düşmesine neden olan iyi bilinen bir sorundur. Topraktaki biyolojik olarak kullanılabilir Zn seviyeleri optimalin altında olduğunda, Zn eksikliği bitkiler için ciddi biyokimyasal ve fizyolojik sonuçlara yol açabilir [1]. Yaprak konsantrasyonları kurumadde ağırlığı üzerinden 15 mg Zn kg^{-1} 'in altına düştüğünde, bodur büyümenin yanı sıra azalan verim ve düşük tahıl mikro besin içeriğini bağlı eksiklik belirtileri gözlemlenir, ancak bu, türün doğal duyarlılığına bağlı olarak değişebilir [2, 3]. Dünya tarım topraklarının %50 kadarının düşük Zn içeriğinden ve düşük biyoyararlanımdan, bununla birlikte kireçli alkali topraklardan etkilendiği tahmin

edilmektedir. Türkiye, Pakistan, İran, İsrail, Suudi Arabistan, Çin, Güney Amerika'nın kuzeybatı bölgeleri ve Sahra altı Afrika özellikle güçlü bir şekilde bu faktörlerden etkilenen yerlerdir [4].

Zn arzında bir kıtlıkla karşı karşıya kalındığında, bitkiler Zn alımını artırarak iklime uyum sağlarlar. Son yıllarda, Zn eksikliğine karşı bitki direncinin daha iyi anlaşılması söz konusu olmakla birlikte, bitkilerin Zn kullanım verimliliğindeki genotipik varyasyonlar ve antioksidan ve flavonoid biyosentezine etkisi konusu önemli görünmektedir. Özellikle son yıllarda yerel buğday genotiplerinin yüksek antioksidan içeriği nedeniyle insanlar üzerinde faydalı etkileri olduğu düşünülmektedir. Ancak buğday tanesinin geliştirme sırasında antioksidan ve flavonoid biyosentez sürecinin sistematik olarak anlaşılması eksiktir.

Bu tez çalışması ile seçilen yerel buğday genotiplerinde antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeyleri ve bu biyosentez yolundaki anahtar enzim genlerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu ile ifade düzeylerindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, bazı yerel buğday genotiplerinin toplam antioksidan içeriği ile antioksidan ve flavonoid biyosentezinde yer alan dört farklı genin transkripsiyon seviyeleri analiz edilmiştir. Yapraktan Zn uygulaması ile agronomik biyofortifikasyon uygulanan yerel buğday genotiplerinde aynı enzimlerin gen ifadesindeki değişim transkripsiyonel düzeyde araştırılmıştır.

Bu çalışma, yerel buğday tanelerinin çimlenmesi ve çinko ile biyofortifikasyon uygulaması ile antioksidan ve flavonoid biyosentez sürecinin davranışını anlamaya yardımcı olmakta ve yerel buğday genotiplerinden faydalanabilmek için ön bilgi sağlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Buğday Hakkında Genel Bilgi

Tahılın kültüre alınma süreci, tarım toplumlarının oluşmasıyla başlamış ve tahıl insan beslenmesinde bu dönemlerden itibaren büyük yer edinmiştir [5]. Buğday, pirinç, mısır, arpa ve çavdar gibi tahıllar, botanik olarak *Gramineae* bitki ailesine aittir. Bu tahıl genotipleri arasında buğdayın önemi ise tohumlarının ekmek ve makarnanın yanında diğer unlu mamüllerin de bileşenleri olan irmik, un gibi gıda eldesi için öğütülebilmesidir. Buna ek olarak buğday; tarımı kolay ve yüksek verimli, bir tahıl olup farklı toprak ve iklim şartlarına uyum sağlayabildiği için dünyada pek çok yerde yetiştirilmektedir [6].

Buğdayın kökeni Afrika'nın ve Asya'nın çeşitli bölgelerine dayanmaktadır [6]. Buğdayın gen merkezlerinden biri olarak kabul edilen Anadolu topraklarında buğday tarımı yaklaşık 10000 yıllık bir geçmişe sahiptir [7]. "Tahıl Ambarı" olarak da bilinen Anadolu toprakları, 28 yabani buğday türüne ve 400'den fazla kültüre alınmış buğday çeşidine ev sahipliği yapmakta ve bu sayede yabani buğday ve buğdayla ilişkili türlerin genetik çeşitlilik merkezleri arasında bulunmaktadır [8, 9]. Genellikle çiftçilerin süregelen yetiştiricilik dönemleri boyunca beğenileri doğrultusunda seleksiyonla ıslah ettikleri ve bulundukları yöreye uyum sağlamış olan bir kültür bitkisine ait çeşitler, yerel çeşit ya da köy çeşidi olarak adlandırılır. Yerel çeşitler, yetiştikleri ekolojik şartlara adaptasyon sağlayan bir genetik çeşitliliği barındırır. Bununla birlikte, modern buğday çeşitleri, tarımın modernize olması ile birlikte yüksek girdi kullanımı ile yetiştirilmeye başlanmış ve tahıl üretiminde gözle görülür artışlar sağlanmıştır. Buna bağlı olarak yerel buğday çeşitlerinin kullanımı giderek azalmış, kimi yerlerde de bu çeşitler tamamen terk edilmiştir [9].

Bazı ülkelerde yerel buğday çeşitleri uzun bir süre ihmal edildikten sonra yeniden değerlendirilmiş ve yerel gıdaların üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle sağlıklı gıda pazarlarında yerel buğdayların tüketimine büyük ilginin olduğu Batı Avrupa'nın bazı bölgelerinde üretimleri yeniden başladığı görülmektedir [10].

Buğday (*Triticum*) genetik niteliklerine göre 3 temel gruba ayrılmaktadır. Kromozomlarına göre bu gruplar hekzaploid ($2n=42$), tetraploid ($2n=28$) ve diploid

($2n=14$) şeklindedir [11, 12]. İki cins (*Aegilops* ve *Triticum*) ve üç ploidi düzeyinde (diploid, tetraploid ve hekzaploid) sınıflandırılan kültür buğdayları ve yabani buğdaylar, bunların yakın ataları ve akrabalarının tamamı Türkiye’de bulunmaktadır. Ülkemizde buğday; hububat ürünleri içerisinde %55’lik bir orana sahip olup, toplam ekili alanların %45’ini oluşturmaktadır [9, 13]. Tüketicilerin yerel buğday çeşitlerine artan ilgisi, bu çeşitlerde insan sağlığı açısından önem arz eden biyoaktif maddelerin bulunması, Türkiye’de konu ile ilgili araştırmaların sayı ve niteliğini artırmıştır. Genetik kaynakların tür altı kategorilerde gıda bileşimlerine dair daha çok veri elde edilmesine ilişkin araştırmalar giderek daha fazla kabul görmektedir [14, 15]. Yerel çeşitlerin değerlendirilmesi ve sürdürülebilir korunması için gıda bileşimi, kalite ve benzeri yönden araştırılmaları, bu veriler ışığında yetiştiriciliklerinin ve tüketimlerinin teşvik edilmesi ya da dolaylı olarak bu özellikleri içeren çeşitlerin ıslah çalışmalarında kullanılması büyük önem taşımaktadır.

2.2. Buğdayda Bulunan Sağlığa Faydalı Bileşenler

Düşük ve orta gelirli ülkelerde buğday, protein kaynağı olarak pirincin veya mısırın yerini alırken, kalori kaynağı olarak pirinçten sonra ikinci sıradadır [16]. Buğdayın genel olarak fenolikler, lignanlar, steril ferulatlar, tokoferoller, tokotrienoller, karotenoidler, fenolik asitler, flavonoidler ve fitosteroller gibi sağlığa faydalı bileşenlerin kaynağı olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir [10, 17-23]. HEALTHGRAIN adı ile Avrupa’da kurulan forum, tahıl ve tahıl esaslı ürünlerle ilgilenen üniversite, enstitü ve endüstriden üyeleri bulunan önemli bir bilimsel ağıdır. Bu forumun üyelerinin bir kısmı, buğdayda bulunan biyoaktif fitokimyasalların tanedeki dağılımı, ekstrakte edilebilirliği, analizi ve işlevsel özellikleri hakkında araştırmalar gerçekleştirmektedir. Ayrıca gıda işleme yöntemlerinin buğday biyoaktif bileşenleri üzerindeki etkisini anlamak ve işlenmiş gıdada biyoaktif bileşiklerin daha yüksek miktarda olması için süreç geliştirme çalışmaları da yapmaktadırlar [24]. Konunun önemi ülkemizde de “Uluslararası Buğday Çeşitliliği ve İnsan Sağlığı Konferansı (22-24 Ekim 2019, İstanbul)’nın” amacı olarak “buğdayın çeşitli genetik kaynaklarının modern ıslah, sürdürülebilir üretim ve işleme teknolojilerini kullanarak, bilgi alışverişinde bulunmak ve buğdayın sağlık yararlarını arttırmak için olası stratejileri tartışmak” şeklinde vurgulanmıştır.

Buğdaydaki fenolikler, lignanlar, tokoferoller, karotenoidler, alkilrezorsinoller, steril ferulatlar gibi biyoaktif maddelerin sağlığa faydaları üzerine yapılan son çalışmalar, yerel buğday çeşitlerimizde de biyoaktif madde profilinin ortaya çıkarılması gerekliliğine işaret etmektedir. Ayrıca, flavonoid bileşiklerin biyosentezi en çok çalışılan bitki metabolik yollarından biridir [25-31]. Son moleküler ve genomik yöntemlerin geliştirilmesi, buğdayda flavonoid biyosentezinin moleküler-genetik temelini anlamada kayda değer ilerleme sağlamıştır [32]. Önceki çalışmalarda, buğdayda (*Triticum aestivum* L.), iki antioksidan enzim geninin (*SOD*) ve (*CAT*), dört askorbat-glutasyon döngü geninin (*GR*, *DAR*, *MDAR* ve *APX*) ve iki flavonoid biyosentez yolu geninin (*PAL*) ve (*CHS*) nispi ifade seviyelerinin iki farklı doz çinko (Zn) varlığında ve kuraklık stresi altında farklılaştığı ve transkripsiyonel seviyede çoklu antioksidan savunma sistemlerini düzenleyebildiği kanıtlanmıştır [33]. Bundan başka biyoinformatik ile buğdayda bulunan flavonoid biyosentez enzimlerinin sınıflandırması, Uğuz ve Yılmaz [34] tarafından da sunulmuştur. Buna göre, buğdayda kalkon sentaz, kalkon izomeraz, flavonon hidroksilaz, dihidroflavanonol redüktaz, antosiyanidin sentaz, glukoflorovanol redüktaz, antosiyanidin sentaz ve glukozoflavonoidglikosil transferaz olan flavonoid biyosentez enzimleri ve bunların yapısal olarak veri tabanları kullanılarak analiz ve ilgili genler tespit edilmiştir. İnsan tüketimi için günlük temel gıda olarak buğday (*Triticum* spp.), tahıl kalitesini optimize etmek ve insan beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için sürekli bir araştırma konusudur. Çizelge 2.1’de buğdayda bulunan antioksidan enzim genleri (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genleri (*PAL* ve *CHS*) ve bunların fonksiyonları ile ilgili reaksiyonlar verilmiştir.

Çizelge 2.1. UniProt Bilgi Bankası'nda *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genleri için yer alan temel veriler [35-39]

<i>Gen</i>	<i>Protein</i> <i>EC</i> <i>No</i>	<i>UniProtKB ID</i>	<i>Fonksiyon</i>	<i>Reaksiyon</i>
<i>SOD</i> (TAU72212.1)	Süperoksit Dismutaz EC 1.15.1.1	O82571 (O82571_WHEA T)	Hücrede üretilen radikalleri yok eder. Demir mangan süperoksit dismutaz ailesinde bulunur.	$2 H^+ + 2 \text{ süperoksit} = H_2 O_2 + O$
<i>CAT</i> (X94352.1)	Katalaz EC 1.11.1.6	D6PW71 (D6PW71_WHE AT)	Aerobik solunum yapan hemen hemen tüm organizmalarda bulunur ve hücreleri hidrojen peroksidin toksik etkilerinden korumada etkindir. Bitki hücresinde peroksizomlarda bulunur. Fenilpropan iskeletine dayalı çok çeşitli doğal ürünlerin L-fenilalaninden	$2 H_2 O_2 = 2 H_2 O + O_2$
<i>PAL</i> (AY005474.1)	Fenilalanin amonyum liyaz EC 4.3.1.24	Q43210 (PALY_WHEAT)	biyosentezindeki ilk reaksiyonu katalize eden bitki metabolizmasının kilit bir enzimidir. Sinamik asit biyosentetik süreci ve L-fenilalanin katabolik süreci biyolojik süreçleridir.	$L\text{-fenilalanin} = (E)\text{-sinamat} + NH_4^+$
<i>CHS</i> (AB187025)	Kalkon sentaz EC 2.3.1.74	W8PF32 (W8PF32_WHEA T)	Asiltransferaz aktivitesi, amino-asil grupları dışındaki transfer grupları ile sağlanır.	malonyl-CoA:4-coumaroyl-CoA malonyltransferase (cyclizing)

2.2.1. Buğdayda Antioksidan Aktivitesi

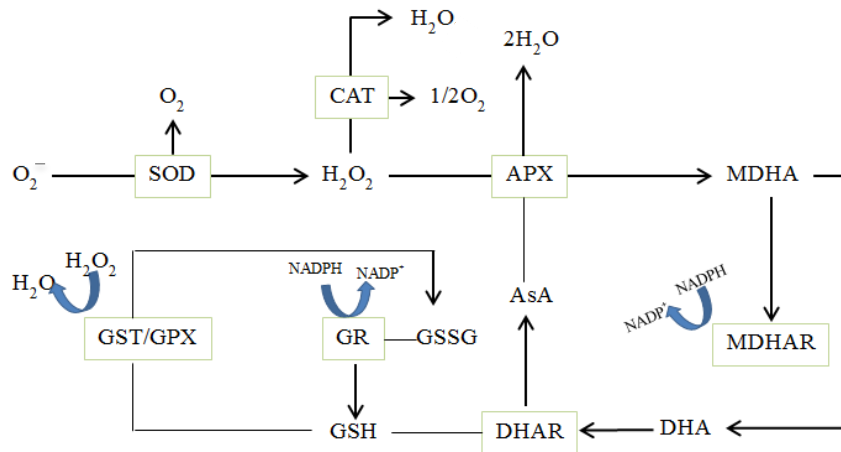
Çevresel stres (tuzluluk, kuraklık, soğuk vb.), hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olur. ROS'lar bir molekül ya da atomdan (radikal olmayan) bir elektron uzaklaşmasıyla ya da molekül ya da atomun bir elektron almasıyla oluşurlar. Bahsedilen ROS artışı sonucu bitkilerde ciddi seviyede oksidatif hasar oluşmaktadır. Oksidatif stres ise bitkide büyümeyi ve tane verimini olumsuz etkiler. Bitkiler, bu olumsuz etkileri durdurmak ve hayatta kalabilmek için bitkiler ROS kontrolü sağlayan antioksidan mekanizmalarına sahiptirler [40, 41].

ROS'un hücrelerde yol açabileceği potansiyel hasarı önlemek ve büyümeyi, metabolizmayı, gelişmeyi ve genel üretkenliği korumak için, hücre içi düzeyde ROS

üretimi ve eliminasyonu arasındaki denge sıkı bir şekilde düzenlenmeli ve verimli bir şekilde metabolize edilmelidir. ROS üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki bu denge, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından sürdürülür.

Bitkilerde bulunan ROS seviyelerini kontrol altına alma mekanizmalarının temel elemanları askorbat (AsA)/ dehidro askorbat (DHA) ve iki redoks çifti olan glutatyon (GSH) ve glutatyon disülfididir (GSSG). Antioksidan sisteminin detoksifikasyon kısmında süperoksit dismutaz (SOD), oksijen radikalini (O_2^- 'yi) oksijene (O_2)'ye ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürür. H_2O_2 daha sonrada katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve diğer birkaç enzimle degrade edilebilir. H_2O_2 'nin APX ile degradasyonu sırasında, AsA monodehidroaskorbat (MDHA) ve DHA'ya oksitlenir. Ayrıca, AsA ve GSH daha yavaş kinetikle ROS tarafından doğrudan oksitlenebilir. MDHA redüktaz (MDHAR), DHA redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR), antioksidanları oksitlenmiş halden indirgenmiş forma geri dönüştürür. MDHAR ve GR, indirgeyici bir eşdeğer olarak NADPH'yi kullanırken DHAR aynı amaç için, GSH'yi kullanır. Anlatılan bu mekanizma Şekil 2.1'de gösterilmiştir [41, 42].

Hücrelerin mitokondrilerindeki SOD enzimi, süperoksit anyonlarını hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüştürerek ortadan kaldırır. CAT enzimleri ise, peroksizomlar gibi hücrelerin alt organel parçaları içinde H_2O_2 'ye, suya (H_2O) ve O_2 dönüştürme işlevi görür [43].



Şekil 2.1. Bitkilerde antioksidan savunma mekanizmasının özeti- antioksidan enzimlerinin ROS'u detoksifiye etme mekanizması [44]

2.3.1.1. Antioksidan Kapasite Ölçümü

Daha önce de bahsedildiği gibi antioksidan maddeler oksidasyonu önlemek yoluyla vücutta kansere ve mikroorganizmalara karşı koruyucu etki gösterir ve kalp-damar hastalıklarının oluşması riskini azaltır [45]. Gıdaların besleyiciliğini artırılması ve bu amaçla da bitkilerin antioksidan kaynağı olarak kullanılması ile ilgili yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Bu doğrultuda da, gıdanın insan sağlığı üzerindeki olumlu etkisini ve besleyici özelliklerinin belirlenmesinde antioksidan kapasitesinin ölçülmesi gerekir [46, 47].

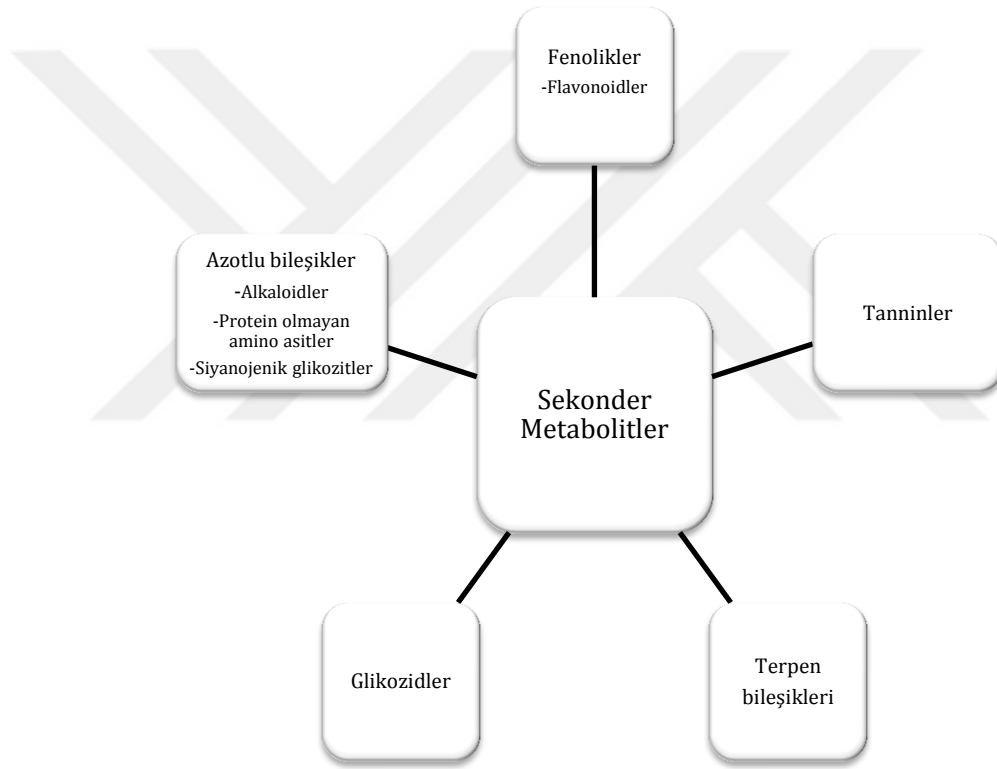
2.3.1.1.1. ABTS Yöntemi

ABTS (2,2'-azinobis 3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) testi ayrıca, "Troloks Eşdeğerliği Antioksidan Kapasite Yöntemi" olarak da bilinir[48]. ABTS testi, antioksidanlar tarafından azaltılabilen, mavi/yeşil ABTS•+ üretimine dayanır [49]. Prensibi, 734 nm'de güçlü absorpsiyon bandına sahip renkli ve nispeten kalıcı ABTS radikal katyonu ile reaksiyona dayanmaktadır. ABTS radikali, numunedeki antioksidan bir elektronu kabul ettiğinde, mavi-yeşil renk, ABTS'nin rejenerasyonunu gösteren uçuk mavi veya renksiz bir renge dönüşür [50]. Toplam antioksidan aktivite miktarı, referans antioksidan madde (Troloks) ile çizilen standart eğri ve 1 kg kuru madde içerisinde bulunan mmol Troloks (Vitamin E analoğu) Eşdeğer Antioksidan Kapasite (mmol TEAK/kg km) şeklinde gösterilir. Bu sebeple ABTS yöntemi çoğunlukla TAEK olarak da ifade edilir [47, 51].

2.2.2. Buğdayda Flavonoid Biyosentezi

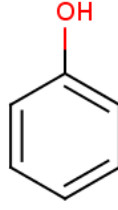
Bitkilerde bulunan fitokimyasal bileşenler, temel metabolik süreçlerdeki işlevlerine ve oluştukları metabolik yollara göre primer ve sekonder metabolitler olarak iki gruba ayrılırlar. Primer metabolitler, temel yaşam fonksiyonlarından (büyüme, üreme vb.) sorumludurlar ve oluşumu neredeyse bütün organizmalarda aynıdır. Buna karşın temel yaşam fonksiyonlarında sekonder metabolitlerin önemli bir görevi yoktur. Bitki adaptasyonunda ve savunma mekanizmasında önemli görevleri vardır ve bitkinin yanı sıra, mantar ve mikroorganizmalarda da bulunan, α -l-amino asitler (fenilalanin, tirozin, triptofan) de dahil olmak üzere temel aromatiklerin sentezinde görevli şikimik asid yolağı gibi yardımcı yolların ürünleri olan organik maddelerdir [52, 53].

Sekonder bitki metabolitleri, bitki hücresi tarafından primer metabolik yollardan türetilen çok sayıda kimyasal bileşiktir. Sekonder metabolitler, birçok antik toplulukta geleneksel tıpta şifalı otların kullanılması yoluyla bilimsel bir temel oluşturmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda sekonder metabolitler antibiyotik, antifungal ve antiviral olarak tanımlanmıştır ve bu nedenle bitkileri patojenlerden koruyabilirler. Ayrıca, sekonder metabolitler, önemli UV (ultraviyole) ışınlarını emici bileşikler oluştururlar, bu yolla da ışıktan kaynaklanan yaprak hasarını ciddi bir seviyede önleyebilirler. Sekonder bitki metaolitleri, kimyasal yapılarına göre birkaç sınıfa ayrılır (Şekil 2.2). Fenolikler bitki sekonder metabolit sınıflarından biridir [54].



Şekil 2.2. Sekonder bitki metabolitlerinin sınıflandırılması[54]

Fenolikler bitki sekonder metabolitlerinin en büyük grubunu oluşturur. Ortak bir özellik olarak hepsi fenol grubunu içerir (Şekil 2.3) [55].

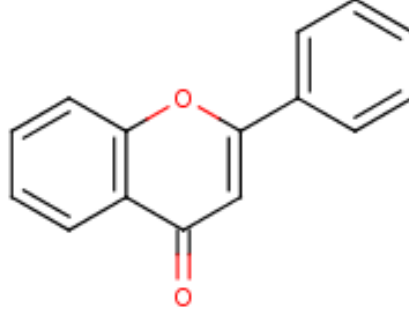


Şekil 2.3. Fenol grubu. Tek bir hidroksi ikamesi taşıyan benzenden oluşan organik bir hidroksi bileşiği (CHEBI:15882) [56]

Fenolik moleküllerin çoğu, özellikle flavonoidler aynı zamanda serbest radikal özelliği gösterirler ve antioksidan özelliği taşırlar. Fenolik maddeler yapılarına ve biyosentetik kökenlerine göre sınıflandırılabilirler. Flavonoidler bu gruplardan biridir [55].

Flavonoidlerin biyosentezi en çok çalışılan bitki metabolik yollarından biridir. Günümüzde bu bileşiklerin 2000'den fazlası bilinmektedir bununla birlikte flavonoidlerin yaklaşık olarak 500 tanesi serbest halde bulunmaktadır. Ayrıca araştırmacılar, flavonoid biyosentezinin biyokimyasal, fizyolojik ve genetik yönleriyle ilgili çalışmalarını sürdürmektedir [55].

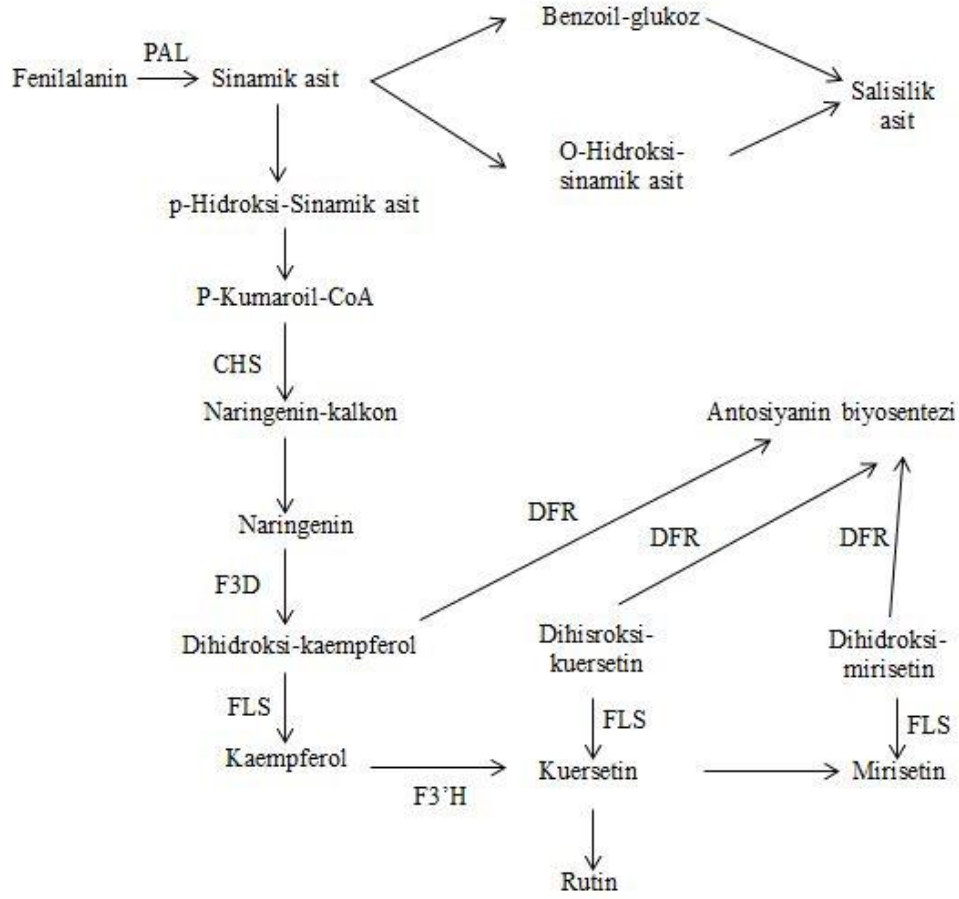
Flavonoidler, bitkide vakuol adı verilen organellerde depolanırlar. Flavonoidlerin iskeleti 2, 3 ve 4 konumlarında aromatik kroman halkası içerir [55]. Flavonoidler, karbon halkasının oksidasyon seviyesine göre gruplara ayrılabilir. Bu gruplardan bazıları antosiyaninler, flavonlar (Şekil 2.4) ve flavonollerdir. Flavonlar genellikle sarı renklidir. Antosiyaninler bitkide renk oluşumunda (çiçek, meyve) görevlidir. Ayrıca bitkide hücre duvarında yapı materyalleri içerisindedir [55, 57].



Şekil 2.4. Bir flavonoid sınıfı olan flavonların kimyasal yapısı (CHEBI:16243) [58]

Flavonoidler, bitki gelişiminde, patojenlerden ve olumsuz ortam şartlarından korunmada önemlilerdir. Antioksidan enzim aktivitesinin tükenmesinin bir sonucu olarak aktive olan ikincil bir antioksidan sistem oluştururlar. Yaralanma, kuraklık, metal toksisitesi ve besin yoksunluğu gibi negatif ortam koşullarında biyotik ve abiyotik streslerin ardından flavonoid seviyelerinde önemli bir artış bulunmuştur [59].

Birçok flavonoid biyosentez geninin de stres altında ifadesinin arttığı ve flavonoidlerin biyosentezinin strese karşı hassas türlerde strese karşı güçlü kalabilen türlere göre daha fazla uyarıldığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [32].



Şekil 2.5. Buğdayda flavonoid biyosentez yolağı [59]

Buğdayda flavonoid pigmentlerin birikmesi bazen ticari açıdan değeri etkileyebilir. Buna örnek olarak yüksek tanen içeriği ile ilişkili olarak kırmızı tane rengine sahip buğdaylar hasattan önce filizlenmeyi önler bu sebeple de tercih sebebi olabilir [32].

2.4. Malnütrisyon, Gizli Açlık, Biofortifikasyon ve Uygulamaları

Malnütrisyon; yetersiz beslenme, enerji alımındaki dengesizlikleri ifade eder ve besin replasmanı ile önüne geçilebilmektedir. Enerji, protein ve diğer besin öğelerinin yetersiz, dengesiz veya fazla alınması nedeniyle vücut yapı ve fonksiyonlarının ölçülebilir şekilde olumsuz etkilendiği bir durumdur. Malnütrisyon üç gruba ayrılabilir. Bu gruplara [60-62] ait özet bilgiler aşağıda verilmiştir.

1-Zayıflık (boya göre düşük kilo), bodurluk (yaşa göre kısa boy) ve düşük kiloyu (yaşa göre düşük kilo) içeren malnütrisyon

2-Mikrobesin eksiklikleri (vücut için gerekli vitamin ve minerallerin eksikliği) ya da mikro besin fazlalığını içeren malnütrisyon

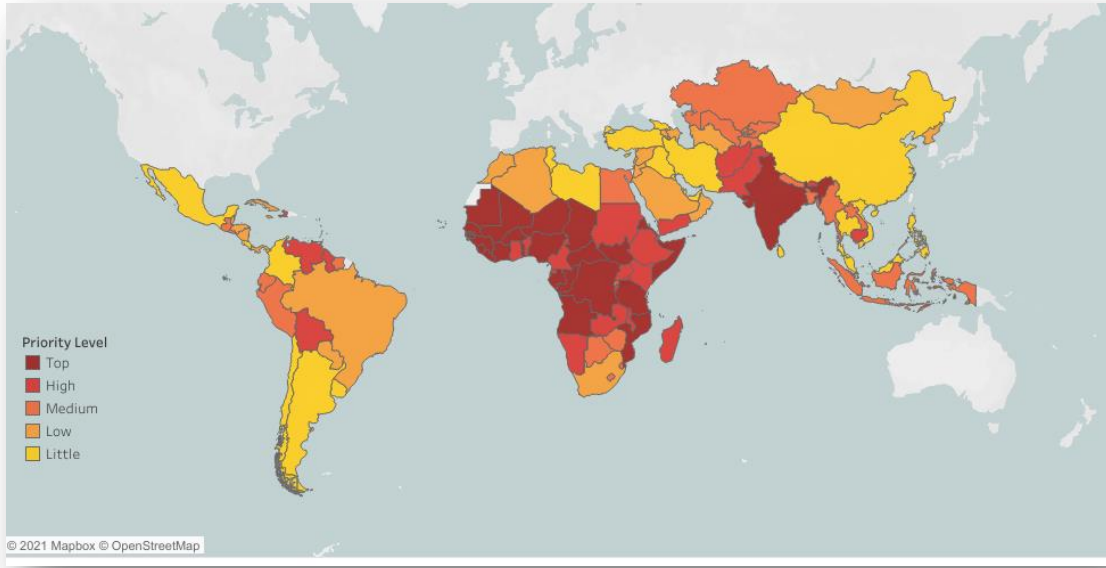
3-Aşırı kilo, obezite ve diyetle bağlı bulaşıcı olmayan hastalıkları (kalp hastalığı ve bazı kanser çeşitleri) içeren malnütrisyon [60, 61]

Gizli açlık ise, vitamin ve minerallerin (çinko, iyot ve demir gibi) alımı ve emilimi, sağlığı ve gelişimi sürdürmek için çok düşük olduğunda ortaya çıkan bir yetersiz beslenme biçimidir. İmmün sistemin zayıflaması, halsizlik gibi mikro besin eksikliği belirtileri genellikle fark edilmemesi sebebi ile bu şekilde görülen yetersiz beslenme biçimine “gizli açlık” adı verilir [62, 63].

Dünya genelinde iki milyardan fazla insanda "gizli açlık" görülmektedir. A vitamini, çinko ve demir gibi vitamin ve mineraller mikro besinlere örnektir. Mikro düzeyde gerekli olmalarına rağmen, hastalıkların oluşumunun önlenmesi ve sağlıklı yaşamın sürdürülebilmesi için gereklidirler [64].

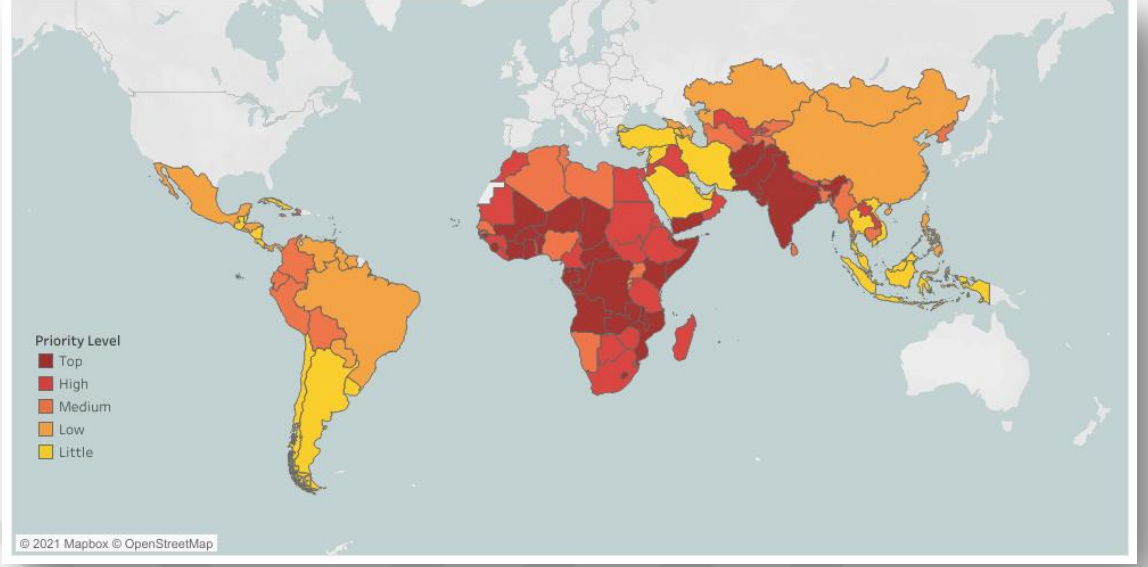
Dünya genelinde yaklaşık 800 milyon kadın ve çocukta anemi görülmektedir. Buna ek olarak dünya genelindeki toplam nüfusun yaklaşık dörtte birinde demir eksikliği kaynaklı anemi görülür ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açtığı için genel

hastalık yükünün birinci sebeplerinden biridir [65, 66]. Özellikle çocukları, menopoz öncesi kadınları ve düşük ve orta gelirli ülkelerdeki insanları etkiler. Afrika'da 5 yaşındaki çocukların %60'ından fazlasının fiziksel potansiyelini ve bilişsel becerisini sınırlar. Gelişmekte olan ülkelerde, demir eksikliği aneminin birinci sebebidir. HarvestPlus 2021 verilerine göre; Mali, Somali, Çad ve Orta Afrika Cumhuriyeti demir eksikliğinin görüldüğü ilk 4 ülkedir. Türkiye ise bu sıralamada 128 ülke arasında 103. sıradadır (Şekil 2.6) [66, 67].



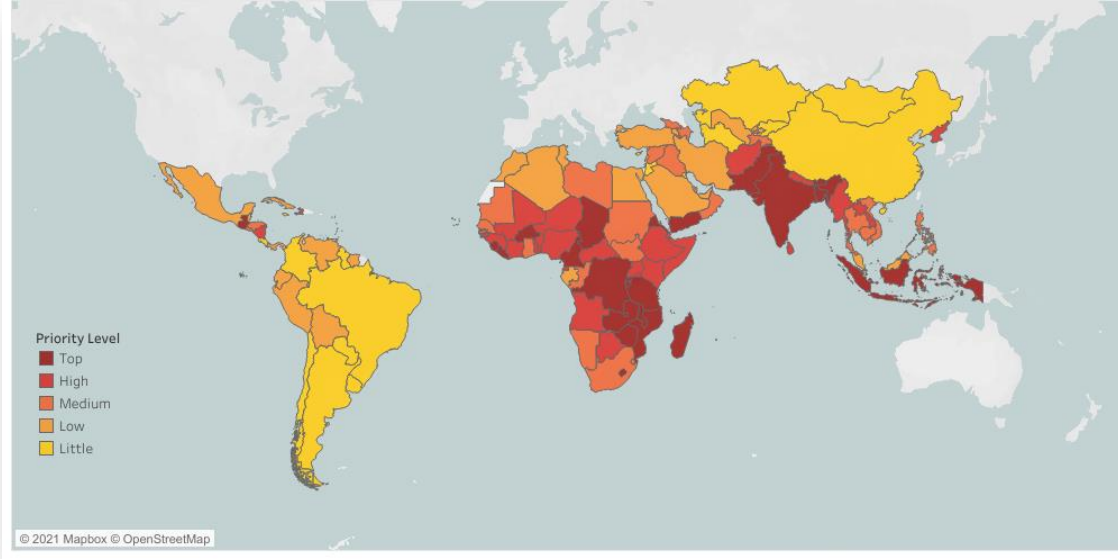
Şekil 2.6. Demir eksikliğinin 128 ülkede görülme seviyesi [66]

Gece körülüğü gibi ciddi sonuçlar doğurabilen vitamin A eksikliği ise, dünya genelinde yaklaşık 190 milyon okul öncesi çocukta görülmektedir [68]. Buna ek olarak gelişmekte olan ülkelerde yaklaşık 7 milyon hamile kadında da vitamin A eksikliği görülmektedir. HarvestPlus 2021 verilerine göre; Angola, Orta Afrika Cumhuriyeti, Demokratik Kongo Cumhuriyeti ve Hindistan demir eksikliğinin görüldüğü ilk dört ülkedir. Türkiye ise bu sıralamada 128 ülke arasında 114. Sıradadır (Şekil 2.7) [69].



Şekil 2.7. Vitamin A eksikliğinin 128 ülkede görülme seviyesi [66]

Dünya nüfusunun %17'sinde çinko eksikliği görülür ve yine dünya genelinde, özellikle hububat ürünlerinin günlük diyetin büyük bölümünü oluşturduğu ülkelerde yaklaşık 3 milyar insanda temel olarak demir ve çinko eksikliği görülür [65, 70]. Çinko eksikliğinin immün sistemin zayıflamasına, bilişsel yeteneklerin olumsuz şekilde etkilenmesine ve büyüme geriliğine sebep olduğu bilinmektedir [65, 70]. HarvestPlus 2021 verilerine göre; Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Burundi, Zambia ve Malawi çinko eksikliğinin görüldüğü ilk dört ülkedir. Türkiye ise bu sıralamada 128 ülke arasında 81. sıradadır (Şekil 2.8) [70].



Şekil 2.8. Çinko eksikliğinin 128 ülkede görülme seviyesi [66]

Fortifikasyon, toplum sağlığına fayda sağlamak için, işlenmiş gıdaların mikro besin kapasitesinin yükseltilmesi olarak ifade edilir [71, 72]. Fortifikasyon uygulamaları ile bir toplumun mikro besin durumu güvenli ve etkili bir şekilde iyileştirilebilir. Sofra tuzunun iyot ile fortifikasyonu bu uygulamanın küresel olarak yüksek kapsama alanı sağlamayı başarmış bir örneğidir [73].

Yapılan bir araştırmada, demir fortifikasyonu yapılmış inci darısının beslenme ve bilişsel performansı önemli ölçüde iyileştirerek demir eksikliğinin olumsuz dalgalanma etkilerini engelleyebileceğini gösterilmiştir [74, 75].

Biyofortifikasyon ise, bitkinin gelişim evrelerinde besin değerinin arttırılmasını içerir. Tarım ya da biyoteknolojik uygulamalar ile yapılan biyofortifikasyon uygulamaları mevcuttur [72]. Bununla birlikte biyofortifikasyonun mikro besin eksikliklerini düzenlediği çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, turuncu tatlı patates, manyok ve mısırın, kadınların ve çocukların provitamin A, serum retinoland ve toplam A vitamini depolarını arttırarak A vitamini eksikliğini azalttığı gösterilmiştir [76-80]. Bir diğer çalışmada, agronomik olarak çinko bakımından zenginleştirilmiş yiyeceklerle beslenen çocuklarda zatürre hastalığına yakalanma oranının düştüğü, yakalananlarda ise hastalık süresinin kısaldığı ortaya konmuştur [74, 81].

Dünya genelinde, milyarlarca insan için buğday, arpa, mısır ve pirinç gibi hububat ürünleri, en çok üretilen ve en erişilebilir gıda ürünleridir ve dünya nüfusunun büyük çoğunluğunun diyetlerinin %50'den fazlasını oluşturur. Buğday tek başına diyetle alınan kaloringin %18'ine katkıda bulunur. Biyofortifikasyon uygulamalarında da yüksek ulaşılabilirlikleri sebebiyle pirinç, buğday ve mısır gibi hububat ürünleri tercih edilen ürünler arasındadır. Günümüzde yürütölen biyofortifikasyon çalışmaları temel gıdaların fazlalıkla tüketildiğı, gelişmekte olan ölkeleri hedef almaktadır [73, 82].

Transgenik yaklaşımlarla ve CRISPR teknolojisi ile biyofortifikasyon çalışmaları ile ilgili de çalışmalar yapılmaktadır. Kumar ve arkadaşları [82] tarafından yapılan bir çalışmada vitamin A, çinko ve demir içeriğini artırmak amacıyla transgenik yaklaşımlarla yapılan çalışmalar incelenmiştir. Bu çalışmada insan glutelin-1 promotörü kontrolünde laktoferrin genini içeren transgenik pirinçlerde, heterolog proteinlerin ekspresyonunun kontrole göre önemli oranda fazla olduğı belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, pirincin besleyiciliğini artırmak amacı ile yeni bir yaklaşım olan CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılmıştır. CRISPR-Cas9 teknolojisi hedeflenen iki konumda pirinç genomuna DNA kasetleri eklenmek için kullanılmıştır ve bu yolla A vitamininin öncüsü olan karotenoid açısından zenginleştirilmiş pirinç elde edilmiştir [83].

2.5. Bitkilerde Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon analizi, bir organizmanın transkriptomik veya genomik davranışlarındaki değişiklikleri araştırma yöntemidir [84]. Transkriptom, belirli bir hücre veya doku tipindeki tam transkript setidir [85]. Gen ifadesi çeşitli faktörlere bağılı olarak (biyotik ve abiyotik stres) değişebilir ve genel olarak, transkriptom analizinin amacı, farklı koşullarda farklı şekilde ifade edilen genleri tanımlayarak, koşullarla ilişkili genlerin ve yolların yeni bir anlayışına yol açmaktır [84, 85]. Transkriptom analizi, binlerce genin ifadesindeki değişiklikleri yorumlamak için uygun bir istatistiksel yöntem gerektirir. Genomik analizi ise, DNA dizisi, yapısal varyasyon ve gen ekspresyonu gibi genomik özelliklerin ölçölmesi ve karşılaştırılmasını içerir [86].

Gen ekspresyonu analizi için mevcut teknolojiler iki grupta incelenebilir: Kapalı sistemler ve açık sistemler. İlgili genomun bilgisine dayanan kapalı sistemde sadece iyi karakterize edilmiş genler analiz edilir. Tipik olarak, mikroarray ve kantitaif gerçek

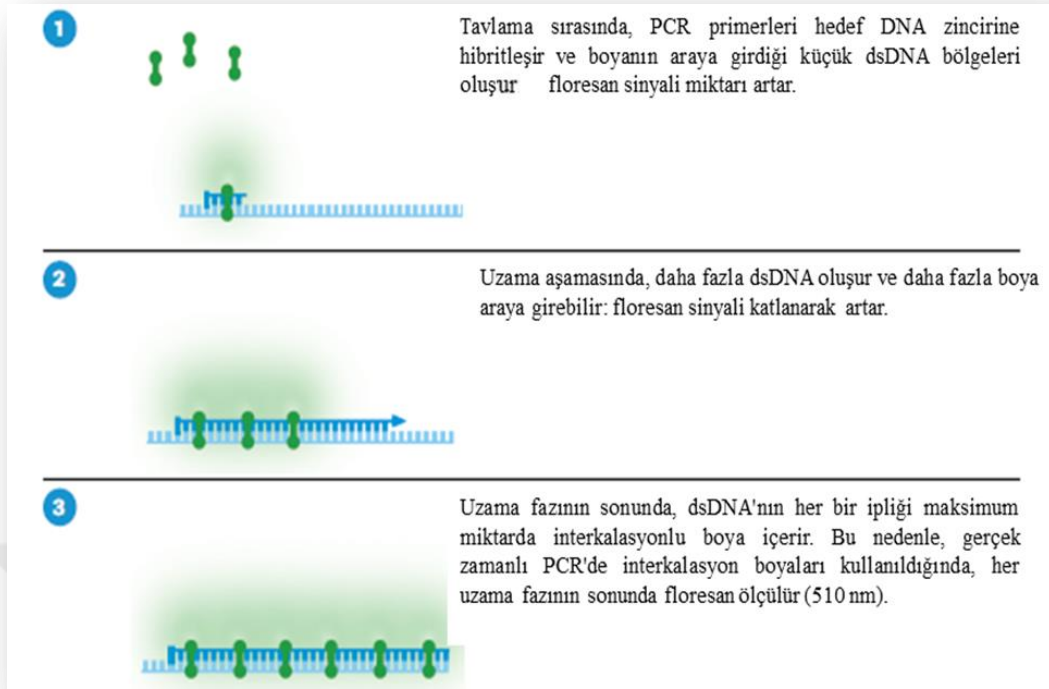
zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) gibi kapalı sistemler bitkilerde gen ekspresyon analizinde yaygın olarak kullanılan tekniklerdir. Açık sistemlerde ise, organizmanın genomunun ya da transkriptomunun önceden bilinmesine gerek yoktur. cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) ve SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) transkript bolluğunu ölçmek ve farklı doku tiplerinde ya da bitkilerde gelişim aşamalarında transkript verilerini ölçmek için başarıyla kullanılan açık sistemlere örnektir [84, 87].

2.5.1. Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

qPCR, geniş bir dinamik aralığa sahip olması, yüksek duyarlılığı, diziye spesifik olması, amplifikasyon sonrası işlemenin çok az olması ve artan numuneye uygun olması nedeniyle gen ekspresyon analizinin en yaygın kullanılan yöntemlerinden biri haline gelmiştir.

1970'lerin başında retroviral ters transkriptazın keşfi ile RT-PCR tekniği mümkün kılınmıştır. Bu teknikte RNA transkriptleri, önce ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA'ya nicelenir. cDNA'nın amplifikasyonunu takiben son ürünlerin gerçek zamanlı olarak saptanması ve nicelenmesi gerçekleştirilir. cDNA, RNaz bozulmalarına maruz kalmaz bu sayede cDNA RNA'ya kıyasla daha kararlıdır [87, 88].

RT-PCR'de, başlangıç RNA'sı daha sonra bozunur, çift zincirli DNA (dsDNA) üretilir ve PCR amplifikasyonu olağan şekilde ilerler. Şekil 2.9'da DNA tespitinin temel adımları gösterilmiştir. Bir amplifikasyon reaksiyonunun kantifikasyon döngüsü veya C_q değeri, floresansın bir niceleme eşiğine ulaşması için gerekli olan fraksiyonel döngü sayısı olarak tanımlanır. Reaksiyonun başlangıcında daha fazla hedef kopyasının olması durumunda, niceleme eşiği ile ilişkili amplifikasyon ürünü miktarına ulaşmak için daha az amplifikasyon döngüsü gerekir. Bu basit ilişki, halen en güncel qPCR analiz yöntemlerinin başlangıç noktası olan orijinal qPCR veri analizinin temelini oluşturur [89].



Şekil 2.9. DNA tespitinin temel adımları [84]

RT-PCR moleküler tıp, biyoteknoloji ve mikrobiyolojide kantitatif veri analizi için mRNA seviyesinin hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlayan bir teknolojidir. Bunlara ek olarak, RT-PCR, RNA virüsü enfeksiyonlarının (örn., insan immün yetmezlik virüsü ve hepatit C virüsü) teşhisinde, miktar tayininde; Hodgkin dışı lenfomalar, lösemiler ve sarkomlarla bağlantılı translokasyonlar tarafından üretilenler gibi mRNA transkriptlerinin analizinde yaygın olarak kullanılır [87, 90].

2.6. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının asıl amacı, yerel buğday çeşitlerinde antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeylerinin ve iki farklı doz çinkonun bu genlerin ifade düzeyine olan etkisinin transkriptomik düzeyde araştırılmasıdır.

Bu çalışma ile, yerel buğday çeşitlerindeki bazı antioksidan enzim genlerinin ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin aktivitelerinin moleküler düzeyde araştırılması ile Türkiye'deki yerli buğdayın çeşitliliği, insan beslenmesinde buğdayın kullanımı ve

buğdayda modern ıslah ve sürdürülebilir üretim konularının tartışıldığı bilimsel ortama önemli bir katkıda bulunulacaktır. Buğdayın anavatanı olan ülkemizdeki yerel buğday çeşitleri ve tohumlarımızın karşılaştırmalı transkriptomik yaklaşımla ilgili genlerin çalışılması bu çeşitlerin korunması ve ıslah çalışmalarında kullanılması açısından önemlidir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Buğday Örnekleri

Araştırma konusu olan buğday örnekleri, Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) Tarla Bitkileri Araştırma Enstitüsü (Enstitü) tarafından sağlanmıştır (Çizelge 3.1). Herhangi bir stres uygulaması yapılmaksızın aynı tarla ve iklim koşullarında üretilen buğday örnekleri Enstitü tarafından sağlanmıştır. Yine Enstitü tarafından sağlanan ve karşılaştırma yapmak amacıyla 2 adet ticari (Eminbey makarnalık, Demir 2000 ekmeklik) buğday çeşidi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırma için kullanılan buğday genotip listesi

	<i>Materyalin adı</i>	<i>Botanik adı</i>
1	Ak-702	<i>Triticum aestivum</i>
2	Köse 220/33	<i>Triticum aestivum</i>
3	Sünter	<i>Triticum aestivum</i>
4	Zerun	<i>Triticum aestivum</i>
5	Demir 2000	<i>Triticum aestivum</i>
6	Mergüze (Siyez)	<i>Triticum monococcum</i>
7	Atasiyez (Siyez)	<i>Triticum monococcum</i>
8	Siyez 4	<i>Triticum monococcum</i>
9	Siyez Pop.	<i>Triticum monococcum</i>
10	Kafkas (Kavılca)	<i>Triticum dicoccum</i>
11	Kavılca Kırmızı başak	<i>Triticum dicoccum</i>
12	Gernik	<i>Triticum dicoccum</i>
13	Karakılçık	<i>Triticum durum</i>
14	Sarı buğday	<i>Triticum durum</i>
15	Eminbey	<i>Triticum durum</i>
16	Spelta Sarı başak	<i>Triticum spelta</i>

3.1.2. Ekipmanlar

Tez çalışmasında, RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR aşamasında kullanılan ekipmanlar aşağıdaki gibidir:

Isıtıcı Blok (Major Science MD-01N)

Mikrosantrifüj (Neuaton i Fuge BL08VT)

Spektrofotometre cihazı (Thermoscientific Nanodrop 2000c)

qPCR cihazı (Roche Lightcycler96)

Vorteks (Biosan Vortex V-1 Plus)

Hassas Terazı (Yıldırım KD-TBC 300 g (0.001 g))

Plate Santrifüj (MiuLab MINIP2500 Micro-plate Centrifuge)

Buzdolabı -20 °C, (2 adet, Vestel ve Arçelik)

Analizi çalıştırmak için yazılım arayüzü (Roche Lightcycler yazılım)

Santrifüj (Nüve NF800)

3.1.3. Kimyasallar

Tez çalışmasında buğday sterilizasyonu sırasında kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir:

1. Sodyum hipoklorit (%20)
2. Steril saf su

Çinko gübresi uygulamasında kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir:

1. Çinko sülfat hepta hidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), ACS grade %99,0-103,0
2. Deiyonize su

RNA ekstraksiyonu için kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir (Çalışmada RNA izolasyonu için “EURX-E3700 katalog numaralı RNA Extracol” kitinde yer alan kimyasallar kullanılmıştır):

1. RNA Extracol
2. Kloroform
3. İzopropanol
4. Etanol (%75)
5. PCR-grade su
6. RNase ZAP (Cleaning agent for removing RNase)

cDNA sentezi için kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir (Çalışmada cDNA sentezi için “EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis” kitinde yer alan kimyasallar kullanılmıştır):

1. Oligo (dT) 20 (50 µM) primer
2. 0.1 M DTT
3. 5 x cDNA Tamponu
4. smART Ters Transkriptaz (200 U/µl)
5. 10 mM dNTPs Karışımı
6. RNaz İnhibitörü (50 U/µl)

7. RNaz içermeyen su

RT- PCR aşamasında kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir:

1. 5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (NO ROX)
2. PCR grade su

3.1.4. Sarf Malzemeler

1. 0.2 ml 96-Well PCR Plate, Eteksiz (BIORAD)
2. 96-Well PCR Plate Sealing Film
3. 0.2 ml Sertifikalı 8 Strip PCR Tüpleri
4. 8 Strip PCR Tüp ve Plate Kapağı
5. Petri Kutusu, (Firatmed/90x15)
6. 100 ml sprej şişesi
7. Mikropipet ucu (10/20/100/200/1000µl)
8. Mikropipet (0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
9. Mikrosantrifüj tüpü (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)
10. Cam pipet (2 mL, 5mL, 10 mL)
11. Pens
12. Spatül
13. Havan ve tokmak
14. Falkon tüpleri (15 mL, 50 mL)

3.1.5. Primerler

Bu çalışmada, ayrıca Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [33] *Triticum aestivum* genotipi için tasarlanmış *SOD*, *CAT*, *PAL* primer sekansları (Çizelge 3.2) ve Ahmed ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [91] yine *Triticum aestivum* genotipi için tasarlanmış *CHS* primer sekansı (Çizelge 3.3), bütün yerel buğday genotiplerinde gen ifade analizi amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. *SOD*, *CAT* ve *PAL* genleri için Ma ve arkadaşlarının çalışmasında [33] tasarlanan primer listesi.

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Sekans (5'-3')</i>
<i>TaSOD</i>	Sod-F	AAGCACCCACGCCACCTAC
	Sod-R	TGGGCTTGAGGTTCTTCC
<i>TaCAT</i>	Cat-F	GTTGGACGGATGGTACTGA
	Cat-R	AAGACGGTGCCTTTGGGT
<i>TaPAL</i>	Pal-F	CACCACCCTGGACAGATTG
	Pal-R	TGAGGCGAAGTGCGGAG

Çizelge 3.3. *CHS* geni için Ahmed ve arkadaşlarının çalışmasında [91] tasarlanan primer listesi.

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Sekans (5'-3')</i>
<i>CHS</i>	TaCHS-L	ATCACCCACCTCGTCTTCTG
	TaCHS-R	AGGAGGTGGAAGGTGAGTCC

3.2. Metot

3.2.1. Materyalin analizler için hazırlanması

Çalışmada tek başaktan üretilmiş hatlara ait örnekler ve siyez ve gernik popülasyonuna ait de bulunan buğday tanesi haricindeki maddeler selektör ile ayrılmıştır. Bu amaç için 2,2 mm elek üzerinde kalan taneler kullanılmıştır. Selektör ile ayırma işleminden sonra bütün buğday çeşitleri ayrı ayrı el ile tekrar ayıklanıp yabancı maddelerin, kırık ve yarık buğday tanelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bütün buğday genotipleri çalışmada kullanılmak üzere tartılarak vakumlanmış torbalarda +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Antioksidan kapasitesinin belirleneceği deney aşamasında kullanılmak üzere ise her bir buğday çeşidinden ayrı ayrı 30 gram tartılıp öğütülmüştür. Bu öğütülmüş örnekler muhafaza edilmek üzere -20°C’ye alınmıştır.

3.2.2. Buğday Genotiplerinin Toplam Antioksidan Kapasitesilerinin (TAK) Belirlenmesi

3.2.2.1. ABTS•+ Stok Çözeltisinin Hazırlanması

ABTS•+ stok çözeltisi, 7 mmol/L sulu ABTS çözeltisinin 2.45 mmol/L potasyum persülfat ile reaksiyona sokulmasıyla ve 16 saat karanlık ortamda bekletilmesiyle önceden hazırlanmıştır.

3.2.2.2. ABTS•+ Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

ABTS•+ stok çözeltisinin önceden hazırlanan etanol su (50:50 v/v) çözeltisi ile 734 nm dalga boyunda 0,75-0,80 absorbans aralığına kadar seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

3.2.2.3. Trolox Çözeltisinin Hazırlanması

Trolox stok çözeltisinin metanolde çözündürülmesi ile 0, 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 µg/mL konsantrasyon aralığında standart trolox çözeltileri hazırlanmıştır.

3.2.2.4. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Her buğday örneğinden ~10 mg tartılmıştır. Aynı zamanda standart trolox çözeltileri de 100µl tartılmıştır ve 10ml ABTS çalışma solüsyonuyla karıştırılmıştır. 27 dakika boyunca 350 rpm'de karıştırıldıktan sonra 6080xg'de 2 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. 734 nm'de 2,5-4,5 mL'lik pipetler kullanılarak spektrofotometrik okumalar yapılmıştır.

3.2.3. Yerel Buğday Genotiplerinde Antioksidan ve Flavonoid Biyosentez Enzim Genlerinin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, tüm örnekler antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeyleri saptamak üzere öncelikle çimlendirilmiş, daha sonra saksı denemesi 1 ve saksı denemesi 2 kurularak yirmi günlük süre ile yetiştirilmiş, ardından hasat edilen buğday yapraklarından RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi ve ardından qPCR ile gen ifadesi ve veri analizi yapılmıştır (Şekil 3.1).



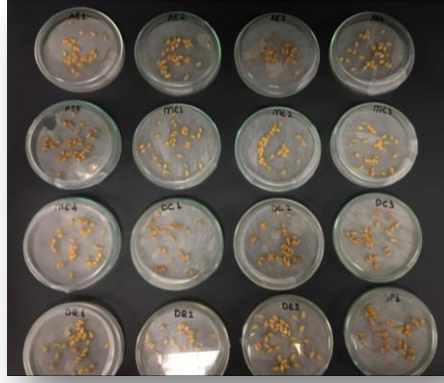
Şekil 3.1. Gen ifade analizi işlem akım şeması

3.2.3.1. Çimlendirme

Tez çalışmasına ait materyal Çizelge 3. 1’de verilmiştir.

Materyale ait buğday tohumları ayrı ayrı %20’lik (w/v) çamaşır suyunda 30 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu işlemi yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonunu takiben buğday taneleri, steril saf suda 45 dakika bekletilmiş 15 dakika aralıklarda buğdayların bekletildiği su süzülüp yenilenmiştir ve ardından yine steril saf suda durulama işlemi yapılmıştır.

Steril buğday tohumları öncelikle petri kaplarına ekilmiştir (Şekil 3.2). Petri kaplarına tabanlarını kaplayacak şekilde steril kurutma kâğıdı yerleştirilmiştir. Steril buğday tohumları kurutma kağıtlarının üzerine yerleştirip üzerlerine yaklaşık 2ml steril su eklenmiştir ve ardından +4°C’de karanlıkta nemli filtre kağıdında çimlenmeye bırakılmıştır. Her gün +4°C’deki buğday örnekleri kontrol edilmiştir ve kuruma görüldüğü durumlarda steril su ilave edilmiştir. Daha sonra çimlenmiş buğdaylar +4°C’den çıkarılıp toprağa ekilmiştir [92-94].



Şekil 3.2. Petri kaplarına ekilmiş buğday örnekleri

Çimlenen tohumlar Saksı Denemesi 1 ve Saksı Denemesi 2 için kullanılmıştır. Saksı Denemesi 1 ve Saksı Denemesi 2 arasındaki fark yalnızca çinko uygulamasıdır. Bu aşamada çinko uygulanmayacak buğday örnekleri (Saksı Denemesi 1) ile çinko uygulanacak buğday örneklerine ait saksılar (Saksı Denemesi 2) aynı ortamda bulunmakla birlikte, birbirlerinden uzaklaştırılmış ve paravan ile ayrılmışlardır.

3.2.3.1.1. Saksı Denemesi 1

Karanlık ve nemli ortamda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de çimlenmeye bırakılmış buğday tohumları bu aşamanın ardından küçük plastik saksılara ekilmişlerdir. Plastik saksılara ekimlerini takiben $18-20^{\circ}\text{C}$ ortam koşullarına alınıp yine ışık almamaları sağlanmış ve 2 gün süresince bu koşullarda bırakılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Işık almayan, $18-20^{\circ}\text{C}$ ortam koşullarında bekletilen buğday örnekleri



Şekil.3.4. Işık almayan, 18-20°C ortam koşullarında iki gün boyunca tutulan buğday örneklerinin aydınlık ortama alındığındaki görüntüsü

Buğdaylar karanlık ortam koşullarında 18-20°C sıcaklıkta iki gün bekletildikten sonra (Şekil 3.4) ışık almaları sağlanıp 6°C’de yetiştirmeye bırakılmışlardır. Buğdaylar yirmi günlük yetişkinliğe ulaştıktan sonra (Şekil 3.5), RNA izolasyonu için küçük metal bir makasla kesilmişlerdir. Saksı denemesi 1, iki biyolojik tekrar oluşturacak şekilde kurulmuştur. Toplanan yaprak örnekleri birleştirilerek ileri analizlerde kullanılmıştır.

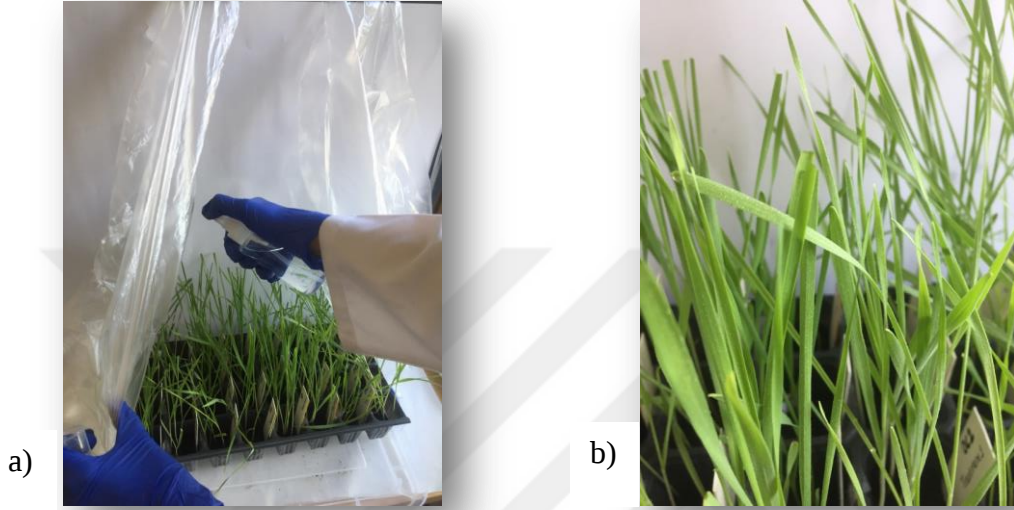


Şekil.3.5. Yirmi günlük yetişkinliğe ulaşan buğday yaprağı örnekleri

3.2.3.1.2. Saksı Denemesi 2

Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı şekilde yetiştirilmişler ve aynı şekilde Saksı denemesi 2 de iki biyolojik tekrar oluşturacak şekilde kurulmuştur. Saksı Denemesi 2’de çimlenmiş buğdaylara kardeşlenme aşamasına geldiklerinde çinko uygulaması yapılmıştır. Bu amaç için %0,5’lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi spreyle yapraklardan uygulanmıştır [95].

Uygulama sırasında (Şekil 3.6) her bir buğday yaprağının tamamen spray gübre ile ıslanmış olmasına dikkat edilmiştir. Hemen kurumaması için yapraklara temas etmeyecek şekilde etrafı naylon ile çevrenmiştir. Buğdaylar 20 günlük yetişkinliğe ulaştıktan sonra, RNA izolasyonu için küçük metal bir makasla kesilmişlerdir. Toplanan yaprak örnekleri birleştirilerek ileri analizlerde kullanılmıştır.



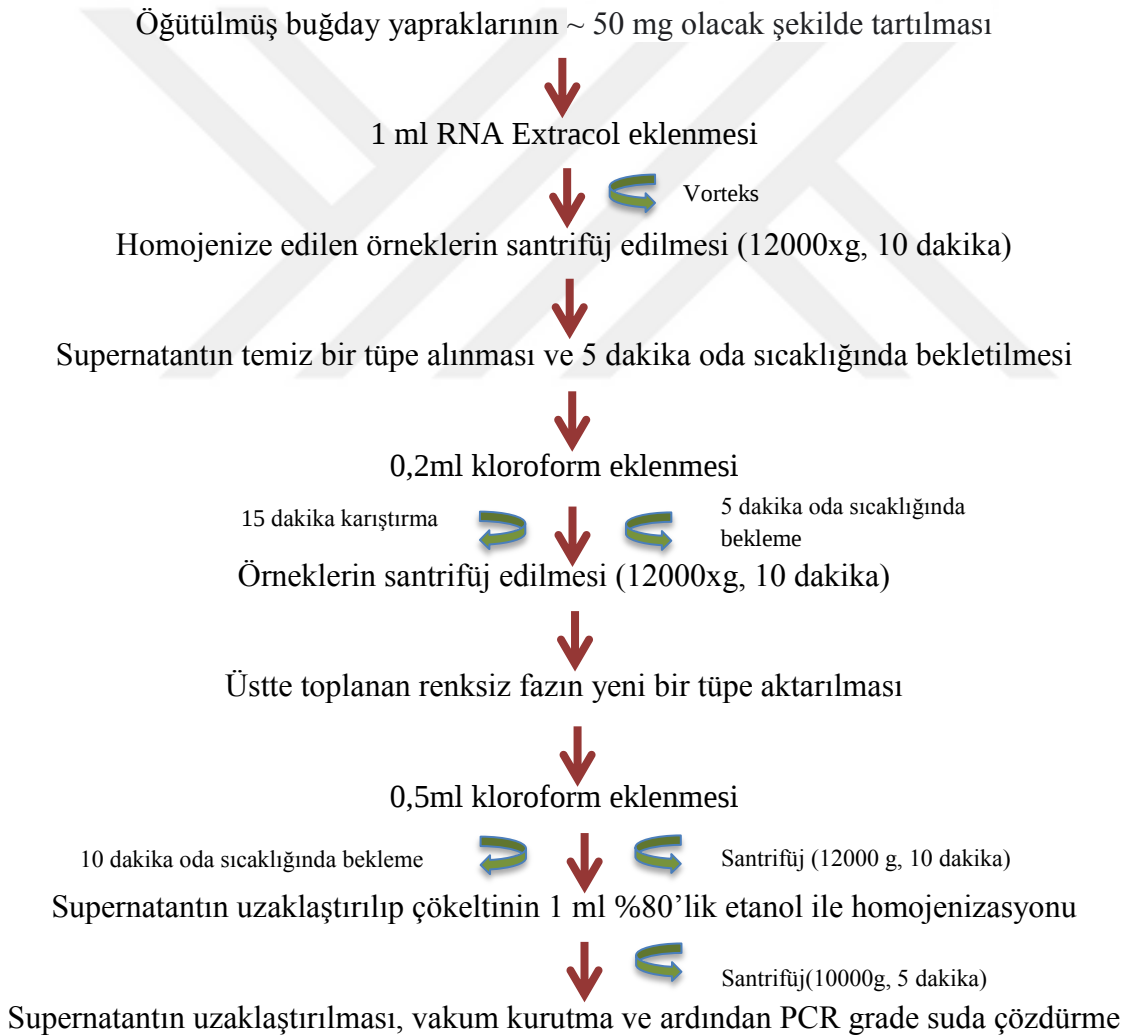
Şekil 3.6. a)Buğday yapraklarına yapılan spray çinko gübreleme uygulaması b)Çinko gübresi ile tamamen ıslanmış buğday yaprakları

Alkali toprak koşullarında çözünmesi güç bileşikler oluşturduklarından dolayı demir, çinko, mangan, bakır ve bor gibi mikro elementlerin alınımında yetersizlik görülür [96]. Bu sebeple çinko stresi uygulanacak örnekler çinko uygulaması yapraktan (üst) gübreleme yöntemiyle yapılmıştır. Kardeşlenme aşamasında örnekler %0,5 (w/v) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi uygulanmıştır [95, 97]. Çinko uygulaması yapılmayan ve üst gübrelemeyle çinko uygulanan örneklerde antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeyleri arasındaki farklılığın belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.2.3.2. RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi

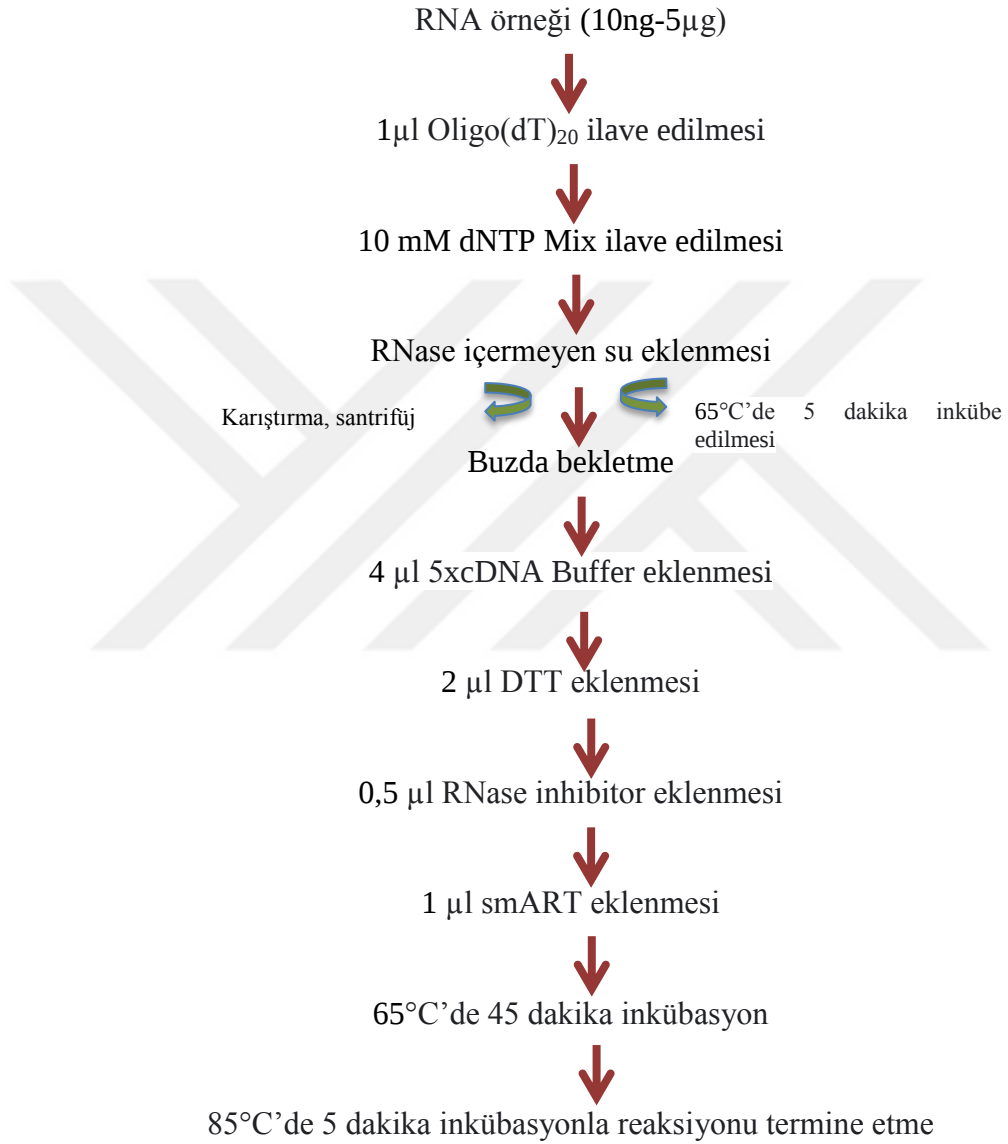
Hasat edilen örneklerden ivedilikle RNA izole edilmiştir. Bu amaç için EURx-E3700 RNA extracol kiti kullanılmıştır. İlk önce buğday yaprakları havanda tokmak kullanılarak ezilmiş sonra tartılarak üç paralele ayrılmıştır. Paralellerden bir tanesi stok

olarak -20°C'ye alınmış diğer iki paralel ile RNA izolasyonuna devam edilmiştir. RNAExtracol, RNA izolasyonunu kolaylaştırmak için tasarlanmış fenol, kaotropik tuzlar ve diğer bileşenlerin monofazik bir çözeltisidir. Fenol ve guanidin izotiyosiyanat içerir. Yöntem, organik çözücüler kullanılarak nükleik asit sulu çözeltilerinin ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Öğütülmüş buğday örnekleri RNA Extracol ile homojenize edilir. Kloroform eklenir ve homojenat, berrak bir üst sulu tabaka, bir interfaz ve bir alt organik tabaka halinde ayrılır. Fazlar arasında nükleik asitlerin ayrılması pH'a bağlıdır. pH 4-6'da DNA organik faza geçerken RNA sulu fazda (RNA içeren) kalır. İzopropanol eklenerek sulu tabakadan RNA'nın çökmesi sağlanır. Çökeltilen RNA, safsızlıkları gidermek için etanol ile yıkanır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. EURX RNA extracol kitinin bitki dokusu için RNA ekstraksiyon protokolü

RNA ekstraktlarının miktar ve kalitesi spektrofotometrik yöntem (Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer) ile ölçülmüştür. Hasat edilen buğday yapraklarından RNA izole edilmesini takiben cDNA sentezi yapılmıştır. Bu amaç için ise “EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis Kit” kullanılmıştır (Şekil 3.8). Kitin prosedürü ters transkriptaz enzimine dayanmaktadır. Enzim, *E. coliden* saflaştırılmıştır.



Şekil.3.8. EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis Kit protokolü

3.2.3.3. Gen İfadesinin Kantitatif Analizi

Bu tez çalışmasında, örneklerdeki antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi için Ters Transkriptaz (Reverse Transcriptase) Polimeraz Zincir Reaksiyon Tekniği (RT-PCR) kullanılmıştır.

3.2.3.3.1. Optimizasyon

Çalışmada LightCycler® 96 (Roche) qPCR cihazı ve 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR kiti kullanılmış ve kit protokolünde verilen programlar izlenmiştir. Ancak Ma ve arkadaşlarının [33] çalışmasında tasarlanan primerlerin optimizasyon çalışmaları sırasında RealQ Plus 2x Master Mix Green Low ROX kiti kullanılmıştır.

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla, LightCycler® 96 (Roche) qPCR cihazında gradient seçeneği seçilerek yürütme yapılmıştır. Her bir primerin çalıştığı bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra kontrol buğday genotiplerinde her bir primer için belirlenen sıcaklıklarda çalışılarak standart eğrileri oluşturulmuştur. Çalışmanın bu basamağı için denemeler ve gerekli optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Primerlerin hacim/konsantrasyon değerleri ve qPCR döngü programları Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ma ve arkadaşlarının çalışmasında [33] tasarlanmış primerler için reaksiyon başına son hacim/konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı

<i>Bileşen</i>	<i>Son Konsantrasyon</i>	<i>µL/reaksiyon</i>
<i>RealQ Plus 2x Master Mix Green Low ROX</i>	2x	10 µL
<i>İleri Primer (20 µM)</i>	0.4 µM	0.8 µL
<i>Geri Primer (20 µM)</i>	0.4 µM	0.8 µL
<i>cDNA</i>		2 µL
<i>ddH₂O</i>		6,4 µL
<i>Toplam Reaksiyon Hacmi</i>		20 µL

Çizelge 3.5. Ma ve arkadaşlarının çalışmasında [33] tasarlanmış primerler için qPCR döngü programı

Basamak	Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sinyal Alımı	Döngüler
1	Başlangıç Aktivasyonu		95	900	Hayır	1
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	Hayır	40
		Tavlama	50-58	30	Hayır	
		Uzama	72	60	Evet	

3.2.3.3.2. Standart Eğri Eldesi

Ticari genotipler olan Demir 2000 ve Eminbey genotiplerinden ekstrakte edilen RNA'lerden cDNA sentezlendikten sonra cDNA'lar 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 ve 1/6 seyreltme oranlarında seyreltilmiş ve *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerine ait primerler ile qPCR yapılmıştır. Her dilüsyon üç paralel olarak hazırlanmış ve qPCR'da verdikleri Cq değerlerine göre konsantrasyona karşılık Cq grafikleri çizilerek standart eğriler elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* primerleri için reaksiyon başına son hacim/konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı

<i>Bileşen</i>	<i>Son Konsantrasyon</i>	<i>µL/reaksiyon</i>
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX)	4x	4 µL
İleri Primer (20 µM)	0.5 µM	0.3 µL
Geri Primer (20 µM)	0.5 µM	0.3 µL
cDNA		2 µL
ddH ₂ O		13.4 µL
Toplam Reaksiyon Hacmi		20 µL

Çizelge 3.7. SOD primeri için qPCR döngü programı

Basamak	Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sinyal Alımı	Döngüler
1	Başlangıç Aktivasyonu		95	720	Hayır	1
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	Hayır	40
		Tavlama	53	30	Hayır	
		Uzama	72	60	Evet	

Çizelge 3.8. CAT primeri için qPCR döngü programı

Basamak	Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sinyal Alımı	Döngüler
1	Başlangıç Aktivasyonu		95	720	Hayır	1
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	Hayır	40
		Tavlama	57	30	Hayır	
		Uzama	72	60	Evet	

Çizelge 3.9. PAL primeri için qPCR döngü programı

<i>Basamak</i>	<i>Aşama</i>		<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Süre (s)</i>	<i>Sinyal Alımı</i>	<i>Döngüler</i>
1	Başlangıç Aktivasyonu		95	720	Hayır	1
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	Hayır	40
		Tavlama	57	30	Hayır	
		Uzama	72	60	Evet	

Çizelge 3.10. *CHS* primeri için qPCR döngü programı

<i>Basamak</i>	<i>Aşama</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Süre (s)</i>	<i>Sinyal Alımı</i>	<i>Döngüler</i>
1	Başlangıç Aktivasyonu	95	720	Hayır	1
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	Hayır
		Tavlama	50	30	Hayır
		Uzama	72	60	Evet

3.2.3.3.3. Yerel Buğday Çeşitlerinin qPCR Analizi

Her bir buğday genotipine ait cDNA'lar *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerinin her biri için seyretilerek pozitif kontrollerle beraber optimize edilen ve standart eğri eldesi için kullanılan qPCR programları (Bölüm 3.2.3.3.2) uygulanmıştır. Her dilüsyon üç paralel olarak hazırlanmış ve absolut kuantifikasyon metoduna göre gen ifade değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Veri Analizi

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS-16.0 programından yararlanılarak yapılmıştır. Birbirinden bağımsız üç paralel halinde yapılan ölçümlerin ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile incelenmiştir. Grup çiftleri arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı araştırmak için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel buğday çeşitlerinin tamamının *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerinin her biri için qPCR analizinden hemen sonra Lightcycler 96 yazılımı ile Cq değerleri Bölüm 4.3.1'de gösterilmiştir. Ticari buğday çeşitlerinin bilinen cDNA konsantrasyonlarına ait Cq verileri ile standart eğriler oluşturulmuştur. Standart eğri denklemleri ve yerel buğday genotiplerine ait Cq değerleri kullanılarak absolut kuantifikasyon metoduna göre gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. Her bir yerel buğday genotipine ait gen ifade miktarının hesaplamasında Şekil 3.9'da belirtilen formül kullanılmıştır.



Şekil.3.9. Absolut kuantifikasyon gen ifade miktarı (Cq: Kantifikasyon döngüsü,
b: Standart eğride y eksenini kesen nokta, m: Standart eğri eğimi)



4. BULGULAR

Bu tez çalışmasının amacı, yerel buğday genotiplerinde antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeyleri ve iki farklı doz çinkonun bu genlerin ifade düzeyine olan etkisinin transkriptomik düzeyde araştırılmasıdır.

Bu amaçla öncelikle yerel buğday genotipleri belirlenmiş, bu genotiplerin antioksidan kapasitesi ölçülmüştür. Daha sonra yerel buğday genotipleri çimlendirilerek bu sırada iki farklı saksı denemesi kurularak bir saksı denemesinde kardeşlenme aşamasında yaprakтан çinko biyofortikasyonu uygulanmıştır. Buğday yaprakları yirmi günlük yetişkinliğe ulaştıklarında hasat edilerek ivedilikle RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri ileri gen ifade analizlerinde kullanılmıştır. Bunun için öncelikle ticari buğday çeşitleri (Demir 2000 ve Eminbey) bilinen cDNA konsantrasyonları kullanılarak antioksidan enzim genleri (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genleri (*PAL* ve *CHS*) için RT-PCR analizleri için optimizasyon gerçekleştirilmiş ve standart eğriler elde edilmiştir. Bu aşamanın ardından seçilen bütün buğday genotiplerinde RT-PCR analizleri ile gen ifade düzeyleri ölçülmüştür. Bundan sonra istatistiksel analizler ile karşılaştırmalı değerlendirmeler verilmiştir.

4.1. Çalışmada kullanılan yerel buğday genotipleri

Buğday tanesinin birçok botanik veya taksonomik sınıflandırması olmasına rağmen, bitki bilimciler buğdayı (1) gelişme tabiatı (yazlık, kışlık ve alternatif), (2) protein içeriği, (3) gluten kalitesi (güçlü elastik gluten ve güçlü elastik olmayan gluten) ve (4) tane rengi (kırmızı, sarı, beyaz, mavi, mor ve siyah) gibi özelliklerine göre sınıflara ayırırlar. Bu özelliklerden hareketle yumuşak buğdayın kek ve turta yapımına uygun olduğu, ekmek yapımında ise sert buğdayın kullanıldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada ise Demir 2000 (*Triticum aestivum*) ve Eminbey (*Triticum durum*) ticari çeşitlerinin yanı sıra Çizele 4.1’de verilen 14 farklı yerel buğday çeşidi kullanılmıştır. Bunların içinde *Triticum aestivum* genotiplerinden olan Ak-702, Köse 220/33, Sünter, Zerun; *Triticum monococcum* genotiplerinden olan Mergüze, Atasiyez, Siyez 4 ve Siyez Pop.; *Triticum dicoccum* genotiplerinden olan Kafkas, Kavılca kırmızı ve Gernik;

Triticum durum genotiplerinden olan Karakılçık ve Sarı buğday ve *Triticum spelta* genotipinden (42 kromozomlu ekmeklik buğday sınıfında) Spelta Sarı Başaklı bir hat bulunmaktadır. Modern ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*), kavuzlu buğdayın (*Triticum spelta*) kavuzsuz formu olarak kabul edilmektedir [98].

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan yerel buğday genotipleri ve bazı morfolojik özellikleri ile tane görüntüsü.

<i>Buğday isimleri</i>	<i>Morfolojik Özellikleri</i>	<i>Tane Görüntüsü</i>
<i>Ak-702(tescilli yerel çeşit)-ekmeklik buğday</i>	-Tescil yılı:1931 Kılçıklı beyaz başaklı Bitki boyu uzun Yumuşak beyaz taneli	

*Köse 220/33(tescilli
yerel çeşit)-ekmeklik
buğday*

-Tescil yılı:1939

-Renkli başaklı

-Kılçıksız

-Beyaz yumuşak
taneli

-Bitki boyu uzun



*Sünter(yerel çeşit
ancak tescilli değil)-
ekmeklik buğday*

-Kırmızı kavuzlu

-Kılçıklı, renkli
başaklı

- Beyaz taneli

-Bitki boyu uzun

[99]



*Zerun (yerel çeşit
ancak tescilli değil)-
ekmeklik buğday*

- Renkli başaklı
- Kılçıksız
- Kavuzları tüylü
- Beyaz taneli [99]



*Demir 2000 (kültür
çeşidi)-ekmeklik
buğday*

- Tescil Yılı: 2000
- Kılçıklı ve beyaz başaklı
- kırmızı sert taneli
- orta uzun boylu



*Mergüze (tescilli
yerel çeşit)-Siyez*

- Tescil yılı: 2021
- Kılçıklı ve beyaz başaklı
- Beyaz kavuzlu
- Kehribar taneli
- Orta büyüklükte taneli [100]



*Atasiyez (tescilli
yerel çeşit)-Siyez*

-Tescil yılı: 2021

-Kılçıklı ve beyaz
başaklı

-Beyaz kavuzlu

-Kehribar taneli

-Orta büyüklükte
taneli [100]



Siyez 4 (hat)

-Kılçıklı ve beyaz
başaklı

-Beyaz kavuzlu

-Kehribar taneli

-Orta büyüklükte
taneli [100]



Siyez Popülasyon

-Kılçıklı ve beyaz
ve siyah kılçıklı
başaklara sahip

-Beyaz ve siyah
kavuzlu

-Kehribar renkte
ve orta
büyüklükte taneli
[100]



*Kafkas (tescilli yerel
çeşit)- Kavılca*

-Tescil yılı: 2021

-Sert kavuzlu ve
kılçıklı

Beyaz başaklı

-Orta -sert taneli
[101]



*Kavılca Kırmızı
başak (hat)*

-Sert kavuzlu ve
kılçıklı

Renkli başaklı

Kehribar renkli

Orta-sert
taneli[101]



Gernik(popülasyon)
(Kavılca)

-Beyaz-renkli
başaklı ve kılçıklı

-Tane rengi
kehribar

-Büyük taneli

Orta sert taneli
[100, 101]



Karakılçık (yerel
çeşit) Makarnalık
buğday

-Kara kılçıklı

-Koyu sarı tane
renkli

-Uzun boylu

-Sert taneli



Sarı buğday(yerel çeşit) Makarnalık buğday

-Tescil yılı:1931

-Kılçıklı

-İri taneli

-Tane rengi sarı

-Uzun boylu



Eminbey (kültür çeşidi)-makarnalık buğday

-Tescil yılı: 2009

-Kılçıklı ve beyaz başaklı

-Başakları orta uzun, dik

-Sağlam saplı

-Tane şekli uzamış yumurta biçimindedir.



Spelta Sarı başaklı

*Kavuzlu ekmeklik
buğday (hat)*

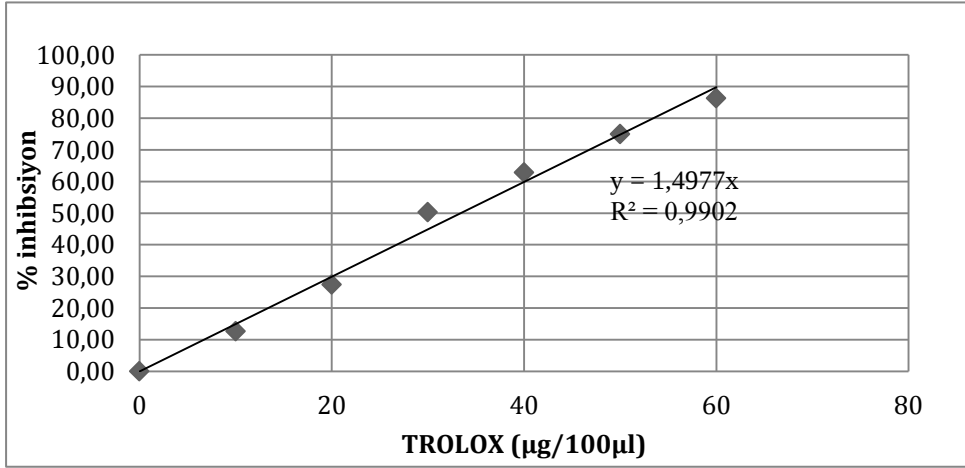
- İri kavuzlu
- Kılçıksız
- Bitki boyu uzun
- İri tohumlu
- Sapı sağlam
- Geççi



Çizelge 4.1.'de morfolojik özellikler arasında tane rengi, tane büyüklüğü gibi özelliklere yer verilmiştir. Buna göre Köse 220/33 genotipi beyaz tane rengine ve tüylü kılçıksız kavuza; Gernik genotipi kehribar tane rengine ve kılçıklı kavuza; Karakılçık genotipi ise koyu sarı tane rengine ve kılçıklı kavuza sahiptir.

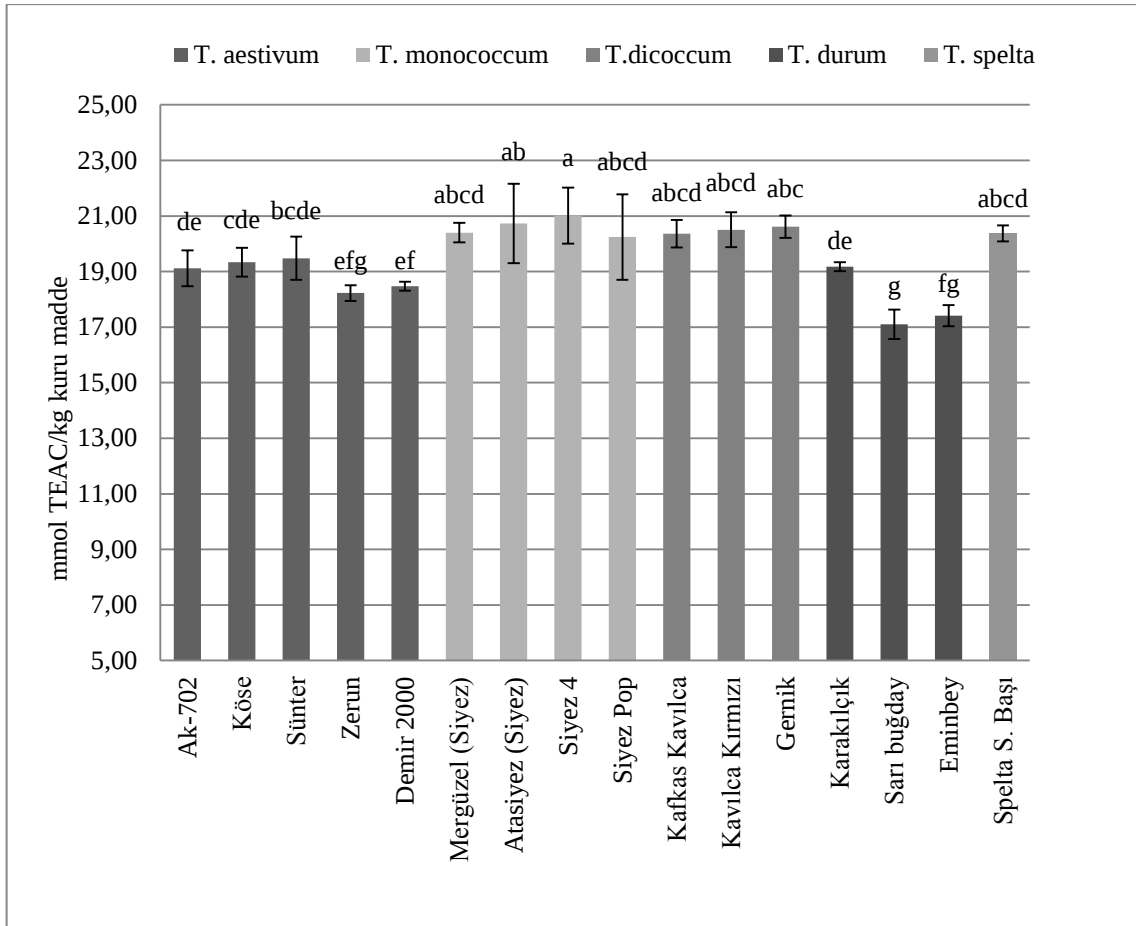
4.2. Yerel Buğday Genotiplerinin Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Buğday genotiplerinin toplam antioksidan kapasitesi, QUENCER hızlı antioksidan testlerinden olan ABTS testi ile belirlenmiştir. Bu amaç için öncelikle ABTS standart kalibrasyon eğrisi 734 nm'de TROLOX ($\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$) konsantrasyonuna karşı % inhibisyonun grafiğe geçirilmesi ile oluşturulmuştur. Şekil 4.1.'de Trolox konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ABTS radikali için çizilen kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. (% İnhibisyon (örnek) = (Abs saf – Abs örnek)/Abs saf x 100)



Şekil 4.1. Standart TROLOX konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ABTS radikali için kalibrasyon eğrisi.

TEAK (TROLOX eşdeğeri antioksidan kapasite), numunelerde kuru fazda serbest radikal temizleme kabiliyetini göstermek için kullanılmış ve buğday numunesinin yüzde inhibisyonu ile TROLOX kalibrasyon eğrisinin eğimi arasındaki oran alınarak belirlenmiştir. (mmol TEAK / kg buğday km = (% İnhibisyon / kalibrasyon eğimi x kuru madde cinsinden numune miktarı) x 10)



Şekil 4.2. ABTS radikal kullanarak analiz edilmiş yerel buğday çeşitlerinin toplam antioksidan kapasite değerleri; a-g, Farklı küçük harfler buğday çeşitleri arasında istatistiksel farklılık göstermektedir ($p < 0.05$).

Toplam antioksidan kapasitesi, antioksidanların önceden oluşturulmuş serbest radikalleri uzaklaştırma yeteneğini tanımlar. Yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında en yüksek antioksidan kapasitesinin Siyez 4 genotipine ait olduğu saptanmıştır.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek antioksidan kapasitesine sahip genotipler Köse 220/33 ve Sünter genotipleri; en az antioksidan aktivitesine sahip olan ise Zerun genotipi olduğu belirlenmiştir.

Triticum monococcum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez 4 genotipinin antioksidan kapasitesinin Mergüze, Atasiyez ve Siyez 4 genotiplerine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Bununla birlikte, *Triticum monococum* genotiplerinin antioksidan kapasitelerinin, *Triticum aestivum* genotiplerine göre daha istatistiksel açıdan anlamlı fark gösterdiği ve yüksek olduğu saptanmıştır.

Triticum dicocum genotipleri karşılaştırıldığında, Kafkas ve Kavılca Kırmızı genotiplerinin Gernik genotipine göre daha düşük antioksidan kapasitesine sahip olduğu istatistiksel olarak da doğrulanmıştır.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek antioksidan kapasitesine sahip genotip Karakılçık'tır.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak genotipindeki antioksidan kapasitesinin ticari çeşitler olan Demir 2000 ve Eminbey'den yüksek olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da ispatlanmıştır.

4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi

4.3.1. Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA İzolasyon Sonuçları

Çizelge 4.2.'de Yerel buğday çeşitlerinden EURx RNA extracol kiti kullanılarak kit prosedürüne göre izole edilen RNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarı, (A260/A280) ve (A260/A230) değerleri karşılaştırılmalı olarak verilmiş; Çizelge 4.3.'te ise Yerel buğday EURx RNA extracol kiti kullanılarak kit prosedürüne göre izole edilen RNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA izolasyon sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	A(Abs) 260	A(Abs) 280	A 260/280	A 260/230
AE1-1	Ak-702		762,700	19,067	13,420	1,42	0,60
AE1-2			1301,700	32,544	20,199	1,61	0,96
AE2-1	Köse		906,600	22,665	13,874	1,63	0,80
AE2-2	220/33		847,600	21,191	13,493	1,57	0,73
AE3-1	Sünter	<i>Triticum aestivum</i>	207,500	5,187	3,425	1,51	0,44
AE3-2			184,300	4,608	3,149	1,46	0,43
AE4-1	Zerun		1567,000	3,918	2,872	1,36	0,39
AE4-2			231,300	5,782	3,665	1,58	0,56
AE5-1	Demir		589,600	14,739	9,076	1,67	0,86
AE5-2	2000		378,400	9,460	6,454	1,47	0,59
MC1-1	Mergüze		856,000	21,400	13,499	1,59	1,29
MC1-2	(Siyez)		341,000	8,524	5,138	1,66	0,63
MC2-1	Atasiyez		105,800	2,645	1,777	1,49	0,36
MC2-2	(Siyez)	<i>Triticum monococcum</i>	320,000	8,000	5,176	1,55	0,69
MC3-1	Siyez 4		234,500	5,862	3,216	1,82	1,35
MC3-2			217,100	5,427	3,067	1,77	1,79
MC4-1	Siyez Pop		268,600	6,716	3,952	1,70	1,27
MC4-2			184,000	4,600	2,710	1,70	1,47
DC1-1	Kafkas		339,100	8,477	5,018	1,69	0,53
DC1-2	(Kavılca)		852,400	21,309	13,146	1,62	0,79
DC2-1	Kavılca	<i>Triticum dicoccum</i>	269,700	6,743	4,096	1,65	0,48
DC2-2	Kırmızı		286,500	7,162	4,282	1,67	0,58
DC3-1	Gernik		736,100	18,403	11,809	1,56	0,82
DC3-2			777,600	19,440	13,342	1,46	0,68
DR1-1	Karakılçık		612,100	15,302	11,005	1,39	0,55
DR1-2			721,600	18,040	13,845	1,30	0,52
DR2-1	Sarı buğday	<i>Triticum durum</i>	403,100	10,077	6,143	1,64	0,61
DR2-2			1842,000	46,060	30,354	1,52	1,12
DR3-1	Eminbey		469,400	11,735	7,489	1,57	0,69
DR3-2			649,800	16,244	11,469	1,42	0,50
SP-1	Spelta S.	<i>Triticum spelta</i>	912,500	22,813	14,362	1,59	0,76
SP-2	Başak		520,300	13,008	8,063	1,61	0,77

Çizelge 4.2. incelendiğinde A 260/280 değeri 1,36 ile 1,82 arasında değişmektedir. 260 nm ve 280 nm'de absorbands oranı, DNA ve RNA'nın saflığını değerlendirmek için kullanılır. Burada ~1.8-2.0 arasındaki bir oran genellikle RNA için "saf" olarak kabul edilir. Her iki durumda da oran önemli ölçüde düşükse, 280 nm'de veya yakınında güçlü bir şekilde muhtemel protein, fenol veya diğer kirlleticilerin varlığını gösterebilir.

Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA’larda Nanodrop 2000c spektrofotometre ölçümü sonucunda elde edilen saflık değerleri 1,8 değerinden düşük olduğundan protein, fenol veya diğer kirletici kontaminasyonu düşünülebilir. İzole edilen RNA’lardan cDNA sentezi yapıldığında 260/280 saflık değerlerinde büyük bir değişme olmadığı, daha sonra bu cDNA’lar kullanılarak yapılan qPCR denemelerinde inhibisyon oluşmadığı saptanmıştır.

260/230 oranı nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olarak kullanılır. Beklenen 260/230 değerleri genellikle 2.0-2.2 aralığındadır. Oranın önemli ölçüde düşük olması durumunda beklendiği gibi, 230 nm’de absorbe eden kirleticilerin varlığını ve DNA kontaminasyonunu gösterebilir. Ancak qPCR yoluyla transkript hedeflerinin nicelleştirilmesi için cDNA kullanılması planlanmış ve cDNA sentezinden sonra ölçülen 260/230 değeri (Çizelge 4.5) ileri çalışmalar için kabul edilmiştir [102].

Çizelge 4.3. Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA'lara ait varyasyon katsayısı sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	Ortalama	Standart Sapma	Varyasyon Katsayısı
AE1-1	Ak-702		762,70	1032,20	269,50	26,11
AE1-2			1301,70			
AE2-1	Köse		906,60	877,10	29,50	3,36
AE2-2	220/33		847,60			
AE3-1	Sünter	<i>Triticum aestivum</i>	207,50	195,90	11,60	5,92
AE3-2			184,30			
AE4-1	Zerun		1567,00	899,15	667,85	74,28
AE4-2			231,30			
AE5-1	Demir		589,60	484,00	105,60	21,82
AE5-2	2000		378,40			
MC1-1	Mergüze		856,00	598,50	257,50	43,02
MC1-2	(Siyez)		341,00			
MC2-1	Atasiyez		105,80	212,90	107,10	50,31
MC2-2	(Siyez)		320,00			
MC3-1	Siyez 4	<i>Triticum monococcum</i>	234,50	225,80	8,70	3,85
MC3-2			217,10			
MC4-1	Siyez		268,60	226,30	42,30	18,69
MC4-2	Pop.		184,00			
DC1-1	Kafkas		339,10	595,75	256,65	43,08
DC1-2	(Kavılca)		852,40			
DC2-1	Kavılca	<i>Triticum dicoccum</i>	269,70	278,10	8,40	3,02
DC2-2	Kırmızı		286,50			
DC3-1	Gernik		736,10	756,85	20,75	2,74
DC3-2			777,60			
DR1-1	Karakılçık		612,10	666,85	54,75	8,21
DR1-2			721,60			
DR2-1	Sarı	<i>Triticum durum</i>	403,10	1122,55	719,45	64,09
DR2-2	buğday		1842,00			
DR3-1	Eminbey		469,40	559,60	90,20	16,12
DR3-2			649,80			
SP-1	Spelta S. Başak	<i>Triticum spelta</i>	912,50	716,40	196,10	27,37
SP-2			520,30			

Çizelge 4.3. incelendiğinde *Triticum aestivum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 1032,20 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 195,90 ng/μl'dir. *Triticum monococcum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 598,50 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 212,90 ng/μl'dir. *Triticum dicoccum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 756,85 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 278,10 ng/μl'dir. *Triticum durum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı

1122,55 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 559,60 ng/μl'dir. *Triticum spelta* genotipi olan Spelta S. Başak genotipinden elde edilen RNA miktarı 716,40 ng/μl'dir.

Burada elde edilen tüm konsantrasyonlar cDNA sentezi ve RT-PCR uygulamasını yapabilmek için yeterlidir.

4.3.2. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Uygulanmış Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA İzolasyon Sonuçları

Çizelge 4.4.'te yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinden EURx RNA extracol kiti kullanılarak kit prosedürüne göre izole edilen RNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarı, (A260/A280) ve (A260/A230) değerleri karşılaştırılmalı olarak verilmiş; Çizelge 4.5.'te ise yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinden RNA Extracol yöntemi kullanılarak izole edilen RNA için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.4. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Yapılmış Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA izolasyon sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	A(Abs) 260	A(Abs) 280	A 260/280	A 260/230	
AE1-1	Ak-702	<i>Triticum aestivum</i>	884,600	22,116	14,473	1,53	0,76	
AE1-2			994,900	24,872	15,129	1,64	0,87	
AE2-1	Köse		796,400	19,910	12,216	1,63	0,62	
AE2-2	220/33		800,400	20,010	12,081	1,66	0,77	
AE3-1	Sünter		178,000	4,451	2,960	1,50	0,38	
AE3-2			272,700	6,818	4,181	1,63	0,68	
AE4-1	Zerun		234,600	5,866	3,904	1,50	0,46	
AE4-2			171,400	4,284	3,009	1,42	0,38	
AE5-1	Demir		777,900	19,447	12,001	1,62	0,78	
AE5-2	2000		791,300	19,782	12,223	1,62	0,78	
MC1-1	Mergüze	<i>Triticum monococcum</i>	279,000	6,974	4,242	1,64	0,64	
MC1-2	(Siyez)		282,300	7,058	4,452	1,59	0,74	
MC2-1	Atasiyez		272,000	6,801	4,283	1,59	0,53	
MC2-2	(Siyez)		194,300	4,859	3,100	1,57	0,44	
MC3-1	Siyez 4		249,900	6,247	3,508	1,78	2,01	
MC3-2			205,000	5,125	2,859	1,79	1,03	
MC4-1	Siyez Pop.		158,400	3,961	2,280	1,74	1,55	
MC4-2			121,300	3,032	1,813	1,67	0,67	
DC1-1	Kafkas		<i>Triticum dicoccum</i>	4423,000	11,057	6,427	1,72	0,68
DC1-2	(Kavılca)			1537,600	38,441	25,647	1,50	1,22
DC2-1	Kavılca	455,200		11,379	6,638	1,71	0,75	
DC2-2	Kırmızı	272,900		6,824	4,203	1,62	0,49	
DC3-1	Gernik	651,400		16,284	10,824	1,50	0,66	
DC3-2		669,100		16,728	10,876	1,54	0,69	
DR1-1	Karakılçık	585,400		14,635	10,387	1,41	0,45	
DR1-2		345,200		8,631	5,565	1,55	0,53	
DR2-1	Sarı buğday	<i>Triticum durum</i>		852,000	21,301	13,220	1,61	0,66
DR2-2				627,100	15,677	10,117	1,55	0,65
DR3-1	Eminbey	469,200	11,729	7,070	1,66	0,70		
DR3-2		627,500	15,688	11,544	1,36	0,44		
SP-1	Spelta S.	<i>Triticum spelta</i>	627,000	15,674	11,064	1,42	0,45	
SP-2	Başak		617,300	15,432	9,974	1,55	0,54	

DNA ve RNA saflık değerlendirme kriterlerinden Bölüm 4.3.1’de basedilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde A 260/280 değeri 1,36 ile 1,79 arasında değişmektedir. Buna göre Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Yapılmış Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA’larda Nanodrop 2000c spektrofotometre ölçümü sonucunda elde edilen saflık değerleri 1,8 değerinden düşük olduğundan protein, fenol veya diğer kirlenici kontaminasyonu düşünülebilir. İzole edilen RNA’lardan cDNA sentezi yapıldığında 260/280 saflık değerlerinde büyük bir değişme olmadığı, daha sonra bu

cDNA'lar kullanılarak yapılan qPCR denemelerinde inhibisyon oluşmadığı saptanmıştır.

Nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olan 260/230 oranları 2.0'den düşük olduğu için 230 nm'de absorbe eden kirleticilerin varlığından bahsedilebilir. Ancak qPCR yoluyla transkript hedeflerinin nicelleştirilmesi için cDNA kullanılması planlanmış ve cDNA sentezinden sonra ölçülen 260/230 değeri (Çizelge 4.5) ileri çalışmalar için kabul edilmiştir.



Çizelge 4.5. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Uygulanmış Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan elde edilen RNA'lara ait varyasyon katsayısı sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	Ortalama	Standart Sapma	Varyasyon Katsayısı
AE1-1	Ak-702	Triticum aestivum	884,60	939,75	55,15	5,87
AE1-2			994,90			
AE2-1	Köse		796,40	798,40	2,00	0,25
AE2-2	220/33		800,40			
AE3-1	Sünter		178,00	225,35	47,35	21,01
AE3-2			272,70			
AE4-1	Zerun		234,60	203,00	31,60	15,57
AE4-2			171,40			
AE5-1	Demir		777,90	784,60	6,70	0,85
AE5-2	2000		791,30			
MC1-1	Mergüze		279,00	280,65	1,65	0,59
MC1-2	(Siyez)		282,30			
MC2-1	Atasiyez		272,00	233,15	38,85	16,66
MC2-2	(Siyez)		194,30			
MC3-1	Siyez 4	Triticum monococcum	249,90	227,45	22,45	9,87
MC3-2			205,00			
MC4-1	Siyez		158,40	139,85	18,55	13,26
MC4-2	Pop.		121,30			
DC1-1	Kafkas	4423,00	2980,30	1442,70	48,41	
DC1-2	(Kavılca)	1537,60				
DC2-1	Kavılca	455,20	364,05	91,15	25,04	
DC2-2	Kırmızı	272,90				
DC3-1	Gernik	651,40	660,25	8,85	1,34	
DC3-2		669,10				
DR1-1	Karakılçık	585,40	465,30	120,10	25,81	
DR1-2		345,20				
DR2-1	Sarı	852,00	739,55	112,45	15,21	
DR2-2	buğday	627,10				
DR3-1	Eminbey	469,20	548,35	79,15	14,43	
DR3-2		627,50				
SP-1	Spelta S. Başak	Triticum spelta	627,00	622,15	4,85	0,78
SP-2			617,30			

Çizelge 4.5. incelendiğinde *Triticum aestivum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 939,75 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 203,00 ng/μl'dir. *Triticum monococcum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 280,65 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 139,85 ng/μl'dir. *Triticum dicoccum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 2980,30 ng/μl, ortalama en düşük RNA miktarı 364,05 ng/μl'dir. *Triticum durum* genotipleri için ortalama en yüksek RNA miktarı 739,55 ng/μl,

ortalama en düşük RNA miktarı 465,30 ng/μl'dir. *Triticum spelta* genotipi olan Spelta S. Başak genotipinden elde edilen RNA miktarı 622,15 ng/μl'dir.

Burada elde edilen tüm konsantrasyonlar cDNA sentezi ve RT-PCR uygulamasını yapabilmek için yeterlidir.

4.3.3. Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA'lardan Sentezlenen cDNA Sonuçları

Çizelge 4.6.'da yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA'lar ve "EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanılarak kit prosedürüne göre sentezlenen cDNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarı, (A260/A280) ve (A260/A230) değerleri karşılaştırılmalı olarak verilmiş; Çizelge 4.7.'de ise yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA'lar ve "EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanılarak kit prosedürüne göre sentezlenen cDNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. Yerel buğday çeşitlerine ait cDNA sentez sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	A(Abs) 260	A(Abs) 280	A 260/280	A 260/230	
AE1-1	Ak-702	<i>Triticum aestivum</i>	1020,60	30,93	20,98	1,47	0,87	
AE1-2			955,00	28,94	19,91	1,45	0,92	
AE2-1	Köse		979,90	29,70	19,82	1,50	1,00	
AE2-2	220/33		839,30	25,43	16,14	1,58	1,01	
	220/33							
AE3-1	Sünter		723,90	21,94	14,01	1,57	1,14	
AE3-2			779,90	23,63	14,97	1,58	1,22	
AE4-1	Zerun		989,80	29,99	18,59	1,61	1,44	
AE4-2			799,10	24,22	15,52	1,56	1,26	
AE5-1	Demir		817,50	24,77	16,13	1,54	1,01	
AE5-2	2000		810,10	24,55	16,43	1,49	0,93	
MC1-1	Mergüze	<i>Triticum monococcum</i>	1090,00	33,03	20,20	1,64	1,56	
MC1-2	(Siyez)		1162,90	35,24	22,23	1,59	1,20	
MC2-1	Atasiyez		753,80	22,84	14,64	1,56	1,54	
MC2-2	(Siyez)		903,40	27,38	14,86	1,53	1,43	
MC3-1	Siyez 4		1082,20	32,79	19,73	1,66	1,54	
MC3-2			509,50	15,44	11,59	1,33	1,15	
MC4-1	Siyez Pop.		976,50	29,54	18,67	1,58	1,50	
MC4-2			990,60	30,02	18,49	1,62	1,48	
DC1-1	Kafkas		<i>Triticum dicoccum</i>	1439,40	43,62	27,92	1,56	1,30
DC1-2	(Kavılca)			1757,20	53,25	33,11	1,61	1,40
DC2-1	Kavılca	1067,70		32,35	22,67	1,43	1,11	
DC2-2	Kırmızı	1008,50		30,56	20,64	1,48	0,99	
DC3-1	Gernik	945,70		28,66	19,71	1,45	1,14	
DC3-2		939,10		28,46	20,15	1,41	0,87	
DR1-1	Karakılçık	863,00		26,15	17,34	1,51	1,03	
DR1-2		876,90		26,57	18,39	1,45	0,96	
DR2-1	Sarı buğday	846,40		25,65	18,72	1,37	1,02	
DR2-2		3055,60		92,60	57,23	1,62	1,52	
DR3-1	Eminbey	839,10	25,43	17,18	1,48	0,95		
DR3-2		848,20	25,70	16,63	1,55	1,05		
SP-1	Spelta S.	<i>Triticum spelta</i>	2005,50	60,77	37,54	1,62	1,44	
SP-2	Başak		1928,00	58,43	35,60	1,64	1,47	

DNA ve RNA saflık değerlendirme kriterlerinden Bölüm 4.3.1’de basedilmiştir. Çizelge 4.6. incelendiğinde A 260/280 değeri 1,33 ile 1,66 arasında değişmektedir. Buna göre Yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA’lar ve “EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis” kiti kullanılarak kit prosedürüne göre sentezlenen cDNA’larda Nanodrop 2000c spektrofotometre ölçümü sonucunda elde edilen saflık değerleri 1,8 değerinden düşük olduğundan protein, fenol veya diğer kirletici kontaminasyonu düşünülebilir.

Nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olan 260/230 oranlarını 2.0'den düşük olduğu için 230 nm'de absorbe eden kirleticilerin varlığından bahsedilebilir. Ancak daha sonra bu cDNA'lar kullanılarak yapılan qPCR denemelerinde inhibisyon oluşmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.7. Yerel buğday çeşitlerine ait cDNA varyasyon katsayısı sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	Ortalama	Standart Sapma	Varyasyon katsayısı
AE1-1	Ak-702		1020,60	987,80	32,80	3,32
AE1-2			955,00			
AE2-1	Köse		979,90	909,60	70,30	7,73
AE2-2	220/33		839,30			
AE3-1	Sünter	<i>Triticum aestivum</i>	723,90	751,90	28,00	3,72
AE3-2			779,90			
AE4-1	Zerun		989,80	894,45	95,35	10,66
AE4-2			799,10			
AE5-1	Demir		817,50	813,80	3,70	0,45
AE5-2	2000		810,10			
MC1-1	Mergüze		1090,00	1126,45	36,45	3,24
MC1-2	(Siyez)		1162,90			
MC2-1	Atasiyez	<i>Triticum monococcum</i>	753,80	828,60	74,80	9,03
MC2-2	(Siyez)		903,40			
MC3-1	Siyez 4		1082,20	795,85	286,35	35,98
MC3-2			509,50			
MC4-1	Siyez		976,50	983,55	7,05	0,72
MC4-2	Pop.		990,60			
DC1-1	Kafkas		1439,40	1598,30	158,90	9,94
DC1-2	(Kavılca)		1757,20			
DC2-1	Kavılca	<i>Triticum dicoccum</i>	1067,70	1038,10	29,60	2,85
DC2-2	Kırmızı		1008,50			
DC3-1	Gernik		945,70	942,40	3,30	0,35
DC3-2			939,10			
DR1-1	Karakılçık		863,00	869,95	6,95	0,80
DR1-2			876,90			
DR2-1	Sarı	<i>Triticum durum</i>	846,40	1951,00	1104,60	56,62
DR2-2	buğday		3055,60			
DR3-1	Eminbey		839,10	843,65	4,55	0,54
DR3-2			848,20			
SP-1	Spelta S.	<i>Triticum spelta</i>	2005,50	1966,75	38,75	1,97
SP-2	Başak		1928,00			

Çizelge 4.7. incelendiğinde *Triticum aestivum* genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 987,80 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 751,90 ng/μl'dir.

Triticum monococcum genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 1126,45 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 795,85 ng/μl'dir. *Triticum dicoccum* genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 1598,30 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 942,40 ng/μl'dir. *Triticum durum* genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 1951,00 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 843,65 ng/μl'dir. *Triticum spelta* genotipi olan Spelta S. Başak genotipinden elde edilen nükleik asit miktarı 1966,75 ng/μl'dir.

Burada elde edilen tüm konsantrasyonlar RT-PCR uygulamasını yapabilmek için yeterlidir.

4.3.4. Yapraktan Çinko Biyofortifikasyonu Uygulanmış Yerel Buğday Çeşitlerinin Yapraklarından Elde Edilen RNA'lardan Sentezlenen cDNA Sonuçları

Çizelge 4.8.'de yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA'lar ve "EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanılarak kit prosedürüne göre sentezlenen cDNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarı, (A260/A280) ve (A260/A230) değerleri karşılaştırılmalı olarak verilmiş; Çizelge 4.9.'da ise yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA'lar ve "EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanılarak kit prosedürüne göre sentezlenen cDNA'lar için Nanodrop 2000c spektrofotometre sonucunda elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.8. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait cDNA sentez sonuçları

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	A(Abs) 260	A(Abs) 280	A 260/280	A 260/230
AE1-1	Ak-702	<i>Triticum aestivum</i>	894,10	27,09	17,91	1,51	0,90
AE1-2			926,00	28,06	18,16	1,54	0,98
AE2-1	Köse		860,60	26,08	16,82	1,55	1,07
AE2-2	220/33		821,30	24,89	15,43	1,61	1,12
	220/33						
AE3-1	Sünter		995,30	30,16	18,88	1,60	1,21
AE3-2			881,70	24,60	15,17	1,62	1,31
AE4-1	Zerun		875,80	26,54	16,85	1,57	1,29
AE4-2			1003,90	30,42	18,94	1,61	1,28
AE5-1	Demir		768,80	23,30	15,79	1,48	0,87
AE5-2	2000		930,20	28,19	17,53	1,61	1,08
MC1-1	Mergüze		1154,10	34,97	22,08	1,58	1,37
MC1-2	(Siyez)		1181,10	35,79	22,38	1,60	1,42
MC2-1	Atasiyez		1057,20	32,04	20,46	1,57	1,28
MC2-2	(Siyez)		1151,40	34,89	21,97	1,59	1,42
MC3-1	Siyez 4		753,00	22,82	14,19	1,61	1,40
MC3-2			900,30	27,28	16,68	1,64	1,41
MC4-1	Siyez Pop.		920,10	27,88	18,57	1,50	1,37
MC4-2			994,40	30,13	18,75	1,61	1,41
DC1-1	Kafkas	1330,90	40,33	25,39	1,59	1,40	
DC1-2	(Kavılca)	1757,20	53,25	33,11	1,61	1,40	
DC2-1	Kavılca	847,20	25,67	17,65	1,45	1,27	
DC2-2	Kırmızı	795,10	24,10	16,00	1,51	1,23	
DC3-1	Gernik	874,60	26,50	17,00	1,56	1,03	
DC3-2		818,90	24,81	16,26	1,53	0,95	
DR1-1	Karakılçık	822,40	24,92	17,22	1,45	0,94	
DR1-2		815,60	24,72	17,22	1,44	1,02	
DR2-1	Sarı buğday	3356,50	101,71	61,24	1,66	1,53	
DR2-2		2151,20	65,19	39,71	1,64	1,50	
DR3-1	Eminbey	744,80	22,57	16,56	1,36	0,75	
DR3-2		942,30	28,55	19,98	1,43	0,85	
SP-1	Spelta S.	1457,50	44,167	28,253	1,56	1,14	
SP-2	Başak	1650,10	50,003	31,781	1,57	1,29	

DNA ve RNA saflık değerlendirme kriterlerinden Bölüm 4.3.1’de basedilmiştir. Çizelge 4.7. incelendiğinde A 260/280 değeri 1,43 ile 1,66 arasında değişmektedir. Buna göre yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait yapraklardan izole edilen RNA’lar ve “EURX-Smart First Strand cDNA Synthesis” kiti kullanılarak kit prosedürüne göre sentezlenen cDNA’larda Nanodrop 2000c spektrofotometre ölçümü sonucunda elde edilen saflık değerleri 1,8 değerinden düşük olduğundan protein, fenol veya diğer kirlenici kontaminasyonu düşünülebilir.

Nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olan 260/230 oranlarını 2.0'den düşük olduğu için 230 nm'de absorbe eden kirleticilerin varlığından bahsedilebilir. Ancak daha sonra bu cDNA'lar kullanılarak yapılan qPCR denemelerinde inhibisyon oluşmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.9. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerine ait cDNA varyasyon katsayısı

Örnek No	Örnek adı	Botanik adı	Nükleik Asit (ng/μl)	Ortalama	Standart Sapma	Varyasyon katsayısı
AE1-1	Ak-702	<i>Triticum aestivum</i>	894,10	910,05	15,95	1,75
AE1-2			926,00			
AE2-1	Köse		860,60	840,95	19,65	2,34
AE2-2	220/33		821,30			
AE3-1	Sünter		995,30	938,50	56,80	6,05
AE3-2			881,70			
AE4-1	Zerun		875,80	939,85	64,05	6,81
AE4-2			1003,90			
AE5-1	Demir		768,80	849,50	80,70	9,50
AE5-2	2000		930,20			
MC1-1	Mergüze	<i>Triticum monococcum</i>	1154,10	1167,60	13,50	1,16
MC1-2	(Siyez)		1181,10			
MC2-1	Atasiyez		1057,20	1104,30	47,10	4,27
MC2-2	(Siyez)		1151,40			
MC3-1	Siyez 4		753,00	826,65	73,65	8,91
MC3-2			900,30			
MC4-1	Siyez		920,10	957,25	37,15	3,88
MC4-2	Pop.		994,40			
DC1-1	Kafkas	<i>Triticum dicoccum</i>	1330,90	1544,05	213,15	13,80
DC1-2	(Kavılca)		1757,20			
DC2-1	Kavılca		847,20	821,15	26,05	3,17
DC2-2	Kırmızı		795,10			
DC3-1	Gernik		874,60	846,75	27,85	3,29
DC3-2			818,90			
DR1-1	Karakılçık	<i>Triticum durum</i>	822,40	819,00	3,40	0,42
DR1-2			815,60			
DR2-1	Sarı		3356,50	2753,85	602,65	21,88
DR2-2	buğday		2151,20			
DR3-1	Eminbey		744,80	843,55	98,75	11,71
DR3-2			942,30			
SP-1	Spelta S.	<i>Triticum spelta</i>	1457,50	1553,80	96,30	6,20
SP-2	Başak		1650,10			

Çizelge 4.8. incelendiğinde *Triticum aestivum* genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 939,85 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 40,95 ng/μl'dir.

Triticum monococcum genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 1167,60 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 826,65 ng/μl'dir. *Triticum dicoccum* genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 1544,05 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 821,15 ng/μl'dir. *Triticum durum* genotipleri için ortalama en yüksek nükleik asit miktarı 2753,85 ng/μl, ortalama en düşük nükleik asit miktarı 819,00 ng/μl'dir. *Triticum spelta* genotipi olan Spelta S. Başak genotipinden elde edilen nükleik asit miktarı 1553,80 ng/μl'dir.

Burada elde edilen tüm konsantrasyonlar RT-PCR uygulamasını yapabilmek için yeterlidir.

4.4. RT-PCR Optimizasyonu ve Standart Eğrilerin eldesi

Çalışmada LightCycler® 96 (Roche) qPCR cihazı ve 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR kiti kullanılmış ve Bölüm 3.2.3.3.1'de anlatılan yol izlenmiştir.

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla, LightCycler® 96 (Roche) qPCR cihazında gradient seçeneği seçilerek yürütme yapılmıştır. Burada optimizasyon aşaması için elde edilen ham veriler verilmemiştir. Her primer için ayrı ayrı optimum bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra kontrol buğday genotiplerinde her bir primer için belirlenen sıcaklıklarda çalışılarak standart eğrileri oluşturulmuştur.

4.4.1. Standart Eğri Eldesi

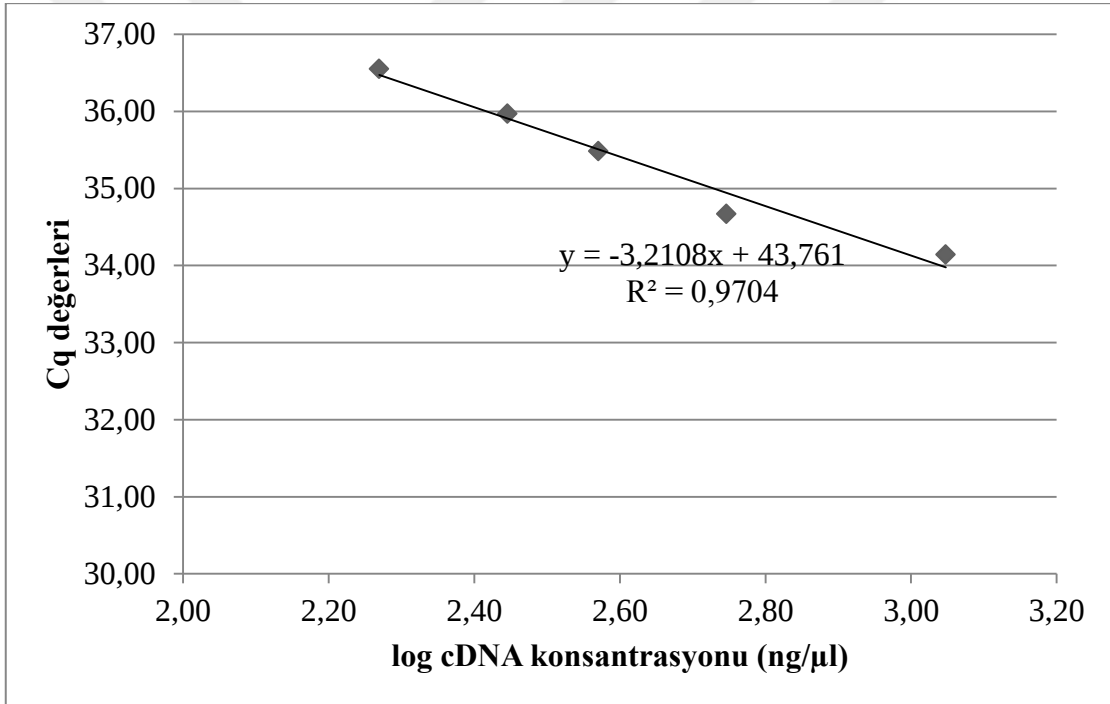
Ticari genotipler olan Demir 2000 ve Eminbey genotiplerinden ekstrakte edilen RNA'lardan cDNA sentezlendikten sonra cDNA'lar 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 ve 1/6 seyreltme oranlarında konsantrasyon elde edildip *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerine ait primerler ile qPCR yapılmıştır. Her dilüsyon üç paralel olarak hazırlanmış ve qPCR'da verdikleri Cq değerlerine göre konsantrasyona karşılık Cq grafikleri çizilerek standart eğriler elde edilmiştir ve Şekil 4.4.-Şekil 4.11. arasında gösterilmiştir. Elde edilen standart eğri denklemlerindeki eğim değerlerine göre PCR verimleri Şekil 4.3.'te verilen denklem ile hesaplanmıştır.

$$E = [10^{(-1/e\ddot{g}i_m)}]$$

$$\% \text{ Verimlilik} = (E - 1) \times 100$$

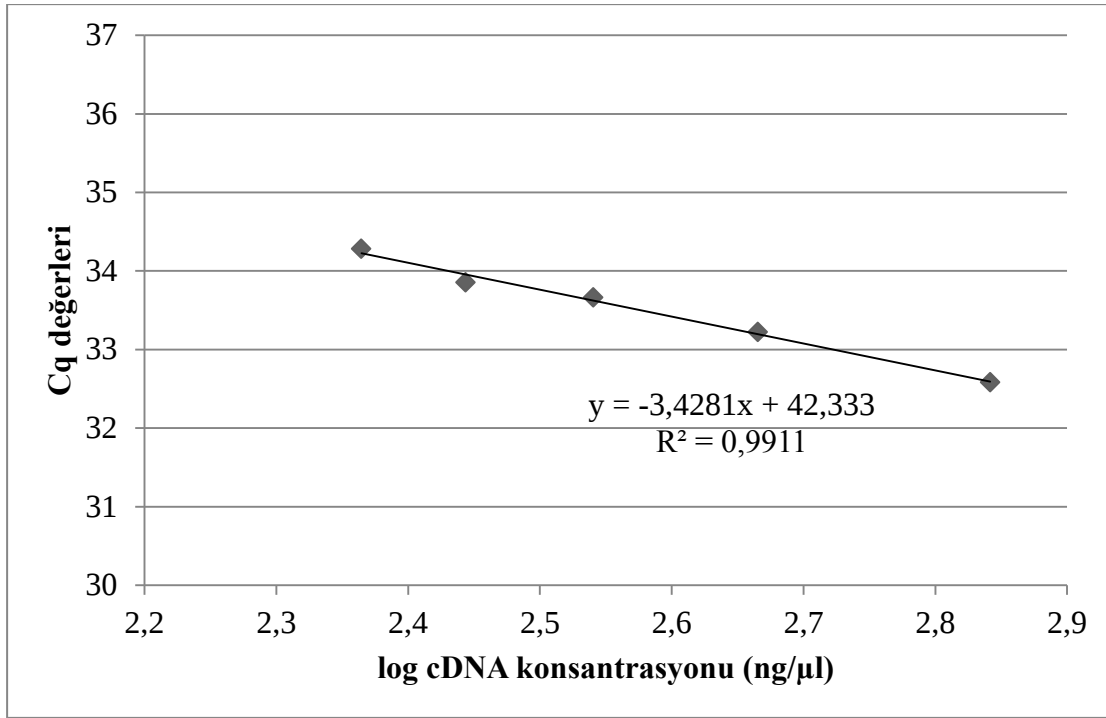
Şekil 4.3. RT-PCR % Verim hesabı için kullanılan eşitlik

Şekil 4.4’de Demir 2000 ticari buğday çeşidi için *SOD* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,2108x + 43,761$) ve R^2 (0,97) değeri görülmektedir. PCR verimi, Şekil 4.3’de verilen formül kullanılarak, %104 olarak hesaplanmıştır.



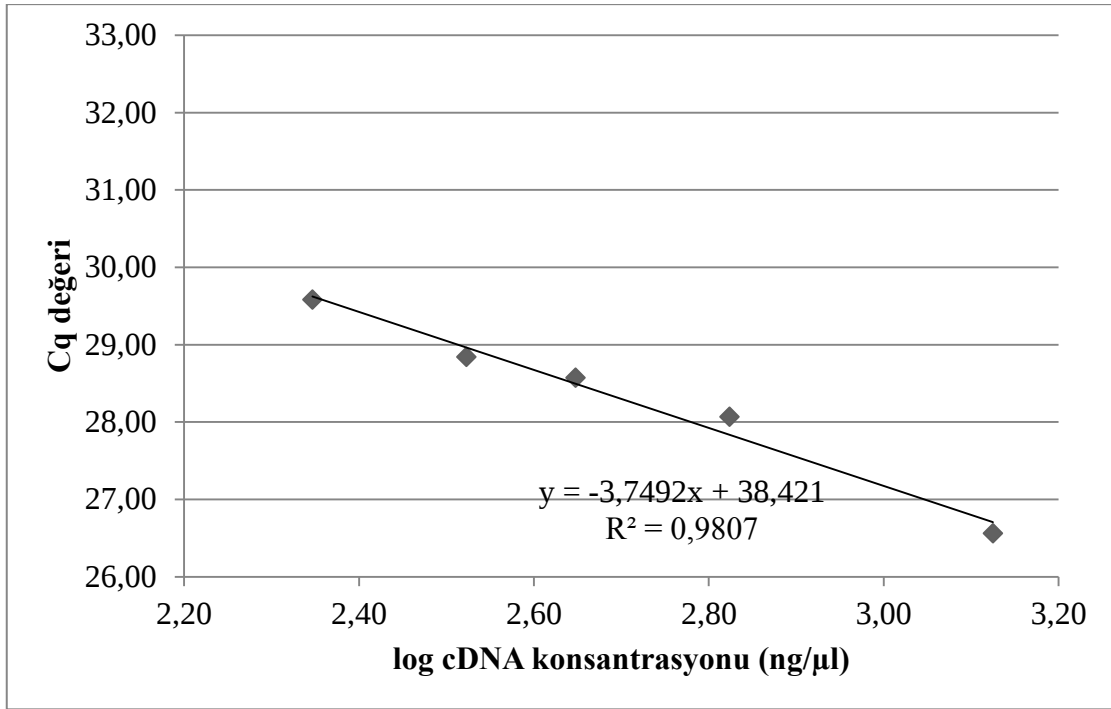
Şekil 4.4. *SOD* geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri.

Şekil 4.5.’te Eminbey ticari buğday çeşidi için *SOD* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,4281x + 42,333$) ve R^2 (0,9911) değeri görülmektedir. PCR verimi %95,75 olarak hesaplanmıştır.



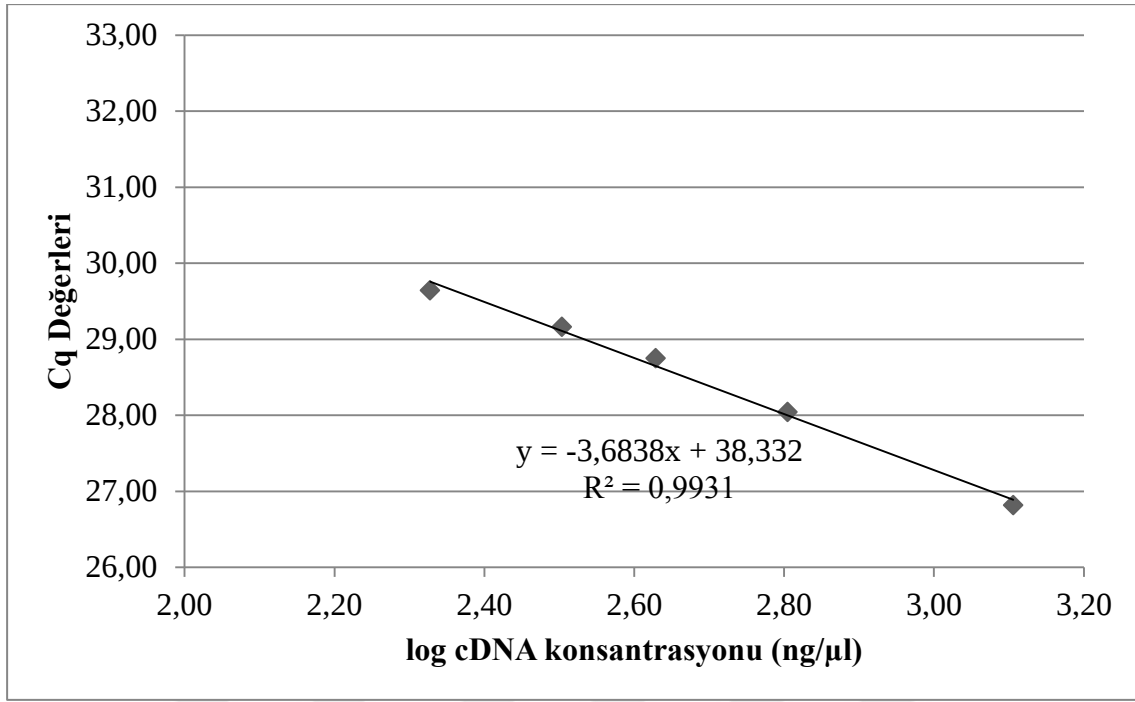
Şekil 4.5. SOD geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Şekil 4.6.'da Demir 2000 ticari buğday çeşidi için CAT genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,7492x + 38,421$) ve R^2 (0,9807) değeri görülmektedir. PCR verimi %84,81 olarak hesaplanmıştır.



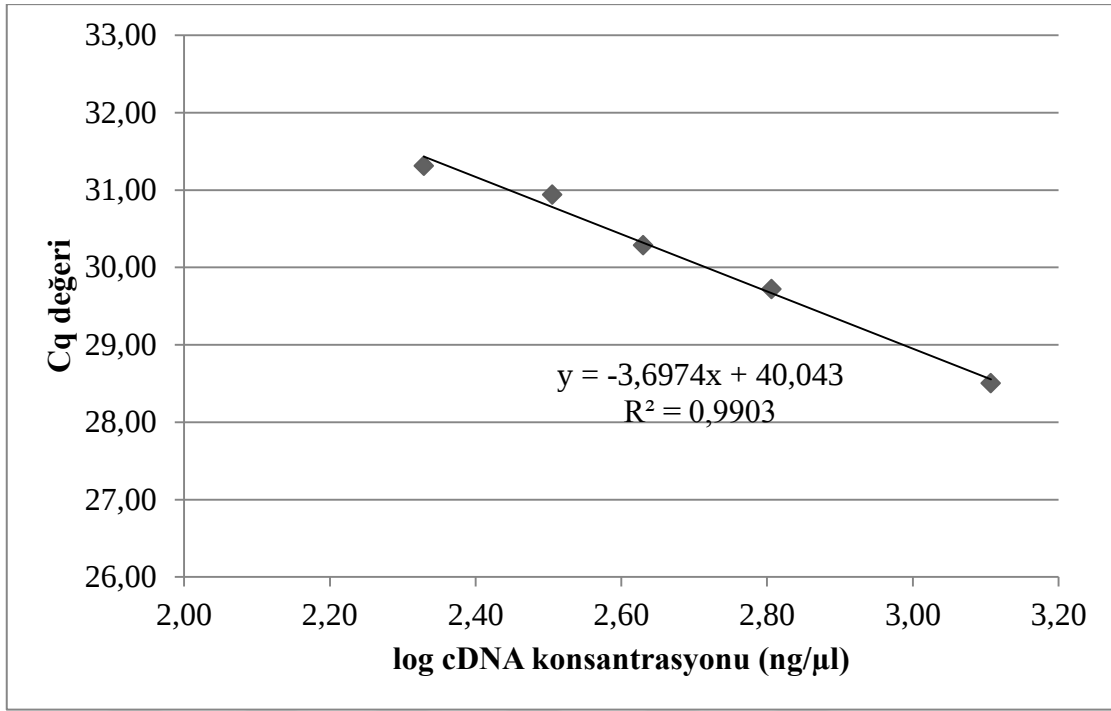
Şekil 4.6. *CAT* geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Şekil 4.7.'de Eminbey ticari buğday çeşidi için *CAT* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,6838x + 38,332$) ve R^2 (0,9931) değeri görülmektedir. PCR verimi %86,84 olarak hesaplanmıştır.



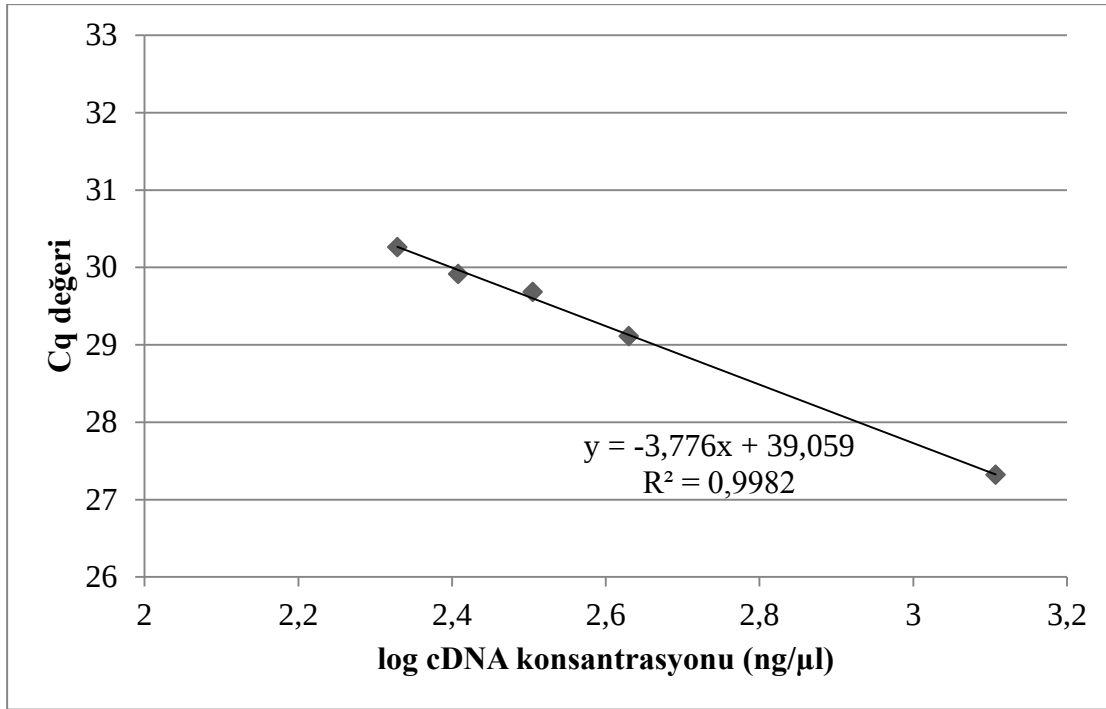
Şekil 4.7. *CAT* geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Şekil 4.8.'de Demir 2000 ticari buğday çeşidi için *PAL* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,6974x + 40,043$) ve R^2 (0,9903) değeri görülmektedir. PCR verimi %86,41 olarak hesaplanmıştır.



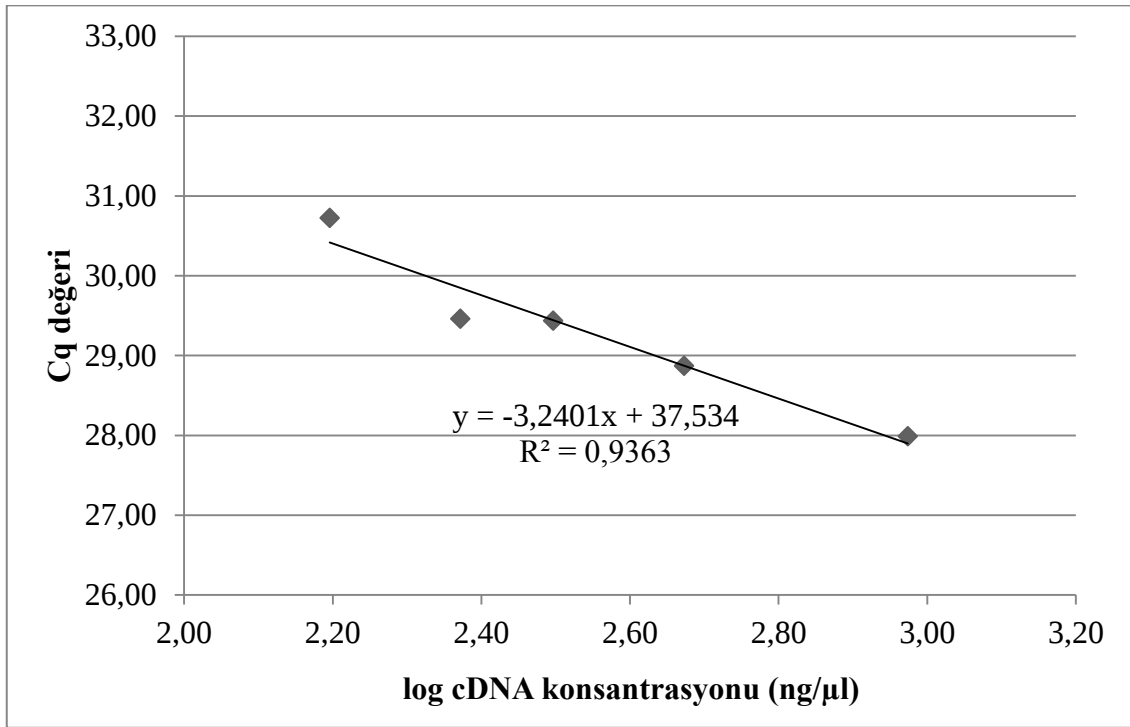
Şekil 4.8. *PAL* geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Şekil 4.9.'da Eminbey ticari buğday çeşidi için *PAL* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,776x + 39,059$) ve R^2 (0,9982) değeri görülmektedir. PCR verimi %84,01 olarak hesaplanmıştır.



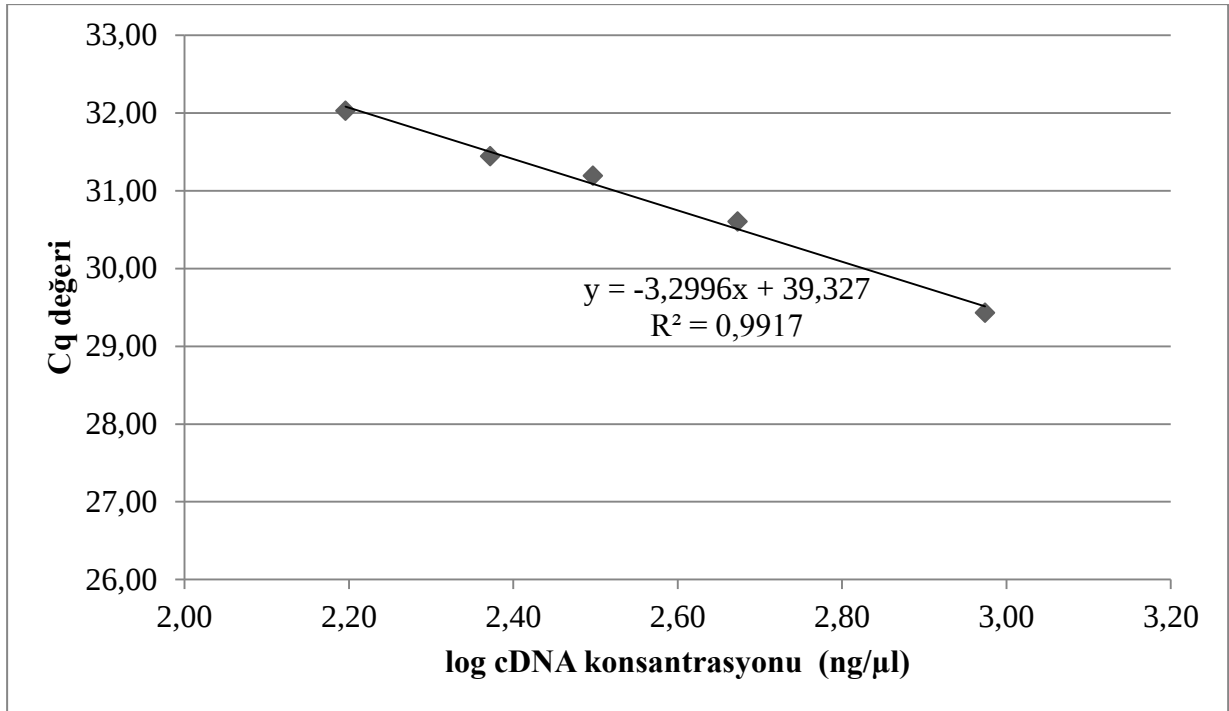
Şekil 4.9. *PAL* geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Şekil 4.10.'da Demir 2000 ticari buğday çeşidi için *CHS* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,2401x + 37,534$) ve R^2 (0,9363) değeri görülmektedir. PCR verimi %103,53 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. *CHS* geni ve Demir 2000 ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Şekil 4.11.'de Eminbey ticari buğday çeşidi için *CHS* genine spesifik olarak oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait doğru denklemi ($y = -3,2996x + 39,327$) ve R^2 (0,9917) değeri görülmektedir. PCR verimi %100,94 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. *CHS* geni ve Eminbey ticari çeşidi ile yapılan qPCR ile elde edilen standart eğri

Standart eğriler, bir PCR testinin verimliliği ve performansı ile ilgili bilgiler sağlar. Çizginin eğimi, PCR testinin verimliliğinin bir ölçüsüdür. -3.1 ile -3.6 arasındaki eğimler kabul edilebilir niteliktedir, -3.32'lik bir eğim ise %100 verimliliğin göstergesidir. R^2 , testin performansının bir ölçüsüdür korelasyon katsayısı R^2 0,99'dan büyük olmalıdır [105].

Buna göre Şekil 4.4.,4.5, 4.7, 4.8, 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilen standart eğriler güven aralığında; Şekil 4.6. ve Şekil 4.9'da gösterilen standart eğrilerin eğimleri ise güven aralığına yakındır. Şekil 4.5, 4.7, 4.8, 4.9 ve Şekil 4.11'de gösterilen standart eğrilere ait R^2 değerleri 0,99'dan büyük, Şekil 4.4, 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilen standart eğrilerdeki R^2 değeri ise 0,99'a yakındır.

Ticari buğday çeşitleri cDNA örnekleri kullanılarak elde edilen standart eğri denkleminin eğimi ile PCR reaksiyonunun yüzde verimleri %84,01 ile %104 arasında olup, her standart eğriye ait verim kendine ait şeklin altında belirtilmiştir. PCR'nin verimliliği %90-100 arasında olmalıdır. Şekil 4.4 ile Şekil 4.11 arasında gösterilen

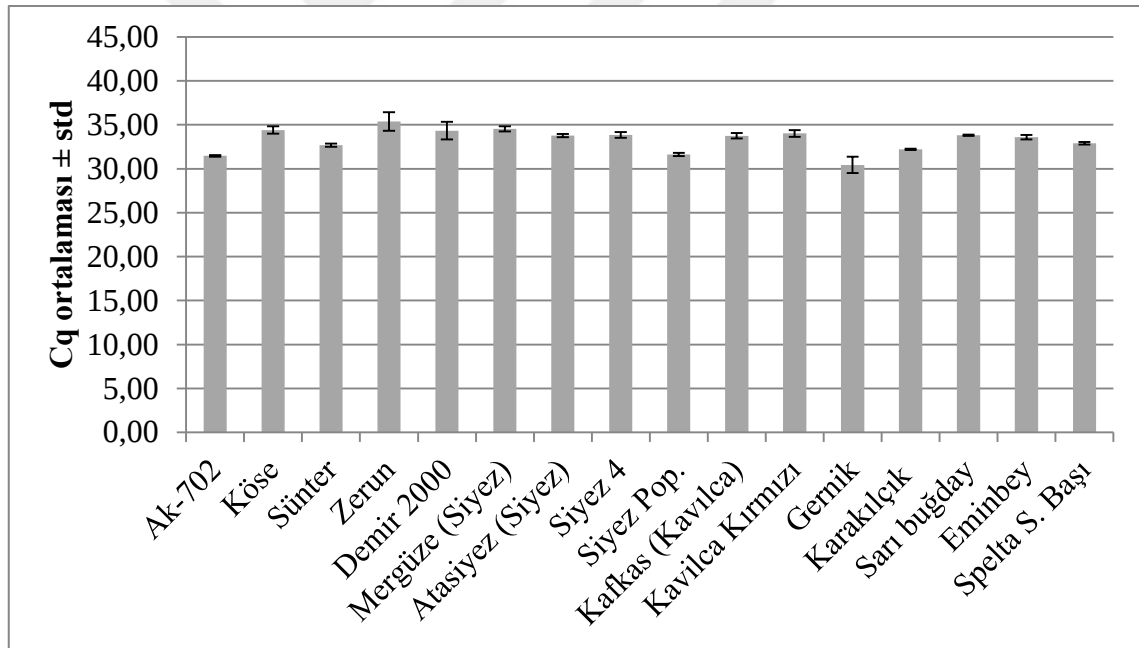
standart eğrilerde yüzde verim değerleri belirtilen aralıkta ya da belirlenen aralığa yakın çıkmıştır.

4.4.2. Yerel Buğday Çeşitlerinin qPCR Analizi

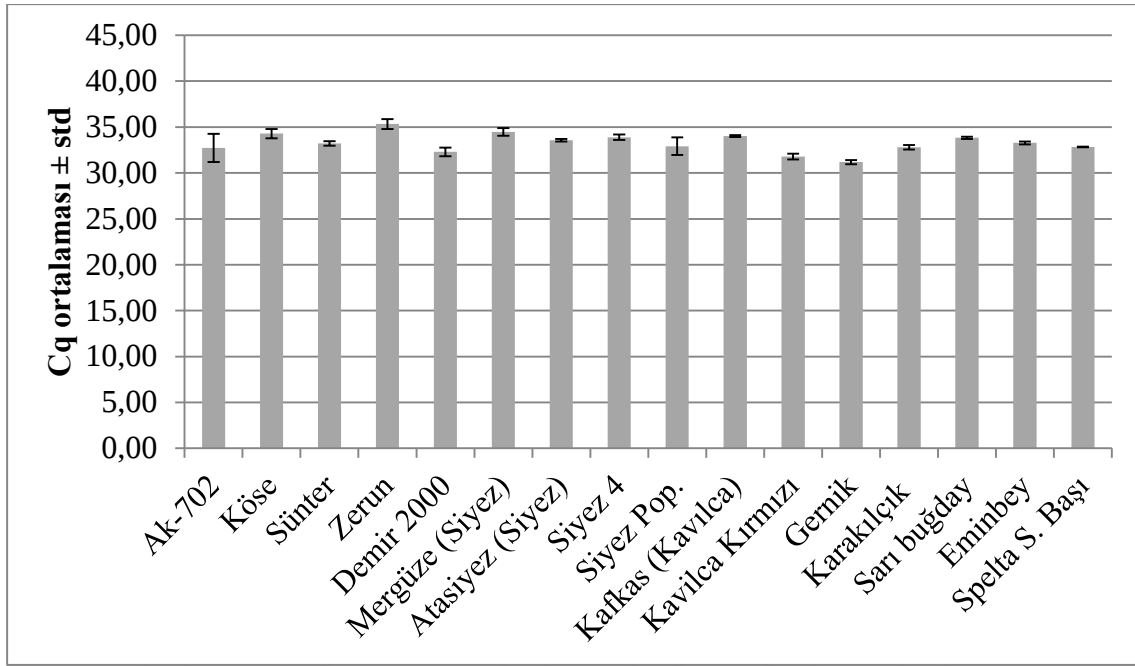
Her bir buğday genotipine ait cDNA'lar *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerinin her biri için seyretlerek pozitif kontrollerle birlikte qPCR yapılmıştır.

4.4.2.1. Yerel Buğday Genotiplerinin qPCR Analizi Sonucu Elde Edilen Cq değerleri

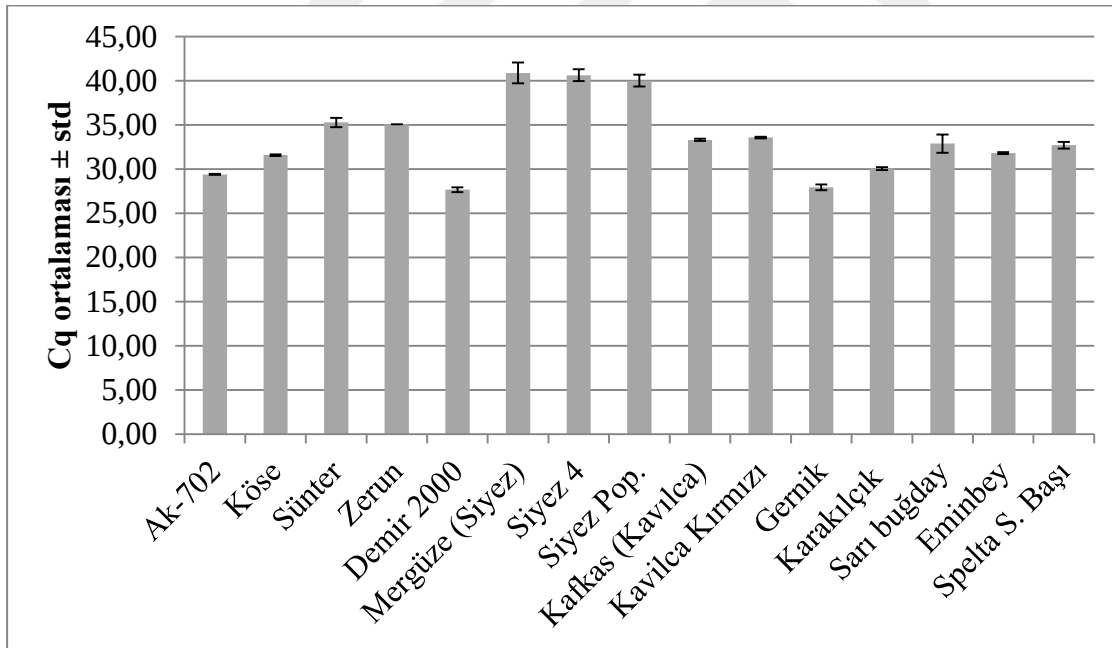
Yerel buğday çeşitlerine ait Materyal ve Metot bölümünde anlatıldığı şekilde sentezlenen cDNA'lar ile reaksiyon karışım çizelgeleri ve ilgili döngü parametrelerine göre ve sırasıyla *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* primerleri kullanılarak yapılan qPCR ile elde edilen Cq değerleri Şekil 4.12.-Şekil 4.19. arasında gösterilmiştir. Cq değerleri Pfaffl vd. [103]'de verilen hesaplama yöntemi kullanılarak normalizasyon işlemi yapılmıştır.



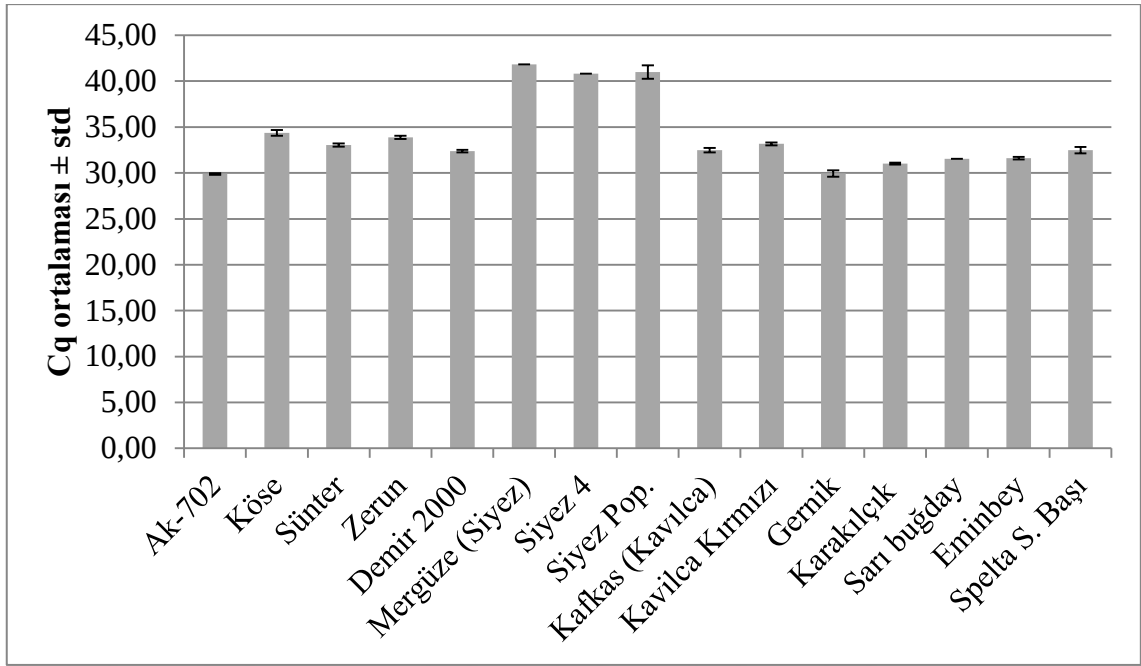
Şekil 4.12. Bazı yerel buğday genotiplerinin *SOD* genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



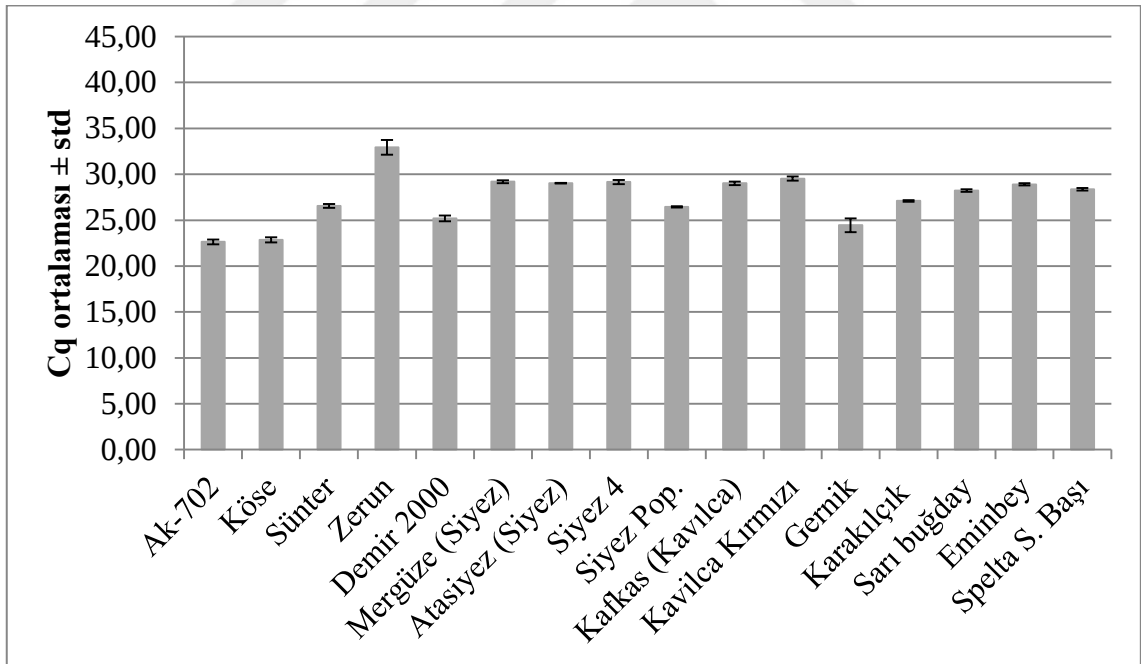
Şekil 4.13. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin SOD genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



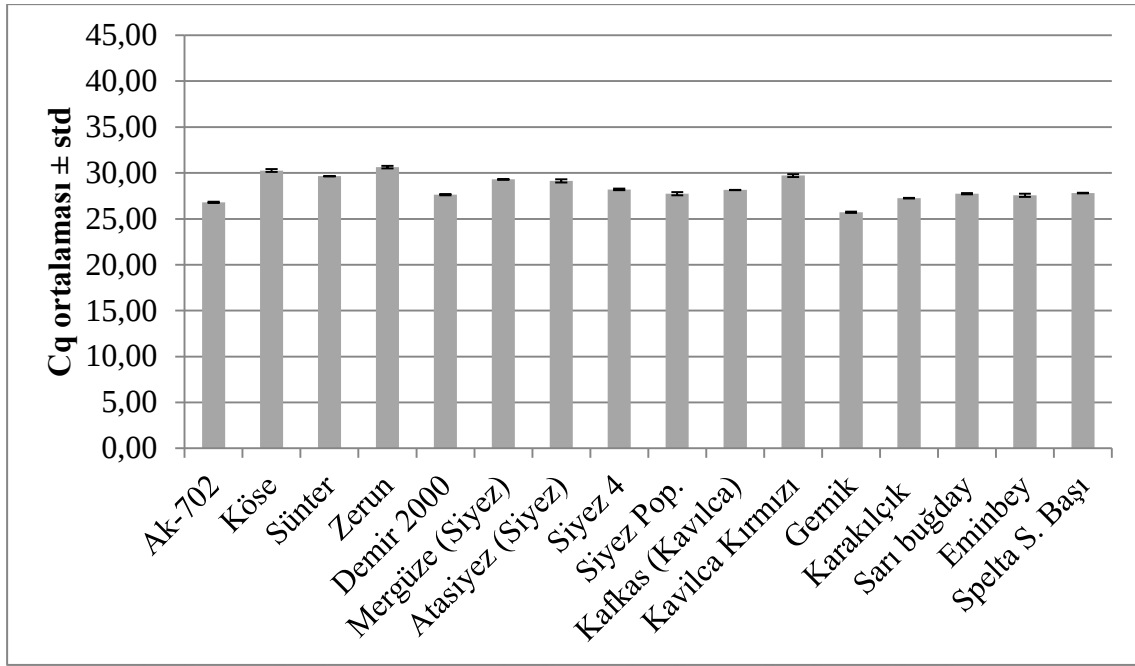
Şekil 4.14. Bazı yerel buğday genotiplerinin CAT genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



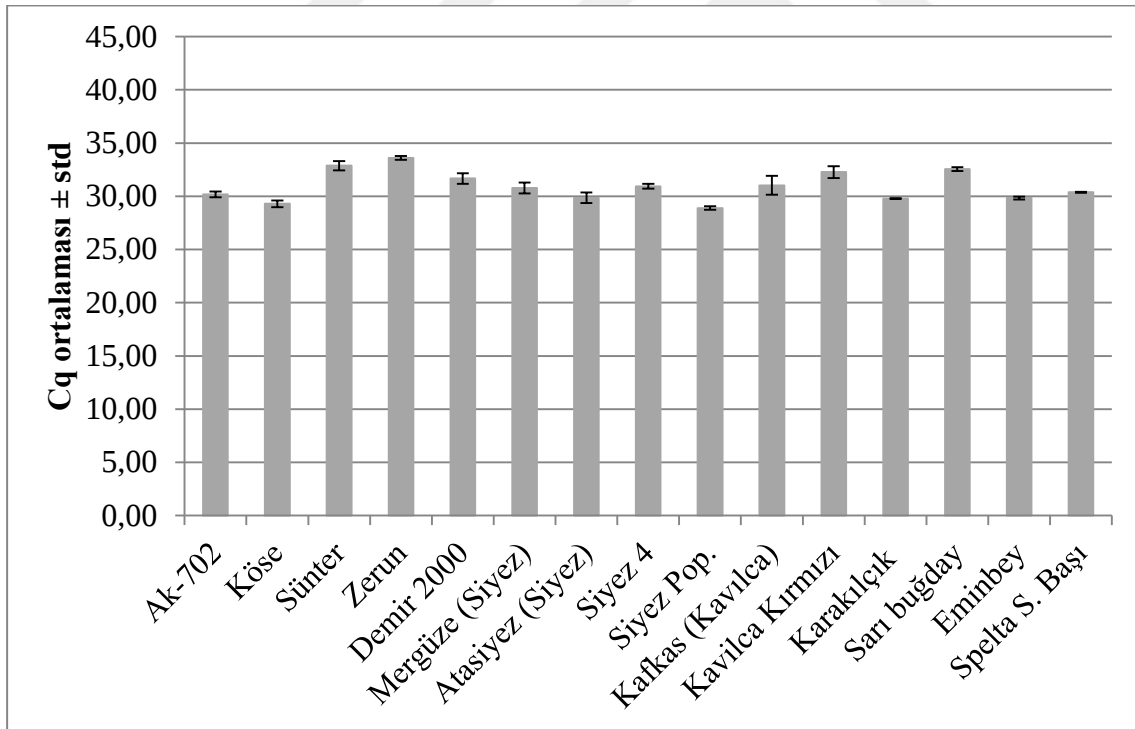
Şekil 4.15. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin CAT genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



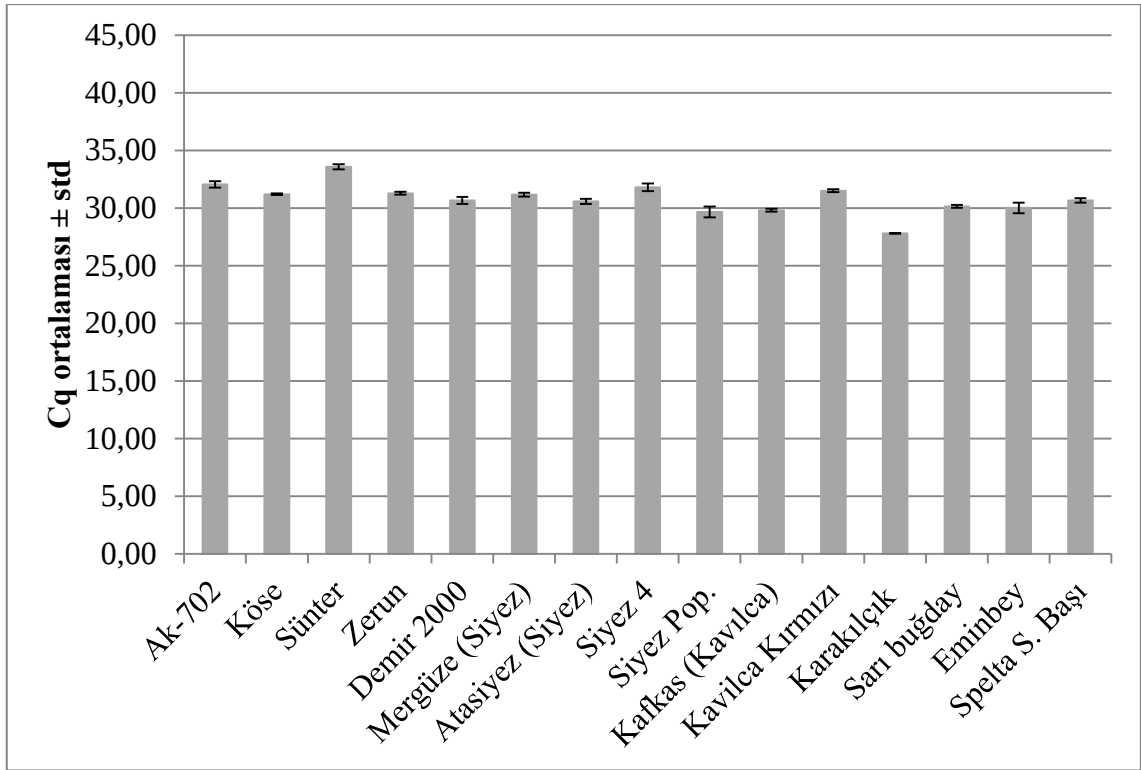
Şekil 4.16. Bazı yerel buğday genotiplerinin PAL genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



Şekil 4.17. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin *PAL* genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



Şekil 4.18. Bazı yerel buğday genotiplerinin *CHS* genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri



Şekil 4.19. Yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin *CHS* genine ait primer ile yapılmış qPCR sonucu elde edilen Cq değerleri

Yerel buğday genotipleri ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış genotiplerden oluşan örnekler ile elde edilen ve Şekil 4.12-Şekil 4.19 arasında gösterilen Cq değerleri, tasarlanan primerlerin kullanımı yoluyla amplifikasyon reaksiyonunun özgülüğünü göstermiştir.

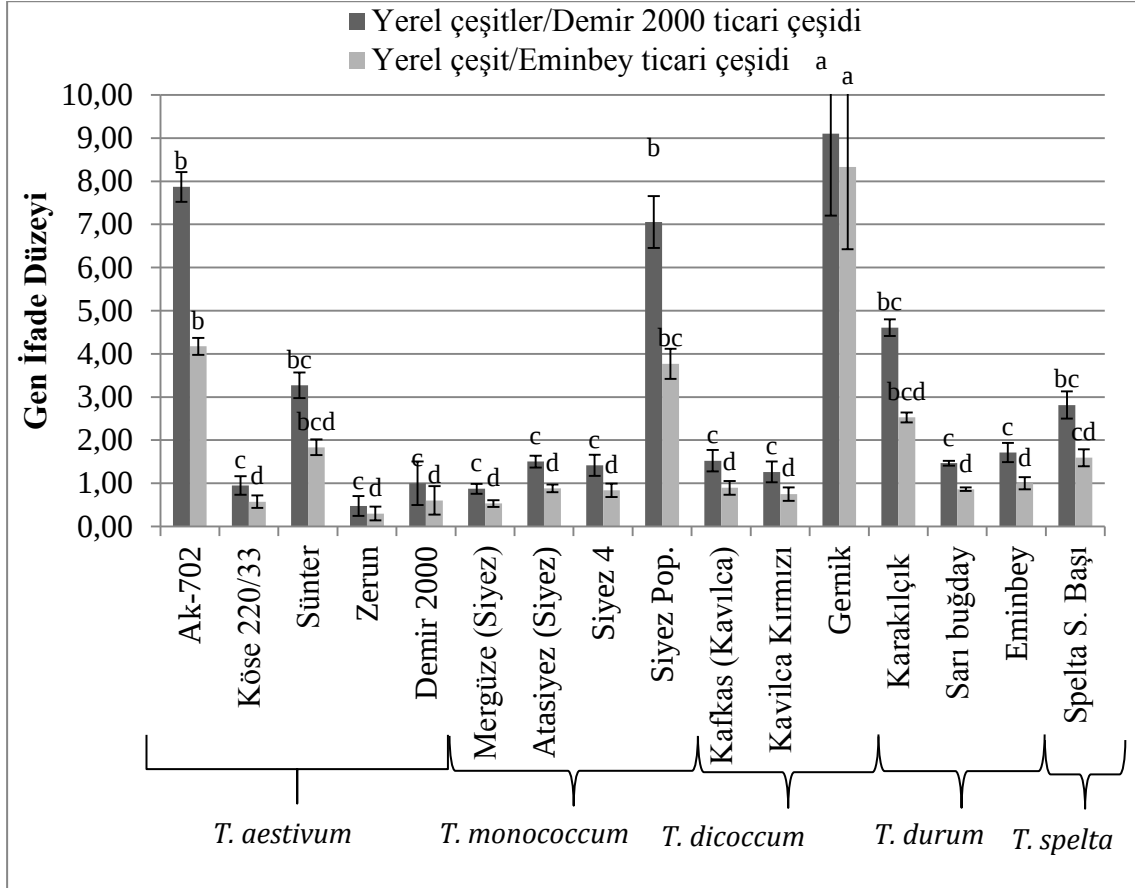
4.5. Gen İfade Analizi

Çalışmanın bu aşamasında gen ifade analizleri yapılırken ticari buğday çeşitlerinin bilinen cDNA konsantrasyonlarına ait Cq verileri ile oluşturulan Bölüm 4.5.1’de gösterilen standart eğri denklemleri kullanılmıştır. Standart eğri denklemleri ve yerel buğday genotiplerine ait Cq değerleri kullanılarak absolut kuantifikasyon metoduna göre gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. Her bir yerel buğday genotipine ait gen ifade miktarı hesaplanmıştır.

4.5.1. Yerel Buğday Çeşitlerinde *SOD* Geni İfadesi

Şekil 4.20’de yerel buğday çeşitlerinde Şekil 4.21’de yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *SOD* geninin ifade düzeyi

Demir 2000 ve Eminbey ticari çeşitlerine oranlanarak gösterilmiştir. Şekil 4.22’de ise yerel buğday çeşitlerinde ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *SOD* geni ifade düzeyleri Demir 2000 ticari çeşidine oranlanarak gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Bazı yerel buğday genotiplerinin *SOD* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-d) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). (Gernik genotipi için şekilde verilen değer 3,1 kat azaltılarak gösterilmiştir.) Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *SOD* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek *SOD* geni aktivitesine sahip genotipler AK-702 (b, b) ve Sünter (bc, bcd); en düşük *SOD* geni aktivitesine sahip genotip ise Zerun (c, d) genotipidir. Ticari çeşit olan Demir 2000 genotipinin *SOD* geni aktivitesi

Ak-702 genotipinden 7 kat, ve Köse 220/33 genotipinden yaklaşık 1 kat daha düşük; buna karşın Sünter genotipinden yaklaşık 3 kat ve Zerun genotipinden yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

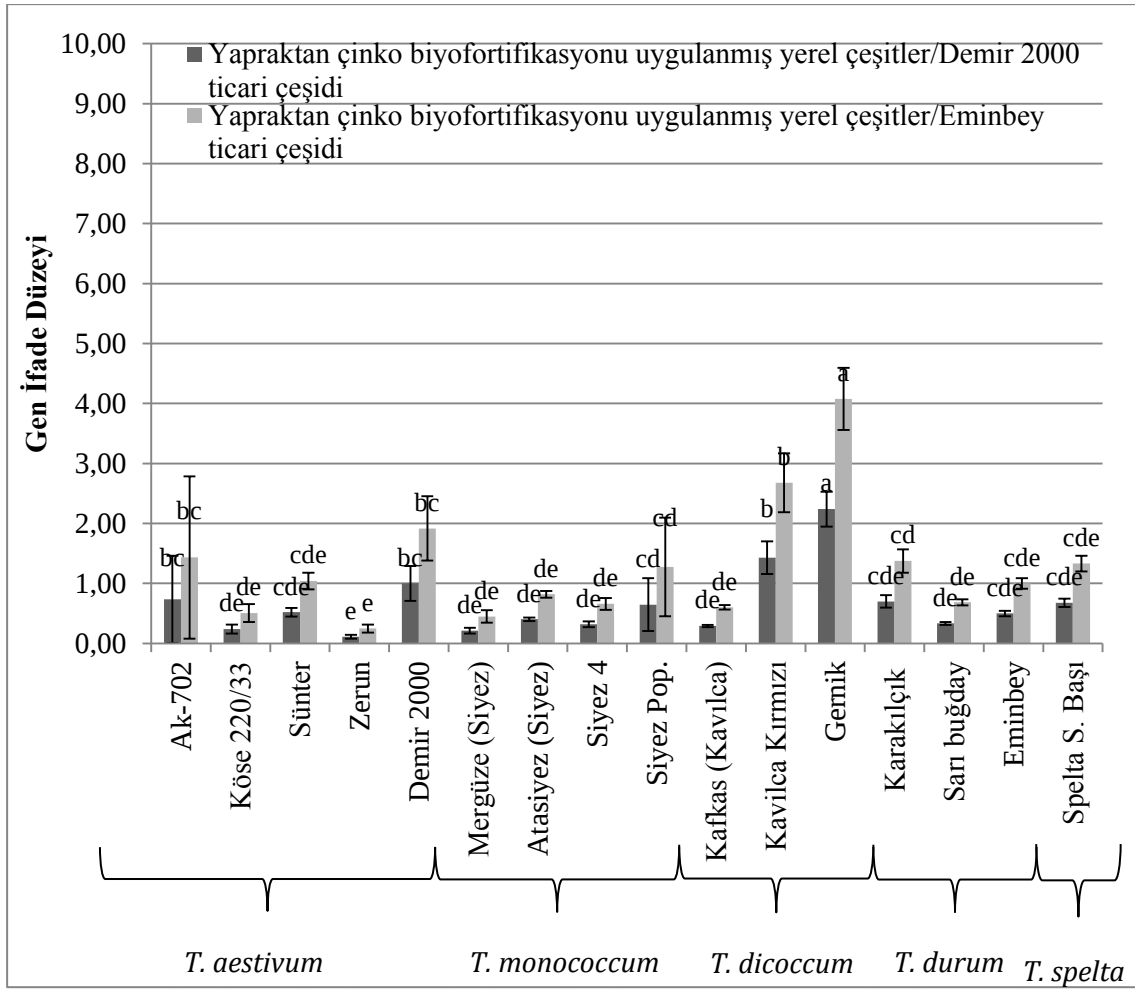
Triticum monoccum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez pop genotipinin *SOD* gen aktivitesinin Mergüze genotipinden yaklaşık 7,5 kat, Atasiyez genotipinden yaklaşık 4,5 kat ve Siyez 4 genotipinden ise yaklaşık 5 kat yüksek olduğu gösterilmiştir.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *SOD* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik (a, a) olduğu istatistiksel olarak da ispatlanmıştır. Ticari genotipler olan Demir 2000 ve Eminbey'e göre de Gernik genotipindeki *SOD* geni aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı farklı ve yüksek olduğu gösterilmiştir.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek *SOD* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık (bc, bcd) olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Karakılçık genotipinin *SOD* geni aktivitesi Sarı Buğday genotipine göre yaklaşık 3 kat, Eminbey'e göre yaklaşık 2,5 kat fazladır.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (bc, cd) genotipindeki *SOD* gen aktivitesinin ticari genotip olan Demir 2000 genotipi ile arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte; Eminbey'den yaklaşık 1,6 kat yüksek olduğu görülmüştür.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek *SOD* geni aktivitesine sahip genotiplerin AK-702 ve Sünter; en düşük *SOD* geni aktivitesine sahip genotipin ise Zerun olması; *Triticum dicoccum* genotipleri arasında en yüksek *SOD* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında en yüksek *SOD* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.21. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası *SOD* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *SOD* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında *SOD* geni aktivitesi için hem Demir 2000 ticari çeşidi hem de Eminbey ticari çeşidi esas alındığında en fazla aktivite gösteren genotipin Gernik (a, a) olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da gösterilmiştir.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek *SOD* gen aktivitesine sahip olan yerel çeşitler AK-702 (bc, bc) ve Demir 2000 (bc, bc); en düşük olanlar ise Zerun (e, e) ve Köse 220/33 (de, de) genotipleridir. Ticari çeşit olan Demir 2000 ile kıyaslandığında ise Ak-702 genotipinin istatistiksel anlamlı farklı olmadığı gösterilmiştir.

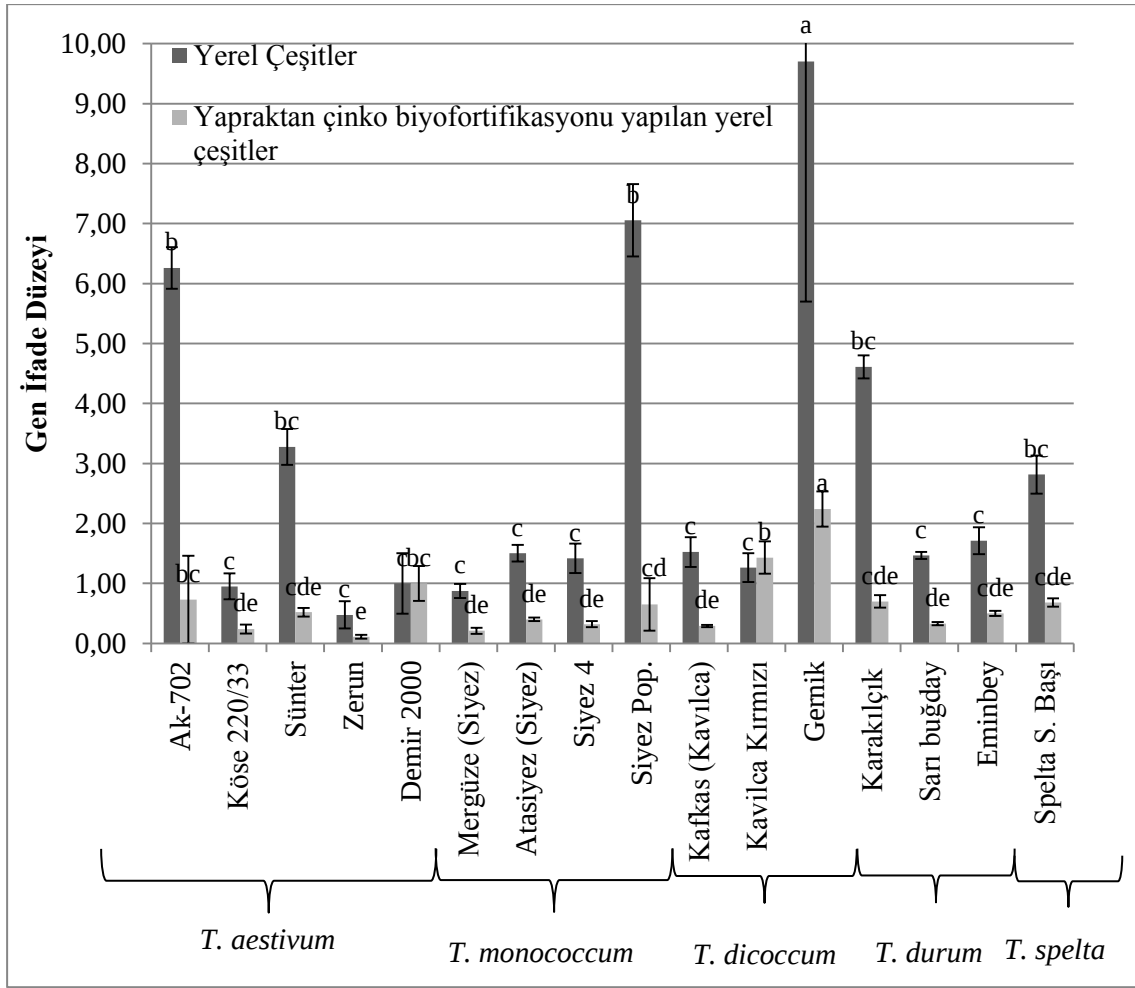
Triticum monococcum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez pop. (cd, cd) genotipinin *SOD* gen aktivitesinin Mergüze, Atasiyez ve Siyez 4 genotiplerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Atasiyez ve Mergüze genotipleri arasında *SOD* gen aktivitesi açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *SOD* geni aktivitesine sahip genotipin Gernik (a, a) olduğu görülmüştür. Gernik genotipinin *SOD* gen aktivitesinin *Tritium monococcum* türlerine göre yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Ticari genotipler olan Demir 2000 ve Eminbey'e göre de Gernik genotipindeki *SOD* geni aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı seviyede farklı ve Demir 2000 genotipinden yaklaşık 2 kat; Eminbey genotipinden ise yaklaşık 4 kat yüksektir.

Triticum durum genotipleri arasında *SOD* geni aktivitesi bakımından istatistiksel anlamlı farklılık görülmediği gösterilmiştir.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (cde, cde) genotipindeki *SOD* gen aktivitesinin ticari genotip olan Demir 2000'den yaklaşık 1,4 kat düşük ve Eminbey'den istatistiksel olarak farklı olmadığı gösterilmiştir.

Triticum aestivum genotipleri içinde en düşük *SOD* geni aktivitesine sahip genotipin Zerun olması; *Triticum dicoccum* genotipleri arasında en yüksek *SOD* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında en yüksek *SOD* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.22. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında *SOD* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel genotiplerin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Gernik genotipi için şekilde verilen değer 3,1 kat azaltılarak gösterilmiştir. Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000 ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *SOD* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun *Triticum aestivum* genotiplerinde çinko biyofortifikasyonunun *SOD* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Aynı şekilde *Triticum monoccum* genotiplerinde çinko biyofortifikasyonunun *SOD* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

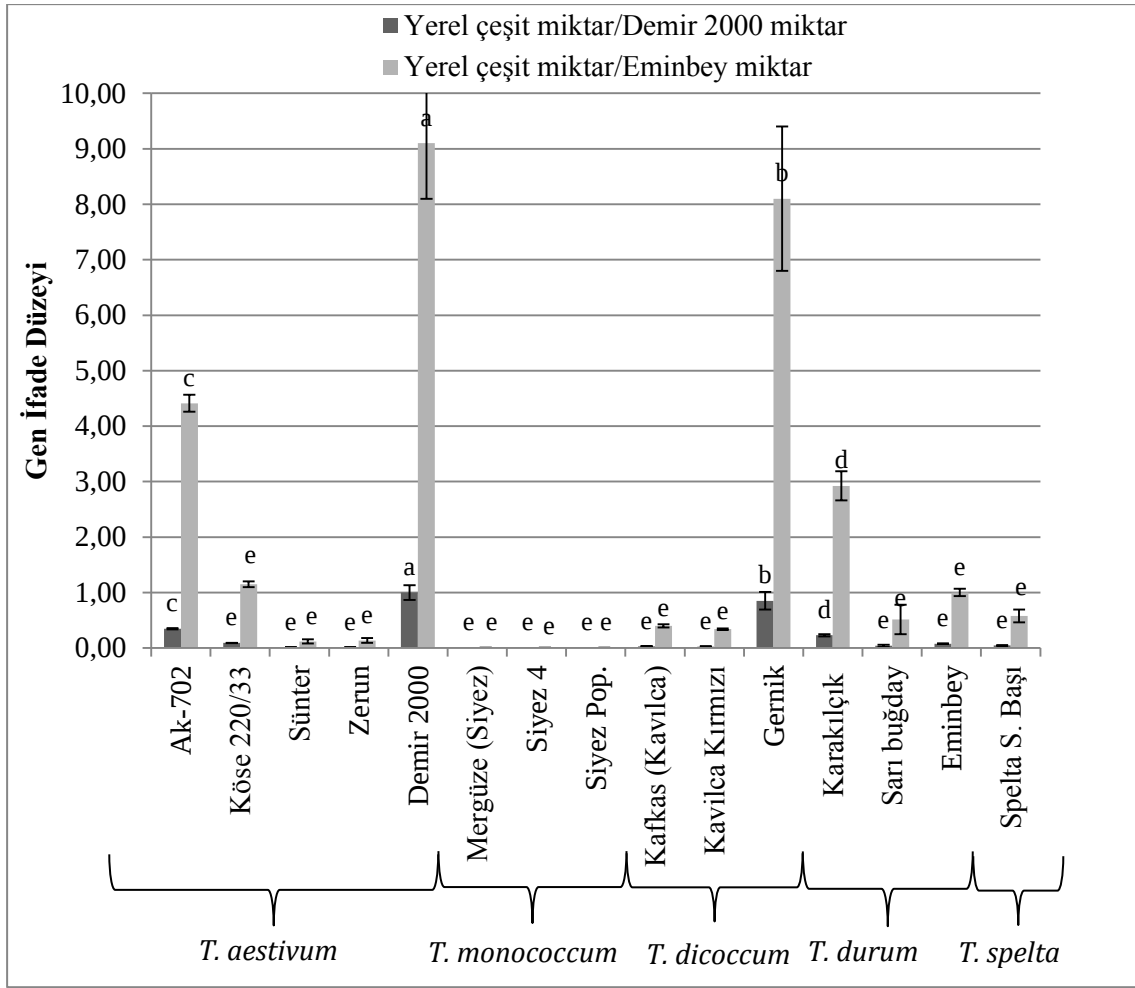
Kavılca kırmızı başak dışındaki *Triticum dicoccum* genotiplerinde çinko biyofortifikasyonunun *SOD* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Triticum durum genotiplerinde çinko biyofortifikasyonunun *SOD* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Triticum spelta genotipinde çinko biyofortifikasyonunun *SOD* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

4.5.2. Yerel Buğday Çeşitlerinde CAT Geni İfadesi

Şekil 4.23'te yerel buğday çeşitlerinde Şekil 4.24'te yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *CAT* geninin ifade düzeyi Demir 2000 ve Eminey ticari çeşitlerine oranlanarak gösterilmiştir. Şekil 4.25'te ise yerel buğday çeşitlerinde ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *CAT* geni ifade düzeyleri Demir 2000 ticari çeşidine oranlanarak gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Bazı yerel buğday genotiplerinin *CAT* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Demir 2000 genotipi için şekilde verilen değer 1,4 kat; Gernik genotipi için 1,3 kat azaltılarak gösterilmiştir. Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *CAT* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında en fazla *CAT* geni aktivitesi Demir 2000 ve Eminbey ticari çeşitleri esas alındığında Demir 2000 (a, a) ve Gernik (b, b) yerel genotiplerine ait olduğu saptanmıştır.

Triticum aestivum genotipleri içinde en fazla *CAT* geni aktivitesine sahip genotipler AK-702 (c, c) ve Demir 2000 genotipleri olduğu istatistiksel olarak da ispatlanmıştır.

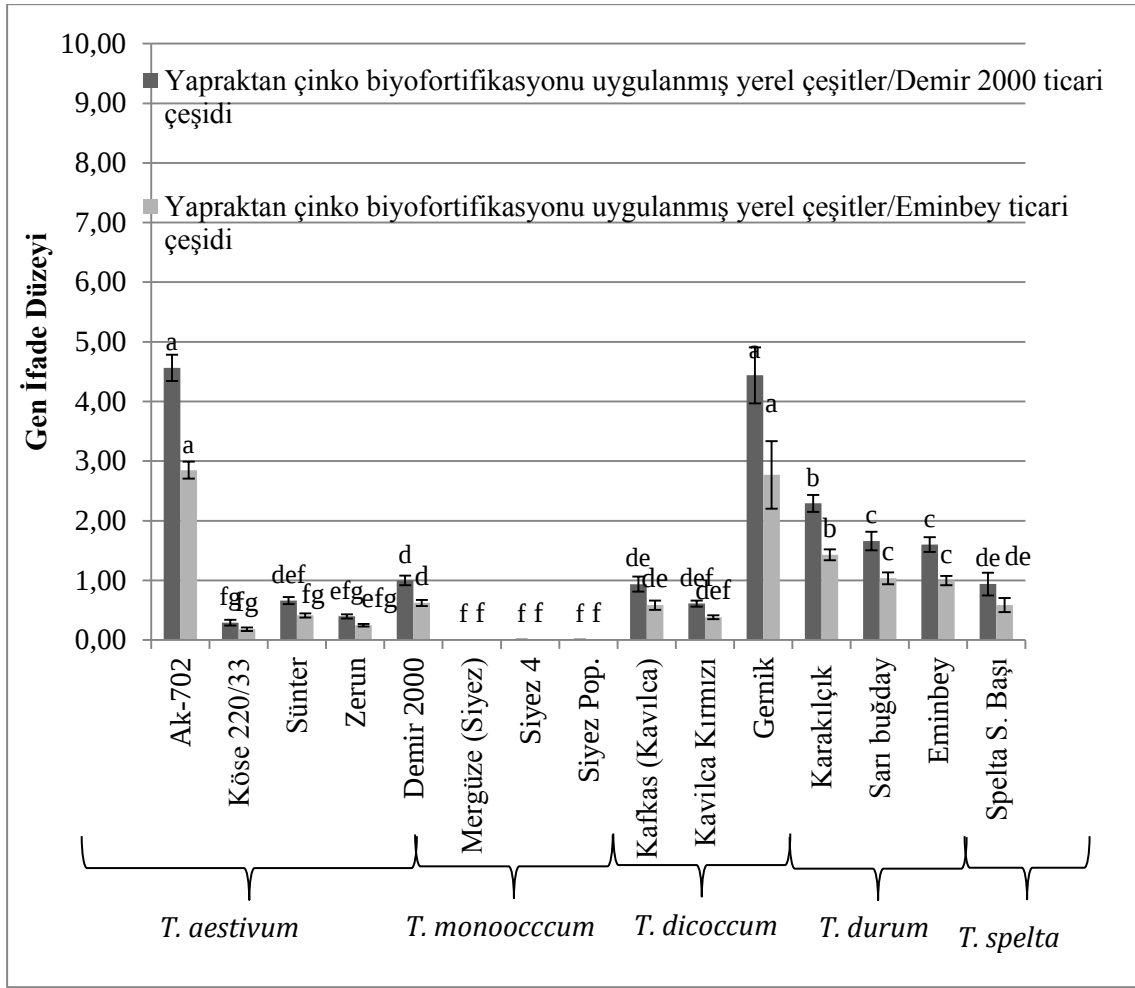
Triticum monococcum genotipleri kıyaslandığında ise genotiplerin *CAT* geni aktivitelerinin farklı olmadığı istatistiksel olarak ispatlanmıştır.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *CAT* geni aktivitesine sahip genotipin Gernik (b, b) olduğu görülmüştür. Gernik genotipinin *CAT* gen aktivitesinin Kafkas genotipinden yaklaşık 20 kat; Kavılca (Kırmızı) genotipinden ise yaklaşık 25 kat fazla olduğu göstermiştir.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek *CAT* gen aktivitesine sahip genotip Karakılçık (d, d) genotipidir. Karakılçık genotipinin *CAT* geni aktivitesi Sarı Buğday genotipine göre yaklaşık 5,7 kat, Eminbeye göre yaklaşık 2,9 kat fazladır.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (e, e) genotipindeki *CAT* gen aktivitesinin ticari genotip olan Demir 2000'den düşük; Eminbey'den ise istatistiksel olarak farklı olmadığı gösterilmiştir.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *CAT* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında en yüksek *CAT* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir



Şekil 4.24. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası CAT geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan CAT geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında CAT geni aktivitesi için hem Demir 2000 ticari çeşidi hem de Eminbey ticari çeşidi esas alındığında en fazla aktivite gösteren genotipin Ak-702 (a, a) ve Gernik (a, a) olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da gösterilmiştir.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek CAT gen aktivitesine sahip olan genotip AK-702 genotipidir. Ticari çeşit olan Demir 2000 ile kıyaslandığında ise Ak-702 genotipinin CAT gen aktivitesinin yaklaşık 4,6 kat, daha yüksek olduğu; ancak Köse 220/33 genotipinin yaklaşık 3,4 kat, Sünter genotipinin yaklaşık 1,5 kat ve Zerun genotipinin ise yaklaşık 2,5 kat gen aktivitelerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

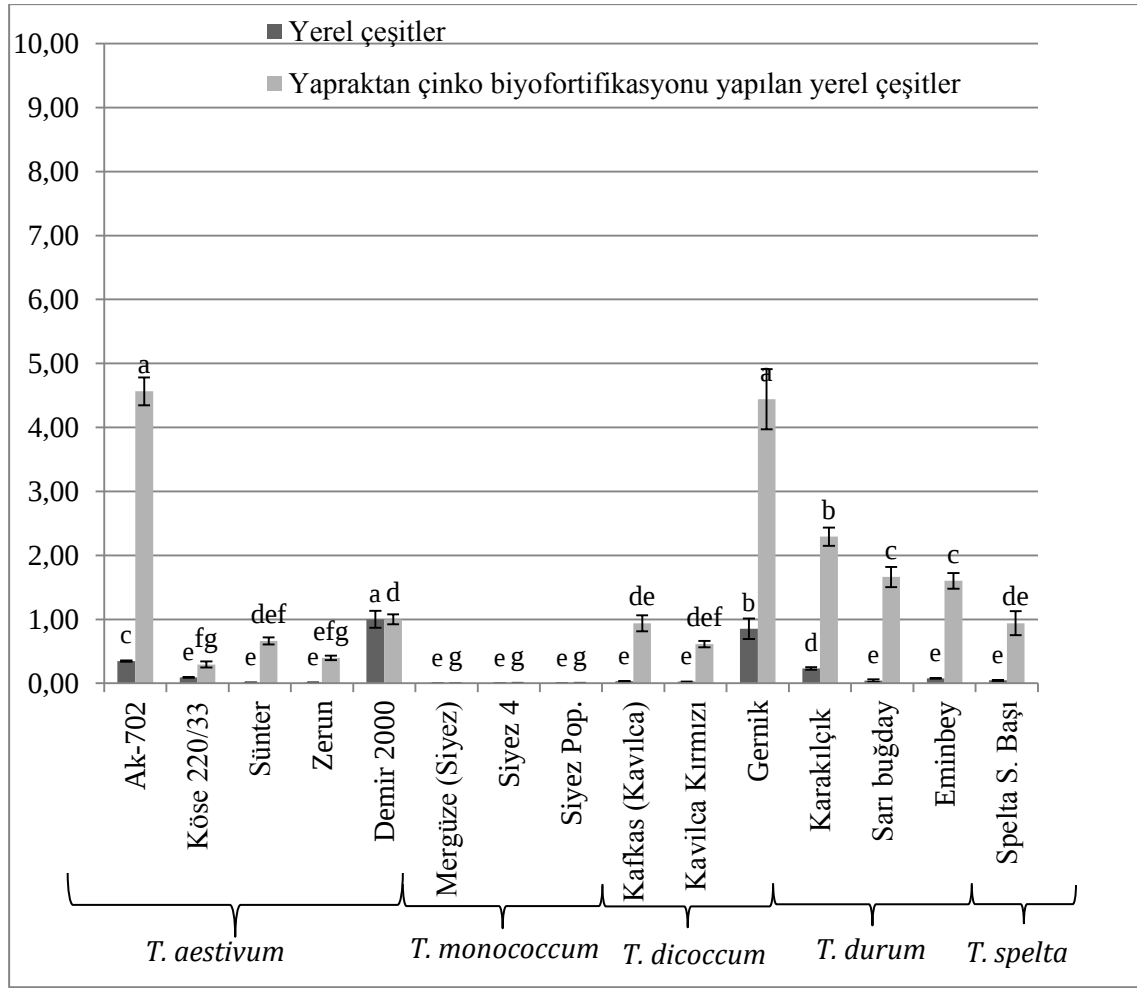
Triticum monococcum genotipleri kıyaslandığında ise CAT gen aktivitesinin oldukça düşük olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı gösterilmiştir.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek CAT geni aktivitesine sahip genotipin Gernik olduğu görülmüştür. Gernik genotipinin CAT gen aktivitesinin *Tritium monococcum* türlerine göre yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Ticari genotipler olan Demir 2000 ve Eminbey'e göre de Gernik genotipindeki CAT geni aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede farklı ve Demir 2000 ticari çeşidinden 4,4 kat, Eminbey ticari çeşidinden yaklaşık 2,8 kat yüksektir.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek CAT geni aktivitesine sahip genotipin Karakılçık (b, b) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Karakılçık genotipinin gen aktivitesinin ticari çeşit olan Eminbeye göre istatistiksel olarak farklı ve yüksek olmasına karşın aralarındaki fark azdır.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (de, de) genotipindeki CAT gen aktivitesinin ticari genotip olan Demir 2000'den istatistiksel olarak farklı olmayıp; Eminbey'den istatistiksel olarak farklı olduğu ve CAT gen aktivite değerinin 1,7 katdüşük olduğu gösterilmiştir.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek CAT gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında en yüksek CAT aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.25. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında CAT geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan CAT geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun *Triticum aestivum* genotiplerinin tamamının CAT geni ifadesini artırdığı söylenebilir. Bu artışın Ak-702 genotipinde yaklaşık 13,1 kat, Köse 220/33 genotipinde yaklaşık 3,2 kat, Sünter genotipinde yaklaşık 70,9 kat Zerun genotipinde ise yaklaşık 37,5 kat olduğu gösterilmiştir.

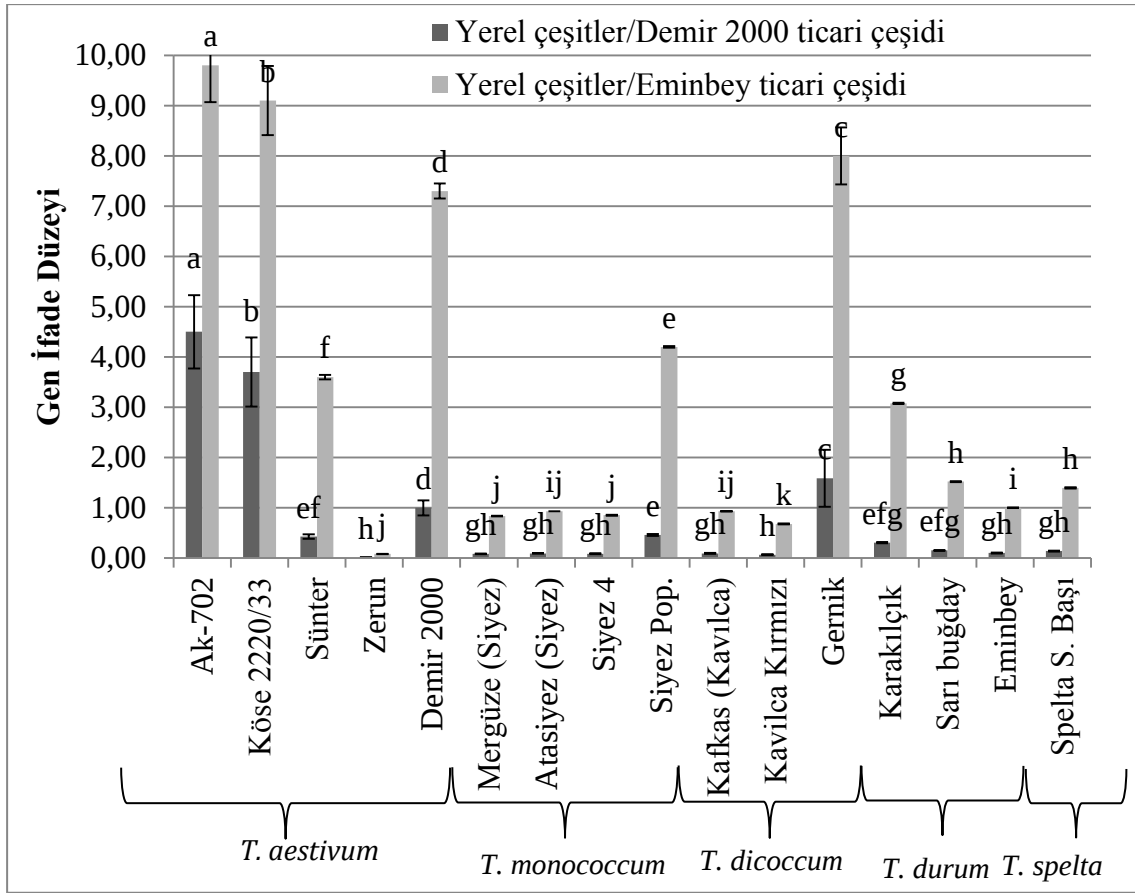
Buna karşın *Triticum monococcum* genotiplerinde çinko biyofortifikasyonunun *CAT* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Triticum dicoccum genotiplerinin tamamında çinko biyofortifikasyonu sonunda *CAT* geni ifade düzeylerinde artış görülmüştür. Bu artış oranlarının Kafkas genotipinde yaklaşık 30 kat, Kavılca genotipinde yaklaşık 23 kat ve Gernik genotipinde ise yaklaşık 5,2 kat olduğu gösterilmiştir.

Triticum spelta genotipinde de çinko biyofortifikasyonu sonunda *CAT* geni ifade düzeyinde 20 kat artış görülmüştür.

4.5.3. Yerel Buğday Çeşitlerinde *PAL* Geni İfadesi

Şekil 4.26'de yerel buğday çeşitlerinde Şekil 4.27'de yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *PAL* geninin ifade düzeyi Demir 2000 ve Eminey ticari çeşitlerine oranlanarak gösterilmiştir. Şekil 4.28'de ise yerel buğday çeşitlerinde ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *PAL* geni ifade düzeyleri Demir 2000 ticari çeşidine oranlanarak gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Bazı yerel buğday genotiplerinin *PAL* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Ak-702 genotipi için şekilde verilen değer 4,1 kat; Köse 220/33 genotipi için 3,6 kat azaltılarak gösterilmiştir. Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *PAL* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında en fazla *PAL* geni aktivitesi Demir 2000 ve Eminbey ticari çeşitleri esas alındığında Ak-702 (c, a) yerel buğday genotipine ait olduğu saptanmıştır. *Triticum aestivum* genotipleri içinde en fazla *PAL* geni aktivitesine sahip genotipler AK-702 (a, a) ve Köse 220/33 (b, b) genotipleri; en az *PAL* geni aktivitesine sahip olan ise Zerun (h, j) genotipi olduğu belirlenmiştir.

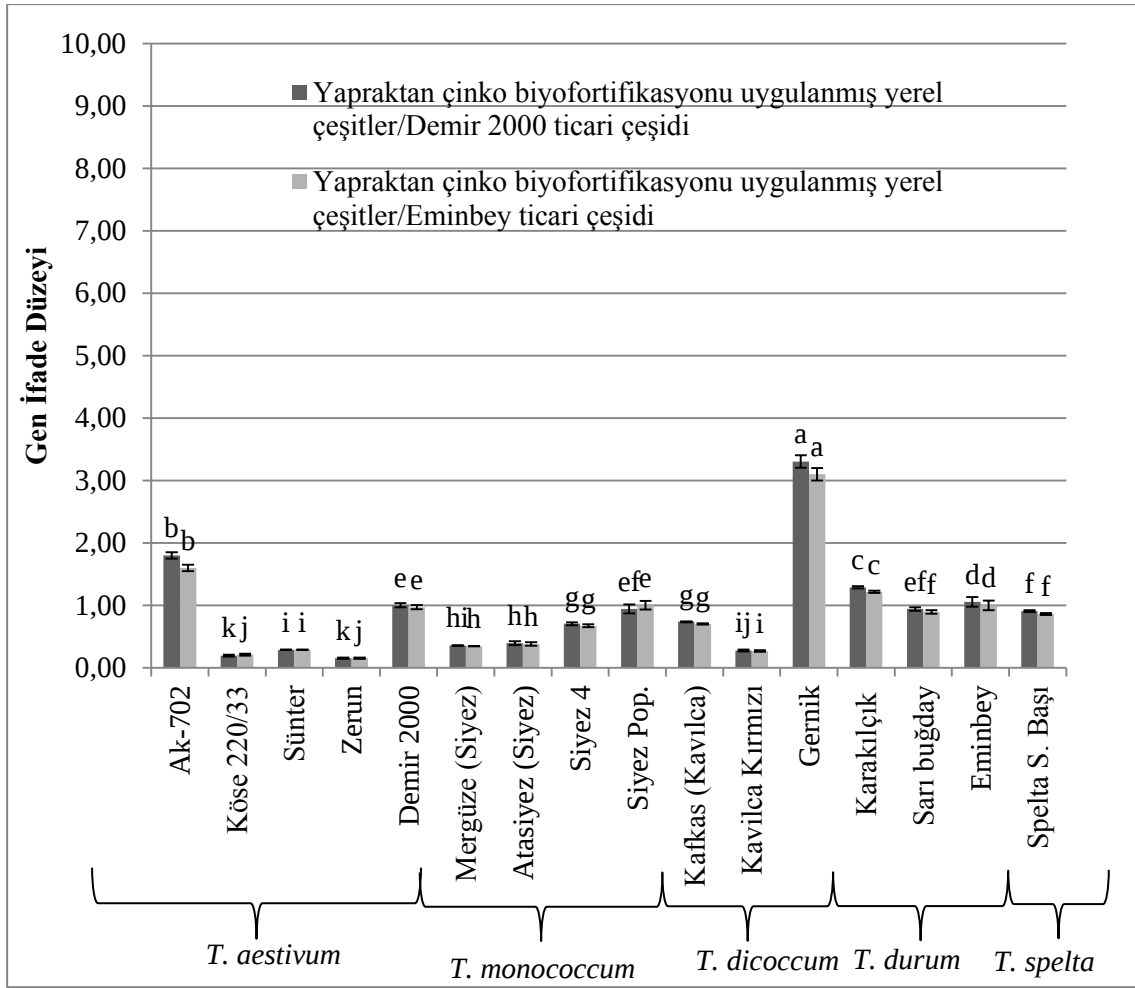
Triticum monoccum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez pop (e, g) genotipinin *PAL* geni aktivitesinin Mergüze, Atasiyez ve Siyez 4 genotiplerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, *Triticum monococcum* genotiplerinin *PAL* geni aktivitelerinin, Zerun genotipi dışında *Triticum aestivum* genotiplerine göre daha istatistiksel açıdan anlamlı fark gösterdiği ve düşük olduğu saptanmıştır.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *PAL* geni aktivitesine sahip genotipin Gernik (c, c) olduğu görülmüştür. Gernik genotipinin *PAL* gen aktivitesinin Ak-702 (a, a) ve Köse 220/33 (b, b) dışındaki ticari çeşitler dahil tüm genotiplere göre yüksek olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir.

Triticum durum genotipleri arasında Eminbey ticari çeşidi temel alındığında en yüksek *PAL* gen aktivitesine sahip genotip Karakılçık'tır (efg, g). Aynı ticari çeşitle karşılaştırıldığında, Karakılçık genotipi *PAL* geni aktivitesi Sarı Buğday genotipine göre 2 kat, Eminbeye göre 3 kat fazladır.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (gh, h) genotipindeki *PAL* gen aktivitesinin ticari genotip olan Demir 2000'den düşük; Eminbey'den ise yüksek olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da ispatlanmıştır.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *PAL* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında en yüksek *PAL* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.27. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası *PAL* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *PAL* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel buğday çeşitlerinin tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında *PAL* geni aktivitesi için hem Demir 2000 ticari çeşidi hem de Eminbey ticari çeşidi esas alındığında en fazla aktivite gösteren genotipin Gernik (a, a) olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da gösterilmiştir.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek *PAL* gen aktivitesine sahip olan yerel çeşitler AK-702 (b, b); en düşük olanlar ise Zerun (k, j) ve Köse 220/33 (k, j) genotipleridir. Ticari çeşit olan Demir 2000 ile kıyaslandığında ise Ak-702 genotipinin *PAL* gen aktivitesinin yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu; ancak Sünter genotipinin yaklaşık 3 kat, Köse 220/33 genotipinin yaklaşık 5 kat ve Zerun genotipinin ise yaklaşık 6 kat gen aktivitelerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

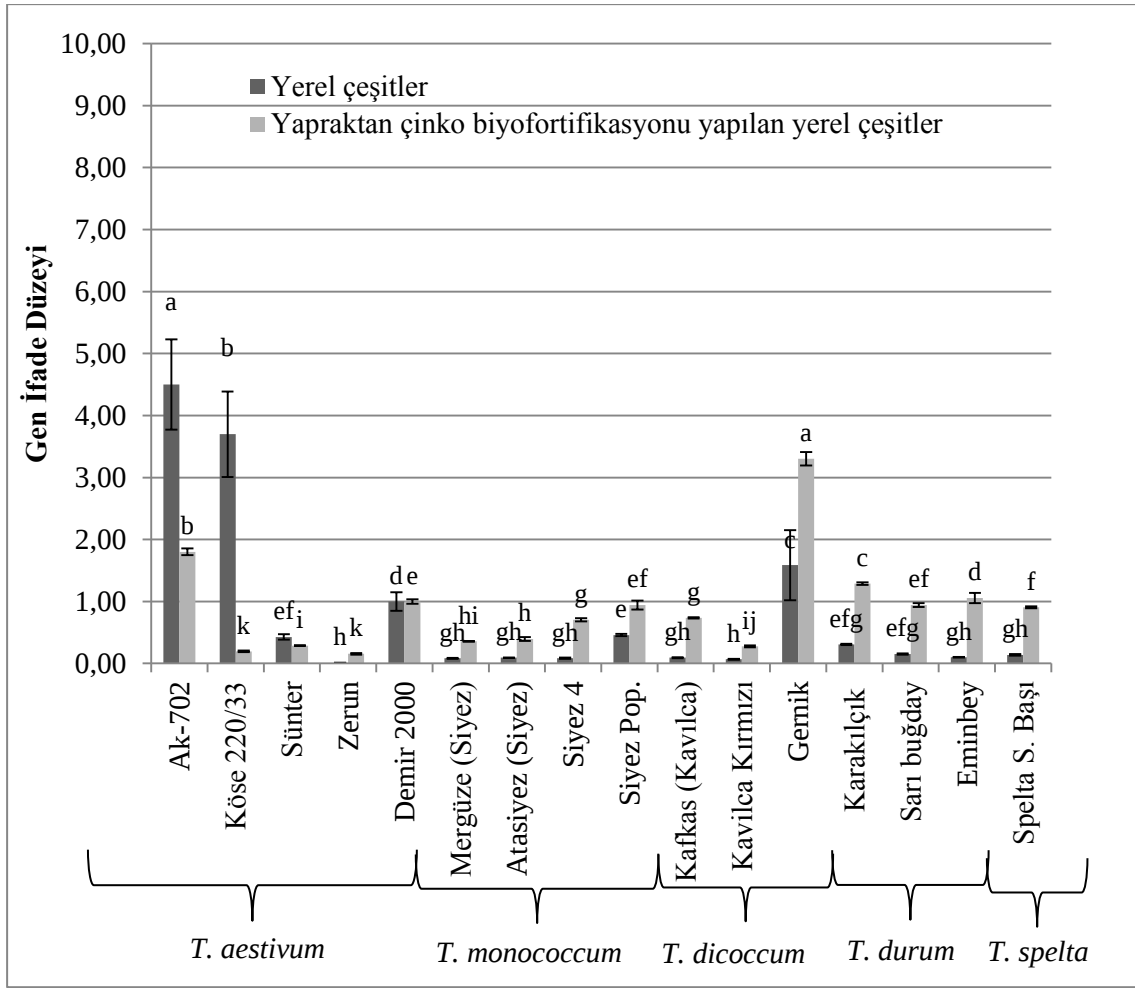
Triticum monoccum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez pop (e, fe) genotipinin *PAL* gen aktivitesinin Mergüze, Atasiyez ve Siyez 4 genotiplerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Atasiyez ve Mergüze genotipleri arasında *PAL* gen aktivitesi açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Ticari genotiplerle kıyaslandığında ise, çinko biyofortifikasyonu uygulanmış *Triticum monococcum* türlerinin çinko biyofortifikasyonu uygulanmış Demir 2000 ve Eminbey genotiplerine göre daha az *PAL* geni aktivitesi gösterdiği görülmüştür.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *PAL* geni aktivitesine sahip genotipin Gernik (a, a) olduğu görülmüştür. Gernik genotipinin *PAL* gen aktivitesinin *Tritium monococcum* türlerine göre yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Ticari genotipler olan Demir 2000 ve Eminbey'e göre de Gernik genotipindeki *PAL* geni aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede farklı ve yaklaşık 3 kat yüksektir.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek *PAL* geni aktivitesine sahip genotipin Karakılçık (c, c) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Karakılçık genotipinin gen aktivitesinin ticari çeşit olan Eminbeye göre istatistiksel olarak farklı ve yüksek olmasına karşın aralarındaki fark azdır.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (f, f) genotipindeki *PAL* gen aktivitesinin ticari genotip olan Demir 2000 ve Eminbey'den istatistiksel olarak farklı olduğu ancak *PAL* gen aktivite değerinin 1,1 katdüşük olduğu görülmüştür.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *PAL* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında en yüksek *PAL* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.28. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında *PAL* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000 ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *PAL* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun *Triticum aestivum* genotipleri içerisinde sadece Zerun genotipinin *PAL* geni ifadesini artırdığı söylenebilir. Buna karşın Ak-702, Köse 220/33, Sünter ve Demir 2000 genotiplerinde çinko biyofortifikasyonunun gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Buna karşın *Triticum monoccum* genotiplerinin tamamında %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonu sonucu *PAL* geni ifadelerinin arttığı görülmüştür. Bu artış sırasıyla Siyez Pop, Siyez 4, Atasiyez ve Mergüze genotipinde görülmüştür. Siyez Pop genotipinin *PAL* geni ifade düzeyinin çinko uygulaması sonunda ticari genotip olan Demir 2000'e ait *PAL* gen ifade düzeyiyle arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Siyez Pop genotipinin *PAL* gen ifadesinin çinko biyofortifikasyonu sonucunda Demir 2000 genotipinin gen ifadesi seviyesine geldiği görülmüştür.

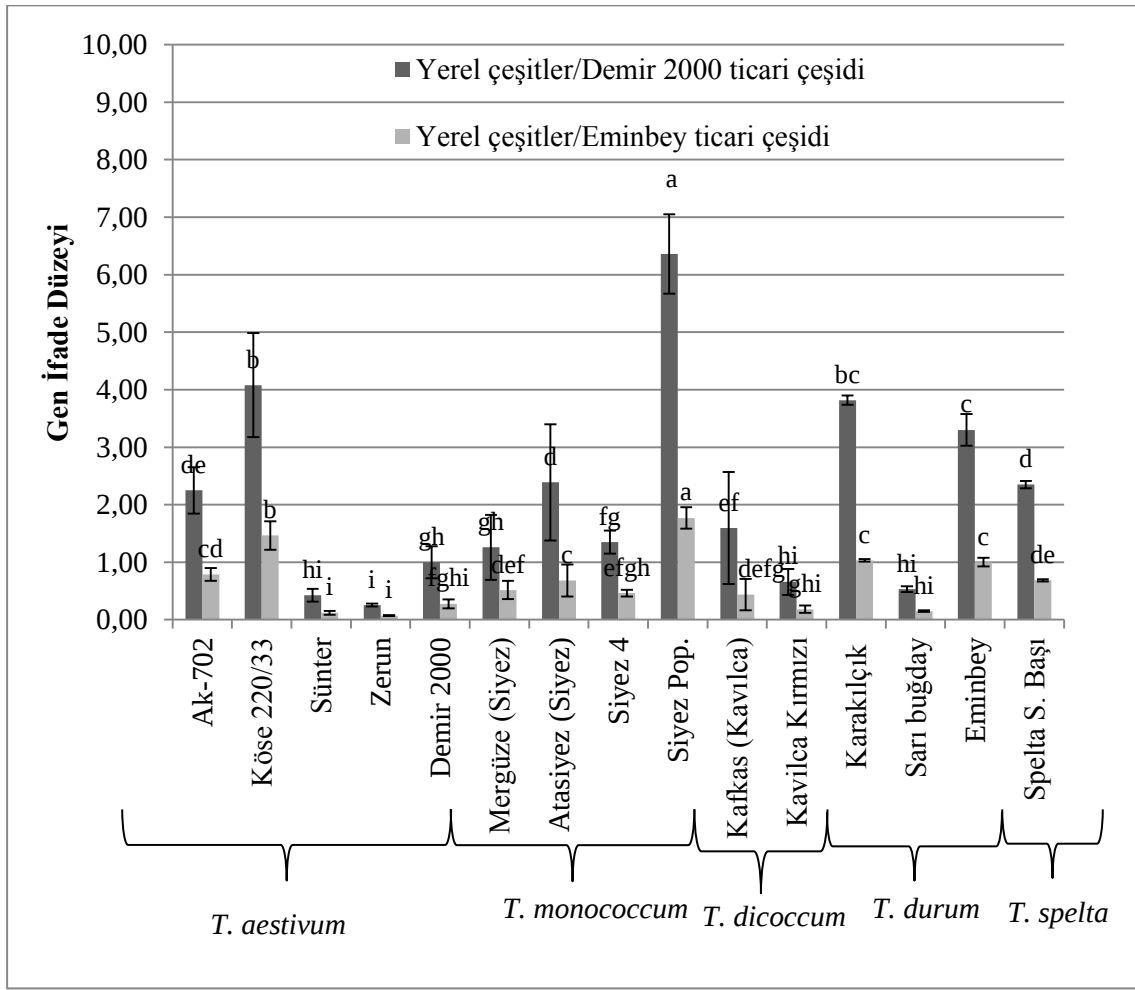
Triticum dicoccum genotiplerinin tamamında çinko biyofortifikasyonu sonunda *PAL* geni ifade düzeylerinde artış görülmüştür. *PAL* gen ifadesindeki artış oranları büyükten küçüğe sırasıyla Gernik genotipi, Kafkas genotipi ve Kavılca kırmızı başak genotipi şeklindedir.

Triticum durum genotiplerinin hepsinde çinko biyofortifikasyonu sonunda *PAL* geni ifade düzeylerinde artış görülmüştür. *PAL* gen ifadesindeki artış oranları Karakılçık ve Eminbey genotiplerinde ve Sarı Buğday genotipine göre daha fazla görülmüştür.

Triticum spelta genotipinde de çinko biyofortifikasyonu sonunda *PAL* geni ifade düzeylerinde artış görülmüştür.

4.5.4. Yerel Buğday Çeşitlerinde *CHS* Geni İfadesi

Şekil 4.29'da yerel buğday çeşitlerinde Şekil 4.30'da yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *CHS* geninin ifade düzeyi Demir 2000 ve Eminey ticari çeşitlerine oranlanarak gösterilmiştir. Şekil 4.31'de ise yerel buğday çeşitlerinde ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday çeşitlerinde *CHS* geni ifade düzeyleri Demir 2000 ticari çeşidine oranlanarak gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Bazı yerel buğday genotiplerinin *CHS* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-i) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *CHS* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında *CHS* geni aktivitesi içinde en yüksekini Demir 2000 ve Eminbey genotipi esas alındığında Siyez Pop. (a, a) genotipi olduğu görülmüştür.

Triticum aestivum genotipleri içinde en fazla *CHS* gen aktivitesine sahip genotipler AK-702 (de, cd) ve Köse 220/33 (b, b) genotipleri; en az *CHS* geni aktivitesine sahip olanlar ise Zerun (i, i) genotipi olduğu belirlenmiştir.

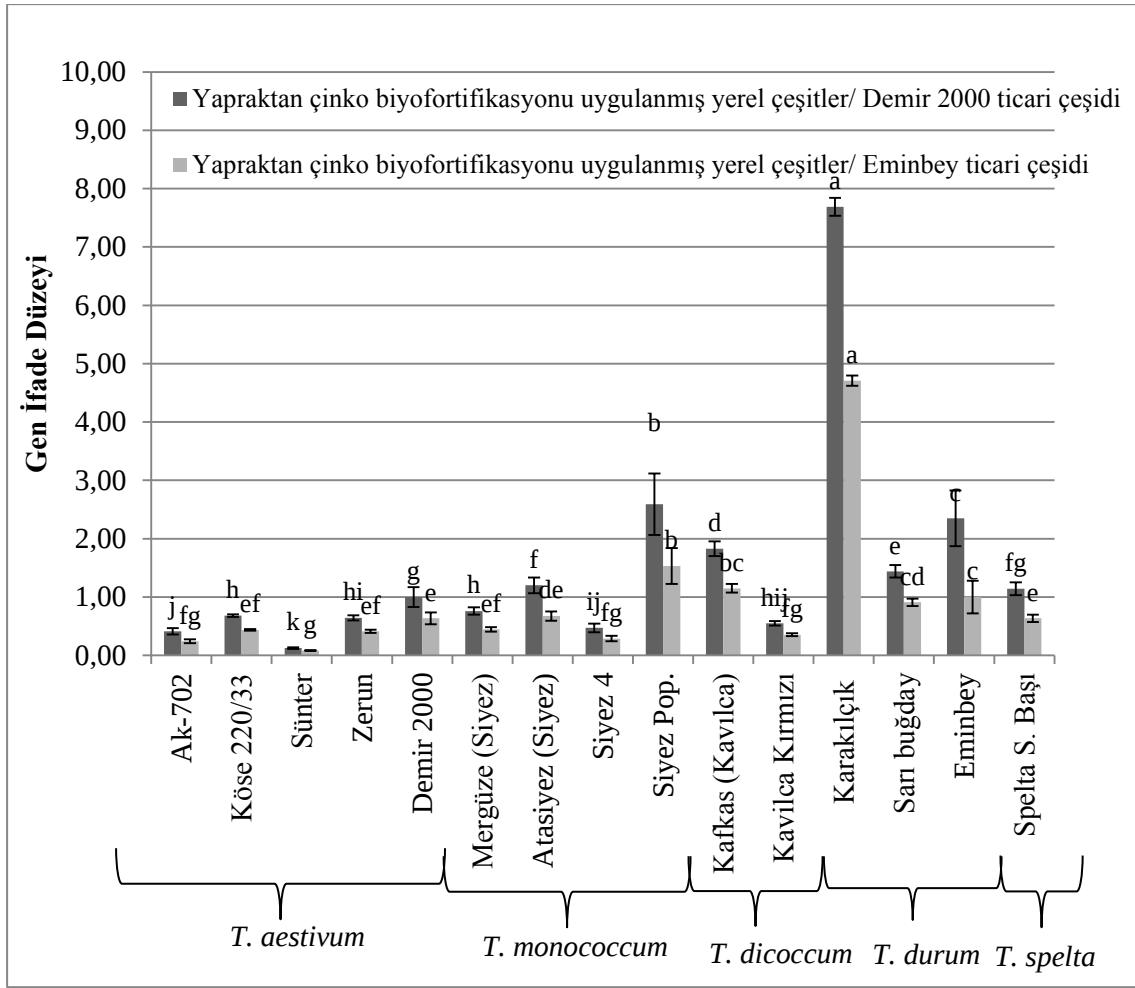
Triticum monoccum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez pop. (a, a) genotipinin gen aktivitesinin Mergüze, Atasiyez ve Siyez 4 genotiplerine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Triticum dicoccum genotipleri arasında Kafkas (ef, defg) genotipinin *CHS* geni aktivitesinin Kavılca Kırmızı genotiplerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Triticum durum genotiplerinden Karakılçık ve Eminbey arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte bu genotiplerin *CHS* gen aktivitesinin Sarı buğday'ın *CHS* gen aktivitesinden yaklaşık 7 kat yüksek olduğu görülmüştür.

Triticum spelta çeşidine ait Spelta S. Başak (d, de) genotipindeki gen aktitesinin ticari çeşit olan Demir 2000'den yüksek; Eminbey'den ise düşük olduğu istatistiksel olarak da ispatlanmıştır.

Triticum aestivum genotipleri içinde *CHS* geni aktivitesinin Köse 220/33 genotipinde yüksek; Zerun genotipinde ise en düşük; *Triticum dicoccum* genotipleri arasında en yüksek *CHS* gen aktivitesine sahip genotipin Gernik olması ve *Triticum durum* genotipleri arasında Karakılçık genotipinin yüksek *CHS* aktivitesine sahip olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.30. Bazı yerel buğday genotiplerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu sonrası *CHS* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *CHS* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin tamamı karşılaştırıldığında *CHS* geni aktivitesi için hem Demir 2000 ticari çeşidi hem de Eminbey ticari çeşidi esas alındığında en fazla aktivite gösteren genotipin Karakılçık (a, a) olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da gösterilmiştir.

Triticum aestivum genotipleri içinde en yüksek *CHS* gen aktivitesine sahip genotip Demir 2000 (g, e) genotipidir. Demir 2000 ile kıyaslandığında ise Ak-702 genotipinin *CHS* gen aktivitesinin yaklaşık 2,5 kat, Köse 220/33 genotipinin yaklaşık 5 kat, Sünter genotipinin yaklaşık 8 kat ve Zerun genotipinin ise yaklaşık 1,5 kat daha düşük olduğu görülmüştür.

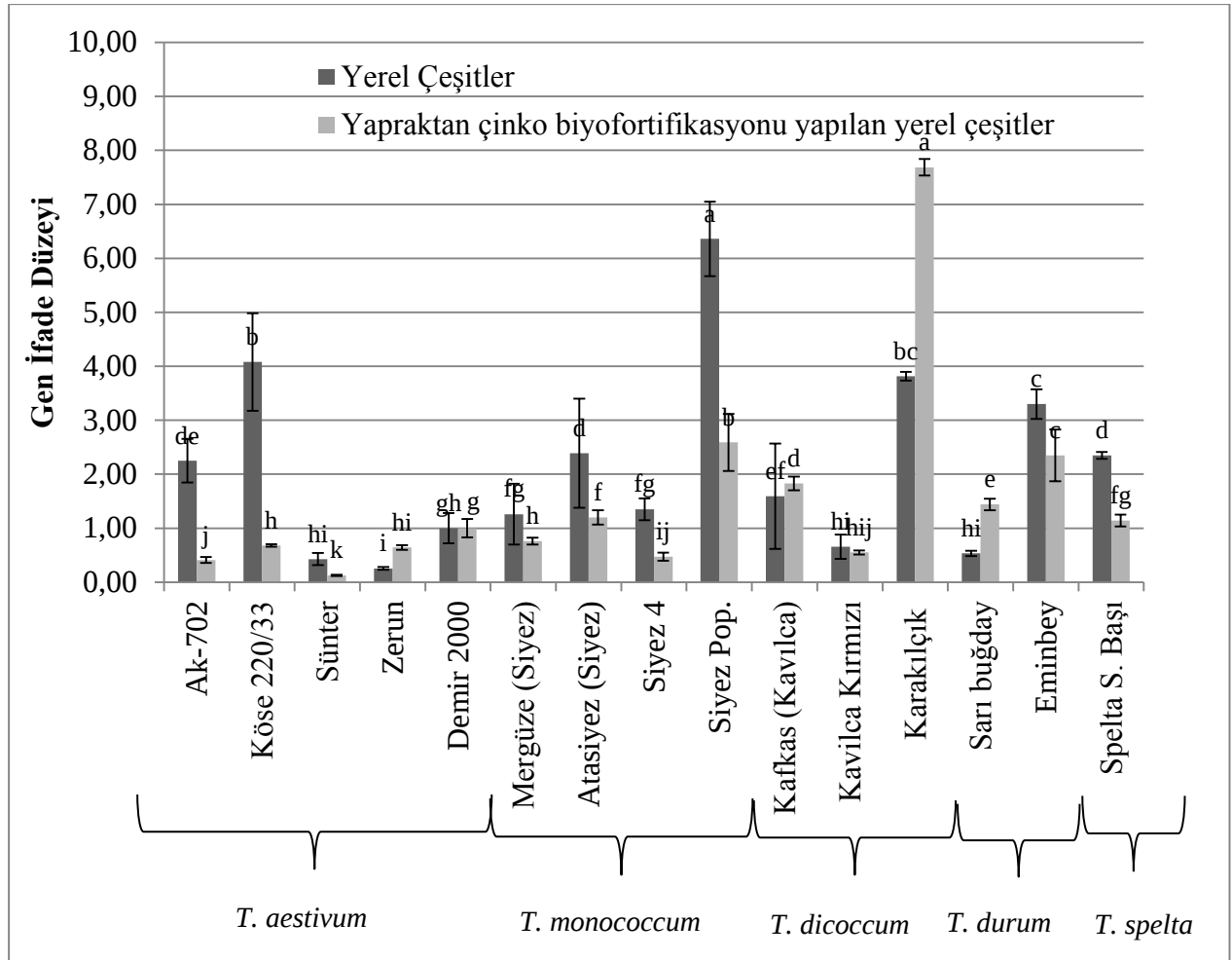
Triticum monococcum genotipleri kıyaslandığında ise Siyez pop (b, b) genotipinin *CHS* gen aktivitesinin Mergüze genotipinden yaklaşık 3,5 kat, Atasiyez genotipinden yaklaşık 2,2 kat ve Siyez 4 genotipden yaklaşık 5,5 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Ticari genotiplerle kıyaslandığında ise, çinko biyofortifikasyonu uygulanmış Mergüze ve Siyez 4 genotiplerinin çinko biyofortifikasyonu uygulanmış Demir 2000 ve Eminbey genotiplerine göre daha düşük; Atasiyez ve Siyez Pop. genotiplerinin ise daha yüksek *CHS* gen aktivitesi gösterdiği görülmüştür.

Triticum dicoccum genotipleri arasında en yüksek *CHS* geni aktivitesine sahip genotipin Kafkas (d, bc) olduğu ve Kavılca Kırmızı genotipinden 3,3 kat yüksek olduğu gösterilmiştir.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek *CHS* geni aktivitesine sahip genotipin Karakılçık (a, a) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Karakılçık genotipinin gen aktivitesinin ticari çeşit olan Eminbeye göre yüksek olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Diğer ticari çeşit olan Demir 2000'e göre de Karakılçık genotipindeki *CHS* geni aktivitesinin yaklaşık 7,5 kat fazla olduğu görülmüştür.

Triticum spelta türüne ait Spelta S. Başak (fg, e) genotipindeki *CHS* gen aktitesinin ticari genotip olan Eminbey'den yaklaşık 2 kat düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte diğer bir ticari çeşit olan Demir 2000 ile arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Triticum durum genotipleri arasında en yüksek *CHS* aktivitesine sahip genotipin Karakılçık olması Bölüm 4.2.'de gösterilen buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.31. Bazı yerel buğday genotiplerinin ve bunlara yapraktan çinko biyofortifikasyonu yapıldığında *CHS* geni ifade değerleri. Farklı küçük harfler (a-k) yerel buğday genotiplerinin ve yapraktan çinko biyofortifikasyonu uygulanmış yerel buğday genotiplerinin kendi grupları içinde ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$). Burada gen ifade değerleri sırasıyla Demir 2000, Eminbey ticari buğday çeşidi ve her bir genotipe ait olan *CHS* geni aktivitesi temel alınarak hesaplanmıştır. Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Yerel çeşit buğday tohumlarının çimlendirilmesinden sonra kardeşlenme aşamasında yapraktan %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun *Triticum aestivum* genotipleri içerisinde sadece Zerun genotipinin *CHS* geni ifadesini artırdığı söylenebilir. Buna karşın Ak-702, Köse 220/33, Sünter ve Demir 2000 genotiplerinde çinko

biyofortifikasyonunun *CHS* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Triticum monococcum genotiplerinde ise %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile çinko biyofortifikasyonunun *CHS* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Aynı şekilde *Triticum dicoccum* genotiplerinde %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile çinko biyofortifikasyonunun *CHS* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

Triticum durum genotiplerinden Karakılçık'ta çinko biyofortifikasyonu sonunda *CHS* geni ifade düzeylerinde 2 kat, ve Sarı buğdayda ise 2,7 kat artış görüldüğü istatistiksel olarak da ispatlanmıştır.

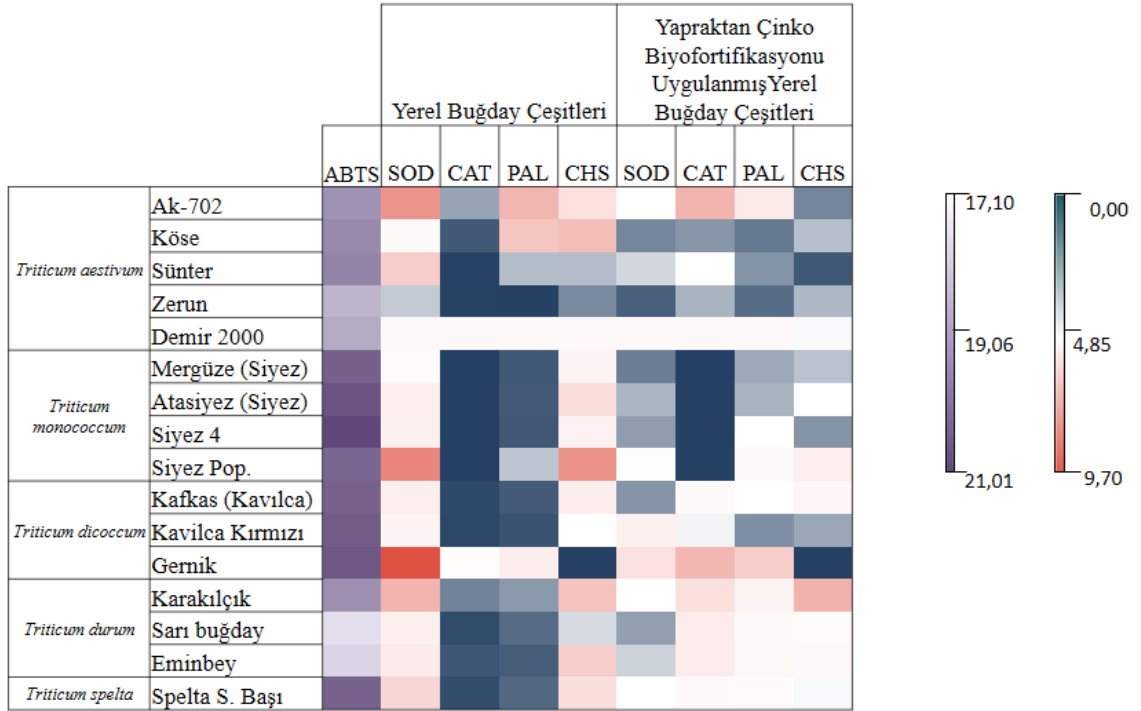
Triticum spelta genotipinde de genotiplerinde %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile çinko biyofortifikasyonunun *CHS* gen ifadesini artması yönünde etkilemediği ve %0,5'lik $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile biyofortifikasyonun etkili olmadığı gösterilmiştir.

5. YORUM

İnsan tüketimi için günlük temel gıda olan buğday, tahıl kalitesini optimize etmek ve insan beslenme ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda “sağlıklı gıda” eğiliminin oluşması nedeniyle dünya çapındaki en önemli mahsullerden biri olan buğdayın çeşitlerinde ve ülkemiz için yerel buğday genotiplerinde antioksidan ve flavonoid biyosentezinin moleküler temelini anlaşılmaması önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması ile seçilen yerel buğday genotiplerinde antioksidan enzim genlerinin (*SOD* ve *CAT*) ve flavonoid biyosentez enzim genlerinin (*PAL* ve *CHS*) ifade düzeyleri ve bu biyosentez yolundaki anahtar enzim genlerinin yapraktan çinko biyofortifikasyonu ile ifade düzeylerindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, bazı yerel buğday genotiplerinin toplam antioksidan içeriği ile antioksidan ve flavonoid biyosentezinde yer alan dört farklı genin transkripsiyon seviyeleri analiz edilmiştir.

Son yıllarda, Zn eksikliğine karşı bitki direncinin daha iyi anlaşılması söz konusu olmakla birlikte, bitkilerin Zn kullanım verimliliğindeki genotipik varyasyonlar ve antioksidan ve flavonoid biyosentezine etkisi konusu önemli görünmektedir. Bu çalışmada ayrıca yapraktan Zn uygulaması ile agronomik biyofortifikasyon uygulanan yerel buğday genotiplerinde aynı enzimlerin gen ifadesindeki değişim transkripsiyonel düzeyde araştırılmıştır. Şekil 5.1’de yerel buğday genotiplerinin ABTS değerleri, yerel buğday genotiplerinin ve bunlara uygulanan yapraktan çinko biyofortifikasyonundan sonra *SOD*, *CAT* ve *PAL*, *CHS* gen ifade düzeylerinin korelasyonuna dayalı ısı haritası (heatmap) ile analizi gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Yerel buğday çeşitlerinin ABTS değerleri, Yerel buğday çeşitlerinin ve bunlara uygulanan yapraktan çinko biyofortifikasyonundan sonra SOD, CAT ve PAL, CHS gen ifade düzeylerinin korelasyonuna dayalı ısı haritası (heatmap) ile analizi.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre;

1-Yerel buğday genotiplerine ait yapraklardan izole edilen RNA'lar için ölçüm sonuçları incelendiğinde qPCR uygulaması için yeterli saflık ve kalitede RNA ve sonrasında yeterli saflık ve kalitede cDNA elde edildiği görülmektedir.

2- Çalışmada, buğday genotiplerinin antioksidan kapasiteleri karşılaştırıldığında en yüksek antioksidan kapasitesinin Siyez 4 genotipine; en düşük antioksidan kapasitesinin ise Sarı Buğday'a ait olduğu saptanmıştır. *Triticum aestivum* genotiplerinden Ak-702 genotipinde, *Triticum monococcum* genotiplerinden Siyez Pop. genotipinde, *Triticum durum* genotiplerinden Karakılçık genotipinde, hem antioksidan kapasitesinin hem de SOD, CAT, PAL ve CHS genlerinin ifade düzeylerinin yüksek olduğu dolayısıyla ABTS ve gen ifade analizi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür. *Triticum dicoccum* genotiplerinden ise Gernik genotipinde hem antioksidan kapasitesinin yüksek olması hem de SOD, CAT ve PAL genlerinin ifade düzeyinin yüksek olması sonuçların uyumlu olduğunu göstermektedir (Şekil 5.1). Bu sonuçlar, antioksidan enzim genlerinin ve

flavonoid biyosentez genlerinin ifade düzeylerinin, genotipe bağılı olarak değiştiiğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu sonuçlar her bir buğday çeşidinde yer alan genotipler ayrı ayrı değerlendirildiğinde Ak-702 çeşidinin tohumluğu çoğaltılarak ticarete konu olması gerektiğini ve ayrıca Siyez Pop, Gernik ve Karakılıçık genotiplerinin ticarileştirilmek üzere seçilebilecek genotipler olduklarını göstermektedir.

3- Yapraktan çinko biyofortifikasyonunun *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerinin ifade düzeylerine olan etkisi değerlendirildiğinde ise, %0,5'lik $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile yapraktan biyofortifikasyonun *SOD*, *CAT*, *PAL* ve *CHS* genlerinin ifade düzeylerinde daha eşit bir dağılım görölmesine neden olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlar *Triticum dicoccum* ve *Triticum durum* genotiplerinin yapraktan uygulanan Zn gübresini daha iyi kullanabildikleri göstermiştir ve yapraktan uygulanan Zn gübresinin farklı genlerin ifade düzeyinin farklı oranda etkilediğini ayrıca yapraktan uygulanan Zn gübresinden etkilenme miktarının genotipler arasında değiştiiğini göstermektedir. Guo'nun [103] çalışmasında, tahılda Zn birikimini düzenleyen anahtar genleri tanımlamak ve farklı çeşitler arasında Zn konsantrasyonu ve mevcudiyet farkının moleküler mekanizmasını ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya hala ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır. Bu çalışmada ayrıca tahılda yapraktan Zn biyofortifikasyonu uygulaması için kullanılacak Zn çözeltisi konsantrasyonun önemi de vurgulanmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan Zn çözeltisi konsantrasyonu %0.5 olarak seçilmiştir. Ancak ticari olarak çinko gübresinin "Suda çözünür Zn" olarak %22 (w/w) konsantrasyonda satıldığı ve buğday için kardeşlenme döneminde yapraktan uygulanması sırasında %2.5-3.0 (g/L) olarak hazırlanmasının uygun olacağı belirtilmektedir. Yapılan son çalışmalar yapraktan Zn biyofortifikasyonu için %0.5'ten daha yüksek konsantrasyon uygulamanın yaprakta Zn toksisitesine neden olmayacağını göstermiştir. Bu nedenle ileri çalışmalarda biyofortifikasyon için daha yüksek Zn çözeltisi hazırlanıp uygulanmalıdır.

Bu çalışmada transkriptomik analiz yaklaşımı ile yerel çeşit buğday genotiplerinde antioksidan enzim ve flavonoid biyosentez enzim genlerinde genotip farklılığına bağılı olarak aktivite değişiklikleri ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, yapraktan Zn uygulaması ile söz konusu genlerin ifade profilindeki değişimin daha eşit bir dağılım gösterme yönünde olduğu ortaya konmuştur. Çalışma, daha önce antioksidan kapasitesi ve ilgili genlerin ifade düzeyleri üzerine sıklıkla çalışmalar yapılmış olan *Triticum aestivum* genotiplerinin yanı sıra *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum*, *Triticum*

durum ve *Triticum spelta* genotiplerini de içermesi sebebiyle önem taşımaktadır ve belirtilen genotiplerde yapılacak transkriptomik analizler için kaynak oluşturmaktadır. İleri çalışmalarda yerel buğday genotiplerinde metabolomik çalışmaların yapılması ve tam genom sekanlama çalışmaları ile elde edilecek sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi önerilebilir. Böylece, yerel buğday genotiplerine çinko biyofortifikasyonu uygulandıktan sonra yapraklardaki antioksidan mekanizmalarının temel elemanları olan askorbat ve glutatyon içeriğinin, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid içeriklerinin analiz edilmesi de daha etkili olabilir.



7. KAYNAKLAR

- [1] C. Stanton, D. Sanders, U. Krämer, D. Podar, Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification, *Molecular Plant*,15, (2022), 65-85.
- [2] I. Cakmak, M. Atli, R. Kaya, H. Evliya, H. Marschner, Association of high light and zinc deficiency in cold-induced leaf chlorosis in grapefruit and mandarin trees, *Journal of Plant Physiology*,146, (1995), 355-360.
- [3] P. J. White, M. R. Broadley, Physiological limits to zinc biofortification of edible crops, *Frontiers in plant science*,2, (2011), 80.
- [4] M. Sillanpää, Micronutrient assessment at the country level: an international study. Book M. Sillanpääs, (eds: Vol.Number, 1990.
- [5] N. Zencirci, F. S. Baloch, E. Habyarimana, G. Chung, Wheat Landraces. Book, 2021.
- [6] B. Belderok, J. Mesdag, H. Mesdag, D. A. Donner, Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe. Book B. Belderok, J. Mesdag, H. Mesdag, D. A. Donners, 2000.
- [7] A. Karagöz, Wheat landraces of Turkey, *Emirates journal of food and agriculture*,26, (2014), 149.
- [8] F. Özberk, A. Karagöz, İ. Özberk, A. Ayhan, Buğday genetik kaynaklarından yerel ve kültür çeşitlerine; Türkiye'de buğday ve ekmek, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*,25, (2016), 218-233.
- [9] A. K. Hafız Muminjanov, Türkiye'nin Biyoçeşitliliği: Genetik Kaynakların Sürdürülebilir Tarım ve Gıda Sistemlerine Katkısı. Book A. K. Hafız Muminjanovs, (eds: Hafız Muminjanov, A. K.), 2019.
- [10] E. Giambanelli, F. Ferioli, B. Koçaoglu, M. Jorjadze, I. Alexieva, N. Darbinyan, L. F. D'Antuono, A comparative study of bioactive compounds in primitive wheat populations from Italy, Turkey, Georgia, Bulgaria and Armenia, *Journal of the Science of Food and Agriculture*,93, (2013), 3490-3501.
- [11] S. O. Serna-Saldivar, Cereal Grains Properties, Processing, and Nutritional Attributes. Book S. O. Serna-Saldivars, 2010.
- [12] B. Z. Hançerlioğulları, *Süne Zararının Tespiti İçin Florometrik Yöntem Geliştirilmesi*. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2017.

- [13] İ. Kemaloğlu, Türkiye'de Buğday. *Gıda Türk* 2020,
- [14] S. Padulosi, B. Mal, S. B. Ravi, J. Gowda, K. Gowda, G. Shanthakumar, N. Yenagi, M. Dutta, Food security and climate change: role of plant genetic resources of minor millets, *Indian Journal of Plant Genetic Resources*,22, (2009), 1-16.
- [15] B. Burlingame, R. Charrondiere, B. Mouille, Food composition is fundamental to the cross-cutting initiative on biodiversity for food and nutrition, *Journal of food composition and analysis*,22, (2009), 361-365.
- [16] S. Dhua, K. Kumar, Y. Kumar, L. Singh, V. S. Sharanagat, Composition, characteristics and health promising prospects of black wheat: A review, *Trends in Food Science & Technology*,112, (2021), 780-794.
- [17] K. Zhou, L. Yu, Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation, *LWT-Food science and Technology*,37, (2004), 717-721.
- [18] T. Nurmi, A.-M. Lampi, L. Nyström, Y. Hemery, X. Rouau, V. Piironen, Distribution and composition of phytosterols and steryl ferulates in wheat grain and bran fractions, *Journal of Cereal Science*,56, (2012), 379-388.
- [19] D. L. Luthria, Y. Lu, K. M. John, Bioactive phytochemicals in wheat: Extraction, analysis, processing, and functional properties, *Journal of functional foods*,18, (2015), 910-925.
- [20] Y. Zhu, P. Wang, W. Sha, S. Sang, Urinary biomarkers of whole grain wheat intake identified by non-targeted and targeted metabolomics approaches, *Scientific reports*,6, (2016), 1-16.
- [21] O. El-Sayed, A. Rizkalla, S. Sabri, In vitro mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*,4, (2007), 377-383.
- [22] E.-S. Abdel-Aal, P. Hucl, F. Sosulski, R. Graf, C. Gillott, L. Pietrzak, Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,49, (2001), 3559-3566.
- [23] M. U. Akram, A. B. Uğuz, R. Yılmaz, U. Uygun, C. Y. Tüzün, Ş. B. Topaloğlu, A. Salantur, A. Dissanayake, M. Nair. In Fatty acid and antioxidant profiles of selected Turkish wheat landraces, *Wheat Diversity & Human Health*, İstanbul, 2019, p 46.-
- [24] Healthgrain Forum, (Erişim tarihi: **28 Kasım 2021**).

- [25] K. K. Adom, R. H. Liu, Antioxidant activity of grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (2002), 6182-6187.
- [26] K. K. Adom, M. E. Sorrells, R. H. Liu, Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, (2003), 7825-7834.
- [27] K. K. Adom, M. E. Sorrells, R. H. Liu, Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005), 2297-2306.
- [28] E. Graf, J. W. Eaton, Antioxidant functions of phytic acid, *Free Radical Biology and Medicine*, 8, (1990), 61-69.
- [29] K.-H. Kim, R. Tsao, R. Yang, S. W. Cui, Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chemistry*, 95, (2006), 466-473.
- [30] P. Mattila, J.-m. Pihlava, J. Hellström, Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005), 8290-8295.
- [31] G. Panfili, L. Cinquanta, A. Fratianni, R. Cubadda, Extraction of wheat germ oil by supercritical CO₂: oil and defatted cake characterization, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, (2003), 157-161.
- [32] E. Khlestkina, O. Y. Shoeva, E. Gordeeva, Flavonoid biosynthesis genes in wheat, *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 5, (2015), 268-278.
- [33] D. Ma, D. Sun, C. Wang, H. Ding, H. Qin, J. Hou, X. Huang, Y. Xie, T. Guo, Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress, *Frontiers in plant science*, 8, (2017), 860.
- [34] A. B. Uğuz, R. Yılmaz. In *Structural Bioinformatics Search of Enzymes Involved in the Biosynthesis Pathway of Flavonoids in Bread Wheat 20. ULUSLARARASI KATILIMLI ULUSAL BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ*, Ankara, 2019.-
- [35] UniProt, Superoxide dismutase, <https://www.uniprot.org/uniprot/O82571> (Erişim tarihi: 15.02.2022).
- [36] UniProt, Catalase, <https://www.uniprot.org/uniprot/D6PW71> (Erişim tarihi: 15.02.2022).

- [37] UniProt, Phenylalanine ammonia-lyase, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q43210> (Erişim tarihi: **15.02.2022**).
- [38] UniProt, Chalcone synthase, <https://www.uniprot.org/uniprot/W8PF32> (Erişim tarihi: **22.03.2022**).
- [39] M. Heinze, B. Gerhardt, Plant catalases. *Plant peroxisomes*, (eds: Springer, Place, Published, 103-140, **2002**).
- [40] S. S.-A. İlker Büyük, Sümer Aras, Bitkilerin Stres Koşullarına Verdięi M¼lek¼ler Cevaplar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoteknoloji Dergisi,69, (**2012**), 97-110.
- [41] A. Caverzan, A. Casassola, S. P. Brammer, Antioxidant responses of wheat plants under stress, Genetics and molecular biology,39, (**2016**), 1-6.
- [42] F. Groß, J. Durner, F. Gaupels, Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses, Frontiers in plant science,4, (**2013**).
- [43] S. Stephenie, Y. P. Chang, A. Gnanasekaran, N. M. Esa, C. Gnanaraj, An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement, Journal of functional foods,68, (**2020**), 103917.
- [44] M. Hasanuzzaman, M. Bhuyan, K. Parvin, T. F. Bhuiyan, T. I. Anee, K. Nahar, M. Hossen, F. Zulfiqar, M. Alam, M. Fujita, Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence, International Journal of Molecular Sciences,21, (**2020**), 8695.
- [45] R. MERAL, İ. S. DOĞAN, G. S. KANBEROĞLU, Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar, Journal of the Institute of Science and Technology,2, (**2012**), 45-50.
- [46] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in plant science,2, (**1997**), 152-159.
- [47] E. E. Çelik, *Besinsel Lifelere Bağlı Biyoaktif Maddelerin Antioksidan Kapasitesi ve Rejenerasyon Davranışının Quencher Metoduyla Belirlenmesi*. Hacettepe Üniversitesi, **2013**.
- [48] H. V. Onur Tolga Okan, Mehmet Öz, İlhan Deniz, Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doęu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler, Orman Fak¼ltesi Dergisi,13, (**2012**), 48-50.

- [49] A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S. I. Koo, O. K. Chun, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *Journal of food composition and analysis*,24, (2011), 1043-1048.
- [50] A. Serpen, V. Gökmen, N. Pellegrini, V. Fogliano, Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products, *Journal of Cereal Science*,48, (2008), 816-820.
- [51] M. Davies, L. Forni, R. Willson, Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions, *The Biochemical journal*,255, (1988), 513-22.
- [52] H. Ç. Şendoğan Topçu, Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*,8, (2015), 9-29.
- [53] G. A. Bresnahan, F. A. Manthey, K. A. Howatt, M. Chakraborty, Glyphosate Applied Preharvest Induces Shikimic Acid Accumulation in Hard Red Spring Wheat (*Triticum aestivum*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,51, (2003), 4004-4007.
- [54] K. Das, S. Gezici, Review article Plant secondary metabolites, their separation, identification and role in human disease prevention, *Annals of Phytomedicine: An International Journal*,7, (2018), 13-24.
- [55] R. Hussein, A. El-Anssary, *Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants*. (eds: Place, Published, 2019.
- [56] ChEBI, Phenol,<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:15882> (Erişim tarihi: 21.02.2022).
- [57] F. A. Fatma Alaca, Neşet Arslan, Sekonder Metabolitlerin Bitkiler Açısından Önemi, *Ziraat Mühendisliği*, (2012), 48-55.
- [58] ChEBI, Flavone,<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:42491> (Erişim tarihi: 22.3.2022).
- [59] O. K. Gondor, T. Janda, V. Soós, M. Pál, I. Majláth, M. K. Adak, E. Balázs, G. Szalai, Salicylic Acid Induction of Flavonoid Biosynthesis Pathways in Wheat Varies by Treatment, *Frontiers in plant science*,7, (2016).
- [60] Malnutrition,<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition> (Erişim tarihi: 2021).

- [61] N. D. Nihal Dündar, Bumin Dündar, Malnütrisyonlu Çocuğun Değerlendirilmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,13, (2016), 39-42.
- [62] W. H. Organization, Levels and trends in child malnutrition: UNICEF, (2021).
- [63] Global Hunger Index The Challenge of Hidden Hunger: Addressing the Challenge of Hidden Hunger. Book, 2014.
- [64] Nutrition,<https://www.harvestplus.org/what-we-do/nutrition> (Erişim tarihi: 2 Kasım 2021).
- [65] N. D. Rathan, D. Sehgal, K. Thiagarajan, R. Singh, A.-M. Singh, V. Govindan, Identification of Genetic Loci and Candidate Genes Related to Grain Zinc and Iron Concentration Using a Zinc-Enriched Wheat ‘Zinc-Shakti’, Frontiers in Genetics,12, (2021).
- [66] Iron Deficiency Subindex,https://bpi.harvestplus.org/subindex_micronutrients.html?id=c2 (Erişim tarihi: 21 Kasım 2021).
- [67] S.-R. Pasricha, J. Tye-Din, M. U. Muckenthaler, D. W. Swinkels, Iron deficiency, The Lancet,397, (2021), 233-248.
- [68] Vitamin A Deficiency,<https://www.who.int/data/nutrition/nlis/info/vitamin-a-deficiency> (Erişim tarihi: 22 Şubat 2022).
- [69] Vitamin A Deficiency Subindex,https://bpi.harvestplus.org/subindex_micronutrients.html?id=c2 (Erişim tarihi: 21 Şubat 2021).
- [70] HarvestPlus, Zinc Deficiency Subindex,https://bpi.harvestplus.org/subindex_micronutrients.html?id=c2 (Erişim tarihi: 2 Kasım 2021).
- [71] O. Acar, *Biyofortifikasyonun Arpa, Yulaf ve Öğütme Fraksiyonlarında Bazı Mineraller ve Fonksiyonel Bileşenler Üzerine Etkisinin Araştırılması*. 2020.
- [72] P. Nestel, H. E. Bouis, J. V. Meenakshi, W. Pfeiffer, Biofortification of Staple Food Crops, The Journal of Nutrition,136, (2006), 1064-1067.
- [73] C. Herrington, K. Lividini, M. D. Angel, E. Birol, Prioritizing countries for biofortification interventions: biofortification priority index second edition (BPI 2.0), HarvestPlus Working Paper, (2019).

- [74] HarvestPlus, *Catalyzing Biofortified Food Systems: The 2018 Annual Report*, **2019**.
- [75] S. P. Scott, L. E. Murray-Kolb, M. J. Wenger, S. A. Udipi, P. S. Ghugre, E. Boy, J. D. Haas, Cognitive Performance in Indian School-Going Adolescents Is Positively Affected by Consumption of Iron-Biofortified Pearl Millet: A 6-Month Randomized Controlled Efficacy Trial, *The Journal of Nutrition*, **148**, (2018), 1462-1471.
- [76] A. C. Palmer, K. Healy, M. A. Barffour, W. Siamusantu, J. Chileshe, K. J. Schulze, K. P. West, Jr., A. B. Labrique, Provitamin A Carotenoid–Biofortified Maize Consumption Increases Pupillary Responsiveness among Zambian Children in a Randomized Controlled Trial, *The Journal of Nutrition*, **146**, (2016), 2551-2558.
- [77] C. Hotz, C. Loechl, A. Lubowa, J. K. Tumwine, G. Ndeezi, A. Nandutu Masawi, R. Baingana, A. Carriquiry, A. de Brauw, J. V. Meenakshi, D. O. Gilligan, Introduction of β -Carotene–Rich Orange Sweet Potato in Rural Uganda Resulted in Increased Vitamin A Intakes among Children and Women and Improved Vitamin A Status among Children, *The Journal of Nutrition*, **142**, (2012), 1871-1880.
- [78] E. F. Talsma, I. D. Brouwer, H. Verhoef, G. N. Mbera, A. M. Mwangi, A. Y. Demir, B. Maziya-Dixon, E. Boy, M. B. Zimmermann, A. Melse-Boonstra, Biofortified yellow cassava and vitamin A status of Kenyan children: a randomized controlled trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **103**, (2016), 258-267.
- [79] M. J. Haskell, K. M. Jamil, F. Hassan, J. M. Pearson, M. I. Hossain, G. J. Fuchs, K. H. Brown, Daily consumption of Indian spinach (*Basella alba*) or sweet potatoes has a positive effect on total-body vitamin A stores in Bangladeshi men, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, (2004), 705-714.
- [80] B. Gannon, C. Kaliwile, S. A. Arscott, S. Schmaelzle, J. Chileshe, N. Kalungwana, M. Mosonda, K. Pixley, C. Masi, S. A. Tanumihardjo, Biofortified orange maize is as efficacious as a vitamin A supplement in Zambian children even in the presence of high liver reserves of vitamin A: a community-based, randomized placebo-controlled trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **100**, (2014), 1541-1550.
- [81] S. Sazawal, U. Dhingra, P. Dhingra, A. Dutta, S. Deb, J. Kumar, P. Devi, A. Prakash, Efficacy of high zinc biofortified wheat in improvement of micronutrient status, and prevention of morbidity among preschool children and

- women - a double masked, randomized, controlled trial, *Nutrition Journal*,17, (2018).
- [82] S. Kumar, A. Palve, C. Joshi, R. K. Srivastava, Rukhsar, Crop biofortification for iron (Fe), zinc (Zn) and vitamin A with transgenic approaches, *Heliyon*,5, (2019), e01914.
- [83] O. X. Dong, S. Yu, R. Jain, N. Zhang, P. Q. Duong, C. Butler, Y. Li, A. Lipzen, J. A. Martin, K. W. Barry, J. Schmutz, L. Tian, P. C. Ronald, Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9, *Nature Communications*,11, (2020).
- [84] Sanchita, A. Sharma, Chapter 23 - Gene Expression Analysis in Medicinal Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, (eds: Ahmad, P., Ahanger, M. A., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Alam, P., Alyemeni, M. N.), Academic Press, 407-414, 2018.
- [85] B. T. Li, J. X. Lim, M. H. T. Ling, Analyzing Transcriptome-Phenotype Correlations. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, (eds: Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C.), 819-824, 2019.
- [86] Natureportfolio, Genomic Analysis,<https://www.nature.com/subjects/genomic-analysis> (Erişim tarihi: 23 Kasım 2021).
- [87] M. C. Baloglu, *Expression Analysis of NAC Type Transcription Factors on Wheat Seedlings Under Abiotic Stress Conditions*. 2011.
- [88] S. Derveaux, J. Vandesompele, J. Helleman, How to do successful gene expression analysis using real-time PCR, *Methods*,50, (2010), 227-230.
- [89] A. Ruiz-Villalba, J. M. Ruijter, M. J. B. van den Hoff, Use and Misuse of C(q) in qPCR Data Analysis and Reporting, *Life (Basel, Switzerland)*,11, (2021), 496.
- [90] D. H. Farkas, C. A. Holland, Chapter 3 - Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*, (eds: Tubbs, R. R., Stoler, M. H.), Churchill Livingstone, 19-32, 2009.
- [91] N. Ahmed, M. Maekawa, K. Noda, Anthocyanin accumulation and expression pattern of anthocyanin biosynthesis genes in developing wheat coleoptiles, *Biologia plantarum*,53, (2009), 223-228.

- [92] P. Koehler, G. Hartmann, H. Wieser, M. Rychlik, Changes of Folates, Dietary Fiber, and Proteins in Wheat As Affected by Germination, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, (2007), 4678-4683.
- [93] T. Samreen, Humaira, H. U. Shah, S. Ullah, M. Javid, Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*), *ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, 10, (2017), S1802-S1807.
- [94] H. Manmathan, N. L. V. Lapitan, Measuring Germination Percentage in Wheat, *Bio-protocol*, 3, (2013), e866.
- [95] P. Boonchuay, I. Cakmak, B. Rerkasem, C. Prom-U-Thai, Effect of different foliar zinc application at different growth stages on seed zinc concentration and its impact on seedling vigor in rice, *Soil science and plant nutrition*, 59, (2013), 180-188.
- [96] S. Sönmez, *Bitki Beslemenin Temel Unsurları*. Book S. Sönmezs, 2013.
- [97] V. Mandic, V. Krnjaja, Z. Tomic, Z. Bijelic, A. Simic, D. Ruzic Muslic, M. Gogic, Nitrogen fertilizer influence on wheat yield and use efficiency under different environmental conditions, *Chilean journal of agricultural research*, 75, (2015), 92-97.
- [98] Y. Kaya, *Buğdayın Kültüre Alınması (Bilgi Notu I)*, 19, 2018.
- [99] T. İ. BİR, *TÜRKİYE’NİN BUĞDAY ATLASI*, (2016).
- [100] İ. Coşkun, M. Tekin, A. Taner, Türkiye Kökenli Diploid ve Tetraploid Kavuzlu Buğday Hatlarının Bazı Agro-morfolojik Özellikler Bakımından Tanımlanması, *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5, (2019), 322-334.
- [101] H. ÇILGINOĞLU, D. GÜNER, Kastamonu Gastronomik Ürünlerinin Nuh’un Ambarı Projesi Kapsamında, *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 9, (2021), 2874-2892.
- [102] T. Scientific, 260/280 and 260/230 ratios. T042-Technical bulletin Nanodrop spectrophotometers. In Tilgjengeligg fra: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science>: 2009.
- [103] M. W. Pfaffl, Relative quantification, *Real-time PCR*, 63, (2006), 63-82.

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

2. Uluslararası / 12. Ulusal Gıda Mühendisliği Kongresi- “The Effect of RNA Quality Extracted from Wheat Leaf in Tillering Stage” başlıklı poster sunumu

The 2nd International/12th National Food Engineering Congress, 25-27 November 2021, Ankara

The Effect of Cold Stress on RNA Quality Extracted from Wheat Leaf in Tillering Stage

Aysegül Bilge Uğuz¹, Ayten Salantur², Remziye Yılmaz¹

¹ FoodOmics Laboratory, Department of Food Engineering, Hacettepe University, 06800, Beytepe, Ankara, Turkey

² Ministry of Agriculture and Forestry, Field Crops Central Research Institute, TAGEM, Ankara, Turkey

ABSTRACT

In this study, we aimed to present the effect of cold stress on RNA quality extracted from wheat leaf at tillering stage which is one of the early growth stages of wheat. To achieve this purpose, phenol-chloroform based RNA extraction method was used to compare the quantity and quality of RNA extracted from selected Turkish wheat genotypes. The results showed that when the cold stress was removed, the amount of nucleotides obtained from RNA isolation increased 2 to 28 times the average for wheat genotypes. The results show the importance of ambient temperatures for the amount of RNAs isolated from wheat leaves.

INTRODUCTION

Wheat is one of the major components of nutrients for the human diet. Recent studies on the health advantages of bioactive compounds from wheat, have become crucial. In addition, studies involving the characterization of bioactive compounds in wheat and transcriptomic analysis of the expression level of enzyme genes responsible for bioactive compounds are gaining popularity. RT-PCR is one of the methods used in gene expression analysis. The starting material of RT-PCR is RNA therefore the application of this method begins with RNA isolation and RNA quality and quantity are important factors for ensuring the accuracy of gene expression analysis.

METHODOLOGY

In the study, selected 10 Turkish wheat genotypes were germinated as two groups after sterilization.

Fig.1: Wheat grains taken into petri dishes after sterilization

All of the local wheat genotypes selected in the group called "cold stress group" were germinated at 6° C, but the ambient temperature was reduced to -5° C 5 days before they reached the tillering stage. In the group called "control group", the growing environment temperature of the wheat samples

Fig.2: Wheat genotypes at tillering stage

Wheat Genotype	Genotype ID
Marginal (Şeyt)	MC1
İzmit (Şeyt)	MC2
Şeyt 4	MC3
Şeyt Pop.	MC4
Karlıca (Karlıca)	DC1
Karlıca (Karlıca)	DC2
Garnik	DC3
Karlıca (Karlıca)	DR1
Sarıbuğday	DR2
Şiribay	DR3

■ Wheat genotype grown in 4°C ambient conditions
■ Wheat genotype grown in 12°C ambient conditions

Sample ID	Nucleic acid (ng/µl)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)
MC1-1	899.000	21.200	19.499	1.99
MC1-2	267.000	8.250	6.724	0.82
MC1-3	119.000	2.915	2.777	0.99
MC1-4	222.000	9.000	5.176	1.75
MC1-5	224.000	2.692	2.219	1.62
MC1-6	217.000	6.427	6.557	1.71
MC1-7	199.000	6.719	6.992	1.70
MC1-8	184.000	1.900	2.710	1.43

Fig.3: RNA isolation results from control group wheat samples belonging to *Triticum monococcum* genotypes

Sample ID	Nucleic acid (ng/µl)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)
MC1-1	130.000	3.000	1.411	0.47
MC1-2	42.000	2.100	1.580	0.74
MC1-3	164.000	2.100	1.528	0.84
MC1-4	169.000	1.970	1.808	0.80
MC1-5	168.000	2.110	1.728	0.71
MC1-6	171.000	2.180	1.971	0.86
MC1-7	169.000	2.170	1.942	0.89
MC1-8	171.000	2.870	2.384	0.87

Fig.4: RNA isolation results from experimental group wheat samples belonging to *Triticum monococcum* genotypes

Sample ID	Nucleic acid (ng/µl)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)
MC1-1	899.000	21.200	19.499	1.99
MC1-2	267.000	8.250	6.724	0.82
MC1-3	119.000	2.915	2.777	0.99
MC1-4	222.000	9.000	5.176	1.75
MC1-5	224.000	2.692	2.219	1.62
MC1-6	217.000	6.427	6.557	1.71
MC1-7	199.000	6.719	6.992	1.70
MC1-8	184.000	1.900	2.710	1.43

Fig.5: RNA isolation results from control group wheat samples belonging to *Triticum dicoccum* genotypes

Sample ID	Nucleic acid (ng/µl)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)
MC1-1	899.000	21.200	19.499	1.99
MC1-2	267.000	8.250	6.724	0.82
MC1-3	119.000	2.915	2.777	0.99
MC1-4	222.000	9.000	5.176	1.75
MC1-5	224.000	2.692	2.219	1.62
MC1-6	217.000	6.427	6.557	1.71
MC1-7	199.000	6.719	6.992	1.70
MC1-8	184.000	1.900	2.710	1.43

Fig.6: RNA isolation results from experimental group wheat samples belonging to *Triticum dicoccum* genotypes

Sample ID	Nucleic acid (ng/µl)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)
MC1-1	899.000	21.200	19.499	1.99
MC1-2	267.000	8.250	6.724	0.82
MC1-3	119.000	2.915	2.777	0.99
MC1-4	222.000	9.000	5.176	1.75
MC1-5	224.000	2.692	2.219	1.62
MC1-6	217.000	6.427	6.557	1.71
MC1-7	199.000	6.719	6.992	1.70
MC1-8	184.000	1.900	2.710	1.43

Fig.7: RNA isolation results from control group wheat samples belonging to *Triticum durum* varieties

Sample ID	Nucleic acid (ng/µl)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)	A(A260)/A(280)
MC1-1	899.000	21.200	19.499	1.99
MC1-2	267.000	8.250	6.724	0.82
MC1-3	119.000	2.915	2.777	0.99
MC1-4	222.000	9.000	5.176	1.75
MC1-5	224.000	2.692	2.219	1.62
MC1-6	217.000	6.427	6.557	1.71
MC1-7	199.000	6.719	6.992	1.70
MC1-8	184.000	1.900	2.710	1.43

Fig.8: RNA isolation results from experimental group wheat samples belonging to *Triticum durum* varieties

From all wheat samples RNA extraction was performed at tillering stage. Thermo NanoDrop 2000 was used to determine RNA quantity and quality.

RESULTS

It has been observed that leaves that develop under cold stress before harvesting wilt and dry out.

Fig.9: a) Grounded wheat genotypes left control group right experimental group b) RNA extracted dried wheat genotype left control group right experimental group

Under the cold stress conditions the nucleotide amount obtained as a result of RNA isolation, a 2 fold decrease in *Triticum monococcum* genotypes (Fig.1, Fig.2) and 12 fold in *Triticum dicoccum* genotypes (Fig.3, Fig.4) and 8 fold in *Triticum durum* (Fig.5, Fig.6) varieties was observed. In the group exposed to cold stress. When the cold stress was removed, a 2 to 28 fold increase in the amount of nucleotides obtained as a result of RNA isolation was observed.

Fig.10: Wheat withered under cold stress

CONCLUSION

The results show the importance of ambient temperatures for the amount of RNAs isolated from wheat leaves. In addition, it was observed that the greatest decrease in the amount of nucleotides occurred in *Triticum dicoccum* genotype as a result of RNA isolation under cold stress conditions.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects (BAP) Coordination Unit (Project Code: FUK-2019-17752)

REFERENCES

1. Cohen M, U. Uğur, D. B. Yılmaz, U. Uğur, U. Salantur, A. Toprak, S. B. Yılmaz, C. N. Özkaya, A. N. N. (2020). The Effect of Cold Stress on the Growth and Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Mediterranean Region of Turkey.
2. Hossain, M. A., Wang, C., Wang, M., Muhammad, N., Yan, D., Hu, X., Yang, X., Wang, L., Li, C., Liu, Z., Jia, L. (2020). Cold Stress in Wheat: Plant Growth, Physiology and Management. *Strategies in Plant Science*, 10, 1000000.
3. Tuncel, U., Uğur, M., Yılmaz, S. B., Yılmaz, C. N. (2019). Comparative Effect of Cold Stress on *Triticum dicoccum* and *Triticum durum* Genotypes. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 100-105.
4. Tuncel, U., Yılmaz, S. B., Yılmaz, C. N., Uğur, M., Yılmaz, S. B., Yılmaz, C. N. (2019). Optimization of Phenol-chloroform RNA extraction Method. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 100-105.