



**EKMEKLİK BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM L.*)
BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNE CEVAPTA
ETKİLİ OLAN BAZI GENLERİN İFADE
SEVİYELERİNİN VE DNA METİLASYON
ORANLARININ BELİRLENMESİ**

İlknur ÇOLAK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI
(Her hakkı saklıdır.)**

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

**EKMEKLİK BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM L.*) BİTKİSİNDE KADMIYUM
STRESİNE CEVAPTA ETKİLİ OLAN BAZI GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN
VE DNA METİLASYON ORANLARININ BELİRLENMESİ**

(Determination of Expression Levels and DNA Methylation Rates of Some Genes Affecting
Cadmium Stress Responses in *Triticum aestivum*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur ÇOLAK

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI

Erzurum
Temmuz, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

İlknur ÇOLAK tarafından hazırlanan “*Ekmeklik buğday (Triticum aestivum L.) Bitkisinde Kadmiyum Stresine Cevapta Etkili olan Bazı Genlerin İfade Seviyelerinin ve DNA Metilasyon Oranlarının Belirlenmesi*” başlıklı çalışması 26 / 07 / 2021 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:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Filiz AYGÜN ERTÜRK <i>Bayburt Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

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 Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 8329

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiri, 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. Üyesi Gökçe KARADAYI* danışmanlığında sunulan “*Ekmeklik buğday (Triticum aestivum L.) Bitkisinde Kadmiyum Stresine Cevapta Etkili olan Bazı Genlerin İfade Seviyelerinin ve DNA Metilasyon Oranlarının 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	7	30
Kuramsal Temeller	24	30
Materyal ve Yöntem	20	35
Bulgular	1	20
Tartışma	13	20
Tezin Geneli	14	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
İlknur ÇOLAK	Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI
26.7.2021	26.7.2021
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* 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

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma BAP tarafından, Lisansüstü Tez Projesi kapsamında 8329 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Bu nedenle üniversitemizin BAP kurumuna teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince, bilgisi, deneyimi ve yakın ilgisi ile bana her zaman destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI'ya, yüksek lisans eğitimim boyunca teşvik ve desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI'ya, tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Moleküler Biyoloji Laboratuvarının Sayın hocalarım Prof. Dr. Güleray AĞAR'a ve Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye yapmış oldukları destek ve katkılardan dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecinde ilgisini ve desteğini gördüğüm Sayın Uzman Biyolog Selma SEZEN'e yine bu süreçte teknik desteklerini benden esirgemeyen sevgili dayım Osman KÜÇÜK'e ve sevgili amcam Ramazan ÇOLAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda olduğu gibi bu süreçte de sabır ve özveri ile hep yanımda olan, maddi manevi yardım ve desteklerini asla esirgemeyen değerli anneme, babama ve kardeşlerime gönülden sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İlknur ÇOLAK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKMEKLİK BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM L.*) BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNE CEVAPTA ETKİLİ OLAN BAZI GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN VE DNA METİLASYON ORANLARININ BELİRLENMESİ

İlknur ÇOLAK

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI

Amaç: Son yıllarda kullanılan kimyasal gübreler, yanlış sulama teknikleri, değişen iklim koşulları gibi faktörler kadmiyum (Cd) ağır metalinin topraktaki birikimini artırmaktadır. Çalışmamızda önemli bir tarım ürünü olan ekmeklik buğdaya (*Triticum aestivum L.*) farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd stresi sonrasında bitkide stres ile ilişkili olan genlerin ekspresyon seviyelerinin ve Real-Time PCR temelli kantitatif DNA metilasyon analizi (qAMP) ile ilk kez metilasyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: 0, 100, 250, 500 µM dozlarında Cd stresine maruz bırakılan buğday bitkisinin geliştirilmesi sağlanmış ve bu bitkilerden DNA ve RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmış ve seçilen gen bölgelerine özgü primerler tasarlanarak üretilen cDNA'lar ile gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. DNA metilasyon oranları restriksiyon enzim temelli Real-Time PCR temelli kantitatif DNA metilasyon analizi tekniği uygulanarak belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar ile gen ekspresyon analizleri karşılaştırılmıştır.

Bulgular: 0, 100, 250, 500 µM dozlarında uygulanan CdCl₂ stresi altında, UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinin gen ekspresyon seviyeleri ve DNA metilasyon yüzdeleri belirlenmiştir. UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 geninde metilasyon yüzdesi hem gövdede hem de kökte en yüksek 250 µM konsantrasyonda belirlenmiştir. UGT-3 geninde ekspresyon seviyesi gövdede 250 µM konsantrasyonda en yüksek oranı verirken, LTP-4 geninde kökte 250 µM konsantrasyonda aşırı ekspresyon gerçekleşmiştir.

Sonuç: UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinin metilasyon oranlarındaki değişimler bitkilerde kullanımı yeni bir teknik olan qAMP ile ilk kez araştırılmıştır. Genlerin ekspresyon seviyeleri ile metilasyon durumları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum stresi, DNA Metilasyonu, qAMP, Gen Ekspresyonu.

Temmuz 2021, 85 Sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF EXPRESSION LEVELS AND DNA METHYLATION RATES OF SOME GENES AFFECTING CADMIUM STRESS RESPONSES IN *TRITICUM AESTIVUM*

Ilknur COLAK

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gokce KARADAYI

Purpose: Factors such as chemical fertilizers used in recent years, incorrect irrigation techniques, changing climatic conditions increase the accumulation of cadmium (Cd) heavy metal in the soil. In study, it was aimed to determine the expression levels of stress-related genes in the plant and the methylation levels for the first time by Real-Time PCR-based quantitative DNA methylation analysis (qAMP) after Cd stress applied at different concentrations to bread wheat (*Triticum aestivum* L.), which is an important agricultural product.

Method: The development of wheat plants exposed to Cd stress at doses of 0,100, 250, 500 μ M was achieved and DNA and RNA isolations were performed from these plants. cDNA synthesis was made from the obtained RNA samples and gene expression analyzes were performed with the cDNAs produced by designing primers specific to the selected gene regions. DNA methylation rates were determined by applying the restriction enzyme-based qAMP technique and the obtained results were compared with gene expression analysis.

Findings: Gene expression levels and DNA methylation percentages of UGT-3, LTP-4 and PIP-1 genes were determined under CdCl₂ stress applied at doses of 0.100, 250, 500 μ M. The percentage of methylation in the UGT-3, LTP-4 and PIP-1 genes was determined at the highest concentration of 250 μ M in both the stem and root. The expression level of the UGT-3 gene gave the highest rate at 250 μ M concentration in the stem, while the overexpression of the LTP-4 gene was observed at 250 μ M concentration in the root.

Results: Changes in methylation rates of UGT-3, LTP-4 and PIP-1 genes were investigated for the first time with qAMP, a new technique used in plants. A significant correlation was observed between the expression levels of genes and their methylation status.

Keywords: Cadmium stress, DNA Methylation, qAMP, Gene Expression.

July 2021, 85 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
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	10
Ağır Metaller.....	10
Kadmiyum (Cd)	13
Epigenetik	15
Histon modifikasyonları.....	16
RNA temelli mekanizmalar.....	17
DNA metilasyonu	17
Metilasyonu saptamak için kullanılan yöntemler / moleküler markörler	20
Southern blot yöntemi	21
Bisülfıt DNA dizileme yöntemi	21
MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism / Metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi) yöntemi	21
COBRA (Combined bisülfite restriction analysis / Karışık bisülfıt restriksiyon analizi) yöntemi.....	22
CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion and random amplification / Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım) yöntemi.....	22
IRAP (Inter retrotransposons amplified polymorphism / Retrotranspozon-arası çoğaltılmış polimorfizm) yöntemi	22
Metilasyona duyarlı tek nükleotid primer ekleme yöntemi	22
qAMP (Quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR / Real-Time PCR temelli kantitatif DNA metilasyon analizi) yöntemi	23

Restriksiyon enzimleri	24
Not I	25
Hpa II	25
Hha I.....	26
McrBC.....	26
Gen ekspresyonu	26
Buğday	27
MATERYAL VE METOT	28
Materyal	28
Kullanılan bitkisel materyal	28
Yararlanılan alet ve cihazlar.....	28
Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	29
Yöntem.....	30
Deney bitkilerine kadmiyum stresinin uygulanması.....	30
DNA ve RNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi.....	30
Primer tasarımı	32
PCR ile DNA çoğaltımı	33
Agaroz jel elektroforezi.....	34
qRT-PCR ile qAMP Analizi	34
qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi	36
ARAŞTIRMA BULGULARI	38
Primer bağlanma sıcaklıklarının tespiti.....	38
Tasarlanan primerlerin gen bölgelerinde gösterimi	38
UGT-3	38
LTP-4	39
PIP-1.....	40
qRT-PCR ve gen ekspresyonu seviyelerindeki değişim	41
qAMP analizi ve DNA metilasyon yüzdesi	43
Gen ekspresyonu seviyelerindeki ve DNA metilasyon yüzde değişimlerinin karşılaştırılması	48
TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	70

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Temel Endüstrilerin Atıklarında Saptanan Bazı Ağır Metaller	10
Tablo 2. Bazı Ağır Metallerin Ekolojik Sınıflaması	11
Tablo 3. Kadmiyum Ağır Metalinin Kimyasal Formları	14
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Restriksiyon Enzimleri	25
Tablo 5. Ekmeklik Buğdayın Taksonomik Sınıflandırılması	27
Tablo 6. Çalışma Esnasında Kullanılan Cihazlar	28
Tablo 7. qAMP Analizinde Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimleri	33
Tablo 8. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimleri	33
Tablo 9. Seçilen Genlerde Ekspresyon Seviyesindeki Değişim Oranları.....	41
Tablo 10. UGT-3 Gen Bölgesinde Meydana Gelen MSRE ve MDRE Metilasyon Yüzdeleri	43
Tablo 11. LTP-4 Gen Bölgesinde Meydana Gelen MSRE ve MDRE Metilasyon Yüzdeleri	44
Tablo 12. PIP-1 Gen Bölgesinde Meydana Gelen MSRE ve MDRE Metilasyon Yüzdeleri	45
Tablo 13. Analizler Sonucunda Elde Edilen Gen Ekspresyon Oranları ve DNA Metilasyon Yüzdeleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Epigenetik düzenlemelerin genel şeması	16
Şekil 2. Sitozine metil grubunun eklenmesi ile 5-metilsitozin bazının oluşması.....	18
Şekil 3. Bitki metiltransferaz enzimleri.....	20
Şekil 4. Hedef primerlerin jel elektroforezi.....	38
Şekil 5. Ekmeklik buğday (<i>Triticum aestivum</i>) bitkisinin gövdesinde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin çizgi grafiği.....	42
Şekil 6. Ekmeklik buğday (<i>Triticum aestivum</i>) bitkisinin gövdesinde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin kolon grafiği	42
Şekil 7. Ekmeklik buğday (<i>Triticum aestivum</i>) bitkisinin kökünde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin kolon grafiği	42
Şekil 8. Bitki gövdesinde seçilen genlerin MSRE bölgelerindeki metilasyon oranları	46
Şekil 9. Bitki kökünde seçilen genlerin MSRE bölgelerindeki metilasyon oranları.....	46
Şekil 10. Bitki gövdesinde seçilen genlerin MDRE bölgelerindeki metilasyon oranları.....	47
Şekil 11. Bitki kökünde seçilen genlerin MDRE bölgelerindeki metilasyon oranları	47
Şekil 12. Seçilen genlerin bitki gövdesinde MSRE ve MDRE bölgesindeki metilasyon oranları.....	48
Şekil 13. Seçilen genlerin bitki kökünde MSRE ve MDRE bölgesindeki metilasyon oranları.....	48
Şekil 14. Gövdedeki gen ekspresyon ve DNA metilasyon seviyelerinin değişim oranları.....	50
Şekil 15. Kökteki gen ekspresyon ve DNA metilasyon seviyelerinin değişim oranları	50

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

%	: Yüzde
<	: Küçük
>	: Büyük
°	: Derece
°C	: Santigrat
µl	: Mikrolitre
A	: Adenin
ABA	: Absisik Asit
APX	: Askorbat Peroksidaz
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
CAT	: Katalaz
CCOD	: Sitokrom C Oksidaz
Cd (C ₃₆ H ₇₂ O ₄)	: Kadmiyum Stearat
Cd (CH ₃ COO) ₂	: Kadmiyum Asetat
Cd (NO ₃) ₂	: Kadmiyum Nitrat
Cd (OH) ₂	: Kadmiyum Hidroksit
Cd	: Kadmiyum
Cd.Cu	: Kadmiyum-Bakır Alaşımı
CdCl ₂	: Kadmiyum Klorür
CdCO ₃	: Kadmiyum Karbonat
CdO	: Kadmiyum Oksit
CdS	: Kadmiyum Sülfür
CdSO ₄	: Kadmiyum Sülfat
-CH ₃	: metil grubu
cm ²	: Santimetre kare
CMT ₃	: Kromometilaz
Co	: Kobalt
COBRA	: Combined Bisulfite Restriction Analysis (Birleştirilmiş Bisülfıt Restriksiyon Analizi)
CpG	: Sitozin-Fosfat-Guanin
Cr	: Krom

CRED-RA	: Coupled Restriction Enzyme Digestion and Random Amplification (Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım)
Cu	: Bakır
dC	: Deoksisitozin
DHAR	: Dehidroaskorbat Redüktaz
dmC	: 5-deoksimetilsitidin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT	: DNA Metiltransferaz
DON	: Deoksinivalenol
FCM	: Akış Sitometrisi
Fe	: Demir
FHB	: Fusarium Head Blight (Fusarium Baş Yanıklığı)
g	: Gram
G	: Guanin
Gb	: Giberellin
GT	: Glikoziltransferaz
GUS	: β -Glukuronidaz
HDAC	: Histon Deasetilaz
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi)
HSA	: Heptanoil Salisilik Asit
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
l	: Litre
LEA	: Geç Embriyogenez Bağımlı Protein
LTP	: Lipit Transfer Proteini
LTP-4	: Lipit Transfer Proteini-4
M	: Molar
MDRE	: Methylation Dependent Restriction Enzymes (Metilasyona Bağlı Restriksiyon Enzimi)
MeDIP	: Metilli DNA İminopresipitasyonu

MET1	: Metiltransferaz 1
mg	: Miligram
Mg	: Magnezyum
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
Mn	: Manganez
Mo	: Molibden
MSAP	: Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (Metilasyon Duyarlı Çoğaltılmış Fragman Polimorfizmi)
MSRE	: Methylation-Sensitive Restriction Enzymes (Metilasyona Duyarlı Restriksiyon Enzimi)
Na	: Sodyum
ng	: Nanogram
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
nsLTP	: Non-Spesifik Lipit Transfer Protein
NTP	: Ulusal Toksikoloji Program
Pb	: Kurşun
ph	: Hidrojenli gücü
PIP	: Plazma Zarı İçi Protein
PIP-1	: Plazma Zarı İçi Protein-1
Pol IV	: RNA Polimeraz IV
POX	: Guaiakol Peroksidaz
QAMA	: Quantitative Analysis of Methylated Alleles (Metillenmiş Alellerin Kantitatif Analizi)
qAMP	: Quantitative Analysis of DNA Methylation Using Real-Time PCR (Real-Time PCR temelli kantitatif DNA metilasyon analizi)
QMSP	: Quantitative Methylation-Specific PCR (Metilasyona Özgü Kantitatif PCR)
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RdDM	: RNA-Yönelimli DNA Metilasyonu
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)

RNA	: Ribon�kleikasit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SA	: Salisilik Asit
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
Se	: Selenyum
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SIPK	: Salisilik Asit Birikimi ile İndüklenen Protein Kinaz
siRNA	: Small İnterfering RNA
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SoPCS	: Fitokelatin Sentaz
T	: Timin
tRNA	: Taşıyıcı Ribon�kleikasit
UGT	: UDP- Glikoziltransferaz
UGT-3	: UDP- Glikoziltransferaz-3
v/v	: Hacim/Hacim
w/v	: Ağırlık/Hacim
Zn	: Çinko
�g	: Mikrogram
�M	: Mikromolar

GİRİŞ

Bitkiler doğada aktif olarak hareket edemeyen organizmalardır. Bu durum onları yaşamları boyunca abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı savunmasız hale getirmektedir. UV ışığı, kızılötesi ışık, yüksek radyasyon, aşırı tuzluluk, kuraklık, sel, ani sıcaklık düşüşleri, besin yetersizlikleri, hava ve toprak kaynaklı kontaminantlar bitkilerin maruz kaldığı abiyotik stres faktörleri arasında gösterilmektedir. Ayrıca böcek istilası, bakteriyel ve fungal patojenlere maruziyet, sekonder metabolitler de bitkilerin sık karşılaştıkları biyotik stres faktörleridir. Stres faktörleri, iç dengelerini koruma eğiliminde olan bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere yol açmaktadır (Bajguz and Hayat, 2009). Morfolojik değişimlere; bitki kökünün uzaması, stomaların korunması amacı ile yaprakların kıvrılması veya yuvarlanması, epidermis üzerindeki kutikula tabakasının kalınlığının değişmesi ve yaprakların kaybedilmesi örnektir. Fizyolojik ve biyokimyasal değişimlere ise; stomaların açılıp-kapanmasının düzenlenmesi, fotosentez seviyesinin düzenlenmesi, hücre zarının geçirgenliğinin değişmesi, fitohormon seviyelerinin düzenlenmesi, makromoleküller ile potasyum (K^+), sodyum (Na^+) gibi iyonların homeostasisi, ozmolitler (şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler), ısı şok proteinleri (Heatshock) ve geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinler gibi farklı koruyucu moleküllerin sentezi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve detoksifikasyonu örnektir (Per et al., 2017; Zhu et al., 2018; Bhattacharya, 2019; Takahashi and Shinozaki, 2019; Gong et al., 2020). Bu değişimler beraberinde oksidatif ve genotoksik stresleri de indüklemekte ve deoksiribonükleik asit (DNA) çift sarmalında çeşitli mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır. DNA'daki onarılamayan mutasyonlar genomun işleyişinde düzensizliklere yol açarken bitki yaşamı üzerinde ise hem genel hem de spesifik olumsuzluklara hatta bitkinin ölümüne neden olmaktadır (Dutta et al., 2018). Bitkiler yaşamlarının bir dönemini veya yaşamlarının tamamını bu stres faktörleriyle geçirmektedirler. Son yıllarda normal seviyelerin üzerinde artış gösteren ağır metaller bitkilerin karşılaştıkları abiyotik stres faktörlerinin başında gelmektedir.

Ağır metaller, doğal olarak oluşan ve yer kabuğu boyunca bulunan, suyla karşılaştırıldığında nispeten yüksek bir yoğunluğa sahip metalik elementlerdir. Çevresel parametrelerdeki eser miktarlarda varlıklarından dolayı iz elementler olarak düşünülmektedir (Tchounwou et al., 2012). Ağır metaller organik maddelerden farklı olarak stabilitelerini korumakta ve biyolojik aktivitelere karşı dayanıklılık göstermektedirler (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). Ayrıca, bitkilerde ve hayvanlarda esansiyel olan ağır metaller biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarda da kullanılmaktadır. Kobalt (Co), bakır (Cu), krom

(Cr), demir (Fe), magnezyum (Mg), manganez (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), selenyum (Se), çinko (Zn) gibi metaller çeşitli biyomedikal ve fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan esansiyellerdir (WHO 1996). Bu esansiyel metaller bazı ana enzimlerin önemli bileşenleridir ve oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde temel rol almaktadırlar. Örneğin Cu; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), sitokrom c oksidaz (CCOD), ferroksidaz, monoamin oksidaz ve dopamin β monoksidaz gibi oksidatif stres enzimleri için gerekli kofaktör olarak görev alır. Ağır metallerin canlılar için hayati rolleri olmasına rağmen yüksek toksisiteleri, kolay dağılımları, ekosistemdeki süreklilikleri ve biyoakümülyasyonları nedeniyle son yıllarda doğada normal değerlerin üzerinde birikimleri ekolojik kaygıların artmasına sebep olmaktadır (Tchounwou et al., 2012).

Ağır metallerin doğada birikimi, sanayi devriminin başlamasından bu yana küresel bir tehdit olarak tanımlanmıştır (Wu et al., 2016). Ağır metal kontaminasyonuna madencilik ve döküm işlemleri, endüstriyel üretim ve tüketim, metallerin ve metal içeren bileşiklerin evsel ve tarımsal kullanımı gibi antropojenik faaliyetler öncülük etmektedir. Aynı zamanda metal korozyonu, atmosferik birikim, toprak erozyonu ve ağır metal yıkanması, su kaynaklarından toprak ve yeraltı sularına geçen metallerin de birikime neden olduğu bilinmektedir. Aşınma ve volkanik patlamalar gibi doğal fenomenler de ağır metal kontaminasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Tchounwou et al., 2012).

Doğu Kazakistan bölgesinde yapılan bir çalışmada yabani bitki örtüsünde 6 aileden 18 tür olmak üzere toplam 100 bitki örneğinde Cu, Zn, Mn, Co, kurşun (Pb), Cd ağır metallerinin birikimi ve dağılımı incelenmiştir. Çalışma bölgesindeki yabani bitki örtüsünde Co'dan çok daha fazla miktarda Pb içeriğine rastlanmıştır. Ağır metallerdeki maksimum değişim %72'lik oranla Cd ve %62'lik oranla Mn'de gözlenirken, minimum değişim Zn'da %25'lik oranla gözlenmektedir. Elde edilen verilere göre Cu, Mn, Co ve Pb bitkiler tarafından ortalama emilim seviyesine sahipken, Zn ve Cd bitkiler tarafından yüksek emilim seviyesine sahip olduğu gösterilmektedir. Co, Pb ve Cd'un birikimi bitki köklerinde maksimum, gövdelerinde minimum olduğu saptanmıştır (Sassykova et al., 2020).

Bir başka çalışmada ise Güneydoğu Hindistan'daki Palk Körfezi'nde ağır metal birikimi üzerine yapılan analizlerde Cd, Pb, Cu ve Zn ağır metal konsantrasyonlarının, deniz çayırları türleri arasında önemli ölçüde değişiklik gösterdiği ve bazı türlerin diğer türlere kıyasla daha yüksek Cd ve Pb birikimi kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca belirlenen ağır metal konsantrasyon yoğunluğunun geçmiş yıllardaki verilerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde artışların meydana geldiği saptanmıştır (Gopi et al., 2020).

Zea mays fideleri, letal olmayan dozlarda Zn, Ni, Cd ve Cu stresine maruz bırakıldıktan sonraki 14. ve 21. günlerde kök, yaşlı yaprak ve genç yapraklarda; büyüme, absisik asit (ABA) seviyesi ve redoks değişiklikleri için ölçümler yapılmıştır. Uygulanan ağır metal stresleri, tüm organlarda endojen metal seviyelerinde önemli artışa neden olurken en yüksek artış mısır köklerinde gözlenmiştir. Mısır biyokütlelerinin ağır metal stresi altında önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Hatta yaşlı yaprakların köklere göre daha az ağır metal içeriği biriktirmelerine rağmen, biyokütlelerindeki azalmanın daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Ağır metal stresinin ABA birikimini ve özellikle yaşlı yapraklarda stoma kapanmasını tetiklediği belirlenmiş, bunun sonucunda fotosentezi azalttığı bildirilmiştir. Ağır metallerin mısır organlarında farklı seviyelerde oksidatif strese neden olduğu gözlemlenmiştir. Tokoferoller, polifenoller ve flavonoidler özellikle Zn, Ni ve Cu ağır metalleri maruziyetinde sürgünlerde artış gösterirken, Cd stresi altında önemli bir değişiklik göstermemiştir. Köklerde Cu ve Cd stresi altında SOD ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) aktiviteleri indüklenirken, askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi sadece yaşlı yapraklarda arttığı saptanmıştır (AbdElgawad et al., 2020). Ayrıca Cd ağır metali bitkilerde, fotosentetik aparat, karbonhidrat metabolizması, azot metabolizması, bazik mineraller ve su alımı dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri etkileyerek bitki büyümesini ve gelişimini engellemektedir (Peng et al. 2015). Cd, sinyalleşme reseptörlerini bloke ederek çeşitli işlev bozukluklarına neden olabilirken ATP sentezinin azalması, enzim aktivitesinin inhibisyonunu ve ROS oluşturulmasını da tetiklemektedir (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). Cd maruziyetinin sebep olduğu bitki büyüme inhibisyonu, kök ucu nekrozuna sebep olan, hücre zarı geçirgenliğini etkileyen, kök ve sürgünler tarafından iyon taşınımını azaltan bir problem olduğu bildirilmiştir (Ouzounidou et al., 1997). Bu nedenle, Cd metalinin bitki metabolizmasına alımı, birikimi, yer değiştirmesi ve detoksifikasyonunun altında yatan moleküler mekanizmaları açıklamak önemlidir.

Nitekim, son yıllarda yapılan çalışmalarda Cd'un bitkilerin genetik materyalinde meydana getirdiği değişimler ve sonuçları daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. Mevcut bir çalışmada $0.5 \times MS$ ortamında hidrofonic olarak büyütülen Arabidopsis thaliana fideleri $0-2,5 \text{ mg L}^{-1}$ arasında 5 farklı dozda Cd stresine maruz bırakıldıktan sonra fidelerin kökleri gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve akış sitometrisi (FCM) analizleri ile sırasıyla hücre döngüsünü düzenleyici genlerin ekspresyonundaki değişim ve DNA hasar yanıt genleri ile ilişkili olan hücre döngüsünün ilerlemesindeki değişiklikler araştırılmıştır. Cd stresinin, Arabidopsis fidelerinde kök büyümesini ve klorofil içeriğini azalttığı bildirilmektedir. Cd stresinin hücre döngüsündeki etkileri FCM ile incelendiğinde stresin G0/G1, G1/S, G2/M fazlarını bloke ettiği tespit

edilmiş ve hücre döngüsünü düzenleyici genlerin hücre proliferasyonu (PCNA 1 ve PCNA 2), G1/S fazı (Histon H4 ve E2Fa) ve G2/M fazı (WEE1, CDKA;1 ve CYCB1;1) ekspresyonundaki değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir. Ek olarak, DNA hasar yanıt genlerinin (MRE11, BRCA1, MLH1, MSH2, MSH6) ekspresyonundaki değişimleri indüklediği bildirilmiştir. (Cui et al., 2017).

Sphagnum palustre, çayır yosunu üzerine yapılan çalışmada ise 10^{-4} M Cd stresine maruz kalan yosunların 24-48 saat içerisinde öldüğü ve aynı dozdaki Pb stresine maruz kalan yosunların tolere ettiği belirlenmiştir. Yapılan basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (ISSR) analizi, her iki ağır metale maruz kalmış bitkilerin bant profillerinde doza bağımlı olarak, bir genotoksik etkinin varlığını belirten varyasyonların oluştuğu ve genom stabilitesinde genel bir azalmaya neden olduğu gösterilmektedir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizinde, iki metalin organizmada hücreler arası geçişinde farklı yollar izlediği gözlemlenmiştir. Cd çoğunlukla hücrelere girerek çözünürken, Pb ise büyük ölçüde çözünmeyip parçacıklar şeklinde çökelmiştir (Sorrentino et al., 2017).

Değişmiş çevresel koşullar altında bitki değişen şartları algılayarak zarar görmeyi önleyecek şekilde, strese karşı yeniden bir homeostasis kurmayı amaçlayarak aktif bir süreç başlatır (Kosová et al., 2007). Bitkilerin başvurdukları stratejiler, metabolik yollardaki fizyolojik değişiklikleri ve kalıtsal olabilen gen ifadesi durumlarındaki değişiklikleri içermektedir (Boyko and Kovalchuk, 2008).

Cd stresi altında büyüyen şeker kamışında (*Saccharum officinarum*) morfolojik değişimler, antioksidan enzim aktivitesi ve fitokelatin sentaz (SoPCS) gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. *S. officinarum* bitkisinin kontrol grubuna kıyasla Cd stresinin bitki büyümesinde ve biyokütlelerinde azalmaya neden olduğu belirtilmektedir. Cd maruziyetinden sonra bitkilerde kloroz ve nekroz gözlemlenmiştir. Kontrol bitkilerine kıyasla Cd stresi altında büyüyen şeker kamışlarında doza bağlı olarak epidermiste stroma yoğunluğunun önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir. Artan Cd konsantrasyonu şeker kamışı yapraklarının pigmentasyonunda görev alan klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarı azalırken karotenoidlerin artmasına neden olmuştur. Yapraklardaki APX, guaiakol peroksidaz (POX), CAT enzimlerin aktivitesi artarken toplam protein konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir. Şeker kamışında qRT-PCR ile analiz edilen SoPCS gen ekspresyonu Cd stresi altındaki yapraklarda ve köklerde farklılık göstermiştir. Farklı Cd konsantrasyonları yapraklarda farklı ekspresyon seviyelerine neden olduğu bildirilmiştir. Başlangıçta (100 μ M) SoPCS gen ekspresyon seviyesini artarken daha sonraki dozlarda kademeli olarak azaldığı saptanmıştır. Köklerdeki SoPCS gen ekspresyonu seviyesindeki artışların her dozda çok daha

belirgin olduğu analizler sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Kontrol grubuyla en yüksek doz arasındaki SoPCS gen ekspresyon seviyesindeki artışın yedi kat olduğu gösterilmektedir (Yousefi et al., 2018).

Bir başka çalışmada *Triticum aestivum*'a uygulanan Cd stresi ve salisilik asit (SA) sonucunda SA birikimi ile indüklenen protein kinazın (SIPK) gen ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki çalışılmıştır. Cd maruziyetinin, konsantrasyona bağlı olarak endojen SA seviyesini ve SIPK'nin ekspresyon seviyesini artırdığı bildirilmiştir. SIPK ekspresyonunun indüksiyonu, endojen SA birikiminden önce gerçekleşmiştir. Köklerde, yapraklarda olduğundan daha yüksek SIPK indüksiyonu gözlenmiştir. SIPK ekspresyonunun aynı eğilimi hem Cd hem de SA ile muamele edilmiş bitkilerde tespit edilmiştir. Ancak daha sonra ekspresyonunun kontrol seviyesine hatta daha altına hızla düştüğü belirtilmiştir. SIPK'nin indüksiyonu her durumda geçici olduğu bildirilmektedir. Sonuçlar, SIPK'nin Cd stres tepkisini ve eksojen SA kaynaklı sinyal verme sürecini başlatmada bir role sahip olduğunu göstermiştir (Tajti et al., 2019).

Gen ifadesini değiştiren en önemli epigenetik mekanizmalardan biri de DNA metilasyonudur. Bu mekanizmanın bitki genomlarında epigenetik etkilerin ve sonuçların başlıca kaynağı olduğu bilinmektedir. DNA metilasyonu, metil transferaz enzimi aracılığıyla bir metil grubunun (-CH₃) deoksisitozinin (dC) pirimidin halkasının 5' karbonuna eklenmesi ve 5-deoksimetilsitidin (dmC) yapısının oluşması olayı olarak açıklanmaktadır. Ökaryot organizmalarda metil transferaz enziminin CpG (sitozin-fosfat-guanin) adacıklarında daha etkin olduğu bilinmektedir. Bitki genomlarında memeli genomlarından farklı olarak CHG ve CHH adacıklarının (H bazı A, T veya C olmak üzere) da olduğu bilinmektedir (Bewick and Schmitz, 2017). DNA metilasyon seviyesinin çok yüksek (hipermetilasyon) veya çok düşük (hipometilasyon) oluşu DNA replikasyonu ve onarımı, gen transpozisyonu ve transkripsiyonu, hücre farklılaşması ve gen suskunluğu, imprinting, biyo-savunma, transgen ifadesi, hücrede yabancı gen ifadesinin de yer aldığı birçok genetik fonksiyonu etkilemektedir. Bitkilerde DNA metilasyonu canlılık, üretkenlik, üreme, genetik sağlık, tuza, kurağa, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılıkla ilgili olabilmektedir. Metilasyon genellikle gen ekspresyonunu susturması olarak ortaya çıksa da bu durum genel bir kural olarak düşünülmemektedir. Promotör ve gen kısımları metilasyon düzeyleri ve içerikleri ile gen fonksiyonuna bağlı olarak metilasyon düzeylerinde farklılıklar tespit edilmiştir (Law and Jacobsen, 2010; Vanyushin and Ashapkin, 2011; Feng et al., 2016; Bewick and Schmitz, 2017; Brutigam and Cronk, 2018; Ramirez-Prado et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Bir çalışmada Cd stresinin *Posidonia oceanica*'daki DNA metilasyon düzeyindeki etkileri ile kromatinin yeniden yapılandırılması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Stres faktörü bitkiye; kısa süre (6 saat) ve uzun süre (2-4 gün) olmak üzere düşük ve yüksek dozlarda uygulanmıştır. Cd stresi apikal uçtan ve yapraklardan alınan örneklerde önemli bir metal tolerans geninin (PoMT2k) transkripsiyonun indüklenmesine yol açmıştır. Hem apikal uçtan hem de yapraklardan alınan örnekler MSAP yöntemiyle analiz edilmiş ve DNA metilasyon seviyelerinde hızlı artışların meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada Cd'un kromozom desenini değiştirdiği de bildirilmektedir (Greco et al., 2012).

Başka bir çalışmada Cd'un gen ifadesi ve DNA metilasyonu üzerinde olan etkisi *Nicotiana benthamiana* bitkisinde araştırılmıştır. Cd stresine maruz bırakılan bitkide NbMORC3, NbMUT ve NbBG genlerinde metillenen kısımların CG ve CHG bölgeleriye, NbHGSNAT geninde CHH bölgesi olduğu saptanmış ve bu durum metillemede farklı enzimlerin aktif olduğunu göstermiştir. Aynı genlerin ekspresyon seviyelerinin ise metilasyon seviyeleriyle paralellik göstermediği saptanmıştır (Xin et al., 2019) .

Yapılan literatür çalışmasında bölgeye özgü DNA metilasyon seviyesini saptamak için çeşitli tekniklerin var olduğu görülmüştür. Bu teknikler genellikle bisülfıt konversiyon temelli tekniklerdir. Bunlar içerisinde en çok kabul gören bisülfıt genomik sekans metodu ise; DNA'nın küçük bir bölgesindeki tüm CpG dinükleotitlerindeki metilasyonu belirlemede kullanılan en yüksek kararlılığı ve bilgiyi sağlayan metot olarak bilinmektedir. Ancak bu yöntem zaman ve maliyet gereksinimleri nedeniyle çok sayıda lokusun araştırılması için uygun değildir. Buna karşın yine sodyum bisülfıt konversiyonu kullanan Ms-SNuPE (Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension) ve COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) gibi daha az sayıda CpG dinükleotiti araştıran nicel teknikler daha kullanışlıdır. Bunların en önemli avantajları daha kısa sürede sonuç vermeleridir. Ancak, jel elektroforezi ve ardından yoğunluk ölçümü ile analiz gerektirmelerinden dolayı kararlılıkları düşüktür. QMSP (Quantitative Methylation-specific PCR) ve QAMA (Quantitative Analysis of Methylated Alleles) teknikleri ise zaman kazandıran real time PCR teknolojisini kullanmaktadırlar. Ancak yine de bisülfıt konversiyon adımını içermeleri en büyük dezavantajlarıdır (Marina, 2020). Sodyum bisülfıt kullanımının numunede aşırı DNA kaybına ve sıklıkla tamamlanmamış dönüşümlerin gerçekleşmesine yol açabildiği bilinmektedir. Bu nedenle biz sodyum bisülfıt ile muamele edilmeden genomik DNA'nın metilasyona duyarlı ve metilasyona bağlı restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmesini ve ardından real time PCR yöntemi ile ölçülmesini içeren bir tekniği değerlendirmekteyiz. Bu teknik Quantitative Analysis of DNA Methylation using Real-time PCR (qAMP) olarak isimlendirilmektedir.

Uzun zamandır memeli dokularında kullanılmaktadır. Son zamanlarda ise bitki temelli çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Choi et al., 2021). qAMP tekniğinin bisülfid konversiyon için gereken ek süre olmadan hızlı, tekrarlanabilir ve doğru sonuçlar verdiği bilinmektedir. Bu uygulama başlangıç materyalinin daha az miktarda kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca literatürde bölgeye özgü DNA metilasyonu veya DNA'nın tekli bölgelerindeki metilasyon analizinde hızlı, nicel bir yöntem olarak önerilmektedir (Oakes et al., 2006).

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda Cd stresine karşı yanıt mekanizmasında pek çok gen görev almaktadır ve bu genlere dahil olan UGT-3 (UDP- glikoziltransferaz), aquaporin PIP-1 (Plazma zarı İçi Protein) ve LTP-4 (Lipit Transfer Protein) genlerinin ekspresyonunda DNA metilasyonunun rolü bildirilmemiştir (Peng et al., 2015). Glikoziltransferazlar (GT'ler) glikozilasyondan sorumlu enzimlerdir. Glikozilasyon, tüm canlı organizmalarda yaygın bir hücrel modifikasyon reaksiyonu olup, hidroksil veya biyosentetik yoldaki bir molekülün diğer fonksiyonel grubuna karbonhidrat bağlanması olarak tanımlanmaktadır. Böylece çeşitli biyo-moleküllerin kimyasal özelliklerini, hücre altı yerlerini ve aktivitelerini değiştiren bir ko-translasyon ve post-translasyon modifikasyonu gerçekleştirmektedir. GT'ler 94 aileye ayrılabilir, bu ailelerden biri UDP- glikoziltransferazlar (UGT'ler) olarak adlandırılır ve bitkilerde en yaygın bulunan glikoziltransferazlardır. TaUGT-3 geni buğdayda bulunan UDP- glikoziltransferaz genidir. TaUGT-3 geninin DON (Deoxynivalenol) birikimini kontrol ettiği, buğday bitkilerinde FHB (Fusarium head blight) enfeksiyonuna karşı pozitif bir regülatör olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Zhao et al., 2018).

Aquaporinler ise, su ve/veya diğer küçük çözünenlerin hücre zarlarından geçişini kolaylaştıran çok işlevli kanallardır. Plazma zarı İçi Proteinleri (PIP'ler) olarak bilinen yüksek oranda korunmuş bitki aquaporinleri, hücre zarı su değişimi için ana geçiricilerdir. PIP'ler temel olarak; PIP-1 ve PIP-2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda PIP-1 ekspresyonundaki azalışın kök ve çiçek organlarında hidrolik iletkenlikte önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Postaire et al., 2010). PIP-1 geninin aşırı eksprese olduğu bitkilerde, su kullanım verimliliğinde (Ding et al., 2004), fotosentez oranında (Flexas et al., 2006) veya büyüme oranlarında (Liu et al., 2013) önemli değişiklikler sergilediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, PIP'lerin aşırı ekspresyonu (veya baskılanması) aynı şekilde stres direncini iyileştirmede başarıya ya da başarısızlıklara yol açmıştır (Martinez-Ballesta and Carvajal, 2014) . Tuz, kuraklık ve düşük sıcaklıklar gibi abiyotik stres toleransı, embolizm ve çimlenme dahil olmak üzere fizyolojik ve patolojik süreçlere katılan PIP1'in

analizi, bitki suyu homeostazındaki rolünün anlaşılmasına katkı sağlamıştır (Yanef et al., 2015).

Küçük ve bazık proteinler olan bitkilere non-spesifik lipit transfer proteinleri (nsLTP'ler), lipit moleküllerinin zarlar arasında in vitro transferini kolaylaştırmaları ile bilinmektedir. Sınıflandırmalarına göre, LTP'ler moleküler ağırlıklarına göre iki büyük aileye ayrılır: LTP-1 (9 kDa) ve LTP-2 (7 kDa) (Wang et al., 2008). Yapıları bakımından, bitki LTP'leri, sekiz sistein kalıntıları ile korunmuş dört disülfür bağının ve yağ asitleri gibi çeşitli hidrofobik molekülleri ile etkileşime girebilen proteinler olarak karakterize edilmektedirler (Han et al., 2001). Bitkilerdeki LTP'lerin, kutikula oluşumu, patojen saldırılarına karşı savunma yanıtı ve bitki sinyali gibi birçok biyolojik süreçte kilit rol oynadığı düşünülmektedir. LTP genlerinin kuraklık, düşük sıcaklıklar, yüksek tuzluluk gibi abiyotik stresler tarafından da uyarıldığı düşünülmektedir (Nielsen et al., 1996; Gomès et al., 2003). LTP gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ABA ile SA'lar, etilen ve metil jasmonat gibi fitohormonların rol aldığı bilinmektedir (Carvalho and Gomes, 2007). LTP-1 gen transkriptleri ve bu transkriptlere karşılık gelen proteinler esas olarak hava organlarının epidermal dokusunda bulunur ve kutikula monomerlerinin taşınmasını sağlamaktadır. Oysaki, LTP-2 gen transkriptleri mantar doku monomerlerinin taşınmasını sağlarlar ve köklerde bol miktarda bulunurlar (Yubero-Serrano et al., 2003). LTP-4 geni ise ilk kez buğday bitkisinde keşfedilmiştir. NaCl, ABA ve H₂O₂ dahil olmak üzere çeşitli stres koşulları altında bitki gelişiminde LTP-4 geninin aşırı ekspre edildiği gösterilmiştir. Ek olarak, LTP-4'ün hücredeki lokalizasyonu periferik hücrelerin katmanları ve transgenik dizilerin bulunduğu yaprakların hücre duvarları olarak tespit edilmiştir (Safi et al., 2019). LTP-4'ün yaşa ve çoklu abiyotik strese bağlı olarak, ayrıca dokuya özgü desenlerin oluşumunda β -glukuronidazın (GUS) gen ekspresyonunu yönlendirme yeteneğinin bulunduğu ve GUS aktivitesinin *Arabidopsis* fidelerinin gelişimi sırasında 8 ve 12 günlük genç yaprak dokularında olduğu tespit edilmiştir (Fleming et al., 1992). Bu sonuçlar, LTP gen ekspresyonunun genç yapraklarında yaşlı yapraklara göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Safi et al., 2019).

Buğday bitkisinin tüketim yelpazesinin geniş olması, laboratuvar şartlarında yetiştirilmesinin kolay ve hızlı olması ayrıca bilimsel çalışmalarda oldukça yaygın kullanılması gibi birçok avantaj buğdayı tercih etmemizi sağlamıştır. Son yıllarda kullanılan kimyasal gübreler, yanlış sulama teknikleri, değişen iklim koşulları Cd'un topraktaki birikiminin artmasına neden olduğu ve böylece suda kolayca çözündüğü için bitki köklerinden absorbe edilmesini sağladığı görülmektedir. Cd'un etki mekanizmalarının henüz tam olarak aydınlatılmaması ve son yıllarda toprakta artan birikimiyle bilimsel çalışmaların odak noktası

haline gelmiştir. Belirlediğimiz genlerde (TaUGT-3, aquaporin PIP-1 ve LTP-4) Cd'a karşı oluşabilecek gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin bölgeye özgü DNA metilasyon seviyesini belirleyen qAMP tekniği ile saptayarak DNA metilasyonunun rolünü belirlemek ve anlamlandırmak amaçlanmıştır.



KURAMSAL TEMELLER

Ağır Metaller

Dünya, uyum içinde çalışan dört sistem ile tanımlanmaktadır. Bunlar: biyosfer (canlılar), atmosfer (hava), litosfer (kara) ve hidrosferdir (su). Çevresel kontaminatların bu dört sistemin herhangi bir bölümünde olması gerektiğinden daha yüksek seviyelerde bulunması çevresel kirliliğe yol açmaktadır (Briffa et al., 2020). Bu kontaminantların en önemlilerinden biri ise ağır metallerdir (Ahmad and Ansari, 2020; Hu et al., 2020)

Ağır metaller, yer kabuğunda ve yüzey toprağında doğal olarak bulunmaktadır. Doğal olarak oluşan ağır metallerin dağılımı oldukça heterojendir ancak bazı durumlarda topraktaki varlığı önemli ölçüde yüksek konsantrasyonlara çıkabilmektedir. Ağır metaller, akarsular, yeraltı suları, hava koşulları ve atmosferik döngü (örneğin rüzgâr, volkanik patlamalar, çökeltme, yağmur) gibi doğal yollarla diğer alanlara dağılabilmekte ve bu alanlarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Kentsel topraklarda ağır metal kontaminasyonu antropojenik faaliyetlerden kaynaklanmaktadır. Kırsal topraklarda yüksek ağır metal konsantrasyonlarının artması ise, pestisit ve gübre uygulamaları, tarım alanlarında kirlenmiş su ile sulama, yerel endüstriyel tesislerin kimyasal atıkları (Tablo 1), madencilik faaliyetleri, kanalizasyon sularının kullanımı, çöp sahaları gibi farklı kaynaklardan metallerin sızması ile gerçekleşmektedir. Ağır metal kontaminasyonunun çoğu uzun vadeli ve doğası gereği geri döndürülemez niteliktedir (Li et al., 2014; Hou et al., 2017; Wang et al., 2017).

Tablo 1. Temel Endüstrilerin Atıklarında Saptanan Bazı Ağır Metaller (Rether, 2002)

Endüstri	Cd	Sn	Cu	Pb	Hg	Ni	Cr	Zn
Gübre Sanayi	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Petrokimya	✓	✓		✓	✓		✓	✓
Kağıt Endüstrisi		✓	✓	✓	✓	✓		
Termik Enerji Üretimi	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Klor-Alkali Üretimi	✓	✓		✓	✓		✓	✓
Demir-Çelik Sanayi	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Ağır metaller, suyla karşılaştırıldığında nispeten yüksek bir yoğunluğa sahip metalik elementler olarak tanımlanmaktadır. Çevresel parametrelerdeki eser miktarlarda varlıklarından dolayı iz elementler olarak düşünülmektedir (Tchounwou et al., 2012). Ağır metaller doğada genellikle; toprak çözeltisi içerisinde organik materyallerle bileşik oluşturarak çökelti halinde, minerallerle bileşik oluşturarak ya da serbest radikaller ile şelatlı

bileşikler oluşturarak eriyik halde, farklı çözeltiler içerisinde çeşitli formlarda katı ya da iyon halinde bulunabilmektedir (Vareda et al., 2019) Ağır metaller organik maddelerden farklı olarak stabilitelerini korumakta ve biyolojik aktivitelere karşı dayanaklılık göstermektedir (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). Ayrıca, bitkilerde ve hayvanlarda esansiyel olan ağır metaller biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarda da kullanılmaktadır (Tablo 2). Co, Cr, Ni, Fe, Mo, Cu, Mg, Mn, Se, Zn gibi metaller çeşitli biyomedikal ve fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan esansiyeller olarak sınıflandırılmaktadır (WHO, 1996). Bu esansiyel metaller bazı ana enzimlerin önemli bileşenleridir ve oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde temel roller almaktadır. Metaller, metalloproteinler içinde yapısal destek sağlamak, enzimatik kofaktörler olarak hizmet etmek ve elektron taşınmasına aracılık etmek gibi üç ana işlevi yerine getirmektedir. Örneğin; Mn insanda, bağışıklığın düzenlenmesi, kan şekeri ve hücrel enerji düzenlenmesi, üreme, sindirim, kemik büyümesi, kan pıhtılaşması, hemostaz ve reaktif oksijen türlerine karşı savunmada gerekli olduğu bilinmektedir. Başka bir ağır metal olan Fe, hemoglobin, miyoglobin ve sitokromlar dahil olmak üzere birçok enzim için vazgeçilmez bir bileşendir. Fe, elektron transfer eden ve redoks reaksiyonlarına aracılık eden katalitik bir alt birim olarak görev almaktadır. Fe'in bu önemli rollerine rağmen, organizmada bulunan yüksek Fe miktarı, yüksek oksitlemeye sebep olur ve fenton reaksiyonu yoluyla ROS oluşumunu indüklediği için zararlıdır (Tchounwou et al., 2012; Wang et al., 2020).

Tablo 2. Bazı Ağır Metallerin Ekolojik Sınıflaması (Yıldız, 2004)

Element	g/cm ³ özgül ağırlık	Kirletici olup olmadığı	Bitki ve hayvan için gereklilik
Ag (Gümüş)	10,5	K	–
Cd (Kadmiyum)	8,5	K	–
Co (Kobalt)	8,9	K	G
Cu (Bakır)	8,9	K	G
Hg (Civa)	13,6	K	-
Mn (Mangan)	7,4	-	G
Pb (Kurşun)	11,3	K	-
Ni (Nikel)	8,9	K	G
Pt (Platin)	21,5	-	-
Tl (Talyum)	11,9	K	-
Sn (Kalay)	7,3	K	-
V (Vanadyum)	6,1	K	G
W (Tungstem)	19,3	K	G
Zn (Çinko)	7,1	K	G
Zr (Zirkon)	6,5	-	-
Cr (Krom)	7,2	K	G
Fe (Demir)	7,9	K	G
Mo (Molibden)	10,2	K	G
U (Uranyum)	19,1	K	G

Ağır metaller, insan vücudunun metabolik işlevlerini de çeşitli şekillerde etkilemektedir. Beyin, kalp, karaciğer ve böbrekler gibi insan vücudunun önemli organlarında birikerek normal biyolojik fonksiyonları bozmaktadır. Dahası çok sayıda çalışma, ağır metallerin kanserojen ve mutajenitesinin oksidatif stres indüksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Lang-Mladek et al., 2010; Secco et al., 2015; Chwialkowska et al., 2016; Li et al., 2016; Ganguly et al., 2017; Liu et al., 2017). Depolanan ağır metaller vücudun ana metabolik süreçlerini yok etmekte ve antioksidanların dengesizliğine neden olmaktadır. Benzer şekilde çeşitli hormonların aktivitesi ve önemli enzimlerin işlevi de etkilenmektedir (Fu and Xi, 2020). Bu konuda yapılan bazı çalışmalar biyolojik sistemlerde redoks reaksiyonlarının Ni, Cr, Co ve As gibi kanserojen metal iyonları tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu reaksiyonlar tarafından üretilen serbest radikaller, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara neden olmaktadır. DNA doğrudan zarar görmemesine rağmen, bu redoks reaksiyonları sonucunda oluşan ürünlerin, insanlarda kanserle ilişkili redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve mitotik bir sinyale neden olduğu bildirilmektedir (Genestra, 2007). Bu mekanizmalar vücuttaki nörotransmitterlerin sentezini ve uygulamasını değiştirmekte ve bu durum merkezi sinir sisteminde düzensizliklerin oluşmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, insan metabolizmasında farklı kanser türlerine, bozulmuş böbrek fonksiyonuna, nörolojik hastalıklara ve diğer endokrin hastalıklara yol açabilen bir süreç gerçekleşmektedir (Genestra, 2007; Sall et al., 2019; Fu and Xi, 2020). İnsanların ağır metal maruziyeti toprakla teması sonucunda ya doğrudan alım ya da bitkisel ve hayvansal ürünler yoluyla dolaylı yoldan olmaktadır. Ağır metaller son yıllarda besin zincirimizin önemli bir parçası olan bitkiler için de tehdit oluşturmaktadır.

Ağır metallerin bitkilerdeki toksik etkileri ise, bitki türüne, özellikle metalin miktarına, kimyasal formuna, toprak bileşimine ve ayrıca toprağın pH'sına bağlı olarak değişmektedir. Ağır metaller sadece toksik olarak kabul edilmekle kalmaz, aynı zamanda bazılarının bitkinin büyümesi için eser miktarlarda gerekli olduğu kabul edilmektedir (Tablo 2). Ağır metallerden bazıları bitkilerde, redoks tepkimelerinde rol almakta ve enzimatik reaksiyonların kofaktörü veya aktivatörü olarak görev yaparak reaksiyonları başlatmak, aktivitelerini arttırmak için enzimlerle bağlanmaktadır. Bitkiler için esansiyel olmayan ağır metallerin parçalanması zor olmakta ve metabolize edilememektedirler. Bunlara ek olarak, biyo-birikimli doğaları nedeniyle bitki bünyesinde kolayca birikmektedirler. Bitkiler genelde bu ağır metalleri kökleri aracılığıyla metabolizmalarına almaktadır, ancak bitkinin diğer organlarına da taşınabilmekte ve taşındıkları organlarda birikebilmektedir (Ahmad and Ansari, 2020).

Ağır metal birikimi, bitkinin dengeli işleyişini bozmaktadır. Bitki hücrelerinde bulunan moleküllerin fonksiyonel grupları bu birikimle birlikte, sitoplazmik zarın yapısına müdahale etmekte, sürekli olarak fotosentezi, solunumu, enzimatik aktiviteleri baskılamakta ve pigmentlerin normal işleyişi engellenmektedir (Emamverdian et al., 2015). Oksidasyon durumlarına bağlı olarak, ağır metaller oldukça reaktif olabilir ve bu bitki hücrelerinin birçok yönden toksisitesine neden olur. Hücresel ve moleküler düzeyde, ağır metal toksisitesi, enzimlerin, proteinlerin inaktivasyonu ve denatürasyonu, metabolik olarak önemli moleküllerin fonksiyonel gruplarının bloke edilmesi, temel metal iyonlarının biyomoleküller ve fonksiyonel hücresel birimler ile yer değiştirmesi, konformasyonel değişiklikler, membran bütünlüğünün bozulması, fotosentez ve solunum inhibisyonu dahil olmak üzere farklı bitki fizyolojik süreçlerinde değişikliklere neden olmaktadır. Ağır metallerin, serbest radikallerin ve singlet oksijen ($^1 O_2$), süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyarak redoks homeostazını bozduğu da bilinmektedir (Hossain et al., 2012) .

Kadmiyum (Cd)

Cd başlıca ağır metallerin arasında yerini almakta ve toprakta genellikle düşük konsantrasyonlarda doğal olarak bulunmaktadır. Wagner'e (1993) göre, kirlenmemiş toprakların toprak çözeltisindeki Cd konsantrasyonu 0,04-0,32 μM , orta derecede kirli topraklar ise 0,32–1,00 μM Cd içermektedir. Fakat antropojenik faaliyetler ve doğal süreçler nedeniyle Cd birikimi normal konsantrasyonların üzerine çıkabilmekte ve bu durum toprağın kirlenmesine neden olmaktadır (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). Cd, korozyona karşı koruyucu özellik gösterdiği için boya, gemi, sanayi ve elektronik gibi alanlarda da kullanıldığı bilinmektedir. Ancak, biyolojik olarak ömrünün uzun olması ve düşük konsantrasyonlarda bile gösterdiği yüksek etkisinden dolayı en toksik ağır metaller arasında sıralanmaktadır. Cd, Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC, 1993) ve Ulusal Toksikoloji Programı (NTP, 2000) tarafından Grup-1 kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca Cd'un suda oldukça kolay çözünmesi su kaynaklarının kontaminasyonuna ve su kaynaklarındaki canlı türlerinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, atık suların ve arıtma çamurlarının tarım arazilerinde bilinçsiz kullanımı, toprak için uygun olmayan gübre ve tarım ilacı kullanımı, toprak ve su kaynaklarında Cd kontaminasyonunun artmasına neden olmaktadır. Özellikle tarım topraklarına uygulanan fosforlu gübreler ile toprakta biriken Cd miktarının artış gösterdiği yapılan araştırmalar ile desteklenmiştir (Yerli ve ark., 2020).

Cd, besin zincirine tüm ağır metaller gibi bitkiler sayesinde dahil edilmektedir. Aslında Cd bitkiler için esansiyel bir element değildir, fakat Cd maruziyetine uğramış

topraklarda bitki bünyesine kolayca absorbe edilmektedir (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). Cd'un absorpsiyonu, $CdCl^+$, $CdCl_2$ ve $CdSO_4$ gibi inorganik Cd kompleksleri (Tablo 3) veya fitometallofor kompleksleri gibi organik kompleksler olarak da meydana gelmektedir (Hasan et al., 2009). Cd iyonlarının absorpsiyonu, aynı transmembran taşıyıcısı boyunca potasyum (K), kalsiyum (Ca), Mg, Fe, Mn, Cu, Zn ve Ni gibi elementlerle rekabet halinde gerçekleşmektedir. Cd, kök korteks yoluyla stele ve oradan da ksilemden sürgünlere simplastik yolla taşınmaktadır. Aynı zamanda floemle bitki metabolizmasına da katılmaktadır (Pál et al., 2006). Cd, sülfidril ligand gruplarıyla bağ oluşturmakta, N ve O ligand gruplarına da bağlanmaktadır. Bu nedenle ksilem özsuyundaki sistein ve diğer sülfidril içeren bileşikler (fitoşelatinler, glutatyon vb.) ve çeşitli organik asitler (sitrat) ve diğer amino asitler Cd'un köklerden sürgünlere taşınmasında önemli rol oynamaktadır (Hasan et al., 2009).

Tablo 3. Kadmiyum Ağır Metalinin Kimyasal Formları (IARC, 2012)

Kimyasal İsim	CAS Kayıt Numarası	Sinonim	Formül
Kadmiyum	7440-43-9	Kadmiyum metali	Cd
Kadmiyum asetat	543-90-8 (24 558-49-4; 29 398-76-3)	bis(asetoksi)-kadmiyum; kadmiyum (II) asetat; kadmiyum diasetat; kadmiyum etanoat	$Cd(CH_3COO)_2$
Kadmiyum karbonat	513-78-0 [93820-02-1]	Karbonik asit, kadmiyum tuzu; kadmiyum karbonat ($CdCO_3$); kadmiyum monokarbonat	$CdCO_3$
Kadmiyum klorür	10 108-64-2	Kadmiyum diklorür; diklorokadmiyum	$CdCl_2$
Kadmiyum hidroksit	21 041-95-2 (1 306-13-4; 13 589-17-8)	Kadmiyum hidroksit ($Cd(OH)_2$); kadmiyum dihidroksit	$Cd(OH)_2$
Kadmiyum nitrat	10 325-94-7 (14 177-24-3)	Nitrik asit, kadmiyum tuzu; kadmiyum dinitrat; kadmiyum (II) nitrat	$Cd(NO_3)_2$
Kadmiyum stearat	2223-93-0	Kadmiyum distearat; kadmiyum oktadekanoat; kadmiyum(II) stearat; oktadekanoik asit, kadmiyum tuzu; stearik asit, kadmiyum tuzu	$Cd(C_{36}H_{72}O_4)$
Kadmiyum sülfat	10 124-36-4 (62 642-07-3) [31119-53-6]	Kadmiyum monosülfat; kadmiyum sülfat; sülfürik asit, kadmiyum tuzu (1:1)	$CdSO_4$
Kadmiyum sülfür	1306-23-6 (106 496-20-2)	Kadmiyum monosülfür; kadmiyum portakalı; kadmiyum sarısı	CdS
Kadmiyum oksit	1306-19-0	Kadmiyum monoksit	CdO
Kadmiyum-bakır alaşımı	37 364-06-0 12 685-29-9 (52 863-93-1) 132 295-56-8 132 295-57-9	Bakır baz, Cu, Cd Kadmiyum baz olmayan, Cd, Cu Bakır alaşımı, baz, Cu 99,75–100, Cd 0,05 0,15; UNS C14300 Bakır alaşımı, baz, Cu 99,60–100, Cd 0,1–0,3; UNS C14310	$Cd.Cu$

Bitkilerin bünyesine geçen Cd, karbonhidrat ve azot metabolizmasını değiştirmekte, enzim aktivitesini engellemekte, stomaların kapanmasına ve böylece transpirasyonla su kaybının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, Cd stresine maruz kalan bitkilerde K ve nitrat (NO_3) alımının azaldığı görülmüştür (Yerli ve ark., 2020). NO_3 alımının düşmesi ile bitkide sürgün gelişimi zayıflatmaktadır. Bunun sonucunda, birçok fizyolojik aktivite negatif etkilenerek bitkide yıkım olayları gerçekleşmektedir. Ayrıca NO_3 'ın toprakta zamanla aşırı birikmesi ise yeraltı sularına karışarak topraklarda ve sularda nitrat kirliliğine neden olmaktadır (Yerli ve ark., 2020).

Yapılan araştırmalarda, Cd toksisitesi elektron transferinin inhibisyonu nedeniyle fotosistem II'nin foto-aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Böylece, Cd yaprakların kloroplastlarındaki bozulma yoluyla ROS üretimine dolaylı olarak katkıda bulunabilmektedir. Yine, mitokondriyal elektron transfer zincirinde ROS gelişimini uyarabilmektedir (Haider et al., 2021).

Yüksek Cd konsantrasyonları daha fazla DNA hasarına ve DNA metilasyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir (Li et al., 2015). Buna karşın, *Arabidopsis thaliana* ile yapılan bir araştırmada AtFC1 geninin Cd maruziyeti ile transkripsiyonel olarak indüklendiği gösterilmektedir. AtFC1'in aşırı ekspresyonu, bitkilerde antioksidasyon kapasitesini geliştirdiği, birincil kök büyümesini, biyokütle ve klorofil konsantrasyonunu artırarak, dokularda reaktif oksijen türlerinin birikimini azaltarak Cd stresine karşı bitki toleransı sağladığı belirtilmiştir (Song et al., 2017).

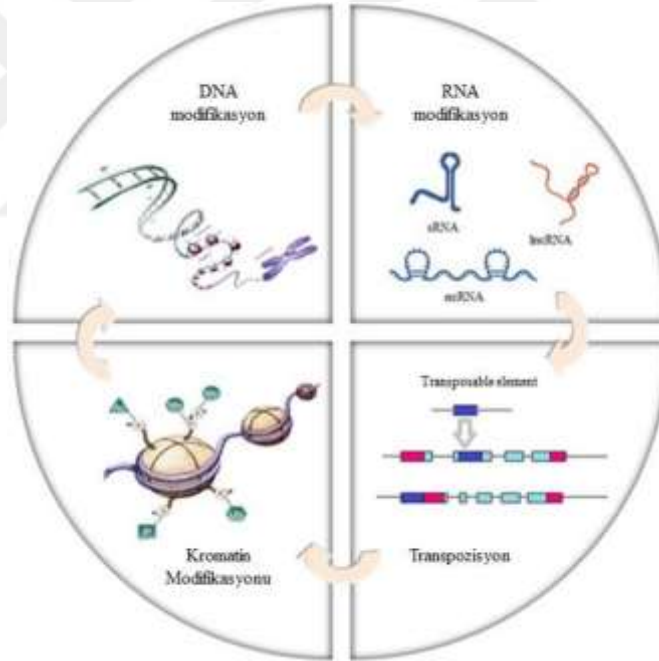
Epigenetik

Epigenetik terimi ilk olarak Conrad H. Waddington'un 1942 yılında 'Epigenotip' hakkında yazdığı bir makalede kullanılmıştır. Waddington bu terimi, genotip ve fenotip arasındaki bağlantının kurulması ve bu bağlantının gelişimsel süreçlerin bir karışımı olduğunu belirtmek için öne sürmüştür (Waddington, 1942). Epigenetik; organizmada veya hücredeki mevcut olan DNA diziliminde bir değişiklik meydana gelmeksizin; canlının çevre şartlarıyla olan etkileşimlerine ek olarak DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan ribonükleik asitler (RNA) gibi farklı düzenleyicilerin sürece katılmasıyla ortaya çıkan gen anlatımındaki değişimleri ve bunun sonucunda canlının kazandığı farklı özellikleri incelemektedir (Baulcombe and Dean, 2014).

Epigenetik etkiler, bireysel genomda fenotipik plastisiteye katkıda bulunurken nesiller arasında ise kalıtsal varyasyona katkıda bulunmaktadır. Epigenetik varyasyon çevre tarafından değiştirilebilmekte, bu değişimler kararsız ve geri dönüştürülebilir olabilmektedir

(Grativol et al., 2012). Bitkilerdeki epigenetik yolların çeşitliliği oldukça dikkat çekicidir ve bu çeşitliliğin bitkilerin post-embriyonik gelişimlerinde gösterdikleri fenotipik plastisite vasıtasıyla değişken çevre şartlarında hayatta kalabilmeye katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Marin et al., 2020). Ayrıca bitkiler, epigenetik düzenlenmelerin en iyi gözlemlendiği canlı grubu olarak da tanımlanmaktadır. Transpozonların inaktivasyonu, genetik materyalin atasoydan kalıtılmasına bağlı olarak farklı ekspresyon seviyeleri (genomik imprinting), paramutasyon ve gen susturulması gibi pek çok klasik epigenetik olgu ilk kez bitkilerde keşfedilmiştir (Köhler and Springer, 2017). Buna ek olarak epigenetik açıdan en çok araştırılan bir diğer grup olan memelilerin de dahil olduğu çeşitli ökaryotik organizmalarda tespit edilmiş temel epigenetik mekanizmaların tamamının bitkilerde de işlevsel olduğu bilinmektedir (Baulcombe and Dean, 2014; Pikaard and Scheid, 2014; Köhler and Springer, 2017).

Dolayısıyla epigenetiği düzenleyen mekanizmaların anlaşılması, çevresel faktörlerin etkileri ile primer DNA sekansı içindeki genetik bilginin ekspresyonundaki değişiklikler arasındaki bağlantının da daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır (Şekil 1).



Şekil 1. Epigenetik düzenlemelerin genel şeması (Akgun, 2018)

Epigenetik mekanizmaların merkezinde yer alan histon modifikasyonları, RNA tabanlı mekanizmalar ve DNA metilasyonu genellikle "epigenetiğin üç temeli" olarak anılmaktadır (Grant-Downton and Dickinson, 2005)

Histon modifikasyonları

Histon modifikasyonları, genlerin ekspresyonu veya susturulması, DNA onarımı ve kromatin yoğunlaşması gibi bir dizi hücresel olayı düzenlemektedir. Kromatin, nükleozom

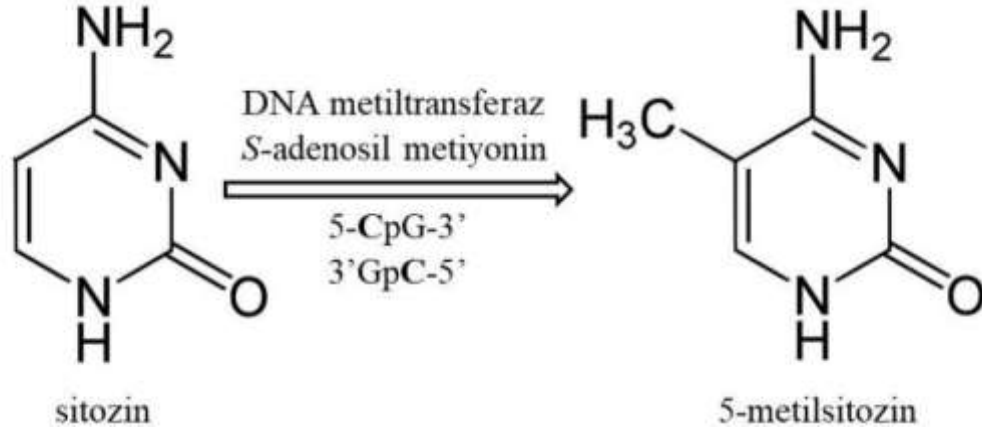
dizilerinin boncuk benzeri bir yapısından oluşur. Her nükleozom, etrafında 200-146 baz çifti (bp) DNA ipliği sarılı olan ikişer H2A, H2B, H3 ve H4 proteinlerinden oluşan oktamer bir yapıdır. Histon proteinlerinin N-terminal ve C-terminal kuyrukları, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi çeşitli modifikasyon kombinasyonlarının gerçekleştiği bölgeler bulunmaktadır. Histon modifikasyonları genellikle gen ifadesinin aktivasyonu ve susturulması ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Dahası, histon modifikasyonları, histon deasetilaz (HDAC) ve histon demetilazlar gibi spesifik enzimler tarafından tersine çevrilebilir, bu da kromatin durumlarında her an değişebilen etkin değişiklikler sağlamaktadır (Saze, 2008).

RNA temelli mekanizmalar

Epigenetik düzenleme, hedeflenen mRNA degradasyonu veya translasyonel inhibisyon yoluyla posttranskripsiyonel olarak gerçekleşmektedir. Bitkilerdeki transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası susturma mekanizmalarının ortak özelliği, small RNA'ların, özellikle mikro RNA (miRNA) 'ların veya “small interfering RNA (siRNA)” ların katılımıdır (Pikaard and Scheid, 2014) . miRNA ve siRNA'lar küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA parçacıkları sayesinde gerçekleşmektedir. Kodlamayan RNA'lar farklılaşma, hücre çoğalması, gelişim ve apoptozis gibi önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol almaktadır (Duempelmann et al., 2020).

DNA metilasyonu

Epigenetik kalıtımla kalıtılan özelliklerin temelinde DNA metilasyonu yatmaktadır. DNA metilasyonu, bir metil grubunun, kovalent şekilde DNA metiltransferaz (DNMT) enzimlerinin katalizlemesi sonucunda, bir CpG dinükleotidindeki sitozinin 5. karbon atomuna eklenmesiyle (Şekil 2) gen ifadesini değiştirerek canlıdaki hücre fonksiyonlarını farklılaştırmaktadır. Metilasyon, genetik olarak özdeş bireyler arasındaki fenotipik farklılıkların yanı sıra bu farklılıkların kalıtsal nitelik kazanmasında da rol oynamaktadır.



Şekil 2. Sitozine metil grubunun eklenmesi ile 5-metilsitozin bazının oluşması

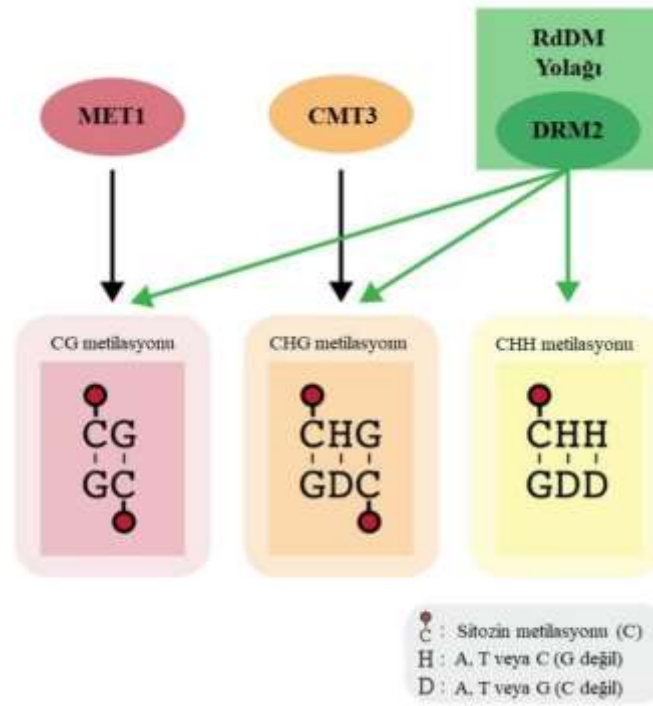
CpG adaları, yüksek oranda CG dinukleotidleri içeren genomik bölgeler olarak bilinmektedir. CpG adaları inaktif X kromozomu ve genomik imprintinge giden genler dışında tüm hücre tiplerinde metillenmemiş olarak görülmekte, genellikle Housekeeping genlerin promotor bölgeleri çevresinde yer almakta ve birçoğu transkripsiyon bağlanma bölgesi içermektedir (Vanyushin and Ashapkin, 2011).

DNA'nın bazlarından birine metil grubunun eklenmesi sonucu meydana gelen DNA metilasyonu, DNMT'ler tarafından katalizlenmektedir. Metil vericisi olarak S-Adenosil Metiyonin (SAM) kullanılmaktadır. Canlılarda birçok DNMT'nin var olduğu bildirilmekte ve ökaryotlarda tanımlı 5 farklı DNMT bulunmaktadır. Bunlar; DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L olarak isimlendirilmektedir (Zhang et al., 2018).

DNMT1 enzimi, replikasyon sırasında tek zinciri metillenmiş DNA'nın yeni zincirinin de metillenmesini sağlamaktadır. Yani, DNMT1, kalıp DNA zincirinin var olan metilasyonu yeni sentezlenen zincire de işlenmesini sağlamaktadır. Bu sayede DNA metilasyonu kalıtılabilmekte ve epigenetik bir işaret olarak mitoz ve mayoz bölünme süreçleriyle de nesilden nesile aktarılmaktadır. Bir diğer enzim olan DNMT2'nin ise moleküler yapısından dolayı bu enzimin DNA hasarının tespit edilmesinde, DNA rekombinasyonunda ve mutasyon tamirinde görev aldığı düşünülmektedir. DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L enzimleri, gametogenez, embriyogenez ve somatik doku gelişimi sırasında metilasyon oluşturulmasından sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B *de novo* metilasyonu gerçekleştirmektedir. *de novo* DNA metilasyonu oluşturulurken metillenmemiş DNA substrat olarak kullanılmaktadır. Embriyonik kök hücre ve erken embriyolarda DNMT3A ve DNMT3B'nin inaktive edilmesi *de novo* metilasyon eksikliğine neden olmaktadır. DNMT3L ise diğer *de novo* metiltransferazlara yardımcı bir protein olarak tanımlanmaktadır. DNMT

aktif bölge motiflerine sahip değildir. Fonksiyonu diğer *de novo* metiltransferazlarla beraber bulunmasına bağlıdır (Law and Jacobsen, 2010).

Bitkilerde bulunan DNA metiltransferaz enzimleri memelilerden farklıdır (Şekil 3). Bitkilerde metiltransferaz 1 (MET1), kromometilaz (CMT3) ve yeniden düzenlenmiş 1 ve 2 domain (DRM 1 ve DRM 2) enzimleri DNA metilasyonunda etkili olmaktadır. MET1 enzimi, DNA dizisinde 5'-CG-3' bölgelerinde etkindir. Transpozonların, tekrarlanan elementlerin, bazı 'imprint' genlerin susturulmasında rol almaktadır. Memelilerde DNMT1 enzimine homologdur ve temel olarak, özellikle sentromerik tekrarlar ve transpozonlarda CG dizilerinin metilasyonundan sorumlu rol almaktadır. CMT3 enzimi, bitkilerde heterokromatin içindeki CHG bölgelerinin metilasyonunu sağlamaktadır. siRNA yolu ile çalışan DRM enzimi (DRM1 ve DRM2), özellikle CNN dizilerinin tüm dizi bağlamlarının (CG, CHG, CHH) *de novo* metilasyonundan sorumlu olarak görev almaktadır (Şekil 3). DNA metilasyonu, RNA-yönelimli DNA metilasyonu (RdDM) olarak meydana gelmektedir. RNA Polimeraz IV (Pol IV) ve RNA Polimeraz V (Pol V) enzimleri, RdDM yolunda işlev görmektedir. RdDM'de, spesifik RNA transkriptleri çift iplikli yapılar oluşturmaktadır. İki iplikli RNA'lar, ya siRNA ya da miRNA yolları aracılığıyla, RNA'yı üreten orijinal genom bölgesi için *de novo* DNA metilasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu mekanizmanın RNA virüslerine ve/veya transpozonlara karşı hücrel olarak savunmada önemli olduğu düşünülmektedir, çünkü bunların her ikisi de konak genomda mutasyonlara yol açabilecek çift iplikli RNA oluşturmaktadır. Henüz iyi aydınlatılamayan bir mekanizmayla bu zararlı bölgelerin metillenmesi sonucu, bunların ifadesi sonlandırılmakta ve mutagenik etkilerinden korunulmaktadır (Bräutigam and Cronk, 2018; Zhang et al., 2018).



Şekil 3. Bitki metiltransferaz enzimleri (Akgun, 2018)

Metilasyonu saptamak için kullanılan yöntemler / moleküler markörler

Moleküler markör teknikleri DNA molekülündeki, polimorfik bölgelerin tespit edilmesini amaçlayarak çalışmaktadır. Bir gen ya da fenotipik özelliğin polimorfik olarak kabul edilmesi için popülasyonda herhangi bir genin ya da özelliğin birden fazla formunun bulunması gerekmektedir. Polimorfizm, DNA dizisi, amino asit dizisi, kromozomal yapı ya da fenotipik özellik varyantları benzeri düzeylerde görülebilmektedir. Son yıllarda bütün bir genomun analiz yapılabileceği DNA'yı elde etmek için, organizmanın herhangi bir kısmından alınan az miktarda doku parçası yeterli olmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005). DNA markörleri sabit olup, tüm dokularda ortaya çıkabilmekte ve değişen çevre şartlarından etkilenmemektedir. Ayrıca bu markörler kodominant ya da dominant özellikte olabilmekte ve kalıtımı basit prensiplere dayanmaktadır (Williams et al., 1990). Moleküler markörler, DNA bazlarında oluşan nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar veya tekrarlanan DNA'nın replikasyonunda oluşan hatalardan oluşmaktadır ve nötraldirler. Genellikle DNA'nın kodlanmayan kısımlarında oluşmaktadır. DNA markörleri teorikte sınırsız sayıda kabul edilmektedir, morfolojik ve biyokimyasal markörlerin aksine, çevresel faktörlerden ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmemektedir (Gülşen ve Mutlu, 2005; Yorgancılar ve ark., 2015). DNA metilasyonun belirlenmesinde de moleküler markörlerden aktif olarak yararlanılmaktadır.

DNA metilasyonunun belirlenmesinde birbirlerinden farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC),

restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP), metilasyon duyarlı spesifik polimeraz zincir reaksiyonu, birleştirilmiş bisülfid restriksiyon analizi (COBRA), metilasyon duyarlı çoğaltılmış fragman polimorfizmi (MSAP), çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım (CRED-RA), metilasyon duyarlı tek nükleotit uzatımı, metilli DNA iminopresipitasyonu (MeDIP), hibridizasyon array, restriksiyon genomu taraması, bisülfid uygulamasından sonra yeni nesil sekanslama, tek molekül gerçek zamanlı DNA sekanslaması, qAMP ve benzeri yöntemler yer almaktadır. Bunlardan bazılarına aşağıda kısaca değinilmektedir.

Southern blot yöntemi

Southern blot tekniği DNA metilasyon analizlerinde tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemde izole edilen DNA spesifik olan metilasyona duyarlı ve duyarsız RE'ler ile kesilerek belirli sayı ve uzunlukta DNA frangmentlerinin oluşumu sağlanmaktadır. Restriksiyon fragmentleri agaroz jel yöntemiyle izole edilerek membrana aktarılmakta ve hedef DNA dizisine spesifik bir prob yardımıyla hibridize edilmektedir. Otoradyografi ile tahmin edilen bant büyüklükleri ortaya çıkarılmakta ve yorumlanmaktadır (Dubeau et al., 1986).

Bisülfid DNA dizileme yöntemi

Bisülfid DNA dizileme yönteminin bulunması yeni metilasyon tekniklerinin bulunmasına ve geliştirilmesine öncülük etmiştir. Bisülfid DNA dizisi analizi ilk kez Frommer tarafından 1992'de tanımlanmıştır (Frommer et al., 1992). Bu teknik DNA'da bulunan 5-metilsitozinlerin tespitini hedeflemektedir. Yöntem tek zincirli DNA'nın bütün sitozinlerine sodyum bisülfitle muamale edilerek urasile dönüştürülmesi esasına dayanarak çalışmaktadır. 5-metilsitozinler deaminasyon esnasında değişmeden kalmaktadır. Modifikasyona uğramış DNA'lar spesifik olan bir primer seti PCR ile çoğaltılmaktadır. Daha sonra tüm urasiller timin olarak amplifiye olurken yalnızca 5-metilsitozinler sitozin olarak kalmaktadır. Amplifiye olan fragmentlere direkt olarak ya da replikasyondan sonra dizi analizi yapılabilmektedir.

MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism / Metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi) yöntemi

MSAP 1996'da Herman'ın geliştirdiği bir tekniktir. Bu yöntemle bisülfid uygulaması sonrasında metillenen ve metillenmeyen DNA bölgeleri arasında bulunan sekans farklılıkları saptanmaktadır. Sitozinler urasile deamine olmakta ve deamine urasiller PCR uygulamasıyla timine replike olmaktadır. Amplifiye olmuş DNA'da metillenmemiş veya metillenmiş sekanslara spesifik olan primer çiftleri elde edilmektedir (Herman et al., 1996). MSAP,

DNA'nın belirlenmiş bir bölgesinde bulunan metilasyon varlığını analizini hızlı bir şekilde tespit etmektedir.

COBRA (Combined bisulfite restriction analysis / Karışık bisülfite restriksiyon analizi) yöntemi

Bu yöntem temelinde bisülfite uygulamasıyla çalışmaktadır. Sodyum bisülfite ile tek iplikli DNA'daki bütün sitozinlerin urasil deamine olması sağlanmaktadır. Daha sonra modifiye edilmiş DNA, spesifik primerler aracılığıyla PCR'da çoğaltılmaktadır. Replikasyon esnasında değişime uğrayan sitozin olan urasiller timin şeklinde çoğaltılırken 5-metilsitozinler değişmeden kalmaktadır. Replik olmuş fragmentler direkt ya da çoğaltılma işleminden sonra dizi analizi yapılmaktadır (Eads and Laird, 2002).

CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion and random amplification / Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım) yöntemi

Bu yöntem metilasyona duyarlı olan enzimler ile DNA kesildikten sonra gelişimin farklı aşamalarında veya farklı dokular arasındaki metilasyon değişikliklerini saptamakta kullanılmaktadır. Ayrıca, diziler ve türler arasındaki varyasyon çalışmaları için kullanılabilir. Genom metilasyonu, MspI ve HpaII restriksiyon enzimleri kullanılarak analiz edilmektedir. Her iki enzimde CCGG sekansını tanımaktadır. Fakat Hpa II yalnızca sitozinler metillenmediğinde aktif olarak çalışırken, MspI RE (Restriksiyon Endonükleaz) ikinci sitozin metillendiğinde DNA'ya eklenememektedir. DNA, RAPD yöntemi ile PCR'da çoğaltılmaktadır. Sonra RE'ler ile DNA kesilmekte ve tekrar PCR'da çoğaltılarak değerlendirmeler yapılmaktadır (Bolukbasi ve Aras, 2016).

IRAP (Inter retrotransposons amplified polymorphism / Retrotranspozon-arası çoğaltılmış polimorfizm) yöntemi

IRAP, retrotranspozonlar arasındaki bölgelerin çoğaltılmasına dayanan ve PCR temelli çalışan bir işaretleme yöntemidir. Polimorfizmi saptayabilmek için gen ekspresyonu için gerekli dizilimi içeren korunmuş retrotranspozon dizilerini (LTR) kullanmaktadır. LTR (Uzun terminal tekrar) retrotranspozonlara özgüdür ve bitişik bölgelerin çoğaltılması için genetik analizlerde LTR primerleri kullanılmaktadır (Goldfarb et al., 2016).

Metilasyona duyarlı tek nükleotid primer ekleme yöntemi

Gonzalvo ve Jones (1997) tarafından metilasyonun gerçekleştiği spesifik CpG adacıklarındaki metilasyon seviyelerindeki değişim oranını saptamak için geliştirdiği bir yöntemdir. DNA'nın bisülfite uygulaması ve hedef sekansın spesifik primerlerle amplifikasyonundan sonra, amplifiye olmuş DNA'da metilasyona duyarlı tek nükleotid

primer ekleme kalıbı olarak kullanılmaktadır. DNA'daki hedef bölge metillenme durumunda sitozin nükleotidi ekleme esnasında birleşmektedir. Metillenmemiş durumda ise timin ile birleşmektedir. Sitozin ile timin birleşme miktarı hedef bölgedeki metilasyon durumunu belirlemektedir (Gonzalzo and Jones, 1997).

qAMP (Quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR / Real-Time PCR temelli kantitatif DNA metilasyon analizi) yöntemi

qAMP memeli dokularında metilasyon analizi tekniği olarak kullanılmaktadır. Tekniğin memeli hücrelerinde bisülfite konversiyon için gereken ek süre olmadan hızlı, tekrarlanabilir ve doğru sonuçlar verdiği bilinmektedir. Bu uygulama başlangıç materyalinin daha az miktarda kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca literatürde bölgeye özgü DNA metilasyonu veya DNA'nın tekli bölgelerindeki metilasyon analizinde hızlı, nicel bir yöntem olarak önerilmektedir (Oakes et al., 2006).

Bu teknik 3 temel aşamaya sahiptir;

- 1) Bir metilasyona bağlı restriksiyon enzimi (MDRE) ve metilasyona duyarlı restriksiyon enzimi (MSRE) ile ilgili DNA örneğinin kesilmesi,
- 2) Özel genomik bölgelere özgü primerlerin tasarlanması,
- 3) PCR ürün oluşumunu izlemek için real time PCR ile amplifikasyon oluşumu.

Bu yöntemin en önemli özelliklerinden birisi kantitatif bir değerlendirmeye sahip olmasıdır. Yine qAMP tekniği tüm DNA örneklerini amplifiye eden aynı primer çiftini kullanmaktadır. Bu nedenle ölçümlerin doğruluğunu ve test kapasitesini artıran standart eğri değerleri ile ilişkilendirilmesi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. Oligonükleotitler metilasyonu tam ayırt etmede restriksiyon enzimleri kadar işleve sahip değildir. Oligonükleotit bağlaması tekli CpG'lerin sorunlu olduğunu tespit edilmesini sağlayan tek bir nükleotit uyumsuzluğunda dahi meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda, çoklu metillenen veya metillenmeyen CpG'lere özgü tasarlanan oligonükleotitler metillenmiş örneklerle heterojen bir şekilde etkili olarak bağlanamayacaktır. Özel CpG'lerin analizinde farklı MSRE'lerin kullanılması bir bölgedeki tek veya çoklu CpG'lerin araştırılmasından çok daha iyi bir stratejidir. Üçüncüsü, qAMP yöntemi hem MSRE'leri hem de MspI restriksiyon enzimini kullanarak metillenen ve metillenmeyen DNA zincirlerinden kaynaklanan bağımsız ve tamamlayıcı iki ölçümü üretmektedir. Bu durum sonuçların güvenilir şekilde elde edilmesine ve DNA metilasyonunun tam bir dizide doğru şekilde değerlendirilmesine izin vermektedir. Bunun aksine, bisülfite temelli testlerde metillenen ve metillenmeyen örnekler için elde edilen değerler tek bir oran olarak ifade edilmektedir. Dördüncüsü, DNA'nın tek zincirli yapısına uygulanan bisülfite büyük ölçüde örneklerin kararlılığını azaltır, oysaki qAMP

testi çift zincirli olarak kullanılan kesilmiş DNA'nın uzun süreli kullanımı için daha elverişlidir. Son olarak, bu test birçok aday lokusun hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde incelenmesini sağlamaktadır. İlgili lokus bisülfite sekans yöntemi kullanılarak daha kapsamlı belirlenebilir. Fakat, tarama amacıyla yapılan çalışmalarda belirli bir bölgedeki her CpG'nin kesin metilasyon durumunun incelenmesi çoğu durumda gerekli değildir. Memeli DNA'sındaki tüm CpG'lerin yüzde 30 ila yüzde 40'ı, sırasıyla nispeten ucuz 3-5 MSRE kullanılarak araştırılabilir. Bu taktik çok sayıda lokusun incelenmesi için çok daha etkili olacaktır. Özellikle, bisülfite sekans yöntemini kullanarak tek bir lokusun araştırılması her bir örneğin üç tekrarı ve 4 restriksiyon enziminin kullanıldığı qAMP yönteminden yaklaşık 5 kat daha fazla maliyetli olduğu görülmüştür. Dahası, işlem süresi de klonlama ve sekanslama adımları iptal edildiği için 5 günden 1 güne indirilmektedir. Ayrıca, kesimler yapıldıktan sonra kesilmiş DNA, birçok PCR reaksiyonu için rahatça kullanılabilir. Örneğin, 500 ayrı reaksiyon için yeterli olan 1000 µl'ye seyreltilmiş 1 µg kesilmiş DNA ile yüksek kaliteli sonuçlar elde edilebilir. Yine primerler, tekrarlanmayan dizilerde bulunan hemen hemen tüm kesim bölgelerini analiz etmek için tasarlanabilir. Böylece birçok farklı bölgeyi test etmek için aynı örnekler kullanılabilir (Oakes et al., 2006; 2009)

Restriksiyon enzimleri

RE enzimleri, bakterilerde doğal olarak bulunan ve kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı bir nükleik asitteki fosfodiester bağlarının hidrolizini katalize ederek kesen enzimler olarak tanımlanmaktadır.

Bu dizilere palindromik diziler adı da verilmektedir. RE'lerin asıl biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında üslendikleri işlevler olarak bildirilmektedir. Bakteriye giren yabancı DNA'ları da kesebildiklerinden, intraselüler bakteriyel patojenleri inaktive edebilme yetenekleri sayesinde bakteriyi virüslerden ve yabancı DNA'lardan korumaktadırlar. Mikroorganizmalar RE'lerinin kendi DNA'larında kesim yapmaması için metilasyon gibi çeşitli modifikasyonlar kullanmaktadır. RE'lerin isimlendirmesinde önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirtilmektedir. Her restriksiyon endonükleazların uygun aktivite oluşturmaları için kendilerine özgü gereksinimleri bulunmaktadır. İdeal saklanma ve test koşulları belirli enzim fonksiyonlarında en yüksek doğruluk ve aktiviteye sahip olmaktadır. Sıcaklık, pH, enzim kofaktörü, tuz bileşimi ve iyonik gücü gibi koşullar enzim aktivitesini ve

sabitesini etkilemektedir (di Felice et al., 2019). Çalışmamızda Not I, Hpa II, Hha I, McrBC enzimleri kullanılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Restriksiyon Enzimleri

Restriksiyon Enzimi	İzole edildiği Bakteri	Kesim Bölgesi	Enzimin Özelliği
Not I	<i>Nocardia otitidis</i>	5 '... GC GGCC GC... 3' 3'... CG CCGG CG... 5 '	Tip II* restriksiyon endonükleazdır
Hpa II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5 '... C CG G... 3' 3'... G GC C... 5 '	Tip II* restriksiyon endonükleazdır
Hha I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5 '... G CG C... 3' 3'... C GC G ...5 '	Tip II* restriksiyon endonükleazdır
McrBC	<i>Escherichia coli</i>	5 '... (A / G) mC (Nn) (A / G) mC ... 3' mC: 5-hidroksimetilsitozin, 5-metilsitozin, 4-metilsitozin, n = 40-2.000	Tip IV** restriksiyon endonükleazdır. McrBC, bir veya her iki iplikçikte metilsitozin içeren DNA'yı kesen bir endonükleazdır. McrBC, metillenmemiş DNA üzerine etki etmez.

* Tip II restriksiyon enzimleri, tam hedef nükleotitten veya çok yakınından kesim yapma yeteneğine sahiptirler. Mg⁺² iyonlarının varlığında çift zincir DNA üzerindeki palindromik sekansları tanır ve bu sekans içindeki özel bölgeden kesim yaparlar. Kesimleri ATP'ye bağlı değildir.

**Tip IV restriksiyon enzimleri metillenmiş DNA'yı keser. Bunlar iki farklı altbirimden oluşmaktadır. DNA kesimi için Mg⁺² ve GTP kofaktör olarak gerekmektedir. Tanıma yeri iki parçalıdır. Metillenmiş bazlar arasında birden fazla kesim olur.

Not I

Nocardia otitidis-caviarum kaynaklı tip II restriksiyon enzimi olan metilasyona bağlı olarak çalışan Not I restriksiyon enzimi, 8 bp DNA dizisini 5'-GC/GGCCGC-3' bölgesinden tanıyan ve 4 bazlı yapışkan uç oluşturmak için DNA'nın her iki sarmalını ayıran bir homodimerdir. Not I'nin tanıma dizisi yalnızca G:C baz çiftlerinden oluştuğundan, sıklıkla ökaryotik genomların CpG adaları olarak bilinen bölgelerinde bulunmaktadır. Not I DNA hedef bölgesinin, M.Not I metilaz veya M.EagI ile modifikasyonu, bölünmeyi bloke etmektedir. Kısaca metilasyon varlığında metillenmeyen DNA dizilerinin kesiminde rol almaktadır.

Hpa II

Restriksiyon enzimi olan Hpa II ile genomik kesimler oluşturulmaktadır. Hpa II enzimi, *Hemophilus parainfluenzae* bakterisinden izole edilmiştir. Hpa II'nin CCGG dizilerini ve hemimetillenmiş ^mCCGG dizilerini keserken DNA metilasyonu ile inhibe olmakta ve C^mCGG sekansını kesemedikleri bilinmektedir. Kesim sonunda yapışkan uçlar elde edilmektedir.

Hha I

Haemophilus haemolyticus'dan elde edilen bir RE olan Hha I DNA dizisindeki 5'... C | CGG... 3' palindromik sekansları tanıyarak ve bu sekanslarda kesim yapmaktadır. Metilasyon varlığında metillenmeyen DNA dizilerinin kesiminde rol almaktadır. Kesim sonunda yapışkan uçlar elde edilmektedir.

McrBC

Escherichia coli K-12'nin GTP gerektiren, modifikasyona bağlı bir endonükleazı olan McrBC, spesifik olarak 5' R(m)C 3' formundaki DNA bölgelerini tanımaktadır. Organizmanın DNA'sında bu sekans çoğunlukla bir CpG dinükleotiti oluşturmak için bir G'nin işlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Tanımlanan sekans palindrom değildir, bu yüzden McrBC enzimi 5' -G^mCG-3' ve 5' -A^mCG-3' ile birlikte 5' -^mCGC-3' ve 5' -^mCGT-3' komplementlerini de tanır. McrBC RE'i GTP bağımlı çalışmakta ve metillenen DNA zincirlerinden kesim yapmaktadır.

Gen ekspresyonu

Nükleik asitler genetik bilginin depolanması ve ifade edilmesini sağlamaktadır. Kimyasal olarak iki çeşit nükleik asit bulunmaktadır; DNA ve RNA. Hücre DNA'sı hücrenin yaşamsal işlevlerine yardımcı olabilecek genleri ve genler arası bölgeleri içermektedir. Her DNA molekülünde bulunan kalıtım birimlerine gen adı verilmektedir. Moleküler anlamda gen; fonksiyonel bir ürün, ribozomal ribonükleik asit (rRNA), taşıyıcı ribonükleik asit (tRNA) ve polipeptid sentezini kodlayan DNA dizisi olarak tanımlanabilmektedir. Genlerin ürünleri hücrenin metabolik aktivitelerini yönetmektedir. Bir hücrenin tüm genleri ve intergen DNA (genler arasındaki DNA)'ları ile birlikte hücre genomunu oluşturmaktadır. DNA molekülünde şifrelenen genetik bilginin ifade edilmesi veya bu bilginin kullanılması gen ekspresyonu olarak tanımlanmaktadır (Şişecioğlu, 2010). Gen ekspresyonu organizmada yaşamı boyunca düzenlenmektedir. Örneğin bazı metabolik yolak enzimleri besin kaynakları değiştiğinde ya da tükendiğinde azalabilmekte ya da artabilmektedir. Çok hücreli bir organizmanın gelişimi sırasında, hücreler farklılaşmayı etkileyen bazı proteinler, çok az hücrede yalnızca kısa bir süre bulunabilmektedir. Organizmalar gen ifadesini, gelişim süreçlerinde, çeşitli metabolik yollarda veya stres faktörlerine karşı cevap oluşturmak için düzenlemektedir.

Bitkiler, her organizma gibi iç dengelerini koruma ve devam ettirme eğilimi göstermektedirler. Değişen çevre koşulları altında bitki, stres karşısında yeniden bir homeostasis kurmayı amaçlayarak kendi içinde aktif bir süreç başlatmaktadır. Bitkiler değişen olumsuz şartları algılayarak zarar görmeyi önleyecek şekilde bir cevap oluşturmaktadır.

(Kosová et al., 2015). Bu karmaşık mekanizmada genlerin ifadesinde çeşitlilik olması, farklı stres faktörleri tarafından indüklenmesinden kaynaklanmaktadır (Duque et al., 2013).

Buğday

Buğday (*Triticum aestivum* L.) buğdaygiller (Poaceae) familyasından gelen tek yıllık, karasal iklimde yaşayan bir bitki türüdür. Tablo 5.'de *Triticum aestivum* L. sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 5. Ekmeklik Buğdayın Taksonomik Sınıflandırılması

Alem	Plantae
Şube	Tracheophyta
Sınıf	Liliopsida
Takım	Poales
Familya	Poaceae (Buğdaygiller)
Alt familya	Poideae
Cins	Triticum
Tür	<i>Triticum aestivum</i> L.

Buğday dünyada en çok ekimi yapılan ve besin olarak tüketilen tahıllardan biridir. İnsanların günlük beslenmelerinde buğday önemli bir yer tutmaktadır. Yürütülen bazı çalışmalar önümüzdeki yıllarda da bu durumun devam edeceğini öngörmektedir. Fakat hızla artan ve yetersiz gıda alan nüfusun artışı devam ederken, talebi karşılamak için buğday üretiminin 2050 yılına kadar mevcut seviyelere göre %50'den fazla artması gerektiği bildirilmektedir (Velde et al., 2018; Tadesse et al., 2019). Bununla birlikte, dünyadaki buğday üretiminde büyük pay sahibi olan ülkelerde son yıllarda yetersiz toprak arazisi, su kaynaklarının azalması ve değişen iklim gibi nedenlerden dolayı buğday çeşitlerinin mahsulünde verim artışı olmamakta, ya da çok az olmaktadır (Reynolds et al., 2021). Bunlara ek olarak çevre kirliliği de buğday üretimindeki negatif etkiyi ağır olarak artırmaya devam etmektedir (Atar, 2017). Buğdayda özellikle ağır metal maruziyeti, ekosistemdeki canlılar için de büyük tehditler oluşturmaktadır. Buğdayın temel besin kaynakları arasında yer alması nedeniyle oluşan ağır metal maruziyeti insan sağlığı için önemli bir sorun teşkil etmektedir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan bitkisel materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edilen *Triticum aestivum* türünün bitkisinin Gerek 79 çeşidinin tohumlarının çimlendirilmesiyle elde edilen kök ve gövde kullanılmıştır.

Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışma Esnasında Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	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 BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A, KOREA
Mikrodalga Fırın	Arçelik, TÜRKİYE, MD 592
Nanodrop	Qiagen/Qiaxpert 200061 24V F 2.5A
Otoklav	Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
PCR	Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA
pH Metre	InoLab pH730 wtw Series, GERMANY
RT-PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q
Saf Su Cihazı	GFL 2004, GERMANY
Santrifüj	Hettich, GERMANY, EBA-20
Steril Kabin	(Esco AC2-4E1, SINGAPORE) 27
Su Banyosu	Memmert WNB14, GERMANY
Vorteks	Velp Scientifica, F202A0173

Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıdaki gibidir:

Kadmiyum çözeltisi.

- 1000 μM 'lık stok çözeltisi için 0,129 g $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 250 ml steril saf su içerisinde çözülerek üzeri 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- Daha sonra elde edilen stok çözeltisinden 1:1 oranında 500 μM , 1:3 oranında 250 μM , 1:9 oranında steril saf suyla seyreltilerek CdCl_2 çözeltileri elde edilmiştir.

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 oranında hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, 77617).

Kloroform: İzooamil alkol.

24: 1 oranında 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 alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Ethidium Bromür (Et-Br) Çözeltisi.

- 500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300 μl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Bromfenol Blue Çözeltisi.

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

0,5X TBE tamponu.

- Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak hazırlanmış ve 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim 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 çözülerek daha sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlanmıştır. pH 8.0'e ayarlanmıştır.

Primerlerin Hazırlanması: Kullanılan primerler üretici firmanın önerdiği miktarda seyreltilerek stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Yöntem

Deney bitkilerine kadmiyum stresinin uygulanması

Eşit boyutlarda seçilen 20 *Triticum aestivum* tohumları %2,5/w/v'lik NaOCl'de 3 dakika steril edilmiştir. Tohumlar dört kez saf su ile durulanmış ve steril filtre kağıdı ile kurutulmuştur. Bu tohumlar 1 saat süreyle saf su ile ıslatılan 20 tohum iki kat steril whatman 1 numaralı filtre kağıdı konulmuş 15 cm çaplı petri kaplarında 0, 100, 250, 500 µM CdCl₂ çözeltileri eklenilerek 8 günde çimlendirilmiştir. Bu süre sonunda uygulama yapılan petrilere ve kontrol grubundan bitki örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -80° C'de saklanmıştır.

DNA ve RNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi

DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu protokolü Nardemir (2012) esas alınarak ve bazı düzenlemeler yapılarak manuel olarak aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- Sıvı azotta parçalanıp 2 ml'lik tüplere alınan 300 mg bitki materyali üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst edilmiştir. Önceden 70 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 10 dakikada bir yavaşça alt üst edilerek 60 dakika bekletilmiştir.
- Örnekler su banyosundan sonra 10 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda üzerine 750 µl Fenol: Kloroform: İzooamil alkol eklenerek 15-20 dakika rototorda alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- 14000 rpm ve 24 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır (karın içindeki tüplere).
- 1000 µl Kloroform: İzooamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilmiştir. 14000 rpm ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır (karın içindeki tüplere).
- Üst faza 2,5 µl RNase ile 8 µl Proteinaz K eklenerek 30-45 dakika 37°C'de bekletilmiştir.
- Her tüpe 100 µl amonyum asetat, 100 µl sodyum asetat ve 800 µl soğuk izopropanol eklenmiştir (karın içinde).
- 14000 rpm ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilip üst faz atılmıştır.
- Oluşan pellet 37 °C'de 15 dakika bekletilerek alkol uçuncaya kadar kurutulmuştur.
- Kurutulan DNA 100 µl TE tamponunda çözülmüştür.
- Kullanılınca kadar -20 °C'de saklanmıştır.

RNA izolasyonu

RNA izolasyonu QIAGEN' den alınan RNeasy Plant Mini Kit protokolüne göre yapılmıştır.

- 100 mg bitki örneği sıvı azotta ezilmiştir.
- 100 mg ezilmiş örneği üzerine 450 µl RLT Bufferı eklenmiş ve iyice vortekslenmiştir.
- Lizat, 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş bir QIAshredder spin kolonuna (leylak) aktarılmış ve en yüksek hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki hücre artıklarından oluşan peleti bozmadan süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne dikkatlice aktarılmıştır.
- Temizlenmiş lizata 0,5 hacim etanol (%96–100) eklenmiş ve hemen pipetlenerek karıştırılmıştır. Santrifüj etmeden hemen sonraki basamağa geçilmiştir.

- Oluşan çökelti de dahil olmak üzere 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy spin kolonuna (pembe) aktarılmıştır. Kapak yavaşça kapatılmış ve $\geq 8000 \times g$ 'de (≥ 10.000 rpm) 15 saniye santrifüj edilmiştir. Akış (kolondan geçen kısım) atılmıştır.
- RNeasy spin kolonuna 700 μ l RW1 Bufferı eklenmiş ve kapağı kapatılıp ve $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Akan kısım atılmıştır.
- RNeasy spin kolonuna 500 μ l RPE Bufferı eklenmiş ve kapağı kapatılıp ve $\geq 8000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- RNeasy spin kolonunu yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolon membranına doğrudan 30-50 μ l RNase-free water eklenmiş ve kapağı yavaşça kapatılıp ve RNA'nın ayrılması için $\geq 8000 \times g$ 'de (≥ 10.000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Primer tasarımı

- Primer tasarımı hem kontrol bölgesinin hem de ilgili bölgenin yan kısımları dahil primer çiftlerinin oluşturulmasını içermektedir. Primerler hem MSRE hem de MDRE kesim bölgelerini kapsayacak şekilde seçilmiştir.
- PCR primerleri; McrBC'nin özel enzimatik özellikleri dikkatle gözönüne alındığında PCR ile amplifiye edilmiş bölge içerisindeki bilgilendirici kesim bölgelerinin varlığına dayanan özel bölgelerin yanına yerleşmek üzere seçilmiştir. McrBC; 5'-G/AmC-3' kısmını tanımaktadır. Organizmanın DNA'sında bu sekans çoğunlukla bir CpG dinükleotiti oluşturmak için bir G'nin işlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Tanımlanan sekans palindrom değildir, bu yüzden McrBC enzimi 5'-G^mCG-3' ve 5'-A^mCG-3' ile birlikte 5'-^mCGC-3' ve 5'-^mCGT-3' komplementlerini tanımıştır.
- İki yan bölgenin optimum kesilmesi 55-103 bp uzunluğundadır ve enzim her iki bölgeden yaklaşık 30 bp uzunluğunda iki bölge arasında DNA'yı kesmektedir. MSRE bölgesi primer bağlanma sekansı arasında olması tercih edilmiştir. Ürün boyutu 100-200 bp uzunluğunda oluşturulmuştur. Tüm primer çiftleri bu kriterlere göre test edilerek kullanılmıştır.
- Bu analiz için kullanılacak primerlerin tasarlanmasında Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) programı kullanılmıştır. Tasarlanan primerler Tablo 7.'de gösterilmiştir.

Tablo 7. qAMP Analizinde Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimleri

Gen Bölgesi	Forward Primer	Reverse Primer
UGT-3 (1. Primer)	5'-CCTATCAAAGGGTGGGGTGG-3'	5'-TAAAAACTTACGTGGCGCAGT-3'
UGT-3 (2. Primer)	5'-GATGGCTACGACGAAGGAGG-3'	5'-AGCATCTTACGAGACTGTTTGT-3'
LTP-4 (1. Primer)	5'-ACTGCGCCACGTAAGTTTTT-3'	5'-AGTGCGTTGGCGGAAAGATA-3'
LTP-4 (2. Primer)	5'-CCTATCAAAGGGTGGGGTGG-3'	5'-TAAAAACTTACGTGGCGCAGT-3'
Aquaporin PIP-1 (1. Primer)	5'-TGTTCTTAGCCCCGAAGCTG-3'	5'-GGGAAAAATGCTCGAAACCGA-3'
Aquaporin PIP-1 (2. Primer)	5'-GGATGACCACGTGAGTTTCCA-3'	5'-GGACAAGGCCAGAAACCAGA-3'

Tablo 8. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimleri

Gen Bölgesi	Forward Primer	Reverse Primer
UGT-3	5'-TGAATGGCTCTGGTGTTCCTCC-3'	5'-TTCGGATTCCCGTACAACCC-3'
LTP-4	5'-GCGGTGTTAGCATCCCTAT-3'	5'-TATGAGTGCGTTGGCGGAA-3'
Aquaporin PIP-1	5'-TCTGTTCTTAGCCCCGAAGC-3'	5'-TTGGGATGGTTGCCAAGTGA-3'
β -actin	5'-GTGTCGCACCAGAGGATCAT-3'	5'-CGCTGGCATACAAGGACAGA-3'
GAPDH	5'-GAGGTTGCTGTGTTTGGCTG-3'	5'-GGAGCAAGGCAGTTAGTGGT-3'

PCR ile DNA çoğaltımı

Bu aşamada, tasarlanan primerlerin bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek için bitki DNA'ları ilgili primerler kullanılarak PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. Daha sonra elde edilen ürünlere agaroz jel elektroforezi işlemi uygulanmıştır.

PCR işlemi için şu protokol basamakları izlenmiştir; 0,2 ml'lik tüpe,

10X PCR tamponu	3µl
dNTP (10mM)	1 µl
MgCl ₂ (25mM)	2µl
5Unit/µl Taq DNA polimeraz	1 µl
DNA (100ng/µl)	3µl
Reverse primer (5µM)	1,5µl
Forward primer (5µM)	1,5µl
Steril saf su	13 µl

ilave edilerek hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan örnekler PCR otomatik thermocycle aletine yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

- 1) 5 dakika 95° C
- 2) 38 döngü olacak şekilde sırasıyla,
 - a. 1 dakika 94° C
 - b. 1 dakika 30 saniye 56-60° C

c. 2 dakika 72° C’de

3) 15 dakika 72° C tamamlanmıştır.

PCR aletinden çıkarılan örnekler 4° C’de saklanmıştır.

Agaroz jel elektroforezi

- Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5X TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0,5µg/ml olacak miktarda Et-Br eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3µl bromfenol mavisi + 7µl PCR ürünü) yüklenmiştir.
- Elektrik akımı verilerek 90V–90 dakika süre ile PCR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

qRT-PCR ile qAMP Analizi

DNA’ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

McrBC enzimi

NEBuffer 2(10X)	5 µl(1X)
BSA (100X)	0,5 µl
GTP (100X)	0,5 µl
DNA	1 µg
McrBC	1 µl (10 units)

Steril saf su ile son hacim 50 µl’ye tamamlanmıştır.

- Hazırlanan örnekler önce enzim inkübasyonu için 1-2 saat 37° C’de bekletilmiştir.
- Daha sonra inaktivasyon için 20 dakika 65° C’de bekletilmiştir.

Not I enzimi

10X Buffer O	2 µl
DNA	1 µl
Not I	1 µl

Steril saf su ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

- Hazırlanan örnekler önce enzim inkübasyonu için 1-16 saat 37° C'de bekletilmiştir.
- Daha sonra inaktivasyon için 20 dakika 80° C'de bekletilmiştir.

Hha I enzimi

10X Buffer Tango	2 µl
DNA	1 µl
Hha I	1 µl

Steril saf su ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

- Hazırlanan örnekler önce enzim inkübasyonu için 1-16 saat 37° C'de bekletilmiştir.
- Daha sonra inaktivasyon için 20 dakika 80° C'de bekletilmiştir.

Hpa II enzimi

10X Buffer Tango	2 µl
DNA	1 µl
Hpa II	1 µl

Steril saf su ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

- Hazırlanan örnekler önce enzim inkübasyonu için 1-16 saat 37° C'de bekletilmiştir.
- Daha sonra inaktivasyon için 20 dakika 80° C'de bekletilmiştir.

qAMP yönteminin uygulanması

Tasarlanan primerler ile aşağıdaki gibi PCR işlemi yapıldı.

Tasarlanan primerler ile Procomcure Biotech 2X Magic SYBR Mix Kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde aşağıdaki gibi PCR işlemi yapılmıştır.

- Kullanılacak tüm solüsyonlar hafif bir şekilde vortekslenmiştir.
- Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

2X Magic SYBR Mix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Kalıp DNA	2 µl

Steril su ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

- Karışım PCR tüplerine aktarılmış ve hafifçe santrifüj edilmiştir.

- PCR döngüsü aşağıdaki gibi ayarlanır;

1) 5 dakika 95°C

2) 40 döngü olacak şekilde sırasıyla,

a. 10 saniye 95° C

b. 15 saniye bağlanma sıcaklığında*

c. 20 saniye 72° C

3) Son olarak 2 dakika 72° C tutularak süreç tamamlanmıştır.

PCR aletinden çıkarılan örnekler 4° C’de saklanmıştır.

* Tasarlanan primerin bağlanma sıcaklığına göre değişim göstermektedir.

qAMP sonuçlarının değerlendirilmesi

Seçilen bölgenin metilasyon yüzdesi her bir başarılı PCR amplifikasyonunun ürün miktarındaki yaklaşık 2 kat artışla sonuçlanan temel prensip kullanılarak Ct değerindeki değişimden belirlenmiştir. Böylece, 1,0 değerindeki ΔCt değeri örneğin %50’sinin, 2,0 değerindeki ΔCt değerinin %75’inin kesildiğini göstermiştir. ΔCt ile ilişkili MSRE için metilasyon yüzdesi = $100 \times (2^{-\Delta Ct})$; ΔCt ile ilişkili MDRE (McrBC) için metilasyon yüzdesi = $100 \times (1 - 2^{-\Delta Ct})$ formülleriyle hesaplanmıştır.

qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi

Bu analiz için kullanılacak primerlerin tasarlanmasında Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) programı kullanılmıştır. Tasarlanan primerler Tablo 8.’de gösterilmiştir. qRT-PCR işlemini gerçekleştirmek için Procomcure Biotech 2X Magic SYBR Mix Kiti kullanılmıştır. Protokol üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır.

- Kullanılacak tüm solüsyonlar hafif bir şekilde vortekslenmiştir.
- Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

2X Magic SYBR Mix 10 µl

Forward Primer 1 µl

Reverse Primer 1 µl

Kalıp DNA 2 µl

Steril su ile son hacim 20 µl’ye tamamlanmıştır.

- Karışım PCR tüplerine aktarılmış ve hafifçe santrifüj edilmiştir.
- PCR döngüsü aşağıdaki gibi ayarlanır;

1) 5 dakika 95°C

- 2) 40 döngü olacak şekilde sırasıyla,
 - a. 10 saniye 95° C
 - b. 15 saniye bağlanma sıcaklığında*
 - c. 20 saniye 72° C
- 3) Son olarak 2 dakika 72° C tutularak süreç tamamlanmıştır.

PCR aletinden çıkarılan örnekler 4° C’de saklanmıştır.

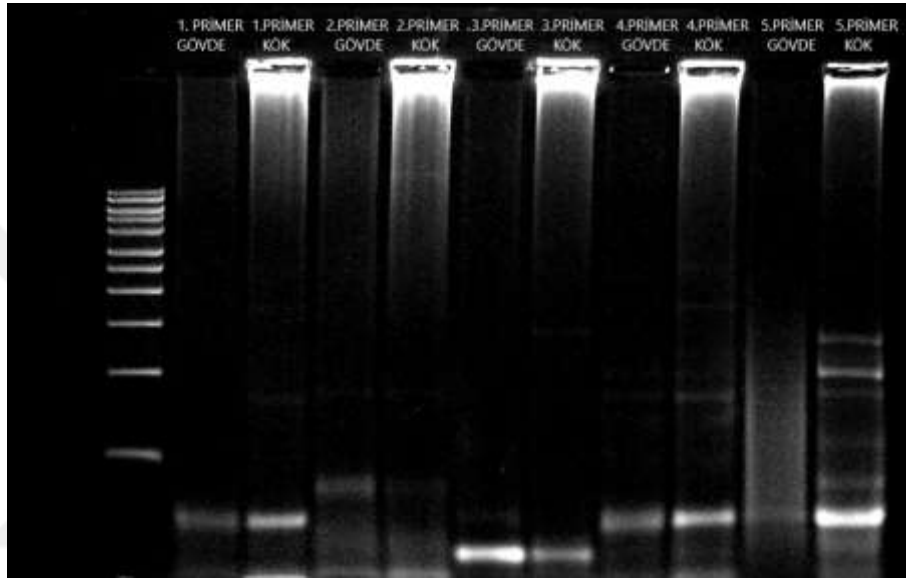
* Tasarlanan primerin bağlanma sıcaklığına göre değişim göstermektedir.

Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi için gen ekspresyon analizi sonucunda örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buğdaya ait genlerin ifade oranları Livak ve Schmittgen (2001) göre $\Delta\Delta Ct$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. RT-PCR analizinde referans gen olarak buğday β -Aktin ve GAPDH genleri kullanılmış ve genlerin ifade analizi referans gen ifadesine göre değerlendirilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Primer bağlanma sıcaklıklarının tespiti

Cd stresine karşı yanıt mekanizmasında görev alan UGT-3, PIP-1 ve LTP4 genlerinin PCR ile çoğaltılması sonucunda oluşan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerin bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir (Şekil 4.).



Şekil 4. Hedef primerlerin jel elektroforezi

Hedef primerlerle yapılan PCR işleminden sonra oluşan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan tek bant profiline göre bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. UGT-3 geninin 1. ve 2. bölgesi olarak tasarlanan 1. ve 2. Primerin bağlanma sıcaklıkları 60 ° C olarak belirlenmiştir. LTP-4 geninin 1. ve 2. bölgesi olarak tasarlanan 3. primerin bağlanma sıcaklığı 56 ° C olarak, 4. primerin ise 57 ° C olarak belirlenmiştir. PIP-1 geninin 1. ve 2. bölgesi olarak tasarlanan 5. ve 6. primerin bağlanma sıcaklıkları 59 ° C olarak belirlenmiştir (Şekil 4).

Tasarlanan primerlerin gen bölgelerinde gösterimi

UGT-3

UGT-3 gen sekansında RE'lerin kesim bölgeleri aşağıdaki gibi belirlenmiştir. Bu bölgelerden kırmızı alanlar Hpa II'nin kesim bölgelerini, yeşil alanlar Hha I'in kesim bölgelerini ve sarı alanlar McrBC'nin kesim bölgelerini temsil etmektedir.

ATCAGCCATGACCTT **CG** **CCGG** CA **GCG** GTGATGGCCAGA **GCG** GCTCT **GCG** AGG **GC**
GC ACTT **CGT** GCTGGTACCCATGATGGCTCAAGGC **CGT** ACCATCCCCATGACCGAC
 ATGGCATGCCTGCTGGCAGAGCATG **GCGG** GCAGGTCAGCTTCATCACC **ACG** **CCGG**
 TCA **ACGCGCG** TAGGTTGGAAGGCTT **CGCGCG** TAAGGTGGAG **GCGGCG** GGCCTGG
 TGGTTCAGCT **CGT** GGAGCTCCACTTCCCGAGTGTAGAGTTCGGCCTACCAGATGG
 GT **GCG** AGAACCTCGACATGATCCAATCAAAGAATTTGTTCTTTAACTTCATGAAG
 GCATGTGC **GCGG** TGCATGAGC **CGC** TCATG **GCGT** ACCTC **CGT** GAGCAGCA **GCGG** T
 CCCCTCCTAGCTGCATCATATCTGACATG **GCGG** ACTGGTGGGA **CCGG** TGACAT **GCG**
 AAGGGAGCTCGGCATCCCGAGGCTCACCTTTAGTGGCTTTTGTGGCTTCT **CGT** CCC
 TTGTCAGGTACAAACATAAAGAGGCCAAACCTTGTGAATACTGGACTTTTTTTTTTA
 CCC **GCG** AAAAAAAAAAAGATTAAGTATTTTACTTCAATAGTACAGGCCAGATTACT
 AGTATAAATTCCTTCCAGAAAAGAAGAAAGCATAACATATATAATAGAGTACACA
 AGATAATAAAATCGACATGTGTGCTACCTT **ACGT** AATGAAACATGTAATTCAAAC
 TACATAAGGAAGTATAGAAAATAAGAATTTTCATCAGATATTTGTT **ACGC** CAGTT
 ACAGCTGGTTGATGTGTCA **ACG** ATGTCTGCACTTCA **ACGT** ATTTTAAACAATAA
 TATCATCTTGCAGGTACAT **CGT** TTTTCAACAATGTATTGGAGAATGTCACAGAT
 GACAATGAGCTCATC **ACG** ATC **CCGG** GGTTCCTACAC **GCG** TAGAGTTG **ACG** AAGG
 CTAAGTTGCCTGGAACCTTTGTGTT **CCGG** GTATGGAGCAAATC **CGT** GAGAAGAT
 GTTTGAGGAGGAGCTGAGAT **GCG** ATGGTGAGATCACCAATAGCTTCAAAGAGCT
 CGAGACATTGTACATTGAATCCTATGAGCAGATAACAAGGAAGAAGGTCTGG **AC**
G ATCGGGCCAATGTGCCTCTGCCACCGAAACAGCAACAGA **ACG** **GC** **GCG** AAGAGG
 AAACAAG **GCGT** CAATGGATGAGGCACAGTGCTTGCAATGGCTTGATTCAAGGAA
 GCCAGGCTCAGTGATCTTTGTGAGTTTGGGAAGCCT **GCG** TTGCACTACACCTCAAC
 AACTTGTTGAACTGGGACTGGGACTTGAAGCCTCCAAGAAACCATTTGTTTGGGT
 GATTAAAGCAGGAGCTAAGCTTCCAGAAGTCGAGGAATGGCT **GCG** AGATGGGTT
 CGAGGA **GCGCGT** CAAAGACAGAGGTCTGATCATAAGGGGTTGGGCACCACAGCT
 CATGATCCTGCAGCACCAAGC **CGT** TGGAGGATT **CGT** G **ACGC** ACT **GCG** GGTGGAAC
 TCAACAATAGAGGGCATCTGTGCAGGTGTGCCCATGATCACATGGCCACACTTTG
 GGGAGCAGTTTTTTGAATGAGAAGCTGCTTGTGGATGTGCTGCAAATCGGGATGGA
 GGTGGAGTGAAAGGAGTTACACAGTGGGGAAGTGAAAACCAGGAGGTTATGGT
 TACCAGAGATGCTGTGGAGACAGCAGTGAACACCCTGATGGGTGAAGGGGAGGC
 TACAGAGGAGTTGAGAATGAGAGCAGAAGACT **GCGG** CATTAAAGGCAAGGAGGGC
 TTTCG **ACG** AGGAAGGTTCTTCTTACAACA **ACGT** AAGGCTGTTAATTCAAGAAATG
 GGAAACAAG **ACG** AATGCATGTGGTTGATAGAGATTACCTAAGCT **GCG** TTTTTCAG
 TGTAACATGAAGTGAAACATCCTAGAGTACATATATCATCATATAGAATTTTGT
 ACCAGGCTCACAGGTGATTATTTAGAGATTATAGATGATCCAAATGAAGGGAATA
 TCAATTATCCTCTCTATTATGT **ACGC** TCTTTCATGGCAGTCCACATAACAACACTACA
 CAGTCTGCTATTCTAGATGGTT **ACGC** TCTCACTTG

LTP-4

LTP-4 gen sekansında RE'lerin kesim bölgeleri aşağıdaki gibi belirlenmiştir. Bu bölgelerden kırmızı alanlar Hpa II'nin kesim bölgelerini, yeşil alanlar Hha I'in kesim bölgelerini ve sarı alanlar McrBC'nin kesim bölgelerini temsil etmektedir.

qRT-PCR ve gen ekspresyonu seviyelerindeki değişim

CdCl₂ ağır metali dört doz (0, 100, 250, 500 µM) olarak *Triticum aestivum* türüne uygulanmış ve UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinde, gen ekspresyon seviyesindeki değişimler qRT-PCR aracılığıyla incelenmiştir. Bu genlerin gen ekspresyon seviyeleri belirlenirken β-Actin ve GAPDH housekeeping genleri ile karşılaştırma yapılmıştır. CdCl₂ stresi altında ilgili genlerin gen ekspresyon seviyeleri UGT-3 geninde 100, 250, 500 µM CdCl₂ dozlarında gövdede sırasıyla 0,77; 31,05; 16,64 oranında değişim gözlenirken, kökte 0,04; 2,85; 6,35 oranında değişim görülmüştür. Bu genin doza bağlı olarak arttığı, fakat 500 µM dozunda ekspresyonun aşırı düştüğü gözlenmiştir. Kökte ise doza bağlı olarak UGT-3 geninin ekspresyonunda önemli olmayan bir artış görülmüştür (Tablo 9).

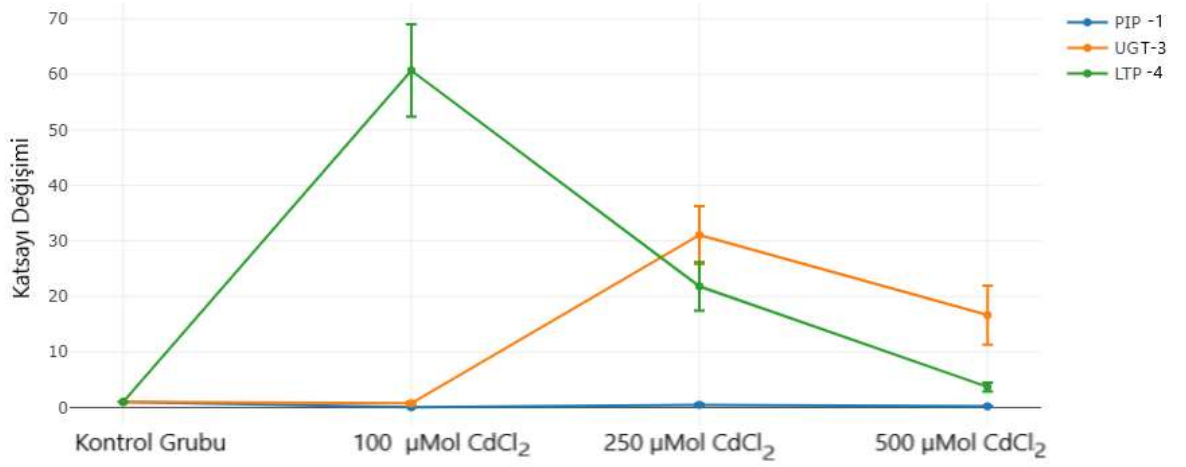
LTP-4 geninin ekspresyon seviyesindeki değişim 100, 250, 500 µM CdCl₂ dozlarında gövdede sırasıyla 60,69; 21,81; 3,7 şeklindeyken kökteki değişim 0,03; 5928; 14,77 şeklinde gerçekleşmiştir (Tablo 9). LTP-4 geninin gövdede Cd stresinin artışına bağlı olarak ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüştür. Yine bu genin bitkinin kökünde en fazla 250 µM Cd konsantrasyonunda ekspre olduğu ve bu ekspresyon oranının önemli olduğu görülmüştür.

PIP-1 geninde 100, 250, 500 µM CdCl₂ dozlarında gövdede sırasıyla 0,04; 0,48; 0,2 oranlarındayken kökteki değişim 0,03; 6,29; 14,91 oranlarında gerçekleşmiştir (Tablo 9). Bu genin stres maruziyeti sonucunda kökte doz artışına bağlı ekspresyon artışı olmuştur. Yine gövdede Cd dozlarının artışıyla orantılı olarak ekspresyon seviyesi artmıştır, fakat önemli bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 7).

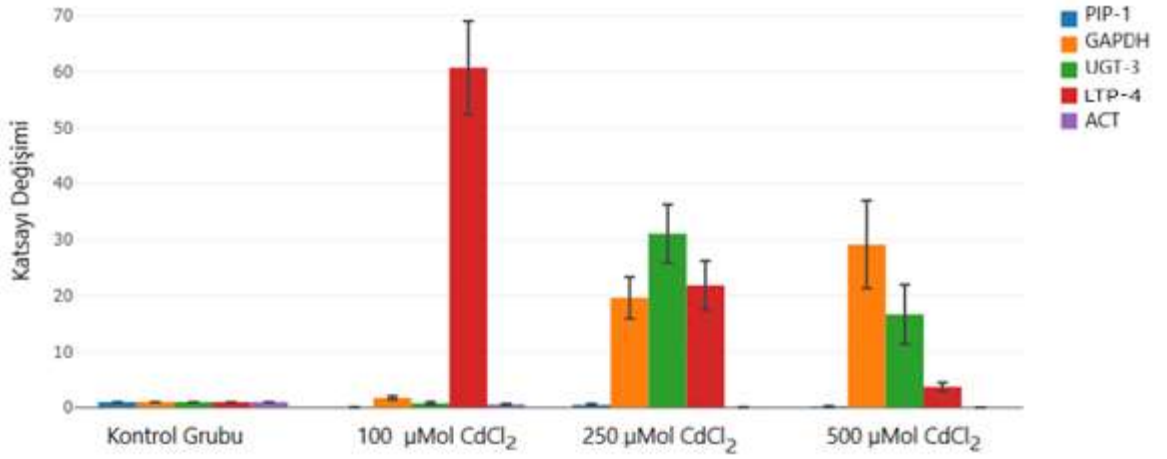
Tablo 9. Seçilen Genlerde Ekspresyon Seviyesindeki Değişim Oranları

	100 µM CdCl ₂ (gövde)	250 µM CdCl ₂ (gövde)	500 µM CdCl ₂ (gövde)	100 µM CdCl ₂ (kök)	250 µM CdCl ₂ (kök)	500 µM CdCl ₂ (kök)
UGT-3	0,77	(+)31,05	(+)16,64	(-)0,04	(+)2,85	(+)6,33
LTP-4	(+)60,69	(+)21,81	(+)3,7	(+)0,03	(+)5928	(+)14,77
PIP-1	(-)0,04	(-)0,48	(-)0,2	(-)0,03	(+)6,29	(+)14,91

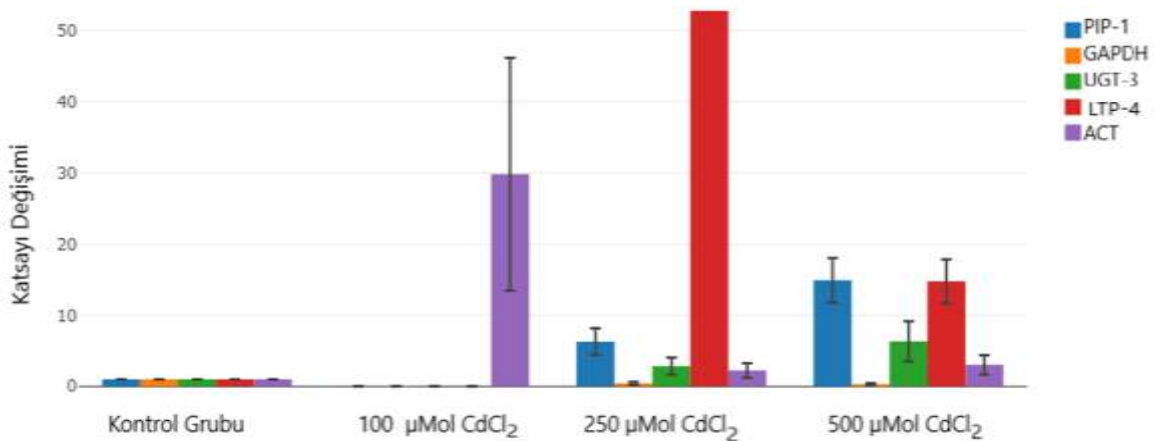
Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinin Cd stresi maruziyeti sonucunda gövdede ekspresyon seviyesinde en fazla değişimin LTP-4 geninde meydana geldiği görülmüştür. PIP-1 geninde ise anlamlı bir değişim gözlenememiş, hatta kontrol bitkisiyle aynı ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir (Şekil 5., Şekil 6.).



Şekil 5. Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin gövdesinde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin çizgi grafiği



Şekil 6. Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin gövdesinde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin kolon grafiği



Şekil 7. Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin kökünde meydana gelen ekspresyon değişimlerinin kolon grafiği

qAMP analizi ve DNA metilasyon yüzdesi

Dört konsantrasyon (0, 100, 250, 500 μM) şeklinde uygulanan Ekmeklik buğday bitkisinin kök ve gövdesinde UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinin qAMP tekniği kullanılarak DNA metilasyon seviyelerinde değişimler saptanmıştır. Cd stresi ile ilişkili olarak seçilen bu genlerin her üçünde de metilasyon seviyelerinde değişimler görülmüştür (Tablo 10., Tablo 11., Tablo 12.).

Tablo 10. UGT-3 Gen Bölgesinde Meydana Gelen MSRE ve MDRE Metilasyon Yüzdeleri

CdCl₂ KONSANTRASYONLARI	MSRE	MDRE
Gövde Kontrol	0,694569	99,95662
100 μM CdCl ₂ (gövde)	5,281146	99,00982
250 μM CdCl ₂ (gövde)	27,98007	98,14337
500 μM CdCl ₂ (gövde)	0,050095	99,97284
Kök Kontrol	0,069718	99,94226
100 μM CdCl ₂ (kök)	47,91715	85,99512
250 μM CdCl ₂ (kök)	148,4796	80,66232
500 μM CdCl ₂ (kök)	43,71819	55,13342

UGT-3 geninde MSRE'ler için 16 bölgede ve MDRE'ler için 37 bölgede metilasyon analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda MSRE bölgeleri için bitkinin gövdesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100, 250 ve 500 μM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %5,28, %27,98 ve %0,05 oranlarında metilasyon meydana gelmiştir. Kontrol grubuna göre en yüksek metilasyon oranı 250 μM konsantrasyonunda oluşmuştur (Şekil 8). Bitkinin kökünde ise 100, 250 ve 500 μM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %47,91; %148,47 ve %43,71 oranlarında metilasyon meydana gelmiştir (Şekil 9). Gövdede olduğu gibi kökte de en yüksek metilasyon oranı 250 μM CdCl₂ konsantrasyonunda görülmüştür (Tablo 10). MDRE bölgeleri içinse, gövdede metilasyon seviyesi tüm konsantrasyonlarda yaklaşık %99 iken (Şekil 10., Şekil 12.) kökte 100, 250 ve 500 μM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %85,99, %80,66 ve %55,13 oranlarında metilasyon oluşmuştur (Şekil 11., Şekil 13.). Bu metilasyon oranlarına göre MDRE bölgelerinde gövdede meydana gelen metilasyon oranı kökte oluşan metilasyon oranından yüksek olarak incelenmiştir (Tablo 10)

Tablo 11. LTP-4 Gen Bölgesinde Meydana Gelen MSRE ve MDRE Metilasyon Yüzdeleri

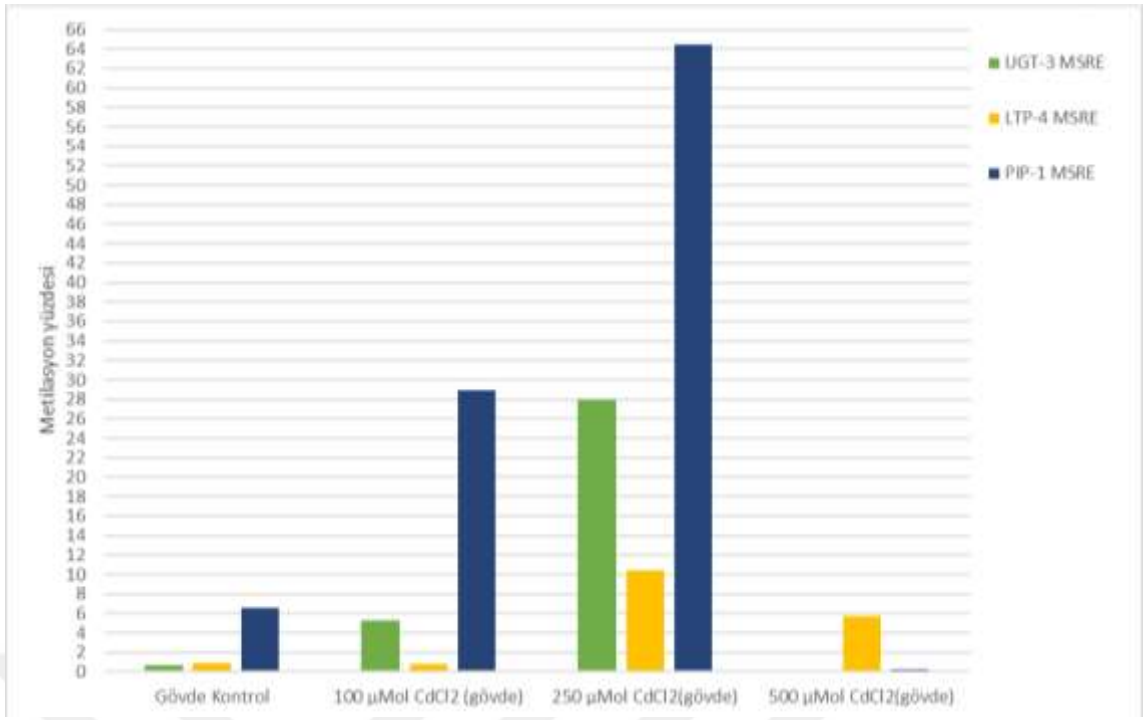
CdCl₂ KONSANTRASYONLARI	MSRE	MDRE
Gövde Kontrol	0,945859036	99,863834
100 µM CdCl ₂ (gövde)	0,798892376	99,894369
250 µM CdCl ₂ (gövde)	10,40170546	97,067659
500 µM CdCl ₂ (gövde)	5,767321002	99,356073
Kök Kontrol	0,014463916	99,955728
100 µM CdCl ₂ (kök)	3,427608549	98,518716
250 µM CdCl ₂ (kök)	38,8725155	60,510902
500 µM CdCl ₂ (kök)	0,884757884	99,348123

LTP-4 geninde MSRE'ler için 6 bölgede ve MDRE'ler için 29 bölgede metilasyon analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda MSRE bölgeleri için bitkinin gövdesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100, 250 ve 500 µM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %0,79; %10,40 ve %5,76 oranlarında metilasyon meydana gelmiştir. Kontrol grubuna göre en yüksek metilasyon oranı 250 µM konsantrasyonunda oluşmuştur (Şekil 8). Bitkinin kökünde ise 100, 250 ve 500 µM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %3,42; %38,87 ve %0,88 oranlarında metilasyon meydana gelmiştir (Şekil 9). Gövdede olduğu gibi kökte de en yüksek metilasyon oranı 250 µM CdCl₂ konsantrasyonunda görülmüştür (Tablo 10). MDRE bölgeleri içinse, gövdede metilasyon seviyesi 100 ve 500 µM konsantrasyonlarda yaklaşık %99 iken 250 µM konsantrasyon %97'ye düşüş gözlenmiştir (Şekil 10., Şekil12.). Bitkinin kökünde ise 100, 250 ve 500 µM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %98,51; %60,51 ve %99,34 oranlarında metilasyon oluşmuştur (Şekil 11., Şekil 13.). Bu metilasyon oranlarına göre MDRE bölgelerinde kökte meydana gelen metilasyon oranı gövdede oluşan metilasyon oranından yüksek olarak incelenmiştir (Tablo 11).

Tablo 12. PIP-1 Gen Bölgesinde Meydana Gelen MSRE ve MDRE Metilasyon Yüzdeleri

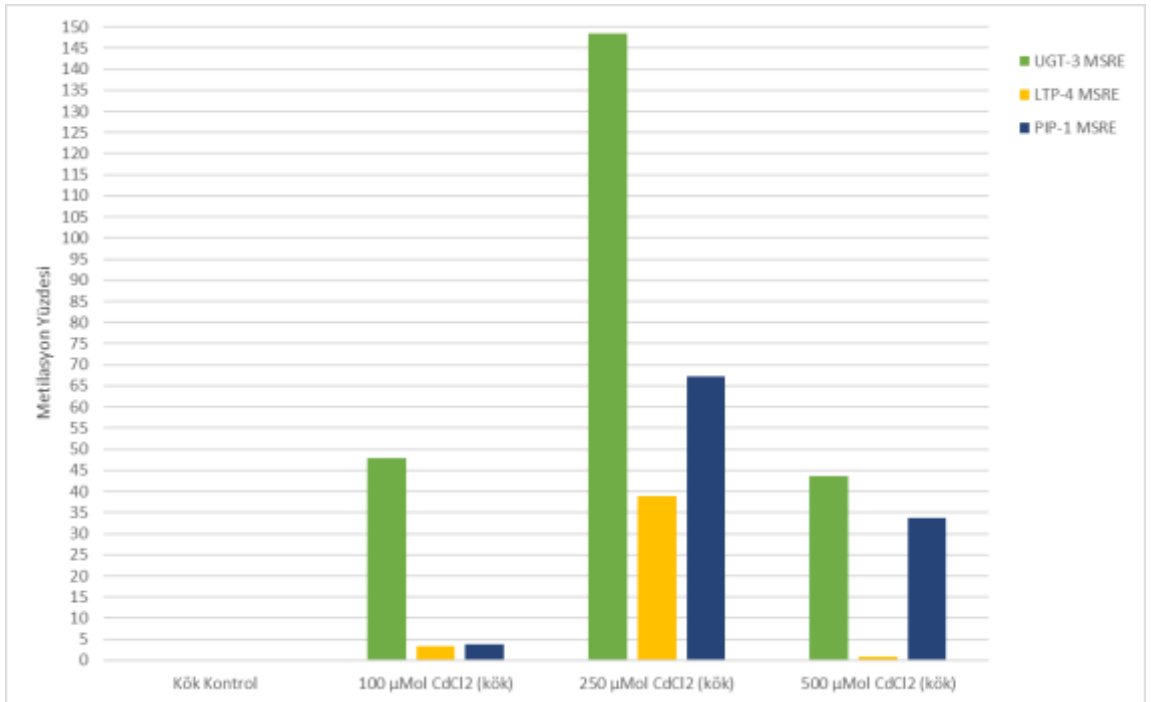
CdCl₂ KONSANTRASYONLARI	MSRE	MDRE
Gövde Kontrol	6,58742483	97,678289
100 µM CdCl ₂ (gövde)	28,90284673	98,469244
250 µM CdCl ₂ (gövde)	64,47432351	71,615049
500 µM CdCl ₂ (gövde)	0,296955067	99,223633
Kök Kontrol	0,143442657	99,978527
100 µM CdCl ₂ (kök)	3,906784364	68,158896
250 µM CdCl ₂ (kök)	67,18650243	97,674718
500 µM CdCl ₂ (kök)	33,74871597	85,757808

PIP-1 geninde MSRE'ler için 30 bölgede ve MDRE'ler için 68 bölgede metilasyon analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda MSRE bölgeleri için bitkinin gövdesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100, 250 ve 500 µM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %28,90; %64,47 ve %0,29 oranlarında metilasyon meydana gelmiştir. Kontrol grubuna göre en yüksek metilasyon oranı 250 µM konsantrasyonunda oluşmuştur (Şekil 8). Bitkinin kökünde ise 100, 250 ve 500 µM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %3,90; %67,18 ve %33,74 oranlarında metilasyon meydana gelmiştir (Şekil 9). Gövdede olduğu gibi kökte de en yüksek metilasyon oranı 250 µM CdCl₂ konsantrasyonunda görülmüştür (Tablo 12). MDRE bölgeleri içinse, gövdede metilasyon seviyesi 100 ve 500 µM konsantrasyonlarda yaklaşık %99 iken 250 µM konsantrasyon %71'e düştüğü görülmüştür (Şekil 10., Şekil12.). Bitkinin kökünde ise 100, 250 ve 500 µM CdCl₂ konsantrasyonlarında sırasıyla %68,15; %97,67 ve %85,75 oranlarında metilasyon oluşmuştur (Şekil 11., Şekil 13.). Bu metilasyon oranlarına göre MDRE bölgelerinde gövdede meydana gelen metilasyon oranı kökte oluşan metilasyon oranından yüksek olarak incelenmiştir (Tablo 12).



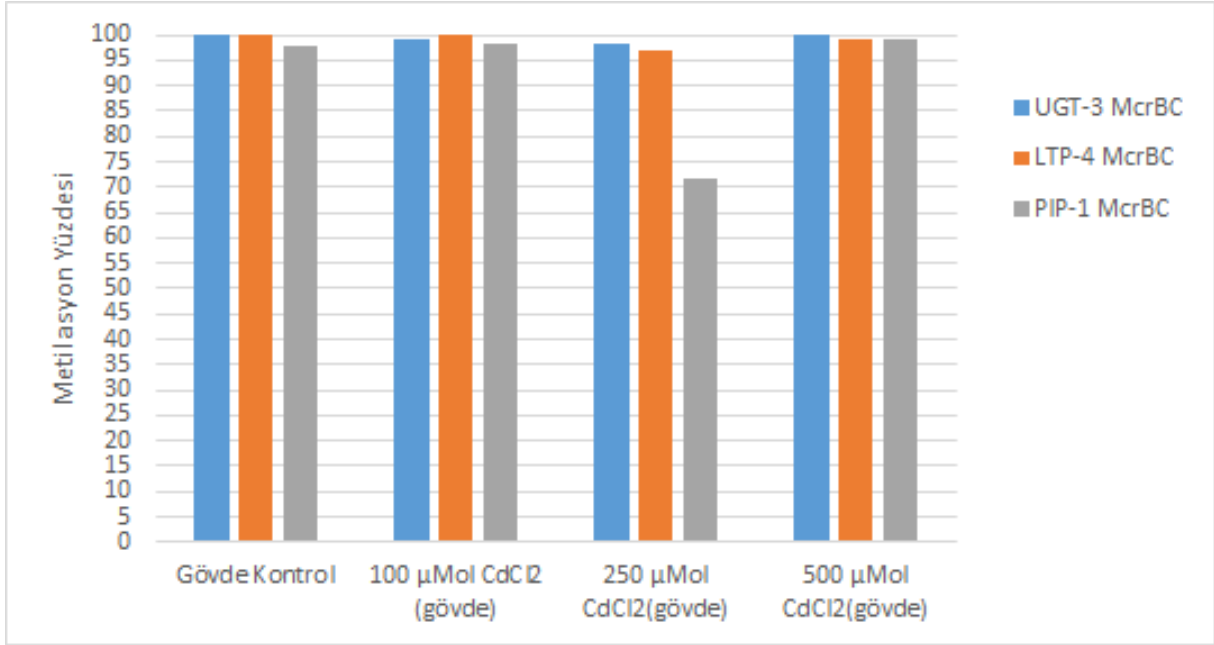
Şekil 8. Bitki gövdesinde seçilen genlerin MSRE bölgelerindeki metilasyon oranları

UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinde belirlenen MSRE bölgeleri incelendiğinde bitkinin gövdesinde en fazla metilasyon oranının 250 µM Cd konsantrasyonunda PIP-1 geninde gerçekleştiği görülmüştür. Yapılan analiz sonucunda, tüm genlerde 100 ve 250 µM Cd konsantrasyonlarında metilasyon miktarının arttığı, fakat 500 µM Cd konsantrasyonunda metilasyon oranının düştüğü gözlenmiştir (Şekil 7).

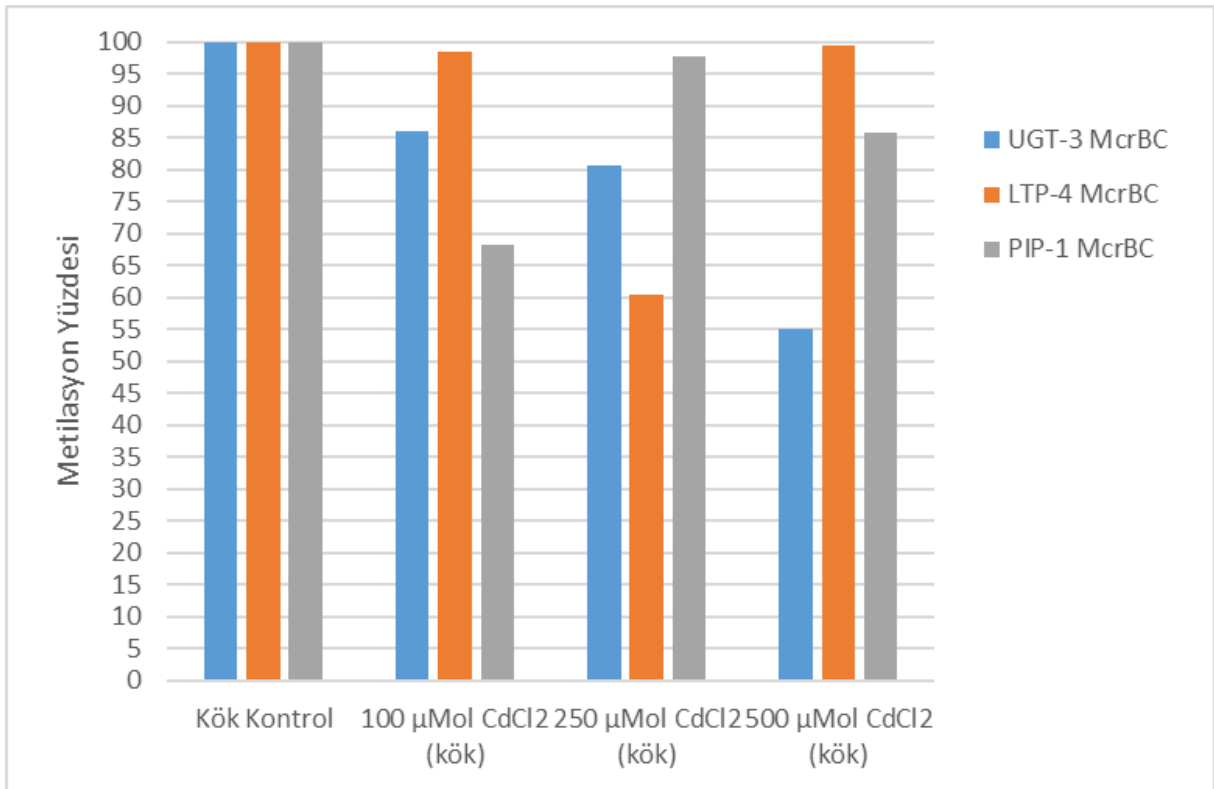


Şekil 9. Bitki kökünde seçilen genlerin MSRE bölgelerindeki metilasyon oranları

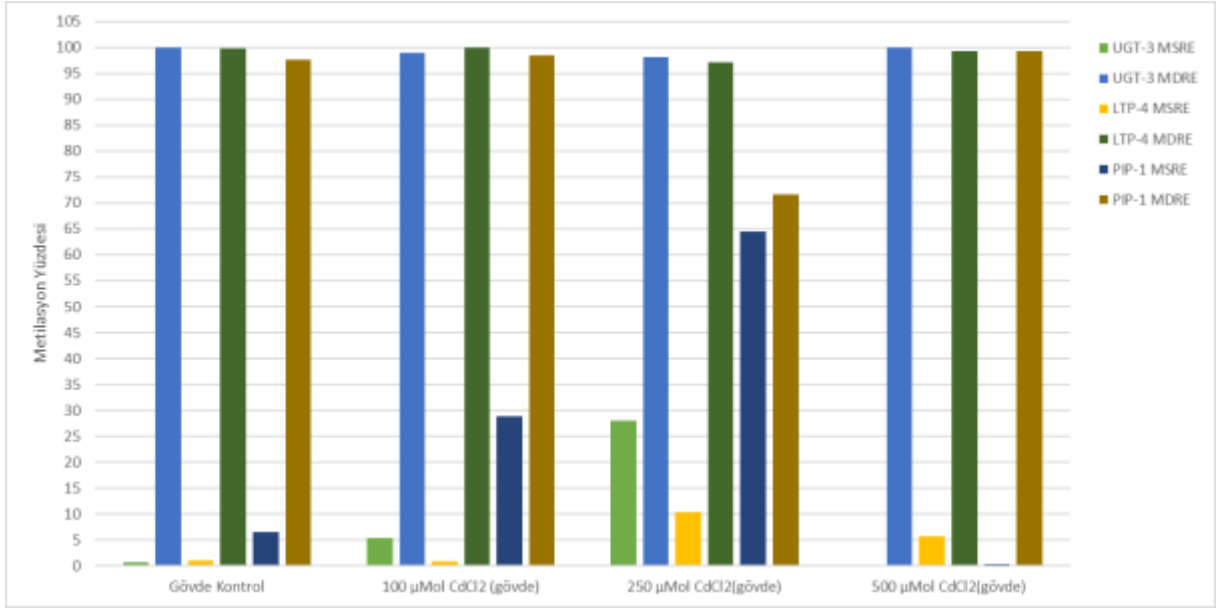
UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinde belirlenen MSRE bölgeleri incelendiğinde bitkinin kökünde en fazla metilasyon oranının 250 μ M Cd konsantrasyonunda UGT-3 geninde gerçekleştiği görülmüştür. Yapılan analiz sonucunda, tüm genlerde 100 ve 250 μ M Cd konsantrasyonlarında metilasyon miktarının arttığı, fakat 500 μ M Cd konsantrasyonunda metilasyon oranının düştüğü gözlenmiştir (Şekil 9).



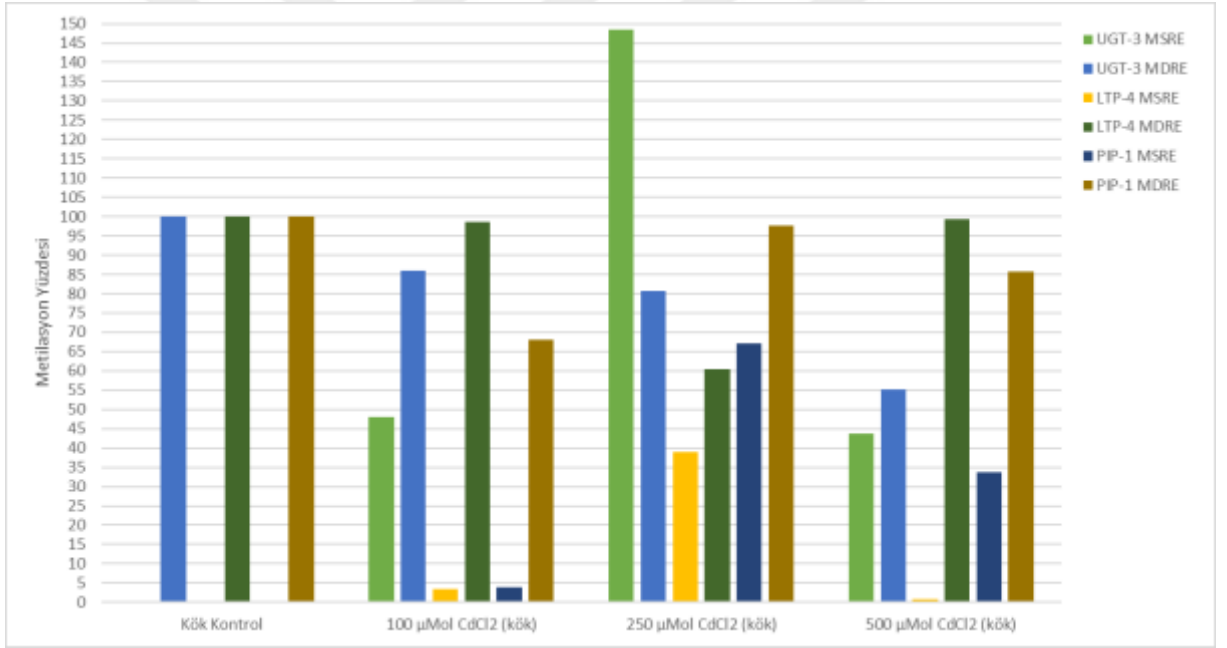
Şekil 10. Bitki gövdesinde seçilen genlerin MDRE bölgelerindeki metilasyon oranları



Şekil 11. Bitki kökünde seçilen genlerin MDRE bölgelerindeki metilasyon oranları



Şekil 12. Seçilen genlerin bitki gövdesinde MSRE ve MDRE bölgesindeki metilasyon oranları



Şekil 13. Seçilen genlerin bitki kökünde MSRE ve MDRE bölgesindeki metilasyon oranları

Gen ekspresyonu seviyelerindeki ve DNA metilasyon yüzde değişimlerinin karşılaştırılması

CdCl₂ ağır metalinin dört doz (0, 100, 250, 500 µM) olarak *Triticum aestivum* türüne uygulanması sonucunda UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinde kontrol grubu baz alınarak hesaplanan, gen ekspresyon seviyesinde değişimler ve metilasyon yüzdesi değişimleri elde edilmiştir (Tablo 13). Elde edilen bu veriler gövde ve kök için her bir gen ayrı ayrı birbiriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 12., Şekil 13.).

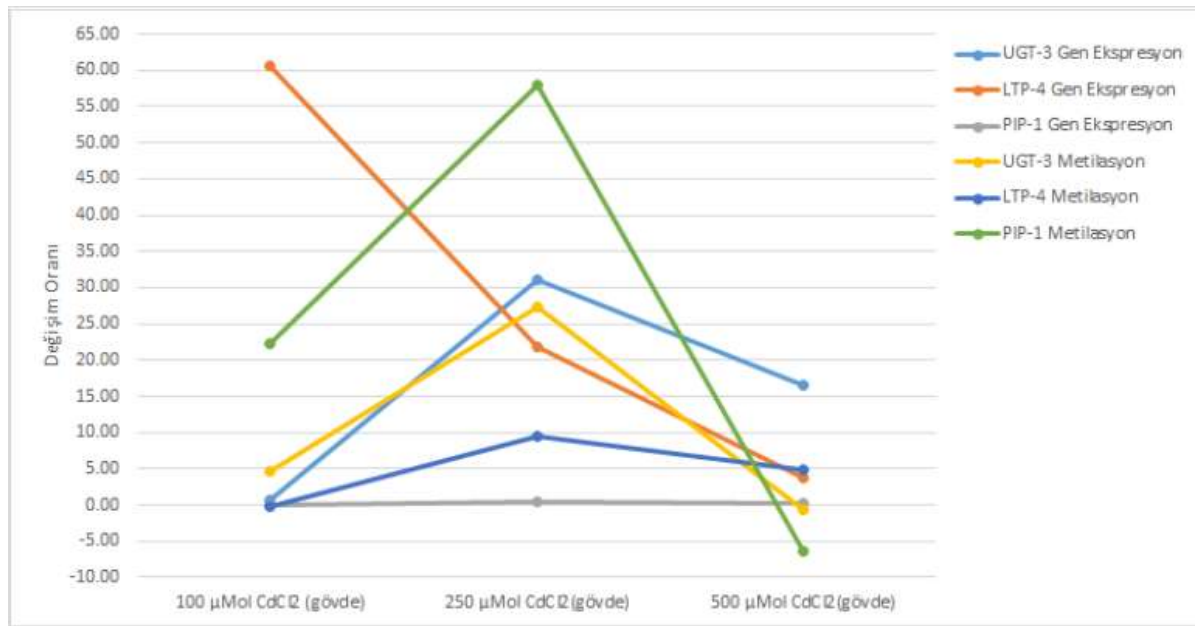
Tablo 13. Analizler Sonucunda Elde Edilen Gen Ekspresyon Oranları ve DNA Metilasyon Yüzdeleri

	100 µM CdCl ₂ (gövde)	250 µM CdCl ₂ (gövde)	500 µM CdCl ₂ (gövde)	100 µM CdCl ₂ (kök)	250 µM CdCl ₂ (kök)	500 µM CdCl ₂ (kök)
UGT-3 Geninin Ekspresyon Oranları	0,77	(+)31,05	(+)16,64	(-)0,04	(+)2,85	(+)6,35
LTP-4 Geninin Ekspresyon Oranları	(+)60,69	(+)21,81	(+)3,7	(+)0,03	(+)5928	(+)14,77
PIP-1 Geninin Ekspresyon Oranları	(-)0,04	(-)0,48	(-)0,2	(-)0,03	(+)6,29	(+)14,91
UGT-3 Geninin Metilasyon Yüzdesi	4,58657643	27,285501	-0,6711906	47,847428	148,40992	43,648474
LTP-4 Geninin Metilasyon Yüzdesi	-0,1469666	9,4558464	4,8214619	3,4131446	38,858051	0,8702939
PIP-1 Geninin Metilasyon Yüzdesi	22,3154219	57,886898	-6,2904697	3,7633417	67,043059	33,605273

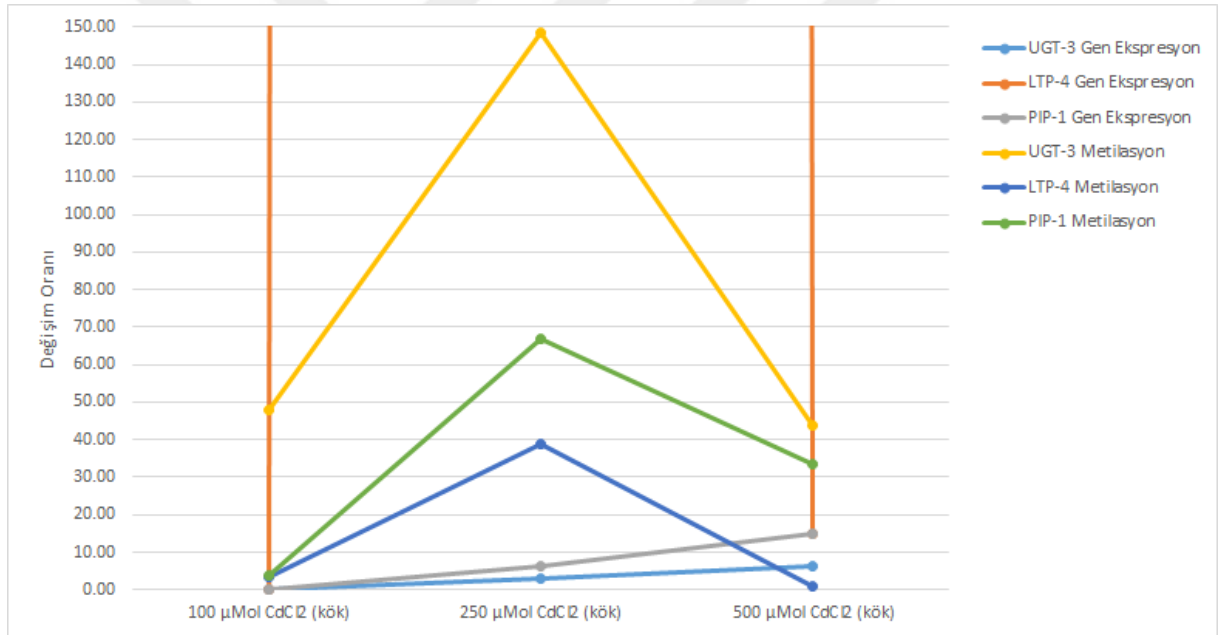
CdCl₂ ağır metali maruziyetinde gövdede UGT-3 geninin ekspresyon seviyesi doza bağlı olarak artarken 500 µM Cd konsantrasyonunda 250 µM konsantrasyonuna göre düşüş sergilemiştir. Metilasyon yüzdesi ise kontrol grubuna göre 100 µM ve 250 µM dozlarında yükselirken 500 µM Cd konsantrasyonunda özellikle 250 µM'e göre düşüş göstermiştir (Şekil 14). UGT-3 geninin kökteki ekspresyon doza bağlı olarak artarken metilasyon yüzdesi 250 µM dozlarında artış göstererek diğer dozlarda da artmıştır (Şekil 15).

CdCl₂ ağır metali maruziyetinde gövdede LTP-4 geninin ekspresyon seviyesi doza bağlı olarak azalırken metilasyon yüzdesi ise kontrol grubuna göre 100 µM dozunda anlamlı olmayan bir düşüş gösterirken diğer dozlarda artmıştır ancak 500 µM dozunda 250 µM konsantrasyonuna oranla bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 14). LTP-4 geninin kökteki ekspresyon seviyesi 250 µM Cd konsantrasyonunda aşırı şekilde artış göstererek artmıştır. LTP-4 geninin kökteki metilasyon yüzdesinde kontrol grubuna göre en çok artışı 250 µM Cd konsantrasyonunda göstererek diğer dozlarda da artmıştır (Şekil 15).

Triticum aestivum bitkisinde CdCl₂ ağır metali maruziyetinde gövdede PIP-1 geninin ekspresyon seviyesi anlamsız olarak artış göstermiştir. Metilasyon yüzdesi ise kontrol grubuna göre 100 µM ve 250 µM dozlarında ciddi derecede artarken 500 µM Cd konsantrasyonunda düşüş göstermiştir (Şekil 14). Kökte PIP-1 geninin ekspresyon seviyesi doza bağlı olarak artmıştır. Metilasyon yüzdesinde kontrol grubuna göre en çok artışı 250 µM Cd konsantrasyonunda göstererek diğer dozlarda da artmıştır (Şekil 15).



Şekil 14. Gövdedeki gen ekspresyon ve DNA metilasyon seviyelerinin değişim oranları



Şekil 15. Kökteki gen ekspresyon ve DNA metilasyon seviyelerinin değişim oranları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Hızla artan nüfusun beraberinde getirdiği hızlı kentleşme ve sanayileşme, doğa ve insanlık için bir dizi problemi de beraberinde getirmiştir. Çevresel kirlilik bu problemlerin başında gelen ve önleyici adımlar atılması gereken temel problemlerden biridir. Günümüzde ağır metallerin oluşturmuş olduğu ekolojik kirlilik tüm dünya gündeminde önemli ve endişe verici bir konu olarak yer almaktadır. Birçok bilim dalı ve multidisipliner çalışma tarafından ağır metallerin atmosferi kirlettiği, toprak yapısını bozduğu, bitkisel verimi azalttığı, su kalitesini düşürdüğü gibi etkileri ortaya koyulmuştur (Hossain et al., 2012; Emamverdian et al., 2015; Wang et al., 2017; Briffa et al., 2020; Fu and Xi, 2020; Mishra et al., 2021).

Ağır metaller grubunda yer alan Cd; kimyasal gübrelerin değiştirilmesi, çamur ve lağım suları ile sulamaların yapılması gibi nedenlerden dolayı toprakta birikimi artmaktadır. Ekilebilir topraktaki Cd kirliliği, son birkaç yılda dünya çapında çarpıcı bir şekilde artmıştır ve gıda güvenliği, insan sağlığı için potansiyel tehdit oluşturmuştur (Li et al., 2014; Zhou et al., 2018; Vareda et al., 2019). Cd'nin insana ulaşımını kolaylaştıran unsurlardan biri hiç şüphesiz bitkilerdir. Bitkiler için temel olmayan bu ağır metalin birikimi birçok hücrel fonksiyonu etkilemekte fotosentez, su ve besin alımını azaltmaktadır. Genel semptomları arasında büyüme inhibisyonu, kloroz ve farklı dokulardaki anatomik, morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal özelliklerin değişimleri bulunmaktadır (Genchi et al., 2020). Cd'nin bitki için hayati olan fonksiyonlardaki rollerini bitki tepkilerinin moleküler mekanizmaları ve Cd stresine karşı savunma mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir. Yaptığımız çalışmada, Cd stresinin 100, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarında yetiştirilen Ekmeklik buğday bitkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kök ve gövde organlarının gözle görülebilir şekilde boylarının kısaldığı ve daha zayıf büyüdükleri görülmüştür.

Bitkiler, diğer organizmalarda olduğu gibi iç dengelerini koruma eğilimi göstermektedirler. Değişmiş çevresel koşullar altında bitki, strese karşı yeniden bir homeostasis kurmayı amaçlayarak aktif bir süreç başlatmaktadır. Bitkiler değişen şartları algılayarak zarar görmeyi önleyecek şekilde bir yanıt oluşturmaktadırlar (Kosová et al., 2007). Bu karmaşık mekanizmada genlerin ifadesinde değişikliklerin oluşması, farklı stres faktörleri tarafından indüklenmesinden kaynaklanmaktadır (Duque et al., 2013). Yapılan bir çalışmada, Cd stresinin uygulandığı soya fasulyesinde ABA bozunması, GB ve SA biyosentezi, hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi ve Cd taşınması ile ilgili genlerin upregüle olduğu, zeatinriboside (ZR), indol 3-asetik asit (IAA) ve metil jasmonat (MeJA) ile ilgili

genlerin ise downregüle olduğu rapor edilmiştir (Bashir et al., 2019). Çalışmamızda PIP-1 geninin bitkinin gövdesinde downregüle olduğu, fakat bunun önemli bir oranda gerçekleşmediği görülmüştür. UGT-3 ve LTP-4 genlerinin ise önemli derecede upregüle olduğu gözlenmiştir. Ayrıca LTP-4 geninin gövdede en yüksek 100 μ M konsantrasyonda en yüksek ekspre olduğu dozların artmasıyla ekspresyon miktarının azaldığı görülmüştür.

Farklı abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde LTP genlerinin ekspresyon verileri ile ilgili pekçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda LTP'lerin tuz stresine (Jang et al., 2004; Wang et al., 2010), osmotik strese (Choi et al., 2008), kuraklık stresine (Cameron et al., 2006) ve soğuk stresine (Jung et al., 2003) adaptasyon sağlamada rol oynadığına dair birçok kanıt bildirilmiştir (Hinch et al., 2001). Tayeh ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, buğday bitkisine maruz bırakılan stresi bertaraf etmek için Heptanoil Salisilik Asit (HSA) uygulanmış ve LTP genlerinin ekspresyon oranlarına bakılmıştır. Strese maruz bırakılan genlerde LTP genlerinin ekspresyonunda önemli bir değişiklik olmazken, HSA püskürtüldüğünde bu genlerin yüksek oranda upregüle olduğu bildirilmiştir (Tayeh et al., 2013). Yine başka bir araştırmada, yüksek ekspre olan LTP mutant bitkilerinin tuz stresine maruziyetinde kontrol bitkilerine göre çok daha iyi büyüdükleri belirlenmiştir. Bunun aksine, LTP genlerinin baskılandığı mutantlarda ise belirgin bir büyüme etkisi görülmemiştir (Jülke and Ludwig-Müller, 2016). LTP'lerin yüksek oranda ekspre olduğu mutantlarda organizma içerisinde ABA seviyesinin arttığı ve özellikle LTP-3'ün ABA yolunun düzenleyicisi olduğu kanıtlanmıştır (Gao et al., 2016). Çalışmamızda da LTP-4 geninin Cd stres dozlarının artışıyla gövdede upregülasyon oranlarının düştüğü, bitkinin kökünde ise 250 μ M konsantrasyonda ani bir yükselme ile upregüle olduğu görülmüştür. Durum buğdayında yapılan çalışmada, abiyotik stres koşullarına toleranslı ve hassas olan genotiplere farklı abiyotik stresler uygulanmıştır. Bu bitkilerde LTP-4 geninin ekspresyon oranları incelenmiştir. Elde edilen verilere göre, toleranslı genotipte hassas olan genotipe kıyasla daha fazla LTP-4 geninin ekspre olduğu bulunmuştur. LTP-4'ün aşırı ekspre olması bitki büyümesinin teşvik edilmesi ile sonuçlanmıştır (Safi et al., 2015). Bu durum LTP-4 geninin abiyotik streslere karşı tolerans mekanizmalarında etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, çalışmamızda bitki köklerinde 250 μ M konsantrasyonda bu genin aşırı upregüle olması Cd stresine doğrudan maruz kalan organların kökler olması nedeniyle burada savunma proteinlerinin daha aktif olduğu için gerçekleştiği düşünülmüştür (Driouich et al., 2013; Baetz and Martinoia, 2014; Khan et al., 2021). Dahası, sonraki yüksek dozda upregülasyonun çok fazla düşmesi abiyotik streslerin sınır seviyeye kadar savunma genlerini aşırı ekspre ettiği, bitkinin ölüme yaklaştığı sınırlarda ise savunma genlerinin ekspresyonunu çok azalttığı şeklinde yorumlanmıştır (Sorrentino et al., 2017).

Glikosiltransferazlar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan çeşitli şekerlerin eklenmesini katalizleyen enzimler olarak tanımlanırlar. En önemli özellikleri aglikonların glikozilasyon aktivitelerini, çözünürlüklerini ve taşınmalarını değiştirmeleri olarak bildirilmiştir. Bu nedenle, glikolizasyon hücrel metabolizmada önemli bir düzenleyici olarak kabul edilmişlerdir (Lim and Bowles, 2004). Bitki UGT'leri, bitki hormonları, bitki sekonder metabolitleri ve biyolojik homojen/heterolog maddeler (siyanojenik glikozitler ve herbisitler gibi) dahil olmak üzere glikozilasyon reaksiyonları için çok çeşitli substratları katalize etmektedirler. *Arabidopsis* genomunda >100 UDP-glikosiltransferaz (UGT) aile üyesi mevcuttur (Ross et al., 2001). Çalışmamızda UGT-3 geni hem kökte hem de gövdede upregüle olmuştur. Gen ekspresyonunun en yüksek olduğu doz bitkinin gövdesinde araştırılan 250 µM konsantrasyon olarak bulunmuştur. Ekmeklik buğday bitkisinin kökünde ise Cd stresinin artışıyla orantılı olarak ekspresyon seviyesi artmıştır. Çin karnıbaharında yapılan çalışmada, bitki savunmasında önemli bir rol oynayan glikosinolatların üretimi üzerine UGT'lerin etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, glikosinolat birikiminin yüksek olduğu bitkilerde UGTJB1 'in ekspresyon seviyesinin iki kat arttığı bildirilmiştir (Zheng et al., 2021). Su stresine karşı UGT74E2 geninin Indol-3-bütirik aside (IBA) birlikte etkileri araştırılmıştır. IBA'nın strese karşı koruyucu rolünü UGT74E2'nin desteklediğini ve sinerjik etki oluşturdukları rapor edilmiştir (Tognetti et al., 2010). Ayrıca UGT-3 geninin özellikle bitkilerde fungal hastalıkların bertaraf edilmesinde de etkili olduğu bildirilmiştir. Mikotoksinlerden biri olan DON'un meydana getirdiği küf hastalığının mekanizması buğday bitkisinde araştırılmış, UGT-3 geninin aşırı ekspre olduğu transgenik bitkilerde kontrole göre daha az DON birikimi sergilendiği belirlenmiştir. Yine UGT-3'ün upregüle olması kök uçlarında SA ve JA'nın miktarını arttığını ve savunma cevaplarını pozitif olarak düzenlediğini göstermiştir (Xing et al., 2018).

Transmembran su iletimi, aquaporinler olarak adlandırılan su kanalı proteinlerinden dolayı membran geçirgenliğinin artmasıyla çift lipid tabakası boyunca difüzyon ile gerçekleşmektedir (Preston et al., 1992). Bu aquaporinler, suyun zar boyunca hızlı ve kontrollü bir şekilde yer değiştirmesini sağlamaktadır. Bitki aquaporinlerinden en önemlilerinden biri PIP'lerdir. PIP'ler tuz, kuraklık, soğuk, su stresi, ışık gibi abiyotik streslere ve fitohormonlara yanıt mekanizmalarında görev aldıkları çeşitli bitkilerde kanıtlanmıştır (Gao et al., 1999; Yang et al., 2003). Farklı abiyotik stres koşullarına dayanıklılık gösteren *Festuca* türleri arasında PIP genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, kuraklık stresi altında PIP-1 geninin ekspresyon miktarının azaldığı, fakat yüksek kuraklık altında PIP-2 geninin ekspresyon seviyesinin arttığı belirtilmiştir. Soğuk stresi maruziyetinde ise her iki genin de ekspresyon seviyelerinin

azaldığı rapor edilmiştir (Pawłowicz et al., 2017). Çalışma sonuçlarımıza göre, PIP-1 geni Ekmeklik buğday bitkisinin köklerinde kontrol grubuna kıyasla önemli olmayan bir şekilde downregüle olurken, gövdede ise Cd stresinin artışına bağlı olarak yaklaşık 6 kat upregüle meydana gelmiştir. Yapılan bir çalışmada, PIP-1 ve PIP-2 genlerinin köklerde aktif olduğunu gösterirken gövdede sadece PIP-2'in ekspre edildiği bildirilmiştir. Bu nedenle PIP-2'nin köklerde su alınımasını ve taşınmasını sağlayan en önemli gen olduğu rapor edilmiştir (Guo et al., 2006). ABA ve tuzun uygulandığı *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde strese yanıt olarak PIP genlerinin ekspresyonunun arttığı da ortaya konulmuştur (Jang et al., 2004).

Gen ifadesini düzenleyen mekanizmaların başında epigenetik mekanizmalar gelmektedir. Bitki epigenetiğinde DNA metilasyonu özellikle gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan önemli bir mekanizmadır. Spesifik bir DNA metilasyonu, meydana gelişi, korunması ve aktif uzaklaştırma faaliyetlerinin dinamik düzenlenmesinin sonucunu yansıtmaktadır. Bu aktiviteler, farklı yollarla spesifik genomik bölgelerde hedeflenen çeşitli enzimler tarafından katalize edilmektedir. Bitki DNA metilasyonu, tüm sitozin sekanslarında meydana gelebilmektedir: CG, CHG ve CHH (H = A, T veya C'yi temsil etmektedir) (Zhang et al., 2006; Lister et al., 2008). *A. thaliana*'da yapılan çalışmalar genomunda DNA metilasyonu; transposable elementler (transpozonlar) ve diğer tekrarlayan DNA sekanslar ile zenginleştirilmiş heterokromatin bölgesindeki ağır metilasyon ile karakterize edilmektedir (Henderson and Jacobsen, 2007).

Bitkilerde genlerle ilişkili DNA metilasyonu, promotörde veya kopyalanan gen bölgesi içinde meydana gelebilmektedir. Promotör DNA metilasyonu genellikle gen transkripsiyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ancak bazı durumlarda *A. thaliana*'da ROS1 geninde ve domateste meyve olgunlaşmasını engelleyen yüzlerce gende olduğu gibi gen transkripsiyonunu destekleyebildiği de rapor edilmiştir (Zhang and Zhu, 2012; Lei et al., 2015; Williams et al., 2015). Promotör DNA metilasyonu, transkripsiyon aktivatörlerinin bağlanmasını inhibe ederek, transkripsiyon baskılayıcıların bağlanmasını teşvik ederek doğrudan transkripsiyonu baskılayarak, H3K9me2 gibi baskılayıcı histon modifikasyonlarını teşvik ederek ve histon asetilasyonu gibi histon modifikasyonlarını inhibe ederek transkripsiyonu baskılayabilmektedir (Domcke et al., 2015; Zhu et al., 2016). Promotör metilasyonunun gen transkripsiyonunu nasıl aktive ettiği konusu henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen, DNA metilasyonu, bazı transkripsiyon aktivatörlerinin bağlanmasını artırması veya bazı transkripsiyon baskılayıcıların bağlanmasını engellemesi şeklinde düşünülmüştür. Promotörlerdeki DNA metilasyonu, genellikle yakındaki transpozonlardan ve diğer tekrarlayan sekanslardan metilasyon bölgelerinin yayılması

şeklinde açıklanmıştır. Gen bölgesine bitişik bulunan transpozonlar ve tekrarlar, genleri transkripsiyonel susturulmadan korumak için aktif DNA demetilasyon mekanizması tarafından da belirlenmektedir (Tang et al., 2016). Promotör DNA metilasyonu tarafından aktive edilen genlerin durumunda, genlerin transkripsiyonel susturulmasına neden olan aktif demetilasyonun rol aldığı bildirilmiştir (Lang et al., 2017). *A. thaliana*'da, promotör bölgelerinde genlerin sadece yaklaşık %5'i metillenir. Buna karşılık, daha büyük genomlara sahip ekin bitkileri, daha yüksek bir transpozon içeriğine ve genlere yakın daha fazla transpozona sahip olabilir; sonuç olarak, promotör metilasyonuna sahip daha fazla gen vardır (Matzke and Mosher, 2014). Bu nedenle, DNA metilasyonu, birkaç ekin bitkisinde gen düzenlemesinde *A. thaliana*'dan daha önemli rollere sahiptir ve bu ekin bitkilerindeki DNA metilasyon mutantları genellikle ya öldürücüdür ya da ciddi büyüme ve gelişim kusurlarına sahiptir (Alleman et al., 2006; Liu et al., 2015).

Bitkilerin çeşitli biyotik ve abiyotik çevresel uyaranlara karşı yanıtta DNA metilasyonunun işlev gördüğü bilinmektedir. Çevresel ortamın, özellikle geçmişte maruz kalınan ortamların olası bitki hafızasına kaydedilmesine duyulan hayranlıktan dolayı DNA metilasyonunu değiştirip değiştiremeyeceğine büyük bir ilgi duyulmaktadır. *A. thaliana* epigenomları üzerine yapılan çalışmalar, sadece metilasyona dayalı epigenetik özellikli lokusları değil, aynı zamanda DNA metilasyonu ile lokal adaptasyon arasında bir korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır (Schmitz et al., 2013) ve bunlar epiallellerin neden olduğu farklı gen ekspresyonu ile tüm genomdaki DNA metilasyon seviyeleri arasında bağlantı olduğunu vurgulanmıştır (Dubin et al., 2015; Kawakatsu et al., 2016). Ayrıca, bitki DNA metilasyonunun çevresel stres koşulları altında bireysel lokuslarda veya tüm genom boyunca değişebileceğini göstermiştir, ancak abiyotik strese yanıt olarak herhangi bir değişikliğin adaptif olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (Zhang et al., 2018).

Araştırmacılar, ısı, soğuk, kuraklık, yüksek tuzluluk, hiperosmotik stres, ultraviyole radyasyon stresi, toprak besin maddesi eksikliği, pestisitler ve iklim değişikliği dahil olmak üzere çok çeşitli abiyotik çevresel stres koşullarına bitki yanıtlarında DNA metilasyonunun potansiyel rollerini yoğun bir şekilde araştırmıştır. Bu araştırmalar *A. thaliana*, mısır, pirinç, kışlık buğday, *Brassica rapa*, *Brassica napus*, arpa, *Populus* gibi pekçok farklı bitki türünde yapılmıştır (Lang-Mladek et al., 2010; Secco et al., 2015; Chwialkowska et al., 2016; Li et al., 2016; Ganguly et al., 2017; Liu et al., 2017). Son çalışmalar, bitkilerde DNA metilasyonuna bağlı stres belleği oluşturmak için kalıcı stresin potansiyel önemini vurgulamıştır (Jiang et al., 2014; Sanchez and Paszkowski, 2014; Wibowo et al., 2016). Buğday bitkisindeki VERNALİZASYON-A1 geninde CG dışı hipermetilasyonunun soğuk maruziyetinde

indüklendiğini ve bu metilasyonun mitoz yoluyla iletildiğini rapor etmiştir. Domates meyvelerinde ise, soğuk stresinin DNA demetilaz DML2'nin ekspresyonunu downregüle ettiği, böylece promotör hipermetilasyonuna ve aromatik yağların biyosentezinden sorumlu genlerin susturulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Zhang et al., 2016).

Çalışmamızda Cd stresi uygulanan Ekmeklik buğday bitkilerindeki DNA metilasyon seviyeleri qAMP tekniği ile araştırılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarında UGT-3 geninde MSRE'lerin metilasyon yüzdesi hem gövdede hem de kökte en yüksek 250 μ M konsantrasyonda belirlenmiştir. Bitkinin gövdesinde MSRE bölgelerinde en yüksek %27 oran bulunduğu ve hipometilasyonun gerçekleştiği bulunmuştur. Kökte ise MSRE bölgelerinde 100, 250 ve 500 μ M konsantrasyonlarında sırasıyla %47; %148 ve %43 oranları tespit edilmiştir. 250 μ M dozda %100'ün üzerinde bir oran bulunması qAMP tekniğinde enzimlerin kesim bölgelerinin yan bölgelerindeki metillenmeleri de kapsamından kaynaklanmaktadır (Oakes et al., 2009). Metilasyon oranının gövdeye göre kökte daha fazla olması ekspresyon seviyesinde de düşüşe neden olmuştur. Bitkinin gövdesinde 31 kat ekspresyon oranı kökte 6 kat ekspresyon oranına düşmüştür. MDRE'lerin metilasyon yüzdelere bakıldığında gövdede dozlar arasında önemli bir değişimin olmadığı, enzimin kestiği bölgelerde hiper metilasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Fakat, bitkinin kökünde ise %85 oranında en yüksek metilasyon yüzdesi 100 μ M konsantrasyonda tespit edilmiştir. 500 μ M konsantrasyonda ise %55'e kadar metilasyon oranının düştüğü görülmüştür. UGT gen ailesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Chorispora bungeana* bitkisine +4°C ve -4°C' de soğuk stresi uygulanmıştır. Bu bitkilerde CbADH1, CbUGT ve CbPGIP genlerinin metilasyon seviyeleri ve gen ekspresyon oranları karşılaştırılmıştır. +4°C ve -4°C' de bu genlerin metilasyon seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. CbUGT'nin metilasyon seviyesinde küçük bir değişim gerçekleştiği, fakat ekspresyon seviyesinde yaklaşık 8 kat artışın gerçekleştiği belirtilmiştir (Song et al., 2017). Patates bitkisinde maternal ebeveyn ve ondan doku kültürü ile klonlanan varyantı arasında genlerin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. UGT geninin klonlanan varyantta hipermetilasyona uğradığı ve ekspresyon seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Tiwari et al., 2021).

LTP-4 geni bitkinin hem gövdesinde hem de kökünde 250 μ M konsantrasyonda MSRE bölgelerinde en yüksek metilasyon oranları görülmüştür. Fakat bu oranlar hipometilasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Buna bağlı olarak gövdenin en düşük metilasyonun gerçekleştiği 100 μ M konsantrasyonda ekspresyon oranı en yüksek gerçekleşmiştir. Bitkinin kökünde yapılan analiz sonuçlarında ise 250 μ M konsantrasyonda MSRE bölgesinde en yüksek %38 oranında hipometilasyon gerçekleşmiştir. Ancak, gen

ekspresyon analizlerinde bakıldığında bu dozda yaklaşık 5000 kat ekspresyon oranı belirlenmiştir. Bunun nedeni, MDRE bölgesinde gerçekleşen metilasyon oranının düşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü diğer dozlarda yaklaşık %99'luk bir metilasyon varken 250 µM konsantrasyonda %60'lık bir metilasyon meydana geldiği belirlenmiştir. *Brassica oleracea* bitkisinde ebeveyn hatlarda ve yeni elde edilen nesilde vejetatif büyüme ile ilgili genlerin ekspresyon ve metilasyon oranları araştırılmıştır. MSAP tekniği kullanılarak yapılan çalışmada yeni nesillerde metilasyon oranı artan bölgeler belirlenmiş ve bu bölgelerin sekans analizi yapılmıştır. Belirlenen genlerden biri olan LTP-1 geninin metilasyon oranı arttığı ve ekspresyon yüzdesinin düştüğü görülmüştür (Salmon et al., 2009).

PIP-1 geninde MSRE bölgelerinin metilasyon oranı en yüksek hem gövdede hem de kökte 250 µM konsantrasyonda tespit edilmiştir. Bu dozda hipermetilasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna karşın, bitkinin gövdesinde ekspresyon seviyesinde downregülasyonun gerçekleştiği ve sonuçların birbirleriyle uyumlu oldukları görülmüştür. Bitkinin kökünde ise 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 6 ve 14 kat upregülasyon gerçekleşmiştir. Bu durum araştırıldığında MDRE bölgesindeki metilasyon oranlarının düştüğü görülmüştür. *Triticum aestivum* bitkisinin maruz kaldığı tuz stresinde PIP genleri araştırılmıştır. Bu çalışmada, PIP-2 geni tuzluluk stresi altında metilasyon oranının arttığı bildirilmiştir (Xu et al., 2013). Ayrıca, bu genin tuz stresi dozlarının artışıyla downregüle olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarımız bu çalışmayla desteklendiği görülmüştür.

Çalışmamızda DNA metilasyon oranlarını belirlemek için kullandığımız qAMP yöntemi genellikle memeli hücrelerinde kullanılan bir tekniktir. Erkek farelerin germ hücrelerinde DNMT3L'nin aktivitesi prenatal gonositlerde ile spermatogenez sırasındaki hücrelerle karşılaştırılmıştır. 61 bölge taranmış, spermatogenezde bu bölgelerin metilasyonunun %50 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Bu durum, genom boyunca birçok lokusun DNMT3L tarafından metilasyon için işaretlendiği olarak yorumlanmıştır (la Salle et al., 2007). Wistar ratlarının dişilerinde periontal hastalıklarda etkili olan Slc2a4 geninin ekspresyonu ve metilasyon yüzdesi araştırılmıştır. Gruplara bakıldığında Slc2a4 geninin metilasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (Mattera et al., 2019).

Sonuç olarak bu çalışmada, Cd stresinin ekmeklik buğday bitkisinde meydana getirdiği belirli genler üzerindeki gen ekspresyon değişimleri ve DNA metilasyon profilleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Cd ağır metalinin bitkide birikimi sonucunda stres yanıt mekanizmalarının devreye girdiği, bu mekanizmalarda önemli rol oynayan genlerin (UGT-3, LTP-4 ve PIP-1) ekspresyon seviyelerinde artış ve azalışların olduğu bulunmuştur. Ayrıca

ilgili genlerin DNA metilasyon oranlarında Cd uygulamasına bağlı olarak değişikliklerin de meydana geldiği ortaya konmuştur.

Çalışmamız ile Cd stresi altında UGT-3, LTP-4 ve PIP-1 genlerinin metilasyon oranlarındaki değişimler ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca, genellikle memeli hücrelerinde kullanılan qAMP tekniği bitki hücrelerinde ilk kez kullanılmış ve başarıyla sonuçlandırılmıştır. Beklenildiği üzere, genlerin ekspresyon seviyeleri ile metilasyon durumları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir. Öte yandan, genlerin bazı dozlarında gözlenen gen ekspresyonu ile DNA metilasyon oranlarının ters orantılı olmaması durumu, gen işleyişinin düzenlenmesinde rol alan diğer mekanizmaların da araştırılarak sonuçların daha detaylı açıklanması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdelgawad, H., Zinta, G., Hamed, B. A., Selim, S., Beemster, G., Hozzein, W. N., ... Abuelsoud, W. 2020. "Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity". *Environmental Pollution*, 258.
- Ahmad, I., Ansari, T. M. 2020. "An assessment of toxic heavy metals in soil and plants (*Allium cepa* and *Daucus carota*) by GFAAS". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*.
- Akgün, Ü. 2018. "*Faklı Dozlarda UV-C Radyasyon Işığına Maruz Bırakılan Buğday (Triticum aestivum) Bitkisinin DNA Metilasyon Seviyelerinin Moleküler Yöntemlerle Ölçülmesi*". Erzincan.
- Alleman, M., Sidorenko, L., McGinnis, K., Seshadri, V., Dorweiler, J. E., White, J., ... Chandler, V. L. 2006. "An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize". *Nature*, 442(7100), 295–298.
- Ana Sofia Duque, A., de Almeida, A. M., da Silva, A. B., da Silva, J. M., Paula, A., Santos, D., ... Sousa Araujo, S. de. 2013. "Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive". In *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech.
- Atar, B. 2017. "Gıdamız Buğdayın, Geçmişten Geleceğe Yolculuğu". Süleyman Demirel Üniversitesi Yalvaç Akademi Dergisi , 2(1), 1–12.
- Baetz, U., Martinoia, E. 2014, February. "Root exudates: The hidden part of plant defense". *Trends in Plant Science*.
- Bajguz, A., Hayat, S. 2009. "Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses". *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 1–8.
- Baker, B. A., Cassano, V. A., Murray, C., Dreger, M. 2018. "Arsenic exposure, assessment, toxicity, diagnosis, and management: Guidance for occupational and environmental physicians". *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 60(12), 634–639.
- Bashir, W., Anwar, S., Zhao, Q., Hussain, I., Xie, F. 2019. "Interactive effect of drought and cadmium stress on soybean root morphology and gene expression". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 90–101.
- Baulcombe, D. C., Dean, C. 2014. "Epigenetic regulation in plant responses to the environment". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9).
- Bewick, A. J., Schmitz, R. J. 2017. "Gene body DNA methylation in plants". *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 103–110.
- Bhattacharya, A. 2019. "Effect of High-Temperature Stress on the Metabolism of Plant Growth Regulators". In *Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules* (pp. 485–591). Elsevier.
- Bolukbasi, E., Aras, E. S. 2016. "Determination of DNA Methylation Levels with CRED-RA Technique in the Genome of Sunflower Seedlings (*Helianthus annuus* L.) Subjected to Zinc Stress". *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 1(3), 438–444.
- Boyko, A., Kovalchuk, I. 2008, January. "Epigenetic control of plant stress response". *Environmental and Molecular Mutagenesis*.

- Bräutigam, K., Cronk, Q. 2018. "DNA methylation and the evolution of developmental complexity in plants". *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R. 2020. "Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans". *Heliyon*, 6(9), e04691.
- Cameron, K. D., Teece, M. A., Smart, L. B. 2006. "Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco". *Plant Physiology*, 140(1), 176–183.
- Carvalho, A. de O., Gomes, V. M. 2007. "Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review". *Peptides*, 28(5), 1144–1153.
- Choi, A. M., Lee, S. B., Cho, S. H., Hwang, I., Hur, C. G., Suh, M. C. 2008. "Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds". *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(2), 127–139.
- Choi, W. L., Mok, Y. G., Huh, J. H. 2021. "Application of 5-methylcytosine DNA glycosylase to the quantitative analysis of DNA methylation". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–13.
- Chwialkowska, K., Nowakowska, U., Mroziewicz, A., Szarejko, I., Kwasniewski, M. 2016. "Water-deficiency conditions differently modulate the methylome of roots and leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.)". *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 1109–1121.
- Cui, W., Wang, H., Song, J., Cao, X., Rogers, H. J., Francis, D., ... Liu, W. 2017. "Cell cycle arrest mediated by Cd-induced DNA damage in *Arabidopsis* root tips". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145(July), 569–574.
- di Felice, F., Micheli, G., Camilloni, G. 2019, June 1. "Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview". *Journal of Biosciences*. Springer.
- Ding, X., Iwasaki, I., Kitagawa, Y. 2004. "Overexpression of a lily PIP1 gene in tobacco increased the osmotic water permeability of leaf cells". *Plant, Cell and Environment*, 27(2), 177–186.
- Domcke, S., Bardet, A. F., Adrian Ginno, P., Hartl, D., Burger, L., Schübeler, D. 2015. "Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1". *Nature*, 528(7583), 575–579.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M. L., Vicié-Gibouin, M., Hawes, M. 2013, August. "Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense". *Current Opinion in Plant Biology*.
- Dubeau, L., Chandler, L. A., Gralow, J. R., Nichols, P. W., Jones, P. A. 1986. "Southern Blot Analysis of DNA Extracted from Formalin-fixed Pathology Specimens". *Cancer Research*, 2964–2969.
- Dubin, M. J., Zhang, P., Meng, D., Remigereau, M.-S., Osborne, E. J., Paolo Casale, F., ... Nordborg, M. 2015. "DNA methylation in *Arabidopsis* has a genetic basis and shows evidence of local adaptation". *eLife*, 4, 5255.
- Duempelmann, L., Skribbe, M., Bühler, M. 2020. "Small RNAs in the Transgenerational Inheritance of Epigenetic Information". *Trends in Genetics*, 36(3), 203–214.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., Roy, S. 2018. "Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability". *Plant Signaling and Behavior*, 13(8), 1–17.

- Eads, C. A., Laird, P. W. n.d. "*Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)*". (K. I. Mills & B. H. Ramsahoye, Eds.), *From: Methods in Molecular Biology* (Vol. 200).
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y. 2015a. "Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response". *Scientific World Journal*. Hindawi Publishing Corporation.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y. 2015b. "Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response". *Scientific World Journal*, 2015, 7–9.
- Feng, S. J., Liu, X. S., Tao, H., Tan, S. K., Chu, S. S., Oono, Y., ... Yang, Z. M. 2016. "Variation of DNA methylation patterns associated with gene expression in rice (*Oryza sativa*) exposed to cadmium". *Plant Cell and Environment*, 39(12), 2629–2649.
- Fleming, A. J., Mandel, T., Hofmann, S., Sterk, P., de Vries, S. C., Kuhlemeier, C. 1992. "Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex". *The Plant Journal*, 2(6), 855–862.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Hanson, D. T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., ... Kaldenhoff, R. 2006. "Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo". *Plant Journal*, 48(3), 427–439.
- Fu, Z., Xi, S. 2020, March 23. "The effects of heavy metals on human metabolism". *Toxicology Mechanisms and Methods*. Taylor and Francis Ltd.
- Ganguly, D. R., Crisp, P. A., Eichten, S. R., Pogson, B. J. 2017. "The arabidopsis DNA methylome is stable under transgenerational drought stress". *Plant Physiology*, 175(4), 1893–1912.
- Gao, S., Guo, W., Feng, W., Liu, L., Song, X., Chen, J., ... Hu, J. 2016. "LTP3 contributes to disease susceptibility in Arabidopsis by enhancing abscisic acid (ABA) biosynthesis". *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 412–426.
- Gao, Y.-P., Young, L., Bonham-Smith, P., Gusta, L. v. 1999. "*Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of Brassica napus during germination under stress conditions*". *Plant Molecular Biology* (Vol. 40).
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., Catalano, A. 2020, June 1. "The effects of cadmium toxicity". *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG.
- Genestra, M. 2007. "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants". *Cellular Signalling*, 19(9), 1807–1819.
- Gogoi, K., Manna, P., Dey, T., Kalita, J., Unni, B. G., Ozah, D., Baruah, P. K. 2019. "Circulatory heavy metals (cadmium, lead, mercury, and chromium) inversely correlate with plasma GST activity and GSH level in COPD patients and impair NOX4/Nrf2/GCLC/GST signaling pathway in cultured monocytes". *Toxicology in Vitro*, 54, 269–279.
- Goldfarb, M., Santana, M. F., Salomão, T. M. F., Pereira, P. H. S., de Queiroz, M. V., de Barros, E. G. 2016. "Technique IRAP (inter retrotransposon amplified polymorphism) to study the genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations". *Australasian Plant Pathology*, 45(4), 357–360.
- Gomès, E., Sagot, E., Gaillard, C., Laquitaine, L., Poinssot, B., Sanejouand, Y. H., ... Coutos-Thévenot, P. 2003. "Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) Cells in response to fungal elicitor treatments". *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(5), 456–464.

- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G., ... Zhu, J. K. 2020. "Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency". *Science China Life Sciences*, 63(5), 635–674.
- Gonzalzo, M. L., Jones, P. A. 1997. "*Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)*". *Nucleic Acids Research* (Vol. 25). Oxford University Press. Retrieved from <https://academic.oup.com/nar/article/25/12/2529/2901841>
- Gopi, S., Arulkumar, A., Ganeshkumar, A., Rajaram, R., Miranda, J. M., Paramasivam, S. 2020. "Heavy metals accumulation in seagrasses collected from Palk Bay, South-eastern India". *Marine Pollution Bulletin*, 157.
- Grant-Downton, R. T., Dickinson, H. G. 2005, December. "Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants". *Annals of Botany*.
- Grativol, C., Hemerly, A. S., Ferreira, P. C. G. 2012, February. "Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations". *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., Bitonti, M. B. 2012. "In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning". *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 695–709.
- Guo, L., Zi, Y. W., Lin, H., Wei, E. C., Chen, J., Liu, M., ... Gu, H. 2006. "Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family". *Cell Research*, 16(3), 277–286.
- Gülşen, O., Mutlu, N. 2005. "Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları". *Alatırım*, 4(2), 27–37.
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., ... Farooq, M. 2021, March 15. "Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press.
- Han, G. W., Lee, J. Y., Song, H. K., Chang, C., Min, K., Moon, J., ... Suh, S. W. 2001. "Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography". *Journal of Molecular Biology*, 308(2), 263–278.
- Hasan, S. A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., Ahmad, A. 2009. "Cadmium: Toxicity and tolerance in plants". *Journal of Environmental Biology*, 30(2), 165–174. Retrieved from <http://www.jeb.co.ininfo@jeb.co.in>
- Henderson, I. R., Jacobsen, S. E. 2007, May 24. "Epigenetic inheritance in plants". *Nature*. Nature Publishing Group.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. 1996. "*Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands (DNA methylation/tumor suppressor genes/pl6/p15)*". *Medical Sciences* (Vol. 93).
- Hincha, D. K., Neukamm, B., Srör, H. A. M., Sieg, F., Weckwarth, W., Rü, M., ... Schmitt, M. 2001. "*Cabbage Cryoprotectin Is a Member of the Nonspecific Plant Lipid Transfer Protein Gene Family 1*". Retrieved from www.plantphysiol.org
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., Fujita, M. 2012. "Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation". *Journal of Botany*, 2012, 1–37.

- Hou, D., O'Connor, D., Nathanail, P., Tian, L., Ma, Y. 2017. "Integrated GIS and multivariate statistical analysis for regional scale assessment of heavy metal soil contamination: A critical review". Environmental Pollution. Elsevier Ltd.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. "IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans".
- International Agency for Research on Cancer. 2012. "Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts" (Vol. 100C). Lyon.
- Jang, C. S., Lee, H. J., Chang, S. J., Seo, Y. W. 2004. "Expression and promoter analysis of the TaLTP1 gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)". Plant Science, 167(5), 995–1001.
- Jang, J. Y., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., Kang, H. n.d. "An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*".
- Jiang, C., Mithani, A., Belfield, E. J., Mott, R., Hurst, L. D., Harberd, N. P. 2014. "Environmentally responsive genome-wide accumulation of de novo *Arabidopsis thaliana* mutations and epimutations". Genome Research, 24(11), 1821–1829.
- Jung, H. W., Jung, H. W., Kim, W., Byung, &, Hwang, K. 2003. "Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses*". Plant, Cell and Environment (Vol. 26).
- Jülke, S., Ludwig-Müller, J. 2016. "Response of *Arabidopsis thaliana* roots with altered lipid transfer protein (LTP) gene expression to the clubroot disease and salt stress". Plants, 5(1), 627–654.
- Karimi, J., Mohsenzadeh, S. 2017. "Expression of some Genes in Response to Cadmium Stress in *Triticum aestivum*". International Letters of Natural Sciences, 63, 10–17.
- Kawakatsu, T., Huang, S. shan C., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R. J. J., Urich, M. A. A., ... Schork, N. J. 2016. "Epigenomic Diversity in a Global Collection of *Arabidopsis thaliana* Accessions". Cell, 166(2), 492–505.
- Khan, M. I. R., Chopra, P., Chhillar, H., Ahanger, M. A., Hussain, S. J., Maheshwari, C. 2021, July 1. "Regulatory hubs and strategies for improving heavy metal tolerance in plants: Chemical messengers, omics and genetic engineering". Plant Physiology and Biochemistry. Elsevier Masson s.r.l.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T. 2007. "The role of dehydrins in plant response to cold". Biologia Plantarum, 51(4), 601–617.
- Kosová, Klára, Vítámvás, P., Urban, M. O., Klíma, M., Roy, A., Tom Prášil, I. 2015, September 1. "Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops-a proteomic perspective". International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG.
- Köhler, C., Springer, N. 2017, July 6. "Plant epigenomics-deciphering the mechanisms of epigenetic inheritance and plasticity in plants". Genome Biology. BioMed Central Ltd.
- la Salle, S., Oakes, C. C., Neaga, O. R., Bourc'his, D., Bestor, T. H., Trasler, J. M. 2007. "Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L". BMC Developmental Biology, 7.
- Lang, Z., Wang, Y., Tang, K., Tang, D., Datsenka, T., Cheng, J., ... Zhu, J. K. 2017. "Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition

- of ripening-repressed genes in tomato fruit". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), E4511–E4519.
- Lang-Mladek, C., Popova, O., Kiok, K., Berlinger, M., Rakic, B., Aufsatz, W., ... Luschnig, C. 2010. "Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in arabidopsis". *Molecular Plant*, 3(3), 594–602.
- Law, J. A., Jacobsen, S. E. 2010, March. "Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals". *Nature Reviews Genetics*.
- Lei, M., Zhang, H., Julian, R., Tang, K., Xie, S., Zhu, J. K. 2015. "Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in Arabidopsis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3553–3557.
- Li, J., Huang, Q., Sun, M., Zhang, T., Li, H., Chen, B., ... Wu, X. 2016. "Global DNA methylation variations after short-term heat shock treatment in cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas". *Scientific Reports*, 6.
- Li, Zhaoling, Liu, Z., Chen, R., Li, X., Tai, P., Gong, Z., ... Liu, W. 2015. "DNA damage and genetic methylation changes caused by Cd in *Arabidopsis thaliana* seedlings". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(9), 2095–2103.
- Li, Zhiyuan, Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z., Huang, L. 2014a, January 15. "A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment". *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V.
- Li, Zhiyuan, Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z., Huang, L. 2014b, January 15. "A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment". *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V.
- Lim, E. K., Bowles, D. J. 2004, August 4. "A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis". *EMBO Journal*.
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., Ecker, J. R. 2008. "Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis". *Cell*, 133(3), 523–536.
- Liu, Chang, Zhu, Y., Lu, Z., Guo, W., Tumen, B., He, Y., ... Li, S. 2020. "Cadmium induces acute liver injury by inhibiting Nrf2 and the role of NF-κB, NLRP3, and MAPKS signaling pathway". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(1).
- Liu, Chengwei, Fukumoto, T., Matsumoto, T., Gena, P., Frascaria, D., Kaneko, T., ... Kitagawa, Y. 2013. "Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination". *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 151–158.
- Liu, R., How-Kit, A., Stammitt, L., Teyssier, E., Rolin, D., Mortain-Bertrand, A., ... Gallusci, P. 2015. "A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10804–10809.
- Liu, T., Li, Y., Duan, W., Huang, F., Hou, X. 2017. "Cold acclimation alters DNA methylation patterns and confers tolerance to heat and increases growth rate in *Brassica rapa*". *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1213–1224.
- Marin, P., Genitoni, J., Barloy, D., Maury, S., Gibert, P., Ghalambor, C. K., Vieira, C. 2020. "Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome". *Functional Ecology*, 34(2), 385–400.
- Marina, D. 2020. "Bisulfite PCR of repetitive genomic sequences". In *Epigenetics Methods* (pp. 93–115). Elsevier Inc.

- Martinez-Ballesta, M. del C., Carvajal, M. 2014. "New challenges in plant aquaporin biotechnology". *Plant Science*, 217–218, 71–77.
- Mattera, M. S. de L. C., Chiba, F. Y., Lopes, F. L., Tsosura, T. V. S., Peres, M. A., Brito, V. G. B., ... Sumida, D. H. 2019. "Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring". *Journal of periodontology*, 90(8), 884–893.
- Matzke, M. A., Mosher, R. A. 2014. "RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity". *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group.
- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, Y., Bhatt, P., Chen, S. 2021. "Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils". *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126253.
- Nardemir, G. 2012. "*Malathion ve glifosatin Triticum aestivum (buğday) üzerindeki genetik ve epigenetik etkilerinin moleküler yöntemler ile belirlenmesi*". Erzurum.
- National Toxicology Program. 2000. "*Tenth Report on Carcinogens*".
- Ng, E., Lind, P. M., Lindgren, C., Ingelsson, E., Mahajan, A., Morris, A., Lind, L. 2015. "Genome-wide association study of toxic metals and trace elements reveals novel associations". *Human Molecular Genetics*, 24(16), 4739–4745.
- Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., Mikkelsen, J. D. 1996. "New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) showing homology to non-specific lipid transfer proteins". *Plant Molecular Biology*, 31(3), 539–552.
- Oakes, C. C., la Salle, S., Robaire, B., Trasler, J. M. 2006. "Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR". *Epigenetics*, 1(3), 146–152.
- Oakes, C. C., Salle, S. la, Trasler, J. M., Robair, B. 2009. "Restriction Digestion and Real-Time PCR (qAMP)". *Methods in Molecular Biology*, 507, 271–280.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Eleftheriou, E. P. 1997. "Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32, 154–160.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. 2006. "Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize". *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169(2), 239–246.
- Pawłowicz, I., Rapacz, M., Perlikowski, D., Gondek, K., Kosmala, A. 2017. "Abiotic stresses influence the transcript abundance of PIP and TIP aquaporins in *Festuca* species". *Journal of Applied Genetics*, 58(4), 421–435.
- Peng, H., He, X., Gao, J., Ma, H., Zhang, Z., Shen, Y., ... Lin, H. 2015. "Transcriptomic changes during maize roots development responsive to Cadmium (Cd) pollution using comparative RNAseq-based approach". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(4), 1040–1047.
- Per, T. S., Khan, N. A., Reddy, P. S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M. I. R., Anjum, N. A. 2017, June 1. "Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics". *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS.
- Pikaard, C. S., Scheid, O. M. 2014. "Epigenetic regulation in plants". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(12).

- Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Grondin, A., Boursiac, Y., Morillon, R., Schäffner, A. R., Maurel, C. 2010. "A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*". *Plant Physiology*, 152(3), 1418–1430.
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., Agre, P. 1992. "Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CH IP28 Protein". *Science*, 256, 385–387.
- Ramirez-Prado, J. S., Abulfaraj, A. A., Rayapuram, N., Benhamed, M., Hirt, H. 2018, September 1. "Plant Immunity: From Signaling to Epigenetic Control of Defense". *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd.
- Rether, A. 2002. "*Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen*".
- Reynolds, M. P., Lewis, J. M., Ammar, K., Basnet, B. R., Crespo-Herrera, L., Crossa, J., ... Braun, H. J. 2021. "Harnessing translational research in wheat for climate resilience". *Journal of Experimental Botany*.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E.-K., Bowles, D. J. n.d. "*Protein family review Higher plant glycosyltransferases*". Retrieved from <http://genomebiology.com/2001/2/2/reviews/3004.1>
- Safi, H  la, Belgaroui, N., Masmoudi, K., Brini, F. 2019. "Promoter of the wheat lipid transfer protein, TdLTP4, drives leaf-preferential expression in transgenic *Arabidopsis* plants". *Functional Plant Biology*, 46(3), 275–285.
- Safi, H  la, Saibi, W., Alaoui, M. M., Hmyene, A., Masmoudi, K., Hanin, M., Brini, F. 2015. "A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 64–75.
- Sall, M. L., Karim, A., Diaw, D., Gningue-Sall, D., Snezana, & Aaron, E., Aaron, J.-J. 2020. "Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review". *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 29927–29942.
- Salmon, A., Bellis, H., Chable, V., Manzanares-Dauleux, M. J. 2009. "Identification of differentially expressed genes related to aberrant phenotypes in brassica oleracea var. botrytis". *Plant Breeding*, 128(6), 631–639.
- Sanchez, D. H., Paszkowski, J. 2014. "Heat-Induced Release of Epigenetic Silencing Reveals the Concealed Role of an Imprinted Plant Gene". *PLoS Genetics*, 10(11).
- Sassykova, L. R., Aubakirov, Y. A., Sh. Akhmetkaliyeva, M., Sassykova, A. R., Sendilvelan, S., Prabhakar, M., ... Zhussupova, A. K. 2020. "Heavy metals accumulation in plants of the dry-steppe zone of the East Kazakhstan region". *Materials Today: Proceedings*, 33, 1187–1191.
- Saze, H. 2008. "Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants". *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19(6), 527–536.
- Schmitz, R. J., Schultz, M. D., Urich, M. A., Nery, J. R., Pelizzola, M., Libiger, O., ... Ecker, J. R. 2013. "Patterns of population epigenomic diversity". *Nature*, 495(7440), 193–198.
- Secco, D., Wang, C., Shou, H., Schultz, M. D., Chiarenza, S., Nussaume, L., ... Lister, R. 2015. "Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements". *eLife*, 4(JULY2015).

- Song, J., Feng, S. J., Chen, J., Zhao, W. T., Yang, Z. M. 2017. "A cadmium stress-responsive gene AtFC1 confers plant tolerance to cadmium toxicity". *BMC Plant Biology*, 17(1).
- Song, Y., Liu, L., Feng, Y., Wei, Y., Yue, X., He, W., ... An, L. 2015. "Chilling and freezing induced alterations in cytosine methylation and its association with the cold tolerance of an alpine subnival plant, *Chorispora bungeana*". *PLoS ONE*, 10(8).
- Sorrentino, M. C., Capozzi, F., Giordano, S., Spagnuolo, V. 2017. "Genotoxic effect of Pb and Cd on in vitro cultures of *Sphagnum palustre*: An evaluation by ISSR markers". *Chemosphere*, 181, 208–215.
- Şişecioğlu, M. 2010. "*Fare Genomunda Bulunan Kolesterol Ve Safra Asitleri Sentezinde Görev Alan Bazı Enzim Genlerinin Cdna'larının Üretilmesi Ve İn Situ Hibridizasyonu İle Gen Ekspresyon Analizi*". Erzurum.
- Tadesse, W., Sanchez-Garcia, M., Assefa, S. G., Amri, A., Bishaw, Z., Ogbonnaya, F. C., Baum, M. 2019. "Genetic Gains in Wheat Breeding and Its Role in Feeding the World". *Crop Breeding, Genetics and Genomics*.
- Tajti, J., Németh, E., Glatz, G., Janda, T., Pál, M. 2019. "Pattern of changes in salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) gene expression and salicylic acid accumulation in wheat under cadmium exposure". *Plant Biology*, 21(6), 1176–1180.
- Takahashi, F., Shinozaki, K. 2019. "Long-distance signaling in plant stress response". *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 106–111.
- Tang, K., Lang, Z., Zhang, H., Zhu, J. K. 2016. "The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications". *Nature Plants*, 2.
- Tayeh, C., Randoux, B., Bourdon, N., Reignault, P. 2013. "Lipid metabolism is differentially modulated by salicylic acid and heptanoyl salicylic acid during the induction of resistance in wheat against powdery mildew". *Journal of Plant Physiology*, 170(18), 1620–1629.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. 2012. "Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology". *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 101, 133–164.
- Tiwari, J. K., Buckseth, T., Singh, R. K., Zinta, R., Saraswati, A., Kumar, M., Chakrabarti, S. K. 2021. "Methylome and transcriptome analysis reveals candidate genes for tuber shape variation in tissue culture-derived potato". *Plant Growth Regulation*, 93(3), 319–332.
- Tognetti, V. B., van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., de Clercq, I., ... van Breusegem, F. 2010. "Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance". *Plant Cell*, 22(8), 2660–2679.
- van der Velde, M., Baruth, B., Bussay, A., Ceglar, A., Garcia Condado, S., Karetos, S., ... van den Berg, M. 2018. "In-season performance of European Union wheat forecasts during extreme impacts". *Scientific Reports*, 8(1).
- Vanyushin, B. F., Ashapkin, V. v. 2011. "DNA methylation in higher plants: Past, present and future". *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 360–368.
- Vareda, J. P., Valente, A. J. M., Durães, L. 2019a, September 15. "Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review". *Journal of Environmental Management*. Academic Press.

- Vareda, J. P., Valente, A. J. M., Durães, L. 2019b, September 15. "Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review". *Journal of Environmental Management*. Academic Press.
- Waddington, H. C. 1942. "The epigenotype". *Endeavour*, 1, 18–20.
- Wang, Chenguang, Zhang, R., Wei, X., Lv, M., Jiang, Z. 2020. "Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity". In *Advances in Immunology* (Vol. 145, pp. 187–241). Academic Press Inc.
- Wang, Chunming, Xie, W., Chi, F., Hu, W., Mao, G., Sun, D., ... Sun, Y. 2008. "BcLTP, a novel lipid transfer protein in *Brassica chinensis*, may secrete and combine extracellular CaM". *Plant Cell Reports*, 27(1), 159–169.
- Wang, H. W., Kwon, H. J., Yim, W. C., Lim, S. D., Moon, J. C., Lee, B. M., ... Jang, C. S. 2010. "Expressional diversity of wheat nsLTP genes: Evidence of subfunctionalization via cis-regulatory divergence". *Genetica*, 138(8), 843–852.
- Wang, S., Wu, W., Liu, F., Liao, R., Hu, Y. 2017. "Accumulation of heavy metals in soil-crop systems: a review for wheat and corn". *Environmental Science and Pollution Research*, 24(18), 15209–15225.
- Wibowo, A., Becker, C., Marconi, G., Durr, J., Price, J., Hagmann, J., ... Gutierrez-Marcos, J. 2016. "Hyperosmotic stress memory in *Arabidopsis* is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity". *eLife*.
- Williams, B. P., Pignatta, D., Henikoff, S., Gehring, M. 2015. "Methylation-Sensitive Expression of a DNA Demethylase Gene Serves As an Epigenetic Rheostat". *PLoS Genetics*, 11(3).
- World Health Organization. 1996. "Trace elements in human nutrition and health World Health Organization". World Health Organization, 360. Retrieved from <https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>
- Wu, J., Song, J., Li, W., Zheng, M. 2016. "The accumulation of heavy metals in agricultural land and the associated potential ecological risks in Shenzhen, China". *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1428–1440.
- Xin, C., Chi, J., Zhao, Y., He, Y., Guo, J. 2019. "Cadmium stress alters cytosine methylation status and expression of a select set of genes in *Nicotiana benthamiana*". *Plant Science*, 284, 16–24.
- Xing, L., Gao, L., Chen, Q., Pei, H., Di, Z., Xiao, J., ... Wang, X. 2018. "Over-expressing a UDP-glucosyltransferase gene (Ta-UGT3) enhances *Fusarium* Head Blight resistance of wheat". *Plant Growth Regulation*, 84(3), 561–571.
- Xu, C., Wang, M., Zhou, L., Quan, T., Xia, G. 2013. "Heterologous expression of the wheat aquaporin gene TaTIP2;2 compromises the abiotic stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*". *PLoS ONE*, 8(11).
- Yanef, A., Vitali, V., Amodeo, G. 2015. "PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators?". *FEBS Letters*, 589(23), 3508–3515.
- Yang, L., Zheng, B., Mao, C., Yi, K., Liu, F., Wu, Y., ... Wu, P. 2003. "cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit". *Gene*, 314(1–2), 141–148.
- YERLİ, C., ÇAKMAKCI, T., SAHİN, U., TÜFENKÇİ, Ş. 2020. "Ağır Metallerin Toprak, Bitki, Su ve İnsan Sağlığına Etkileri". *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9, 103–114.

- Yerli, C., Çakmakcı, T., Şahin, U., Tüfenlçi, Ş. 2020. "Ağır Metallerin Toprak, Bitki, Su ve İnsan Sağlığına Etkileri". *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9, 103–114.
- Yıldız, N. 2004. "*Toprak ve Bitki Ekosistemindeki Ağır Metaller* " (Vol. ZT-531.). Erzurum: Yüksek Lisans Ders Notları.
- Yorgancılar, M., Yakişir, E., Tanur Erkoyuncu, M., Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, S., Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, B. 2015. "Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı". *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi Journal of Bahri Dagdas Crop Research*, 4(2), 1–12. Retrieved from www.arastirma.tarim.gov.tr/bahridagdas
- Yousefi, Z., Kolahi, M., Majd, A., Jonoubi, P. 2018. "Effect of cadmium on morphometric traits, antioxidant enzyme activity and phytochelatin synthase gene expression (SoPCS) of *Saccharum officinarum* var. cp48-103 in vitro". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157(March), 472–481.
- Yuan, Y., Wu, Y., Ge, X., Nie, D., Wang, M., Zhou, H., Chen, M. 2019. "In vitro toxicity evaluation of heavy metals in urban air particulate matter on human lung epithelial cells". *Science of the Total Environment*, 678, 301–308.
- Yubero-Serrano, E.-M., Moyano, E., Medina-Escobar, N., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.-L. 2003. "Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress.". *Journal of experimental botany*, 54(389), 1865–1877.
- Zhang, B., Tieman, D. M., Jiao, C., Xu, Y., Chen, K., Fe, Z., ... Klee, H. J. 2016. "Chilling-induced tomato flavor loss is associated with altered volatile synthesis and transient changes in DNA methylation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(44), 12580–12585.
- Zhang, H., Zhu, J. K. 2012. "Active DNA demethylation in plants and animals". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 161–173.
- Zhang, Huiming, Lang, Z., Zhu, J. K. 2018, August 1. "Dynamics and function of DNA methylation in plants". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W. L., Chen, H., ... Ecker, J. R. R. 2006. "Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*". *Cell*, 126(6), 1189–1201.
- Zhao, L., Ma, X., Su, P., Ge, W., Wu, H., Guo, X., ... Kong, L. 2018. "Cloning and characterization of a specific UDP-glycosyltransferase gene induced by DON and *Fusarium graminearum*". *Plant Cell Reports*, 37(4), 641–652.
- Zheng, H., Zhang, C., Wang, Y., Zhou, W., Chen, J., Yan, X., ... Sun, B. 2021. "Overexpression of the glucosyltransferase gene *BoaUGT74B1* enhances the accumulation of indole glucosinolates in Chinese kale". *Scientia Horticulturae*, 288.
- Zhou, G., Guo, J., Yang, J., Yang, J. 2018. "Effect of fertilizers on Cd accumulation and subcellular distribution of two cosmos species (*Cosmos sulphureus* and *Cosmos bipinnata*)". *International Journal of Phytoremediation*, 20(9), 930–938.
- Zhu, G., Xiao, H., Guo, Q., Zhang, Z., Zhao, J., Yang, D. 2018. "Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two Compositae plants". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 300–308.
- Zhu, H., Wang, G., Qian, J. 2016. "Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation". *Nature Reviews Genetics*, 17(9), 551–565.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	İlknur ÇOLAK
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Mecidiye Anadolu Lisesi
Lisans:	Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü