



Termik Santralden Savrulan Küllerdeki Ağır Metallerin Mısır (*Zea mays* L.) Üzerinde Meydana Getirdiği Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi.

Hüseyin BULUT^{1*}, Nalan YILDIRIM DOĞAN¹

¹Erzincan Üniversitesi Üzümlü Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Organik Tarım Programı, Üzümlü/Erzincan.

²Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan.

*Sorumlu Yazar

E-posta: huseyinbulut@erzincan.edu.tr

Geliş Tarihi: 18 Ağustos 2017

Kabul Tarihi: 15 Kasım 2017

Özet

Çevre kirliliği sanayi devrimi ve endüstrileşmeden dolayı canlılar için önemli bir unsur olmuştur. Ülkemizde artan enerji ihtiyacının karşılanmasında termik santraller önemli bir paya sahiptir. Bu santrallerden atılan ağır metaller çevre kirliliğinin ana etkenlerinden birisi konumundadır. Ağır metallerin bitki metabolizmasında meydana getirdiği genetik, epigenetik, kanserojenik etkisi üzerine birçok çalışma mevcuttur. Bitkiler sabit konumlarından dolayı çevre kirliliğinin meydana getirdiği genetik toksisitenin tespitinde kullanılan biyoindikatör durumundadırlar. Bu durumdan dolayı *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* ve *Arabidopsis thaliana* gibi farklı bitki türleri araştırmacılar tarafından son yıllarda genotoksik etkinin tespiti için model organizma olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda ağır metallerin neden olduğu stres nedeniyle arpada meydana gelen toksik etkinin düzeyi IRAP analizleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız ağır metal kaynağına yakın konumda yetişen arpa örneklerinde polimorfizmlerin oluştuğu ve GTS değerinde düşüş meydana geldiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Epigenetik, IRAP, Retrotranspozon.

Determination by molecular methods of genetic and epigenetic changes caused by heavy metals in ashes discharged from thermic power plants.

Abstract

Environmental pollution has become an important element for the living things due to industrial revolution and industrialization. Thermal power plants have an important share in meeting the increasing energy needs with technological needs. Heavy metals released from these power plants are one of the main causes of environmental pollution. There are many studies on the genetic, epigenetic, carcinogenic effect of heavy metals on plant metabolism. Plants are bioindicators used to detect genetic toxicity caused by environmental pollution due to their fixed position. Because of this, different plant species such as *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* have been used by researchers as model organisms for the detection of genotoxic activity in recent years. In our study, the level of toxic effect to stress caused by heavy metals was evaluated by IRAP analyze. Our results have shown that polymorphisms occur in barley specimens grown near heavy metal sources and that GTS declines in value.

Key words: Epigenetic, Gene expression, Heavy metal, IRAP, Retrotransposon

GİRİŞ

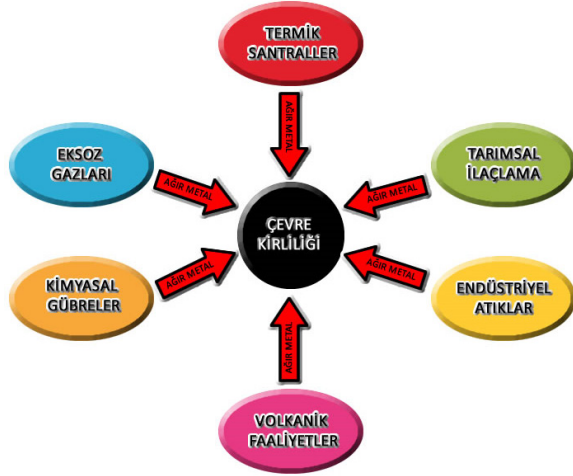
Canlıların yaşamları boyunca karşılıklı olarak etkileşim içinde buldukları ortam çevre olarak tanımlanmaktadır [1]. Endüstriyel üretim sonucu çevreye salınan ağır metaller, çevre kirliliğinin ana kaynaklarından biri olmaya başlamıştır [2]. Farklı sektörlerden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleşmektedir [3]. Resim 1’de ağır metallerin doğaya salınmasını sağlayan faktörler görselleştirilmiştir.

Kömür ile elektrik enerjisinin üretildiği termik santraller ağır metallerin çevreye yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır [4]. Linyit kömürünün yakılması sonucunda kül ile çevreye Cd, Ni, Co, Mn, Cr, Pb, Cu, Zn, Fe ağır metalleri salınmakta olup, termik santrallerden çevreye salınan uçucu küllerin genotoksik ve mutajenik maddeler içerdiği saptanmıştır [5],[6]. Hücresel düzeyde aşırı miktarda ağır metal

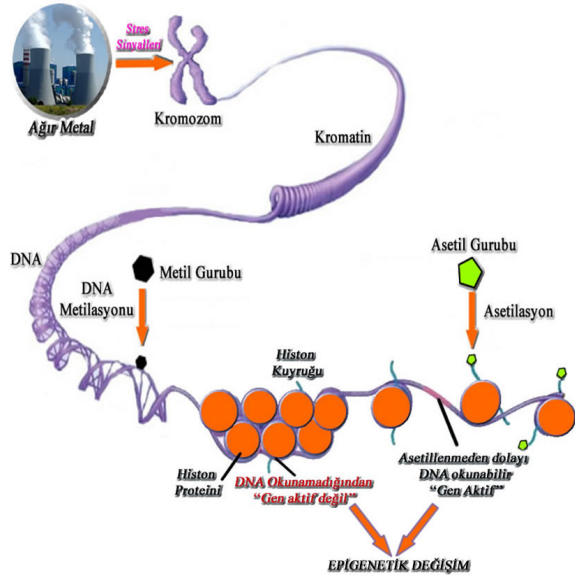
birikimi membranlar, proteinler ve DNA gibi farklı hücre bileşenleri için çeşitli stres tepkilerine ve hasara neden olmaktadır [7]. Yapılmış birçok çalışma ağır metallerin bitkilerin moleküler yapısını etkilediğini göstermiştir [8], [9], [10], [11]. Ağır metal gibi genotoksik maddeler DNA’yı geri dönüşümsüz olarak değiştirerek kalıtsal bir değişime yol açarlar. Bu nedenle genotoksinler aynı zamanda mutajenik maddelerdir [12]. İlk kez literatüre 1942’de Conrad Waddington tarafından kazandırılan “Epi- genetik” terimi fenotipik ifadeye izin veren genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimler olarak tanımlanmıştır [13]. Stres koşullarının etkisi ile metabolizmada tepki ve değişimler meydana gelebilmektedir

Kromatin yapısı üzerinde meydana gelen epigenetik modifikasyonların genlerin ifadelerini etkilemesi, DNA meti-

lasyonu, histon modifikasyonları ve RNA gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir [14]. Bu üç mekanizmanın birlikte çalışması sonucu gen ifadesinde kalıtsal farklılıklar meydana gelmektedir. Mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen bir hata, gen anlatımının aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik



Resim 1: Ağır metal kirliliğine neden olan faktörler.



Resim 2: Epigenetik mekanizmanın işleyiş modeli.

bozukluklara yol açmaktadır [15] (Resim 2).

Genomdaki hareketli gen mekanizmalarından transpozonların etkisi ile epigenetik değişimler meydana gelirken, transpozonlarda epigenetik mekanizmaların etkisi ile susturulmakta veya aktifleştirilebilmektedir [16].

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), ülkemizde tahıl ekilişi ve üretim miktarı bakımından buğdaydan sonra ikinci sırada yer almaktadır. TÜİK [17] verilerine göre ülkemizde son beş yıldaki arpanın üretim miktarı ve ekilen alan Resim 3'de verilmiştir.

Arpanın beslenme ihtiyaçlarını karşılamada bu kadar yoğun ve çok kullanımı bu ürün üzerinde çalışmaya sevk etmiştir. Bu çalışmadaki amacımızı şu şekilde sıralayabiliriz;

Canlıların temel gıda maddesi olan arpada ağır metallerin neden olduğu genotoksik etki sonucu oluşabilecek gene-

tik ve epigenetik değişiklikleri retrotranspozon hareketliliği üzerinden tespit etmek.

Yetiştirilecek tarımsal ürünler için ağır metal kaynağına olan ekim mesafesi hakkında fikir elde edilebilir.

MATERYAL VE METOT

Tohumların Sterilizasyonu

Saf arpatohumları% 5' lik Sodyum hipoklorit (NaClO)' de 10 dakika bekletilerek yüzeysel olarak sterilize edildikten sonra saf su ile yıkanıp kurutuldu.

Tohumların Ekilmesi ve Örneklerin Toplanması

Seçilen eşit büyüklükteki tohumlar termik santral çevresine aynı doğrultuda olacak şekilde 500'er metre mesafe ile 15 farklı noktaya ekildi. Bitki örnekleri 40 günlük vejetasyon sürecinin ardından toplandı. Toplanan örnekler moleküler incelemeler ve ağır metal içerik analizinden önce sterilize edildi.

DNA İzolasyonu

Genomik DNA sıvı azot ile toz haline getirilmiş yapılarından, Qiagen DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak izole edildi.

Genomik DNA saflığının ölçülmesi

Genomik DNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi % 0.8 agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntüldü.

IRAP

Arpada meydana gelen retrotranspozon hareketliliğini değerlendirmek için IRAP (İnter Retrotranspozon Amplifikasyon Polimorfizmi) tekniği kullanılmıştır. IRAP profillerini oluşturmak için 5 primer IRAP-PCR uygulamasında kullanılmıştır. Kullanılan IRAP primerlerine ait bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

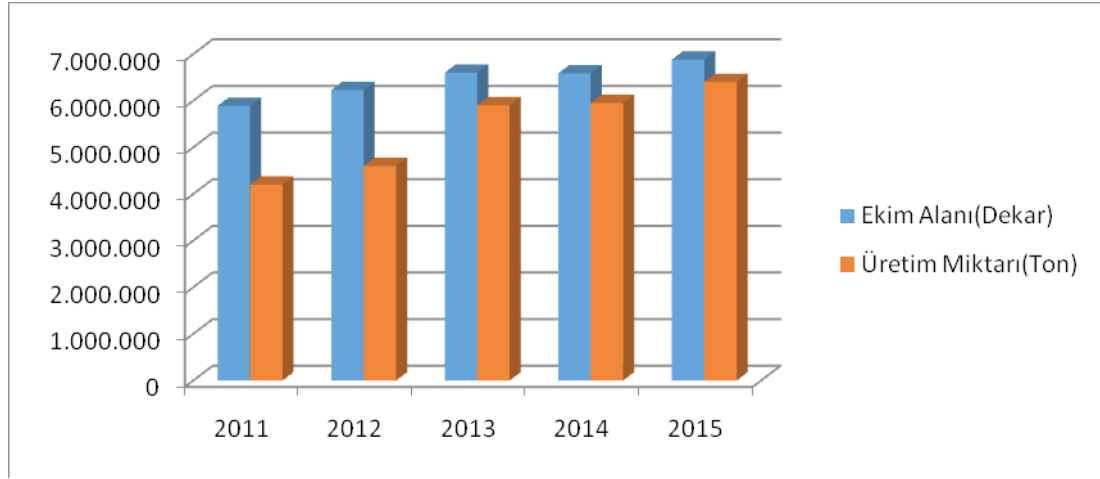
IRAP-PCR reaksiyon karışımı 2 µl 10 x PCR Buffer, 0,5 µl dNTPs (10 nM), 1,25 µl MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl Primer (5 mM), 1,0 µl Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 birim), 13,25 µl Ultra saf su ve 1,0 µl Genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. PCR şartları aşağıdaki programa göre gerçekleştirildi; 95 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 30 saniye 2 döngü, X °C (IRAP Primeri bağlanma sıcaklığı) 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 30 saniye 41 döngü, 35 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 5 dakika. PCR ürünleri daha sonra 4 °C'de stoklandı.

Elektroforez

Elde edilen PCR ürünleri 6x gel yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 150 dakika için 70 Voltta 0.5 TBE (Tris-Boreta-Edta) ile agaroz jel içine yüklenerek elektroforez işlemi yapıldı. Jel Etidyum bromür solüsyonunda (2 µl Etbr / 100ml 1xTBE tampon) 40 dakika boyunca boyandı ve Uvi-soft analiz paketi (Cambridge, İngiltere) ile Bio Doc Görüntü Analizi Sistemi UV altında görüntüldü.

Data Analiz

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol IRAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar görüntüleme cihazı ve Total LAB TL 120 (Nonlinear Dynamics) yazılımıyla belirlenmiştir. Genomik kalıp sabitliliği (%) tüm primer ürünleri için 100 x 1-a/b formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki; a; her bir uygulama örneği için tespit edilen IRAP polimorfik profillerini, n; ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bant sayısı olarak seçilmiştir. Uygulama gruplarına ait IRAP profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bantın ortaya çıkması veya mevcut bir bantın kaybolmasını kapsamıştır.



Resim 3: 2015 Tük verileri.

Primer Adı	Baz Dizilişi	TM(°C)	GC %
ZmGF14-4F	5' - GAACCTCTTATCTGTTGCCT- 3'	50	45
ZmGF14-4R	5' - GATGACTAGATGCCAGTTCC - 3'	52	50
ZmGF14-6F	5' - GCATGCAGAAGGGTTGAGCA - 3'	56	57
ZmGF14-6R	5' - TCAGGGCTCATCTAGCTGGTCTG - 3'	61	58
β-actin-F	5' - TTTGAAGAGTCGGTGAAGGG - 3'	52	50
β-actin-R	5' - TTTCATACAGCAGGCAAGCA - 3'	50	45

Tablo 1: RT-PCR'da kullanılan primerler.

Primer Adı	Baz Dizilimi	TM(°C)
SUKKULA	5'- GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC-3'	63.3
3LTR5	5'- TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA-3'	64.6
LTR6150	5' CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA-3'	64.4
NIKITA	5'-ACCCCTCTAGGCGACATCC-3'	58.7
5LTR1	5'-TTGCCTCTAGGGCATATTTTCCAACA-3'	58.4
LTG6149	5'-CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGGTTTATT-3'	65.9

Tablo 2: IRAP primer listesi.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Arpa örneklerinde IRAP analizi sonucu oluşan bantların dağılımı, polimorfizm oranları ve GTS değerleri Tablo 2.'de verilmiştir. Arpa örneklerine uygulanan 5 IRAP primerinde toplam 345 bant oluşmuştur. Meydana gelen bantların büyüklüğü 81 bp ile 2117 bp aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre 9 örnekte polimorfizm tespit edilmiştir. Oluşan polimorfizm değerleri %9.52 ile

%52.38 aralığında değişiklik göstermektedir. En yüksek polimorfizm ağır metal kaynağına en yakın noktadan alınan örneklerde tespit edilmiştir. Bu noktadaki polimorfizm oranı %52.38'dir. Bu örnekte toplam 11 polimorfik bant varlığı veya eksikliğinin olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm 10. noktadan 15. noktaya kadarki örneklerde tespit edilmemiştir.

Örneklerin GTS oranında termik santrale yakınlıkları ile ters orantılı olarak artış olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm tespit edilen 9 örneğin GTS değerleri %47.62 ile %90.48 aralığında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak 10. noktadan 15. noktaya kadar olan örneklerin GTS değeri

%100 olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Biyosferdeki ağır metal kirliliği, tüm dünyada kabul edilmiş dikkat edilmesi gereken çevresel sorunlardan birisidir. Bundan dolayı ağır metallerden kaynaklı toksik etkiler

ekolojik araştırmaların en popüler başlıklarından biri haline almıştır[19]. Bu çalışmada, ağır metal kaynağına farklı mesafelerde ekilerek yetiştirilen arpa örneklerinden retrotranspozonların meydana getirdiği hareketler analiz edilmiştir. Örnekler arasında retrotranspozonların hareket

-liliğinden kaynaklanan polimorfizm oranını belirlemek için IRAP-PCR tekniği kullanılmıştır. Bugüne kadar farklı stres koşullarının karşılaştırılması amacıyla [20], [21], [22], [23], [24] IRAP-PCR tekniği ile pek çok çalışma yapılmıştır.

Bazı stresler retrotranspozonları aktive edebilmektedir. Yaptığımız çalışmada ağır metal kaynağına yakınlık durumu bağlı olarak retrotranspozon hareketinin arttığı ve buna bağlı olarak GTS oranının azaldığı gözlenmiştir. Ertürk [24] yaptığı çalışmalarda mısır bitkisine uyguladığı farklı dozlarda ağır metallerden kaynaklı olarak genetik farklılıkların ortaya çıktığını tespit etmiştir. Abiyotik stres

faktörleri bitkilerde retrotranspo zonların hareketliliğini etkilerken bitkinin kararlılığı üze rinde rol oynadığına ilişkin birçok mevcut çalışma vardır[25],[26],[27] ve [28]. Çalışmamızın sonuçlarından elde ettiğimiz veriler önceki

çalışmaları destekler niteliktedir. Bitkiler sabit organizmalar olarak, kuraklık, tuzluluk, olum suz sıcaklık, ağır metal toksisitesi, besin yetersizliği gibi çe şitli abiyotik ve biyotik stresleri algılama ve bunlara cevap vermek için karmaşık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu abiyotik ve biyotik streslerin neden olduğu sinyallere, bitkiler hayatta kalabilmek için doğru tepkiler vermelidir. Ayrıca bu tepkiler koordine edilmeli ve bitkinin gelişim gibi bütün süreçlerine dâhil olmalıdır [25], [26].

Genomun yapısını ve boyutunu etkileme konusunda önemli potansiyele sahip retrotranspozonlara termik santralenden yayılan ağır metallerin neden olduğu stres düzeyi arpa örneklerinde irap analizleri ile incelenmiştir.

Analizlerde kullanılan Sukkula, 3LTR-5, LTR 6150, Nikita e2647-, LTR 6149-5 ltr retrotranspozonlarının hareketliliğinden kaynaklı polimorfizmler tespit edilmiştir. Ağır metal kirliliğine neden olan termik santrale yakın noktalarda yetiştirilen arpa örneklerinde polimorfizm değerlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Retrotranspozonların bu hareketliliğinin bitkilerde genomik kalıp sabitliğini de olumsuz yönde etkilediği anlaşılmıştır. Çünkü en düşük GTS değerleri termik santrale en yakın örneklerde tespit edilmiştir. Retrotranspozonların bu hareketliliği primer bağlanma noktalarını etkilemesi sonucunda genom profilindeki meydana gelen değişimler yeni bantların oluşumu ve/veya bantın kaybolması ile tespit edilmiştir.

Retrotranspozon hareketlilik düzeyinin araştırılması amacıyla farklı stress koşulları altında farklı metabolizmaların IRAP tekniği kullanılarak yapılmış literatür çalışmaları mevcuttur. Tuz stresinin buğday (*Triticum aestivum* L.) üzerinde retrotranspozon hareketliliğine etkisinin incelendiği çalışmada uygulanan farklı tuz konsantrasyonuna bağlı olarak retrotranspozon hareketinin arttığı ve buna bağlı olarak GTS oranının azaldığı gözlenmiştir [29].

Farklı dozlardaki Mn ağır metalinin mısır (*Zea mays* L.) üzerinde meydana getirdiği genotoksik etki IRAP tekniği ile analiz edilmiş ve %22 ile %42 arasında değişen oranlarda polimorfizmler tespit edilmiştir. Ayrıca mn doz artışına bağlı olarak gts değerlerinde düşüş meydana geldiği vurgulanmıştır [30].

Bu literatür sonuçlarından elde edilen bulgular ile çalışmamızın sonuçları paralellik göstermektedir.

Sanayi kuruluşlarının çevre kirliliğine etkilerinin azaltılması için akümülatör bitkilerin tespiti ve uygulanması basit ve uygulanabilir bir çözüm olabilir. Ayrıca ağır metal kirliliğine toleransı yüksek tahıl türlerinin tespit edilerek bu bölgelere ekilmesi daha uygun olacağı kanaatini taşımaktayız.

REFERANSLAR

[1]. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı 2016,2872 sayılı Çevre Kanunu - Mevzuat Bilgi Sistemi, www.mevzuat.gov.tr / MevzuatMetin/1.5.2872.doc.

[2]. Jomova K, Valko M. 2011, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*. 2011 May 10;283(2-3):65-87. doi: 10.1016/j.tox.2011.03.001. Epub 2011 Mar 23.

[3]. Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A. and Timur S., 2007. Metallerin Çevresel Etkileri –I. (erişim adresi: www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf, erişim tarihi: 13.05.2007).

[4]. Öztürk, M. (2009). Kül Dağları ve Toksik Metal Kirliliği. Son erişim 1 Eylül 2011.

[5]. Celik, M., Donbak, L., Unal, F., Yuzbasioğlu, D., Aksoy, H., Yılmaz, S. 2006. Cyto genetic Damage in Workers From a Coal-Fired Power Plant. *Mutation Research*, 627: 158-163.

[6]. Leonard, A., Deknuds, G., Leonard, E.D., Decat, G. 1984. Chromosome Aberrations in Employees from Fossil-Fueled and Nuclear-Power Plants. *Mutation Research*, 138: 205-212.

[7]. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D.2003,- Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology*. 2003 Nov 5;192(2-3):95-117.

[8]. Kumar,A., Prasad, M.N.V., and Sytar, O.(2012) Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically, *Chemosphere*, 89,1056-1165.

[9]. Malec JF, Lezak MD. Manual for the MayoPortland Adaptability Inventory. April 2003; revised January 2008. The Center for Outcome Measurement in Brain Injury Web site. Available at: <http://www.tbims.org/combi/mpai/manual.pdf>. Accessed November 5, 2008.

[10]. Maleva M G, Nekrasova G F, Malec P, Prasad M N V, Strzałka K, 20009. Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere*, 77: 392–398

[11]. Gangwar, S., Singh, V.P., Srivastava, P.K., and Maurya, J.N.,(2011) Modification of chromium(VI) phytotoxicity by exogenous gibberellicacid application in *Pisum sativum*(L.) seedlings açta. *Physiol. Plant.*, 33,1385-1397.

[12]. Vural,Nevin (2005) ,Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73

[13]. Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942;1:18–20.

[14]. Rodenheiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174 (3): 341-8.

[15]. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy, *Cell* 2012; 150(1):12-27. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis* 2010; 31(1):27-36.

[16]. Slotkin RK, Martienssen R (2007) , Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome, *Nat Rev Genet*. 2007 Apr;8(4):272-85.

[17]. Tüik (2016), <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>

[18]. Xiayu Rao1, Xuelin Huang2, Zhicheng Zhou3, and Xin Lin3(2013), An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 August ; 3(3): 71–85.

[19]. Gupta, M. and Sarin, N.B., 2009. Heavy metal induced DNA changes in DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *J. Environ. Sci.*, 21: 686-690.

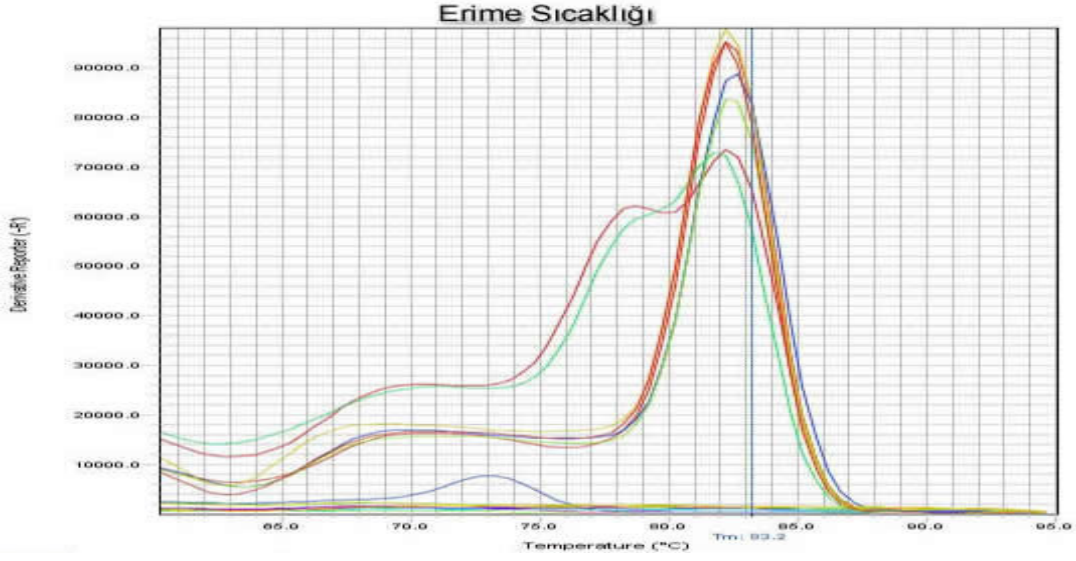
[20]. Alavı-Kıa, S.S., Mohammadı, S.A., Aharızad, S., Moghaddam, M., 2008, Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationshipsin *Crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22 (3), 795-800.

[21]. Carvalho, A., Guedes-Pinto, H., Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., 2010, Genetic variability of old portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers, *Annals of Applied Biology*, 156, 337-345.

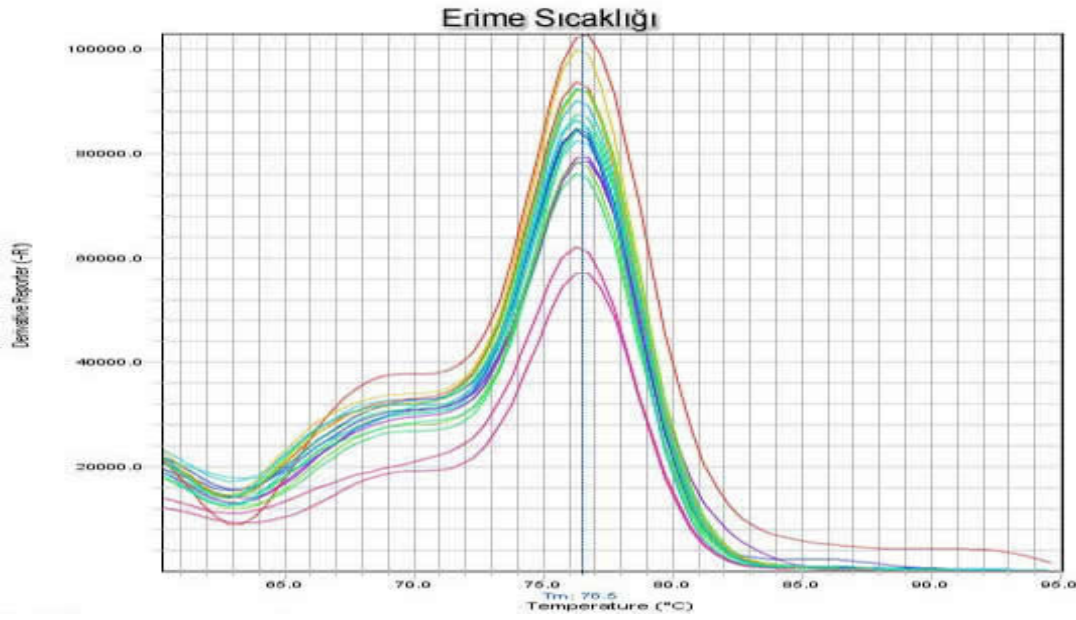
[22]. Hamad- Mecbur, H., Yılmaz, S., Temel, A., Sahın K., Gozukırmızı, N., 2012, Effects of epirubicin on barley seedlings, *Toxicology and Industrial Health*, DOI: 10.1177/0748233712451768.

[23]. Temel, A., Kartal, G., Gozukırmızı, N., 2008, Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22 (4), 911-914.

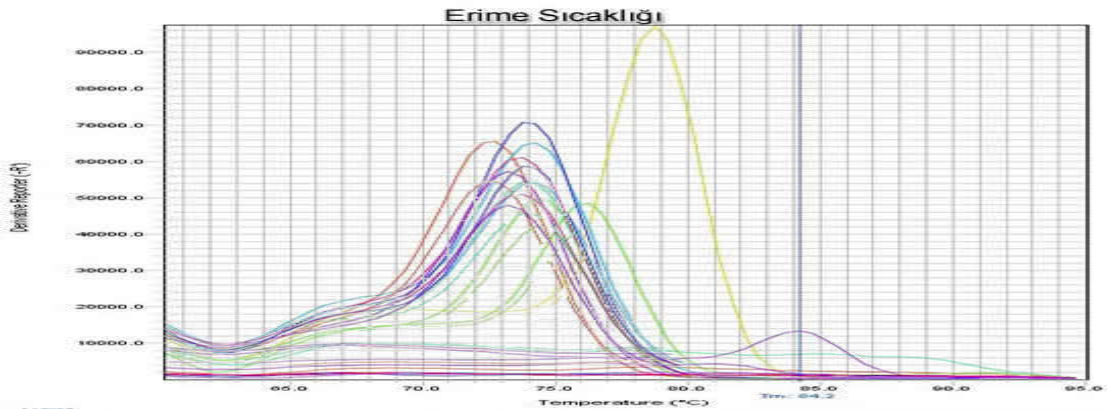
[24]. Filiz AYGÜN ERTÜRK (2013)Ağır Metallerin

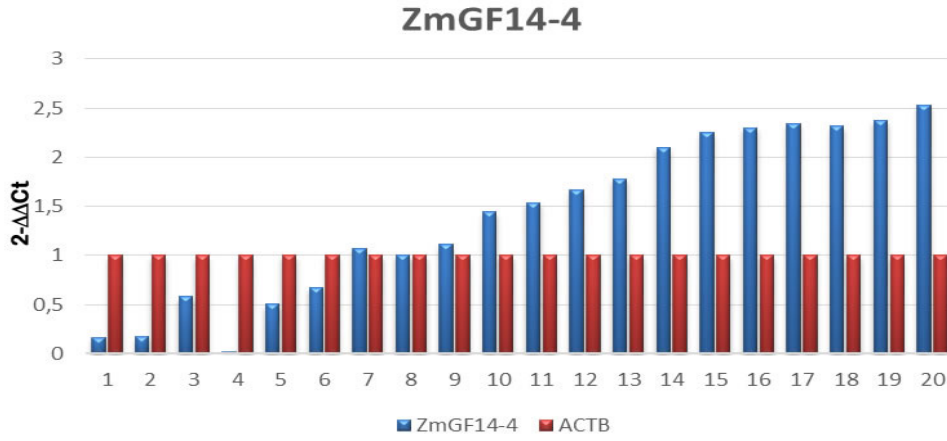


Resim 4. ZmGF14-4gen primerinin melting curve analiz görüntüsü.



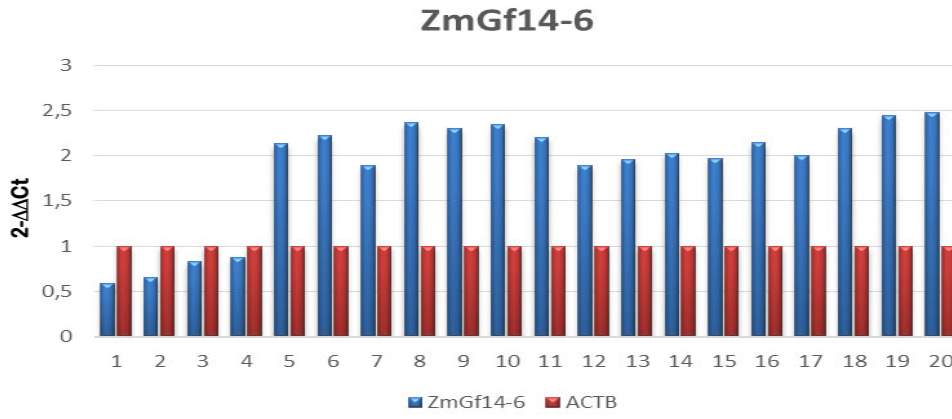
Resim 5. ZmGF14-6gen primerinin melting curve analiz görüntüsü.

Resim 6. β -Actin gen primerinin melting curve analiz görüntüsü.



Resim 7: ZmGF14-4 geninin ifade düzeyi.

ZmGF14-6 gen ifade analizleri incelendiğinde ise 1-2-3-4 numaralı örneklerde gen ifadesinin β -actine göre ifade düzeyinin düşük olduğu 5. numuneden itibaren gen ifade düzeylerinin yükseldiği görülmüştür (Resim 8).



Resim 8: ZmGF14-6 geninin ifade düzeyi.

PRIMER	Kontrol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
3LTR5	2	+133 +966	+143 +971	+152 +977	+162 +994	+171 +979	+157 -358	+157	+143	+100	+61	
LTR6150	4	+351 +1.266 +1.333 +1.621	+1.212 +1.474 +1.672	+1.286 +1.425 +1.612	+1.297 +1.496 +1.646	+1.234 +1.398 +2.411	+1484 +1.633	+1.799	+944
SUKKULA	6	+856	+823	+837 -155	+831	+824	+829	+830 -155	+836	+819	
NIKITA	4	+2.046 +868	+1.989 +849	+1985	+1977 +963	+1099	+1689	+1093	+1156	+847	+1097	
SLTR1	1	
LTG6149	3	-1.043 -2.035	-1.043	-1.043	-1.043	-1.043	-1.043	-1.043	
Toplam Bant Sayısı	20	11	9	10	9	8	8	6	4	3	2											
Polimorfizm Oranı		%55	%45	%50	%45	%40	%40	%30	%20	%15	%10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GTS		%45	%55	%50	%55	%60	%60	%70	%80	%85	%90	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	

Tablo 3: IRAP primerlerinin polimorfizm ve GTS değerleri.

	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb
Örnek	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt
1	3019772	13141	532315	1293552	324704	760491	32156	611794
2	1046604	9856	455483	1282304	323604	733846	29875	557562
3	439928	6217	<0.000	1071248	275040	439264	13686	275521
4	215930	<0.000	<0.000	1050320	249465	371668	11242	265238
5	<0.000	<0.000	<0.000	1012014	193667	307795	<0.000	201980
6	<0.000	<0.000	<0.000	1021629	180271	302151	9054	164000
7	<0.000	<0.000	<0.000	837189	152661	290776	<0.000	127869
8	<0.000	<0.000	<0.000	420641	149145	153515	<0.000	109645
9	<0.000	<0.000	<0.000	37365	153614	90891	<0.000	97372
10	<0.000	<0.000	<0.000	12359	45584	3123	<0.000	<0.000
11	<0.000	<0.000	<0.000	4646	579	687	<0.000	<0.000
12	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	621	<0.000	<0.000	<0.000
13	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
14	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
15	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
16	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
17	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
18	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
19	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
20	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
Kontrol	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000

Tablo 4: Örneklerin ağır metal içeriklerinin ICP-MS sonuçları.

Neden Olduğu Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, Atatürk üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Erzurum.

[25]. Picault N, Chaparro C, Piegu B, Stenger W, Formey D, Llauro C, Descombin J, Sabot F, Lasserre E, Meynard D, Guiderdoni E, Panaud O (2009) Identification of an active LTR retrotransposon in rice. *Plant J* 58:754–765

[26].Grandbastien MA (2014) LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response. *Biochim Biophys Acta* 1849:403–416

[27].Woodrow P, Pontecorvo G, Fantaccione S, Fuggi A, Kafantaris I, Carillo P (2010) Polymorphism of a new Ty1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. *Theor Appl Genet* 121:311–322

[28].Alzohairy AM, Yousef MA, Edris S, Kerti B, Gyulai G, Bahieldin A (2012) Detection of LTR retrotransposons Reactivation induced by in vitro Environmental Stresses in Barley (*Hordeum vulgare*) via RT-Qpcr. *Life Sci J* 9:5019–5026

[29]. Bayram, E., Yılmaz, S., Hamad-Mecbur, H., Kartal, G., Gozukırmızı, N., 2012, *Nikita* retrotransposon movements in barley (*Hordeum vulgare* L.) callus culture, *Plant-tomics*, 5 (3), 211-215.

[30]. S. Campo, C. Peris-Peris, L. Montesinos, G. Peñas, J. Messeguer, B. San Segundo, Expression of the maize ZmGF14-6 gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 983e999.

[31]. P.J. Zwack, A.M. Rashotte, Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses, *J. Exp. Bot.* 66 (2015) 4862e4871.

[32]. Vinocur B, Altman A.(2005), Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, *Curr Opin Biotechnol.* 2005 Apr;16(2):123-32.

[33]. Oecking C, Jaspert N.(2009), Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs, *Curr Opin Plant Biol.* 2009 Dec;12(6):760-5. doi: 10.1016/j.pbi.2009.08.003.

Epub 2009 Sep 12.

[34]. J.E. Obidiegwu, G.J. Bryan, H.G. Jones, A. Prashar, Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement, *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 542.

[35]Chen, F., Li, Q.,Sun, L., and He, Z.(2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Res*13: 53-63.

[36]M.R. Roberts, J. Salinas, D.B. Collinge, 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress, *Plant Mol. Biol.* 50 (2002) 1031e1039.

[37]F.C. Denison, A.L. Paul, A.K. Zupanska, R.J. Ferl, 14-3-3 proteins in plant physiology, *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (2011) 720e727.

[38]Chengjian Xie, Liujie Hu, Yongzhu Yang, Dunxiu Liao, Xingyong Yang, (2017) Accumulation and tolerance to cadmium heavy metal ions and induction of 14-3-3 gene expression in response to cadmium exposure in *Coprinus atramentarius*, *Microbiological Research*, Volume 196, March 2017, Pages 1–6.

[39] J.R. Owen, C.A. Morris, B. Nicolaus, J.L. Harwood, P. Kille (2012), Induction of expression of a 14-3-3 gene in response to copper exposure in the marine alga, *Fucus vesiculosus* *Ecotoxicology*, 21 pp. 124–138.

