



**KURŞUN AĞIR METAL STRESİNE MARUZ KALAN
TRİTİCUM AESTIVUM BİTKİLERİNDE
TRİAKONTANOLÜN GENETİK VE EPİGENETİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Levent GENÇDAL

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**KURŞUN AĞIR METAL STRESİNE MARUZ KALAN TRİTİCUM AESTIVUM
BİTKİLERİNDE TRİAKONTANOLÜN GENETİK VE EPİGENETİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

(Identifying the Genetic and Epigenetic Effects of Tricontanol on Triticum aestivum Plants
Exposed to Lead Heavy Metal Stress)

Levent GENÇDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI

Erzurum
Ocak, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Levent GENÇDAL tarafından hazırlanan “*Kurşun Ağır Metal Stresine Maruz Kalan Triticum aestivum Bitkilerinde Triakontanolün Genetik ve Epigenetik Etkilerinin Belirlenmesi*” başlıklı çalışması 17/01/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç.Dr.Aslı YILMAZ
Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Danışman: Dr.Öğr. Gökçe KARADAYI
Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Jüri Üyesi: Dr.Öğr.Üyesi Filiz AYGÜN ERTÜRK
Bayburt Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

.....
Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Gökçe KARADAYI danışmanlığında sunulan “Kurşun Ağır Metal Stresine Maruz Kalan Triticum aestivum Bitkilerinde Triakontanolün Genetik ve Epigenetik Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	4	30
Kuramsal Temeller	14	30
Materyal ve Yöntem	31	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	1	20
Sonuç ve Öneriler	1	20
Tezin Geneli	25	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Levent GENÇDAL	Dr. Öğr. Gökçe KARADAYI
17.01.2024	17.01.2024
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde, bilgisi, deneyimi ve yakın ilgisi ile bana her zaman destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI'ya, yüksek lisans eğitimim boyunca manevi teşvik ve desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI'ya, tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Moleküler Biyoloji Laboratuvarının sayın hocaları Prof. Dr. Güleray AĞAR'a ve Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye yapmış oldukları destek ve katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin deneysel çalışmaları sürecinde ilgisini ve desteğini gördüğüm Sayın Uzman Moleküler Biyolog İlknur ÇOLAK, Moleküler Biyolog Rabia TATAR ve Mikrobiyolog Yusuf GÜLŞAHİN'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, bu süreçte maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen GENÇDAL ailesine ve ikinci ailem olan Atatürk Üniversitesi'ne içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Levent GENÇDAL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURŞUN AĞIR METAL STRESİNE MARUZ KALAN TRİTİCUM AESTIVUM BİTKİLERİNDE TRIAKONTANOLÜN GENETİK VE EPİGENETİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Levent GENÇDAL

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI

Amaç: Tarihte ağır metallerin keşfedilmesi ile doğadaki birikimleri giderek artmaya devam etmektedir. Bu ağır metallerden biri olan kurşunun (Pb) maddelerde sertliği artırdığı ve yapısal bütünlüğü sağladığı gerekçesiyle, metal ve metaloidlerin üretildiği sanayide çokça kullanılması topraktaki ve besin zincirindeki birikimi giderek artırmaktadır. Çalışmamızda önemli bir tarım ürünü olan *Triticum aestivum* L. (Ekmeklik buğday) bitkisinin Pb stresi altında meydana gelen olumsuz genetik ve epigenetik durumlara karşı Triakontanol (TRIA) hormonunun farklı konsantrasyonlarda uygulanması ve tüm genomda stres kaynaklı metilasyon ve mutasyon yüzdelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: 10 mM Pb stresi uygulanan buğday örneklerine 10, 20 ve 40 µmol konsantrasyonlarında TRIA uygulanmıştır. Uygulamadan 10 gün sonra bitki örnekleri alınarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Tüm genomda mutasyon ve metilasyon oranlarını belirlemek için RAPD ve CRED-RA teknikleri kullanılmıştır. Dahası agaroz jel değerlendirmeleri TotalLab TL120 programında gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Yapılan uygulamalar sonrasında en yüksek GTS oranı 10 mM Pb + 20 µmol TRIA konsantrasyonunda, en düşük GTS oranı ise 40 µmol TRIA konsantrasyonunda belirlenmiştir. Ayrıca tüm genom üzerinde belirlenen metilasyon oranlarına göre en yüksek %27,2 oranında 40 µmol TRIA dozunda, en düşük %16,8 ile 40 µmol TRIA dozunda görülmüştür.

Sonuç: Pb stresi altındaki *Triticum aestivum* L. bitkisinin stres toleransını artırmak için kullanılan TRIA hormonunun ekzojenik olarak uygulandığında hem mutasyon oranını hem de metilasyon oranını artırdığı görülmüştür. Fakat kurşuna maruz bırakılan bitkilere uygulandığında mutasyonda ve metilasyon miktarlarında önemli düşüşler tespit edilmiştir. Ayrıca 40 µmol TRIA dozunun en yüksek genotoksik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kurşun, DNA metilasyonu, RAPD, CRED-RA, *Triticum aestivum* L.

Ocak 2024, 88 Sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

IDENTIFYING THE GENETIC AND EPIGENETIC EFFECTS OF TRICONTANOL ON TRITICUM AESTIVUM PLANTS EXPOSED TO LEAD HEAVY METAL STRESS

Levent GENCDAL

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gokce KARADAYI

Purpose: The accumulation of heavy metals in nature has been steadily increasing since the discovery of them in history. Lead (Pb), one of these heavy metals, is widely used in the industry where metals and metalloids are produced on the grounds that it increases the hardness of materials and provides structural integrity, and its accumulation in the soil and food chain is gradually increasing. Our research investigates the use of Triacontanol (TRIA) hormone in different concentrations to combat negative genetic and epigenetic conditions that occur during Pb stress in *Triticum aestivum*, a significant agricultural product and stress-induced methylation and mutation percentages in the entire genome.

Method: Wheat samples under stress with 10 mM Pb were treated with TRIA in 10, 20, and 40 μ mol concentrations. Plant samples were collected 10 days after the application and DNA isolations were carried out. The whole genome was analyzed for mutation and methylation rates using RAPD and CRED-RA techniques. Moreover, the TotalLab TL120 program carried out agarose gel evaluations.

Findings: After the treatments, the highest GTS ratio was determined at 10 mM Pb + 20 μ mol TRIA concentration, while the lowest GTS ratio was determined at 40 μ mol TRIA concentration. Moreover, the methylation rates determined on the entire genome showed that the highest rate was observed at 40 μ mol TRIA dose at 27.2% and the lowest rate of 16.8% was observed at 40 μ mol TRIA dose.

Results: Exogenous application of TRIA hormone which is used to increase the stress tolerance of *Triticum aestivum* L. plants under Pb stress resulted in an increase in both mutation rate and methylation rate. When applied to plants exposed to lead, it was found that mutation and methylation levels decreased significantly. The highest genotoxic effect was determined to be caused by a dose of 40 μ mol TRIA.

Key Words: Lead, DNA methylation, RAPD, CRED-RA, *Triticum aestivum* L.

January 2024, 88 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	8
Ağır Metaller.....	8
Kurşun (Pb).....	9
Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	13
Triacontanol (TRIA)	14
Epigenetik	18
DNA metilasyonu	19
Bitkilerde metilasyon	20
DNA metilasyonunun gen ifadesini etkilemesi.....	21
Histon modifikasyonu	21
Moleküler Markırlar.....	23
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi).....	24
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism- Çoğaltılan Parça Uzunluğu Polimorfizmi).....	24
ISSR (Inter Simple Sequence Repeats- Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)	25
SSR (Simple Sequence Repeats-Basit dizi tekrarları)	25
RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA).....	25
CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification - Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım).....	26

Restriksiyon Endonükleaz Enzimler	26
Hpa II	27
Msp I	27
MATERYAL VE METOT	29
Kullanılan bitkisel materyali	29
Deney aşamasında kullanılan alet ve cihazlar	29
Çalışma sürecinde kullanılan çözelti ve solüsyonlar	29
Deney bitkilerinin yetiştirilmesi ve Pb stresinin uygulanması	31
Deney bitkilerine Kurşun ve TRIA uygulamaları	32
Bitkilerin Hasat Edilmesi	33
DNA izolasyonu	33
RAPD-PCR analizi	35
CRED-RA analizi	36
Agaroz jel elektroforezi	37
İstatiksel veri analizi	37
ARAŞTIRMA BULGULARI	39
RAPD analizi	39
CRED-RA analizi	42
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	53
EKLER	61
EK 1. Çalışmamızda Elde Ettiğimiz Diğer RAPD Jel Görüntüleri	61
EK 2. Çalışmamızda Elde Ettiğimiz Diğer CRED-RA Jel Görüntüleri	65
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ağır Metallerin Biyosferde Bulunma Oranları.....	10
Tablo 2. Çalışma Sürecinde Kullanılan Cihazlar.....	29
Tablo 3. RAPD ve CRED-RA Analizinde Kullanılan Primerler ve Sekans Dizilimi	35
Tablo 4. RAPD Analizi Sonucunda Belirlenen Polimorfik Bantların Uzunlukları ve GTS Oranları	41
Tablo 5. Kurşun ve TRIA Uygulamalarına Göre Belirlenen GTS Oranları	42
Tablo 6. CRED-RA Analizi Sonucunda Oluşan Toplam Bant Sayıları	43
Tablo 7. CRED-RA Analizi Sonucunda Oluşan Toplam Polimorfik Bant Sayıları	44
Tablo 8. CRED-RA Analizi Sonucunda Belirlenen % Polimorfizm Değerleri.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pb ağır metalinin moleküler hedefleri.....	11
Şekil 2. Çin İZABE tesisi ve ağır metallerin toprakta bulunma oranları	12
Şekil 3. Çin İZABE tesisi ağır metallerin dağılımını gösteren diyagram	13
Şekil 4. TRIA hormonunun yapısal formülü.....	14
Şekil 5. TRIA'nın bitkilerdeki rolleri.....	15
Şekil 6. TRIA'nın L-adenozinin tetiklemesi sonucunda stresin baskılanmasının şematik gösterimi.....	17
Şekil 7. DNA metilasyonunun gerçekleşme mekanizması	20
Şekil 8. DNA'nın katlanması ve histonlar.....	22
Şekil 9. Petri kabında <i>Triticum aestivum</i> tohumlarının filizlenmesi.....	31
Şekil 10. Pb ve TRIA konsantrasyonlarının bitkilere uygulanma planı.....	32
Şekil 11. <i>Triticum aestivum</i> bitkilerine hem Pb hem de TRIA uygulandıktan sonra 1. Gün...	33
Şekil 12. <i>Triticum aestivum</i> bitkilerine hem Pb hem de TRIA uygulandıktan sonra 7. Gün...	33
Şekil 13. RAPD analizinde kullanılan OPY-6 ve OPA-6 primerlerinin jel görüntüsü	39
Şekil 14. CRED-RA analizinde kullanılan OPB-1 primerinin jel görüntüsü.....	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
(Pb(NO ₃) ₂)	: Kurşun nitrat
<	: Küçük
>	: Büyük
°	: Derece
°C	: Santigrat
µg/dl	: Mikrogram/desilitre
µl	: Mikrolitre
A	: Adenin
ABA	: Absisik Asit
AFLP	: Amplified fragment length polymorphism (Çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi)
ALAD	: Porfobilinojen sentaz
AMP	: Adenozin monofosfat
APX	: Askorbat Peroksidaz
As	: Arsenik
BAP	: Benzilaminopurin
bp	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albümin
C	: Sitozin
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
-CH ₃	: Metil grubu
cm ²	: Santimetre kare
CMT3	: Kromometilaz 3
Co	: Kobalt
CpG	: Sitozin-Fosfat-Guanin
Cr	: Krom
CRED-RA	: Coupled Restriction Enzyme Digestion and Random Amplification (Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım)
CTAB	: Heksadesiltrimetilamonyum bromür

Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT1	: DNA metil transferaz 1
DNMT3	: DNA metil transferaz 3
dNTP	: Eşit konsantrasyonlarda karıştırılmış dATP, dGTP, dCTP ve dTTP
DRM2	: DNA (sitozin-5)-metiltransferaz
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Et-Br	: Ethidium bromür
Fe	: Demir
g	: Gram
G	: Guanin
Gb	: Giberellin
GB	: Glisin betanin
GDC	: Glisin dekarboksilaz kompleksi
GR	: Glutasyon redüktaz
GT	: Glikoziltransferaz
GTS	: Genomik kalıp sabitliği
HP2	: İnsan protamin 2(human protamin 2)
Hpa II	: Hemophilus parainfluenzae 2 enzimi
IARC	: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
IBA	: Indol-3-bütirik asit
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)
K	: Potasyum
kb	: Kilo Baz
Kg	: kilogram
l	: Litre
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MET1	: Metiltransferaz 1
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
Msp I	: Moraxella species 1 enzimi

Na	: Sodyum
NAA	: Naftalinasetik asit
NaCl	: Sodyum klorür
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
ng	: Nanogram
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
OH	: Hidroksil
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonuna
PGR	: Bitki gelişim düzenleyicileri
PKC	: Kinaz ailesinin bir üyesi olan Protein Kinaz C
POX	: Guaiakol Peroksidaz
PRX	: Peroksidoksin enzimleri
PS-II	: Fotosistem-II'nin
PVP	: Polivinilprolidon
qRT-PCR	: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR-Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
rbcS	: Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz küçük alt birimi
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RuBisCO	: Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
SCoT	: Start codon targeted (Hedeflenen kodonu başlat)
SHMT	: Hidroksimetiltransferaz
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSR	: simple sequence repeats (Basit dizi tekrarları)
T	: Timin
TBE	: Tris-Borik EDTA

TDZ	: Tiazuron
TFIIIA	: Transkripsiyon faktörü 3A
TRIA	: Triacantanol
Tris-HCl	: Tris bazı ve hidroklorik asit
US EPA	: ABD Çevre Koruma Ajansı'na
USDA	: ABD tarım bakanlığı
v/v	: Hacim/Hacim
V	: Volt
w/v	: Ağırlık/Hacim
Zn	: Çinko
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar

GİRİŞ

Küresel geçim kaynağımız olan tarım topraklarının ağır metallere maruz kalması ağır metal toksisitesinin ortaya çıkmasına, tarım bitkilerinin büyümesi, gelişmesi ve epigenetiği üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı ağır metal kirliliği küresel bir çevre sorunu haline gelmiştir (Memon, 2020). Bitkiler sessil canlılar olmaları nedeniyle ağır metallere maruz kalmış topraktan direkt olarak etkilenmektedirler (Ali and Perveen, 2020). İnsanlar ve hayvanlar yer değiştirilebilen varlıklardır, bu nedenle kaçınma yoluyla çevreye kolayca uyum sağlayabilmektedirler fakat bitkiler kaçınma tepkilerinden çok, dirence güvenmek zorundadırlar. Dünyadaki organizmaların maruz kaldığı 35'ten fazla metal bulunmaktadır. Bunların 23 tanesi ağır metallerdir. En çok toksik olduğu bilinen ağır metaller Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Krom (Cr), Demir (Fe), Kobalt (Co), Bakır (Cu), Nikel (Ni), Cıva (Hg) ve Çinko (Zn)'dur. Bu ağır metallerden biri olan Pb, canlılar üzerinde önemli etkisi olan, son derece zararlı, bozunmayan ve toksik etki yaratan bir ağır metal kirleticidir (Ahmad *et al.* 2021). Pb doğada eser miktarda bulunsa da daha çok antropojenik etkiler sonucunda doğaya karışmaktadır. Antropojenik etkiler; madencilik, eritme işlemleri, endüstriyel üretim, endüstriyel gübreler, madeni taş üretimi, şehir altı kanalizasyon atıkları, böcek öldürücü ilaçlar (biyositler), maden atıksuları, ev ve kent atıkları, motor ile çalışan araçlar ve bunlardan çıkan egzoz gazları gibi etkiler ile toprağa geçmektedir (Seven *et al.* 2018). Pb topraktan bitkiler tarafından kolay bir şekilde emilerek bitkilerin çeşitli kısımlarında birikmektedir (Shi *et al.* 2019). Bitkilerdeki bu ağır metal birikimi besin zincirine dâhil olduğu için insanlar, hayvanlar ve bitkilerin kendisi için önemli bir riski doğurmaktadır (Patlolla *et al.* 2009a; Wani *et al.* 2015). Pb'ye maruz kalan bitkilerde, oluşan stres nedeni ile artan malondialdehit (MDA) içeriği, kloroz, deformasyona uğramış kloroplast mekanizması, su ve besin alınımında azalma, düzensiz terleme, fotosentez ile beraber ortaya çıkan hücrel redoks homeostazında değişikliklerin oluşması ve hücrelerde proteinlerin yıkımına neden olurken bu durum reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasını tetiklemektedir (Kumar and Kumari, 2015). Bitkiler; süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi çeşitli enzimlerden oluşan kendi savunma mekanizmalarını aktive ederek oksidatif stresi tolere etmektedirler (Tchounwou *et al.* 2004). Günümüzde Pb'nin tahılın büyümesi, biyokütlenin artırılması ve verim üzerindeki olumsuz etkilerini bertaraf etmek için birçok yaklaşım bulunmaktadır (Okcu *et al.* 2009). Örneğin; abiyotik stresin bulunduğu ortamlarda bazı stres iyileştirici hormonlar ile tohumların hazırlanması, büyümeyi, gelişmeyi ve tohumlardaki çıkış

sayısını artırmaktadır. Bu teknik ile bitki büyümesinin erken aşamalarında uygulanarak bitkilerde Pb toksisitesini azaltarak biyogüvenli bitkilerin geliştirilmesi sağlanmaktadır (Ali and Perveen, 2020). Tohum hazırlanması abiyotik stresin bulunduğu ortamlarda tohumların çimlenme yüzdesini, çimlenme tekdüzeliğini, büyümeyi ve gelişmeyi artırmaktadır (Rademacher, 2015). Ekim öncesi tohuma yapılan uygulamalar besin mevcudiyetini, çeşitli enzimlerin aktivasyonunu, hücrel hasarların onarımı ve tohumların çimlenmesi için gerçekleşmesi gereken biyokimyasal süreçlerin başlatılması için kolay bir yöntem olarak açıklanmıştır (Sarkar *et al.* 2020). Yapılan birçok çalışma tohum hazırlama işleminin stres koşulları altında bitki büyümesini, kalitesini ve verimini artırmak için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir (Alp and Kabay.. 2017; Küpper, 2017; Navabpour *et al.* 2020).

Pb ağır metale maruz kalmış bitkilerde ROS seviyesi artmaktadır (Tropberger and Schneider, 2013). ROS; DNA, proteinler ve yağ asitlerinin oksidasyonunu tetiklerken fotosentetik aktiviteyi ve ATP üretimini engelleyebilmektedir. ROS, bitkileri stres koşullarına adapte etmek için hücrelerde fizyolojik etkiler oluşturarak bitkinin koruyucu hormonlarını salgılaması için ilk sinyal oluşturucu olarak görev yapmaktadır (Sharma *et al.* 2012). Bitki antioksidan sisteminde askorbat peroksit (APX), CAT, SOD, GR, glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksidoksin (PRX) enzimleri görev almaktadır (Tropberger and Schneider 2013; Samanta *et al.* 2020). Bu nedenle yapılan çalışmalarda Pb stresine maruz kalmış bitkilerde ROS'ların seviyeleri araştırılmaktadır. Verma and Dubey (2003) tarafından pirinç (*Oryza sativa* L.) çeşidinin fidelerinde, ortamda 500 ve 1000 μM Pb (NO_3)₂ konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerde yapılan araştırmada, Pb konsantrasyonunun artmasıyla kök ve sürgünlerin uzunlukları ve ağırlıklarının azaldığı belirlenmiştir. Dahası, kontrol bitkisi ile karşılaştırıldığında SOD, guaiakol peroksidaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin aktivitelerinin lipid peroksidasyonu (LPO) ile birlikte arttığı belirlenmiştir. Her ne kadar Pb büyüyen fideler tarafından kolaylıkla emilse bile lokalizasyonunun sürgünlerden ziyade köklerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca antioksidan enzimlerinin bağıl gen ekspresyonu ve aktivitesi hem yaprak hem de kök dokularında önemli ölçüde artmış olup kökte gen ekspresyonu ve enzimatik aktivite seviyesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Hücrede bulunan glutatyon gibi antioksidanlar hücreyi hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikallerden korumaktadır. Bu nedenle, Pb uygulanan bitkilerde ROS seviyesinin arttığı, antioksidan seviyelerinin ise azaldığı rapor edilmiştir (Jaishankar *et al.* 2014). ROS seviyesinin yüksek olması hücredeki protein, nükleik asit ve lipitlere zarar vermektedir. Bu durum hücrede daha çok stres oluşmasına neden olmaktadır (Jaishankar *et al.* 2014).

Navabpour *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada üç farklı buğday çeşidinde (*Morvarid*, *Gonbad* ve *Tirgan*) Pb ağır metalinin biyokimyasal özellikleri, antioksidan enzim seviyeleri ve gen ekspresyonundaki değişimler araştırılmıştır. Pb (NO₃)₂ ile 0, 15, 30 ve 45 mg/kg toprak dört farklı konsantrasyon kullanılarak yetiştirilen buğdayların yaprak ve kök örnekleri fidelerin üç yapraklı olduğu dönemde alınarak yapılan analizlerde üç buğday çeşidinde de Pb ağır metal toksisitesinin buğday bitkisinde savunma sistemi anahtar enzimlerinin gen ekspresyonunu ve antioksidan aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Genomdaki bu moleküler değişim ile beraber oksidatif ve genotoksik streslerin indüklendiği ayrıca DNA’da çeşitli mutasyonların oluşmasına neden olduğu saptanmıştır. Genomdaki onarılamayan bu mutasyonlar genomun işleyişinde düzensizliklere neden olurken bitki yaşamı üzerinde ise hem genel hem de spesifik olumsuzluklara neden olduğu, hatta bazen bu durumun bitkinin ölümü ile sonuçlandığı saptanmıştır.

Saleh *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada Pb, Cd ve Ni ağır metallerine maruz bırakılan buğday tohumlarında (*Triticum aestivum* L.) RAPD analizi kullanılarak genetik değişimler belirlenmiştir. Ayrıca protein ve gen ekspresyon seviyeleri, fotosentetik pigmentler ve oksidatif stres indekslerinin değerlendirilmesi yoluyla buğdaya uygulanan tüm stres faktörlerinin vejetatif büyüme parametrelerini önemli ölçüde azalttığını fidelerde 30 gün, tahıllarda 5 ay sonra antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve fide yapraklarında ve köklerinde ekspresyon seviyelerini değiştirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, yüksek Pb ve Cd dozları, yüksek derecede polimorfizm ve düşük derecede genom stabilitesine neden olmuştur. Sonuç olarak normal bitki metabolizmasını ve pigment içeriğini değiştirerek buğday veriminde ve kalitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca, Pb’nin Cd ve Ni’den daha fazla genotoksik ve fitotoksik etkilere neden olduğu bulunmuştur.

Bitkilerde Pb toksisitesinin ilk etkisi kök uçlarındaki hücre bölünmesinin inhibisyonuna bağlı olarak kök büyümesini hızlı bir şekilde yavaşlatmasıdır. Pb fazlalığındaki bitki hücrelerinin yapısında önemli değişiklikler meydana gelmiştir (Kayis ve Emre, 2012). Yapılan bir çalışmada ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisine Al, Cd, Cu, Ni, Pb ve Zn uygulanmış ve ağır metallerin toksisiteleri karşılaştırıldığında Pb’un en yüksek fitotoksisiteyi gösterdiği belirlenmiştir (Küpper, 2017). Pb ağır metali hücrede protein denatürasyonuna, fotosentez aktivitesinin değişikliğine, tilakoid membranların lipid bileşiminde değişikliklere ve membran geçirgenliğinin değişimine neden olmaktadır (Kayis ve Emre, 2012). Pirinç bitkisinin tohumlarına Pb uygulandığında tohumların çoğunun çimlenmediği ve çimlenen tohumların ise bodurlaşma gibi birçok gelişim anormalliklerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durumun, Pb stresinin bitkide DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ettiği için gerçekleştiği bildirilmiştir

(Kayis ve Emre, 2012). Dahası, Pb'nin DNA ve RNA moleküllerinin dahil olduğu çok sayıda moleküle güçlü bir şekilde bağlanarak transkripsiyonel süreci ve mitotik aktiviteyi değiştirdiği, DNA'da depolimerizasyonlara, anormal azotlu bazların oluşmasına, DNA-DNA çapraz bağlarının bozulmasına, DNA- protein çapraz bağlarında hasarlara neden olduğu bildirilmiştir (Klotz and Göen, 2017).

Tangahu *et al.* (2011) tarafından yapılan bir çalışmada beş çeşit yeşil sebzenin yenilebilir kısımlarında Pb, Cd, Cr, Zn, Ni ve Cu'nun miktar analizleri yapılmıştır. Farklı türlerin kök, sürgün ve yaprak dokularında 50 mg/g Pb biriktiği gözlenmiştir. Bu türler arasında *Brassica campestris* L, *Brassica carinata*, *Brassica juncea* L. Czern ve *Brassica nigra* L. Koch'da 100 mg/g oranında Pb biriktiği tespit edilmiştir (Tangahu *et al.* 2011). İnsanlar ve hayvanlar tarafından yenilen bazı yabancı bitkilerin (*Prosopis* sp. ve *Salsola kali*) sırasıyla Pb ve Cd potansiyel hiperakümülatörleri olarak tanımlandığı belirtilmiştir (De La Rosa *et al.* 2004; Pinho and Ladeiro, 2012).

Ağır metal toleransında yer alan mekanizmaları aydınlatmak için Pb, Cu ve Pb+Cu toksisite işlemlerine tabi tutulan turuncgillerin (*Citrus aurantium*) yapraklarında fotosentetik değişiklikler ve oksidatif strese karşı antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu bitkilerde MDA, H₂O₂, klorofiller, flavonoidler, karotenoidler, fenolikler, klorofil floresansı ve fotosentetik parametreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Pb ve Cu'nun eksojen uygulaması yapraklarda H₂O₂ ve MDA'da artışa neden olurken hem Pb hem de Cu ile muamele edilmiş bitkilerin toksisite semptomları, büyümenin engellenmesi, pigment konsantrasyonunun azalması ve fotosentetik aktivitesinde diğer uygulamalara göre önemli bir düşüş görülmüştür. Dahası, bitkilerde yüksek Pb ve Cu konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra antioksidan oranları kontrol ile kıyaslandığında önemli ölçüde artmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, Pb ve Cu'nun lipid peroksidasyonunu desteklediğini, membran bütünlüğünü bozduğunu, büyümeyi ve fotosentezi azalttığını ve topraktan yeterli mineral alınımının engellendiğini göstermektedir. Ayrıca, *Citrus aurantium* bitkilerinin insanlar tarafından yenilebilir olması ve bitkinin yenilebilen kısımlarında Pb ve Cu birikiminin gerçekleşmesi insan sağlığını tehdit edebilen bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, daha fazla araştırma yapılmasının önemli olduğuna işaret edilmektedir (Giannakoula *et al.* 2021).

Şimdiye kadar mahsul bitkilerinde incelenen çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri arasında, yeni bir bitki büyüme düzenleyicisi sınıfı olan TRIA, bitki büyümesini ve mahsul verimliliğini artırmadaki faydalı rolü nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir. TRIA hakkındaki mevcut bilgiler, bitkilerdeki çeşitli fizyolojik, biyokimyasal süreçlerin düzenlenmesinde ve değiştirilmesinde potansiyel işlevlere sahip olduğunu göstermektedir (Ali

et al. 2021). Bitkideki epikütikül mum, bitki büyümesi, gelişmesi ve korunması gibi çeşitli şekillerde önemli işlevleri olan doğal bir TRIA kaynağıdır (Pang et al. 2020). Genellikle meyve üretimini arttırmak için kullanılan ve meyvelerin epikütiküler mumlarında bulunan doğal bir bitki büyüme düzenleyicisi olan TRIA, en çok *Croton californicus* (kraton kalifornia), *Copernicia cerifera* (karnauba) ve *Jatropha curcas* dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinin epikütiküler mumlarında bulunan doymuş uzun karbon zincirine sahip birincil alkollü fitohormondur (Islam and Mohammad, 2020). TRIA bitkiye eksojen olarak uygulandığında bitkinin biyokütlesi, su içeriği, besin alımı, pigmentlerin oranı, fotosentez aktivitesi ve terleme oranında önemli değişimler gözlemlenmiştir. TRIA ile eksojen olarak muamele edilen fidelerin daha yüksek oranda karbondioksit ve su emilim kabiliyetini arttığı, yüksek karbonik anhidraz aktivitesine sahip olduğu, nitrat redüktaz aktivitesinin arttığı, bitkilerdeki çözünür şeker ve protein içeriğini arttığı bulunmuştur (Sharma et al. 2018). Bu önemli bitki büyüme düzenleyicisi, ekstrem çevre koşulları altındaki (soğuk, kuraklık, tuzluluk ve ağır metaller) streslere karşı kök ve sürgün büyümesini, klorofil biyosentezini, fotosentez hızını, osmolit üretimini ve antioksidan potansiyelini iyileştirerek fidelerdeki olumsuz etkileri azaltmaktadır (Karam et al. 2017; Perveen et al. 2017).

Naeem et al. (2017) tarafından *Catharanthus roseus* L. (Madagaskar cezairi) üzerinde yaptıkları araştırmada TRIA uygulanan bitkilerde kök sayısını artışı ve bu durumun bitkinin topraktan daha fazla besin almasına ve bitkilerin veriminin artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde TRIA uygulanan çilek bitkilerinde hektar başına düşen en yüksek meyve oluşum oranına sahip oldukları belirlenmiştir (Katel et al. 2022). Ayrıca TRIA, su ve mineral besin alımı, uçucu yağ verimi, ikincil metabolitlerin artışı, nitrojen asimilasyonu, prolin metabolizması ve glisin betain birikimi gibi hayati bitki fizyolojik süreçlerini de geliştirerek bitkileri çeşitli zararlılardan korumaktadır.

TRIA'nın, çiftlik bitkilerinde (yonca, mısır, ayçiçeği) strese dayanıklılık bileşenlerinin aktivasyonunu kontrol ettiği ve böylece bitkilerin çevre stresine neden olan değişikliklerle başa çıkmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Islam and Mohammad, 2020; Zaid et al. 2020). TRIA 1 ppm'e kadar domates (*Solanum lycopersicum*) yapraklarına uygulanmıştır. Bunun sonucunda sürgün ve kökler kontrol ile karşılaştırıldığında taze ve kuru ağırlıkları iki kat olarak belirlenmiştir (Samanta et al. 2020).

Ali et al. (2021) mısır (*Zea mays* L.) üzerine yaptıkları çalışmada, kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin yapraklarına TRIA uygulayarak, iki mısır çeşidinin (cv. MMRI-Yellow ve cv. Hybrid S-515) çeşitli büyüme ve fizyokimyasal parametreleri üzerindeki etkisini değerlendirdiler. Kuraklık stresi, büyümeyi ve SOD aktivitesini önemli ölçüde azaltırken, CAT

ve POD aktivitelerini ve toplam fenolikler, toplam çözümlür proteinler, glisin betain (GB) ve serbest prolin içeriğini arttırmıştır. Dahası, TRIA uygulaması, H₂O₂ ve MDA miktarını azaltmıştır. Bu analizlerin sonucunda TRIA'nın iki mısır çeşidinde de kuraklık stresi altında büyümeyi arttırdığı görülmüştür (Ali *et al.* 2021).

Günümüzde geleneksel manuel uygulamalar yerine makinelerle fide ekimi yapılmaktadır. Transplantasyon, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi üzerinde önemli bir olumsuz etki yaratmakta ve nakil fidelerin köklerinin zarar görmesine neden olmaktadır. Yeni ekilen fideler, terleme hızı ile su ve mineral besin maddelerinin alımı arasında bir dengesizlik gelişir. Bu durum su stresi nedeniyle bitkide solma ya da ölümle sonuçlanmaktadır (Samanta *et al.* 2020). Makineli transplantasyon, fidelerde oluşan ciddi transplantasyon şokun etkisiyle daha uzun bir iyileşme aşamasına neden olmaktadır.

Li *et al.* (2016) tarafından TRIA'nın piriçteki transplantasyon şokuna etkisini incelemek için TRIA (0, 1, 5 ve 10 µM), ekimden 2 gün önce yaprakların üzerine püskürtülerek bitkilerin klorofil ve şükroz içeriği, oksidatif hasar, antioksidan enzim seviyeleri, glutatyon (GSH) ve askorbat (ASA) redoks durumları araştırılmıştır. Sonuçlar yaprağa uygulanan TRIA'nın, nakil şokunun neden olduğu büyüme inhibisyonunu ve oksidatif hasarı önemli ölçüde hafiflettiğini göstermektedir. Üstelik TRIA uygulaması bitkilerin klorofil ve şükroz içeriğini arttırmıştır. Aynı zamanda APX ve GR gibi ASA-GSH döngüsünde yer alan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek ASA ve GSH'nin redoks durumlarını da arttırmıştır. 10 µM TRIA dozu, nakil şokunun olumsuz etkilerini azaltmada, salkımları, tane dolumunu ve tepebaşına tane verimini sırasıyla %17,80, %5,86 ve %16,49 oranında artırmada en etkili doz olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRIA'nın, ASA ve GSH'nin redoks durumlarının ve antioksidan enzimlerin düzenlenmesiyle bağlantılı olarak nakil şokunu azaltacak şekilde hareket ettiğini ve fotosentetik kapasiteyi korumak aynı zamanda yüksek oranda filizlenmeyi teşvik etmek için etkili bir antioksidan görevi gördüğünü göstermektedir (Li *et al.* 2016).

Sarwar *et al.* (2017) tarafından tuz stresine maruz kalmış *Cucumis sativus* (salatalık) bitkisi tohumlarının üzerinde yapılan çalışmada tohumlar ekimden önce 12 saat boyunca 25 µM ve 50 µM'lik TRIA çözeltisinde bekletilmiştir. Bu TRIA uygulaması işleminden sonra normal ve tuzlu koşullar altında salatalık fidelerinin kontrole kıyasla, filizlenme oranını, filizlenme tekdüzeliğini ve erken büyümesini arttırmıştır. Ancak tuz stresine maruz kalan bitkiler ve TRIA uygulanmayan tohumlar büyüme, fizyoloji ve biyokimyasal özellikler açısından zayıf performans göstermiştir. Bununla birlikte, 25 ve 50 µM TRIA ile hazırlanan tohumlar, tuzlu koşullar altında dahi sürgün verme süresi kısalmış, sürgün verme oranında artış ve iyileşme, sürgün/kök uzunluklarında, fide kuru ağırlığında, gaz değişim özelliklerinde, klorofil ve prolin

içeriklerinde artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, tüm özelliklerde tuz stresinden maksimum iyileşme 50 µM TRIA dozunda görülmüştür. Sonuç olarak TRIA'nın tuzluluğun zararlı etkilerini azaltarak, tohumların çimlenme kapasitesini başarıyla artırdığını bildirmektedirler.

Ağır metallerin toprakta birikmesi ve bitkiler tarafından alınımı özellikle tahıl bitkilerinde önemli olumsuzluklara neden olmaktadır. Bu nedenle bitkilerde meydana gelen morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeydeki değişimler büyük önem arz etmektedir. Pb'nin bitkiler üzerine etkileri hususunda pek çok araştırma yapılmasının nedeni bu olumsuzluklardan kaynaklanmaktadır. Pb'nin olumsuz etkileri azaltmak veya bertaraf etmek için bazı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan TRIA'nın daha önce Pb ağır metaline karşı etki mekanizmalarının araştırılmamış olması özgün değerini oluşturmaktadır. Bu nedenle, Pb'nin bitkinin DNA'sı üzerine meydana getirdiği etkilere karşı TRIA'nın gerçekleştireceği değişimleri DNA mutasyonu ve DNA metilasyonu seviyesinde incelemek ve anlamlandırmak amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Ağır Metaller

Ağır metaller, periyodik cetvelde yoğunluğu 5 g/cm³'den fazla, atom numaraları 21 ve üzerinde olan toksik etki ve çevre kirliliğine sebep olan metaller olarak tanımlanmaktadır (Seven *et al.* 2018). Dünyadaki organizmaların maruz kaldığı 35'ten fazla metal bulunmakta ve bunların 23 tanesi ağır metallerdir. Pb, Cd, Fe, Cr, Co, Ni, Cu, Zn ve Hg gibi metaller ağır metal sınıfında yer almaktadırlar (Tchounwou *et al.* 2012). Ağır metallerin yaygınlaşmasında antik çağlardan bu yana antropojenik etkiler ve doğa olayları söz konusudur (Seven *et al.* 2018). Ağır metal kirliliği bu yayılma işlem kademelerinden sonra dünyanın atmosfer, litosfer ve piroster tabakalarına yayılmaktadır. Ağır metaller sıvı, katı veya gaz halinde olabildikleri için kolay bir şekilde toprağa, akarsulara, yağmur, yeraltı suları ve havaya karışarak ekosistemin dengesine zarar verebilmektedir. Son yıllarda ağır metal kontaminasyonu ile ilişkili artan çevre kirliliği, ekolojik ve küresel olarak insanlığın endişesini artırmıştır (Tchounwou *et al.* 2012). Yapılan araştırmalar ağır metallerin organizmaların biyolojik sisteminde hücre zarı, mitokondri, endoplazmik retikulum, lizozom organelleri, nükleus ve hücresel hasarın onarılmasında yer alan bazı enzimler ile etkileşime girerek bileşenlere zarar verdiği tespit edilmiştir (Wang and Shi, 2001)

Ağır metaller ile ilgili hücre ve doku üzerine yapılan çalışmalarda ağır metallerin DNA ve nükleer proteinler gibi hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan proteinlere bağlanması sonucu, DNA hasarının oluşmasına neden olduğu ve bu durumun hücrelerin karsinogenez sürecine girmesine veya apoptoza yol açabilen DNA konformasyonel değişikliklere neden olduğu saptanmış olup aynı zamanda ROS üretiminin artmasıyla oksidatif stresin toksisitesinde de önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Rebelo and Caldas, 2016; Stern, 2010; Yedjou *et al.* 2010). ABD Çevre Koruma Ajansı (US EPA) ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) gerçekleştirdiği toplumsal ve deneysel çalışmalara dayalı olarak ağır metaller bilinen veya olası insan kanserojenleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Stern, 2010; Tchounwou *et al.* 2004). Her ağır metalin kendisine ait toksik etki mekanizması bulunmaktadır. Ağır metaller benzersiz ve fizikokimyasal özelliklere sahip olduğundan insan, hayvan ve diğer mikroorganizmalarda kanser insidansı ağır metalin türüne, toksisitesine ve kanserojenik etkisindeki mekanik yolundaki özelliklere bağlı olarak değişmektedir (Tchounwou *et al.* 2012).

Bakır ağır metali ile yapılan bir çalışmada, bakırın SOD, CAT, POX, ferroksidaz, monoamin oksidaz, ve dopamin b-monooksijenaz dahil olmak üzere oksidatif stres ile ilgili birçok enzim için gerekli bir kofaktör olarak hizmet ettiği belirtilmektedir (Stern, 2010). Bakırın oksitlenmiş bir formu olan Cu^{+2} ve indirgenmiş formu olan Cu^{+1} arasında geçişler süperoksit ve hidroksil (OH) radikallerinin oluşumuna neden olabileceğinden bakırın bu özelliği onu potansiyeli yüksek toksik ağır metal haline getirmektedir (Wang and Shi, 2001; Stern, 2010).

Yapılan araştırmalarda bakıra uzun süre maruz kalmış insanlarda Wilson hastalığı tespit edilmiş olup bu durum bakırın hücrelere verdiği hasarla ilişkilendirilmiştir (Stern, 2010; Wang and Shi, 2001). Bilindiği üzere biyolojik işlevler için bazı temel elementler gerekli olmalarına rağmen fazla miktarı çeşitli olumsuz etkilere ve insanlardaki hastalıklara veya hücre, doku hasarına sebep olmaktadır (Patlolla *et al.* 2009b; Saleh *et al.* 2020). As, Cd, Cr, Pb ve Hg gibi metaller kanserojenitesi ve yüksek dereceli toksik etkileri nedeniyle insan sağlığı açısından büyük hasar verebilen ağır metaller arasında yer almaktadırlar (Patlolla *et al.* 2009b; Yedjou and Tchounwou, 2012).

Kurşun (Pb)

Ağır metallerden biri olan Pb, yer kabuğunda eser oranda bulunan, doğal olarak oluşan mavimsi, grimsi bir görünüme sahiptir. Pb çoğu elementlerden özkütle bakımından daha yoğun olup kısmen reaktif olamayan bir geçiş sonrası metali olmasının yanı sıra amfoterik özelliğe de sahiptir, Pb oksitler, asitler ve bazlar ile reaksiyona girdiklerinde kovalent bağlar oluştururlar. Pb bileşikleri genellikle, karbon grubundaki kendisinden hafif üyeler ile +4 durumundan daha çok +2 durumunda bulunmaktadır. Pb'nin bu özelliği organizmalarda birikmesine ve gıda zincirinde dolaşarak ekosistemde tehlikeli yoğunlukta uzun süre kalabilmesine neden olmaktadır (Okcu *et al.* 2009).

Pb, insanların antropojenik faaliyetleri sonucunda ekolojik sisteme en çok zararı veren ilk metal olma özelliğini taşımaktadır. İlk 1920'lerde Pb'nin bir bileşiği olan Pb tetraetilin benzinine ilave edilmeye başlanmış ve bu kullanım alanı Pb'nin ekolojik sisteme yayılmasında büyük rol oynamıştır. Pb çevrede doğası gereği bulunsa bile, fosil yakıtların yakılmasının artması, madencilik ve imalat gibi antropojenik faaliyetler yüksek konsantrasyonların salınımına neden olmaktadır. Pb'nin birçok farklı endüstriyel, tarımsal ve evsel kullanım alanı vardır. En çok Pb-asit pillerinin üretimi, metal ürünlerin (lehim, boru) ve X-ışınlarından koruyan cihazların üretimi ve tasarımında kullanılmaktadır (Rebelo and Caldas, 2016). Birçok yerde kullanılması Pb maruziyetinin de artmasına neden olmaktadır. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde ülke çapında yaklaşık 890.000 çocuğu etkileyen en yaygın pediatrik sağlık sorunlarından biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bu maruziyetin kaynağı olarak 1978

yılına kadar yasaklanmamış olan Pb içeren boyaların kullanımı nedeniyle kirlenmiş toprakların neden olduğu bilinmektedir. Son araştırmalar, mevcut toprak kirliliğinin çoğunun, binaların dış cephesinde kullanılan Pb'li boyaya ek olarak, Pb'li benzin kullanan arabaların egzozundan kaynaklanan tortuların bir sonucu olduğunu öne sürmektedir (Ding *et al.* 2019).

Dahası, Pb'nin çevrede oldukça kalıcı olan Pb^{+2} bileşikleri olarak veya bunlara dönüşerek bulunduğu bilinmektedir (Ding *et al.* 2019). Yapılan araştırmalar, Pb'e maruz kalan kaynakların düzeltilmesinin pahalı ve zor olması Pb zehirlenmesinin insanlığı uzun yıllar rahatsız etmeye devam edeceğini göstermektedir. Ayrıca, çocuklar kronik olarak kuşuna maruz kaldıklarında kalıcı nöro-gelişimsel problemlerin olduğu görülürken, yetişkinlerde maruziyet sonlandığında durumun eski haline dönebildiği belirlenmiştir (Figlioli *et al.* 2019).

US EPA çeşitli ağır metaller için hava, toprak ve sudaki maksimum kirletici seviyelerini belirlemiştir (Duruibe *et al.* 2007) (Tablo 1).

Tablo 1. Ağır Metallerin Biyosferde Bulunma Oranları

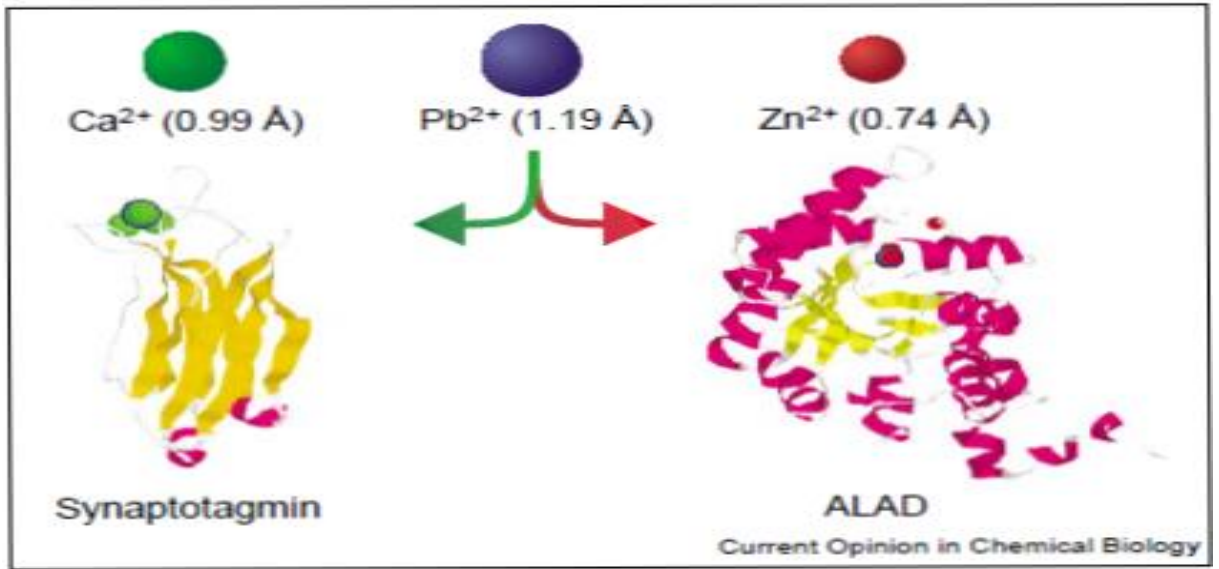
Ağır metaller	Havadaki mg/m ³ cinsinden maksimum konsantrasyonu	Topraktaki mg/kg cinsinden maksimum konsantrasyonu	Sudaki mg/l cinsinden maksimum konsantrasyonu
Cd	0.1- 0.2	85	0.005
Pb	----	420	0.01 (0.0)
Zn²	1.5	7500	5.00
Hg	----	1	5.00
Ca	5	Tolere edilebilir	50
Ag	0.01	----	0.0
As	----	----	0.01

Pb ile ilgili birçok epidemiyolojik çalışma yapılmış olmasına rağmen, Pb zehirlenmesi ve onun moleküler temelleri üzerine yürütülen çalışmalar yetersiz görülmektedir. Bu nedenle biyofizik ve moleküler biyoloji alanlarında, Pb'nin biyolojik etkileri araştırılarak belirlenmeye çalışılmaktadır (Godwin, 2001).

Pb'nin moleküler hedefleri

Pb zehirlenmesi ile ilişkili semptomlara açıklık getirmek için birkaç moleküler hedef sınıfı bilinmektedir. Bu hedefler iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Şekil 1) (Godwin, 2001).

- 1) Doğal olarak kalsiyumu bağlayan proteinler
- 2) Doğal olarak çinkoyu bağlayan proteinler



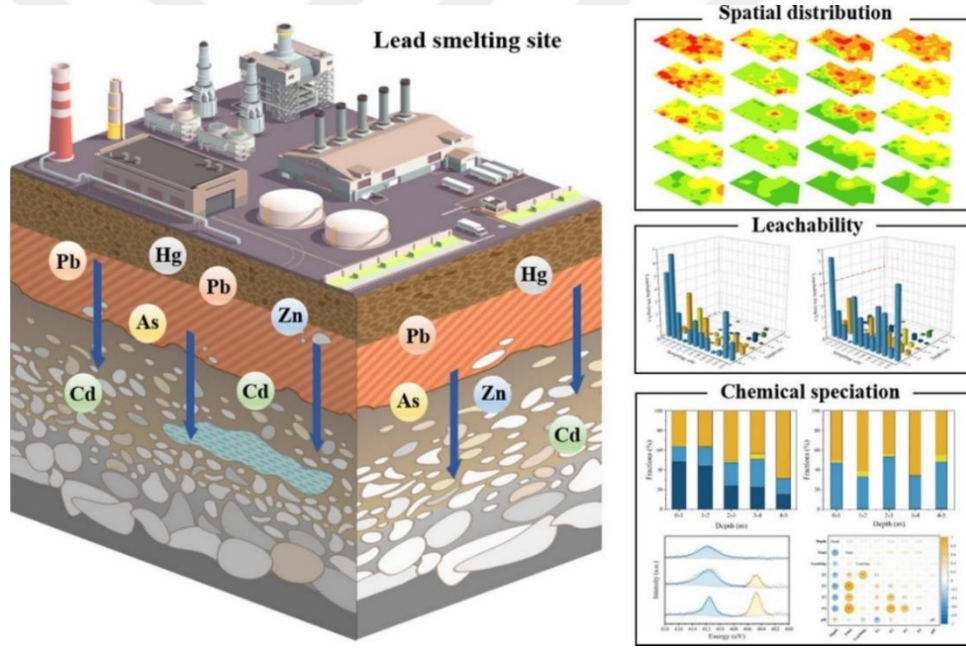
Şekil 1. Pb ağır metalinin moleküler hedefleri (Godwin, 2001)

Burada Pb, bir bağlanma yeri için başka bir metal iyonu (Ca ve Zn) rekabet halindeyken, iki metalin bağıl yakınlıkları ve konsantrasyonları dikkate alınmalıdır (Ghani *et al.* 2021). Pb için duyarlı ve seçici floresan problemlerin olmaması nedeniyle, biyoyararlı Pb miktarı çoğu hücre tipi için deneysel olarak belirlenememiştir (Deo and Godwin, 2000). Bir bireyin atomik absorpsiyon spektroskopisi ile ölçülmek üzere kanında toplam 10 µg/desilitre ve üzeri Pb bulunması Pb zehirlenmesi olarak kabul edilmektedir (Ding *et al.* 2019). Buna karşılık Pb zehirlenmesi olmayan bir kişinin kanında ise ~2 µg/dl (0,1 µM veya milyarda 20 parça) olduğu saptanmıştır. Kandaki toplam Pb un <%5'inin plazma proteinlerine bağlı olduğu ve plazmadaki Pb un yalnızca %0.01'inin (~ pikomolar Pb) biyolojik olarak temin edilebilir olduğu tahmin edilmektedir. Buna karşılık, insan plazmasındaki toplam Zn ve Ca konsantrasyonları yaklaşık 17 µM ve 10⁻⁶ ila 10⁻³ M'dir (Deo and Godwin, 2000)

ALAD, porfobilinojen sentaz olarak da adlandırılan bir enzimdir. Zn ALAD'da Cys3 bölgesini tercih etmektedir, fakat Pb için daha fazla afinitesi olan bu bölge Pb sıkı bir şekilde bağlanır ve daha az afiniteye sahip Zn ayırmak zorunda bırakmaktadır. Yapılan çalışmalar "Pb'un hücre içinde sistein proteinlerinin aktif bölgelerinde bulunan Zn metali yerine geçebilir mi? ve Pb'nin bu proteinlerden herhangi birine bağlanması, Pb zehirlenmesiyle ilişkilendirilebilir mi? " gibi sorulara cevap aramaktadır (El-Monem *et al.* 2009).

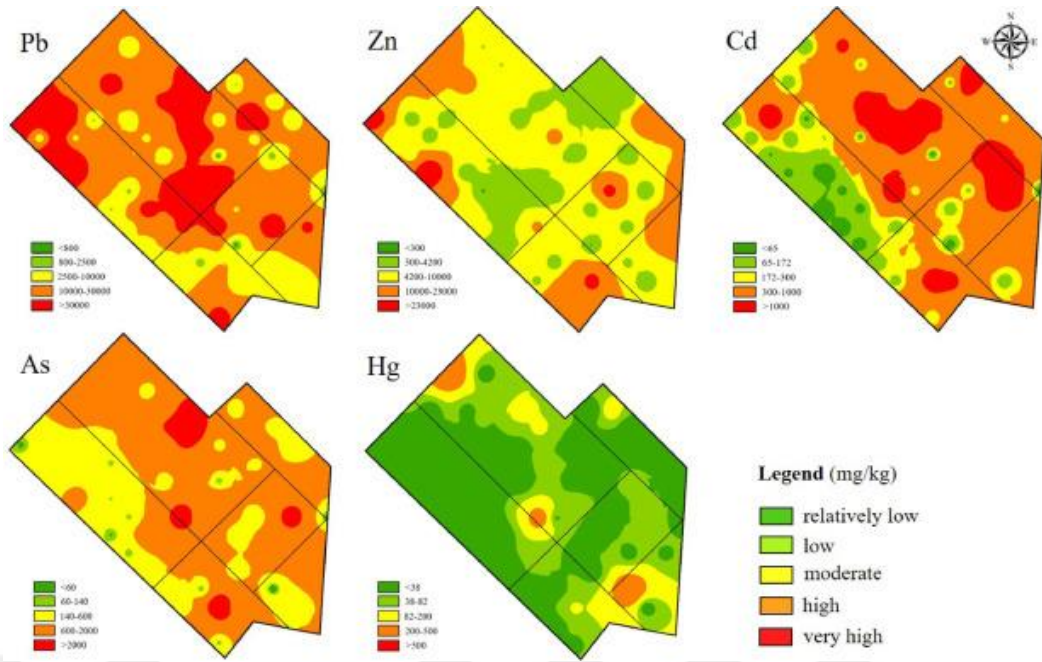
Pb, Ca'nın nöral hücrelerde nörotransmitterlerin ekzositozunu tetikleme kabiliyetine müdahale edebilmektedir. Pb'nin pikomolar konsantrasyonlarda kalsiyuma bağımlı bir enzim ailesi olan PKC'ı aktive edebildiği gözlemlenmiştir. PKC ailesi ve üyelerinin hücre büyümesi, düzenlenmesi, öğrenme ve hafızaya kadar pek çok hücresel olayı düzenlediği bildirilmiştir (Reis *et al.* 2015).

Yapılan başka bir çalışmada insan protamin 2 (HP2) yapısına Zn'nin katıldığı ve HP2'nin spermatogenezde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Pb ve HP2 arasındaki etkileşim araştırıldığında ise Pb'ye maruz kalan erkeklerde artan kısırılık oranlarından sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bunun nedeninin Pb, HP2'deki tiol gruplarına bağlanması ve bu durumun proteinin yapısını değiştirmesinden kaynaklandığı ön görülmüştür (Quintanilla-Vega *et al.* 2000). Dahası, ortamda yeterince yüksek düzeyde Pb bulunduğunda (5–20 μM), TFIIA'nın DNA'yı bağlamadığını ortaya koymaktadır. Kim *et al.* (2000) tarafından yapılan çalışma Pb'nin PC12 hücrelerinde PKC'nin gen ekspresyonunu bağımlı bir şekilde değiştirdiğini ortaya koymaktadır. Gözlenen gen ifadesindeki değişikliklerin, Pb^{+2} 'nin PKC'nin gen transkripsiyon faktörü ile etkileşiminden mi yoksa yalnızca PKC'nin doğrudan aktivasyonundan mı kaynaklandığı bilinmemektedir. Bu çalışmalar, aynı zamanda Pb hücrelerde sinyal iletimini değiştirdiği mekanizmalar hakkında kapsamlı, sistemik çalışmalara ihtiyaç duyulduğuna işaret etmektedir.



Şekil 2. Çin İZABE tesisi ve ağır metallerin toprakta bulunma oranları (Li *et al.* 2024)

Çin'de bulunan İZABE tesisinde (Şekil 2) eritme işlemi ve pil üretimi sırasında çok miktarda ince metal açısından zengin cüruf ve toz parçacıkları üretilmektedir. Bu tesisin etrafındaki topraklarda yapılan bir araştırmada ortalama Cd, Cu, Pb ve Zn içeriklerinin sırasıyla 20, 265, 1536 ve 1371 mg/kg olduğu tespit edilmiştir (Sun *et al.* 2022; Li *et al.* 2024). Bu oran normalin üzerinde olduğundan, bu ağır metallerin çevreyi kirleterek hem insan sağlığını hem de toprak ekosistemlerini tehlikeye attığını göstermektedir.



Şekil 3. Çin İZABE tesisi ağır metallerin dağılımını gösteren diyagram (Li *et al.* 2024)

Bu tesisin yakınlarındaki topraklarda bulunan başlıca kirlilikler Pb, Zn, As ve Cd olup, standart değerlerin üzerine çıkma oranları sırasıyla %77,3, %73,4, %78,3 ve %55,2 olarak rapor edilmiştir. Toplam Pb, Zn, Cd ve As içeriği, toprak derinliğinin artmasıyla azalmış, (Şekil 3) bu durum toprağın ağır metallerin göçü üzerinde bloke edici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ağır metallerin 5 metreden daha derin toprağa ulaşması, yeraltı suyunun kirlenmesine neden olabilmektedir.

Bitki Büyüme Düzenleyicileri

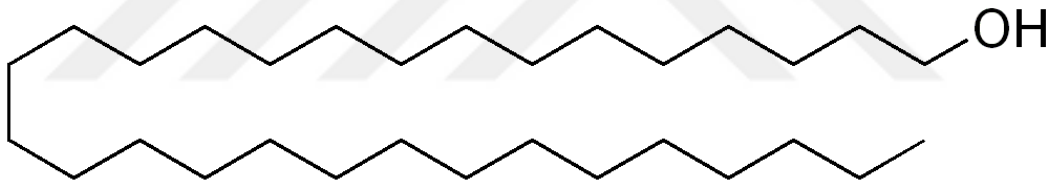
1930'larda USDA (United States Department of Agriculture) araştırmacıları, polen ekstraktlarının bitki büyümesini desteklediğini gözlemlediler. Daha sonra yapılan çalışmalarda, pirinçlerdeki aktif bileşikler tanımlamak ve sentezlemek için seçilmiş bazı bitkilerin (buğday, mısır, soya fasulyesi ve patates gibi) verimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere bunları serada ve tarlada yetiştirerek büyüme düzenleyicilerin özelliklerini değerlendirmek için bir çalışma başlatmışlar bu çalışmaların sonucunda, fitohormonların yapısı birçok spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatılmıştır (Zullo and Adam, 2002).

Fitohormonlar; büyüme, gelişme, bitkilerdeki evre geçişleri ve besin dağılımına aracılık ederek bitkilerde değişen ortam şartlarına uyum sağlamada hayati rollere sahiptirler. Bu sinyal moleküllerinin biyosentezi bitki hücrelerinde gerçekleşir ve büyüme düzenleyicileri olarak da adlandırılırlar (Arıca *et al.* 2022). Abiyotik streslere yanıt birkaç faktöre bağlı olsa da, fitohormonların, bitkilerde adaptasyon ve fizyolojik tepkilerde en önemli endojen maddelerden olduğu düşünülmektedir (Fahad *et al.* 2015). Fitohormonlar aynı zamanda bitkilerde biyolojik

sinyal olarak da bilinmektedirler. Bu maddeler sinerjik veya antagonistik çalışarak bitkilerin hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı koruyucu yanıtlar düzenlenmesine neden olmaktadır (Schmelz *et al.* 2003). Altı sınıfa ayrılan fitohormonlar, oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit, etilen ve brassinosteroidlerden oluşmaktadırlar. Her hormon sınıfı bitkiyi farklı yollar ve şekillerde etkilemektedir. Literatürlerde genel olarak bitki büyüme düzenleyicileri olarak geçen fitohormonlar hem sentezlendikleri yerde hem de büyüme ve gelişme tepkilerine aracılık edilen bölgeye taşınabilen biyolojik sinyal molekülleri olarak işlevlerini sürdürmektedirler (Sorrentino *et al.* 2022).

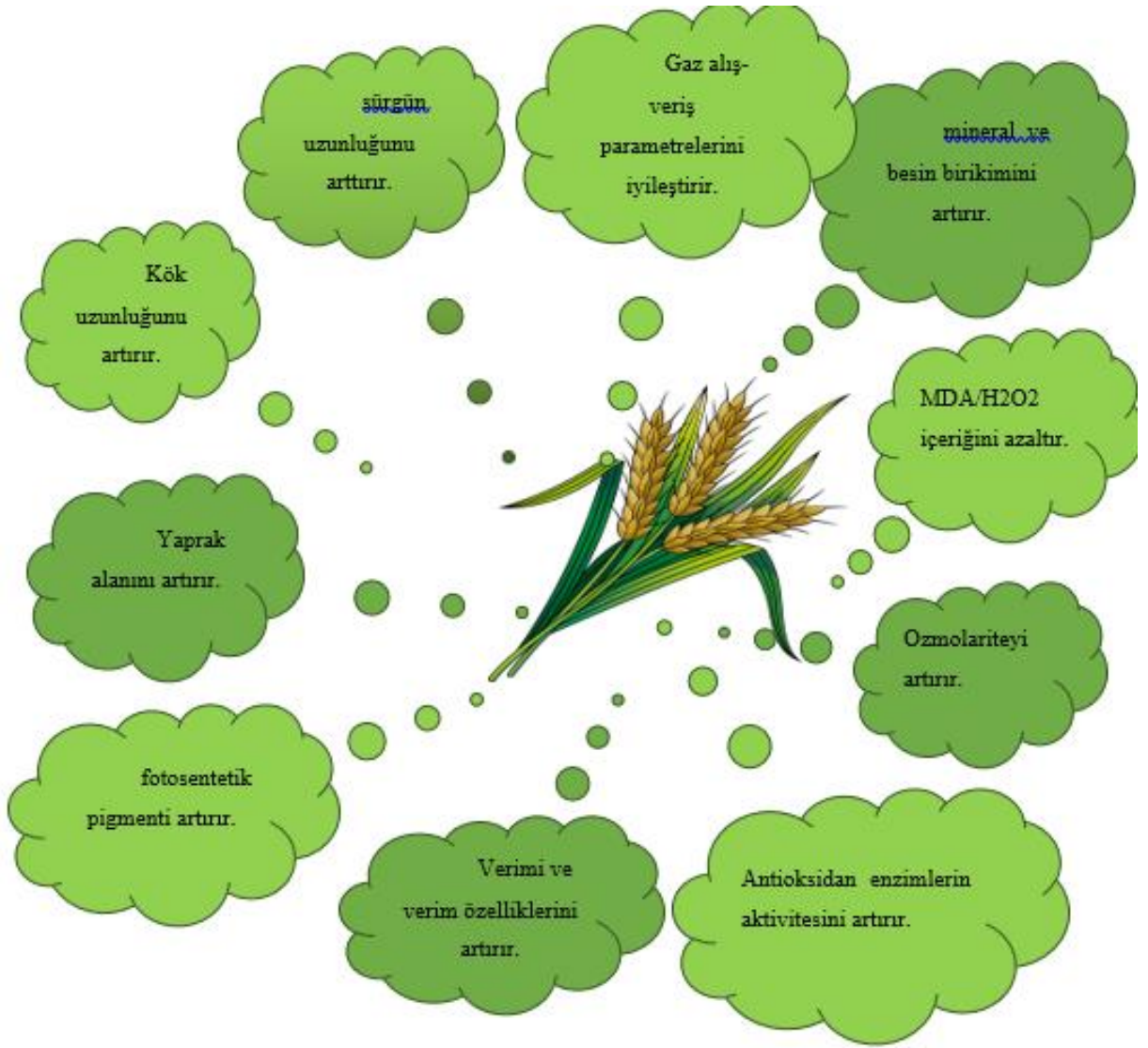
Triacontanol (TRIA)

TRIA ilk olarak 1933 yılında Chibnall *et al* tarafından tanımlanan, bitkilerde bulunan doymuş birincil alkollü fitohormon olup ilk olarak yonca bitkisinden izole edilmiştir. Bitkilerde çeşitli metabolik aktiviteleri düzenleyerek tuzluluk, kuraklık, ağır metal toksisitesi ve transplantasyon şoku gibi çeşitli abiyotik stresleri iyileştirme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Naeem *et al.* 2012). TRIA, $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{28}\text{OH}$ formülüne sahip organik çözücülerde çözünebilen ve moleküler kütlesi 438.8 g mol^{-1} olan bir maddedir (Şekil 4). Bitkilerde genellikle epikütiküler mumda bulunmaktadır.



Şekil 4. TRIA hormonunun yapısal formülü (İslam *et al.* 2021)

TRIA, özellikle Asya'da milyonlarca hektarda tahıl üretimini ve verimini arttırmak için kullanılmaktadır. Araştırmacılar TRIA'nın büyüme, verim, fotosentez, protein sentezi, su ve besinlerin alınımı, azot fiksasyonu, enzim aktiviteleri, serbest amino asitlerin içeriği, indirgeyici şekerler, çözünür protein ve aktif bileşenlerde yaşanan birçok anormal metabolik olaylarda iyileştirme özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Şekil 5) (Perveen *et al.* 2017; Samanta *et al.* 2020 ; Islam and Mohammad, 2020; Islam *et al.* 2021).



Şekil 5. TRIA'nın bitkilerdeki rolleri (Islam *et al.* 2021)

TRIA, bitki hücrelerinde fizyolojik etkinliği arttırmakta ve böylece bitkinin genetik potansiyelinden büyük ölçüde yararlanmamızı sağlamaktadır. Naeem *et al.* (2012) tarafından pirinç bitkisinde yapılan bir araştırmada sürgünlere nanomolar konsantrasyonlarda TRIA püskürtülmüş ve bitkilerin köklerinde 1 dakika içinde L-adenosin görünümünü ortaya çıkarmışlardır. Normal ve olumsuz koşullar altında kök veya yapraklara uygulanan TRIA tarımsal, bahçe, tıbbi ve aromatik bitkiler, sebzeler gibi pek çok bitkinin büyümesini ve verimini arttırdığına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır (Chen *et al.* 2002; Karam *et al.* 2017; Islam and Mohammad, 2020). Bununla birlikte, abiyotik strese maruz kalan tıbbi ve aromatik bitkilerle ilgili olarak TRIA'nın bitki büyüme regülasyonu, fizyolojik aktiviteler ve ikincil metabolit biyosentezi üzerindeki olası rolünü aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu rapor edilmiştir (Ali and Perveen, 2020; Sardar *et al.* 2022).

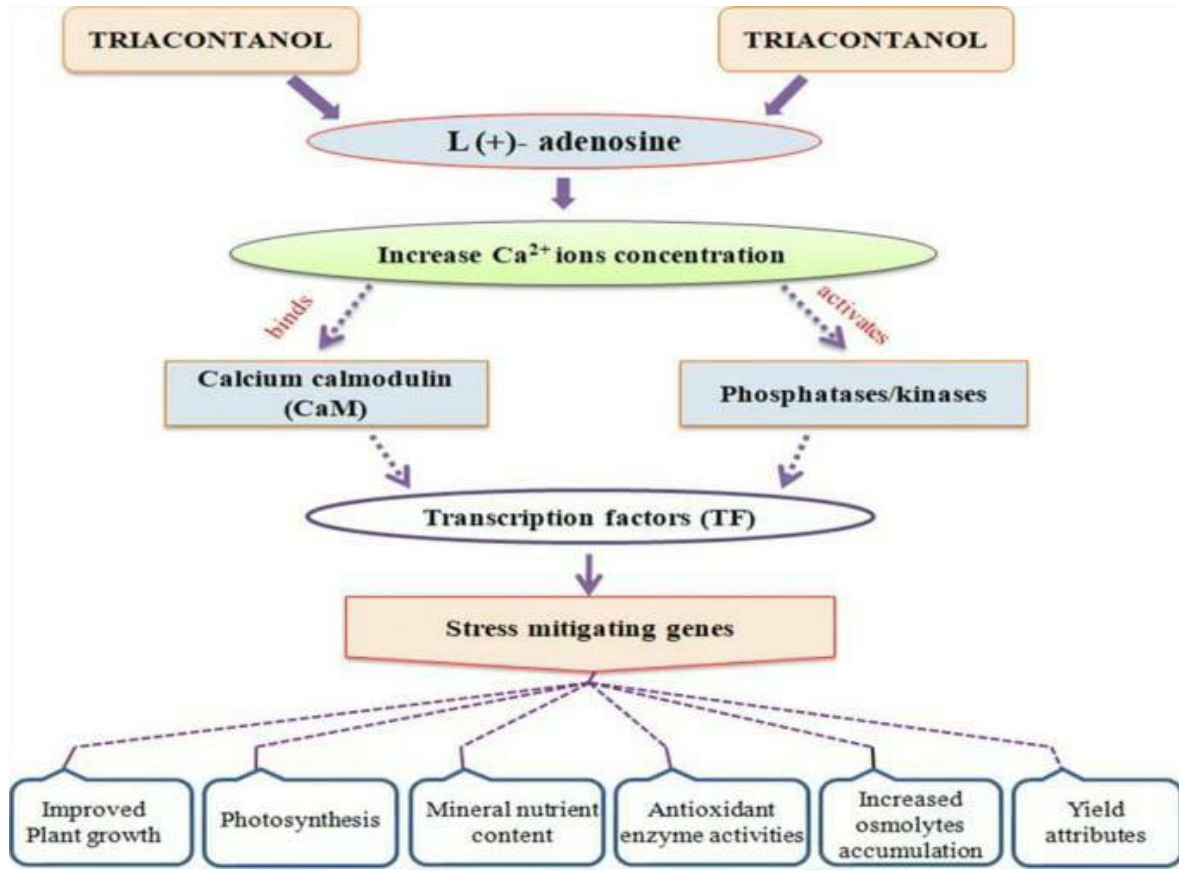
Naeem *et al.* (2017) tarafından yapılan bir çalışmada alternatif tıp sistemlerinde kullanılan terapötik ajanların en önemli kaynaklarından biri olan Mısır nanesi (*Mentha arvensis*

L.) fidelerinde 10^{-6} M TRIA'nın sprey şeklinde yapraklara uygulanması sonucunda, kontrole kıyasla gaz değişim miktarı, toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. TRIA'nın ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) aktivitesini ve seviyesini hızla arttırdığını, fotosentezle ilişkili olan rbc S genlerinin daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaştığını ve böylece yüksek fotosentetik aktivite ile sonuçlandığı tespit edilmiştir.

Khan *et al.* (2006) tarafından domates (*Solanum lycopersicum L.*) bitkisinde 1 ppm'ye kadar TRIA'nın yapraklara sprey şeklinde uygulanması sonucunda sürgün ve köklerin taze ve kuru ağırlığının iki kat arttığı bildirilmiştir. TRIA'nın mitarı artırılarak 1 μ M uygulandığında ise bitkinin boyu, dal sayısı, yaprak sayısı, kuru ağırlığı ve gelişme ile ilgili tüm fizyolojik verilerde artış olduğunu belirtmişlerdir.

İslam *et al.* (2020) L ve D adenosinin TRIA uygulamasından sonra bitkilerdeki oranlarını tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre L-adenosin oranı %11'e kadar çıkmıştır. Adenosin monofosfat (AMP)'ın L-adenozin tarafından taşınması bitkideki metabolik aktivitenin de artmasına neden olmuştur. Çünkü D-adenozin bitki metabolizmasını uyaramaz lakin L-adenozin uyatabilmektedir.

Şekil 6'da belirtildiği gibi TRIA uygulaması, stres koşullarında bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal karakterleri üzerine önemli etkilere sahiptir. Strese maruz kalan bitkilerin performansları üzerine kötü etkisini hafifletmede TRIA'nın rollerine ilişkin çeşitli bulguları yukarıda özetlenmiştir.



Şekil 6. TRIA'nın L-adenozinin tetiklemesi sonucunda stresin baskılanmasının şematik gösterimi (İslam *et al.*2020)

Perveen *et al.* (2017) tarafından TRIA uygulanan mısır bitkisinde (*Zea mays L.*) **rbcS** (ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz küçük alt birimi), **GDC** (glisin dekarboksilaz kompleksi) ve **SHMT** (hidroksimetiltransferaz) gibi fotosentezi düzenleyen genleri artırıcı yönde düzenlediği, fakat stresle ilişkili genleri azalttığı tespit edilmiştir. TRIA'nın uygulanmasından sonra ortaya çıkan L-adenozinin bitki metabolizmasında, su alımını ve mineral besin alımını artırdığı, organik bileşiklerin sentezini uyardığı ve ayrıca uygun metabolik süreçler için antioksidan enzim aktiviteleri artırdığı tespit edilmiştir. TRIA'nın çeşitli süreçler üzerindeki bu iyileştirici etkilerin, stres durumundaki bitkilerde zararlı etkilerin hafifletilmesine yardımcı olduğunu göstermişlerdir (Perveen *et al.* 2017).

TRIA'nın kakao (*Theobroma cacao*) tohumlarının büyümesine etkisini değerlendirmek için Sijinjak and Pandiangan (2014) tarafından bir çalışma başlatılmıştır. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda TRIA (kontrol, 0,1 ml/L, 0,5 ml/L, 1,0 ml/L ve 2,0 ml/L) tohumlara uygulanmış ve 5 tekerrür olacak şekilde tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, kakao fidelerinin büyümesini en etkili şekilde artıran TRIA konsantrasyonunun 1,0 ml/L olduğu belirlenmiştir. Fidelerin uzunluğu, yaprak sayısı, yaprak uzunluğu ve gövde çapı kontrol ile kıyaslandığında sırasıyla %26,21; %3,70; %42,28 ve %10,42 daha yüksek miktarlar elde

edilmiştir. Böylece TRIA'nın kakao fidelerinin büyümesi üzerine önemli etkileri olduğu ve ticari verimin yüksek olması için kullanabileceğini vurgulamışlardır.

TRIA, pirinç, mısır ve buğday fidelerinde çalışılmış ve bu çalışmada büyüme, klorofil içeriği, fotosistem-II'nin (PS-II) verimliliği ve gaz değişim özellikleri üzerinde olumlu etki göstermiştir. Dahası, bitki büyümesi ve biyokütlesinde de artışa neden olmuştur. Temel olarak, TRIA'nın fotosentez sürecinde yer alan birçok genin regülasyonunu arttırdığı ve fotosentez aktivitelerinde iyileştirici etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Kumaravelu *et al.* 2000). Besin ortamında yetiştirilen pirinç, mısır, arpa ve domates fidelerinin yapraklarına sprey yoluyla uygulanan TRIA'nın özellikle bitki boyu, taze ve kuru ağırlıkları, yaprak alanı ve kök nodülasyonu üzerinde büyümeyi teşvik edici etkileri tespit edilmiştir. TRIA'nın zerdeçal (*Curcuma longa L.*) ve sümbül bitkisinde büyüme özelliklerini önemli ölçüde uyardığı ortaya konulmuştur (Chen *et al.* 2002). Ayrıca TRIA'nın bazı terapötik özelliklere sahip bitkilerin (hardal, ısırgan otu, kekik, kereviz) üretkenliğini arttırdığı aynı zamanda afyon ve morfin üretiminde ise büyük önem teşkil ettiği görülmüştür (Naeem *et al.* 2012; Islam and Mohammad, 2020).

Epigenetik

Epigenetik terimi, eski Yunancada varolan *epi* ve genesis kelimelerinden türetilmiştir. (Holliday, 2006). Aristoteles, epigenesis sözcüğünü preformasyona yani önceden oluşuma karşıt bir teori olarak kullanmıştır. Epigenetik terimi ilk olarak 1940 yılında Emriyolog Conrad Waddington tarafından literetürde kullanılmıştır (Deans and Maggert, 2015). Waddington genetiğe karşı güçlü bir ilgiye sahip olmakla beraber sitoloji, embriyoloji, evrimsel biyoloji gibi biyolojinin alt dallarıyla birlikte multidisipliner olarak çalışması gerektiğini savunmaktaydı (Van Speybroeck, 2002).

Bu kavramların birleşimi sayesinde epigenetik terimini oluşturmuştur. Waddington'a göre epigenetik; gelişim esnasında genotipin fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen bilim dalıydı (Goldberg *et al.* 2007). Bu konudaki en önemli katkılarından biri de genotip ve fenotip arasındaki esnek ilişkiyi kabul etmesi ve buna özellikle vurgu yapmasıydı.

Günümüzde 'Epigenetik' kavramının tanımı ise DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklı olmayan ama aynı zamanda kalıtsal olan gen ifadesindeki değişiklikleri inceleyen bilim dalı olarak belirtilmektedir. Yani genetik olmayan fenotipik varyasyonlar incelenmektedir. Bu değişimler hücreden başlayarak organizmanın tümüne etki etmektedir ancak DNA'nın diziliminde herhangi bir değişiklik söz konusu değildir (Martin and Zhang, 2007).

Genetik araştırmalarda bazı cevaplanamayan soruların ortaya çıkmasıyla epigenetik kavramı ortaya çıkmıştır (Bond and Finnegan, 2007; Waterland and Michels, 2007). Bunlar;

- Fenotipimizi belirleyen nedir?
- Bir organizmadaki tüm hücreler aynı genotipi taşımlarına rağmen, nasıl olur da farklı profillere ve bağımsız hücre fonksiyonuna sahip olabilmektedirler?
- Fibroblast veya lenfositler gibi farklılaşmamış hücreler, nasıl olur da hücre bölünmesi yoluyla fenotiplerini sabit bir şekilde koruyabilmektedirler?
- Nasıl, farklılaşmamış bir kök hücre, bazen bölündüğünde iki yeni kök hücre oluştururken, bazen de bir kök hücre ve bir farklılaşmış hücre verebilmektedir?
- Tamamen aynı genotipe sahip tek yumurta ikizlerinin, nasıl olur da hastalıklara genetik yatkınlıkları farklı olur?
- Çevremiz ve yaşam tarzımız gen ifademizi yani bizi ne kadar, nasıl etkiler?
- Bu etkiler bizden sonraki nesillere de aktarılır mı? şeklinde sıralanabilmektedir.

(Van Speybroeck, 2002; Van Vliet *et al.* 2007; Waterland and Michels, 2007; Nishimura and Paszkowski, 2007; Martin and Zhang, 2007; Lan *et al.* 2009; Lim and Maher, 2010; Tok *et al.* 2011; Erturk *et al.* 2015; Nardemir *et al.* 2015)

Epigenetik mekanizmalar ikiye ayrılmaktadır;

1) Genin ifadesini etkileyen veya doğrudan kontrol eden mekanizmalar

- DNA metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu ve bikitinasyonu
- Kovalent olmayan DNA modifikasyonları (histon değışimleri, kromozom etkileşimleri, kromatin tadilatları)
- Transkripsiyon faktörleri

2) Gen ifadesini dolaylı yoldan kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar

- Kodlanmayan RNA'lar
- Posttranskripsiyonel mekanizmalar

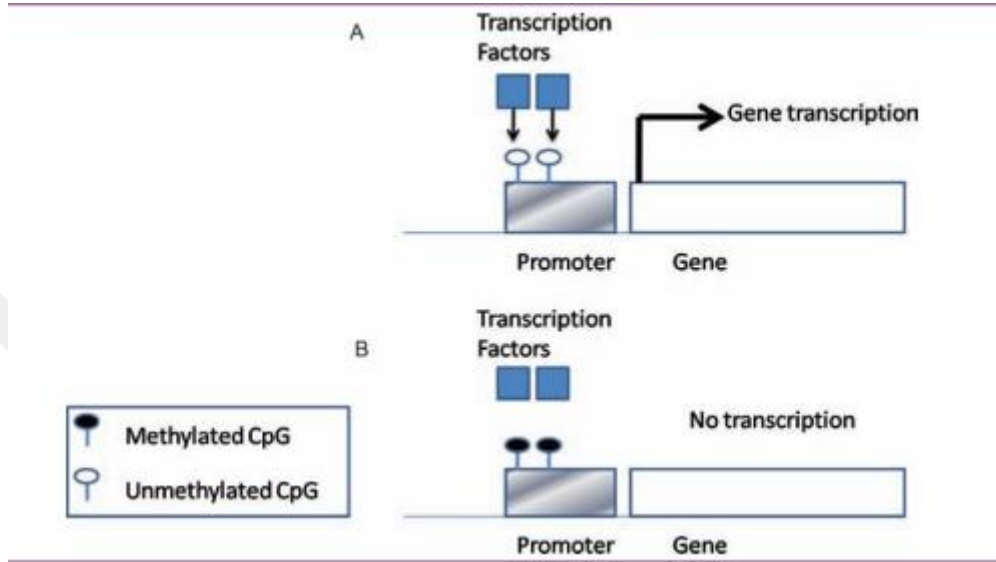
DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, 5'-CpG-3' dinkleotidindeki sitozin bazına kovalent olarak bir metil grubunun (CH₃) eklenmesi anlamına gelmektedir (şekil 7) (Lim and Maher, 2010).

CpG terim olarak, DNA nükleotit dizisindeki guanin (G) ile sitozinin (C) bir fosfat bağı ile bağlanması ifade etmektedir. Genomların oğu CpG dinükleotidi şeklinde metillenirler. Bununla birlikte, metillenmemiş CpG'ler de bulunur ancak bunlar rastgele dağılmış değışillerdir.

Genellikle birçoğu genin promotör bölgesinde bulunan 'CpG adalarında' küme halinde bulunurlar (Toparslan *et al.* 2015).

Çoğu hücrede eksprese edilen önemli genlerin promotörlerindeki CpG adalarının esas olarak metillenmemiş olduğu ve kanser hücrelerinde CpG adalarının metilasyonunun sıklıkla gözlemlendiği görülmüştür. CpG adalarının metilasyona uğraması gen ekspresyonunun susturulmasına yol açmaktadır (Lim and Maher, 2010; Altunkaynak *et al.* 2016).



Şekil 7. DNA metilasyonunun gerçekleşme mekanizması (Lim and Maher, 2010)

Bitkilerde metilasyon

Bitkiler âleminde bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana* ile yapılan çalışmalar DNA metilasyonunun anlaşılmasında önemli bilgiler elde edilmesini sağlamıştır (Aufsatz *et al.* 2002). Metilasyon memelilerde genel olarak CpG dizilerindeki C'nin metillenmesi ile meydana gelirken bitkilerde CpG, CpNpG ve CpNpN dizilerinde de C'nin metillenmesi ile oluşmaktadır (N; guanin dışında diğer nükleotit için kullanılmaktadır).

Arabidopsis bitkisindeki esas DNA metiltransferaz enzimleri DRM2, MET1 ve CMT3'dür. DRM2 ve MET1 proteinleri, memeli metiltransferazları olan DNMT3 ve DNMT1 ile önemli derecede homoloji gösterirler, CMT3 ise bitki alemine hastır. DNA metiltransferazlar iki sınıfa ayrılırlar.

- 1) De novo grup; DNA'ya yeni metil grupları ekleyen enzimler.
- 2) Devam ettirici grup; DNA'nın eşlenmesi sırasında ana moleküldeki metil gruplarını tanıyıp yeni ipliklerde aynı konumlarda metil grupları ekleyen enzimler.

DRM2, de novo yani DNA metiltransferaz olduğu gösterilmiş tek enzimdir. DRM2'nin, MET1 ve CMT3 ile birlikte, DNA replikasyonu sırasında metilasyonun korunmasını sağladığı da belirtilmiştir (Cao and Jacobsen, 2002).

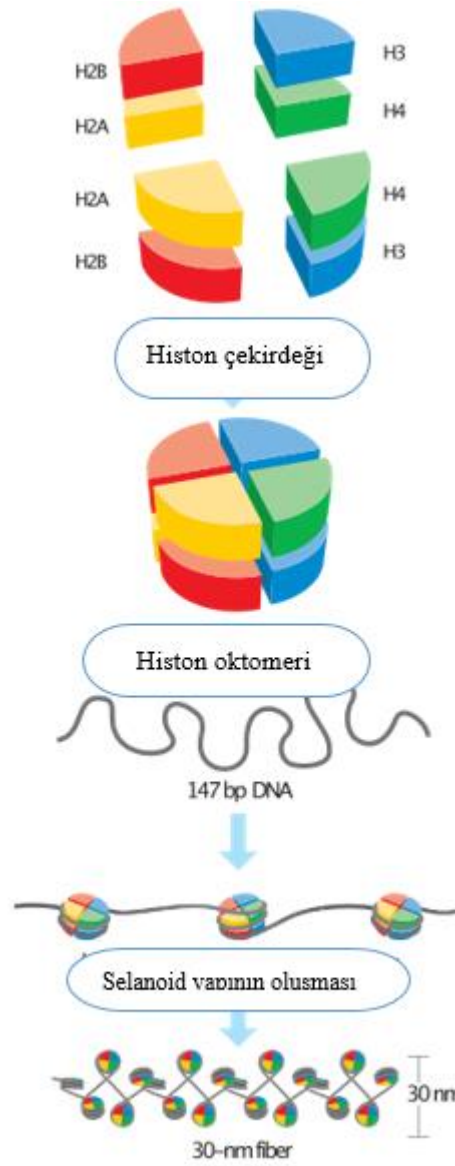
DNA metilasyonunun gen ifadesini etkilemesi

Genlerin transkripsiyonunun gerçekleşebilmesi için gen promotörünün, transkripsiyon faktörleri ve diğer düzenleyici birimler tarafından kolayca erişilebilir olması gerekmektedir. DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörünün bağlanmasını doğrudan önleyebilir ve transkripsiyon faktörlerinin gene erişimini kısıtlayan kromatin yapısında değişikliklere yol açabilmektedir. Örneğin, metillenmiş CpG'ler, baskılayıcı komplekslerinin üzerine metil-CpG bağlayıcı proteinlerini çekerek histon modifikasyonuna neden olabilmektedir. Histonlar, kromatinin temel protein bileşenleri olup değiştirilebilen DNA'nın sarılmasında görev almaktadırlar. Baskılayıcı komplekslerin aktifleşmesi ile histon modifikasyonları oluşmaktadır. Böylece, transkripsiyon için gereken açık ve aktif kromatin yapısının (ökromatin) yanı sıra transkripsiyonun gerçekleşmediği daha yoğun bir kromatin yapısı (heterokromatin) ortaya çıkmaktadır (Lim and Maher, 2010).

Histon modifikasyonu

Histonlar hücre çekirdeklerinde bulunan fazla miktarda lizin ve arginin bulunduran basit proteinler olup nükleozom adı verilen yapısal birimler oluşturmak için DNA'nın etrafına sarmalandığı makara benzeri yapılardır (Xiao *et al.* 2017). Nükleozomlar, sıkı bir şekilde paketlenmiş kromatin denilen yapıları oluşturan 30 nanometrelik liflere sarılmaktadırlar. Bu histonlar DNA'nın karışmasını, zarar görmesini engellemekte ve gen regülasyonunda önemli roller oynamaktadırlar (Wang *et al.* 2005).

Histon ailesi 5'e ayrılmaktadır. H1 ve H5 bağlayıcı histonlar, H2,H3 ve H4 çekirdek histonları olarak adlandırılmaktadırlar (Reche *et al.* 2006). Nükleozom çekirdeği, iki H2A-H2B dimerinden ve bir H3-H4 tetramerinden oluşur. Histonların pozitif yüklü, DNA'nın ise fosfat omurgasının negatif yüklü olması, sıkı bir elektrostatik çekimin oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum DNA'nın sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlamaktadır (Reche *et al.* 2006). Histonlar, genlerdeki transkripsiyonu düzenlemek için enzimlerin etkisiyle kimyasal olarak değiştirilebilmektedirler (Mariño-Ramírez *et al.* 2014).



Şekil 8. DNA'nın katlanması ve histonlar (Goldberg *et al.* 2007)

En çok bilinen modifikasyon şekli, arginin ile lizin metilasyonu veya lizinin asetilasyonu olarak bildirilmektedir. Metilasyon transkripsiyon faktörleri gibi diğer proteinlerin nükleozomlarla etkileşimini etkilemektedir. Lizin asetilasyonu, lizin üzerindeki pozitif yükü ortadan kaldırır, böylece histon ve DNA arasındaki elektrostatik çekimi zayıflatarak DNA'nın kısmen çözülmesine neden olup DNA'yı gen ifadesi için daha erişilebilir hale getirmektedir (Wang *et al.* 2005). Nükleozom oluşurken önce dört farklı dimer bir araya gelir (Şekil 8) ve 63 angstrom çapında oktomerik yapıyı oluştururlar. Bu yapı Selenoid yapı olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra, Yaklaşık 146 bp baz çiftini içeren DNA çekirdek parçacığının etrafını 1.65 kez sola dönümlü bir süper sarmal dönüşle sarar ve yaklaşık 100 angstrom çapında parçacık oluşturur. Bağlayıcı histon olan H1, nükleozomu DNA'nın giriş ve çıkış bölgelerine bağlayarak DNA'nın sabitleşmesini ve daha yüksek dinamik yapının oluşmasını sağlamaktadır (Harshitha and Nair, 2020).

Mitoz ve mayoz sırasında oluşan yoğunlaştırılmış kromozomlar, nükleozomlar ve diğer düzenleyici proteinler arasındaki etkileşimler ile gerçekleşmektedir (Ding *et al.* 2019).

Bu etkileşimler;

- Bazik amino asitlerin (özellikle lizin ve arginin) yan zincirleri ile DNA üzerindeki fosfat oksijenleri arasındaki tuz köprüleri ve hidrojen bağlarının etkileşimleri.
- Heliks-dipolarlar H3, H4 ve H2B'de alfa sarmalları oluşturur ve DNA üzerindeki negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girerler,
- DNA omurgası ile histon proteinlerinin ana zincirindeki amid grubu arasındaki hidrojen bağlarının etkileşimleri.
- DNA üzerindeki histon ve deoksiriboz şekerleri arasındaki polar olmayan etkileşimler (Mersfelder and Parthun, 2006).

Genel olarak, aktif olan genler daha az bağlı histona sahipken aktif olmayan genler daha sıkı bağlı olarak bulunmaktadır. Hücre interfaz sırasında DNA histonlarla yüksek oranda etkileşimdedir (Allison, 2021). Ayrıca, histonların yapısının evrimsel olarak korunduğu bilinmektedir. (Tropberger and Schneider, 2013).

Moleküler Markırlar

Moleküler biyolojide tekniklerin geliştirilmesi sayesinde, genetik polimorfizmi saptamak için çok sayıda DNA markırlar geliştirilmiştir. Son yıllarda DNA markırlardan en çok kullanılmakta olan moleküler teknik, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı olan tekniklerdir. Moleküler markırlar, genotipler arasında ayırım yapma özelliklerinden ötürü genetik temelli inceleme alanlarında oldukça önemlidir. Antosiyaninler, fenolikler gibi ikincil metabolitler farklı bitki türleri arasında ayırım yapmak için markır olarak kullanılan ilk moleküllerdir (Grover and Sharma, 2016). Moleküler markırlar genetik kodu üzerinde taşıyan DNA'daki spesifik bir bölgeyi tespit etmek için kullanılan genetik işaretler olup, genomda büyük bir bölümün veya tek bir nükleotidin özel belirlenmesinde kullanılabilirler. Enzim markırları (allozimler ve izozimler), DNA dizilerinde oluşan polimorfizme dayalı olarak farklı bireyler arasındaki değişkenliği saptayan markırlardır. Daha güçlü DNA markırlarının keşfedilmesinden önce kısa bir süre için önem arz etmişlerdir. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, bir dizi moleküler genetik markırın oluşturulmasını hızlandırmıştır. DNA markır yöntemlerinin çözünürlüğü ve kullanılabilirliği, nükleik asit hibridizasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizileme yöntemlerindeki ilerlemelerle önemli ölçüde artmıştır. Son zamanlarda, dünya genelinde farklı tekniklerde bir dizi moleküler markır tekniği geliştirilmiştir.

Ama bu yöntemlerin sadece birkaçı (RFLP, RAPD, AFLP ISSR, SSR ve SNP) kabul edilmiştir (Grover and Sharma, 2016).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Moleküler biyolojide, türler içindeki veya arasındaki DNA farklılıklarının tespiti veya genlerin dizi içindeki konumlarını belirlemek için kullanılan en hassas tekniklerden biridir (Grover and Sharma, 2016). RFLP analizi, maliyeti az olan DNA dizileme teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla artık büyük ölçüde geçerliliğini yitirmiş, ancak yaygın uygulamayı görece kadar ilk DNA profillemeye tekniklerindendir. RFLP'nin analizi, genom haritalamada, genetik bozuklukların tespitinde genlerin DNA'daki yerlerinin tespit edilmesinde, genetik hastalıkların risk oranının tespitinde ve babalık testinde önemli bir erken dönem teşhisi tanımaktadır (Heras *et al.* 2016). RFLP'lerin moleküler temeli, enzim tanıma dizisindeki bir nokta mutasyonu, ekleme, silme veya inversiyona yol açan bir moleküler olay nedeniyle bir kısıtlama bölgesinin kaybı veya kazancıdır. Her iki durum da Southern blot'larda tespit edilebilen genomik kısıtlama fragmanlarının uzunluk farkıyla sonuçlanır. RFLP'ler, geleneksel markırlara kıyasla birçok avantaja sahiptirler. Fenotip yerine doğrudan genotipi tanımlarlar ve bu nedenle çevreden etkilenmezler. Haritalandırılabilen RFLP markırlarının sayısı yalnızca mevcut genotipler arasında var olan moleküler farklılıklar ile sınırlı olması tekniğin dezavantajını oluşturmaktadır. RFLP çalışmaları ve ayrıntılı RFLP bağlantı haritaları, moleküler yöntemlerle bitki ıslahına, bitki taksonomisine, bitki evrimine ve benzeri alanlarda önemli oranda katkı sunmuştur (Grover and Sharma., 2016).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism- Çoğaltılan Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

AFLP; DNA parmak izi, popülasyon genetiği, filogenetik araştırmalar, bağlantı haritalama, ebeveynlik analizleri ve tek lokuslu PCR markırları geliştirme gibi geniş uygulama alanlarına sahip olan moleküler markırlama tekniği olarak bilinmektedir. (Meudt and Clarke, 2007). Bu teknik 1995'te yayımlanmasından bu yana, bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakteriler üzerine yapılan ve genetik, evrim ve ekolojideki çok sayıda disiplini kapsayan birçok çalışma için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. AFLP'ler, toplam genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimler ile kesilmesinin ardından fragmentlerin seçici PCR amplifikasyonu ile çoğaltılması ve daha sonra elektroforezde görüntülenmesi ile gerçekleştirilir. Böylece her bir birey için benzersiz ve tekrarlanabilir parmak izinin (veya profil) oluşturulmasını sağlamaktadır. Parmak izini oluşturan markırlar, genellikle sentromerik

bölgelerde yoğunlaşmasına rağmen genom çapında geniş bir varyasyonun değerlendirilmesine izin verebilmektedir (Meudt and Clarke, 2007).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats- Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)

Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (ISSR'ler) diğer yöntemlere göre daha yeni bir tekniktir ve genetik çeşitliliği değerlendirmek veya birçok farklı türde yakından ilişkili çeşitleri belirlemek için güçlü, hızlı, basit, tekrarlanabilir ve ucuz bir yol olduğu kanıtlanmıştır. ISSR markır sistemi, önceden herhangi bir sekans bilgisi olmaksızın mikro işaretleyiciler ile DNA bölgelerindeki polimorfizmleri tespit etmektedir. Primerler, genellikle dejenere bir 3' bölgesinden yapışarak bölgeyi tekrarlamak sekansına dayanmaktadır. primer başına çok sayıda amplifikasyon ürününün üretilmesini ve düşük maliyetle yüksek tekrarlanabilirlik sağlamaktadır (Grover and Sharma, 2016).

SSR (Simple Sequence Repeats-Basit dizi tekrarları)

Mikro işaretleyiciler veya basit dizi tekrarları (SSR'ler), 1-6 baz çifti (bp) uzunluğundaki birimlerden oluşan art arda tekrarlanan DNA parçalarıdır. Prokaryot ve ökaryot genomlarının tüm bölgelerinde bulunabilirler (Zhao *et al.* 2011). Mikro işaretleyiciler genomun herhangi bir yerinde hem protein kodlayan hem de kodlamayan bölgelerde bulunabilir. Yüksek değişkenlikleri nedeniyle mikro işaretleyicilerin kantitatif genetik varyasyon yaratarak ve koruyarak genom evriminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Canlılarda bu tekrarların artması anormal fizyolojik ve moleküler durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kusursuz ve kusurlu mikro-/mini nükleotid aramaları için kullanılan bu algoritma A, T, C ve G bazlarının olası tüm bileşikler karşılaştırarak 1 ile 6 nükleotit arasındaki veri tabanındaki benzer okumaları gerçekleştirir (Oliveira *et al.* 2008).

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

Genel olarak kullanılan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA %60 ya da daha fazla GC içeriğine sahip 10 bazlı primerin kullanımına dayanan bir PCR yöntemidir. RAPD'ler birçok lokustaki polimorfizmlerin eş zamanlı olarak taranmasında genel olarak tercih edilmektedirler. RAPD polimorfizmleri, hazırlama bölgelerindeki dizi çeşitliğinden veya primer bağlanma bölgeleri arasında bulunan hedef dizideki uzunluk varyasyonundan kaynaklanmaktadır. RAPD radyoaktif olmayan bir yöntem olup az miktarda DNA gerektirir ve kısa sürede yapılabilir. Aynı zamanda RAPD daha az teknik uzmanlık istemektedir. RAPD'in bir başka avantajı da genellikle birçok markırın oluşması ve çoğu zaman tüm genoma dağılmış halde olmasıdır. RAPD tekniği genel olarak şu adımlardan oluşmaktadır. Uygun primerleri

içeren PCR reaksiyonlarıyla hedef bölgeler kopyalanır, kopyalanan spesifik DNA bölgeleri elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılır ve görüntülenir. Görüntüleme yapılırken bantların varlığı ve yokluğuna göre sonuçlar değerlendirilir. Değerlendirilen sonuçlar ile genotipler arasındaki polimorfizm açığa çıkarılabilmektedir (Idrees *et al.* 2014).

CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification - Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım)

CREDRA tüm genomdaki metilasyona duyarlı enzimler ile DNA'nın kesilmesi ve metilasyon değişikliklerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Gelişimin farklı evrelerinde ve farklı aşamalarında kontrol sağlanabilmekle beraber türler arasındaki varyasyon saptama çalışmaları içinde kullanılması tercih edilmektedir. Bu teknikte genomun metilasyonu Msp I ve Hpa II restriksiyon enzimleri kullanılarak analiz edilmektedir. CCGG sekansını her iki enzim de tanıyabilmektedir. Fakat sitozinler metillenmediğinde yalnızca Hpa II aktifleşirken Msp I ise dış sitozin metillendiğinde DNA ile etkileşime girememekte DNA'da metillenme olmadığında etkileşime girebilmektedir. Bu durumda restriksiyon enzimleri ile DNA kesilir daha sonra DNA, PCR ile çoğaltıldıktan sonra spesifik DNA bölgeleri elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılır ve görüntülenir, görüntüdeki bantların varlığı ve yokluğuna göre değerlendirmelere tabi tutulmaktadır (Bakır ve Ağar, 2021).

Restriksiyon Endonükleaz Enzimler

1950'li yıllarda Werner Arber, Dan Nathans ve Hamilton Smith tarafından, bakterilerin bakteriyofaj enfeksiyonlarına direnç gösterme yeteneğini ortaya koyan mikrobiyal genetikteki önemli çalışmaları gözlemlemişlerdir (Di Felice *et al.* 2019). Bu çalışmalar, fajın enfeksiyon kapasitesinin büyüme döngüsü sırasında geçirdiği değişiklikleri tanımlayarak, bu değişikliklerin yeni mutasyonlar veya seçici süreçlerden kaynaklanmadığını göstermektedir. Daha sonra, altta yatan savunma sisteminin, faj DNA'sını parçalayarak viral etkiyi kısıtlayan (restriksiyon enzimleri terimi), ilgili DNA metil-transferaz aktivitesine bağlı DNA dizisine özgü endonükleazlara dayandığı doğrulandıktan sonra Werner Arber, Dan Nathans ve Hamilton Smith, 1978 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görüldüler. Arber, bu enzimlerin spesifik DNA dizileri tarafından temsil edilen bölgelerde DNA'ya bağlanabildiği varsayımında bulunmuştur. Smith, saflaştırılmış enzimler kullanarak ve bunların simetrik ve spesifik nükleotid dizilerini kesebildiklerini göstererek Arber'in hipotezini doğrulamıştır. Nathans, spesifik DNA fragmanlarının ilk kısıtlama kesim bölgesi haritalarını üreterek bu enzimlerin olası kullanımını fark etmesiyle birlikte restriksiyon enzimlerinin karakterizasyonu çok hızlı gelişmiş ve dört farklı enzim sınıfı tanımlanmıştır. Sınıf II'ye ait enzimler, DNA'nın manipülasyonu ve karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılır. Hedef DNA dizilerini tanımak

ve onu parçalamak için yalnızca Mg^{2+} ye ihtiyaç duyarlarken ATP'ye ihtiyaç duymamaktadırlar. Bu şekilde restriksiyon enzimlerinin farklı kombinasyonlarını kullanarak, DNA'yı karakterize etmenin ve manipüle etmenin birçok farklı yolunun bulunduğu saptanmıştır (Di Felice *et al.* 2019).

Sınıf I, III ve IV restriksiyon enzimleri, DNA kesme spesifikliklerinin düşük olması nedeniyle DNA çalışmalarında çok az kullanılmaktadırlar. Sınıf II restriksiyon endonükleaz enzimleri DNA bölgelerine spesifik, kısa uzunluktaki sekansa sahip enzimlerdir. Bu enzimlerin bakteriler tarafından yabancı DNA'ların parçalanması için savunma amaçlı üretildiği bilinmektedir. Bakteri, kendi DNA'sını metilleyerek kendi ürettiği enzimin kesimine karşı koruma mekanizması geliştirmiştir. Restriksiyon enzimleri çift zincirli DNA üzerinde tanıdıkları spesifik alanlara tutunarak kesim gerçekleştirirler. Pek çok restriksiyon enziminin tanıdıkları bölgede tek veya çift zincirde metillenme oluştuğunda DNA'yı kesemeyecekleri gözlemlenmiştir. Her bir restriksiyon endonükleazın uygun aktivite oluşturmaları için kendilerine özgü optimum çalışma aralığının mevcut olması gerekmektedir. İdeal saklanma ve test koşulları belirlendiği zaman enzim fonksiyonları en yüksek doğruluk ve aktiviteye sahip olmaktadır. Sıcaklık, pH, enzim kofaktörü, tuz bileşimi ve iyonik gücü gibi koşullar enzim aktivitesini ve stabilitesini etkilemektedir. Bu nedenden dolayı çalışmamızda metilasyona duyarlı olan Hpa II ve Msp I restriksiyon enzimleri kullanılmıştır (Erturk *et al.* 2015; Di Felice *et al.* 2019).

Hpa II

Hpa II restriksiyon enzimi *Hemophilus parainfluenzae* bakterisinden izole edilmiş olup Hpa II ile genomik kesimler oluşturulmaktadır. Hpa II, DNA metilasyonu ile inhibe olmakta ve CmCGG sekansını kesemedikleri bilinmektedir. Genom, metilasyonun olmadığı bölgede bölünür ve CpG'lerin metillendiği yerlerde parçalanır. Büyük fragmentin Hpa II kesiminden oluştuğu düşünülür. Küçük fragmentlerin ise bu olaydan oluştuğu düşünülmemektedir. Onlara Hpa II tiny fragments (HTF'ler) denilmektedir. Bunları içeren bölgeler de HTF adacıkları olarak adlandırılmıştır. HTF adaları, genlerin yanında yerleşme eğilimindedirler, genellikle genlerin 5' kısmında ve G+C içeriği ile zengindirler. HTF adalarında CpG sekansları metillenmemiş olup eğer buralarda metillenme yoksa mutasyon ile CpG'nin fazla kaybı olmamalı ve böylece bu sekans sıklığı G+C içeriğini yansıtmalıdır (Nardemir *et al.* 2015).

Msp I

Msp I enzimi, *Moraxella* cinsi bakteriden izole edilmiş olup genomik kesimlerin yapıldığı bir restriksiyon enzimidir. Msp I enzim ampikonları 5'CCGG 3' tanıma bölgesinden

keserek her alt grup için farklı DNA parçaları oluşturur. Böylece iç sitozinde metillenme olduğunda aktif oldukları bilinmektedir (Erturk *et al.* 2015).



MATERYAL VE METOT

Kullanılan bitkisel materyali

Bu çalışmamızda ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin Altınyıldız çeşidinin tohumları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edilmiş ve çimlendirilerek yetişmiş genç bitkilerin yaprakları kullanılmıştır.

Deney aşamasında kullanılan alet ve cihazlar

Tablo 2. Çalışma Sürecinde Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Temin Edilen firma
Azot Tankı	Termo, Electron Corporation
Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Derin Dondurucu	Nuarie, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK
Elektroforez Akım Sağlayıcı	OWL OSP300-2Q, U.S.A.
Elektroforez Tankı	(Yatay) OWL B2, U.S.A.
Etüv	Memmert, UN55
Hassas Terazi	Mettler Toledo AL204, CHINA)
Jel Görüntüleme Sistemi	DNR Bioluminescence Systems MiniBis Pro, ISRAEL
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A, KOREA
Mikrodalga Fırını	Arçelik, TÜRKİYE, MD 592
Nanodrop	Qiagen/Qiagxpert 200061 24V F 2.5A
Otoklav	Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
PCR	Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA
Saf Su Cihazı	GFL 2004, GERMANY
Santrifüj	Hettich, GERMANY, EBA-20
Su Banyosu	Memmert WNB14, GERMANY
Vorteks	Velp Scientifica, F202A0173

Çalışma sürecinde kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıdaki gibidir:

DNA ekstraksiyon tamponu:

- 1 M Tris-HCl (pH 8.0)
- 0,5 M EDTA (pH 8.0)
- 5 M NaCl
- %2 β -mercaptoethanol (v/v)
- Heksadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB)

Fenol: Kloroform: İzooamil alkol:

25: 24: 1 oranlarında hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, 77617).

Kloroform: İzooamil alkol:

24: 1 oranlarında hazır olarak kullanılmıştır (Fluka, 25666).

TE tamponu:

- 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

%70'lik Etil Alkol:

- 70 ml etil alkol ile 30 ml steril distile su ile hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Ethidium bromür (Et-Br) çözeltisi:

500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmış ve ışık almayacak 25 C° sıcaklığındaki ortamda muhafaza edilmiştir.

Bromfenol blue çözeltisi:

0,25 g bromfenol mavisi ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavlanarak steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

0,5X TBE tamponu:

Bu çalışmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak hazırlanmış ve 50 ml 10X TBE tampon + 950 ml saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

10X TBE tamponu:

- 107 g Tris-Base
- 55 g Borik Asit
- 5,8 g EDTA
- 500 ml distile suda çözdürülerek daha sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlanmıştır. pH ise 8.0'e ayarlanmıştır.

Primerlerin hazırlanması

Seçilen primerlerin üretici firma tarafından önerildiği miktarlarda çözülerek stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar yapılarak çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

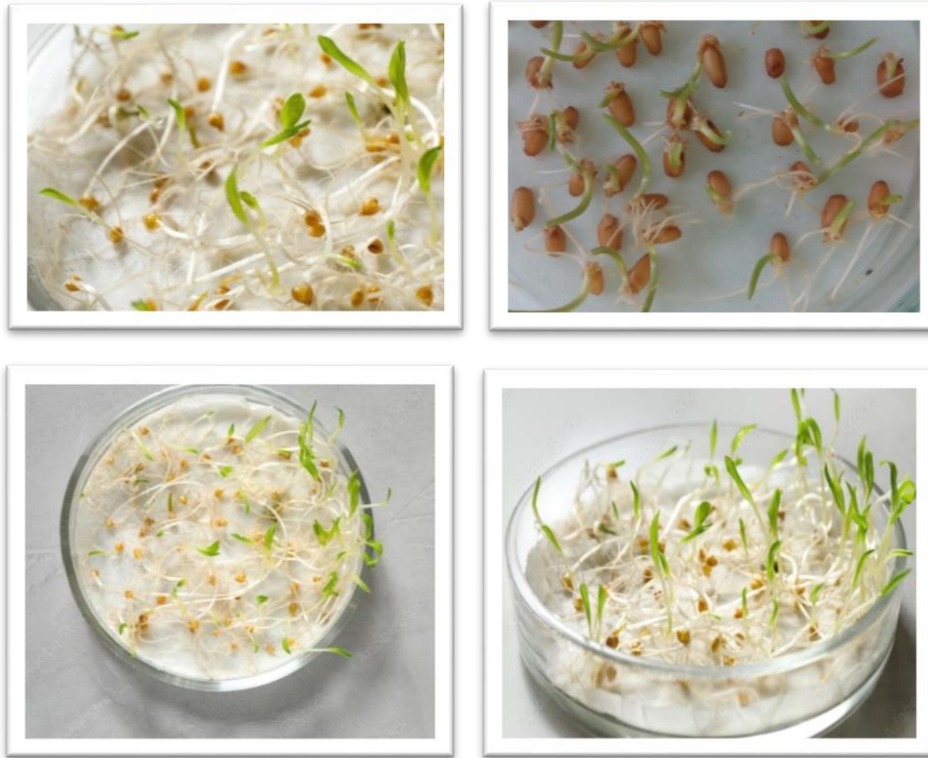
Deney bitkilerinin yetiştirilmesi ve Pb stresinin uygulanması

Triticum aestivum tohumları %0,5 sodyum hipoklorit (NaOCl)'de 5 dakika bekletilerek sterilize edildikten sonra birkaç tekrar distile su ile durulandırılmıştır. Çimlenmesi için 15 cm çaplı cam petri kaplarına iki kat steril whatman filtre kâğıdı konularak üzerine yerleştirilen tohumlar optimum şartlarda yeterince filizlendikten sonra (Şekil 9) toprak içeren saksılarda 2 tekerrür olacak şekilde ekimler yapıldı (Şekil 10). Ekim grupları şu şekilde belirlendi;

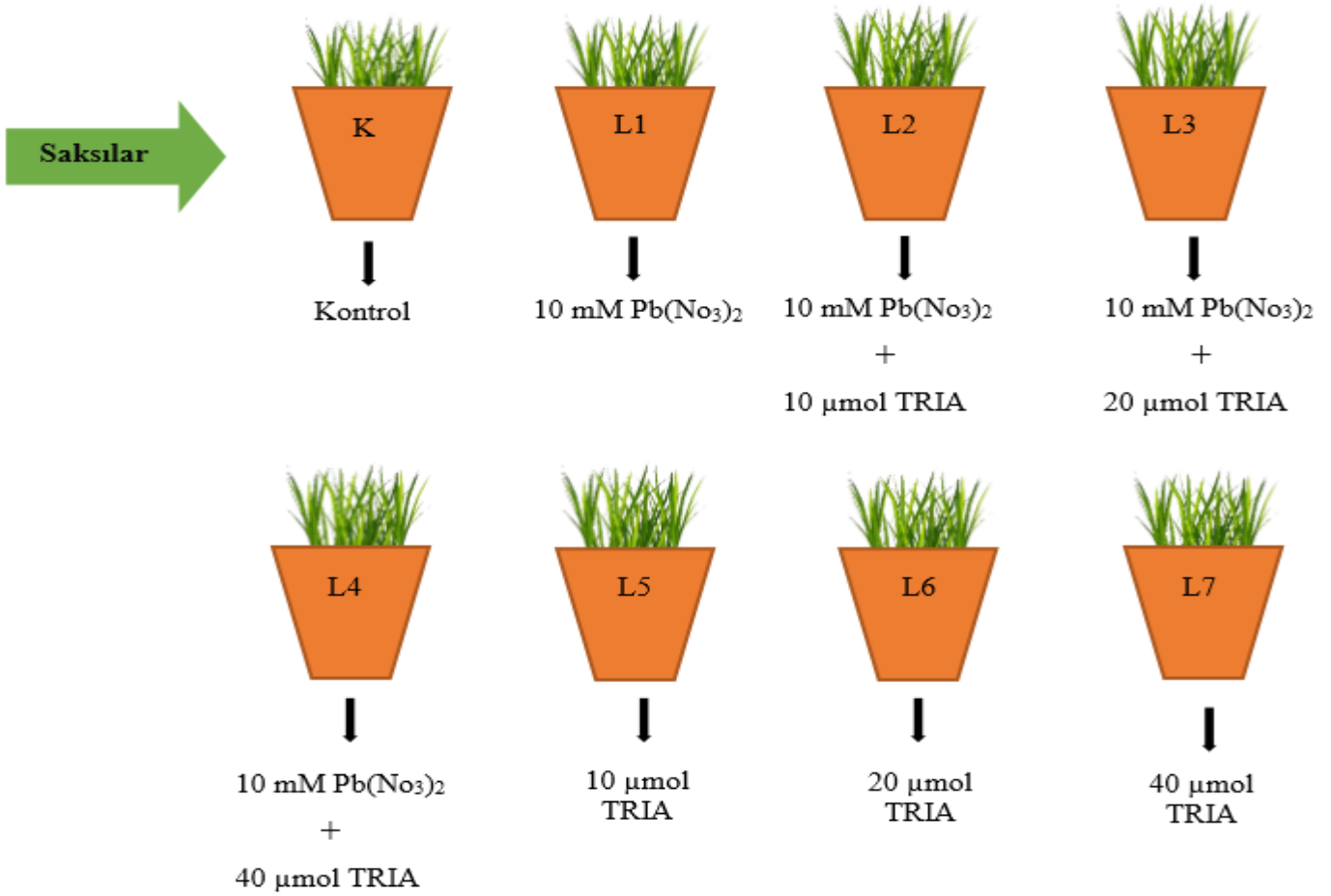
- Kontrol
- 10 mM Pb(NO₃)₂
- 10 mM Pb(NO₃)₂ +10 µmol TRIA
- 10 mM Pb(NO₃)₂ +20 µmol TRIA
- 10 mM Pb(NO₃)₂ +40 µmol TRIA
- 10 µmol TRIA
- 20 µmol TRIA
- 40 µmol TRIA

2 Tekerrür olacak şekilde toplamda 16 adet saksı ekim yapıldı.

Ekilen tohumlar 24 saatlik sirkadiyen döngüsünün 8 saat/16 saat olacak şekilde ayarlandı.



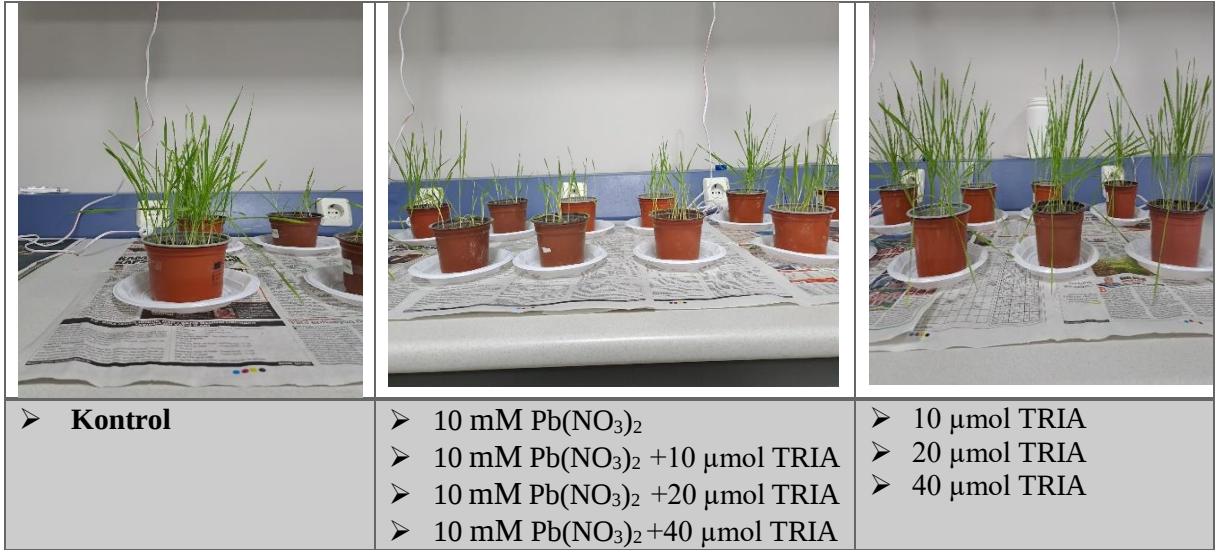
Şekil 9. Petri kabında *Triticum aestivum* tohumlarının filizlenmesi



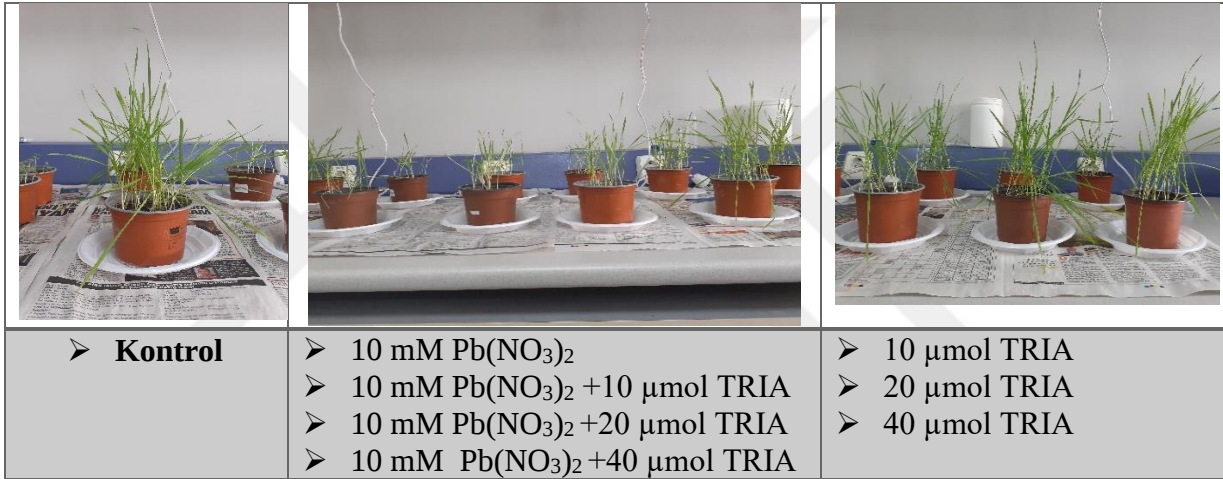
Şekil 10. Pb ve TRIA konsantrasyonlarının bitkilere uygulanma planı

Deney bitkilerine Kurşun ve TRIA uygulamaları

Öncelikle petrilerde çimlendirilen *Triticum aestivum* bitkisi daha sonra saksılara alınmıştır. Bir hafta sonunda Pb ağır metali uygulanmıştır. 10 gün sonra ise TRIA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Şekil 11 ve Şekil 12’de uygulama sonrasındaki ilk gün ve son gün görselleri belirtilmiştir. Hasat edileceği zaman bitkiler incelendiğinde Pb ve TRIA’nın birlikte uygulandığı bitkilerde büyümede yavaşlama ve yapraklarda sararmalar meydana gelmiştir. Fakat TRIA’nın tek uygulandığı bitkilerde daha yüksek büyüme ve yapraklarda sararmalarda azalmalar tespit edilmiştir.



Şekil 11. *Triticum aestivum* bitkilerine hem Pb hem de TRIA uygulandıktan sonra 1. Gün



Şekil 12. *Triticum aestivum* bitkilerine hem Pb hem de TRIA uygulandıktan sonra 7. Gün

Bitkilerin Hasat Edilmesi

Yetiştirilen bitkiler makas ile gövdenin toprağa temas eden kısmından 2 cm yukarıda olacak şekilde kesilerek üzerine isimleri ve dozları önceden yazılmış saklama poşetlerine konuldu. Daha sonra poşetler -20 °C de 30 dk bekletildikten sonra, kullanılmak üzere -80 °C konuldu.

DNA izolasyonu

Bitki materyalinden DNA izolasyonu

- -80 °C'ye konulan bitkiler izolasyon için Sıvı azot ile havanda ezilerek 2 ml'lik santrifüj tüplerine alınan 200 mg bitki örneği üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon buffer ve 100 µl PVP ve 20 µl Betamerkapto Etanol eklenerek ve alt üst edildikten sonra 60 °C'deki su banyosunda 10 dakika arayla hafifçe alt üst edilerek 60 dakika inkübe edildi.

- Bu işlemden sonra örnekler 15 dakika oda sıcaklığında dinlendirilir. Her bir örnek üzerine 750 µl Fenol: Kloroform: İzooamil alkol eklenip 30 dakika rototorda alt-üst edilerek karıştırılması sağlandı.
- Rötör işleminden sonra 14000 rpm ve 24 °C’de 20 dakika santrifüj edilen örnekler iki faza ayrıldı. Üst fazdan 600 µl ayarlanmış otomatik pipet ile yeni 2 ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldı (buz aküsü içindeki tüplere).
- 2 ml’lik santrifüj tüplerini üzerine 1000 µl Kloroform: İzooamil alkol eklenerek birkaç defa alt-üst edildikten sonra 14000 rpm ve 4 °C’de 20 dakikalık santrifüjden sonra üst fazdan son derece dikkatli bir şekilde 500 µl alınarak yeni bir 2 ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldı (buz aküsü içindeki tüplere).
- Aynı tüplere 2,5 µl RNase ile 8 µl Proteinaz K ekledikten sonra 45 dakika 37°C’ye ayarlanmış etüvde inkübe edildi.
- Bu süre sonunda tüplere sırasıyla 100 µl amonyum asetat, 100 µl sodyum asetat ve 800 µl soğuk izopropanol eklenerek tüpler birkaç defa alt-üst edildikten sonra 45 dk -20 °C bekletildi.
- Bu sürenin sonunda; 14000 rpm ve 4°C’de 10 dakika santrifüj edilir sonrasında dikkatli bir şekilde üst faz atıldı. Oluşan pellet etüv’de 37 °C’de 12 saat bekletilerek kurutulması sağlandı. Kurutulan DNA 100 µl TE buffer tamponunda çözdürüldü. Sonrasında -20 °C’de kullanılmak üzere saklandı.

Primerlerin belirlenmesi

RAPD ve CRED-RA analizi için 30 primer arasından en iyi ampifliye olan 15 adet primer seçilmiştir (**Tablo 3**).

Tablo 3. RAPD ve CRED-RA Analizinde Kullanılan Primerler ve Sekans Dizilimi

Primerlerin veri tabanındaki kodları	Baz içerikleri
OPB-13	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-2	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPE-13	5'-CACAGCGACA-3'
OPW-18	5'-TTCAGGGCAC-3'
OPA-4	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'
OPB-1	5'-GTTTCGCTCC-3'
OPH-16	5'-TCTCAGCTGG-3'
UBC450	5'-CGGAGAGCCC-3'
OPA-6	5'-CAGCACCCAC-3'
UBC519	5'-ACCGGACACT-3'
OPH-18	5'-GAATCGGCCA-3'
OPY-6	5'-AAGGCTCACC-3'
OPY-7	5'-AGAGCCGTCA-3'

RAPD-PCR analizi

PCR işlemine geçilmeden önce işlem yapılacak ortam hava akımını engellemek için pencereler kapatıldı. Deneylerde kullanılan laboratuvar ortamı %70'lik etanol ile steril hale getirildi.

PCR protokolü için şu basamaklar izlendi; 0,2 ml'lik santrifüj tüpüne,

- PCR Buffer 2,5 µl
- dNTP(10mM) 2,5 µl
- MgCl₂ (25mM) 2,5 µl
- Taq DNA polimeraz enzimi 0,125 µl
- DNA örneği (100ng/µl) 0,5 µl
- Primer 1 µl
- Distile saf su 16,375 µl

Total hacim 25,5 µl olan örnekler PCR otomatik sıcaklık döngüsü aletine yerleştirildi ve aşağıda belirtilen döngüye 38 defa tabi tutuldu.

- 1) 5 dakika boyunca 95° C
- 2) Aşağıda belirtilen sürelerde 38 döngüde belirtilen sıcaklıklar uygulandı
 - a. 1 dakika boyunca 94° C
 - b. 1 dakika boyunca 32° C
 - c. 2 dakika boyunca 72° C’de
- 3) Son olarak örnekler 15 dakika 72°C’de bekletildi. Daha sonra PCR aletinden çıkarılan örnekler kısa süreli kullanım için 4°C’de saklandı.

CRED-RA analizi

DNA’ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

DNA izolasyonu sonucunda izole edilen DNA, -80 °C’den çıkarılarak 1:1 oranında TE ile seyreltilmiştir. Daha sonra genomdaki metilasyon özelliklerinin gözlenmesi için MspI (Promega) ve HpaII (Thermo) restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.

DNA’nın MspI enzimi ile kesilmesi

Bu işlem için; 0,5ml’lik tüpe son hacmi 40 µl olacak şekilde

- 32,6 µl sterile su,
- 4 µl 10X Buffer,
- 0,4 µl BSA (10µg/µl),
- 2 µl DNA (1µg/µl),
- 1 µl Restriksiyon enzimi ilave edildi.

Enzim kesimi için, tüpler 37°C’deki etüvde 4 saat inkübe edildi. Enzim aktivitesini durdurmak için ise etüvde 65°C’de 15 dakika bırakılmıştır.

DNA’nın HpaII enzimi ile kesilmesi

Bu işlem için; 0,5ml’lik tüpe son hacmi 20 µl olacak şekilde

- 16 µl sterile su,
- 2 µl 10X Buffer,
- 1 µl DNA (1µg/µl),
- 1 µl Restriksiyon enzimi ilave edildi.

Enzimlerin kesimi gerçekleştirmesi için, tppler 37°C’deki etüvde 4 saat inkübe edildi. Enzimin aktivetisini durdurmak için tekrardan etüvde 65°C’de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Elde edilen ürünler kontrol etmek amacıyla 4l alınarak 1l 6X yükleme tamponuyla karıştırıldıktan sonra %1’lik agaroz jelde 70V’da yürütülmüştür. Jel görüntüleme sistemiyle incelenmiştir.

Agaroz jel elektroforezi

- %1 agaroz jel hazırlamak için 1 gram agaroz tartıldı ve 100 ml 0,5X TBE buffer içerisine aktarıldıktan sonra mikrodalga fırında 4 dk ısıtılarak çözünmesi sağlandı.
- Mikrodalga fırınından ıkarılan 0,5X TBE + Agaroz çözeltisine toplam konsantrasyonu 1 g/ml olacak miktarda Ethidium-Bromide eklenerek homojenize edildi.
- Hazırlanan jel polimerleşmeden dengelenmiş tanka dökülerek 30 dk polimerleşmesi için bekletildi.
- Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılıp jel elektroforez tankına düzgün bir şekilde yerleştikten sonra parafin kağıdına hazırlanmış her örnek için 3l bromfenol mavisini damlatılarak daha sonra 4 C saklanan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmek üzere çıkarılıp 7l PCR ürünü ve bromfenol mavisini ile al-ver yaparak karıştırılması sağlandıktan sonra ilk kuyucuktan yükleme yapmaya başlandı.
- 4C saklanan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmek üzere çıkarılıp 7l PCR ürünü ile 3l bromfenol mavisini ile karıştırılarak kuyucuklara yükleme yapılmıştır. Yükleme işlemi bittikten sonra enerji kaynağı 100 V ayarlanıp 60 dakika boyunca DNA’ların yürütülmesi sağlandı.
- Elektroforez işlemi bittikten sonra tanktan çıkarılan jel görüntüleme sisteminde incelenerek görüntüleri alınmıştır.

İstatiksel veri analizi

Elektroforez işleminden sonra alınan jel görüntülerinde TotalLab TL120 programı ile bp cinsinden bantların değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme bir markıra karşı kontrol dozu ile diğer uygulama dozlarının kıyaslanması ile gerçekleştirilmiştir. Yeni oluşan bantlar veya kaybolan bantların belirlenmesi sonucunda polimorfik bantlar elde edilmiştir.

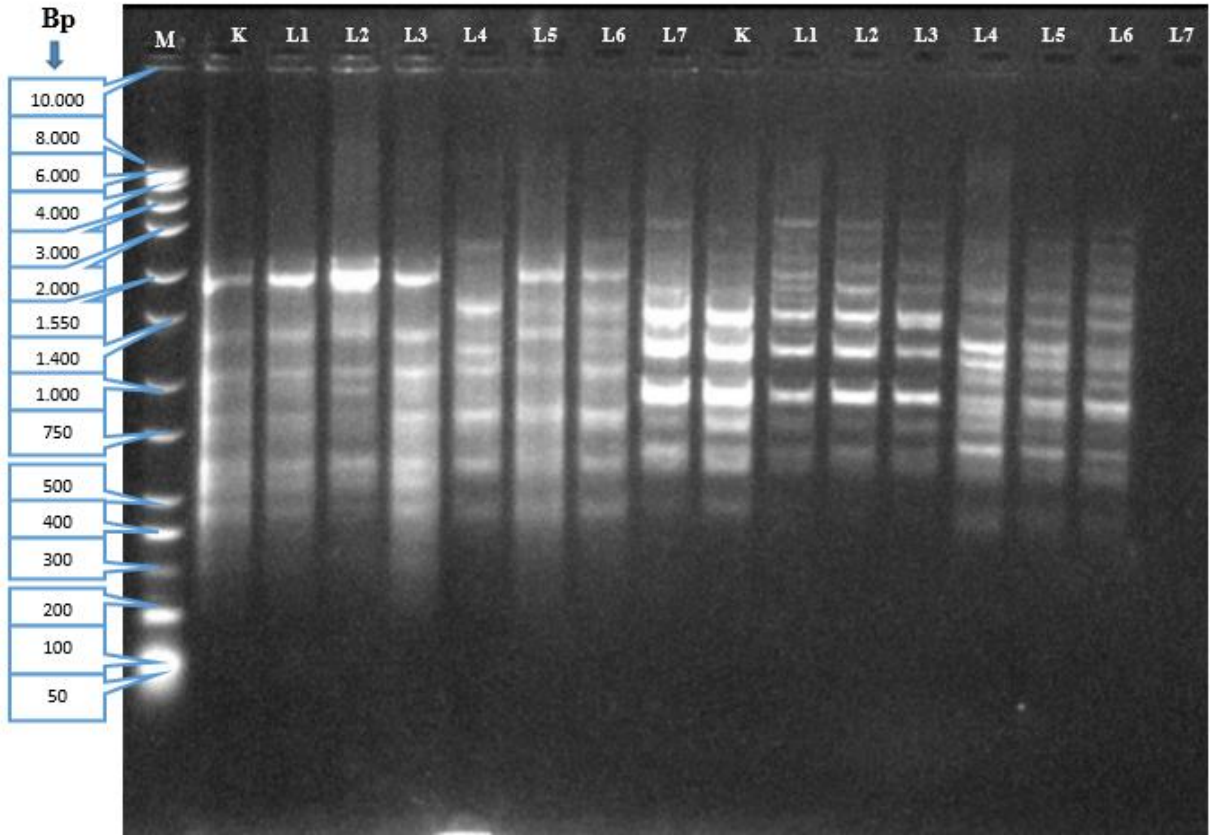
GTS (Genomic Template Stability-Genomik Kalıp Sabitliliği) oranı; $1-(a/n) \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır. Bu formülde yer alan a; her bir örnekteki polimorfik bant sayısını temsil ederken, n; her bir örnekteki toplam bant sayısını göstermektedir. % Polimorfizm oranı ise; $(a/n) \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır (Mohamed *et al.* 2017).



ARAŞTIRMA BULGULARI

RAPD analizi

Yapılan RAPD analizinde 15 RAPD primeri kullanılmıştır. RAPD analizi sonucunda uygulanan agaroz jel görüntüleri alınmış ve TotalLab L120 programında değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda, polimorfik bantların baz uzunlukları Tablo 4’te verilmiştir. Bu verilere göre, polimorfik bantların uzunlukları 10.000 ila 174 arasında değişmektedir. Ayrıca toplamda 241 polimorfik bant meydana gelmiştir. En fazla polimorfik bant 20 μ mol TRIA dozunda meydana gelirken en az 10 mM $Pb(NO_3)_2$ +40 μ mol TRIA dozunda meydana gelmiştir.



M, markır, Bp, baz çifti, K, kontrol, L1, 10 mM $Pb(NO_3)_2$; L2, 10 mM $Pb(NO_3)_2$ +10 μ mol TRIA; L3, 10 mM $Pb(NO_3)_2$ +20 μ mol TRIA; L4, 10 mM $Pb(NO_3)_2$ +40 μ mol TRIA; L5, 10 μ mol TRIA; L6, 20 μ mol TRIA; L7, 40 μ mol TRIA

Şekil 13. RAPD analizinde kullanılan OPY-6 ve OPA-6 primerlerinin jel görüntüsü

Polimorfik bantlar ve toplam bantlar göz önüne alınarak GTS değeri belirlenmiş ve Tablo 4’te verilmiştir. Primerler göz önünde bulundurulduğunda en yüksek GTS oranı OPB-13 primerinde gözlenmiştir.

En düşük GTS oranı ise OPA-18 ve OPW-18 primerlerinde belirlenmiştir. Ayrıca, toplam GTS oranlarına göre en yüksek GTS oranı 10 mM $Pb(NO_3)_2$ +20 μ mol TRIA

konsantrasyonunda belirlenirken en düşük GTS oranı 40 µmol TRIA konsantrasyonunda görülmüştür. Sadece TRIA uygulanan dozlarda en yüksek GTS oranı 20 µmol TRIA dozu olmuştur. Aynı şekilde, kurşun ve TRIA'nın birlikte uygulandığı dozlarda 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA konsantrasyonunda en yüksek GTS oranı belirlenmiştir. TRIA'nın tek başına uygulandığı dozlardaki GTS oranları 10 mM Pb(NO₃)₂ dozundaki GTS oranına göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Fakat kurşun ile birlikte uygulanan TRIA dozlarında 10 mM Pb(NO₃)₂ konsantrasyonuna göre her üç dozda da çok daha yüksek GTS oranı tespit edilmiştir.



Tablo 4. RAPD Analizi Sonucunda Belirlenen Polimorfik Bantların Uzunlukları ve GTS Oranları

Primer	Pb		Pb+TRIA konsantrasyonları			TRIA Konsantrasyonları		
	Kontrol	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
OPA-2	7	-504,	+391	+404	+1455	+408, +283 -504	-504	-504
OPB-13	3	-953,+1907	-953, +2000 +1403	-953	+850	+174	-	-953
OPA-18	7	+1200,-700	+1600	+1600+306-700, -600 -504	+300,-504,-600	+10,000,+326 -700	-700, -504, -600, -972, - 1131, -1300	-1450,-700 -1131,-600
OPA-20	4	+1510 +939	+1510, +939	+1510	+1510, +1450 +924	+1510,+962	+1510,+931	+1510, +954
OPB-1	3	+1348, +831+722	+1653,+1357 +1126,+838	+1357 +831,+716	+1340, +817 +716	+1700, +1348 +824,+716	+1633,+1331 +992,+838	+1633, +1357 +831
UBC450	6	+1501, -570, -408	-1414, -1107,	+1136	+1918, +1556, +1384,	+981, -408	+1557,+1377 +963, -408	+1588, +1392 -408
UBC519	7	+1557 +122, +981 +303	+1518, +1260,	+1543 +1187 +296	+1505, -408	+1465, -408	+990	+912
OPW-13	6	+1294	+526,+354	+500, +338	+508, +341	+1947, -750, -633	+1240, +540	+522, +338
OPW-18	6	-1312, +100, +513 +338	-927,+500 +334	+500,+328 -927	+640, +500 +331, -927	-1530, -1312, -927 +504,+328	+500, +325	-927,+526 +318
OPA-4	8	-576,-334	-857, -730	-730	-730	+9531, +1141 +935, +813 +717	+9531, +1150 +904	-9656, -8765 -967
OPH-16	8	-576,-334,	-768	-	-	-1588,+1387,	-1588,+1388	+1588,+1382 +1141
OPA-6	10	-10,000 +2622,-473	+2236, -473	+2365 -10,000	+1131,+888	-10,000, -919, -473	+2112, +873 -473	-10,000, -792 -473
OPH-18	14	-368	+2026	-	-445,-218	-476,-303	-476,-368,-226	-731, -226
OPY-6	8	+567, -335	+1008, -335	+556, -335	-335	-10,058, -335	+10,058 +1721, -335	+2431, +1400 +927, -335
OPY-7	12	-1535 +1162	+2287, +1789 +1171	-	-448,-349	-1535	+10,000, +2478 -960, - 770, -519 -448, -349	+1477, -960 -349
Toplam polimorfik bant sayısı	109	34	31	25	30	40	43	38

L1,10 mM Pb(NO₃)₂; L2, 10 mM Pb(NO₃)₂+10 µmol TRIA; L3, 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA; L4, 10 mM Pb(NO₃)₂+40 µmol TRIA; L5, 10 µmol TRIA; L6, 20 µmol TRIA; L7, 40 µmol TRIA

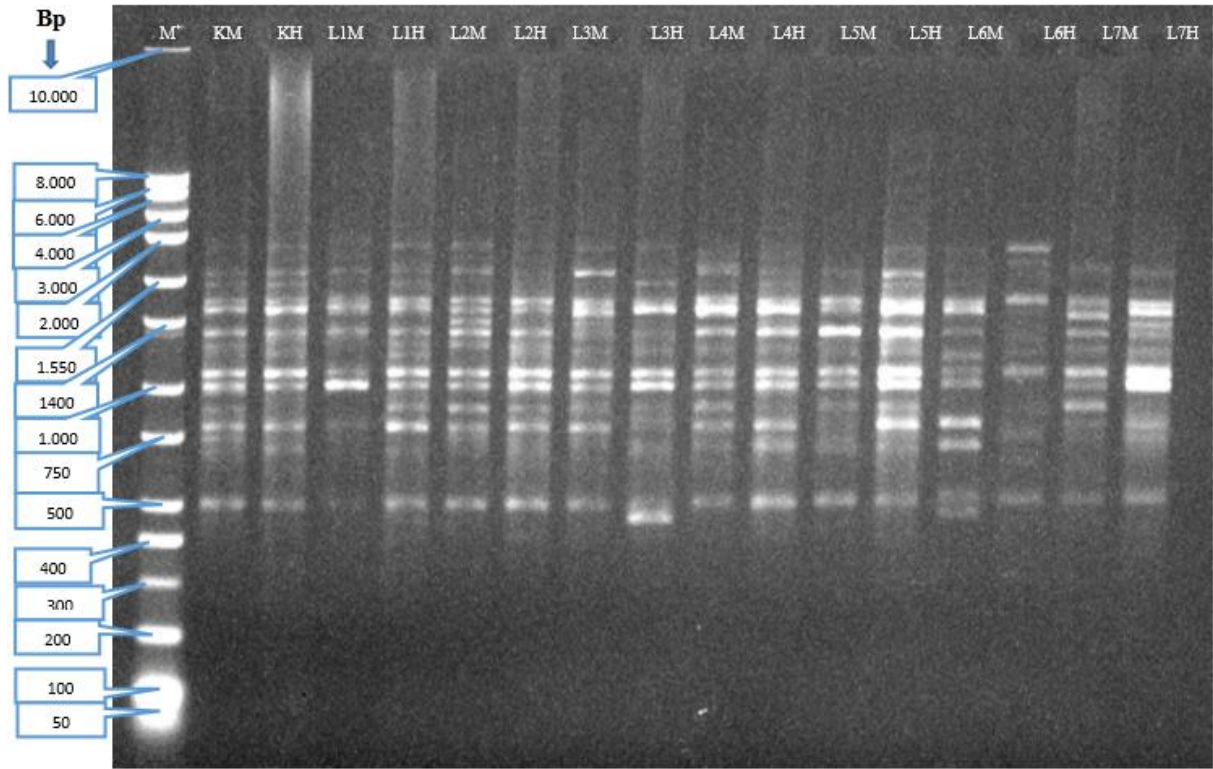
Tablo 5. Kurşun ve TRIA Uygulamalarına Göre Belirlenen GTS Oranları

Primerler	Kurşun	Kurşun+TRIA Konsantrasyonları				TRIA Konsantrasyonları	
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
OPA-2	83,4	87,5	87,5	87,5	62,5	83,3	83,3
OPB-13	33,4	25	50	75	75	100	50
OPA-18	71,5	87,5	14,2	50	62,5	0	0
OPA-20	66,7	66,6	80	57,1	66,6	66,6	66,6
OPB-1	50	42,8	50	50	42,8	42,8	50
UBC450	40	50	85,7	66,6	66,6	50	57,1
UBC519	63,7	77,7	70	71,4	71,4	87,5	87,5
OPW-13	85,7	75	75	75	40	75	75
OPW-18	50	57,1	57,1	50	0	75	57,1
OPA-4	66,6	66,6	85,7	85,7	61,5	72,7	40
OPH-16	66,6	85,7	100	100	75	75	72,7
OPA-6	66,6	80	80	83,3	57,1	72,7	57,1
OPH-18	92,3	93,3	100	83,3	83,3	72,7	83,3
OPY-6	75	75	75	85,7	66,6	66,6	60
OPY-7	83,3	80	100	80	90,9	22,2	72,7
Polimorfizm oranı	33,7	30	26	26,7	38,6	35,9	39,2
GTS değeri	66,3	70	74	73,3	61,4	64,1	60,8

L1, 10 mM Pb(NO₃)₂; L2, 10 mM Pb(NO₃)₂+10 µmol TRIA; L3, 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA; L4, 10 mM Pb(NO₃)₂+40 µmol TRIA; L5, 10 µmol TRIA; L6, 20 µmol TRIA; L7, 40 µmol TRIA

CRED-RA analizi

Gerçekleştirilen CRED-RA analizinde 15 RAPD primeri kullanılmıştır. Bu analizin sonuçları uygulanan agaroz jel görüntüleri ile elde edilmiş ve TotalLab 120 programında değerlendirilmiştir. Bu analiz ile *Msp I* ve *Hpa II* restriksiyon enzimleriyle DNA fragmentleri kesilmiştir. Her bir primein meydana getirdiği amplikasyonlar belirlenerek % polimorfizm oranları belirlenmiştir.



Şekil 14. CRED-RA analizinde kullanılan OPB-1 primerinin jel görüntüsü

Bp, baz çifti; **M***, markır; **M**, *Msp I* restriksiyon enzimi; **H**, *Hpa II* restriksiyon enzimi; **KM**, kontrol *Msp I* restriksiyon enzimi; **KH**, kontrol *Hpa II* restriksiyon enzimi; **L1**, 10 mM Pb(NO₃)₂; **L2**, 10 mM Pb(NO₃)₂+10 µmol TRIA; **L3**, 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA; **L4**, 10 mM Pb(NO₃)₂+40 µmol TRIA; **L5**, 10 µmol TRIA; **L6**, 20 µmol TRIA; **L7**, 40 µmol TRIA

Tablo 6’da CRED-RA analizi sonucunda meydana gelen toplam bant sayıları verilmiştir. Buna göre, en yüksek bant sayısını OPH-18 primeri verirken, en az bant sayısı OPW-13 primerinden elde edilmiştir.

Tablo 6. CRED-RA Analizi Sonucunda Oluşan Toplam Bant Sayıları

Primerler	Kontrol		L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7	
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
OPA-2	10	10	11	8	11	9	7	7	6	9	7	7	9	8	7	10
OPB-13	10	8	9	9	9	11	10	8	7	11	9	7	9	7	8	10
OPA-18	6	7	6	7	5	7	4	4	4	4	6	4	6	5	5	3
OPA-20	6	9	7	10	7	8	7	5	7	7	7	8	6	7	7	6
OPB-1	14	12	10	14	12	11	12	13	12	12	10	13	13	12	11	11
UBC450	8	9	7	7	7	8	9	8	6	7	6	8	5	8	5	6
UBC519	9	7	6	8	5	6	7	9	8	7	9	12	6	4	8	6
OPW-13	3	5	4	4	4	7	6	4	5	5	5	8	3	5	4	3
OPW-18	10	9	12	11	12	10	11	11	11	9	8	9	11	8	11	12
OPA-4	12	11	7	10	16	12	15	12	13	12	17	16	6	7	9	9
OPH-16	16	13	14	13	13	14	14	13	14	14	13	14	12	15	18	16

Tablo 6. (devamı)

OPA-6	9	8	7	9	10	12	9	10	9	9	9	12	12	9	5	5
OPH-18	15	16	11	12	14	13	16	16	12	14	15	17	12	12	12	12
OPY-6	10	12	14	10	11	10	11	11	10	12	11	11	11	11	13	11
OPY-7	11	10	13	11	11	11	14	12	9	9	13	10	13	9	13	9
Ortalama	9,9	9,7	9,2	9,5	9,8	9,9	10,1	9,5	8,8	9,4	9,6	10,4	8,9	8,4	9	8,6

M, *Msp I* restriksiyon enzimi; **H**, *Hpa II* restriksiyon enzimi; **L1**, 10 µmol Pb(NO₃)₂; **L2**, 10 mM Pb(NO₃)₂ + 10 µmol TRIA; **L3**, 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA; **L4**, 10 mM Pb(NO₃)₂ + 40 µmol TRIA; **L5**, 10 µmol TRIA; **L6**, 20 µmol TRIA; **L7**, 40 µmol TRIA

CRED-RA analizi sonucunda toplam polimorfik bant sayıları belirlenmiştir (Tablo 7). Bu veriler ışığında, en fazla polimorfik bant sayısı OPA-4'te gerçekleşmiştir.

Tablo 7. CRED-RA Analizi Sonucunda Oluşan Toplam Polimorfik Bant Sayıları

Primerler	Kontrol		L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7	
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
OPA-2	10	10	1	2	1	1	3	3	4	1	3	3	1	2	3	0
OPB-13	10	8	1	1	1	3	0	0	3	3	1	1	1	1	2	2
OPA-18	6	7	0	0	1	0	2	3	2	3	0	3	0	2	1	4
OPA-20	6	9	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	0	2	1	3
OPB-1	14	12	4	2	2	1	2	1	2	0	4	1	1	0	3	1
UBC450	8	9	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	3	1	3	3
UBC519	9	7	3	1	4	1	2	2	1	0	0	5	3	3	1	1
OPW-13	3	5	1	1	1	2	3	1	2	0	2	3	0	0	1	2
OPW-18	10	9	2	2	2	1	1	2	1	0	2	0	1	1	1	3
OPA-4	12	11	6	1	4	1	3	1	1	1	5	5	6	4	3	2
OPH-16	16	13	2	0	3	1	2	1	2	1	3	1	4	2	2	3
OPA-6	9	8	2	1	1	2	0	2	0	1	0	4	3	1	4	3
OPH-18	15	16	4	4	1	3	1	0	3	2	0	1	3	4	3	4
OPY-6	10	12	4	2	1	2	1	1	0	0	1	1	1	1	3	1
OPY-7	11	10	2	1	0	1	3	2	2	1	2	0	2	1	2	1
Ortalama			2,2	1,4	1,6	1,4	1,6	1,6	1,7	1,1	1,7	2	1,9	1,6	2,2	2,2

M, *Msp I* restriksiyon enzimi; **H**, *Hpa II* restriksiyon enzimi; **L1**, 10 mM Pb(NO₃)₂; **L2**, 10 mM Pb(NO₃)₂+10 µmol TRIA; **L3**, 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA; **L4**, 10 mM Pb(NO₃)₂+40 µmol TRIA; **L5**, 10 µmol TRIA; **L6**, 20 µmol TRIA; **L7**, 40 µmol TRIA

Tüm konsantrasyonlarda toplam bant sayıları ve polimorfik bant sayıları ele alınarak % polimorfizm hesaplanmıştır (Tablo 8). Bu verilere göre, *Msp I* enziminde en yüksek polimorfizm oranı 40 µmol TRIA konsantrasyonunda % 27.2 olarak belirlenmiştir. En düşük

polimorfizm oranı ise 10 μmol TRIA konsantrasyonunda %16.8 olarak tespit edilmiştir. Yalnızca $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ uygulanan dozda polimorfizm oranı %24.9 iken, 10 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ +10 μmol TRIA, 10 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ +20 μmol TRIA ve 10 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ +40 μmol TRIA dozlarında polimorfizm oranı sırasıyla %18.6, %19.5 ve %23.6 şeklinde belirlenmiştir. 10 μmol TRIA, 20 μmol TRIA ve 40 μmol TRIA konsantrasyonlarında ise sırasıyla %16.8, %24.3 ve %27.2 olarak gözlenmiştir.



Tablo 8. CRED-RA Analizi Sonucunda Belirlenen % Polimorfizm Değerleri

Primerler	L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7	
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
OPA-2	9,0	25	9	11,1	42,8	42,8	66,6	11,1	42,8	42,8	11,1	25	42,8	0
OPB-13	11,1	11,1	11,1	27,2	0	0	42,8	27,2	11,1	14,2	11,1	14,2	25	20
OPA-18	0	0	20	0	50	75	50	75	0	75	0	40	10	100
OPA-20	14,2	10	14,2	12,5	14,2	80	14,2	28,5	14,2	12,5	0	28,5	14,2	50
OPB-1	40	14,2	16,6	9	16,6	7,6	16,6	0	40	7,6	7,6	0	27,2	9
UBC450	14,2	28,5	14,2	12,5	11,1	12,5	33,3	28,5	33,3	12,5	60	12,5	60	20
UBC519	50	12,5	80	16,6	28,5	22,2	12,5	0	0	41,6	50	75	12,5	16,6
OPW-13	25	25	25	28,5	50	25	40	0	10	37,5	0	0	25	66,6
OPW-18	16,6	18,1	16,6	10	9	9	9	0	25	0	9	12,5	9	25
OPA-4	71,4	10	25	8,3	20	8,3	7,6	8,3	29,4	31,2	100	57,1	33,3	22,2
OPH-16	14,2	0	23	7,1	14,2	0	14,2	7,1	23	7,1	33,3	13,3	11,1	18,7
OPA-6	28,5	11,1	10	33,3	0	20	0	11,1	0	33,3	25	11,1	80	60
OPH-18	36,3	33,3	7,1	23	6,2	0	25	14,2	0	5,8	33,3	33,3	20	33,3
OPY-6	28,5	20	9	20	9	9	0	0	9	9	9	9	23	9
OPY-7	15,3	9	0	9	21,4	16,6	22,2	11,1	15,3	0	15,3	11,1	15,3	11,1
%	24,9	15,1	18,6	15,2	19,5	21,8	23,6	14,8	16,8	22	24,3	22,8	27,2	30,7
polimorfizm														

M, *Msp I* restriksiyon enzimi; H, *Hpa II* restriksiyon enzimi; L1, 10 mM Pb(NO₃)₂; L2, 10 mM Pb(NO₃)₂+10 µmol TRIA; L3, 10 mM Pb(NO₃)₂+20 µmol TRIA; L4, 10 mM Pb(NO₃)₂+40 µmol TRIA; L5, 10 µmol TRIA; L6, 20 µmol TRIA; L7, 40 µmol TRIA

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Nüfusun artışı ve gelişen teknoloji ile birlikte ağır metaller doğada kontrolsüzce artmaya devam etmektedir. Bu ağır metallerden biri olan Pb, antik çağlardan bu yana kullanılmakta ve güçlü bir çevre kirleticisi olarak bilinmektedir. Günümüzde tarım ve endüstriyel faaliyetlerin artışının bir sonucu olarak yaygın bir şekilde çevreye dağılmaktadır. Çevredeki Pb kirliliği, Pb kullanan fabrikaların bacaları, akümülatörden çıkan atık sular, sanayi, Pb içeren boyalar, Pb cevherlerinin madenciliği ve eritilmesi, metal kaplama ve eritme işlemleri, gübreler, pestisitler ve pigmentlerdeki katkı maddeleri, benzinin oktan sayısını arttırmak için benzine tetraetil ve tetrametil Pb eklemesi gibi etkinlikler çevre kirliliğini artırmaktadır. Pb'den etkilenen topraklar 400-800 mg kg⁻¹ aralığında Pb içerirken, sanayileşmiş bölgelerde bu düzey 1000 mg kg⁻¹ olarak rapor edilmiştir. Birçok ülkede çevreye kurşun girişini sınırlamak için kabul edilen düzenleyici önlemlere rağmen kurşunlu kirleticilerin çoğu modern insan yaşamı için vazgeçilmezdir. Bu nedenle, toprağın kurşunla kirlenmesini önlemek yakın gelecekte de pek mümkün görünmemektedir (Yang et al, 1999).

Samardakiewicz and Wozny, (2005) ördek otu (*Lemna minör L.*) bitkilerine bir saat boyunca Pb ile muamele ettiklerinde, bitkinin hücrelerindeki boşluklarda Pb biriktiğini gözlemlemiş, 6 ve 12 saatlik Pb uygulamasından sonra ise hücre duvarlarındaki Pb içeriği giderek arttığı, tespit edilmiştir. Bu durum Pb vakuoller ve hücre duvarları arasında Pb lokalizasyon hareketinden kaynaklandığını ve artan apoplastik taşımayı yansıtmaktadır. *Lemna minör*'deki küçük keseciklerde Pb varlığı, bu bitkilerde Pb alımında endositozun önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Pb küçük miktarlarda bile hücre içine girdiğinde fizyolojik süreçler üzerinde çok çeşitli olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Pb fitotoksitesitesi, enzim aktivitelerinin inhibisyonuna, mineral beslenmesinin bozulmasına, su dengesizliğine, hormonal durumda değişikliğe ve membran geçirgenliğinde değişikliğe yol açmaktadır. Bu bozuklukların bitkinin normal fizyolojik aktivitelerini bozduğu ve yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne dahi neden olduğu belirlenmiştir (Seregin and Ivanov, 2001). Pb; çimlenme yüzdesini, çimlenme indeksini, kök/sürgün uzunluğunu, tolerans indeksini ve kök ve sürgünlerin kuru kütlesini azaltmaktadır (Verma ve Dubey, 2003). Kayis ve Emre (2012) yaptıkları çalışmada ise, ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) Al, Cd, Cu, Ni, Pb ve Zn ağır metalleri bitkiye uygulanmış ve Pb'nin en yüksek fitotoksitesiteyi gösterdiği belirlenmiştir. Pb ağır metali hücrede protein

denatürasyonuna, fotosentez aktivitesi değişikliğine, tilakoid membranların lipid bileşiminde değişikliklere ve membran geçirgenlik değişimine neden olmaktadır.

Çalışmamızda Pb ağır metal stresine karşı TRIA'nın etkileri RAPD analizi ile araştırılmıştır. Bu veriler ışığında, sadece Pb uygulanan dozunda GTS değeri, Pb ve TRIA'nın birlikte uygulandığı dozlardaki GTS değerinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca TRIA'nın artan dozlarına bağlı olarak GTS oranlarının arttığı görülmüştür. Saleh *et al.* (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da Pb, Cd ve Ni ağır metallerine maruz bırakılan *Triticum aestivum* L. tohumlarında RAPD analizi kullanılmıştır ve yüksek Pb ve Cd dozlarında yüksek derecede polimorfizm ve düşük oranlarda GTS değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca, Pb'nin Cd ve Ni'den daha fazla genotoksik ve fitotoksik etkilere neden olduğu bulunmuştur (Saleh *et al.* 2020). Navabpour *et al.* (2020) tarafından üç farklı buğday çeşidi (*Morvarid*, *Gonbad* ve *Tirgan*) farklı Pb konsantrasyonlarında yetiştirilmiş ve antioksidan analizleri ile RAPD tekniği gerçekleştirilmiştir. Antioksidan analizlerde Pb konsantrasyonunun artışına bağlı olarak savunma sistemi ve antioksidan aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca RAPD analizleri sonucunda DNA'da mutasyonların oluşmasına neden olduğu saptanmıştır. Genomdaki onarılamayan bu mutasyonlar genomun işleyişinde düzensizliklere neden olurken bitki yaşamı üzerinde ise hem genel hem de spesifik olumsuzluklara neden olduğu, hatta bazen bu durumun bitkinin ölümü ile sonuçlandığı saptanmıştır (Navabpour *et al.* 2020).

Gerçekleştirilen CRED-RA analizinde ise tüm genom üzerinde meydana gelen metilasyon oranları tespit edilmeye çalışılmıştır. Sadece Pb uygulanan dozda metilasyon oranının en yüksek ikinci doz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu oran Pb ile TRIA'nın birlikte uygulandığı dozlara kıyasla çok daha yüksektir. Sadece TRIA'nın 40 µmol dozuna göre önemli olmayan bir düşüş gözlenmiştir. Dozlara göre bakıldığında ise, hem Pb ile birlikte uygulanan TRIA dozlarının hem de sadece TRIA uygulanan dozların artışıyla metilasyon oranlarının arttığı görülmüştür. Bu durumun TRIA'nın özellikle 40 µmol dozunun metilasyona neden olabildiği kanıtlanmıştır. 40 µmol TRIA dozunun hem en yüksek metilasyon oranına sahip olması hem de en düşük GTS oranı göstermesi bu dozun bitkilerde stres mekanizmalarını teşvik ettiği ve hücrelerde toksik etkiye sebep olabildiği olarak yorumlanmıştır.

Ayçiçeği bitkisinde Cu ağır metal stresinin meydana getirdiği genetik ve epigenetik değişimler 7 farklı doz uygulanarak incelenmiştir. RAPD ve CRED-RA analizleri sonucunda en yüksek doz oranı 20 mg/L dozda saptanırken en düşük 320 mg/L dozunda belirlenmiştir. Dahası, metilasyon oranları kıyaslandığında en yüksek 20 mg/L konsantrasyonunda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Ağır metal uygulamasının en düşük dozunda hem metilasyon oranının hem de polimorfizm oranının en yüksek olduğunu göstermiştir

(Bolukbasi, 2022). Arpa bitkisine tetrakonazol fungusitinin 4 farklı konsantrasyonu uygulanmıştır. Bu uygulama sonrasında RAPD ve CRED-RA analizleri gerçekleştirilmiştir. Arpa bitkisinde 0, 50, 100, 200 µg/mL dozlarında tetrakonazol uygulanmıştır. GTS oranlarında ve metilasyon oranlarında önemli bir değişim meydana gelmemiştir. Böylece, tetrakonazol fungusitinin DNA değişimlerine neden olmadığı kanaatine varılmıştır (Dülger ve Yörük 2022). Harshitha and Nair (2020) bitkide yerleşik mikroorganizmaların bir alt kümesini temsil eden endofitlerden (prednizonun) bitkiler için biyoyararını ve genomdaki metilasyon oranlarında yaptığı değişiklikleri saptamak için CpG tanıma sekansına sahip *Hpa II* ve *Hae II* restriksiyon enzimleri ile beraber CRED-RA ve RAPD tekniğini kullanarak DNA'nın metilasyon oranlarını belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre prednizonun genomun tam metilasyonunu inhibe ederken yarı metilasyon modelini indüklemeye etkili olduğu belirtilmiştir.

Günümüzde Pb'nin tahıl büyümesi, biyokütle artışı ve verim üzerindeki olumsuz etkilerini bertaraf etmek için birçok yaklaşım bulunmaktadır (Okcu *et al.* 2009). Örneğin; abiyotik stresin bulunduğu ortamlarda bazı stres iyileştirici hormonlar ile tohumların hazırlanması, büyümeyi, gelişmeyi ve tohumlardaki çıkış sayısını artırmaktadır. Bu tekniğin bitki büyümesinin erken aşamalarında uygulandığında bitkilerde Pb toksisitesini azalttığı ve böylece biyogüvenli bitkilerin geliştirilmesinin sağlandığı ifade edilmiştir (Ali and Perveen, 2020). Tohum hazırlanması abiyotik stresin bulunduğu ortamlarda tohumların çimlenme yüzdesini, çimlenme tekdüzeliğini, büyümeyi ve gelişmeyi artırmaktadır (Rademacher, 2015). Ekim öncesi tohuma yapılan uygulamalar besin mevcudiyetini, çeşitli enzimlerin aktivasyonunu, hücrel hasarların onarımı ve tohumların çimlenmesi için gerçekleşmesi gereken biyokimyasal süreçlerin başlatılması için kolay bir yöntem olarak bilinmektedir (Sarkar *et al.* 2020). Yapılan birçok çalışma tohum hazırlama işleminin stres koşulları altında bitki büyümesini kalitesini ve verimini artırmak için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir (Alp and Kabay 2017; Küpper, 2017; Navabpour *et al.* 2020).

Şimdiye kadar tahıl bitkilerinde incelenen çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri arasında, yeni bir bitki büyüme düzenleyicisi sınıfı olan TRIA, bitki büyümesini ve tahıl verimliliğini artırmadaki rolü nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir. TRIA hakkındaki mevcut bilgiler, bitkilerdeki çeşitli fizyolojik, biyokimyasal süreçlerin düzenlenmesinde ve değiştirilmesinde potansiyel işlevlere sahip olduğunu göstermektedir (Ali *et al.* 2021). TRIA bitkideki epikütikül mumu, bitki büyümesi, gelişmesi ve korunması gibi çeşitli şekillerde önemli işlevleri olan doğal bir hormondur (Pang *et al.* 2020). Genellikle meyve üretimini arttırmak için kullanılan ve meyvelerin epikütiküler mumlarında bulunan TRIA, en çok *Croton californicus* (kraton kalifornia), *Copernicia cerifera* (karnauba) ve *Jatropha curcas* dahil olmak üzere çeşitli bitki

türlerinin epikütikuler mumlarında bulunmaktadır (Islam and Mohammad, 2020). TRIA bitkiye eksojen olarak uygulandığında bitkinin biyokütlesi, su içeriği, besin alımı, pigmentlerin oranı, fotosentez aktivitesi ve terleme oranında önemli değişimler gözlemlenmiştir. TRIA ile eksojen olarak muamele edilen fidelerin daha yüksek oranda karbondioksit ve su emilim kabiliyetinin arttığı, yüksek karbonik anhidraz aktivitesine sahip olduğu, nitrat redüktaz aktivitesinin arttığı, bitkilerdeki çözünür şeker ve protein içeriğinin arttığı bulunmuştur (Sharma *et al.* 2018). Bu önemli bitki büyüme düzenleyicisi, ekstrem çevre koşulları altındaki (Soğuk, kuraklık, tuzluluk ve ağır metaller) streslere karşı kök ve sürgün büyümesini, klorofil biyosentezini, fotosentez hızını, osmolit üretimini ve antioksidan potansiyelini iyileştirerek fidelerdeki olumsuz etkileri azaltmaktadır (Karam *et al.* 2017; Perveen *et al.* 2017). Bu nedenle, çalışmamızda Pb stresinin olumsuz etkilerine karşı TRIA uygulanmıştır.

Çalışmamızda TRIA konsantrasyonları hem tek başına hem de Pb ile birlikte buğday bitkilerine uygulanmıştır. Yapılan RAPD analizi sonucunda TRIA'nın Pb ile birlikte kullanıldığı dozlarda GTS oranını önemli bir şekilde artırdığı belirlenmiştir. Özellikle TRIA'nın konsantrasyonlarının artışı ile GTS oranı da artmıştır. Fakat, TRIA'nın tek başına uygulanan dozlarında GTS oranında önemli bir düşüşün yaşandığı, hatta sadece Pb uygulamasına kıyasla daha düşük GTS oranları belirlenmiştir. Bu durumun, TRIA konsantrasyonlarının stres karşısında koruyucu bir etki gösterirken yalnız uygulandığında genotoksik etki gösterebileceği ifade edilmektedir.

Sarwar *et al.* (2017) tarafından tuz stresine maruz kalmış salatalık (*Cucumis sativus*) bitkisi tohumlarında yapılan çalışmada tohumlar ekimden önce 12 saat boyunca TRIA çözeltisinde bekletilmiştir. Bu kaplama, işleminden sonra normal ve tuz stresi altında kontrole kıyasla, filizlenme oranını, filizlenme tekdüzeliğini ve erken büyümesini arttırmıştır. Ancak tuz stresine maruz kalan ama TRIA uygulanmayan tohumlarda büyüme, fizyoloji ve biyokimyasal özellikler açısından zayıf performans göstermiştir. Bununla birlikte, TRIA ile hazırlanan tohumlar, tuzlu koşullar altında dahi filizlenme süresi kısalmış, filizlenme oranında artış ve iyileşme, sürgün/kök uzunluklarında, fide kuru ağırlığında, gaz değişim özelliklerinde, klorofil ve prolin içeriklerinde artış rapor edilmiştir. Sonuç olarak TRIA'nın tuzluluğun zararlı etkilerini azaltarak, tohumların çimlenme kapasitesini başarıyla artırdığını bildirmektedirler.

Naeem *et al.* (2017) tarafından Madagaskar cezairi (*Catharanthus roseus L.*) üzerine yaptıkları araştırmada TRIA uygulanan bitkilerde kök sayısının arttığı ve bu durumun bitkinin topraktan daha fazla besin almasına ve bitkilerin veriminin artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde TRIA uygulanan çilek bitkilerinde hektar başına düşen en yüksek meyve oluşum oranına sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca TRIA su ve mineral besin

alımını, uçucu yağ verimi, ikincil metabolitlerin artışı, nitrojen asimilasyonu, prolin metabolizması ve glisin betain birikimi gibi hayati bitki fizyolojik süreçlerini de geliştirerek bitkileri çeşitli zararlılardan korumaktadır (Katel *et al.* 2022). Çilek bitkisinde TRIA'nın kuraklık stresine karşı yanıt mekanizmasındaki etkileri incelenmiş ve antioksidan enzim miktarları araştırılmıştır. Bu nedenle SOD, POX ve CAT enzimlerinde oluşan değişimler belirlenmiştir. Kuraklık stresinin oranı arttığında bu enzimlerin miktarlarında artışlar görülmüştür. Fakat 1 ppm TRIA ile birlikte uygulandığında bitkilerin verimliliğinde ve büyümelerinde önemli artışlar belirlenmiştir. Böylece antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonundaki artışı TRIA'nın etkilediği rapor edilmiştir (El-Beltagi *et al.* 2022).

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz CRED-RA analizinde TRIA'nın Pb ile birlikte uygulandığında önemli bir şekilde metilasyon oranını düşürmesi Pb stresine karşı yanıt veren mekanizmaları teşvik ederek metilasyonun oluşma oranını azaltabildiği olarak yorumlanmıştır. Fakat TRIA'nın özellikle 20 μ mol ve 40 μ mol konsantrasyonlarında metilasyon oranının Pb uygulamasına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hem DNA değişimleri hem de epigenetik değişimler gözönüne alındığında TRIA'nın 40 μ mol konsantrasyonunun genotoksik özellikte olduğu kanaatine ulaşılmıştır. Ancak bu konsantrasyon Pb ile uygulandığında abiyotik strese karşı önemli bir yanıt oluşturduğu da kanıtlanmıştır.

Ağır metal stresini azaltmak için bitki büyüme hormonlarının daha fazla araştırılması ve bitkinin endojen düzenlemesi hakkında daha derin bir bilgiye katkıda bulunması beklenmektedir. Diğer abiyotik streslerin yanı sıra ağır metal maruziyeti altında bitki hormonlarının önemini destekleyen birçok çalışma halihazırda mevcuttur. Günümüz ortamında gördüğümüz muazzam abiyotik strese karşı yanıt oluşturulmasındaki mekanizmaların yeni fizyolojik, biyokimyasal ve genetiksel yaklaşımlar ile incelenmesi kritik bir öneme sahiptir. Dahası, bitkilerde çeşitli stresler altında üretilen hormonlar stres koşullarında bitkide önemli hayati rol oynamaktadır. Bunlar hücre koruması için gerekli olan temel enzimlerin üretimine ve proteinlerin ve lipidlerin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Bu hormonlar tarafından elde edilen kritik bitki toleransı doğrudan veya dolaylı olarak teşvik edilebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda Pb stresi altında uyguladığımız TRIA hormonunun, genetik ve epigenetik etkilerinin değerlendirilmesi ilk kez araştırılmıştır.

Laboratuvar ortamında optimum şartlarda yetiştirilen *Triticum aestivum* bitkisinde TRIA'nın toksik etki yapması, açık alan topraklarında yetiştirilen bitkilerde aynı sonuca varılacağı anlamına gelmemektedir. Dış ortamlarda yetiştirilen bitkilerin günümüz şartlarında Pb veya diğer abiyotik stres faktörlerine maruz kalmaları muhtemeldir. Bu nedenle tarım arazilerinde yetiştirilen bitkilerde TRIA'nın kullanılması daha iyi sonuçlar alınması ihtimalinin

olması ile birlikte çelişkilerin daha da aydınlatılması için yapılan çalışmaların tarım arazisinde uygulanması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Ahmad, A., Shahzadi, I., Mubeen, S., Yasin, N. A., Akram, W., Khan, W. U., Wu, T., 2021. Karrikinolide alleviates BDE-28, heat and Cd stressors in *Brassica alboglabra* by correlating and modulating biochemical attributes, antioxidative machinery and osmoregulators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112047.
- Ali, A., Kumar, A., Rasool, K., Ganai, N. A., Lone, A., Baba, T. R., Hamid, M., Haq, A., 2021. Triacontanol spray mediated plant growth and productivity in fruits crops : A review. *10(7)*, 789–792.
- Ali, H. M. M., Perveen, S., 2020. Effect of foliar applied triacontanol on wheat (*Triticum aestivum* L.) under arsenic stress: a study of changes in growth, yield and photosynthetic characteristics. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(6), 1215–1224.
- Allison, A. lizabeth., 2021. *Fundamental Molecular Biology - Lizabeth A. Allison* - Google Books.
- Alp, Y., Kabay, T., 2017. Yıl Üniversitesi, Y., Bilimleri Enstitüsü, F., Bitkileri ABD, B., Meslek Yüksekokulu, E. Kuraklık Stresinin Bazı Yerli ve Ticari Domates Çeşitlerinde Bitki Gelişimi Üzerine Etkileri, 22 (2) 86-96.
- Altunkaynak, E. Büyük, I. Aydın, S. S., and Aras, S. 2016. New insight into evaluation of DNA methylation levels with CRED–RA technique in the genome of *Lycopersicum esculentum* subjected to NaCl and PEG. *Biol Divers Conserv*, 9, 163-171.
- Arica, A. O., 2022. Kuşburnu (*Rosa canina* L.) Çeliklerinin Kambiyum Faaliyeti Üzerinde Kobalt Stresine Karşı İndol-3-Asetik Asit, Gibberellik Asit ve Kinetin Karışımlarının Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(1-2), 9-22.
- Aufsatz, W., Mette, M. F., Van Der Winden, J., Matzke, A. J. M., Matzke, M., 2002. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 16499–16506.
- Bakır, Ö., Ağar, G., 2021. Investigation of DNA Methylation Level in Wheat Genome Exposed to Vanadium by Using CRED-RA Technique. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 0225(1), 36–46.
- Bolukbasi, E. 2022. Analysis of genetic and epigenetic effect of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seedlings in response to copper stress. *Fresenius environmental bulletin* 31: 4596-4602.
- Bond, D. M., Finnegan, E. J., 2007. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends in Plant Science*, 12(5), 211–216.
- Cao, X., Jacobsen, S. E., 2002. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 16491–16498.
- Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., Du, B., Weng, Q., and He, G. 2002. Isolation and characterization of triacontanol-regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): possible role of triacontanol as a plant growth stimulator. *Plant and Cell Physiology*, 43(8), 869-876.
- Costa De Oliveira, A., Maia, L. C. Da, Palmieri, D. A., Souza, V. Q. De, Kopp, M. M., Carvalho, F. I. F. De., 2008. SSR locator: Tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. *International Journal of Plant Genomics*.

- Deans, C., Maggert, K. A., 2015. What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199(4), 887–896.
- Deo, S., Godwin, H. A., 2000. A selective, ratiometric fluorescent sensor for Pb^{2+} . *Journal of the American Chemical Society*, 122(1), 174–175.
- Di Felice, F., Micheli, G., Camilloni, G., 2019. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *Journal of biosciences*, 44(2), 38.
- Ding, G. H., Guo, D. Di, Guan, Y., Chi, C. Y., Liu, B. D., 2019. Changes of DNA methylation of *Isoetes sinensis* under Pb and Cd stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 3428–3435.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Egwurugwu, J. N., 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112–118.
- Dündar, Y., and Aslan, R., 2005. Yaşamı kuşatan ağır metal kurşunun etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 6(2), 1-5.
- El-Beltagi, H. S., Ismail, S. A., Ibrahim, N. M., Shehata, W. F., Alkhateeb, A. A., Ghazzawy, H. S., ... Sayed, E. G., 2022. Unravelling the effect of triacontanol in combating drought stress by improving growth, productivity, and physiological performance in Strawberry plants. *Plants*, 11(15), 1913.
- El-Monem, A., Sharaf, M., Farghal, I. I., Sofy, M. R., 2009. Role of Gibberellic Acid in Abolishing the Detrimental Effects of Cd and Pb on Broad Bean and Lupin Plants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(5), 668–673.
- Erturk, F. A., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G., 2015. Analysis of genetic and epigenetic effects of maize seeds in response to heavy metal (Zn) stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 10291–10297.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M. R., Tareen, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N., Huang, J., 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75(2), 391–404.
- Figlioli, F., Sorrentino, M. C., Memoli, V., Arena, C., Maisto, G., Giordano, S., Capozzi, F., Spagnuolo, V., 2019. Overall plant responses to Cd and Pb metal stress in maize: Growth pattern, ultrastructure, and photosynthetic activity. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1781–1790.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., De la Rosa, G. ve Corral-Diaz, B. 2004. *Convolvulus arvensis* L.'nin kadmiyum, krom ve bakırın biyolojik birikimi: bitki büyümesi ve besin elementlerinin alımı üzerindeki etkisi. *Biyokaynak teknolojisi* , 92 (3), 229-235.
- Ghani, M. A., Abbas, M. M., Ali, B., Aziz, R., Qadri, R. W. K., Noor, A., Azam, M., Bahzad, S., Saleem, M. H., Abualreesh, M. H., Alatawi, A., Ali, S., 2021. Alleviating role of gibberellic acid in enhancing plant growth and stimulating phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.) under lead stress. *Sustainability (Switzerland)*, 13(21).
- Giannakoula, A., Therios, I., Chatzissavvidis, C., 2021. Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in citrus (*Citrus aurantium* L.) plants. the role of antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress. *Plants*, 10(1), 1–14.
- Godwin, H. A., 2001. The biological chemistry of lead. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 223–227.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., Bernstein, E., 2007. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 128(4), 635–638.

- Golden, R., Doull, J., Waddell, W., Mandel, J., 2003. Potential Human Cancer Risks from Exposure to PCBs: A Tale of Two Evaluations. In *Critical Reviews in Toxicology* 33(5), 543–580.
- Grover, A., Sharma, P. C., 2016. Development and use of molecular markers: Past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290–302.
- Hanumanth Kumar, G., Pramoda Kumari, J., 2015. Heavy Metal Lead Influative Toxicity and Its Assessment in Phytoremediating Plants - A Review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(10).
- Harshitha, K., Nair, R. A., 2020. Evaluation of DNA Methylation Changes by CRED–RA Analysis Following Prednisone Treatment of Endophyte, *Fusarium oxysporum*. *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), 254–258.
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., Zarazaga, M., 2016. A survey of tools for analysing DNA fingerprints. *Briefings in Bioinformatics*, 17(6), 903–911.
- Holliday, R., 2006. Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*, 1(2), 76–80.
- Hosseini, N., Zarei, L. ve Cheghamirza, K., 2023. Etkörn buğdayında bireylerin metilasyon modellerinin farklı nem rejimlerine göre çeşitliliği CRED-RA tekniği ile ortaya çıkarıldı. *Genet Kaynak Mahsulü Gelişimi*.
- Idrees M, I. M., 2014. Molecular Markers in plants for analysis of genetic diversity: A review. *European Academic Research* , 2(1), 1513–1540.
- Islam, S., Mohammad, F., 2020. Triacntanol as a dynamic growth regulator for plants under diverse environmental conditions. In *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26(5), 871–883).
- Islam, S., Zaid, A., Mohammad, F., 2021. Role of Triacntanol in Counteracting the Ill Effects of Salinity in Plants: A Review. In *Journal of Plant Growth Regulation* 40(1), 1-10.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Rosche, W. A., Sinden, R. R., Wells, R. D., 2000. DNA polymerase III proofreading mutants enhance the expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 2174–2184.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., Beeregowda, K. N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. In *Interdisciplinary Toxicology* 7(2), 60–72).
- Karam, E. A., Maresca, V., Sorbo, S., Keramat, B., Basile, A., 2017. Effects of triacntanol on ascorbate-glutathione cycle in *Brassica napus* L. exposed to cadmium-induced oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 268–274.
- Katel, S., Mandal, H. R., Kattel, S., Yadav, S. P. S., Lamshal, B. S., 2022. Impacts of plant growth regulators in strawberry plant: A review. *Heliyon*, 8(12).
- Kayis, T., Emre, I., 2012. Effects of heavy metal stress on protein and glycogen synthesis of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera:Ichneumonidae). *Ekoloji*, 21(83), 61–67.
- Khan, M. M. A., Rahman, M. M., Naeem, M., Mohammad, F., Shidiqui, M. H., Khan, M. N., 2006. Triacntanol – Induced Changes in Growth , Yield and Quality of Tomato(*Lycopersicon Esculentum* Mill). *Electronic Journal of Environment, Agricultural and Food Chemistry*, 5(4) 1492–1499.
- Kim, K. A., Chakraborti, T., Goldstein, G. W., Bressler, J. P., 2000. Immediate Early Gene Expression in PC12 Cells Exposed to Lead: Requirement for Protein Kinase C. *Journal of Neurochemistry*, 74(3), 1140–1146.

- Klotz, K., Göen, T., 2017. Human biomonitoring of lead exposure. In *Lead: Its Effects on Environment and Health* 17, 99–121.
- Kumaravelu, G., Livingstone, V. D., Ramanujam, M. P., 2000. Triacntanol-induced changes in the growth, photosynthetic pigments, cell metabolites, flowering and yield of green gram. *Biologia Plantarum*, 43(2), 287–290.
- Küpper, H., 2017. Lead toxicity in plants. In *Lead: Its Effects on Environment and Health* 17, 491–500..
- Lan, Z., Yan hao, X., Jian bo, W., 2009. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6201–6207.
- Li, C., Li, M., Zeng, J., Yuan, S., Luo, X., Wu, C., Xue, S., 2024. Migration and distribution characteristics of soil heavy metal(loid)s at a lead smelting site. *Journal of Environmental Sciences*, 135, 600–609.
- Li, X., Zhong, Q., Li, Y., Li, G., Ding, Y., Wang, S., Liu, Z., Tang, S., Ding, C., Chen, L., 2016. Triacntanol reduces transplanting shock in machine-transplanted rice by improving the growth and antioxidant systems. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–10.
- Lim, D. H. K., Maher, E. R., 2010. SAC review DNA methylation : a form of epigenetic control of gene expression Learning objectives : Ethical issues : The Obstetrician and Gynaecologist, 12, 37–42.
- Mariño-Ramírez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A., Landsman, D., 2014. Histone structure and nucleosome stability, 2(5), 719–729.
- Markovac, J., Goldstein, G. W., 1988. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* , 334(6177), 71–73.
- Martin, C., Zhang, Y., 2007. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3), 266–272.
- Memon, A. R. (2020). Heavy metal-induced gene expression in plants. *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management*, 143-173.
- Mersfelder, E. L., Parthun, M. R., 2006. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Research*, 34(9), 2653.
- Meudt, H. M., Clarke, A. C., 2007. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, 12(3), 106–117.
- Mohamed, R. A., Aboulila, A. A., El-Kholya, S. Z., and Hamza, A. 2017. Evaluation of genetic polymorphism, genomic template stability, condition factor and hemato-biochemical parameters in response to slow reduction in water level during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) harvest. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 47(4), 435-448.
- Naeem, M., Aftab, T., Idrees, M., Singh, M., Ali, A., Khan, M. M. A., Uddin, M., Varshney, L. 2017. Modulation of physiological activities, active constituents and essential oil production of *Mentha arvensis* L. by concomitant application of depolymerised carrageenan, triacntanol and 28-homobrassinolide. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 179–188.
- Naeem, M., Khan, A., Masroor, M., Moinuddin., 2012. Triacntanol: A potent plant growth regulator in agriculture. In *Journal of Plant Interactions* 7(2), 129–142).
- Nardemir, G., Agar, G., Arslan, E., Aygun Erturk, F., 2015. Determination of genetic and epigenetic effects of glyphosate on *Triticum aestivum* with RAPD and CRED-RA techniques. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(2), 131–139.

- Navabpour, S., Yamchi, A., Bagherikia, S., Kafi, H., 2020. Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(4), 793–802.
- Nishimura, T., Paszkowski, J., 2007. Epigenetic transitions in plants not associated with changes in DNA or histone modification. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1769(5–6), 393–398.
- Okcu, M., Tozlu, E., Metin Kumlay, A., Pehlivan, M., Tarihi, G., 2009. Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 17(2), 14-26.
- Pang, Q., Chen, X., Lv, J., Li, T., Fang, J., Jia, H., 2020. Triacntanol Promotes the Fruit Development and Retards Fruit Senescence in Strawberry: A Transcriptome Analysis. *Plants*, 9(4), 488.
- Patlolla, A. K., Barnes, C., Hackett, D., Tchounwou, P. B., 2009a. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(2), 643–653.
- Patlolla, A. K., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V. R., Tchounwou, P. B., 2009b. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in sprague-dawley rats. *Environmental Toxicology*, 24(1), 66–73.
- Perveen, S., Iqbal, M., Parveen, A., Akram, M. S., Shahbaz, M., Akber, S., Mehboob, A., 2017. Exogenous triacntanol-mediated increase in phenolics, proline, activity of nitrate reductase, and shoot k^+ confers salt tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Botanica*, 40(1), 1–11.
- Pinho, S., Ladeiro, B., 2012. Phytotoxicity by Lead as Heavy Metal Focus on Oxidative Stress. *Journal of Botany*, 1–10.
- Quintanilla-Vega, B., Hoover, D. J., Bal, W., Silbergeld, E. E., Waalkes, M. P., Anderson, L. D., 2000. Lead Interaction with Human Protamine (HP2) as a Mechanism of Male Reproductive Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 13(7), 594–600.
- Rademacher, W., 2015. Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 845–872.
- Rebelo, F. M., Caldas, E. D., 2016. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. *Environmental Research*, 151, 671–688.
- Reche, P. A., Keskin, D. B., Hussey, R. E., Ancuta, P., Gabuzda, D., Reinherz, E. L., 2006. Elicitation from virus-naïve individuals of cytotoxic T lymphocytes directed against conserved HIV-1 epitopes. *Medical Immunology*, 5(1), 1-14.
- Reis, G. S. M., De Almeida, A. A. F., De Almeida, N. M., De Castro, A. V., Mangabeira, P. A. O., Pirovani, C. P., 2015. Molecular, biochemical and ultrastructural changes induced by Pb toxicity in seedlings of theobroma cacao L. *PLoS ONE*, 10(7), 129696.
- Saleh, S. R., Kandeel, M. M., Ghareeb, D., Ghoneim, T. M., Talha, N. I., Alaoui-Sossé, B., Aleya, L., Abdel-Daim, M. M., 2020. Wheat biological responses to stress caused by cadmium, nickel and lead. *Science of the Total Environment*, 706, 136013.
- Samanta, S., Singh, A., Banerjee, A., and Roychoudhury, A. (2020). Exogenous supplementation of melatonin alters representative organic acids and enzymes of respiratory cycle as well as sugar metabolism during arsenic stress in two contrasting indica rice cultivars. *Journal of Biotechnology*, 324, 220-232.
- Samardakiewicz, S., and Woźny, A. 2005. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. *Aquatic Botany*, 83(4), 289-295.

- Sardar, R., Ahmed, S., Akbar, M., Yasin, N. A., and Li, G. 2022. Alleviation of cadmium phytotoxicity in triacontanol treated *Coriandrum sativum* L. by modulation of physiochemical attributes, oxidative stress biomarkers and antioxidative system. *Chemosphere*, 295, 133924.
- Sarkar, A., Sharangi, A. B., Soujanya, S., Datta, A., 2020. Seed yield and quality of coriander (*Coriandrum sativum* L.) as influenced by seed priming. *Journal of Crop and Weed*, 16(1), 51–55.
- Sarwar, M., Amjad, M., Ayyub, C. M., 2017. Alleviation of salt stress in cucumber (*Cucumis sativus*) through seed priming with triacontanol. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(4), 771–778.
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H., Tumlinson, J. H., 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10552–10557.
- Seregin, I. V., and Ivanov, V. B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian journal of plant physiology*, 48, 523-544.
- Seven, T., Can, B., Darende, B. N., Ocak, S., 2018. Hava ve Toprakta Ağır Metal Kirliliği. *Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1(2), 91–103.
- Sharma, M. K., Singh, A., Kumar, A., Simnani, S. A., Nazir, N., Khalil, A., Mushtaq, R., Bhat, R., 2018. Response of Triacontanol on Temperate Fruit Crops-A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7(11), 3239–3243.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 1–26.
- Shi, W. G., Liu, W., Yu, W., Zhang, Y., Ding, S., Li, H., Mrak, T., Kraigher, H., Luo, Z. Bin., 2019. Absciscic acid enhances lead translocation from the roots to the leaves and alleviates its toxicity in *Populus × canescens*. *Journal of Hazardous Materials*, 362, 275–285.
- Sitinjak, R. R., Pandiangan, D., 2014. The effect of plant growth regulator triacontanol to the growth of Cacao seedlings (*Theobroma cacao* L.). *Agrivita*, 36(3), 260–267.
- Sorrentino, M. C., Giordano, S., Capozzi, F., Spagnuolo, V., 2022. Metals Induce Genotoxicity in Three Cardoon Cultivars: Relation to Metal Uptake and Distribution in Extra-and Intracellular Fractions. *Plants*, 11(4), 475.
- Stern, B. R., 2010. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: Overview, update and regulatory considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 73(2–3), 114–127.
- Sun, R., Gao, Y., Yang, Y., 2022. Leaching of heavy metals from lead-zinc mine tailings and the subsequent migration and transformation characteristics in paddy soil. *Chemosphere*, 291, 132792.
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Foxx, D. N., Ishaque, A. B., Shen, E., 2004. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG 2) cells. In *Molecular and Cellular Biochemistry* 255, 161-170

- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. In EXS, 101, 133–164.
- Tok, D., Senturk-Akfirat, F., Sevinc, D., Aydin, Y., Altinkut-Uncuoglu, A., 2011. Identification of genetic polymorphism and dna methylation pattern in wheat (*Triticum aestivum* L.). Turkish Journal of Field Crops, 16(2), 157–165.
- Toparslan, E., Mercan, L., Kuran, M., 2015. Kalıtımın Epigenetik Boyutunda DNA Metilasyon Desenleri Kalıtımın Epigenetik Boyutunda DNA Metilasyon Desenleri. Hayvansal Üretim Dergisi, 56(2), 38-42.
- Tropberger, P., Schneider, R., 2013. Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. Nature Structural Molecular Biology, 20(6), 657–661.
- Tufan Dülger, A.F., Yörük, E., 2022. Risk Assessment of Tetraconazole Fungicide at the Molecular Level in *Hordeum vulgare* L.. Biol Bull Russ Acad Sci 49, 292–298.
- Van Speybroeck, L. 2002. From Epigenesis to Epigenetics. Annals of the New York Academy of Sciences, 981(1), 61–81.
- Van Vliet, J., Oates, N. A., Whitelaw, E., 2007. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. Cellular and Molecular Life Sciences, 64(12), 1531–1538.
- Verma, S., Dubey, R. S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science, 164(4), 645–655.
- Wang, H., Shen, H., Wang, Y., Li, Z., Yin, H., Zong, H., Jiang, J., Gu, J., 2005. Overexpression of small glutamine-rich TPR-containing protein promotes apoptosis in 7721 cells. FEBS Letters, 579(5), 1279–1284.
- Wang, S., Shi, X., 2001. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry, 222, 3–9.
- Wani, A. L., Ara, A., Usmani, J. A., 2015. Lead toxicity: A review. Interdisciplinary Toxicology, 8(2), 55–64.
- Waterland, R. A., Michels, K. B., 2007. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. 27, 363–388.
- Xiao, H., Wang, F., Wisniewski, J., Shaytan, A. K., Ghirlando, R., Fitzgerald, P. C., Huang, Y., Wei, D., Li, S., Landsman, D., Panchenko, A. R., Wu, C., 2017. Molecular basis of CENP-C association with the CENP-A nucleosome at yeast centromeres. Genes and Development, 31(19), 1958–1972.
- Yang, J.-L., Wang, L.-C., Chang, C.-Y., Liu, T.-Y., 1999. Singlet Oxygen Is the Major Species Participating in the Induction of DNA Strand Breakage and 8-Hydroxydeoxyguanosine Adduct by Lead Acetate. Environmental and molecular mutagenesis, 33(3), 194-201.
- Yedjou, C. G., Milner, J. N., Howard, C. B., Tchounwou, P. B., 2010. Basic apoptotic mechanisms of lead toxicity in human leukemia (HL-60) cells. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7(5), 2008-2017.
- Yedjou, C. G., Tchounwou, P. B., 2006. Oxidative stress in human leukemia (HL-60), human liver carcinoma (HepG2), and human (Jurkat-T) cells exposed to arsenic trioxide. In Metal ions in biology and medicine: proceedings of the... International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine held... Les ions métalliques en biologie et en médecine: Symposium international sur les ions métalliques, 9, 298.
- Zaid, A., Asgher, M., Wani, I. A., Wani, S. H., 2020. Role of triacontanol in overcoming environmental stresses. Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives, 491-509.

- Zhao, X., Tan, Z., Feng, H., Yang, R., Li, M., Jiang, J., Shen, G., Yu, R. , 2011. Microsatellites in different Potyvirus genomes: Survey and analysis. *Gene*, 488(1–2), 52–56.
- Zullo, M. A. T., Adam, G., 2002. Brassinosteroid phytohormones - Structure, bioactivity and applications. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(3), 143–181.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Levent GENÇDAL
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Açık Öğretim Lisesi
Lisans:	Atatürk üniversitesi
Yüksek lisans:	Atatürk üniversitesi
Yabancı Dil	
İngilizce	Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
Kurşun Ağır Metal Stresi Uygulanan Bitkilerde Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Fizyolojik ve Moleküler Düzeyde Etkileri	