

**TUZLULUK STRESİNİN BUĞDAYDA
(*Triticum aestivum* L.) MEYDANA
GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPON
POLİMORFİZMİ ÜZERİNE
β-ÖSTRADİOL'ÜN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Semra YAĞCI

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Güleray AĞAR
2015
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TUZLULUK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.)
MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPON
POLİMORFİZMİ ÜZERİNE β -ÖSTRADİOL'ÜN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Semra YAĞCI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**TUZLULUK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) MEYDANA GETİRMİŞ
OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE
β-ÖSTRADIOL'ÜN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Semra YAĞCI tarafından hazırlanan bu çalışma 03/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 04/07/2015 tarih ve 27/904 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZLULUK STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) MEYDANA GETİRMİŞ OLDUĞU RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ ÜZERİNE β-ÖSTRADIOL'ÜN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Semra YAĞCI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Bu araştırmada, 4 farklı tuz konsantrasyonunun (0,200, 300 ve 400 mM NaCl) retrotranspozonlara dayalı polimorfizm üzerine (E2647, WLTR2105, Stowaway, Sukkula, Nikita, BARE1(0) ve BARE1LTR2R) ve DNA hasarı üzerine etkisi belirlenmiştir. Ayrıca tuzluluk ile beraber uygulanan β-östradiol'ün bu polimorfizm üzerine antagonistik etkisi araştırılmıştır. Retrotranspozonların polimorfizmi ve DNA hasarı için Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) ve Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) teknikleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda tuz stresinde retrotranspozon kaynaklı polimorfizmin yüksek olduğu ve DNA hasarının meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca polimorfizm göstergesi olan genomik kararlılık sabitliliği'nin (GTS) artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Fakat tuzluluk ile beraber uygulanan β-östradiol'ün tuzluluk stresinin meydana getirdiği bu etkileri azalttığı tespit edilmiştir.

2015, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, Tuz Stresi, β-östradiol, IRAP, REMAP, Retrotranspozon

ABSTRACT

Master Thesis
**DETERMINATION OF β -ESTRADIOL
EFFECT ON RETROTRANSPOSON POLYMORPHISM BY SALT STRESS IN
WHEAT (*Triticum aestivum* L.)**

Semra YAĞCI

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Branch of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AGAR

In this study, the effects of 4 different salt concentrations (0, 200, 300, 400 mM NaCl) polymorphism on retrotransposons (E2647, WLTR2105, Stowaway, Sukkula, Nikita, BARE1 (0) and BARE1LTR2) and also DNA damage effects has been determined. Besides of β -estradiol with saltiness applied antagonistic effect on these polymorphisms were investigated. For polymorphisms of retrotransposons and DNA damage have been used Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) and Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) techniques. As a result of this research it has been observed that high polymorphism originated retrotransposon and DNA damage caused by salinity stress. Besides Genomic Template Stability (GTS), which of polymorphism indicative, has been found to decrease depending on increasing salt concentration. However, it has been observed to reduce of β -estradiol with saltiness applied this effects caused by salinity stress.

2015, 78 pages

Keywords: Wheat, Salinity stress, β -estradiol, IRAP, REMAP, Retrotransposon.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin her aşamasında benden sevgisini ve desteğini esirgemeyen her konuda bana yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tez çalışmalarım süresince destek ve yardımlarıyla yanımda olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a, Sayın Arş. Gör. Esra ARSLAN'a, Sayın Arş. Gör. Gökçe NARDEMİR'e, Sayın Biyolog Burcu SIĞMAZ'a, Sayın Biyolog Muhammet YAPRAK'a; ayrıca Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda çalışan hocalarım ve arkadaşlarıma desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde maddi manevi desteklerini ve eşsiz sevgilerini esirgemeyen, ayrıca bana güvendikleri ve hep yanımda oldukları için annem babam ve kardeşlerime özellikle Bülent YAĞCI ve Ruşen YAĞCI'ya sonsuz teşekkürler.

Semra YAĞCI

Haziran, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	9
2.1. Buğdayın Önemi.....	9
2.2. Stres.....	10
2.2.1. Tuz stresi.....	11
2.3. Memeli seks hormonları.....	15
2.3.1. Hormon sentez mekanizmaları.....	18
2.4. Transpozonlar.....	18
2.4.1. Transpozonların keşfi ve sınıflandırılması.....	19
2.4.1.a. Retrotranspozonlar.....	22
2.5. Retrotranspozonların Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Markırlar.....	25
2.5.1. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism).....	25
2.5.2. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism).....	26
2.5.3. SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism).....	27
2.5.4. RBIP (Retrotansposon Based Insertional Polymorphism).....	28
2.5.5. ISAP (Inter-SINE Amplified Polymorphism).....	29
2.5.6. iPBS (Inter-Primer Binding Site Amplification).....	29
2.5.7. TAM (Tagged Microarray Marker).....	30
2.5.8. R-RAP (RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism).....	30
2.5.9. IMP (Inter-MITE Polymorphism).....	31
2.5.10. TD (Transposon Display).....	31
2.6. Epigenetik ve Transpozon İlişkisi.....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33

3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal	33
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	33
3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	34
3.1.3.a. Kullanılan tuz (NaCl) çözeltilerinin hazırlanışı.....	34
3.1.3.b. Kullanılan β -östradiol çözeltilerinin hazırlanışı	34
3.1.3.c. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler	35
3.1.3.d. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler	37
3.1.3.e. Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler	39
3.2. Yöntem	39
3.2.1. β -östradiol ve tuz (NaCl) çözeltilerinin bitkiye uygulanması	39
3.2.2. DNA izolasyonu	40
3.2.3. IRAP-REMAP	41
3.2.3.a. IRAP-REMAP primerleri	41
3.2.3.b. IRAP-REMAP PCR protokolü.....	42
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	43
3.2.5. IRAP analizleri ve genomik kararlılık sabitliğinin (%GTS) belirlenmesi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. IRAP Analizleri ve Genomik Kararlılık Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%)	44
4.2. IRAP Jel Görüntüleri.....	47
4.3. REMAP Analizleri ve Genomik Kararlılık Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%)	53
4.4. REMAP Jel Görüntüleri	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	60
5.1. Sonuç ve Öneriler	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik Asit
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
AP	: Aspartik Proteinaz
APX	: Askorbat Peroksidaz
CAM	:Crassulacean Asit Metabolizması
CAT	: Katalaz
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromür Deoksiribonükleik Asit
dH ₂ O	: Distile Su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
<i>env</i> /ENV	: Envelope geni/Protein
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
g	: Gram
<i>gag</i> /GAG	: GAG geni/Protein
GSH	: Glutasyon
GTS	: Genomic Template Stability (Genomik Kararlılık Sabitliği)
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
Hsps	: Heat-Shock Proteins (Sıcak Şoku Proteinleri)
IMP	: Inter-MITE Polymorphism
INT	: DDE İntegraz
ISSR	: Inter-Simple Sequence Repeat
<i>int</i> /INT	: İntegrase geni
iPBS	: Inter-Primer Binding Site Amplification
JA	: Jasmonik Asit
LEA	: Late Embryogenesis Abundance (Geç Embryogenesis Proteinleri)

LINE	: Long Interspersed Nuclear Elements (Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elementler)
LTR	: Long terminal repeats (Uzun Uç Tekrarlar)
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MITE	: Miniature Inverted Repeat Transposable Element (Minyatür Evrik Tekrarlı Yer Değiştirebilen Elementler)
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid (Mesajcı Ribonükleik Asit)
MSAP	: Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (Metilasyona Duyarlı Çoğaltma Polimorfizmi)
MSH	: Mammalian Sex Hormones (Memeli Seks Hormonları)
Na ₂ SO ₄	: Sodyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NO ⁻	: Nitrik Oksit
NR	: Nitrat Redüktaz
O ₂	: Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit
PBS	: Primer Binding Site (Primer Bağlanma Bölgesi)
PC	: Fosfatidilkolin
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PE	: Fosfatidiletalomin
POX	: Peroksidaz
PPO	: Polifenol oksidaz
IRAP	: Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (İç-Retrotranspozon Çoğaltma Polimorfizmi)
RBIP	: Retrotransposon Based Insertional Polymorphism (Retrotranspozon Temelli İnsersiyonel Polimorfizm)

REMAP	: Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (Retrotranspozon Mikrosatellit oğaltma Polimorfizmi)
RNaz H	: Ribonkleaz H
ROT	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Trleri)
R-RAP	: RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism
RT	: Revers Transcriptaz (Ters Transkriptaz)
SA	: Salisilik Asit
SINEs	: Short Interspersed Nuclear Elements (Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Elementler)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
S-SAP	: Sequence-Spesific Amplified Polymorphism
MeJA	: Metillenmiş Jasmonik Asit
Ta	: Bağlanma Sıcaklığı
TAM	: Tagged Microarray Marker
TBE	: Tris-borat-EDTA tamponu
TD	: Transposon Display
TE	: Tris-EDTA tamponu
TIR	: Terminal Inverted Repeats (Terminal Ters Tekrarlar)
Tm	: Erime Sıcaklığı
tRNA	: Transfer Ribonucleic Acid (Taşıyıcı Ribonükleik Asit)
v/v	: Hacim/Hacim
l	: Mikrolitre
M	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tuz stresinin zararları	12
Şekil 2.2. Memeli seks hormonlarının kimyasal yapısı	16
Şekil 2.3. Sınıf I ve sınıf II retrotranspozonlarının yapısı.....	24
Şekil 2.4. IRAP çalışma prensibi	26
Şekil 2.5. REMAP çalışma prensibi	27
Şekil 2.6. S-SAP çalışma prensibi	28
Şekil 2.7. RBIP çalışma prensibi	28
Şekil 2.8. iPBS çalışma prensibi	30
Şekil 4.1. <i>Stowaway</i> primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	47
Şekil 4.2. BARE1LTR2R primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	48
Şekil 4.3. E2647 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	49
Şekil 4.4. Sukkula primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	50
Şekil 4.5. BARE1(0) primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	51
Şekil 4.6. WLTR2105 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	52
Şekil 4.7. LTR7286(R) +8081 Primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	56
Şekil 4.8. BARE1LTR6149(R)+ISSR8082 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	57
Şekil 4.9. LTR6150(R) +ISSR8081 Primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	58
Şekil 4.10. WLTR2105+ISSR8082 primerine karşı oluşan amplifikasyon.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri, erime (T _m) ve bağlanma (T _a) sıcaklıkları.....	41
Çizelge 3.2 REMAP-PCR’da kullanılan primer dizileri, erime (T _m) ve bağlanma (T _a) sıcaklıkları.....	41
Çizelge 3.3. IRAP-REMAP PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	42
Çizelge 4.1. IRAP'taki β-östradiol ve NaCl genomik kararlılık sabitliliği (%GTS) ve %polimorfizm.....	45
Çizelge 4.2. β-östradiol ve NaCl'nin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin buğday tohumlarının üzerine etkisi ile değişen bantların moleküler ağırlığı.....	46
Çizelge 4.3. REMAP’taki β-östradiol ve NaCl genomik kararlılık sabitliliği (%GTS) ve %polimorfizm.....	54
Çizelge 4.4 REMAP'taki β-östradiol ve NaCl'nin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin buğday tohumlarının üzerine etkisi ile değişen bantların moleküler ağırlığı	55

1. GİRİŞ

Buğday artan insan nüfusuyla birlikte gittikçe ekonomik değer kazanan bir besin olmaktadır. Buğday, içerdiği gluten proteinlerinden dolayı önemli bir tahıldır ve Türkiye’de olduğu gibi çoğu ülkede de insanların besin maddeleri arasında vazgeçilmez bir yeri vardır (Hoseney 1994; Bushuk 1998). Buğdaydan üretilen makarna, un, bulgur, insan gıdası olarak; buğdayın saplarıda hayvan besininde ve karton sektöründe kullanılmaktadır.

Ülkemizin hemen her yerinde buğday üretimi yapıldığı için ekim alanları ve üretim açısından ilk sırada yer almaktadır. 2014 FAO verilerine göre ise dünyada 704.0 milyon ton buğday üretilmiştir. Ancak 2013’e göre (716.2 milyon ton) %1.7’lik bir azalma meydana gelmiştir (Anonymous 2015).

Hem Dünya’da hemde ülkemizde buğday üretiminde bazı sebeplerden dolayı azalma meydana geldiğinde hem ekmek fiyatları hem de undan yapılan gıdaların maliyetleri artarak herkesi etkilemektedir. Bundan dolayı tüm ülkelerin buğday üretimi açısından yeterli buğday ürünü bulundurması şarttır. Ayrıca, buğday tanesinin zengin besin içeriği, korunması ve kolaylıkla işlenmesinden dolayı yaklaşık 50 ülkenin ana besin kaynağı olmuştur.

Şuanda dünya nüfusunun 6,5 milyarı geçmesi ve 2020’li yıllarda 8 milyara ulaşması beklenmektedir. Bu nüfustaki artışla beraber; Dünya’da, açlık ve beslenme ciddi bir sorun teşkil edecektir. Tarımsal ekim bölgelerinin sınıra dayandığı göz önüne alındığında buğday verimini ve üretimini arttırmadaki tek yöntem birim alandan alınan verimliliğin yükseltilmesidir.

Fakat dünyada tarımsal üretim artışı için yapılan sulama nedeniyle çoğu tarım alanında zamanla tuz oranı arttığı için bitkilerin oluşan tuzluluktan önemli ölçüde zarar gördüğü tespit edilmiştir. (Pitman and Läuchli 2002; Tuteja 2007).

Dünyadaki tuzdan etkilenmiş olan toprakların büyük kısmını sodyum klorür ve sodyum sülfatın yol açtığı tuzlu topraklar oluşturmaktadır (Pessarakli and Szabolcs 1999). Tuzluluğun artmasıyla tarıma elverişli olan bölgelerin yaklaşık 25 yıl içerisinde %30'unun, 21. yüzyılın yarısında ise %50'sinin hasar göreceği öngörülmektedir (Munns 2002; Bonilla *et al.* 2004; Ahmadi *et al.* 2009).

Tuz stresi, bitkilerdeki büyüme ve gelişmeyi iyon stresine ve osmotik basınca sebep olarak engellemektedir (Parida and Das 2005). Tuz stresi bitkiler üzerindeki ilk etkisini osmotik ve iyon stresi meydana getirerek; ikinci etkisini ise; stres faktörleri sonucunda bitkilerde oluşan yapısal hasarlar ve toksik bileşenlerin oluşmasıyla göstermektedir. Tuzluluğun meydana getirdiği temel sekonder etkiler; DNA hasarı, protein yapı bozukluğu, klorofil ve zar işlevlerine hasar veren reaktif oksijen türlerinin (ROT) sentezi; fotosentezde aksaklıklar; potasyum alımını önleme ve hücre ölümüdür (Botella *et al.* 2005; Hong *et al.* 2009). Ayrıca tuz stresinin; bitkiye uygulanan tuz çeşidi; bitkinin tuza maruz kalma süresi, bitki çeşidine ve genotipik çeşitliliğine göre de farklılık göstermektedir (Dajic 2006).

Tuz stresi altındaki bitkilerde büyüme ve gelişme sürecinde yavaşlama olmaktadır. Bu süreçle beraber bazı özel enzimler, protein ve nükleik asitlerin oranı düşmekte ve enzim aktiviteleri de yavaşlamaktadır (Weimberg 1975). Ayrıca tuz oranının artmasıyla fasulye tohumlarında amilaz ve polifenol oksidaz (PPO) (Kocaçalışkan ve Kabar 1990); yapraklarında ise ribuloz bifosfat karboksilaz enzim aktivitelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Seemann and Critchley 1985). Aynı zamanda, tuzun hasar verdiği bitkilerde fotosentez miktarında azalmaya, solunum miktarında artmaya sebep olmaktadır (Shannon 1979).

Genellikle bitkiler tuzun zararlı ve yıkıcı etkisinden korunmak amacıyla gereken osmotik düzenlemelerle iyonların alımlarını azaltmakta, ya da tuzları alarak yeşil aksamda depolamaktadırlar. (Shannon 1978; Ashraf 1994). Tuzluluk; bu ekstrem grupta tarım ürünleri arasında önemli bir yeri olan ekmeklik buğday çeşidi olan *Triticum aestivumu*'da etkilemekte ve ortalama verimini %50 oranında düşürmektedir.

Tuza toleranslı türler çözülebilir karbohidratları hassas olan türlere kıyasla daha fazla biriktirmişlerdir. Ayrıca iyonik stresin sukroz, fruktan ve indirgen karbohidrat miktarlarını önemli düzeylerde artırdığı tespit edilmiştir. Taslak ile arkadaşlarının (2007), yaptıkları bir saksı deneyinde, yirmi iki tane arpa çeşidinin tuza dayanıklılıklarını, kullanılan beş ayrı tuz konsantrasyonunda (0, 5, 10, 15 ve 20 dS/m) çimlenme ve fide gelişimi ile test etmişlerdir. İncelenen genotiplerde çimlenme seviyesi kök boyu, tuza tolerans potansiyelinin artan tuz oranlarıyla düştüğünü, ancak sürgün ve kök miktarının arttığını belirtmişlerdir.

Yapılmış olan tuz stresi ile ilgili araştırmalarda *Ceratophyllum demersum* L.(tilki kuyruğu), *Brassica juncea* L. Czern. (hardal), *Triticum aestivum* L. (buğday), *Vigna mungo* L. (siyah mercimek) ve *Phaseolus vulgaris* L. (fasulye) türlerinde stres şartlarında askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin ve genetik ifadenin arttığı belirlenmiş bu artışın stres savunma mekanizmasıyla ilgili olduğu belirtilmiştir. (Beauchamp and Fridovich 1971; Polidoros and Scandalios 1999; Mobin and Khan 2007).

Bunlara ilave olarak bitkiler strese maruz kaldıkları zaman potansiyel stres yanıtlarını harekete geçirmek için farklı algılama ve sinyal mekanizmalarının bir kısmını kullanmaktadır. Genellikle bu sinyal biyotik streste başlıca salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA), etilen ve abiyotik stres durumunda absisik asit (ABA) hormonlarını içermektedir. Absisik asit, tuzluluk stresinde bazı genlerin aktif hale gelmesinde de rol oynamaktadır. Pirinçteki tuz savunma mekanizmasında, absisik asit ile aktif edilen genlerin önemli rollere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Absisik asitin moleküler düzeyde de bazı zararlara sebep olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bu hormonların kodlamayan siRNA'lar ve proteinler üreten veya bunları bağlayıcı sinyal stresine dahil olduğunu ve daha sonra, transkripsiyon ya da transkripsiyon sonrası gen susmasını uyurabildiğini gösteren kanıtlar da mevcuttur (Khraiwesh *et al.* 2012).

Bitkilerin biyotik ve tuz gibi abiyotik uyaranlara karşı uyumunu sağlayan temel yöntemlerden biriside gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Gen ekspresyonundaki

değişmeler mRNA transkripsiyonu, işlenmesi, taşınması, translasyonu, depolanması ve yıkımı gibi moleküler mekanizmalar ile sağlanmaktadır. Biyotik ve abiyotik faktörler aniden meydana gelir ve hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için hızlı bir cevap oluşturması açısından da büyük bir öneme sahiptir (Echevarría-Zomeño *et al.* 2013).

Bitkiler, olumsuz abiyotik stres şartlarıyla başa çıkmak için, bazı genleri aktifleştirerek stresle ilgili proteinleri üretmektedir. Şaperonlar olarak görev alan Sıcak Şoku Proteinleri (Hsps: Heat-Shock Proteins) ve Geç Embryogenezis Proteinleri (LEA: Late Embryogenesis Abundance), sıcaklık, tuzluluk ve su eksikliğinde uyarılmaktadır (Holmberg and Bülow 1998; Sairam and Tyagi 2004). LEA proteinleri, absisik asit ile aktifleşen proteinlerin bir bölümüdür sistein ve triptofan içermezler. Sitoplazmada bulunan bu proteinler, stres devam ettiği sürece hücrel yapıları korumakla görevlidirler. Stres koşullarında *lea* genleri tarafından ifade edilen hidrofilik ve çözünabilir LEA proteinleri suyu bağlayarak, tuzluluk stresi süresince ortaya çıkan su eksikliğinin zararlı etkilerinden, hücrel membran ve protein/enzim gibi yapı ve bileşenleri korumada büyük görevleri bulunmaktadır (Yıldız vd 2010). Ayrıca Grup 1, 2, 3, 4, 5 LEA proteinleri ve LEA D95 gibi alt gruplara ayrılan LEA proteinlerinin rolleri olduğu da tespit edilmiştir (Sairam and Tyagi 2004).

Strese maruz kalmış bitkilerde özel genlerin indüksiyonu gibi çeşitli hücrel veya moleküler değişiklikler meydana gelmektedir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). Ayrıca prolin ve şeker gibi organik çözünen maddelerin birikimi strese adaptasyon için önemli fizyolojik bir süreçtir (Aghaleh *et al.* 2009). Bu bileşiklerin dışında özellikle spermidin, spermin ve diamin öncülleri olan putresinin biyotik ve abiyotik stresten sorumlu bileşikler olduğunu belirtmiştir (Liu *et al.* 2007; Kusano *et al.* 2008)

Tuz stresi hücrel ve moleküler seviyelerde biyokimyasal ve fizyolojik değişimlere sebep olur. ABA hormonunun kuraklık, tuz ve soğuk stresi gibi çeşitli abiyotik stresler üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Örneğin bitkilerde stres hormonu ABA ve reaktif oksijen türleri (ROT)'ların artmasıyla; hücre ve dokuların hasarı, DNA metilasyonu

(sitozin metilasyonu), ve histon modifikasyonu (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon) ve gen ekspresyonu düzenlenmesi gibi birtakım hayati rolü olan genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelmektedir (Cho *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009). Son yıllarda birkaç çalışma su, kuraklık, soğuk ve tuz gibi çevresel streslerin DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi gen ekspresyonunu değiştirdiğini epigenetiksel değişiklikler meydana getirdiğini göstermiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça evrensel DNA metilasyon seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Li *et al.* 2009; Tan 2010; Zhao *et al.* 2010). Bunun aksine, tuz stresi kolza, *Arabidopsis thaliana* ve bezelye bitkilerinde sitozin hipermetilasyonuna sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tuzluluğun farklı konsantrasyonları *Jatropha curcas* L.'de DNA metilasyon değişimine sebep olarak hem transkripsiyonel hemde posttranskripsiyonel düzeydeki gen ifadesini düzenlemede tamamlayıcı bir rol oynadığı bildirilmiştir (Paszkowski and Whitham 2001).

Tuz stresinin pamukta DNA metilasyon motifinde değişime sebep olduğu belirtilmiştir (Xue-Lin *et al.* 2009). Stresin uyum zamanında apomiktik ya da klonal kökende; somatik rekombinasyonu kolaylaştırarak genetik çeşitliliğin artmasına sebep olabilen strese bağlı metilasyonda yeniden motiflenmeye yol açabildiği ileri sürülmektedir (Bond and Finnegan 2007; Boyko *et al.* 2007).

Bunlara ilaveten tütün, pamuk ve buğdayda tuz stresinin meydana getirmiş olduğu epigenetiksel değişikliklerde genomik DNA hipometilasyona ve strese duyarlı genlerin düzenlenmesi arasındaki ilişki Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) metodu ve Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) teknikleri kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca DNA metilasyonundaki değişimler; osmotik stres altında; tütünde, biberde tohum filizlenmesi boyunca ve ginsengde somatik embriyogenez sırasında gözlemlenmiştir (Kovarik *et al.* 1997; Xu *et al.* 2000; Chakrabarty *et al.* 2003; Prtis *et al.* 2004).

Şaşırtıcı bir şekilde, endojen genlerin transkripsiyon bölgelerinde hipermetilasyon genelde yaygındır ve strese karşı bir bitki adaptasyon mekanizmasını oluşturmaktadır (Tran *et al.* 2005). Çevresel stres etmenlerine karşı bitki hücresinde meydana gelen

epigenetik düzeydeki değişimlerden biri de; transpozonların hareketidir. Transpozisyon ve transpozon aktivasyonunun çevre stresi tarafından tetiklendiğine dair birçok örnek vardır ancak transpozonlar bitki genomunda epigenetik düzenlemeler vasıtasıyla yeniden bir baskılanmada ve inaktif haldeki durumunu sürdürmektedir (Grandbastien 1998; Slotkin and Martienssen 2007). Neredeyse tüm bilinen bitki retrotranspozonları normal büyüme ve gelişme boyunca inaktif durumda olup farklı abiyotik ve biyotik stres faktörleri tarafından aktive edilebilir ve harekete geçirilebilirler. Böylelikle bu hareketlilikleri mutasyon oranını arttırmakta ve yeni genetik çeşitliliği ortaya çıkarmaktadır (Kumar and Bennetzen 1999). Bitki genomunda bol bulunan retrotranspozonlar, özellikle epigenetik düzenlemeler vasıtasıyla edinilen stres adaptif özelliğinde önemlidir ve evrimin hızlı sürücülerini olarak kabul edilmektedirler (Bennetzen 2000; Slotkin and Martienssen 2007).

Farklı streslerin birçok bitki retrotranspozonunu etkilediği literatür bilgisi olarak bilinmektedir. Çeşitli abiyotik ve biyotik stresler mekanik hasar, enfeksiyon, in vitro rejenerasyon, hibridizasyon ve çift haploidlerin oluşumunu içeren transkripsiyonel açıdan aktif LTR retrotranspozon çeşidinin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Hirochika 1995; Grandbastien *et al.* 2005; Salazar *et al.* 2007). Dolayısıyla stres ve çevresel faktörler tarafından aktif hale gelen retrotranspozonların insersiyonel polimorfizme sebep olması en yaygın özelliğidir. Çeltik bitkisinde, doku kültürü ile oluşturulan mutasyonları kapsayan retrotranspozonların olduğu bildirilmiştir (Hirochika *et al.* 1996). Aynı zamanda, hücre duvarı hidrolazlarına maruz kalan tütünde retrotranspozon spesifik ekspresyonunun aktif hale geldiği gösterilmiştir (Pouteau *et al.* 1991). Stres altında transpozonların ve psödogenlerin ifadesinin daha fazla arttığını ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (Zeller *et al.* 2009). Farklı gen ekspresyonunu ve protein fonksiyonunu düzenleyen bitki yeteneği, bitki direncinin temelini oluşturmaktadır. Ve epigenetik modifikasyonlarda bu konuda yardımcı olmaktadır.

Epigenetik mekanizmalarda DNA metilasyonunun en önemli etkisi transpozon elementlerinin transkripsiyonunu kısıtlamak ve böylece onların hareketini engellemektir. Düzenleyici mekanizmaların karmaşıklığına ek olarak komşu genlerin

transkripsiyonel kontrolü aracılığıyla transpozonun birçok örneği konak genleri etkileyen transpozon aktivasyonu stres tarafından tetiklenerek başlatılabilmektedir (Feschotte 2002).

Bitki tuz stresine karşı birtakım fizyolojik ve genetik önlemler almış olsada bazen bunlar yetersiz kalmakta ve bitkiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Dolayısıyla birçok çalışma, tuz stresi altında büyüyen bitkilerin toleransını çeşitli biyolojik olarak aktif bileşiklerin kullanımı ile geliştirilebilir olduğunu göstermiştir (Averina vd 2010). Bu amaç için, bitki büyüme düzenleyicileri oksinler, sitokininler, absisik asit, nitrik oksit ve salisilik asit yaygın tuzluluğun olumsuz etkilerini hafifletmek için kullanılmıştır (Foolad *et al.* 2003a; Ashraf and Harris 2004; Munns and Tester 2008; Grewal 2010).

Bu bitki büyüme hormonlarının da tuzluluk tarafından oluşturulan oksidatif strese bitki yanıtlarını hafiflettiği rapor edilmiştir (Xiong 2002; Cao *et al.* 2005).

Bitkiler abiyotik stres koşullarına karşı yapılarında doğal olarak bulunan ya da eksojen olarak uygulanan hormonlarla kendini koruyabilmektedirler. Öte yandan, birkaç çalışmada progesteron, β -östradiol ve andosteron gibi eksojen memeli seks hormonlarının stressiz koşullar altında bitkinin inorganik bileşenlerini etkileyerek, protein ve nükleik asit içeriğini artırarak, antioksidan enzimlerin aktivitesini uyararak, hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriğini ve lipid peroksidasyonunun monodihidroaskorbat (MDA) seviyesini azaltarak oksidatif enzimlerin aktivitesini ve sentez reaksiyonlarını uyararak bitki büyüme ve gelişmesi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (Dogra and Thukral 1996; Erdal and Dumlupinar 2011).

Ayrıca, tuz stresi sonrası uygulanan memeli seks hormonlarının (MSH), süperoksit (O_2^-) üretimi ve hidrojen peroksit içeriğindeki (H_2O_2) artmayı; süperoksit dismutaz (SOD), peroxidaz (POX), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve nitrat redüktaz (NR) aktivitesi ile elimine ettiği ilk defa Erdal (2011), tarafından kaydedilmiştir. Aynı araştırmacı MSH uygulamasının tuz stresi tarafından uyarılmış bitkilerde; kuru ağırlık, şeker, prolin, protein, klorofil ve glutatyon (GSH), miktarlarında artışa neden olduğunu

ve de tuzluluğa karşı önleyici bir etki oluşturduğunu göstermiştir (Erdal 2011). Ayrıca aynı araştırmacılar, nohut tohumlarında MSH uygulaması ile Na, K, ve Ca içeriği artmış olmasına rağmen Cl içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir ve MSH uygulamasının K/Na ve Ca/Na oranındaki sodyumun dengesindeki değişikliği önlediği için tuz stresini etkisiz hale getirmede bu hormonlarının hayati öneme sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (Erdal and Dumlupinar 2010; Erdal *et al.* 2010).

Dünyada artan popülasyonla birlikte bitki üretiminin artan talepler doğrultusunda arttırılması ya da biyotik ve abiyotik stres altında bitkinin alacağı hasarın minimuma indirilmesi gerekmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda MSH'nin strese maruz kalan bitkilerde koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir. Literatür bilgilerine göre MSH uygulamasının bitkilerdeki tuz stresinin negatif etkilerini hafiflettiği ileri sürmüştür. Ancak tuz stresine karşı retrotranspozon insersiyonal polimorfizmi ve DNA hasarı üzerine β -östradiol'ün koruyucu rolünün etkisi ele alınmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada; ekmeklik buğdayda tuz stresinin oluşturduğu retrotranspozon insersiyonel polimorfizmi ve DNA hasarına karşı β -östradiol'ün koruyucu etkisinin olup olmadığı IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) ve REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) teknikleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Buğdayın Önemi

Dünya nüfusunun hemen hemen %35'inin ana besinini temsil eden buğday, dünyada besinlerdeki kalorisinin %20'sini oluşturmaktadır. Bu oran ülkemizde %53'tür. Bunun başlıca sebebi ise buğday bitkisinin farklı iklim ve çevre koşullarına adapte olmasından kaynaklanmaktadır (Atlı 1999). Son zamanlarda buğday ekim bölgelerinin ülkemizde tükenme noktasına geldiğinden dolayı buğday için elverişsiz bölgelerde bile buğday tarımı yapıldığı görülmektedir. Bundan dolayı ekim bölgesinden fazla verim alınacak türlerin geliştirilmesi çok önemlidir.

Buğdaygiller buğday (*Triticum aestivum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.), yulaf (*Avena sativa* L.), çavdar (*Secale cereale* L.), mısır (*Zea mays* L.) ve pirinç (*Oryza sativa* L.) gibi büyük bitki ürünlerini içermektedir. Buğdaygiller arpa ve buğdayın dahil olduğu 15 tür ve 300 den fazla çeşit içeren aileden birisidir. Buğday birkaç çiçekli başakçıkdan biri olan sesil ve sapın üst tarafında karşılıklı gerçek bir başak oluşturan çim ailesindeki buğdaygillere dahildir (Briggle and Reitz 1963) .

Linnaeus ilk 1753'te buğdayı sınıflandırmıştır. Sakamura (1918), de tanımlanmış her bir ortak tür için sayısız kromozom genomları bildirmiştir. Aynı araştırmacı buğdayı üç gruba ayırmıştır; 14 (n=7) kromozoma sahip diploidler, 28 (n=14) kromozoma sahip tetraploidler ve 42 (n=21) kromozoma sahip hekzaploidlerdir. Ekmeklik buğday *Triticum aestivum* dur. *T. durum* ve *T. compactum* diğer iki büyük türdür. Her üçü artık ticari olarak yetiştirilen ataları arasındaki doğal hibridizasyonun ürünleridir (Briggle 1967).

Hekzaploid buğdayın haploid DNA içeriği (*Triticum aestivum* L. em Thell, 2n=42, AABBDD) yaklaşık $1,7 \times 10^{10}$ bp dir. *Arabidopsis thaliana* genomundan yaklaşık 100 kat, pirinç genomundan yaklaşık 40 kat ve mısırın genomundan yaklaşık 6 kat daha

büyüktür (Bennett and Smith 1976; Amuruganathan and Earle 1991). Ekmeklik buğdayın genom büyüklüğü, genomun %80'inden fazlası tekrarlayan DNA dizisinden oluşan poliploidlerden ve uzayan duplikasyonlardan oluşmaktadır (Smith and Flavell 1974). Ortalama buğday kromozomu 810 MB civarındadır ve pirinç kromozom ortalamasının 25 katıdır. Bu büyük boyut buğday genomunun kökeninden kaynaklanmaktadır (Talbert *et al.* 1998). Ayrıca buğdayın üçlü yapısı (ABD genomları) ve geniş duplikasyonları kapsayan, tüm genomun %85'ten fazlası yüksek oranda metillenmiş tekrarlayan dizilerden oluşmaktadır (Moore *et al.* 1993). Şuanda yüksek bitkilerdeki gen sayısının 25.000 ve 43.000 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Miklos and Rubin 1996).

Mevcut çalışmalara göre, yaklaşık 30.000 gen çeşidi buğday fenotipine etki etmektedir. Bunlardan çoğu tanımlanıp haritalanmış ayrıca onların birincil ve pleiotrofik etkileri tanımlanmıştır. Dünya yüzünde yetişen 15 kadar buğday türünden sadece 3 tanesi ekonomik ve ticari yönden öneme sahiptir.

2.2. Stres

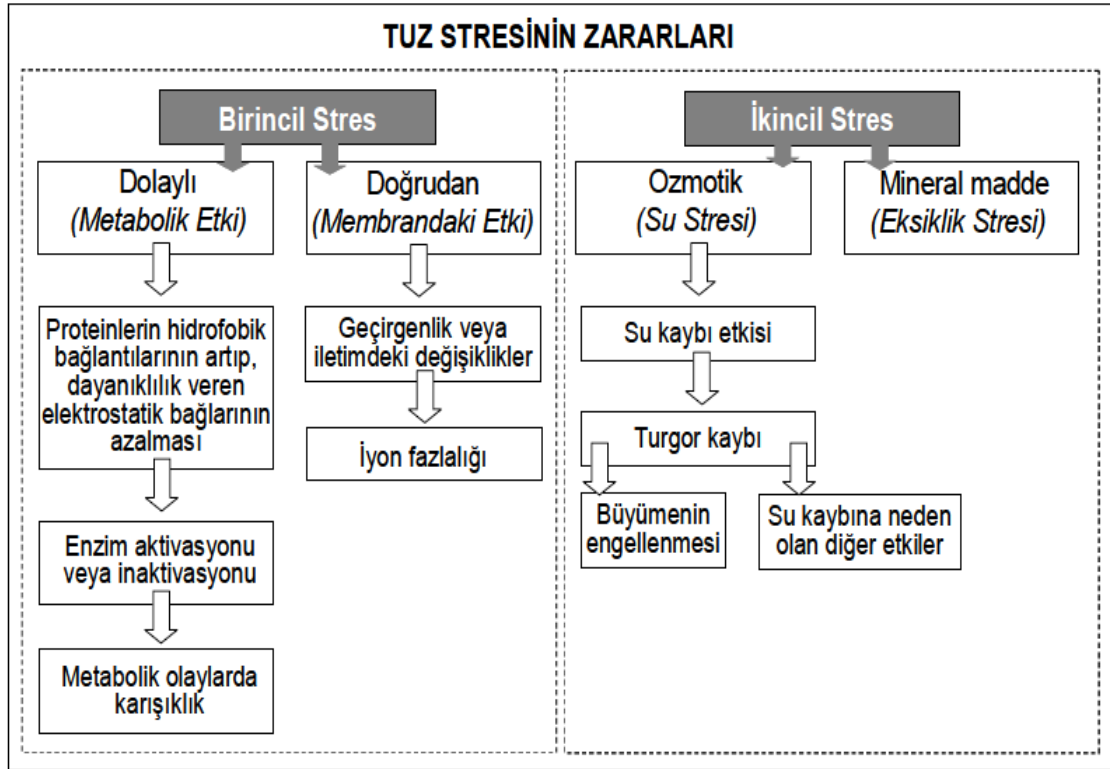
Olumsuz biyotik ve abiyotik çevre etmenlerinin bitkide meydana getirdiği değişimler stres olarak tanımlanmaktadır. Hem tarımsal hem de çevre koşulları altında bitkiler, sıklıkla çevresel stres etmenlerine maruz kalmaktadır. Bazı çevresel faktörler, rüzgar sel hava sıcaklığı gibi doğal etmenler birkaç gün sürerken; toprakta bulunan tuz ve aşırı su gibi diğer faktörlerin meydana getirdiği stresler aylarca sürebilir (Taiz and Zeiger 2008). Stres bitkilerin büyüme ve gelişmesini sınırlandıran birçok faktörden oluşmaktadır. Normalde doğal şartlar altında bitkiler en az iki farklı stres faktörünün etkisine maruz kalmaktadır. Stres faktörleri, kökenlerine göre biyotik ve abiyotik stres faktörleri olarak ikiye ayrılabilir. Abiyotik stres faktörleri soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, hava kirliliği, yaprakta kıvrılma ve katlanma (ışık stresi) mekanik etkiler (rüzgar kar buz örtüsü) pestisitler toksinler toprak pH'sı ve toprakta besin yetersizliği gibi çevresel faktörlerdir. Biyotik stres

faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler, yabancı otlar, hayvanlar ve herbivorlardır (Mahajan and Tuteja 2005).

Abiyotik ve biyotik stresler ekonomik önem içeren ürünlerin ve tüm bitkilerin normal fizyolojik ilerlemesinde değişikliklere sebep olmaktadır. Aşırı sıcaklıklar; su kıtlığı veya bolluğu; toprak tuzluluğundaki artış; yüksek güneş ışınlamı; erken sonbahar veya geç ilkbahar zemindeki donlar patojenler gibi doğal stres faktörlerinden dolayı bitki hasarı ve verimlilikte azalma meydana gelmektedir. Son zamanlarda pestisitler gibi toksik kirleticiler, zararlı gazlar (SO, NO, N O₂, NO_x, O₃ ve fotokimyasal sis) gibi faktörlerle birlikte; gübrelerin aşırı dozu, ağır metaller, yoğun UV-B, radyasyon, fotooksidanlar, toprak asitlenmesi, mineral eksikliği ve asit yağmurları nedeniyle; bitki organizmaları yeni insan faaliyetlerine (antropojenik stres faktörleri) büyük bir ölçüde maruz kalmaktadır. Tüm bu stres faktörleri; bitki organizmasının biyosentez kapasitesini azaltır ve onun normal fonksiyonlarını değiştirip zarar vererek bitkinin ölümüne yol açabilmektedir (Levitt 1980; Lichtenthaler 1996).

2.2.1. Tuz stresi

Ürünün verimini performansını zıt yönde etkileyen, kuraklık dengesiz beslenme, yetersiz mineral veya mineral toksisitesi, aşırı sıcaklık gibi dünya çapında verimi azaltan birkaç çevresel faktör vardır. Bu büyük çevresel streslerden dolayı bugün ekilebilir toprakları %10'dan daha az olduğu tahmin edilmektedir (Dudal 1976). Tuzluluk ve kuraklık bitki büyüme ve gelişimini etkileyen bitkinin coğrafik katkısını sınırlandıran iki önemli abiyotik strestir. Tuzluluktan etkilenen bitkilerde toksik etkiler oluşmakta ve mineral beslenmesinde bozuklukların ortaya çıkmasıyla bitkinin biyokimyasal ve fizyolojik metabolizmasında hasar meydana gelmektedir. Yağışların yetersiz olması ve aşırı buharlaşma durumunda, yarı kurak ve kurak bölgelerde tuzluluk meydana gelmektedir (Shannon 1984).



Şekil 2.1. Tuz stresinin zararları Lewitt (1980)

Abiyotik stres faktörlerinin ilk işareti, spesifik membranların hasar görmesidir (Holmberg and Bülow 1998). NaCl tuzluluğunun membran yapısında sebep olduğu değişimlerle ilgili yapılan çalışmada, *Dactylis glomerata* L.'da 200 mM NaCl uygulamasının plazma membranında bozulmalara ve kıvrımlara neden olduğu; hücrelerin sitoplazmalarında membrana bağlı keseciklerin gözlemlendiği ifade edilmiştir (Gupta 2007).

Tuzdan ilk etkilenen kısım olan plazma membranı geçirgenliği, farklı genotiplere ait hücrelerde farklılık göstermektedir. Tuzluluk şartlarında, hücre zarı hasarının tuza duyarlı formlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Mansour and Salama 2004).

Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde ise membran geçirgenliği artmış ve bağlı su içeriği azalmıştır. Sonuç olarak, membran geçirgenliğini azaltmak için, Na'un zararlı etkilerini giderebilecek düzeylerde hücreye Ca, Mg ve K uygulaması yapılabileceği önerilmiştir

(Yakıt and Tuna 2006). Tuz stresi altında hücrel membranların içeriğindeki lipitlerle ilgili olarak yapılan çalışmalar da mevcuttur. İyonlara karşı membran geçirgenliğinin düzenlenmesinde, plazma membranı serbest sterollerinin arttığı gözlenmektedir. Membran akışkanlığının azalması ve membran yağ asitleri doygunluğunun artması, tuz stresi altındaki bitkiler için elzem hale gelmektedir (Mansour and Salama 2004).

Yer fıstığında lipit içeriğinin, NaCl'ün düşük konsantrasyonunda arttığı ve yüksek konsantrasyonlarda azaldığı ortaya çıkarılmıştır. *Spartina patens*'in kök hücrelerine ait plazma zarında NaCl stresi sonucunda fosfolipitlerin azaldığı ayrıca sterollerin molar oranlarının da azaldığı belirlenmiştir. Plazma membranında, fosfatidilkolin (PC) ve fosfatidiletalomin (PE) içeriğinin azaldığı tespit edilirken, glikolipit ve total lipit bakımından önemli bir artış görülmemiştir (Parida and Das 2005). Bitkisel üretimin kısıtlandığı tuzlu bölgelerde meydana gelen maddi zararların düşürülmesi ya da yok edilmesi için, bu bölgelerde yaşamaya elverişli bitki çeşitlerinin seçilmesi çok önemlidir. Toprakta artan tuz konsantrasyonları, bitkinin su alma yeteneğini azaltır ve köklerden sodyum ve klorürü fazla miktarda aldığı zaman da sodyum ve klorür hem metabolik süreçleri bozarak ve hemde fotosentez etkinliğini azaltarak büyümeyi olumsuz yönde etkiler (Flowers and Yeo 1995; Ma^{er} *et al.* 2002) .

Bitkiler, su alımını maksimize ederken su kaybını azaltarak osmotik stresi azaltmak için mekanizmalar göstermektedir. Ayrıca, bitkiler özellikle vakuollerde sodyumun yaprak dokularından çıkarılmasıyla sodyumun iyonik stresinin zararlı etkilerini en aza indirmektedir (Blumwald 2000; Munns and Tester 2008).

Toprak tuzluluğu dünya çapında tarım için büyüyen bir sorundur. Ekilebilir topraklardaki tuz birikimi başlıca deniz suyundan ve sodyum kloridin az miktarını içeren sulama suyundan gelmektedir (Flowers and Yeo 1995; Tester and Davenport 2003).

Tuz stresinde, bitkilerde poliaminlerin konsantrasyonunun önemli seviyede artmasının tuz stresine karşı koruyucu bir mekanizma ve tuza toleransla ilişkili olduğu bildirilmiştir

(Iqbal and Ashraf 2005). Arpa bitkilerinde kök tonoplast veziküllerinde serbest ve bağlı poliaminlerin içeriğinin tuza tolerans ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir (Zhao *et al.* 2000). Spermidin ve sperminin tuz stresi altında plazma membranını koruduğu ve tuza toleransı arttırdığı ileri sürülmüştür (Gonzalez and Ramirez 1999).

Tuzluluk, kuraklık ve soğuk stresi, absisik asit (ABA) biyosentezi ve birikimine neden olmaktadır. Borsani *et al.* (2003), *Citrus sinensis* türünde tuz stresinin, ABA ve etilen üretimini arttırdığını ve ABA'nın, büyüme-gelişme, fotosentez ve asimilasyon ürünlerinin taşınmasında NaCl'ün engelleyici etkisini azalttığını bildirmiştir. Bunun yanında ABA, *Mesembryanthemum crystallinum* türünde C3'ten (Crassulacean Asit Metabolizması) CAM'a dönüşümü başlattığı ve ABA'nın stres şartları altında, stoma bekçi hücrelerinde hızla iyon akısını azaltarak stomada kapanmayı başlattığı belirtilmiştir (Parida and Das 2005). Tuz ve diğer çevresel streslerde, yapraklardaki ABA konsantrasyonunun 50 kat arttığı ve bununla birlikte, iyon dengesinin kontrolünde ABA'nın gerekli olduğu ile ilgili kanıtlar mevcuttur. Bitki köklerinden K^{+} 'un alımı ve birikiminin ABA ile kontrol edildiği gösterilmiştir. İyon dengesinde önemli olan Ca^{+2} 'un sitoplazmada birikimi, ABA tarafından teşvik edilmektedir (Borsani *et al.* 2003). Bitkilerin tuza maruz kalmasını takiben, gen ekspresyonunda bazı değişiklikler meydana gelmektedir.

Son yıllarda, tuzla teşvik edilen genlerin çoğu karakterize ve izole edilebilmiştir (Sairam and Tyagi 2004). Stresin; histon modifiye enzimlerinin yokluğunda mutantlarda strese direnci değiştirmiş ve histon kuyruk modifikasyonlarını uyarmıştır. İşaretli aktivasyonun kurulması stresli genlerin transkripsiyon seviyelerinin artmasıyla sonuçlanabilir, fakat sonra daha ciddi bir saldırı üzerine hızlı ya da güçlü yanıt için hedef genler basitçe dengede olabilir (Berr *et al.* 2010; Jaskiewicz *et al.* 2011).

ABA ve tuzun tütün ve Arabidopsis hücre kültürlerinde H3 fosforilasyonunu ve H4 asetilasyonunu değiştirdiği tespit edilmiştir (Sokol *et al.* 2007). Arabidopsis'te bir bağışıklık reseptör proteini (R) geni için bir genin aktivasyonu H3K36me3 yüklerken bir histon metiltransferaz bağlı olduğu ifade edilmiştir (Palma *et al.* 2007). Birçok

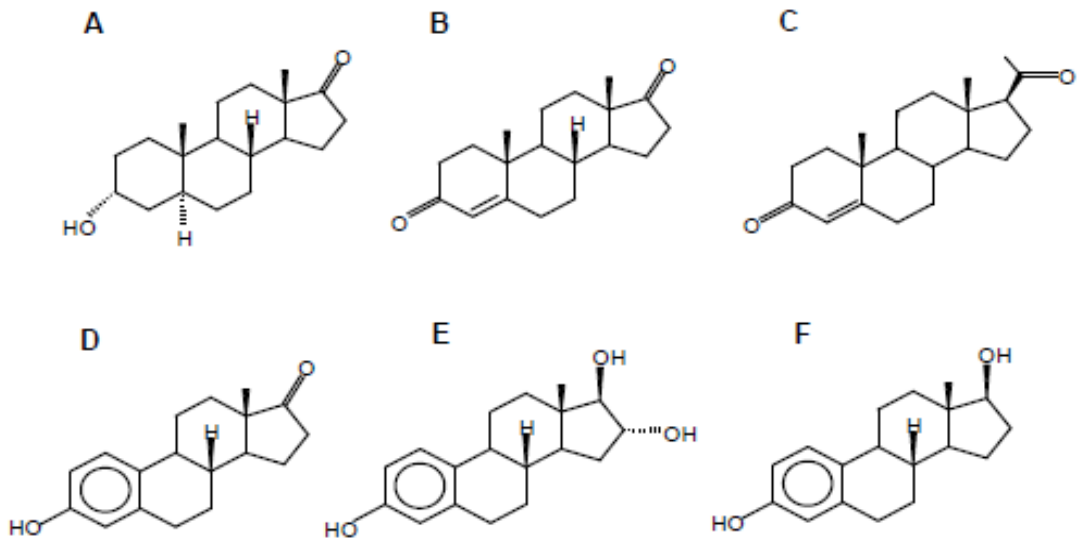
çalışmada, stres kaynaklı bir epigenetik faktördeki değişikliğin diğer epigenetik faktörlerdeki değişikliklerle de ilişkili olduğunu kanıtlamıştır Song *et al.* (2012), tuza duyarlı birkaç transkripsiyon faktörünün DNA metilasyon seviyesini tuza yanıt olarak azalttığını göstermiştir ve bu değişikliğe, çok sayıda histon modifikasyonları düzeyindeki değişikliklerin yanı sıra soya fasulyesindeki gen ekspresyonu değişiklikleri de eşlik etmiştir. Buna ek olarak Bilichak *et al.* (2012), tuz stresinin *Arabidopsis thaliana*'da birkaç lokusun hipometilasyon seviyesinin onun H3 asetilasyonu ve metilasyon seviyeleriyle ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

2.3. Memeli seks hormonları

Memeli seks hormonları (MSH), lipofilik ve düşük moleküler ağırlıklı olan steroidlerin bir grubudur. Steroidler lipofilik ve düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerdir. Bu bileşenler izopropenoidlerden türetilmiştir ve yüksek ökaryotların farklılaşması gelişmesi ve iç dengesi üzerine önemli etkilere sahiptirler (Kliwer *et al.* 1998). Bunlar kimyasal haberciler, vitaminler, sitotoksinler ve hormonlar gibi hücre zarı bileşenlerinin ve düzenleyicileri gibi çeşitli rollerde görev almaktadırlar (Barrington 1979; Sandor and Mehdi 1979). Steroidlerin bir grubu olan, MSH, memelilerde, gelişme ve üremenin kontrol edilmesinde anahtar rol oynamaktadırlar (Janeczko and Skoczowski 2005). Aynı zamanda memelilerde minerallerin kontrolü ve protein metabolizmasında yer almaktadırlar (Kliwer *et al.* 1998; Janeczko and Skoczowski 2005).

Temel bir strean karbon iskeletine sahip bileşiklerin bir grubu steroidlere ait olan östrojen, androjen ve progesteron; memeli seks hormonlarındandır. Yaşayan organizmalardaki farklı steroidler streana iliştirilmiş fonksiyonel grupların pozisyon ve tipleri tarafından tespit edilmiştir (Dogra and Kaur 1994; Erdal and Dumlupinar 2010). Mevcut bilgiler bize doğal bir şekilde bitkilerin MSH'ı (androjen, östrojen ve progesteron) içediğini göstermesine rağmen; bu bileşiklerin bitki hormonları gibi düşünülmesine izin vermemektedir (Geuns 1978; Erdal *et al.* 2010).

Önceden yalnızca hayvanlarda olduğu bilinen memeli seks hormonları (MSH), şimdi çeşitli bitki türlerinden ve onların kök, gövde, yaprak ve çiçek gibi doku ve organlarından izole edilmektedir Bitkilerde doğal olarak mevcut MSH, bugün birçok bitki türünden izole edilmiştir. Bu hormonlar 17β -östradiol, östron, östriol, androstendion, androsteron, testosteron ve progesterondur ve bunlar bitki türlerinin %60-80'inde doğal olarak mevcuttur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Memeli seks hormonlarının kimyasal yapısı;

(A) Androsteron; (B) Androstendion; (C) Progesteron; (D) Östron; (E) Östriol; (F) 17β -östradiol

Memeli seks hormonlarından; östrojenler, 1926'da ilk Dohrn ve arkadaşları tarafından, bitkilerde tespit edilmiştir. 1980'ler ve sonrasında bitki hayvan ve insanda MSH'ın niteliğinin ve niceliğinin analizi ile ilgili sayısız rapor yayınlanmıştır. Son yıllarda, pek çok araştırmacı MSH'ın bitkilerde doğal olarak mevcut olduğunu bildirmiş ve onların içerikleri bitki türlerinin, doku ve gelişim aşamasına bağlı olarak değiştiğini rapor etmişlerdir (Erdal *et al.* 2010). Bitkilerde MSH'ın varlığı ile ilgili olarak artan çalışmalar bitkilerde de büyüme düzenleyicileri olarak rollerinin değerlendirmesini gerektirmiştir (Dogra and Kaur 1994). Genellikle bu çalışmaların çoğu; MSH'ın, biyodönüşümleri, rolleri ve bitkilerin miktarının analizi üzerine yoğunlaşmıştır (Dohrn *et al.* 1926; Dogra and Thukral 1996; Dogra and Thukral 1998) .

Bitkiler dıştan uygulanan MSH'nin çiçeklenmeden büyüme aşamalarına farklı etkileri olduğu rapor edilmiştir (Dogra and Thukral 1995; Janeczko and Skoczowski 2005; Cakmak *et al* 2010; Erdal and Dumlupinar 2010). Birçok araştırmacı morfolojik parametreler üzerine dıştan uygulanan MSH'nin etkilerini araştırmışlar; kök, gövde uzunluğu, çoğu enzimin aktivitesi, protein, şeker, nükleik asit ve klorofil gibi biyokimyasal parametreleri değiştirdiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmalarda MSH'nin özellikle düşük konsantrasyonlarda bitki büyüme ve gelişmesini önemli ölçüde uyardığını rapor etmişlerdir.

Önceki çalışmalarda bezelye embriyosunun östron (1mg/l) tarafından uyarıldığı; östron, östradiol ve testosteronun, çeşitli bitkilerde çimlenme derecesi ve büyüme oranını arttırdığı bildirilmiştir (Helmkamp and Bonner 1952; Martinez *et al.* 1976). Çimlenme ve fide büyümesindeki artışlar artan sentez reaksiyonlarına bağlanabilir. Diğer yandan, MSH'nin giberellinlerle sinerjik etki gösterdiği ve onlar gibi fizyolojik cevaplar oluşturabildikleri bildirilmiştir (Kopcewicz 1969).

Buğday ve mısır bitkisinin inorganik bileşenleri üzerine MSH'nin etkileri hakkındaki araştırmada N, P, Fe, Na ve K'un içeriğindeki değişimleri belirlenmiştir. Ayrıca Erdal *et al.* (2010), progesteron ve β -östradiol'e maruz kalan bezelye fideleri büyümesindeki bazı inorganik element konsantrasyonlarındaki değişimi rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar MSH'nin önemli ölçüde özellikle düşük konsantrasyonlarda mineral içeriğini arttırdığını tespit etmişlerdir. Prolin ve şeker içeriği, antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyon düzeyi ve ROT üretimindeki değişiklikler stres koşullarında bitki toleransı ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Erdal *et al.* (2010), yaptıkları diğer bir çalışmada ise normal koşullar altında büyüyen tohum ve fidelerde hidrojen peroksit içeriğini ve lipid peroksidasyonunun seviyesini (MDA) azalttığını superoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini uyardığını göstermişlerdir. Aynı zamanda bitkilerde bu hormonların dönüşümü ve biyosentezi için sorumlu enzimler bulunduğu bilinmektedir. Hücre bölünmeleri, kök ve sürgün büyümesi, embriyo gelişimini,

çiçeklenme, polen tüpü büyümesi ve kallus çoğalmasını; cinsiyet hormonları veya onların öncülleriyle tedavi edildiğinde bitkilerin gelişimini etkilemişlerdir (Erdal and Dumlupinar 2010; Erdal *et al.* 2010; Erdal and Dumlupinar 2011).

2.3.1. Hormon sentez mekanizmaları

Kaya *et al.* (2009)'ya göre bitki hormonları, bitkinin bir kısmında üretilen ve başka yerlere transloke olabilen çok düşük konsantrasyonlarda fizyolojik tepkiyi uyaran organik maddeler olarak tanımlanabilmektedir. Bitki hormonları doğal üretilirler ve kimyasal bir şekilde sentezlendiğinde bitki büyüme düzenleyicileri olarak adlandırılırlar. Araştırmalar, androjen östrojen ve progesteron gibi birçok steroid bileşenin bitkilerdeki nicelik ve biyosentez mekanizmalarına yer vermiştir (Janeczko and Skoczowski 2005).

Son zamanlarda, reseptörleri ve spesifik bağlanma bölgeleri, yaygın olarak bitkilerde MSH'nin fizyolojik etki mekanizmasını açıklamak için incelenmiştir. Bu çalışmaların sonunda varsayılan steroid bağlanma zar proteinleri, östradiol ve progesteron için spesifik bağlanma bölgelerinin varlığı tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Janeczko and Skoczowski 2005; Yang *et al.* 2005; Iino *et al.* 2007; Janeczko *et al.* 2008; Simersky *et al.* 2009).

Ancak bitkilerde MSH'nin reseptörleri ve özel bağlanma bölgeleri kısmen ortaya çıkmasına rağmen onların fiziksel aktiviteleri henüz tamamiyle açıklanmamıştır (Simersky *et al.* 2009).

2.4. Transpozonlar

Transpozonlar genom içerisinde hareket eden ve genomdaki dizilişi değiştiren mobil elementler olarak tanımlanırlar. Bu hareketli elementler translokasyon, insersiyon, duplikasyon veya delesyonla farklı kromozomların etkileşmesini sağlamaktadırlar. *Plasmodium* cinsinin birkaç türü hariç tüm ökaryotlarda ve neredeyse tüm

prokaryotlarda bulunan transpozonlar, ökaryotik organizmalardan bitki genomlarının ortalama %50-90, hayvan genomlarının da %3-45 kadarını oluşturmaktadır (Okamoto and Hirochika 2001; Bowen and Jordan 2002; Grzebelus 2006; Wicker *et al.* 2007; Jurka 2008; Huang *et al.* 2009).

2.4.1. Transpozonların keşfi ve sınıflandırılması

Transpozonlar, ilk kez Barbara McClintock tarafından 1950’de mısırdaki keşfedilmiştir. Transpozon elementleri bitki alemleri arasındaki benzerliklerle bile analiz edilmiş tüm genomlarda olduğu rapor edilmiştir (Feschotte *et al.* 2002). Prokaryotların çoğunluğunda %1-3 oranında, mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) %3, memelilerde %25-45, insanda %45 ve *Graminaceae*’de ve *Liliaceae*’de %90-98 kadar transpozon elementleri bulunmaktadır (Bowen and Jordan 2002; Schulman and Kalendar 2005; Mansour 2007; Wicker *et al.* 2007; Roberts *et al.* 2008; Lerat 2009; Wessler 2009).

Transpozon elementleri bir konakçı genomdaki hareket eden yada çoklu olabilen genomdaki ayırık diziler olabilirler (Sabot *et al.* 2004). LTR retrotranspozonlarını ve LTR’siz transpozonları içeren Sınıf I transpozon elementleri mRNA’ya transkribe edilir ve ardından bir ters transkriptaz aracılığıyla DNA’ya transkribe edilmektedir. Sınıf II transpozon elementleri; TIR (Terminal Ters Tekrarlar), MITE (Minyatür Evrik Ters Tekrarlar), helitronları içeren DNA transpozonları, genomik konumundan kesilmiş ve başka bir yere entegre olmuş DNA molekülleri olarak hareket etmektedirler (Wicker *et al.* 2007). DNA transpozonları genelde otonom elementler olup basit bir yapıya sahiptirler. Çoğunluğunun gövde kısmında transpozaz enzimini kodlayan tek bir gen ve bu genin iki ucunda TIR’lar mevcuttur. Transpozaz enziminin rekombinasyonu için gerekli olan bu kısa tekrarlar genelde 10–40 bp uzunluğunda olmakla beraber, 200 bp uzunluğunda da olabilmektedirler. Otonom olmayan elementler transpozaz kodlayan geni içermezler ancak içerdikleri TIR dizileri ve otonom bir transpozonun ürettiği olduğu transpozaz sayesinde genomda hareket edebilirler. DNA transpozonlarının transpozisyonu sırasında gerekli olan bir diğer enzim ise rezolvazdır ve enzim

transpozonun insersiyon yapmasına olanak tanımaktadır (Smitt and Riggs 1996; Feschotte 2002; Wessler *et al.* 2009).

Transpozon elementleri řu anda genomik organizasyonuna katkıda bulunan ve genom evriminin büyük sürücüleri olarak kabul edilmektedir. Sentromerik stabilitede ve heterokromatin korunmasında önemli rol oynayabilen (Bennetzen 2000; Slotkin and Martienssen 2007), sentromerik ve perisentromerik bölgeler özellikle transpozon elementlerinden oluşmaktadır (Dong *et al.* 1998; Kishii *et al.* 2001). Transpozon elementlerinin aktif hale gelmesiyle; farelerde değiştirilmiş kromozom ayrılması ve mayozda aksaklıklar, maya da kardeş kromatid uyumunun kaybı ve *A. thaliana*'da sentromer uyumunun kaybıyla sonuçlanmıştır (Volpe *et al.* 2002; Bourchis and Bestor 2004; Lippman and Martienssen 2004). Aktif transpozon elementleri genomdaki mutasyonların büyük bir kaynağını meydana getirmektedir.

Transpozon elementlerinin transpozisyonu gen ifadesinde değişme (Cohen *et al.* 1986; Zhang and Saier 2009), yeni düzenlemelerin meydana gelmesi (Naito *et al.* 2009), gen delesyonları (Harberd *et al.* 1987; Chopra *et al.* 1999), gen duplikasyonları (Akhunov *et al.* 2007), genom boyutunda artış (SanMiguel *et al.* 1998; Kalendar *et al.* 2000; SanMiguel *et al.* 2002), rekombinasyon (Lönnig and Saedler 2003), istenmeyen rekombinasyon, kromozom kırıkları ve yeniden çerçevelenmelerle sonuçlanabilmektedir (McClintock 1950; McClintock 1984).

Aktif transpozon elementlerinin potansiyel zararlı etkilerinden dolayı genomdaki çoğu transpozon elementlerinin ifadesi baskılanmıştır. Böylece tümünün otonom transpozisyon yeteneği olsa bile transpozon elementlerinin çoğu bitkinin yaşam döngüsü boyunca sessiz kalmaktadır (Slotkin and Martienssen 2007). Transpozon elementlerinin aktivasyonu biyotik ve abiyotik stres koşulları altında gözlemlenmiştir. (Hirochika 1995; Wendel and Wessler 2000). Transpozon elementlerinin ifadesi hem transkripsiyonda hemde transkripsiyon sonrasındaki epigenetik mekanizmalarla susturulmuştur (Slotkin and Martienssen 2007).

Transpozon elementleri histon kuyruklarının modifikasyonlarını ve değiştirilmiş kromatin paketlerini içeren; DNA metilasyonu ve baskılayıcı kromatin oluşumlarıyla transkripsiyonel olarak susturulabilmektedirler (Steimer 2000; Feschotte *et al.* 2002; Tompa *et al.* 2002). Transpozon elementlerinin transkripsiyon sonrası susturulması RNA kompleksinin yıkılarak transpozon elementlerinin kopyalarının bozulmasıyla elde edilmektedir (Wu-Scharf *et al.* 2000; Feschotte *et al.* 2002; Feschotte *et al.* 2008). Küçük kodlanmayan RNA (sRNA)'lar çift zincirli RNA'yı oluşturduğunda, transkripsiyon sonrası susturmaya kılavuzluk eden özel diziler dicer ailesine ait proteinler tarafından ayrılmaktadır (Baulcombe 2004).

sRNA'lar nükleustaki homolog DNA dizisinin metilasyonunda (RNA'dan direk DNA metilasyonu) ve heterokromatin oluşumuyula alakalıdır aynı zamanda transkripsiyon seviyesinde transpozon elementlerinin susturulmasını da teşvik etmektedir (Qi *et al.* 2006; Schwach *et al.* 2009).

sRNA'ların fonksiyonları uzunluklarda ilişkilidir; 21 nt uzunluğundaki transkripsiyon sonrası susturmada 24 nt uzunluğundaki ise RNA'ya bağımlı DNA metilasyonu ve heterokromatin koruma aracılığıyla susturma ile alakalıdır (Slotkin and Martienssen 2007; Schwach *et al.* 2009), *Caenorhabditis elegans* mutantlarında RNAi'deki kusurlu olması transpozon elementlerinin hareketlenmesi (Ketting *et al.* 1999; Tabara *et al.* 1999), ve *A. Thaliana*'nın mutantlarında ise DNA metilasyonundaki ve kromatin yapı düzenlenmesindeki eksikliğe sebep olmaktadır (Miura 2001; Tompa *et al.* 2002; Tsukahara *et al.* 2009).

Son yıllardaki araştırmalarda, transpozon transkripsiyonu ve hareket kontrolünü de içeren epigenetiksel çalışmalar gelişim biyolojisindeki ilerlemelere yeni bir ışık tutmuştur. Aynı zamanda transpozonların çeşitli biyolojik yönleri ve onların evrim ve konakçı genomun düzenlenmesi üzerine etkileri ele alınmıştır (Slotkin and Martienssen 2007; Weil and Martienssen 2008; Feng and Jacobsen 2010).

2.4.1.a. Retrotranspozonlar

Retrotranspozonlar gen anlatımını değiştiren, mutasyonları uyaran ve genom büyümesine sebep olan en önemli epigenetik değişimlerden biri olarak görölmektedir. Gelişme aşamasında çoğunlukla etkisiz olmakta, fakat stres şartlarında aktif duruma geçmektedirler.

Retrotranspozonlar ökaryotik transpozon elementlerinin en yaygın sınıfıdır. Retrotranspozonlar genelde, uzun uç tekrarları LTR (Long Terminal Repeats) içerip içermediğine göre sınıflandırılırlar. LTR'li ve LTR'siz olmak üzere iki temel gruba bölünmüşlerdir. LTR retrotranspozonlarında Ty1 copia ve Ty3-gypsy alt gruplarına bölünürken LTR'siz retrotranspozonlarda LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) ve SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) altgruplarına ayrılmıştır. LTR retrotranspozonları iç kodlayan bölgelere yakın olan 100 bp'den 1 kb'ye uzunluğunda değişen uzun uç tekrarlara sahiptir. Hem Ty1-copia hemde Ty3-gypsy grupları iki büyük gendeki proteinlerin sayısını kodlamaktadırlar. *Gag* ve *pol*, kodlanan bir proteaz elementi tarafından fonksiyonel peptidlere bağlanan bir poliprotein olarak sentezlenmektedirler.

Gag; RNA retrotranspozonlarının paketlenmesi için önemli protein (kılıf yapısında bir proteini) yapılarını kodlarken *pol* geni retrotranspozon yaşam döngüsü için ihtiyaç duyulan enzimatik aktiviteleri kodlamaktadır. Bu polipeptid, aspartik proteinaz (AP), ters transkriptaz (RT), ribonükleaz H (RH veya RNaz H) ve DDE integras (INT) aktivitelerine sahiptir. Bu enzimatik aktiviteleri yapmak için de Ty1-copia ve Ty3-gypsy elementleri arasında *pol* geni farklılıklarını da kodlamaktadır. İntegras ters transkriptazı ve RNaz H önce gelirken, Ty1-copia elemanlarında proteaz kodlama kapasitesinin hemen alt akışında konumlanır, Ty3- gypsy elemanları *pol* geninin ucunda yer almaktadır. LTR retrotranspozonlarının transkripsiyonu, 5' LTR başlar ve 3' LTR biter ve LTR'ler genellikle elementlerin hem promotor hemde terminatör transkripsiyonu için düzenleyici sekanslar içermektedir. LTR'li retrotranspozonlar bitkilerde bol miktarda bulunurken, bu oran hayvanlarda düşüktür ve insan genomunun

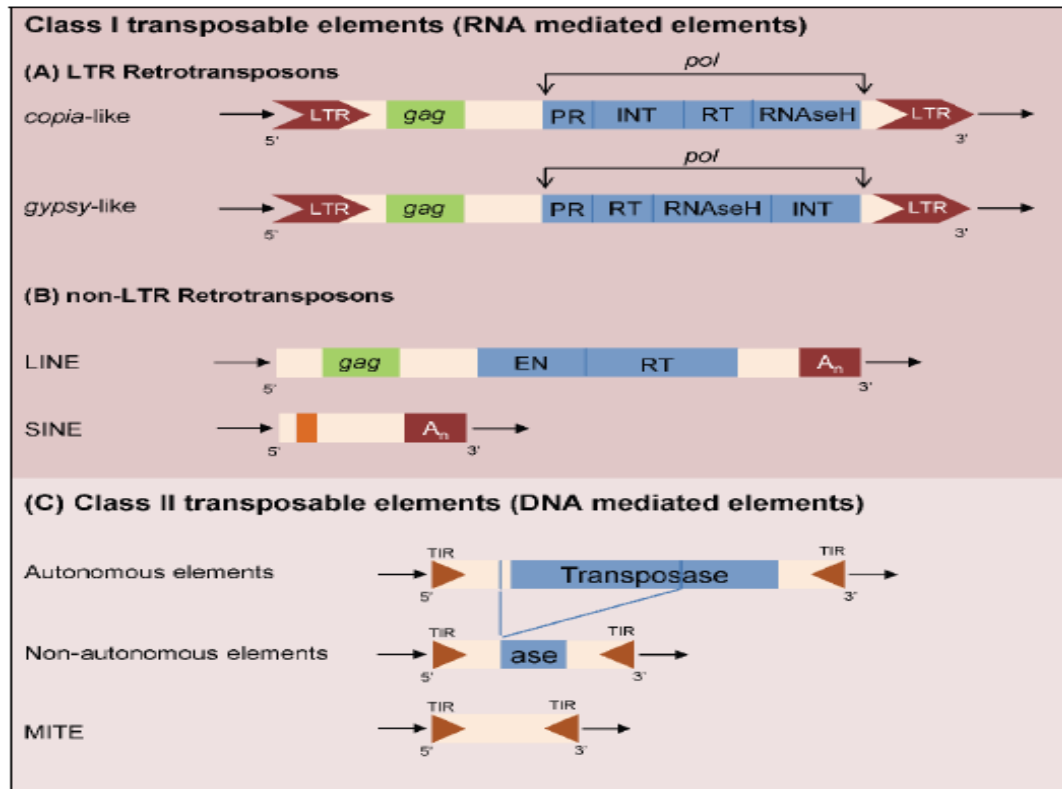
%8'ini oluşturmaktadır. Uzunlukları bir kaç yüz baz çiftinden, 25 kilobaza kadar değişiklik göstermektedirler. LTR'siz retrotranspozonlar LTR'lerden yoksundur ve iç promotorlerden transkribe edilmektedir. LTR'siz retrotranspozonlara örnek olarak LINEs ve SINEs dizileri verilebilir (Şekil 2.3).

LINE'ler LTR retrotranspozonları gibidir yapısal ve enzimatik aktiviteleri kodlayan *gag* ve *pol* genlerine sahiptirler ve hemen hemen 6500 bç uzunluğa sahiptirler. LINE'ler iki tane gen şifrelemektedirler; biri ters transkriptaz diğeri ise entegraz (transpozaz)'dır. İnsan genomunda mevcut olan 900.000 LINE dizisi, insan genomunun yaklaşık %21'ini oluşturmaktadır (Xiong and Eickbush 1990).

Bunların aksine SINE olarak adlandırılan küçük retrotranspozonlar diğerlerinden çok farklıdır ve onlar herhangi bir kodlama yeteneğine sahip değildirler. SINE'ler tRNAs ya da 7SL RNAs gibi polimeraz III transkriptlerinden türetilmiştir ve yerini değiştirmek için özel LINEs fonksiyonlarını kullanırlar ve hemen hemen 100-400 bç uzunluğundadırlar. RNA polimeraz III vasıtasıyla çevri yazılmış bazı hücrel RNA'ların ters transkripsiyonu sonucu genoma girmişlerdir. Bunların en iyi bilinen örnekleri Alu elemanlarıdır. İnsan genomunun neredeyse 1 milyon dizisini oluşturan SINE'ler, insan genomun %13'ünü oluşturmaktadır (Kajikawa and Okada 2002).

Hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunan, MITE gibi, RNA aracılığı olmadan kopyala-yapıştır mekanizmasıyla hareket edebilen transpozonların keşfedilmesi, ikili sisteme meydan okumuştur. Bazı araştırmacılar, bu tarz transpozisyon yapan grupları tamamen ayrı bir sınıf olarak kabul etmiştir. Başka araştırmacılar ise MITE gibi dizilerin keşfinden sonra, transpozonları transpozisyon aracına göre sınıflandırmayı reddederek, tamamen enzimolojik sınıflandırmalar geliştirmişlerdir. MITE'ler DNA transpozonlarına (Sınıf II transpozonları) benzemektedirler fakat daha küçüklerdir yaklaşık (100-500 bç) uzunluğundadır ve transpozisyonları için gerekli genlere sahip değildirler. Genomda mevcut olan diğer transpozonların transpozazları vasıtasıyla hareket ettikleri düşünülmektedir. MITE'ler retrotranspozonlarla kıyaslandığında çok kısa elementlerdir ve aynı zamanda bitki genomunun önemli bir kısmını örneğin pirinç

genomunun yaklaşık %6'sı MITE'lerden oluşmaktadır ve pirinçteki *Stowaway* grubunda %2'sini oluşturmaktadır (Mao *et al.* 2000). İlk olarak bitki genomlarında tespit edilmişler, ardından insan ve çeşitli canlı türlerinde de mevcut oldukları belirlenmiştir. İnsan genomundaki 100.000 MITE ise, neredeyse genomun %1'ini oluşturmaktadır. MITE'lerin çoğu normal genomun kodlanmayan bölgelerinde tanımlanmıştır; transkripsiyonun başlangıç ve poliadenilasyona katılan düzenleyici sekansları sağladığı görülmüştür. Bu örneklerle rağmen normalde MITE'lerin gen ekspresyonuna katkısı vardır fakat gen ekspresyonunun ilk çıkışını değiştirip değiştirmediği tam olarak açık değildir (Bureau and Wessler 1992; Bureau and Wessler 1994).



Şekil 2.3. Sınıf I ve sınıf II retrotranspozonlarının yapısı (Craig *et al.* 2002; Wicker *et al.* 2007)

2.5. Retrotranspozonların Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Markırlar

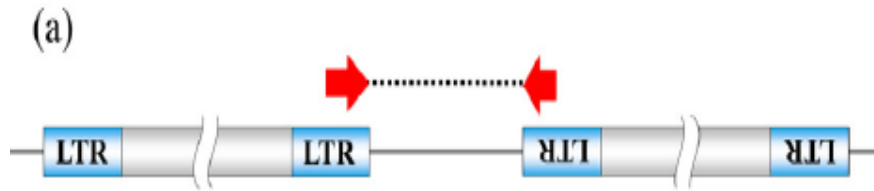
Genom üzerinde belli bir bölgeyi tanımlamak için kullanılan genetik belirteçlerdir ve DNA'nın büyük bir kısmının veya tek bir özel nükleotidin simgesi olabilmektedirler. Son yıllarda bilim adamları tarafından yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar, kaynağını bitkilerin hücrelerinde mevcut olan DNA'lardan aldığı için, bitki çeşitliliğinde veya populasyondaki bitki genotiplerinin yakınlık derecelerinin belirlenmesinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilmektedir. Moleküler markır teknolojisi; genetik çeşitlilik, adli tıp, genetik bağlantılı haritalama, filogenetik ilişkiler ve moleküler ıslahı içeren bitki biyolojisinde hayati bir rol oynamaktadır.

Genomdaki farklılığın dağılımının analizine dayalı birkaç markır sistemi vardır. Retrotranspozonların integrasyonları genomik DNA ve korunmuş uçları arasında yeni ek yerleri oluşturduğundan, markır olarak kullanılabilir. Polimorfizmleri retrotranspozon insersiyonu ile belirlemekte kullanılan markır sistemleri; genelde bu uçlar arasındaki ve bitişik DNA bölgelerinin bazı bileşenlerinin polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla çoğaltılmasına dayanmaktadır. LTR retrotranspozonlarının dizileri değişik PCR parmak izi teknikleri tarafından tek bir türe ait analiz formlarının polimorfizm tespit etmek için: IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) ve SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) teknikleri uygundur (Kalendar *et al.* 1999).

2.5.1. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)

IRAP (İç-Retrotranspozon Çoğaltma Polimorfizmi) tekniği iki LTR dizisi arasındaki DNA segmentlerini çoğaltmakta ve primerler bu bölgelere bağlanmaktadır. LTR için özel olarak dizayn edilmiş ya bir ya da iki primer aynı PCR de kullanılabilir fakat sonuçlar bu bölgelerin yönlendirmesiyle belirlenmektedir. Hedeflenen Sınıf I elemanları (5' 3' veya 3' 5') her iki yönde gerçekleşebilen transpozisyonun 'kopyala-yapıştır' yöntemini kullanmaktadır. Genomik bolluğun yanı sıra bu baştan başa, kuyruktan

kuyruğa ya da baştan kuyruğa yönlendirmede bulunan gen kopyalama amaçlı kümelerde farklılığa yol açar. Baştan başa ve kuyruktan kuyruğa düzenlemeler için yalnızca basit bir primer IRAP ürünlerini oluşturmak için gerekmektedir. Baştan kuyruğa yönlendirmede; genomik DNA'nın arasına girip çoğaltmak için hem 5' hem de 3' LTR primerlerine ihtiyaç vardır. IRAP basittir ve genomdaki tüm hedef bölgeleri taramak için tek bir primerle gerçekleştirir. Ayrıca SSAP ve REMAP'tan daha ekonomik ve elverişlidir. Simple Sequence Repeat (SSR) bölgelerinin taranmasına ve genomun kesilmesine gerek yoktur. IRAP ve REMAP DNA parmak izlerini oluşturmak için Kalendar ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılan mobil elementlere dayalı birer markır sistemidir (Kalendar et al.1999). Her ikisi de, 100-5,000 bp büyüklüğüne kadar değişen doğrudan LTR'ler içeren retrotranspozonların bir grubunu hedef almaktadır (Kumar and Bennetzen 1999) (Şekil.2.4).

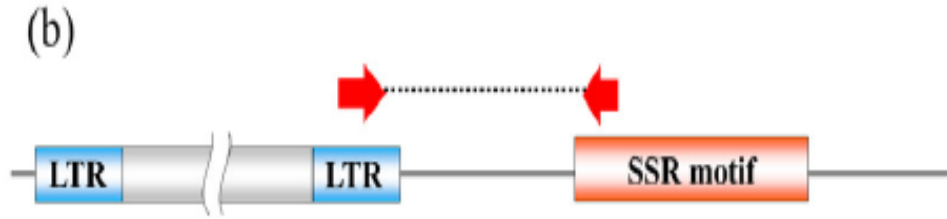


Şekil 2.4. IRAP çalışma prensibi (Kalendar *et al.* 2010)

2.5.2. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)

REMAP (Retrotranspozon-Mikrosatellit Çoğaltma Polimorfizmi) tekniği IRAP'tan farklıdır. REMAP primerleri, mikrosatellit dizileri ve LTR retrotranspozonları arasındaki bir segmentin çoğalmasının polimorfik ürünlerini tanımlamak amacıyla bağlantılı ISSR primerleriyle kombinlenir. Bu teknik bir REMAP reaksiyonundaki primerlerden biri IRAP primeriyle kombinlenen ISSR'lere bağlı olduğundan dolayı Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) tekniğinin uzatılmış ya da modifiye edilmiş bir versiyonu olarak kabul edilmektedir. REMAP metodu BARE 1 retrotranspozonunun LTR'lerin dış yüzündeki primerlerinden dizayn edilmektedir. Bunu elde etmek için, özel olarak tasarlanmış tek bir LTR primeri basit bir tekrar içeren örneğin, (CA)_n (GA)_n isteğe bağlı olarak seçilen bir diğer primer ile karıştırılmaktadır.

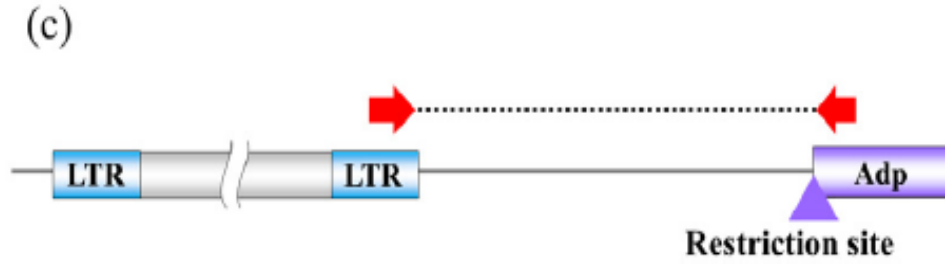
IRAP ve REMAP güvenilir ve tekrarlanabilir bantlama profilleri oluşturdıkları için çok sayıda bitki cinsinde genetik çeşitliliği çalışmalarında, kombinasyon da ve bireysel bir şekilde kullanılmışlardır (Branco *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2011) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. REMAP çalışma prensibi (Kalendar *et al.* 2010)

2.5.3. SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism)

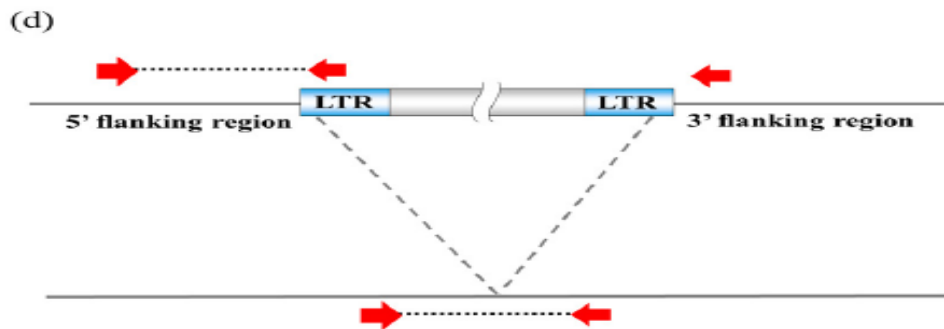
Waugh ve arkadaşları tarafından geliştirilen SSAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism/ Sekansa Özgü Çoğaltma Polimorfizmi) tekniği büyük oranda AFLP'ye (Amplified Fragment Length Polymorphism/ Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) benzemektedir, ancak AFLP tekniğinden daha yüksek seviyede polimorfizm göstermektedir (Vos *et al.* 1995). Tipik bir AFLP prosedürü için ön bir dizi bilgi gerekli değilken, SSAP için dikkatli planlama ve ön transpozon dizisi bilgisi tavsiye edilmektedir (Waugh *et al.* 1997). SSAP'taki genomik DNA bir restriksiyon enzimi (*MseI* veya *PstI*) ile kesilmektedir. Kesimden sonra sekansları bilinen kısa çift zincirli adaptörler kesilmiş DNA fragmentlerine bağlanmaktadır. Adaptör homolog primerlerle ön seçici bir PCR amplifikasyonu yapılmaktadır. Ön amplifikasyon adımı genom karmaşıklığını azaltmak ve daha yüksek bir tekrarlanabilirlik sağlamak için gerçekleştirilmektedir. Bir sonraki adım; adaptör primer yerine ya nadiren ya da sıklıkla eşleşen transpozona özgü bir primerle seçici bir amplifikasyondur. Primerler genellikle retrotranspozonların LTR bölgelerine veya iç kısımlarına bağlanır. Fragmentlerin büyüklükleri genellikle transpozisyon insersiyon alanı ve komşu restriksiyon kesim alanları arasındaki uzaklığa bağlı olarak değişmektedir (Syed and Flavell 2006). S-SAP amplifikasyonları için Ty1-copia veya Ty3-gypsy retrotranspozonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Poczai *et al.* 2013) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. S-SAP çalışma prensibi (Kalendar *et al.* 2010)

2.5.4. RBIP (Retrotansposon Based Insertional Polymorphism)

İnsersiyon sekans temelli polimorfizm tekniği kendi insersiyonundan primerler ve insersiyon bölgelerine yakın primerler arasında PCR kullanarak retrotranspozon insersiyonlarının basit bir PCR'ye dayandırılarak tespit edilmektedir. Temel RBIP (Retrotansposon Based Insertional Polymorphism/ Retrotransopon Temelli İnsersiyonel Polimorfizm) metodu bir filtre hibridizasyonu ile elektroforez jelin yerini alarak yüksek uygulamalar için geliştirilmiştir (Flavell *et al.* 1998). RBIP pirinçte Vitte *et al.* (2004) tarafından Indika ve Japonika pirinç çeşitlerinin evrim sorununu gidermek için kullanılmıştır. Bu teknik tüm sekans bilgisine ihtiyaç duyduğu için diğer tekniklerden daha pahalı ve karmaşıktır (Kalendar *et al.* 2011).



Şekil 2.7. RBIP çalışma prensibi (Kalendar *et al.* 2010)

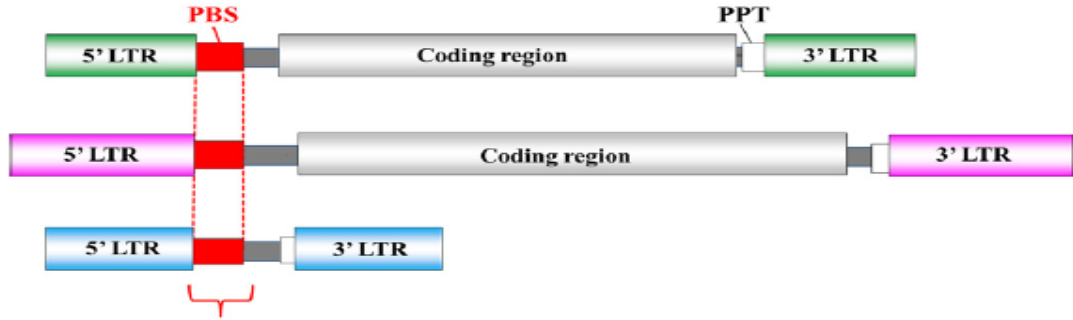
2.5.5. ISAP (İnter-SINE Amplified Polymorphism)

Seibt ve arkadaşları tarafından geliştirilen ISAP (İnter-SINE Amplified Polymorphism/ İç- Kısa Serpiştirilmiş Nükleotid Elementleri Çoğaltma Polimorfizmi) tekniği; eksik LTR motifleri olan retrotranspozonlara dayalı tekniktir (Seibt *et al.* 2012). Bu teknik özellikle patates için geliştirilmiştir. ISAP markırları bitişik SINE elemanları arasındaki genom dizilerinin amplifikasyonuna dayanmaktadır. Primerlerin SINE elementlerinde farklı pozisyonlarda bağlanması için her biri dış ya da iç tarafa yönlendirilir. Özel primer tasarımı farklı Solanaceae'deki SINE elemanlarının konsensus dizileri karşılaştırılarak elde edilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada biyoinformatik araçlar kullanılarak belirlenen Solanaceae familya ve alt familyalarına özgü SINE elementlerinin yaklaşık 6500 kopyası olduğu bulunmuştur (Wenke *et al.* 2011). Bu elementler, Solanaceae bitkilerinde yaygın olduğu gibi bu tür ve cinslerinden içinde kolaylıkla aktarılabilir olduğu öne sürülmüştür (Şekil 2.8).

2.5.6. iPBS (İnter-Primer Binding Site Amplification)

Son zamanlarda Kalendar and Schulman (2010), LTR retrotranspozonlarının belirli primer bağlanma bölgeleri arasındaki iPBS'ye (inter-Primer Binding Site Amplification/ iç-Primer Bağlanma Bölgelerine Dayalı Çoğaltma) dayalı olan DNA parmak izi için yeni bir evrensel yöntem geliştirmişlerdir. Bu tekniklerin çoğunun kısıtlayıcı oluşu her bir bitki türü için özel retrotranspozon dizilerine dayalı moleküler markır sistemlerini gerektirmektedir. iPBS moleküler markırının kullanımı için LTR sekansının bilinmesinin gerekmesi sınırlayıcı faktörlerden biridir. Fakat eğer ön bilgi yoksa LTR'ler klonlanıp dizilmelidir veya tRNA'ların sınırlı setine tamamlayıcı 18 nükleotidle LTR transpozonları tarafından paylaşılan retrotranspozonların PBS bölgeleri kullanılarak bu sorunun üstesinden gelinmektedir (Mak and Kleiman 1997). Bu bölgelere bağlanması için dizayn edilen primerlerin uzunluğu 12-18 bp uzunluğu arasında değişmektedir. iPBS için retrotranspozonların ters yönlü olması ve intergenik bölgeleri amplifiye etmek için birbirine yeterince yakın olması gerekmektedir. Bu metod PBS elementlerine sahip retrotranspozonlarda çoğu organizma üzerinde evrensel

ve transfer edilebilir gibi görünmektedir (Smýkal *et al.* 2011; Gailite and Rungis 2012) (Şekil 2.9).



Şekil 2.8. iPBS çalışma prensibi (Kalendar *et al.* 2010)

2.5.7. TAM (Tagged Microarray Marker)

TAM (Tagged Microarray Marker/ Etiketli Mikroarray Markır) tekniği cam mikroarray slayt üzerinde bir ko-dominant moleküler marker için DNA'ların binlerce işareti için RBIP'den geliştirilmiş mikroarray tabanlı bir yöntemdir. RBIP aynı zamanda tek nükleotid polimorfizmi (SNP) markırları ile de iyi çalışmaktadır (Flavell *et al.* 2003; Jing *et al.* 2007). Bu yaklaşımda, allele özgü PCR ürünleriyle sonlanan biyotin, streptavidin kaplı cam lam üzerine saflaştırılmamış benekli ve allele- özgü PCR primerleri bağlı etiketlere floresan dedektör oligonükleotidlerin hibridleşmesiyle ile görüntülenmiştir.

İki etiketlenmiş primer oligonükleotidler bir florokromun çoklu kopyasıyla ile etiketlenmiş bir konkatamerik DNA probu oluşturmak için hibridizasyonla tespit edilen her bir etiket ve lokus yüzdesi kullanılır.

2.5.8. R-RAP (RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism)

R-RAP tekniği (RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism/ Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Retrotranspozon Çoğaltma Polimorfizmi) LTR

retrotranspozon primerleri ve RAPD'in kombinlenmesiyle kullanılan retrotranspozon temelli yeni bir markır sistemidir. Bantlama örnekleri diğer moleküler markır sistemleriyle kapsanmayan farklı genomik bölgelerin tespitini göstermek için IRAP ve RAPD tarafından farklı ampliconlardan R-RAP primer kombinasyonu ile elde edilmektedir.

Kullanılan LTR retrotranspozonları arpa ve buğdaydan izole edilmiştir ve bu metodun etkinliğini ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Diğer metodlarla karşılaştırıldığında bu retrotranspozon temelli moleküler markır genomdaki büyük değişiklikleri tespit edebilmektedir. Son zamanlarda ucuz ve sekans bilgisine gerek duyulmadığından dolayı bitki türlerinde bu retrotranspozon markır sistemine dayalı araştırmalar artmaktadır (Branco *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2010; Abdollahi Mandoulakani *et al.* 2012).

2.5.9. IMP (Inter-MITE Polymorphism)

IMP (Inter-MITE Polymorphism/ İç-Minyatür Evrik Tekrarlı Transpozon Elementler Polimorfizmi) tekniği; temelinde IRAP'a çok benzemektedir fakat retrotranspozonlardan ziyade MITE benzeri transpozonlar kullanılmaktadır. Bu teknikte çok karmaşık elektroforetik profiller oluşabilmektedir. İlk olarak arpadaki MITE'nin; biri *Stowaway* ailesine ait diğeri *Barfly* ailesine ait olan iki grubunu tanımlamada, arpa genomunun bağlı haritalarını ortaya çıkarmak ve ekilebilir birkaç arpa arasındaki genetik benzerliği tespit etmede kullanılmıştır (Chang *et al.* 2001).

2.5.10. TD (Transposon Display)

TD AFLP gibi kalıp DNA'nın restriksiyon kesimini, adaptörlerin bağlanması ve ardından da PCR ile çoğaltılmasını içermektedir. Ancak, transpozon ekine bağlı sınırlayıcı fragmentlerin frekansını arttıran ek bir adım içermesinden dolayı genellikle S-SAP'tan farklıdır. Diğer tekniklerin aksine TD LTR retrotranspozonları için henüz kullanılmamıştır.

2.6. Epigenetik ve Transpozon İlişkisi

Epigenetik modifikasyonlar, orijinal DNA sekansında değişim olmaksızın gen aktivitesindeki değişikliğin mayoz ya da mitoz esnasında hücrenin ürününe dönüşen değişimler olarak tanımlanırlar (Chen *et al.* 2010b). Birkaç hücre bölünmesiyle stresin hafızasını sürdürme potansiyeliyle geri dönüşümlü ve hızlı bir şekilde meydana gelen bu değişimler, çevresel koşullara yanıtta bitkinin esnekliğini tarif etmek için potansiyel bir mekanizma olabilmektedirler (Bruce *et al.* 2007). Aynı zamanda bitki stres toleransını geliştirmede kullanılabilirler.

Fizyolojik ve gelişimsel uyarıcıların yanı sıra çevresel stres bu epigenetik değişikliklere neden olabilmektedir (Boyko and Kovalchuk 2008). Birçok çalışma, gen ekspresyonunda değişiklikleri bitki stres tepkileri esnasında epigenetik statüsündeki değişimler ile koordine edilir olduğunu ortaya koymuştur. Genelde nükleozom doluluk oranı transkripsiyonel aktivasyonla negatif ilişkilidir. Bu nedenle, bir genomik bölge transkripsiyonel olarak aktive edildiğinde, bu bölgede nükleozom yoğunluğu azalır ve kromatin yapısını rahatlatılır (Kim *et al.* 2010).

Epigenetik değişiklikler nedeniyle kromatin yapısındaki değişiklikler kromatin ilişkili çeşitli proteinlerin katılmasına bağlıdır (Verbsky and Richards 2001). Bağlayıcı histon 1 yüksek mobil grup (High Mobility Group) HMG proteinleri, histon modifikasyon enzimleri gibi bu kromatin ilişkili proteinler ve kromatin yeniden şekillenme kompleksi bileşenleri, ilgili genleri düzenlemek amacıyla kromatin montaj ve nükleozom ambalaj ile kromatinin üst düzey yapısını değiştirmektedir (Bianchi and Agresti 2005; Grasser *et al.* 2007; Jerzmanowski 2007).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi'nden temin edilen ve yapılan ön denemelerde tuza karşı hassas olduğu bulunan *Triticum aestivum* cv. Kırık çeşidi kullanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen bitkilerden yararlanılmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı:

Otoklav (Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00)

Santrifüj (Hettich, GERMANY, EBA-20)

PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)

Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Otomatik Pipetler (Eppendorf, GERMANY)

Spektrofotometre (Cecil, CE 5502)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

Derin Dondurucu (Nuairie, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)

Hassas Terazî (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE, MD 592)

Kar makinesi (Scotsman, U.S.A., AH 19828 5)

3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıda verilmiştir:

3.1.3.a. Kullanılan tuz (NaCl) çözeltilerinin hazırlanışı

Konsantrasyon	Miktar (g/l)
---------------	--------------

0 mM	1000 ml saf su
------	----------------

200 mM	11,68 g NaCl
--------	--------------

300 mM	17,52 g NaCl
--------	--------------

400mM	23,36g NaCl
-------	-------------

3.1.3.b. Kullanılan β -östradiol çözeltilerinin hazırlanışı

Aşağıdaki konsantrasyonlarda solüsyon hazırlanmıştır.

10^{-6} M β -östradiol

10^{-8} M β -östradiol

10^{-10} M β -östradiol

3.1.3.c. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler**1M Tris-HCl (1000 ml)**

121,1 gram Tris-base

700 ml dH₂O

42 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M)

700 ml su içerisine 121,1 gr Tris-base karıştırıldı. Üzerine 42 ml konsantre HCl eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlandı ve otoklavlandı.

0.5 M EDTA PH=0.8 (1000 ml)

136,1 gr EDTA

20 gr NaOH

800 ml dH₂O

800 ml su içerisine 136,1 gr EDTA eritilip, üzerine 20 gr NaOH eklenerek pH=8.0 olarak ayarlandı. Filtreden geçirildi ve otoklavlandı.

5 M NaCl (500 ml)

146,1 gr NaCl

450 ml dH₂O

146,1 gr NaCl 450 ml suda eritildi. Toplam hacim 500 ml'ye tamamlanıp oda sıcaklığında saklandı (otoklavlanmadı).

10X TE Buffer (1000 ml)

100 ml 1 M Tris-HCl pH=8.0

20 ml 0.5 M EDTA

880 ml dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır.

1X TE Buffer (1000 ml)

10X TE Buffer'dan 100 ml alınıp 900 ml saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı.
(DNA 1X TE'de çözülür.)

3 M Sodyum Asetat (Ph= 5.2)(100 ml)

40.8 gr Sodyum Asetat ($\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 80 ml ultra saf suda iyice eritildi. Ve pH= 5.2 oluncaya kadar glasiyel asetik asit (GAA) eklenir ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

10 M Amonyum Asetat

77 gr Amonyum asetat

800 ml dH_2O

77 gr Amonyum asetat 800 ml distile su içerisinde çözüldü. Distile su kullanarak hacmi 1 litreye tamamlanarak stok hazırlandı. Çalışmada 250 mM olacak şekilde seyreltilerek $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

DNA ekstraksiyon tamponu (50 örnek için):

1 gr toz CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)

0.5 gr (%0,1) Sodyum bisülfid (NaHS_3 ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ karışımı)(Sigma, 243973)

5 ml Tris-HCl (1 M)

14 ml NaCl (5 M)

2 ml EDTA (0.5 M)

0.1 ml (%0.2) β -merkaptoetanol (v/v)

Kloroform: İzoamil alkol:

24: 1 oranında hazır olarak kullanıldı (Fluka, 25666).

2-propanol (izopropanol)

Hazır olarak kullanıldı (Sigma, I9516).

Proteinaz K

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlandı. (Sigma, P2308).

Ribonükleaz (RNaz)

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlandı. (Sigma, R6513).

%70'lik Etil Alkol:

70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.d. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler**Etidyum Bromür Çözeltisi:**

500 ml 0,5X TBE tamponu içerisine 300 µl etidyum bromür ilave edilerek hazırlandı. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Bromfenol Blue Çözeltisi:

0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi.

10X TBE tamponu:

108 gr Tris-base

55 gr Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA

700 ml dH₂O

700 ml distile su içerisinde 108 gr Tris-base, 55 gr Borik asit ve 40 ml 0,5 M EDTA çözüldü. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

1X TBE tamponu:

Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak hazırlandı ve seyreltilerek (100 ml 10X TBE Tamponu + 900 ml saf su) 1X TBE tamponu hazırlandı.

Primerlerin Hazırlanması:

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlandı.

3.1.3.e. Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler

%1'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit):

%5 NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari *Domestos®* marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

%75'lik Etil Alkol:

75 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. β -östradiol ve tuz (NaCl) çözeltilerinin bitkiye uygulanması

Eşit boyutlarda ve yeterli miktarda seçilen *Triticum aestivum* cv. Kırık çeşidine ait musluk suyunda yıkanan tohumlar sonra %75'lik etil alkolde 5 dk karıştırılıp 3 kez steril saf su ile yıkanıp ardından tween20 katılan %10'luk NaOCl'de 10 dakika steril edilmiştir. Tohumlar 6-7 kez saf su ile durulanmış ve steril filtre kağıdı ile kurutulmuştur. Eşit olarak ayrılan steril tohumlar saksıda perlit içerisine ekilmiş ve 10 gün boyunca MS (MURASHIGE and SKOOG 1962) çözeltilisiyle beslenmiştir. Bitkileri 10 günlük büyümenin sonunda 4 farklı uygulama grubuna ayırarak (0, 10^{-6} M β -östradiol, 10^{-8} M β -östradiol ve 10^{-10} M β -östradiol) dozlarında β -östradiol çözeltileri püskürtülme işlemi ile uygulanmıştır. β -östradiol uygulamasından 7 gün sonra (0, 200, 300, 400 mM NaCl) sodyum klorür içeren tuz çözeltileri uygulanmıştır ve 24. günün sonunda hasat edilmiştir. Bu süre sonunda uygulama yapılan saksılardaki ve kontrol grubundaki bitki örneklerinden yeterli miktarda alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- a. Taze olarak hazırlanmış DNA Ekstraksiyon tamponu önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda bekletilmiştir. Bitki materyaline ilave edilmeden önce ekstraksiyon tamponuna %0.2 (v/v) oranında β -merkaptoetanol ilave edilmiştir.
- b. Önceden sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınan 0.3 g bitki materyali üzerine 1000 μ l DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda her 10 dk'da alt üst edilip karıştırılarak 60 dk. bekletilmiştir.
- c. Su banyosu aşamasından sonra 10 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır ve bu süre sonunda her örneğe 750 μ l fenol kloroform izoamil alkol eklenip tüm örnekler 15 dk. yavaşça alt üst ederek karıştırılmıştır.
- d. 14000 g ve 24°C'de 20 dk. santrifüjlendirilip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- e. 1000 μ l Kloroform izoamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst ederek karıştırılmıştır. 14000 g ve 4°C'de 20 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- f. Üst faza 2,5 μ l RNaz ve 8 μ l proteinaz K eklenmiş ve 45 dk. 37°C'de bekletilmiştir.
- g. DNA'yı çöktürmek için her tüpe 100 μ l amonyum asetat, 100 μ l sodyum asetat (3M), 800 μ l soğuk izopropanol eklenmiştir.
- h. 14000 g ve 4°C'de 20 dk. santrifüjlenip üst faz atılmıştır.
- i. Pelet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- j. Yıkanan pelet 37°C'de 15 dk bekletilerek kurutulmuştur.
- k. Kurutulan DNA 100 μ l TE tamponunda fingerprint yapılarak çözülmüştür.
- l. 24 saat +4°C'de dinlendirildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA 250 kat (3 μ l DNA+747 μ l TE tamponu) seyreltilerek spektrofotometrede 260nm ve 280nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri okunmuştur. OD (okuma değeri) 260/280 değeri 1,1–1,8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme

katsayısı) x OD₂₆₀ (260nm’de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA miktarı hesaplanmıştır. Stok DNA’dan 50ng/μl DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.3. IRAP -REMAP

3.2.3.a. IRAP-REMAP primerleri

Çalışmada 7 IRAP primeri (Metabion International AG Lena-Christ-Strasse 44/I D-82152 Martinsried, Deutschland) kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Ayrıca Çizelge 3.2 verilen 4 IRAP ve 2 ISSR primeri kombinlenerek REMAP primerleri oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri, erime (T_m) ve bağlanma (T_a) sıcaklıkları

No	Primer adı	Dizisi (5' → 3')	T _m (°C)	T _a (°C)
1	BARE1(0)	CTAGGGCATAATTCCAACA	53.0	52.0
2	BARE1LTR2R	ATCATTGCCTCTAGGGCATAATTC	62.0	58.0
3	E2647	ACCCCTCTAGGCGACATCC	62.0	58.0
4	Sukkula	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	71.0	68.0
5	Stowaway	CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT	62.0	52.0
6	WLTR 2105	ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA	61.0	55.0
7	N-57Nikita(F)	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC	60.0	55.0

*Ta sıcaklıkları Gradient PCR ile belirlenmiştir

Çizelge 3.2. REMAP-PCR’da kullanılan primer dizileri, erime (T_m) ve bağlanma (T_a) sıcaklıkları

No	Primer adı	Dizisi (5' → 3')	T _m (°C)	T _a (°C)
1	LTRreverse 7286	GGAATTCATAGCATGGATAA TAAACGATTATC	66.0	58.0
2	8081	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	57.0	54.0
3	8082	CTCTCTCTCTCTCTCTG	57.0	54.0
4	LTRreverse 6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATG TATCCACACATGGTA	77.0	60.0
5	BARE1LTRforward 6149	CTCGCTCGCCCACTACATCAAC CCGCGTTTATT	75.0	60.0
6	WLTR 2105	ACTCCATAGATGGATCTTGGTGA	61.0	55.0

*Ta sıcaklıkları Gradient PCR ile belirlenmiştir

3.2.3.b. IRAP- REMAP PCR protokolü

IRAP-PCR işlemi için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. IRAP- REMAP PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril distile su	13µl	-
10X PCR tamponu(MgCl ₂ içermeyen)	2µl	1X
25 mM MgCl ₂	2µl	2,5mM
5 µM primer	1µl	0,25µM
10 mM dNTP	0,5µl	0,25mM
50 ng/µl Kalıp DNA	1µl	50ng
5 U/µl <i>Taq</i> -DNA polimeraz (Sigma, D6677)	0,3µl	1,5 U
Toplam	20µl	

Yukarıda Çizelge 3.3'te verilen standart değerlere göre her bir örnekten izole edilen genomik DNA ve Çizelge 3.1'de ve Çizelge 3.2'de verilen IRAP ve REMAP primerleri ile her bir örnek için ayrı PCR tüpü hazırlanmıştır.

Bu işlemlerin ardından örnekler PCR otomatik termodöngü aletine (Corbatt Mastercycler Gradient Authorized Thermal Cycle) yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

- 1) PCR aleti otomatik olarak 5 dakika 95°C tutmuş,
- 2) 42 döngü olacak şekilde sırasıyla,
 - a. 1 dakika 94°C
 - b. 1 dakika bağlanma sıcaklığı (Değişken)
 - c. 2 dakika 72°C
- 3) 15 dakika 72°C
- 4) Son olarak 10 dakika 4°C tutulmuş, PCR aletinden çıkarılan örnekler +4°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- Jel içerisinde agarozun konsantrasyonu %1,5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 1X TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0,75µg/ml olacak miktarda etidyum bromür eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3 µl bromfenol mavisi +7 µl PCR ürünü) yüklenmiştir.
- Elektrik akımı verilerek 70V–160 dk. süre ile PCR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiştir.
- Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve değerlendirilmek üzere fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5. IRAP-REMAP Analizleri ve Genomik Kararlılık Sabitliğinin (%GTS) Belirlenmesi

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol IRAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar temin edilmiş olan agaroz jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Elde edilen jel görüntüleri TotalLab TL120 programı ile değerlendirilmiştir. Genomik kararlılık sabitliliği (%) her bir primer ürünü için Atienzar (1999)'a göre $100 - (100 * a/n)$ formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki a her bir uygulama örneği için tespit edilen IRAP ve REMAP polimorfik profillerini, n ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bantı sayısını göstermektedir. Uygulama gruplarına ait IRAP ve

REMAP profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bandın ortaya çıkması veya mevcut bir bandın kaybolmasını kapsamıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. IRAP Analizleri ve Genomik Kararlılık Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%)

β -östradiol ve NaCl'nin dozları *Triticum aestivum* cv. Kirik çeşidi üzerine uygulandıktan sonra genomdaki retrotranspozon polimorfizmini ortaya çıkarmak için 11 IRAP primeri denenmiş bunların içinden en iyi amplifikasyon veren 7 primer (Stowaway, Sukkula, WLTR2105, NikitaN57, E2647, BARE1(0), BARE1LTR2R) seçilerek değerlendirmeye alınmıştır. Polimorfizm oranı NaCl konsantrasyonunun artan dozlarına bağlı olarak artış göstermiştir. Fakat tuz ile uygulanan β -östradiol'ün özellikle yüksek dozlarında bu polimorfizi azalttığı gözlenmiştir. Aşağıda Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi NaCl uygulamasında en yüksek GTS oranı (%83,1) 200 mM NaCl dozunda iken en düşük GTS oranı ise (%50,5) 400 mM NaCl dozunda olup doz artışına bağlı olarak GTS oranının düştüğü belirlenmiştir.

GTS oranı üzerine dozların temel etkileri karşılaştırıldığında NaCl dozuna bağlı olarak bir azalış söz konusu iken, β -östradiol uygulaması zıt bir etki oluşturmuş ve GTS oranında artışa sebep olmuştur. Her iki uygulamanın birlikte verildiği dozlarda ise NaCl uygulamasının en düşük ve β -östradiol uygulamasının en yüksek olduğu dozda GTS oranı en yüksek iken (%62,4), NaCl uygulamasının en yüksek ve β -östradiol uygulamasının en düşük olduğu dozda ise GTS oranının en düşük (%48,7) olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma primerleri dikkate alındığında totalde en yüksek polimorfizm oranı (%55,5) BARE1(0) primerinde gözlenirken en düşük polimorfizm oranı (%24,1) WLTR2105 primerinde gözlenmiştir.

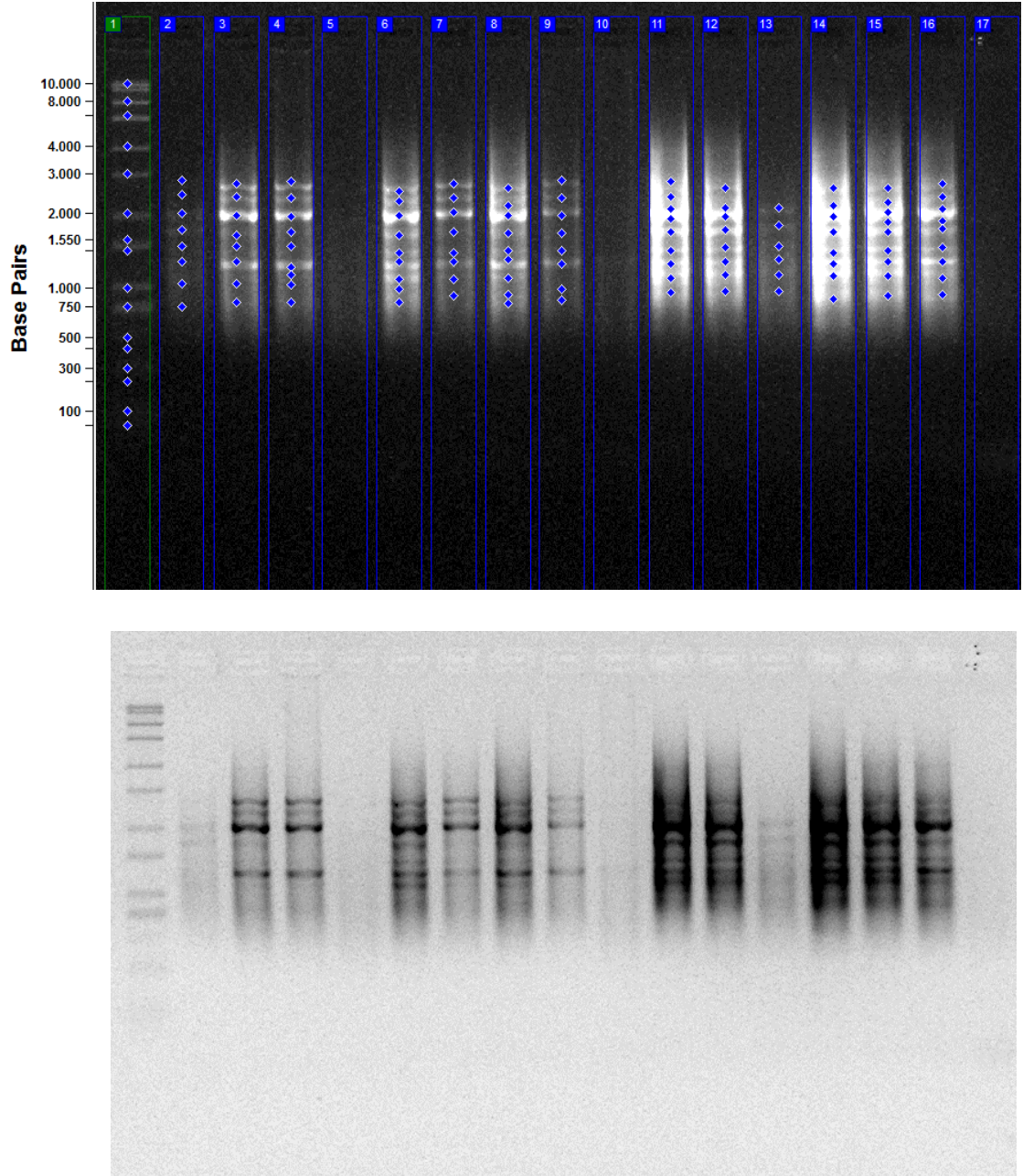
Çizelge 4.1. IRAP'taki β -östradiol ve NaCl genomik kararlılık sabitliliği (%GTS) ve retrotranspozon % polimorfizmi

Primerler	0 M β -östradiol				10^{-6} M β -östradiol				10^{-8} M β -östradiol				10^{-10} M β -östradiol			
	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl
WLTR 2105	100	85,7	71,4	71,4	85,7	57,1	85,7	71,4	71,4	71,4	85,7	57,1	71,4	71,4	71,4	85,7
N57 NİKİTA	100	75	62,5	62,5	62,5	50	62,5	87,5	75	75	62,5	87,5	50	62,5	75	12,5
SUKKULA	100	71,4	71,4	57,1	57,1	71,4	57,1	71,4	57,1	57,1	57,1	85,7	71,4	71,4	57,1	71,4
E2647	100	75	50	50	62,5	62,5	62,5	50	50	50	62,5	50	37,5	50	37,5	50
STOWAWAY	100	87,5	87,5	50	50	75	50	75	50	62,5	50	50	62,5	50	62,5	75
BARE 1(0)	100	87,5	50	12,5	62,5	87,5	50	62,5	25	37,5	37,5	25	37,5	12,5	12,5	12,5
BARE1LTR2R	100	100	50	50	50	33,3	83,3	83,3	50	33,3	50	66,6	50	66,6	33,3	33,3
%GTS	100	83,1	63,3	50,5	61,5	62,4	64,4	71,6	54	55,3	57,9	60,3	54,3	53,1	49,9	48,7
%Polimorfizm	0	16,9	36,7	49,5	38,5	37,6	35,6	28,4	46	44,7	42,1	39,7	45,7	46,9	50,1	51,3

Çizelge 4.2. β -östradiol ve NaCl'nin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerinin buğday tohumlarının üzerine etkisi ile değişen bantların moleküler ağırlığı

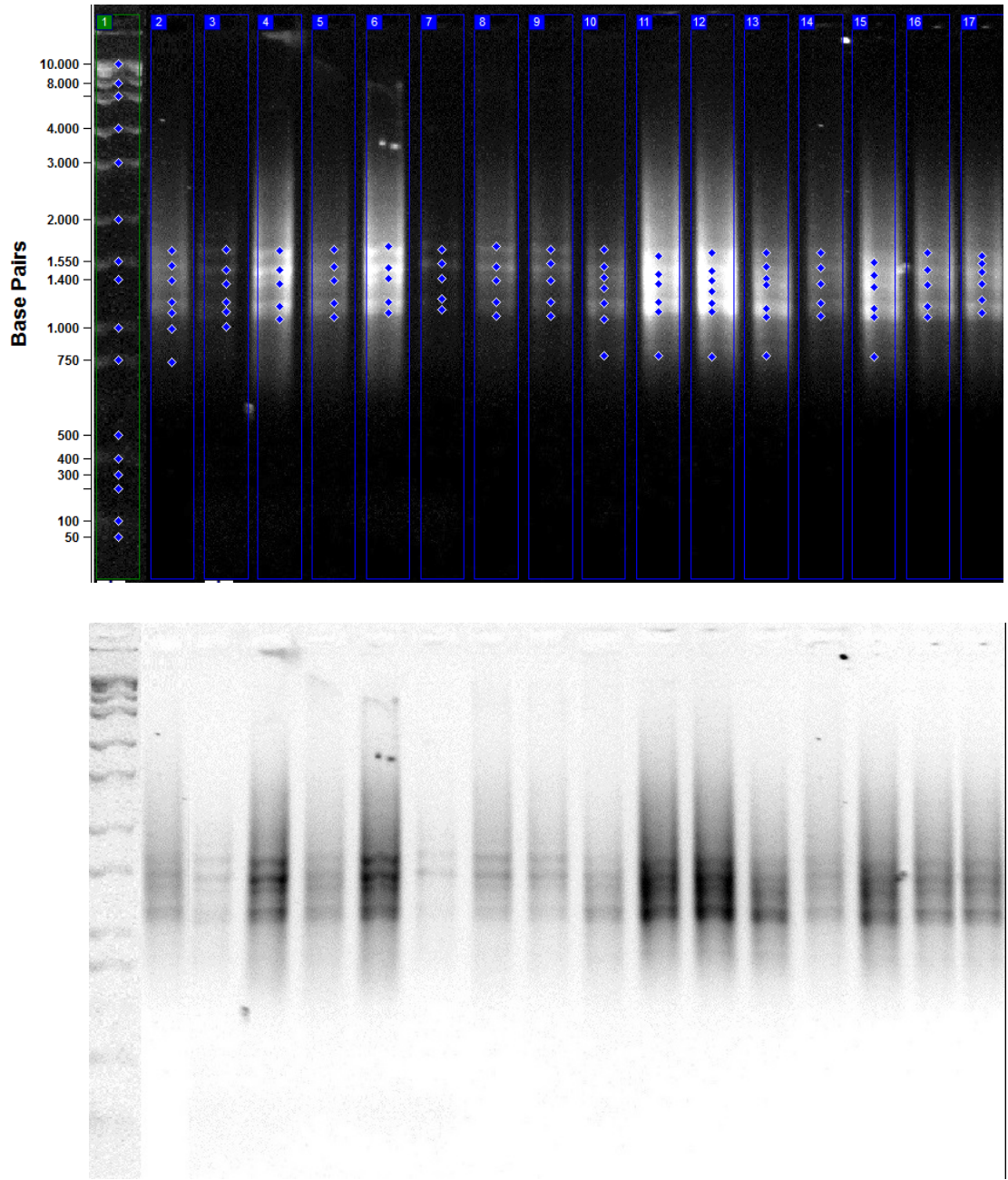
Primer	Kontrol	+/-	0 M β -östradiol				10^{-6} M β -östradiol				10^{-8} M β -östradiol				10^{-12} M β -östradiol			
			0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl
WLTR2105	7	+	100				1097	1097	1030	1097	1302?	753; 591			1030	1030	1030	
		-		507	507; 784	507; 784		946; 784		946	946		1380	1522; 1380; 946	946	946	946	642
Nikita	8	+	100			1348	2000			2348				2348	2000			2000; 1348; 2348
		-		1717; 1230	1230; 3031; 817	1230; 817	1717; 817	1717; 3031; 1230; 817	3031; 1230; 817		3031; 1230	1717; 1467	3031; 1230; 817		2549; 1230; 817	3031; 1717; 817	3030; 1717; 1230	3031; 1717; 1230; 817
Sukkula	7	+	100	2430; 2024	2272; 1829	2184; 1868; 1059	2430; 1931	2272; 1829	2128; 1868	2156	2213; 1811; 1033	2272; 1829; 1085	2272; 1868; 1046		2184	1272; 1888	2213; 1848	2368; 1909
		-					989		989	989				1128	989		989	
E2647	8	+	100		1780; 1244	1865; 1268	1865; 1293		1847	1796	1256	1732; 1244	1716; 991	1732; 1231	1716; 1178	1780; 1244	1716; 1331; 1199	1655; 1167
		-		771; 359	701; 450	701; 296	701	701; 359; 296	701; 296	701; 296; 351	701; 359; 296	701; 296	991	771	771; 674; 296	701; 296	701; 296	771; 296
Stowaway	8	+	100	1029	1029	904	984; 2500	888	2150; 904	839	904; 1029	937; 1885	953; 1929	953	2150	1821; 2231	1841; 904	904
		-				2150; 2809; 2406	2809; 2406	750	2809; 2406	750	750; 2406	750	2809; 750	2809; 2406; 750	2809; 2406	2406; 2809	750	750
BARE 1(0)	8	+	100	746	2694; 1569	3000; 2049; 1561; 1198	3140; 1302		4000; 2659		4576; 1444	5783; 3222	5783; 2791	1444; 1674	5783; 2944	2791; 2944; 1548	5783; 5400; 3291	5783; 4806; 3412; 1960
		-			1406; 922	2264; 1406; 354	354	548	2264; 354	2264; 354	2264; 354; 922; 548	1406; 548; 354	1440; 548; 354	2264; 1406; 548; 354	2264; 548; 354	354; 1406; 548; 2264	1444; 1406; 548; 354	548; 354
BARE1 LTR2R	6	+	100	-			6572	4558; 6572			6572; 1551	7031; 1551	6137; 1549	6224; 1556	1548	1548	5483; 2623	6876
		-			2172	2172	2172; 5865	5865; 2172	2172	2172	2172	7510; 2172	2172		3210; 2172	4112	4112; 2172	4865; 2172; 1033

4.2. IRAP Jel Görüntüleri



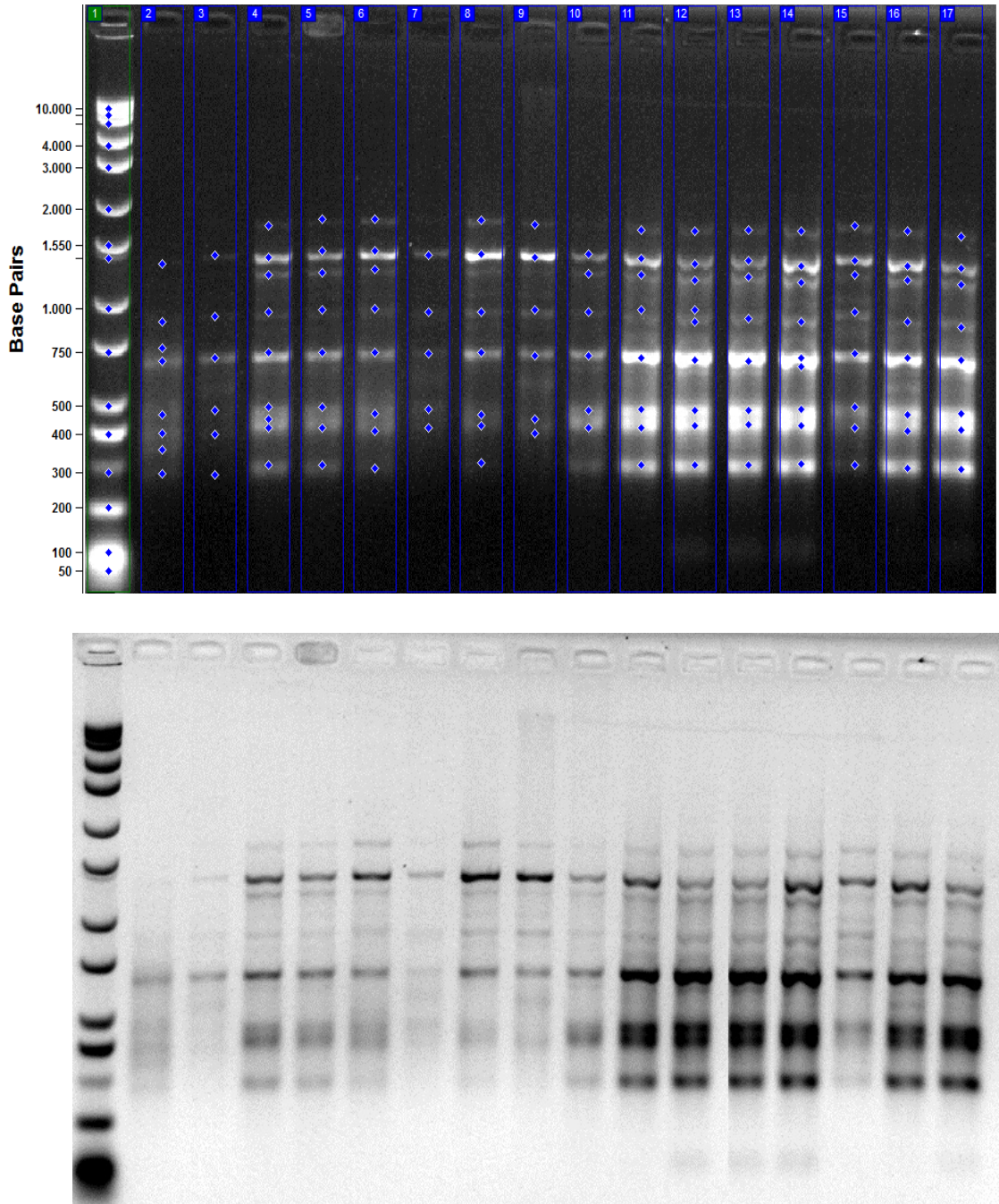
Şekil 4.1. Stowaway primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



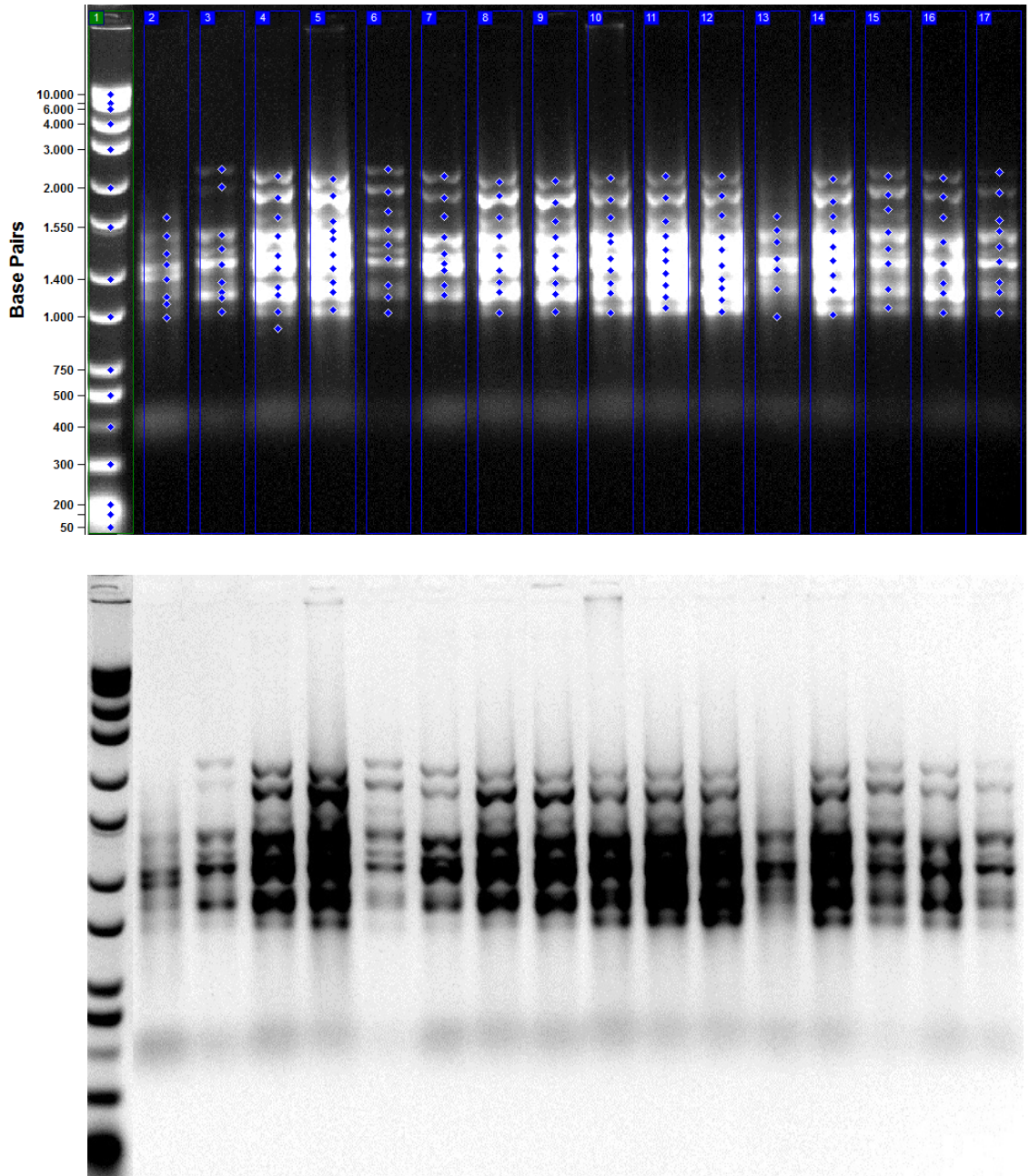
Şekil 4.2. BARE1LTR2R primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β-östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β-östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β-östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β-östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol)



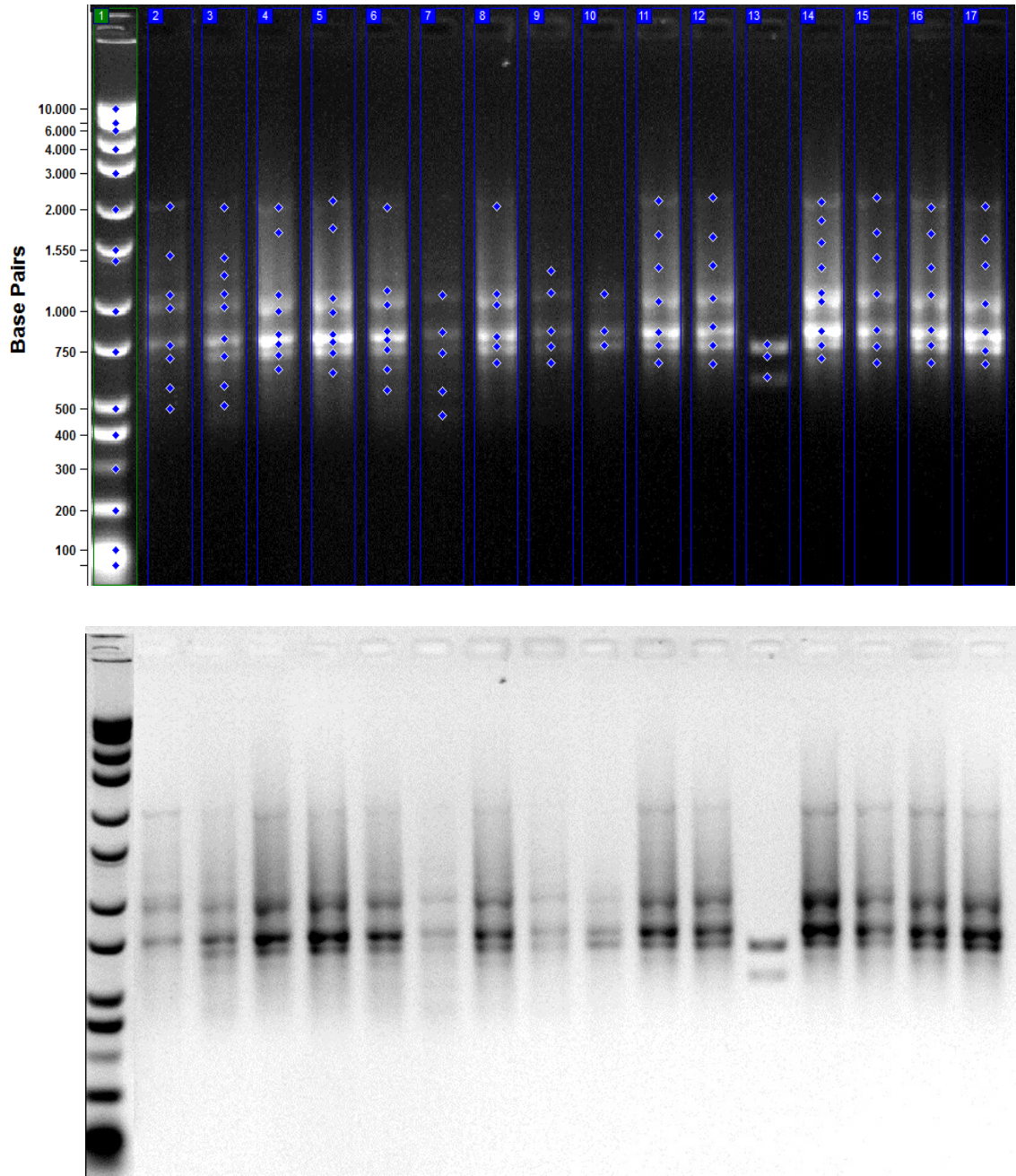
Şekil 4.3. E2647 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



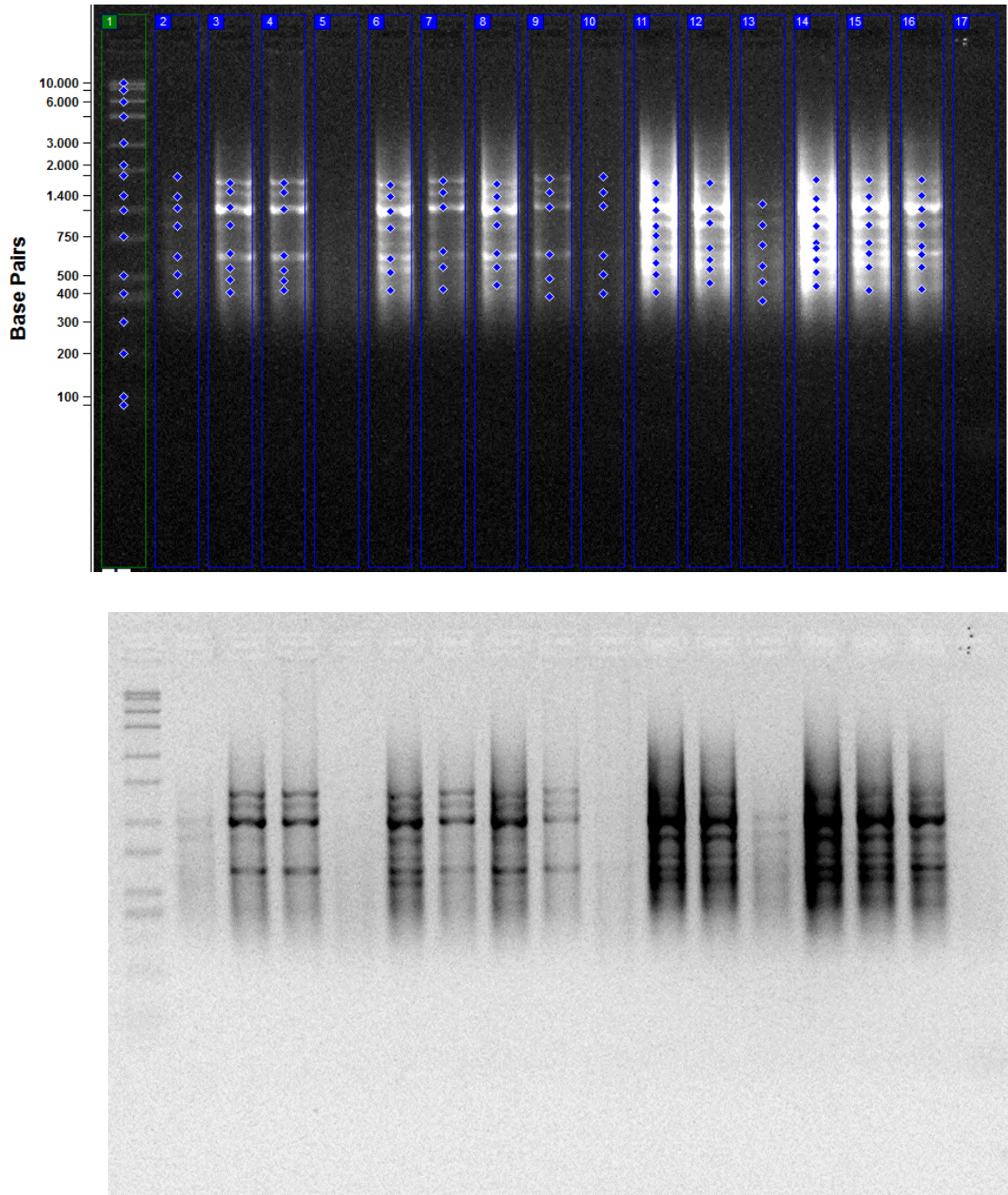
Şekil 4.4. Sukkula primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



Şekil 4.5. BARE1(0) primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



Şekil 4.6. WLTR2105 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β-östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β-östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β-östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β-östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β-östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β-östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β-östradiol)

4.3. REMAP Analizleri ve Genomik Kararlılık Sabitliliği (Genomik Template Stability; GTS%)

REMAP tekniği için ise IRAP primerlerinden seçilen WLTR2105, LTRreverse6150, LTRforward6149 ve LTRreverse7286 primerleri ISSR'nin 8081 ve 8082 primerleriyle kombinlenerek 4 tane primer oluşturulmuş ve amplifikasyonları dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi kullanılan bütün tuz konsantrasyonlarının GTS değerini azalttığı gözlenmiştir. Ancak tuzla beraber β -östradiol uygulamasının GTS oranlarını yükselterek polimorfizmi önlediği tespit edilmiştir. IRAP'ta en yüksek polimorfizm %42,9'la (WLTR2105)'de iken; REMAP'ta ise en yüksek polimorfizmin oranının; %66,7'yle (WLTR2105+8082)'de olduğu gözlenmiştir. REMAP'ta polimorfizmin yüksek olmasının nedeni ise bu teknikle hem retotranspozonların hareketi hem de DNA zararının hesaplanmaya alınmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Totalde ise en yüksek polimorfizm oranı IRAP'ta (400 mM dozunda 51,3) iken; REMAP'ta (400 mM dozunda %54,1)'dir.

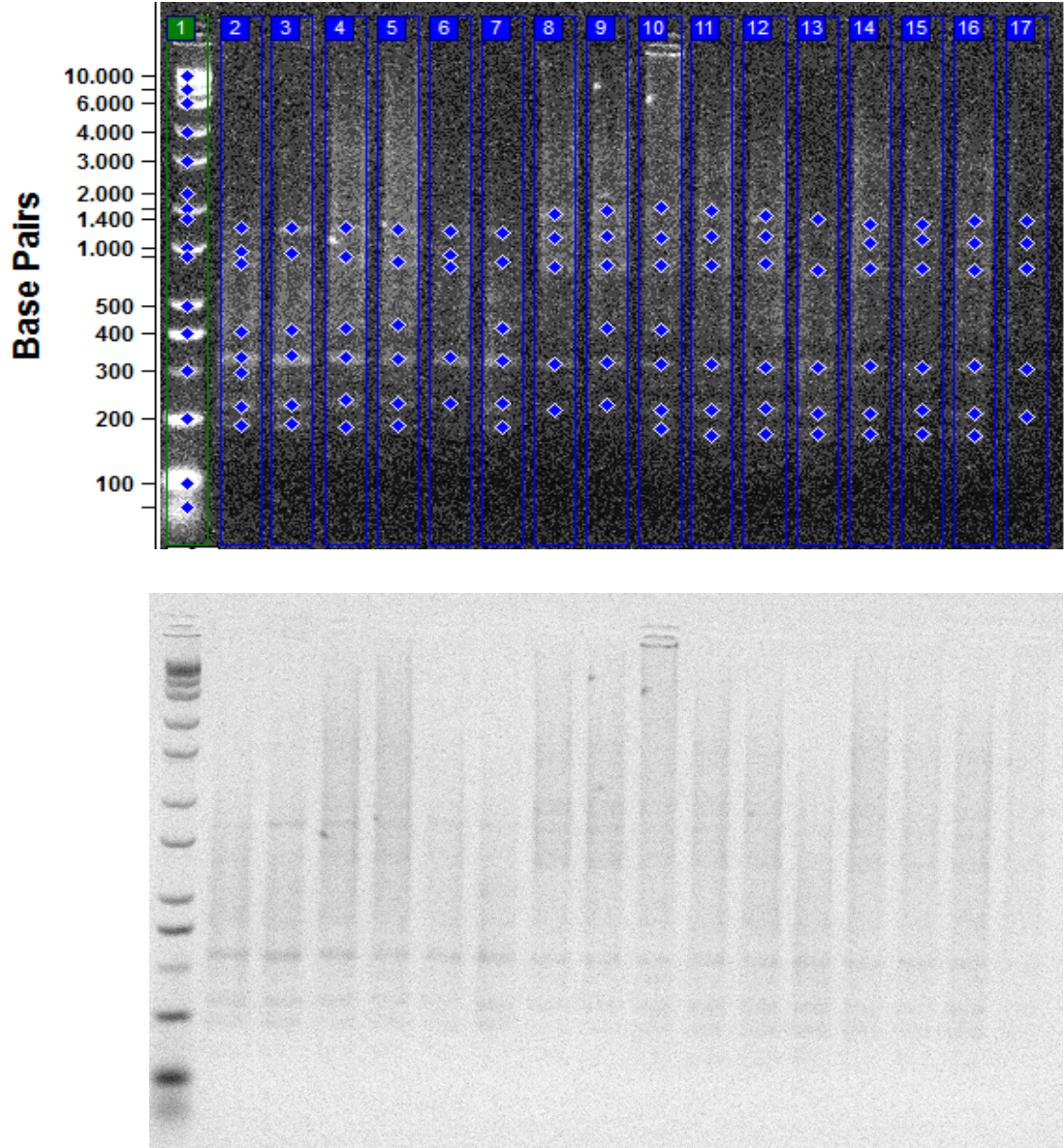
Çizelge 4.3. REMAP'taki β -östradiol ve NaCl genomik kararlılık sabitliliği (%GTS) ve retrotanspozon % polimorfizmi

IRAP +ISSR Primerleri	0 M β -östradiol				10^{-6} M β -östradiol				10^{-8} M β -östradiol				10^{-10} M β -östradiol			
	0	200	300	400	0	200	300	400	0	200	300	400	0	200	300	400
	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl	mM NaCl
LTR7286R+8081	100	75	75	50	37,5	62,5	50	62,5	62,5	62,5	50	62,5	62,5	62,5	25	50
LTR6149F+8082	100	100	75	75	87,5	75	87,5	100	75	62,5	75	62,5	75	50	62,5	62,5
LTR6150R+8081	100	100	75	75	50	75	62,5	75	75	62,5	75	50	50	50	50	37,5
WLTR2105+8082	100	100	77,7	66,6	66,6	77,7	77,7	88,8	66,6	77,7	77,7	66,6	66,6	44,4	55,5	33,3
GTS%	100	93,7	75,7	66,7	60,4	72,6	69,5	81,6	69,8	66,3	69,5	60,4	63,5	51,7	48,3	45,9
Polimorfizm%	0	6,3	24,3	33,3	39,6	27,4	30,5	18,4	30,2	33,7	30,5	39,6	36,5	48,3	51,7	54,1

Çizelge 4.4. REMAP'taki β -östradiol ve NaCl'nin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin buğday tohumlarının üzerine etkisi ile değişen bantların moleküler ağırlığı

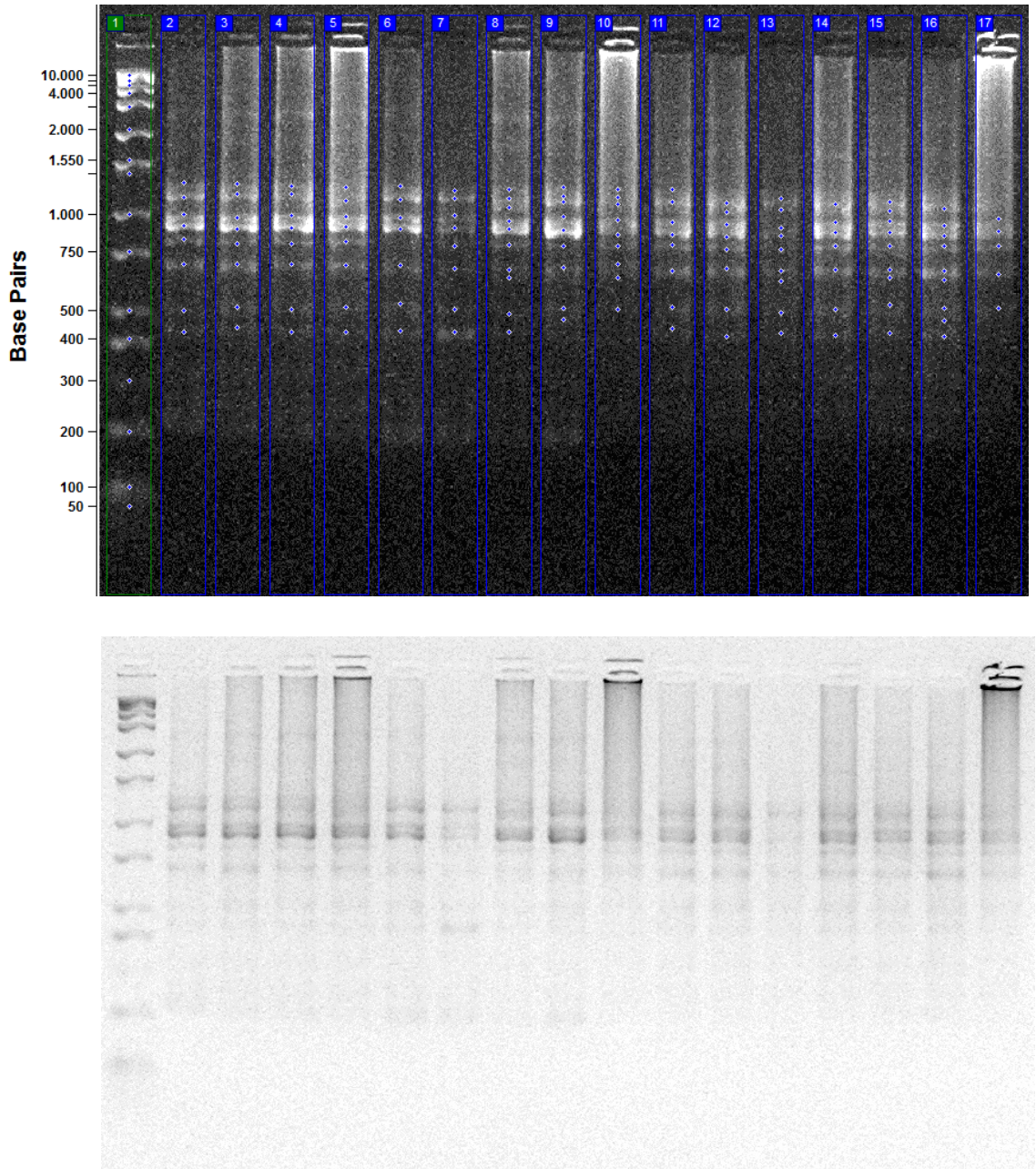
Primer	Kontrol	+/-	0 M				10^{-6} M β -östradiol				10^{-8} M β -östradiol				10^{-12} M β -östradiol			
			0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl	0 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl	400 mM NaCl
WLTR2105+8082	9	+	100	-	473	1385; 1447	1451; 750	1453	1453						1334	1055	1356	1423; 1028
		-			524	450	874	1394	1394	1556	1256; 524; 450	1556; 1394	1556; 1394	1556; 1499; 1256	1556; 1256	1556; 1499; 1394; 874	1556; 874; 1256	1556; 1499; 1256; 874
LTR7286R+8081	8	+	100	-	-	572	1212	-	1475	1529	1596	1529; 1154	1444; 1154	1400	1057	1097	1370; 1057	1370; 1057
	-	-	-	899; 398	971; 398	971; 516; 398	1277; 516; 398; 288	1277; 398; 971	1277; 516; 288	1277; 288	1125; 971	1277	1277; 516	971; 516	971; 516	971; 516	1277; 971; 288; 516	971; 516; 288
LTR6149F+8082	8	+	100	-	1256	1119	-	1208	1220	-	620	1220	756	1098	1088	1128; 1109	615; 407	-
		-		-	1293	1152	820	1293	-	-	418	-	1293	1152; 1293	1152	1293; 1152	1293	1293; 418; 1152
LTR6150R+8081	8	+	100	-	1768	1768	1768; 1650	1635	1787; 817	1920	1681	1850; 1635	1732	1768; 1386	1559; 1334	1650; 1360	1563; 486	1653; 1295; 464
		-	-	-	699	699	1714; 1591	1714	1714	1467	1714	1591	1714	1714; 1467	1714; 1467	1714; 1591	1714; 1591	1714; 1593

4.4. REMAP Jel Görüntüleri



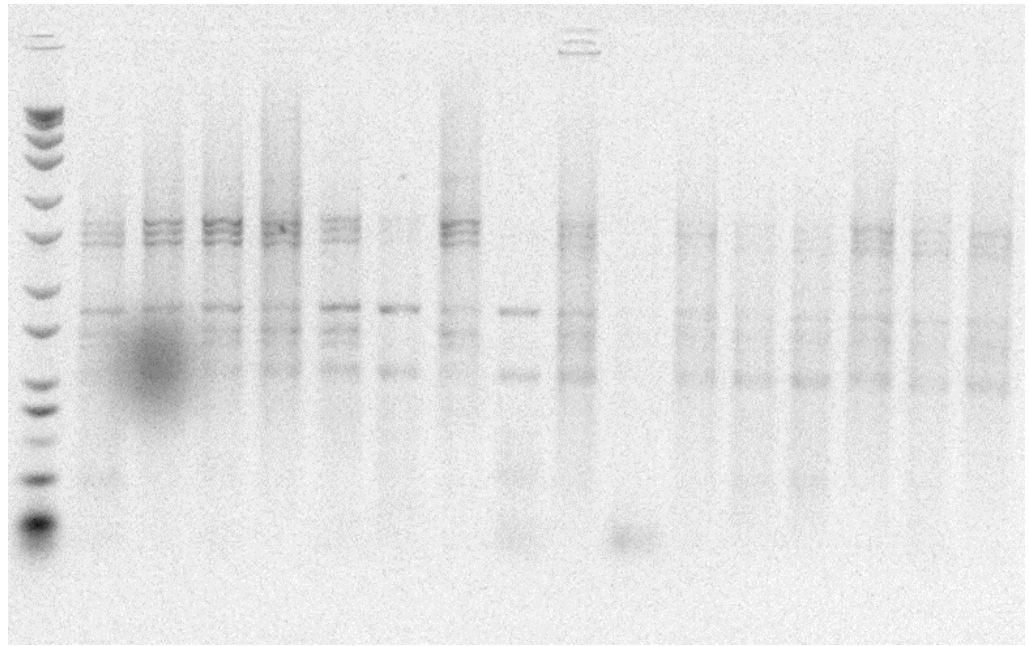
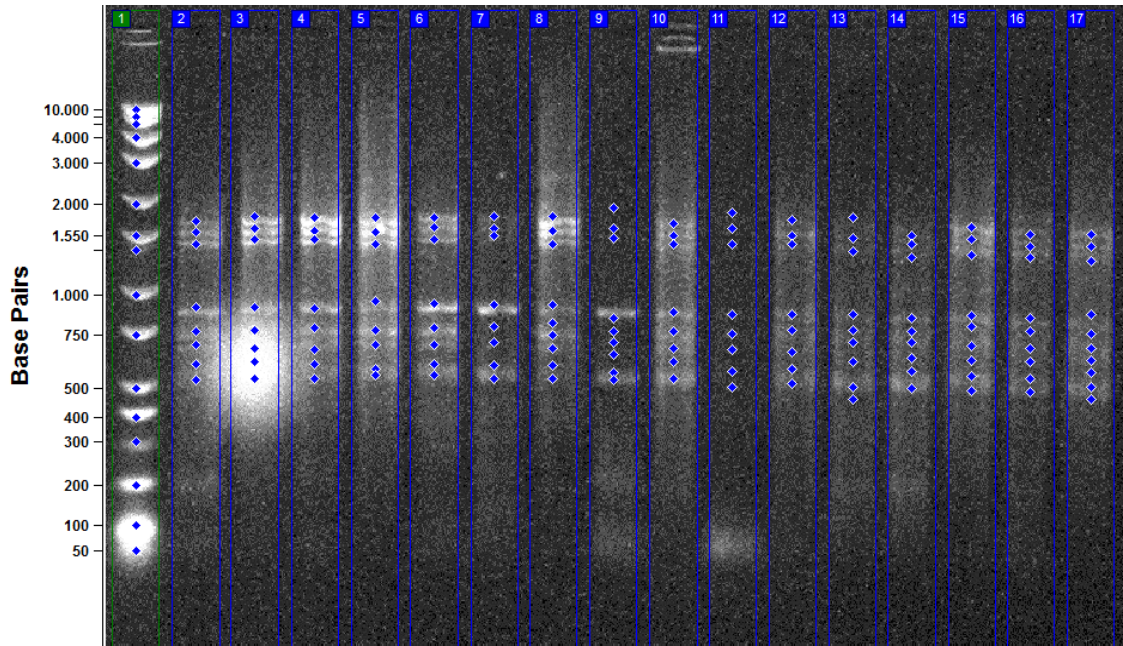
Şekil 4.7. LTR7286(R) +8081 Primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



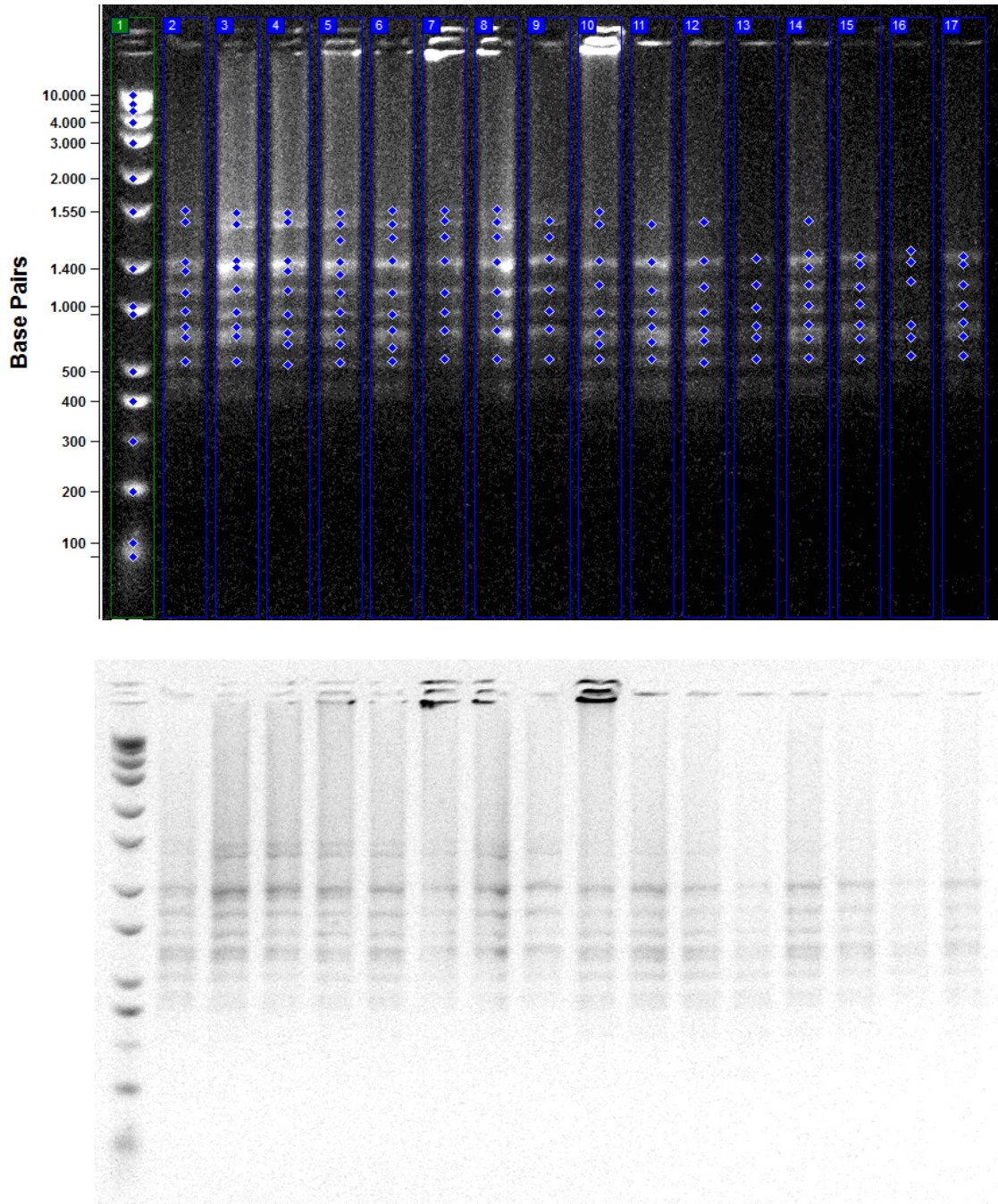
Şekil 4.8. BARE1LTR6149(R))+ISSR8082 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



Şekil 4.9. LTR6150(R) +ISSR8081 Primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)



Şekil 4.10. WLTR2105+ISSR8082 primerine karşı oluşan amplifikasyon

(1.Markır;2. 0 mM NaCl, 0 M β -östradiol;3. 200mM NaCl, 0 M β -östradiol;4. 300mM NaCl, 0 M β -östradiol;5. 400mM NaCl, 0 M β -östradiol;6. 0 mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol; 7. 200mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;8. 300mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;9. 400mM NaCl, 10^{-6} M β -östradiol;10. 0mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;11. 200mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;12. 300mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;13. 400mM NaCl, 10^{-8} M β -östradiol;14. 0 mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;15. 200mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;16. 300mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol;17. 400mM NaCl, 10^{-10} M β -östradiol)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Stres bir bitkinin büyüme, gelişme ve verimliliği üzerine negatif etkiye sahiptir. Çeşitli bölgelerde bitki türlerinin dağılımını kısıtlamakta ayrıca bitki populasyonu üzerine güçlü bir evrimsel baskı uygulamaktadır (Madlung and Comai 2004; Boyko and Kovalchuk 2008). Stresler biyotik ve abiyotik stres gibi dışsal; ya da spontan gen mutasyonları gibi içsel olabilmektedir. Biyotik stresler patojen saldırıları rekabet ve herbivorları içermektedir oysa abiyotik stres aşırı ya da yetersiz ışık, su, tuz ve sıcaklık gibi uygun olmayan çevresel koşullardan kökenlenmektedir (Madlung and Comai 2004). Olumsuz çevresel faktörler birçok yolla her zaman organizmaları etkilemektedir. Özellikle toprağın aşırı tuzluluğu doğal habitatta bitkilerin yayılmasını kısıtlayan en önemli faktördür. Tuzluluk dünyanın %40'ını temsil eden kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkiler için büyüyen en büyük sorundur (Fisher and Turner 1978; Shanon 1986). Abiyotik stres faktörleri bitkilerde moleküler, fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin karmaşık bir serisine yol açmaktadır (Wang *et al.* 2001). Bu yüzden herbisitlere, hastalıklara ve abiyotik stres gibi kompleks bir özelliğe karşı toleranslı bitki üretmek için, genetik modifikasyon uygulanmıştır (Wang *et al.* 2003).

Genel olarak, abiyotik strese karşı bitki yanıtı birbirine bağlı bir kaç seviyede kontrol edilebilmektedir. İlk olarak, stres birincil reseptörler tarafından algılanır; genellikle strese sokulmuş bitkilerin çoğunda ortak olan oksidatif sinyaller ve bağımlı kalsiyum sinyalleri ve solunun aktivasyonu ile takip edilmektedir. Bu sinyal yolları ya yaygın stresler arasında ya da belirli bir strese özgü olan; stres duyarlı genlerin (erken yanıt genleri)'in bir grubunun ifadesinin değiştirilmesiyle sonlanabilir. Bazı erken yanıt genleri; diğer stres duyarlı genlerini (geç yanıt genleri) kontrol eden transkripsiyon faktörlerini kodlar. Bu ikinci genler; protein dönüşümü ya da mekanik savunmanın dahil olduğu genler gibi farklı işlevlere sahip ayrı kategoriler halinde gruplandırılan genelde strese özgü genlerdir. Tüm bu multi seviyedeki tepkiler değişen ortama uyum sağlamasına veya bitkinin hayatta kalması için olanak sağlamaktadır (Kilian *et al.* 2012).

Genellikle NaCl'nin neden olduğu yüksek toprak tuzluluğu, oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimini yanı sıra iyonik toksisite etkileri ve hiperosmotik indüksiyon nedeniyle bitki büyümesini engellemektedir (Gong *et al.* 2001). Üretilmiş olan ROT, membran lipitleri, fotosentetik pigmentler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücre bileşenlerini bozabilmekte ve sonuçta hücre ölümüne neden olmaktadır (Ghorbanli *et al.* 2004). Çalışmamızdaki tuz stresi uygulamasında REMAP sonuçlarındaki polimorfizmin yüksek ve GTS'nin düşük olmasının sebebi DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilip bu hasara üretilmiş olan ROT'ların aktif hale gelerek sebep olduğu sonucuna varılmaktadır. Bazı araştırıcılarda uygun olmayan çevresel koşullar altında bitkilerde ROT'ların üretimini önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir (Mittler *et al.* 2004; Verma and Mishra 2005).

Fakat bitkiler tuz stresi karşısında osmotik stres toleransının uyarılmasını ve membran bütünlüğüne katılan proteinleri kontrol etmekte, su ya da iyon homeostasisini ve ROT'ları atma gibi yanıtlar oluşturmaktadır. Ayrıca çeşitli sinyal yolu ara ürünleri ve transkripsiyon faktörleri ( rneğin çinko-parmak kopyalama faktörü gibi), transkripsiyonel olarak osmotik ayarlı genlerin promoterleri ile etkileşim yoluyla efektörleri aktive ederek tuz stresinde bitkiye yardımcı olmaktadır (Gong *et al.* 2001).

Böylece tuz stresi gen ekspresyonu kalıplarında ve protein dağılım profillerinde değişikliklere sebep olmaktadır. Bunlara ek olarak bitkilerde strese yanıtta; siRNA'ları üreten bölgeler, heterokromatin, transpoze elementler (TEs), ve ps dogenler ağır bir şekilde metillenmektedirler (Zhang *et al.* 2006).

Transpozon elementleri gibi tekrar dizilerindeki metilasyon normal genom işleyişiyle araya giren bu dizileri önlemektedir (Chan *et al.* 2005). Genlerdeki metilsitozinlerin yoğunluğu; tekrar dizilerinden daha düşük olmasına rağmen *Arabidopsis*'in ifade edilen genlerinin üçte birinden fazlası onların transkribe edildiği bölgelerde özellikle CG bölgelerinde metilasyon içermektedir.İfade edilen genlerin yalnız %5'i kendi promotör bölgelerinde metilasyon içermektedir (Zhang *et al.* 2006). Metillenen genler promotör bölgelerinde dokuya özgü ifade gösterirken; transkribe edilen bölgelerdeki metilasyon

gen ifadesini orta derecede baskılamaktadır (Zhang *et al.* 2006; Zilberman *et al.* 2007). Bitki genomlarının önemli bir bölümünü oluşturan ve DNA metilasyonu ile inaktive durumda tutulan transpozon elemanları, DNA demetilasyon yoluyla çevresel faktörler tarafından aktive edilebilmektedirler (Chinnusamy and Zhu 2009).

Çeşitli smRNA'lar ve miRNA'lar dehidrasyon, tuz, ve soğuk stresi gibi abiyotik streslere yanıt olarak kendi seviyelerinde miktarlarını değiştirmektedirler (Sunkar and Zhu 2004; Zhou *et al.* 2008). Örneğin, miR319c seviyesi soğuk stresine yanıt olarak artar, ancak dehidrasyon ve tuz stresinde yanıtı yoktur (Sunkar and Zhu 2004). Doğal antisens transkriptleri (nat-siRNAs)'den elde edilen smRNAs miRNAs ve siRNAs'da abiyotik stres koşullarına yanıtta düzenleyicidir (Borsani *et al.* 2005).

Çevresel stres ile tetiklenen retrotranspozisyonun kısıtlanması için transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası epigenetik kontrolün hayati bir öneme sahip olduğu açıktır. Tütünde ve pirinçte protoplast ya da hücre kültüründen sonra kodlama dizilerinin içine retrotranspozonları yerleştirdiği belirtilmiştir (Grandbastien *et al.* 1989; Hirochika *et al.* 1996). Bu durum retrotranspozisyonun somaklonal varyasyona önemli bir katkı yapabileceğini göstermiştir. Tütün yaprağı dokusundan izole edilen protoplastlarda yüksek bir şekilde uyarılan *Tnt1A*'nın ifadesinin artması strese karşı bitki retrotranspozonunun aktivasyonunun ilk kanıtıdır (Pouteau *et al.* 1991).

Bazı stresler retrotranspozonları aktive edebilmektedir. Yaptığımız çalışmada uygulanan 4 (0,200, 300, 400 mM NaCl) farklı tuz konsantrasyonuna bağlı olarak retrotranspozon hareketinin arttığı ve buna bağlı olarakta GTS oranının azaldığı gözlenmiştir.

Çalışmamıza paralel olarak makarnalık buğdayda (*Triticum durum*) tuz ve ışık stresinin *Ttd1a* retrotranspozon hareketini arttırdığı ve tuz stresinin insersiyonel polimorfizmi arttırdığına dair çalışmalarda mevcuttur (Woodrow *et al.* 2010). Araştırmamızda da tuz stresine bağlı olarak meydana gelen retrotranspozon hareketinin sebebini; tuz stresi sonucunda oluşan bu sinyal moleküllerinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Nitekim Salazar *et al.* (2007) *TLC1.1* retrotranspozonunun stresle ilgili çeşitli sinyal molekülleri

(SA, ABA, MeJA, H₂O₂ ve sentetik oksin 2,4-D) tarafından aktive edildiğini bildirmişlerdir.

Yine, aktif retrotranspozonların karakterlerinden biri olarak promotörlerinde bulunan cis-düzenleyici elementlerin (5'LTR'nin U3 bölgesi) bitki savunmasında görevli olan sinyal yayılım yoluyla olan ilişkisi gösterilmiştir. Örneğin, *BARE-1* retrotranspozonunun 5'LTR bölgesinde ABA'ya duyarlı cis-düzenleyici elementlerden biri olan ABRE elementlerini içerdiği bilinmektedir (Salazar *et al.* 2007).

Ancak çalışmamızda, WLTR2105, Nikita ve Sukkula retrotranspozonlarının polimorfizminin az olduğu gözlenmiştir. Bu durum, strese bağlı olarak retrotranspozon hareketliliğini önlemek için genel olarak DNA hipermetilasyonu ile açıklanabilmektedir.

Daha önce yaptığımız çalışmalarda da tuz stresinin DNA hipermetilasyonuna sebep olduğu gözlenmiştir (yayına sunulmuştur).

Çoğu bitkide mevcut olan LTR (Uzun Uç Tekrarlı Retrotranspozonlar), transkripsiyonda görev alan LTR sekansındaki yüksek değişim oranı ile tarif edilmektedir. Biyotik ve abiyotik strese yanıtta bitkilerdeki LTR retrotranspozonlarının çoğu, daha büyük transkript havuzları oluşturmaktadır. Kısa süre önce, aktif LTR elementlerinin epigenetik aktivitedeki bitişik genlerin ifadesini değiştirdiği ve genomu yapıca ve niteliksel olarak farklı bir şekilde yapılandırarak mutasyonlara neden olduğu gözlenmiştir. IRAP ve REMAP sonuçlarındaki polimorfizmin LTR retrotranspozonlarının mutasyona sebep olduğunun bir göstergesidir. Bundan dolayı LTR retrotranspozonlarının aktivitesi bitkilerin çeşitlenmesinde ve evrimsel süreci için hayati öneme sahiptir.

Bitkinin strese karşı adaptasyonu için meydana gelen fizyolojik ve genetik değişikliklere ilaveten eksojen bazı uygulamalar bitkinin adaptasyonunu arttırmada yardımcı olabilir.

Son yıllarda bazı eksojen bitki hormonlarının ve bitki düzenleyicilerinin bitkide büyümeyi arttırdığı ve streslere karşı bitkiyi koruduğuna dair yayınlar mevcuttur. Bazı çalışmalar fitoöstrojenlerin çeşitli bozukluklara karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Adlercreutz 2002; Johnston 2003).

Memeli seks hormonları (MSH), bitki büyümesi düzenleyicileri olarak kabul edilmemiştir ancak, bitkilerde doğal olarak bulunmaktadır. Ayrıca, dıştan bitkiye uygulandığı zaman bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde önemli teşvik edici etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Erdal and Dumlupinar 2010; Erdal and Dumlupinar 2011).

Çalışmamızda da uygulanan bütün β -östradiol dozlarının doza bağlı olarak retrotranspozon aktivitesini ve DNA hasarını azalttığı GTS'yi ise arttırdığı tespit edilmiştir.

Martinez-Honduvilla *et al.* (1976), östron, β -östradiol ve testosteronun *Pinus Pinea* tohumlarında uygulamasının kontroller ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir büyüme hızı ve çimlenme derecesi ile sonuçlandığını bildirmiştir (Dogra and Thukral 1991; Dogra and Kaur 1994). Fakat hormonların bu etkilerinin konsantrasyona bağlı olduğunu ve en iyi uyarıcı etkilerinin 10^{-6}M - 10^{-8}M dozları arasında olduğu ifade etmişlerdir. Uygulanan bu dozların CAT ve POX enzimlerinin aktivitelerini artırdığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada artan maksimum enzim aktiviteleri, maksimum çimlenme yüzdeleri ve maksimum kök-gövde uzunluklarının aynı konsantrasyonlarda kaydedilmesi, bu hormonların ya doğrudan giberellinler gibi etki gösterip amilaz enzim aktivitesini uyarak, ya da dolaylı olarak giberellinlerin sentezlenmesini sağlayan fizyolojik cevaplar oluşturarak çimlenme hızında ve buna bağlı olarak kök-gövde uzamasında artışa neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Benzer şekilde, diğer araştırmacılar östron ile uyarılmış bezelye embriyosunun büyümesini artırdığını tespit etmişlerdir (Kögl and Heagen-Smit 1936; Bonner and Axtman 1937; Helmkamp and Bonner 1952). MSH ile ilgili bazı çalışmalarda stressiz

koşullar altında uygulanan MSH'nin protein ve nükleik asit içeriğini arttırdığı, oksidatif enzim aktivitesini uyardığı, H_2O_2 içeriğini ve lipid peroksidasyonunu (MDA) azalttığı, bitkilerin inorganik bileşenlerini etkilediği, büyüme ve gelişmeyi arttırdığı belirtilmiştir (Karl and Lauchli 2010; Erdal and Dumlupinar 2010; Erdal and Dumlupinar 2011b).

Bitkilerde epigenetik modifikasyonda MSH'nin rolü ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tezde bitkilerde stressiz ve tuz stres koşulları altında β -östradiol'ün retrotranspozon polimorfizmi üzerine etkisini gösteren ilk rapordur. Daha önce yayına sunulan bir raporda tuz stresinin sebep olduğu DNA hipermetilasyonuna karşı β -östradiol'ün koruyucu rolü olduğunu göstermiştir. Bir çok araştırmacı tuz stresi altında uygulanan β -östradiol'ün çözünebilir protein içeriğini arttırdığını rapor etmiştir. (Erdal 2011; Afzal *et al.* 2006; Karl and Lauchli 2010). Bununla retrotranspozon hareketinin ortadan kalkmasının tuzluluk stresinin de sebep olduğu ROT'ların β -östradiol'ün antioksidan seviyesini uyararak ortadan kaldırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca literatür bilgisinde β -östradiol'ün bitkilerde inorganik madde bileşimini etkilediği de bildirilmiştir. Dolayısıyla β -östradiol'ün H_2O_2 içeriğini ve lipid peroksidasyonunu (MDA) azaltarak ve bitkilerde inorganik madde bileşimini etkileyerek bunu yapmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

5.1. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma sonucunda normalde inaktif halde bulunan retrotranspozonların tuz stresi altında aktif hale gelmesiyle retrotranspozon polimorfizmi arttırdığı ancak uyguladığımız β -östradiol'ün oluşan retrotranspozon polimorfizmini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak β -östradiol'ün tuz stresi altında yetiştirilen bitkiler için adaptif bir öneme sahip olduğu ve tarımda kullanılması önerilebilir. Ayrıca REMAP tekniğinin hem DNA hasarı hemde retrotranspozon hareketini tespit ettiği için genetik toksikolojide kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adlercreutz, H., 2002. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol.* **3**(6): 364–373.
- Afzal, I., Basara, S.M.A., 2006. Faoq Mand Nawaz, A.: Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid.- *Int. J. Agric. Biol.* **8**: 23–28.
- Aghaleh, M., Niknam, V., 2009. Ebrahimzadeh, H., Razavi, K.: Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*. - *Biol. Plant.* **53**: 243-248.
- Ahmadı, A., Emam, Y., Pessaraklı, M., 2009. Response of Various Cultivars of Wheat and Maize to Salinity Stress. *Journal of Food, Agriculture Environment*, 7(1): 123-128.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R, Dvorak J., 2007. Mechanisms and rates of birth and death of dispersed duplicated genes during the evolution of a multigene family in diploid and tetraploid wheats. *Mol Biol Evol*, 24:539-550.
- Anonymous, 2015. <http://www.fao.org/docrep/019/i3618e/i3618e.pdf>
- Arurnuganathan, K. and Earle, E.D., 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol. Reporter* 9:221-231.
- Ashraf, M. ve Harris, P.J.C., 2004. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants, *Plant Science*, 166, 3-16.
- Ashraf, M., 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sci.* 13, 17-42.
- Atlı, A., 1999. *Buğday ve ürünleri kalitesi*. Orta Anadolu’da Hububat Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları Sempozyumu. Hububat Kalite ve Teknolojisi Bildirileri, 8-11 Haziran 1999, Konya, s: 498-506.
- Averina, N.G., 2010. Gritskevicha, E.R., Vershilovskayaa, IV., Usatovb, A.V. and Yaronskayaa EB, Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian J Plant Physiol* **57**:792–798
- Barrington, E.J.W., 1979. In: *Hormones and Evolution* (Barrington E.-J.-W., ed.). Academic Press, London, pp. 7 – 21.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356-363
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44: 276-87. Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356-363
- Bennett, M.D. and Smith, J.B., 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274: 227±274.
- Bennetzen, J.L., 2000. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol*, 42:251-269.
- Berr, A., McCallum, E.J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T., Shen, W.H., 2010. Arabidopsis histone methyltransferase set domain group mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol*, 154:1403-1414.

- Bilichak, A., Ilnystkyy, Y., Hollunder, J., and Kovalchuk, I., 2012. The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression. *PLoS ONE* 7, e30515.
- Blumwald, E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 431–434
- Bond, D.M. and Finnegan, E.J., 2007. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci.* 12, 211–216.
- Bonilla, I., El-Hamdaoui, A., Bolanos, L., 2004. Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress. *Plant Soil*, 267(1-2):97-107.
- Bonner, J. and G. Axtman., 1937. The growth of plant embryos *invitro*. Preliminary experiments on the role of accessory substances. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 23: 453-457.
- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A., 2003. ‘‘Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach’’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 101-115.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.K., 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123, 1279-1291.
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 2005. *Plant Adaptive Responses to Salinity Stress, Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing Ltd., 270p.
- Bourchis, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431:96-99.
- Bowen, N.J. and Jordan, K.I., 2002. Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity, *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 65-76.
- Boyko, A. and Kovalchuk, I., 2008. Epigenetic control of plant stress response. *Environ Mol Mutagen* 49, 61-72.
- Boyko, A., Kathiria, P., Zemp, F.J., Yao, Y.L., Pogribny, I., Kovalchuk, I., 2007. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (virusinduced plant genome instability). *Nucleic Acids Res.* 35, 1714–1725.
- Branco, C.J.S., Vieira, E.A., Malone, G., Kopp, M.M., Malone, E., Bernardes, A., Mistura, C.C., Carvalho, F.I.F., Oliveira, C.A., 2007. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J Appl Genet*, 48:107–113.
- Briggle, L.W. and Reitz, L.P., 1963. ‘‘Classification of Triticum species and of wheat varieties grown in the United States.’’ Technical Bulletin 1278. United States Department of Agriculture.
- Briggle, L.W., 1967. Morphology of the Wheat Plant. In *Wheat and Wheat Improvement*. Am. Soc. Of Agronomy Monograph.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A. and Pickett, J.A., 2007. Stressful ‘‘memories’’ of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173, 603-608.
- Bureau, T.E. and Wessler S.R., 1994. Mobile inverted-repeat elements of the Tourist family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:1411-1415.

- Bureau, T.E. and Wessler, S.R., 1992. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell*, 4:1283-1294.
- Cao, S., Xu, Q., Cao, Y., Qian, K., An, K., Zhu, Y., 2005. Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 123: 57–66.
- Carvalho, A., Guedes-Pinto, H., Lima-Brito, J.E., 2011. Genetic diversity in old Portuguese durum wheat cultivars assessed by retrotransposon-based markers. *Plant Mol Biol Rep*, 30:578–589.
- Chakrabarty, D., Yu, K.W., Paek, K.Y., 2003. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci*. 165, 61–68.
- Chan, S.W., Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E., 2005. Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat Rev Genet* 6, 351-360.
- Chen, Y., Cunningham, F., Rios, D., McLaren, W., Smith, J., Pritchard, B., Spudich, G.M., Brent, S., Kulesha, E., Marin-Garcia, P., Smedley, D., Birney, E. and Flicek, P., 2010. Ensembl variation resources. *BMC Genomics*, 11, 293.
- Chinnusamy, V., and Zhu, J.K., 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12, 133-139.
- Cho, D., Shin, D., Jeon, W.B., Kwak, J.M., 2009. ROS-mediated ABA signaling. *Journal of Plant Biology*. 52: 102-113.
- Chopra, S., Brendel V, Zhang J, Axtell JD, Peterson T., 1999. Molecular characterization of a mutable pigmentation phenotype and isolation of the first active transposable element from *Sorghum bicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:15330-15335.
- Cohen, E.S., Carpenter, R., Martin, C., 1986. Transposable elements generate novel spatial patterns of gene-expression in *Antirrhinum majus*. *Cell*, 47:285-296.
- Craig, N.L., Craigie, R, Gellert, M., Lambowitz, A.M., 2002. Mobile DNA II. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.
- Dajic, Z., 2006. Salt Stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, ISBN-13 978-1-4020-4224-9, Dordrecht, The Netherlands, 345p.
- Dogra, R and Thukral, A.K., 1995. Steroid pretreatment effects on some inorganic components of maize plants. *Geobios (Jodhpur)* 22:78–82.
- Dogra, R and Thukral, A.K., 1996. Effect of steroid on some inorganic constituents of wheat plants. *Current Res Plant Sci* 2:155–160.
- Dogra, R and Thukral, A.K., 1998. Effect of steroids on inorganic constituents of maize leaves. *Environment and Development*. Scientific Publishers, Jodhpur, pp 269–273.
- Dogra, R. and Kaur, A., 1994. Effect of steroids on some growth and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. during germination. *Crop Res* 8:611–620
- Dogra, R. and Thukral, A., 1991. Effect of steroid and plant hormones on some germination aspects of *Triticum aestivum* L. In: *New Trends in Plant Physiology* (Dhir K. K., Dua I. S., and Chark K. S.). Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, pp. 65-70.
- Dohrn, M., Faure, W., Poll, H., Blotvogel, W., 1926. Tokokinine, Stoff mit sexualhormonartiger Wirkung aus Pflanzenzellen. *Med Klin* 22: 1417-1419.

- Dong, F.G., Miller, J.T., Jackson, S.A., Wang, G.L., Ronald, P.C., Jiang, J.M., 1998. Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:8135-8140.
- Dudal, R., 1976. Inventory of Major Soils of the World with Special Reference to Mineral Stress, Cornell Univ Agric Exp Stn Ithaca, 3 pp 89-96.
- Echevarria-Zomeno, S., Yanguéz, E., Fernandez-Bautista, N., Castro Sanz, A.B., Ferrando, A., Castellano, M.M., 2013. Regulation of Translation Initiation under Biotic and Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 14:4670–4683.
- Erdal, S. and Dumlupinar, R., 2010. Progesterone and β -estradiol stimulate the seed germination in chickpea by causing important changes in biochemical parameters. *Z Naturforsch C* 65:239–244.
- Erdal, S. and Dumlupinar, R., 2011. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. *Acta Physiol Plant* 33:1011–1017.
- Erdal, S., 2011. Alleviation of salt stress in wheat seedlings by mammalian sex hormones.- DOI: 10.1002/jsfa.4716.
- Erdal, S., Dumlupinar, R., Cakmak, T. and Genisel, M., 2010. Mammalian sex hormones influence germination velocity and enzyme activities in germinating maize seeds. *Fres Environ Bull* 19:1458–1465.
- Erdal, S., Dumlupinar, R., 2011. Exogenously treated mammalian sex hormones affects inorganic constituents of plants. *Biol. Trace Elem. Res.* 143: 500-506.
- Erdal, S., Dumlupinar, R., Cakmak, T., *et al* 2010. Determination of some inorganic element concentration changes in germinating chickpea seeds exposed to progesterone and β -estradiol by using WDXRF spectroscopic technique. *Fres Environ Bull* 19:507–515.
- Erdal, S., Dumlupinar, R.: Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants.- *Acta Physiol. Plant.* 33: 1011–1017, 2011.
- Feng, S., Jacobsen, S.E., Reik, W., 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330:622-627.
- Feschotte, C., 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet*, 9:397-405.
- Feschotte, C., Jiang, N., Wessler, S.R., 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Genet*, 3:329–341.
- Fisher, R.A., Turner, N.C., 1978. Plant productivity, in arid and semi arid zones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 897–912.
- Flavell, A.J., Knox, M.R., Pearce, S.R., Ellis, T.H.N., 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* 16: 643-650.
- Flowers, T.J. and Yeo, A.R., 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 875–884
- Foolad, M.R., Zhang L, Subbiah, P., 2003. Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome* 46:536–545.
- Gailite, A., Rungis, D., 2012. An initial investigation of the taxonomic status of *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. utilising DNA markers and sequencing. *Plant Syst Evol*, 298:913–919.
- Geuns, J.M.C., 1978. Steroid hormones and growth and development. *Phytochemistry* 17:1–14.

- Ghorbanli, M., Ebrahimzadeh, H., Sharifi, M., 2004. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. *Biologia Plantarum* 48, 575-581.
- Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda, S., Matsumoto, T.K., Zhu, J., Cushman, J.C., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M., 2001. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiology* 126, 363-375.
- Gonzalez, L.M. ve Ramirez, R., 1999. Respiration, water relations and pigment concentrations in rice seedlings grown under saline conditions. *Cultivos Tropicales* 20,35-37.
- Grandbastien, M., 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci*, 3:181-187.
- Grandbastien, M.A., Audeon, C.E., Bonnivard, J.M., Casacuberta, B., Chalhoub, A.P.P., Costa, Q.H., Lea, D., Melayah, M., Petit, C., Poncet, S.M., Tam, M.A., Van Sluys, C. and Mhiria, 2005. Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. *Cytogenet Genome Res.* 110: 229- 241.
- Grandbastien, M.A., Spielmann, A., Caboche, M., 1989. Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature*, 337:376-380.
- Grasser, K.D., Launholt, D. and Grasser, M., 2007. High mobility group proteins of the plant HMGB family: dynamic chromatin modulators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 346-357.
- Grewal, H.S., 2010. Response of wheat to subsoil salinity and temporary water stress at different stages of the reproductive phase. *Plant soil*. 330: 103-113.
- Grzebelus, D., 2006. Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14 (1), 21-29
- Gupta, S.D., 2007. 'Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchardgrass during NaCl stress', *Biologia Plantarum*, 51 (4): 759-763.
- Harberd, N.P., Flavell, R.B, Thompson, R.D., 1987. Identification of a transposon-like insertion in a *Glu-1* allele of wheat. *Molecular & General Genetics*, 209:326-332.
- Helmkamp, G. and Bonner, J., 1952. Some relationships of sterols to plant growth. *Plant Physiol.*, 28:428-436.
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H. and Kanda M., 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 7783-7788
- Hirochika, H., 1995. Activation of plant retrotransposons by stress, in Oono K, Takaiwa F (eds): *Modification of Gene Expression and Non-Mendelian Inheritance*, pp 15-21, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba.
- Holmberg N, Bülow L., 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci*, 3(2): 61-6.
- Hong, C-Y., Chao, Y-Y., Yang, M-Y., Cho, S-C. ve Kao, C.H., 2009. Na⁺ But Not Cl⁻ or Osmotic Stress is Involved in NaCl Induced Expression of Glutathione Reductase in Roots of Rice Seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 166, 1598-1606.
- Hoseney, R.C., 1994. *Principles of Cereal Science and Technology* (2nd ed.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN; Bushuk, W., 1998. Wheat breeding for end-product use. *Euphytica*, 100, 137-145.

- Huang, J., Zhang, K., Shen, Y., Huang, Z., LI, M., Tang, D., GU, M., Cheng, Z., 2009, Identification of a high frequency transposon induced by tissue culture, *nDaiz*, a member of the *hAT* family in rice, *Genomics*, 93 (3), 274-281.
- Iino M, Nomura N, Tamaki Y, Yamada Y, Yoneyama K, Takeuchi Y, Mori M, Asami T, Nakano T, Yokota T., 2007. Progesterone: its occurrence in plants and involvement in plant growth. *Phytochemistry* **68**: 1664-1673. MEDLINE
- Iqbal, M. ve Ashraf, M., 2005. Changes in growth, photosynthetic capacity and ionic relations in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) due to pre-sowing seed treatment with polyamines. *Plant Growth Regul.* 46, 19–30.
- Janeczko, A., Budziszewska, B., Skoczowski, A., Dybała, M., 2008. Specific binding sites for progesterone and 17 β -estradiol in cells of *Triticum aestivum* L., *Acta Biochim. Pol.* 55:701–711.
- Janeczko, A., Skoczowski, A., 2005. Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochem Cytobiol* 43:71–79.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., Peterhaensel, C., 2011. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep*, 12:50-55.
- Jerzmanowski, A., 2007. SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 330-345.
- Johnston, I., 2003. *Phytochem Functional Foods*. C.R.C. Press Inc. pp: 66–68.
- Jurka, J., 2008. Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 201-204.
- Kajikawa, M., Okada, N., 2002. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 30 sequence. *Cell* 111, 433–444.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., Schulman, A.H., 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation, *Theor. Appl. Genet.* 121:1419–1430.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi A, Schulman A., 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet*, 98:704–711.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E, Schulman, A.H., 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6603-6607.
- Karl, H., L auchli, M.A., 2000. Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance.- *Biol. Plant.* **43**: 245–251.
- Kaya C, Tuna AL, Yokas I (2009) The role of plant hormones in plants under salinity stress. *Book salinity and water stress* 44: 45-50.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., Van Luenen, H.G. and Plasterk, R.H., 1999. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, 99, 133-141
- Khraiweh, B., Zhu, J.K., Zhu, J., 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 1819:137-148.

- Kilian, J., Peschke, F., Berendzen, K.W., Harter, K., and Wanke, D. (2012). Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. *Biochim Biophys Acta* 1819, 166-175.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K.C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T.J., Irizarry, R.A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., R. Weissleder, S. H. O., Weissman, I.L., Feinberg, A. P. and Daley, G.Q., 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467, 285-290.
- Kishii, M., Nagaki, K., Tsujimoto, H., 2001. A tandem repetitive sequence located in the centromeric region of common wheat (*Triticum aestivum*) chromosomes. *Chromosome Res*, 9:417-428.
- Kliwer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T. and Lehmann, M., 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**, 73 – 82.
- Kocacalışkan, I. and K. Kabar, 1990. Effects of salinity on polyphenol oxidase during seed germination. *Doğa Botanik Der.* 15, 41-49.
- Kopcewicz, J. 1969. Influence of estrone on growth and endogenous gibberellin content in dwarf pea. *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II. Ser. Sci. Biol.*, 17:727-31.
- Kovarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M., Opatrny, Z., 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theor. Appl. Genet.* 95, 301–306.
- Kögl, F. and A.J. Haagen-Smit., 1936. Biotin und Aneurin als Phytohormone. *Z. Physiol. Chem.* 243: 209-227.
- Kumar, A., Bennetzen, J.L., 1999. Plant retrotransposons. *Ann Rev Genet*, 33:479–532.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y., 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. - *Planta* **228**: 367-381.
- Lerat, E., 2009. Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: How to find your way through the dense forest of programs, *Heredity*, 104, 520-523.
- Lewitt, J., 1980. Responses of Plants to environmental stresses. Vol. 1, Acad. Press, 496.
- Lichtenthaler, H. K., 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiology*, 148, 4–14.
- Lippman, Z., Martienssen, R., 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 431:364-370.
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T., 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. - *Plant Biotechnol.* 24: 117-126.
- Lönnig, W.E., Saedler, H., 2003. Chromosome rearrangements and transposable elements. *Annu Rev Genet*, 36:389-410.
- Maer, P. et al. 2002. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett.* 531, 157–161.

- Madlung, A. and Comai, L., 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann Bot* 94, 481-495.
- Mahajan, S., and Tuteja, N., 2005. 'Cold, salinity and drought stress: an overview', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158
- Mak J. and Kleiman L., 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol*, 71:8087–8095.
- Mansour, A., 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposons, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6 (2), 99-107.
- Mansour, M.M.F., and Salama, K.H.A., 2004. 'Cellular basis of salinity tolerance in plants', *Environmental and Experimental Botany*, 52: 113- 122.
- Mao, L., Wood, T.C., Yu, Y., Budiman, M.A., Tomkins, J., Woo, S., Sasinowski, M., Presting, G., Frisch, D., Goff, S., Dean, R.A., Wing, R.A., 2000. Rice transposable elements: a survey of 73,000 sequenced tagged- connectors. *Genome Res.* 10, 982–990.
- Martinez-Honduvilla, C.J., Gimenez-Solves, A. and Santos-Ruiz, A. 1976. Biochemical changes in *Pinus pinea* seeds. III. The effect of growth substances and steroidal hormones on nucleic acids. *Rev. Esp. Fisiol.*, 32: 169-174.
- McClintock B., 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 36:344-355.
- McClintock B., 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226:792-801.
- Miklos, G.L.G. and Rubin, G.M., 1996. The role of the genome project in determining gene function: Insights from model organisms. *Cell* 86: 521-529
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Miura, A., 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 411:212-214.
- Mobin, M., Khan, N.A., 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and anti-oxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol*, 164: 601-10.
- Moore, B.C.J., Shailer, M.J., Hall, J.W., & Schooneveldt, G.P., 1993. Comodulation masking release in subject with unilateral and bilateral cochlear hearing impairment. *Journal of the Acoustical Society of America*, 93, 435-451.
- Munns, R., 2002. Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Naito, K., Zhang, F., Tsukiyama, T., Saito, H., Hancock, C.N., Richardson, A.O., Okumoto, Y., Tanisaka, T., Wessler, S.R., 2009. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature*, 461:1130-1134.
- Okamoto, H., Hirochika, H., 2001. Silencing of transposable elements in Plants, *Trends in Plant Science*, 6 (11), 527-534
- Palma, K., Thorgrimsen, S., Malinovskiy, F.G., Fiil, B.K., Nielsen, H.B., Brodersen, P., Hofius, D., Petersen, M., Mundy, J., 2010 Autoimmunity in *Arabidopsis* and 11

- is mediated by epigenetic regulation of an immune receptor. *PLoS Pathog*, 6:e1001137.
- Parida, A.K., and Das, A.B., 2005. 'Salt tolerance and salinity effects on plants: a review', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324- 349.
- Paszkowski, J., Whitham, S.A., 2001. Gene silencing and DNA methylation processes.- *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 123-129.
- Pessarakli, M. ve Szabolcs, I., 1999. Soil Salinity and Sodidity as Particular Plant/Crop Stress Factors, *Handbook of Plant Crop Stress*, ISBN 0-8247-1948-4, New York, 1198 p.
- Pitman, M.G. ve Läuchli, A., 2002. Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems, *Salinity: Environment-Plants-Molecules*, Published by Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0492-3, Dordrecht, The Netherlands, 522p
- Pocza, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J.P.T. and Hyvönen, J., 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review *Plant Methods*, 9 (6), 1-31.
- Polidoros, N.A., Scandalios, J.G., 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant*, 106: 112-20.
- Pouteau, S., Huttner, E., Grandbastien, M.A. and Caboche, M., 1991. Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. *EMBO J.* 10: 1911-1918.
- Prtis, E., Acquadro, A., Comino, C., Lanteri, S., 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci.* 166, 169–178.
- Qi Y, He X, Wang X-J, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ., 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443:1008-1012.
- Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guedon, G., Mullany, P., Pembroke, T., ROOD, J.I., Smith, J., Summers, A.O., Tsuda, M., Berg, D.E., 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements, *Plasmid*, 60 (3), 167-173.
- Sabot F, Simon, D., Bernard, M., 2004. Plant transposable elements, with an emphasis on grass species. *Euphytica*, 139:227-247.
- Sairam, R.K. and Tyagi, A., 2004. 'Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants', *Current Science*, 86 (10): 407-421.
- Salazar, M., González, E., Casaretto, JA., Casacuberta, J.M. and Ruiz-Lara, S., 2007. The promoter of the TLC1.1 retrotransposon from *Solanum chilense* is activated by multiple stress-related signaling molecules. *Plant Cell Rep.* 26(10): 1861-1868.
- Sandor, T. and Mehdi, A.Z., 1979. In: *Hormones and Evolution* (Barrington E. J. W., ed.). Academic Press, London, pp. 1–72.
- SanMiguel, P., Gaut, B.S., Tikhonov, A., Nakajima, Y., Bennetzen, J.L., 1998. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet*, 20:43-45.
- SanMiguel, P., Ramakrishna, W., Bennetzen, J., Busso, C., Dubcovsky, J., 2002. Transposable elements, genes and recombination in a 215-kb contig from wheat chromosome 5A m. *Funct Integr Genomics*, 2:70-80.

- Schulman, A.H., Kalendar, R., 2005. A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics, *Cytogenetic and Genome Research*, 110, 598-605.
- Schwach, F., Moxon, S., Moulton, V., Dalmay, T., 2009. Deciphering the diversity of small RNAs in plants: the long and short of it. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 8:472-481.
- Seemann, J.R. and Critchley, C., 1985. Effects of salt stress on the growth, ion concent, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164, 151-162.
- Seibt, K.M., Wenke, T., Wollrab, C., Junghans, H., Muders, K., Dehmer, K.J., Diekmann, K., Schmidt, T., 2012. Development and application of SINE-based markers for genotyping of potato varieties. *Theor Appl Genet*, 125:185–196.
- Shannon, M.C., 1978. The testing of salt tolerance variability among tall wheatgrass lines. *Agron. J.* 70, 719-722.
- Shannon, M.C., 1979. In quest rapid screening techniques for plant salt tolerance. *Hortsci.* 14, 587-589.
- Shannon, M.C., 1984. Breeding selection and the genetics of salt tolerance. *Salinity Tolerance in Plant Strategies for Crop Improvement*. A Viley- Interscience Pub. 231-254.
- Shannon, M.C., 1986. New insights in plant breeding efforts for improved salt tolerance. *Hort. Technol.* 6, 96–99.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene Networks involved in drought stress response and tolerance. - *J. exp. Bot.* 58: 221-227.
- Simersky, R., Novák, O., Morris, D.A. *et al.* 2009. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC–MS/MS. *J Plant Growth Regul* 28:125–136.
- Slotkin, R.K., Martienssen R., 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Rev Genet*, 8:272-285.
- Smit, A.F.A. and Riggs, A.D., 1996. Tiggers and Other DNA Transposon Fossils in the Human Genome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1443-1448.
- Smith, D.B. and Flavell, R.B., 1974.. The relatedness and evolution of repeated nucleotide sequences in the genomes of some Gramineae species. *Biochem Genet.* 12: 243-256.
- Smýkal, P., Bačová-Kerteszová, N., Kalendar, R., Corander, J., Schulman, H., Pavelek., M., 2011. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theor Applied Genet*, 122:1385–1397.
- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A., Prymakowska-Bosak, M., 2007. Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta*, 227:245-254. 29.
- Song, Y., Ji, D., Li, S., Wang, P., Li, Q., and Xiang, F., 2012. The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLoS ONE* 7, e41274.
- Steimer A., 2000. Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12:1165-1178.

- Sunkar, R. and Zhu, J.K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2001-2019.
- Syed, N.H., Flavell, A.J., 2006. Sequence-specific amplification polymorphisms (SSAPs): a multi-locus approach for analyzing transposon insertions. *Nat Protoc*, 1:2746–2752.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. and Mello, C.C., 1999. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99,123-132.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2008. Bitki Fizyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara (Çeviri Editörü: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN).
- Talbert, L.E., Smith, L.Y., Blake, N.K., 1998. More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA. *Genome* 41: 402–407.
- Tan, M.P., 2010. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism.- *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 21-26.
- Taslak, İ., Çağlar, Ö., Bulut, S., Akten, Ş., 2007. Bazı Arpa Genotiplerinin Tuzluluğa Toleranslarının Belirlenmesi I. Çimlendirme Denemesi. VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran, 188-192, Erzurum.
- Tester, M. and Davenport, R., 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503–527
- Tompa, R., McCallum, C.M., Delrow, J., Henikoff, J.G., van Steensel, B., Henikoff, S., 2002. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol*, 12:65-68.
- Tran, R.K., Henikoff, J.G., Zilberman, D., Ditt, R.F., Jacobsen, S.E., Henikoff, S., 2005. DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in *Arabidopsis* genes. *Current Biology* 15, 154–159.
- Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A., Kakutani, T., 2009. Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. *Nature*.
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants, *Methods in Enzymology*, 428, 419-438.
- Verbsky, M.L. and Richards, E.J., 2001. Chromatin remodeling in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 494-500.
- Verma, S. and S.M., Mishra., 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *J. Plant Physiol.* 162: 669-677.
- Vitte, C., Ishii, T., Lamy, F., Brar, D., Panaud, O., 2004. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L). *Mol. Genet. Genomics* 272:504-511
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S., Martienssen, R.A., 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297:1833-1837.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., van de Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23:4407–4414.

- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A., 2003. ‘‘Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance’’, *Planta*, 218: 1-14.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2001). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta horticulturae* 560., 285-292.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A. J., Pearce, S. R., Kumar, A., Thomas, B. B., Powell, W., 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 253, 687–694.
- Weil, C., Martienssen, R.A., 2008. Epigenetic interactions between transposons and genes: lessons from plants. *Curr Opin Genet Dev*, 18:188-192.
- Weimberg, R., 1975. Effect of growth in highly salinized media on the enzymes of the photosynthetic apparatus in pea seedlings. *Plant Physiol.* 56, 8-12.
- Wendel, J.F., Wessler, S.R., 2000. Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6250-6252.
- Wenke, T., Döbel, T., Sörensen, T.R., Junghans, H., Weisshaar, B., Schmidt, T., 2011. Targeted identification of short interspersed nuclear element families shows their widespread existence and extreme heterogeneity in plant genomes. *Plant Cell*, 23:3117–3128.
- Wessler, S.R., 2009. *The Implicit Genome*[online], Eukaryotic transposable elements: teaching old genomes new tricks http://www.plantbio.uga.edu/wesslerlab/The_Implicit_Genome.pdf.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaund, O., Paux, E., Sanmiguel, P. and Schulman, A.H., 2007. A unified classified classification system for eukaryotic transposable elements, *Nature Reviews Genetics*, 8, 973-982.
- Woodrow, P., Pontecorvo, G., Fantaccione, S., Fuggi, A., Kafantaris, I. and Carillo, P., 2010. Polymorphism of a new Ty1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. *Theor Appl Genet*, 121 (2), 311-322.
- Wu-Scharf, D., Jeong, B.R., Zhang, C., Cerutti, H., 2000. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-Box RNA helicase. *Science*, 290:1159-1162.
- Xiong, L.M. , Schumaker and J.K. Zhu, K.S., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress.- *Plant Cell*. 14: 165–183,
- Xiong, Y., Eickbush, T.H., 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9, 3353–3362.
- Xu, M., Li, X., Korban, S.S., 2000. AFLP based detection of DNA methylation. *Plant Mol. Biol. Report.* 18, 361–368.
- Xue-Lin, L., Zhong-Xu, L., Yi-Chun, N., Xiao-Ping, G., Xian-Long, Z., 2009. MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. *Acta Agron. Sin.* 35, 588–596.
- Yakıt, S., and Tuna, A.L., 2006. ‘‘Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) stres parametreleri üzerine Ca, Mg ve K’un etkileri’’, *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (1): 59-67.
- Yang, X.H., Xu Z.H., Xue, H.W., 2005. Arabidopsis membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. *Plant Cell* 17: 116-131.

- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkçi, S., Arıkan Terzi, E.S., and Urusak, B., 2010. 'Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri', Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 1 (1): 1-33.
- Zeller, G., Henz, H.R., Widmer, C.K., Sachsenberg, T., Ratsch, G., Weigell, D. And Laubinger, S., 2009. Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. The Plant Journal, 58 (6), 1068-1082.
- Zhang ZG, Saier MH: A Novel Mechanism of Transposon-Mediated Gene Activation. *Plos Genetics* 2009, 5:e1000689.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Ecker, J.R. 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. Cell 126, 1189-1201.
- Zhao, F.G., Sun, C. ve Liu, Y.L. 2000. Effects of salinity stress on the levels of covalently and non covalently bound polyamines in plasma membrane and tonoplast isolated from leaves and roots of barley seedlings. *Acta Bot. Sin.* 42, 920– 926.
- Zhao, Y., Yu, S., Ye, W., Wang, H., Wang, J., Fang, B., 2010. Study on DNA cytosine methylation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome and its implication for salt tolerance.- Agriculture Science in China. **9**: 783-791.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., and Henikoff, S., (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. Nat Genet 39, 61-69.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kars'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars'ta tamamladı. 2008 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.