

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**TUZ STRESİ UYGULANAN BETA VULGARIS VE
BETA MARITIMA BİTKİLERİNDE KROMATİN
YENİDEN DÜZENLENME MODELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Seher YOLCU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 31.07.2015

Bornova-İZMİR

2015

SEHER YOLCU tarafından DOKTORA tezi olarak sunulan “TUZ STRESİ UYGULANAN BETA VULGARIS VE BETA MARITIMA BİTKİLERİNDE KROMATİN YENİDEN DÜZENLENME MODELLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 31.07.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR	
Raportör Üye	: Doç. Dr. Melike BOR	
Üye	: Doç. Dr. H. Çağlar KARAKAYA	
Üye	: Doç. Dr. Okan ACAR	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Burcu SEÇKİN DİNLER	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “TUZ STRESİ UYGULANAN BETA VULGARIS VE BETA MARITIMA BİTKİLERİNDE KROMATİN YENİDEN DÜZENLENME MODELLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

31/07/ 2015

İmzası



Adı-Soyadı

Seher YOLCU

ÖZET**TUZ STRESİ UYGULANAN BETA VULGARIS VE BETA
MARITIMA BİTKİLERİNDE KROMATİN YENİDEN
DÜZENLENME MODELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YOLCU, Seher

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Temmuz 2015, 94 sayfa

Bitkilerde histon asetilasyonu çevresel streslere karşı gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Model bitkiler dışındaki farklı bitki türlerinde stres uygulamalarının hedef genlerdeki histon modifikasyonu seviyelerini ne şekilde etkilediği hala bilinmemektedir. Tez çalışmamızda 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulanan *Beta vulgaris* (şeker pancarı) ve tuza toleranslı akrabası *Beta maritima* (yabani pancar) bitkilerinde büyüme parametreleri, bağıl su içeriği (RWC), yaprak ozmotik potansiyeli, fotosentez, lipid peroksidasyonu, peroksidaz (POX) enzim aktivitesi, *POX* transkripsiyon düzeyleri, *POX* geninde H3K9 ve H3K27 asetilasyon seviyeleri incelendi.

Çalışmamızda tuz uygulanan *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) antioksidan enzimlerini kodlayan genlerin düzenlenmesinin histon modifikasyonları ile ilişkisinin incelenmesi hedeflendi. Tuz stresi koşullarında POX enzimini kodlayan gende H3K9 ve H3K27 asetilasyon seviyeleri ChIP (kromatin immünopresipitasyon) ve kantitatif real time-PCR yöntemleri ile analiz edildi. H3K9 ve H3K27 asetilasyonlarının *POX* gen ifadesi ile ilişkili olduğu saptandı. Tuz uygulamalarının *B. maritima*'da H3K9 ve *B. vulgaris*'de ise H3K27 asetilasyon düzeylerini arttırdığı tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Histon asetilasyonu, tuz stresi, şeker pancarı, yabani pancar, peroksidaz

ABSTRACT**INVESTIGATION OF CHROMATIN REMODELING IN BETA
VULGARIS AND BETA MARITIMA UNDER SALT STRESS
CONDITIONS**

YOLCU, Seher

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Filiz OZDEMIR

July 2015, 94 pages

Histone acetylation have functions in responses of plants to environmental stress. It is still unknown the levels of histone modifications on target genes in different plant species other than model plants under various environmental stress factors. In this work, we investigated the effects of 0, 250 and 500 mM NaCl concentrations on growth parameters, leaf osmotic potential, chlorophyll fluorescence, relative water content (RWC), lipid peroxidation, peroxidase (POX) enzyme activity, *POX* relative transcript abundance, H3K9 and H3K27 acetylation levels of *POX* gene in *Beta vulgaris* (sugar beet) and salt tolerant *Beta maritima* (wild beet).

We aim to indicate the relationship between histone modifications and expression of five genes that encode antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) in NaCl treated two beet species, *B. vulgaris* and *B. maritima*. In this study, we analyzed the levels of H3K9ac, and H3K27ac on the beet *POX* gene under salinity by ChIP procedure combined quantitative real-time PCR. H3K9 and H3K27 acetylations were found to be correlated with expression of *POX* gene. We found that the levels of H3K9 acetylation in *B. maritima* and H3K27 acetylation in *B. vulgaris* were increased after NaCl treatment.

Keywords: Histone acetylation, salt stress, sugar beet, wild beet, peroxidase.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamı ‘Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt içi Doktora Burs Programı’ (2211-C) ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkür ederim.

Çalışmam süresince değerli fikirleriyle bilimsel gelişimime katkıda bulunan ve laboratuvar çalışmalarımda birikimiyle her zaman destek veren değerli hocam Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e, laboratuvar çalışmalarımda tecrübelerinden faydalandığım, analizlerim süresince yanımda olan ve her konuda destek aldığım hocam Doç. Dr. Melike BOR'a yürekten teşekkür ederim. Değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a ve Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN'e çok teşekkür ederim. Tez savunma sınavı komitesinde yer alan Doç. Dr. Çağlar H. KARAKAYA, Doç. Dr. Okan ACAR ve Yrd. Doç. Dr. Burcu SEÇKİN DİNLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel çalışmalarımda beni sabırla ve sevgiyle destekleyen ve sonsuz manevi desteğiyle bana güç katan sevgili annem Fatmagül YOLCU'ya, sevgili babam Mahsut YOLCU'ya ve sevgili kardeşim Sezgin YOLCU'ya yürekten teşekkür ederim.

Güler yüzleri ve samimi arkadaşlıklarıyla beni hiç yalnız bırakmayan Aybüke H. GÜLER, Rengin ÖZGÜR UZİLDAY, Barış UZİLDAY, Ebru TEKİN ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tuz Stresi.....	2
1.2. Epigenetiğin Tarihçesi.....	13
1.3. Histon Modifikasyonları ve Kromatin Modelleme.....	13
1.3.1. Histon asetilasyonu.....	18
1.3.2. Histon metilasyonu.....	23
1.3.3. Histon fosforilasyonu.....	27
1.3.4. Histon ubikutinasyonu.....	29
1.3.5. ATP-bağımlı kromatin modelleme kompleksleri.....	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.4. Şeker Pancarı (*Beta vulgaris L.*) ve Yabani Pancar (*Beta maritima L.*)

Hakkında Bilgi.....32

1.5. ChIP (Kromatin İmmünopresipitasyonu) Yöntemi.....35

2. MATERYAL VE METOD.....37

2.1. Bitki Yetiştirme ve Tuz Stresinin Uygulanması.....37

2.2. Kök, Gövde Uzunlukları ve Bağlı Büyüme Hızı (RGR).....38

2.3. Klorofil Flüoresansı (Fv/Fm) Ölçümleri.....39

2.4. Yaprak Ozmotik Potansiyeli.....39

2.5. Bağlı Su İçeriği (RWC).....39

2.6. Lipid Peroksidasyonu.....39

2.7. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması.....40

2.8. Total Protein Tayini.....40

2.9. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi.....40

2.10. ChIP Analizi.....41

2.11. Kantitatif PCR Analizleri.....44

2.12. İstatistiksel Analizler.....45

3. SONUÇLAR.....46

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1. Kök, Gövde Uzunlukları ve Bağlı Büyüme Hızı (RGR) Değerleri.....	46
3.2. Bağlı Su İçeriği (RWC) Sonuçları.....	48
3.3. Ozmotik Potansiyel Sonuçları.....	49
3.4. Klorofil Flüoresansı (Fv/Fm) Sonuçları.....	50
3.5. Lipid Peroksidasyonu.....	51
3.6. Peroksidaz Enzim Aktivitesi.....	52
3.7. Peroksidaz Gen İfadesi.....	53
3.8. Peroksidaz Geninde H3K9 ve H3K27 Asetilasyon Seviyeleri.....	54
4. TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Süperoksit, hidrojen peroksit radikallerinin oluşumu ve süpürülmesi (Sairam and Tyagi'den 2004). APX: askorbat peroksidaz, DHA: dehidroaskorbat, ASC: askorbat, DHAR: dehidroaskorbat redüktaz, MDHAR: monodehidro askorbat redüktaz, Fd: Ferrodoksin, GR: glutatyon redüktaz, GSH: indirgenmiş glutatyon, GSSG: okside glutatyon, HO: hidroksil, NE: non enzymatic reaction (enzimatik olmayan reaksiyon).....	10
1.2. A) Nukleozom partikülünün yüksek-çözünürlüklü yapısı. DNA çift sarmalı mavi, H3 histon dimeri kırmızı, H4 histonu yeşil, H2A deniz mavisi ve H2B ise mor renklerle gösterildi (Marmorstein'den 2001).....	15
1.2. B) Kromatini meydana getiren nukleozom partikülleri sarı silindirler halinde resmedildi. Siyah zincirler DNA'yı, kırmızı eğri çizgiler amino ucu histon kuyruklarını (N-terminal tails) gösterir (Marmorstein'den 2001).....	15
1.3. H3 ve H4 histon kuyruklarında translasyon sonrası modifikasyonlar. Asetilasyon mor, metilasyon kırmızı, fosforilasyon yeşil ve ubikutinasyon turuncu renkler ile gösterilmiştir (Zhang and Reinberg'den 2001).....	17

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 1.4. Pancar bitkisine özgü ChIP metodu aşamalarının özet gösterimi. Pancar yaprakları steril su ile iki kere yıkandıktan sonra kromatin, %1 formaldehit çözeltisinde çapraz bağlanır. Kromatin izolasyonu ve sonikasyon aşamalarından sonra kromatin karışımına agaroz toplar ve antikör eklenir. İmmün komplekslerin agaroz toplardan ayrıştırılması için yıkama tamponları kullanılır. Kromatin çapraz bağları bozularak DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilir. Antioksidan genlere özgü primerlerle gerçekleştirilen real time-PCR işlemi ile histon modifikasyonlarının seviyesi yorumlanır.....36
- 2.1. A) 250 ve 500 mM NaCl stresinin 7., 14. ve 21. hasat günlerine ait *B. vulgaris* bitki fotoğrafları.....37
- 2.1. B) 250 ve 500 mM NaCl stresinin 7., 14. ve 21. hasat günlerine ait *B.maritima* bitki fotoğrafları.....38
- 2.2. %1,5 agaroz jelde sonikasyon etkinliğinin belirlenmesi. Sonikasyon işleminden önce ve sonra ayrılan kromatin örnekleri agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülendi. 0,2 M NaCl eklenen şeker pancarı kromatin örnekleri bir gece 65 °C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra agaroz jelde yürütüldü. 1-4 numaralı örnekler sonikasyondan önce ayrılan kromatin örnekleri; 6-9 numaralı örnekler sonikasyondan sonra ayrılan kromatin örnekleridir. **1:** *B. maritima* kontrol, **2:** *B. maritima* 500 mM NaCl, **3:** *B.vulgaris* kontrol, **4:** *B.vulgaris* 500 mM NaCl, **6:** *B. maritima* kontrol, **7:** *B. maritima* 500 mM NaCl, **8:** *B.vulgaris* kontrol, **9:** *B.vulgaris* 500 mM NaCl, **10:** 100 bç DNA ladder.....43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
3.1. <i>B. vulgaris</i> ve <i>B. maritima</i> bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl tuz konsantrasyonlarının kök ve gövde uzunluklarına etkisi. <i>y</i> -ekseninde kök, gövde uzunlukları (cm), <i>x</i> -ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P < 0,05$).....	47
3.2. <i>B. vulgaris</i> ve <i>B. maritima</i> bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl tuz konsantrasyonlarının RGR değerlerine etkisi. <i>y</i> -ekseninde RGR değerleri ($\text{g g}^{-1} \text{gün}^{-1}$), <i>x</i> -ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki * ($p < 0,05$) ve ** ($p < 0,01$) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.....	48
3.3. <i>B.vulgaris</i> ve <i>B.maritima</i> bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) RWC (bağıl su içeriği) değerlerine etkisi. <i>y</i> -ekseninde RWC (%) değerleri, <i>x</i> -ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P<0,05$).....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.4. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) ozmotik potansiyel değerlerine (MPa) etkisi. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. y-ekseninde ozmotik potansiyel (MPa) değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir (P<0,05).....50
- 3.5. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) MDA seviyelerine (nmol g YA⁻¹) etkisi. y-ekseninde MDA (nmol g YA⁻¹) değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.....52
- 3.6. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) POX aktivitesine (ünite mg protein⁻¹) etkisi. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. y-ekseninde POX (ünite mg protein⁻¹) aktivitesi, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.....53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7. <i>B.vulgaris</i> ve <i>B.maritima</i> bitkilerinde POX transkript seviyeleri (POX relative transcript abundance) q-PCR yöntemi ile ölçüldü. Aynı uygulama gününde şeker pancarı ve yaban pancarının 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulama gruplarının karşılaştırılması için ortalama $\pm$ SE (n=4) değerleri kullanıldı. y-ekseninde POX transkript düzeyi, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. . Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.....	54
3.8. POX geninde H3K9 asetilasyon seviyeleri. H3K9 asetilasyonu ChIP analizi ile tespit edildikten sonra input DNA'ya (%IP) göre normalize edildi. 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulanan <i>B.vulgaris</i> ve <i>B.maritima</i> bitkilerinde POX geni H3K9ac seviyeleri q-PCR yöntemi ile karşılaştırıldı. Ortalama $\pm$ SE (n=4) değerleri kullanıldı. y-ekseninde %IP değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.....	55
3.9. POX geninde H3K27 asetilasyon seviyeleri. H3K27 asetilasyonu ChIP analizi ile tespit edildikten sonra input DNA'ya (%IP) göre normalize edildi. 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulanan <i>B.vulgaris</i> ve <i>B.maritima</i> bitkilerinde POX geni H3K27ac seviyeleri q-PCR yöntemi ile karşılaştırıldı. Ortalama $\pm$ SE (n=4) değerleri kullanıldı. y-ekseninde %IP değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

- 1.1. Dünyanın tamamında tuzdan etkilenen toprakların oranı (Ghassemi et al.'dan 1995).....3
- 2.1. Real time PCR analizinde kullanılmak üzere tasarlanan *POX* ve *ACT* genlerine özgü reverse ve forward primerler.....45
- 3.1. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) Fv/Fm değerlerine etkisi. Çizelgenin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Ortalama değerler üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir (P < 0,05). (0K: 0.gün kontrol, 7K: 7.gün kontrol, 7-250: 7.gün 250 mM NaCl, 7-500: 7.gün 500 mM NaCl, 14K: 14.gün kontrol, 14-250: 14.gün 250 mM NaCl, 14-500: 14.gün 500 mM NaCl, 21K: 21.gün kontrol, 21-250: 21.gün 250 mM NaCl, 21-500: 21.gün 500 mM NaCl).....51

1. GİRİŞ

Yüksek sıcaklık, kuraklık, tuz gibi abiyotik stresler ve patojenler gibi biyotik stres faktörleri ürün kaybına ve tarımsal üretimin azalmasına neden olur. Moleküler genetik alanındaki son gelişmeler bir canlının fenotipinin belirlenmesinde sadece DNA dizisindeki genetik bilginin yeterli olmadığını ortaya koymaktadır. Epigenetik modifikasyonlar, bir genin DNA dizisi değişmeden, hem kısa süreli (mitotik) hem de uzun süreli (mayotik) aktif veya inaktif hale gelebilmesini sağlar (Saze, 2008). Tüm ökaryotlarda olduğu gibi bitkilerde de gen ifadesinin seçici olarak düzenlenmesi stres koşulları altında ve normal büyüme ve gelişme süreçlerinde özel bir öneme sahiptir. Bitki bilimi farklı stres tolerans mekanizmalarını incelemenin yanı sıra bu mekanizmaların tarım bitkilerine aktarılabilmesi ile ilgili yaklaşımları ve eğer genetik temeli varsa ortaya çıkartılmalarını hedefler (Mickelbart et al., 2015). Çevresel stres etmenlerine maruz kalan bitkilerde fizyolojik değişikliklerin yanı sıra epigenetik değişimler de meydana gelir. Gen ifadesinin düzenlenme mekanizmaları içinde yer alan epigenetik süreçlerin bu konudaki katkıları yeni yeni anlaşılmaktadır. Onkoloji, moleküler biyoloji, genetik ve gelişim biyolojisi alanlarında yapılan çok sayıda çalışmada epigenetik düzenlenmenin önemi vurgulanmaktadır (Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011; Kim et al., 2008; Berger, 2007). Özellikle bu süreçlerin çeşitli canlı gruplarında benzer şekillerde gerçekleştiğinin anlaşılması yeni araştırma olanakları sağlar. Kromatin yeniden düzenlenmesi ile ilişkili faktörler ve kromatin modifikasyonunda görev alan proteinler önce memeliler, maya ve *Drosophila*'da keşfedilmiş daha sonra bitkilerde de homologları bulunmuştur (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2007; Berger, 2007; Perruc et al., 2007). *Arabidopsis*, mısır, çeltik, domates gibi model bitkilerde abiyotik stresin gen ifadesini tetiklediği ve kromatin modifikasyonları/kromatin modelleme komplekslerinin kromatin yapısını etkileyerek gen ifadesini düzenlediği tespit edilmiştir (Yuan et al., 2013; Luo et al., 2012; Kim et al., 2010; Kim et al., 2008). Bitkiler diğer organizmalarda görülen epigenetik modifikasyonlara sahip olduklarından dolayı epigenetik çalışmalar için ideal model sistemlerdir (Saze, 2008). Literatürde *Beta vulgaris* hücre hatlarında DNA metilasyonu,

demetilasyonu ve histon asetilasyonu seviyelerinin hücre farklılaşması ve morfogenez süreci üzerindeki etkileri incelenmiş olmasına (Causevic et al., 2006) rağmen abiyotik strese yanıtta kromatin modifikasyonlarının gen ifadesi üzerindeki etkileri konusunda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Araştırma grubumuz tarafından önceki yıllarda yapılan ve sonuçları yayınlanan bir çalışmamızda *Beta vulgaris* ve *Beta maritima* bitkilerinin tuz stresine toleransında etkili olan antioksidan savunma sisteminin önemi ortaya konulmuştur (Bor et al., 2003). Ancak bu savunma sisteminin düzenlenmesinde hangi süreçlerin rol oynadığı hala bilinmemektedir. Çalışmamızda tuz stresi koşulları altında süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), peroksidaz (POX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerini kodlayan genlerin ifadesinin histon asetilasyon süreçleri tarafından düzenlenip düzenlenmediğini incelemeyi hedefledik.

1.1. Tuz Stresi

Dünyadaki toplam arazilerin %6'sı ve sulanan arazilerin %20'si tuz stresinden etkilenmiştir (Unesco Water Portal, 2007). Tarım alanlarının %50'den fazlasının çok yakın bir gelecekte tuzlanma sorunuyla karşı karşıya kalacağı öngörülmektedir (Varshney et al., 2011). Uluslararası İklim Değişikliği Paneli'nin (<http://www.ipcc.ch>) raporunda iklim değişikliği nedeniyle yakın bir gelecekte abiyotik streslerin zararlı etkilerinin daha da artacağı vurgulanmaktadır. Sanayileşme ve arazi kullanımı gibi faktörler tarım alanlarının daralmasına neden olarak gıda üretimini tehdit etmektedir. Öte yandan 2050 yılında 9 milyara ulaşması beklenen dünya nüfusu için gıda üretimi yeterli değildir, küresel gıda üretiminin %70 oranında artırılması gerekmektedir (Varshney et al., 2011). Dünya üzerinde su kaynaklarının giderek azalması, toprak ve sudaki tuzlanmanın artması bitkilerde büyümeyi sınırlayan en önemli abiyotik stres faktörlerinin başında gelir (Vinocour and Altman, 2005). Tuzluluk bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen ve ürün kaybına neden olan çevresel bir stres faktörüdür. Çevresel streslerden kaynaklanan ürün kaybının azaltılması artan gıda talebinin karşılanmasında büyük bir önem taşır (Shanker and Venkateswarlu, 2011). Toprak tuzluluğunun tarihi tarımın keşfinden çok daha eskiye dayanmasına

rağmen bu sorun sulama gibi insan kaynaklı faktörler nedeniyle artış göstermiştir (Zhu, 2001). Dünyada tuzdan etkilenen tarım alanlarının yüzdeleri çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Ghassemi et al.’dan 1995).

Çizelge 1.1. Dünyanın tamamında tuzdan etkilenen toprakların oranı (Ghassemi et al.’dan 1995)

Ekilen alanlar	Sulanan alanlar	Tuzdan etkilenen sulanan alanlar
1474 Mha	227 Mha (%15)	45,4 Mha (%20)

Toprak veya su tuzluluğu kurak ve yarı kurak bölgelerde görülen ve bitkilerin büyümesini ve üremesini sınırlayan temel stres faktörlerinden biridir (Allahverdiev et al., 2000; Koca et al., 2007). Tuz stresi ile karşılaşan bitkilerde görülen ilk tepki yaprak yüzeyinin genişleme hızının azalmasıdır. Tuz stresi çimlenme, büyüme, fotosentez pigmentleri, fotosentez, su durumu, besin dengesi, oksidatif stres ve verim gibi temel süreçleri etkiler. Tuz stresinin yarattığı etkiler su potansiyelini düşürür, iyon toksisitesine (homeostaz bozulur) yol açar ve değişen su durumu nedeniyle bitki büyümesi yavaşlar ve verim düşer (Parihar et al., 2014). Tuz stresinin etkileri bitkide iki aşamada gözlenmektedir (Munns 1993; 2005). Birinci aşamada bitkinin büyüme ortamında yer alan tuzlar toprağın ozmotik potansiyelini arttırarak bitkinin su almasını engeller (ozmotik etki), yaprak ve kök büyümesi yavaşlar (Munns, 1993). İkinci aşama ise tuzun bitkide yarattığı toksik etkiyi kapsar. Bitki tarafından alınan tuz yaşlı yapraklarda yoğunlaşır, transpirasyonun yapıldığı yapraklara taşınır ve yüksek miktarda Na^+ ve Cl^- birikimi sonucunda yapraklar ölür. Hasarın nedeni, vakuolde biriktirilemeyecek kadar fazla tuz yükünün mevcut olmasından kaynaklanabilir. Bunun sonucunda tuzlar sitoplazmada hızlıca birikerek enzim aktivitesini baskılar veya hücre duvarında birikerek dehidrasyona neden olur. Na^+ ve Cl^- , bitkide fizyolojik bozukluklara ve zararlı etkilere yol açan temel iyonlardır. Na^+ , potasyum iyonu alınımını engellediği ve stoma düzenlemesine zarar verdiği (bu durum su kaybına neden olur) için birincil iyon olarak kabul edilir. Sitosolde Na^+ seviyeleri 1 mM’dan daha düşük olmalıdır, Na^+ seviyesindeki yükselme iyonun hücre dışına atılmasına veya vakuolde depolanmasına neden olur (Binzel and Ratajczak, 2001). Yüksek Na^+ miktarı K^+ ve Ca^{2+} alınımını azaltır ve stoma

iletkenliğini düşürerek fotosentezi azaltır. Buna karşın Cl^- stresi, stomalardan bağımsız bir şekilde klorofilin parçalanması nedeniyle bitkide fotosentez kapasitesini düşürür (Tavakkoli et al., 2011). Bitkilerde Cl^- turgor basıncının, pH'nın ve sitosoldeki enzim aktivitelerinin düzenlenmesinde gerekli bir iyondur. Dang et al.'a (2008) göre topraktaki Cl^- konsantrasyonu büyüme ve verimin inhibisyonu açısından Na^+ 'dan daha önemlidir. Büyüme veya verimi %10 oranında azaltan kritik Cl^- konsantrasyonu $490 \text{ mg Cl}^- \text{ kg}^{-1}$ toprak olarak belirlenmiştir. Ekmek, durum buğdayları ve nohut bitkilerinin en genç yapraklarında Cl^- konsantrasyonu Na^+ konsantrasyonundan daha fazla çeşitlilik gösterir (Dang et al., 2006). Toprakta yüksek düzeyde çözünebilir tuzlar bitki için gerekli olan mineral nutrient alınımı ve metabolizması ile rekabet eder. Hücre içinde iyon taşıyıcıları Na^+ 'un hücreye girişini engeller ve aşırı Na^+ 'un vakuolde birikmesini sağlar. Tuz koşullarında Na^+ iyonu halofitlerde olduğu gibi hızlı bir şekilde vakuolde biriktirilemez. Sonunda tuzların mineral beslenme ile olan etkileşimi besin degesizliklerine ve besin kıtlığına neden olur (Binzel and Ratajczak, 2001). Tuz birikiminin artması Na^+ , Cl^- veya sülfat (SO_4^{2-}) gibi spesifik iyon toksisitelerini tetikleyerek esansiyel nutrientlerin (fosfor, potasyum, azot, kalsiyum) alınımını azaltır (Zhu, 2001). Tuzlu topraklarda mikronutrientlerin kullanımı; çözünürlüklerine, toprak çözeltisinin pH'sına, redoks potansiyeline, organik ve inorganik partikül yüzeylerindeki bağlanma bölgelerine bağlıdır. Bitkiler özellikle fide ve vejetatif büyüme aşamalarında tuz stresine duyarlıdır. *Suaeda salsa* türünde yapılan bir çalışmada bitki boyunun, dal sayısı ve uzunluğunun ve sürgün çapının tuzluluktan etkilendiği bildirilmiştir (Guan et al., 2011). Greenway and Munns'a göre (1980), 200 mM NaCl uygulaması şeker pancarı gibi tuza toleranslı türlerin kuru ağırlıklarında %20 azalmaya, orta derecede toleranslı türlerde (pamuk) %60 azalmaya ve hassas türlerde (soya fasulyesi) ise ölüme neden olmuştur.

Tuz stresi ile karşı karşıya kalan bitkilerde fotosentez hızının düşmesi su potansiyelindeki azalmaya bağlıdır (Parihar et al., 2014). Yüksek miktarda Na^+ ve Cl^- iyonlarının kloroplastlarda birikmesi fotosentezi baskılayan bir diğer faktördür (Zhang et al., 2005). Tuz stresi uygulaması bitkide klorofil içeriğinin azalmasına neden olur. Literatürde klorofil konsantrasyonu, hücrenin metabolik durumunu gösteren hassas bir belirleyici olarak kullanılır (Chutipaijit et al., 2011). 14 gün

boyunca 200 mM NaCl stresi verilen *Oryza sativa* bitkisinin yapraklarında klorofil a ve b içerikleri azalır (Amirjani et al., 2011). Mittal et al'a göre (2012) *Brassica juncea* bitkisinde tuz stresinin fotosentez (PSII) ve elektron taşınım hızlarını ve D1 proteinini etkilemesi sonucunda büyüme azalır. Tuz stresi koşullarında büyütülen bitkilerde fotosentez hızının azalması, hücre membranlarının dehidrasyonu, tuz toksisitesi, senesensin artması, sitoplazmik yapının değişmesiyle birlikte enzim aktivitesinin değişmesi gibi faktörlere de bağlıdır (Iyengar and Reddy, 1996).

Tuz stresi tohum çimlenmesi üzerinde de belirgin bir etkiye sahiptir. Tuz stresi *Posidonia*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Brassica spp.* gibi bitki türlerinde tohum çimlenmesini olumsuz etkilemektedir (Fernández-Torquemada and Sánchez-Lizaso 2013; Khodarahmpour et al., 2012; Ibrar et al., 2003). Tuz stresi çimlenme ortamında ozmotik potansiyeli düşürerek tohumların su alımını kısıtlar, nükleik asit metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivitelerini değiştirir, protein metabolizmasını ve hormon dengesini bozar, tohum rezervlerinin kullanımını engeller (Gomes-Filho et al., 2008; Dantas et al., 2007; Khan and Rizvi 1994). Bordi (2010), 200 mM NaCl verilen *Brassica napus* tohumlarında çimlenme yüzdesinin %38 ve çimlenme hızının %33 oranlarında azaldığını belirlemiştir.

Su potansiyeli bitkilerin su durumunun belirlenmesinde önemli bir fizyolojik parametredir (Parida and Das 2005). Romero-Aranda et al'a göre (2001) kök ortamında tuz miktarının artması yaprak su potansiyelinde azalmaya neden olur. Yüksek miktarda çözünmüş tuz iyonları ihtiva eden suyun ozmotik potansiyelinde meydana gelen azalma bitki hücrelerinde ozmotik basıncın artmasına neden olur. Çok düşük toprak su potansiyeli, bitkinin topraktan suyu çekmesini ve turgorunu devam ettirmesini engeller. Ancak düşük veya orta düzeyde tuz konsantrasyonlarında toprağın su potansiyeli daha yüksektir ve bitkiler ozmotik ayarlama (çözgenlerin biriktirilmesi) yapar ve su girişi için potansiyel gradientini devam ettirir. *Cucumis sativa*'da yapılan bir araştırmada tuz miktarı arttıkça su potansiyelinin doğrusal olarak azaldığı gösterilmiştir (Khan et al., 2013).

Bitkiler ozmotik dengeyi sağlamak için hücre metabolizması ile uyumlu quaterner amino asit türevleri, şeker alkoller, basit şekerler, sülfonyum bileşenleri

gibi ozmolit bileşikleri üretir (Sairam and Tyagi, 2004). Ozmotik düzenlemeyi sağlayan bileşikler glisin betain ve prolin gibi azot içerikli bileşikler, sukroz ve rafinoz gibi şekerler, mannitol ve sorbitol gibi polioller ve siklik polihidrik alkollerdir (siklik polioller). Tuz stresi uygulanan bitkilerde prolin ve glisin betain gibi ozmolitlerin metabolizmasında değişimler saptanmıştır. Tuz koşullarında *Thellungiella* bitkisinde prolin biyosentezinde yer alan enzimlerin seviyesinde artış ve prolin hidrolizini katalizleyen enzim seviyesinde azalma tespit edilmiştir (Pang et al., 2010). Tuz stresi uygulanan *Suaeda aegyptica* bitkisinde glisin betain biyosentezinde yer alan S-adenosil methionin sentetaz (SAMS), kolin monooksijenaz ve betain aldehit dehidrogenaz enzim miktarlarında artış saptanmıştır (Askari et al., 2006).

Bitkiler yaşam döngüleri boyunca hücresel düzeyde stresten kaçınmaya çalışır. Bitkinin tuza tolerans geliştirebilmesi için hasarı ya önlemesi ya da azaltması ve stres ortamına uygun homeostatik koşullar oluşturması gereklidir. Hücrenin metabolik dengesini bozan tuz stresinde atmosferik oksijenin indirgenmiş formları olan reaktif oksijen türevleri (ROS) üretilir. 2,7 milyar yıl önce moleküler oksijenin atmosferde ortaya çıkışından beri ROS'lar aerobik yaşamın istenmeyen bileşenleri olmuştur (Halliwell and Gutteridge, 1989). Fotosentetik elektron taşıma zincirinin indirgenmesi sonucunda ROS oluşumu artar ve oksidatif stres tetiklenir. Yüksek uyarılma enerjisi kloroplastlarda ROS'ların oluşmasına neden olur (Parida and Das, 2005). Tüm aerobik organizmaların evrimi etkili ROS süpürme mekanizmaları geliştirmelerine bağlıdır. ROS'ların düzenlenmesi istenmeyen toksisitenin ve oksidatif hasarın giderilmesinde hayati bir süreçtir (Halliwell and Gutteridge, 1989). Yapısında eşleşmemiş elektronları barındıran ROS'lar kararsızdır. Tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{HO}^\cdot$) gibi ROS çeşitleri hücre için toksiktir ve hücre bileşenlerini okside ederek oksidatif hasara sebebiyet verir (Asada and Takahashi, 1987). Süperoksit radikali kloroplast (Elstner, 1991) ve mitokondride (Rich and Bonner, 1978) düzenli olarak sentezlenir. Normal büyüme koşullarında hücrede O_2^- üretimi $240 \mu\text{M s}^{-1}$ ve H_2O_2 seviyesi ise $0,5 \mu\text{M}$ 'dır (Mittler, 2002). Tuzluluk gibi bir abiyotik stres faktörü ile karşı karşıya kalan hücrede homeostazın zarar görmesi sonucunda O_2^- seviyesi $720 \mu\text{M s}^{-1}$ ve H_2O_2 ise $15 \mu\text{M}$ düzeyine çıkar (Mittler, 2002). Kloroplastlarda 10

μM düzeyine ulaşan H_2O_2 fotosentezin %50 oranında azalmasına neden olur (Kaiser, 1979). H_2O_2 , sistein (-SH) ve metionin (-SCH₃) amino asitlerini ve enzimlerin thiol gruplarını (Calvin döngüsü enzimleri, Cu/Zn SOD, Fe-SOD vs.) oksitler (Halliwell and Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksidin başlıca zararı hidroksil radikallerinin ve lipid peroksitlerin üretimiyle sonuçlanan ardışık reaksiyonları başlatmasıdır (Noctor and Foyer, 1998). Süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri, Fe^{+2} ve Fe^{+3} varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile oluşturulan hidroksil radikali kadar toksik değildir (Fenton, 1899; Haber and Weiss, 1934). Yapısında eşleşmemiş tek bir elektronu barındıran hidroksil radikali tüm biyolojik moleküllerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonu, protein ve membran hasarına neden olur (Foyer et al., 1997). Membranlarda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, enzimlerin inhibisyonu, DNA ve RNA hasarı gibi oksidatif süreçler hücre ölümü ile sonuçlanır (Mittler, 2002). Organik molekülün yapısına katılan veya ondan hidrojen atomu koparan hidroksil radikali bu reaksiyonlar yoluyla organik substratları oksitler. Hücre içinde ROS seviyesi kontrol altında tutulmadığı takdirde ROS'lar proteinlere, lipidlere, karbohidratlara ve DNA'ya zarar verir (Mittler, 2002). Bitkilerde kloroplast, mitokondri ve mikrobadiler gibi yüksek okside edici metabolik aktiviteye ve yoğun elektron akış hızına sahip organeller ROS üretiminin ana kaynaklarıdır. Kloroplastlarda ROS üretiminin temel kaynağı Mehler reaksiyonu ve anten pigmentleridir (Asada and Takahashi, 1987). Bitki kloroplastlarında kuraklık, tuz, sıcaklık stresleri ve farklı streslerin yüksek ışık stresleriyle birlikte etki etmesi gibi karbondioksit fiksasyonunu sınırlandıran koşullar ROS üretimini arttırır. C3 bitkilerinde karbondioksit koşullarının sınırlandırılması fotorespirasyon yolunu da aktifleştirebilir (Foyer, 2002). Fotorespirasyon yolunda glikolat oksidaz aktivitesi ile peroksizomlarda H_2O_2 oluşturulur. Mikrobadilerde yağ asidi oksidasyonunun yan ürünü olarak H_2O_2 üretilir. Mitokondrilerde elektron transport zincirinin aşırı indirgenmesi O^{2-} üretiminin ana kaynağını oluşturur (Moller, 2001). Bitki hücrelerinde diğer ROS kaynakları sitoplazma ve endoplazmik retikulumda sitokromlar tarafından katalizlenen detoksifiye reaksiyonlarını da kapsar (Urban et al., 1997). Plazma zarı NADPH-bağlı oksidazların (memelilerdeki kalsiyumca düzenlenen NOX5 NADPH oksidazı ile benzerdir) ROS sinyallemede rol aldığı düşünülmektedir. NADPH-bağlı oksidazların yapısında oksijenin süperokside indirgenmesini

sağlayan bir elektron transport zinciri oluşturan çok alt birimli flavositokrom bulunur. Memelilerde NADPH oksidazın kimyasal inhibitörü olan difenilen iyodinyum, abiyotik veya biyotik stres uygulanan bitkilerde ROS üretimini engeller (Dat et al., 2003). NADPH oksidazlar dışında pH'ya bağımlı hücre duvarı peroksidazları, germin benzeri oksalat oksidazlar ve amin oksidazların apoplastta ROS oluşturduğu düşünülmektedir (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Hu et al., 2003).

Tuzluluğa yanıt bitki türüne, stresin süresine, şiddetine, bitkinin gelişim evresine, organ ve hücre tipine ve organel çeşidine bağlı olarak farklılık gösterir (Sairam and Tyagi, 2004). Bitkiler ROS'ların süpürülmesinde enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalara sahiptir. Bitkilerde süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) enzimleri ROS'ları süpüren temel mekanizmadır (Asada and Takahashi, 1987; Willekens et al., 1997). Enzimatik mekanizmalar $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 miktarlarının en aza indirilmesini sağlar (Sairam and Tyagi, 2004). SOD ve APX/CAT enzim aktiviteleri arasındaki denge $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikal seviyelerinin belirlenmesinde önemlidir (Bowler et al., 1991). Bu denge ferritin veya metal bağlayan proteinlerin metal iyonlarını depolamasıyla birlikte $HO^{\cdot}$ radikalinin oluşumunu engeller (Bowler et al., 1991; Asada and Takahashi, 1987).

Hemen hemen tüm hücre bölmelerinde bulunan ve bir metalloenzim olan SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'i H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür ($O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$). SOD enzimi ROS'lar tarafından oluşturulan hasara karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Das and Roychoudhury, 2014). SOD enzimi bağladıkları metal iyonu çeşidine göre Mn-SOD (mitokondride yer alır), Fe-SOD (kloroplastta bulunur) ve Cu/Zn-SOD (sitosol, peroksizom, kloroplast ve mitokondride bulunur) olmak üzere üç izoenzim altında sınıflandırılır (Mittler, 2002). Üç SOD izoenzimi çoklu gen aileleri tarafından nukleusta kodlanır. *A. thaliana* genomunda Cu/ZnSOD enzimini kodlayan *CSD1*, *CSD2* ve *CSD3* genleri; FeSOD'ü kodlayan *FSD1*, *FSD2* ve *FSD3*; MnSOD'u kodlayan bir gen bulunur (Fink et al., 2002). Abiyotik ve biyotik streslere karşı *SOD* gen ifadesinin artması bitkilerde stres toleransı açısından genel bir yanıttır. SOD izoformlarını yüksek düzeyde ifade eden *Arabidopsis*, çeltik, patates, tütün vs. bitkilerde oksidatif strese tolerans gözlenmiştir (Van Camp et al., 1994).

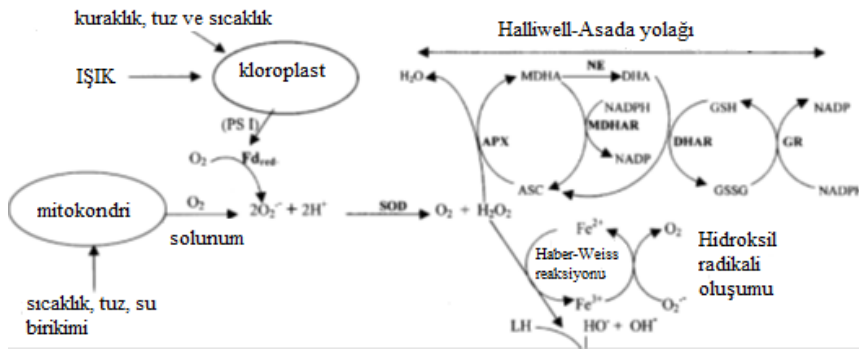
Tetramerik hem içeren bir enzim olan ve peroksizomlarda sık rastlanan katalaz iki molekül H_2O_2 'i su ve oksijene dönüştürür ($2H_2O_2=2H_2O+O_2$). Angiospermelerde *CAT1*, *CAT2* ve *CAT3* olmak üzere üç adet *CAT* geni bulunur. *CAT1* polen ve tohumlarda, *CAT2* fotosentetik dokular, kök ve tohumlar, *CAT3* ise yapraklar ve vasküler dokularda ifade olur (Willekens, 1997).

Guaiacol ve pyragallol adlı elektron vericileri oksitleyen guaiacol peroksidaz (GPX) abiyotik ve biyotik streslere karşı savunmada rol alır. Bitki dokularında H_2O_2 azaltan guaiacol peroksidaz izoenzimleri vakuol, hücre duvarı ve sitosolde bulunur (Asada, 1992). Bitkilerde H_2O_2 'in süpürülmesi bitki peroksidazları (sınıf III) tarafından gerçekleştirilir ($H_2O_2 + R(OH)_2 \rightarrow 2H_2O + R(O)_2$). *Arabidopsis*'de bu enzimleri kodlayan çok sayıda gen bulunmaktadır ve bu enzimler sitosol, vakuol, apoplast ve hücre duvarında bulunur (Hiraga et al., 2001). O_2^- , H_2O_2 , OH^- radikallerinin oluşumu ve süpürülmesi şekil 1.1'de gösterilmektedir (Sairam and Tyagi'den 2004).

Kloroplastta oluşan H_2O_2 , askorbat-glutasyon döngüsü vasıtasıyla askorbat peroksidaz (APX) enzimi tarafından etkisiz hale getirilir (Halliwell and Gutteridge, 1986). Hidrojen peroksidi suya indirgeyen APX, elektron vericisi olarak askorbatı kullanır ve beraberinde monodehidroaskorbatı da (MDHA) oluşturur. MDHA, dehidroaskorbat (DHA) ve askorbata dönüşür. DHA redüktaz glutasyonu elektron verici olarak kullanır ve askorbatı oluşturur. Kloroplast stromalarında gerçekleşen askorbat-glutasyon döngüsü fotosentetik organizmalarda toksik seviyelerde H_2O_2 birikimini engeller (Noctor and Foyer, 1998). APX enzimi H_2O_2 seviyelerinin düzenlenmesi, redoks metabolizmasının kontrolü ve strese yanıt mekanizmalarının aktifleştirilmesinde önemli rollere sahiptir (Dabrowska et al., 2007). *A. thaliana* genomunda APX gen ailesi sitosol (*APX1*, *APX2*, *APX6*), kloroplast (*APX3*, *APX4*, *APX6*), mitokondri (*APX6*, *APX7*) ve peroksizomda (*APX3*, *APX5*) bulunan izoenzimleri kodlayan dokuz genden meydana gelir. Ayrıca tillakoide bağlı APX kodlayan bir gen ile hem kloroplast stroması hem de mitokondriyi hedefleyen bir gen de bu gen ailesine dahildir (Chew et al., 2003). Domates *tAPX* genini yüksek düzeyde ifade eden tütün bitkilerine yüksek ve düşük sıcaklık stresleri uygulandığında foto oksidatif hasar en aza iner (Sun et al., 2010). Sitosolik APX enzimini kodlayan gen,

bitkinin kuraklık ve sıcaklık streslerinin ikisine birden alışmasını sağlar (Koussevitzky et al., 2008).

İndirgeyici olarak NAD(P)H'ı kullanan glutatyon redüktaz (GR) enzimi, GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizleyen bir flavoprotein oksidoredüktazdır ($\text{GSSG} + \text{NADPH} = 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$). İndirgenmiş glutatyon (GSH) monodehidroaskorbat ve dehidroaskorbattan askorbatın yeniden sentezi için kullanılır. Askorbat-glutatyon döngüsünde yer alan GR, glutatyon disülfid bağının oluşumunu katalizleyerek GSH/GSSG oranını korur (Mittler et al., 2004).



Şekil 1.1. Süperoksit, hidrojen peroksit radikallerinin oluşumu ve süpürülmesi (Sairam and Tyagi'den 2004). APX: askorbat peroksidaz, DHA: dehidroaskorbat, ASC: askorbat, DHAR: dehidroaskorbat redüktaz, MDHAR: monodehidro askorbat redüktaz, Fd: Ferrodoksin, GR: glutatyon redüktaz, GSH: indirgenmiş glutatyon, GSSG: okside glutatyon, HO: hidroksil, NE: non enzymatic reaction (enzimatik olmayan reaksiyon).

Munns'a göre (2005) tuz stresine toleransı arttıran genler üç temel fonksiyonel gruba ayrılır: 1) Tuz alınımlarını ve taşınımını kontrol eden genler, 2) Ozmotik veya koruyucu moleküller ile ilgili genler, 3) Yüksek tuz koşullarında büyüme ve gelişmeyi kontrol eden genler. ROS üretiminin bir etkisi de çeşitli transkripsiyon faktörlerinin sentezlenmesi ve sinyal yollarının tetiklenmesidir. Bitkilerde strese cevap olarak ozmoprotektanlar, şaperon moleküller, detoksifikasyon enzimleri, transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar sentezlenir ve bu bileşenler sayesinde bitkiler strese karşı savunma oluşturur.

Na^+ 'un hücre dışına atılmasından ve vakuolde depolanmasından sorumlu olan mekanizmalardan biri SOS (salt-overly-sensitive) yolağıdır. SOS1, SOS2/SOS3 (SOS3: Ca^{2+} sensörü, SOS2: serin-treonin protein kinaz) kinaz kompleksleri tarafından düzenlenen bir Na^+/H^+ antiportıdır (Shi et al., 2000). Tuz stresinin uyardığı Ca^{2+} SOS3 tarafından algılanır. SOS3/SOS2 kinaz

kompleksi SOS1 antiportörünü ve vakuolar NHX'i tetikler (Chinnusamy et al., 2004). Bir serin treonin tipi protein kinazı kodlayan SOS2 geni SOS1'i aktiveleştirir (Liu et al., 2000). SOS3 geni EF-hand tipi kalsiyum bağlı proteini kodlar ve bu proteinin hayvanlardaki nöron kalsiyum sensörlerine ve mayadaki kalsinörin B alt birimine benzediği bilinmektedir (Mahajan et al., 2008). SOS2 fiziksel olarak SOS3 ile etkileşime girmesinin yanı sıra SOS3 tarafından da aktiveleştirilir (Halfter et al., 2000). Bu nedenle SOS2 ve SOS3, Na⁺ ve K⁺ homeostazında ve tuza toleransta düzenleyici bir yolak olarak tanımlanır. SOS1 aktivitesinin SOS2 dışında SOS4 tarafından da düzenlenebileceği düşünülmektedir. SOS4, bir kofaktör olan pridoksal-5-fosfatın oluşumunu katalizler. Pridoksal-5-fosfat SOS1 için ligand olarak sunulan bir kofaktördür (Shi and Zhu, 2002). SOS1'in pridoksal-5-fosfat kofaktörünü bağlayan bir diziye sahip olduğu tahmin edilmektedir. SOS1, bitkinin tuza toleransında en fazla rolü olan SOS lokusudur. Plazma membranında P-tipi H⁺-ATPazlar (pompa) proton motif güç oluşturarak K⁺ ve Na⁺ gibi çözgenlerin aktif taşınımını sağlar (Sze et al., 1999). Na⁺'un büyük çoğunluğu hücreye girdikten sonra Na⁺/H⁺ antiportörler vasıtasıyla vakuole depolanır (Apse et al., 1999). Yang et al. (2009) *AtNHX1*, *SOS1*, *SOS3*, *AtNHX1+SOS3*, *SOS2+SOS3* ve *SOS1+SOS2+SOS3* genlerini yüksek düzeyde ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde tuza toleransın arttığını buldular, bu bitkilerde Na⁺ birikiminin düşmesi ve K⁺ birikiminin artması sonucunda tuz stresine tolerans artar (Yang et al., 2009). Çeltik bitkisinde tuza toleransın *SOS1*, *SOS2* ve *SOS3* gen ifadesiyle doğru orantılı olduğu ve bitkinin bu sayede Na⁺'u sürgünlerden atabildiği rapor edilmiştir (Martinez-Atienza et al., 2007). Na⁺'un hücreden uzaklaştırılması ve yapraklarda K⁺/Na⁺ oranının korunmasında *HKT* görevlidir. Bu proteinin Na⁺ ve K⁺ iyonlarının hücre içindeki seviyesini düzenleyerek tuz toleransına aracılık ettiği düşünülmektedir (Munns and Tester, 2008). *HKT* genlerince kodlanan taşıyıcılar Na⁺'u ksilemden uzaklaştırır ve yapraklarda Na⁺ seviyesinin düşmesine yardımcı olur (Munns and Tester, 2008). *Arabidopsis*'de *AtHKT1;1* geni Na⁺'u ksilemden uzaklaştırarak kökten sürgünlere taşınmasını engeller. Strese yanıt genlerinin ifadesi bitkiler için yaşamsal öneme sahiptir (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Strese yanıt genlerinin promotorlarına bağlanan transkripsiyon faktörleri abiyotik strese toleransın ana belirleyicileridir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Spesifik DNA

dizilerine bağlanan transkripsiyon faktörleri stresle aktive olan genlerin ifadesinden sorumludur. Yapısında homolog DNA-bağlanma domaini bulunan çok sayıda transkripsiyon faktörü DNA-bağlanma domainlerine göre MYB-benzeri, MADS domain, homeobox ve bZip proteinleri olarak sınıflandırılır (Parihar et al., 2014). DREB1 (Dehydration-responsive element binding protein1)/CBF (C-repeat binding factor) ve DREB2, ABA'dan bağımsız gen ifadesinde yer alır iken; ABRE (ABA-responsive element) binding protein (AREB)/ ABF (ABRE binding factor) ise ABA bağımlı gen ifadesinde yer alır. *DREB1/CBF*, *DREB2*, *AREB/ABF* ve *NAC* çeltikte abiyotik strese yanıtta önemli genlerdir (Nakashima et al., 2009). Örneğin ABA, soğuk, tuz ve kuraklık stresleri çeltik bitkisinde *NAC6* geninin tetiklenmesine neden olur (Nakashima et al., 2009). Kuraklık, tuz ve soğukla uyarılan *RD29A/COR78/LTI78* genlerinin promotorunda ABRE ve DRE/CRT olmak üzere iki temel cis-etkili eleman bulunur (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). *CBF/DREB1* genini yüksek düzeyde ifade eden transgenik bitkilerde kuraklık, tuz, donma streslerine karşı tolerans gelişir (Liu et al., 1998). Bitkilerde tuzluluk, kuraklık ve soğuk streslerinde Ca^{2+} birikimi, ikincil sinyal molekülleri ve fosfoprotein kaskatları tetiklenir ve bunun sonucunda *Arabidopsis*'de *DREB1*, *DREB2*, *AREB1* ve *AREB2* genleri ve tütünde *Tsi1* geni uyarılır (Xiong et al., 2002). Bu genlerin ürünleri olan transkripsiyon faktörleri; *RD29B*, *RD29A* ve ozmotin gibi genleri etkiler. *OrbHLH2* geni (Basic helix-loop-helix kodlar) transkripsiyon faktörü olarak görev yapar ve tuz stresi sinyalini düzenler. Yüksek düzeyde *OrbHLH2* genini ifade eden *Arabidopsis* bitkilerinde tuz ve ozmotik sreslere karşı toleransın arttığı tespit edilmiştir (Zhou et al., 2009). Tuza duyarlı (*IR64*) ve dirençli (*pokkali*) çeltik hatlarının kullanıldığı bir çalışmada *GST*, *LEA*, *V-ATPaz*, *OSAP1* çinko parmak proteini ve *HB1B* transkripsiyon faktörü gibi tuza yanıt genlerinin *pokkali* hattında daha yüksek seviyelerde ifade olduğu belirlenmiştir (Kumari et al., 2009). *Arabidopsis*'de ZAT7 adlı çinko-parmak proteini tuz toleransından sorumlu genlerin ifadesini tetikler (Ciftci-Yılmaz et al., 2007). Tuz stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinin köklerinde *ONAC063* geni ifade olur (Yokotani et al., 2009). *ONAC063* genini ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkisinin tohumları yüksek tuz konsantrasyonlarına ve ozmotik basınca direnç geliştirmiştir.

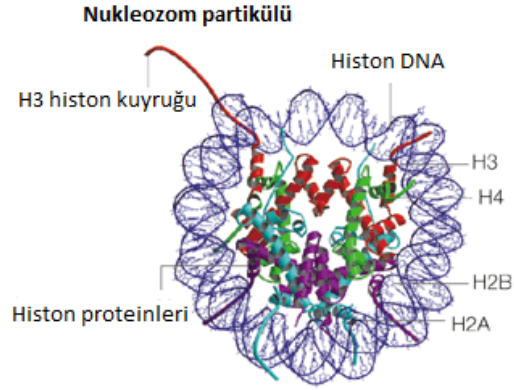
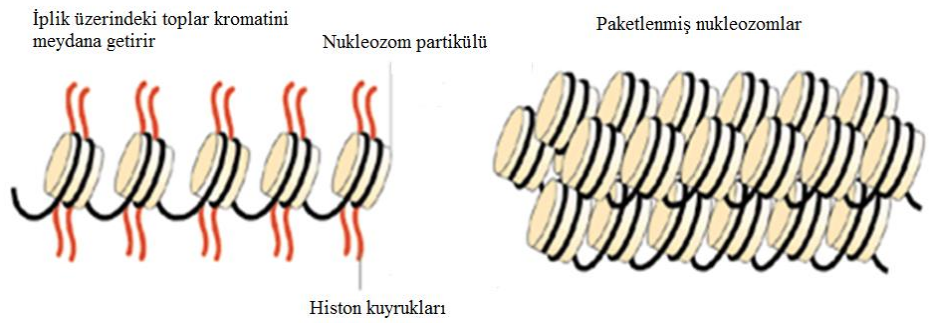
1.2. Epigenetiğin Tarihçesi

Epigenetik, üzerinde uzun yıllardır çalışılmasına rağmen biyologlar ve epigenetikçiler tarafından tanımı net yapılamamış bir terimdir (Bird, 2007). Epigenetik terimi ilk defa 1940'lı yılların ortalarında Waddington tarafından önerildi. Bu terim Yunanca 'epigenesis' kelimesinden kökenlenir ve farklılaşmamış embriyonun gelişim aşamalarını ifade eder (Jablonka and Lamb, 2002). Conrad Waddington tarafından 1942 yılında türetilen epigenetik sözcüğü 'genotip ve fenotip arasındaki ara faktör' anlamına gelmektedir (Waddington and Kacser, 1957). Günümüzde epigenetik DNA dizisinde bir farklılaşma olmadan kalıtılabilen değişiklikleri ifade eder ve bu değişiklikler bir kuşaktan diğer kuşağa aktarılabilir özelliktedir. Waddington epigenetik sözcüğünü 'fenotipi oluşturan genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimlerin çalışılması' olarak tanımlamıştır (Jablonka and Lamb, 2002). Başka bir deyişle epigenetik, genetik haricindeki (*epi*) süreçleri, gelişim esnasında genler arası etkileşimleri ifade eder. 1990'lı yılların ortalarında genler arası etkileşimlerden ziyade gelişim sürecinde gen ifadesini etkileyen kromozom modifikasyonlarını ifade eden epigenetik, daha özgün bir terim haline geldi. Böylece epigenetik, gen dizisini içeren DNA moleküllerindeki değişimlerden bağımsız mitotik ve mayotik olarak kalıtılan farklılaşmalar olarak tanımlandı (Jablonka and Lamb, 2002; Waddington, 1968). Kalıtılabilen değişimler, histon varyantları ve DNA metilasyonu gibi gelişim ve stres süreçlerinde gen ifadesini etkileyen modifikasyonları kapsar (Law and Jacobsen, 2010; Downen et al., 2012). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının genom düzeyinde dağılımının belirlenmesini sağlayan bisülfür sekanslama (Bisulfide sequencing) ve ChIP-seq tekniklerinin geliştirilmesi epigenetik teriminin anlamını değiştirdi. Teknolojik gelişmeler sayesinde epigenetik; canlı türleri, dokuları ve hücre tipleri arasındaki varyasyonları çalışan bir bilim dalı haline gelmiştir.

1.3. Histon Modifikasyonları ve Kromatin Modelleme

Kromatin terimi paketlenmiş DNA'yı ifade etmek için kullanılır (Bowler et al., 2004). Kromatinin yapısı her birinden ikişer kopya olmak üzere H2A, H2B,

H3, H4 temel histon proteinleri ve 146 bç (baz çifti) DNA sarmalından oluşur, H3-H4 tetrameri ve iki adet H2A-H2B dimeri olarak organize olur (Luger et al., 1997). Histon proteinleri ve DNA sarmalının birlikte oluşturduğu yapı ‘nukleozom’ olarak adlandırılır ve kromatinin temel birimidir. Temel histon proteinleri pozitif yüklü bazik amino asitlerce zengindir ve negatif yüklü DNA-fosfat grupları ile birleşerek nukleozomu meydana getirirler. Nukleozomun yapısı şekil 1.2’de gösterilmektedir (Marmorstein’dan 2001). Gevşek bir yapıya sahip olan kromatin mikroskopta 30 nm çapında bir iplik olarak görünmesine rağmen aslında 10 nm çapa sahiptir (Bowler et al., 2004). Bu iplikte H1 histonu (linker) 40-70 bç uzunluğundaki DNA’ya bağlanarak her nukleozomu birbirinden ayırır. 30 nm’lik iplikler her dönüşte yaklaşık altı adet nukleozom içeren sarmal yapılar olarak görülebilir, DNA yaklaşık 40 kat yoğunlaşır (Goodrich and Tweedie, 2002). Kromatin yoğunluğuna ve transkripsiyon aktivitesine göre ökromatin ve heterokromatin olmak üzere ikiye ayrılır. Transkripsiyonel olarak aktif olan 30 nm’lik iplikler ökromatini, nukleozomların üst üste paketlenildiği yapılar ise heterokromatini oluşturur. Heterokromatin gen ifadesinin aktifleşmesi için gevşeyerek ökromatine dönüşebilir veya peri-sentromerik bölgelerde olduğu gibi geçici olarak inaktif hale gelebilir (Bowler et al., 2004). Sıkıca paketlenmiş heterokromatin bölgesinde bulunan genler genellikle ifade olmaz. Buna karşılık ökromatin bölgesi transkripsiyon elemanlarının girişine izin veren gevşek bir yapıya sahiptir. Farklı kimyasal ve biyokimyasal özelliklere sahip olan her iki kromatin formu gen ifadesinin sürdürülmesi veya baskılanması ile ilişkili epigenetik işaretler bulundurlar (Tariq and Paszkowski, 2004).

A**B**

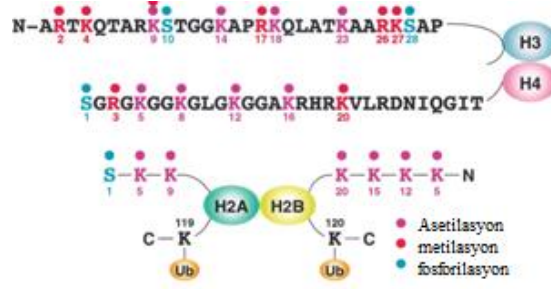
Şekil 1.2. A) Nukleozom partikülünün yüksek-çözünürlüklü yapısı. DNA çift sarmalı mavi, H3 histon dimeri kırmızı, H4 histonu yeşil, H2A deniz mavisi ve H2B ise mor renklerle gösterildi (Marmorstein'den 2001). **B)** Kromatini meydana getiren nukleozom partikülleri sarı silindirler halinde resmedildi. Siyah zincirler DNA'yı, kırmızı eğri çizgiler amino ucu histon kuyruklarını (N-terminal tails) gösterir (Marmorstein'den 2001).

Ökaryotik kromozomun temel birimi olan nukleozomun yapısını oluşturan histonların N-terminallerindeki lizin, arjinin, serin amino asitleri nukleozom yapısının dışına doğru uzanır. Histon kuyrukları olarak bilinen bu yapılarda modifikasyon geçirmiş çok sayıda amino asit mevcuttur (Kouzarides, 2007). Histon N-terminal amino asitleri metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumolasyon gibi modifikasyonlar geçirir (Yuan et al., 2013). Histonların N-terminal kuyrukları nukleozomun paketlenmesini sağlar.

Chinnusamy et al'a göre (2008), organizmaların genomunda meydana gelen DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar 'epigenomu' meydana getirir. Epigenom karmaşık mekanizmalardan oluşur ve organizma genomuna çeşitlilik kazandırır. Birçok organizmada H3 ve H4 histonlarının N-terminal kuyruklarındaki lizin (K) amino asitlerinin metilasyonu ve asetilasyonu heterokromatin oluşumunda büyük bir öneme sahiptir (Richards

and Elgin, 2002). Bitkiler ve memelilerde H3 histonunun 9. lizininin (H3K9) metilasyonu ve DNA'nın yüksek düzeyde metilllenmesi temel heterokromatine ait bir özellik olarak görülür. Buna karşılık H3K9 metilasyonu ve DNA metilasyon seviyesinin azalması ökromatin yapısı ile ilişkilendirilir (Richards and Elgin, 2002; Jenuwein and Allis, 2001). Kromatin yapısında meydana gelen ve enzimlerle kontrol edilen değişimler 'kromatin modifikasyonları' olarak adlandırılır. Histon-DNA etkileşimlerini değiştiren veya nukleozomların konumunu düzenleyen ATP-bağımlı veya ATP'den bağımsız gerçekleşen süreçlere 'kromatin modelleme' adı verilmektedir (Jerzmanowski, 2007).

Kromatin yapısındaki modifikasyonlar DNA transkripsiyonu, replikasyonu, tamiri ve rekombinasyonu gibi önemli süreçlerin doğru bir şekilde düzenlenmesi için gereklidir (Mathieu et al., 2007). Histon proteinlerinin N-terminal kuyruklarındaki amino asitlerin translasyon-sonrası modifikasyonları (metilasyon, asetilasyon, ubikütinasyon, fosforilasyon, sumolasyon vs.), ATP-bağımlı kromatin modelleme kompleksleri ve DNA metilasyonu gen ifadesini düzenler (Yuan et al., 2013). Histon proteinleri translasyon sonrası modifikasyonları şekil 1.3'de gösterilmektedir (Zhang and Reinberg'den 2001). Histon modifikasyonları aracılığıyla gerçekleşen gen ifadesinin düzenlenmesine ait mekanizma mayadan insana kadar çeşitli organizmalarda korunmuştur (Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2007). Kromatin modifikasyonları ve küçük RNA'ların oluşumu, gen ifadesinin transkripsiyonel ve transkripsiyon-sonrası kontrolünde yer alır (Angers et al., 2010). Translasyon sonrası modifikasyonlar tarafından değişikliğe uğratılan negatif yüklü DNA ve histon N-terminal kuyrukları arasındaki etkileşim, gen ifadesinin düzenlenmesini sağlar (Rice and Allis, 2001). Histon modifikasyonları ve kromatin modelleme kompleksleri nukleozomu açarak transkripsiyonu başlatır.



Şekil 1.3. H3 ve H4 histon kuyruklarında translasyon sonrası modifikasyonlar. Asetilasyon mor, metilasyon kırmızı, fosforilasyon yeşil ve ubiquitasyon turuncu renkler ile gösterilmiştir (Zhang and Reinberg'den 2001).

Transkripsiyonun aktifleşmesi veya baskılanması modifikasyonun tipine ve modifikasyon geçiren amino asit çeşidine bağlıdır. Genellikle H3 histonunun 4. lizininin (H3K4) ve H3 histonunun 36. lizininin (H3K36) metilasyonu gen ifadesini aktifleştirir iken; H3 histon deasetilasyonu, H3K9 metilasyonu ve H3K27 metilasyonu gen ifadesini susturur (Liu et al., 2010). Histon modifikasyonları genellikle birbirleriyle ilişkilidir. Örneğin H3 histonunun 9. lizinde meydana gelen deasetilasyon bir sonraki metilasyon işleminin belirtecidir, heterokromatin protein 1 gibi baskılayıcı proteinlerin bağlanmasını ve heterokromatinin inaktif halde kalmasını sağlar (Rice and Allis, 2001). Modifikasyonun tamamlanması sonucunda epigenetik hafıza, kromatin yapısını ve gen aktivitesini belirleyen 'histon kodu' formunda depolanır (Jenuwein and Allis, 2001). Histon kodu hipotezine göre, farklı histon kuyruklarındaki translasyon sonrası modifikasyonlar, farklı kromatin faktörlerinin (chromatin associated factors) bağlanması için tanıma dizileri olarak görev alır (Fischle et al., 2003; Jenuwein and Allis, 2001). Bu tür dinamik ve geri döndürülebilir modifikasyonlar, gen ifadesinin epigenetik kontrolü için kalıtılabilir mekanizmalar sağlar. Strese adaptasyonun soylar boyunca aktarılması DNA metilasyonu ve kromatin yapısındaki kalıtılabilir değişikliklere aracılık eden epigenetik faktörlere bağlıdır (Kwon et al., 2009).

Strese tolerans ve stresten kaçınma mekanizmaları genellikle ilgili genlerin transkripsiyon düzeylerindeki değişimlere ve epigenetik düzenlemelere bağlıdır (Kim et al., 2008; Grativol et al., 2012). Bitkilerde, abiyotik streslerle uyarılan bir çok genin baskılanması veya aktive edilmesi epigenetik değişimlere bağlıdır

(Yuan et al., 2013). Çevresel stres etmeni ortadan kalktıktan sonra bazı epigenetik modifikasyonlar temel seviyelerine dönebilirken, bazıları sabit kalarak 'stres hafızası' olarak sonraki nesillere aktarılır (Chinnusamy and Zhu, 2009). Son yıllarda, bitkiler üzerine yapılan çalışmalar strese cevap sürecinde kromatin modifikasyonları ve kromatin yeniden modellemenin gen ifadesinin düzenlenmesinde büyük önemi olduğunu göstermektedir (Kim et al., 2008; Van Dijk et al., 2010; Zong et al., 2012). Bununla birlikte kromatinin yeniden düzenlenmesi süreci ile ilgili mekanizmalar, hedef genler ve bu süreçte rol oynayan proteinler (enzimler) henüz tam anlamı ile bilinmemektedir (Luo et al., 2012).

1.3.1. Histon asetilasyonu

Lizin amino asitlerinin asetilasyonu transkripsiyonun aktivasyonu ile ilişkilidir (Kouzarides, 2007). Aktif transkripsiyon bölgelerinde histon asetilasyonu tespit edilmiştir. Transkripsiyonu kolaylaştıran histon asetilasyonu histon-DNA etkileşimini zayıflatır. Bu bölgelerde asetil gruplarındaki negatif yükler histonların pozitif yüklerini nötralize eder ve transkripsiyon elemanları kromatine girer (Mizzen et al., 1998).

Histonların N-terminal kuyruklarındaki spesifik lizin kalıntılarına asetil gruplarının eklenmesi histon asetiltransferaz, çıkartılması histon deasetilaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Strahl and Allis, 2000). Diğer bir deyişle, histon asetilaz ve deasetilazlar histon asetilasyonu sürecini düzenleyen iki enzim grubudur (Kouzarides, 2007). Bir nukleozomda asetilasyona uğrayan yaklaşık 26 farklı bölge olduğu bilinmektedir (Spencer and Davie, 1999). H3 histonunun 9., 14., 18., 23. lizin amino asitleri, H4 histonunun 5., 8., 12., 16., 20. lizin amino asitleri; H2A histonunun 5., 9. lizin amino asitleri ve H2B histonunun 5., 12., 15., 20. lizin amino asitleri en sık asetillenen bölgelerdir (Kallin and Zhang, 2004). Genellikle histon asetiltransferazlar genlerin promotor bölgelerindeki histonların asetilasyonunu gerçekleştirir (Kuo et al., 2000) ve histon deasetilazlar ise histonlardan asetil gruplarını hızlı bir şekilde uzaklaştıran enzimlerdir (Kim et al., 2012; Katan-Khaykovich and Struhl, 2002). Histon asetiltransferazlar transkripsiyon koaktivatörleri, histon deasetilazlar ise korepresörler olarak işlev

görür (Kallin and Zhang, 2004). Heterokromatinin aksine ökromatin bölgelerinde asetillenmiş histon oranı daha fazladır (Tsuji et al., 2006). *Arabidopsis*'de histon asetiltransferaz enzimleri GNAT (GCN5-related N-terminal acetyltransferase), MYST, CBP (CREB-binding protein) ve TAFII 250 (TATA binding protein-associated factors) olmak üzere dört aileye ayrılır (Pandey et al., 2002). GCN5 (General Control Non derepressible5) proteini histon asetiltransferaz komplekslerinin katalitik alt birimidir, ADA2 (alteration/deficiency in activation 2) adaptör proteinleri ise GCN5-içeren komplekslerin tamamlayıcı parçasıdır. Son çalışmalar GCN5 ve ADA2 proteinlerinin bitki gelişiminde önemli role sahip olduğunu ortaya çıkartmıştır (Bertrand et al., 2003). GCN5/HAG1 ve ADA2b mutasyonları *Arabidopsis*'de cücelik, kök gelişiminde anormallik, kısa petal ve stamenler gibi gelişim kusurlarına neden olur (Bertrand et al., 2003). *Arabidopsis*'de AtGCN5 ve ADA2 proteinleri soğukla tetiklenen gen ifadesinde görev alan CBF1 (C-repeat/DRE binding factor 1) transkripsiyon faktörü ile etkileşime girer. Bitkilerde histon asetiltransferazların tuz, soğuk ve patojen streslerine yanıtta rol aldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stresi uygulanan çeltik bitkisinde *OsHAC703*, *OsHAG703*, *OsHAF701* ve *OsHAM701* histon asetiltransferaz genleri uyarılmış ve H3K9, H3K18, H3K27, H4K5 asetilasyon düzeyleri artmıştır (Fang et al., 2014). Soğuk stresi koşullarında H3K9 asetilasyonunun artması ve DNA metilasyonu ile H3K9 dimetilasyonunun azalması sonucunda sentromer ve telomerlerin yakınında bulunan tekrarlı dizilerin baskılandığı belirlenmiştir (Hu et al., 2012). Li et al., (2014) histon asetilasyonu ve *ZmHATB* ve *ZmGCN5* gen ifadesi arasındaki bağlantının ortaya çıkartılması için *HATB* ve *GCN5* transkript seviyelerini incelemiştir. Tuz uygulamasından 96 saat sonra mısır bitkisinde *HATB* ve *GCN5* histon asetiltansferaz gen ifadelerinin indüklendiği gözlenmiştir. *ZmHATB* gen ifadesi 96 saat sonra, *ZmGCN5* gen ifadesi ise 4 saat sonra en yüksek seviyelerine ulaşmıştır (Li et al., 2014). *GCN5* ve *ADA2* genleri hasar görmüş mutant *Arabidopsis* bitkilerinde soğukla uyarılan genlerin mRNA seviyelerinin azaldığı ve buna bağlı olarak soğuk stresine toleransın azaldığı kaydedilmiştir (Vlachonasios et al., 2003).

Histon deasetilasyonu gen ifadesini susturur ve kromatini baskılar. Ökaryotlarda histon deasetilazlar RPD3/HDA1, SIR2 ve HD2 olmak üzere üç

temel aileye ayrılır (Pandey et al., 2002). Memeli histonları, yapısında mSin3A ve NuRD proteinlerini bulunduran kompleksler tarafından deasetillenir (Knoepfler and Eisenman, 1999). Deasetilaz kompleksleri, HMG (high mobility group proteins) ve transkripsiyon faktörleri ile beraber aktivite gösterir. *Arabidopsis*'de HDC1 (histone deacetylase complex1), HDA6, HDA19 ve AtSin3 (Swi-Independent3) proteinleri bir histon deasetilaz kompleksini meydana getirir (Perrella et al., 2013). *Arabidopsis*'de HDA19 ve HDA6 histon deasetilazları jasmonik asit ve patojenlere yanıt, tohum çimlenmesi ve tuz stresi yanıtlarında yer alır (Zhou et al., 2005). *Arabidopsis*'de HDA19 histon deasetilazı AtERF3, AtERF4 ve AtERF7 transkripsiyon baskılayıcıları ile birleşerek abiyotik strese yanıt genlerinin ifadesini düzenler (Song et al., 2005). *Arabidopsis*, çeltik, arpa ve domates bitkilerinde HD2A, HD2B, HD2C ve HD2D bitkilere özgü HD2-tip histon deasetilazlardır (Pandey et al., 2002; Demetriou et al., 2009). *Arabidopsis*'de HD2A, HD2B ve HD2C histon deasetilazları gen ifadesini baskılar. Bitkilere özgü histon deasetilazlar (HD2A, HD2B, HD2C) tohum gelişimini düzenler. HD2A, HD2B ve HD2C histon deasetilazları *Arabidopsis*'de somatik embriyogenez sürecinde ovül, embriyo, sürgün apikal meristemleri ve primer yapraklarda ifade olur (Zhou et al., 2004). Çeltikte histon deasetilaz genlerinin bitki hormonları ve abiyotik streslerden etkilendiği gösterilmiştir. Çeltikte ABA uygulaması *HDT701*, *HDT702*, *SRT701* ve *SRT702* genlerinin ifadesini baskılar. Soğuk, mannitol ve tuz stresleri de *SRT701* ve *SRT702* genlerinin ifadesini baskılamaktadır (Fu et al., 2007). Mısır bitkisinde soğuk stresi uygulaması, histon deasetilazları kodlayan genlerin ifadesini uyarır, H3 ve H4 histon deasetilasyonu gerçekleşir (Hu et al., 2011). *Arabidopsis*'de ABA, *AtHD2C* gen ifadesini baskılar. *AtHD2C* genini yüksek düzeyde ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkileri ABA'ya duyarsız özellikte bir fenotip göstermektedir. Bu bitki hatları tuz ve kuraklık streslerine yaban tip bitkilerden daha dayanıklıdır. Transgenik bitkilerde LEA-benzeri ABA-yanıt genlerinin (*RD29B* ve *RAB18*) ifadesinin artması ve *ABI2*, alkol dehidrogenaz 1 (*ADH1*), *SKOR* (K outward rectifier), *KAT1* ve *KAT2* (K inward rectifier) genlerinin ifadesinin azalması tuz ve kuraklık streslerine toleransı arttırmıştır (Sridha and Wu, 2006). Abiyotik stres ve ABA yanıtlarında histon asetilasyonunun rolü *hos15-1* (for high expression of osmotically responsive genes) mutantının genetik

analizi sonucu anlaşılmıştır (Zhu et al., 2008). HOS15, insanda bulunan TBL1 (transducin beta-like protein-1) WD-40 repeat proteinine benzer bir proteini kodlar. Bu protein, histon deasetilasyonunda görevli kromatin baskılayıcı bir komplekstir. *Arabidopsis*'de HOS15 proteini histonlardan asetil gruplarını uzaklaştırarak soğuk stresine toleransı sağlayan genlerin ifadesini baskılar (Zhu et al., 2008). *Hos15-1* mutantları ABA ve NaCl streslerinin çimlenmeyi engellemesine karşı çok hassastır. ABA, soğuk ve tuz uygulamaları *HOS15* ifadesini arttırmıştır. *Arabidopsis*'de HOS15, H4 histonu ile etkileşime girer. Soğuk stresi uygulanan *hos15* mutant bitkilerde H4 asetilasyon düzeyleri ile birlikte *RD29A* gen ifadesi de yaban-tıp bitkilerden daha yüksektir. Sonuç olarak ABA'nın HOS15 ifadesini arttırarak ABA'ya ve abiyotik strese cevabı düzenlediği düşünülmektedir (Zhu et al., 2008). Soğuk stresi uygulanan mısır bitkilerinde H3 ve H4 deasetilasyonu ve histon deasetilaz gen ifadesi artar (Hu et al., 2011). Mısır bitkisinde soğuk stresi ile tetiklenen *ZmDREB1* ve *ZmCOR413* genleri histon deasetilaz inhibitörü (Trichostatin A) tarafından baskılanır. Histon deasetilazların ABA-bağımlı gen ifadesine etkisinin tespit edilmesi amacıyla ABA, tuz ve kuraklık stresleri tarafından tetiklenen ancak soğuk stresinden etkilenmeyen *ZmDBF1* ve *rab17* genleri incelenmiş ve analizler sonunda bu genlerin TSA inhibitörünce baskılanmadığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar histon deasetilazların soğuk koşullarında gen ifadesini ABA sinyal yolundan bağımsız bir şekilde düzenlediğini göstermektedir (Hu et al., 2011). Mısır histon deasetilaz 19 (*hda19*) mutant fidelerinin hedef genlerinde H3K9ac seviyelerinin artması aktif gen transkripsiyonunu arttırmaktadır (Zhou et al., 2010). *A. thaliana athd1-t1* mutant bitkilerinde *AtHD1* (*AtHDA19*) geninin gelişim genleriyle ilişkisi ve histon asetilasyon seviyeleri ChIP, microarray ve immüno blot denemeleriyle analiz edildi (Tian et al., 2005). Homozigot *athd1-t1* bitkileri yaban tip bitkilerle geri çaprazlanarak heterozigot bitkiler elde edilmiş ve bu bitkilerde histon asetilasyonu düzeyleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Homozigot bitkilerde H4-tetra (lizin), H4K12 ve H3K9 asetilasyon seviyeleri 1,5-4 kat daha yüksek bulunmuştur, heterozigot bitkilerde asetilasyon seviyelerinin azalması histon asetilasyon/deasetilasyon reaksiyonlarının tersinir özellikte olduğunu kanıtlar. *athd1-t1* mutant yapraklarında Cu-Zn süperoksit dismutaz (CSD2) ve P glikoprotein (PGP1) genlerinde H4K12 asetilasyonu düzeylerinin yaban tip

bitkilerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Tian et al., 2005). H4-tetra (lizin) ve H3K9 asetilasyonları genlerin 500 bp'lik promotor bölgelerine özgüdür ve *AtHD1* geni tarafından modifiye edilir. *athd1-t1* bitkilerin yapraklarında *No apical meristem (NAM)* ve *glutasyon transferaz (GST)* gen ifadeleri baskılanır (Tian et al., 2005). *HDT701* genini (bitkilere özgü histon deasetilazı) yüksek düzeyde ifade eden çeltik bitkisinde giberellin biyosentez genlerinden *GA3ox1*, *GA3ox2* ve *GA3ox3*'ün H4 asetilasyon seviyelerinin düştüğü saptanmıştır. Mutant bitkilerin tohumları ABA, tuz ve PEG uygulamalarına karşı hassas olmasına karşın çeltik fidelerinin tuz ve PEG streslerine karşı dirençli olduğu saptanmıştır (Zhao et al., 2015).

Kromatin paketlenmesini gevşeten H3 histon asetilasyonu çiçeklenme ve soğuk stresine direnç gibi süreçlerde de görev almaktadır (Zhu et al., 2008; Kumar Dhar et al., 2014). Tütün ve *Arabidopsis* bitkilerinde kuraklık stresi; *RD29B*, *RD20*, *At2g20880* genlerinin kodlanan bölgelerinde H3K23 (H3 histonu 23. lizin) ve H3K27 (H3 histonu 27. lizin) asetilasyon düzeylerinde artışa neden olmuştur (Kim et al., 2008). Tsuji et al. (2006), su altında bırakılan çeltik bitkilerinde H3K4me3 ve H3 asetilasyonunun *alkol dehidrogenaz1 (ADH1)* ve *piruvat dekarboksilaz1 (PDC1)* genlerinin ifade düzeylerine olan etkilerini gösteren bir çalışma yapmıştır. Buna göre, *ADH1* ve *PDC1* genlerinde H3 asetilasyon seviyesi yükselmeden önce H3K4me2 modifikasyonunun H3K4me3'e dönüştüğü belirlenmiştir. Stres uygulamasından 12 saat sonra H3 asetilasyon seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. *ADH1* ve *PDC1* genlerinde histon asetilasyonundan önce transkript düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Literatürde histon asetilasyonu ve metilasyonu süreçlerinin birbirleri ile ilişkili olduğunu gösteren çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; ABA ve tuz stresi uygulamaları ABA ve abiyotik strese yanıt genlerinde (*DREB2A*, *RD29A*, *RD29B*) H3K9K14 asetilasyonu ve H3K4 trimetilasyonunu teşvik etmesine karşın H3K9 dimetilasyonunu azaltır (Chen et al., 2010). Araştırmacılar, *Arabidopsis hda6* mutantlarına dışarıdan ABA ve tuz uyguladıklarında H3K4me3 seviyelerinin azaldığını saptamışlardır. H3K4 trimetilasyon sürecinin işleyebilmesi için HDA6 (histon deasetilaz) proteininin gerekli olduğu öngörülmektedir (Chen et al., 2010). Literatürde çiçeklenme ve vernalizasyon süreçlerinde gen ifadesinin

düzenlenmesinde H3K4me3 ve H3K9ac seviyelerinin birlikte görev aldıkları bilinmektedir (Sung and Amasino, 2005; Dennis and Peacock, 2007). Yüksek tuz konsantrasyonları uygulanan *Arabidopsis hdc1* mutantlarında *ABA1*, *ABA3* ve *RAB18* genlerinin ifadesi uyarılır (Perrella et al., 2013). HDC1 genini yüksek düzeyde ifade eden bitkilerde ise tuz koşulları *ABA1*, *RAB18* ve *RD29A* gen ifadeleri baskılanmaktadır (Perrella et al., 2013). Soya fasulyesinde tuz stresi uygulaması H3K4me3 ve H3K9ac seviyelerinin artmasına ve buna bağlı olarak *AP2/EREB*, *bZIP*, *NAC* ve *MYB* transkripsiyon faktörlerinin ifadesinin indüklenmesine neden olmuştur (Song et al., 2012). Memelilerde nikel ve bakır gibi ağır metaller histon asetilasyonunu engelleyerek gen ifadesini baskılamaktadır (Kang et al., 2004). Nikel, H4 histonunun N-terminal kuyruğunda yer alan 18. histidine bağlanarak histonun asetillenmesini engellemektedir (Zoroddu et al., 2002). Memelilerde toksik düzeylerin altında nikel uygulaması H4 histonu 12. lizinin, mayada ise H4 histonu 4. lizinin asetilasyon düzeylerini düşürür (Broday et al., 2000). Memeli hücrelerinde gen ifadesinin baskılanması H4 histonu asetilasyonunun baskılanması ile birlikte DNA metilasyonunun aktifleşmesi ile de bağlantılı olabilir (Broday et al., 2000).

Bitkilerde abiyotik stres koşullarında DNA metiltransferaz ve histon deasetilazların ne şekilde etkileşime girdikleri hala bilinmemektedir (Luo et al., 2012). Literatürde özellikle kromatin yapısını etkileyen histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu arasındaki etkileşimler, üzerinde araştırma yapılan bir konudur. Bu etkileşimlerin keşfedilmesi bitkilerde abiyotik strese yanıt süreçlerinin anlaşılmasına önemli bir katkı sağlayacaktır.

1.3.2. Histon metilasyonu

Histonların lizin ve arjinin amino asitleri metillenmektedir. Histon metilasyonu konusunda yapılan ilk çalışmalarda H3 histonu 4., 9., 27. ve 36. lizin ve H4 histonu 20. lizin amino asitlerinin metillendiği tespit edilmiştir (Zhang and Reinberg, 2001). H3 histonu lizin metilasyonu en çok rastlanan modifikasyon tipidir (Kumar-Dhar et al., 2014). Tüm genom düzeyinde yapılan analizlerde H3K4 metilasyonunun *Arabidopsis* genlerinin 2/3'sini kapsadığı saptanmıştır (Zhang et al., 2009). Çeltik bitkisinde iki kromozom üzerinde yapılan analizlerde,

protein kodlayan genlerin %50'sinde H3K4 dimetil ve trimetil gruplarının bulunduğu tespit edilmiştir (Li et al., 2008). H3 histonunun lizin amino asitlerine bir, iki veya üç metil grubunun eklenmesi gen ifadesinin baskılanmasına veya aktivasyonuna neden olur (Kumar Dhar et al., 2014). H3K9 metilasyonu heterokromatin için çok gerekli bir modifikasyon tipidir. *Arabidopsis*'in çeşitli lokuslarında H3K9me'nin heterokromatine bağlı gen ifadesinin baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Gendrel et al., 2002). Heterokromatini temsil eden H3K9 metilasyonu diğer modifikasyonlarla bir araya gelerek gen ifadesini baskılar (Kumar Dhar et al., 2014; Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002). H3K9 dimetilasyonu heterokromatin, transpozon, pseudogenler ve tekrar bölgelerinde bulunur (Bernatavichute et al., 2008). H3K9 dimetilasyonu transpozonların ve perisentromerik heterokromatinde yoğun olarak bulunan tekrar dizilerinin susturulmasında önemli bir rol oynar (Lippman et al., 2004; Zhang 2008). Bitkilerde H3K9 metilasyon seviyesinin yükselmesi gen ifadesinin baskılanmasının sürdürülmesi için yeterli değildir. *Arabidopsis*'de yapılan sitolojik çalışmalarda yoğun heterokromatik bölgelerin sitozin metilasyonu ve H3K9me açısından zengin olduğu tespit edilmiştir (Probst et al., 2003). Bu epigenetik işaretler heterokromatinin yoğunlaşması için gereklidir (Probst et al., 2003). Mayada ve memelilerde heterokromatinin kilit bileşeni olan heterokromatin protein1 (HP1) proteini H3K9 metil işaretlerini tanır (Lachner et al., 2001). 2001 yılında *Arabidopsis*'de HP1 proteinine benzeyen LHP1 proteini keşfedilmiştir (Gaudin et al., 2001). *Lhp1* mutantlarında çiçeklenme zamanının değiştiği ve *CONSTANS*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, *AGAMOUS*, *SEPALLATA3* transkript seviyelerinin azalmasına bağlı olarak fenotipte farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir (Kotake et al., 2003).

Bitkilerde histon metilasyonu histon lizin metiltransferaz (HKMT) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Histon lizin metiltransferazlarda SET domaini bulunur (Pontvianne et al., 2010). Bitkilerde SET domaini beş sınıfa ayrılır. I. sınıf HKMT'ler H3K27 metiltransferaz aktivitesine sahiptir ve *Drosophila*'da bulunan E(Z) ile homologtur. *Arabidopsis* genomunda CURLY LEAF (CLF), MEDEA (MEA) ve SWINGER (SWN) olmak üzere üç adet E(Z)-benzeri protein kodlanır. *Arabidopsis*'de CLF (I. sınıf HKMT), SDG8 (II. sınıf HKMT) ve ATXR7/SDG25

(III. sınıf HKMT) çiçeklenme zamanının düzenlenmesinde görev alır (Zhao et al., 2005). ATXR5 ve ATXR6 IV. sınıf HKMT'ler H3K27 monometiltransferaz aktivitesi gösterir (Jacob et al., 2009). V. sınıf HKMT'ler SU(VAR)3-9 homolog (SUVH) ve SU(VAR)3-9 related (SUVR) proteinleri olmak üzere iki gruba ayrılır. In vitro aktivite analizlerinde SUVH1 ve SUVH4-6 proteinlerinin H3K9 metiltransferaz aktivitesi gösterdiği rapor edildi (Jackson et al., 2002). *Arabidopsis*'de trithorax-benzeri protein1 (ATX1) proteini H3K4'e özgü bir histon metiltransferazdır. *Arabidopsis*'de TRX homologlarının H3 histonunun 4. lizin amino asidini metillediği gösterilmiştir (Saleh et al., 2008). ATX1 proteini kuraklık stresine yanıtta görevlidir. Dehidrasyon stresi uygulanan *Arabidopsis* bitkilerinde H3K4 trimetilasyonunda meydana gelen azalma sonucu ATX1-bağımlı bir gen olan *WRKY70*'in ifadesi azalır. *Atx1* mutant bitkileri dehidrasyon stresine çok duyarlıdır (Ding et al., 2009).

Bitkilerde lizine özgü demetilaz 1 (KDM1/LSD1) ve Jumonji C (JmjC) domain-içeren proteinler olmak üzere iki tip histon demetilaz bulunur (Liu et al., 2010). H3 histonu 4. lizin amino asidinden monometil ve dimetil gruplarını uzaklaştıran LSD1 keşfedilmeden önce histon metilasyonunun geri dönüşümsüz bir süreç olduğu düşünülüyordu (Shi et al., 2005). KDM1/LSD1 ve JmjC domain proteinleri oksidatif demetilasyon reaksiyonu ile histon metilasyonunu geri dönüşüme uğratar. Bu reaksiyon için KDM1/LSD1 proteinleri flavin, JmjC domain proteinleri ise Fe(II) ve α -ketoglutarat kofaktörlerini kullanır. Bitkilerde LSD1 homologları keşfedilmiştir. *Arabidopsis* genomunda Flowering Locus D (FLD), LSD1-benzeri 1 (LDL1), LDL2 ve LDL3 olmak üzere dört tip KDM1/LSD1 histon demetilaz bulunur (Liu et al., 2010). Bitkilerde histon demetilazların gelişim süreçlerinde yer aldıkları bilinmesine karşın bu proteinlerin abiyotik strese yanıt sürecini nasıl etkilediği konusu hala açıklık kazanmamıştır (Luo et al., 2011). *Arabidopsis*'de FLD, FLC'yi baskılayarak bitkinin vejetatif fazdan reproduktif faza geçmesini sağlar (He et al., 2003).

Met1-1 ve *cmt3* (DNA metiltransferaz) mutant bitkilerde DNA (CG ve CNG) metilasyon seviyesinin düşmesi halinde H3K9 metilasyonu H3.3 varyantı ile yer değiştirir (Johnson et al., 2002). *FLC* geninin farklı bölgelerindeki histon

modifikasyonlarını ChIP metodu ile analiz eden Bastow et al (2004), vernalizasyon sürecine giren bitkilerde *FLC* geninin promotor ve ilk ekzonunda H3K9 dimetilasyon seviyesinin arttığını rapor etmiştir. Kim et al. (2012) kuraklık stresi uygulandıktan sonra iyileşme periyoduna alınan *Arabidopsis* bitkilerinde H3K4 trimetilasyon ve H3K9 asetilasyon seviyelerini incelemiştir. Araştırmacılar kuraklık stresi uygulanan *Arabidopsis* bitkisinde *RD29A*, *RD20* ve *AtGOLS2* genlerinin kodlanan bölgelerinde H3K4me3 seviyelerinin yükseldiğini ve rehidrasyon (iyileşme) koşullarına bırakılan bitkilerde ise düştüğünü tespit etmiştir (Kim et al., 2012). H3K4me3 modifikasyonunun iyileşme koşullarından sonra bile düşük seviyelerde kalması bu modifikasyon çeşidinin bir sonraki çevresel uyarana yanıtı kolaylaştıran bir stres hafızası oluşturduğunu göstermiştir (Kim et al., 2012). H3 histonunda 4. lizinde trimetilasyonun görüldüğü genlerde H3K4me2 modifikasyonunun da yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Schubeler et al., 2004). H3K4me2 ve H3K4me3 genlerin 5' ve promotor bölgelerinde, H3K4me1 ise genlerin 3' ucunda bulunur (Zhang et al., 2009). Genlerin 5' bölgesindeki H3K4 trimetilasyonu transkripsiyonel aktiviteyi sağlamaktadır. *Arabidopsis* bitkisinde H3K4me1, H3K4me2 ve H3K4me3 modifikasyonlarının genom çapında dağılımını gösteren bir çalışma yayımlanmıştır (Zhang et al., 2009). Buna göre, *Arabidopsis* genlerinin 2/3'ünün en az bir H3K4 metilasyon çeşidi barındırdığı rapor edilmiştir (Zhang et al., 2009). Literatürde maya, çeltik, *Arabidopsis* ve insanda gen ifadesinin yüksek olduğu durumlarda H3K4me3 seviyesinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir (Pokholok et al., 2005; Zhang et al., 2009). Buna karşın Alvarez-Venegas and Avramova (2005), *Arabidopsis*'de H3K4me3 modifikasyonunun her koşulda gen ifadesini etkilemediğini göstermişlerdir. H3K4me1, H3K4me2 ve H3K4me3 modifikasyonlarının stresle ilişkili genlerin yanı sıra, *Arabidopsis*'de su kıtlığı koşullarında ifadesi azalan genlerde de dağılım gösterdiği rapor edilmiştir, dehidrasyon stresi ile uyarılan genlerde H3K4 metilasyon düzeylerinin aktif kromatin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (van Dijk et al., 2010). Su kıtlığı sonucu ifadesi artan genlerde H3K4me3 seviyesi, ifadesi azalan genlerden (downregulated genes) daha yüksektir. ABA ve dehidrasyon stresi uygulanan bitkilerde H3K4 trimetilasyonu, genlerin transkripsiyon başlangıç bölgesinin 300 bp aşağı bölgesinde yoğunlaşır (van Dijk et al., 2010). *Arabidopsis*'de kuraklık

stresi H3K4me1, H3K4me2 ve H3K4me3 seviyelerinin tüm genomda değişmesine sebep olur (van Dijk et al. 2010). Kuraklık stresi uygulanan çeltik fidelerinde 4837 gende H3K4me3 modifikasyonu gösterilmiştir (Zong et al. 2012). *Arabidopsis* bitkilerinde soğuk stresi, *COR15A* ve *GOLS3* genlerinde (soğuk stresine yanıt genleri) H3K27me3 seviyelerini azaltmıştır (Kwon et al., 2009). Genlerin 5', kod ve heterokromatin ile etkileşime giren bölgelerinde H3K27me3, H3K9me3 ve H3K9me2 modifikasyonları yoluyla gen ifadesi baskılanmaktadır (Bernatavichute et al., 2008). *Arabidopsis*'de binlerce genin 5' bölgesinde yer alan H3K27me3, gen ifadesini susturan bir modifikasyondur (Zhang et al., 2007). Yapısında chromodomain bulunan polycomb (Pc) proteini H3K27 metilasyonunu tanımlar. Bu süreç sayesinde gen ifadesinde meydana gelen baskılanmanın devamlılığı sağlanır (Czernin et al., 2002). Na⁺ ön uygulaması yapılan bitkilerin kontrol grubuna göre kuraklık stresine karşı daha toleranslı oldukları tespit edilmiştir (Sani et al., 2013). Orta düzeyde tuz stresine alıştıran bitkilerin *HKT1* geninde (K⁺ taşıyıcısı) H3K27me3 düzeylerinin azaldığı ancak H3K4me2, H3K4me3 ve H3K9me2 seviyelerinin sabit kaldığı belirlenmiştir (Sani et al., 2013). H3K27 trimetilasyonun uzun süre devre dışı kalması sonucunda *HKT1* mRNA seviyesi hızlı bir şekilde yükselir. ChIP-seq tekniği ile genom düzeyinde yapılan araştırmada çok sayıda genin H3K27me3 düzeylerinde meydana gelen azalmanın somatik hafızanın oluşturulmasında önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır (Sani et al., 2013).

Memeli hücrelerinde histon demetilasyonu ve deasetilasyonu arasında bir iletişim olduğu tespit edilmesine rağmen (Shi et al., 2005) bitki hücrelerinde bu ilişkiye dair bir kanıt elde edilememiştir. Bitki hücrelerinde abiyotik strese yanıt sürecinde histon demetilazların işlevleri henüz bilinmemektedir.

1.3.3. Histon fosforilasyonu

Histonların serin ve treonin amino asitleri fosforlanır (Kallin and Zhang, 2004). H3 histonunun N-terminalinde ser10, ser28, thr3 ve thr11; H4 histonunun ser1, H2A histonunun ser1, H2AX histonu ser139 ve H2B histonunun ser14 amino asitleri fosforlanır (Kallin and Zhang, 2004). H3 histon fosforilasyonu transkripsiyon, apoptoz, DNA tamiri, hücre bölünmesi, hücre döngüsüne bağlı

kromatin paketlenmesi ve ayrılması olaylarında önemlidir (Prigent and Dimitrov, 2003). Hücre döngüsüne bağımlı olan histon fosforilasyonunun M fazında en yüksek seviyeye çıktığı bilinmektedir (Schroeder-Reiter et al., 2003; Kallin and Zhang, 2004). Histon fosforilasyonunun temel işlevinin kromozomların farklı bölgelerini belirlemek veya etiketlemek olduğu düşünülmektedir (Prigent and Dimitrov, 2003). Immunogold scanning elektron mikroskobu ile görüntülenen mitoz aşamalarında H3-ser10 fosforilasyonu metafaz aşamasında perisentromerik kromatide biriktiği tespit edilmiştir (Schroeder-Reiter et al., 2003). Mayoz I'de kromozomların tamamı fosforlanır, mayoz II aşamasında ise H3 fosforilasyonu perisentromer bölgeleri ile sınırlı kalmaktadır. Anafaz I safhasında ayrılan kromatidlerde H3 fosforilasyonu görülmez. Bitkilerde metafaz I aşamasında kardeş kromatidlerin birbirine bağlanması ve mitoz/metafaz II safhalarında kardeş kromatid perisentromerleri için H3 serin fosforilasyonu gereklidir (Gernand et al., 2003). H3 histonundaki ser10'un sentromer aktivitesiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Gao et al., 2011). H3 histonu ile karşılaştırıldığında H2A histon fosforilasyonu hakkında daha az şey bilinmektedir. Bitkilerde profaz aşamasında mitotik kromozomlarda H2A histon fosforilasyonu görülür. Mayada H2A-Ser129 fosforilasyonu DNA çift-zincir kırıklarının tamirinde gereklidir (van Attikum et al., 2004). İnsanlarda H2AX histon varyantının karboksil-ucu, fosforlanmış H2AX-Ser139 (γ -H2AX) ve maya H2A türevleri ile homologtur (Redon et al., 2002). Yüksek ökaryotlarda mayoz bölünme sürecinde γ -H2AX'in DNA zincir kırıkları ile birleştiği bilinmektedir (Che et al., 2011). Mısır *afd1* mutantının metafaz I fazında sinapsis görülmez ve kardeş kromatidler birleşemez (Golubovskaya et al., 2006, Kaszas and Cande, 2000). Dong and Han (2012), mısır-H2A histonunun maya H2A histonu ile benzer bir motif taşıdığını belirlemiştir.

Tuz stresi veya büyüme faktörlerinin uygulanması histonlardaki farklı serin/treonin bölgelerinin fosforlanmasına neden olur (Reitsema et al., 2005). H3 fosforilasyonunun bitki genlerinin transkripsiyon aktivasyonunu etkilediği tahmin edilmektedir (Li et al., 2001). *Arabidopsis* bitkilerinde soğuk, tuz ve hormon uygulamaları ATPK6/19 kinazların (*Arabidopsis* MSK homoloğu) aktivitesini arttırmıştır (Mizoguchi et al., 1995). MSK kinazlar stres koşulları altında histon

fosforilasyon sürecinde yer alan enzimlerdir (Clayton et al., 2003). Tuz ve soğuk stres uygulaması yapılan tütün BY-2 ve *Arabidopsis* T87 hücre kültürlerinde H3 ser-10 fosforilasyonu ardından H3 fosfoasetilasyonu ve H4 asetilasyon seviyelerinde artış meydana gelmiştir (Sokol et al., 2007). Ağır metal stresi de fosforilasyon seviyelerinde değişimlere neden olur. Arsenit uygulamasına yanıt olarak H3 ser10 fosforilasyon seviyelerinde hızlı bir artış rapor edilmiştir (Moggs and Orphanides, 2004).

1.3.4. Histon ubikutinasyonu

Ubikutin, 76 amino asitten meydana gelen evrimsel olarak korunan bir proteindir. Ubikutin ve SUMO gibi proteinler hedef proteinlere kovalent bağlanan modifiye edici protein ailesini meydana getirirler (Feng and Shen, 2014). Ubikutinasyon süreci proteoliz özelliği sayesinde keşfedilmiştir, daha sonraki yıllarda proteolizden bağımsız işlevleri de olduğu belirlenmiştir. Ubikutinasyon geçirdiği keşfedilen ilk histon proteini dana timusunda bulunan H2A histonudur (Goldknopf et al., 1975). H2A ve H2B histonlarında geri dönüşümlü olarak ubikutinasyon meydana gelir. Ubikutinasyon H2A histonunun 119. lizini, H2B histonunun 120. lizinde gerçekleşir. Yüksek ökaryotlarda H2A histonlarının %10'ununda, H2B histonlarının %2'sinde ubikutinasyon meydana gelir (Kallin and Zhang, 2004). Ubikutinasyon hedef proteinin biyokimyasal, moleküler veya hücre içi lokalizasyon aktivitelerinde değişiklikler meydana getirebilir. Ubikutinasyon işlemi ubikutin C-ucundan substrat proteinin lizin amino asit zincirine konjugasyonu yoluyla da gerçekleşir (Hershko and Ciechanover, 1998). Bu işlem ubikutin-aktifleştirici E1 enzimi ile başlar, aktifleşen ubikutin E2 konjugasyon enziminin sistein amino asidi ile birleşir. Son aşamada izopeptid E3 ligaz yardımıyla hedef proteinin lizin amino asidine aktarılır. H2B ubikutinasyonu transkripsiyonel aktivasyonla ilişkilendirilmiştir. Karaczyn et al.'a göre (2006) memeli hücrelerinde nikel uygulaması H2B ubikutinasyon düzeylerinde değişimlere neden olmuştur. Ke et al.'a göre (2006), çözünebilir nikel bileşenleri H2A ve H2B histon ubikutinasyon seviyelerini arttırmıştır. H2Bub1 (Monoubiquitinated H2B) maya, insan ve bitkilerde tespit edilmiştir (Weake and Workman, 2008).

Mayada H2B histon ubikutin modifikasyonları H3K4 metilasyonu ve RNA polimeraz II aktivasyonu ile birlikte gerçekleşir (Xiao et al., 2005). Mayada Bre1, genetik olarak Elongator histon asetiltransferaz kompleksi ile etkileşim içindedir. Bre1 ve Elongator komplekslerinin karşılıklı etkileşimi transkripsiyonel uzamada rol alır (Xiao et al., 2005). İnsanlarda H2B histon ubikutinasyonu Facilitates Kromatin Transkripsiyon (FACT) kompleksi ile birlikte işlev görür ve transkripsiyonel uzamayı tetikler (Laribee et al., 2007). FACT kompleksi H2B birimlerini uzaklaştırarak nukleozomun kararlılığını bozar. *Arabidopsis*'de FACT kompleksi HUB1 ile etkileşime girer (Lolas et al., 2010). H2B histon monoubikutinasyon süreci hasar gören *hub1* ve *hub2* mutant bitkilerde uzun ve kısa gün koşullarında erken çiçeklenme başlar. H2Bub1 çiçeklenme zamanını *FLC* gen ifadesini düzenleyerek kontrol eder. *hub1*, *hub2*, *hub1 hub2* ve *ubc1 ubc2* gibi erken çiçeklenen mutant bitkilerde *FLC* gen ifadesi ve *FLC* kromatininde H2Bub1 seviyesi azalmıştır (Gu et al., 2009). *FLC*, *MADS AFFECTING FLOWERING 4 (MAF4)* ve *MAF5* gibi çiçeklenme zamanını kontrol eden genler erken çiçeklenmeye neden olur (Gu et al., 2009).

Arabidopsis'de H2Bub1 mutasyonu *FLC* ve sirkadiyen saat genlerinde H3K4me3 ve H3K36me2 oluşumuna zarar verir (Himanen et al., 2012). H2Bub1 seviyelerinin artması da *FLC* kromatininde H3K36me3 oluşumunu engellemektedir (Schmitz et al., 2009). Buna karşın *Arabidopsis*'de H2Bub1 eksikliği H3K4me2/3 ve H3K36me2/3 seviyelerini neredeyse hiç etkilemez (Dhawan et al., 2009). *Hub1-1* mutant bitkilerde soğuğa alışma, ksantofil metabolizması, mikrosporogenez, çiçek ve embriyo sonrası gelişimi, protein katlanma, aromatik bileşen metabolizması, öksin ve jasmonik asit biyosentezi ve karbohidrat taşınımı ile ilgili süreçlerde yer alan genlerin ifadesi azalmıştır. HUB1 hedef genlerinin kodlanan bölgelerinde H2B histon ubikutinasyonu belirlenmiştir. H2B monoubikutinasyonu (K143) H3 metilasyonu ve H2B deubikutinasyonunu düzenlemektedir. H2B deubikutinasyon reaksiyonu SUP32/UBP26 nükleer ubikutin proteazı tarafından gerçekleştirilir. SUP32/UBP26 proteazı gen ifadesini baskılamıştır (Sridhar et al., 2007). *ubp26/sup32* mutant bitkilerinde *FLC* gen ifadesi azalmış, *FLC* kromatininde H2Bub1 seviyesi artmış ve erken çiçeklenme görülmüştür (Schmitz et al., 2009).

1.3.5. ATP-bağımlı kromatin modelleme kompleksleri

Ökaryotlarda gen ifadesinin düzenlenmesinde ATP-bağımlı kromatin modelleme kompleksleri de önemli bir yer tutmaktadır (Jerzmanowski, 2007). Bu kompleksler histon-DNA etkileşiminin kararlılığını bozar, histon oktamelerinin yerini değiştirir ve nukleozomun yapısına histon varyantlarını katarak kromatinin yapısını düzenler (Clapier and Cairns, 2009). Bu kompleksler ATP hidrolizinden gelen enerjiyi kullanır. Yüksek konsantrasyonlarda kromatin modelleme kompleksi histon oktamelerinin başka bir DNA'ya aktarılmasına neden olur. Orta düzeyde kromatin modelleme kompleksi oktamerin bulunduğu konumdan kayarak birbirine yakın nukleozomlar arasında boşluklar yaratmasına neden olur. Bu boşluklardan transkripsiyon faktörleri, restriksiyon enzimleri vs. geçebilir (Clapier and Cairns, 2009; Jerzmanowski, 2007).

ATP-bağımlı kromatin modelleme kompleksleri SWI/SNF ATPazlar, ISWI (imitation switch) ATPazlar, CHD (chromodomain and helicase-like domain) ATPazlar olmak üzere üç temel sınıfa ayrılır. CHD proteinleri SNF2-benzeri ATPaz ailesine aittir (Hall and Georgel, 2007). Bu proteinler kuraklık, tuz ve sıcaklık streslerine yanıtta, çimlenme ve büyüme süreçlerinde görevlidir. SWI/SNF komplekslerinden SNF2 ATPazı ilk defa mayada Peterson and Herskowitz tarafından 1992 yılında keşfedilmiştir. *Arabidopsis* genomunda kırktan fazla SNF2-benzeri protein mevcut olmasına rağmen bunlardan sadece pickle, ddm1, mom, splayed proteinlerinin fonksiyonu bilinmektedir. SWI/SNF kompleksi çok alt birimli DNA'ya bağlanan bir ATPazdır ve kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesinin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (Schwabish and Struhl, 2007). AtCHR12 genini (SNF2/Brahma-tip kromatin-modelleme proteini) yüksek düzeyde ifade eden *Arabidopsis* mutant bitkilere kuraklık, sıcaklık ve tuz stresleri uygulandığında primer tomurcukların büyümesi durur ve primer gövde büyümesi azalır (Mlynarova et al., 2007). AtCHR12 proteini, stres koşullarında geçici olarak büyümenin durmasına neden olmaktadır.

ATP-bağımlı kromatin modelleyici kompleksler ABA-bağımlı stres cevapları ile de ilgilidir. *Arabidopsis* 'de çimlenme ve büyüme süreçlerinin ABA-aracılığıyla baskılanması, SWI/SNF kompleksinin bir alt birimi olan SWI3B

tarafından pozitif olarak düzenlenir (Saez et al., 2008). SWI3B, ABA sinyallemede negatif düzenleyici olarak rol alan HAB1 proteini ile etkileşime girmektedir. *swi3b* mutantlarında ABA-aracılığıyla gerçekleşen çimlenme ve büyüme baskılanması olaylarına karşı daha az duyarlıdır. Mutant bitkilerde *RAB18* ve *RD29B* gibi ABA yanıt genlerinin ifadesinin azalması SWI3B ve ABA sinyallemesi arasındaki pozitif ilişkiyi gözler önüne serer (Saez et al., 2008). ChIP analizlerine göre *RD29B* ve *RAB18* promotorlarının yakınında bulunan HAB1, ABA tarafından ortadan kaldırılır. ABA ve kuraklık stresi uygulanan *Pisum sativum* bitkisinde *PsSNF5* gen ifadesi tetiklenmiştir. PsSNF5, çimlenen embriyolarda ve vejetatif dokularda bulunan kromatin modelleyici bir proteindir (Rios et al., 2007).

UV-B stresi uygulanan mısır bitkilerinin hedef genlerinde SWI2/SNF2 seviyesi artmıştır (Casati et al., 2008). Jing et al. (2013), PKL/EPP1'in (CHD3 kromatin modelleme faktörü) ışık sinyalinde önemli bir baskılayıcı olduğunu tespit etmiştir. Bir E3 ubiquitin ligaz olan COP1; HY5, HYH, LONG AFTER FAR-RED LIGHT1 ve LONG HYPOCOTYL IN FAR RED1 gibi fotomorfogenezin pozitif düzenleyicilerini hedefleyerek translasyon sonrasında parçalar (Lau and Deng, 2012). COP1 ve PKL/EPP1, HY5 ile etkileşime girerek fotomorfogenez baskılar. ATP-bağımlı kromatin modelleme kompleksi olan PKL/EPP1, HY5 hedef genlerin histon modifikasyonu örüntülerini değiştirir. Jing et al. (2013) tarafından önerilen modele göre, PKL/EPP1 H3K27me3 modifikasyonunu baskılayarak hedef genlerin ifadesinin gerçekleşmesini sağlar ve böylece karanlıkta hipokotil uzaması meydana gelir.

1.4. Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) ve Yabani Pancar (*Beta maritima* L.) Hakkında Bilgi

Beta vulgaris (şeker pancarı) *Chenopodiaceae* ailesine ait bir glükofittir (Ghoulam et al., 2002). *Caryophyllales* ordosuna mensup olan bitkide $2n=18$ kromozom bulunur ve 714-758 megabaz genom boyutuna sahiptir. Şeker pancarı ve yabani pancar fakültatif çok yıllık bitkilerdir, doğal koşullar altında bir veya iki yıllık çiçeklenme davranışı gösterirler. Şeker pancarı iki yıllık yaşam döngüsünün

birinci yılında vejetatif kalır ve fotosentez ürünlerine kaynak olan yaprak rozeti geliştirir. Asimilatlar sukroz olarak taşınır (Elliott and Weston, 1993). Flöemde taşınan sukrozun büyük bir kısmı kazık kökte biriktirilir. Pancar Roma döneminden beri yetiştiriliyor olmasına rağmen şeker pancarı tarımı daha yakın bir dönemde başlamıştır. 18. yüzyılın sonlarında yem pancarı ile pazı bitkileri çaprazlanarak şeker pancarı elde edilmiştir. (Fischer, 1989). Son 200 yıllık dönemde şeker pancarı ıslah çalışmalarında depo kökten elde edilen şeker miktarı %8'den %18'e yükselmiştir. Şeker pancarı dünyanın yıllık şeker ihtiyacının %30'unu karşılar (Dohm et al., 2014). Türkiye şeker pancarı üretiminde dünyada dördüncü Avrupa'da üçüncü sırada yer almaktadır.

B. vulgaris Avrupa, Asya ve Amerika'da yayılış gösteren, şeker üretiminde önemli bir yeri olan, biyoetanol kaynağı ve hayvan yemi olarak kullanılan önemli bir tarım bitkisidir (Dunajska-Ordak and Tyburski, 2014; Bor et al., 2003). Kültür pancarının yabani akrabası olan *Beta maritima* L. kıyusal bölgelere, tuzlu bataklıklara, Akdeniz'in terk edilmiş tuzlu alanlarına ve Kuzey Avrupa'da ki tuzlu bölgelere uyum sağlamıştır (Bor et al., 2003). Şeker pancarının kökeni *B.maritima*'ya dayanır (Clarke et al., 1993). Şeker pancarı ile melezlenen deniz pancarı (*B.maritima*) biyotik ve abiyotik streslere direnç amacıyla kullanılan önemli bir kaynaktır (Biancardi, 2012). Çalışmamızda *B. vulgaris* ve tuza toleranslı akrabası *B. maritima* kullanıldı.

Bazı araştırmacılara göre şeker pancarı çimlenme ve fide aşamalarında tuz stresine duyarlı bir bitkidir (Bor et al., 2003; Dunajska-Ordak and Tyburski, 2014; Mostafavi, 2012). Şeker pancarı derin bir kök sistemine sahip olmasına rağmen su kaybı yapraklarının solmasına neden olur (Clarke et al., 1993). Şeker pancarı varyetelerinin tuza tolerans kabiliyetleri birbirinden farklıdır (Ghoulam et al. 2002; Bor et al., 2003). Şeker pancarı yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabildiği ve 500 mM'dan fazla NaCl düzeylerine dayanabildiği için tuza toleranslı bir tür olarak da kabul edilir (Wakeel et al., 2011). *B. vulgaris* tonoplastlarında Na^+/H^+ exchange (NHX) aktivitesinin yüksek olması bu bitkinin tuza toleranslı bir tür olduğunu düşündürmektedir (Pantoja et al., 1990). Şeker pancarında glisin betain ve prolin gibi ozmotik düzenleyici moleküller yüksek

düzeylerde biriktirilir. Ayrıca şeker pancarı Na^+ ve Cl^- iyonlarını da sitosol ve vakuolde biriktirerek ozmotik potansiyelini korur (Pakniyat and Armion 2007; Ghoulam et al., 2002). Glisin betain birikimi *Chenopodiaceae* familyasının tipik bir özelliğidir. Şeker pancarı köklerinde stres sonrasında glisin betain ve α -amino bileşenleri yüksek miktarda birikmektedir (Clarke et al., 1993).

İklim değişikliği ve çevresel stres koşulları kuraklık, tuz, yüksek sıcaklık ve sel gibi faktörlere uyum sağlayabilen tarım bitkilerine olan ihtiyacı arttırmaktadır (Mickelbart et al., 2015). Kuraklık stresine bağlı yıllık şeker üretim kaybı 141.000 ton (27,9 milyon dolar kayıp) olarak belirlenmiştir (Pidgeon and Jaggard, 1998). Su kıtlığı nedeniyle Orta Avrupa'da şeker pancarı verim kayıpları 1961-1995 yılları arasında %15-30 oranları arasındadır (Pidgeon et al., 2001).

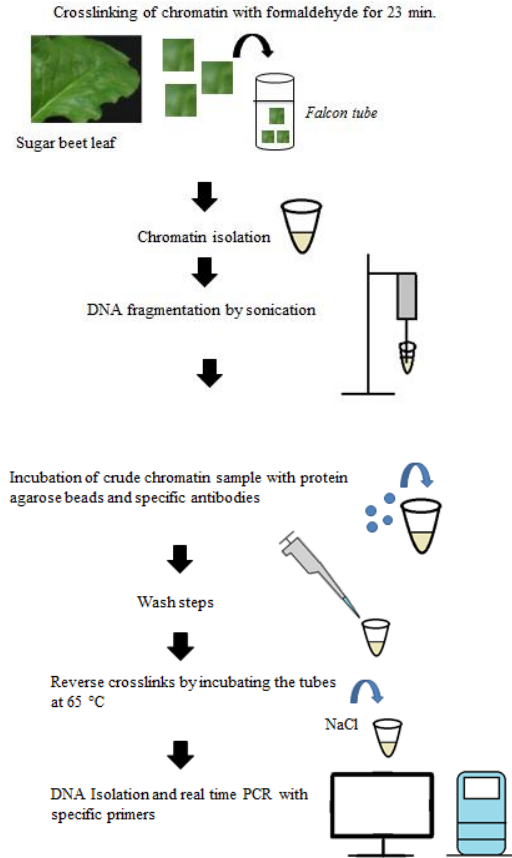
Model bitkilerden elde edilen bilgiler abiyotik strese yanıt ve tolerans mekanizmalarını daha iyi anlamamıza olanak sağlamasına rağmen bu süreçlerin model bitkiler haricindeki tarım bitkilerinde de çalışılması büyük önem taşımaktadır (Hirayama and Shinozaki, 2010). Bununla birlikte kromatin modifikasyonları ve yeniden modelleme çalışmaları da daha çok *Arabidopsis*, tütün, domates, çeltik ve mısır gibi model bitkiler üzerinde yapılmaktadır (Yuan et al., 2013). Tarım bitkilerinin yabani akrabaları sert iklim koşullarına uyum sağlamaları nedeniyle araştırmalarda kullanılır (Sairam and Tyagi, 2004). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda doğal popülasyonların stres koşullarına uyumunun genetik ve epigenetik varyasyonlar arasındaki etkileşime bağlı olduğu saptandı (Grativol et al., 2012). Şeker pancarı ekonomik öneme sahip bir bitki olmasına karşın bu bitkinin abiyotik streslere karşı verdiği yanıtlar ve tuz stresine karşı gösterdiği toleransla ilişkili mekanizmalar detaylı olarak bilinmemektedir (Dunajska-Ordak and Tyburski, 2014). Çalışmamızda önemli bir tarım bitkisi olan şeker pancarında antioksidan enzimleri kodlayan genlerin histon asetilasyonuna bağlı düzenlenmesi incelendi. Şeker pancarı ve yabani pancarda abiyotik streslere yanıt sürecinin ve strese-tolerans mekanizmalarının incelenmesi, tuz stresine yanıtta histon asetilasyonunun rolünün anlaşılması tarımsal üretim ve verimin artırılması açısından önemlidir.

1.5. ChIP (Kromatin İmmünopresipitasyonu) Yöntemi

DNA-protein etkileşimlerinin incelenmesi için geliştirilen yöntemler DNA replikasyonu, rekombinasyon, DNA tamiri ve transkripsiyon çalışmalarında merkezi bir öneme sahiptir (Saleh et al., 2008). Histon modifikasyonları ve epigenetik alanında çalışan laboratuvarlarda en yaygın kullanılan yöntem kromatin immünopresipitasyonudur (ChIP). Tarihte ChIP metodu ilk defa 1984 ve 1985 yıllarında Gilmour and Lis tarafından *Drosophila* ve *Escherichia coli* türlerine uygulandı. Bitkilerde ChIP metodu ilk defa *Arabidopsis thaliana*'da histon varyantlarının nukleus içi dağılımının haritalanmasında kullanılmıştır (Ascenzi and Gantt, 1999). Bitkilerde yapılan ilk ChIP çalışmalarında *Drosophila* ve maya organizmaları için kullanılan ChIP yöntemleri, yapılan modifikasyonlarla model bitki *Arabidopsis*'e uygulanmıştır. Sert hücre duvarları, yüksek miktarda selüloz, lignin ve geniş vakuoller gibi bitki hücrelerini hayvan hücrelerinden ayıran anatomik farklılıklar bitki hücrelerine uygulanan ChIP metoduna çeşitli sınırlamalar getirir (Saleh et al., 2008). Bitki hücrelerinde DNA-protein çapraz bağlanmasını sağlayan çözeltinin hücre içine emilimini sağlamak için vakum infiltrasyonu uygulanır (Ascenzi and Gantt, 1999). Olgun bitki hücrelerinde geniş vakuollerin varlığı bir gram dokudan az miktarda nukleus elde edilmesine neden olur. Müntz'e göre (2007), vakuoller proteolitik aktivite kaynağı olmaları nedeniyle izolasyon prosedürü dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmeli ve sağlıklı taze yapraklar kullanılmalıdır. Bu nedenle çalışmamızda ChIP prosedürü için her hasat gününde taze ve sağlıklı yapraklar kullanıldı. Dondurulmuş yaprak örneklerinin formaldehidin işlev görmesini engellediği tarafımızca tespit edildi. Chua et al. (2001) plastosiyanin geninde (*PetE*) H3 ve H4 histon asetilasyon durumunun belirlenmesinde bezelye bitkisine ChIP metodunu uyguladı.

ChIP, hedef DNA dizilerinde yer alan özel protein bölgelerinin bu proteinlere özgü antikorlar ile belirlenmesine dayanan bir yöntemdir (Haring et al., 2007). İlk aşamada yapraklara formaldehit çözeltisi uygulanarak DNA-protein yapısının korunması sağlanır. Ardından sırasıyla kromatin izole edilir, DNA parçalara ayrılır, kromatin protein kompleksi ve antikorlarla muamele edildikten sonra DNA izolasyonu ve real time-PCR uygulamaları yapılır (Haring et al.,

2007). ChIP yöntemi aşamaları şekil 1.4’de gösterilmektedir. ChIP güçlü bir yöntem olmasına rağmen kendisine özgü birtakım dezavantajlara da sahiptir (Saleh et al., 2008). Örneğin her histon modifikasyonuna ve histon proteinine özgü antikorların kullanılmasının gerekliliği, çapraz bağlanma aşamasında epitopun kararsızlığı veya antikorun bağlanma düzeyinin düşük olması yanlış veya negatif sinyallerin görülmesine neden olur (Saleh et al., 2008). Çalışmamızda literatürdeki *Arabidopsis*, mısır, domates, çeltik gibi model bitkilere özgün ChIP yöntemleri modifiye edilerek pancar bitkisine uygun ChIP yöntemi ilk defa çalışma grubumuz tarafından geliştirilerek kullanılmıştır (Haring et al., 2007; Saleh et al., 2008; Bowler et al., 2004).

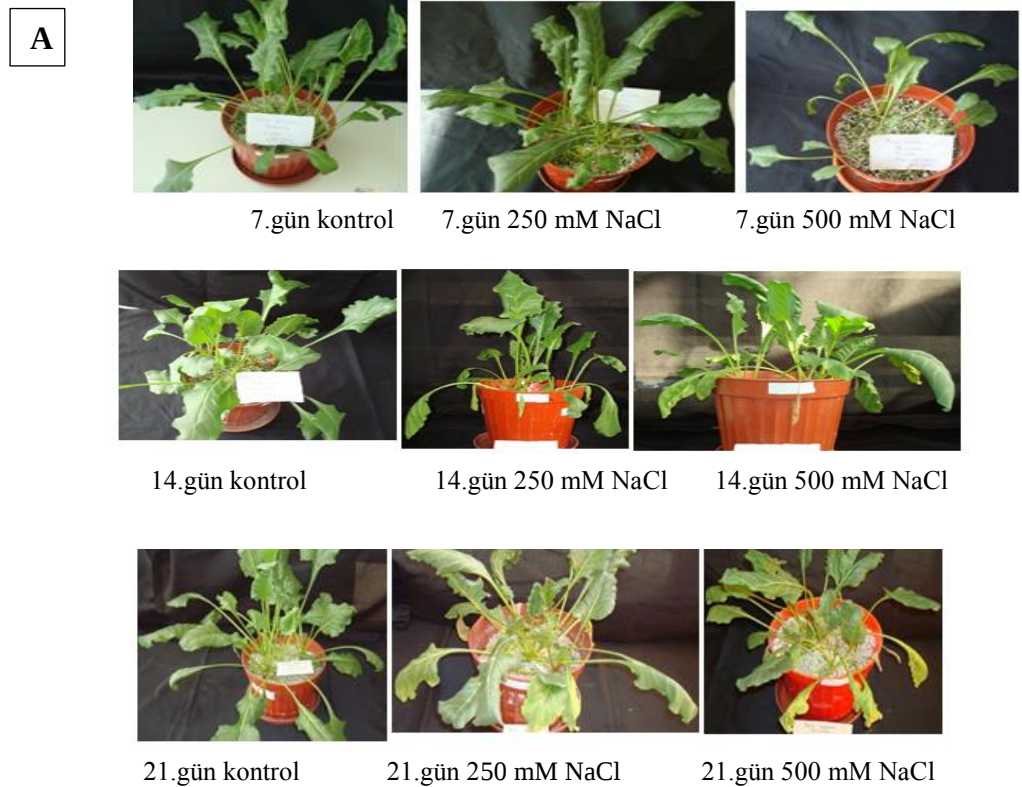


Şekil 1.4. Pancar bitkisine özgü ChIP metodu aşamalarının özet gösterimi. Pancar yaprakları steril su ile iki kere yıkandıktan sonra kromatin, %1 formaldehit çözeltisinde çapraz bağlanır. Kromatin izolasyonu ve sonikasyon aşamalarından sonra kromatin karışımına agaroz toparlar ve antikor eklenir. İmmün komplekslerin agaroz toparlardan ayrıştırılması için yıkama tamponları kullanılır. Kromatin çapraz bağları bozularak DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilir. Antioksidan genlere özgü primerlerle gerçekleştirilen real time-PCR işlemi ile histon modifikasyonlarının seviyesi yorumlanır

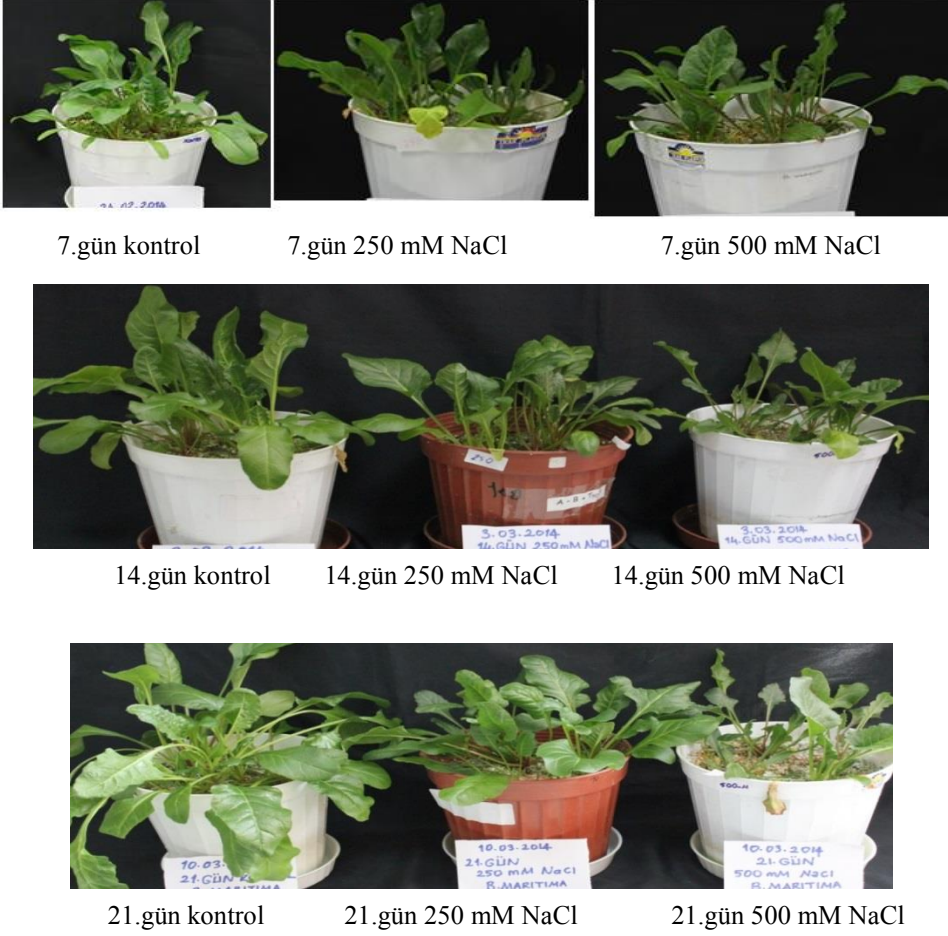
2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitki Yetiştirme ve Tuz Stresinin Uygulanması

Projemizde bitkisel materyal olarak şeker pancarı enstitüsünden gönderilen *Beta vulgaris Felicita* varyetesiine ait tohumlar ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *Beta maritima* tohumları kullanıldı. Tohumlar çimlendirildikten sonra perlite aktarıldı ve tuz stresi uygulaması bitkiler 40 günlük olduktan sonra iki farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi (250 ve 500 mM NaCl). Stres uygulaması öncesinde ve sonrasında bitkiler $\frac{1}{2}$ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisi (Hoagland and Arnon, 1950) ile gün aşırı sulandı. Tuz stresi uygulaması 250 ve 500 mM NaCl içeren Hoagland çözeltisi ile bitkiler sulanarak yapıldı. Tuz stresi uygulamasının 0., 7., 14., 21. günlerinde bitki yapraklarından örnekleme yapıldı. Örneklerde büyüme parametreleri, ozmotik potansiyel, RWC, Fv/Fm değerleri ölçüldü ve ChIP analizi yapıldı. Diğer analizler için sonradan kullanılmak üzere yaprak örnekleri sıvı azotta hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'de saklandı. 250 ve 500 mM NaCl stresinin 7., 14. ve 21. hasat günlerine ait *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitki fotoğrafları sırasıyla şekil 2.1 A ve B'de gösterilmektedir.



B



Şekil 2.1. A) 250 ve 500 mM NaCl stresinin 7., 14. ve 21. hasat günlerine ait *B. vulgaris* bitki fotoğrafları. **B)** 250 ve 500 mM NaCl stresinin 7., 14. ve 21. hasat günlerine ait *B.maritima* bitki fotoğrafları.

2.2. Kök, Gövde Uzunlukları ve Bağlı Büyüme Hızı (RGR)

Deneme serilerinde 0., 7., 14. ve 21. günlerde 0, 250 ve 500 mM tuz uygulanan bitki gruplarının kök ve gövde uzunlukları ve yaş ağırlıkları belirlenerek kaydedildi (n=6). Tuz stresi uygulamasının 0., 7., 14., 21. günlerinde kök, gövde yaş ağırlıkları tartıldı. 80 °C’de 72 saat kurutulan kök ve gövde örneklerinin kuru ağırlıkları ölçüldü. Bitkilerin bağlı büyüme hızları kök, gövde yaş ve kuru ağırlıkları kullanılarak Hunt et al.’un (2002) önerdiği programa göre hesaplandı.

2.3. Klorofil Flüoresans (F_v/F_m) Ölçümleri

Klorofil flüoresans ölçümleri, tuz uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde yapıldı. Flüoresans ölçümlerinden önce, yaprak üst yüzeyindeki 1 cm²'lik alan 20 dk boyunca yaprak klipsleri kullanılarak karanlığa alıştırıldı. Plant Efficiency Analyser cihazı (Hansatech) kullanılarak maksimum flüoresans uyarılması (F_m), F_o (basal non-variable chlorophyll fluorescence level), değişken flüoresans (F_v) ve F_v/F_m oranları (PSII fotokimyasal etkinliği) belirlendi (n=6).

2.4. Yaprak Ozmotik Potansiyeli

Tuz uygulamasının 0., 7., 14., 21. günlerinde kontrol ve tuz gruplarına ait yaprakların (n=6) ozmotik potansiyeli Vapro Vapor pressure Osmometer 5520 cihazı ile ölçüldü. Osmotik potansiyel değerleri mmol kg⁻¹ biriminden MPa birimine çevrildi (Santa-Cruz et al., 2002).

2.5. Bağlı Su İçeriği (RWC)

Yapraklardaki bağlı su miktarını belirlemek için tuz uygulamasının 0., 7., 14., 21. günlerinde bitkilerin önce yaprak yaş ağırlıkları (YA) tespit edildi (n=6). Daha sonra bu yapraklar turgorlu hale gelebilmeleri için 5 saat süre ile oda sıcaklığında deiyonize suda bekletildiler. Yaprakların fazla suyu alındıktan sonra turgorlu ağırlıkları (TA) ölçüldü. Bu işlemin ardından, yapraklar 72 saat boyunca 80 °C'lik etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları (KA) belirlendi. RWC değerleri $RWC\% = [(YA-KA)/(TA-KA)] \times 100$ formülüne göre hesaplandı (Smart and Bingham, 1974).

2.6. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı Madhava Rao and Stresty (2000)'e göre ölçüldü. TBARS (TBA reactive substances) thiobarbiturik asit reaksiyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonu ürünüdür. 0,5 g yaprak örneği %0,1 trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edildi. Homojenat 5 dk 10.000xg'de santrifüj edildikten sonra üzerine

süpernatantın 4 katı hacminde %20 TCA ve %0,5 tiobarbiturik asit (TBA) karışımı eklendi. Karışım 95 °C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 10.000xg'de 15 dk santrifüj edildi. TBARS konsantrasyonu (nmol g YA^{-1}) 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'deki absorbans değeri çıkartılarak hesaplandı. MDA miktarının hesaplanmasında $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanıldı.

2.7. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması

0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde hasat edilen *B. vulgaris* ve *B. maritima* yaprakları sıvı azotla dondurularak POX ve total protein analizlerine kadar -20 °C'de muhafaza edildi. 1 gram yaprak örneği içeriğinde 1 mM EDTA.Na₂ ve % 2 (w/v) PVPP bulunan 3 ml 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,8) homojenize edildi. Homojenatlar 13,000 xg'de 40 dk (4 °C) santrifüj edildikten sonra süpernatantlar yeni ependorf tüplerine aktarıldı. Süpernatantlar total protein ve POX enzim aktivitesi tayinleri için kullanıldı.

2.8. Total Protein Tayini

Örneklerdeki total protein miktarı Bradford'a (1976) göre BSA (bovin serum albumin) standartları kullanılarak belirlendi. 1 ml.'lik polistren küvetlere 50 µl örnek ve Bradford ajanı (Coomassie Brilliant Blue protein boyası) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletilen örneklerden 595 nm.'de absorbans alındı. BSA standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak çözünebilen total protein miktarı mg yaş ağırlık olarak belirlendi. Tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1600 cihazı ile yapıldı (Shimadzu, Japan).

2.9. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi

Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde Herzog and Fahimi'nin (1973) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre, oksitlenerek kahverengi-kırmızı renge dönüşen DAB substratının (3,3'-diaminobenzidine-tetra hydrochloride dihydrate) oluşum hızı 465 nm dalga boyunda 3 ml polistren küvetlerde spektrofotometrik olarak belirlenir. 0,1% (w/v) jelatin içinde çözdürülen DAB

  zeltisi 0,15 M Na fosfat-sitrat tamponu (pH 4,4) ile karıştırılır. Reaksiyon karışımına DAB   zeltisi, %0,6 H₂O₂ ve örnek pipetlendi. POX aktivitesi 465 nm'de spektrofotometrik olarak 3 dk. içinde absorbansta gözlenen artış ile belirlendi. Bir birim POX aktivitesi, dakikada   mol mL⁻¹ H₂O₂'nin parçalanması şeklinde tanımlandı.

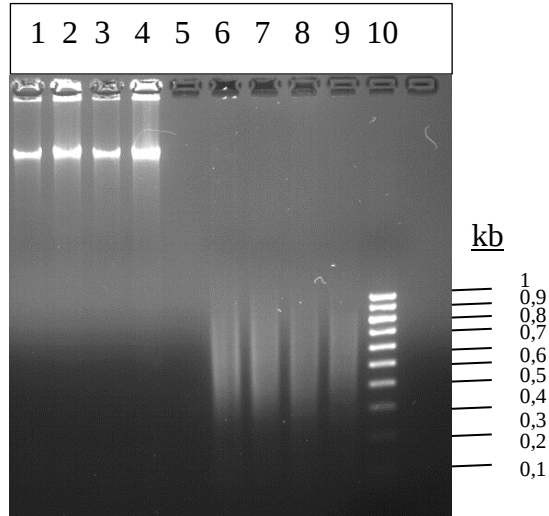
2.10. ChIP Analizi

Kromatin izolasyonu için Bowler et al. (2004) ve Haring et al. (2007) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek kullanıldı. Bowler'ın yönteminde yer alan kromatinin formaldehit ile çapraz-ba lanması, kromatin izolasyonu, sonikasyon, immünopresipitasyon ve real time-PCR aşamaları   n denemelerle pancar bitkisine göre geliştirildi. ChIP metodu ve real time PCR analizleri beş günde tamamlandı. Tuz uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde hasat edilen taze yaprak örneklerinden 3 g tartılarak üzerine %1 formaldehit çözeltisinden 37 ml (1% formaldehyde, 0.4 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM Sodium butyrate, 5 mM   -ME) eklendi. Karışım vakum altında 17 dk tutulduktan sonra çapraz bağlanma işleminin durdurulması için 0,125 M glisin ilave edilerek 6 dk daha vakum uygulandı. Bu işlem sonrasında örnekler önce 40 ml soğuk steril su ile yıkanıp sonra sıvı azotta masere edilerek toz haline getirildi. Elde edilen toz 0.4 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM sodium butyrate, 10 mM MgCl₂, 5 mM   -ME ve 0.1 mM PMSF içeren 45 ml ekstraksiyon tamponu 1 ile karıştırılıp vorteks ile düşük hızda çözdürüldü. İki katlı t  lbent bezinden yeni falkon t  b  ne s  z  len karışım 20 dk +4   C'de karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışım 20 dk 4000 rpm'de +4   C'de santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılarak   kelti 0.25 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM sodium butyrate, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 ve 0.1 mM PMSF içeren 1,5 ml ekstraksiyon tamponu 2'de   z  ld  kten sonra 2 ml ependorf tüplerine aktarıldı. 13.000 rpm'de 10 dk +4   C'de santrifüj edilen karışımdan üst faz uzaklaştırıldı.   kelti 450   l ekstraksiyon tamponu 2 ile   z  ld  . 2 ml ependorfa ekstraksiyon tamponu 3'den (1.7 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM sodium butyrate, 0.15% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM PMSF) 0,45 ml ilave edildikten sonra   zd  rd    m  z karışım ekstraksiyon tamponu 3 üzerine

pipetlendi. Karışım 1 saat süre ile 13.000 rpm, +4 °C’de santrifüj edildi. Son santrifüj aşamasından sonra üst faz atılarak kromatin içeren çökelti 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS karışımı içeren 450 µl lizis tamponu ile çözüldü. Bu aşamadan sonra izole edilen kromatin karışımları sonikatör yardımı ile 200-1000 bp uzunluğundaki DNA fragmanlarına parçalandı. Sonikasyon işleminden önce 10 µL kromatin daha sonra agaroz jelde yürütülmek üzere -80 °C’ye depolandı. Sonikasyon aşaması için Bandelin Sonopuls sonikatör cihazından yararlanıldı. Ön denemelerle belirlenen sonikasyon koşulları: 15 saniye, %10 power, 11 tekrar. Her sonikasyon döngüsünden sonra kromatin karışımı buzda 30 sn bekletildi. Sonikasyondan sonra 13.000 rpm’de +4 °C’de 10 dk santrifüj yapılan kromatin karışımının süpernatantı yeni tüplere aktarıldı. Sonikasyon işleminden sonra agaroz jelde yürütülmek üzere 10 µL kromatin -80 °C’de depolandı. %1,5 agaroz jelin herbir boşluğuna 50-100 ng örnek pipetlendikten sonra 100 V akımda, 50 dk yürütülüp jel fotoğrafı çekildi. Sonikasyon işleminden geçirilen örneklerle ait bantların 200-1000 baz çifti uzunluğunda olduğu gözlemlendi. Örnek agaroz jel görüntüsü şekil 2.2’de verilmiştir.

Kromatin örneği ChIP seyreltme tamponu (%1,1 Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl, pH=8, 167 mM NaCl) ile 1:10 oranında seyreltildikten sonra immünopresipitasyon işlemine başlandı. 50 µL Protein A Agarose beads/salmon sperm DNA (Millipore, 16-157) 1 ml ChIP seyreltme tamponu ile üç defa yıkandı. Agaroz toparın üzerine 1,5 ml seyreltilmiş kromatin örneği eklendikten sonra 1 sa +4 °C’de karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Agaroz toparın çöktürülmesi için kromatin karışımı 3.000 rpm’de +4 °C’de 3 dk santrifüj edildi. Üst faz yeni tüplere aktarıldıktan sonra 60 µL’si ‘INPUT’ kontrol olarak kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı. İmmünopresipitasyon aşaması için gerekli antikor miktarları ön denemelerle belirlendi. Çalışmada ChIP denemelerine özgü primer antikorlar kullanıldı: anti-histone H3 (acetyl K9) (abcam, ab4441), anti-histone H3 (acetyl K27) (abcam, ab4729). Birinci ependorf tüpündeki 600 µL kromatin örneğine 2,5 µg primer antikor (immünopresipite örnek) ve ikinci ependorf tüpüne ise sadece 600 µL kromatin örneği (MOCK) ilave edildikten sonra bu iki tüp bir gece +4 °C’de karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün ChIP seyreltme tamponu ile yıkanan protein A Agarose beads/salmon sperm DNA

'ya bir gece inkübasyona bırakılan kromatin+antikor karışımı pipetlendi ve 1 sa +4 °C'de inkübe edildi. Aynı işlemler MOCK tüpü için de uygulandı. Santrifüjden sonra süpernatantı uzaklaştırılan agaroz toplar sırasıyla Low Salt, High Salt, LiCl ve TE tamponları (pH= 8) ile yıkandı. Agaroz toplar üzerine Elution tamponu eklendikten sonra 65 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra aynı işlem tekrarlanarak süpernatantlar tek bir tüp içinde birleştirildi. Ardından, kromatin yapısındaki çapraz bağlanmanın geri dönüşümü için (reverse crosslinks) ChIP örneği, MOCK ve INPUT tüplerine 0,2 M NaCl eklendikten sonra 65 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler 10 µl 0.5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris-HCl (pH 6.5) ve 1µl 20 mg/ml proteinaz K eklenerek 45 °C'de 3 saat inkübe edildi. En son aşamada fenol/kloroform (1:1 v/v) ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu metodları ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Sambrook and Russell, 2006). DNA örnekleri real time-PCR analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de depolandı.



Şekil 2.2. %1,5 agaroz jelde sonikasyon etkinliğinin belirlenmesi. Sonikasyon işleminden önce ve sonra ayrılan kromatin örnekleri agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülendi. 0,2 M NaCl eklenen şeker pancarı kromatin örnekleri bir gece 65 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra agaroz jelde yürütüldü. 1-4 numaralı örnekler sonikasyondan önce ayrılan kromatin örnekleri; 6-9 numaralı örnekler sonikasyondan sonra ayrılan kromatin örnekleridir. **1:** *B. maritima* kontrol, **2:** *B. maritima* 500 mM NaCl, **3:** *B.vulgaris* kontrol, **4:** *B.vulgaris* 500 mM NaCl, **6:** *B. maritima* kontrol, **7:** *B. maritima* 500 mM NaCl, **8:** *B.vulgaris* kontrol, **9:** *B.vulgaris* 500 mM NaCl, **10:** 100 bp DNA ladder.

2.11. Kantitatif PCR Analizleri

Kantitatif PCR (q-PCR) analizleri Applied Biosystems (ABI) StepOne real time-PCR cihazında SYBR Green mastermix (Power SYBR® Green PCR Master Mix for Applied Biosystems, Life Technologies) kullanılarak gerçekleştirildi. Q-PCR analizleri için kontrol ve tuz (250 ve 500 mM NaCl) gruplarından genomik DNA, input, mock ve immünopresipite örnekler kullanıldı. *POX* ve *ACT* genlerine özgü primerler Invitrogen-Oligo Perfect Designer programı ile dizayn edildi. PCR koşulları ve DNA seyreltme miktarı ön denemelerle belirlendi. PCR karışımı hazırlanmadan önce INPUT, MOCK ve immünopresipite örnekler 1:10 oranında seyreltilti. 20 µL PCR karışımında 10 µL SYBR Green mastermix, 1'er µL forward ve reverse primer (10 µM), 3 µL nuclease free H₂O ve 5 µl hedef DNA bulunmaktadır. Transkript seviyelerinin belirlenmesinde *B.vulgaris actin (ACT1)* geni (GenBank accession no: DQ866829) endojen kontrol olarak kullanıldı. *B.vulgaris actin* dizisinin amplifikasyonunda ChIP örnekleri (H3K9ac ve H3K27ac antikorlarıyla immünopresipitasyon işleminden geçirilen örnekler) kullanılmadı. PCR koşulları: 95 °C'de 10 dk denatürasyon, 95 °C'de 15 sn (x40), 60 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1 dk uzama. Floresan sinyal 60°C'de belirlendi. Amplifikasyon reaksiyonlarının özgünlüğünün ve primer dimerlerinin tespit edilmesi amacıyla melt-curve analizi kullanıldı (60 °C'den 95 °C'ye 0.3 °C'lik sıcaklık artışları). Real time-PCR analizlerinden elde edilen veriler % input normalizasyon metoduna göre normalize edildi (Haring et al., 2007). Real time-PCR analizinde kullanılmak üzere tasarlanan primerler çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Input ve immünopresipite örneklerdeki % input değerlerinin hesaplanması için Ct (cycle threshold) ve ΔCt değerleri kullanıldı (Lin et al., 2012). ΔCt ve %IP hesaplamaları Lin et al. (2012) metoduna göre yapıldı:

$$\Delta C_t [\text{normalize ChIP}] = C_t (\text{ChIP}) - [C_t (\text{Input}) - \text{Log}_2 (\text{Input seyreltme faktörü})].$$

$$\text{Input \%} = 100/2^{\Delta C_t [\text{normalize ChIP}]}$$

Hedef DNA bölgesindeki histon modifikasyonlarının yoğunluğunu gösteren % input değeri immünopresipite ve input örnekleri arasındaki farkı verir.

2.12. İstatistiksel Analizler

Her deneme en az üç defa tekrar edildi. Elde edilen veriler ANOVA ile analiz edildi. Bütün şekillerdeki ve çizelgelerdeki değerler ortalamalar $\pm$ SE (n=6) şeklinde gösterilmektedir. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P < 0,05$). Sütunlar üzerindeki * ($p < 0,05$) ve ** ($p < 0,01$) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.

Çizelge 2.1. Real time PCR analizinde kullanılmak üzere tasarlanan *POX* ve *ACT* genlerine özgü reverse ve forward primerler.

Hedef gen (Accession No)	Forward (F) ve reverse (R) Diziler	Ürün (bp)
<i>Actin</i> (DQ866829.1)	Forward: GATTTGGCACCACACCTTCT Reverse: CAGGCACATTGAAGGTCTCA	140
<i>Peroxidase</i> (AJ276131.1)	Forward: CAATAGGGCAAGCCAGATGT Reverse: CAGCGGGGTAAGATTGTTGT	131

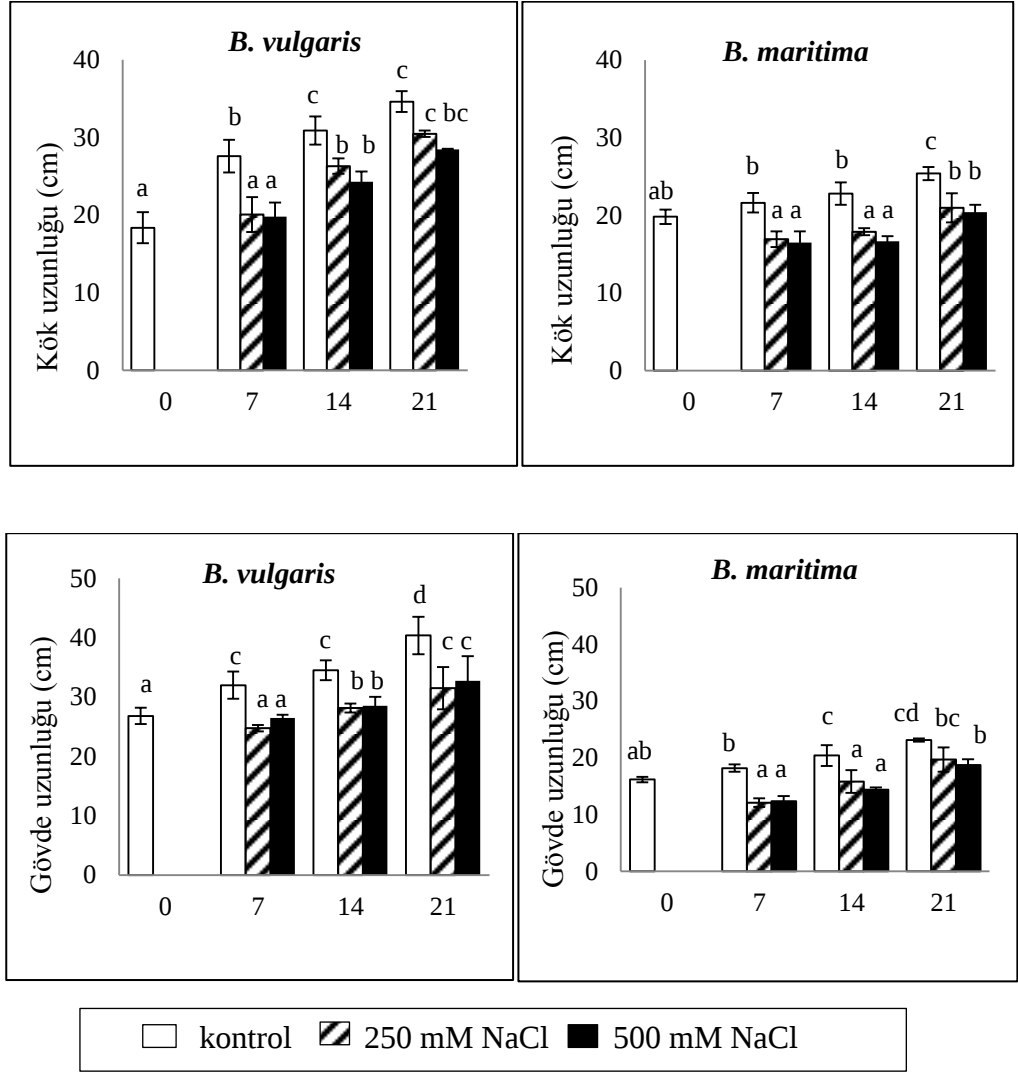
3. SONUÇLAR

3.1. Kök, Gövde Uzunlukları ve Bağlı Büyüme Hızı (RGR) Değerleri

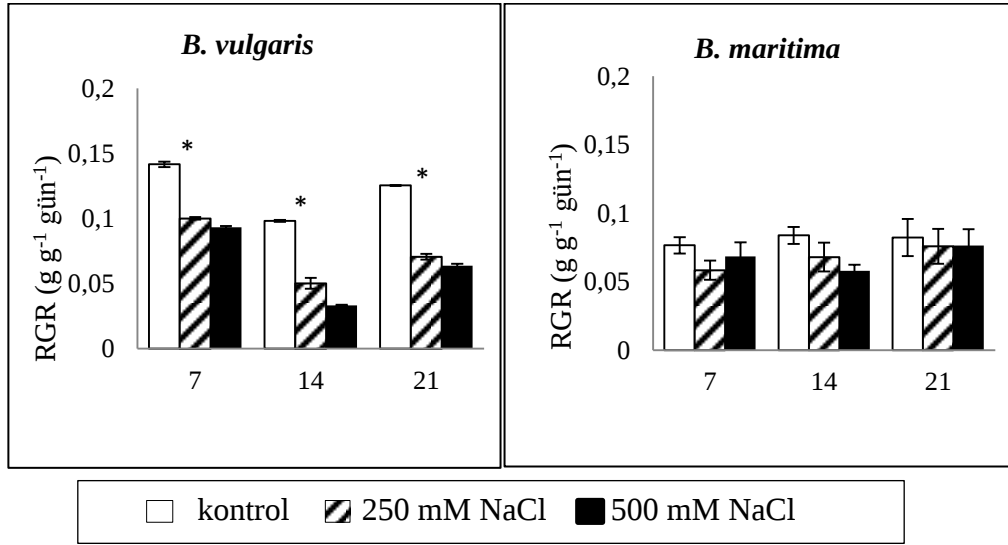
B.vulgaris ve *B.maritima* bitki türlerinde kök/gövde uzunlukları ve RGR değerlerinin tuza bağlı değişimleri şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir. İki farklı tuz uygulaması yapılan bitki gruplarında RGR değerleri, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırılarak Hunt et al.’un (2002) programı ile hesaplandı.

Her iki bitki türünde tuz stresi uygulaması sonucunda kök ve gövde uzunlukları geriledi ve RGR değerleri ise belirgin biçimde azaldı. Kök uzunluklarında en fazla azalma *B. vulgaris*’de %28 ve *B. maritima*’da %27 oranları ile sırasıyla 7.gün ve 14.gün 500 mM NaCl uygulanan bitki gruplarında gözlemlendi. 500 mM NaCl uygulamasının 14. ve 21. günlerinde kök uzunlukları *B. vulgaris* türünde %21 ve %18; *B. maritima* türünde ise %27 ve %20 oranlarında azaldı. *B. maritima* türünde 7. günde 250 ve 500 mM tuz uygulaması gövde uzunluğunu sırasıyla %34 ve %32 oranlarında inhibe etti. 500 mM NaCl uygulanan *B. vulgaris* bitkilerinde 14. günde gövde uzunluğu %17 ve 21. günde ise %19 oranında azaldı. Bununla birlikte, *B. maritima* 14. gün 500 mM NaCl uygulanan grupta gövde uzunluğu %29 ve 21. günde %19 gerileme gösterdi.

Her iki türün RGR değerlerinin de tuz uygulamasıyla birlikte azaldığı tespit edildi. 7, 14 ve 21. günlerde RGR değerleri *B. vulgaris*’de *B. maritima*’ya oranla daha fazla azalmıştır (bkz. şekil 3.2). RGR değerlerinin en fazla 500 mM tuz uygulanmasından etkilendiği görülmektedir. Örneğin 500 mM NaCl uygulamasından 14 gün sonra *B. vulgaris*’de RGR değeri %66 ve *B. maritima*’da ise %31 oranında geriledi. 14. günde tuz stresi *B. vulgaris* bitkilerinde büyümeyi belirgin bir biçimde baskılamasına rağmen *B. maritima* bitkilerinin tuz stresinden daha az etkilendiği görülmektedir. Denememizde *B. vulgaris* bitki grubunda tuz stresinin uygulama süresi arttıkça RGR düzeylerinin azaldığı saptandı. 250 mM tuz uygulamasından 7, 14 ve 21 gün sonra *B. vulgaris*’de RGR değerleri %29, %49 ve %44 azalırken, *B. maritima*’da %24, %19 ve %8 oranlarında azalmıştır. 250 ve 500 mM NaCl uygulanan yabani pancar bitkilerinde 21. günde RGR değerlerinin tuz stresinden %10’dan daha az oranlarda etkilendiği görülmektedir.



Şekil 3.1. *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl tuz konsantrasyonlarının kök ve gövde uzunluklarına etkisi. y-ekseninde kök, gövde uzunlukları (cm), x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P < 0,05$).

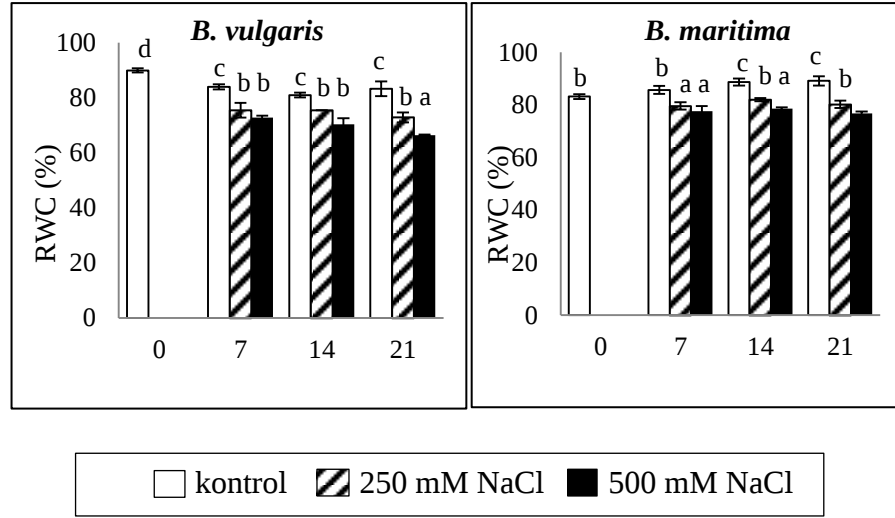


Şekil 3.2. *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl tuz konsantrasyonlarının RGR değerlerine etkisi. y-ekseninde RGR değerleri ($\text{g g}^{-1} \text{gün}^{-1}$), x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki * ($p < 0,05$) ve ** ($p < 0,01$) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.

3.2. Bağlı Su İçeriği (RWC) Sonuçları

B.vulgaris ve *B.maritima* bitkilerinde tuz stresi uygulaması sonucunda 0., 7., 14. ve 21. günlerde RWC’de meydana gelen değişimler şekil 3.3’de gösterilmiştir. *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinin kontrol ve tuz gruplarının RWC değerlerinde anlamlı farklılıklar tespit edildi. Tuz uygulamasının ilk haftasından itibaren azalmaya başlayan RWC değerlerinin tüm deneme süresi boyunca kontrol grubuna oranla azaldığı gözlemlendi. Buna göre *B.vulgaris* türünün 7. gün 250 mM NaCl uygulanan grubunda RWC değerinin kontrol grubuna oranla %10; 500 mM NaCl grubunda ise %13 azaldığı saptandı. Buna karşın *B.maritima* türünün 7.gün 250 mM tuz grubunda kontrol grubuna oranla %7; 500 mM tuz grubunda ise %9 azalma belirlendi. *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinde 250 mM NaCl uygulamasının 14. gününde RWC değerinin kontrol grubuna göre sırasıyla %7 ve %8; 500 mM NaCl grubunda ise %13 ve %11 azaldığı gözlemlendi. En düşük RWC değeri, *B. vulgaris* bitkisinin 21. gün 500 mM NaCl grubunda %66 olarak belirlendi. RWC değerlerinde en belirgin azalmanın 500 mM tuz uygulamasından 21 gün sonra *B. vulgaris* türünde %20 ve *B. maritima* türünde ise %14 oranlarında olduğu saptandı. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde

özellikle stres uygulamasının 21. gününde RWC değerlerinin *B.vulgaris* türünde *B.maritima*'ya göre daha belirgin bir düşüş gösterdiği görülmektedir.

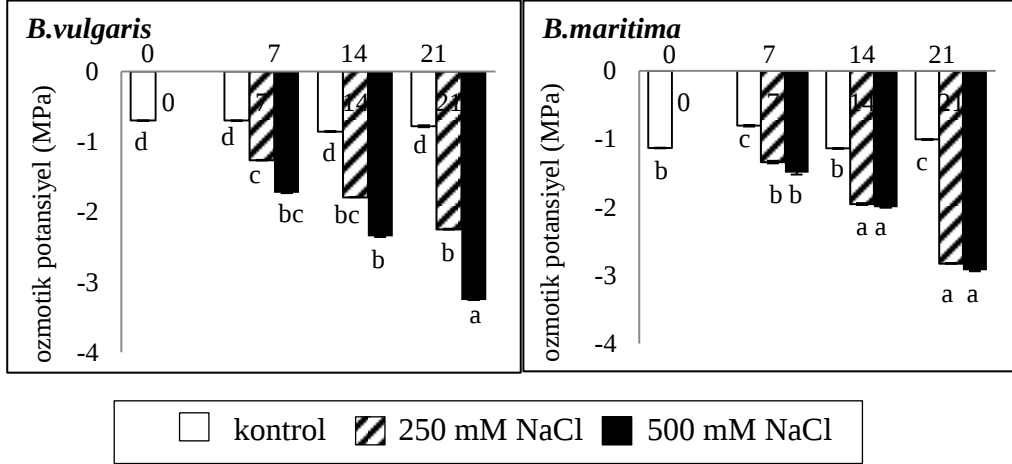


Şekil 3.3. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) RWC değerlerine etkisi. y-ekseninde RWC (%) değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P < 0,05$).

3.3. Ozmotik Potansiyel Sonuçları

B.vulgaris ve *B.maritima* bitki türlerinin tuz stresi uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde ozmotik potansiyel değerlerinde meydana gelen değişimler şekil 3.4'de gösterilmiştir. *B.vulgaris* ve *B.maritima* türlerine ait ozmotik potansiyel düzeylerinin tuz stresi uygulamasından sonra azaldığı belirlendi. *B. vulgaris* bitkilerinde 250 mM NaCl uygulamasının 7. günde, ozmotik potansiyelde şiddetli bir düşüş meydana getirdiği saptandı. 7. günde 250 ve 500 mM tuz uygulanan *B. maritima* bitkilerinde ozmotik potansiyel %66 ve %86 oranlarında ve *B. vulgaris*'de ise %83 oranında ve %149 düşmüştür. 14. gün 250 ve 500 mM tuz gruplarında *B. vulgaris*'de sırasıyla %109 ve %175 oranında azalmalar görülürken; *B. maritima* bitkilerinde sırasıyla %73 ve %77 oranlarında azalmalar görülmüştür. Tuz stresinin ozmotik potansiyel üzerindeki en belirgin etkisi 21. gün 500 mM NaCl bitki gruplarında tespit edildi. Tuz uygulamasının 21. gününde, ozmotik potansiyelin *B.vulgaris*'de $-3,25 \pm 0,0041$ ve *B.maritima*'da $-2,92 \pm 0,0132$ değerlerine kadar gerilediği görüldü. *B.vulgaris* ve *B.maritima*

bitkilerinde ozmotik potansiyel değerlerindeki en etkili azalmanın 500 mM tuz uygulanan gruplarda meydana geldiği bulunmuştur. İki bitki türü karşılaştırıldığında tuz stresinin *B. vulgaris* bitkisinin ozmotik potansiyel değerlerini *B. maritima*'ya oranla daha çok etkilediği saptanmıştır.



Şekil 3.4. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) ozmotik potansiyel değerlerine (MPa) etkisi. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. y-ekseninde ozmotik potansiyel (MPa) değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P < 0,05$).

3.4. Klorofil Flüoresans (F_v/F_m) Sonuçları

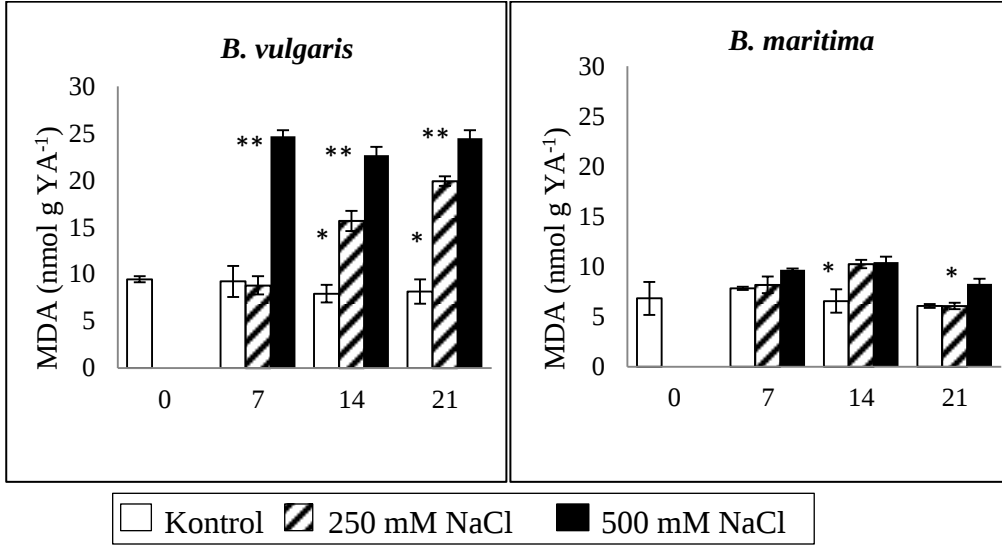
B.vulgaris ve *B.maritima* bitkilerinde tuz stresi uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde F_v/F_m değerlerinde meydana gelen değişimler çizelge 3.1'de gösterilmiştir. *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinde F_v/F_m değerleri bakımından anlamlı bir farklılık görülmemesi bu bitkilerin tuz stresine uyum sağladığının göstergesidir. Ancak, *B. vulgaris*'de tuz stresi uygulamasından 7, 14 ve 21 gün sonra F_v/F_m değerlerinde az miktarda bir değişim meydana geldi. 21. günde *B. vulgaris*'de 250 ve 500 mM NaCl uygulaması sonucunda F_v/F_m değerleri kontrol grubuna göre %2,4 oranında düştü. Şeker pancarı bitkilerinde 500 mM tuz uygulamasının 7., 14. ve 21. günlerinde klorofil flüoresansı sırasıyla %1,17, %2,35 ve %2,4 oranlarında azaldı. *B. maritima*'da 7. günde 500 mM NaCl uygulamasının F_v/F_m değerini %0,11 oranında azalttığı gözlemlendi. *B. maritima* bitkilerinin 14. ve 21. gün 500 mM NaCl gruplarında ise F_v/F_m değerleri sırasıyla $0,848 \pm 0,008$ ve $0,859 \pm 0,003$ olarak belirlendi.

Çizelge 3.1. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) Fv/Fm değerlerine etkisi. Çizelgenin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. Ortalama değerler üzerindeki aynı harfler istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri gösterir ($P < 0,05$). (0K: 0.gün kontrol, 7K: 7.gün kontrol, 7-250: 7.gün 250 mM NaCl, 7-500: 7.gün 500 mM NaCl, 14K: 14.gün kontrol, 14-250: 14.gün 250 mM NaCl, 14-500: 14.gün 500 mM NaCl, 21K: 21.gün kontrol, 21-250: 21.gün 250 mM NaCl, 21-500: 21.gün 500 mM NaCl)

Stres uygulama günleri	<i>B.vulgaris</i> Fv/Fm	<i>B.maritima</i> Fv/Fm
0K	0.835 ^b $\pm$ 0.01	0,850 ^a $\pm$ 0,008
7K	0.851 ^c $\pm$ 0.09	0,854 ^a $\pm$ 0,005
7-250	0.833 ^b $\pm$ 0.02	0,860 ^{ab} $\pm$ 0,001
7-500	0.848 ^{bc} $\pm$ 0.01	0,853 ^a $\pm$ 0,007
14K	0.843 ^{bc} $\pm$ 0.01	0,842 ^a $\pm$ 0,01
14-250	0.847 ^{bc} $\pm$ 0.01	0,843 ^a $\pm$ 0,01
14-500	0.835 ^b $\pm$ 0,01	0,848 ^a $\pm$ 0,008
21K	0.831 ^b $\pm$ 0,01	0,858 ^{ab} $\pm$ 0,004
21-250	0.816 ^a $\pm$ 0,02	0,857 ^{ab} $\pm$ 0,005
21-500	0.813 ^a $\pm$ 0,01	0,859 ^{ab} $\pm$ 0,003

3.5. Lipid Peroksidasyonu

B.vulgaris ve *B.maritima* yapraklarındaki lipid peroksidasyonu MDA miktarları ölçülerek değerlendirildi. Tuz stresinin MDA düzeyine etkisi şekil 3.5’de gösterilmiştir. Uygulama süresi boyunca MDA içeriklerinin tuz stresinden etkilendiği belirlendi. Özellikle 500 mM NaCl stresinin şeker pancarında MDA birikimini şiddetli bir biçimde arttırdığı ve yabani pancarda ise bu artışın daha düşük düzeylerde seyrettiği görüldü. 7. gün 500 mM NaCl uygulaması MDA seviyesini *B. vulgaris*’de kontrol grubuna göre %168 ve *B. maritima*’da ise %24 oranlarında arttırdı. 250 ve 500 mM NaCl uygulamasının 14. gününde *B. vulgaris* türünde MDA düzeyleri sırasıyla %98 ve %186 oranında; *B. maritima*’da ise %56 ve %59 oranlarında artış gösterdi. *B. vulgaris* 21. gün 250 ve 500 mM NaCl gruplarında MDA seviyeleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sırasıyla %145 ve %200 oranında arttı. Buna karşın *B. maritima* bitkilerinin 21. gün 500 mM NaCl gruplarına ait MDA düzeylerinde %36 oranında bir artış meydana geldi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde *B. vulgaris* MDA değerlerindeki artış oranının *B. maritima* MDA değerlerinden daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır.

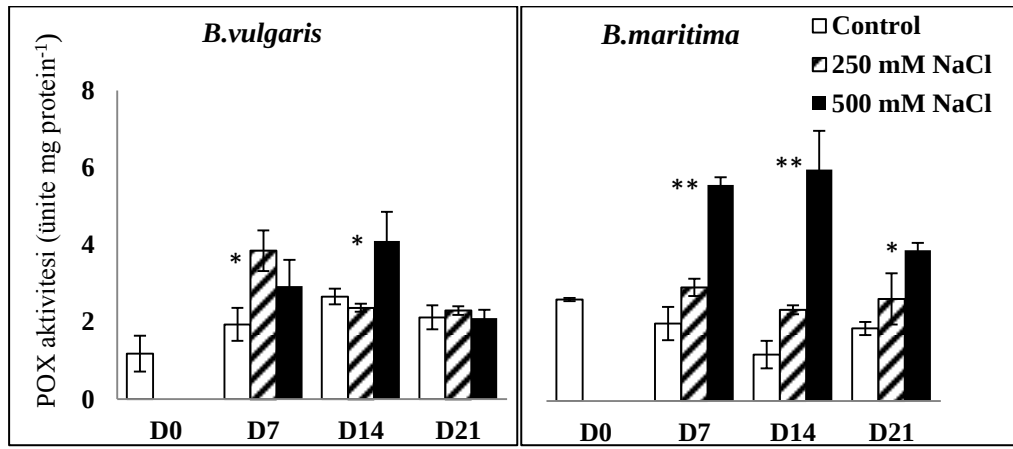


Şekil 3.5. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) MDA seviyelerine (nmol g YA^{-1}) etkisi. y-ekseninde MDA (nmol g YA^{-1}) değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE ($n=6$) değerleri kullanıldı. Sütunlar üzerindeki * ($p < 0,05$) ve ** ($p < 0,01$) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.

3.6. Peroksidaz Enzim Aktivitesi

Tez projemizde *B.vulgaris* ve *B.maritima* kontrol ve tuz gruplarında (250 ve 500 mM NaCl) POX enziminin strese yanıt ve tolerans süreçlerine katkısının anlaşılması amacıyla POX enzim aktivitesi ölçüldü. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitki türlerinde tuz stresi uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde POX enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler şekil 3.5’de gösterilmiştir. Şeker pancarı ve yabani pancarda temel ve indüklenmiş POX aktivitelerinin yüksek olduğu tespit edilmesine karşın *B.maritima*’nın daha yüksek değerlere sahip olduğu görüldü. *B. vulgaris* bitkilerinin 7. gün 250 ve 500 mM NaCl uygulanan gruplarında POX enzim aktivitelerinin sırasıyla %98 ve %51 oranında arttığı saptandı. Buna karşın *B. maritima* türünün 7. gün 250 mM NaCl grubunda kontrol grubuna oranla %47; 500 mM NaCl grubunda ise %179 artış belirlendi. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde en yüksek POX aktivitesi 500 mM NaCl uygulamasından 14 gün sonra tespit edildi (4.10 ve 5.58 ünite mg protein^{-1}). *B.maritima* bitkisinde 250 mM tuz uygulaması, POX aktivitesini arttırmasına rağmen 500 mM NaCl uygulaması, POX enzim aktivitesini daha belirgin düzeyde arttırdı. Bu durum *B.vulgaris* için geçerli değildir, sadece 14. günde 500 mM NaCl’nin POX aktivitesi artış oranlarını 250 mM tuza kıyasla daha çok etkilediği belirlendi. Buna göre 14. gün 500 mM NaCl uygulaması POX enzim aktivitesini

B. vulgaris'de %54; *B. maritima*'da ise %400 oranlarında arttırdı. Stres uygulamasından 21 gün sonra *B. vulgaris* yapraklarında POX aktivitesinin kontrol grubuna yakın değerlerde seyrettiği görülürken yabani pancarın 250 ve 500 mM tuz gruplarının her ikisinde de POX aktivitelerinin dikkate değer bir şekilde yükseldiği saptandı. 250 mM NaCl uygulamasından 21 gün sonra *B. vulgaris*'de POX enzim aktivitesi sadece %9 ve *B. maritima*'da ise %41 oranında yükseldi. 500 mM NaCl uygulamasının 21. gününde *B. maritima* bitkilerinde POX enzim aktivitesi değerinin %108 oranında arttığı saptandı.

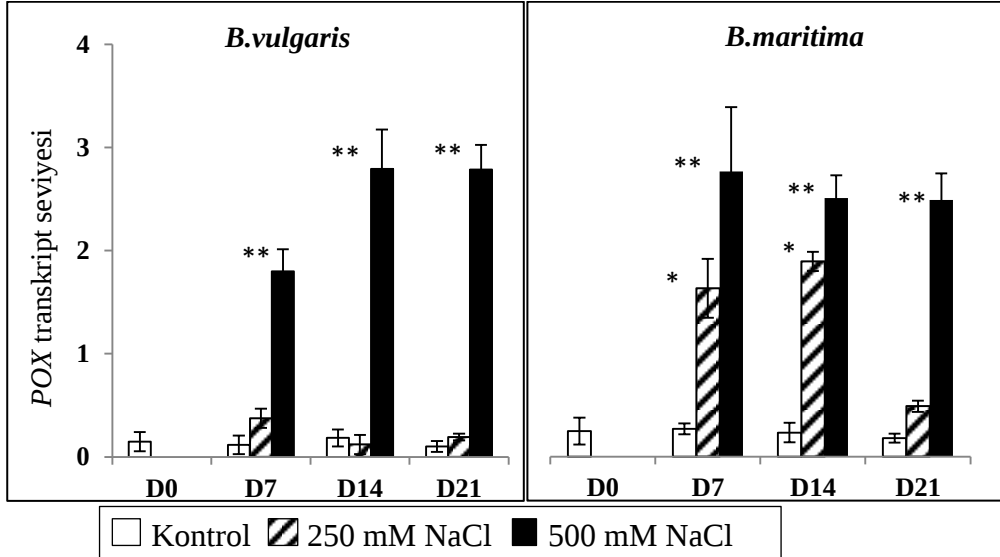


Şekil 3.6. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının (0., 7., 14. ve 21. gün) POX enzim aktivitesine (ünite mg protein⁻¹) etkisi. Grafiklerin oluşturulmasında ortalama $\pm$ SE (n=6) değerleri kullanıldı. y-ekseninde POX (ünite mg protein⁻¹) aktivitesi, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.

3.7. Peroksidaz Gen İfadesi

Kontrol ve tuz gruplarında peroksidaz geninin ifadesi q-PCR analizleri ile belirlendi. 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde *POX* gen ifadesi değişimleri şekil 3.7'de gösterildi. Her iki tuz uygulamasının da *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinde transkripsiyonu uyardığı ve uygulamalar arasında belirgin farklılıklar olduğu tespit edildi. 250 ve 500 mM NaCl uygulamalarının 7. gününde şeker pancarında *POX* transkripsiyonu sırasıyla 3 kat ve 15 kat arttı. *B. maritima* 7. gün 250 ve 500 mM NaCl gruplarında ise 6 kat ve 10 kat yükselmeler saptandı. 250 mM NaCl uygulamasından 14 ve 21 gün sonra *B. maritima*'da *POX* transkripsiyonu 8 kat ve 3 kat yükselirken; *B. vulgaris*'de ise

250 mM NaCl uygulamasının sadece 21. gününde 1,8 katlık bir artış tespit edildi. Bununla birlikte, *B. vulgaris* 14. ve 21. gün 500 mM NaCl uygulanan gruplarda POX transkripsiyonu 15 kat ve 27 kat artarken; *B. maritima*'da ise 11 kat ve 14 kat arttı. Şeker pancarı ve yabani pancar bitkilerinde POX transkripsiyonunda en belirgin yükselmeler 21. gün 500 mM NaCl uygulama gruplarında belirlendi.

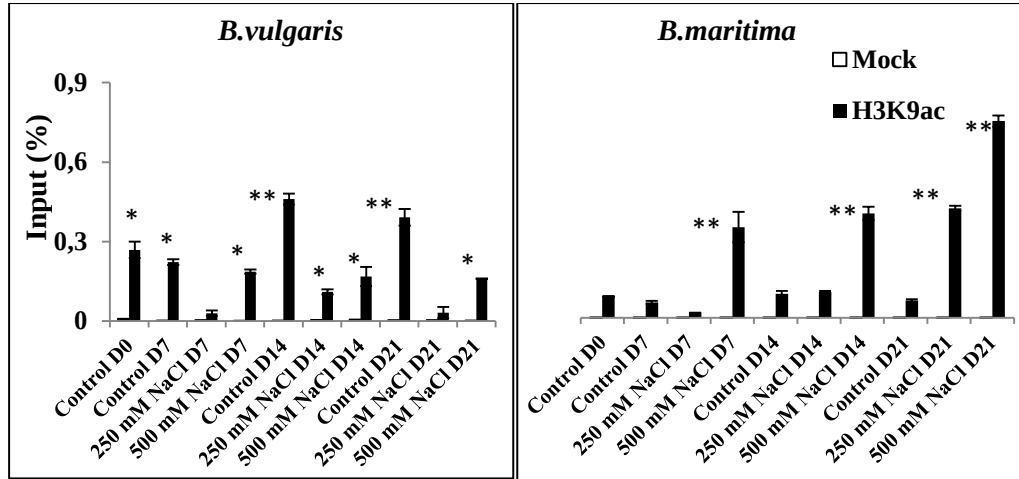


Şekil 3.7. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde POX transkript seviyeleri (POX relative transcript abundance) q-PCR yöntemi ile ölçüldü. Aynı uygulama gününde şeker pancarı ve yabani pancarın 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulama gruplarının karşılaştırılması için ortalama $\pm$ SE (n=4) değerleri kullanıldı. y-ekseninde POX transkript düzeyi, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * ($p < 0,05$) ve ** ($p < 0,01$) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.

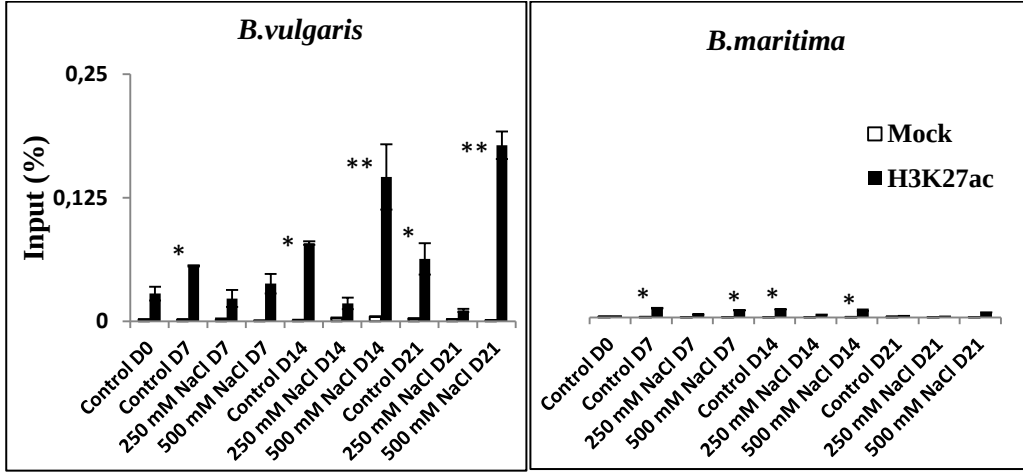
3.8. Peroksidaz Geninde H3K9 ve H3K27 Asetilasyon Seviyeleri

POX geninin düzenlenmesinde kromatinin yeniden düzenlenmesinin rolünü incelemek amacıyla *B.vulgaris* ve *B.maritima* kontrol ve tuz gruplarında H3K9 ve H3K27 asetilasyon seviyeleri ChIP yöntemi ile tespit edildi (şekil 3.8 ve şekil 3.9). *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde H3K9 ve H3K27 asetilasyonunun *POX* transkript seviyesi ilişkili olduğu bulundu. H3K9 asetilasyonunun *POX* gen aktivasyonu üzerinde daha etkili olduğu gözlemlendi. H3K27 asetilasyonu *POX* geninin ifadesinde etkili bir histon modifikasyonu olmasına karşın özellikle *B.maritima*'da H3K27ac seviyelerinin düşük olduğu saptandı. *B.maritima* tuz gruplarında H3K9 asetilasyon düzeylerinin belirgin biçimde yükseldiği ve özellikle 500 mM NaCl stresi uygulanan bitki gruplarında bu artışın daha da fazla olduğu görülmektedir (Bkz. şekil 3.8). *B.vulgaris* bitkilerinde H3K9ac

seviyelerinin tuz stresi uygulanan gruplardan (250 ve 500 mM NaCl) ziyade kontrol gruplarında daha yüksek olduğu belirlendi. En yüksek H3K9 asetilasyon seviyesi 21 gün boyunca 500 mM NaCl uygulanan *B.maritima* bitkilerinde %0,8 ve *B.vulgaris* 14. gün kontrol gruplarında ise %0,5 olarak tespit edilmiştir. *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkileri arasında H3K27 asetilasyon düzeyleri bakımından önemli farklılıklar saptanmıştır. Şeker pancarında en yüksek H3K27ac seviyesi 14. ve 21. gün 500 mM NaCl gruplarında rapor edildi (%0,15 ve 0,18) (Bkz. şekil 3.9). Yabani pancarın kontrol ve tuz gruplarında H3K27 asetilasyon seviyeleri açısından belirgin farklılıklar yoktur. *B.maritima* %input değerlerinin *B.vulgaris*'e oranla çok daha düşük olduğu görülmektedir (en yüksek %IP değeri %0,009).



Şekil 3.8. *POX* geninde H3K9 asetilasyon seviyeleri. H3K9 asetilasyonu ChIP analizi ile tespit edildikten sonra input DNA'ya (%IP) göre normalize edildi. 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulanan *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde *POX* geni H3K9ac seviyeleri q-PCR yöntemi ile karşılaştırıldı. Ortalama $\pm$ SE (n=4) değerleri kullanıldı. y-ekseninde %IP değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * (p < 0,05) ve ** (p < 0,01) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.



Şekil 3.9. *POX* geninde H3K27 asetilasyon seviyeleri. H3K27 asetilasyonu ChIP analizi ile tespit edildikten sonra input DNA'ya (%IP) göre normalize edildi. 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulanan *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde *POX* geni H3K27ac seviyeleri q-PCR yöntemi ile karşılaştırıldı. Ortalama $\pm$ SE (n=4) değerleri kullanıldı. y-ekseninde %IP değerleri, x-ekseninde ise stres uygulama günleri gösterilmiştir. Sütunlar üzerindeki * ($p < 0,05$) ve ** ($p < 0,01$) işaretleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir.

4. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda 0, 250 ve 500 mM NaCl uygulanan şeker pancarı (*B. vulgaris*) ve yabani pancar (*B. maritima*) bitkilerinde büyüme parametreleri (kök, gövde uzunluğu, RGR), bağıl su içeriği, ozmotik potansiyel, fotosentez, lipid peroksidasyonu, POX enzim aktivitesi, *POX* transkripsiyon düzeyleri ve *POX* genindeki H3K9 ve H3K27 asetilasyon düzeyleri incelendi.

NaCl stresi bitki organlarında, köklerde ve sürgünlerde büyümeyi yavaşlatır (Li et al., 2014; Katsuhara and Kawasaki, 1996). Çalışmamızda *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitki türlerinde 0, 250 ve 500 mM NaCl konsantrasyonlarının kök, sürgün uzunluklarını ve RGR değerlerini azalttığı tespit edildi. Kuraklık stresinin sürgünlerde büyümeyi kök büyümesinden daha çok etkilediği ve kök/sürgün kuru ağırlık oranında artışa neden olduğu bilinmektedir (Marschner, 1995). Çalışmamızda *B. vulgaris* ve *B. maritima*'da tuz stresi kök ve gövde büyümesini azalttığı için RGR değerlerinde belirgin bir değişim gözledik. Özellikle *B. vulgaris* bitkilerinin büyüme değerleri *B. maritima* bitkilerine göre tuz stresinden daha fazla etkilendi. Çeşitli şeker pancarı varyetelerinde tuz stresinin etkilerinin incelendiği yayınlarda NaCl stresinin büyüme parametrelerini baskıladığı ortaya çıkmıştır (Ghoulam et al., 2002; Bor et al., 2003). Ghoulam et al.'a (2002) göre beş şeker pancarı varyetesinde tuz uygulamasının yaprak alanı, yaş ve kuru ağırlıkları azalttığı ve tuz miktarları yükseldikçe büyüme değerlerinin daha da fazla düştüğü görülmüştür. TOP adlı şeker pancarı varyetesinde 200 mM NaCl uygulamasının yaş ağırlıkları daha belirgin düzeylerde azalttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 200 mM NaCl uygulamasından sonra kuru ağırlığın kontrol grubundan %48 ve %40 oranlarında daha düşük olduğu açığa çıkartılmıştır (Ghoulam et al., 2002). 125 mM NaCl uygulaması yapılan *B. vulgaris* bitkilerinin gövde ve kök yaş ağırlıklarının kontrol gruplarına göre %36 ve %35 daha düşük olduğu belirlenmiştir (Wakeel et al., 2011). *Oryza sativa Pokkali* (tuza dirençli) ve IR-28 (tuza duyarlı) varyelerinde yapılan tuz denemelerinde tuza duyarlı bitkilerde kök uzunluklarının azaldığı ve tuza dirençli bitkilerde ise değişiklik olmadığı saptanmıştır (Demiral and Türkan, 2005). Demiral and Türkan'a (2005) göre, IR-28 varyetesinde kök büyümesinin tuza bağlı azalması köklerde H₂O₂ seviyesinin

artmasıyla ilintilidir. Mısır bitkisinde NaCl stres uygulamasının 7. gününde kök ve sürgün büyümesi azalmıştır (Li et al., 2014). 200 mM NaCl stresi verilen *Zea mays* bitkilerinde 96 saat sonra kök uzunluğundaki azalma oranı kontrol grubuna göre %27 ve %26 daha düşüktür. Soğuk, yüksek sıcaklık, tuz ve ağır metal streslerinin mısır fidelerinde kök uzunluğu, yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla %30-45, %43-68 ve %45-78 oranlarında düşürdüğü anlaşılmıştır (Zhao et al., 2014b). Tuz stresi bitki büyümesini yavaşlatmasına rağmen tuza toleranslı bitkilerin yüksek tuz oranlarında bile yaşayabildiği bilinmektedir (Munns and Tester, 2008).

Yaprakların su durumunun belirlenmesinde ozmotik potansiyel ve RWC değerleri kullanıldı. Toprak tuzluluğuna maruz kalan bitkilerin topraktan su alımını azaltma yoluna giderek büyümeyi baskıladıkları bilinmektedir (Greenway and Munns, 1980). Çalışmamızda yaprak su durumunun tuz stresinden etkilendiği görülmektedir. Şeker pancarı ve yabani pancar bitkilerinde RWC ve ozmotik potansiyel değerlerinde azalmalar meydana geldiği ve bitki türleri arasında azalma oranları bakımından farklılıklar olduğu görüldü. 200 mM NaCl stresine maruz bırakılan TOP adlı şeker pancarı varyetesinde RWC değeri %80'den %58'e gerilemiştir (Ghoulam et al., 2002). Tuz stresi uyguladığımız *B. vulgaris* ve *B. maritima* bitkilerinde özellikle stresin 21. gününde ozmotik potansiyel değerlerinde belirgin bir artış gözlemlendi. Katerji et al.'a (1997) göre yüksek tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılan şeker pancarı turgor potansiyeli kaybını önlemek için ozmotik potansiyeli 0,4 MPa'a düşürür. Turgor kaybı RWC'nin düşmesine ve su kullanımında azalmaya neden olur (Katerji et al., 1997; Ghoulam et al., 2002). Clarke et al'a göre (1993) stomaların kapanması yaprak su potansiyelinde azalmaya neden olur ve böylece şeker pancarında su alımını, büyüme ve fotosentezin devamlılığı sağlar.

Tuz stresi stomaların kapanmasıyla birlikte yapraklardaki karbon dioksit miktarının azalmasına ve fotosentezin olumsuz etkilenmesine neden olur (Li et al., 2014; Ben Taarit et al., 2009). Tuz stresi dışında böcekler, patojenler, soğuk ve kuraklık stresleri de klorofilin parçalanmasına neden olur (Hendry et al., 1987). Projemizde *B.vulgaris* ve *B.maritima* fotosentez etkinlikleri arasında belirgin bir farklılık görülmedi. NaCl uygulaması nedeniyle klorofil içeriğinde azalma ve

oksidatif stres oluşumu fotosentezi olumsuz etkiler. Buna rağmen Fv/Fm değerlerinde meydana gelen küçük değişimler Beta genotiplerinin diğer bitkilere oranla tuz stresi altında daha iyi bir performansa sahip olduğunu gösterir (Zhang et al., 2005). Tez çalışmamızda *B. maritima* bitkisinin kontrol ve tuz gruplarının tamamında Fv/Fm değerlerinde belirgin bir farklılık gözlenmedi. Bu durum *B. maritima*'nın yüksek tuz stresi koşullarında bile PSII'yi (klorofil flüoresans) *B. vulgaris* türünden daha iyi koruyabildiğini göstermektedir. *B. maritima*'nın aksine tuz stresi uygulanan *B. vulgaris* bitkilerinin Fv/Fm değerlerinde özellikle stresin 21. gününde belirgin bir azalma görülmüştür. Pigment seviyelerinin azalmasıyla birlikte klorofil flüoresans yoğunluğu da %16 oranında kaybolur. Fotosistem II (PSII), fotosentez sisteminin hassas bir elemanıdır (Allakhverdiev et al., 2000). Tuz koşulları PSII etkinliğinde, elektron taşıma zincirinde (ETC) ve CO₂ asimilasyon hızında belirgin azalmalara neden olur (Piotr and Grazyna, 2005).

Lipid peroksidasyonunda gözlenen değişiklikler oksidatif hasarın göstergesidir (Borsani et al., 2001). MDA, fosfolipidlerde doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda meydana gelen son ürünlerden biridir (Halliwell and Gutteridge, 1989). ROS'lar fosfolipid moleküllerinin iki karbon atomu arasındaki doymamış (çift) bağlara ve gliserol ve yağ asidi arasındaki ester bağına saldırır. O₂⁻ ve 'OH radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerinin metilen gruplarıyla reaksiyona girerek dienler, lipid peroksi radikaller ve hidroperoksitleri meydana getirir (Smirnoff, 1995). Çalışmamızda *B.maritima* bitkilerinde diğer fizyolojik parametrelerle birlikte lipid peroksidasyonu seviyelerinin daha düşük olması bu bitkilerin yüksek tuz miktarlarına karşı daha dirençli olduklarını gösterir. *B.vulgaris*'de lipid peroksidasyonu artış oranlarının daha yüksek olması bu bitkilerde membran hasarının meydana geldiğini ve tuz stresine toleransın düştüğünü göstermektedir. Çalışmamıza benzer şekilde, Bor et al. 'un (2003) çalışmasında da MDA seviyeleri tuz stresi koşullarında *B. vulgaris*'de *B. maritima*'dan daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Bor et al'a (2003) göre, kültür ve yabani pancar türlerinin her ikisinde de 500 mM NaCl uygulamasının özellikle 12. gününde lipid peroksidasyonu seviyeleri belirgin biçimde yükselmiştir. Tuz stresi koşullarında *B. maritima*'da MDA içeriği %40 ve *B. vulgaris*'de ise %42'dir (Bor et al., 2003). Tuz stresi koşullarında SOD, POX, APX, CAT ve GR

enzim aktivitelerinin artması yabancı pancarda membran bütünlüğünün korunmasında oksidatif hasarın azaltılması açısından önemlidir (Bor et al., 2003). Uzun süreli tuz uygulaması (60 gün) buğday fidelerinde H_2O_2 ve lipid peroksidasyonunda artışa neden olur, tuza hassas olan kültürde bu oran daha da artar (Sairam et al., 2002). IR-28 çeltik varyetesinde (tuza duyarlı) tuz stresi arttıkça lipid peroksidasyonu seviyesinin de aşama aşama arttığı kaydedilmesine karşın tuza dirençli *pokkali* varyetesinin köklerinde tuzun şiddeti arttırılsa bile lipid peroksidasyonunda değişiklik belirlenmemiştir (Demiral and Türkan, 2005). Tuza toleranslı *pokkali* kültürünün köklerinde lipid peroksidasyonu seviyesinin IR-28'den daha düşük olması tuza duyarlı bitkilerin oksidatif hasara karşı daha iyi bir korumaya sahip olduğunu gösterir (Demiral and Türkan, 2005). *Lycopersicon esculentum* ve tuza toleranslı yabancı akraba *Lycopersicon pennellii* domates bitkilerinde yapılan bir çalışmada, 100 mM tuzlu ortamda yetiştirilen tuza duyarlı bitkilerde lipid peroksidasyon seviyesinin toleranslı bitkilerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Shalata and Tal, 1998). Tuza toleranslı domates bitkilerinde tuzla birlikte uyarılan SOD ve APX aktivitelerinin kısmen de olsa etkili bir antioksidan koruma sağladığı söylenebilir (Shalata and Tal, 1998).

Bitki hücrelerinde SOD, POX ve CAT antioksidan enzimleri hücreleri oksidatif hasardan koruyan bir savunma ekibi gibi çalışır (Mittler, 2002). POX kloroplastlarda H_2O_2 'yi süpüren enzimlerden biridir (Asada and Takahashi, 1987). POX, savunma enzimi olmasının yanı sıra lignifikasyon, süberizasyon, hücre duvarı proteinlerinin çapraz bağlanması, senesens ve öksin katabolizması gibi süreçlere de katkı sağlar (Hiraga et al., 2001). Bitki peroksidazları *A.thaliana*, çeltik ve tütünde tanımlanan çok sayıda izoenzimi ve varyantları ile birlikte bir süper aile olarak gruplandırılır (Hiraga et al., 2001). Bu çalışmada ve 2003 yılında çalışma grubumuz tarafından yayımlanan makalede *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde total POX aktivitelerinin yükselmesi diğer POX enzimlerinin katkısıyla ilişkili olabilir. Tez projemizde şeker pancarı ve yabancı pancarda temel ve indüklenmiş POX aktivitelerinde artış gözlemlendi. Ancak, en yüksek POX aktivitesi 500 mM NaCl uygulanan yabancı pancar bitkilerinde tespit edildi. Bu sonuçlar çalışma grubumuz tarafından 2003 yılında yayımlanan makalenin bulguları ile paralellik göstermektedir. Bor et al (2003), 150 ve 500 mM NaCl

stresleri uygulanan *B. maritima* ve *B. vulgaris* bitkilerinde POX aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığını tespit etmiştir. *B. maritima* POX aktivitesi değerlerinin *B. vulgaris* POX değerlerinden daha yüksek olması tuza toleranslı pancar türünün ROS'ları daha etkin bir şekilde süpürebildiğini ve POX gen ifadesinin daha yüksek olduğunu gösterir (Bor et al., 2003). Tuza toleranslı bitkilerde antioksidan sistemin katkısı bitki türüne göre değişmektedir (Shalata and Tal, 1998). *Limonium sinense* halofit türünde 500 mM NaCl uygulamasından 4 gün sonra CAT aktivitesi en yüksek seviyesine, POX ve SOD aktiviteleri ise 2.ve 3. günde maksimum seviyelerine ulaşmıştır (Zhang et al., 2014). Çalışmamızda şeker pancarı ve yabani pancar bitkilerinde POX enzim aktivitesi 500 mM tuz stresinden 14 gün sonra maksimum seviyesine ulaştı. Tez projemizde *B. vulgaris* 21. gün 500 mM tuz grubu bitkilerinde POX aktivitesi değerlerinin kontrol grubuna yakın olduğu görülmektedir. IR-28 çeltik varyetesinde (tuza duyarlı) tuz stresi arttıkça POX enzim aktivitesinin arttığı kaydedilmesine karşın tuza dirençli pokkali varyetesinin köklerinde tuzun şiddeti arttırıldığında POX enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Demiral and Türkan 2005). Lin and Kao (2001), NaCl miktarı arttıkça azalan kök büyümesinin hücre duvarı peroksidaz aktivitesinin artışına bağlı olduğunu göstermiştir. Tuza toleranslı ve duyarlı domates bitkisinde yapılan çalışmalarda da POX aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Shalata and Tal, 1998). Başka bir çalışmada UV-B radyasyonuna maruz bırakılan üç haftalık şeker pancarı bitkilerinde peroksidaz enzim aktivitesinin yükseldiği rapor edilmiştir (Panagopoulus et al., 1990). 150 mM NaCl stresi uygulanan çeltik bitkilerinde (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) guaiacole özgül peroksidaz aktivitesinin belirgin biçimde yükseldiği tespit edilmiştir (Lee et al., 2001). Tuz stresi uygulanan *Carthamus tinctorius* (aspir) ve *Helianthus annuus* bitkilerinde POX enzim aktivitesi sırasıyla %81,48 ve %76,58 oranlarında yükselmiştir (Jabeen and Ahmad, 2013). Mittal and Dubey (1991), tuza tolerans bakımından farklılık gösteren iki çeltik kültüründe peroksidaz enzimi ve tuza tolerans arasında negatif bir ilişki olduğunu tespit ettiler.

Tez çalışmamızda 250 mM NaCl stresinin *B. maritima* POX gen ifadesini *B. vulgaris*'den daha fazla etkilediği tespit edildi. Farklı bitki türlerinde antioksidan savunma mekanizmaları korunur ve tuz stresine yanıt olarak antioksidan genlerin

ifadesi artar (Menezes-Benavente et al., 2004). Menezes-Benavente et al., (2004), tuz stresi uygulanan çeltik bitkilerinde antioksidan enzimleri kodlayan genlerin transkript seviyelerini inceledi. Tuz uygulanan 11 günlük fidelerde *SodCc1*, *SodCc2*, *CatB*, *APx* ve *GR* gen ifadesinde artış görülmüştür. Dunajska-Ordak, Tyburski et al (2014), *B. vulgaris* yaprak örneklerinden peroksizom askorbat peroksidazı (*BvpAPX*) izole etmişlerdir. *B. vulgaris* Huzar ve Janosik varyeteleri ile *B. vulgaris ssp. maritima* türünde tuz uygulamasından 32 gün sonra *APX* gen ifadesinin belirgin düzeyde artış gösterdiği ancak düşük NaCl miktarlarının 18 gün sonra gen ifadesinde değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Üç pancar genotipinde 300 mM NaCl uygulamasından sonra *BvpAPX* ifade düzeyleri belirgin şekilde artmıştır. Tuz uygulanan *B.vulgaris ssp.maritima* bitkilerinde *APX* enzim aktivitesinin gen ifadesinden daha önce tetiklendiği anlaşılmıştır *Poa pratensis* bitkisinin kuraklığa toleranslı (midnight) ve hassas (brilliant) kültürlerinde yapılan bir çalışmada kuraklık uygulanan ve iyileşme periyoduna alınan bitkilerde *CAT*, *POX*, *FeSOD*, *MnSOD*, *GR* ve *DHAR* gen ifadelerinde değişiklik görülmemiştir (Xu et al., 2011). 6 günlük iyileşme periyodundan sonra midnight kültürünün *CAT*, *POX* ve *APX* aktivitelerinin brilliant kültüründen daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna göre *P.pratensis* bitkisinde *CAT*, *POX* ve *APX* enzimleri kuraklık sonrası iyileşme sürecinde daha etkin rol almaktadır (Xu et al., 2011).

Bitkiler kuraklık, tuz, yüksek sıcaklık ve soğuk gibi olumsuz çevre koşullarına yanıt için moleküler mekanizmalar evrimleştirmiştir (Bor et al., 2003; Kumar Dhar et al., 2014). Bitkilerde stresin uygulama süresine bağlı olarak meydana gelen kısa ve uzun süreli yanıt mekanizmaları mevcuttur. Strese uzun süreli yanıt mekanizmasında savunma ile ilişkili genlerin transkript seviyeleri artar veya baskılanır (Kumar Dhar et al., 2014). Mutasyon ve genetik rekombinasyon süreçleri bitki hücrelerinde strese direncin gelişmesini sağlayan yeni allelerin oluşmasına zemin hazırlamasına rağmen yeni alleler oluşmadan önce bitkilerin çevresel stres faktörleriyle karşılaşmaları muhtemeldir (Peng and Zhang, 2009). Bu tür koşullarda bitkide stresle ilişkili genlerin epigenetik düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır.

En bilinen histon modifikasyonlarından biri olan histon asetilasyonu kromatini gevşeterek gen ifadesini düzenler (Pandey et al., 2002; Kim et al., 2010). Tersinir özellikte olan histon asetilasyonu ve deasetilasyonu reaksiyonları bitkilerin çevresel streslere yanıt süreçlerinde rol alır (Zhao et al., 2014b). Tuz stresine maruz bırakılan bitkilerde gen ifadesi histonların N-kuyruklarındaki amino asitlerin modifikasyonu aracılığıyla düzenlenir (Chen et al., 2010; Sokol et al., 2007). Çalışmamızda, tuz stresi koşullarında *POX* geninin transkripsiyonunun histon asetilasyonuna bağlı değişimlerini ChIP ve qPCR yöntemlerini kullanarak belirledik. GenBank/NCBI veritabanında *B.vulgaris* genomuna ait sadece bir *POX* dizisi mevcuttur. Şeker pancarı ve yabani pancarda *POX* gen aktivasyonunun düzenlenmesinde H3 asetilasyonu ortak bir modifikasyon olmasına rağmen asetilasyon seviyeleri ve hedefleri birbirinden farklıdır. Yabani pancarda en yüksek asetilasyon seviyesinin H3 histonunun 9. lizininde (H3K9); şeker pancarında ise H3 histonunun 27. lizininde (H3K27) olduğu tespit edildi. 500 mM NaCl uygulanan *B. maritima* bitkilerinde H3K9ac; *B. vulgaris*'de ise H3K27ac seviyelerinin *POX* transkripsiyon düzeyleri ile ilişkili olduğu görülmektedir. Buna karşın, *B. vulgaris*'de H3K9 asetilasyon düzeylerinin kontrol gruplarında tuz gruplarına göre daha yüksek olması histon asetilasyonunun tersinir özelliği ile ilişkili olabilir (Magraner-Pardo et al., 2014; Tian et al., 2005). Çalışmamızda tuz stresinin şeker pancarı ve yabani pancar bitkilerinde *POX* enzimini kodlayan genin transkripsiyon seviyelerini ve H3 asetilasyon düzeylerini farklı şekillerde aktive ettiğini belirledik. *B.vulgaris* ve *B.maritima* bitkilerinde H3 asetilasyonunun tuz stresi koşullarında gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu belirledik. Bununla birlikte savunma ile ilgili genlerin aktivasyonu veya baskılanması süreçlerinde başka düzenleyici mekanizmaların da görev aldığı bilinmektedir. Bu yanıtın stres hafızası ile ilişkisinin açığa çıkartılması için yeni çalışmaların yapılması gereklidir. Kromatin modifikasyonları ve küçük RNA'lar bitki türü, doku, organel ve yaşa bağlı olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alır (Sahu et al., 2013; Angers et al. 2010). Bir veya birden fazla histon modifikasyonu diğer proteinlerle etkileşime giren bir sinyal kompleksi işlevi görür ve böylece kromatin yapısını düzenler (Berger, 2007). Literatürde histon modifikasyonlarının abiyotik stres koşullarında gen ifadesini değiştiren önemli düzenleyiciler olduklarını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Yuan et al., 2013).

Mısır ve *Arabidopsis* genomlarında H3K9 asetilasyonu geniş kapsamlı bir dağılıma sahiptir (Zhou et al., 2010). H3K9 ve H3K27 asetilasyon çeşitlerinin her ikisi de aktif genlerle ilişkilidir (Lauria and Rossi, 2011; Zhou et al., 2010). Zhao et al (2014a) mannitol uygulaması (ozmotik stres) yaptıkları mısır bitkilerinin köklerinde *ZmDREB2A* hedef geninde H3K9 ve H4K5 asetilasyon seviyelerinde artış meydana geldiğini saptamışlardır. Aynı çalışma ekibi ekzojen ABA uygulamasının *ZmDREB2A* geninin promotor bölgesinde H3K9 ve H4K5 asetilasyon düzeylerini azalttığını ve böylece transkripsiyonunun baskılandığını tespit ettiler. *S. cerevisiae* türünde yapılan genom düzeyinde ChIP analizlerinde genlerin 5'-uçlarında ve promotor bölgelerinde H3K9, H3K14 ve H4K8 asetilasyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (Magraner-Pardo et al. 2014). Mayada 400 mM NaCl stres uygulamasından sonra ifadesi azalan 400 gen ve ifadesi artan 248 gende H3K9, H3K14 ve H4K8 asetilasyon seviyeleri belirlendi. İfadesi azalan genlerde H3K9, H3K14 ve H4K8 asetilasyon seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir. Aktif genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinde histon asetilasyon seviyesinin artmasına rağmen inaktif genlerde deasetilasyon seviyesi asetilasyondan daha yüksektir. Genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinde yer alan H3K9, H3K14 ve H4K8 bölgelerinin hızlı bir şekilde deasetillenmesi sonucunda gen ifadesi susturulur (Magraner-Pardo et al. 2014). Tuz stresine verilen yanıtların kromatin modifikasyonları ile ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, mısır bitkisi kontrol gruplarında hücre duvarı ile ilişkili *ZmEXPB2* ve *ZmXET1* genlerinin kodlanan ve promotor bölgelerinde H3K9 ve H4K5 asetilasyon düzeylerinde değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir. Buna karşın, 200 mM NaCl stresi uygulanan mısır bitkisi grubunda H3K9 ve H4K5 asetilasyon seviyelerinde %40-60 oranlarında bir artış meydana geldiği belirlenmiştir (Li et al., 2014). Kim et al.'a (2010) göre, kuraklık stresi uygulanan *Arabidopsis* bitkilerinde *RD20* ve *RD29B* genlerinde H3 asetilasyon seviyeleri yükselmesine karşın *RD29A* geninde aynı durum tespit edilememiştir. Mısır bitkisinde tuz, sıcaklık, soğuk ve ağır metal streslerinden sonra total histon asetilasyonu artar ve özellikle sıcaklık stresi uygulanan bitkilerde kontrol gruplarına oranla daha yüksektir (Zhao et al., 2014a). Tütün ve *Arabidopsis* bitkilerinde tuz ve soğuk stresleri H3 histonu 10. serin fosforilasyonu ve H4 asetilasyon seviyelerinin artmasına neden olur (Sokol et al., 2007). Kim et al'a

göre (2012), kuraklık stresi uygulanan *Arabidopsis* bitkilerinde kuraklık stresinden sonra *RD29A*, *RD20* ve *AtGOLS2* genlerinin 5'-bölgesinde H3K9 asetilasyon düzeyi artar ancak bitki stresi atlattıktan (rehidrasyon) sonra asetilasyon büyük ölçüde azalır. Kim et al.'un (2012) çalışması transkripsiyonun çevresel streslere karşı duyarlılığına vurgu yapmaktadır. Kontrol koşullarında transkripsiyon düzeyleri yükselen ribozomal protein (RP) genlerinin ifadesi ozmotik stres uygulamasından sonra azalmıştır (Romero-Santacreu et al., 2009). Ribozomal protein genlerinin ifadesinin artması H3K14ac ve H3K9ac düzeylerinin artması ile bağlantılıdır. UV-B stresi uygulanan confite ve B73 (inbred line) adlı UV-B dirençli mısır hatlarında flavonoid biyosentez genlerinde H3 ve H4 asetilasyon seviyeleri artmıştır (Casati et al., 2008). UV-B stresine hassas mısır hatlarında ise H3 ve H4 asetilasyon düzeylerinde herhangi bir değişiklik saptanamamıştır.

İklim değişikliği, yüksek sıcaklık ve değişen yağış miktarının, ürün geliştirmeyi gıda üretiminden bile daha önemli hale getireceği düşünülmektedir. Bu nedenle tuzdan etkilenen alanların tarım ürünü üretiminde etkili bir şekilde kullanılması için tuza dirençli bitkilerin geliştirilmesi büyük önem taşır (Turan et al., 2012). Tuzdan etkilenen tarlalarda tuza toleranslı bitki türlerinin geliştirilmesi çağımızın en önemli araştırma konularından biridir (Turan et al., 2012). Çeşitli stres koşullarında farklı bitki türlerine ait genlerde histon modifikasyonu seviyeleri hala bilinmemektedir (Yuan et al., 2013). Epigenetik modifikasyonların soylar arası stres hafızasına katkısı hala net bir şekilde açıklanamamıştır. Bu modifikasyonların kalıtılabilir olması durumunda abiyotik stres koşullarıyla karşı karşıya kalan bitkilerde uyumsal bir avantaj sağladıkları anlaşılabilir (Kim et al., 2010). Bitkilerde çevresel streslere yanıtta yer alan epigenetik mekanizmaların bilinmesi, hem bitkilerin strese cevap yollarının anlaşılmasında hem de strese dirençli transgenik bitkilerin geliştirilmesinde önemlidir (Luo et al., 2012; Yuan et al., 2013). Gelecekte hücreye ve bitki türüne özgü epigenetik işaretler ve genom düzeyinde çalışmalar sayesinde strese toleranslı bitkilerin geliştirilmesinde önemli adımlar atılacaktır (Lauria and Rossi, 2011). *Arabidopsis* haricindeki bitki türlerinde abiyotik stres sinyalleme ve tolerans mekanizmalarının anlaşılması önemlidir (Hirayama and Shinozaki, 2010). Bitkilerde epigenetik düzenlemelerin

aydınlatılması için farklı türlerde yapılan çalışmaların önemi büyüktür (Lister et al., 2009).

Önemli ekonomik bir bitki olmasına rağmen *B. vulgaris*'de tuz stresi ve kuraklık üzerine yapılan çalışmalar çok sınırlıdır (Clarke et al., 1993; Dunajska-Ordak and Tyburski, 2014). Özellikle tolerans mekanizmaları ve stres yanıtları kapsamında ilgili genlerin düzenlenmesi ve düzenlenme mekanizmaları bilinmemektedir. Abiyotik stres yanıtlarının önemli bir bileşeni olan antioksidan enzimleri kodlayan genlerin düzenlenmesi stres toleransı açısından önemlidir. Tez projemiz kapsamında tuz stresi yanıtlarında *B. vulgaris* ve *B. maritima* pancar bitkilerinde *POX* enzimini kodlayan genin asetilasyon düzeyleri ve asetilasyonun genin ifadesindeki rolü ilk kez incelendi. Ayrıca araştırmamızda *Arabidopsis*, domates, mısır bitkilerine uygulanan yöntemlerden yararlanılarak pancar bitkisine özgü ChIP metodu geliştirildi. Bununla birlikte çalışmamız, kromatin yeniden düzenlenmesinde model bitkiler dışında bir bitkinin kullanıldığı ilk çalışmadır. Bu açıdan gelecek yıllarda *B. vulgaris*'de epigenetik süreçleri inceleyecek araştırmacılar için çalışmamızın önemli bir referans oluşturduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızın genetik mühendisliği yoluyla abiyotik streslere dirençli tarım ürünleri üretmek için gerekli temel bilgilerin sağlanmasına katkı sağlayacağına inanmaktayız. Şeker pancarında çevresel uyaranların tetiklediği sorunlarla mücadele edebilmek ve strese dirençli bitkiler yetiştirmek için bu bitkinin moleküler mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi edinmeliyiz (Shaw et al., 2002).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ascenzi, R. and Gantt, J.S.**, 1999, Subnuclear distribution of the entire complement of linker histone variants in *Arabidopsis thaliana*, *Chromosoma*, 108:345-355 pp.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. and Salekdeh, G.H.**, 2006, Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves, *Proteomics*, 6:2542-2554 pp.
- Ben, Taarit M., Msaada, K., Hosni, K., Hammami, M., Kchouk, M.E. and Marzouk, B.**, 2009, Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions, *Ind Crops Prod*, 30(3):333-337 pp.
- Berger, S.L.**, 2007, The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*, 447:407-412 pp.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M. and Jacobsen, S.E.**, 2008, Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS ONE*, 3: 3156 p.
- Bertrand, C., Bergounioux, C., Domenichini, S., Delarue, M. and Zhou, D.X.**, 2003, *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway, *J. Biol. Chem.*, 278:28246-28251 pp.
- Biancardi, E., Panella, L.W. and Lewellen, R.T.**, 2012, *Beta maritima*: The Origin of Beets, *Springer, Science+business media, LLC*, 1-2 pp.
- Binzel, M.L. and Ratajczak, R.**, 2001, Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast, Läubli, A. and Lüttge, U. (Eds.), *Salinity: environments-plants-molecules*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 423-450 pp.
- Bird, A.**, 2007, Perceptions of epigenetics, *Nature*, 447:396-398 pp.
- Bonaldi, T., Regula, J.T. and Imhof, A.**, 2004, The use of mass spectrometry for the analysis of histone modifications, *Methods Enzymol.*, 377:111-130 pp.
- Bor, M., Özdemir, F. and Türkan, I.**, 2003, The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L., *Plant Science*, 164:77-84 pp.
- Bordi, A.**, 2010, The influence of salt stress on seed germination, growth and yield of canola cultivars, *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, 38:128-133 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A.** 2001, Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings, *Plant Physiol.*, 126:1024-1030 pp.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M., and Inzé, D.** 1991, Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants, *EMBO J.*, 10:1723-1732 pp.
- Bowler, C., Benvenuto, G., Laflamme, P., Molino, D., Probst, A.V., Tariq, M. and Paszkowski J.**, 2004, Chromatin techniques for plant cells, *The plant journal*, 39:776-789 pp.
- Bradford, M. M.**, 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72:248-254 pp.
- Broday, L., Peng, W., Kuo, M-H., Salnikow, K., Zoroddu, M. and Costa, M.**, 2000, Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation, *Cancer Res.*, 60:238-241 pp.
- Casati, P., Campi, M., Chu, F., Suzuki, N., Maltby, D., Guan, S., Burlingame, A.L. and Walbot, V.**, 2008, Histone Acetylation and Chromatin Remodeling Are Required for UV-B–Dependent Transcriptional Activation of Regulated Genes in Maize, *The Plant Cell*, 20: 827-842 pp.
- Causevic, A., Gentil, M.V., Delaunay, A., El-Soud, W.A., Garcia, Z., Pannetier, C., Brignolas, F., Hagege, D. and Maury, S.**, 2006, Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines, *Planta*, 224:812–827 pp.
- Che, L.X., Tang, D., Wang, K.J., Wang, M., Zhu, K.M., Yu, H.X., Gu, M.H. and Cheng, Z.K.**, 2011, OsAM1 is required for leptotene-zygotene transition in rice, *Cell Res.*, 21:654-665 pp.
- Chen, M., Lv, S. and Meng, Y.**, 2010, Epigenetic performers in plants, *Development Growth and Differentiation*, 52(6):555-566 pp.
- Chew, O., Whelan, J. and Millar, A.H.**, 2003, Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants, *J. Biol. Chem.*, 278:46869-46877 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chinnusamy, V., Gong, Z. and Zhu, J.K.**, 2008, Absciscic acid - mediated epigenetic processes in plant development and stress responses, *J. Integr. Plant Biol.*, 50: 1187-1195 pp.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu J-K.**, 2004, Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *Journal of Experimental Botany*, 55(395) Crosstalk in Plant Signal Transduction Special Issue, 225-236 pp.
- Chua, Y.L., Brown, A.P. and Gray, J.C.**, 2001, Targeted histone acetylation and altered nuclease accessibility over short regions of the pea plastocyanin gene, *Plant Cell*, 13:599-612 pp.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S. and Sompornpailin, K.**, 2011, High contents of proline and anthocyaninincrease protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica, *Aust J Crop Sci*, 5:1191-1198 pp.
- Ciftci-Yilmaz, S., Morsy, M.R., Song, L., Coutu, A., Krizek, B.A., Lewis, M.W., Warren, D., Cushman, J., Connolly, E.L. and Mittler, R.**, 2007, The EARmotif of the Cys2/His2 type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress, *J Biol Chem.*, 282:9260-9268 pp.
- Clapier, C.R. and Cairns, B.R.**, 2009, The biology of chromatin remodeling complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, 78: 273-304 pp.
- Clarke, N.A., Hetschkun, H., Jones, C., Boswell, E. and Marfaing, H.**, 1993, Identification of stress tolerance traits in sugar beet. Jackson M.B. and Black C.R. (Eds.), *Interaction Stresses on Plants in a Changing Climate*. Springer-Verlag, 1993, Berlin, 511-524 pp.
- Clayton, A.L. and Mahadevan, L.C.**, 2003, MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H-3 and inducible gene regulation, *FEBS Lett.*, 546:51-58 pp.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta V.**, 2002, Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites, *Cell*, 111:185-196 pp.
- Dabrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska-Hebda, M. and Skrzypek, E.**, 2007, Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family, *Acta Biol Cracow Ser Bot.*, 49:7-17 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dang, Y.P., Dalal, R.C., Mayer, D.G., McDonald, M., Routely, R., Schwenke, G.D., Buck, S.R., Daniells, I.G., Singh, D.K., Manning, W. and Ferguson, N.,** 2008, High subsoil chloride concentrations reduce soil water extraction and crop yield on Vertisols in north-eastern Australia, *Aust J Agric Res.*, 59:321-330 pp.
- Dang, Y.P., Dalal, R.C., Routley, R., Schwenke, G.D. and Daniells, I.,** 2006, Subsoil constraints to grain production in the cropping soils of the northeastern region of Australia: an overview, *Aust J Exp Agric.*, 46:19-35 pp.
- Dantas, B.F., De Sa, R.L. and Aragao, C.A.,** 2007, Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress, *Rev Bras de Sementes*, 29:106-110 pp.
- Das, K. and Roychoudhury, A.,** 2014, Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Front. Environ. Sci.*, 2:53 p.
- Dat, J.F., Pellinen, R., Beeckman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjärvi, J., Inzé, D. and Van Breusegem, F.,** 2003, Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco, *Plant J.*, 33:621-632 pp.
- Demetriou, K., Kapazoglou, A., Tondelli, A., Francia, T., Stanca, M.A. and Bladenopoulos, K. and Tsaftaris A.S.,** 2009, Epigenetic chromatin modifiers in barley: I. cloning, mapping and expression analysis of the plant specific HD2 family of histone deacetylases from barley, during seed development and after hormonal treatment, *Physiol. Plant.*, 136:358-368 pp.
- Demiral, T. and Türkan, I.,** 2005, Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 53:247-257 pp.
- Dennis, E.S. and Peacock, W.J.,** 2007, Epigenetic regulation of flowering, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10:520-527 pp.
- Dhawan, R., Luo, H., Foerster, A.M., Abuqamar, S., Du, H.N., Briggs, S.D., Mittelsten Scheid, O., Mengiste, T.,** 2009, HISTONE MONOUBIQUITINATION 1 interacts with a subunit of the Mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in Arabidopsis, *Plant Cell*, 21:1000-1019 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ding, Y., Lapko, H., Ndamukong, I., Xia, Y., Al-Abdallat, A., Lalithambika, S., Sadler, M., Saleh, A., Fromm, M., Riethoven, J.J., Lu, G. and Avramova, Z.,** 2009, The Arabidopsis chromatin modifier ATX1, the myotubularin-like AtMTM and the response to drought, *Plant Signal. Behav.*, 4:1049-1058 pp.
- Dohm, J.C., Minoche, A.E., Holtgrawe, D., Capella-Gutierrez, S., Zakrzewski, F., Tafer, H., Rupp, O., Sørensen, T.R., Stracke, R., Reinhardt, R., Goesmann, A., Kraft, T., Schulz, B., Stadler, P.F., Schmidt, T., Gabaldon, T., Lehrach, H., Weisshaar, B. and Himmelbauer, H.,** 2013, The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*), *Nature*, doi:10.1038/nature12817, 1-10 pp.
- Dong, Q. and Han, F.,** 2012, Phosphorylation of histone H2A is associated with centromere function and maintenance in meiosis, *The Plant Journal*, 71:800-809 pp.
- Downen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Downen, J.M., Nery J.R., Dixon J.E. and Ecker J.R.,** 2012, Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress, *PNAS Proc Natl Acad Sci USA*, 109:2183-2191 pp.
- Dunajska-Ordak, K., Skorupa-Klaput, M., Kurnik, K., Tretyn, A. and Tyburski, J.,** 2014, Cloning and Expression Analysis of a Gene Encoding for Ascorbate Peroxidase and Responsive to Salt Stress in Beet (*Beta vulgaris*), *Plant Mol Biol Rep.*, 32:162-175 pp.
- Elliott, M.C. and Weston, G.D.,** 1993, Biology and physiology of the sugar-beet plant. Cooke D.A., Scott R.K., (Eds.) The sugar beet crop: science into practice. Chapman and Hall, London, 37-66 pp.
- Elstner, E.F.,** 1991, Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cell. Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism, Pell, E.J. and Stefen, K.L. (Eds.) American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, 13-25 pp.
- Fang, H., Liu, X., Thorn, G., Duan, J. and Tian, L.,** 2014, Expression analysis of histone acetyltransferases in rice under drought stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443:400–405 pp.
- Feng, J. and Shen, W-H.,** 2014, Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants, *Frontiers in plant science*, 5:83 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feng, S.Y., Ota, K., Yamada, Y., Sawabu, N. and Ito, T.,** 2004, A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313:922-925 pp.
- Fenton, H.J.H.,** 1899, Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts, *Proc. Chem. Soc.*, 25:224 p.
- Fernández-Torquemada, Y. and Sánchez-Lizaso, J.L.,** 2013, Effects of salinity on seed germination and early seedling growth of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Estuarine, Coastal Shelf Sci.*, 119:64-70 pp.
- Fink, R.C. and Scandalios, J.G.,** 2002, Molecular evolution and structure: Function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 399:19-36 pp.
- Fischer, H. E.,** 1989, Origin of the 'Weisse Schlesische Rube' (white Silesian beet) and resynthesis of sugar beet, *Euphytica*, 41:75-80 pp.
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D.,** 2003, Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond, *Nature*, 425:475-479 pp.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat J.F. and Scott, I. M.,** 1997, Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiologia Plantarum*, 100(2):241-254 pp.
- Foyer, C.H.,** 2002, The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In *Oxidative Stress in Plants*, Inze, D. and Van Montagu, M. (Eds.), Taylor and Francis, 33-68 p
- Fu, W., Wu, K. and Duan, J.,** 2007, Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 356:843-850 pp.
- Gao, Z., Fu, S., Dong, Q., Han, F. and Birchler, J.A.,** 2011, Inactivation of a centromere during the formation of a translocation in maize, *Chromosome Res.*, 19:755-761 pp.
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D. and Grandjean, O.,** 2001, Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*, *Development*, 128:4847-4858 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gendrel, A., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V. and Martienssen, R.A.,** 2002, Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1, *Science*, 297(5588):1871-1873 pp.
- Gernand, D., Demidov, D., Houben, A.,** 2003, The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes, *Cytogenet. Genome Res.*, 101:172-176 pp.
- Ghassemi, F., Jakeman, A.J. and Nix, H.A.,** 1995, Salinisation of land and water resources: Human causes, extent, management and case studies, UNSW Press, Sydney, Australia, and CAB International, Wallingford, UK.
- Ghoulam, C., Foursy, A. and Fares, K.,** 2002, Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five beet cultivars, *Environ. Exper. Bot.*, 47: 39-50 pp.
- Gilmour, D.S. and Lis, J.T.,** 1984, Detecting protein-DNA interactions in vivo: Distribution of RNA polymerase on specific bacterial genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:4275-4279 pp.
- Gilmour, D.S. and Lis, J.T.,** 1985, In vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell Biol.*, 5:2009-2018 pp.
- Goldknopf, I.L., Taylor, C.W., Baum, R.M., Yeoman, L.C., Olson, M.O., Prestayko, A.W., Busch H.,** 1975, Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein, *J. Biol.Chem.*, 250:7182-7187 pp.
- Golubovskaya, I.N., Hamant, O., Timofejeva, L., Wang, C.J., Braun, D., Meeley, R. and Cande, W.Z.,** 2006, Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase, *I. J. Cell Sci.*, 119:3306-3315 pp.
- Gomes-Filho, E., Machado Lima, C.R.F., Costa, J.H., da Silva, A.C., daGuia Silva Lima, M., de Lacerda, C.F. and Prisco, J.T.,** 2008, Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment, *Plant Cell Rep*, 27:147-157 pp.
- Goodrich, J. and Tweedie, S.,** 2002, Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18, 707-746 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grativol, C., Hemerly, A.S. and Ferreira, P.C.G.,** 2012, Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations, *Biochim. Biophys. Acta*, 1819:176-185 pp.
- Greenway, H, Munns, R.,** 1980, Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes, *Annu Rev Plant Physiol*, 31:149-190 pp.
- Gu, X., Jiang, D., Wang, Y., Bachmair, A. and He, Y.,** 2009, Repression of the Floral transition via histone H2B monoubiquitination, *Plant J.*, 57:522-533 pp.
- Guan, B., Yu, J., Chen, X., Xie, W. and Lu, Z.,** 2011, Effects of salt stress and nitrogen application on growth and ion accumulation of *Suaeda salsa* plants, *Intl Conf Remote Sens Environ Transport Engin*, 24-26 June, 8268-8272 pp.
- Haber, F. and Weiss, J.,** 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proc. R. Soc. London Ser. A*, 147:332-334 pp.
- Halfter, U, Ishitani, M. and Zhu, J.K.,** 2000, The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium binding protein SOS3, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:3735-3740 pp.
- Hall, J.A. and Georgel, P.T.,** 2007, CHD proteins: A diverse family with strong ties, *Biochem. Cell Biol.*, 85:463-476 pp.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.,** 1989, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford, UK, 2nd edition.
- Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C. and Stam, M.,** 2007, Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization, *Plant Methods*, 3:11 p.
- He, Y., Michaels, S.D. and Amasino, R.M.,** 2003, Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis, *Science*, 302:1751-1754 pp.
- Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. and Brown, S.B.,** 1987, The degradation of chlorophyll-a biological enigma, *New Phytol.*, 107: 255-302 pp.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.,** 1998, The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:425-479 pp.
- Herzog, V. and Fahimi, H.,** 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Anal. Biochem.*, 55:554-562 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Himanen, K., Woloszynska, M., Boccardi, T.M., DeGroeve, S., Nelissen, H., Bruno, L., Vuylsteke, M., Van Lijsebettens, M.,** 2012, Histone H2B monoubiquitination is required to reach maximal transcript levels of circadian clock genes in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 72:249-260 pp.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. and Matsui, H.,** 2001, A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.*, 42:462-468 pp.
- Hirayama, T., Shinozaki, K.,** 2010, Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future, *The Plant Journal*, 61:1041-1052 pp.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I.,** 1950, The water culture method for growing plants without soil, *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347:1-32 pp.
- Hu, Y., Zhang, L., Zhao, L., Li, J., He, S., Zhou, K., Yang, F., Huang, M., Jiang, L. and Li, L.,** 2011, TrichostatinA selectively suppresses the cold-induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize, *PLoS ONE*, 6:22132 p.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B., Askew, P.,** 2002, A modern tool for classical plant growth analysis, *Ann Bot.*, 90:485-488 pp.
- Ibrar, M., Jabeen, M., Tabassum, J., Hussain, F. and Ilahi, I.,** 2003, Salt tolerance potential of *Brassica juncea* Linn., *J Sci Tech Univ Peshawar*, 27:79-84 pp.
- Iyengar, E.R.R., Reddy, M.P.,** 1996, Photosynthesis in highly salt-tolerant plants. Pessaraki M., (Eds.) Handbook of photosynthesis, Marcel Dekker, New York, 897-909 pp.
- Jabeen, N. and Ahmad, R.,** 2013, The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan, *J Sci Food Agric*, 93:1699-1705 pp.
- Jablunka, E., Lamb, M.J.,** 2002, The changing concept of epigenetics, *Ann NY Acad Sci*, 981:82-96 pp.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E.,** 2002, Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase, *Nature*, 416:556-560 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. and Michaels, S.D.,** 2009, ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16:763-768 pp.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D.,** 2001, Translating the histone code, *Science*, 293:683-692 pp.
- Jerzmanowski, A.,** 2007, SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1769:330-345 pp.
- Jing, Y., Zhang, D., Wang, X., Tang, W., Wang, W., Huai, J., Xu, G., Chen, D., Li, Y. and Lin, R.,** 2013, Arabidopsis Chromatin Remodeling Factor PICKLE Interacts with Transcription Factor HY5 to Regulate Hypocotyl Cell Elongation, *The Plant Cell*, 25(1):242-256 pp.
- Johnson, L.M., Cao, X. and Jacobsen, S. E.,** 2002, Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation, *Current Biology*, 12(16):1360-1367 pp.
- Kaiser, W.M.,** 1979, Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplast by hydrogen peroxide, *Planta*, 145:377-382 pp.
- Kallin, E. and Zhang, Y.,** 2004, Chromatin remodeling. Encyclopedia of Biological Chemistry, Lennarz W. J., Lane M. D., (Eds.), Academic Press, Elsevier Inc. 456462 pp.
- Kang, J., Lin, C., Chen, J. and Liu, Q.,** 2004, Copper induces histone hypoacetylation through directly inhibiting histone acetyltransferase activity, *Chem. Biol. Interact.*, 148:115-123 pp.
- Karaczyn A.A., Golebiowski, F. and Kasprzak, K.S.,** 2006, Ni(II) affects ubiquitination of core histones H2B and H2A, *Exp. Cell Res.*, 312: 3252-3259 pp.
- Kaszas, E. and Cande, W.Z.,** 2000, Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin, *J. Cell. Sci.*, 113:3217-3226 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Katan-Khaykovich, Y. and Struhl, K.,** 2002, Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors, *Genes Dev.*, 16:743-752 pp.
- Katerji, N., van Hoorn, J.W., Hamdy, A., Mastrorilli M., Mou Karzel, E.,** 1997, Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomata, conductance, growth and field, *Agric Water Manag.*, 1997, 34:57-69 pp.
- Katsuhara, M., Kawasaki, T.,** 1996, Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots, *Plant Cell Physiol*, 37(2):169-173 pp.
- Ke, Q., Davidson, T., Chen, H., Kluz, T., and Costa, M.,** 2006, Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride, *Carcinogenesis*, 27:1481-1488 pp.
- Khan, M.M., Al-Masoudi, R.S.M., Al-Said, F. and Khan, I.,** 2013, Salinity Effects on Growth, Electrolyte Leakage, Chlorophyll Content and Lipid Peroxidation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.), International Conference on Food and Agricultural Sciences IPCBEE vol.55:6 p.
- Khan, M.A. and Rizvi, Y.,** 1994, Effect of salinity, temperature and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. *Stocksii*, *Can J Bot*, 72:475-479 pp.
- Khodarahmpour, Z., Ifar, M. and Motamedi, M.,** 2012, Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage, *Afr J Biotechnol*, 11:298-304 pp.
- Kim, J.M., To, T.K., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., Toyoda, T., Kimura, H., Shinozaki, K. and Seki, M.,** 2008, Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 49:1580-1588 pp.
- Kim, J.M., To, T.K., Nishioka, T. and Seki, M.,** 2010, Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses, *Plant Cell Environ.*, 33:604-611 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, J.M., To, T.K., Ishida, J., Matsui, A., Kimura, H. and Seki, M.,** 2012, Transition of Chromatin Status During the Process of Recovery from Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 53(5):847-856 pp.
- Knoepfler, P.S. and Eisenman, R.N.,** 1999, Sin meets NuRD and other tails of repression, *Cell*, 99(5):447-450 pp.
- Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I.,** 2007, The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environ. Exp. Bot.*, 60, 344-351 pp.
- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M. and Goto, K.,** 2003, *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER 2 gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes, *Plant Cell Physiol.*, 44:555-564 pp.
- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V. and Mittler, R.,** 2008, Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination, *J. Biol. Chem.*, 283: 34197-34203 pp.
- Kouzarides, T.,** 2007, Chromatin modification and their function, *Cell*, 128:693-705 pp.
- Kumar Dhar, M., Vishal, P., Sharma, R. And Kaul, S.,** 2014, Epigenetic Dynamics: Role of Epimarks and Underlying Machinery in Plants Exposed to Abiotic Stress, *International Journal of Genomics*, 2014: 2014 p.
- Kumari, S., Panjabi, V., Kushwaha, H.R., Sopory, S.K., Singla-Pareek, S.L. and Pareek, A.,** 2009, Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L., *Funct Integr Genomics*, 9:109-123 pp.
- Kwon, C.S., Lee, D., Choi, G. and Chung, W.I.,** 2009, Histone occupancy-dependent and-independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 60:112-121 pp.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T.,** 2001, Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, *Nature*, 410:116-120 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Laribee, R.N., Fuchs, S.M. and Strahl, B.D.**, 2007, H2B ubiquitylation in transcriptional control: a FACT-finding mission, *Genes Dev.*, 21:737-743 pp.
- Lau, O.S. and Deng, X.W.**, 2012, The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later, *Trends Plant Sci.*, 17: 584-593 pp.
- Lauria, M. and Rossi, V.**, 2011, Epigenetic control of gene regulation in plants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809:369-378 pp.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E.**, 2010, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals, *Nat Rev Genet*, 11:204-220 pp.
- Lee, D.H., Kim, Y.S. and Lee, C.B.**, 2001, The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.), *J. Plant Physiol.*, 158:737-745 pp.
- Li, H., Yan, S., Zhao, L., Tan, J., Zhang, Q., Gao, F., Wang, P., Hou, H. and Li, L.**, 2014, Histone acetylation associated up-regulation of the cell wall related genes is involved in salt stress induced maize root swelling, *Bmc Plant Biology*, 14:105 p.
- Li, X., Wang, X., He, K., Ma, Y., Su, N., He, H., Stolc, V., Tongprasit, W., Jin, W., Jiang, J., Terzaghi, W., Li, S. and Deng, X.W.**, 2008, High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between dna methylation, histone methylation, and gene expression, *Plant Cell*, 20:259-276 pp.
- Lin, X., Tirichine, L. and Bowler, C.**, 2012, Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species, *Plant Methods*, 8:48 p.
- Lippman, Z., Gendrel, A.V., Black, M., Vaughn, M.W., Dedhia. N., McCombie, W.R., Lavine, K., Mittal, V., May, B., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Doerge, R.W., Colot, V. and Martienssen R.**, 2004, Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control, *Nature*, 430:471-476 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Harvey-Millar, A., Thomson, J.A., Ren, B. and Ecker, J.R., 2009,** Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature*, 19: 315-322 pp.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X. and Cao, X., 2010,** Histone methylation in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61:395-420 pp.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S. and Zhu, J.K., 2000,** The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:3730-3734 pp.
- Liu, Q., Sakuma, Y., Abe, H., Kasuga, M., Miura, S., Yamaguchi Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 1998,** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 10:1491-1406 pp.
- Lolas, I.B., Himanen, K., Gronlund, J.T., Lynggaard, C., Houben, A., Melzer, M., Van Lijsebettens, M., Grasser, K.D., 2010,** The transcript elongation factor FACT affects *Arabidopsis* vegetative and reproductive development and genetically interacts with HUB1/2, *Plant J.*, 61:686-697 pp.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J., 1997,** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature*, 389:251-260 pp.
- Luo, M., Liu, X., Singh, P., Cui, Y., Zimmerli, L. and Wu, K., 2012,** Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2):129-136 pp.
- Madhava Rao, K.V. and Sresty, TV., 2000,** Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Sci.*, 157(1):113-128 pp.
- Magraner-Pardo, L., Pelechano, V., Coloma, M.D. and Tordera, V., 2014,** Dynamic remodeling of histone modifications in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *BMC Genomics*, 15:247 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahajan, S., Pandey, G.K., and Tuteja, N.**, 2008, Calcium and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway, *Arch Biochem Biophys*, 471:146-158 pp.
- Marmorstein, R.**, 2001, Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:422-432 pp.
- Marschner, H.**, 1995, Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd edn. Academic Press, London, 889 p.
- Martinez-Atienza, J., Jiang, X., Garcadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M. and Quintero, F.J.**, 2007, Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice, *Plant Physiol*, 143:1001-1012 pp.
- Mathieu, O., Reinders, J., Caikovski, M., Smathajitt, C. and Paszkowski, J.**, 2007, Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation, *Cell*, 130: 851-862 pp.
- Menezes-Benavente, L., Teixeira, F.K., Alvim Kamei, C.L. and Margis-Pinheiro, M.**, 2004, Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian *indica* rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Science*, 166:323-331 pp.
- Mickelbart, M.V., Hasegawa, P.M., Bailey-Serres, J.**, 2015, Genetic Mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability, *Nat. Rev. Genet.*, 16:237-251 pp.
- Mittal, S., Kumari, N. and Sharma, V.**, 2012, Differential response of salt stress on Brassica juncea: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes, *Plant Physiol Biochem*, 54:17-26.
- Mittal, R. and Dubey, R.S.**, 1991, Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance, *Plant Physiol. Biochem.*, 29 (1):31-40.
- Mittler, R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *TRENDS in Plant Science*, 7(9): 405-410 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F.V.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *TRENDS in Plant Science*, 9 (10): 490-498 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi Shinozaki, K., Kamada, H. and Shinozaki, K.,** 1995, 2 genes that encode ribosomal-protein-S6 kinase homologs are induced by Cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 358:199-204 pp.
- Mizzen, C., Kuo, M.H., Smith, E., Brownell, J., Zhou, J., Ohba, R., Wei, Y., Monaco, L., Sassone-Corsi, P. And Allis C.D.,** 1998, Signaling to chromatin through histone modifications: How clear is the signal? Cold spring harbor symp., Quant. Biol. LXIII: 469-481 pp.
- Mlynarova, L., Nap, J.P. and Bisseling, T.,** 2007, The SWI/SNF chromatin-remodeling gene *AtCHR12* mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress, *Plant J.*, 51:874-885 pp.
- Moggs, J.G. and Orphanides, G.,** 2004, The role of chromatin in molecular mechanisms of toxicity, *Toxicol Sci.*, 80(2):218-224 pp.
- Moller, I.M.,** 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52:561-591 pp.
- Mostafavi, K.,** 2012, Effect of salt stress on germination and early seedling growth stage of sugar beet cultivars, *American-Eurasian J Sust Agric.*, 6:120-125 pp.
- Munns, R.,** 1993, Physiological processes limiting plant growth in saline soil:some dogmas and hypotheses, *Plant Cell Environ*, 16:15-24 pp.
- Munns, R.,** 2005, Genes and salt tolerance: bringing them together, *New Phytol*, 167:645-663 pp.
- Munns, R. and Tester, M.,** 2008, Mechanisms of Salinity Tolerance, *Annu Rev Plant Biol.*, 59:651-681 pp.
- Müntz, K.,** 2007, Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles, *J. Exp. Botany*, 58:2391-2407 pp.
- Nakashima, K., Ito, Y. And Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2009, Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses, *Plant Physiology*, 149:88-95 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Noctor, G. And Foyer, C.**, 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:249-279 pp.
- Pakniyat, H. and Amnion, M.**, 2007, Sodium and proline accumulation as osmoregulators in tolerance of sugar beet genotypes to salinity, *Pak J Biol Sci.*, 22:4081-4086 pp.
- Panagopoulos, I., Bornman, J.F. and Björn, L.O**, 1990, Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 8(1):73-87 pp.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pikaard, C. S., Richards, E. J., Bender, J., Mount, D.W. and Jorgensen, R.A.**, 2002, Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes, *Nucleic Acids Res.*, 30:5036-5055 pp.
- Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Wang, Y., Chen, Y. and Yan, X.**, 2010, Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, *J Proteome Res*, 9:2584-2599 pp.
- Pantoja, O., Dainty, J. and Blumwald, E.**, 1990, Tonoplast ion channels from sugar-beet cell-suspensions. Inhibition by amiloride and its analogs, *Plant Physiol*, 94:1788-1794 pp.
- Parida, A.K. and Das, A.B.**, 2005, Salt tolerance and salinity effect on plants: a review, *Ecotoxicol Environ Saf*, 60:324-349 pp.
- Parihar, P., Singh. S., Singh, R.. Singh, V.P. and Prasad, S.M.**, 2014, Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review, *Environ Sci Pollut Res.*, 22:4056-4075 pp.
- Peng, H. and Zhang, J.**, 2009, Plant genomic DNA methylation in response to stresses: potential applications and challenges in plant breeding. *Progress in Natural Science*, 19(9):1037-1045 pp.
- Perrella, G., Lopez-Vernaza, M.A., Carr, C., Sani, E., Grossele, V., Verduyn, C., Kellermeier, F., Hannah, M.A. and Amtmann, A.**, 2013, Histone deacetylase complex1 expression level titrates plant growth and abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 25:3491-3505 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perruc, E., Kinoshita, N. and Lopez-Molina, L.,** 2007, The role of chromatin-remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during Arabidopsis seed germination, *Plant Journal*, 52(5):927-936 pp.
- Peterson, C.L. and Herskowitz, I.,** 1992, Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription, *Cell*, 68(3):573-583 pp.
- Pidgeon, J.D. and Jaggard, K.W.,** 1998, Drought stress in sugar beet-the extent of the problem and future solutions, *Aspects Appl. Biol.*, 52: 65-70 pp.
- Pidgeon, J.D., Werker, A.R., Jaggard, K.W., Richter, G.M., Lister, D.H. and Jones, P.D.,** 2001, Climatic impact on the productivity of sugar beet in Europe, 1961-1995, *Agric. Forest Meteorol.*, 109:27-37 pp.
- Piotr, S., Grazyna, K.,** 2005, Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress, *Physiol Plant*, 125:31-40 pp.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K. and Young, R.A.,** 2005, Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast, *Cell*, 122:517-527 pp.
- Pontvianne, E., Blevins, T. and Pikaard, C.S.,** 2010, Arabidopsis histone lysine methyltransferases, *Adv. Bot. Res.*, 53:1-22 pp.
- Prigent, C. and Dimitrov, S.,** 2003, Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell Sci.*, 116:3677-3685 pp.
- Probst, A.V., Fransz, P., Paszkowski, J., Mittelsten Scheid, O.,** 2003, Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin, *Plant J.*, 33:743-749 pp.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W.,** 2002, Histone H2A variants H2AX and H2AZ, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12: 162-169 pp.
- Regulski, M., Lu, Z., Kendall, J., Donoghue, M.T., Reinders, J., Llaca, V., Deschamps, S., Smith, A., Levy, D., McCombie, W.R., Tingey, S., Rafalski, A., Hicks, J., Ware, D., Martienssen, R.,** 2013, The maize methylome influences mRNA splice sites and reveals widespread paramutation-like switches guided by small RNA, *Genome Res*, 23:1651-1662 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reitsema, T., Klovov, D., Banath, J.P. and Olive P.L.,** 2005, DNA-PK is responsible for enhanced phosphorylation of histone H2AX under hypertonic conditions, *DNA Rep.*, 4:1172-1181 pp.
- Rice, J.C. and Allis, C.D.,** 2001, Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13:263-273 pp.
- Rich, P. R. and Bonner, W.D.Jr.,** 1978, The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, 188:206-213 pp.
- Richards, E.J. and Elgin, S.C.,** 2002, Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects, *Cell*, 108:489-500 pp.
- Rios, G., Gagete, A.P., Castillo, J., Berbel, A., Franco, L. and Rodrigo, I.,** 2007, Absciscic acid and desiccation-dependent expression of a novel putative SNF5-type chromatin-remodeling gene in *Pisum sativum*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 45:427-435 pp.
- Rodriguez-Paredes, M. and Esteller, M.,** 2011, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology, *Nature medicine*, 17(3):330-339 pp.
- Romero-Aranda, R., Soria, T. and Cuartero, S.,** 2001, Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions, *Plant Sci*, 160:265-272 pp.
- Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E. and Alepuz, P.,** 2009, Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *RNA*, 15:1110-1120 pp.
- Saez, A., Rodrigues, A., Santiago, J., Rubio, S. and Rodriguez, P. L.,** 2008, HAB1-SWI3B interaction reveals a link between absciscic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 20(11): 2972-2988 pp.
- Sahu, P.P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M. and Prasad, M.,** 2013, Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation, *Plant Cell Rep.*, 32:1151-1159 pp.
- Sairam, R.K. and Tyagi, A.,** 2004, Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, *CURRENT SCIENCE*, 86(3):407-421 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sairam, R.K., Roa, K.V. and Srivastava, G.C.**, 2002, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Sci*, 163:1037-1046 pp.
- Saleh, A., Alvarez-Venegas, R. and Avramova, Z.**, 2008, An efficient chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for studying histone modifications in *Arabidopsis* plants, *Nature protocols*, 3(6):1018-1024 pp.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.**, 2006, Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform, *Protocol. Cold Spring Harb Protoc*, doi:10.1101/pdb.prot4455.
- Sani, E., Herzyk, P., Perrella, G., Colot, V. and Amtmann, A.**, 2013, Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome, *Genome Biol.*, 14:R59 p.
- Santa-Cruz, M.M., Martinez-Rodriguez, F., Perez-Alfocea, R., Romero-Aranda, R. and Bolarin, M.C.**, 2002, The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype, *Plant Sci.*, 162:825-831 pp.
- Saze, H.**, 2008, Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19:527-536 pp.
- Schmitz, R.J., Tamada, Y., Doyle, M.R., Zhang, X. and Amasino, R.M.**, 2009, Histone H2B deubiquitination is required for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C and for proper control of flowering in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 149:1196-1204 pp.
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F.**, 2009, The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics, *Science*, 326:1112-1115 pp.
- Schroeder-Reiter, E., Houben, A., Wanner, G.**, 2003, Immunogold labeling of chromosomes for scanning electron microscopy: a closer look at phosphorylated histone H3 in mitotic metaphase chromosomes of *Hordeum vulgare*, *Chromosome Res.*, 11: 585-596 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schubeler, D., MacAlpine, D.M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D.E., O'Neill, L.P., Turner, B.M., Delrow, J., Bell, S.P. and Groudine, M.,** 2004, The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote, *Genes Dev.*, 18:1263-1271 pp.
- Schwabish, M.A. and Struhl, K.,** 2007, The Swi/Snf complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation in vivo, *Molecular and Cellular Biology*, 27, 6987-6995 pp.
- Shalata, A. and Tal, M.,** 1998, The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the of the cultivated tomato and its wild salttolerant relative *Lycopersicon pennellii*, *Physiol. Plant*, 104:169-174 pp.
- Shanker, A.K. and Venkateswarlu, B.,** 2011, Abiotic stress in plants- mechanisms and adaptations, TechJaneza Trdine, 9, 51000 Rijeka, Croatia.
- Shaw, B., Thomas, TH. and Cooke, D.T.,** 2002, Responses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to drought and nutrient deficiency stress, *Plant Growth Regulation*, 37:77-83 pp.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.K.,** 2000, The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6896-6901 pp.
- Shi, H. and Zhu, J.K.,** 2002, *SOS4*, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 129:585-593 pp.
- Shi, Y.J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T. and Shi, Y.,** 2005, Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors, *Mol. Cell*, 19:857-864.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2007, Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221-227 pp.
- Smart, R.E. and Bingham, G.E.,** 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiol*, 53:258-260 pp.
- Smirnoff, N.,** 1995, Antioxidant systems and plant response to the environment, in *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*, N. Smirnoff, (Eds.), 217-243 pp, Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A. and 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 pp.
- Song, C.P., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Wang, P. and Zhu, J.K.,** 2005, Role of an Arabidopsis AP2/EREBP - type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses, *Plant Cell*, 17:2384-2396 pp.
- 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(7):e41274 p.
- Spencer, V.A. and Davie, J.R.,** 1999, Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression, *Gene*, 240(1):1-12 pp.
- Sridha, S., and Wu, K.,** 2006, Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis, *Plant J.*, 46:124-133 pp.
- Sridhar, V.V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu JK.,** 2007, Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination, *Nature*, 447:735-738 pp.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D.,** 2000, The language of covalent histone modifications, *Nature*, 403:41-45 pp.
- Sun, W.H., Duan, M., Shu, D.F., Yang, S. and Meng, Q.W.,** 2010, Over-expression of tomato tAPX gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress, *Biol. Plant.*, 54:614-620 pp.
- Sung, S. and Amasino, R.M.,** 2005, Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56:491-508 pp.
- Sze, H., Li, X. and Palmgren, M.G.,** 1999, Energization of plant membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis, *Plant Cell*, 11: 677-689 pp.
- Tariq, M. and Paszkowski, J.,** 2004, DNA and histone methylation in plants, *TRENDS in Genetics*, 20(6):244-251 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P. and McDonald, G.K.,** 2011, Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress, *J Exp Bot*, 62:2189-2203 pp.
- Tian, L., Fong, M.P., Wang, J.J., Wei, N.E., Jiang, H., Doerge, R.W. and Chen, Z.J.,** 2005, Reversible Histone Acetylation and Deacetylation Mediate Genome-Wide, Promoter-Dependent and Locus-Specific Changes in Gene Expression During Plant Development, *Genetics*, 169:337-345 pp.
- To, T.K., Nakaminami, K., Kim, J.M., Morosawa, T., Ishida, J. and Tanaka, M.,** 2011, Arabidopsis HDA6 is required for freezing tolerance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 406:414-419 pp.
- Tsuji, H., Saika, H., Tsutsumi, N., Hirai, A. and Nakazono, M.,** 2006, Dynamic and Reversible Changes in Histone H3-Lys4 Methylation and H3 Acetylation Occurring at Submergence-inducible Genes in Rice, *Plant Cell Physiol.*, 47(7): 995-1003 pp.
- Turan, S., Cornish, K. and Kumar, S.,** 2012, Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering, *Australian journal of crop science*, 6(9):1337-1348 pp.
- Unesco Water Portal,** <http://www.unesco.org/water> (Erişim tarihi: 2007).
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F. and Pompon D.,** 1997, Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related Arabidopsis thaliana NADPH cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5, *J. Biol. Chem.*, 272:19176-19186 pp.
- Van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. and Gasser, S.M.,** 2004, Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair, *Cell*, 119:777-788 pp.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., Reupold-Popp, P., Sandermann, H.Jr., Langebartels, C.,** 1994, Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage, *Nat. Biotechnol.*, 12:165-168 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van Dijk, K., Ding, Y., Malkaram, S., Riethoven, J-J.M., Liu R., Yang, J., Laczko, P., Chen, H., Xia, Y., Ladunga, I., Avramova, Z. and Fromm, M.,** 2010, Dynamic changes in genome-wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Plant Biology*, 10:238 p.
- Varshney, R.K., Bansal, K.C., Aggarwal, P.K., Datta, S.K., Craufurd, P.Q.,** 2011, Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype? *Trends Plant Sci*, 16:363-371 pp.
- Vinocour, B. and Altman, A.,** 2005, Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, *Current Opinion in Biotechnology*, 16:123-132 pp.
- Vlachonasios, K., Thomashow, M. and Triezenberg, S.,** 2003, Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression, *Plant Cell*, 15:626-638 pp.
- Waddington, C.H.,** 1968, Towards a theoretical biology, *Nature*, 218:525-527 pp.
- Waddington, C. and Kacser, H.,** 1957, The strategy of the genes: A discussion of some aspects of theoretical biology, Allen and Unwin, London.
- Wakeel, A., Asif, A.R., Pitann, B. and Schubert. S.,** 2011, Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress, *Journal of Plant Physiology*, 168:519-526 pp.
- Weake, V.M. and Workman, J.L.,** 2008, Histone ubiquitination: triggering gene activity, *Mol. Cell*, 29:653-663 pp.
- Willekens, H.,** 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants, *EMBO J.*, 16:4806-4816 pp.
- Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., Sun, Z.W., Greenblatt, J.F., Osley, M.A. and Strahl B.D.,** 2005, Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II, *Mol. Cell. Biol.*, 25, 637-651 pp.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu J.K.,** 2002, Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress, *The Plant Cell, Supplement*, S165-S183 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, L., Han, L., and Huang, B.,** 2011, Antioxidant Enzyme Activities and Gene Expression Patterns in Leaves of Kentucky Bluegrass in Response to Drought and Post-drought Recovery, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 136(4):247-255 pp.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.,** 2006, Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses, *Annu Rev Plant Biol.*, 57:781-803 pp.
- Yang, Q., Chen, Z.Z., Zhoua, X.F., Yina, H.B., Lia, X., Xina, X.F., Honga, X.H., Zhu, J.K. and Gong, Z.,** 2009, Over-expression of SOS (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis, *Mol Plant*, 2:22-31 pp.
- Yokotani, N., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., Hirochika, H., Iwabuchi, M. and Oda, K.,** 2009, Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene ONAC063 in transgenic Arabidopsis, *Planta*, 229:1065-1075 pp.
- Yuan, L., Liu, X., Luo, M., Yang, S. and Wu, K.,** 2013, Involvement of histone modifications in plant abiotic stress responses, *J. Integr. Plant Biol.*, 55(10): 892-901 pp.
- Zhang, K., Sridhar, V.V., Zhu, J. and Kapoor, A.,** 2007, Distinctive core histone post-translational modification patterns in Arabidopsis thaliana, *PLoS ONE*, 2(11):e1210 p.
- Zhang. M.H., Qin, Z.H. and Liu X.,** 2005, Remote sensed spectral imagery to detect late blight in field tomatoes, *Prec. Agric.*, 6:489-508 pp.
- Zhang, X., Bernatavichute, Y.V., Cokus, S., Pellegrini, M. and Jacobsen, S.E.,** 2009, Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in Arabidopsis thaliana, *Genome Biology*, 10(6):R62 p.
- Zhang, X., Yin, H., Chen, S., He, J. and Guo, S.,** 2014, Changes in Antioxidant Enzyme Activity and Transcript Levels of Related Genes in Limonium sinense Kuntze Seedlings under NaCl Stress, *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Chemistry*, 2014:6 p.
- Zhang, Y. and Reinberg, D.,** 2001, Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails, *Genes Dev.*, 15:2343-2360 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhao, J., Zhang, J., Zhang, W., Wu, K., Zheng, F., Tian, L., Liu, X. and Duan, J.,** 2015, Expression and functional analysis of the plant-specific histone deacetylase HDT701 in rice, *Frontiers in Plant Science*, 5:1-8 pp.
- Zhao, L., Wang, P., Yan, S., Gao, F., Li, H., Hou, H., Zhang, Q., Tan, J. and Li, L.,** 2014a, Promoter-associated histone acetylation is involved in the osmotic stress-induced transcriptional regulation of the maize ZmDREB2A gene, *Physiologia Plantarum*, 151:459-467 pp.
- Zhao, Z., Yu, Y., Meyer, D., Wu, C. and Shen, W.H.,** 2005, Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36, *Nat. Cell Biol.*, 7:1256-1260 pp.
- Zhao, L., Wang, P., Hou, H., Zhang, H., Wang, Y., Yan, S., Huang, Y., Li, H., Tan, J., Hu, A., Gao, F., Zhang, Q., Li, Y., Zhou, H., Zhang, W. and Li, L.,** 2014b Transcriptional Regulation of Cell Cycle Genes in Response to Abiotic Stresses Correlates with Dynamic Changes in Histone Modifications in Maize, *PLoS ONE*, 9(8):e106070 p.
- Zhou, C., Labbe, H., Sridha, S., Wang, L., Tian, L., Latoszek-Green, M., Yang, Z., Brown, D., Miki, B. and Wu, K.,** 2004, Expression and function of HD2-type histone deacetylases in Arabidopsis development, *Plant J*, 38:715-724 pp.
- Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B. and Wu, K.,** 2005, HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis, *Plant Cell*, 17:1196-1204 pp.
- Zhou, J., Li, F., Wang, J., Ma, Y., Chong, K. and Xu, Y.,** 2009, Basic helix-loop helix transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt and osmotic stress in Arabidopsis, *J Plant Physiol*, 166:1296-1306 pp.
- Zhou, J., Wang, X., He, K., Charron, J.B.F., Elling, A.A. and Deng, X.W.,** 2010, Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression, *Plant Mol. Biol.*, 72: 585-595 pp.
- Zhu J., Jeong, J.C., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Shi, H., Yun, D.J. and Bressan, R.A.,** 2008, Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105:4945-4950 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhu, J.K., 2001, Plant salt tolerance, *Trends Plant Sci*, 6:66-71 pp.

Zong, W., Zhong, X., You, J. and Xiong, L., 2012, Genome-wide profiling of histone H3K4-trimethylation and gene expression in rice under drought stress, *Plant Mol. Biol.*, 81:175-188 pp.

Zoroddu, M.A., Scchinocca, L., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Salnikow K. and Costa, M., 2002, Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modelling Ni(II) binding site in histone H4, *Environ. Health Persp.*, 110: 719-723 pp.

ÖZGEÇMİŞ

14.01.1984 yılında İzmir'de doğan Seher Yolcu 2002 yılında Narlıdere Mehmet Seyfi Eraltay Lisesi'nden birincilikle mezun olmuştur. 2002-2006 yılları arasında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde eğitimini Bölüm İkincisi olarak tamamladıktan sonra Ege Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Filiz Özdemir danışmanlığında yüksek lisansa başlamıştır. 2008-2009 eğitim öğretim yılında Japonya-Kumamoto Üniversitesi Öğrenci Değişim Programı (1 yıl) JASSO bursunu kazanmıştır. Kumamoto Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında Prof. Dr. Susumu Takio danışmanlığında '*Suaeda maritima* Halofitinin Filogenetik Analizi' başlıklı projede görev almıştır. 2010 yılı güz döneminde Ege Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başlamıştır. 2013 yılında TÜBİTAK'ın 'Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt içi Doktora bursunu' almaya hak kazanmıştır. Ege Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Filiz Özdemir danışmanlığında doktora öğrenimini (2010-2015) tamamlamıştır.