İN VİTRO ŞARTLARDA AZASİTİDİN UYGULAMASININ YONCA KALLUSLARINDA ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE *SERK1* VE *WEE1* GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma Özge ASLAN

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU

2023
Her hakkı saklıdır.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İN VİTRO ŞARTLARDA AZASİTİDİN UYGULAMASININ YONCA KALLUSLARINDA ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE *SERK1* VE *WEE1* GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma Özge ASLAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

10 / 01 / 2023

Fatma Özge ASLAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İN VİTRO ŞARTLARDA AZASİTİDİN UYGULAMASININ YONCA KALLUSLARINDA ANTİOKSİDAN SİSTEM İLE *SERK1* VE *WEE1* GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma Özge ASLAN

Erzurum Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU

Yonca yüksek besin değeri, verim potansiyeli biyotik ve abiyotik stress faktörlerine dayanıklı olmasından dolayı dünyadaki en önemli yem bitkisidir. Bu çalışmada, yonca bitkisinin yaprak eksplantlarından alınan kalluslar 0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D, 0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D+2,5µM 3µL 5-azaC, 0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D+2,5µM 6µL 5-azaC içeren ortamlarda 7, 14 ve 21 gün yetiştirilmiş ve yonca kalluslarında malondialdehit (MDA) miktarı, hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyesi, süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POD) enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler, prolin, toplam protein, dinitrosalisilik asit (DNSA) ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Buna ilaveten, azasitidin uygulamasına bağlı olarak Somatik Embriyogenez Reseptör Kinaz 1 (*SERK1*) ve G2 Kontrol Noktası Kinaz (*WEE1*) genlerinin ifadelerinde meydana gelen değişimler ölçülmüştür. Azasitidin uygulamasına bağlı olarak MDA ve H_2O_2 miktarlarının azaldığı, SOD aktivitesi ve protein miktarının düştüğü, POD aktivitesi ve prolin miktarının arttığı belirlenmiştir. *SERK1* ve *WEE1* genlerinin ifadelerinin uygulanan azasitidin konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir.

2023, 53 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Azasitidin, kallus, *in vitro* kültür, somatik embriyo, gen ifadesi

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF AZACITIDINE APPLICATION ON ANTIOXIDANT SYSTEM AND *SERK1* AND *WEE1* GENE EXPRESSION IN ALFALFA CALLUSES IN *IN VITRO* CONDITIONS

Fatma Özge ASLAN

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU

Alfalfa is the most important forage crop in the world due to its high nutritional value, yield potential and resistance to biotic and abiotic stress factors. In this study, calli taken from leaf explants of alfalfa plant 0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D, 0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D+2.5µM 3µL 5-azaC, 0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2.4D+2.5µM 6µL 5-azaC grown for 7, 14 and 21 days and in alfalfa callus malondialdehyde (MDA) amount, hydrogen peroxide (H_2O_2) level, superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) enzymes The changes in the activity of the protein, proline, total protein, dinitrosalicylic acid (DNSA) and total phenolic substances were determined. In addition, changes in the expressions of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 (*SERK1)* and G2 Checkpoint Kinase (*WEE1*) genes were measured due to azacitidine administration. It was determined that MDA and H_2O_2 amounts decreased, SOD activity and protein amount decreased, POD activity and proline amount increased due to azacitidine application. It was observed that the expressions of *SERK1* and *WEE1* genes changed depending on the applied azacitidine concentration and time.

2023, 53 Page

Keywords: Azacytosine, callus, *in vitro* culture, somatic embryo, gene expression

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürecim boyunca destek ve katkılarından dolayı tez danışmanım Doç. Dr İsmail BEZİRĞANOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Büşra YAZICILAR, Merve ŞİMŞEK ve Ümmügülsüm KOÇ' a teşekkür ederim.

Lisans eğitimimim ilk gününden bu yana yanımda olan değerli arkadaşlarım Bahri AVCI ve Berrin ALGÜL'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu süreçte de beni maddi manevi destekleyen ve ilgilerini eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatma Özge ASLAN
Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i

ABSTRACT ii

TEŞEKKÜR iii

İÇİNDEKİLER iv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

ÇİZELGELER DİZİNİ ix

1. GİRİŞ 1

1.1. Bitki Doku Kültürü 1

1.1.1. Kallus kültürü 1

1.1.2. Embriyo kültürü 2

1.1.3. Protoplast kültürü 2

1.1.4. Hücre kültürü 2

1.1.5. Organ kültürü 3

1.2. Yonca (*Medicago sativa* L.) 3

1.3. 5-Azasitidin (5-azaC) 6

1.4. Gen Anlatım Analizi 7

1.4.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) 7

1.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres 9

1.5.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2): 9

1.6. Antioksidanlar 10

1.6.1. SOD (Süperoksit Dismutaz) 10

1.6.2. POD (Peroksidaz) 11

1.6.3. Fenolik bileşikler 12

1.6.4. Prolin 13

1.6.5. Malondialdehit (MDA) 13

2. KAYNAK ÖZETLERİ 15

3. MATERYAL ve YÖNTEM 18

3.1. Kullanılan Cihazlar 18

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları 18

3.3. Bitki Materyali ve Kallus Oluşumu 21
3.4. Kalluslara Azasitidin (5-azaC) Uygulaması 23
3.5. Gen Ekspresyonu Tayini 24
3.5.1. RNA izolasyonu 24
3.5.2. cDNA sentezi 25
3.5.3. RT-qPCR 26
3.6. Antioksidan Aktivite Tayini 27
3.6.1. POD (Peroksidaz) aktivitesi 27
3.6.2. SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesi 28
3.6.3. MDA (melonaldehit) aktivitesi 28
3.6.4. Hidrojen peroksit (H_2O_2) aktivitesi 29
3.6.5. Prolin aktivitesi 29
3.6.6. DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) aktivitesi 30
3.6.7. Total fenolik aktivitesi 30
3.6.8. Total protein aktivitesi 31
3.7. İstatiksel Analiz 31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 32
4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi 32
4.2. POD (Peroksidaz) Aktivitesi 33
4.3. MDA (Malondialdehit) Aktivitesi 33
4.4. Prolin Analizi 34
4.5. DNSA (3,5-Dinitrosalisilik Asit) Aktivitesi 35
4.6. Total Fenolik Aktivitesi 37
4.7. Total Protein Aktivitesi 38
4.8. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Aktivitesi 39
4.9. Gen Aktivitesi 42
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 45
5.1. Sonuçlar 45
5.2. Öneriler 46
KAYNAKLAR 47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ºC	Santigrat Derece
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye

Kısaltmalar

2,4D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
5-azaC	5-Azasitidin
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik Döngüsü
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metil Transferaz
DNSA	3,5-Dinitrosalisilik Asit
ETDA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
MDA	Malondialdehit
ncRNA	Kodlama Yapmayan RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POD	Peroksidaz
RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SAM	S-Adenozil Metiyonin
SE	Somatik Embriyogenez
SERK1	Somatik Embriyogenez Reseptör Kinaz 1
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tioborbütürik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
WEE1	G2 Kontrol Noktası Kinaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: *M. sativa* L.' nın genel ve çiçek görüntüsü 5
Şekil 1.2. 5-azaC' ın kimyasal yapısı (Anonymous 2020) 6
Şekil 1.3. RT-PCR'ın genel çalışma prensibi; floresan ışımanın arka plan ışımasını geçmesi sonucu Ct değerine ulaşılması, floresan miktarının sabit değere ulaşmasıyla plato fazına girilmesi, grafikte A örneği B örneğinde daha fazla miktarda ürün içermektedir (Kubista et al. 2006). 8
Şekil 4.1. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının SOD aktivitesine etkisi..... 32
Şekil 4.2. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının POD aktivitesine etkisi..... 33
Şekil 4.3. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının MDA aktivitesine etkisi..... 33
Şekil 4.4: Prolin standart grafiği 35
Şekil 4.5. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının prolin aktivitesine etkisi 35
Şekil 4.6. DNSA standart grafiği..... 36
Şekil 4.7. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının DNSA aktivitesine etkisi 36
Şekil 4.8: Total fenolik standart grafiği..... 38
Şekil 4.9. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının total fenolik aktivitesine etkisi. 38
Şekil 4.10: Total protein standart grafiği..... 39
Şekil 4.11. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının total protein aktivitesine etkisi. 39
Şekil 4.12. H_2O_2 standart grafiği 40
Şekil 4.13. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının H_2O_2 aktivitesine etkisi..... 40
Şekil 4.14. 5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarındaki *SERK1* ve *WEE1* gen ifadelerinde meydana gelen değişimler. 42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. *M. sativa*' nın sistematik sınıflandırılması (Schoch et al. 2020) 4
Çizelge 1.2. *M. sativa* tür kompleksi içindeki birimlerin taksonomik ilişkisi 4
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında yararlanılan cihazlar ve modelleri 18
Çizelge 3.2. Standart MS besiyeri için kullanılan maddeler ve miktarları 22
Çizelge 3.3. MS besiyeri (Kinetin ve 2,4D) için kullanılan maddeler ve miktarları..... 23
Çizelge 3.4. Farklı 5-azaC konsantrasyonları uygulaması..... 24
Çizelge 3.5. cDNA sentezi için konsantrasyonlara göre belirlenen RNA ve dH_2O miktarları..... 25
Çizelge 3.6. cDNA sentezi için PCR koşulları..... 25
Çizelge 3.7. RT-qPCR için kullanılan primerler..... 26
Çizelge 3.8. Gen ifade seviyesi için RT-qPCR koşulları..... 27
Çizelge 4.1. 5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen SOD, POD ve MDA içeriklerindeki değişimler..... 34
Çizelge 4.2. 5-azaC'nın farklı konsatrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen prolin ve DNSA içeriklerindeki değişimler. 37
Çizelge 4.3. 5-azaC' ın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen total fenolik, total protein ve H_2O_2 içeriklerindeki değişimler..... 41

1. GİRİŞ

Gelişen dünya ile paralel artan nüfus yoğunluğu birçok ihtiyacı beraberinde getirmektedir. 8 milyara dayanan insan nüfusunun gıda ve enerji ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda, tüm dünyada hem bitkisel hem de hayvansal üretimin artırılması hedeflenmektedir. Gıda ihtiyacının karşılaması için atılacak en önemli adımlardan biri mahsul üretimini, verimini ve kalitesini artırmaktır. Geçmişten günümüze bitki verim ve kalitesini artırmak için yaygın olarak kullanılan bitki ıslah yöntemleri fazla iş gücü ve zaman alması, melezlemelerde kısırlık ve uyuşmazlık problemlerinin ortaya çıkması veya istenmeyen gen kaçışına neden olabildiği için günümüzde bitki doku kültürleri ürün verimi ve kalitesini geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kurt ve Şavşatlı 2005). Geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında bitki doku kültürü teknikleri ile ihtiyaç duyulan bitkinin daha kısa sürede ve kontrollü *in vitro* koşullarda üretimi mümkündür. Dahası, bitki doku kültürü yöntemleri ile tarım enstitüsünde çok sayıda başarılı çalışma yapıldığı için bu yöntem gelecek için umut vadeden biyoteknolojik bir yaklaşımdır (Shahzad et al. 2017).

1.1. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü temelde bir üretim prosesi olup klasik üretim yöntemleriyle kıyaslandığında *in vitro* şartlarda bitkiden alınan eksplantın (yaprak, kök, gövde vb.) sterile edildikten sonra gerekli uyaranları içeren besiyerine aktarılmasını ve sıcaklık, ışık, nem gibi kontrollü şartlarda gerçekleştirilen bir kültür işlemidir. Doku kültürü yöntemleri genel olarak 5 grup altında toplanmaktadır. Bu yöntemlerin kendine has özellikleri olmasına rağmen temelde hepsinde benzer teknikler kullanılmaktadır (Türkeç ve Turan 1992).

1.1.1. Kallus kültürü

Kallus, organize olmamış hücreler topluluğu olup bitkinin farklı dokularından (yaprak, kök vs.) elde etmek mümkündür (Dinçer vd 2016). Kallus hücrelerinin totipotent özelliğinin olması en önemli özelliklerinden biridir. Yani hücrelerin bütün genetik bilgiye sahip ve bütün organları farklılaşmış bir bitki meydana getirebilme

kapasitesine sahip olması demektir. Kalluslar, eksplant alınan bitki türüne bağlı olarak uygun uyaranlar (hormon, kimyasal madde) içeren besi ortamında yetiştirilir (Welsh 1981). Uzun süre devam eden kallus kültürü bazı kromozomal değişmelere sebep olur bu değişmeler, genetik varyasyon çalışmalarında araştırılmaktadır (Türkeç ve Turan 1992).

1.1.2. Embriyo kültürü

Embriyo kültürü, yumurtalık içerisinde gelişiminin belirli bir evresinde olgun veya olgunlaşmamış olarak izole edilen embriyoların *in vitro* koşullarda gelişmesi veya muhafaza edilmesi olarak tanımlanır. Ortamdaki karbonhidratlar embriyo için büyük önem taşımaktadır. Yaygın olarak kullanılan karbonhidratlar, embriyo için sadece enerji kaynağı değil, aynı zamanda osmotik düzenleyici olarak kullanılır (Dinçer vd 2016). Embiryo kültürü *in vivo* da melezlenmesi zor olan türler ve cinsler arası melez elde etmek için kullanılabilir. Ayrıca embiriyo kültüründen dormansi ve erken çimlenme sorunlarının çözümünde de yararlanılmaktadır (Türkeç ve Turan 1992).

1.1.3. Protoplast kültürü

Protoplastlar, hücre duvarının kimyasal bir işlemle parçalanmasıyla elde edilir. İki ayrı bitkinin aynı ortamda kültürlenen protoplastların karşılıklı füzyonu ile hibrit bitki oluşur. Protoplastlar mekanik ve enzimatik yöntemlerle izole edilebilirler. Protoplast kültürü ile protoplastlardan çok sayıda bitki elde edilmesi mümkündür (Dinçer vd 2016).

1.1.4. Hücre kültürü

Hücre kültüründe tek hücreler ya da hücre grupları kullanılabilir. Kağıt ve petri dişi olmak üzere iki farklı teknik kullanılarak hücre kültürü yapmak mümkündür. Kağıt yönteminde, kallustan mikropipetle alınan hücre kağıt üstüne konulur ve bölünerek sürgün ve kök oluşturduktan sonra yeni ortamlara taşınır. Petri kabı tekniğinde ise sterilize edilmiş besi ortamı ile hücre grupları karıştırılarak özel bir steril ortamdan

geçirilir ve farklı petri dişlerine aktarıldıktan sonra kültüre alınır. Köklenen sürgünler yeni besi ortamına alınarak tüm bitki oluşumu teşvik edilir (Vidalie 1988).

1.1.5. Organ kültürü

Organ kültüründe sürgün oluşturma ve bitki üremesinde; yapraklar, embriyonik parçalar (kotiledon, hipokotil), sürgün ve sürgün uçları, koltuk ve terminal tomurcukları gibi bitkinin farklı kısımları materyal olarak kullanılmaktadır (Vidalie 1988).

Doku kültürünün avantajları:

- Üretim sürecinin kısa olması,
- Varyasyonların olması,
- Metabolik yolakların incelenmesine imkân vermesi,
- Hücresel süreçlerin incelenmesi,
- Strese dirençli bitkilerin geliştirilmesinde olumlu sonuçlar vermesi olarak sıralanabilir (Türkeç ve Turan 1992).

1.2. Yonca (*Medicago sativa* L.)

Yoncanın (*Medicago sativa* L.) orijin noktası Anadolu'yu da içine alan Kafkasya bölgesidir. Bu bitkinin ülkemiz topraklarında varoluşu yaklaşık 3300 yıl öncesine dayanmaktadır. (Sakiroğlu and Brummer 2013). Sonraki yıllarda ana vatanı Kafkaslardan Sibirya, Meksika, Şili, Kuzey Afrika ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri de dahil Dünya çapında geniş bir yayılım göstermiştir (Barnes et al. 1988; Avcıoğlu vd 2009).

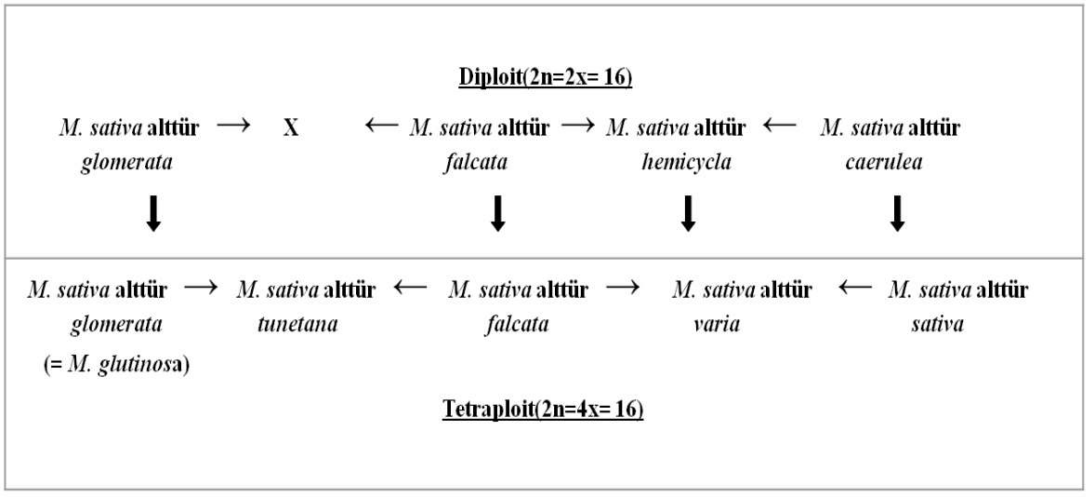
Yonca yaklaşık 350 cins ve 10.000 kadar türü barındıran baklagiller (*Fabaceae*) familyasına dâhildir (Şakiroğlu vd 2011).

Çizelge 1.1. *M. sativa*' nın sistematik sınıflandırılması (Schoch et al. 2020)

Âlem	Bitkiler alemi (Plantae)
Bölüm	Kapalı Tohumlular (Magnoliophyta)
Sınıf	İki Çenekliler (Magnoliopsida)
Takım	Fabales
Familya	Fabaceae (Baklagiller)
Alt Familya	Faboideae
Cins	*Medicago*
Tür	*Medicago sativa* L.

Medicago cinsi temel kromozom sayıları x=7 olan tek yıllık ve temel kromozom sayıları x=8 olan çok yıllık türlere sahiptir. *M. sativa*'nın alt birimleri diploid ($2n = 2x = 16$) ve tetraploidtir ($4n = 4x = 32$) (Şakiroğlu ve İlhan 2011).

Çizelge 1.2. *M. sativa* tür kompleksi içindeki birimlerin taksonomik ilişkisi (Şakiroğlu vd 2011).



M. sativa, *Medicago* cinsine ait *Falcago* seksiyonunun *Falcatae* alt seksiyonuna dahil edilmektedir ve *Falcatae* kompleksi için çiçek rengi ve meyve şekli önemli karakterlerdir (Small et al. 1990). Morfolojik karakterlere ek olarak ploidi seviyelerine görede karakterlendirmeler yapılmıştır (Şakiroğlu et al. 2010). Kompleksin diploid alttürleri; *M. sativa* subsp. *falcata* sarı çiçek-orak meyve, *M. sativa* subsp. *caerulea* mor-menekşe çiçek-kıvrılmış meyve yapısına sahipken bu iki alttürün doğal melezi *M. sativa* subsp. *xhemicycla* ebruli çiçek-melez meyve özelliklerini gösterir. Tetraploid alt türler de ise *M. sativa* subsp. *sativa* L., *M. sativa* subsp. *falcata* ve *M. sativa* subsp. *xvaria* yer almaktadır (Quiros and Bauchan 1988).

Şekil 1.1: *M. sativa* L.' nın genel ve çiçek görüntüsü

M. sativa dünyada ekimi en fazla yapılan, ilk kültüre alınan, geniş adaptasyon yeteneğine sahip olması ve diğer yem bitkilerine göre yüksek besin içeriğine sahip olması nedeniyle yem bitkilerinin kraliçesi olarak isimlendirilmiştir (Elçi 2005; Yeşil ve Şengül 2009; Radovic et al. 2009). Yem bitkilerin içeriği hayvanların günlük ihtiyaç duyduğu besinleri karşılayabilmesi açısından çok önemlidir. Yonca ham protein içeriğinin (15-22 %) yanında B1, B2, A, K, E, D, B7, B12 vb. gibi birçok vitamine ek olarak Potasyum (K), Magnezyum (Mg), Klor (Cl), Kalsiyum (Ca) gibi mineralleri de bünyesinde barındırır. Ayrıca karoten (provitamin A), α-tokoferol (E vitamini), K vitamini ve kanatlı hayvan kalitesini etkileyen ksantofil (Xanthophyll) bakımından oldukça zengindir. Yonca hayvanlarda et, süt ve döl verimini artırılmasında önemli bir role sahiptir (Bauchan and Greene 2002; Geren vd 2004). Sahip olduğu zengin içeriği ile hayvanlar için besleyici ve lezzetli bir besin kaynağıdır (Radovic et al. 2009). Aynı zamanda selüloz miktarının az olması nedeniyle sindirilebilirlik oranını artırmaktadır (Karadavut vd 2011).

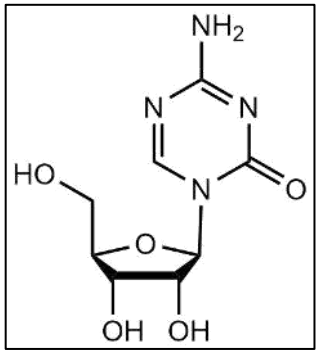
M. sativa dünya genelinde ortalama 80 milyon hektarda yetiştirilmektedir (Michaud et al. 1988; Frame et al. 1998; Russelle 2001). *M. sativa* yetiştiriciliği için sıcak yaz aylarında neme doymuş ve pH' sı 6,5'tan az olmayan topraklar tercih edilmektedir (Orak ve Gökkaya 2014). 1 kg kuru ot eldesi için yaklaşık 800 litre su gerekmektedir, bu nedenle az yağış alan bölgelerde ekstra sulama yapılmaktadır (Gençkan vd 1992). *M. sativa* yetiştiği en ideal sıcaklık ise 25-26 °C arasındadır (Gökalp vd 2017). Yonca toprağın 8-10 m derinlerine ulaşabilen kök yapısı sayesinde su ve besin ihtiyacını kolaylıkla temin edebilir ve diğer bitkiler için verimli bir alan

hazırlar (Açıkgöz 2001). Etkili kök derinliği 120-180 cm'yi bulan yonca topraktaki organik maddeyi arttırarak toprağın fiziksel yapısına da katkı sağlamaktadır. Derinlere ulaşabilen kökleri sayesinde toprak koruyucu özelliği ile erozyonla mücadelede etkin bir rol üstlenir (Uslu ve Balcı 2020).

Yeşil ve kuru ot üretiminin yanı sıra silo yemi, pelet yem, yonca unu, yer örtüsü (erozyona karşı) ve yeşil gübre olarak da değerlendirilmektedir. Çok yıllık baklagil olan yoncanın bir vejetasyon döngüsü içerisinde birden fazla biçilebilmesi birim alanda ot veriminin yüksek olmasını sağlamıştır (Açıkgöz 2001; Radovic et al. 2009). *M. sativa,* besin değeri oldukça yüksek, uzun ömürlü, yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip olması, morfolojik olarak oldukça çeşitli olması ve *Sinorhizobium meliloti* bakterilerini kullanarak azot fiksasyonu yoluyla atmosferik azotu bağlayarak toprak verimliliğini arttırmasından dolayı sürdürülebilir tarım için en önemli yem bitkisi olduğu düşünülmektedir (Uslu ve Balcı 2020).

1.3. 5-Azasitidin (5-azaC)

5-Azasitidin DNA metilasyon inhibitörü olan sitizinin kimyasal analoğudur ve DNA metiltrensferazı inhibe ederek etki gösterir (Argemi et al. 2009). 5-azaC DNA metilasyonunun gelişim sürecindeki rolünü incelemek için sıklıkla tercih edilir. Yeni sentezlenen DNA sarmalına sitozin nükleotidi yerine 5-azaC rastgele dahil edilir ve sonucunda doza ve maruz kalınan süreye göre DNA metiltransferaz aktivitesinde düşüş gözlemlenebilir. Bu olayı rastgele dizilerde genomun hipometilasyonu takip eder (Christman 2002; Issa and Kantarjian 2009).



Şekil 1.2. 5-azaC' ın kimyasal yapısı (Anonymous 2020)

5-azaC' ın DNA'ya eklenmesi gen ifadesinde değişimlere sebep olur. Bir genin metillenmesi ile ifade edilmesi arasında ters bir ilişki vardır. Yani DNA'da ne kadar az metillenme meydana gelirse genin o kadar yüksek oranda ifadesi anlamına gelmektedir (Li et al. 2015).

1.4. Gen Anlatım Analizi

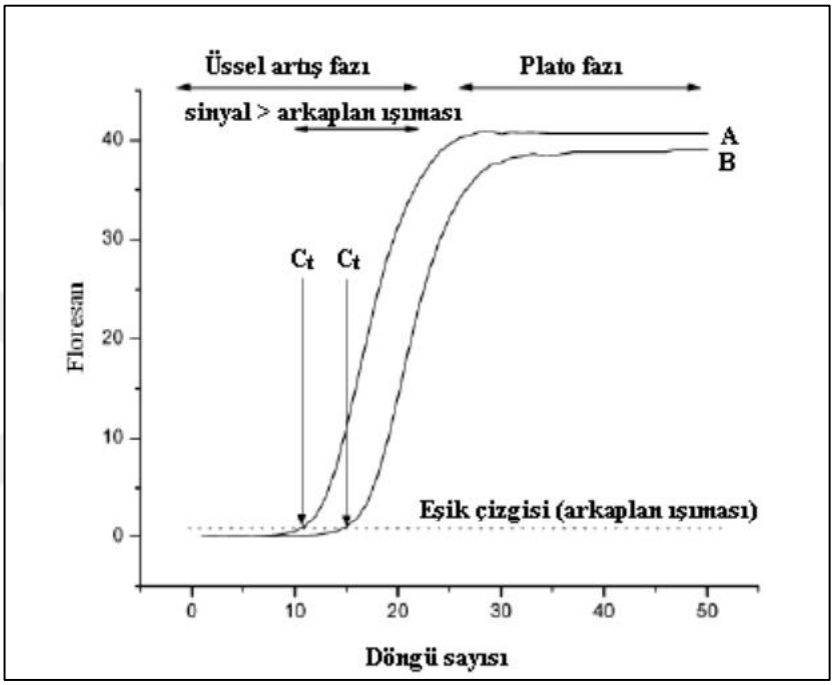
DNA'daki genetik bilginin belirli faktörler aracılığı ile değişimlere uğraması mümkündür. Bu değişimler genlerin anlatımını etkilemektedir. Gen anlatımını belirlemede tek başına veya kombinasyon halinde birkaç yöntem kullanılmaktadır. Bu teknikler differansiyel görüntüleme (differential display; DD), DNA mikrodizilim (DNA microarray) Northern melezleme (Northern blotting), temsili fark analizi (representational difference analysis; RDA) ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) olarak sıralanabilir (Ding and Cantor 2004; Wang et al. 2009). Kullanılan tüm tekniklerin bazı avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Bu sebeple gen anlatımı için seçilecek yöntem yapılacak çalışmaya göre belirlenmelidir.

1.4.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)

Gerçek zamanlı PCR, hedef DNA amplifikasyonunu eş zamanlı gösterebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı bir çoğaltma yöntemidir. Bu yöntemde her döngüden sonra meydana gelen floresan ışıma kaydedilir ve reaksiyon tüpünde oluşan ilk anlamlı artış üssel fazdan itibaren görüntülenebilir (Heid et al. 1996). Gen anlatım analizlerinde problar hedefe özgünlük sağladığı için daha uygun olsa da maliyetleri oldukça yüksektir; bu sebeple genellikle SYBR Green boyası tercih edilir (Lekanne Deprez et al. 2002).

Real-time PCR' da amplifiye edilen hedef DNA miktarı her PCR döngüsü sonucunda belirlenir. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürün miktarı, probların veya boyaların oluşan ürüne bağlanmasıyla meydana gelen floresans emisyonunun izlenmesi ile belirlenir (Kubista et al. 2006). İlk 10-15 PCR döngüsünde, floresan emisyonu yeni başlar ve arka plan emisyonunu aşamaz. Hedef DNA dizisi tarafından indüklenen floresansın arka plan emisyonunu geçtiği döngü, eşik döngüsü (cycle treshold, Ct)

olarak adlandırılır. Bu döngü hedef DNA dizisinin amplifiye edildiği ilk döngüdür. Düşük veya yüksek Ct değerleri başlangıç DNA miktarına bağlıdır. Başlangıç DNA dizisi miktarı ne kadar yüksek olursa, floresan emisyonu o kadar hızlı artar ve Ct değeri o kadar düşük olur. PCR reaksiyonu ilerledikçe ürün miktarı artar ve floresans emisyonu artar. Bir süre sonra PCR bileşenleri sınırlanır ve floresans yoğunlukları hesaplanamaz hale gelir. Reaksiyonda bu aşaması plato aşaması olarak adlandırılır (Wong and Medrano 2005).



Şekil 1.3. RT-PCR'ın genel çalışma prensibi; floresan ışımanın arka plan ışımasını geçmesi sonucu Ct değerine ulaşılması, floresan miktarının sabit değere ulaşmasıyla plato fazına girilmesi, grafikte A örneği B örneğinde daha fazla miktarda ürün içermektedir (Kubista et al. 2006).

Klasik PCR'a göre avantajları mevcuttur. Hızlı ve hassas bir yöntemdir. Klasik PCR'daki gibi sonrasında bir elektroforez gerektirmez ve daha kısa DNA fragmentlerini çoğaltabilmektedir. DNA materyalinin çok az olduğu ve yüksek hassasiyet gereken durumlarda bu yöntem oldukça faydalıdır (Okubara et al. 2005). Gen anlatım analizlerine ek olarak; patojen belirleme, GDO analizleri, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism, SNP), kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da tercih edilen bir yöntemdir (Kubista et al. 2006).

1.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Oksijen elementi bitkiler için oldukça elzemdir ancak eksik indirgenmesi durumunda hücrelere zarar veren reaktif oksijen türleri meydana gelmektedir. Genelini serbest radikallerin oluşturduğu bu reaktif oksijen türleri moleküler oksijenle karşılaştırıldığında bitki için oldukça tehlikeli ürünlerdir. Serbest radikaller son orbitallerin de bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron barındıran non-spesifik bileşiklerdir. Eşlenmemiş elektronları sayesinde reaktiviteleri oldukça fazladır. Hücrelerin oksijen metabolizması esnasında maruz kaldığı birçok stres etmeni oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Başlıca serbest radikaller; tekli oksijen, süperoksit anyonu, hidroksi, peroksi ve alkoksi radikalleridir (Kaur and Kapoor 2001). Serbest radikallerdeki artış oksidatif stres ile sonuçlanır. Oksidatif stres reaktif oksijen türleri ile organizmayı bu zararlılardan koruyan savunma sistemi (antioksidanlar) arasındaki dengenin bozulması sürecidir. Reaktif oksijen türleri (ROT) ile oksidatif stres paralel olarak artar. Artan oksidatif stres ile reaktif oksijen türleri (ROT) hücredeki DNA, protein, karbonhidrat, lipit gibi yapılara zarar vermektedir. Buda birçok olumsuz etkiyle birlikte bitkiyi ölüme kadar götürmektedir (Diplock 1998).

1.5.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksit kararlı bir ROT'tur ve çeşitli stres koşulları altında hücrede sentezi artmaktadır (Ogawa and Iwabuchi 2001). Hidrojen peroksit oluşumu oksijenin iki elektron tarafından enzimatik olarak indirgenmesi veya süperoksit radikallerinin süperoksit dismutaz enzimi ile katalizlenmesi reaksiyonları ile oluşur (Neill et al. 2002).

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (1.1.)$$

Bitki hücrelerinde genellikle bu reaksiyon ile oluşmaktadır. Orta derecede reaktif ve uzun ömürlü bir oksidandır. Yapısında ortaklanmamış elektron içermediği için radikal özelliği yoktur ve reaktif bir tür değildir. Oksitleyici bir tür olarak bilinir, çünkü demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali gibi daha zararlı moleküllerinin öncüsü olarak hareket eder. Bu özelliğinden dolayı hücrede

oluşan, H_2O_2 hızla uzaklaştırılmalıdır. Uzaklaştırma işlemi katalaz ve bazı genel peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirir (Asada 1999).

Hidrojen peroksit hem indirgeyici hem de oksitleyici bir madde olarak işlev görür. Enzimlerin tiol gruplarını oksitleyerek etkisiz hale getirir. Bitkilerde, Calvin döngüsünde görev alan enzimleri inaktive eder. Hidrojen peroksit proteinlerin hem grubundaki demire bağlıdır. Yüksek oksidasyon durumlarında reaksiyona girerek reaktif demir formları oluştururlar. Bu reaktif demir formu kuvvetli oksidasyon etki gösterir (Kaiser 1979).

1.6. Antioksidanlar

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddeler antioksidan olarak adlandırılır (Karabulut ve Gülay 2016).

Antioksidanlar temelde 4 mekanizmaya sahiptirler;

- Temizleme; enzimler ve mikro moleküller bu yolu kullanarak ya oksijen radikallerinin tutunmasını etkilerler ya da oksidanları etkisizleştirirler.
- Baskılama; vitaminler ve flavonoidler bu yolu kullanarak ya oksidanlara hidrojen bağlayarak etkisiz hale getirirler ya da reaksiyon hızlarını yavaşlatırlar.
- Onarma; lipid, protein ve DNA yapılarındaki hasarın onarılmasıdır.
- Zincir koparma; serbest oksijen radikallerine bağlanarak işlevini engellerlerler (Valko et al. 2007).

1.6.1. SOD (Süperoksit Dismutaz)

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi oksidatif strese karşı hücre içinde önemli bir antioksidan savunma hattıdır. SOD, süperoksit radikallerini moleküler oksijen ve hidrojen perokside dönüştüren reaksiyonu katalize eden bir metaloenzimdir (Stephenie et al. 2020). Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi

aracılığı uzaklaştırılmaktadır. Bu sistem hücrede O_2^- seviyesini kontrol altında tutar. SOD, bir α-heliks alt birim ve bir α-heliks ve β- tabaka alt birim olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır.

Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç izoformu mevcuttur:

- Kloroplastik ve sitosolik olan Bakır/çinko SOD (Cu/Zn-SOD)

Bir disülfit bağı ile bağlanmış iki aynı alt birimden oluşur. Alt birim başına birer çinko ve bakır içerir. Enzimin etkinliği için bakır elzem iken çinko; CoH^{2+}, Hg^{2+} , Ca^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle gerçekleşir.

- Mitokondride bulunan Manganez SOD (Mn-SOD)

İki aynı alt birimden oluşur. Alt birim başına birer Manganez içerir.

- Kloroplastik olan Demir SOD (Fe-SOD)

Prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn-SOD'a benzer yapıdadır (Smirnoff 1993; Sen Raychaudhuri et al. 2000; Molassiotis et al. 2006).

1.6.2. POD (Peroksidaz)

Peroksidaz enzimi hidrojen atomu verici bileşikler ile bu atomları alıcı hidrojen peroksit (H_2O_2) bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizlayen bir oksiredüktazdır (Adams 1978; Whintaker and Stauffer 1994). Bu reaksiyonlarda hidrojen verici olarak genellikle Guaiacol (2-metoksifenol) (gayakol) kullanılır (Bernt and Bergmeyer 1974). Hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda, sadece H_2O_2 substratı kullanan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken; hücrenin geri kalan bölümlerinde H_2O_2' den başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Scandalios 2019). POD, hidrojen peroksit aracılığıyla organik ve inorganik

substratların oksidasyonunu katalizlerken; çok sayıda aromatik bileşiklerin (fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi) dehidrojenasyonunu da katalizler. (Pütter and Becker 1987; Huystee 1987). Peroksidazlar, bitkilerin birçok hayati fonksiyonlarında rol alır ve çoğu bitkinin kloroplastlarında sentezlenir. Peroksidaz, bitki sinamil gruplarının lignine polimerizasyonunu katalize eder. Lignin, hücre duvarlarının önemli bir bileşenidir, bitki dokularına mekanik destek sağlar ve ksilemde de bulunur. Bitkileri patojenlerden korumada önemli bir rol oynar. Peroksidaz ayrıca hücre duvarlarını temizler ve fenolik polimerleri biriktirir (Agostini et al. 1997; Duarte-Vázquez et al. 2000). Bitki peroksidazları yaprak, yaralı gövde, kotiledon, çiçek ve saplarında ve epikotillerde, nükleus, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında bulunmaktadır (Banci 1997).

Yüksek bitkiler ferriprotoporfirin POD içerirler. Ferriprotoporfirin peroksidazlar bir prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX 32 (hematin ya da hem) ihtiva ederler (Adams 1978; Whitaker et al. 1994).

1.6.3. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler (polifenoller) bitkilerde doğal olarak bulunurlar. Bitkinin karakteristik özelliklerini etkilemenin yanında çeşitli zararlılara karşı geliştirilen savunma mekanizmasında görev alırlar (Bohn 2014). Aromatik benzen halkasına bir veya birden çok hidroksil (-OH) grubunun bağlanması ile meydana gelirler. Bir adet hidroksil grubu içeren benzen halkası (fenol) fenolik bileşiklerin temel yapısıdır. Diğer fenolik bileşikler bu temel iskeletten türemişlerdir (Hulme 1971; Acar 2006). Fenolik bileşikler flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki grupta incelenirler. Flavonoidler flavanoller, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinler olmak üzere altı alt gruba ayrılırken flavonoid olmayanlar fenolik asitler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar (Shahidi and Yeo 2016). Polifenoller, bitki metabolitlerinin en yaygın gruplarından biridir oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin sağlanmasında önemli role sahiptirler. Polifenoller hücre içerisinde; hücre vakuollerinde konumlanan serbest formdaki fenolikler, glikozitlere veya düşük molekül ağırlıklı bileşenlere esterleşebilen konjuge formdaki fenolikler ve hücre duvarındaki yapılara bağlanan bağlı formdaki fenolikler olmak üzere

üç formda bulunmaktadırlar (Nayak et al. 2015). Polifenollerin antioksidan etkileri, hidrojen veya elektron vericileri olarak yüksek reaktivitelerinden ve polifenollerden türetilen radikalleri elimine etme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Eşlenmemiş elektronları (zincir kırma işlevi) ve geçiş metal iyonlarını (Fenton reaksiyonlarını sonlandırarak) şelatlama yeteneğine sahiptirler (Rice- Evans et al. 1997). Ayrıca fenolik bileşikler lipit metabolizmasını değiştirerek ve zar akışkanlığını azaltarak flavonoidlerin peroksidasyon kinetiklerini değiştirebilmeleridir. Bu değişiklikler serbest radikallerin yayılmasını önleyebilir ve peroksit reaksiyonlarını sınırlayabilir. Antioksidan işlevi olan fenolik bileşikler, lipit peroksidasyonunu katalize edebilen serbest radikal zincir sonlandırıcıları ve redoks-aktif metal iyonlarının bağlayıcıları olarak işlev görebilir (Schroeter et al. 2002). Polifenollerin antioksidan etkilerinin yanında antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antiviral etkileride vardır (Karabulut ve Yemiş 2019).

1.6.4. Prolin

Prolin, proteinleri oluşturan 20 amino asitten biridir. Diğer amino asitler bir birincil amin grubuna sahipken prolinin yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki azot atomuna bağlandığı için, birincil amin ($-NH_2$) grubundan yoksundur. Sahip olduğu azot (N) ikincil amin olarak isimlendirilmektedir. Prolin imminoasit olarak da isimlendirilebilir. Esansiyel olmayan ve glukojenik bir amino asittir. α-ketoglutarat aracılığıyla sentezlenir ve parçalanır. Prolin, ROT üreten reaksiyonlara maruz kaldığında enzimatik olmayan hidroksilasyona uğrayabilmektedirler. ROT' ların hücre zarını tahrip etmesinden kaynaklanan ozmotik dengesizlik prolin birikimi ile engellenir. Prolin birikimi de yıkımın bir indikatörü olarak değerlendirilir. Ninhidrin ile reaksiyonundan pembe renkli bir bileşik oluşturmaktadır (Türkan at al. 2005).

1.6.5. Malondialdehit (MDA)

Serbest radikallerin hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir. İlk olarak yağ asitlerinden hidrojen atomlarının koparılması ile yağ asit zincirleri lipid radikali özelliğine sahip olur. Moleküler oksijen ile reaksiyona giren lipid radikalleri lipid peroksit radikallerini

oluşur. Lipit peroksit radikalleri membrandaki diğer yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerini oluşturur. Açığa çıkan oksijen lipid peroksit ile reaksiyona girerek lipitperoksitlere dönüşür. Lipid peroksitler yıkıldığında biyolojik olarak aktif akrolein, malondialdehit, 4-hidroksinonenal ürünleri açığa çıkmaktadır. Oluşan nihai ürünler ya metabolize edilirler ya da hasarı farklı noktalara yayarlar (Young and Woodside 2001; Ayala et al. 2014).

Malondialdehit (MDA), araşidonik asidin ve daha büyük çoklu doymamış yağ asitlerin enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksidasyonunun toksik etkili son ürünüdür ve MDA oksidatif hasarın önemli biyobelirteçlerinden biridir. 1960'lardan beri oksidatif stres ölçümleri için sıklıkla kullanılmaktadır. İkiden fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin otooksidasyonu sırasında serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın ana kaynağını oluşturmaktadır. Lipid peroksidasyonu çeşitli şekillerde hücre hasarına neden olabilmektedir. Hücre membranında işlev bozukluğu, serbest radikallerin ve sitotoksik aldehitlerin olumsuz etkisi bu olaya örnek verilebilmektedir (Türkan et al. 2005). Literatür taramalarında farklı stres koşullarında bitkilerde MDA içeriğinde artma olduğu gösteren çalışmalar bulunmuştur (Qiu et al. 2014; Kaya ve Doganlar 2016). Bazı çalışmalar ise MDA'nın gen ekspresyonunu düzenleyici ve haberci olarak çalıştığını göstermiştir (Wang et al. 2014).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Osorio-Montalvo et al. (2018), Bir DNA metilasyon inhibitörü olan 5-azaC'ın somatik embriyogenezdeki rolünü çalışmışlardır. DNA metilasyonunu gen ifadesine olan etkisinden dolayı somatik embriyogenez (SE) sonucunu etkileyen başlıca faktörlerden biri olarak tanımlamışlar ve hipometilasyon ve hipermetilasyon arasında kurulan dengenin, SE'nin başarısında önemli bir role sahip olduğunu aktarmışlardır. Çalışma sonucunda SE protokolleri sırasında 5-azaC kullanımının DNA metilasyon seviyesini dengeleyebileceği ve bitki hücrelerinin embriyojenik yetkinlik kazanmasında etkili rol oynadığını savunmuşlardır.

Chen et al. (2020), 5-azaC ile muamele edilen Longan (*Dimocarpus longan* Lour) bitkisisin erken SE mekanizmasını çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda 5-azaC muamelesinin longan bitkisinde erken SE sırasında global DNA metilasyon seviyesinde düşüşe yol açarken erken SE gelişimini olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir.

Kartal ve Şayak (2020), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nin kampüsünden toplanan materyalleri kullanılarak yoncanın antioksidan özelliği üzerine çalışmışlardır. *M. sativa* bitkisinin gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının total fenolik ve flavonoid miktarları belirlenmiştir. Toplam fenolik içeriği en yüksek bitki gövdesinde 274,752 mg GAE/g kuru ekstre olarak bulurken en düşük bitkinin çiçek kısmında 58.094 mg GAE/g kuru ekstre olarak bulunmuştur. Toplam flavonoid içeriği en düşük kateşin (50,233 mg KE/g kuru ekstre) ve kuartesin (204,470 QE/g kuru ekstre) eş değerine göre bakılarak bitkinin gövde kısımlarındayken en yüksek bitkinin yaprak kısmında bulunmuştur. Bu sonuçlara göre yoncanın antioksidan içeriğinin oldukça yüksek olduğu kanısına varmışlardır.

Luan et al. (2020), embriyonik olan ve embriyonik olmayan ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) bitki kalluslarında *SERK1* ifade seviyesini çalışmışlardır. Embriyonik olmayan kalluslar için; farklı zamanlarda (3, 5, 7 ve 9 gün) farklı 5-azaC (0µM, 0,5µM, 5 µM, 50µM, 100 µM) konsantrasyonları ile ananas bitkisini muamele etmişler ve *SERK1* ifade seviyeleri RT-qPCR ile analiz edilmiştir. 3 günlük ve 5 günlük 0,5µM 5-azaC konsantrasyonun *SERK1* ekspresyonunu indükleyemeyeceğini

bulmuşlardır. En yüksek ekspresyon seviyesi 5. Gün 5 µM 5-azaC muamelesinde gözlemlenmiştir. 50µM den sonraki konsantrasyonlarda gen ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Embriyonik kalluslarda ise en yüksek *AcSERK1'in* ifade seviyesi 5 µM 5-azaC ile muamele edilen kalluslarda 30. günde gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda 5-azaC uygulamasının metilasyonu doğrudan etkileyerek ananasta somatik embriyoların sayısını etkilediğini rapor etmişlerdir.

Osorio-Montalvo et al. (2020), *Cocos nucifera* L. bitkisinde farklı maruziyet süresi ve farklı konsantrasyonlarda 5-azaC muamelesinin SE mekanizmasına etkisi ve dolayısıyla SE' i indükleyen bazı genlerin (*SERK*) ifade seviyeleri üzerine çalışmışlardır. 3. gün kontrol gruplarında (5-azaC içermeyen) erken somatik embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir. 15 µM ve 20 µM 5-azaC dozlarının DNA metilasyon seviyesini azaltarak *SERK* ifade seviyelerini düzenlediğini ve SE gelişimini olumlu yönde etkilediğini tespit etmişlerdir. Çalışmaya göre; *SERK* geni, 30. günde 15 µM için 2,2 kat ve 20 µM 5-azaC muamelesi için ise 2,7 kat artış göstermiştir. 90 günde ise 15 µM ve 20 µM 5-azaC konsantrasyonlarında önemli ölçüde azalma gözlemlemişlerdir.

Zeng et al. (2020), Huş ağacı (*Betula platyphylla Sukaczev*) bitkisi DNA metilasyon inhibitörü olarak görev yapan 5-azaC ile muamele edilerek DNA metilasyon seviyesi ve antioksidan savunma mekanizmasında görev alan enzimlerin aktivasyon seviyesi üzerine çalışılmışlardır. Örnekler farklı 5-azaC konsantrasyonlarına 6, 12, 24, 48, 72, 120 ve 168 saat sürelerle maruz bırakılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre 0.1 mM 5-azaC ile 6 saatlik muamele sonrası SOD aktivitesi, kontrolden 1,84 kat daha yüksekken 24 ve 72. saatte kontrolden önemli ölçüde düşüktür. Aynı konsantrasyonlardaki POD aktivitesinde ise 168. saatte kontrole göre yaklaşık 1,2 kat daha yüksekken 24, 48 ve 120. saatte kontrolden önemli ölçüde düşük olduğu rapor edilmiştir. DNA metilasyon seviyesinde ise 5-azaC'a maruz kalma süresine göre kontrol gruplarından daha düşük metillenme olduğunu bulmuşlardır.

Li et al. (2021), Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) bitkisinin tuz stresinden dolayı DNA metilasyon seviyesinde meydana gelen artışı 5-azaC muamelesiyle azaltmayı amaçlamışlardır. Çalışmaya göre tuz stresi kenaf fidesinin büyümesini engellemiş ve

DNA metilasyon seviyelerini arttırmış. 5-azaC muamelesi ile MDA içeriğini azaltarak antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmış ve metilasyon seviyesini düşürmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında yararlanılan cihazlar ve modelleri

Cihaz	Model
Hassas Terazi	Shimadzu ATX224
İklimlendirme Kabini	Wisd Thermostable GC-450
Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST3100F
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ MultiskanGO
Steril Kabin	ESCO Nordicsafe™
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
PCR	Longgene A600
RT-qPCR	Rotor-Gene Q

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Çalışma süresince kullanılan çözeltilerin kullanım alanları ve hazırlanma protokolleri aşağıda belirtilmiştir.

- *22 % 'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl) Çözeltisi (100mL için);* Tohum sterilizasyonu aşamasında kullanılmıştır. 22mL Sodyum hipoklorit üzerine dH_2O ile son hacim 100mL'ye tamamlanmıştır.

- *Makro Element Çözeltisi (1.000mL için);* MS (Murashige and Skoog 1962) besiyeri için kullanılmıştır. 33g Amonyum Nitrat (NH_4NO_3), 38g Potasyum Nitrat (KNO_3), 8,792 g Kalsiyum Klorid ($CaCl_2$), 7,4g Magnezyum Sülfat Heptahidrat ($MgSO_4\,7H_2O$) ve 3,4g Monopotasyum Fosfat (KH_2PO_4) 1000mL dH_2O içerisinde çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ardından +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *Mikro Element Çözeltisi (1.000mL için);* MS besiyeri için kullanılmıştır. 0,62g Borik Asit (H_3BO_3), 1,69g Manganaz Sülfat Monohidrat ($MnSO_4H_2O$), 0,083 g

Potasyum İyodür (KI), 0,86 g Çinko Sülfat Heptahidrat ($ZnSO_4 7H_2O$), 0,025 g Sodyum Molibdat Dihidrat ($Na_2MoO_4 2H_2O$), 0,0025 g Bakır (II) Sülfat Pentahidrat ($CuSO_4 5H_2O$) ve 0,0025 g Kobalt (II) Klorür Hekzahidrat ($CoCl_2 6H_2O$) 1000mL dH_2O içerisinde çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ardından +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *Demir Şelat Çözeltisi (1.000mL için);* MS besiyeri için kullanılmıştır. 2,78 g Demir (II) Sülfat ($FeSO_4$) ve 3,726 g EDTA Disodyum Tuzu($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$) 1.000mL dH_2O içerisinde çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ardından +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *MS Vitamin Çözeltisi (1.000mL için);* MS besiyeri için kullanılmıştır. 0,2 g Glisin($C_2H_5NO_2$), 10 g Myo-inositol ($C_6H_{12}O_6$), 0,05 g Nikotinik Asit ($C_6H_5NO_2$), 0,05 g Pridoksin Hidroklorür ($C_8H_{12}ClNO_3$) ve 0,01 g Tiamin Hidroklorür ($C_{12}H_{17}N_4OS$) 1.000mL dH_2O içerisinde çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ardından +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *70%'de Etanol (1.000mL için);* RNA izolasyonu ve sterilizasyonda kullanılmıştır. 300 mL Etil Alkol dH_2O ile 1.000mL ye tamamlanmıştır.

- *Fosfat Tamponu (300mL için);* POD, SOD, Total Fenolik ve Total Protein aktivite tayininde kullanılmıştır. 4,08 g 0,1M Monopotasyum Fosfat (KH_2PO_4), 0,90 g 3%'lük PVP ve 0,087 g 1mM EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) 200 mL dH_2O içerisinde çözülmüştür. pH 6,75'e ayarlandıktan sonra son hacim 300 mL'ye tamamlanıp + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- *POD Çözeltisi (300mL için);* POD aktivite tayininde kullanılmıştır**.** 4,26 g 0.1M Disodyum Fosfat(Na_2HPO_4) tartılarak 200 mL dH_2O içerisinde çözülmüştür. pH 5.5'e ayarlandıktan sonra üzerine 180µL Etilen Gualikol ($C_2H_6O_2$) ve 126 µL Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ilave edilmiştir ve dH_2O ile son hacim 300 mL'ye tamamlanıp + 4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

- *SOD Çözeltisi (300 mL için);* 2,61 g 50mM Monopotasyum Fosfat (KH_2PO_4) tartılarak 200 mL dH_2O içerisinde çözülmüştür. pH 7.8'e ayarlandıktan sonra üzerine 0,58 g 13mM Metiyonin ($C_5H_{11}NO_2S$), 0,018g 75mM NBT (Nitro Mavi Tetrazolyum Klorür, $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$) ve 0,0087 g 0.1mM EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) ilave edilmiştir ve dH_2O ile son hacim 300 mL'ye tamamlanıp + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- *0,1%'lik TCA (Trikloroasetik asit) Çözeltisi (100mL için);* MDA aktivite tayininde kullanılmıştır. 100 mL dH_2O içerisine 0,1 gram TCA eklenmiştir ve TCA tam olarak çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *20%'lik TCA (Trikloroasetik asit) Çözeltisi (100mL için);* MDA (Malondialdehit) aktivite tayininde kullanılmıştır. 100 mL dH_2O içerisine 20 gram TCA eklenmiştir ve TCA tam olarak çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *0,5%'lik TBA (Tioborbütirik asit) Çözeltisi (100mL için);* MDA aktivite tayininde kullanılmıştır. 100 mL dH_2O içerisine 0,5 gram TBA eklenmiştir ve TBA tam olarak çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *KI (Potasyum İyodür) Çözeltisi (50mL için);* H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) aktivite tayininde kullanılmıştır. 40mL dH_2O içerisine 8,3 g KI eklenmiş ve KI tam olarak çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından son hacim 50 mL' ye tamamlanmıştır.

- *KH_2PO_4 (Monopotasyum Fosfat) Çözeltisi (200 mL için);* H_2O_2 aktivitesi tayininde kullanılmıştır. 100mL dH_2O içerisine 0,136 g KH_2PO_4 eklenmiştir ve KH_2PO_4 tam olarak çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından pH 7'ye ayranmış ve son hacim 200 mL' ye tamamlanmıştır.

- *3%'lük Sülfosalisilik Çözeltisi (50 mL için);* Prolin aktivite tayininde kullanılmıştır. 1,5 mL Sülfosalisilik üzerine dH_2O ile son hacim 50 mL' ye tamamlanmıştır.

- *DNSA (3,5-Dinitrosalisilik Asit) Çözeltisi (100mL için);* DNSA (3,5-Dinitrosalisilik Asit) aktive tayininde kullanılmıştır. 1 g DNSA 20 mL 2M Sodyum Hidroksit (NaOH) ile 45 dakika çalkalanmıştır. Üzerine 30 g Sodyum Potasyum Tartarat ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2$) ve 50 mL dH_2O karışımı eklenmiştir. Son hacim dH_2O ile 100 mL ye tamamlanarak aliminyum folyo içerisinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- *2,5 N HCl (Hidroklorik Asit) Çözeltisi (35 mL için);* DNSA aktive tayininde kullanılmıştır. 7,25 mL HCl üzerine 27,75 mL dH_2O eklenerek hazırlanmıştır.

- *20%'lik Na_2CO_3 (Sodyum Karbonat) Çözeltisi (100mL için);* Total Fenolik aktive tayininde kullanılmıştır. 20g Na_2CO_3 70mL dH_2O ile iyice çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ardından son hacim 100mL ye tamamlanmıştır.

3.3. Bitki Materyali ve Kallus Oluşumu

Çalışmada *M. sativa* tohumları kullanılmıştır.

- Tohumlar 22 %'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 20 dakika 300 rpm karıştırıcıda sterilize edilmiştir.

- Steril kabinde tohumlar ez az 3 defa dH_2O ile yıkanmıştır.

- Standart MS ortamında (Murashige and Skoog 1962) her bir petriye yaklaşık 30 yonca tohumu ekilerek 70 %' lik nemde, 16/8 ışık/karanlık foto periyoduna sahip bir iklimlendirme kabininde 4 hafta beyaz floresan ışıkta bekletilerek rejenere olması sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. Standart MS besiyeri için kullanılan maddeler ve miktarları

Kullanılan Madde	**Miktar**
Makro Elementler	50 mL
Mikro Elementler	1.000 mL
Demir Şelat	10 mL
Şeker	30 g
Agar	8 g

Agar hariç tüm kimyasallar 1.000 mL'lik bir erlene aktarılmıştır. Ardından kimyasal maddelerin üzerine yaklaşık 900mL dH_20 eklenerek elektromanyetik karıştırıcıda 500 rpm de karıştırılarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. Son hacim dH_20 ile 1.000 mL'ye tamamlandıktan sonra agar ilave edilmiştir. Daha sonra 121°C ayarlı otoklavda 1,5 saat steril edilmiştir.

1.000 mL besiyerine steril kabin içerisinde;

C Vitamini=1.000 µL

Ms Vitamin=1.000 µL filtreden geçirilerek eklenmişitir.

1 gece steril kabinde bekletilen Standart MS besiyerine steril tohumlar ekilerek 4 hafta rejenerasyon oluşumu beklenmiştir.

Rejenere olan tohumların yaprak kısmı bistüri yardımıyla kesilerek steril ekim kabininde kinetin ve 2,4-D'li MS ortamına aktarılmış ve 4 hafta karanlıkta bekletilerek kallus oluşumu sağlanmıştır.

Çizelge 3.3. MS besiyeri (Kinetin ve 2,4-D) için kullanılan maddeler ve miktarları

Kullanılan Madde	**Miktarı**
Makro Elementler	50 mL
Mikro Elementler	1.000 mL
Demir Şelat	10 mL
Şeker	30 g
Agar	8 g
Kinetin	0.0125mg\mL
2,4-Diklorofenoksiasetik asittir (2,4-D)	1mg\Ml

Agar, kinetin ve 2,4-D hariç tüm kimyasallar 1.000 mL'lik bir erlene aktarılmıştır. Ardından kimyasal maddelerin üzerine yaklaşık 900mL dH_20 eklenerek elektromanyetik karıştırıcıda 500 rpm de karıştırılarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. Son hacim dH_20 ile 1.000 mL'ye tamamlandıktan sonra agar ilave edilmiştir. Daha sonra 121°C ayarlı otoklavda 1,5 saat steril edilmiştir.

1.000 mL besiyerine steril kabin içerisinde;

C Vitamini=1.000 µL
Ms Vitamin=1.000 µL
Kinetin= 0.0125mg\mL
2,4-D=1mg\mL filtreden geçirilerek eklenmişitir.

1 gece steril kabinde bekletilen MS besiyerine steril kabinde rejenere olmuş tohum yaprakları aktarılarak 4 hafta karanlıkta kallus oluşumu beklenmiştir.

3.4. Kalluslara Azasitidin (5-azaC) Uygulaması

Oluşan kalluslar Çizelge 3.4. de verilen farklı 5-azaC konsantrasyona sahip yeni besiyeri ortamına aktarılmıştır.

Çizelge 3.4. Farklı 5-azaC konsantrasyonları uygulaması

Kontrol (250 mL Besiyeri için)	0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D
3µL 5-azaC (250 mL Besiyeri için)	0.0125mg\mL kinetin+1mg\mL 2,4-D+2,5µM 3µL 5-Azac
6µL 5-azaC (250 mL Besiyeri için)	0.0125mg\mL kinetin 1mg\mL 2,4-D+5µM 6µL 5-Azac

Çizelge 3.3. gösterilen MS besiyeri (Kinetin ve 2,4-D) içerisine Çizelge 3.4 de verilen farklı 5-azaC konsantrasyonları eklenerek besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 1 gece steril kabinde bekletilmiştir. Kalluslar 5-azaC içeren besiyerine steril kabinde aktarılmıştır.

7, 14 ve 21 günlük bekleme süresine tabii tutulmuştur. Her konsantrasyon ve gün için 3 tekrar yapılmıştır.

3.5. Gen Ekspresyonu Tayini

3.5.1. RNA izolasyonu

- Hassas terazi yardımı ile 0,3 gram tartılan kallus dokusu sıvı azot kullanılarak ezilmiştir.
- Üzerine 1mL trizol eklenerek homojenize edilmiştir. 25°C'de 5 dakika bekletilmiştir.
- 200 µL kloroform eklenerek 3 dakika 25°C'de bekletilmiştir.
- 12.000 rpm +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Oluşan üç faz sırası ile en üstte RNA ortada DNA+protein ve en altta organik baz şeklindedir.
- Süpernatant (RNA) kısmı alınmıştır. Yaklaşık 250 µL RNA üzerine 250 µL 25 °C'de izopropanol eklenerek 5-10 kez alt üst yapılmıştır.
- Ardından 10 dakika 25° C de bekletilmiştir.
- +4°C'de 12.000 rpm de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant atılarak oluşan pellet 1mL -20°C 70 %'lik etanol ile alt üst edilmiştir.

- 7.500 rpm de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Daha sonra pellet alkolden dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Pellet tamamen alkolden arındırıldıktan sonra 40 µL RNAaz free saf suda çözündürülmüştür.

RNA konsantrasyonunu belirlemek için izole edilen RNA Nanodrop cihazında 260/280 nm ölçülmüş elde edilen sonuçlar 500 ng/µl 'ye bölünmüştür.

3.5.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi NucleoGene cDNA Syntnesis kiti ile yapılmıştır.

Çizelge 3.5. cDNA sentezi için konsantrasyonlara göre belirlenen RNA ve dH_2O miktarları.

Numune	**RNA Miktarı**	**dH_2O**
7.gün Kontrol	3,25 µL	12,75 µL
7.gün 3µL 5-azaC	4,73 µL	11,27 µL
7. gün 6µL 5-azaC	14,48 µL	1,52 µL
14.gün Kontrol	0,87 µL	15,13 µL
14.gün 3µL 5-azaC	3,68 µL	12,32 µL
14.gün 6µL 5-azaC	1,93 µL	14,07 µL
21.gün Kontrol	2,28 µL	13,72 µL
21.gün 3µL 5-azaC	0,54 µL	15,46 µL
21.gün 6µL 5-azaC	2,61 µL	13,39 µL

Her numune için 3 tekrarlı olacak şekilde;

4 µl NucleoGene cDNA mix, değişen oranda dH_2O ve RNA (Çizelge 3.5.) kullanılarak her tüp için son hacim 20 µL ye tamamlanmıştır. PCR koşulları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. cDNA sentezi için PCR koşulları

İşlem	**Sıcaklık**	**Süre**
Denatürasyon	25°C	5 dk
Bağlanma	42°C	30 dk
Uzama	85°C	5 dk
	4°C	∞

PCR işleminin ardından her tüpe 30 µL dH_2O eklenmiştir.

3.5.3. RT-qPCR

Eva Green Kiti kullanılarak RT-qPCR yapılmıştır.

Çizelge 3.7. RT-qPCR için kullanılan primerler

Primerler	**Baz Dizisi 5′-3′**
WEE1-F	TCCGATTGAGGAAGGAGATG
WEE1-R	AATGAATGACCAGGCAGGAG
MtSERK1-F	GTTGTGGGGATTTTGGATT
MtSERK1-R	AGTCGAGCAAGGTCAAAAGC
Mt18S-F	TGACGGAGAATTAGGGTTCG
Mt18S-R	CCTCCAATGGATCCTCCGTTA

Her numune için 3 tekrarlı olacak şekilde;

WEE1 için;

2 µL master mix

0,2 µL *WEE1* Forward primer (TCCGATTGAGGAAGGAGATG)

0,2 µL *WEE1* Reverse primer (AATGAATGACCAGGCAGGAG)

2 µL cDNA

5,6 µL dH_2O

MtSERK1 için;

2 µL master mix

0,2 µL *SERK1* Forwad primer (GTTGTGGGGATTTTGGATT)

0,2 µL *SERK1* Reverse primer (AGTCGAGCAAGGTCAAAAGC)

2 µL cDNA

5,6 µL dH_2O

Mt18S (Kontrol için kullanılmıştır) için;

2 µL master mix
0,2 µL *Mt18S* Forward primer (TGACGGAGAATTAGGGTTCG)
0,2 µL *Mt18S* Reverse primer (CCTCCAATGGATCCTCCGTTA)
2 µL cDNA
5,6 µL dH_2O kullanılarak PCR tüpleri hazırlanmıştır.

Tüm reaksiyonlar 10µl total hacimde gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR işlemlerinde kullanılan primerlerin en uygun bağlanma sıcaklıkları (Tm) ise daha önce yapılan çalışmalardaki tekrarlı ön denemeler sonucunda belirlenmiştir. RT-qPCR koşulları Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Gen ifade seviyesi için RT-qPCR koşulları

İşlem	Sıcaklık	Süre	
Ön Denatürasyon	95 °C	15 dk	
Denatürasyon	95 °C	15 sn	40 Kez
Bağlanma	55°C	30 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	

3.6. Antioksidan Aktivite Tayini

3.6.1. POD (Peroksidaz) aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,2 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine buz üzerinde muhafaza edilen fosfat tamponundan (pH: 6.75) 2 mL koyularak homojenize edilmiştir.
- 2 mL eppendorf tüplerde +4°C 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alınmıştır.

- Her numune için 3 tekrarlı olacak şekilde küvete 3 mL POD çözeltisi ve 100 µL numune eklenerek 5 dakika bekletilmiştir. Ardından nanodropta 470 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Heath and Packer 1968).

Kör için 3mL POD çözeltisi kullanılmıştır.

3.6.2. SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,2 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine buz üzerinde muhafaza edilen fosfat tamponundan (pH: 6.75) 2 mL koyularak homojenize edilmiştir.
- 2 mL eppendorf tüplerde +4°C 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alınmıştır.
- Her numune için 3 tekrarlı olacak şekilde küvete 2,84 mL SOD çözeltisi, 100 µL riboflavin (B_2) ve 100 µL numune eklenerek 15 dakika bekletilmiştir. Ardından nanodropta 560 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Velikova et al. 2000).

Kör için 2,84 mL SOD çözeltisi ve 100 µL riboflavin kullanılmıştır.

3.6.3. MDA (melonaldehit) aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,2 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine 2 mL 0,1 %'lik TCA (Trikloroasetik asit) koyularak homojenize edilmiştir.
- 2 mL eppendorf tüplerde +4°C 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alınmıştır.
- Her numune için 3 tekrarlı olacak şekilde cam tüplere 1 mL 20% TCA (Trikloroasetik asit), 1mL 0,5 % TBA (Tiyobarbitürik asit) ve 1 mL numune eklenmiştir.

- 98°C su banyosunda 40 dakika bekletilmiştir. Ardından örnekler buz üzerine alınmıştır.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde 100 µL alınıp 96 well plate'e aktarılarak nanodropta 562 nm ve 600 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Heath and Packer 1968; Jaleel et al. 2008).

Kör için 1 mL 20% TCA, 1mL 0,1% TCA ve 1mL 0.5% TBA kullanılmıştır.

3.6.4. Hidrojen peroksit (H_2O_2) aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,2 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine 2 mL 0,1 %'lik TCA (Trikloroasetik asit) koyularak homojenize edilmiştir.
- 2 mL eppendorf tüplerde +4°C 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alınmıştır.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde süpernatanttan 800 µL alınarak 800 µL KH_2PO_4 ve 1.600 µL KI karışımı bulunan tüplere ilave edilmiştir.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde 200 µL alınıp 96 well plate'e aktarılarak nanodropta 390 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Sergiev et al. 1997; Velikova et al. 2000).

Kör için 800 µL KH_2PO_4 ve 1.600 µL KI kullanılmıştır.

3.6.5. Prolin aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,1 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine 10 mL 3 %' lük sülfosalisilik asit koyularak homojenize edilmiştir.
- 6.000 rpm 'de 10 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alınmıştır.
- 2 mL süpernatantın üzerine 1mL asit ninhidrin ve 1mL asetik asit (CH_3COOH) ilave edilmiştir.
- 100°C su banyosunda 1 saat bekletilmiş ardından buz üzerine alınmıştır.

- Örneklerin üzerine 4 mL toluen koyulmuştur.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde 100 µL alınıp cam küvetlere aktarılarak 520 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Velikova et al. 2000).

Kör için 1 mL asit ninhidrin, 1mL asetik asit ve 2 mL sülfosalislik asit kullanılmıştır.

3.6.6. DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,1 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine 5 mL 2.5 N HCl (+4°C) koyularak homojenize edilmiştir.
- 9.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınarak cam tüpe aktarılmıştır.
- 2 mL süpernatantın üzerine 2 mL DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) koyulmuştur.
- 90°C su banyosuna alınarak 20 dakika bekletilmiş ardından buz üzerine alınmıştır.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde 100 µL alınıp 96 well plate'e aktarılarak nanodropta 550 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Velikova et al. 2000).

Kör için 2 mL DNSA ve 2 mL 2,5 N HCl kullanılmıştır.

3.6.7. Total fenolik aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,5 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine buz üzerinde muhafaza edilen 1 mL fosfat tamponu (pH: 6,75) eklenerek homojenize edilmiştir.
- 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant alınmıştır.
- Cam tüplere 125 µL Folin, 250 µL 20 %'lik Na_2CO_3, 25 µL numune koyulup üzeri dH_2O ile 2500 µL'ye tamamlanmıştır.

- Su banyosunda 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde 100 µL alınıp 96 well plate'e aktarılarak nanodropta 765 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Velikova et al. 2000).

Kör için 125 µL Folin, 250 µL 20 %'lik $Na_2 CO_3$ kullanılmıştır.

3.6.8. Total protein aktivitesi

- Muamele edilen her doz için 3 tekrarlı şekilde 0,2 g yonca kallusları tartılarak sıvı azot ile ezilmiştir.
- Üzerine buz üzerinde muhafaza edilen fosfat tamponundan (pH: 6,75) 2 mL koyularak homojenize edilmiştir.
- 2 mL eppendorf tüplerde +4°C 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak supernatant kısmı alınmıştır.
- Her numune için üç tekrarlı olacak şekilde 15 mL bişinkonik asit+ 300 µL bakır sülfattan oluşan çözeltiden 200 µL alınarak 96 well plate'e aktarılmıştır.
- Üzerine 20 µL numune eklenerek su banyosunda 60'de 15 dakika bekletilmiştir (Mor renk oluşumu gözlemlenmiştir).
- Nanodropta 562 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır (Ye et al. 2003; Erdal 2012)

Kör için 15 mL bişinkonik asit ve 300 µL bakır sülfattan oluşan çözeltiden 200 µL kullanılmıştır.

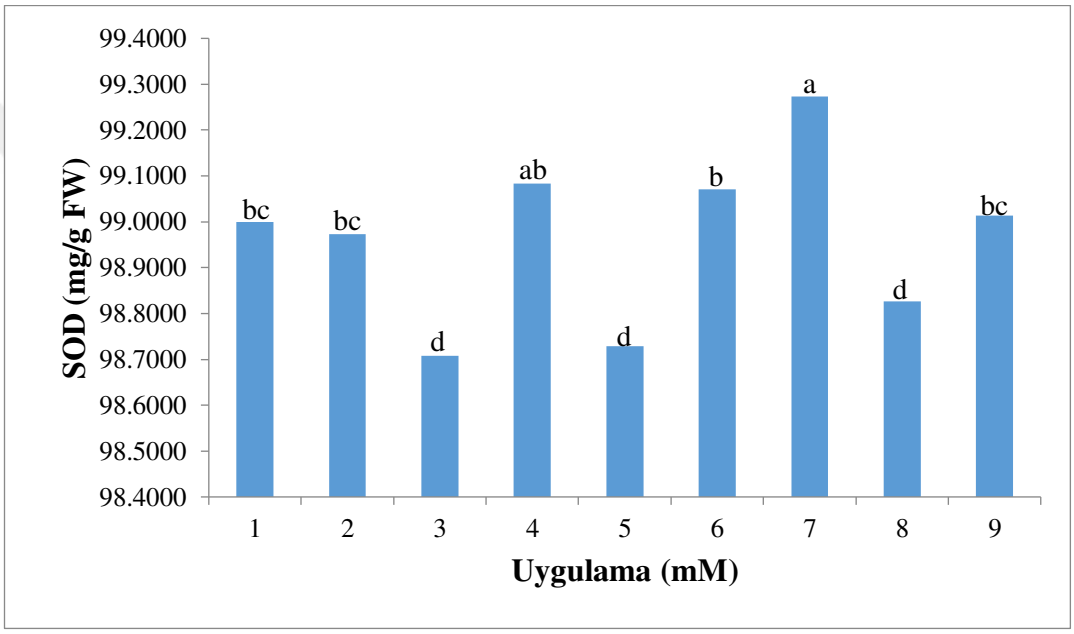
3.7. İstatiksel Analiz

Çalışmadaki tüm istatistiksel analizler, SPSS 20.0 (IBM Crop., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

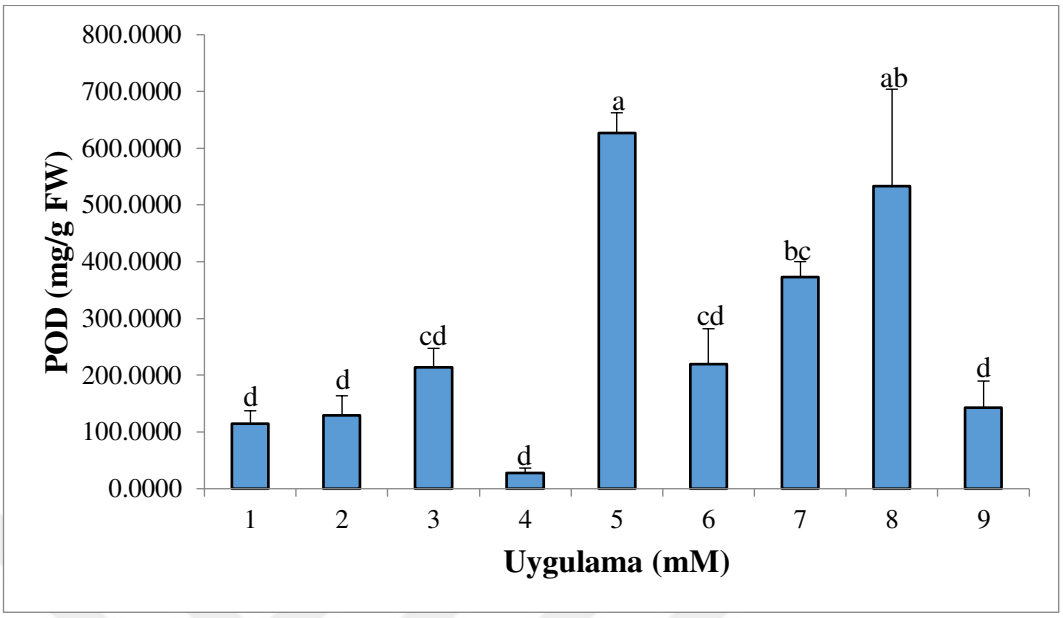
Çalışmada kullanılan *M. sativa* kallusları farklı doz ve sürelerde (7,14 ve 21 gün) bir DNA metilasyon inhibitörü olan 5-azaC' a maruz bırakılmıştır. Kalluslardaki *SERK1* ve *WEE1* genlerinin ifade seviyeleri ve antioksidan mekanizmasında görev alan maddelerin analiz sonuçlarına ulaşılmıştır.

4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi



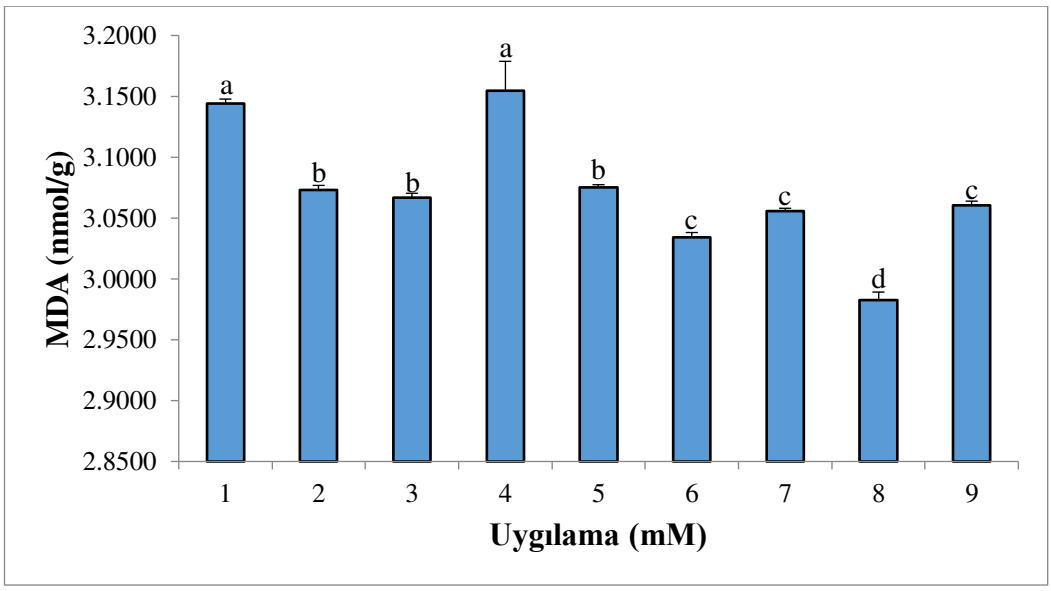
Şekil 4.1. M. sativa bitkisinde 5-azaC uygulamasının SOD aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

4.2. POD (Peroksidaz) Aktivitesi



Şekil 4.2. M. sativa bitkisinde 5-azaC uygulamasının POD aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

4.3. MDA (Malondialdehit) Aktivitesi



Şekil 4.3. M. sativa bitkisinde 5-azaC uygulamasının MDA aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

Çizelge 4.1. 5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen SOD, POD ve MDA içeriklerindeki değişimler.

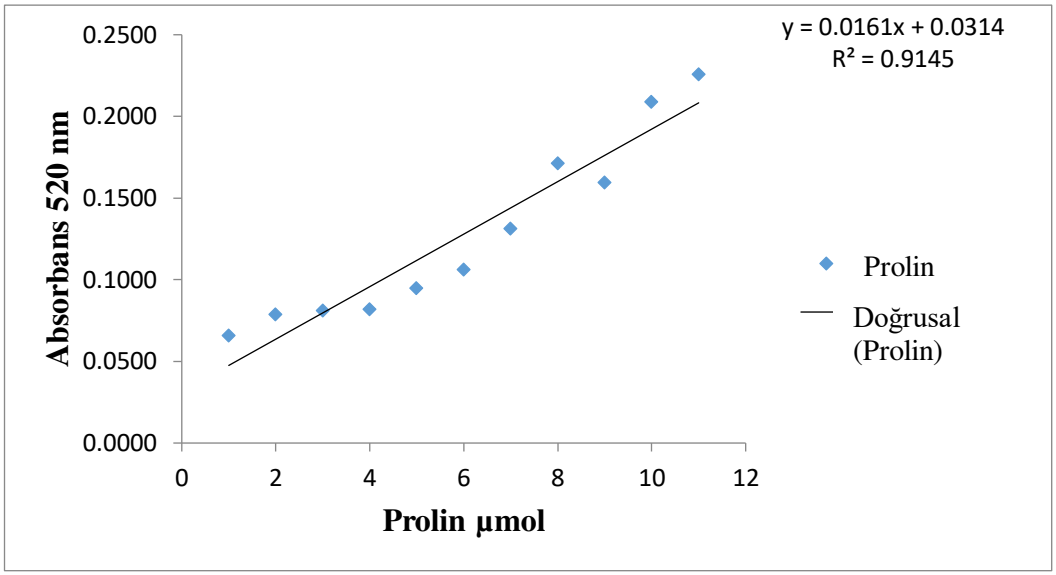
Uygulamalar	SOD (mg/g FW)	POD (mg/g FW)	MDA (nmol/g)
1	98,99±0,03^{bc}	114,84±22,48^{d}	3,14±0,003^{a}
2	98,97± 0,02^{bc}	129,62±34,16^{d}	3,07±0,003^{b}
3	98,70±0,10^{d}	214,22±33,15^{cd}	3,06±0,003^{b}
4	99,08±0,01^{ab}	127,88±8,56^{d}	3,15±0,023^{a}
5	98,72±0,11^{d}	627,11±35,34^{a}	3,07±0,002^{b}
6	99,07±0,09^{b}	219,27±62,58^{cd}	3,03±0,003^{c}
7	99,27±0,04^{a}	373,02±27,14^{bc}	3,05±0,002^{c}
8	98,82±0,08^{d}	532,86±171,18^{ab}	2,98±0,006^{d}
9	99,01±0,05^{bc}	143,14±46,63^{d}	3,06±0,003^{c}

1: 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC

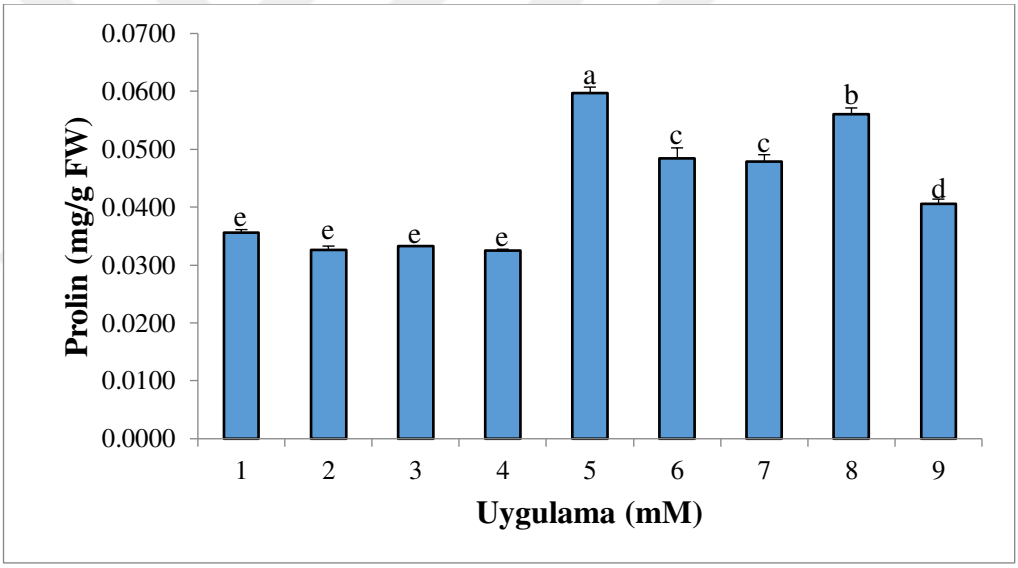
5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen SOD, POD ve MDA içeriklerindeki değişimler verilmiştir (Çizelge 4.1.). SOD analiz sonucuna göre, 7., 14. ve 21.gün kontrolleriyle kıyaslandığında en iyi sonuçları 3 µL 5-azaC vermiştir. POD analiz sonucuna göre 7. ve 14. gün de konsantrasyon artıkça hasar artmıştır. 21. günde ise 6 µL 5-azaC'de en iyi sonucu vermiştir. MDA analiz sonucuna göre 7. ve 14. günde konsantrasyon artıkça hücrede meydana gelen hasar azalmıştır. Fakat en iyi sonucu 21. günde 3 µL 5-azaC vermiştir (Çizelge 4.1).

4.4. Prolin Analizi

Prolin aktivitesinin yorumlanması Şekil 4.4.'te verilen prolin standart grafiği referans alınarak yapılmıştır.



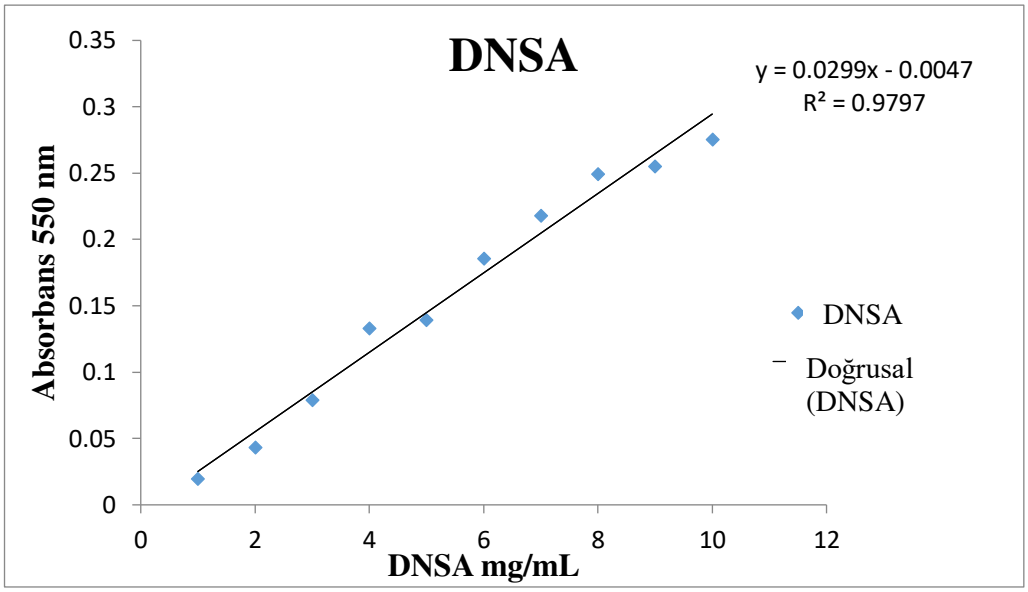
Şekil 4.4: Prolin standart grafiği



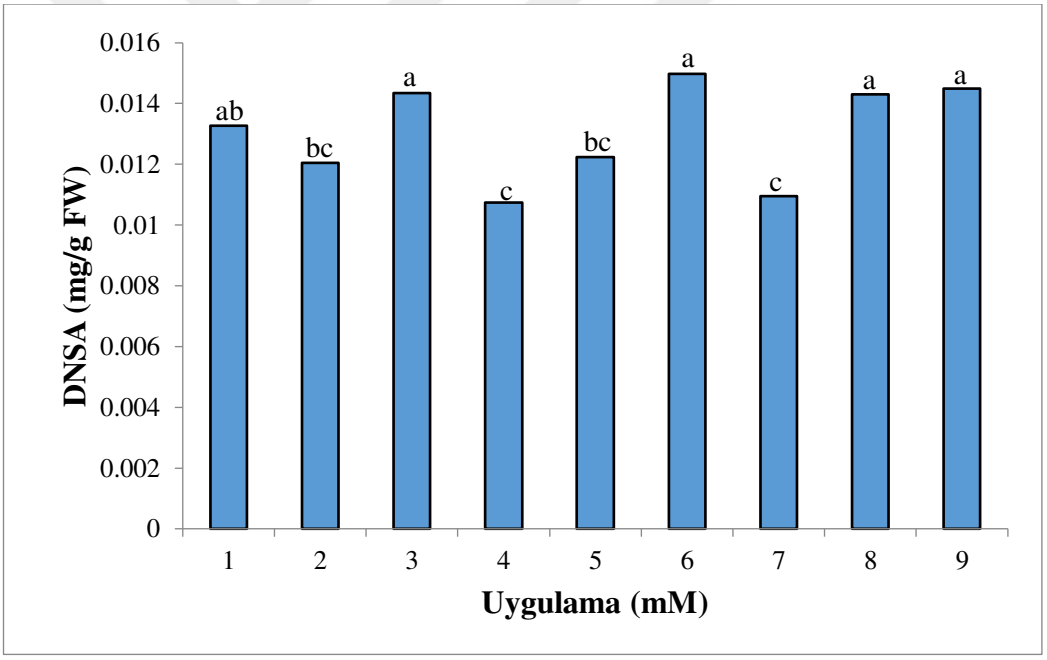
Şekil 4.5. M. sativa *bitkisinde 5-azaC* uygulamasının prolin aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

4.5. DNSA (3,5-Dinitrosalisilik Asit) Aktivitesi

DNSA aktivitesinin yorumlanması Şekil 4.6.'da verilen DNSA standart grafiği referans alınarak yapılmıştır.



Şekil 4.6. DNSA standart grafiği



Şekil 4.7. M. sativa bitkisinde 5-azaC uygulamasının DNSA aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

Çizelge 4.2. 5-azaC'nın farklı konsatrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen prolin ve DNSA içeriklerindeki değişimler.

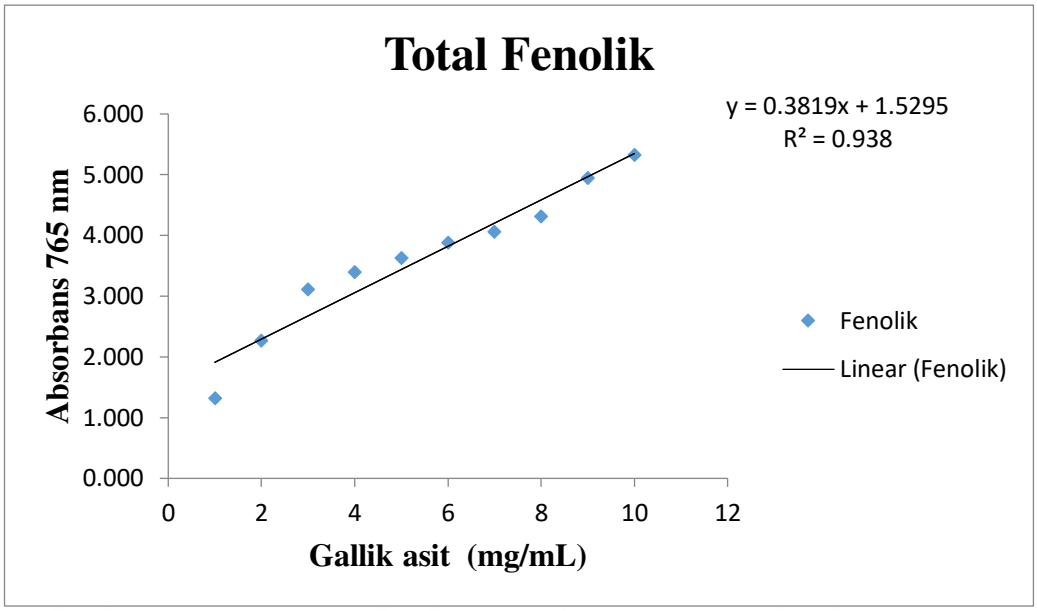
Uygulamalar	Prolin (mg/g FW)	DNSA (mg/g FW)
1	0,035±0,0005^{e}	0,0133±0,0003^{ab}
2	0,032±0,0006^{e}	0,0120±0,0011^{bc}
3	0,033±0,0000^{e}	0,0144±0,0010^{a}
4	0,032±0,0002^{e}	0,0108±0,0002^{c}
5	0,059±0,0010^{a}	0,0122±0,0002^{bc}
6	0,048±0,0018^{c}	0,0150±0,0003^{a}
7	0,047±0,0011^{c}	0,0109±0,0004^{c}
8	0,056±0,0010^{b}	0,0143±0,0003^{a}
9	0,040±0,0007^{d}	0,0145±0,0004^{a}

1: 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC

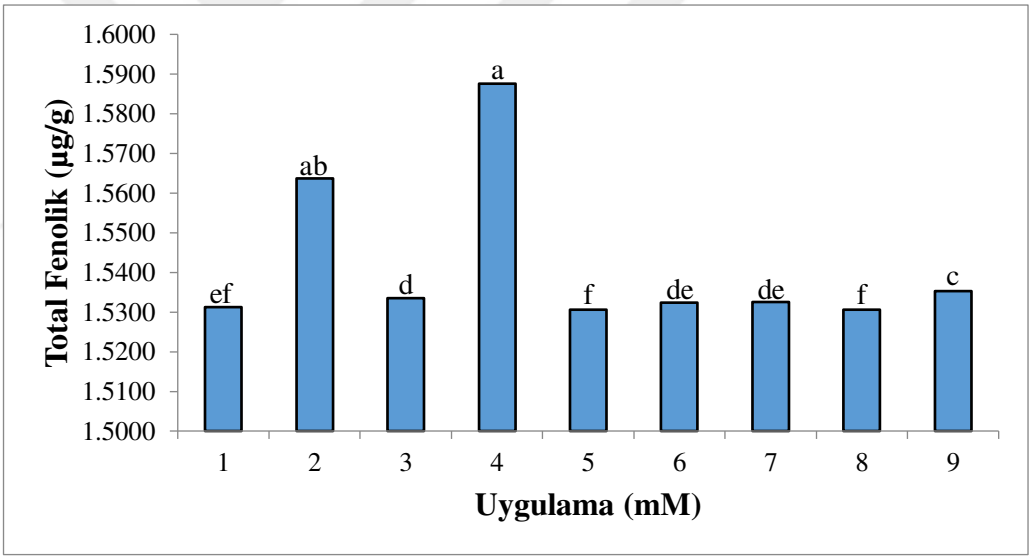
5-azaC'nın farklı konsatrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen prolin ve DNSA içeriğinde meydana gelen değişikler Çizelge 4.2' de verilmiştir. Prolinde 7. gün diğer konsantrasyonlarla kıyaslandığında herhangi farklılık gözlemlenmemiştir. 14. ve 21. gün kontrolle kıyaslandığında farklılıklar gözlemlenmiştir. 14. ve 21. günde en iyi sonucu 3 µL 5-azaC vermiştir. DNSA sonucuna göre, 7., 14. ve 21. gün kontrolle kıyaslandığında farklılıklar gözlemlenmiştir. Konsantrasyon değerleri ve gün sayısı artıkça suda çözülebilir şeker miktarında artış gözlemlenmiştir.

4.6. Total Fenolik Aktivitesi

Total fenolik aktivitesinin yorumlanması Şekil 4.8.'te verilen total fenolik standart grafiği referans alınarak yapılmıştır.



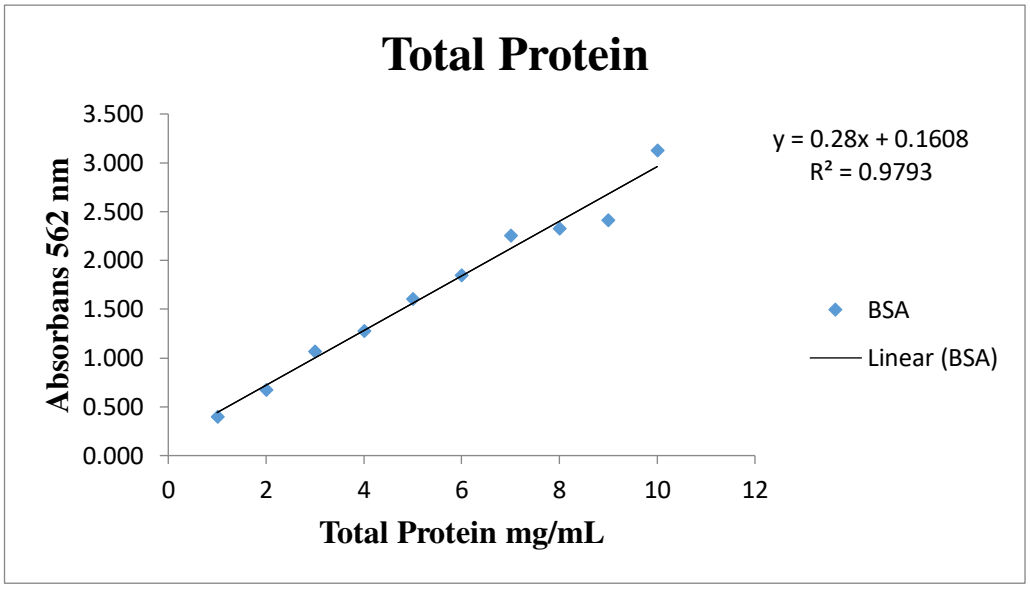
Şekil 4.8: Total fenolik standart grafiği



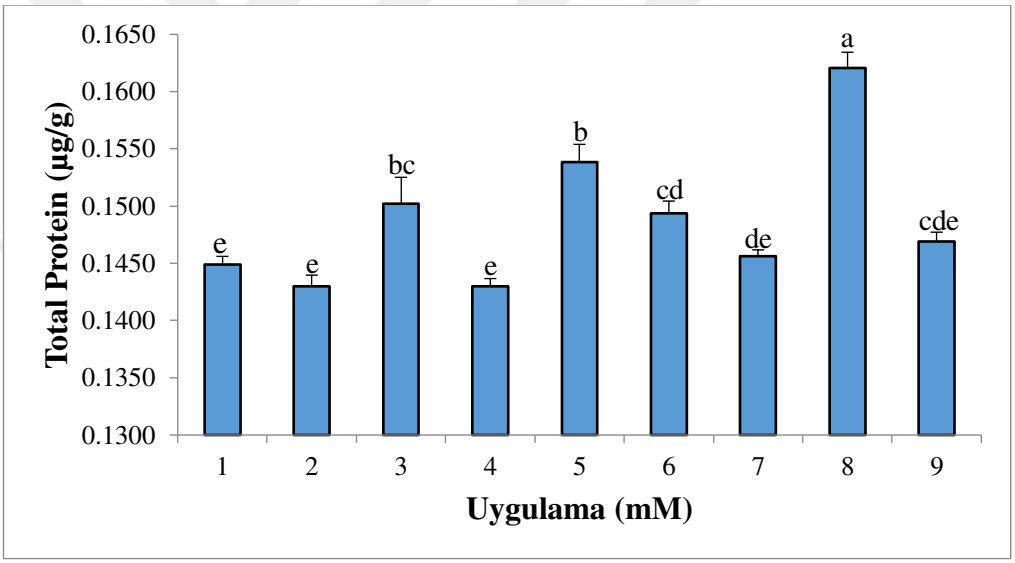
Şekil 4.9. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının total fenolik aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

4.7. Total Protein Aktivitesi

Total protein aktivitesinin yorumlanması Şekil 4.9.'da verilen total protein standart grafiği referans alınarak yapılmıştır.



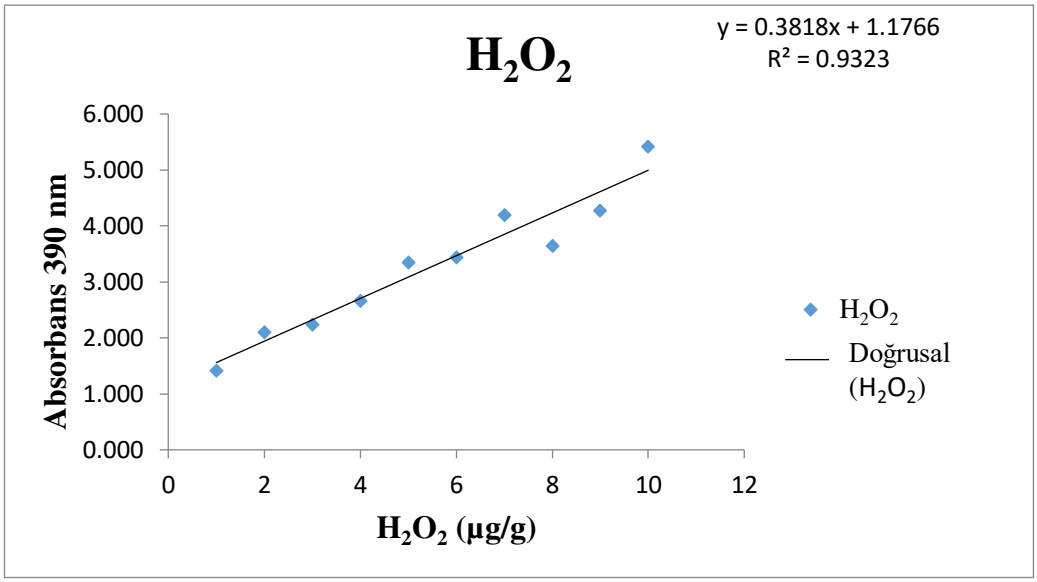
Şekil 4.10: Total protein standart grafiği



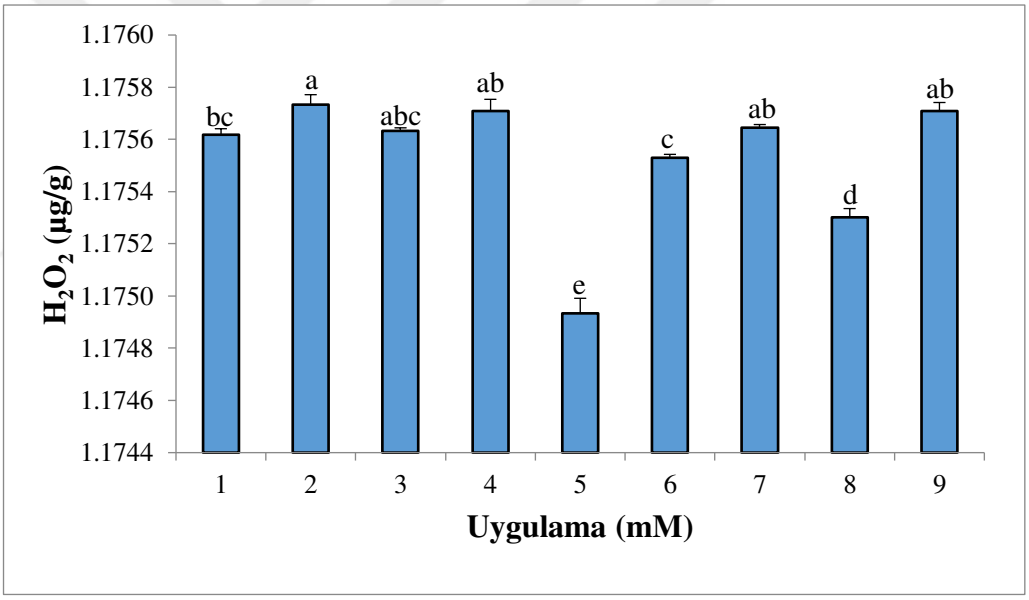
Şekil 4.11. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının total protein aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

4.8. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Aktivitesi

Hidrojen peroksit aktivitesinin yorumlanması Şekil 4.12'de verilen H_2O_2 standart grafiği referans alınarak yapılmıştır.



Şekil 4.12. H_2O_2 standart grafiği



Şekil 4.13. *M. sativa* bitkisinde 5-azaC uygulamasının H_2O_2 aktivitesine etkisi **1:** 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC.

Çizelge 4.3. 5-azaC' ın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen total fenolik, total protein ve H_2O_2 içeriklerindeki değişimler.

Uygulamalar	Total Fenolik (µg/g)	Total Protein (µg/g)	H_2O_2 (µg/g)
1	1,53±0,00024^{ef}	0,14±0,0007^{e}	1,1756±0,00002^{bc}
2	1,56±0,00121^{ab}	0,14±0,0009^{e}	1,1757±0,00004^{a}
3	1,53±0,00009^{d}	0,15±0,0023^{bc}	1,1756±0,00001^{abc}
4	1,58±0,00005^{a}	0,14±0,0006^{e}	1,1757±0,00005^{ab}
5	1,53±0,00072^{f}	0,15±0,0015^{b}	1,1749±0,00006^{e}
6	1,53±0,00020^{de}	0,14±0,0010^{cd}	1,1755±0,00001^{c}
7	1,53±0,00006^{de}	0,14±0,0005^{de}	1,1756±0,00001^{ab}
8	1,53±0,00007^{f}	0,16±0,0013^{a}	1,1753±0,00003^{d}
9	1,53±0,00006^{c}	0,14±0,0008^{cde}	1,1757±0,00003^{ab}

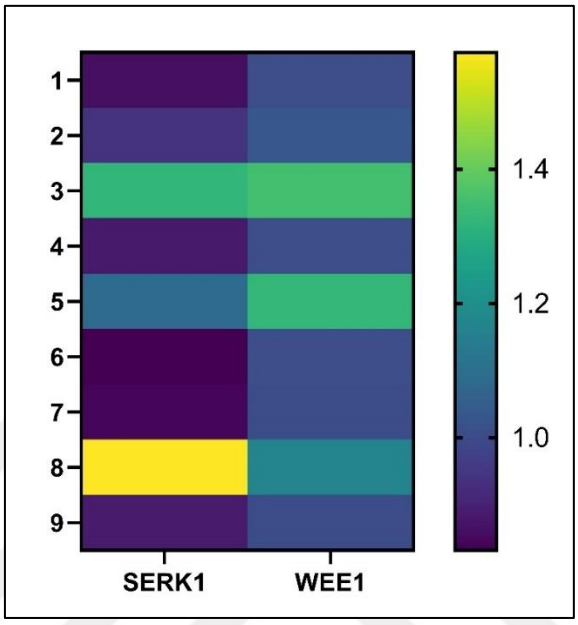
1: 7. gün kontrol, **2:** 7. gün 3 µL 5-azaC, **3:** 7. gün 6 µL 5-azaC, **4:** 14. gün kontrol, **5:** 14. gün 3 µL 5-azaC, **6:** 14. gün 6 µL 5-azaC, **7:** 21. gün kontrol, **8:** 21. gün 3 µL 5-azaC, **9:** 21. gün 6 µL 5-azaC

5-azaC'nın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarında meydana gelen total fenolik, total protein ve H_2O_2 içeriklerindeki değişimler Çizelge 4.3' te verilmiştir. Total fenolik içeriği 7. günde 3 µL 5-azaC'de, 21. günde 6 µL 5-azaC'de en yüksek seviyede göstermektedir. Total protein içeriği 7. günde 6 µL 5-azaC'de, 14. ve 21. günde 3 µL 5-azaC'de artış göstermiştir. H_2O_2 7. Günde herhangi bir değişim gözlemlenmezken, 14. Ve 21. günde 3 µL 5-azaC'de birikimi daha azdır ve hücre hasarı diğer konsantrasyonlara oranla daha düşüktür.

Wei et al. (2019) yaptıkları bir çalışmada DNA metilasyonunun *Cephalotaxus mannii* süspansiyon hücrelerinde sefalotaksinin büyümesi ve sentezi üzerindeki etkisini incelemek için farklı konsantrasyonlarda (15, 25 ve 35 µmol/L) 5-aza-2'-deoksisitidin (5-azaC) demetile edici reaktif *C. mannii* süspansiyon kültürlerine eklemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, 5-Aza-CdR'nin hücre büyümesi üzerindeki etkisinin konsantrasyonuna bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca 5-Aza-CdR'nin etki bölgelerinin temel olarak birincil metabolik sürece odaklandığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdada 5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kallus kültürlerinde

Prolin ve DNSA gibi parametrelerin içeriğinde konsantrasyon ve güne bağlı olarak değişimler meydana gelmiştir.

4.9. Gen Aktivitesi



Şekil 4.14. 5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarındaki *SERK1* ve *WEE1* gen ifadelerinde meydana gelen değişimler.

5-azaC'nın farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan *M. sativa* kalluslarındaki *SERK1* ve *WEE1* gen ifadelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.14' te verilmiştir. SERK1 gen seviyesinde 7. gün kendi arasında kıyaslandığında 5-azaC konsantrasyonu artıkça aşağı olarak gen ifadesi olmuştur. 14. günde ise 6 µL 5-azaC (0,832)'de yukarı regülasyon olmuştur. 21. günde ise gen ifadesi oldukça düşüktür.

WEE1 gen seviyesinde 7. Günü *SERK1* geniyle aynı seviyede regülasyon göstermiştir. 14. (1,004) ve 21. (1,001) günde ise 6 µL 5-azaC'de yukarı regülasyon olmuştur. *M. sativa*'da uygulanan farklı 5-azaC'nin konsantrasyonunda en iyi sonucu 14. günde ise 6 µL 5-azaC göstermiştir. Gen regülasyonunda Ct değerleri 0,832 ile 1,573 arasındaki skala da değişiklik göstermiştir. En iyi sonucu ise *WEE1* gen regülasyonu göstermiştir. Kısacası 7. gün ve 21.gün 5-azaC en uygun uygulama süresi olarak kabul edilemez.

5-azaC muamelesinden sonra sessiz genlerin reaktivasyonunun metillenmiş sitozin düzeylerinde bir değişimle ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını gösteren birçok çalışma mevcut olup; Santos and Fevereiro (2002) *Medicago truncatula* üzerine yaptıkları çalışmada DNA metilasyonunun somatik embriyogenez etkisini araştırmak için, somatik embriyolar üretmek için farklı kapasitelere sahip *M. truncatula* Jemalong çeşidinin embriyogenik ve embriyogenik olmayan hatlarını karşılaştırmışlardır. Alınan sonuçlarda, somatik embriyo üretiminin belirli bir düzeyde DNA metilasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda 5-azaC'nın *M. sativa* kalluslarında *SERK1* gen ifadesinin değiştirdiğini gözlemlenmiş olup bu genin somatik embriyo oluşumunda rol oynadığı belirlenmiştir. Bu sonuç metilasyonun gen ifadesinin gelişimsel düzenlenmesinde bir rol oynadığı normal bitki gelişimi için gerekli olduğunu doğrulamaktadır.

Montalvo et al. (2020) yaptıkları bir çalışmada ise 15 µM ve 20 µM 3 günlük 5-azaC uygulamasının erken somatik embriyo oluşumunu önemli ölçüde artırdığı ek olarak *SERK, WUS, BBM* ve *LEC* genlerinin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde etkilediğini belirlemişlerdir. Bu sonuç göstermektedir ki 5-azaC uygulaması *in vitro* şartlarda DNA metilasyonunun somatik embriyo oluşumu, gelişimi ve hücre farklılaşması gibi tüm süreç boyunca önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Levanic et al. (2004) yaptıkları başka bir çalışmada kabak bitkisine ait 3 farklı embriyogenik hattın doku kültürü şartlarında 2,4-D içeren ve içermeyen ayrıca 5-azaC içeren ortamda kültüre alarak somatik embriyo sürecindeki DNA metilasyonu değişikliklerini belirlemişlerdir. Sonuçta 2,4-D içermeyen 12,3 µM 5-azaC ilave edilmiş ortamda embriyo farklılaşmasını sürecinde DNA metilasyonun azaldığını bildirmişlerdir.

Hugo et al. (2012) yaptıkları çalışmada ise 2,4-D ile 5-azaC kombine etkisinin *Acca sellowiana* bitkisinde somatik embriyo uyarımını ve sayısını artırdığını yapılan histolojik testler ile kültürden 10 gün sonra hızlı hücre bölünmesinin gerçekleştirildiği, kültürden 20 gün sonra eksplant yüzeyleri üzerinde globüler somatik embriyoların oluştuğu, 30 gün sonra ise ikincil somatik embriyoların oluştuğu gözlemlenmiştir.

Li et al. (2010) kenaf bitkisinde 5-azaC uygulamasının tuz stresine uyarıcı genlerin aktivasyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada biyokütle ve antioksidan aktivitelerin süperoksit dismutaz, 5-azaC ile ön işleme tabi tutulmuş kenaf fidelerinin peroksidaz ve katalaz değerleri önemli ölçüde artarken, süperoksit anyonunun içeriği ve malondialdehit (MDA) azaldı, bu da 5-azaC ön işlemi, tuz stresi karşı olumsuz etkiyi önemli ölçüde azaltabilir. Ayrıca 5-azaC uygulamasının tuz stresine tepki veren genlerin aktive edilmesini sağladı. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar alınmıştır.

Yalamalle et al. (2020) yaptıkları bir çalışmada soğan tohumlarının 5-azaC ile muamele edilmesinin çimlenme ve canlılık üzerindeki etkisi değerlendirildi. İki farklı soğan çeşidinin tohumları, 'Bhima Raj' (BRJ) ve 'Bhima Red' (BRD), 0, 10, 25 veya 50 µg mL-1 5-azaC (bir DNA demetilasyon ajanı) uygulandı. Kontrol uygulaması (0 µg mL-1 5-azasitidin) ile karşılaştırıldığında, 5-azaC ile uygulama tohum çimlenmesini, fide uzunluğunu, fide kuru ağırlığını ve tohum canlılık indekslerini geliştirmiştir. 5-azaC muamelesi ayrıca süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini ve toplam antioksidan kapasiteyi (TAC) arttırdı. 5-azaC ile tohum muamelesi, yaşlanmış soğan tohumlarının canlılığını ve gücünü artırma potansiyeline sahiptir.

5-AzaC, farklı bitki türlerinde somatik embriyo oluşumu sağlamak için birçok çalışmada kullanılmıştır, aralarında *Pinus pinaster, Brassica napus, Hordeum vulgare ve Theobroma cacao* gibi embriyogenik kallus oluşum oranının pozitif olduğu durumlar olmuştur. *P. pinaster*'de (Ait.), embriyogenik kalluslar farklı konsantrasyon ve sürelerde 5-AzaC'ye maruz bırakıldı. Embriyogenik kalluslar 9 gün süreyle 5-azaC' e maruz bırakıldığında, büyümeleri hormon konsantrasyonundaki artışla ters orantılıydı. En yüksek somatik embriyo miktarları 10 ve 15 µM 5-AzaC seviyelerinde elde edilmiştir (Klimaszewskak et al. 2009). *Brassica napus* ve *Hordeum vulgare'de* (Solis et al. 2015), 5-azaC (2.5 µM) ile dört günlük muamele ile somatik embriyo oluşum oranı her iki türde de artış gözlenmiştir. 5-azaC uygulamasının, gen ekspresyonunun yeniden programlanmasını, totipotensi kazanımını ve mikrosporlarda embriyogenezin başlatılmasını desteklediğini gösteriyor. Bizim çalışmamızda da 6 µM 5-azaC uygulamasının somatik embriyo oluşum oranını artırdığı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu araştırmada *in vitro* şartlar altında yonca bitkisine ait katı kültür ortamına yaprak eksplantları alınarak kallus oluşumu sağlanmıştır. Bu kalluslar farklı doz ve sürelerde (7,14 ve 21 gün) bir DNA metilasyon inhibitörü olan 3µL 5-azaC ve 6µL 5-azaC'a maruz bırakılmıştır. Kallusların kısa ve uzun süre 5-azaC'a maruz bırakılmasıyla SOD, POD, MDA, H_2O_2, DNSA, prolin, total fenolik, total protein içerikleri belirlenmiştir. Ayrıca *SERK1* ve *WEE1* genlerinin ifade seviyelerine ulaşılmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

SOD ve POD analizi sonuçlarına göre en iyi sonuç 6 µL 5-azaC'de alınmıştır.

MDA analizi sonuçlarına göre en iyi sonuç 3 µL 5-azaC'de alınmıştır.

5-azaC muameleli kalluslar da prolin ve DNSA içeriği yüksek konsantrasyonla ilişkilidir.

5-azaC muameleli kalluslar da total protein ve total fenolik içerikleri konsantrasyon ve güne bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

Zararlı reaktif oksijen türlerinden biri olan ve genelde stres koşullarında artan H_2O_2 miktarı uzun süreli 3 µL 5-azaC'de azalmıştır.

SERK1 ve *WEE1* geninin metilasyona verdiği tepkiler konsantrasyon ve süreye bağlı olarak farklılık göstermiştir.

5.2. Öneriler

Yoncada *in vitro* şartlarda yapılan bu çalışma diğer bitki türlerinde antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadesi çalışmaları içinde uygulanabilir. Yapılan bu çalışma ile daha kısa sürede daha hızlı bir şekilde somatik embriyoların üretilmesi sağlanarak hızlı rejenerasyon sistemleri tesis edilerek doku kültürüne inatçı bitki türlerinde bile *in vitro* optimizasyon koşulları sağlanarak embriyogenik kapasiteye sahip somatik embriyolar üretilebilir.

KAYNAKLAR

Acar, J. 2006. Meyve ve sebze işleme teknolojisi. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 445, Ankara.

Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, 596, Ankara.

Adams, J. B. 1978. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature–short time processing of vegetables. International Journal of Food Science & Technology, 13(4), 281-297.

Agostini, E., Medina, M. I., Milrad de Forchetti, S. R. ve Tigier, H. 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(3), 596-598.

Anonymous, 2022. Web Sitesi: https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/a3656, Erişim Tarihi: 26.12.2022

Argemí, A., Vega, A., Subra-Paternault, P. ve Saurina, J. 2009. Characterization of azacytidine/poly (l-lactic) acid particles prepared by supercritical antisolvent precipitation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50(5), 847-852.

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50(1), 601-639.

Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R. ve Karadağ, Y. 2009. Yembitkileri: baklagil yembitkileri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, 545, İzmir.

Ayala, A., Muñoz, M. F. ve Argüelles, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014(1), 2-17.

Banci, L. 1997. Structural properties of peroxidases. Journal of Biotechnology, 53(2-3), 253-263.

Barnes, D. K., Goplen, B. P. ve Baylor, J. E. 1988. Highlights in the USA and Canada. Alfalfa and Alfalfa Improvement, 29, 1-24.

Bauchan, G. R. ve Greene, S. L. 2002. Status of the *Medicago* germplasm collection in the United States. Plant Genetic Resources Newsletter, 1-10.

Bernt, E. ve Bergmeyer, H. U. 1974. L-Glutamate UV-assay with gutamate dehydrogenase and NAD. In Methods of Enzymatic Analysis, 4, 1704-1715.

Bohn, T. 2014. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. Nutrition Reviews, 72(7), 429-452.

Chen, X., Xu, X., Shen, X., Li, H., Zhu, C., Chen, R., Munir, N., Zhang, Z., Chen, Y., Xuhan, X., Lin, Y. ve Lai, Z. 2020. Genome-wide investigation of DNA methylation dynamics reveals a critical role of DNA demethylation during the early somatic embryogenesis of Dimocarpus longan Lour. Tree Physiology, 40(12), 1807-1826.

Christman, J. K. 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2′-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene, 21(35), 5483-5495.

Deprez, R. H. L., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M. ve Moorman, A. F. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. Analytical Biochemistry, 307(1), 63-69.

Dinçer, D., Bekçi, B. ve Bekiryazıcı, F. 2016. Türkiye'deki doğal bitki türlerinin üretiminde doku kültürü tekniklerinin kullanımı. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5, 295-302.

Ding, C. ve Cantor, C. R. 2004. Quantitative analysis of nucleic acids-the last few years of progress. BMB Reports, 37(1), 1-10.

Diplock, A. T. 1998. Defence against reactive oxygen species. Free Radical Research, 29(6), 463-467.

Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C. ve Whitaker, J. R. 2000. Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. esculenta DC) Peroxidases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(5), 1574-1579.

Elçi, Ş. 2005. Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri. TC Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 486, Ankara.

Erdal, S. 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. Plant Physiology and Biochemistry, 57, 1-7.

Frame, J., Charlton, J. F. L. ve Laidlaw, A. S. 1998. Temperate Forage Legumes. Cab International, 327, İngiltere.

Gençkan, M. S. 1992. Yembitkileri tarımı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 520, İzmir.

Geren, H., Avcıoğlu, R. ve Soya, H. 2004. Bazı fiğ (*Vicia sativa*) çeşitlerinin bornova koşullarındaki hasıl performansları üzerinde araştırmalar. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 14(2), 35-48.

Gökalp, S., Yazıcı, L., Çankaya, N. ve İspirli, K. 2017. Bazı yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin tokat-kazova ekolojik koşullarında ot verimi ve kalite performanslarının belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34(3), 114-127.

Heath, R. L. ve Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125(1), 189-198.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. ve Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research, 6(10), 986-994.

Hulme, A. C. 1971. The Biochemistry of Fruits and Their Products. Academic Press, 788, ABD.

Huystee, R. V. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Annual Review of Plant Physiology, 38(1), 205-219.

Issa, J. P. J. ve Kantarjian, H. M. 2009. Targeting DNA methylation. Clinical Cancer Research, 15(12), 3938-3946.

Jaleel, C. A., Sankar, B., Sridharan, R. ve Panneerselvam, R. 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in catharanthus roseus. Turkish Journal of Biology, 32(2), 79-83.

Kaiser, W. M. 1979. Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. Planta, 145(4), 377-382.

Karabulut, G. ve Yemiş, O. 2019. Fenolik bileşiklerin bağlı formları ve biyoyararlılığı. Akademik Gıda, 17(4), 526-537.

Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. 2016. Antioksidanlar. Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University, 1(1), 65-76.

Karadavut, U., Palta, Ç., Tezel, M. ve Aksoyak, Ş. 2011. Yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisinde bazı fizyolojik karakterlerin belirlenmesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, 6(2), 8-16.

Kartal, D. İ. ve Şayak O. 2020. *Medicago sativa* bitkisinin antioxidant kapasitesinin belirlenmesi. Doğu Fen Bilimleri Dergisi, 3(1), 9-18.

Kaur, C. ve Kapoor, H. C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium's health. International Journal of Food Science & Technology, 36(7), 703-725.

Kaya, A. ve Doganlar, Z. B. 2016. Exogenous jasmonic acid induces stress tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum*) exposed to imazapic. Ecotoxicology and Environmental Safety, 124, 470-479.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. ve Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3), 95–125.

Kurt, O. ve Şavşatlı, Y. 2005. Bitkisel biyoteknolojiye genel bir bakış. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi (Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi), 20(3), 126-133.

Leljak-Levanić, D., Bauer, N., Mihaljević, S. ve Jelaska, S. 2004. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. Plant Cell Reports, 23(3), 120-127.

Li, G., Nie, X., Chen, J., Jiang, Q., An, T., Wong, P. K., Zhang, H., Zhao, H. ve Yamashita, H. 2015. Enhanced visible-light-driven photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* using g-C3N4/TiO2 hybrid photocatalyst synthesized using a hydrothermal-calcination approach. Water Research, 86, 17-24.

Li, Z., Hu, Y., Chang, M., Kashif, M. H., Tang, M., Luo, D., Cao, S., Lu, H., Zhang, W., Huang, Z., Yue, J. ve Chen, P. 2021. 5-azacytidine pre-treatment alters DNA methylation levels and induces genes responsive to salt stress in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). Chemosphere, 271, 129562.

Luan, A., Chen, C., Xie, T., He, J. ve He, Y. 2020. Methylation analysis of CpG islands in pineapple *SERK1* promoter. Genes, 11(4), 425.

Michaud, R., Lehman, W. F. ve Rumbaugh, M. D. 1988. World distribution and historical development. Alfalfa and Alfalfa İmprovement, 29, 25-91.

Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. ve Therios, I. 2006. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (Malus domestica Borkh). Environmental and Experimental Botany, 56(1), 54-62.

Murashige, T. ve Skoog, F. A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3), 473-497.

Nayak, B., Liu, R. H. ve Tang, J. 2015. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains: A review. Critical Reviews In Food Science and Nutrition, 55(7), 887-918.

Neill, S., Desikan, R. ve Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. Current Opinion In Plant Biology, 5(5), 388-395.

Ogawa, K. I. ve Iwabuchi, M. 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia* elegans seeds by hydrogen peroxide. Plant and Cell Physiology, 42(3), 286-291.

Okubara, P. A., Schroeder, K. L. ve Paulitz, T. C. 2005. Real-time polymerase chain reaction: Applications to studies on soilborne pathogens. Canadian Journal of Plant Pathology, 27(3), 300-313.

Orak, A. ve Gökkaya, G., 2014. Yonca Tarımı. İlgi Matbaacılık, 183, Ankara.

Osorio-Montalvo, P., De-la-Peña, C., Oropeza, C., Nic-Can, G., Córdova-Lara, I., Castillo-Castro, E. ve Sáenz-Carbonell, L. 2020. A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). Plant Cell Reports, 39(10), 1345-1357.

Osorio-Montalvo, P., Sáenz-Carbonell, L. ve De-la-Peña, C. 2018. 5-Azacytidine: a promoter of epigenetic changes in the quest to improve plant somatic embryogenesis. International Journal of Molecular Sciences, 19(10), 3182.

Pütter, J. ve Becker, R. 1987. Methods of Enzymatic Analysis Peroxidases. Bergmeyer, 286, ABD.

Qiu, S., Xue, M. ve Zhu, G. 2014. Metal-organic framework membranes: from synthesis to separation application. Chemical Society Reviews, 43(16), 6116-6140.

Quiros, C. F. ve Bauchan, G. R. 1988. The genus *medicago* and the origin of the *Medicago sativa* comp. Alfalfa and Alfalfa Improvement, 29, 93-124.

Radović, J., Sokolović, D. ve Marković, J. J. B. A. H. 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. Biotechnology in Animal Husbandry, 25(5-6-1), 465-475.

Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends In Plant Science, 2(4), 152-159.

Russelle, M. P. 2001. Alfalfa: After an 8,000-year journey, the" Queen of Forages" stands poised to enjoy renewed popularity. American Scientist, 89(3), 252-261.

Sakiroglu, M. ve Charles Brummer, E. 2013. Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (*Medicago sativa* L. subsp. micro carpa Urb.) with evidence of the center of origin. Genetic Resources and Crop Evolution, 60(1), 23-31.

Santos, D. ve Fevereiro, P. 2002. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70(2), 155-161.

Scandalios, J. G. 2019. In causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, 408, ABD.

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S. ve Karsch-Mizrachi, I. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database: the Journal of Biological Databases and Curation, 2020, baaa062.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P., Williams, R. J., Cadenas, E. ve Rice-Evans, C. 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. Neurobiology of Aging, 23(5), 861-880.

Sen Raychaudhuri, S. ve Deng, X. W. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. The Botanical Review, 66(1), 89-98.

Sergiev, I., Alexieva, V. ve Karanov, E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress

markers in plants. Comptes Rendus Academy Bulgarian Sciences, 51(3), 121-124.

Shahidi, F. ve Yeo, J. 2016. Insoluble-bound phenolics in food. Molecules, 21(9), 1216.

Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., Yadav, V., Upadhyay, A. ve Ahmad, Z. 2017. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In Plant Biotechnology: Principles and Applications, 1-36.

Small, E., Jurzysta, M. ve Nozzolillo, C. 1990. The evolution of hemolytic saponin content in wild and cultivated alfalfa (*Medicago sativa, Fabaceae*). Economic Botany, 44(2), 226-235.

Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist, 125, 27-58.

Solís, M. T., El-Tantawy, A. A., Cano, V., Risueño, M. C. ve Testillano, P. S. 2015. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. Frontiers in Plant Science, 6, 472.

Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M. ve Gnanaraj, C. 2020. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. Journal of Functional Foods, 68, 103917.

Şakiroğlu, M., Doyle, J. J. ve Charles Brummer, E. 2010. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 121(3), 403-415.

Şakiroğlu, M., İlhan, D., Kaya, M. M., Demirözoğul, O., Uluçay, O. ve Barış, Eren 2011. Moleküler veriler ışığında *Medicago sativa* L. tür kompleksinin mevcut durumu. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4(1), 32-42.

Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. ve Koca, H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science, 168(1), 223-231.

Türkeç, A. ve Turan, Z. M. 1992. Doku kültür yöntemleri ve bitki ıslahında kullanım olanakları. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9(1), 237-246.

Uslu, Ö. S. ve Balcı, F. 2020. Yonca tarımında büyük sorun: küsküt (*Cuscuta sp*.). Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi, 2(3), 27-31.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. ve Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39(1), 44-84.

Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151(1), 59-66.

Vidalie, H. 1988. Behaviour of miniature hydrangea macrophylla (quality and duration of forcing) after various cold treatments before forcing. In IV International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 261, 355-358.

Wang, T., Lin, J., Chen, Z., Megharaj, M. ve Naidu, R. 2014. Green synthesized iron nanoparticles by green tea and eucalyptus leaves extracts used for removal of nitrate in aqueous solution. Journal of Cleaner Production, 83, 413-419.

Wang, Z., Gerstein, M. ve Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 10(1), 57-63.

Wei, L. R., Qin, W. Y. ve Li, Y. C. 2019. Effects of demethylating reagent 5-aza-2′-deoxycytidine on the growth and cephalotaxine production in *Cephalotaxus mannii* suspension cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 139(2), 359-368.

Welsh, J. R. 1981. Fundamentals of plant genetics and breeding. John Wiley and Sons, 290, ABD.

Whitaker, J. R. ve Stauffer, C. E. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. Trends in Food Science and Technology, 5(9), 304-304.

Wong, M. L. ve Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39(1), 75-85.

Yalamalle, V. R., Gaikwad, N. N., Ithape, D. M., Kumar, A., Gorrepati, K. ve Singh, M. 2020. Loss of seed viability in onion (*Allium cepa* L.) in relation to degradation of lipids during storage. Journal of Applied and Natural Science, 12(4), 635-640.

Ye, Y., Tam, N. F., Wong, Y. S. ve Lu, C. Y. 2003. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. Environmental and Experimental Botany, 49(3), 209-221.

Yeşil, M. ve Şengül, S. 2009. Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanan yonca ekotiplerinin bazı morfolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Alınteri Zirai Bilimler Dergisi, 16(1), 1-6.

Young, I. S. ve Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology, 54(3), 176-186.

Zeng, F., Li, X., Qie, R., Li, L., Ma, M. ve Zhan, Y. 2020. Triterpenoid content and expression of triterpenoid biosynthetic genes in birch (*Betula platyphylla* Suk) treated with 5-azacytidine. Journal of Forestry Research, 31(5), 1843-1850.