

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNDE DNA METİLASYONU VE HETEROSİS
İLİŞKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Emine UYGUR GÖÇER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**OCAK 2019
ANTALYA**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNDE DNA METİLASYONU VE HETEROSİS
İLİŞKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Emine UYGUR GÖÇER
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNDE DNA METİLASYONU VE HETEROSİS
İLİŞKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

**Emine UYGUR GÖÇER
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
FDK-2018-3741 nolu proje ile desteklenmiştir.**

OCAK 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNDE DNA METİLASYONU VE HETEROSİS
İLİŞKİLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Emine UYGUR GÖÇER
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 18/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet KARACA

Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE

Doç. Dr. Mehtap ÇEVİK

Dr. Öğretim Üyesi Bilal AYDINOĞLU

Dr. Öğretim Üyesi Behcet İNAL

ÖZET

Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde DNA Metilasyonu ve Heterosis İlişkileri Üzerine Bir Araştırma

Emine UYGUR GÖÇER

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Ocak 2019, 108 sayfa

DNA'da dizi değişimi olmaksızın gen anlatımı ve fonksiyonundaki kalıtsal değişimler epigenetik olarak tanımlanmaktadır. DNA metilasyonu, epigenetik düzenlemeler arasında en iyi ve yaygın olarak çalışılmış olan mekanizmadır. Bitkilerde en yaygın DNA metilasyonu sitozin bazında gerçekleştiği için metil sitozin beşinci baz olarak adlandırılmaktadır. Sitozin metilasyonu, organizmalarda bir çok epigenetik fonksiyonla ilgilidir. Epigenetik regülasyonun içsel ve dışsal biyo-savunma, heterosis, vernalizasyon, çiçeklenme ve plastisite ile ilgili olduğu bilinmektedir.

Bu doktora tez çalışmasının amaçları: (i) iki kendilenmiş mısır hattı (*Zea mays* L.) ve bu hatların melezlenmesiyle elde edilen hibridi arasında DNA sitozin metilasyon düzeylerinin araştırılması, (ii) 5-azasitidin (5-azaC) ve tuz (NaCl) uygulamalarıyla ebeveyn ve hibridin DNA sitozin seviyesindeki değişimleri karşılaştırılması, (iii) DNA sitozin metilasyonunun heterosis üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada distile su, 150 mM NaCl ve 1.5 mM 5-azaC uygulamaları kullanılmıştır. Uygulamalar olgun mısır tohumları üzerine yapılmış ve analizler ise 6 günlük fidelerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ebeveyn hatlar olarak kendilenmiş hatlar [Mo17 (♀) ve B73 (♂)] kullanılmıştır. Heterosis çalışmaları için ayrıca bu ebeveynler melezlenmiş ve F₁ hibriti [Mo17xB73] elde edilmiştir.

Çalışmada bisülfid sekanslama (BiSeq) yöntemiyle 5 lokus, Gen Spesifik-Metilasyon Duyarlı Çoğaltım Polimorfizm (GS-MSAP) yöntemiyle tekli (unipleks), ikili (dupleks) ve çoklu (multipleks) olmak üzere 18 lokus, Metilasyon Duyarlı Kesilmiş Ünlü Uzunluk Polimorfizm (MS-CULP) yöntemiyle 16 lokus, ve Metilasyon Duyarlı Rastlantısal Çoğaltım Uzunluk Polimorfizm (MS-CRALP) yöntemiyle 4 lokus olmak üzere toplamda 36 lokus çalışılmıştır.

Bu çalışmada BiSeq çalışmaları, çalışılan lokusların çoğunun, kendilenmiş mısır hatlarının olgun tohumları arasında hipo veya hiper-metilasyon göstermediğini açıkça ortaya koymuştur. BiSeq çalışmalarında kullanılan lokuslar arasındaki düşük metilasyon farklılıkların belirlenmiş olması nedeniyle, 6 günlük fidelerin BiSeq metodu kullanılarak araştırılmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, BiSeq yöntemini kullanan daha ileri çalışmaların DNA sitozin metilasyonu ve heterosis arasındaki ilişkilerle ilgili daha fazla bilgi ortaya koyacağı görülmüştür.

GS-MSAP yöntemi, tuz ve demetilasyon ajanı olan 5-azaC ile muamele edilmiş Mo17, B73 ve Mo17xB73 arasında metilasyon farklılıkları gösteren epialleller belirlemiştir. Çoklu GS-MSAP lokusları, DNA sitozin metilasyonu hakkında bazı değerli bilgiler ortaya koymuştur. Ayrıca, sonuçlarımız MS-CULP yöntemi kullanılarak çalışılan bazı lokuslarının Mo17, B73 ve Mo17xB73 arasında metilasyon farklılıkları sunduğunu göstermiştir. Öte yandan, MS-CRALP lokuslarının hiçbirisi çalışılan bitki örnekleri arasındaki metilasyon farklarını ortaya koymamıştır.

Heterosis, tarımda ve bitki ıslahında son derece önemli bir olgudur. Bu çalışmada Mo17 ve B73 hatlarının arasında melezlemeler yapılarak F₁ melez bireyler oluşturmuştur. Melez bitkilerin yüz tohum ağırlığı, her iki ebeveynin de (% 38.18) çok üstünde olup heterosis göstermiştir.

5-azaC ve NaCl'nin etkileri, hibrit ve kendilenmiş ebeveyn hatları arasında farklılık göstermiştir. Sonuçta, hibrid bireylerde (heterosis durumunda) NaCl uygulamasının büyümeyi ve gelişmeyi olumlu yönde etkilediğini, 5-azaC uygulamasının ise heterosiste olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Diğer yandan, bulgular 5-azaC uygulamasının heterosis üzerine NaCl uygulamasından daha fazla olumsuz etkisi olduğunu göstermiştir. Bu, heterosis üzerindeki DNA sitozin metilasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada olgun tohumlarda ve NaCl ve 5-azaC ile muamele edilmiş 6 günlük fidelerde belirli seviyelerde DNA metilasyon farklılıkları olduğunu gözlemledik. Bu çalışma sırasında karşılaşılan bazı sınırlamalar nedeniyle, bu tezin bazı amaçları etkili bir şekilde yerine getirilememiştir. Özellikle mısır ebeveynlerinden birindeki genetik karışım, melezler ve fideler arasında ölçüm farklılıklarına neden olmuştur. Ayrıca, BiSeq yönteminde kullanılan lokusların sayısı çok düşüktür. Ebeveynler ile melez arasındaki farkları ve DNA sitozin metilasyonunun heterosis üzerine etkilerini ortaya çıkarmak için, birden fazla yöntem, birden fazla NaCl ve 5-azaC doz uygulamaları ve daha fazla lokus kullanılmalıdır. Daha iyi ve bilimsel sonuçların alınması için Bütün Genom Bisülfid Sekanslama (WGBS) yöntemi kullanılarak yapılması önerilmiştir.

ANAHTAR KELİMLER: Heterosis, metilasyon, sitozin, tuz, 5-azaC

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE

Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Dr. Öğretim Üyesi Bilal AYDINOĞLU

Dr. Öğretim Üyesi Behcet İNAL

ABSTRACT

A Study on the DNA Methylation and Heterosis relations in Maize (*Zea mays* L.)

Emine UYGUR GÖÇER

Ph.D. Thesis in Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet KARACA

January 2018, 108 pages

Epigenetics is defined as heritable variations in gene expression and functions without the sequence variation in DNA. DNA methylation is the most studied DNA methylation mechanism among the epigenetic regulations. Due to very high occurrence of DNA methylation in cytosine bases, methyl cytosine is called as the fifth base in plants. Cytosine methylation is related with many epigenetic functions in organisms. It is known that epigenetic regulations related with internal and external factors and play important roles on heterosis, bio-defense, vernalization, flowering and phenotypic plasticity.

Aims of this dissertation study were (i) investigation of DNA cytosine methylation levels among two maize inbred lines (*Zea mays* L.) along with their hybrid, (ii) comparison of DNA cytosine level alterations among parents and the hybrid treated with salt (NaCl) and 5-azacytidine (5-azaC), (iii) investigation of the effects of DNA cytosine methylation on heterosis.

In this study, DNA cytosine methylation levels (in terms of hypo- and hyper-methylation compared to water control) of 6 day-old seedlings obtained from mature maize inbred lines [Mo17 (♀) and B73 (♂)] and their F₁ hybrid [Mo17xB73] treated with 150 mM NaCl and 1.5 mM 5-azaC were determined.

In the study, a total of 36 loci consisting of five loci using bisulfite sequencing (BiSeq), 18 loci using uniplex, duplex and multiplex Gene Specific-Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (GS-MSAP), 16 loci using Methylation Sensitive Cleaved Universal Length Polymorphism (MS-CULP) and 4 loci using Methylation Sensitive Cleaved Random Amplified Length Polymorphism (MS-CRALP) were utilized.

In the present study BiSeq studies clearly revealed that most of the loci studied did not show hypo- or hyper-methylation between mature seeds of inbred maize parental lines. One locus produced allelic variation between parental lines. Due to low level of methylation differences among loci utilized in BiSeq studies, 6 day-old seedlings were not investigated using BiSeq method. Based on results we obtained, we believed that further studies using BiSeq method would reveal much more information regarding the relationships between DNA cytosine methylation and heterosis.

GS-MSAP method determined epialleles that showed methylation differences among Mo17, B73 and Mo17xB73 treated with salt and demethylating agent 5-azaC. Multiplexed GS-MSAP loci presented some valuable information on DNA cytosine methylation. Also our results indicated that some of loci studied with MS-CULP method presented methylation

differences among Mo17, B73 ve Mo17xB73. On the other hand, none of MS-CRALP loci revealed methylation differences among plant samples studied.

Heterosis is an extremely important phenomenon in agriculture and plant breeding. In this study crosses between Mo17 and B73 inbred lines created F₁ hibrid (Mo17xB73) individuals. One hundred seed weight of hybrid individuals was much above (38.18%) the both parents, indicating heterosis.

The effects of 5-azaC and NaCl differed between hybrid and parental inbred lines. Result revealed that NaCl administration on the in hybrid individuals affected growth and development positively while 5-azaC application affected negatively. On the other hand, findings indicated that the 5-azaC application had a greater negative effect on heterosis than NaCl administration. This was accepted as an indication of DNA cytosine methylation on heterosis.

As a result, in the present study we observed that there were certain levels of DNA methylation differences in mature seeds and 6 day-old seedlings treated with NaCl and 5-azaC. Due to some limitations encountered during this study some objectives of this dissertation could not be effectively accomplished. Especially genetic mixture in one of the maize parents resulted in measurement differences among hybrids and among seedlings. Furthermore, the number of loci used in BiSeq method were very low. In order to reveal the methylation differences between parents and hybrid and the effects of DNA cytosine methylation on heterosis, more number of loci with several methods and different doses of NaCl and 5-azaC applications method should be used. Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) method was suggested for better and more scientific results.

KEYWORDS: Cytosine, heterosis, methylation, salt, 5-azaC

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül İNCE

Assoc. Prof. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Asst. Prof. Dr. Bilal AYDINOĞLU

Asst. Prof. Dr. Behcet İNAL

ÖNSÖZ

Heterosis ve epigenetik yüzyılı aşkın bir süredir gerek bilim insanlarının gerekse de bitki ıslahçıların ilgisini çeken önemli fenomenler olmasına karşın hem heterosisin hem de heterosisde epigenetik etkinin moleküler temelleri tam olarak ortaya konulamamıştır. Heterosis genetik ve epigenetik süreçlerin birbirleri ile koordineli olarak oluştuğu bir fenomen olması nedeniyle genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte analiz edilmesi, heterosis ve epigenetik regülasyon hakkında yeni veriler ortaya koyma potansiyeline sahiptir.

Bitkilerde DNA metilasyonu düzenlemelerine birçok içsel ve dışsal faktör etki etmektedir. Epigenetik etki olumlu veya olumsuz olarak aralarında canlılık, üretkenlik, üreme, biyotik ve abiyotik (viral, bakteriyel ve fungal, tuza, kurağa, soğuğa, alkali şartlara) dayanıklılıkla ilgili olabilmektedir. Bu durum epigenetiğin tarımsal üretimde doğasıyla insanoğlu için son derece önemli olduğunu göstermektedir. Tarımsal üretimde son derece önemli olan diğer bir görüngü (fenomen) ise heterosistir. Ebeveyn olarak kullanılan bireylerin özelliklerinin herhangi birinin yavrularda artışı heterosis olarak adlandırılmaktadır.

Bu doktora tezinin ana konusu, epigenetik ana mekanizmalarından biri olan DNA sitozin metilasyonunu mısır bitkisinde ebeveyn ve yavruları arasında metilasyon patern ve oranlarını belirlemenin yanında mısır bitkisi tohumlarına NaCl ve 5-azaC uygulamaları kullanılarak DNA metilasyonu kalıtım modlarının belirlenmesidir.

Çalışmalarına yön veren, araştırmalarımın her aşamasında her türlü desteğini benden esirgemeyen, uzun yıllar boyunca edindiği tecrübelerini benimle paylaşan ve tez çalışmamın her aşamasında büyük katkısı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet KARACA'ya en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşan değerli hocam ve aynı zamanda jüri üyem olan Sayın Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE'ye, Doktora tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Adnan AYDIN'a sonsuz teşekkür ederim.

Sayın Jüri üyelerim Doç. Dr. Mehtap ÇEVİK (Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi), Dr. Öğretim Üyesi Bilal AYDINOĞLU (Akdeniz Üniversitesi) ve Dr. Öğretim Üyesi Behcet İNAL'a (Siirt Üniversitesi) Tez savunmamda bulunmaları, engin bilgileri ile tezime bulundukları katkılarından dolayı her birine teşekkür eder, içten saygılarımı sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımı şekillendirirken aldığım her kararda beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim boyunca manevi destek veren ve her an yanımda olmaya çalışan eşim Gökhan GÖÇER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ	ix
AKADEMİK BEYAN	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	20
2. KAYNAK TARAMASI	25
2.1. Mısır Bitkisi	25
2.2. NaCl ve 5-AzaC Uygulamalarında DNA Metilasyon Değişiklikleri	25
2.2.1. NaCl uygulamaları ve DNA metilasyon çalışmaları	25
2.2.2. 5-azaC uygulamaları ve DNA metilasyon çalışmaları	28
2.2.3. Heterosis ve DNA metilasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar	31
3. MATERYAL VE METOT	40
3.1. Bitki Materyali	40
3.2. Bitki Materyallerinin Yetiştirilmesi ve Örneklerin Toplanması.....	40
3.3. NaCl ve 5-AzaC Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Uygulamaları	41
3.3.1. 150 mM NaCl konsantrasyonunu hazırlama	41
3.3.2. 1.5 mM 5-azaC konsantrasyonunu hazırlama	41
3.3.3. NaCl ve 5-azaC konsantrasyonlarının uygulamaları.....	42
3.4. Heterosis Çalışmaları	43
3.4.1. Tohum ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları.....	43
3.4.2. Fide ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları	43
3.5. DNA İzolasyonunun Yapılması.....	43
3.5.1. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler	43
3.5.2. DNA izolasyonu	44
3.6. DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi.....	45
3.7. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi	45
3.8. PZR Protokolü	46
3.9. Bisülfid Dönüşümü	47

3.10. Bisülfıt Reaksiyonları	47
3.10.1. CT kimyasalların hazırlanması.....	47
3.10.2. Yıkama solüsyonun hazırlanması.....	47
3.10.3. Bisülfıt dönüşüm reaksiyonları	47
3.11. Hedef Bölgelerin Amplifikasyonu ve Klonlanması.....	48
3.11.1. Polimeraz zincir reaksiyonları ile hedef bölgelerin amplifikasyonu	48
3.11.2 Amplikonların jelden izolasyonu	49
3.11.3. Transformasyon çalışmaları için çözeltilerin hazırlanması.....	50
3.11.3.1. Sıvı LB ortam hazırlığı.....	50
3.11.3.2. Amfisilin stoğunun hazırlanması.....	50
3.11.3.3. Katı LB ortam hazırlığı	50
3.11.3.4. İzopropil β -thiogalaktopiranosid stokunun hazırlanması	50
3.11.3.5. X-galaktoz stokunun hazırlanması	51
3.11.3.6. Bakteri ana stoku.....	51
3.11.4. Klonlama çalışmaları.....	51
3.11.4.1. Transformasyon için ligasyon çalışmaları	51
3.11.4.2. Transformasyon protokolü	52
3.11.4.3. Rekombinant klonların analizi	52
3.11.5. Plazmit DNA izolasyonu	53
3.11.6. Pozitif klonların PZR yöntemi ile teyit edilmesi	53
3.11.7. Pozitif klonların restriksiyon enzimleri (RE) ile teyit edilmesi	54
3.11.8. Bisülfıt dizi (BiSeq) analizleri.....	54
3.11.9. Metilasyon analizleri	54
3.12. <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> Restriksiyon Enzim Kesim Denemeleri	54
3.13. Restriksiyon Enzimlerinin Hedef Lokusların Kesiminin Teyit Edilmesi.....	54
3.14. Gen Spesifik Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizm (GS-MSAP)	55
3.14.1. Gen spesifik metilasyon primer çiftleri	55
3.14.2. PZR protokolü	57
3.14.3. Agaroz jel elektroforez çalışmaları	58
3.15. Metilasyon Duyarlı Kesilmiş Üniversal Uzunluk Polimorfizm (MS-CULP)	58
3.15.1. MS-CULP primerleri.....	58
3.15.2. PZR Protokolü	59

3.15.3. Agaroz jel elektroforez çalışmaları	60
3.16. Metilasyon Duyarlı Kesilmiş Rastlantısal Çoğaltılmış Uzunluk Polimorfizm (MS-CRALP)	60
3.16.1. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm (MS-CRALP)	61
3.16.2. PZR protokolü	61
3.16.3. Agaroz jel elektroforezi:.....	62
3.17. Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi ve İstatistiksel Analizler	62
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	64
4.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali	64
4.2. Heterosisin Tespiti	65
4.2.1. Tohum ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları.....	65
4.2.2. NaCl ve 5-azaC uygulaması yapılan fide ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları	66
4.3. DNA İzolasyonu	69
4.3.1. DNA kalitesinin ve saflığının belirlenmesi	70
4.3.2. Agaroz jel elektroforez analizleri	72
4.4. Gen Spesifik Primer ve Bisülfid Primer Çiftlerinin Belirlenmesi	72
4.5. Bisülfid Dönüşümü, Bisülfid-PZR, Klonlama ve Sekanslama Reaksiyonları	74
4.6. <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> Restriksiyon Enzim Kesim Denemeleri ve Hedef Lokusların Kesiminin Teyit Edilmesi.....	75
4.6.1. Gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm (GS-MSAP) ...	76
4.6.2. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm (MS-CULP)....	82
4.6.2.1. DNA metilasyon farklılığı tespit edilen MS-CULP markırları.....	83
4.6.2.2. DNA metilasyon farklılığı tespit edilemeyen MS-CULP markırları	85
4.6.3. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm (MS-CRALP)	88
5. SONUÇLAR	90
6. KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde DNA Metilasyonu ve Heterosis İlişkileri Üzerine Bir Araştırma” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

18/01/2019

Emine UYGUR GÖÇER

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

dS/m	“Decisiemens per metre”
g	Gram
M	Molarite
mM	Milimolarite
mL	Mililitre
nm	Nanometre
pH	“Potentia hydrogeny”
R	Guanin, veya Adenin
x	Kez
xg	“gravity” Döngü gücü
Y	Sitozin veya Timin
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
ϵ	Epsilon
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolarite
μ m	Mikron
°	Derece
Σ	Toplam

Kısaltmalar

AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
Bi-Seq	“Bisulfite Sequencing”
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	“Bovine serum albumin”
CHCl ₃	Kloroform
CML	“Cleaved Minisatellite Locus”
COBRA	“Combined bisulfite restriction analysis”
MS-CRALP	“Methylation Sensitive Cleaved Random Amplified Length Polymorphism”
CTAB	“Cetyltrimethylammonium bromide”
MS-CULP	“Methylation Sensitive Cleaved Universal Length Polymorphism”
DAMD	“Directed Amplification of Minisatellite DNA”
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid”
EO	Ebeveynlerin Ortalaması
FAO	“Food and Agriculture Organization”
gDNA	Genomik DNA
GS-MSAP	“Gene Specific Methylation Sensitive Amplification Polymorphism”
HCl	Hidroklorik asit
KAc	Potasyum asetat
KCl	Potasyum klorür
L.	Carl Linnaeus
LB	“Luria Broth”
LiCl	Lityum klorür
MA	Moleküler Ağırlık
MeDIP	“Methylation analysis by DNA immunoprecipitation”
MgCl ₂	Magnezyum klorür

MS	Metilasyon Sensetif
MSAP	“Methylation Sensitive Amplified Polymorphism”
mRNA	“Messenger RNA”
NaAc	Sodyum asetat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
PEG	Polietilen Glikol
PVPP	“Polyvinylpolypyrrolidone, Soluble”
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
RE	Restriksiyon Enzimi
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNaz	Ribonükleaz
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
QTL	“Quantitative Trait Locus”
S	“Svedberg”
SLS	Sodyum Laruil Sarkosil
snRNA	“Small nuclear RNA”
SS	Standart sapma
ssp	“Subspecies”
SSR	“Simple Sequence Repeat”
TBE	TRIS-Borik-Asit-EDTA
TE	“TRIS-EDTA”
TRIS	“Tris(hydroxymethyl)aminomethane”
USDA	“United States Department of Agriculture”
UTR	“Untranslated region”
UV	“Ultraviolet light”
ÜE	Üstün Ebeveyn
ZM & ZMK	<i>Zea mays</i>
5 ^m C	5-metilsitozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Bitki materyalinin serada yetiştirilmesi.	41
Şekil 3.2. NaCl ve 5-azaC uygulamalarının yapıldığı tohum ekim kalıbı ve çimlendirme blokları	42
Şekil 3.3. Plakalar üzerindeki bakteri kolonilerinin gelişimi.....	53
Şekil 3.4. CCGG metilasyon durumuna <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> restriksiyon enzimlerinin duyarlılıkları.....	63
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan mısır ebeveyn ve F ₁ bitkilerine ait a) koçanlar ve b) tohumlar.....	64
Şekil 4.2. Genotiplerin tohum ağırlıklarına göre tek yönlü varyans analiz sonucu	66
Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan mısır ebeveyn ve F ₁ bitkilerine ait kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulaması yapılan fideler	67
Şekil 4.4. Genotip ve uygulamaların fide ağırlıklarına ait iki yönlü varyans analiz sonucunun Tukey testi ile karşılaştırılması	68
Şekil 4.5. Sıvı azot ile doku parçalama ve DNA izolasyon işlemleri	70
Şekil 4.6. DNA kalite ve kantitesinin spektrofotometrik ölçümleri.	71
Şekil 4.7. Genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez analizleri	72
Şekil 4.8. Normalleştirilmiş (50 ng/µL) genomik DNA jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.9. ZM ve ZMK primerinin GS-MSAP markırları için tarama jel görüntüsü	73
Şekil 4.10. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası multipleks 1 ile GS-MSAP sonucu	77
Şekil 4.11. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası multipleks 2 ile GS-MSAP sonucu	78
Şekil 4.12. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası multipleks 3 ile GS-MSAP sonucu	79
Şekil 4.13. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası dupleks 1 ile GS-MSAP sonucu.....	80
Şekil 4.14. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası dubleks 2 ile GS-MSAP sonucu.....	80
Şekil 4.15. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası ZMK 04 primeri ile GS-MSAP sonucu	81
Şekil 4.16. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası ZMK 20 ile GS-MSAP sonucu	82
Şekil 4.17. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası 33.6 primeri ile MS-CULP sonucu	84
Şekil 4.18. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası YNZ 22 primeri ile MS-CULP sonucu	84

Şekil 4.19. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası URP 2F primeri ile MS-CULP sonucu	85
Şekil 4.20. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası metilasyon farklılığı tespit edilemeyen MS-CULP sonucu	87
Şekil 4.21. Genomik DNA'nın <i>MspI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile kesim sonrası OPR 2 primeri ile MS-CRALP sonucu.....	88



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	44
Çizelge 3.2. PZR’de kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	46
Çizelge 3.3. Amplifikasyon profili	46
Çizelge 3.4. Bisülfid reaksiyonlarında kullanılan dönüşüm profili	47
Çizelge 3.5. Bisülfid reaksiyonlarında kullanılan dejenerant primer çiftleri.....	48
Çizelge 3.6. PZR’da kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	49
Çizelge 3.7. Amplifikasyon profili	49
Çizelge 3.8. Çalışmada kullanılan gen spesifik metilasyon primer çiftleri ve amplifikasyonlarında kullanılan multipleks, duplex ve unipleks durumları.....	56
Çizelge 3.9. Gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yöntemindeki PZR’de kullanılan kimyasallar ve miktarları	57
Çizelge 3.10. Gen spesifik lokuslar için kullanılan amplifikasyon profili	57
Çizelge 3.11. Çalışmada kullanılan metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm primerleri	59
Çizelge 3.12. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm yöntemindeki PZR’de kullanılan kimyasallar ve miktarları	59
Çizelge 3.13. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm için amplifikasyon profili	60
Çizelge 3.14. Çalışmada kullanılan oligo primerleri	61
Çizelge 3.15. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm yöntemindeki PZR’de kullanılan kimyasallar ve miktarları	61
Çizelge 3.16. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm için amplifikasyon profili	62
Çizelge 4.1. Her bir genotipe ait 100 tane tohum ağırlığı	65
Çizelge 4.2. Kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulamaları sonucu fide ağırlıkları (g).....	69
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan DNA örneklerine ait spektrofotometre okumaları...	71
Çizelge 4.4. Bisülfid sekanslama (BiSeq) yönteminde kullanılan gen bölgelerine ait metilasyon adacık içerikleri ve sayıları.....	75

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artması ile artan nüfusun beslenme ihtiyacının karşılanması bakımından tarım alanlarındaki besin kaynaklarının maksimum seviyede olması, tüm dünya için olduğu kadar bitki biyoçeşitliliği ve genetik kaynakları bakımından zengin olan ülkemiz için de oldukça önemlidir (Arora vd. 2002). Tahıllar grubu tarla bitkileri ekim alanı içinde önemli yere sahip olmalarından dolayı ülkemiz ve tüm dünya için ekim ve üretim açısından başta gelen ürünler arasındadır (Süzer 1992). Tahıl grubunun önemli bir üyesi olan mısır bitkisinin dünya üzerinde çok geniş alanda yayılması ve farklı iklim özelliklerinde yetiştirebiliyor olması onu önemli bir kültür bitkisi haline getirmiştir.

Mısır (*Zea mays* L.) kullanım alanlarının artmasıyla önemi günden güne artan bir bitkidir. Önceden sadece insan ve hayvan beslenmesi için düşünülen mısır tanesi, kompozisyonunda taşıdığı besin maddeleriyle nişasta bazlı şeker sanayinin, bitkisel yağ sanayinin ve biyodizel yakıt üretiminde ham madde haline gelmiştir. Bu çoklu kullanım alanı mısırı önemli bir tane tarım ürünü haline getirmiştir. Mısır insan beslenmesinde buğday ve çeltikten sonra en fazla kullanılan bitkilerin başında gelmektedir. Dünyada tahıllar içinde 187.959.116 ha ekim alanı ile üçüncü, üretim açısından ise dünyada 1.060.107.470 ton ile ilk sırada yer alan önemli bir tahıl türüdür. Ülkemizde 679.537 ha ekim alanı ve 6.400.000 ton üretim miktarı ile buğday ve arpadan sonra en fazla üretilen önemli bir bitkidir (FAO 2016). Türkiye’de mısır üretiminin desteklenmesi nedeniyle ekim alanı ve üretim yükselmiştir. Yaklaşık 60 ilimizde mısır tarımı yapılmakta, bu üretimin % 68’i tane, %32’si silaj olarak değerlendirilmektedir (UHK 2016).

Buğdaygiller (*Poacea=Gramineae*) familyasının bir üyesi olan mısır, tropik, subtropik ve ılıman iklim kuşaklarına özgü, Antarktika haricinde, hemen hemen dünyanın her yerinde, 58° kuzey ve 40° güney enlemleri arasında kalan alanlarda, deniz seviyesinden başlayarak rakımı 4000 m’ye kadar olan bol güneş alan bölgelerde yetiştirebilen tek yıllık kısa gün bitkisi ve bir sıcak iklim tahılıdır.

Yüksek verimli ve üstün özelliklere sahip yeni mısır çeşitlerinin elde edilmesi mısır ıslah çalışmalarının yoğun olarak devam ettirilmesi ile gerçekleştirilebilir. Amaca yönelik uygulanabilecek ıslah çalışmaları içinde melezleme ıslahı önemli yer kapsamaktadır. Melez mısır ıslahı, kendilenmiş hatlar arasında ilk melez bitkinin yüksek verim elde etmek amacıyla üretime alınmasına katkı sağlar. Melez mısır ıslahı, kendilenmiş hatlar arasında ilk melez bireyin yüksek verim elde etmek amacıyla üretime alınmasına F₁ hibrit gücü ıslahı veya kısaca hibrit ıslahı da denmektedir.

Mısır bitkisinde F₁ hibrit çeşitleri ilk kez 20. yüzyılın başında Amerika Birleşik Devletleri’nde geliştirilmiştir. Ancak bundan çok daha önce tütün bitkisinde melezlerin ebeveynlerinden daha üstün olduğu gözlemlenmiş ve F₁ generasyonu bitkilerinin her zaman çok homojen olduğu saptanmıştır. 1800’lü yıllarda kendine döllenmenin bitkilerde gelişme ve verimlilik bakımından olumsuz sonuçlar ortaya çıktığı ve mısır bitkisinde kendilenmiş hatlarda bitki boyu bakımından azalmaların meydana geldiği, bu saf hatların kendi aralarında melezlenmesiyle normal boy ve büyüklüğün yeniden kazanıldığı ortaya konmuştur (Taba 1995; Sing 2001).

Melez mısırdaki görülen verim artışı heterosis adı verilen olgunun bir sonucudur. Heterosis, iki ebeveyn arasındaki melezlemeden elde edilen bireyin verim ve diğer

(büyüme hızı, erkencilik, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, çevre koşullarına dayanıklılık, kalite özellikleri) özellikler yönünden üstün olma durumudur. Melez bitki ıslahı çoğu bitkilerin ıslahında başarılı olduğu gibi ticari mısır endüstrisi için de son derece önemlidir (Sing 2001).

Heterosisin oluşumuna yönelik çok sayıda hipotez ortaya atılmış olmasına rağmen bunların hiçbirisi tek başına heterosisi açıklamaya yeterli olmamıştır. Bu hipotezlere örnek olarak dominansi hipotezi, üstün dominansi hipotezi, epistasis hipotezi, marjinal üstün dominansi hipotezi, pseudo üstün dominansi hipotezi, fitohormonlar hipotezi, DNA metilasyon hipotezi, metabolik denge hipotezi, metabolik kontrol hipotezi ve eksik genler için tamamlayıcı genler hipotezleri verilebilir (Hagemann ve Lambert 1988; Taba 1995; Tsafaris vd. 1997; de Vienne vd. 1999; Fu ve Dooner 2002; Akel vd. 2018; Lauss vd. 2018). Heterosis olgusunun ortaya çıkışı ile ilgili en eski hipotez yirminci yüzyılın başlarında (1910-1920) ortaya atılmış olan “dominantlık” hipotezidir. Bruce Keeble, Pellew Jones ve Collins tarafından ortaya atılan bu hipoteze göre heterosis dominant allellerin varlığında ortaya çıkmakta ve resesif allellerin varlığından etkilenmemektedir. Ancak resesif genlerin yüksek düzeyde varlığında ise gelişim olumsuz olarak etkilenmektedir. Diğer bir ifadeyle bu hipoteze göre heterosis fazla miktarda dominant allel içeren genotiplerde daha az içerenlere göre daha yüksek performansa sahiptir (Veita ve Vaiman 2010).

Heterosisi açıklayan hipotezlerinden biride yirminci yüzyılın ortalarına doğru (1940-1950) Hull, Crow, ve East tarafından ortaya konulmuştur. Bu hipoteze göre heterosis çok sayıdaki lokusta bulunan üstün dominantlıktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Üstün dominansi (overdominansi) hipotezi adı verilen bu sava göre dominant genleri heterozigot halde taşıyan bireyler aynı genleri homozigot halde bulunduranlardan daha güçlü olmasına sebep olmaktadır. Diğer bir ifadeyle heterosis heterozigotluk ile doğrudan ilişkilidir. Heterozigotluk durumu dominant ve resesif allellerin homozigot durumlarından daha etkindir. Alleller ne kadar farklı ise heterosis o denli güçlüdür. Ayrıca farklı allellerin bulunması kümülâtif etkiye sahiptir (Akel vd. 2018).

Yirminci yüzyılın sonlarında (1990-1999) ortaya atılan diğer bir hipoteze göre ise heterosis epistatik interaksiyonlardır. Pseudo-üstün-dominansi (“Pseudo-over-dominance”) hipotezi ise heterosisin genomda küçük bir bölgede bulunan iki veya daha fazla genin repulsiyon fazında (dominant genler bir kromozomda, resesif genler homolog kromozomda) bulunmasıyla hibritte üstün dominansinin oluştuğunu öne sürmektedir (Yu vd. 1997).

Kendilenmiş hatlar arasındaki genetik farklılık arttıkça heterosis oranı da yükselmektedir. Bu yaklaşım doğrultusunda test ediciler kendilenmiş hatların hangi heterotik gruba ait olduğuna dair bilgi vermektedir. Test edici ile iyi bir kombinasyon yeteneği gösteren hatların farklı bir heterotik gruba ait olduğu düşünülebilir. Fakat bu test edici (tester) ile iyi bir kombinasyon oluşturmeyen hatların her zaman test edici ile aynı grupta olacağı anlamına gelmez. Dünyada yaygın olarak kullanılan test edicilerden ikisi Lancaster heterotik grubunu temsilen Mo17, Reid heterotik grubunu temsilen ise B73 kendilenmiş hatlarıdır (Uhr ve Goodman 1995).

Gen anlatımı, sadece DNA’da bulunan baz dizileriyle değil aynı zamanda kromozomal yapıların da dahil olduğu DNA ile etkileşen protein, RNA ve diğer makro moleküllerle de kontrol edilir (Tchurikov 2005). Bu olayların DNA dizi değişimi dışında ortaya çıkan etkiler epigenetik etki olarak bilinmektedir. Diğer bir ifadeyle epigenetik terimi, DNA dizi değişimi olmaksızın sadece mitotik değil mayotik kalıtımla da meydana gelen gen ekspresyonundaki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (Wu ve Morris 2001). Ökaryotik hücrelerde gen anlatımı genetik düzenlemenin yanı sıra epigenetik olarak da kontrol edilebilmektedir. Bu epigenetik değişimler mitotik veya mayotik olarak nesiller boyu aktarılabilir. Epigenetik regülasyonlar genellikle histon modifikasyonları ve DNA sitozin metillenmesi aracılığıyla olmasına karşın aynı zamanda; özellikle snRNA’lar ile kodlanmayan RNA’ların üretilmesiyle ve işleviyle de gerçekleşmektedir (Huettel vd. 2006; Henderson ve Jacobsen 2008; Karaca vd. 2016).

DNA molekülünde özel pozisyonlarda bulunan C (sitozin) metilasyonu epigenetik düzenlemeler arasında en iyi anlaşılmış olan mekanizmadır (Bestor 2000; Bird 2002). Bitki genomlarında en yaygın DNA metilasyonu sitozin bazında gerçekleşmekte olup bu nedenle metil sitozin, beşinci baz olarak da adlandırılmaktadır. Bitki genomlarının spesifik bir özelliği olarak sitozin metilasyonu aralarında DNA replikasyonu ve onarımı, gen transpozisyonu ve transkripsiyonu, hücre farklılaşması ve gen suskunluğu, imprinting, biyo-savunma, transgen anlatımı, hücrede yabancı gen anlatımının da yer aldığı bir çok genetik fonksiyonla ilgilidir (Zhu 2009). Sitozinin beşinci atomunun metillenmesi bitkilerde ve memelilerde en çok çalışılmış epigenetik değişimlerden biridir. Bitki genomunda metillenmiş sitozinler genellikle CG, CHH veya CHG [H; Adenin (A), Timin (T) veya Sitozin (C)] dizilerini içeren bölgelerde yer almaktadır (Cokus vd. 2008; Karaca vd. 2016).

Çok sayıda çalışma DNA sitozin metilasyonu ve heterosisi içeren epigenetik etkileri ortaya koymuştur. Birçok çalışma heterotik F₁ hibritlerindeki sitozin metilasyonunun farklılıklarını ebeveynlere kıyasla tespit etmiştir. Ancak literatürde bisülfid sekanslama yöntemi (BiSeq), MSAP ve RFLP-PCR yaklaşımlarının tuz; örneğin NaCl, demetilasyon ajanı; örneğin 5-azaC uygulamalarıyla birlikte kullanıldığı çalışma sayısı sınırlıdır.

DNA metilasyonunun belirlenmesinde birbirlerinden farklı değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında yüksek performanslı (basınçlı) likit kromatografi, ince tabaka kromatografi, metilasyon duyarlı spesifik polimeraz zincir reaksiyonu, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP), metilasyon duyarlı çoğaltılmış fragman polimorfizmi (MSAP), birleştirilmiş bisülfid restriksiyon analizi (COBRA), metilasyon duyarlı tek nükleotit uzatımı, metilli DNA iminopresipitasyonu (MeDIP), hibridizasyon arayıcıları, restriksiyon genomu taraması, bisülfid uygulamasından sonra yeni nesil sekanslama, tek molekül gerçek zamanlı DNA sekanslaması ve benzeri yöntemlerdir (Guangyuan vd. 2007; Hetzl vd. 2007; Salmon vd. 2008; Coa vd. 2011; Hegarty vd. 2011; Long vd. 2011; Li vd. 2011; Wang vd. 2011; Karaca vd. 2016).

DNA metilasyonunun tespitinde kullanılan yaygın yöntemlerin başında ise restriksiyon enzim tabanlı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerde en etkin olarak kullanılanlar restriksiyon enzimleri izosizomerleridir. Örneğin AFLP yönteminin bir modifikasyonu olan MSAP yönteminde *HpaII* ve *MspI* izosizomerleri kullanılmaktadır. Her iki enzim hedef bölgede (5'-CCGG-3') bulunan dizileri tanımakta ancak kesme

işlemlerinde farklılıklar göstermektedir. Örneğin *HpaII* enzimi 5'-CCGG-3' dizisindeki sitozinlerin her ikisi metillenmiş ise kesme işlemini gerçekleştirememektedir. Ancak 5'-CCGG-3' dizisinde bulunan tek bir sarmaldaki sitozin metillenmiş ise kesme işlemini gerçekleştirmektedir. *MspI* enzimi ise dizideki her iki sarmalda da iç bölgede yer alan sitozin metillenmiş yani 5'-C^mCGG-3' ise kesim yapmakta ancak dıştaki 5'-^mCCGG-3' metillenmiş ise kesim yapmamaktadır. Böylece iki farklı organizma genomları veya aynı organizmanın farklı dokuları arasındaki hedef bölgelerde var olan metilasyon polimorfizmi tespit edilebilmektedir (Li vd. 2011). Bu yöntemin en büyük dezavantajı enzim tabanlı olması nedeni ile kesim polimorfizminin DNA'nın kalitesiyle ilişkili olması ve sadece CG motiflerinde metilasyonu belirleyebilmesidir. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise polimorfizmi fragman tabanlı olup metilasyonun DNA düzeyinde belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duymasındır. Ancak maliyetinin düşük olması analizlerin kolay olması küçük laboratuvarlara uygun olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Lele vd. 2018).

Metilasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan ve sürekli yeni tekniklerle desteklenen yöntem ise bisülfıt dönüşüm veya bisülfıt sekanslama olarak bilinen yöntemdir. Bisülfıt sekanslama yönteminde (BiSeq) bisülfıt uygulaması ile genomik DNA sodyum bisülfıt ile muamele edilerek 5-metilsitozin (5-^mC) ve hidrokسيمetilsitozin dışındaki metillenmemiş sitozinler (CG, CHC ve CHH), urasilе dönüştürölmektedir. Dönüştürölmüş urasil ise polimeraz zincir reaksiyon çalışmaları ile timin olarak çoğaltılmaktadır. Metilli sitozinler ise polimeraz zincir reaksiyonunda sitozin olarak kalmakta böylelikle klonlama ve sekanslama analizleri ile metilli ve metilsiz sitozinler ortaya konulabilmektedir (Karaca vd. 2016). Bisülfıt sekanslama yöntemi günümüzde gen ve gen elementlerinde sitozin metilasyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmakta ve literatür de altın standart yöntem olarak nitelendirilmektedir. Bu yöntem kullanılarak hedef DNA dizisi üzerindeki bütün sitozin metilasyonunu ortaya koyması bakımından önemlidir.

Metilasyonun düzeylerinin tespitinde yaygın olarak kullanılan MSAP ve bisülfıt dizileme (BiSeq) yöntemlerinden başka yöntemlerinde kullanılmasında yararlar bulunmaktadır. Bu yöntemler MSAP ve BiSeq yöntemleriyle ortaya konulamamış metilasyon farklılığının belirlenmesine yardımcı olabilecektir. Bu tezde bu nedenle hedef spesifik genlerde ve bütün genomda metilasyon düzeylerinin tespitinde kullanılabilecek diğer yöntemlerde kullanılmıştır. Bu yöntemlerden ilki MSAP yönteminin bir modifikasyonu olan gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm [Gene Specific Methylation Sensitive Amplified Polymorphism; (GS-MSAP)], ikincisi DAMD-PCR tekniğinin bir modifikasyonu olan metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm [Methylation Sensitive-Cleaved Universal Length Polymorphism, (MS-CULP)] yöntemi ve üçüncüsü ise RAPD yönteminin bir modifikasyonu olan metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm [Methylation Sensitive Cleaved Random Amplified Length Polymorphism (MS-CRALP)] yöntemidir.

Çalışmada mısır bitkisi seçilmiş olmasının temel nedenlerinden biri heterosis çalışmalarında neredeyse model ve öncü bir bitki olması, diğer taraftan diploit ve küçük genoma sahip olmasının dışında ekonomik önemi olan ve her geçen gün artan katma değerler yaratan bir tarla bitkisi olması da göz önüne alınmıştır.

Bu tez çalışmasının ana hedefi heterosis olgusunun ortaya çıkmasında DNA metilasyonunun rolünün tespit edilmesidir. Heterosisin ortaya çıkmasını kolaylaştırmak amacıyla iki farklı heterotik grubu temsil eden iki kendilenmiş mısır hattı kullanılmıştır. Hedeflenen amaca ulaşabilmek adına (i) homozigot ve heterozigot bireylerde DNA metilasyon düzeyleri ve F_1 bitkisinde heterosis (tohum ağırlığı ve 6. gün fide ağırlığı şeklinde) belirlenmiş, (ii) NaCl uygulamasının homozigot ve heterozigot bireylerde DNA metilasyon veya demetilasyon etkileri ortaya konulmuş, (iii) 5-azaC'nin homozigot ve heterozigot bireylerde DNA metilasyon veya demetilasyon etkileri ortaya konulmasında kullanılabilecek bisülfid primer setleri belirlenmiş ve bisülfid sekanslama yönteminde kullanılmış, (iv) GS-MSAP primer çiftleri belirlenmiş ve bazı multipleks PZR setleri oluşturulmuş, (v) MS-CULP ve MS-CRALP teknikleri ve tekniklere uygun primer setleri belirlenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Mısır Bitkisi

İnsanlık tarihinin en önemli devrimi şüphesiz tarımdır. Amerika'nın keşfi ile insanlığın birçok tarım bitkisine sahip olduğu görülmüştür. Mısır bitkisi de bunlardan biridir. Mısırın bilimsel sınıflandırılmasında cinsi *Zea* olarak, türü ise *mays* olarak bilinmektedir. Familyası *Poaceae* (Buğdaygiller) adıyla bilinen mısırın 7 alt türü bulunmaktadır; *Zea mays indurata* (sert mısır), *Zea mays indentata* (at dişi mısır), *Zea mays everta* (cin mısır), *Zea mays saccharata* (şeker mısır), *Zea mays amylaceae* (unlu mısır), *Zea mays ceratina* (mumlu mısır), *Zea mays tunicata* (kavuzlu mısır). (Russell ve Hallauer 1980; Güvercin 2011; Liu vd. 2014).

Modern mısır genotipleri Meksika, Orta ve Güney Amerika yerlileri tarafından ilkel mısır populasyonları arasından seleksiyonla elde edilmiştir. Mısır ırklarının ayrışımı kendi içerikleri nedeniyle gıda, içecek ve ilaç üretiminde kullanılmış ve bu nedenle bugün eşsiz özelliklerde, kimyasal bileşenleri ve yapısı bakımından farklılıklara neden olmuştur (Swanson-Wagner vd. 2006; Ji vd. 2014).

Mısır bitkisinin milattan önce 8000-6000 yıllarında Meksika ve Guatemala (Mezoamerika)'da ortaya çıktığı öngörülmektedir. Mısır bitkisinin teosinte ile benzerliğin (yabani mısır ve yabani teosinte'nin her ikisinin geldiği atasal bir bitki olmaması, yabani mısır ve yabani teosinte arasında belirgin morfolojik, izozim ve DNA düzeyinde benzerliklerin olması) bulunması nedeniyle teosinteden türediği kabul edilmektedir (Taba 1995). Teosinte, Guatemala ve Meksika'da doğal bitki olarak bulunur. Teosinte Meksika'nın endemik bitkisidir. Bundan dolayı mısırın orijinin Meksika olduğu düşünülmektedir (Smith 1988). Mısırın teosintenin dipten dallanan alt türü *Zea mays* L. ssp. *Parviglumis*' in kültüre alınmasından mı orijinini aldığı ya da yandan dallanan alt tür *Z. mays* L. ssp. *Mexicana*'dan mı orijinini aldığı konusu günümüzde de tam olarak bilinmemektedir. Teosintenin yabani tek yıllık formları mısır bitkisi ile aynı kromozom sayısına sahiptir ve fertil döller elde etmek için mısırla kolaylıkla melezlenebilmektedir. Mısır gibi teosinte de çiçeklenme bakımından tek evcikli olup monoik bitkidir. Dişi ve erkek çiçekler aynı bitkide farklı yerlerde meydana gelmektedir (Yeşilkaya 2013).

2.2. NaCl ve 5-AzaC Uygulamalarında DNA Metilasyon Değişiklikleri

2.2.1. NaCl uygulamaları ve DNA metilasyon çalışmaları

Tuzluluk tarım alanları verimini tehdit eden temel stres faktörlerinin başında gelmektedir. Tahıllar olumsuz şartlarda hayatlarını devam ettirebilmeleri için çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerle bu olumsuz şartlara karşı kendini koruma altına almaktadırlar. Araştırmacılar mevcut tarımsal alanlarda strese toleranslı bitkileri geliştirerek bu durumun üstesinden gelmeyi amaçlamışlardır (Bartels ve Sunkar 2005; Liu vd. 2008).

Yüksek NaCl konsantrasyonu, bitkideki su potansiyelini ve iyon dengesini hem hücresel düzeyde hem de diğer iletim dokularında bozmaktadır. Su ve iyon dengesindeki etkili değişimler bitkide moleküler hasarlara, büyümenin aksamasına hatta bitkinin ölümüne sebep olabilir (Zhu 2001). Yüksek tuzluluk, osmotik ve iyonik streslerin yanı sıra hormonal ve besin dengesizlikleri gibi diğer streslere de sebeptir (Messedi vd. 2004;

Hamed vd. 2007; Türkan ve Demiral 2009). NaCl stresi, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olarak oksidatif hasara da sebep olmaktadır (Türkan ve Demiral 2008).

Mısır NaCl stresine orta derece hassas bir bitkidir. Bu nedenle toprak tuzluluğu mısır için önemli bir tehdittir. Mısırdaki NaCl stresi büyümeyi ve gelişmeyi etkiler ancak bitkilerin tepkisi stres ve bitki büyüme aşamasına göre değişir. Mısır bitkisinin NaCl stresine kısa süreli maruz kalması ozmotik stres nedeniyle bitki büyümesini etkiler (Farooq vd. 2015).

DNA metilasyonu, bitkilerin optimal olmayan koşullara maruz kaldığı durumlarda, hem transkripsiyon hem de transkripsiyonel seviyelerde gen ifadesini ayarlamak için bitkilerin kullandıkları mekanizmalardan birisidir. Abiyotik stres altında, farklı çeşitler genellikle DNA metilasyon seviyesinde epigenetik polimorfizmlerin eşlik ettiği kalıtsal fenotipik varyasyon gösterirler. Bu varyasyon, NaCl toleransı da dahil olmak üzere abiyotik stres toleransını arttırmayı amaçlayan bitki yetiştirme programları için yeni yaklaşımlar sağlayabilir (Al-Lawati vd. 2016).

Çeşitli çevresel ve genetik uyarıların metilasyonu değiştirdiği bilinmektedir. Abiyotik stres, genom boyunca ve spesifik lokusta sitozin metilasyonunda artışa veya azalmaya neden olabilir (Lukens ve Zhan 2007). Mısır bitkisinde stres kaynaklı metilasyon değişimini temsil eden fragmanların bazılarının bilinen genlerin sekanslarına homolog olduğu ve stres tepkilerinde bir rol oynayacağı bulunmuştur (Tan 2010).

DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar, genom düzeyinde gen ifadesini farklı şekilde düzenleyerek fizyolojik ve gelişimsel mekanizmaları ayarlayarak çevresel strese karşı bitki cevabında anahtar bir rol oynarlar (Maury vd 2008; Angers vd 2010). Demetilasyon genellikle bitkiler abiyotik strese maruz kaldıklarında işlevsel olarak aktif olmayan bazı genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar (Santos vd. 2011).

Yaish vd. (2018) DNA metilasyonunun gen ekspresyonunu kontrol etmede potansiyel bir rolü olduğunu ve bu nedenle, bitkilerde tuzluluk adaptasyonuna katkıda bulunabileceğini öngörmüşlerdir. Orta derecede tuzluluğa tolerant baklagil model bitki olan *Medicago truncatula* yaptıkları çalışmada, kontrol veya NaCl koşullarına maruz kalan kök dokulardan ekstrakte edilen DNA örnekleri kullanılarak bir diferansiyel tam genom bisülfid dizilimi gerçekleştirmişlerdir. Yaklaşık 50 milyon farklı metillenmiş bölge tanımlanmış ve bu bölgelerin % 7'si tuzluluğa yanıt olarak önemli ölçüde değişmiştir. Bu analizle metillenmiş bölgelerin % 77.0'nin ³CHH olduğunu, sırasıyla sadece % 9.1'inin ve % 13.9'unun ³CHG ve ³CG olduğunu göstermişlerdir. Metilasyon seviyesindeki ortalama değişim tuzluluk stresinden dolayı % 3.8 ile % 10.2 arasında tüm sekans içeriklerinde arttığını söylemişlerdir. Tuzluluk nedeniyle DNA metilasyonundaki global artışını mass spektrofotometri analizi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, tuzluluğun DNA metilasyonu üzerindeki etkisini ve bitkilerin, tuzluluğa karşılık olarak, gen yapıları boyunca DNA'daki 5-metilsitozin nükleotidinin görünüşünü nasıl yeniden şekillendirebileceğini göstermişlerdir. Bu yeniden modelleme, gen bölgeleri arasında ve 5-metilsitozin dizi içerikleri arasında değiştiğini ve ³CG, NaCl toleranslı mekanizmalarda potansiyel olarak önemli birkaç genin ekspresyon seviyeleri üzerinde belirsiz bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Kumar vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada buğday genotiplerini karşılaştırarak filiz ve kök dokularındaki global 5- metilsitozin için şunları ortaya koymuşlardır: NaCl'e duyarlı genotipin kontrol koşulları altındaki sürgün ve kök dokularındaki metilasyon seviyelerinin (% 4.05–% 6.70) NaCl toleranslı genotipteki metilasyon seviyelerine (% 3.45–% 5.40) göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Wang vd. (2016) pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) NaCl toleransı ve heterosisin moleküler mekanizmasını araştırmak için, bir pamuk hibrit CCRI 29 ve iki ebeveyninde DNA metilasyon seviyesini analiz etmek için kapiler elektroforeze dayanan bir metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizmi yöntemi kullanmışlardır. Buldukları en önemli sonuç ise şöyledir: İlk olarak, NaCl tolerans testi hibrit CCRI 29'un her iki ebeveyninden daha yüksek NaCl tolerans düzeyine sahip olduğunu göstermiştir. CCRI 29'a yapılan NaCl muamelesi global DNA metilasyon seviyesini önemli ölçüde arttırmış, iki ebeveynin NaCl muamelesi ve kontrol arasında önemli ölçüde değişiklik bulmamışlardır. Her türlü DNA metilasyon varyasyonu, pamukta NaCl muamelesi altında gerçekleşmiş olduğunu, hipermetilasyon CCRI 29'daki hipometilasyondan anlamlı derecede daha yüksek bir oranda meydana geldiğini ancak ebeveynlerde görülmediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmadaki sonuçlar, pamuk genomunda global DNA metilasyon düzeyinin artmasının ve ayrıca farklı metilasyon tiplerinin pamukta NaCl ile muamele toleransında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. İkinci olarak NaCl stresinden sonra hem hipometilasyon hem de hipermetilasyon farklı genlerde meydana gelmiş ve bazı genler ise aynı metilasyon seviyesini sürdürdüğünü belirtmişlerdir. Bu durumu şöyle yorumlamışlardır pamukta NaCl stresine cevap verirken gen ekspresyon değişiklikleri meydana gelmiş ve bu, belirli genlerin NaCl toleransında oynadığı rollerin karmaşık özelliklerini göstermiştir. Üçüncü olarak, hibrit CCRI 29'daki çoğu sitosin metilasyon bölgesi paylaşılmış olsa da ebeveynlerin en az birininkiyle aynı statü, hipermetilasyonun bölge sayısı CCRI 29'daki hipermetilasyondan, hem kontrol hem de NaCl stresi altındaki ebeveynlere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuşlar bu da demetilasyonun, pamukta heterosisi açıklayan mekanizma olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Al-Lawati vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada artan NaCl konsantrasyonlarına (0.0, 8.0, 12.0, and 20.0 dS/m) maruz bırakılan yonca (*Medicago* spp.) köklerindeki sitozin metilasyon düzeylerini değerlendirmek için MSAP analizi kullanmışlardır. Kontrol olarak kullanılan NaCl'e toleranslı çeşitlerin yanı sıra 11 tane yöreye özgü kültüre alınan bitki analiz etmişlerdir. Yüksek seviyede toprak tuzluluğuna maruz kalanlarda DNA metilasyon artışı gözlemlenmiştir. MSAP kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda NaCl'e maruz kaldıklarında kültüre alınan yoncalar arasında epigenetik varyasyon gözlemlenmiştir. MSAP ve enzime bağlı immünosorbent analiz sonuçlarına dayanarak, tuzluluk oranının, özellikle en yüksek tuzluluk oranına (20 dS/m) maruz kalan bitkilerde global DNA metilasyon durumunu artırdığını tespit etmişlerdir.

Wang vd. (2015) çeltikte yaptıkları bir çalışmada IL177-103 ve IR64 çeşitlerini kullanmışlardır. IR64, Asya ülkelerinde yetiştirilen NaCl'e duyarlı bir çeşit olup IL177-103, NaCl dayanıklı bir çeşittir. İki genotip arasındaki genetik analiz farklılıkları için SSR markırları kullanmışlardır. IL177-103'ün altı genomik segmentte IR64'den farklı olduğunu belirlemişlerdir. Yine bu çalışmada NaCl stresine maruz bırakılan iki farklı çeltik genotiplerinin NaCl stresi kalktıktan sonraki durumlarına göre yapraklarında az miktarda DNA metilasyon seviyelerinin değişiklikleri ile sonuçlandığını fakat aynı

durumda her iki genotipin kökleri için DNA metilasyonundaki değişiklikler önemli derecede sonuçlanmadığını öne sürmüşlerdir.

Tan (2010) yaptığı çalışmada su stresinin genellikle transkripsiyonu baskılayan sitosin metilasyonunu değiştirdiğini söylemiştir. Bununla birlikte, ozmotik stres altında ki mısırdaki metilasyon değişikliği rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu çalışmada mısır fidelerinde PEG veya NaCl ile indüklenen metilasyon değişimini taramak için MSAP yöntemi kullanmışlardır. Bunun sonucuna göre tam metilasyon ister yapraklarda ister köklerde olsun hemimetilasyondan daha sık meydana gelmiş ve yapraklarda köklere göre hem tam metilasyon hem de hemimetilasyon daha fazla tespit etmişlerdir.

Zhao vd. (2010) yaptıkları bir araştırmada pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) DNA metilasyonu ve abiyotik stres tepkileri arasındaki ilişkiyi incelemek için metilasyon düzeyindeki farklılıklar ve tuz stresi altında iki farklı NaCl dayanıklı pamuk hatlarında sitosin metilasyon paternlerinin değişiminin araştırılması için MSAP yöntemini kullanmışlardır. Sonuçlar, yüksek NaCl toleranslı pamuk hattının CCGG bölgelerinin sitosin metilasyon sayısının, düşük NaCl'e toleranslı pamuk hattına göre daha az olduğunu göstermişlerdir. NaCl stresine bağlı demetilasyon lokusu yüksek tuz toleransına sahip pamuk hatlarında, düşük NaCl toleransına sahip pamuk hatlarına göre daha büyük oranda meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Pamukta demetilasyonun NaCl toleransına olumlu katkıda bulunduğunu ve hipermetilasyonun NaCl toleransı üzerinde olumsuz etki yarattığını öne sürmüşlerdir.

Zhong vd. (2009) yaptıkları çalışmada, NaCl toleransı (NaCl toleranslı Dekang-961 ve duyarlı Lumai-15) bakımından iki *Triticum aestivum* çeşidinde NaCl stresinin neden olduğu DNA metilasyon değişimini karşılaştırmışlardır. Farklı NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılan kök DNA'sının genomunun 5'-CCGG-3' sekansının metilasyon durumundaki değişiklikler NaCl ile muamele edilmemiş bitkilerle MSAP yöntemiyle karşılaştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucu Dekang-961 kontrol bitkilerinin 5'-CCGG-3' dizilerinin Lumai-15'inkinden daha fazla metillenme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Dekang-961 ve Lumai-15'in her ikisinde de NaCl muamelesi demetilasyon ve hipermetilasyona yol açtığını ve NaCl stresine maruz kalan bitkilerde DNA metilasyonunun değişeceğini belirtmişlerdir. Bu değişikliklerin NaCl stresi altında bitki adaptasyonu için bir mekanizma önerebileceğini öne sürmüşlerdir.

Lu vd. (2007) pamuğun tuzluluk stresine bağlı DNA metilom değişimlerinin iyi anlaşılmadığı için bu çalışmada metillenmiş DNA immunopresipitasyon sekanslama metodu kullanılarak NaCl stresi altındaki pamuk yapraklarının tam genom metilasyon karakterlerinin haritalamasını yapmışlardır. Sonuçlar diğer kromozomlarla karşılaştırıldığında kromozom 9 üzerinde metilasyonun olduğunu göstermiş fakat en büyük değişiklik NaCl stresi altındaki kromozom 8'de meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

2.2.2. 5-azaC uygulamaları ve DNA metilasyon çalışmaları

5-azasitidin (5-azaC), DNA metilasyonunun bir inhibitörü olarak etki eder ve yaşlanmadan sorumlu genler dahil olmak üzere bazı genlerin ekspresyonunu indükler (Shkute 2005).

Bir baz analogu olan 5-azaC, DNA’da sitozinin yerine girer. Bu molekül kimyasal olarak metillenmediği için girdiği bölgelerde metillenme derecesi düşer. Bu molekülün DNA’ya aktarılması gen ifadesini değiştirir. Bir genin metillenmesi ile ifadesi arasında ters bir ilişki vardır. Yani düşük derecede metillenme, yüksek oranda gen ifadesi anlamına gelmektedir (Li vd. 2015).

Hipometilasyon ajanları yaygın olarak genom çapında demetilasyonun sonuçlarını incelemek için kullanılır. 5-azaC, bir sitozin analogudur. 5-azaC muamelesinin bitki türlerinin morfolojik, moleküler ve sitolojik özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmesi DNA metilasyonunun fonksiyon ve mekanizmasını keşfetmek için önemlidir. Örneğin, 5-azaC muamelesi, yumru içeren *Solanum* türlerinin fenotipik plastisitesini ve çok çeşitli türlerde DNA metilasyonu ve mikroRNA birikimi arasındaki ilişkiyi geliştirebilir. Yapılan birkaç çalışma, reaktif 5-azaC’nin DNA demetilasyonunun bitki morfolojisi ve gelişimini etkilediğini göstermiştir. 5-azaC muamelesinin ıspanak büyüme ve gelişimini yoğun bir şekilde etkilediğini bulmuşlardır. 5-azaC bileşiği, hem hayvanlarda hem de bitkilerde DNA metilasyonunu inhibe eder (Gao vd. 2014). 5-azaC tarafından indüklenen fenotipik değişiklikler daha önce çeltik, lahana, petunya, buğday gibi çeşitli bitki türlerinde gözlemlenmiştir (King vd. 1995). Önceki çalışmalarda, metilasyon paternlerinin, özellikle de demetilasyon olaylarının, muamele edilmemiş ve 5-azaC ile muamele edilmiş bitkileri arasında farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, büyüme ve gelişmeyi düzenleyen bazı genlerin, demetilasyona yol açan ilacın yüksek konsantrasyonları varlığında, gen aktivitelerini, bitki büyümesini ve gelişimini etkileyebilecek şekilde demetilasyona tabi tutulabileceğini düşündürmektedir (Li vd. 2015).

Alüminyum (Choi ve Sano 2007), ağır metaller ve su stresi (Aina vd. 2004), genomdan ve spesifik lokuslardan sitozin metilasyonunda artışa veya azalmaya neden olabilir. 5-azaC ile muamele, vernalizasyon gerektiren bitki türlerinde düşük sıcaklık muamelesi ile yer değiştirebilir (Yong vd. 2003).

Li vd. (2015) ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) bir çift homomorfik cinsiyet kromozomu X ve Y ile diploid bir dioik bitki olduğunu ve genom epigenetik modifikasyonu için bilinen bir süreç olan bitki DNA metilasyonu, bitkilerde gen ekspresyonunu düzenlediğini söylemişlerdir. Ispanak tohumları, ıspanak büyümesi ve cinsel gelişim üzerine DNA metilasyonunun etkilerini araştırmak için, 5-azaC demetilasyon reaktifi ile muamele etmişlerdir. Elde edilen fenotipler, çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, bitki boyu, çiçeklenme zamanı ve cinsel fenotip dahil olmak üzere araştırmışlardır. Sonuçlar düşük bir konsantrasyonda (30 μ M) 5-azaC’nin ıspanak gelişimini çok az etkilediğini ancak tohum çimlenmesini desteklediğini göstermiştir. Çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve bitki boyu 100-1000 μ M’de 5-azaC ile negatif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Çiçeklenme süresinin 5-azaC ile dört muamelenin de (30, 100, 500, and 1000 μ M) tümünde önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca 5-azaC, ıspanağın cinsel fenotipini etkilemiş ve monoik bireylerin yüzdesini önemli ölçüde artırmıştır. Sonuçlar olarak, vejetatif ve reproduktif büyüme DNA metilasyonu ile epigenetik olarak düzenlenebileceğini öne sürmüşlerdir.

Kondo vd. (2010) yaptıkları çalışmada 5-azaC, uzun gün bitkisi olan *Silene armeria* ve kısa gün bitkisi olan *Perilla frutescens* de çiçeklenmeye sebep olduğunu öne sürmüşlerdir. İndükleyici olmayan fotoperiyodik koşullar altında fotoperiyodik

çiçeklenme ile ilişkili genlerin ekspresyonunun DNA metilasyonu ile düzenlendiğini düşünmüşlerdir. Çiçekleri 5-azaC ile indüklenen bitkilerin yavru dölleri, indükleyici olmayan fotoperiyodik koşullar altında çiçek vermediğini görmüşlerdir. *Perilla frutescens* 5-azaC ve kontrol dölllerinden genomik DNA'nın metilasyon durumunda farklılıklar olamadığını DNA jel blot hibridizasyon analizi ile ortaya koymuşlardır. Sonuçlar yavru döllerde yeniden üretilen DNA demetilasyonu tarafından çiçeklenmeyle ilgili genleri aktif hale getirdiğini söylemiştir. Bu yeniden metilleme sistemi, her jenerasyonda indükleyici fotoperiyodik koşullara yanıt olarak genlerin demetilasyonuna izin verebileceğini söylemişlerdir. 5-azaC muamelesinin *Perilla frutescens*'de cüceleşmeye neden olduğunu ve bu özelliğinde yavru bireylere kalıtıldığını söylemişlerdir. 5-azaC indüklenmiş cücelik ve demetilasyon/remetilasyon sistemi aralarında benzer ilişkiler kuramamışlardır. Genom çapında metilasyon değişiklikleri, *Perilla frutescens*'de MSAP analizi ile incelemişler ve sonuçlarda da DNA metilasyon durumunun fotoperiyodik koşullar ile değiştirildiğini göstermişlerdir.

Kondo vd. (2006) 5-azaC ile muamele, uzun günlerde kısa gün bitkisi olan *Perilla frutescens* L.'de çiçeklenmeleri uyarıldığını tespit etmişlerdir. 5-azaC muamelesi, bitkisel büyümenin hafif baskılanmasına neden olmuş, ancak başka fenotipler üzerinde belirgin bir etki yaratmadığını rapor etmişlerdir. 5-azaC ile muamele edilmiş bitkilerin yapraklarından izole edilen ve *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesimi yapılan genomik DNA'nın southern hibridizasyon analizi yöntemi ile 5-azaC muamelesinin demetilasyona neden olduğunu tespit etmişlerdir. 5-azaC kaynaklı çiçeklenmenin, kısa gün kaynaklı çiçeklenmeye kıyasla geciktiğini gözlemlemişlerdir. DNA demetilasyonu *Perilla frutescens* bir çiçeklenme uyarımının üretimini indükleyerek çiçeklenmeyi başlattığını ve çiçeklerin, 5-azaC ile doğrudan muamele edilmeyen alt boğumlarda bile oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Fieldes ve Harvey (2004) ketende (*Linum usitatissimum*) erken çiçeklenen hatların 5-azaC tarafından uyarıldığını söylemişlerdir. Her bir erken çiçeklenen hatta vejetatif büyüme ve faz geçişi üzerinde pleiotropik etkileri olan ancak çiçek morfogenezinde hiçbir etkisi olmayan erken çiçeklenme fenotipi üç bağımsız lokustaki değişikliklerle kontrol edildiğini öne sürmüşlerdir. Büyüme gelişiminin karşılaştırıldığı çalışmada fide ve genç bitkilerde erken çiçeklenen hatlar ile bunların kontrolleri arasında birkaç farklılık saptamışlar ve gözlenen farklılıklar, erken çiçeklenme hatlarında normalden büyüklüğünün daha küçük ve büyüme oranının daha yavaş olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu hatlar ile onların kontrolleri arasındaki gelişimsel programdaki temel fark erken çiçeklenen hatlarda geç kalan vejetatif dönemi meydana geldiğini ve erken çiçeklenen hatlar, normal yaprak sayısının yaklaşık yarısını oluşturduğunu ve kontrollerinin aksine ana gövde üzerinde üretilen toplam yaprak sayısı ile bir dizi farklı koşullar altında yetiştirildikleri çiçeklenme yaşı arasında bir ilişki göstermişlerdir. Bu hatlar ve bunların kontrolleri arasındaki farklılıkların çoğu erken çiçeklenme hatlarındaki geç vejetatif fazın hızlanmasına bağlandığını rapor etmişlerdir.

Tatra vd. (2000) *Stellaria longipes*'lerinin iki ekotipinde kök uzamasının ışınım aracılı plastisitesine genomik sitosin metilasyonunun yanıtını araştırmışlardır. *Stellaria longipes* sürgünleri yüksek ve düşük oranlarda kırmızı ve uzak kızıl ışık altında yetiştirmişlerdir (sırasıyla kırmızı: uzak kızıl; 3.7 ve 0.7). Kök uzama ve metillenmiş sitozin içeriğini 7 günlük bir süre boyunca ölçmüşlerdir. *Stellaria longipes*'in sürgünleri, 4 gün boyunca uzun süreli sıcak muamelesinden sonra en yüksek demetilasyon düzeyini

göstermiş olduğunu, bu da hızlı kök uzama başlangıcının ilk günü ile olduğunu öne sürmüşlerdir. Özellikle, düşük kırmızı: Uzak kızıl ışık oranlarıyla muamele edilen bitkiler daha düşük bir metilasyon seviyesi sergilediklerini tespit etmişlerdir. Metilleme derecesinin, gövde uzama tepkisinin kontrol edilmesinde önemli bir faktör olup olmadığını araştırmak için, hem alp bitkileri hem de çayır bitkilerinin sürgünleri, 5-azaC ile desteklenmiş MS (Murashige ve Skoog) ortamında 14 gün boyunca büyütülmüşlerdir. 5-azaC muameleleri, alp bitkilerine göre çayır ekotipi bitkilerinin kök uzamasını daha fazla teşvik etmesi amacıyla alp bitkilerinin çayır ekotip bitkilerinden daha yüksek 5-azaC ve dolayısıyla daha düşük metilasyon seviyelerine ihtiyaç duyduğunu rapor etmişlerdir.

Fieldes ve Amyot (1999) yaptıkları çalışmada kısa, erken çiçek açan bitkilerden elde edilen 6 tane keten bitkisi (*Linum usitatissimum*) hattını, 5-azaC ile muamele edilmiş tohumlardan yetiştirilen bitkilerin birinci nesil döllerini olduğunu söylemiştir. Hatların üçüncü ve dördüncü döl jenerasyonları ve üç hat arasındaki melezlerin F₁ ve F₂ döllerini ve onların muamele edilmemiş kontrolleri indüklenen fenotiplerin nispeten stabil kalıtımını gösterdiğini ve indüklenen değişikliklerin genetik kontrolü hakkında bilgi sağladığını rapor etmişlerdir. İndüklenen fenotiplerin bazı versiyonları saptamışlar, ancak yavru nesillerinde gözlenen fenotipik değişkenliğin büyük bir kısmı segregasyona dayandırmışlardır. Segregasyon modelleri, erken çiçeklenme fenotipinin, 5-azaC ile indüklenen değişikliklerin üç (veya daha fazla) bağımsız lokusta kombine etkileri ile belirlendiğini göstermişlerdir. Ayrıca, bir lokusun indüklenmiş şekli baskın veya dominant olduğunu, fakat diğer lokusların indüklenmiş formları çekinik olduğunu söylemişlerdir.

Fieldes (1994) yaptığı çalışmada keten tohumu (*Linum usitatissimum*) 5-azaC ile muamele etmiş ve muamelelerin genel olarak bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine ve daha spesifik olarak Durrant'ın büyük ve küçük genotroflarının zıt fenotipleri üzerindeki doğrudan ve kalıtsal etkilerini incelemiştir. 5-azaC, işlenmiş tohumdan yetiştirilen bitkilerin yüksekliğinde bir azalmaya neden olduğunu bulmuştur. Bu bitkilerin ilk nesil soylarının yüzde yirmi ikisi de kısa fenotiplere sahip olduğunu ve çoğu durumda kısa fenotipler birinci nesil bitkilerin ikinci nesil döllerini tarafından sabit ve düzenli bir şekilde kalıtıldığını söylemiştir. Ayrıca yapılan muamele, ikinci nesil döllere de aktarılan ilk nesil bitkilerin bir kaçında çiçeklenme çağında belirgin bir azalma sağladığını göstermiştir. Sonuç olarak hepsinde olmasa da pek çok yavru nesillerinde görülen etkiler, muamele tarafından uyarılan kalıtsal değişiklikler epigenetik olduğunu küçük genotrofun genomunun 5-azaC kaynaklı kalıtsal değişimlere büyük genotrofun genomuna göre daha az duyarlı olması büyük ve küçük genotrof arasındaki farklılıklardan olduğunu rapor etmiştir.

2.2.3. Heterosis ve DNA metilasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar

Ülkemizde potansiyel tarım alanlarının son sınırına ulaşılmış olması nedeniyle, ekim alanlarını genişleterek üretimi artırma mısır ve diğer bitkilerde imkanı sınırlanmıştır. Bu nedenle üretim genellikle, birim alandan alınabilecek verimi en yüksek seviyeye çıkarmakla mümkün olabilmektedir (Konuskan 2000). Yüksek verimli ve üstün özelliklere sahip yeni mısır çeşitlerinin elde edilmesi mısır ıslah çalışmalarının yoğun bir şekilde devam ettirilmesi ile gerçekleştirilebilir. Amaca yönelik uygulanabilecek ıslah çalışmaları içinde melezleme ıslahı önemli yer tutmaktadır. Melez mısır ıslahı,

kendilenmiş hatlar arasında ilk melez dölün yüksek verim elde etmek amacıyla üretime alınmasına F_1 hibrit gücü ıslahı veya kısaca hibrit ıslahı adı verilmektedir (Karaca ve İnce 2017).

Melez mısırdaki görülen verim artışı heterosis adı verilen olgunun bir sonucudur. Heterosis, iki anaç arasındaki melezlemeden elde edilen bireyin verim ve diğer özellikler yönünden üstün olma durumudur. Melez bitki ıslahı çoğu bitkilerin ıslahında başarılı olduğu gibi ticari mısır endüstrisi içinde son derece önemlidir (Karaca ve İnce 2017).

Melez gücü ilk olarak 1760'larda Kolreuter tarafından tütün bitkisinde saptanmıştır. 1849 yılında Gartner, gerçekleştirdiği binlerce melezlemede F_1 generasyonu bitkilerinin her zaman çok homojen olduğunu gözlemlemiştir. Darwin 1877 yılında kendine döllenmenin bitkilerde gelişme ve verimlilik bakımından olumsuz sonuçlar doğurduğuna işaret etmiştir. 1940 yılında Shull, mısır bitkisinde kendilenmiş hatlarda bitki boyu bakımından azalmaların ortaya çıktığını, bu saf hatların kendi aralarında melezlenmesiyle normal boy ve büyüklüğün yeniden kazanıldığını saptamıştır (Taba 1995; Sing, 2001).

Yüksek heterosis oranına sahip melezlerin elde edilmesinde en önemli özelliklerden birisi, kendilenmiş hatlar arasındaki genetik farklılığın büyük olmasıdır. Diğer taraftan kaynak popülasyonu olarak kullanılacak hatların benzer genetik tabana sahip olmaları da önemlidir. Kaynak popülasyonlar hazırlanırken farklı heterotik gruplar oluşturulmalıdır. Yüksek heterosis oranını elde edebilmek için heterotik gruplar kullanılmalıdır. Dünyada en çok bilinen heterotik model Reid x Lancaster modelidir. Mo17 Lancaster heterotik grubunu temsil ederken Reid heterotik grubunu temsil eden ise B73 mısır hattıdır (Soengas vd. 2003; Karaca ve İnce 2017).

Heterosisi elde etmek için iki ana yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlardan ilki heterosisi ebeveyn hatlar arasındaki genetik farklılık ilişkisinden yararlanarak ortaya koymak iken diğeri ise heterosis ile ilgili kromozomsal bölümlerin tanımlanması için QTL haritalamasıdır. Nitekim bazı çalışmalarda ebeveynler arasındaki genetik uzaklıklar ile heterosis arasında bir ilişki ortaya konmuştur. Ancak bu ilişkinin heterosisi açıklayabilmesi için heterosisin önemli bir sayıda dominant etkiye sahip lokusun var olması ve heterosiste önemli olan genlerin linkaj dengesizliği göstermesi gerektiği farklı araştırmacılar (Charcosset vd. 1991; Charcosset ve Essioux 1994) tarafından ortaya konulmuştur (Karaca ve İnce 2017).

Heterosisin genetik nedenlerini açıklamak için farklı yaklaşım ve teoriler öne sürülmüştür. Bu yaklaşımlar dominans, üstün dominans ve sözde üstün dominanstır (Veita ve Vaiman 2010). Bu hipotezlerden en eski hipotez dominantlık hipotezidir. Dominansi hipotezi iki ebeveyninden oluşan bir hibritte istenen dominant genlerin birikmesinden dolayı ortaya çıkan heterosistir. Üstün dominansi hipotezine göre ise dominant genleri heterozigot yapıda bulunduran genotipler homozigot halde bulunduranlardan daha güçlü olması demektir. Ortaya atılan diğeri bir hipotez ise epistatik etki hipotezinde, farklı lokuslardaki genlerin, diğeri genlerin üzerine yaptıkları etkilerin de heterosise yol açtığı ileri sürülmektedir. Bu hipotezlere ek olarak marjinal üstün dominansi hipotezi, pseudo üstün dominansi, DNA metilasyon hipotezi ve eksik genler için tamamlayıcı genler hipotezleri verilebilir (Akel vd. 2018; Lauss vd. 2018; Karaca ve İnce 2017).

Heterosis, melezlemeden elde edilen bireyin verim veya diğer özelliklerin örneğin büyüme hızı, bitki boyu, biyomas miktarı, erkencilik, hastalık-zararlılara ve diğer abiyotik biyotik koşullara dayanıklılık, kalite gibi birçok özellik yönünden üstün olma durumudur (Lariepe vd. 2012). Bu durum, çoğu bitkinin ıslahında başarılı olduğu gibi ticari mısır endüstrisi içinde önemlidir. Heterosis ilk olarak mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde günümüzden yaklaşık yüz yıl önce tespit edilmiş olup tohum, koçan, bitki boyu, biyomas vb. özelliklerde % 100-% 200'e varan artışlara neden olabilmektedir (Feys vd. 2018).

Bitki ıslahı ve üretiminde pratik veya diğer adıyla ekonomik heterosis daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekonomik heterosis olgusunda bireyin performansının iki ebeveyninin ortalamasından (ana ve baba olarak kullanılan bitkilerin) yüksekliğidir. Bazı durumlarda iyi ebeveyn heterosisi veya heterobeltosisi olarak adlandırılan olgu veya fenomen de bireyin performansının kendini oluşturan iyi ebeveynin performansından daha yüksek oluşudur (Güvercin 2011). Hibritteki gen ekspresyonu kendilenmiş hatların ortalamasının altında ise düşük dominansi olarak ortaya çıkabilmektedir. Swanson-Wagner vd. (2006) B73, Mo17 ve B73 x Mo17 fidelerinde yaptıkları denemelerinde F₁ bitkisinde heterosisin en yüksek oranda dominansi, bir kısmında üstün dominansi ve bir kısmında da düşük dominansi olduğunu saptamışlardır.

Günümüze kadar heterosisin mekanizmasıyla ilgili ilerlemeler kaydedilse de, bu olayın biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler esasını açıklayan yeterli bilgi bulunmamaktadır. Uzun bir süre boyunca da bilim adamları, heterosisi dominantlık ve üstün dominantlığa bağlamış diğer bazı araştırmacılar ise gen interaksiyonlarının heterosisde büyük payı olduğunu belirtmişlerdir. Hormonlar, metabolik denge, metabolik kontrol ve eksik genler için tamamlayıcı hipotezleri de mevcuttur. Son yıllarda epigenetik mekanizmasının heterosis üzerine etkili olduğu yönünde önemli bulgular bulunmaktadır (Taba 1995; Hagemann ve Lambert 1988; Lariepe vd. 2012; Ji vd. 2014; Lauss vd. 2018; Karaca ve İnce 2017).

Tamamlayıcı gen hipotezi Fu ve Dooner (2002) tarafından, ortaya atılmış olup heterosis olgusunun ebeveynlerde bulunmayan genlerin F₁'de birbirlerini tümlediğini/tamamladığını öne süren bir hipotezdir. Yirminci yüzyılın sonlarına doğru heterosis tanımlamaya yönelik fizyolojik ve moleküler hipotezler de ortaya atılmıştır. Örneğin farklı organelleri (mitokondri veya kloroplast) taşıyan mısır hatlarının bazı heterosis özelliklerinin oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Aralarında giberellinin de bulunduğu bazı fitohormonların heterosis oluşumuna neden olarak öne sürülmektedir. Ayrıca bazı spesifik enzimlerin ve DNA metilasyonunun heterosisiye neden olduğuna dair görüş ve hipotezler mevcut iken metilasyon oranı ile heterosis arasında ters bir ilişkinin olabileceği hipotezleride mevcuttur (Ma vd. 2011; Yang vd. 2011; Yang vd. 2015; Lauss vd. 2018; Karaca ve İnce 2017).

Epigenetik terimi, DNA'daki baz dizilerinde değişiklik olmadan ve yavru hücrelere aktarılabilen gen anlatımının değişimi olarak ifade edilmektedir (Weinhold 2006). Epigenetik etki sadece DNA'daki baz dizileriyle değil protein, RNA ve diğer makro moleküllerle de kontrol edilir. Ökaryotik hücrelerde gen anlatımı epigenetik olarak kontrol edilebilmektedir. Bu epigenetik değişimler mitotik veya mayotik olarak nesilden nesile aktarılabilir. DNA metilasyonu ve modifikasyonları, genomik imprinting, transgen sessizleşmesi, histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon, vb.), X kromozom inaktivasyonu, kodlama yapmayan RNA'larla mRNA

anlatımının kontrol edilmesi çiçeklenme, genetik imprint gibi bitkilerde önemli olan durumlar epigenetik olarak gerçekleşmektedir (Grozsmann vd. 2011; Wollman vd. 2012; Karaca ve İnce 2017).

DNA molekülünde bulunan metilasyon epigenetik düzenlemeler arasında en iyi anlaşılmış olan mekanizmadır (Bestor 2000; Bird 2002). DNA sitozin metilasyonu, gen promotörlerinde kromatin ve gen transkripsiyonunun baskılanmasıyla ilişkilidir (Zhu 2009). Beşinci pozisyonundaki sitozinin metillenmesi bitkilerde ve memelilerde en çok çalışılmış epigenetik değişimlerden biridir (İnce ve Karaca 2017).

Kimya bilminde metilasyon bir kimyasal bileşiğe bir metil (CH₃) grubunun bağlanması veya transfer edilmesidir. Biyokimya bilminde ise spesifik olarak bir hidrojen atomunun bir metil grubuyla yer değiştirmesi anlamında kullanılmaktadır. Metilasyon DNA molekülü üzerinde bilinen ender kovalent modifikasyonlardan olup özellikle sitozinin 5 nolu karbonunda gerçekleşmektedir. Metilasyon primidin dimerlerin oluşumuna neden olduğu gibi, transkripsiyonun baskılanması, transpozonların hareketlerinin kısıtlanması, genomik imprinting, X kromozom inaktivasyonu, doku ve organ spesifik gen ekspresyonunda da etkilidir. Metilasyon CG zengin dizilerde daha etkin olmaktadır. Bitki genomlarında epigenetik etkilerin ve sonuçların başlıca kaynağı DNA düzeyindeki metilasyondur. Bitki genomlarında farklı metil transferaz enzimlerin hedeflerinin CG, CHG ve CHH adacıkları (H bazı A, T, veya C olmak üzere) olduğu bilinmektedir. Sitozinlere metillerin eklenmesinde RNA destekli DNA metilasyon mekanizması ile çok sayıda küçük RNA molekülleri görev yapmaktadır. DNA metilasyon seviyesinin çok yüksek (hipermetilasyon) veya çok düşük (hipometilasyon) oluşu aralarında DNA replikasyonu ve onarımı, gen transpozisyonu ve transkripsiyonu, hücre farklılaşması ve gen suskunluğu, imprinting, biyo-savunma, transgen ifadesi, hücrede yabancı gen ifadesinin de yer aldığı birçok genetik fonksiyonu etkilemektedir. Araştırmalarda sitozin metilasyonu kullanılmasının temel nedeni çoğu organizmada embriyonik ve doğum öncesi gelişim, kanser, bakteriyel konuk savunması, transgen suskunluğu, hormon regülasyonu, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı yanıt oluşumu, genom katlanması ve türleşme, heterosis, imprinting olayları üzerine etkili olmasından dolayı kullanılmaktadır (Holiday 1990; Vanyushin 2006; Barciszewska vd. 2007; Vanyushin ve Ashapkin 2011; Bhardwaj vd. 2013; Fan vd. 2013; Gohlke vd. 2013; Ma vd. 2013).

Bitkilerde DNA metilasyonu canlılık, üretkenlik, üreme, genetik saflık, tuza, kurağa, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılıkla ilgili olabilmektedir (Kalinka vd. 2017). Genomda nokta mutasyonları olarak adlandırılan mutasyonlar üzerine DNA metilasyonun etkili olabildiği ve bu nedenle DNA metilasyonunun evrimsel dönüşümlerde önemli olduğu ileri sürülmüştür (Gorelick 2003; Wu vd. 2018; Karaca ve İnce 2017). Alonso vd. (2015)'e göre, metilli sitozin bazlarının metillenmemiş sitozinlere oranla daha yüksek oranda mutasyona uğradıklarını saptamıştır.

Genler arasındaki etkileşimler epistaz (veya epistasis) olarak isimlendirilebilir. Epistaz etkide farklı lokuslardaki genlerin birbirleri üzerine yaptıkları etkilerin de heterosise yol açtığı ileri sürülmektedir. Epistaz etki iki şekilde; epistatik etki veya hipostatik etki olarak görülür. Epistatik etkinin olması ancak hipostatik etkinin veya tam tersi, etkilerin varlığıyla ortaya çıkabilir. Etkisizleştirilen gen hipostatik gen, etkileyen gen ise epistatik etki eden gendir. Heterosisin ortaya çıkmasını sağlayan etki epistatik

etkidir. Epistatik etki domates bitkisinde belirgin olarak görülmektedir. Robbins tarafından yapılan denemede “Red Current” ve “Johannesfeuer” domates çeşitleri kök uçları agarlı besin ortamında yetiştirilmiştir. Vitaminsız zayıf besin ortamlarında her iki çeşitte de kök büyümesi zayıf olmuştur. Ortama nikotinamit katıldığında “Johannesfeuer”, pridoksin katıldığında da “Red Current” çeşidinin kökleri hızla büyümeye başlamıştır. İki çeşidin melezlenmesiyle elde edilen F₁ bitkilerin kökleri ise bütün ortamlarda çok iyi büyüme göstermiştir. Epistasinin heterosise yol açtığını ileri sürenler bu durumu her iki vitaminin biyosentezinde engel oluşturan bazı faktörlerin iki farklı çeşitte mevcut olduğunu ve melez bitkilerde, farklı lokuslardaki allel genler arasındaki ilişkilerin bu engelleri ortadan kaldırdığı biçiminde açıklamaktadır (Xiao vd. 1995; Birchler vd. 2003; Virmani vd. 2003; Li vd. 2008; Seifert vd. 2018).

Bitkiler ile hayvanlar arasındaki DNA metilasyonu karşılaştırıldığında büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bitkilerde yaygın olarak bulunduğu için metil sitozin bazen beşinci baz olarak da adlandırılmaktadır (Kenichi vd. 2009; Gohlke vd. 2013). Literatür araştırmasında DNA metilasyon düzeylerinin tespitinde yaygın olarak MSAP yönteminin yoğun olarak kullanıldığı görülmektedir. MSAP ucuz ve kolay bir yöntem olmasına rağmen çalıştığı hedef bölgenin azlığı yanında ve enzim tabanlı olması nedeniyle metodolojik dezavantajlara sahiptir. Diğer taraftan bisülfid sekanslama tekniği yüksek çözünürlüğü ile spesifik gen bölgesinde yüksek doğrulukta çalışabilmektedir. Global düzeydeki metilasyon analizleri bisülfid sekanslama tekniği verileriyle birlikte analiz edilecek olması metodolojik özgünlük sunmaktadır. Bu yöntemde bisülfid uygulanması ile genomik DNA sodyum bisülfid ile muamele edilerek 5-metilsitozin ve hidroksimetil sitozin dışındaki metillenmemiş sitozinler urasile dönüştürülmektedir. Bisülfid uygulamasından sonra hedef bölge PZR ile çoğaltılıp ya ampikon düzeyinde ya da sekans düzeyinde analizi gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de metilasyon düzeyi kontrollerle (bisülfid uygulaması uygulanmamış) karşılaştırılarak saptanmaktadır. Sekanslama yöntemi kullanılması durumunda her bir sekans ve her bir sekanstaki metilasyon düzeylerinin pozisyonları tespit edilebilmektedir (Wang vd. 2011; Karaca ve İnce 2017).

DNA metilasyonunun tespitinde kullanılan yaygın yöntemlerin başında gelen restriksiyon enzim tabanlı yöntemlerde en etkin olarak kullanılanlar restriksiyon enzimleri izosizomerleridir. Örneğin AFLP yönteminin bir modifikasyonu olan MSAP yönteminde *HpaII* ve *MspI* izosizomerleri kullanılmaktadır. Her iki enzim hedef bölgede (5'-CCGG-3') bulunan dizileri tanımakta ancak kesme işlemlerinde farklılıklar göstermektedir. Örneğin *HpaII* enzimi 5'-CCGG-3' dizisindeki sitozinlerin her ikisi metillenmiş ise kesme işlemini gerçekleştirememektedir. Ancak 5'-CCGG-3' dizisinde bulunan tek bir sarmaldaki sitozin metillenmiş ise kesme işlemini gerçekleştirmektedir. *MspI* enzimi ise dizideki iç bölgede yer alan sitozin metillenmiş yani 5'-C^mCCGG-3' ise kesim yapmakta ancak dıştaki 5'-^mCCGG-3' metillenmiş ise kesim yapmamaktadır. Böylece iki farklı organizma genomları veya aynı organizmanın farklı dokuları arasındaki hedef bölgelerde var olan metilasyon polimorfizmi tespit edilebilmektedir (Li vd. 2011). Bu yöntemin en büyük dezavantajı enzim tabanlı olması nedeni ile kesim polimorfizminin DNA'nın kalitesiyle ilişkili olması ve sadece CG motiflerinde metilasyonu belirleyebilmesidir. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise polimorfizmi fragman tabanlı olup metilasyonun DNA düzeyinde belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duymasıdır. Ancak maliyetinin düşük olması analizlerin kolay olması küçük

laboratuvarlara uygun olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Lele vd. 2018; Karaca ve İnce 2017).

Metilasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan ve sürekli yeni tekniklerle desteklenen yöntem bisülfid dönüşüm veya bisülfid sekanslama olarak bilinen yöntemdir. Bu yöntemde bisülfid uygulaması ile genomik DNA sodyum bisülfid ile muamele edilerek 5-metilsitozin ve hidroksimetil sitozin dışındaki metillenmemiş sitozinler (CG, CHC ve CHH), urasile dönüştürülmektedir. Bisülfid uygulamasından sonra hedef bölge PZR ile çoğaltılıp ya ampikon düzeyinde ya da sekans düzeyinde analizi gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de metilasyon düzeyi kontrollerle (bisülfid uygulaması uygulanmamış) karşılaştırılarak saptanmaktadır. Sekanslama yöntemi kullanılması durumunda her bir sekans ve her bir sekanstaki metilasyon düzeylerinin pozisyonları tespit edilebilmektedir (Wang vd. 2011).

Bisülfid dönüşümü çift sarmallı DNA molekülünün sadece tek bir sarmalında olması nedeni ile uygulama (bisülfid muamelesi sırasında) denatürasyon ve renatürasyon işlemleri gerçekleştirilerek her iki sarmalda bisülfid dönüşümü gerçekleştirilmektedir. Bisülfid yöntemin en belirgin dezavantajı PZR çoğaltımında kullanılacak hedef bölge uzunluğunun 1000 bp'nın altında olması ve dolayısıyla uzun hedefler için çok sayıda primer çiftinin gerekliliğidir (Vanyushin ve Ashapkin 2011; Karaca ve İnce 2017).

Literatürde mısır bitkisinde heterosis ve DNA metilasyonları ile ilgili bazı çalışmalar bulunmakla birlikte DNA sitozin metilasyonunun heterosis etkisi konusunda önemli düzeyde eksiklikler bulunmaktadır (Lauria vd. 2014). Ayrıca promotör ve gen kısımlarındaki DNA metilasyon durumları mısır bitkisinde yeterli düzeyde çalışılmamıştır. Diğer bazı organizmalarda promotör ve gen kısımlarının metilasyon düzeyleri arasındaki farklılığın belirlenmesine rağmen mısır bitkisinde bu konuyla ilgili oldukça az çalışma bulunmaktadır. Örneğin bazı organizmalarda gen kısmı metilasyonu gen ifadesine olumlu katkı sunmaktadır (Wang vd. 2014). Bazı organizmalarda örneğin çeltik ve *Arabidopsis*'de gen kısımlarından olan intron, ekson ve translasyona alınmayan diziler arasında metilasyon farklılığı bulunduğu bu farklılığın bazı genlerde gen ifadesine olumlu katkı sunarken diğer bazı genlerde olumsuz katkı sunduğu tespit edilmiştir (Kenichi vd. 2009; Chen 2013).

Metilasyonun genellikle gen ekspresyonunu susturması olarak ortaya çıksa da bu durum genel bir kural olarak düşünülmemektedir. Promotör ve gen kısımları metilasyon düzeyleri ve içerikleri ile gen fonksiyonuna bağlı olarak metilasyon düzeylerinde farklılıklar tespit edilmiştir. DNA sitozin metilasyonunun gen ifadesini artırma veya azaltma etkisinin dışında genomda sitozin bazının timin bazına transisyonuna neden olduğu ve böylece bazı genetik hastalıkların oluşumuna neden olduğu da öne sürülmektedir (Kenichi vd. 2009; Chen 2013).

Li vd. (2011)'e göre DNA metilasyonunun tespitinde kullanılan yaygın yöntemlerin başında restriksiyon enzim tabanlı yöntemler gelmektedir. Bu yöntemlerde en etkin olarak kullanılanlar restriksiyon enzimleri izosizomerleridir. Örneğin AFLP yönteminin bir modifikasyonu olan MSAP yönteminde *HpaII* ve *MspI* izosizomerleri kullanılmaktadır. Her iki enzim hedef bölgede (5'-CCGG-3') bulunan dizileri tanımakta ancak kesme işlemlerinde farklılıklar göstermektedir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı enzim tabanlı olması nedeni ile kesim polimorfizminin DNA'nın kalitesiyle ilişkili olması

ve sadece CG motiflerinde metilasyonu belirleyebilmesidir. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise polimorfizmi fragman tabanlı olup metilasyonun DNA düzeyinde belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç (düşük çıktılı) duymasıdır (Karaca ve İnce 2017).

Fan vd. (2013) pamuk bitkisinde soğuk uygulamasıyla metilasyon paterni ve frekansı arasında ilişki tespit etmişlerdir. Araştırmacılar soğğun DNA stozin seviyesini etkileyerek gen ifadesinin düzenlenebileceğini öne sürmüşlerdir. Bhardwaj vd. (2013) *Macrotyloma uniflorum* bitkisinde kuraklığa dayanıklı genotipte metilasyonun daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Furrow vd. (2011) epigenetik kalıtımın çevresel faktörlerden etkilendiğini ve bu bulgunun kayıp kalıtımın belirlenmesinde önemli olduğunu, van Ijzendoorn (2011) kalıtım hesabında genotip x çevre etkileşiminde epigenetik katkının eklenmesi gerektiğini vurgulamıştır. Smulder ve de Klerk (2011) bitki doku kültüründe oluşan varyasyonun DNA ve histon metilasyonu ve histon deasetilasyonundan kaynaklandığını belirlemişlerdir. Seymour vd. (2008) meyve gelişimi ve olgunlaşmada görev alan genlerin epigenetiksel olarak regüle edilebileceğini derlemelerinde belirtmişlerdir. Bitkilerde DNA metilasyonunun abiyotik stres, genom katlanması, imprinting, çiçeklenme, vernalizasyon, introgresyonla ilişkilerini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Keyte vd. 2006; Schmitz ve Amasino 2007; Kenichi vd. 2009; He vd. 2011; Yang vd. 2011; Li vd. 2011; Karaca ve İnce 2017).

Kawanabe vd. (2016) *Arabidopsis thaliana*'daki heterosise epigenetik katkısı ele almak için DNA metilasyonunda rolleri olan mutant genler kullanılmıştır. C24 ve Columbia-0 (Col) arasındaki melezler RNA polimeraz IV (Pol IV) veya metiltransferaz I (MET1) fonksiyonu olmadan biyokütle heterosisinin düzeyini azaltmadığını tespit etmişlerdir. DNA metilasyonunda azalmada (ddm1) bir mutasyonla melezler heterosis seviyesinde azalma göstermiştir. Ddm1 mutant melezindeki vejetatif heterosis azaltılmış, fakat elimine edilmemiş; Heterosis düzeyini oluşturmak için kritik olan tüm lokuslarda metilasyonda bir değişiklik olsaydı, tam bir düşüş olabileceğini eğer lokusların bir kısmı metilasyon değişikliğine sahipse sadece heterosiste kısmi bir azalma olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Sun vd. (2015) yaptıkları çalışmada mısırdaki heterosisin moleküler tabanını anlamak, hibritlerin ve ebeveynlerinin (Zheng58 and Chang7-2.) fide kök ve yapraklardaki ve döllenmeden 15 gün sonraki endosperm ve embriyodaki metilasyon paternlerini tahmin etmek için MSAP metodu kullanmışlardır. Tüm dokularda hibritlerde metilasyon seviyeleri ebeveynlerin ortalama değerlerinden daha düşük, demetilasyon olaylarının hibritlerde daha yüksek olduğunu söylemişlerdir. Hibritlerdeki azalan metilasyon ve artan demetilasyon olaylarının ebeveynlerin baskının azalmasına ve hibrit fenotipik varyasyonla ilişkili çeşitli genlerin ekspresyonuna izin vermesiyle ilişkilendirmişlerdir. Gözlenen metilasyon paterni değişikliklerini daha fazla araştırmak için, 50 farklı şekilde görüntülenen DNA fragmanlarını sekanslamışlardır. BLAST analizi, 13 fragmanın, metabolizma, transpozon / retrotranspozonlar, gelişim, stres tepkisi ve sinyal transdüksiyonu ile ilgili proteinler dahil olmak üzere, mısır veya diğer bitki türlerinde bilinen fonksiyonel proteinler ile benzerlik paylaştığını ortaya çıkarmışlardır. Bu proteinler ile ilişkili genlerin mısır azmanlığına önemli ölçüde katkı sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir.

Lauria vd. (2014) MSAP, bisülfid sekanslama ve metil sensetif PZR tekniklerini kullanarak Mo17 mısır hattında CG adacık metilasyonlarının genellikle gen dizilerinde

bulunduğunu ve metilasyonun bir kaç generasyon devam ettirildiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar mısırdaki DNA sitozin metilasyonun doğal bir olgu olduğunu öne sürmüşlerdir. MSAP analizlerine dayanarak araştırmacılar, mısır bitkisinde gen kısmı metilasyonunun transkripsiyon üzerine etki etmediğini belirlemişlerdir.

Liu vd. (2014) DNA metilasyonunun heterosise etkilerini ortaya koymak adına iki elit hat ve bunların melezlerini çalışmışlardır. MSAP yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada hibritlerin metilasyon düzeylerinin ebeveynlerden daha az düzeyde olduğunu, demetilasyonun hibritlerde daha yüksek düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir.

Shan vd. (2013) mısır bitkisinde DNA metilasyon seviyesi ile soğuğa alışma (adaptasyon) arasında doğrudan ilişki saptayamamış ancak indirekt olarak soğuğa alışma ile metilasyon düzeyi değişimi arasında ilişki bulunduğunu MSAP analizi ile ortaya koymuşlardır.

Tani vd. (2012) yaptıkları çalışmada heterosisi, melezlenmiş organizmaların kendi ebeveynleri ile karşılaştırıldığında bir veya daha fazla karakterinde üstünlüğü ifade ettiğini söylemişlerdir. Bu üstünlüğün boy, büyüme oranı artışı ve verim artışı ile ilişkili olabileceğini de öne sürmüşlerdir. DNA metilasyonu heterosisi göstermek için önemli olan birçok gen ekspresyonunu etkileyen genom boyu genel düzenleyici epigenetiksel bir mekanizmadır tanımını yapmışlardır. Önceki çalışmalara göre, mısırdaki DNA metilasyonu, farklı genotipler (ebeveynler ve melezler) ve gelişim aşamaları arasında değişmektedir. Yaptıkları bu son çalışmada büyüme koşullarının DNA metilasyonunun seviyesini ve paternlerini etkilediğini göstermektedir. Ebeveynler ve melezleri iki farklı bitki yoğunluğu altında (1.5 m ile 0.513 plant/m² ve 0.25 m ile 18.5 plant/m² yoğunlukta yetiştirmişlerdir. DNA'nın belli bölgelerinde metilasyon paterni üzerindeki yoğunluğa bağlı stresin CRED-RA tekniği kullanarak incelemişlerdir. Sonuçlar hibritlerin, ebeveynlere göre yoğunlukla ilişkili metilasyon değişikliklerine daha dirençli olduğunu göstermişlerdir.

Waters vd. (2011) DNA metilasyonu ile bazı genlerde susturma işleminin bulunduğunu ve bu işlemin ebeveynlerin orjinlerine göre değiştiğini saptamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında endosperm ve embriyo dokularından elde ettikleri RNA analizlerine göre ortaya koymuşlardır.

Zha vd. (2008) yaptıkları çalışmada heterosisin performansındaki metilasyonun rolünü incelemek için, pamuk heterotik melezleri / nonheterotik melezler ve bunların ebeveyn soyları arasındaki sitozin metilasyon paternlerindeki farklılıkları MSAP yöntemini kullanarak fide aşamasından çiçeklenme aşamasına kadar metilasyon düzeyindeki değişimi araştırmışlardır. Sonuçlar, yüksek heterotik hibritlerde bulunan demetilasyon lokuslarının sayısının, düşük heterotik hibritlerde daha yüksek olduğunu ve fide aşamasındaki pamukta DNA sitozin metilasyonunun seviyesinin çiçeklenme aşamasından daha yüksek olduğunu göstermiştir. Düşük kopya genomik bölgelerdeki değiştirilmiş metilasyon paternleri DNA jel blot analizi ile doğrulanabilir. Farklı metilasyon paternleri gösteren toplam 39 fragman klonlanamış ve sekanslamışlardır. Bu genlerin metilasyon durumu, hibrit ve ebeveynlerde farklı olarak modifiye edilmiş ve bu durumda bu genlerin, heterosis performansında rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir.

Lu vd. (2007) yaptıkları çalışmada 2 adet kendilenmiş mısır hatlarından püskülde, brakte yapraklarında ve kulakçıkta ki 5'-CCGG-3' bölgelerinde üç dokunun metilasyon paternleri ve DNA sitozin metilasyonu seviyeleri karşılaştırmak için MSAP kullanmışlardır. Üç doku arasında sitozin metilasyon düzeyindeki anlamlı farklar ve iki adet kendilenmiş olan mısır hatlarında aynı değişim eğilimini saptamışlardır. MSAP oranını ve tam metilasyon seviyelerini brakte yapraklarda en yüksek bulurlarken püskülde en düşük bulmuşlardır. Her iki mısır hattında aynı dokularda farklı metilasyon seviyelerini de gözlemlemişlerdir.



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden (DATAE) temin edilen Stiff Stalk ve Lancaster heterotik gruplarının önemli temsilcileri olan Mo17 ve B73 (*Zea mays* L.) kendilenmiş saf mısır hattı tohumları kullanılmıştır. İlk yıl her bir hat için üçer saksı hazırlanmış ve her saksıda da üçer bitki yetiştirilmiştir. 2014 yılında kendileme çalışmaları yapılmıştır. 2015 yılında ise Mo17 x B73 melezlerinden F₁ tohumlukları elde edilmiştir. Çalışmaya 2016 yılında da devam edilmiştir. 2016 yılında yapılan ekimde de hem melezleme çalışmaları hem de F₁ bitkisinin kendileme çalışmaları devam etmiştir.

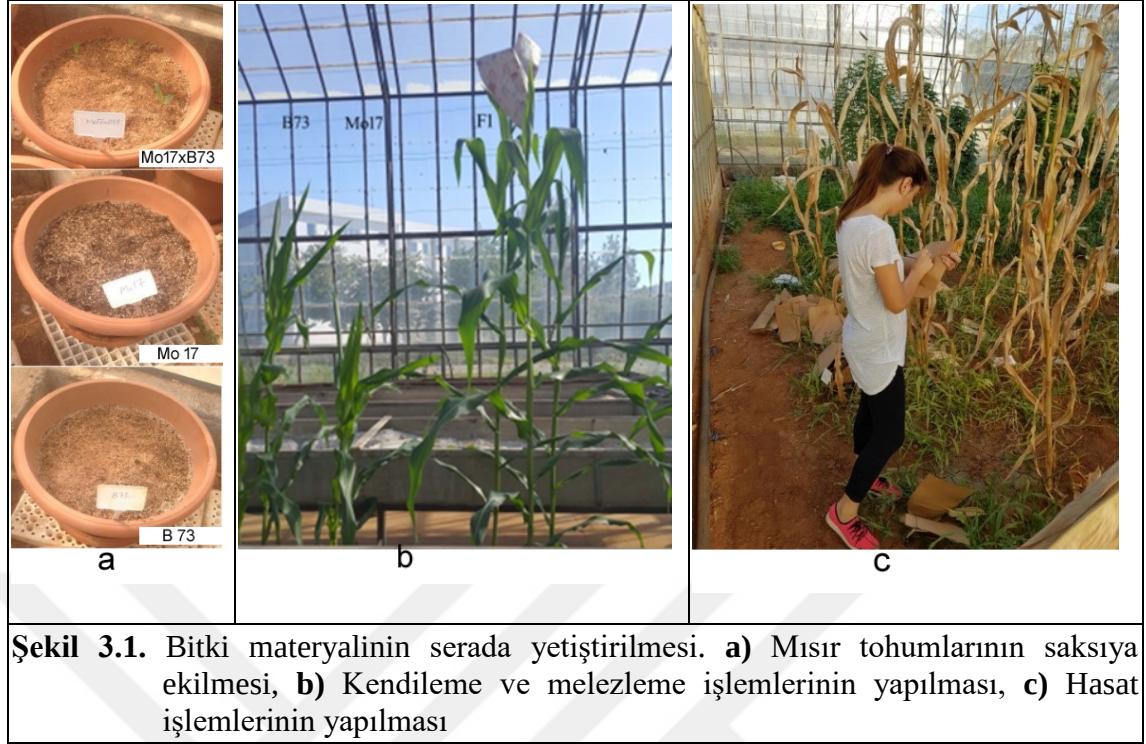
Moleküler analizler yapılarak F₁, Mo17 ve B73 genetik safiyet araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan B73 hattında genetik karışıklığın olduğu tespit edilmiştir. Mikrosatellit markırları kullanılarak yapılan çalışmalarda çalışılan lokuslar yönünden uygun allelik patern gösteren Mo17, B73, F₁ (Mo17 x B73) bitkileri markır destekli seleksiyon yöntemleri kullanılarak seçimleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Bitki Materyallerinin Yetiştirilmesi ve Örneklerin Toplanması

Çalışmada 53 cm yüksekliğinde ve 68 cm genişliğinde saksılar 1/3 toprak, 1/3 torf ve 1/3 perlit oranları dikkate alınarak hazırlanmıştır. Birinci yıl B73 ve Mo17 mısır hatları için açık alanda üçer saksı olmak üzere 6 saksı hazırlanmıştır. İlk yıl yapılan tohum ekimleri mart 2014'ün ilk haftasında saksılara eşit aralıklarla yapılmıştır. Yetiştirmede tohumlar fide dönemine kadar sera şartlarında büyütülmüş ve daha sonra saksılar açık alana alınmıştır.

Birinci yılda yapılan ekimde kendileme çalışmaları yapılmıştır. İkinci yılda ise ekim, mart 2015'in ilk haftasında Akdeniz Üniversitesi araştırma seralarında hem kendileme hem melezleme çalışmaları yapılarak F₁ tohumları elde edilmiştir. 2016 yılında yapılan ekimde de hem tohum çoğaltmak amacıyla hem melezleme çalışmaları hem de F₁ bitkisinin kendileme çalışmaları devam etmiştir. Ekim işlemlerinden sonra deneme alanları her gün ziyaret edilmiş ve gerekli gübreleme ve sulama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Koçan kavuzlarının kuruyup tanenin sertleşip normal görünen rengini alması mısırın hasat olgunluğu devresine geldiğini göstermektedir. Koçan kavuzlarının kuruduğu ve tanenin sertleştiği dönemde hasat işlemleri gerçekleştirilmiş ve hasat edilen koçanlar kese kağıtlarına toplanmıştır.



3.3. NaCl ve 5-AzaC Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Uygulamaları

3.3.1. 150 mM NaCl konsantrasyonunu hazırlama

Bir madde başka bir madde molekülleri veya iyonları halinde homojen dağıldığında ortaya çıkan karışıma çözelti adı verilir. İyonları ve molekülleri halinde dağılan maddeye çözünen madde, maddeyi çözen diğer maddeye ise çözücü adı verilmektedir. Çözeltideki çözünmüş madde miktarı ise konsantrasyondur. Buradaki durum ise 1 litre çözeltide çözünen mol sayısı molarite konsantrasyonudur.

150 mM NaCl stoğu (MA 58.5, Amresco) aşağıdaki molarite formülünden (3.1) yararlanılarak hazırlanmıştır.

$$\text{Molarite} = \frac{\text{kullanılacak miktar (g)}}{\text{MA} \times \text{Litre}} \quad (3.1)$$

Steril 1 litrelik cam şişeye hazırlanan stok için 87.75 g NaCl tartılarak 1 litre distile steril su içerisinde çözülmüş ve kullanmadan önce 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır.

3.3.2. 1.5 mM 5-azaC konsantrasyonunu hazırlama

Öncelikle 450 mM 5-azaC stoğu hazırlanıp bu stoktan günlük olarak 1.5 mM 5-azaC stoğu hazırlanmıştır.

450 mM 3 mL 5-azaC stoğu (MA 244.20, Amresco) molarite formülünden (3.1) yararlanarak hazırlanmıştır.

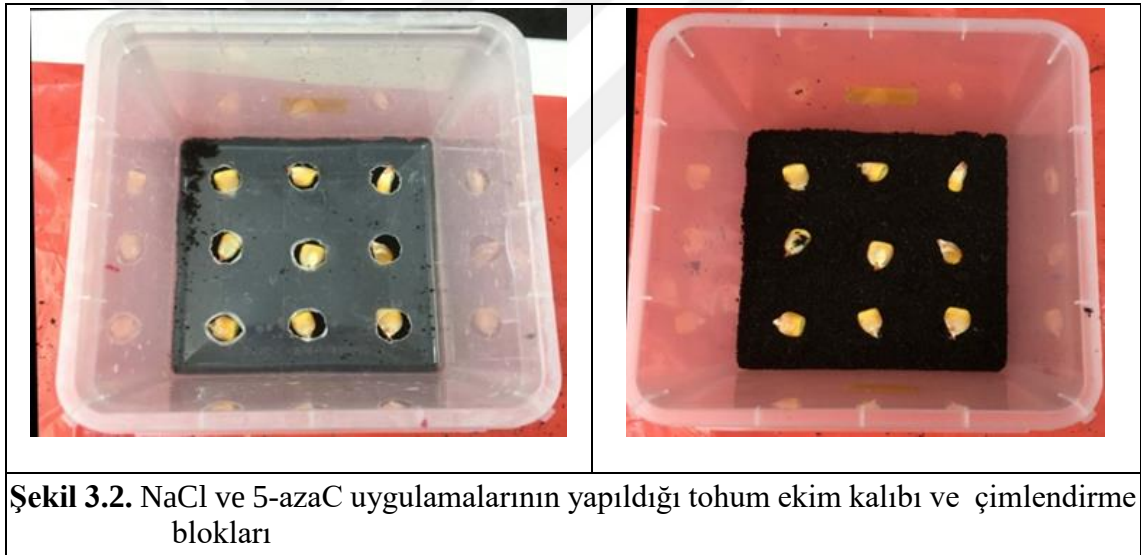
Steril 5 mL'lik tüpün içine hazırlanan stok için 0.33 g 5-azaC tartılıp DMSO (Dimetil sülfoksit) ile 3 mL' e tamamlanmıştır ve bunun içinde çözölmüştür. Hazırlanan bu stok karanlık ve -20 °C saklanmıştır.

Her gün yeniden hazırlanan 1.5 mM 5-azaC stoğu için hassas terazi üzerinde steril bir konteyner içinde 20 mL su tartılarak üzerinden pipet ile 66.7 µL çekilip atılmış ve 450 mM 5-azaC stoğundan 66.7 µL 5-azaC konteynerın içine konmuştur.

3.3.3. NaCl ve 5-azaC konsantrasyonlarının uygulamaları

Sera şartlarında ve açık alanda kendileme ve melezleme çalışmalarından elde edilen melez tohumları ve bu melezlerin ebeveynlerine ait tohumları 12 x 12 cm büyüklüğünde çimlendirme bloklarında 150 mM NaCl ve 1.5 mM 5-azaC konsantrasyonları ve kontrol grubu için su kullanılarak 6 gün boyunca çimlendirme denemelerine alınmıştır (Şekil 3.2).

Çimlendirme bloklarına üç sıra olacak şekilde eşit aralıklarda ve eşit derinlikte ekimlerinin sağlanması amacıyla çalışma için tasarlanan bir tohum ekim kalıbı kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. NaCl ve 5-azaC uygulamalarının yapıldığı tohum ekim kalıbı ve çimlendirme blokları

Çimlendirme işlemi B73, Mo17 ve F₁'de her bir çimlendirme bloğunda 3x7 tohum ile kontrol, NaCl, 5-azaC uygulaması kullanılarak 7 replika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1- Kontrol grubu için ilk olarak 100 mL hacimli beher nemlendirilmiş torf ile doldurulmuş, torf çimlendirme bloğuna aktarılmıştır. Torf çimlendirme bloğu içerisinde bastırılıp, sıkıştırıldıktan sonra kontrol uygulaması için bir püskürtmenin hacmi 100 µL olmakla birlikte 10 püskürtme yapılarak su ile ıslatılmıştır. Bu aşamadan sonra uygulamaya alınacak tohumlar hazırlanan çimlendirme bloğuna uygun aralıklar ile yerleştirilmiş, yüzeyini kaplayacak şekilde torf eklenmiş ve tekrar sıkıştırılmıştır. Son olarak aynı püskürtme hacmi ile 20 kez su ile ıslatılmış ve çimlendirme bloklarının ağzı streç film ile kapatılmıştır.

- 2- NaCl ve 5-azaC grupları için NaCl solüsyonu 150 mM ve 5-azaC solüsyonu 1.5 mM olarak hazırlanmıştır. Kontrol grubunda su ile gerçekleştirilen işlemler NaCl ve 5-azaC uygulamalarında aynı hacimde hazırlanan NaCl ve 5-azaC solüsyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- 3- Bu üç grup içinde hazırlanan çimlendirme blokları 16 saat 30 °C ve 8 saat 25 °C'ye ayarlanmış iklimlendirme kabininde 6 gün (144 saat) boyunca bekletilmiştir. Her gün aynı saatte püskürtme yöntemi ile daha önce belirtilen hacim de (100 µL) 20 kez püskürtme yapılarak 5-azaC, NaCl uygulanmış ve kontrol grubu için su kullanılmıştır. 5-azaC solüsyonu uygulama için her gün yeniden hazırlanmıştır.

3.4. Heterosis Çalışmaları

3.4.1. Tohum ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları

Mo17 ve B73 mısır hatlarına ait tohumlar ile bu hatlara ait F₁ bitki tohumları 25'er adet sayılıp tartılmış ve bu işlem her bir genotip için 12 kez tekrarlanarak 12 tekerrür oluşturulmuştur. Tohum ağırlıkları tek yönlü varyans analizine JMP 8.0 istatistik programı kullanılarak ortalamalar Tukey testi ile karşılaştırılmış ve 0.001 önemlilik düzeyleri belirlenmiştir. Ebeveynlerin ortalaması (EO) ve üstün ebeveyn (ÜE) değerleri iki farklı heterosis tespiti yapılmıştır. Ortalama heterosis ("Average Heterosis" veya "Mid-Parent Heterosis") (3.2) ve heterobeltosis ("Useful Heterosis", Economic veya "Better-Parent Heterosis") (3.3) değerleri aşağıda gösterilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Heterosis (\%): } (F_1 - EO) / EO \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Heterobeltosis (\%): } (F_1 - \text{ÜE}) / \text{ÜE} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4.2. Fide ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları

Her bir genotip (Mo17, B73, F₁) günlük su (kontrol), NaCl ve 5-azaC uygulamasının ardından 6 gününü dolduran fidelerin ağırlıkları torfları bol su ile yıkanarak temizlenip kurutulduktan sonra belirlenmiş ve çift yönlü (2 faktörlü) varyans analizlerine tabi tutulmuştur. İki faktörlü olarak kurulan deneme deseninde faktörlerden biri genotip iken diğeri ise uygulamadır. Analizler üç farklı genotip (Mo17, B73, F₁) ve 3 farklı uygulama (kontrol, NaCl ve 5-azaC) dan oluşmuş ve genotip x uygulama interaksiyonları çift yönlü varyans analizine JMP 8.0 istatistik programı kullanılarak ortalamalar 0.05 önemlilik düzeyinde Tukey testi ile gruplandırılmıştır.

Ortalama heterosis ("Average Heterosis" veya Mid-Parent Heterosis) değerleri formül (3.2) ve heterobeltosis ("Useful Heterosis", "Economic" veya "Better-Parent Heterosis") değerleri formül (3.3) formülleri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5. DNA İzolasyonunun Yapılması

3.5.1. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

Bitkilerde DNA izolasyonu moleküler çalışmaların başlangıç noktasıdır. DNA izolasyon yöntemleri bitki türleri ve doku tiplerine göre belirlenmektedir. Bu araştırmada

kullanılan bitki materyaline ait DNA'lar laboratuvarımızda kullanılan pek çok türde başarılı sayılan ancak mısır bitkisinde büyük başarıyla çalıştığı tespit edilen CTAB tabanlı DNA izolasyon metodu kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Çözeltinin adı	İçeriği
Lezyon Solüsyonu	100 mM TrisHCl (pH:8.0) 20 mM EDTA % 2 CTAB 1.4 M NaCl % 0.5 PVP-Soluble
% 80 Ethanol	8 hacim ethanol 2 hacim distile su
TE (pH 8.0)	10 M TRIS-HCl 1 mM EDTA

3.5.2. DNA izolasyonu

Mo17, B73 hatları ve bu hatlara ait F₁ tohumları için her bir uygulamadan 5'er adet çimlenmiş fide alınmış ve DNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C bekletilmiştir.

6. günün sonunda alınan ve -80 °C'de bekletilen bitki materyalleri steril porselen havan ve havan eli ile sıvı azot kullanarak toz haline getirilmiştir. Öğütülen her bir fidenin dokusu sıvı azot yardımıyla ayrı ayrı tüplere dökülerek aktarılmıştır. Tohumdan DNA izolasyonu için ise tohumlar alüminyum folyo içinde havan eli yardımı ile ezilmiştir.

DNA izolasyonu Karaca vd. (2005)'e göre modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Yapılan DNA izolasyonun protokolü;

- 1- 0.2 g ezilmiş doku 2 mL'lik ependorf tüpüne alınarak üzerine 400 µL ısıtılmış lezyon solüsyonu ve yine 400 µL (aynı oranda) 8 M LiCl (Lityum klorür) ekleyerek iyice vortekslendikten sonra 65 °C su banyosunda her 15 dk bir vorteks yapılarak 2 saat bekletilmiştir.
- 2- 2 saatin sonunda tüpler oda sıcaklığında bekletildikten sonra 800 µL kloroform (CHCl₃) eklenerek iyice vortekslenip 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve 10.000xg de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dikkatli bir şekilde alınabildiği kadar üst faz (süpernatant) temiz bir 2 mL'lik ependorf tüpe alınmış ve üzerine 9/10 u kadar İzopropanol, 1/10 u kadar 5 M'lık NaCl ekleyip ters düz edildikten sonra 10.000xg de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 3- Santrifüj aşamasından sonra üst faz uzaklaştırılarak pellet üzerine tekrar ısıtılmış 600 µL lezyon solüsyonu ekleyip vorteks yaptıktan sonra 65 °C su banyosunda 15 dk bir vorteks yaparak 1 saat bekletilmiştir.
- 4- 1 saatin sonunda tüpler oda sıcaklığında bekledikten sonra 600 µL (CHCl₃) eklenerek iyice vortekslenip oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş ve 10.000xg de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 5- Santrifüj sonunda üst faz dikkatlice temiz bir 1.5 mL'lik ependorf tüpe alınmıştır. Alınan miktarın 9/10 u kadar İzopropanol, 1/10 u kadar 3 M'lık NaAc (Sodyum

- asetat; pH: 5.2) ekleyerek çok az vorteks yaptıktan sonra 10.000xg de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 6- Santrifüj sonunda pellet üzerindeki üst faz uzaklaştırılarak pellet üzerine 65 °C su banyosunda bekletilen TE (pH: 8.0)'den 300 µL eklenerek pellet iyice çözüldükten sonra üzerine 30 µL 2 M'lık KAc (Potasyum asetat; pH: 5.4) eklenip bunun üzerine 825 µL % 100 ethanol eklenerek vorteks yapıldıktan sonra 10.000xg de 5 dk spinlenmiştir.
 - 7- Spinden sonra ethanol uzaklaştırılmış ve % 80 ethanol'dan 400 µL ekleyip 10.000xg de 3 dk santrifüj edilmiştir.
 - 8- Daha sonra ethanol tamamen uzaklaştırılmış ve üzerine 65 °C su banyosunda bekletilen TE (pH:8.0)'den 200 µL eklenerek pellet çözüldükten sonra genomik DNA bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C ya da +4 °C'de saklanmıştır.

B73 hattında genetik karışıklığın olduğu tespit edildiği için Mo17, B73, F₁ tohumlarından 5'er adet ve bunların her bir uygulamalarından da 5'er adet olmak üzere yaklaşık 60 tane DNA izolasyonu yapılmış ve bunlardan Mo17, B73, F₁ için uygun paterni veren 1'er adet tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulaması yapılan DNA'lar dan toplamda 12 DNA seçilmiş ve çalışmalara 12 DNA ile devam edilmiştir.

3.6. DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

DNA örneklerinin saflığı ve miktarı spektrofotometre cihazı ile saptanmıştır. Bu amaçla 25 kat seyreltilmiş olan toplam DNA'nın analizinde 230, 260 ve 280 nm boylarındaki UV ışığını soğurma değerleri ölçülmüş ve saflık kontrolünde bu değerlerin oranı (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}) kullanılmıştır. Bu oranlar 1.8-2.0 değer aralığında ise genomik DNA'nın saf olduğu kabul edilmiştir (İnce 2010). Stoktaki DNA konsantrasyonu formül (3.4) ile hesaplanmıştır.

$$\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} = (A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times \epsilon) \quad (3.4)$$

Formülde nükleik asitler için miktar tayini yapılırken A_{260} nm'de nükleik asit absorbans değeriyle, o nükleik asitin varoluş katsayısının (ϵ) (DNA için 50) ve çözeltinin seyreltme faktörünün çarpımıyla nükleik asit miktarı mikrolitrede nanogram olarak hesaplanmaktadır.

Stok DNA'dan 25 ng/µL DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.7. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Agaroz jel elektroforez yöntemiyle RNA kontaminasyonu, polisakkarit varlığı ve yüksek moleküler ağırlıktaki DNA'nın varlığı araştırılmıştır. Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın kalitesini TRIS-Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforesiz yöntemi ile belirlenmesi için % 1.5'luk agaroz jel, 1x TBE çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır (Karaca ve İnce 2017).

Jel içerisinde 0.5 µg/mL konsantrasyon da olacak şekilde 10 mg/mL stoktan etidium bromit ilave edilmiştir. 250 ng DNA örnekleri 2 µL yükleme çözeltisi ile karıştırılıp jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 1x TBE çözeltisi kullanılarak 5 V/cm

uygulanmış ve 100 dakika süre ile yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra DNA-etidium bromit ultra viole (UV) aracılığıyla görüntülenmiş ve jel görüntüsü UV programı ile bilgisayar ortamında kaydedilmiştir (İnce 2010).

3.8. PZR Protokolü

PZR işlemi için şu protokol uygulanmıştır. Toplam hacmi 25 μL 'ye ayarlanmış ve içerisinde 85 ng toplam genomik DNA, 0.5 μM kullanılan primer çifti, 12 mM Tris-HCl (pH: 9.1), 60 mM KCl, % 0.012 Triton X-100, 3 mM MgCl_2 , 0.28 mM her bir dNTP ve 1 ünite *Taq* DNA polimeraz içeren solüsyonda PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2'de PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.2. PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar		Stok	Miktar	Final
Genomik DNA			8.5 μL	85 ng
Steril- H_2O			5.25 μL	
İleri Primer ("Forward")		20 μM	0.625 μL	0.5 μM
Geri Primer ("Reverse")		20 μM	0.625 μL	0.5 μM
Steril- H_2O			4.4 μL	
10x <i>Taq</i> Reaksiyon buffer	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	3 μL	12 mM
	KCl	500 mM		60 mM
	Triton X-100	% 0.1		% 0.012
MgCl_2		50 mM	1.5 μL	3 mM
dNTP		10 mM	0.7 μL	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz		2.5 ünite/ μL	0.4 μL	1 ünite
Toplam Hacim			25 μL	

B73 mısır hattının genomik DNA'sı kullanılarak dizayn edilen 56 primer çiftine 3 farklı annealing sıcaklığı (55 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ ve 66 $^{\circ}\text{C}$) uygulanarak her primer seti için annealing sıcaklıkları optimize edilmiştir. Bu PZR profilleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Amplifikasyon profili

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94 °C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94 °C	30 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	66 °C→61 °C	30 saniye		Renatürasyon
	60 °C→55 °C			
	55 °C→50 °C			
	72 °C	1 dakika	Sentez	
PZR	94 °C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	1 dakika		Sentez
Final	72 °C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4 °C	1 saat		

3.9. Bisülfıt Dönüşümü

Çalışmada kullanılan 12 genomik DNA örneğinden optimizasyon çalışmalarından elde edilen bilgiler doğrultusunda uygun miktarda DNA MethylCode bisülfıt dönüşüm kiti kullanılarak, genomik DNA üzerinde bulunan ve metilasyon içermeyen bütün sitozin nükleotitleri urasil nükleotidine (PZR sonrası Timin) deaminasyon reaksiyonu ile dönüştürülmüştür. Diğer bir ifade ile genomda bulunan 5-metilsitozinler ve hidroksimetilsitozinler korunurken normal sitozinler urasil nükleotidine (PZR sonrası Timine) dönüştürülmüştür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra yine aynı kit (MethylCode Bisülfıt) kullanılarak saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin ardından -20 °C'de PZR çalışmalarına kadar bekletilmiştir.

3.10. Bisülfıt Reaksiyonları

3.10.1. CT kimyasalların hazırlanması

Her bir hazırlık 10 reaksiyon için yeterli olacak şekilde hazırlanmıştır. CT solüsyonunun hazırlanmasında üzerine 900 µL steril su, 300 µL dilüsyon buffer, 50 µL desüspansiyon buffer koyup iyice girdaplandıktan sonra 10 dk 37 °C'de bekletilmiştir (Karaca ve İnce 2017).

3.10.2. Yıkama solüsyonun hazırlanması

Altı mililitre yıkama solüsyonu üzerine 24 mL absolut etil alkol (% 96-99 ethanol) konularak hazırlanmıştır.

3.10.3. Bisülfıt dönüşüm reaksiyonları

Çalışmaya devam edilen 12 genomik DNA normalleştirilerek 500 ng 20 µL hacimde olacak şekilde 0.2 mL PZR tüplerine alınmıştır. 20 µL hacimdeki 500 ng DNA örneği üzerine 130 µL taze hazırlanmış olan CT solüsyonu konularak karıştırılmıştır. Örnekler bir termal döngü cihazına yerleştirilmiş olup Çizelge 3.4'deki bisülfıt dönüşüm profilinde inkübe edilmiştir (Karaca ve İnce 2017).

Çizelge 3.4. Bisülfıt reaksiyonlarında kullanılan dönüşüm profili

Profil Adı	Süre	Döngü Sayısı
Bisülfıt Dönüşüm Profili		
Başlama	98 °C	10 dk
Döngü Reaksiyonu	53 °C	30 dk
	53 °C	6 dk
	37 °C	30 dk
Final	4 °C	10 dk

Altı saat inkübasyondan sonra kolonlara 600 µL bağlanma solüsyonu eklenmiştir. Üzerine döngü cihazından alınan örnekler (150 µL) ilave edilmiş ve 5 kez ters-düz edilerek karıştırılmıştır. 12000xg de 30 sn santrifüj edildikten sonra kolonların altındaki solüsyon dökülmüştür. Kolon üzerine 100 µL hazırlanmış yıkama solüsyonu eklenmiş ve tekrar 12000xg de 30 sn santrifüj edilerek kolonun altındaki solüsyon dökülmüştür. Sonra kolon üzerine 200 µL desülfanasyon solüsyonu ilave edilerek 20 dakika oda sıcaklığında

bekletilmiştir. Ardından 12000xg de 30 sn santrifüj edilerek kolonun altında kalan solüsyon dökülmüştür. Kolona 200 µL yıkama solüsyonu eklenerek 12000 xg de 30 sn santrifüj edilerek koleksiyon tüpündeki solüsyon dökülmüştür ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

Kolon boş olarak santrifüj edildikten sonra yeni bir 1.5 mL ependorf tüpüne transfer edilmiştir. Üzerine 65 °C de ısıtılmış olan 20 µL elüsyon solüsyonu konulmuş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda 12000 xg de 30 sn santrifüj edilmiştir. Ependorf tüpüne indirilen DNA -20°C muhafaza edilmiştir (Karaca ve İnce 2017).

Daha önce bisülfıt uygulanmamış B73 tohum genomik DNA'sı ile taranan 56 bisülfıt primer çiftinden PZR ürünü üretmeyen ve zayıf PZR ürünü üreten 14 primer çifti hariç geriye kalan 32 primer çifti bisülfıt ile muamele edilmiş B73 tohum DNA örneği (2 µL) ile ANN 55, ANN 60 ve ANN 66 PZR profillerinde taranmıştır. Bunun sonucunda bu 56 primer çiftinden hem bisülfıt reaksiyonda hem de bisülfıt uygulanmamış kontrol genomik DNA örneklerinde çalışan 5 primer çifti seçilmiştir.

Seçilen ZM 05, ZM 10, ZM 15, ZM 17 ve ZM 23 primerleri için ANN 60 profilinin uygun olduğu tespit edilmiştir. Bisülfıt ile muamele edilmiş diğer DNA örnekleri de seçilen 5 primer çifti kullanılarak uygun PZR profillerinde çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Bisülfıt reaksiyonlarında kullanılan dejenerant primer çiftleri

Primer Adı	Primer Dizisi (5' → 3')
ZM-F-05	TGTATGAAAYYATATTAATTGTYTGTG
ZM-R-05	ATCAAACAAACACTCCCTTARTACART
ZM-F-10	TAYAATGTGYTAGAAATAATGATYTG
ZM-R-10	AAACTAACACAATTRTCTRCTATTCCT
ZM-F-15	TAYTGTAATTGATGAAATTTTGGTGA
ZM-R-15	ATRAAAAACCACTTCTAAACACCTA
ZM-F-17	AGTGAYAGYTAGTATGGAAYYTAAAGA
ZM-R-17	RTACAACATTCCATCTTACCARAAAAT
ZM-F-23	GTGTGAAYGGAATATTTTAAAYTYAA
ZM-R-23	TTTRCACRCTAAAATCTRTATCTACTT

R:guanin veya adenin; Y: sitozin veya timin bazını simgelemektedir

3.11. Hedef Bölgelerin Amplifikasyonu ve Klonlanması

3.11.1. Polimeraz zincir reaksiyonları ile hedef bölgelerin amplifikasyonu

Bisülfıt dönüşümü tamamlanmış DNA örnekleri ile bunların kontrol DNA'ları ön denemelerle tespit edilen uygun bir PZR profilinde seçilen 5 primer (Çizelge 3.5) ile çoğaltılmıştır. PZR için kullanılan kimyasallar Çizelge 3.6'da ve amplifikasyon profili Çizelge 3.7'de gösterilmiştir (İnce 2010).

Çizelge 3.6. PZR’da kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar		Stok	Miktar	Final
Genomik DNA			8.5 µL	85 ng
Steril-H ₂ O			5.25 µL	
İleri Primer (“Forward”)		20 µM	0.625 µL	
Geri Primer (“Reverse”)		20 µM	0.625 µL	
Steril-H ₂ O			4.6 µL	
10x <i>Taq</i> Reaksiyon buffer	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	3 µL	12 mM
	KCl	500 mM		60 mM
	Triton X-100	% 0.1		% 0.012
MgCl ₂		50 mM	1.5 µL	3 mM
dNTP		10 mM	0.7 µL	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz		5 ünite/µL	0.2 µL	1 ünite
Toplam Hacim			25 µL	

Çizelge 3.7. Amplifikasyon profili (İnce 2010)

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94 °C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94 °C	30 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	60 °C→55 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	1 dakika		Sentez
PZR	94 °C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	1 dakika		Sentez
Final	72 °C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4 °C	1 saat		

3.11.2 Amplikonların jelden izolasyonu

Amplikonların pürifikasyonları için jellerden kesilen DNA örnekleri (bantlar) önce PureLink Quick Gel (Invitrogen) saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılarak ve daha sonra etanol presipitasyon ile hacmi klonlama reaksiyonlarındaki ligasyon reaksiyon hacmine ayarlanmıştır (İnce 2010).

Jelden hedeflenen fragmanların izolasyonu için % 2 oranında agaroz jeller yapılmış ve bu jellere bisülfid uygulanmış PZR ürünleri yüklenmiştir. 2 saat boyunca elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Amplikonlar ayrı ayrı steril bisturi ucu ile kesilerek 2 mL’lik ependorf tüpü içerisine alınmış ve üzerine 600 µL L3 çözeltisi eklenmiştir. Tüpler 50 °C’de bulunan su banyosunda 5 dakikada bir ters-düz edilerek toplam 15 dakika bekletilmiş ve jelin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Jel çözündükten sonra üzerine 200 µL izopropanol eklenerek nazikçe karıştırılmıştır. Toplam 800 µL solüsyon silika DNA bağlama kolonuna alınmıştır. Sonrasında 12000xg de 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolon üzerine 680 µL W1 çözeltisi eklenerek 12000xg de 1 dakika santrifüj edilmiş ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Kolon boş olarak 12000xg de 2 dakika santrifüj edildikten sonra kolon içerisine 15 µL 65 °C de ısıtılmış

olan elüsyon çözeltisi eklenmiş ve DNA'nın silikadan ayrılarak çözünmesi için oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve tüp 12000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA yeni bir tüpe aktarılmıştır (İnce 2010).

3.11.3. Transformasyon çalışmaları için çözeltilerin hazırlanması

3.11.3.1. Sıvı LB ortam hazırlığı

Luria Broth (LB) sıvı bakteri kültür ortamında 10 g triptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl tartılarak toplam hacmi 1000 mL'e tamamlanır. Çözeltinin pH'sı 5 M NaOH kullanılarak 7.0'ye ayarlanmıştır. Sonrasında 121 °C'de 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterilizasyonu yapıldıktan sonra önceden hazırlanan amfisilinden (final 100 µg/mL) 600 µL ortam içerisine konulmuştur ve +4 °C'de saklanmıştır. Seçilen tek bir koloninin çoğaltımı için 2 mL ependorf tüp içerisine 250 µL LB pH 7.0 ortamı kullanılmıştır (İnce 2010).

3.11.3.2. Amfisilin stoğunun hazırlanması

Bakteri kültüründe antibiyotik kullanmanın amacı seçici bir meydana getirmektir. Antibiyotiğe dayanıklılığı sağlayan pTZ57R/T plazmit vektörünü taşıyan *E. coli* bakterisi JM109 ırkının bu ortamda gelişimi, vektörü taşımayanların ise atılması amacıyla amfisilin antibiyotiği eklenmiştir. Stok solüsyon hazırlanırken 1 g amfisilin (Amresco) tartılarak 5 mL steril su ile çözülmüş ve hacim 10 mL'ye tamamlanarak 100 mg/mL stok solüsyonu hazırlanmıştır. Sterilizasyonu 0.42 mikron çapında membran filtre ile yapılmıştır. Hazırlanan stok solüsyonu küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir (İnce 2010).

3.11.3.3. Katı LB ortam hazırlığı

Katı bakteri kültür ortamı için 10 g Tripton, 5 g maya ekstraktı, 10 g NaCl tartılarak 800 mL steril su ile çözülmüş 5 M NaOH ile pH'sı 7.0'ye ayarlandıktan sonra 15 g agarose tartılmış ve hacmi 1 L'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 20 dakika sürede otoklavlanmıştır. Otoklav sterilizasyonu tamamlandıktan sonra hazırlanan ortamın sıcaklığı 55-60 °C'ye düştükten sonra önceden hazırlanan amfisilinden 600 µL, IPTG'den (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1200 µL, Xgal'dan (X-galactose) 1200 µL eklenmiştir. Tek kullanımlık 12 cm'lik steril petri kaplarına 30 mL ortam dağıtılarak soğutulmuştur. Soğuyan ortamlar streç film ile sarılıp +4 °C'de bekletilmiştir (İnce 2010).

3.11.3.4. İzopropil β-thiogalaktopiranosid stokunun hazırlanması

Çalışmada kullanılan vektörün çoklu klonlama bölgesinde β-galaktosidaz (*beta-galactosidase* (lacZ)) geni yer almaktadır. Çoklu klonlama bölgesine ligasyon işlemi ile gen parçacığı (DNA fragmanı) aktarımı gerçekleştirilmiş ise LacZ geninin çalışması inhibe edilmektedir. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, MA 238.302, Amresco) kimyasal ortama ilave edilerek lacZ geninin transkripsiyonu teşvik edilmiştir (İnce 2010).

Bu çalışmada IPTG LacZ geni promotör bölgesini RNA polimeraz enzimine açarak transkripsiyon için "inducer" (teşvik edici) olarak kullanılmıştır. IPTG stok solüsyonu 0.3 g IPTG tartılarak 5 mL steril su ile çözülmüş ve üzerine 7.2 mL daha ilave edilip 12.5 mL'ye tamamlanarak 0.1 M stok hazırlanmış ve 0.42 mikron çapında

membran filtre ile sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonu 1 mL'lik küçük hacimlerde -20 °C'de saklanmıştır (İnce 2010).

3.11.3.5. X-galaktoz stokunun hazırlanması

5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-galactopyranoside (X-galactose (Xgal), MA 408.629, Amresco) kimyasal β -galaktosidaz enzimi tarafından parçalanmakta ve mavi renk meydana gelmektedir. β -galaktosidaz enziminin aktif olmadığı durumlarda (insersiyonel inaktivasyonu) ise Xgal parçalanmamakta ve beyaz renkli koloni oluşmaktadır. Çalışmada vektör üzerinde bulunan LacZ geninin IPTG kimyasal kullanılarak transkripsiyonu teşvik edilmiştir (İnce 2010).

Transkripsiyon ve translasyon sonucu oluşan β -galaktosidaz enzimi ortamda bulunan Xgal kimyasalını parçaladığı zaman mavi renkli koloniler ortaya çıkmıştır. Ancak LacZ geninin üzerinde bulunan çoklu klonlama bölgesine DNA parçacığı girdiğinde LacZ geninin aktivasyonu durmuş ve beyaz renk meydana gelmiştir. Xgal stok solüsyonu 0.25 g Xgal tartılarak 6.25 mL DiMethyl SulfOxide (DMSO) içerisinde tamamen çözüldükten sonra 6.25 mL steril su (RNaz ve DNaz'lardan arı) ile 12.5 mL'ye tamamlanarak 20 mg/mL stok hazırlanmıştır (İnce 2010).

Xgal DMSO ile reaksiyona girdiği zaman ekzotermik bir reaksiyon oluşturduğu için ağzı sıkıca kapatılmadan soğumaya bırakılmış ve 0.42 mikron çapında membran filtre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonu 1 mL'lik hacimlerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir (İnce 2010).

3.11.3.6. Bakteri ana stoku

E. coli JM109 bakteri ırkı (Prof. Dr. Bayram Çevik tarafından hediye edilmiştir) ana stoku hazırlanırken kurutularak dondurulmuş kompetan hücrelerin bulunduğu tüpe 0.5 mL sıvı LB sıvı (pH 7.0) kültür ortamı ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. LB katı (pH 7.0) plakanın (Petri kabı) üzerine hazırlanan kompetan hücre stoğundan 100 μ L alınarak plaka üzerine pipetle konmuştur. Baget yayma çubuğu ile solüsyon plaka üzerini tamamen eşit oranda kaplayacak şekilde dağıtılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan plakalar sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış olan bir etüv içerisinde düz bir konumda 12 saat süre ile inkübe edilmiştir (İnce 2010).

3.11.4. Klonlama çalışmaları

Klonlama işlemi InsTAclone™ Cloning Kit (Thermo Scientific) kullanılarak Ligasyon, Transformasyon ve Rekombinant klonların teyit edilmesi olarak 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. InsTAclone™ Cloning Kiti 0.055 μ g/ μ L konsantrasyonunda 2886 bp uzunluğunda pTZ57R/T vektörü içermektedir (İnce 2010).

3.11.4.1. Transformasyon için ligasyon çalışmaları

Ligasyon reaksiyonu 1.5 mL'lik ependorf tüplerinde gerçekleştirilmiş olup, 15 μ L PZR ürünü üzerine 2 μ L vektör, 2 μ L PEG 4000, 2 μ L 10X T4 DNA ligaz buffer ve 1 μ L T4 DNA Ligaz enzimi eklenerek hafifçe vortekslenmiştir. Kısa süreli santrifüjlendikten sonra 2 saat 22 °C'de termal döngü cihazında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bu

solüsyonlar buz üzerine alınmış ve transformasyon çalışmalarında 3 µL kullanılmıştır (İnce 2010).

3.11.4.2. Transformasyon protokolü

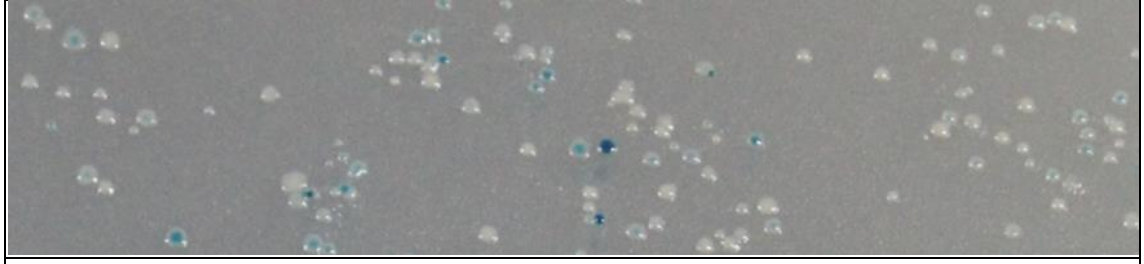
Klonlama işleminde kullanılan InsTAclone™Cloning Kit içerisinde bulunan C-Ortamı'ndan 2 mL'lik steril test tüp içerisine 750 µL eklenmiş ve sonra 37 °C'ye ayarlanmış olan bir orbital çalkalayıcı içerisinde 10-15 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda daha önce LB agar pH 7.0 ortamında büyütülmüş olan kompetan hücreleri taşıyan plakadan koloniler alınarak 37 °C'de bekletilmiş olan 750 µL'lik C-Ortamı içerisine daldırılmış ve karıştırıldıktan sonra tekrar orbital çalkalayıcı içerisine konularak 250 rpm hızda tam 2 saat boyunca büyütülmüştür. Bu sürenin tamamlanmasına 30 dakika varken kullanılacak olan LB-amfisilin katı (pH 7.0) plakalar ön ısıtma yapmak için 37 °C'ye ayarlanmış olan etüv içerisinde ters konularak bekletilmiştir. transformasyonda kullanılacak bütün solüsyonlar ve ligasyon yapılmış olan vektör buz üzerine çıkartılmıştır.

T-Solüsyonunu hazırlamak için 215 µL T-Solüsyonu A ve 215 µL T-Solüsyonu B alınarak bir tüpte karıştırılmış ve buz üzerinde bekletilmiştir. 2 saatlik süre dolunca orbital çalkalayıcıdan alınan bakteri 12000xg hızda 1 dakika santrifüj edilerek oluşan üst fazı uzaklaştırılmış ve pellet bırakılmıştır. Buz üzerinde bekletilmekte olan T-Solüsyonundan 300 µL ile pellet tekrar süspanse edilmiş ve buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 5 dakikanın sonunda 12000xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek oluşan üst fazı pipet ile tekrar uzaklaştırılmıştır.

Oluşan pellet 130 µL T-Solüsyonu ile tekrar çözülmüş ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Bekleme aşamasında 3 µL ligasyon yapılmış olan vektör ve PZR DNA ürünüden alınarak 1.5 mL'lik ependorf tüpüne konulmuş ve 2 dakika bekletilmiştir. 5 dakika olan sürenin sonunda 130 µL T-Solüsyonu ile süspanse edilen hücrelerden 30 µL alınarak buzda bekleyen 3 µL ligasyon ürününe karıştırılmış ve tam olarak 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda steril kabin içerisinde bu 30 µL'lik solüsyon ön ısıtma yapılmış LB-amfisilin katı plakalar üzerine eşit oranda L-bağet ile dağıtılmıştır. Hazırlanmış olan plakalar sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış olan etüv içerisinde ters bir şekilde 15-18 saat süre ile inkübe edilmiştir (İnce 2010).

3.11.4.3. Rekombinant klonların analizi

Ekme işleminin ardından plakalar üzerinde (agar yüzeyinde) koloni gelişimi gözlenmiştir. Koloni büyüklüğü arttıkça mavi ve beyaz renk daha kolay ayırt edilmiştir. Beyaz renkli koloniler rekombinant bakteri hücrelerinin seçiminde kullanılmıştır. 18 saatlik sürenin sonunda beyaz renkteki tek koloniden (rekombinant vektör taşıyan koloniler) lup ile bir kez dokunarak alınmış ve steril ortamda 2 mL'lik tüp içerisine 250 µL antibiyotik içeren LB Sıvı (pH 7.0) ortamı konulup içerisine lup daldırılarak tüpün ağzı kapatılmış ve hücrelerinin çoğaltımı yapılmıştır. Her bir klonlama çalışması için bisülfid uygulaması yapılmadan klonlanan dizilerden 8, bisülfid uygulaması yapılarak klonlanan dizilerden ise 12 klon seçilmiştir. Çoğaltım için 37 °C'ye ayarlanmış olan orbital çalkalayıcı üzerinde 6 saat 250 rpm hızda çalkalanmıştır (İnce 2010).



Şekil 3.3. Plakalar üzerindeki bakteri kolonilerinin gelişimi

3.11.5. Plazmit DNA izolasyonu

Plazmit DNA ekstraksiyonu için Thermo Fisher firmasının “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” plazmit DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (İnce 2010).

- 1- 2 mL’lik ependorf tüp içerisinde 250 µL’lik LB amfisilin (pH 7.0) sıvı ortamında 37 °C’de 250 rpm hızda 18 saatlik kültür sonrası çoğaltılmış olan bakteri kolonisi 12500xg hızda 1 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant pipetle uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet 250 µL LB Sıvı (pH 7.0) ortamında çözülmüştür. Çözülme işlemi tamamlandıktan sonra 12500xg de 1 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır.
- 2- Pellet üzerine RNaz içeren S1 süspansiyon çözeltisinden 250 µL ilave edilerek karıştırılıp vortekslenerek süspanse edilmiş, sonra üzerine 250 µL S2 lezyon çözeltisinden eklenerek nazikçe 6 kez ters düz edilerek karıştırılmıştır. Beş dakikayı aşmayacak bir süre içinde üzerine 350 µL S3 bağlama çözeltisi ilave edilmiş ve 8 kez ters düz edildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 12500xg de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant koleksiyon tüpüne alınmıştır.
- 3- Koleksiyon tüpü 12500xg de 1 dakika santrifüjlenmiş, santrifüj sonrası tüp kartuşu kaldırılarak alt hazne dökülerek atık uzaklaştırılmıştır.
- 4- Üzerine 500 µL W1 yıkama çözeltisi ilave edilmiş ve koleksiyon tüpü 12500xg de 1 dakika santrifüj sonrası tüp kartuşu kaldırılmış alt hazne dökülerek atık uzaklaştırılmıştır.
- 5- Koleksiyon tüp kartuşu üzerine 500 µL W2 yıkama çözeltisi ilave edilmiş ve koleksiyon tüpü 12500xg de 1 dakika santrifüjlenerek sonrasında tüp kartuşu kaldırılmış alt hazne dökülerek atık uzaklaştırılmıştır.
- 6- Kartuş boş şekilde koleksiyon tüpü son olarak 12500xg de 1 dakika santrifüjlenerek sonrasında tüp kartuşu kaldırılmış alt hazne dökülerek atık kalıntıları da uzaklaştırılmıştır.
- 7- Kartuş yeni steril 1.5 mL’lik ependorf tüpün üzerine konularak 60 µL PZR grade su tam silika tabanın üzerine kaplayacak şekilde ilave edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12500xg de 1 dakika santrifüjlenerek kartuş tüp üzerinden alınmış ve örnek etiketlenerek -20 °C’de saklanmıştır.

3.11.6. Pozitif klonların PZR yöntemi ile teyit edilmesi

Pozitif klonların (amplikon taşıyan vektörlerin) PZR yöntemiyle teşhisinde kullanılan yöntemde gen spesifik primer setleri kullanılmıştır. Plazmit DNA ekstraksiyonu yapıp 60 µL PZR grade su içerisinde çözülen vektör DNA örneğinden PZR için 1 µL kullanılmıştır. PZR reaksiyonunda diğer tüm kullanılan çözeltilerin ve

primerlerin konsantrasyonları çalışmada kullanılan yöntem ve miktarlardan oluşmuş olup değiştirilmemiştir (Karaca ve İnce 2017).

3.11.7. Pozitif klonların restriksiyon enzimleri (RE) ile teyit edilmesi

Restriksiyon enzimleriyle (RE) teyit edilirken vektör üzerinde çoklu klonlama bölgesinin uç kısımlarında kesim bölgesi bulunan *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesim gerçekleştirilmiştir. Ligasyon içermeyen toplam plazmit büyüklüğünün 2886 kb olduğu bilindiği için kesim yapıldığı zaman beklenen büyüklükte ampikon içerip içermediğine göre değerlendirmede bulunulmuştur (Karaca ve İnce 2017).

3.11.8. Bisülfid dizi (BiSeq) analizleri

Sekanslama (DNA dizi analizi) DNA üzerinde bulunan baz dizilerinin sırasını ortaya koymak için kullanılan bir genetik şifre çözme yoludur. Çalışmada DNA dizi analizleri Macrogen (Hollanda) firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Sekanslama işlemi Sanger metodu temel alınarak yapılmıştır. Toplam 960 olan plazmit sayısı üzerinden DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sekanslama işleminde universal M13F-pUC primer seti (İleri sekans: 5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3', Geri sekans: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' kullanılmıştır (Karaca ve İnce 2017).

3.11.9. Metilasyon analizleri

Bisülfid uygulanmış örneklerin DNA dizileri ile bu dizilerin kontrolleri Sequencher 4.8 yazılım programı kullanılarak hizalanmış, primer dizileri ve plazmit dizileri uzaklaştırıldıktan sonra her bir örnekten elde edilmiş olan genler (promotör ve gen kısımları) üzerindeki CG, CHG ve CHH motiflerinde bulunan metilasyon ve metilasyon paternleri Kismeth (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>), (Gruntman vd., 2008) programı kullanılarak analiz edilmiştir. JMP programı kullanılarak istatistik analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece ebeveynler ve F₁ arasında ve tohum, kontrol, NaCl, 5-azaC uygulamaları arasında bulunan CG, CHG ve CHH dizilerindeki metilasyon frekansı doğrudan bu dizilerin bulunma sıklıklarıyla ve dağılımlarıyla ilişkili olabileceği diğer bir ifadeyle metilasyon etkisinin olup olmadığı istatistiksel olarak test edilmiştir (Karaca ve İnce 2017).

3.12. *HpaII* ve *MspI* Restriksiyon Enzim Kesim Denemeleri

Her bir hat ve hibritten 2 mikrogram DNA örneği 15 ünite C↓CGG / GGC↑C tanıma bölgesi olan *HpaII* (Fermantas) ve *MspI* (Fermantas) enzimleri ile 25 mikrolitrelik hacimde BSA ve kofaktör eşliğinde 18 saat 37 °C karanlıkta bekletilerek hedef bölgelerin kesimleri gerçekleştirilmiştir. Enzim reaksiyonunun tamamlanmasının ardından hacim yüksek kalitede su kullanılarak 200 µL getirilerek her bir mikro litrede 10 ng DNA bulunması sağlanmıştır (Karaca ve İnce 2017).

3.13. Restriksiyon Enzimlerinin Hedef Lokusların Kesiminin Teyit Edilmesi

HpaII ve *MspI* kesimlerine tabi tutulan her bir örnek farklı primer çiftleri veya primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulmuştur. Enzimle

muamele edilen örnekler enzimle muamele edilmeyenlerle karşılaştırılarak enzimsel kesim reaksiyonlarının başarılı ve tam olduğu teyit ve tespit edilmiştir.

3.14. Gen Spesifik Metilasyon Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizm (GS-MSAP)

GS-MSAP yöntemi unipleks, dupleks ve multipleks olarak uygulanmıştır. Özetle enzim kesimlerine tabi tutulan örnekler yan-yana olacak şekilde yüksek annealing sıcaklığına sahip PZR ile çoğaltılarak ve % 3 yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforez çalışmalarına tabi tutulmuştur (Xu vd. 2013; Paun vd. 2010; Karaca vd. 2016). Tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış Mo17, B73 ve Mo17xB73 fide genomik DNA örneklerinin kullanılan gen spesifik primerleri (Çizelge 3.8) ile gerçekleştirilen PZR sonucu metilasyon oranları ve paternleri bu çalışmanın sonunda açıklanmıştır (Karaca ve İnce 2017).

3.14.1. Gen spesifik metilasyon primer çiftleri

Sequencher 4.8 programı kullanılarak 56 primer setinin temsil ettiği gen spesifik lokuslara ait DNA dizileri ile yapılan kontig analizi sonucu *MspI* ve *HpaII* enzimlerinin kesim bölgeleri bulunan primerler seçilmiştir (Karaca ve İnce 2017). Seçilen primerlerden annealing sıcaklıkları ve sekans uzunlukları göz önünde bulundurularak 18 primer çifti ile çalışmaya devam edilmiştir.

Çalışmada 18 gen spesifik metilasyon primeri kullanılmış olup kullanılan primerlerin baz dizilimleri Çizelge 3.8’de verilmiştir. Bu primerler unipleks, dupleks ve multipleks olarak uygulanmıştır. Unipleks olarak kullanılan primerler ZMK 04 ve ZMK 20 primerleridir. Araştırma kapsamında oluşturulan multipleks 1, multipleks 2 ve multipleks 3 dörtlü primer çiftinden (4 farklı lokustan) oluşturulurken dupleks 1 ve dupleks 2’de 2 primer çifti (2 lokustan) bir araya getirilerek oluşturulmuştur. 18 gen spesifik metilasyon primer çiftine ilişkin özellikler Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Çalışmada kullanılan gen spesifik metilasyon primer çiftleri ve amplifikasyonlarında kullanılan multipleks, dupleks ve unipleks durumları

Set	Lokus	Primer Dizisi (5' → 3')	Boy (bp)
MP 1	ZM-F-28	TGGTTGTTGTTATYTGAYTGTATTTGT	722
	ZM-R-28	RTCARTRCATACTTCTCCTCRATAC	
	ZM-F-31	YTTGGGYGTAGGTGTTGTYTATY	790
	ZM-R-31	ATAAAAATTACCAACAATRTCCCTCCT	
	ZMK-F-19	GAGGAGAAGTATGYAYTGAYGTGAAGATGG	524
	ZMK-R-19	CCCTCTCAACCRACRCAACRCAAACACTACTA	
	ZMK-F-21	GAGGGTGGAGGAAGATGGGTYGTTYATGAA	574
	ZMK-R-21	CTRCTATCATACATCRCACATCCRCTACC	
MP 2	ZM-F-02	GATGTGYTTTTAATTAATTTYYAGTGA	636
	ZM-R-02	TRTTARCTAATAACACCAAAACARAAA	
	ZM-F-05	TGTATGAAAYYATATTAATTGTYTGTG	600
	ZM-R-05	ATCAAACAAACACTCCCTTARTACART	
	ZM-F-14	GTTATTTAAYAGTGTGYTGAAGGGTAT	790
	ZM-R-14	RTTTTATTRACAACCACAATTTRAAATA	
	ZM-F-18	TGYTAAATAAAGYAAGTAGYAGATAGG	755
	ZM-R-18	TRTARTTTCAAATCATAAAATRCAATC	
MP 3	ZM-F-15	TAYTGTAATTTGATGAAATTTTGGTGA	558
	ZM-R-15	ATRAAAAACCARACTTCTAAACACCTA	
	ZM-F-17	AGTGAYAGYTAGTATGGAAYYTAAAGA	698
	ZM-R-17	RTACAACATTCCATCTTACCARAAAAT	
	ZM-F-21	TGTTTGTATCAGCAATTCATCTTTTT	730
	ZM-R-21	ATACCAATTCAGATTCAGAACCAAT	
	ZMK-F-08	AGGGTTGAGGATTATGAAATYYAGGTAAGG	569
	ZMK-R-08	CARCRCAATACRCTACTCCCTCCATTTTAT	
DP 1	ZMK-F-07	GGTAGTTAYATGGAAGTTTGGTTYTTGGTG	600
	ZMK-R-07	CCATTACCACRRCCTTCTATCTTARTAATC	
	ZM-F-30	GYTTAAGYGAGTGAAGGTAYTAYTG	407
	ZM-R-30	TCTRTACCTRTTCAARATARCTAACAA	
DP 2	ZM-F-33	YGTTYGTTYATYATYGGGYTATATA	745
	ZM-R-33	RRCRTTTATCCCATCAARCAAAR	
	ZM-F-12	ATTATTGAGTTAGTAATYYGTGTTTGY	646
	ZM-R-12	ACTCTAAATCAAACRAATTAATRATRR	
UP 1	ZMK-F-04	TGGGGAGAYGTAATGTAAYGAAGAA	503
	ZMK-R-04	CACTCCTCCRTCTCCTACTCCTAACAC	
UP 2	ZMK-F-20	TGTTTGTGYTTGAGGAYAAAAAGGAGTGGT	553
	ZMK-R-20	ARCACCCCATTRCATTACCTTCCTCT	

MP: multipleks, DP: dupleks, UP: unipleks, R: guanin veya adenin; Y: sitozin veya timin bazlarını simgelemektedir.

3.14.2. PZR protokolü

PZR işlemleri hacmi 25 µL'ye ayarlanmış ve içerisinde 50 nanogram önceden *HpaII* ve *MspI* enzimi ile kesilmiş genomik DNA (10 ng/µL), ZM02, ZM05 ve ZM18 primerleri için (Multipleks 2) 0.7 µM ve diğer primerler için 0.5 µM kullanılan primer çifti, 12 mM Tris-HCl (pH: 9.1), 60 mM KCl, % 0.012 Triton X-100, 0.28 mM her bir dNTP, 2.6 mM MgCl₂ ve 1 ünite *Taq* DNA polimeraz içeren solüsyonda gerçekleştirilmiştir. Gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yöntemi için PZR işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve miktarlar Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yöntemindeki PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar		Stok	Miktar	Final
Genomik DNA			5 µL	50 ng
Steril-H ₂ O			8.75 µL	
İleri Primer ("Forward")		20 µM	0.625-0.875 µL	0.5-0.7 µM
Geri Primer ("Reverse")		20 µM	0.625-0.875 µL	0.5-0.7 µM
Steril-H ₂ O			4.6-4.35 µL	
10x <i>Taq</i> Reaksiyon buffer	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	3 µL	12 mM
	KCl	500 mM		60 mM
	Triton X-100	% 0.1		% 0.012
MgCl ₂		50 mM	1.3 µL	2.6 mM
dNTP		10 mM	0.7 µL	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz		2.5 ünite/µL	0.4 µL	1 ünite
Toplam Hacim			25 µL	

Çizelge 3.9'da verilen standart değerlere göre her bir örnekten izole edilen ve *HpaII* ve *MspI* ile hedef bölgelerin kesimi yapılan genomik DNA ve çizelge 3.8'de verilen gen spesifik metilasyon primerleri ile her bir birey için ayrı PZR tüpü hazırlanmıştır. Bu işlemlerin ardından örnekler PZR otomatik thermal döngü cihazına yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.10. Gen spesifik lokuslar için kullanılan amplifikasyon profili

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94 °C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94 °C	30 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	60 °C→55 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	2 dakika		Sentez
PZR	94 °C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	2 dakika		Sentez
Final	72 °C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4 °C	1 saat		

3.14.3. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

PZR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve gen bölgelerinin *MspI* ve *HpaII* enzimleri yönünden farklı sonuç içeriği tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- Jel içerisinde agarın konsantrasyonu % 3 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 1x TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikro dalga fırından çıkarılan 1x TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0.5 µg/mL olacak miktarda ethidium bromit eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra 5 µL DNA yükleme tamponu eklenen PZR ürününden 6 µL her bir kuyucuğa ayrı bir örnek yüklenmiştir.
- Elektrik akımı verilerek 70 Voltta 1 ve 3 saat arasında değişen sürelerde PZR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez tankından çıkartılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.15. Metilasyon Duyarlı Kesilmiş Üniversal Uzunluk Polimorfizm (MS-CULP)

Uygur Gocer ve Karaca (2016) tarafından minisatellit içeriği yüksek genomik bölgelerin polimeraz zincir reaksiyonlarının restriksiyon enzimleri kullanılarak polimorfizm düzeylerinin artırıldığı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm (CML) metodu önerilmiştir. Bu çalışmada CML metodu epigenetik çalışmalarda kullanılmak üzere MS-CULP metoduna dönüştürülmüştür. Özetle *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilen genomik DNA (50 nanogram) touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulmuş ve çoğaltım sonucunda % 2 agaroz jel elektroforez çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu yöntem ile elde edilen metilasyon oranı ve paternleri çalışma sonunda açıklanmıştır.

3.15.1. MS-CULP primerleri

Çalışmada touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulan 16 tane Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm primeri kullanılmıştır. Kullanılan minisatellit primerleri aşağıdaki Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Çalışmada kullanılan metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm primerleri

Primer Adı	Primer Dizisi (5' → 3')
URP1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC
URP2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG
URP4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC
URP6R	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC
URP9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG
URP13R	TACATCGCAAGTGACACAGG
URP25F	GATGTGTTCTTGGAGCCTGT
URP30F	GGACAAGAAGAGGATGTGGA
URP32F	TACACGTCTCGATCTACAGG
URP38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC
6.2H2 (-)	AGGAGGAGGGGAAGG
6.2H1 (+)	CCCTCCTCCTCCTTC
33.6	GGAGGTGGGCA
FVIIEX8	ATGCACACACACAGG
HBV3	GGTGAAGCACAGGTG
YNZ22	CTCTGGGTGTGGTGC

3.15.2. PZR Protokolü

PZR işlemleri hacmi 25 µL'ye ayarlanmış ve içerisinde 50 nanogram önceden *HpaII* ve *MspI* enzimi ile kesilmiş genomik DNA (10 ng/µL), 2.4 µM kullanılan primer çifti, 12 mM Tris-HCl (pH: 9.1), 60 mM KCl, % 0.012 Triton X-100, 0.28 mM her bir dNTP, 2.6 mM MgCl₂ ve 1 ünite *Taq* DNA polimeraz içeren solüsyonda gerçekleştirilmiştir. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm yöntemi için PZR işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm yöntemindeki PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar	Stok	Miktar	Final
Genomik DNA		5 µL	50 ng
Steril-H ₂ O		8.75 µL	
İleri-Geri Primerleri	20 µM	3 µL	2.4 µM
Steril-H ₂ O		4.6 µL	
10x <i>Taq</i> Reaksiyon buffer	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	12 mM
	KCl	500 mM	60 mM
	Triton X-100	% 0.1	% 0.012
MgCl ₂	50 mM	1.3 µL	2.6 mM
dNTP	10 mM	0.7 µL	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	2.5 ünite/µL	0.4 µL	1 ünite
Toplam Hacim		25 µL	

PZR aşamasında touch-down PZR (TD-PZR) yöntemi kullanılmıştır. Bu PZR’de farklı olarak primer sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziyeye bağlanması amaçlanmaktadır. Çizelge 3.12’de verilen standart değerlere göre her bir örnekten izole edilen ve *HpaII* ve *MspI* ile hedef bölgelerin kesimi yapılan genomik DNA ve Çizelge 3.11’de verilen minisatellit primerleri ile her bir birey için ayrı PZR tüpü hazırlanmıştır. Bu işlemlerin ardından örnekler thermal döngü cihazına yerleştirilmiş ve Çizelge 3.13’de ki döngüye tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.13. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm için amplifikasyon profili

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94 °C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94 °C	30 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	52 °C→47 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	2 dakika		Sentez
PZR	94 °C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	47 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	2 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4 °C	1 saat		

3.15.3. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

PZR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve gen bölgelerinin *MspI* ve *HpaII* enzimleri yönünden farklı sonuç içeriği tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- Jel içerisinde konsantrasyonu % 2 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 1x TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 1x TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0.05 µg/mL olacak miktarda ethidium bromit eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra 5 µL 6x DNA yükleme tamponu eklenen PZR ürününden 8 µL her bir kuyucuğa ayrı bir örnek yüklenmiştir.
- Elektrik akımı verilerek 70 Voltta 2.30 saat PZR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez tankından çıkartılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.16. Metilasyon Duyarlı Kesilmiş Rastlantısal Çoğaltılmış Uzunluk Polimorfizm (MS-CRALP)

Bu yöntem RAPD yönteminin bir analogu olup farkı amplifikasyon çalışmalarında kalıp olarak kullanılan genomik DNA moleküllerinin farklı restriksiyon enzimleri ile kesilip (*MspI* ve *HpaII* gibi) PZR çalışmalarında bu iki enzim ürününün amplifikasyonlarının farkının ortaya konulduğu bir yöntemdir. CRALP yöntemi kısa (10

nükleotit) uzunlukta primerler kullanılması nedeniyle amplikasyon reaksiyonlarındaki annealing sıcaklığı 42-37°C arasında tutulmuş ve PZR ürünlerinin % 2 agaroz jel elektroforez yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. MS-CRALP yönteminin metilasyon oranı ve paternleri çalışma sonunda açıklanmıştır.

3.16.1. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm (MS-CRALP)

Çalışmada touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulan 4 tane oligo primeri kullanılmıştır. Kullanılan oligo primerleri aşağıdaki Çizelge 3.14.'de verilmiştir.

Çizelge 3.14. Çalışmada kullanılan oligo primerleri

Primer	Primer Dizisi (5'-3')
OPR 1	TGCGGGTCCT
OPR 2	CACAGCTGCC
OPR 4	CCCGTAGCAC
OPR 5	GACCTAGTGG

3.16.2. PZR protokolü

PZR işlemleri hacmi 25 µL'ye ayarlanmış ve içerisinde 50 nanogram önceden *HpaII* ve *MspI* enzimi ile kesilmiş genomik DNA (10 ng/µL), 2.4 µM kullanılan primer çifti, 12 mM Tris-HCl (pH: 9.1), 60 mM KCl, % 0.012 Triton X-100, 0.28 mM her bir dNTP, 2.6 mM MgCl₂ ve 1 ünite *Taq* DNA polimeraz içeren solüsyonda gerçekleştirilmiştir. Metilasyon duyarlı Kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm yöntemi için PZR işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve miktarlar Çizelge 3.15'de verilmiştir.

Çizelge 3.15. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm yöntemindeki PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar	Stok	Miktar	Final
Genomik DNA		5 µL	50 ng
Steril-H ₂ O		8.75 µL	
İleri-Geri Primerleri	20 µM	3 µL	2.4 µM
Steril-H ₂ O		4.6 µL	
10x <i>Taq</i> Reaksiyon buffer (tamponu)	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	12 mM
	KCl	500 mM	60 mM
	Triton X-100	% 0.1	% 0.012
MgCl ₂		50 mM	2.6 mM
dNTP	10 mM	0.7 µL	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	2.5 ünite/µL	0.4 µL	1 ünite
Toplam Hacim		25 µL	

PZR aşamasında touch-down PZR (TD-PZR) yöntemi kullanılmıştır. Bu PZR'da farklı olarak primer sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziye bağlanması amaçlanmaktadır. Yukarıda verilen standart değerlere göre her

bir örnekten izole edilen ve *HpaII* ve *MspI* ile hedef bölgelerin kesimi yapılan genomik DNA ve Çizelge 3.14’de verilen oligo primerleri ile her bir birey için ayrı PZR tüpü hazırlanmıştır.

Bu işlemlerin ardından örnekler thermal döngü cihazına yerleştirilmiş ve Çizelge 3.16’da ki döngüye tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.16. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm için amplifikasyon profili

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94 °C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94 °C	30 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	42 °C→37°C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	2 dakika		Sentez
PZR	94 °C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	47 °C	30 saniye		Renatürasyon
	72 °C	2 dakika		Sentez
Final	72 °C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4 °C	1 saat		

3.16.3. Agaroz jel elektroforezi:

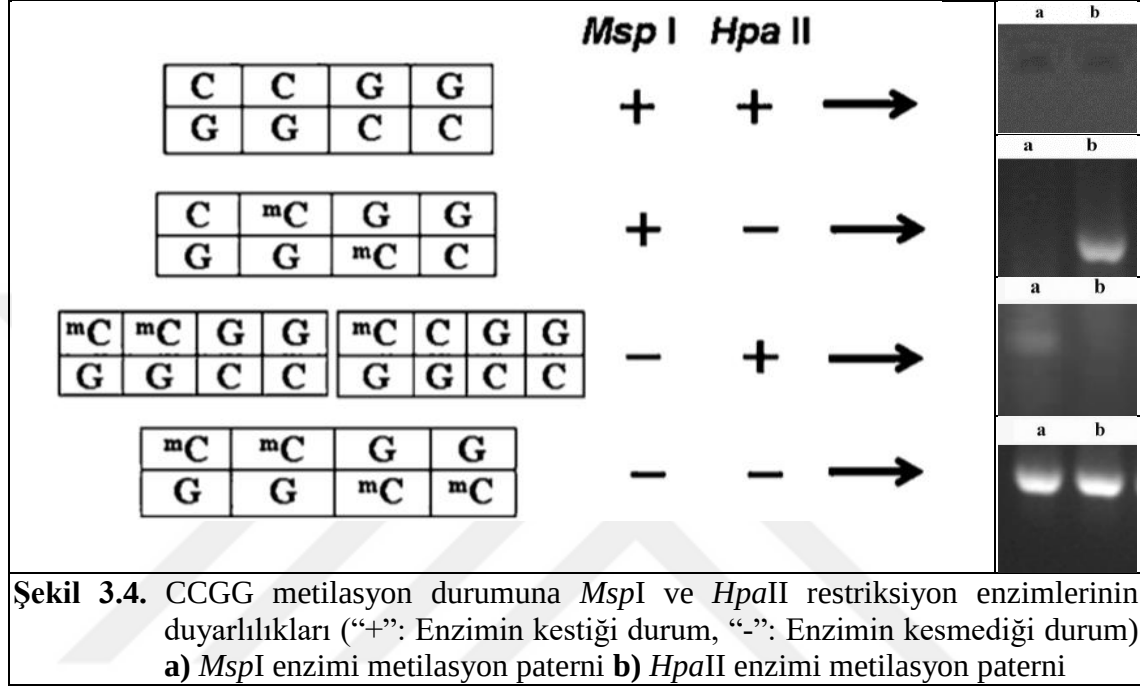
PZR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve gen bölgelerinin *MspI* ve *HpaII* enzimleri yönünden farklı sonuç içeriği tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- Jel içerisinde konsantrasyonu % 2 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- Mikrodalga fırından çıkarılan 1x TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0.05 µg/mL olacak miktarda ethidium bromit eklenmiştir.
- Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- Jel donduktan sonra 5 µL DNA yükleme tamponu eklenen PZR ürününden 10 µL her bir kuyucuğa ayrı bir örnek yüklenmiştir.
- Elektrik akımı verilerek 70 voltta 2 saat PZR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez tankından çıkartılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.17. Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi ve İstatistiksel Analizler

Analizlerde 4 farklı patern durumu söz konusudur. *MspI* ve *HpaII* reaksiyonlarının her ikisinin hedef bölgesinin kesilmesi durumu (+,+ veya 0,0, diğer bir söylemle hedeflerdeki sitozinlerin metilsiz olma durumu) olup hedef 5'-CCGG-3' metil içermediği şeklinde yorumlanacakken, her iki reaksiyonda (*MspI* ve *HpaII*) orijinal fragmanların bulunması durumu reaksiyonun tam metillenme nedeniyle

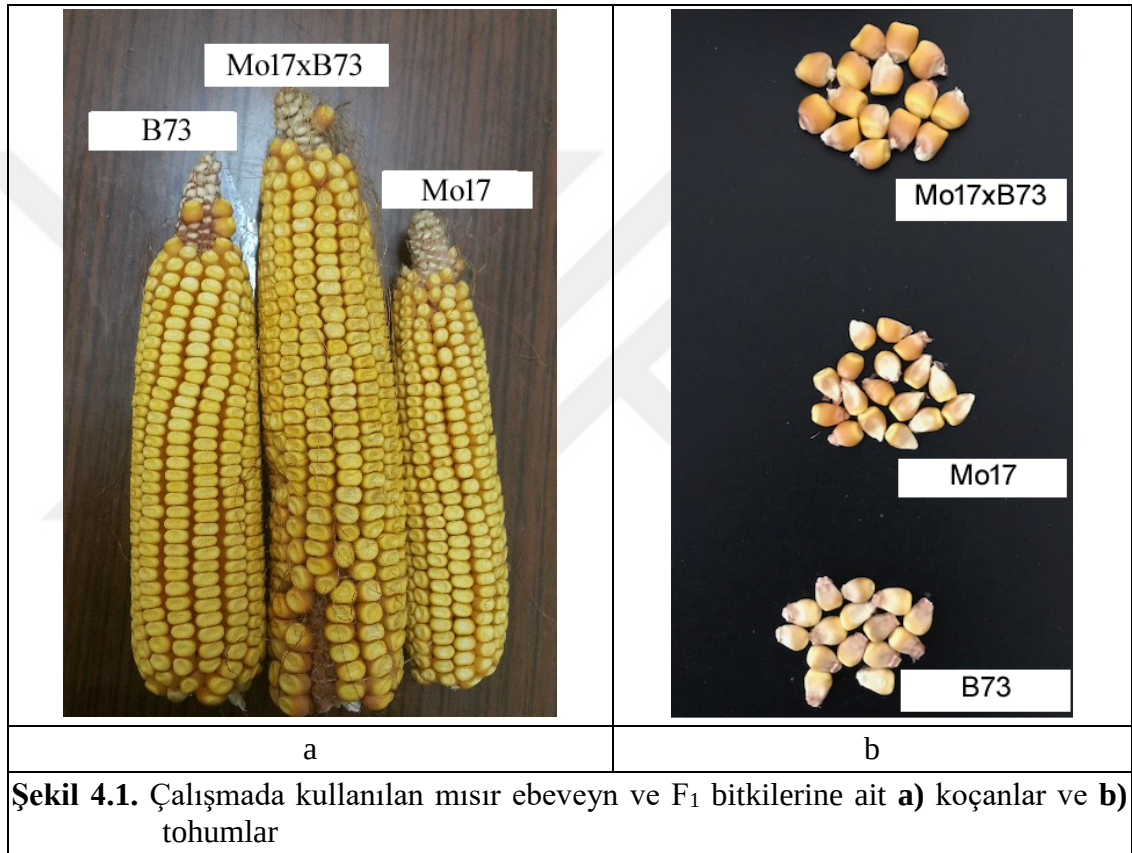
(^mC^mCGG/GG^mC^mC) gerçekleşmediği durumunu ifade edecek (-,- veya 1,1) şekilde gösterilmiştir. *MspI* ve *HpaII* reaksiyonları karşılaştırıldığında *MspI*'de bandın bulunması *HpaII* ise bulunmaması (+,- veya 0,1) durumu C^mCGG veya ^mC^mCGG olarak (CG metilasyonu) tanımlanacaktır. Dördüncü durum ise metilasyonun CHG ve CG motifinin her ikisinde olma durumunda karşımıza çıkabilmekte (-, + veya 1,0) olarak kodlanabilecek durumdur (Fulnecek vd. 2014).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Bu çalışma, Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen mısır hatlarının tohumları ile 2014, 2015, 2016 yıllarında Akdeniz Üniversitesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nde yürütülen, mısır ıslah çalışmalarında oluşturulan genetik materyal kullanılarak yürütülmüştür. Çalışmada Stiff Stalk ve Lancaster heterotik gruplarının önemli temsilcileri olan B73 ve Mo17 (*Zea mays* L.) mısır hattı tohumları kullanılmış olup ve bunların melezlenmesi sonucu elde edilen melez Mo17 x B73 ve tohumları ve koçan fotoğrafları Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan mısır ebeveyn ve F₁ bitkilerine ait **a)** koçanlar ve **b)** tohumlar

Çalışmada kullanılan tane örneklerinin tamamı kendilenmiş bitkilerin koçanlardan elde edilmiştir. Bu amaçla bitkiler çiçeklenme zamanında iken her sabah kontrolleri yapılmış ve dışarıdan toz almaması için koçanlar püskül çıkarmadan önce izole edilmişlerdir. İzole edilen koçanlar aynı bitkiden alınan polenleri ile kontrollü şekilde tozlanarak kendileme yapılmış, birbirleriyle (Mo17 x B73) tozlanarak melezleme gerçekleştirilmiştir. Çalışmada resiprokal melezlemeler yapılmış ancak kullanılmamıştır.

B73 ve Mo17 birbirinden uzak heterotik gruplara ait hatlar olup, birçok rekombinant kendilenmiş hatların eldesinde ebeveyn olarak kullanılan yarıyışlı genotiplerdir. ABD'de çoğu hibrit bu heterotik gruplara ait ebeveynler arasında yapılan melezlemeler sonucu geliştirilmiştir. Dünya çapında en göze çarpan melezlerden olan Mo17 x B73, bu melezlerin temsilcisidir (Lee vd. 2002).

4.2. Heterosisin Tespiti

4.2.1. Tohum ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları

F₁ hibrit çeşitlerin mısır bitkisinde başarılı bir şekilde ticari olarak kullanılmaya başlamasından sonra; heterosis ile oluşturulan çeşitler birçok kültür bitkisinde yaygınlaşmaya başlamıştır. Tohumluk üretimlerinin standart çeşitlere göre daha güç ve masraflı oluşuna karşın F₁ hibrit çeşitlerinin hızla geliştirilmesinin nedeni, bu çeşitlerin standart çeşitlere göre olan bazı üstün yanlarıdır. Heterosis etkisi gözlenen F₁ hibrit çeşitlerinde genellikle vejetatif ve generatif organlarda sayıca artışa ve irileşmeye neden olur (Lariepe vd. 2012).

Araştırmada incelenen tohum ağırlığı özelliği yönünden, F₁ yavru döllerinin ortalamasının, ebeveyn ortalamasına olan (%) artışı (3.2) eşitliği uyarınca üstün ebeveyne göre olan (%) artışı ise (3.3) eşitliği uyarınca hesaplanmıştır (Chang ve Smith, 1967).

Mo17, B73 mısır hatları ve bu hatlara ait F₁ tohumları 25x12 (25 tohum 12 replikasyon) adet olmak üzere tartılmış ve her bir replikanın 25 tane ağırlıkları dört ile çarpılarak 100 tane ağırlığı, heterosis ve heterobeltosis değerleri hesaplanmıştır.

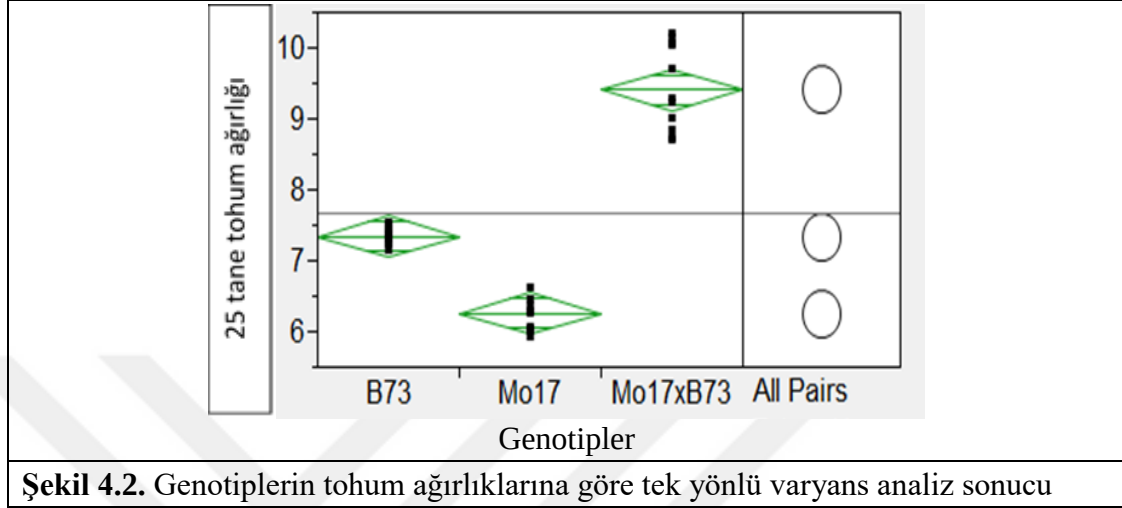
100 tane tohum ağırlıkları ortalamasında en düşük 25.08 g ile Mo17 iken B73 mısır hattı ise 29.376 g olarak belirlenmiştir. Bu hatlara ait F₁ bitkisi 100 tane tohum ağırlığı 37.624 g olarak ölçülmüş, % 38.18 heterosis ve % 28.07 heterobeltosis göstermiştir (Çizelge 4.1). Konak vd. (1999) 100 tane ağırlığını melez mısırlarda 29.2–34.8 g, heterosis oranını da % 1.34 ile % 22.58 arasında belirlemişlerdir. Kara (2001) 100 tane ağırlığında heterosis oranını % 1.9 ile % 33.5 arasında değiştiğini ifade etmiştir. Çalışmamızda F₁'de 100 tane ağırlığı Konak vd. (1999) ile benzerlik gösterirken heterosis oranı da Kara (2001) ile benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.1. Mo17, B73 ve Mo17xB73 100 tohum ağırlıkları

Replika	Mo17 (g)	B73 (g)	Mo17xB73 (g)
1	24.04	29.544	36.008
2	25.432	28.836	36.04
3	25.832	28.504	40.604
4	23.616	28.836	37.12
5	24.968	29.484	36.86
6	24.968	29.672	40.256
7	24.24	29.988	34.768
8	24.464	29.168	35.34
9	24.464	30.12	40.056
10	24.151	28.956	34.836
11	25.084	29.264	38.828
12	25.084	30.14	40.816
Ort.	25.08	29.376	37.624
SS	0.638	0.540	2.344

Ölçülen ağırlıklarda tek yönlü varyans analiz testi yapılmış ve bu sonuca göre genotiplerin ortalama tohum ağırlıkları yönünden istatistiki olarak 0.01 (p<0.001)

düzeyde önemli bulunmuştur. Bulunan P değerinin çok yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılığa sahip olması, genotiplerin birbirinden farklı gruplarda yer aldığını göstermektedir (Şekil 4.2). Genotiplere ait 100 tane ağırlıklarının birbirinden farklı gruplar oluşturması yapılan çalışmada F₁'e ait 100 tane ağırlığında gözlenen heterosisin yüksek olmasını desteklemektedir.



4.2.2. NaCl ve 5-azaC uygulaması yapılan fide ağırlıklarının ölçülmesi ve heterosisin tespiti çalışmaları

Sera ve arazi şartlarında kendileme ve melezleme çalışmalarından elde edilen F₁ tohumları ve bu melezin ebeveynlere ait tohumları hazırlanan çimlendirme bloklarında 16 saat 30°C ışık ve 8 saat 25 °C'de karanlığa ayarlanmış iklimlendirme kabininde 6 gün (144 saat) boyunca bekletilmiştir. Her gün aynı saatte 1.5 mM 5-azaC, 150 mM NaCl uygulanmış ve kontrol grubu için ise steril su kullanılmıştır. İklimlendirme kabininde 6 gününü dolduran tohumlar çimlendirme bloklarından alınmış, torfları bol su ile yıkanarak temizlenip kurutulduktan sonra bütün uygulamalardan elde edilen çimlenmiş tohumların (fideciklerin) tek tek ağırlık ölçümleri yapılmış, heterosis oranı (3.2) eşitliğince ve heterobeltosis oranı ise (3.3) eşitliğince belirlenmiştir. Uygulama ve kontrol fidecikleri arasında morfolojik değişiklikler görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. Çalışmada kullanılan mısır ebeveyn ve F1 bitkilerine ait kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulaması yapılan fideler

Araştırmada 6. gün fide ağırlıklarına ilişkin heterosis oranları kontrol grubunda % 70.05, 150 mM NaCl uygulamasında % 41.02 ve 1.5 mM 5-azaC uygulamasında ise % 35.57 değerleri bulunurken heterobeltosis oranları kontrol grubunda % 69.14, 150 mM NaCl uygulamasında % 34.14 ve 1.5 mM 5-azaC uygulamasında ise % 28.18 olarak belirlenmiştir. Ağırlık ölçümleri kullanılarak iki yönlü varyans analizi yapılmış olup istatistiksel anlamda 0.05 önemlilik düzeyinde pozitif yönde önemli bulunmuştur.

Yapılan ölçümlere göre NaCl uygulamasının tohum çıkışını ve fide ağırlıklarını olumsuz etkilediği gözlemlenirken 5-azaC uygulaması tohum çıkışı ve fide ağırlıklarında artışa sebep olmuştur.

Zhang vd. (2015) DNA metilasyonunun ıspanak büyümesi üzerindeki etkisini araştırmak için ıspanak tohumlarını demetilasyon reaktifi olan 5-azaC ile muamele etmişlerdir. 30 μ M 5-azaC ile muamele ettikleri ıspanak tohumlarında, ıspanak gelişimini ve tohum çimlenmesini teşvik ettiğini görmüşler fakat 100-1000 μ M arasındaki muamelelerde ise ıspanak gelişimi ve çimlenme yüzdesinde negatif korelasyon gösterdiğini söylemişlerdir.

F, Kon	A	Kon	A
F, Aza	A	Aza	A B
F, Tuz	A B	Tuz	B
B73, Kon	B C		
B73, Aza	C D		
Mo17, Kon	C D	F	A
B73, Tuz	C D	B73	B
Mo17, Aza	D	Mo17	C
Mo17, Tuz	D		

Şekil 4.4. Genotip ve uygulamaların fide ağırlıklarına ait iki yönlü varyans analiz sonucunun Tukey testi ile karşılaştırılması

Bu çalışmada 1.5 mM 5-azaC uygulanmış çimlenip gelişen 6 günlük mısır fidelerinde çimlenmeyi teşvik ettiği ve taze ağırlıklarında kontrol grubunun ortalamasıyla kıyaslandığında Mo17'yi % 5.3, B73'ü ise % 17 oranında arttırdığı görülürken Mo17xB73 hibritinin taze ağırlığında % 11.3 oranında azalma görülmüştür. Uygulamalar arasında genotipler de gözlenen 6. Gün fide ağırlıklarında ki artış/azalış oranları istatistiksel olarak farklı gruplandırılmamıştır (Şekil 4.4).

Ağırlık ortalamalarında istatistiksel olarak farklılık gözlenmesine rağmen homozigot durumda 5-azaC biyokütle üzerinde olumlu etki yaparken heterozigot durumda olumsuz etki yapmıştır (Çizelge 4.2). Homozigot durumda olan birey için 5-azaC uygulandığında sitozin bazların da ki metilasyon kaldırıldığından dolayı ifade edilen gen biyokütleyi artırmaya yönelik olduğundan bu genin ifadesiyle biyokütle artmış olabilir. Heterozigot birey içinse biyokütlenin azalması dominant olan gendeki metilasyon düzeyinin kaldırılmasıyla resesif gene olan baskının artmasıyla gen ifadesinin durdurulması ve ifade edilen genin biyokütleyi azaltması ile ilgili yorumlanabilir.

Kontrol ortamında ve 150 mM NaCl stresi uygulanan çimlenip gelişen 6 günlük mısır fidelerinde taze ağırlıklarında Mo17’de % 20.4, B73’de % 12.7 ve Mo17xB73’de % 30.8 oranında azalma görülmüştür. Demirkıran (2012) yaptığı çalışmada 100 mM NaCl stresine maruz kalan arpa tohumlarında çimlenme seviyesini ve fide gelişimini azalttığını ve arpa fidelerinin taze ağırlıklarını % 39 oranında düşürdüğünü öne sürmüştür. Bulgularımız bu araştırıcıyla paralel olup 150 mM NaCl stresine maruz bırakılan Mo17, B73 ve F₁ fide ağırlıkları ortalamaları kontrol ortamındaki fide ağırlık ortalamaları ile kıyaslandığında azalma görülmüştür (Çizelge 4.2). NaCl oranında ki artış su alımını inhibe ettiği için osmotik etkiden dolayı fide gelişimini olumsuz etkilemiştir (Yurtseven ve Baran 2000).

Çizelge 4.2. Kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulamaları sonucu fide ağırlıkları (g)

	Mo17			B73			Mo17 x B73		
	Kont	NaCl	5-azaC	Kont	NaCl	5-azaC	Kont	NaCl	5-azaC
1	0.98	0.8	1.14	1.03	0.83	1.04	1.61	1.03	1.64
2	0.9	0.73	0.98	0.91	0.85	0.93	1.56	0.94	1.49
3	0.86	0.7	0.93	0.92	0.72	1.1	1.65	1.13	1.41
4	0.99	0.7	0.82	0.78	0.87	1.38	1.88	1.2	1.24
5	0.89	0.81	1.06	0.97	0.86	1.12	1.59	1.18	1.3
6	0.99	0.74	0.97	1.05	0.84	1.06	1.25	1.13	1.37
7	0.94	0.73	0.98	0.96	0.82	1.11	1.59	1.11	1.42
Ort.	0.93	0.74	0.98	0.94	0.82	1.10	1.59	1.10	1.41
SS	0.053	0.044	0.100	0.09	0.050	0.137	0.184	0.090	0.130

Standart sapma belli bir populasyon da incelenen özellikle ilgili değerlerin ya da ölçümlerin ne genişlikteki bir aralıkta dağıldığının göstergesidir. Çizelge 4.2’ deki standart sapma değerleri karşılaştırıldığında en yüksek F₁ fidelerinde iken uygulamalar arasında ise 1.5 mM 5-azaC uygulanan fidelerdedir.

4.3. DNA İzolasyonu

Bitkilerde DNA ekstraksiyonu, moleküler düzeyde yapılacak analizlerin başlangıç noktasıdır. DNA ekstraksiyon yöntemleri bitki türleri, doku tipleri veya kullanılacak örneklerin hücresel özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir. DNA’ya bağlı yapılan tüm analizlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu etkileyen faktörlerin başında DNA kalitesi, saflığı ve miktarı yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerine ait DNA’lar CTAB tabanlı DNA ekstraksiyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bitki yaprak dokuları laboratuvarda -196 °C sıvı azot ile havan içerisinde toz haline getirilene kadar ezilmiştir (Şekil 4.5). Ezme işleminin ardından dokuların oksidasyona uğramaması ve dokunun taze kalması için örnekler DNA ekstraksiyon işlemlerine kadar -20 °C’lik derin dondurucuda saklanmıştır.



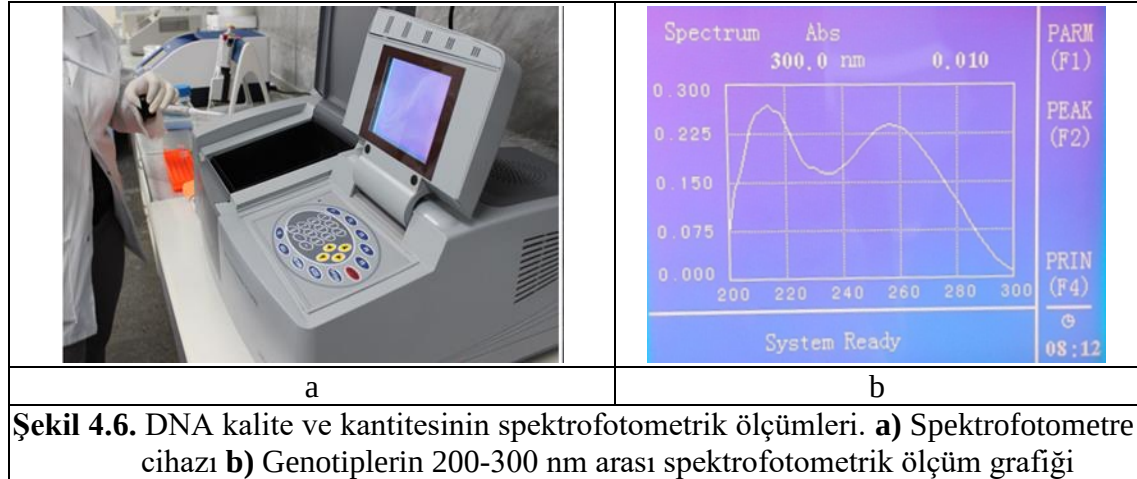
Şekil 4.5. Sıvı azot ile doku parçalama ve DNA izolasyon işlemleri

DNA ekstraksiyonu için her bir örnekten 2 g doku örneği kullanılarak ekstraksiyon işlemleri tamamlanmıştır. Çalışmada kullanılan örnek setleri 6. günün sonunda alınan fidelerden ve tohumlardan oluşturulmuştur. Mısır bitkisinde Mo17, B73 hatları ve bu hatlara ait F_1 tohumlarının her birinden birer adet olmak üzere tek tohum ve her bir uygulamadan da üçer örnek olmak üzere toplamda 12 farklı örneğin genomik DNA'larını başarıyla izole edilebilmesi için ve B73 hattında genetik karışıklığın ortadan kaldırılabilmesi adına toplamda 65 örnekten yapılan DNA izolasyonundan markır destekli seleksiyon yöntemi kullanılarak uygun paterni veren Mo17, B73, F_1 bitki ve tohumlardan 12 genomik DNA seçimi gerçekleştirilmiştir.

DNA ekstraksiyonun ilk aşaması olan lezyon aşamasında hücre içi agregat ve organellerinin kimyasal yolla parçalanması ve polisakkaritlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. LiCl ilavesi hem polisakkaritlerin hem de küçük RNA'ların ortadan kaldırılmasına yardımcı olmuştur. Bu aşamada su banyosu uygulaması kimyasalların etkin çalışmasına, polisakkarit ve yağların çözünmesine yardımcı olmaktadır. Kloroform ekledikten sonra santrifüj yardımıyla hücresel kalıntıların altta, protein ve polisakkaritlerin ortada ve nükleik asitlerin üst fazda olması sağlanmıştır. Dikkatlice alınan üst fazın üzerine izopropanol konularak nükleik asitler yoğunlaştırılmıştır. Karaca vd. (2005)'e göre modifiye edilen DNA izolasyonu etkin ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. DNA kalitesinin ve saflığının belirlenmesi

İzolasyonu tamamlanmış olan DNA'nın kalite ve miktarının belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemde 25 kat seyreltilmiş olan toplam DNA'nın analizinde absorbans 200 nm ile 300 nm dalga boyları arasında tam tarama yapılmış ve A_{230} , A_{260} ve A_{280} değerleri üzerinden DNA konsantrasyonu, polisakkarit varlığı, kimyasal kalıntı olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır (Sambrook ve Russell 2001). 200 nm-300 nm aralığındaki dalga boyu nükleik asitler için 260 nm, proteinler için 280 nm, polisakkarit ve fenolik bileşikler için ise 230 nm dir. A_{260}/A_{280} oranı örnek içindeki protein kontaminasyonunu belirlemek için kullanılır. Saf DNA örneklerinde bu oran yaklaşık 1.8-2.0 değerini vermelidir (Karaca vd. 2005). Örnekteki protein konsantrasyonu arttıkça A_{260}/A_{280} oranı azalır. A_{260}/A_{230} ise örnek içindeki organik kontaminantların (polisakkarit ya da fenolik bileşikler) varlığını ölçmek için kullanılır. Saf bir örnekte bu değer 2.0'a yakındır. Şekil 4.6'da çalışmada kullanılan spektrofotometre ve 200-300 nm arası spektrofotometrik ölçüm grafiği gösterilmiştir. Grafikte de görüldüğü üzere DNA'nın çözüldüğü solüsyon 220 nm ve biraz altında soğurma özelliğine sahiptir. Ancak bu PZR ve restriksiyon enzim kesim çalışmalarında bir sorun olarak ortaya çıkmamıştır. DNA örnekleri saf suda çözüldüğü zaman bu soğurma ortadan kalkmıştır.



DNA ile birlikte izole edilmiş ve DNA'ya bağlı olan protein ve polisakkaritler Polimeraz Zincir Reaksiyonlarını (PZR) ve diğer enzimsel reaksiyonlu çalışmaları olumsuz yönde etkilediği için kaliteli DNA'nın elde edilmesi başarılı bir çalışmanın ön koşullarından biri olarak kabul edilmektedir (Karaca vd. 2005).

DNA miktarının bilinmesi PZR çalışmalarının sağlıklı yapılabilmesi ve doğru sonuçlar alınmasını sağlar. Bu sebeple DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA konsantrasyonlarını belirlemek için farklı dalga boylarında okumalar yapılmıştır. Kalıntıların bulunması oran hesaplarıyla ayırt edilebilir. Bu çalışmada ki örnekler için yapılan farklı dalga boylarındaki okumalar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

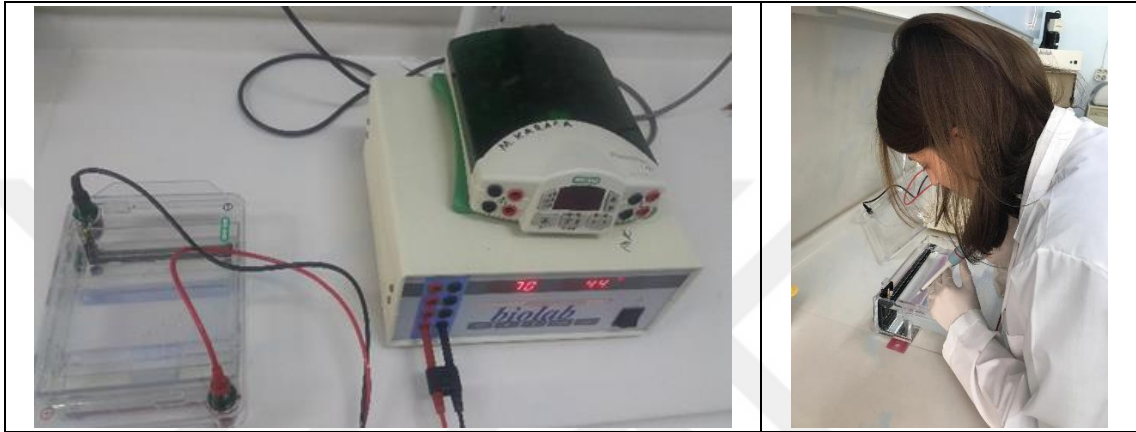
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan DNA örneklerine ait spektrofotometre okumaları

No	Örnek	Uygulamalar	A ₂₈₀	A ₂₆₀	A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	Mo17	Tohum	0.043	0.08	0.05	1.86	1.6
2	B73	Tohum	0.043	0.082	0.058	1.91	1.41
3	Mo17xB73	Tohum	0.042	0.08	0.056	1.9	1.43
4	Mo17	Kontrol	0.115	0.221	0.112	1.92	1.97
5	B73	Kontrol	0.088	0.177	0.105	2.01	1.68
6	Mo17xB73	Kontrol	0.085	0.164	0.065	1.9	2.5
7	Mo17	NaCl	0.058	0.111	0.055	1.9	2
8	B73	NaCl	0.107	0.204	0.106	1.91	1.92
9	Mo17xB73	NaCl	0.171	0.344	0.171	2	2
10	Mo17	5-azaC	0.043	0.074	0.049	1.7	1.5
11	B73	5-azaC	0.097	0.189	0.106	1.94	1.78
12	Mo17xB73	5-azaC	0.139	0.271	0.13	1.95	2.08

Çalışmada kullanılan DNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri sonucunda protein ve polisakkaritlerden arındırılmış olduğu ve elde edilen DNA miktarının çalışmanın yürütülebilmesi için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Ancak spektrofotometrik yöntem elde edilen DNA molekülünün kırılmış veya parçalanmış olmasını ortaya koyamamakta ve aynı zamanda RNA kalıntısının olup olmadığını da tespit edememektedir. Bu durumda elektroforetik yöntemler devreye sokulmaktadır (İnce 2010).

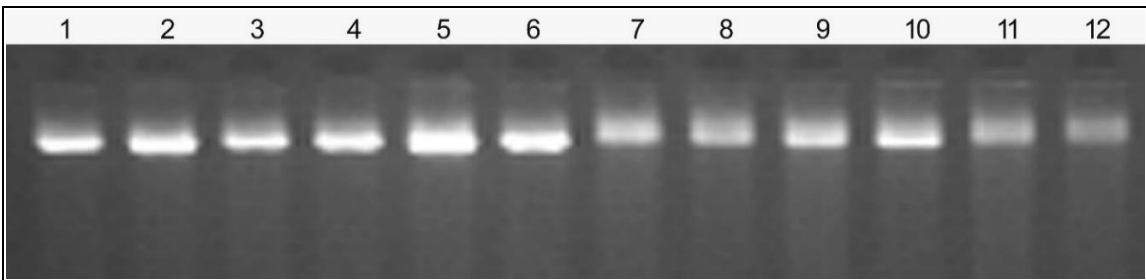
4.3.2. Agaroz jel elektroforez analizleri

Agaroz jel elektroforez yöntemiyle RNA kontaminasyonu, polisakkarit varlığı ve yüksek moleküler ağırlıktaki DNA'nın varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada DNA'nın kantite ve kalitesinin TRIS-Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmesi için % 1.5'lik agaroz jel, 1x TBE çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Jel içerisinde 0.05 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde ethidium bromit ilave edilerek genomik DNA'nın kalitesi tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan örnekler ait genomik DNA'lar 250 ng hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde 6x DNA (2 µL) yükleme çözeltisi ile karıştırılmış ve yüklenmiştir.



Şekil 4.7. Genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez analizleri

DNA örnekleri jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 1x TBE çözeltisi kullanılarak 5 V/cm uygulanmış ve 100 dakika süre ile yürütülmüştür (Şekil 4.7). Elektroforez işleminden sonra DNA mor ötesi (ultra viole, UV) absorbands ölçümleri aracılığıyla görüntülenmiş UVpro programıyla bilgisayar ortamında kaydedilmiştir. Yüksek moleküler ağırlığa sahip, RNA kalıntısından, proteinlerden, polisakkaritlerden arındırılmış genomik DNA agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir. PZR çalışmaları az miktarda DNA gerektirse de kullanılan DNA'nın saflığı doğru sonuç alabilmek için önemlidir.



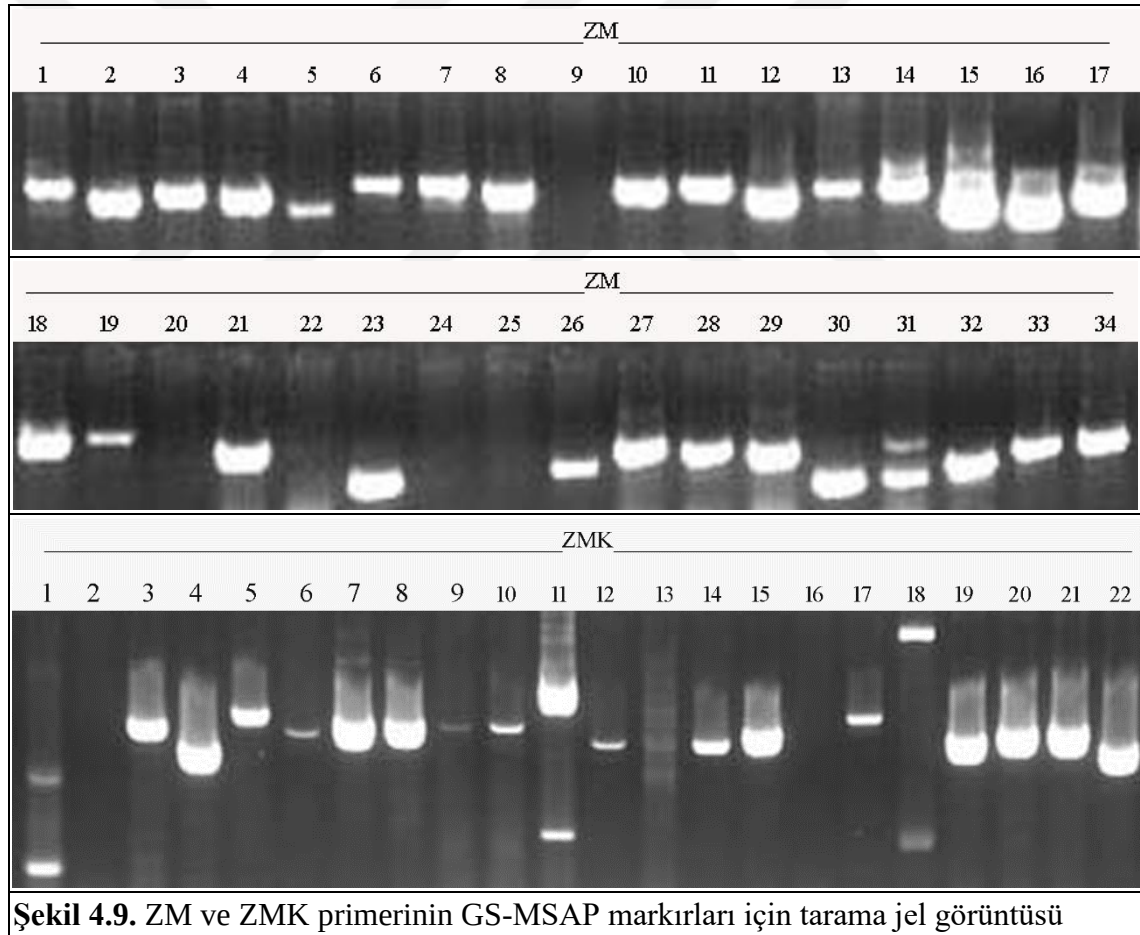
Şekil 4.8. Normalleştirilmiş (50 ng/µL) genomik DNA jel görüntüsü

4.4. Gen Spesifik Primer ve Bisülfid Primer Çiftlerinin Belirlenmesi

Çalışmada Methyl Primer Express Software, Sequencher Programı ve Kismeth programlarından yararlanılarak gen elementleri için primer çiftleri belirlenmiştir. Mısır

bitkisi için 56 primer çifti dizayn edilmiştir. Çalışmada primer çiftleri belirlenirken hedef bölgelerin promotör, kodlayan gen bölgesi, intron, ekson, UTR kısımları olmasına dikkat edilmiştir.

Çalışmada B73 mısır hattı tohum DNA'sı ile 56 adet primer çiftine 3 farklı annealing sıcaklık uygulanarak (55 °C, 60 °C ve 66 °C) gerçekleştirilen PZR sonu gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yöntemi ile multipleks, dupleks ve unipleks olarak kullanacağımız gen spesifik primer çiftleri belirlenmiştir. Multipleks ve dupleks için primer çiftleri belirlenirken aynı annealing sıcaklığına sahip olmaları ve primer sekans uzunlukları göz önünde bulundurulmuştur (Şekil 4.7). Yapılan PZR taramasında 56 adet primer çiftinden ZM 09, ZM 20, ZM 24, ZM 25, ZMK 02, ZMK 16 primerleri yani toplamda 6 adet primer PZR ürünü oluşturmamıştır. Zayıf PZR ürünü oluşturanlar ise 8 adet ZM 05, ZM 19, ZMK 01, ZMK 06, ZMK 09, ZMK 10, ZMK 12, ZMK 17 primerleridir. Geriye kalan 32 primerden gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yönteminde kullanılmak üzere unipleks, dupleks ve multiplekse uygun 18 primer çifti seçilmiştir.



Bisülfid primer çiftlerini belirlemek için ise daha önce bisülfid ile muamele edilmemiş B73 tohum DNA'sı ile gerçekleştirilen PZR sonucunda beklenen büyüklükte ve yoğunlukta PZR ürünü üreten 32 primer çiftinden aynı zamanda bisülfid ile muamele edilmiş B73 tohum DNA'sı ile uygun PZR profilinde gerçekleştirilen PZR sonucunda 5

bisülfıt primer çifti belirlenmiş ve 5 primer çifti ile devam edilmiştir. Bu primer çiftleri ZM 05, ZM 10, ZM 15, ZM 17, ZM 23'dir.

Çalışmada bisülfıt yönteminde mısır bitkisi genomunda bulunan 1- *cat1* genine ait ekson dizisinin 6028-6627 bp bölgesi (ZM 05), 2- *hox1a* genine ait intron bölgesinin 15381-16132 bp kısmı (ZM 10), 3- *hox1a* geninin 12773-13330 bp ekson kısmı (ZM 15) 4- *hox1a* geninin 19947-20644 bp ekson kısmı (ZM 17), 5- *aox1a* genine ait 23-434 bp 5 UTR bölgesi (ZM 23) çalışılmıştır.

4.5. Bisülfıt Dönüşümü, Bisülfıt-PZR, Klonlama ve Sekanslama Reaksiyonları

Mo17 ve B73 mısır hatları ile bu hatlara ait F₁ tohum DNA'ları ile kontrol, NaCl, ve 5-azaC uygulamalarının yapıldığı 6. gün fidelerinin genomik DNA'ları izole edilmiş ve bisülfıt reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla hazırlanmışlardır.

Bisülfıt optimizasyonu çalışmaları Invitrogen firması tarafından üretilmiş olan MethylCode Bisülfıt Dönüşüm (konversiyon) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan DNA miktarı 500 ng olarak ayarlanmış ve bu miktardaki DNA'nın etkin bir şekilde bisülfıt dönüşümüne uygun olduğu deneysel olarak tespit edilmiştir (Karaca ve İnce 2017). Bu işlem için dizisi bilinen bir bölgedeki bütün metillenmemiş sitozinlerin timine PZR sonucu dönüştüğü görülmüştür. Ayrıca bisülfıt dönüşümüne alınmış genomik DNA'nın çok kırılmaması etkin bisülfıt uygulamasından sonra önemli olan diğer bir noktadır.

Etkin bisülfıt dönüşümünde tüm metilli sitozinlerin değişmeden korunması, metilsiz sitozinlerin ise urasile dönüşümü sağlanmalıdır. Bunun yanı sıra genomik DNA'nın çok parçalanmadan korunması ve PZR'de kullanılabilir olmasıdır. Bisülfıt uygulamasının ardından 20 µL elüsyon solüsyonu ile çözünen bisülfıt uygulanmış DNA örneği değişik miktarlarda ANN 60 PZR profili kullanılarak bisülfıt dönüşümünün etkinliği araştırılmıştır.

Seçilen bisülfıt primer çiftlerinin mısır DNA'larında PZR ürünleri üretilip üretilmediklerinin belirlenmesi için seçilen lokuslar iki farklı PZR profilinde her bir lokusun hangi PZR profilinde daha etkin PZR ürünleri oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin tek PZR profilinde oluşturmuş olduğu amplikon özelliklerine uygun PZR profili belirlenmiştir. Çalışmada hedef lokusların optimizasyonun da ANN 60 profilinde çoğaltılması gerektiği belirlenmiştir.

Genel bir olgu olarak bisülfıt uygulanmış genomik DNA örneklerinin PZR etkinliklerinin az olması, zayıf yoğunlukta ürün üretmeleri, çoğu durumda zayıf gerçek olmayan ürünlerin üretilmesi nedeni ile PZR ürünlerinin doğrudan vektöre transferinde sorunlar yaşanabilmektedir. Bu sorunları azaltmanın bir yolu da PZR ürünlerinin önce jelde ayrıştırılması ve ayrıştırılmış hedef DNA fragmanının jelden izolasyonudur.

Çalışmada kullanılan lokuslardan sadece 25 µL PZR ürünü jelden izolasyon ve transformasyon için yeterli olmuştur. Her bir hedef için paralel 4 PZR yapılmasına gerek kalmamıştır. Klonlama işleminin ardında bakteri kültürü ve sekanslama işlemlerine geçilmiştir.

Çalışmada mısır bitkisi genomundaki *cat1* geninin ekson bölgesi, *hox1a* geninin ekson ve intron bölgeleri, *aox1a* geninin 5'- UTR bölgeleri çalışılmıştır. Çalışmada yaklaşık 10x96 (960) klon analiz edilmiştir. Bu 960 klonun içerisinde 96 klon kontrol fragmanlardan (bisülfid uygulaması yapılmadan klonlanan diziler) oluşmaktadır. Çalışmada kullanılan en düşük replika sayısı (aynı transformasyon ürününden kullanılan klon sayısı) 8 ve en fazla olan ise 12'dir. Fazla sayıda replika klonlanmasının temel nedeni bisülfid dönüşümünün kontrolünü sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Teknik replika ise aynı klonun birden fazla tekrarlar dizi analizlerinin yapılmasıdır. Çalışmamızda teknik replika yerine biyolojik replika olarak adlandırılan farklı transformasyon ürünlerinden elde edilen klonların kullanılmasıdır.

Çalışmada NaCl ve 5-azaC uygulamasının ebeveyn ve F₁ bireylerinin metilasyon düzeylerinin tespiti çalışmanın en önemli hedeflerinden birisidir. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri kontrol-NaCl ile kontrol-5-azaC ve ebeveynler ile F₁ arasında sitozin metilasyon paterni ve miktarı yönünden bisülfid sekanslama yöntemi için seçilmiş olan gen bölgelerinin sekans sonuçlarından çözünürlük ve güvenilirlik düzeyi yüksek olan sekanslama verilerinden üç farklı CG, CHG ve CHH metilasyon adacıkları incelendiğinde bu gen bölgeleri için bakılan adacıklarda herhangi bir metilasyon düzey farklılığı saptanmamıştır. Ebeveynler ile F₁ arasında sitozin metilasyon düzeyi arasında belirgin bir farkın görülmemiş olması çalışılan genlerde maternal veya paternal imprinting özelliğinin olmaması şeklinde yorumlanabilmektedir. Ancak çalışmada farklı yöntemler ile bazı genlerde sitozin metilasyon farklılıkları ortaya konmuştur.

Çizelge 4.4. Bisülfid sekanslama (BiSeq) yönteminde kullanılan gen bölgelerine ait metilasyon adacık içerikleri ve sayıları

Lokus	Metilasyon Adacıkları				Zea mays L. Genleri	Hedef
	CG	CHG	CHH	Σ		
ZM 05	22	28	48	98	Catalase 1 (<i>cat1</i>)	Ekson
ZM 10	24	15	66	105	Homeobox (<i>hox 1a</i>)	İntron
ZM 15	8	19	64	91	Homeobox (<i>hox1a</i>)	Ekson
ZM 17	18	38	72	128	Homeobox (<i>hox1a</i>)	Ekson
ZM 23	4	6	31	41	Alternative oxidase 1a (<i>aox1a</i>)	5-UTR

4.6. *MspI* ve *HpaII* Restriksiyon Enzim Kesim Denemeleri ve Hedef Lokusların Kesiminin Teyit Edilmesi

Pek çok ökaryotik organizmanın DNA'sı metillenir. Bu işlem sırasında enzimler aracılığıyla bazlara metil grupları eklenir. Metillemeye genellikle sitozinlere metil grupları eklenir. Metillenme, sitozin bazının 5. pozisyon durumunda olur. Böylece metil grubu DNA sarmalının büyük oluğunda çıkıntı yapar ve proteinlerin DNA'ya bağlanmasını engeller. Metillenme, genellikle CG çiftleri halindeki sitozinlerde ve her iki zincirde birden gerçekleştirilir. DNA'nın metilli olup olmadığını anlamada birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları kromotografi, iki yönlü kromotografi, elektroforetik ayırım, mass spektrofotometri, metilasyon spesifik PZR yöntemi, *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzim kesim yöntemleridir (Tekin vd. 2003; Karaca ve İnce 2017).

Stres koşulları altında oluşan genetik ve epigenetik varyasyonlar bitkilerin genotipini, fenotipini ve rejenerasyonunu dolayısıyla stres toleransını etkilediğinden, bitkinin farklı gelişim evrelerinde oluşan varyasyonların genetik veya epigenetik mekanizmaları ortaya konmalıdır. Tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış fide dönemindeki örneklerin *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzim kesim denemeleri ile metilasyon düzeyindeki farklılık araştırılmıştır.

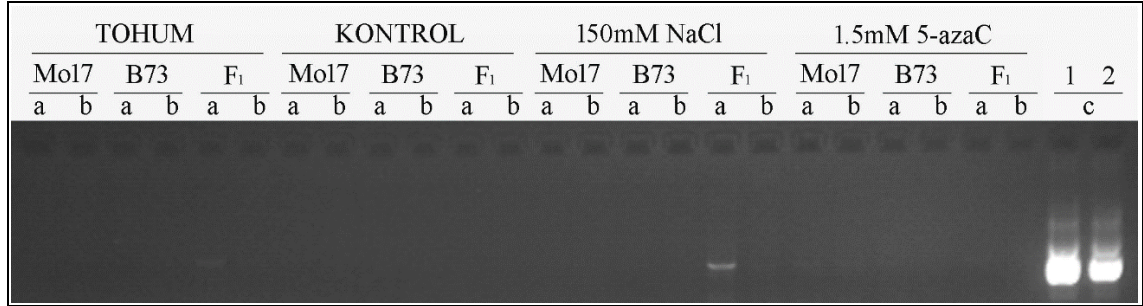
HpaII ve *MspI* restriksiyon enzimleri metilasyon çalışmalarında sık kullanılan ve birbirlerinin izoizomeri olan iki enzimdir. Bu enzimlerin her ikisinde 5'-CCGG-3' bölgesini tanırlar. Ancak sitozinlerin bazı metilasyon durumlarına karşı farklı hassasiyetlere sahiptirler. CCGG/GGCC bölgesinin metilsiz olduğu durumda her iki enzimde bu bölgeyi tanıyıp kesebilmektedir. Her iki sarmalda da (CC^mGG/GGC^mC) içteki sitozinin metilli olduğu durumda *MspI* enzimi DNA'yı keserken *HpaII* enzimi kesim yapamamaktadır.

Diğer bir durum ise tek bir sarmaldaki her iki sitozinin metillendiği ya da dıştaki sitozinin metilli (C^mC^mGG veya C^mCGG) olduğu durumdur. Bu durumda *MspI* enzimi tanıdığı diziyi kesemezken *HpaII* enzimi kesim yapabilmektedir. Son durum da her iki sarmaldaki sitozinlerin metillendiği (C^mC^mGG/GGC^mC^m) ve iki enziminde kesim yapamadığı durumdur (Fu vd. 2012). Bu nedenle jeldeki her bir pozisyon için jelde bandın varlığına (1) yokluğuna (0) atıfta bulunarak jelde dört farklı patern (1 1, 0 0, 1 0, 0 1) varyasyonu olarak bulunabilir (Fulnecek ve Kovarik 2014).

HpaII ve *MspI* restriksiyon enzimleri ile metilasyon konusundaki ilk çalışmaları Wall Wisk ve Flavell 1978 yılında, Sinzeret ve vd 1979 yılında, Cedar vd 1979 yılında yapmışlardır. Bu sistem CCGG bölgesinin analizini yapar ve toplam metilasyonun belirlenmesinde kullanılır. Başka bir deyişle diğer bölgelerdeki metilasyon farklılıkları kaçırılabilir. Çalışmamızda metilasyon farklılıklarının gözlenmesi için *HpaII* ve *MspI* enzimleri (Fermentas) kullanıldı. Aynı bitkiye ait DNA'lar için her iki enzimin kesim reaksiyonu farklı mikrosantrifüj tüplerinde son hacimleri 25 µL olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm (GS-MSAP)

GS-MSAP yönteminin etkinliğini ve maliyetini azaltmak adına multipleksler oluşturulmuş ve multiplekse dâhil olmayan lokuslar ise unipleks ve dupleks olarak uygulanmıştır. Çalışmada toplam 3 multipleks, 2 dupleks ve 2 unipleks testleri oluşturulmuştur. İlk olarak multipleks 1 içinde bulunan ZM 28 ve ZMK 19 lokusları *sus1* genine ait ekson ve intron bölgelerinden, ZM 31 lokusu *GST 27* genine ait kodlama bölgesinden, ZMK 21 lokusu ise *wakr1* genine ait bölgelerden geliştirilmiş olup ZM 28, ZM 31, ZMK 19 ve ZMK 21 lokuslarını multipleks oluşturarak *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesilmiş olan Mo17, B73 ve Mo17xB73 tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış olan fide genomik DNA'lar ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Genomik DNA'nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası multipleks 1 ile GS-MSAP sonucu **a)** *MspI* enzimi metilasyon paternleri **b)** *HpaII* enzimi metilasyon paternleri **c)** *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılmayan sırasıyla Mo17 ve B73 tohum genomik DNA'lar

Şekil 4.10'da bu lokuslara ait bantların görülmemesi *MspI* ve *HpaII* enzimlerinin kesim yapmasıyla açıklanmaktadır. Bu durum CCGG/GGCC bölgesinin (her iki sarmalda da) sitozinlerinin metil içermediğini göstermektedir (Fu vd. 2012). Buradaki diğer bir amaç ise *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri ile muamele edilen örnekleri enzimle muamele edilmeyenlerle karşılaştırmak ve enzimsel kesim reaksiyonlarının başarılı ve tam olduğu teyit ve tespit etmektir. Şekil 4.10'da ki jel fotoğrafında görülen bantlar *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri ile muamele edilmemiş Mo17 ve B73 tohum DNA'larının multipleks 1 ile çoğaltılması sonucu oluşan bantlardır.

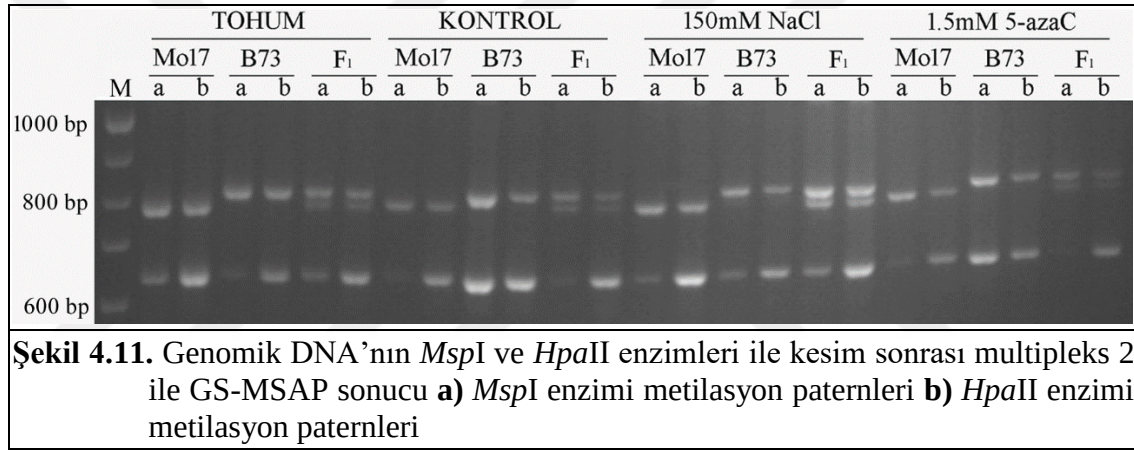
Multipleks 2'de ise ZM 02, ZM 05 lokuslarını *cat1* genine ait intron ve ekson bölgerinden, ZM 14 lokusunu *hox1a* genine ait ekson bölgesinden, ZM 18 lokusunu ise *mads2* genine ait ekson bölgelerinden dizayn edilmiştir. ZM 02, ZM 05, ZM 14, ZM 18 lokusları geliştirilmiş ve bu lokuslar PZR'de bir araya getirilerek multipleks 2 oluşturulmuştur. Oluşturulan multipleks *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesilmiş olan tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış Mo17, B73 ve F₁ fide genomik DNA'lar ile PZR işlemine tabi tutulmuştur.

Multipleks 2 ile gerçekleştirilmiş olan PZR çalışmaları sonucunda multipleks içinde bulunan lokuslardan ZM 05 (600 bp) ve ZM 18 (755 bp) lokuslarının bant oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). Bu durumda CCGG/GGCC bölgesindeki (Her iki sarmalda) hedef sitozinler metil içermemektedir. ZM 14 (790 bp) lokusu epigenetik açıdan F₁'de hem anneye hem de babaya ait bantları görülmektedir. Yani F₁'de metilli lokus sayısı tohum ve uygulamalar arasında farklılık göstermezken, ebeveynlere kıyasla da double metilli durumdadır. ZM 14'de hem *MspI* hem de *HpaII* enzimleri Mo17, B73 ve F₁'in tohum ve tüm uygulamalarında kesim yapamamıştır. Bu durumu jel görüntüsünde bantların varlığı ispatlamıştır. Bu durum ancak C^mC^mGG/GGC^mC^m (her iki sarmalda) durumda yani her iki sarmalda sitozinlerin metillendiği durumdur. ZM 02 (636 bp) lokusunun bant durumunda *MspI* enzimi keserken *HpaII* enzimi kesememiştir. Bu durum bize CC^mGG (her iki sarmalda) bölgesinde içteki sitozinin metilli olduğunu anlatmaktadır (Şekil 4.11). Ancak *MspI* enzimi kesmesine rağmen *MspI*'de görülen zayıf bantlar kopya sayısının fazlalığından dolayı olabileceği gibi bazı kopyalarda içteki sitozinin metilsiz olmasıyla ilgilide olabilmektedir.

ZM 02 lokusu için ayrı ayrı uygulamalara bakıldığında tohumda çok büyük farklılıklar gözlemlenmemiştir. Kontrol grubunda ise B73 genomik DNA'sının *MspI* ve

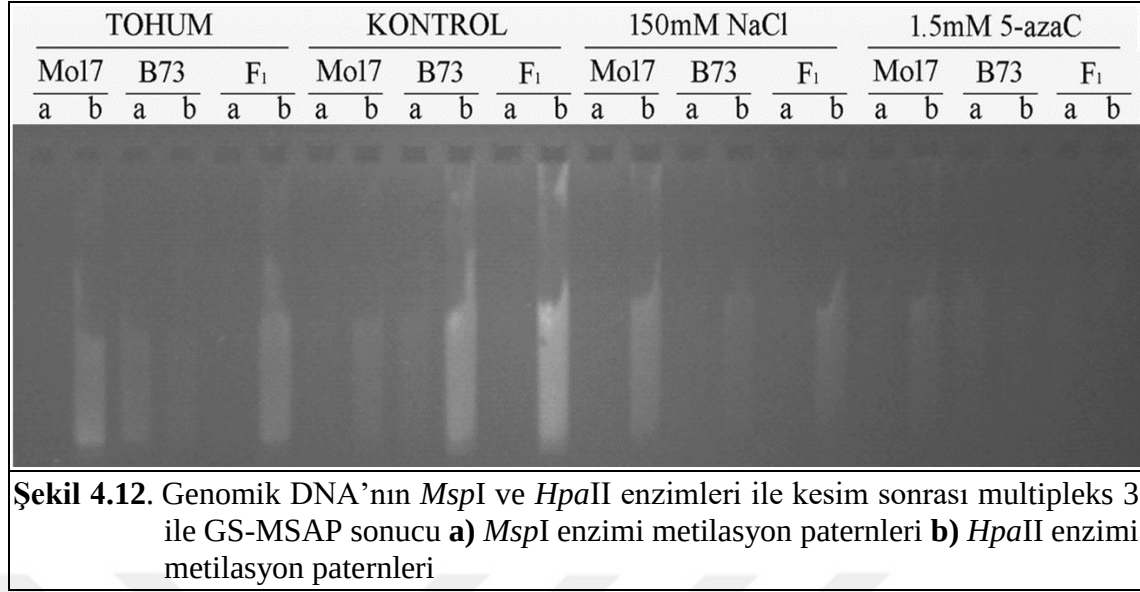
HpaII her iki enzim tarafından da kesilmemesi tam metilli olduğunu gösterirken Mo17 genomik DNA'sının *MspI* enzimi tarafından kesilip *HpaII* enzimi tarafından kesilmemesi içindeki sitozinin metillenmiş olduğunu göstermiştir. F₁ kontrol ise resesif gibi davranıp ebeveynlerden biri olan Mo17'ye benzemiştir. NaCl uygulaması ve kontrol kıyaslandığında ise bant yoğunlukları arttığı için NaCl uygulamasının metilasyon seviyesini arttırmıştır.

Wang vd. (2016) pamuk bitkisinde NaCl muamelesinin global DNA metilasyon seviyesini önemli ölçüde arttırdığını öne sürmüşlerdir. ZM 02 lokusu için çalışmadan elde ettiğimiz bulgular Wang vd. (2016)'nın sonuçlarını desteklemiştir. Çalışmada başka bir uygulamamız olan 5-azaC uygulamasıyla kontrol karşılaştırılırsa 5-azaC uygulamasının metillenmeyi azalttığı görülmüştür. Kondo vd. (2006)'da yaptıkları çalışmada 5-azaC'nin genomik DNA'nın demetilasyona neden olduğunu tespit etmişlerdir ve bu çalışmada ZM 02 lokusundan elde ettiğimiz bulgular söz konusu araştırmacıyı desteklemektedir. PZR ve yükleme uygulamaları düzenli ve dikkatli yapıldığı için ve bant yoğunlukları karşılaştırıldığında görülen farkın PZR hatası olmadığı belirlenmiştir.



Multipleks 3'e ait lokuslar ZM 15, ZM 17, ZM 21 ve ZMK 08 lokusları olup bu lokuslar *hox1a* geninden ZM 15 ve ZM 17, *aox1* geninden ZM 21, *eIF5* geninden ise ZMK 08 lokusları elde edilmiştir. Multipleks 3 lokusları *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesilmiş olan tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış Mo17, B73 ve F₁ fide genomik DNA'lar ile çoğaltılmıştır ve alınan sonuçların multipleks 1 sonucuyla aynı olduğu tespit edilmiştir.

Multipleks 3'ün içerisinde bulunan dört lokusun PZR sonucunda da hem *MspI* hem de *HpaII* enzimi tohum ve tüm uygulamalarda kesim yapmış olduğu için jel görüntüsünde bantlar görülmemektedir (0 0). Bu durum CCGG/GGCC bölgesinin (her iki sarmalda) sitozinlerinin metillenmediğini ispatlamıştır (Şekil 4.12).



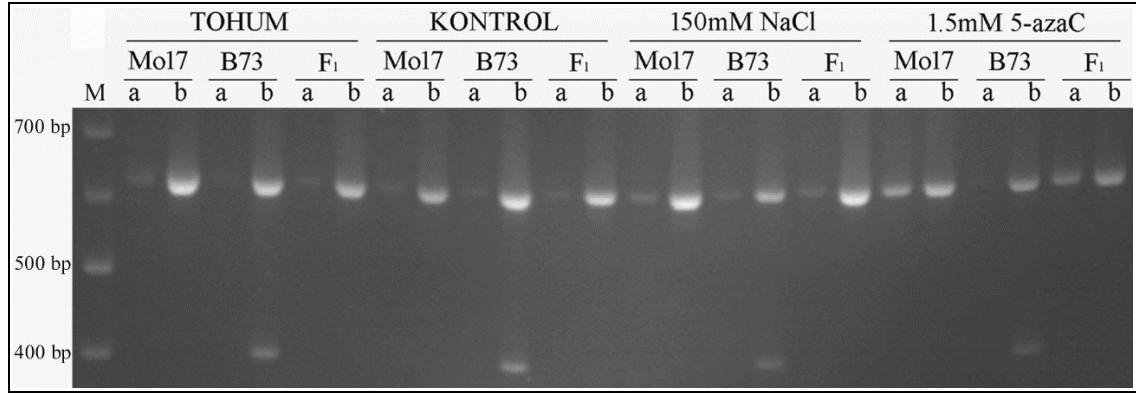
Uygulamalar arasında da değişiklik olmayıp ne NaCl metillenmeyi arttırmış ne de 5-azaC uygulaması metillenmeyi azaltmıştır. Restriksiyon enzimlerinin tamamen kesmesi ise çalışmada kullandığımız konsantrasyonların uygun olduğunu ve çalışmanın düzenli yürütüldüğünü göstermiştir.

Dupleks 1'i oluşturan lokuslar ZMK 07 ve ZM 30 lokuslarıdır. ZMK 07 lokusu *eIF5* genine ait ekson bölgesinden dizayn edilmiştir. Bu genin beklenen ürün boyutu ise 600 bp dir. Bu lokus ile gerçekleştirilmiş olan PZR çalışmaları sonucunda *MspI* enzimi keserken *HpaII* enziminin kesmediği belirlenmiştir. Bu durum içteki sitozinin her iki sarmalda da metilli olduğu anlamına gelmektedir. Multipleks 2'deki gibi *MspI* enzimi kesmesine rağmen ortaya çıkan zayıf bantların görülmesinin nedeni homolog kromozomlarda içteki sitozinin biri metilli iken diğerinin metilsiz olmasından kaynaklanabileceği gibi bazı kopyalarda ki iç sitozinin metilsiz olmasıyla da ilişkili olabilir. Uygulamalar ayrı incelendiğinde ise tohum, kontrol ve NaCl uygulamasında kendi içinde bir değişiklik görülmezken 5-azaC uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında anne ebeveyn olan Mo17'de 5-azaC uygulamasına rağmen metillenmenin arttığı görülmektedir. B73'de ise beklenen durum ortaya çıkmış ve 5-azaC uygulamasının metillenmeyi azalttığı tespit edilmiştir. Fakat F₁' de yine 5-azaC uygulamasına rağmen anne ebeveynin metilasyon paternini almış ve metillenmeyi arttırmıştır (Şekil 4.13).

Dupleks 1'i oluşturan diğer lokus ise *wak1* geninin 3 UTR bölgesinden dizayn edilen ZM 30 lokusudur. Bu gende beklenen boy 407 bp dir. Tüm uygulamalarda Mo 17 ebeveyninde hem *MspI* hem de *HpaII* de bant görülmediği (0 0) için metilsiz olduğu tespit edilirken, B73 ebeveyninde *MspI* enziminin kestiği *HpaII* enziminin kesmediği görülmüştür. Bu durum ancak CCGG bölgesinin her iki sarmalda içteki sitozinin metilli olmasıyla (CC^mGG/GGC^mC) açıklanabilir. F₁' de ise yine anne ebeveyn olan Mo17'nin metilasyon paternini aldığı görülmektedir.

Sun vd. (2015) yaptıkları çalışmada hibritlerde metilasyonun azaldığını demetilasyonun arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da ZM 30 lokusu için elde edilen sonuçta sadece 5-azaC uygulaması söz konusu araştırmacıların sonuçlarını desteklerken

diğer uygulamalar ve tohumda F₁'de metilasyon düzeyinde bir değişiklik görülmemiştir. F₁'de kontrol ve 5-azaC uygulaması karşılaştırıldığında bant yoğunluklarına bakıldığında 5-azaC uygulamasının metillenmeyi azalttığı görülmektedir (Şekil 4.13).

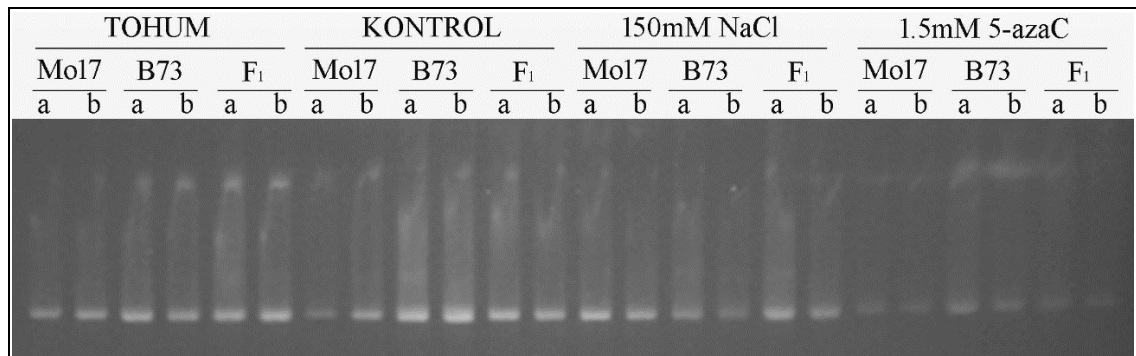


Şekil 4.13. Genomik DNA'nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası dupleks 1 ile GS-MSAP sonucu **a)** *MspI* enzimi metilasyon paternleri **b)** *HpaII* enzimi metilasyon paternleri

Dupleks 2, 745 bp boyunda ZM 33 ve 646 bp boyunda ZM 12 lokuslarının bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. *Mrp3* geninin source bölgesinden elde edilen ZM 33 lokusu, *hox1a* geninin ekson bölgesinden ise ZM 12 lokusu dizayn edilmiştir. Bu duplekste *MspI* ve *HpaII* enzimi lokusun birini tüm uygulamalarda keserken diğer lokusu da hiçbir uygulamada kesmemiştir.

ZM 33 lokusunu tüm uygulamalarda *MspI* ve *HpaII* enzimleri kestiği için bu lokustaki hedef sitozinler her iki sarmalda da metilsizdirler. Dupleks 2' ye ait jel görüntüsünde ZM 33 lokusunun bantları görülmemektedir (0 0) (Şekil 4.14).

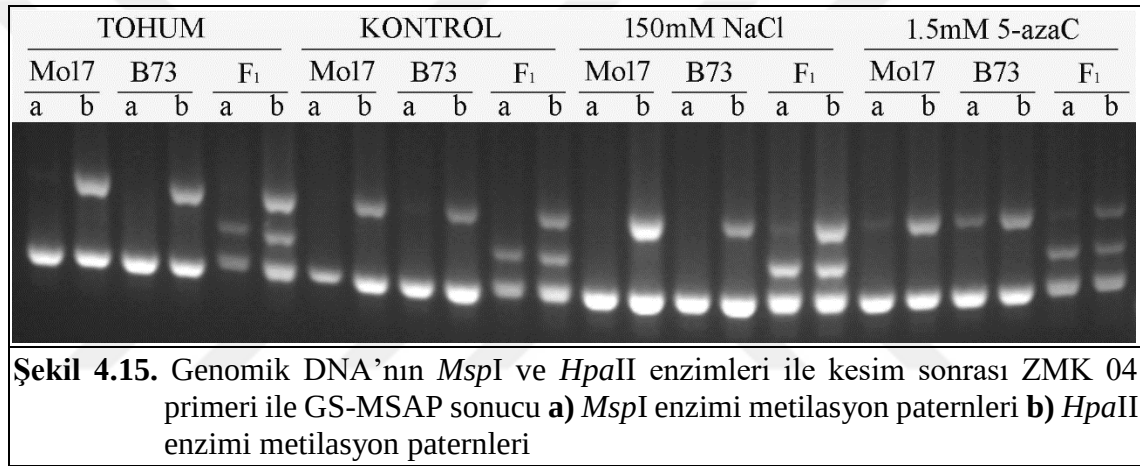
Şekil 4.14'de ZM 12 lokusu için tekrar jel görüntüsüne bakıldığında ise *MspI* ve *HpaII* enzimlerini hiçbir uygulamada kesim yapmadıkları ve her iki sarmalda da CCGG/GGCC bölgelerinde ki hedef sitozinlerin tam metilli olduğu belirlenmiştir (C^mC^mGG). Ancak 5-azaC uygulamasındaki bant yoğunlukları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 5-azaC uygulamasının metilasyon derecesini azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Genomik DNA'nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası dubleks 2 ile GS-MSAP sonucu **a)** *MspI* enzimi metilasyon paternleri **b)** *HpaII* enzimi metilasyon paternleri

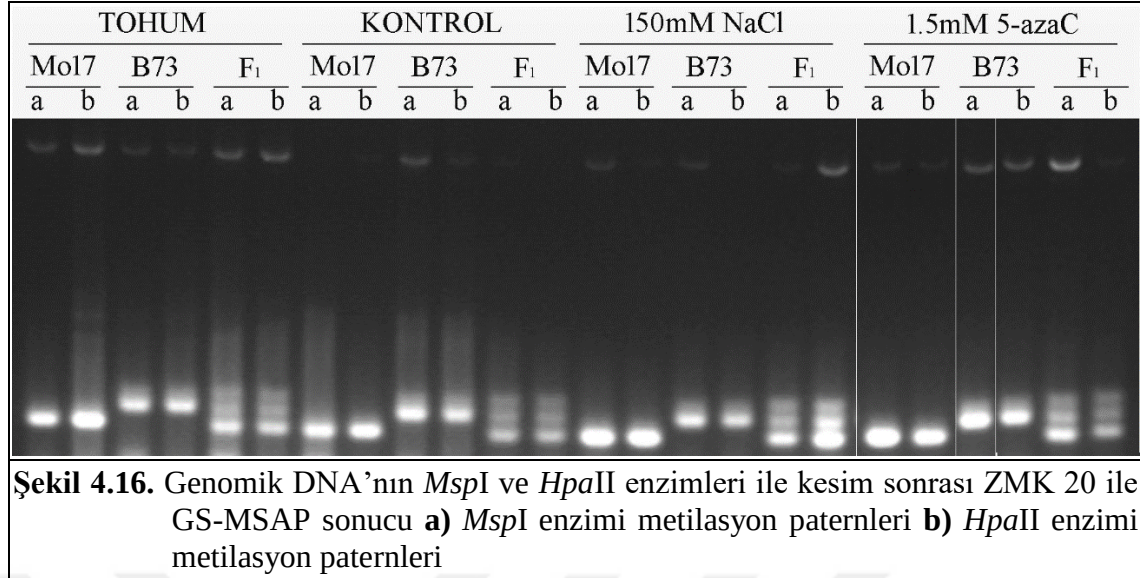
Unipleks olarak kullanılan lokuslardan biri *cat1* geninin ekson bölgesinden dizayn edilen ZMK 04 lokusudur. ZMK 04 (503 bp) lokusuna internal kontrol amaçlı ZMK 15 (528 bp) lokusu kullanılmıştır. İnternal kontrol kullanma amacımız ise verilerin güvenilirliğine inanmak ve aynı zamanda PZR kaynaklı sorunları ortadan kaldırmaktır. Şekil 4.14'e bakıldığında normalde ebeveynlerde görülmeyen bant F_1 'de ortaya çıkmıştır.

DNA metilasyon düzeylerine bakıldığında ise F_1 5-azaC uygulamasına rağmen metillenmiştir. Bu durum Sun vd. (2015) hibritlerde metilasyon seviyeleri ebeveynlerin ortalama değerlerinden daha düşük, demetilasyon olaylarının hibritlerde daha yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir. ZMK 04 lokusu için çalışmadan elde ettiğimiz bulgular Sun vd. (2015)'in sonuçlarını desteklememektedir. Heterosis ortaya çıkıyorsa regülasyon var demektir. Heterosisin ortaya çıkması için regülasyon bazı genleri olumlu yönde etkilemek için ortaya çıkarken bazı genleri bastırmak için ortaya çıkar. Buradaki F_1 bazı genleri bastırarak heterosisi arttırmaya yönelmiştir. ZMK 04 lokusu 503 bp uzunluğunda olup tam metillidir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15'te görüldüğü üzere her iki enzimde hiçbir uygulamada kesim yapamamıştır (1 1). Ancak uygulamalar arasında kontrol ve NaCl uygulaması karşılaştırıldığında NaCl uygulamasının metilasyonu arttırdığı tespit edilmiştir. Zhao vd. (2010) NaCl stresine bağlı demetilasyon lokusu yüksek tuz toleransına sahip pamuk hatlarında, düşük NaCl toleransına sahip pamuk hatlarına göre daha büyük oranda meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. ZMK 04 lokusunda kontrol ve NaCl uygulamalarından elde ettiğimiz bulgular söz konusu araştırmacıların elde etmiş oldukları sonuçları desteklemektedir.

İkinci unipleks lokusumuz *sus1* geninden dizayn edilmiş olan ZMK 20 lokusudur. İnternal kontrol olarak SSR 6 primeri kullanılmıştır. SSR lokusunun boyu 100-150 bp iken ZMK 20 553 bp boyundadır. Bu lokus için uygulamalara bakıldığında tohumda bir değişiklik görülmezken kontrol grubunda Mo17 metilsiz, B73 ya tam metilli ya da yarı metillidir fakat F_1 yine anne ebeveyn olan Mo 17'nin paternini alarak metilsizlenmeyi seçmiştir (Şekil 4.16).



NaCl ve 5-azaC uygulamalarındaki F₁'lerin durumu ise tam terstir. NaCl uygulamasındaki F₁ örneğinde *MspI* enziminin kesip *HpaII* enziminin kesmemesi NaCl uygulamasının metillenmeyi arttırdığını gösterirken, 5-azaC uygulamasında ki durum ise *MspI* enziminin kesmeyip *HpaII* enziminin kestiği durumdur. Bu durum tek sarmalda CCGG bölgesinin ya her iki sitozinin metillenmesi ya da tek sitozinin metillenmesi (C^mC^mGG ya da C^mCGG) ile karşımıza çıkmaktadır.

4.6.2. Metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm (MS-CULP)

Çeşitler veya hatlar arasındaki farklılığın tespit edilmesi veya çeşitlerle ebeveynleri arasındaki benzerliklerin ortaya çıkarılmasında DNA markırları yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydınöğlu vd. 2005; Karaca ve İnce 2008). Bu markırlar yardımıyla çalışmada kullanılan B73 hattında genetik karışıklığın olduğu tespit edilmiş ve yine markırlar yardımıyla doğru allelik paternini gösteren genotiplere ait genomik DNA'lar seçilse de bazı lokuslarda B73 ait genomik DNA'larında uygun olmayan paternler ortaya çıkmaya devam etmiştir. Bazı minisatellit markırlarda da bu durum karşımıza çıkmaktadır.

Minisatellitler ökaryotların genomlarında ard arda tekrarlanan DNA dizleridir ve büyüklükleri 10-100 baz çifti arasında değişen markırlardır (Jeffreys vd. 1985). Minisatellit bölgeleri hemen hemen bütün yüksek ökaryotik canlıların genomunda bulunur ve çok fazla çeşitlilik gösterir. Onlar tekrarlanan dizilerin farklı olmasından dolayı yüksek seviyede allelik uzunluk varyasyonu gösterirler. Bu tekrarlar insan genomunun % 5-10'u kadardır (Lewin 1997).

Her ne kadar ayırım güçleri yüksek olsa da minisatellit lokuslarının çok büyük olması çoğaltılmada engeller oluşturmaktadır. Ayrıca degrede ve kontamine örneklerde minisatellit lokuslarıyla çalışmak zordur (Saferstein 2004). Eşit olmayan crossing over veya gen dönüşleride allelik varyasyonun nedenleri arasındadır. Minisatellit bölgerindeki mutasyon oranları polimorfizm oranlarını arttırmakta ve bireylerin çoklu lokus profillerinin farklılaşmasına neden olmaktadır (Nakamura vd. 1987).

Minisatellitlerin temel avantajları yüksek polimorfizm ve tekrarlanabilir olmalarıdır. Benzer büyüklükte elde edilen DNA parçacıkları homolog olmama ihtimali ve band profillerinin lokuslar veya alleller açısından yorumlanamaması, istatistik analizinin zor olması, homozigot ve heterozigot ayrımının yapılamaması, fazla ve kaliteli DNA'ya gerek duyulması ve zaman alması gibi nedenler ise yöntemin dezavantajlarıdır. Bu markır sisteminin bu metilasyon çalışmasında kullanılma sebebi ise regülatör diziler olduklarından dolayıdır.

Bu çalışmada DAMD-PCR metodu MS-CULP metoduna dönüştürülerek kullanılmıştır. *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilen genomik DNA touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulmuş ve bazı çalışmalar touch-down polimeraz reaksiyon koşullarının kullanılmasının, DAMD-PCR ve kullanım oranının tekrarlanabilirliğini arttırabileceğini ortaya koymuştur (Karaca ve İnce 2008; İnce vd. 2009).

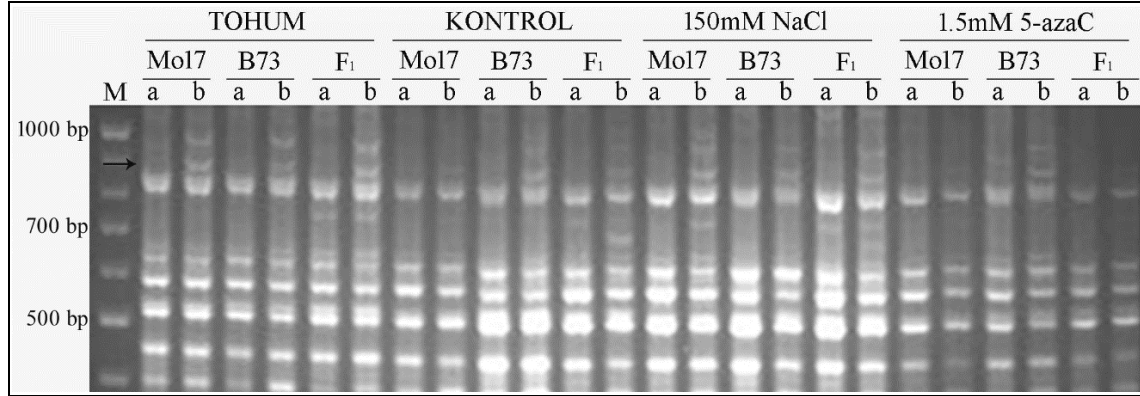
Tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulamalarının mısır genomu üzerindeki epigenetiksel etkilerini test etmek için 16 tane minisatellit markırı touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulmuştur ve elde edilen epigenetik sonuçlar yorumlanmıştır. Bu markırların bir kısmından epigenetik sonuç alınmadığı için 16 minisatellit markırı 2 grupta incelenmiştir.

4.6.2.1. DNA metilasyon farklılığı tespit edilen MS-CULP markırları

Toplam 16 minisatellit markırından 3 tanesinde epigenetik polimorfizm tespit edilirken 13 tanesinde genetik polimorfizm tespit edilsede epigenetik polimorfizm tespit edilmemiştir. Epigenetik sonuç alınan minisatellit primerleri, 33.6, YNZ22 ve URP 2F dir.

MspI ve *HpaII* enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiş olan tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış Mo17, B73 ve F₁ fide genomik DNA'ları 33.6 minisatellit markırıyla touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutularak çoğaltımı yapılmıştır. Minisatellit markırlarının profillerinin lokuslar veya alleller açısından yorumlanması zor olduğundan dolayı kopya sayısı fazla olan bantlar DNA metilasyon düzeyleri açısından değerlendirilmiştir.

33.6, YRNZ22 minisatellit markırlarında sadece ok işaretleri ile gösterilen alleller de aynı metilasyon paternine sahip epigenetik polimorfizm görülmüştür. Her iki markırda da ok işareti ile gösterilen allelde tüm genomik DNA'lar da *MspI* restriksiyon enziminin kestiği *HpaII* enziminin ise kesmediği bantların yokluk varlık durumuna göre tespit edilmiştir (0 1). Bu durum ancak (CC^mGG/GGC^mC) bölgesinde her iki sarmalda da içteki sitozin metilli olduğunda karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

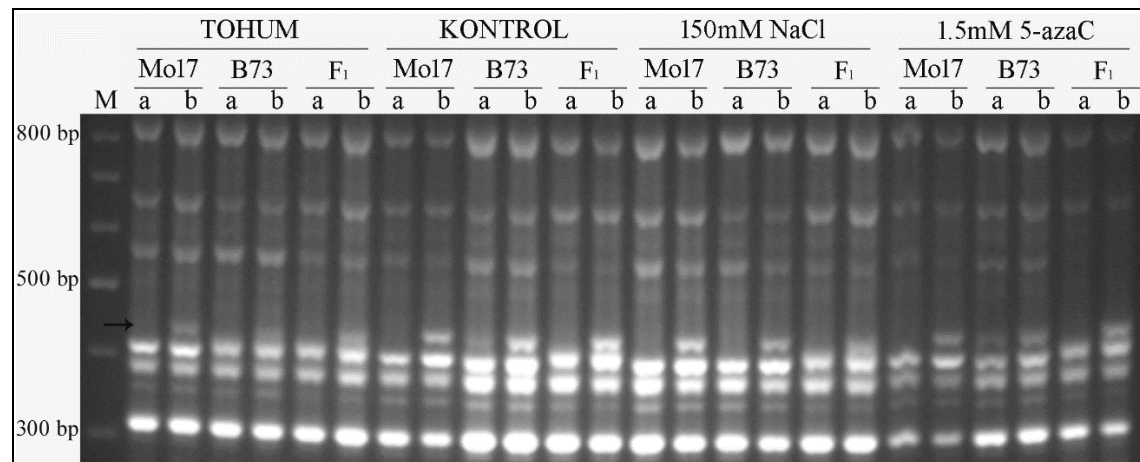


Şekil 4.17. Genomik DNA'nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası 33.6 primeri ile MS-CULP sonucu **a)** *MspI* enzimi metilasyon paternleri **b)** *HpaII* enzimi metilasyon paternleri

Şekil 4.17'da tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulamalarına ayrı ayrı bakıldığında 5-azaC uygulamasının F₁'de metilasyonu kaldırdığı belirlenmiştir. Gao vd. (2014) 5-azaC bileşiğinin hem hayvanlarda hem de bitkilerde DNA metilasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan minisatellit markırlarından 33.6 lokusu için elde ettiğimiz sonuç söz konusu araştırma sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Şekil 4.18'de ise uygulamalar arasındaki tek farklılık NaCl uygulaması B73 genotipinde de metillenme düzeyini artırarak hipermetilasyona sebep olmuştur. Ozmotik stresin bütün bitkisinde iki heterokromatik alanda geçici DNA hipermetilasyonuna sebep olduğu (Kovarık vd. 1997), kuraklık stresinin ise bezelyede DNA hipermetilasyonu ile sonuçlandığı yapılan araştırmaların arasında yer alırken (Labra vd. 2002), bütün bitkisinde NaCl'in DNA demetilasyonuna neden olduğunu öne süren araştırmalarda bulunmaktadır (Choi ve Sano 2007).

MS-CULP yöntemiyle YNZ22 minisatellit markırından elde ettiğimiz sonuç Kovarik vd. (1997) ve Labra vd. (2002)'nin sonuçlarını desteklerken, Choi ve Sano (2007)'nin sonuçlarını desteklememektedir.



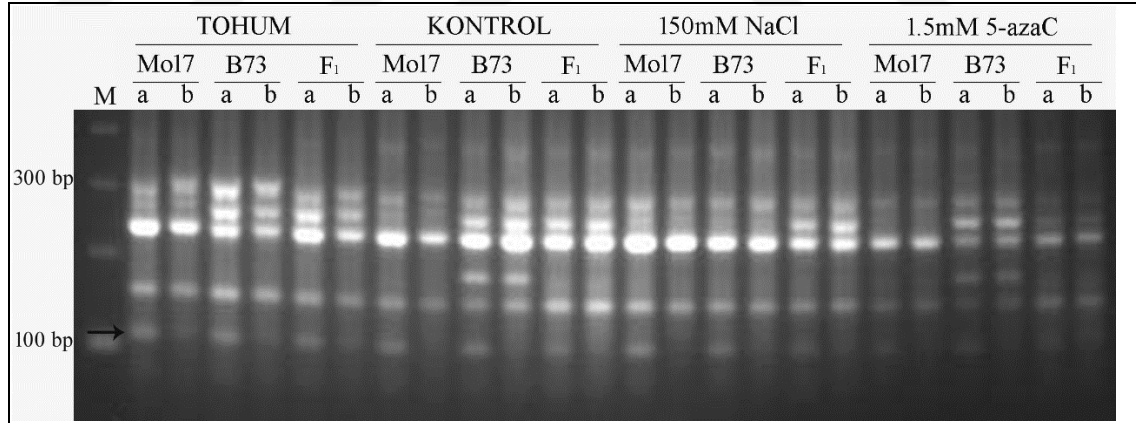
Şekil 4.18. Genomik DNA'nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası YNZ 22 primeri ile MS-CULP sonucu **a)** *MspI* enzimi metilasyon paternleri **b)** *HpaII* enzimi metilasyon paternleri

Şekil 4.19’de URP 2F minisatellit markırında ok işareti ile gösterilen allelde diğer iki minisatellit markırdan (33.6, YNZ22) farklı metilasyon paternine sahip epigenetik polimorfizm görülmüştür. Tüm genomik DNA’lar da *MspI* restriksiyon enziminin kesmediği *HpaII* enziminin kestiği rapor edilmiştir (10).

Bu durum C^mC^mGG veya C^mCGG (tek sarmalda) olduğu durumda karşımıza çıkabilmektedir. Ancak CCCG bölgesinin tam metillimi yarı metillimi olduğunu anlamak mümkün değildir. Uygulamalar ayrı ayrı incelendiğinde ise 5-azaC uygulamasında ebeveynlerdeki bant yoğunluklarının düşük olmasından dolayı metillenme düzeyini azalttığı tespit edilirken hem *MspI* hem de *HpaII* enzimleri 5-azaC uygulamasında F_1 ’de kesim yapmadıkları için 5-azaC uygulamasına rağmen F_1 metil durumunu hipermetilli duruma getirmiştir (C^mC^mGG/GGC^mC^m).

Zha vd. (2008) yüksek heterotik hibritlerde bulunan demetilasyon lokuslarının sayısının, düşük heterotik hibritlere göre daha yüksek olduğunu ve Tani vd. (2012) hibritlerin, ebeveynlere göre yoğunlukla ilişkili metilasyon değişikliklerine daha dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. URP 2F minisatellit markırı için çalışmadan elde ettiğimiz bulgular yukarıda ifade edilen söz konusu araştırmacıların elde etmiş oldukları sonuçlardan Zha vd. (2008)’in sonuçlarını desteklerken Tani vd. (2012)’nin sonuçlarının desteklememektedir.

HpaII enziminin kesmesine rağmen tohum da zayıf bantların ortaya çıkması ve bu bantların fide döneminde görülmemesi çimlenmenin başladığı anda metilasyonun kaldırıldığını göstermiştir (Şekil 4.18). Ayrıca tohumun triploid ($3n$) kromozom taşıyan endosperme sahip olmasında bu duruma sebep olabilecek nedendir.



Şekil 4.19. Genomik DNA’nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası URP 2F primeri ile MS-CULP sonucu **a)** *MspI* enzimi metilasyon paternleri **b)** *HpaII* enzimi metilasyon paternleri

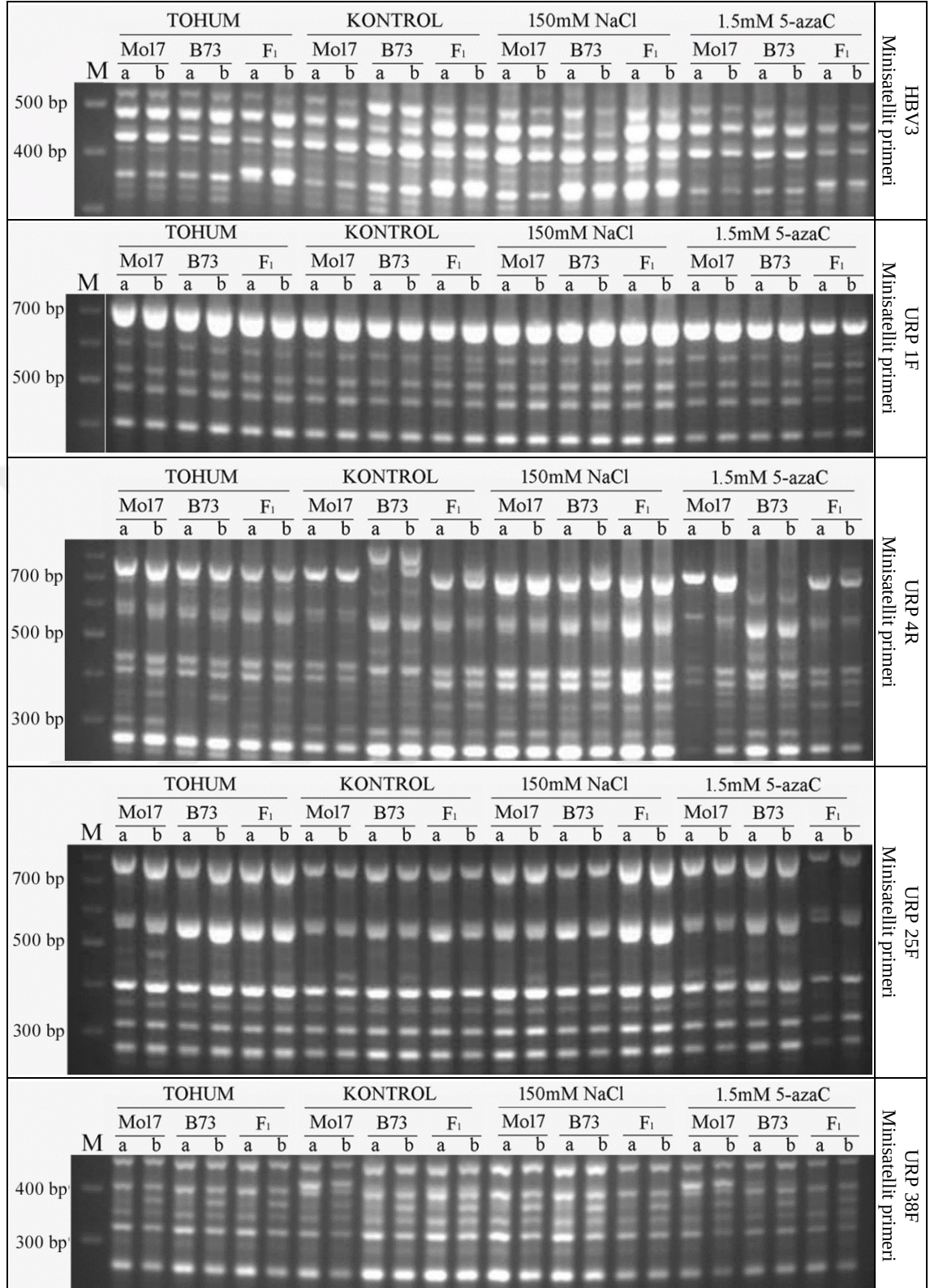
4.6.2.2. DNA metilasyon farklılığı tespit edilemeyen MS-CULP markırları

Toplam 16 minisatellit primerinden 3 tanesinde DNA metilasyon farklılığı MS-CULP markırı olarak tespit edilirken 13 tanesinde DNA metilasyonu farklılığı ile ilgili sonuca rastlanmamıştır. Bu markırlar 6.2H(-), 6.2H(+), FVIIEX8, HBV3, URP 1F, URP 4R, URP 6R, URP 9F, URP 13R, URP 25F, URP 30F, URP 32F, URP 38F dir.

MspI ve *HpaII* enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiş olan tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış Mo17, B73 ve F₁ fide genomik DNA'ları bu markırlar ile touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutulmuş ve çoğaltımı yapılmıştır. Anne, baba ve yavru olarak değerlendirilen mısır hatları arasında oluşturulan alleller yorumlanarak bu markırlar açısından genetik polimorfizme rastlanmış fakat metilasyon farklılığı olarak polimorfizme rastlanmamıştır (Şekil 4.20).

Bu çalışmada çok geniş bir yelpaze organizmada tamamlayıcı dizileri bulunan minisatellit primer çiftlerinin DNA sitozin metilasyon farklılıklarının tespitinde kullanılabileceğine dair kuvvetli bulgular elde edilmiştir. Örneğin YNZ 22 ve URP 4 primerinin kullanımı ile metilli ve metilsiz minisatellit lokuslarını etkin bir şekilde ortaya konulabilmektedir.

DNA dizi bilgisi gerektirmeden DNA metilasyon düzeylerinin tespitinde kullanılabilecek yöntem olan MS-CULP yönteminin diğer önemli kültür bitkilerinde kullanılabileceğine dair kuvvetli bulgular elde edilebilmiştir. Çalışmada MS-CULP yönteminin geliştirilmesinde kullanılan primerlerin dejenerant tipe dönüştürülerek tekrar denemesi yöntemin daha etkin olarak kullanılabilesine olanak tanıyabilecektir.



Şekil 4.20. Genomik DNA'nın *MspI* ve *HpaII* enzimleri ile kesim sonrası metilasyon farklılığı tespit edilemeyen MS-CULP sonucu a) *MspI* restriksiyon enzimi metilasyon paternleri b) *HpaII* restriksiyon enzimi metilasyon paternleri

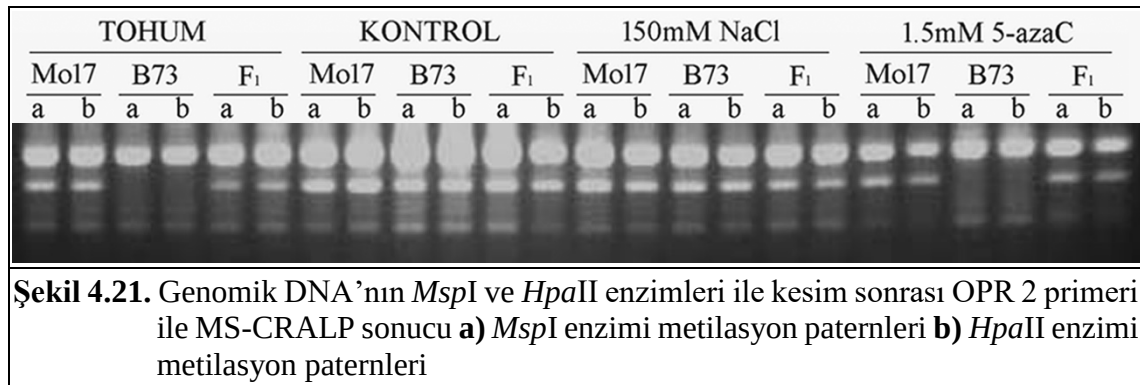
4.6.3. Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm (MS-CRALP)

MS-CRALP yöntemi RAPD yönteminin modifikasyonu olan bir yöntem olup bazı kaynaklarda MS-RAPD veya MS-AP-PCR olarak kullanılmaktadır. RAPD yönteminde genellikle tek, kısa ve rastgele oligonükleotid primerler kullanarak hedef DNA dizilerinin çoğaltılması bulunmaktadır. Bu yöntem duyarlı, hızlı ve çok sayıdaki örneğe uygulanabilen bir yöntemdir. Bu primerler ile genetik işaretleyici olarak ve özgün nükleotid dizi bilgilerine gerek duymadan polimorfizm belirlenebilir (Waugh ve Powell 1992).

RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde, nükleotid sırasında belirli bir ölçü olmadan rastgele hazırlanan primerlerin (yaklaşık 10 bp), düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak, komplementeri olan hedef bölgelere yapışması ve bu bölgelerin PZR tekniği ile geometrik olarak çoğaltılması temelini oluşturmaktadır (Bardakçı 2001).

Genel olarak RAPD tekniği diğer tekniklerle karşılaştırıldığında en büyük avantajı; az miktarda ve düşük kalitede DNA'nın yeterli olması ve DNA baz sırasına ilişkin ön bilgiye ihtiyaç olmamasıdır (Williams vd. 1990). Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilen ve bu oligonükleotidler özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma gerçekleştirmektedirler. RAPD tekniğinin, diğer yöntemlere göre basit, daha ucuz ve daha az iş gücü gerektirmesi de bu yöntemin avantajlarıdır. Dezavantajları ise tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve genellikle dominant markırlar vermesidir (Karaca 2001).

Bu çalışmada MS-CRALP yöntemi ile metilasyon profillerinin anlaşılabilmesi için genomik DNA örnekleri, *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri ile kesime uğratılmıştır. Kesimi gerçekleştirilen ürünlerin taşıdığı epigenetik farklılığı belirlemek amacıyla OPR 1, OPR 2, OPR 4, OPR 5 primerleri touch-down PZR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.21).



MspI ve *HpaII* enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiş olan tohum, kontrol, NaCl ve 5-azaC uygulanmış Mo17, B73 ve F₁ fide genomik DNA'ları OPR 1, OPR 2, OPR 4, OPR 5 oligo primerleriyle touch-down polimeraz zincir reaksiyonlarına tabi tutularak çoğaltımları yapılmıştır ve alınan sonuçlara göre her bir markır için tohum, kontrol ve uygulamalar arasında herhangi bir DNA sitozin polimorfizme rastlanmadığı tespit edilmiştir.

OPR 1, OPR 2, OPR 4 markırları içinde aynı olup jel görüntülerinde ki bantların varlığı (1 1) her iki sarmalda da C^mC^mGG/GGC^mC^m sitozinlerin metilli olduğunu göstermektedir. OPR 5 markırında da diğer oligolarda olduğu gibi tohum, kontrol ve uygulamalar arasında monomorfik sonuç elde edilmiş ve CCGG/GGCC bölgelerinde her iki sarmalda da hedefteki sitozinlerin metilsiz olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre seçilen dört primerin bu tür çalışmada uygun olmadığı ama bantların elde ediliyor olması belki bundan sonraki çalışmalarda farklı oligo primeri kullanılarak çalışmanın devam edebileceğini göstermektedir.



5. SONUÇLAR

Mısır (*Zea mays* L.) dünyada ve ülkemizde insan beslenmesinde en fazla kullanılan bitkilerin başında gelmektedir. Mısırın insan beslenmesinde önemli bir bitki olmasının yanında heterosis göstermesi, genomda yer değiştiren elementlerin (transposable) ilk çalışıldığı bitki olması yanında paramutasyonun da ilk belirlendiği bitkilerden olması, yüksek ekonomik önemi olması mısırı moleküler çalışmalar için ideal bitki yapmaktadır. Ayrıca göreceli olarak küçük genom büyüklüğü, diploit genom yapısı, melezleme ve kendileme çalışmalarının kolaylığı nedeniyle mısır önemli bir model bitki konumundadır (Swanson-Wagner vd. 2006; Ji vd. 2014; Hochholdinger vd. 2018; Karaca ve İnce 2017).

DNA'da dizi değişimi olmaksızın gen anlatımı ve fonksiyonundaki kalıtsal değişimler epigenetik olarak tanımlanmaktadır. DNA metilasyonu epigenetik düzenlemeler arasında en iyi ve yaygın olarak çalışılmış olan mekanizmadır (Karaca ve İnce 2017). Heterosis ise günümüze kadar moleküler temelleri çözülmemiş bir fenomendir (Lariepe vd. 2012). Bu sebeple bu çalışmanın esas amaçlarından bir tanesi heterosis metilasyonun epigenetik regülasyonu olan etkisinin olup olmadığını ortaya koyarak katkı sağlamaktır. Bunun yanı sıra NaCl ve 5-azaC uygulamaları ile değişen metilasyon düzeylerini tespit etmektir. Bu durum dört farklı metot ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu yöntemler bisülfid sekanslama yöntemi (BiSeq), gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yöntemi (GS-MSAP), metilasyon duyarlı kesilmiş universal uzunluk polimorfizm yöntemi (MS-CLUP), metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm (MS-CRALP) yöntemidir.

Bu çalışmada heterosis oranları Mo17, B73 mısır hatlarına ait tohumlar ve bu hatlara ait F₁ bitki tohum ağırlıkları tek yönlü varyans analizi sonucunda oldukça önemli bulunmuş ve heterosis % 38.18 olarak tespit edilmiştir. Başka bir heterosis tespiti ise çimlenmiş tohumların fidelerinin yaş ağırlıkları ile yapılmıştır. Her bir genotip (Mo17, B73 ve F₁) günlük su (kontrol), NaCl ve 5-azaC uygulamasının ardından 6 gününü dolduran fidelerin ağırlıkları çift yönlü varyans analizlerine tabi tutulmuş ve sonuçlar istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En yüksek heterosis oranı % 70.05 ile kontrol grubunda çıkarken bunu % 41.02 ile NaCl ve % 35.57 ile 5-azaC uygulamasındaki heterosis oranları takip etmiştir. NaCl stresi etkisinin belirlenmesi için stres faktörü uygulanmış bitkiler kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve NaCl konsantrasyonun fide gelişimini azalttığı saptanmıştır. 5-azaC uygulaması ise ebeveynlerin fide gelişimini arttırırken F₁'de negatif etki yaptığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda uygulamalar arası metilasyon düzeyini ve heterosis DNA metilasyon ilişkisini tespit etmede kullanılan yöntemlerde bir tanesi de bisülfid sekanslama yöntemidir. Bisülfid sekanslama yönteminde kullanılan hedef gen bölgeleri DNA sitozin metilasyon paternleri yönünden incelendiğinde çalışmada kullanılan gen bölgelerinin ebeveynler ve bunların melezi olan F₁'e uygulanmış olan NaCl, 5-azaC kontrolle karşılaştırıldığında CG, CHG ve CHH adacıkları yönünden metil düzeylerinde herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada yeni lokuslar kullanılarak BiSeq analizlerinin yapılmasının daha etkin sonuçların elde edilmesine ışık tutacağı kanatine varılmıştır.

Bu çalışmada gen spesifik metilasyon duyarlı amplifikasyon polimorfizm yöntemi ile mısır gelişiminde önemli olan genlerden elde edilen 18 adet gen spesifik primer kullanılarak lokusların sitozin metilasyonu farkları araştırılmıştır. Alınan sonuçlara göre 18 lokustan 6 lokusun metilli (ZM 14, ZM 02, ZMK 07, ZM 12, ZMK 04, ZMK 20), 12 lokusun ise sitozinlerinin metilsiz olduğu belirlenmiştir. Sitozinlerinde metilasyon farklılığı ortaya koyamayan primer çiftleri ZM 28, ZM 31, ZMK 19, ZMK 21, ZM 05, ZM18, ZM15, ZM 17, ZM 21, ZMK 08, ZM 30 ve ZM 33 olarak tespit edilmiştir. Bu lokuslarda sitozin dışındaki metilasyon çalışmalarında kullanılmalarında yararlar olabileceği öngörülmüştür.

Çalışmada kullanılan metilasyon duyarlı kesilmiş üniversal uzunluk polimorfizm yönteminde ise DNA metilasyon farklılığı görülen primerleri 33.6, YNZ22 ve URP 2F olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde toplam 16 primerden 13 adedinde [6.2H(-), 6.2H(+), FVIIIEV8, HBV3, URP 1F, URP 4R, URP 6R, URP 9F, URP 13R, URP 25F, URP 30F, URP 32F, URP 38F] DNA metilasyon farklılığı tespit edilememiştir.

Metilasyon duyarlı kesilmiş rastlantısal çoğaltılmış uzunluk polimorfizm yöntemi için seçilen dört oligo primerinde herhangi bir metilasyon farklılığı tespit edilmediği için bu primerlerin mısırdaki DNA metilasyon çalışmalarına uygun olmadığına karar verilmiştir. Ancak yeni primerler kullanılarak metodun kullanılmasında yararlar olabileceği öngörülmüştür.

Çalışmada kullanılan ve tamamen bizim dışımızdan kaynaklı ebeveynlerden bir tanesinde karşılaşılan genetik karışıklıkta kaynaqlanan çalışmada demetilasyon ajanı olarak kullanılan 5-azaC'nın gerek süre ve gerek doz uygulamalarında imkanlar gözönüne alındığında etkin sonuçlar ortaya konulacak deneyler ne yazık ki tam anlamıyla yapılamamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda gerek 5-azaC kaynağı, gerek yeni doz, yeni süreler ve yeni genotipler eklenerek başta bisülfid sekanslama ve diğer yöntemler çalışılabilir.

Çalışmada tek doz NaCl kullanılmış olup NaCl'ün gerek heterosise etkisini gerekse epigenetik regülasyonlara etkisini ortaya koymak için daha fazla çalışmaya gerek vardır. Bu nedenle NaCl konsantrasyonları süreleri NaCl dayanımları yönünden farklılık gösteren genotiplerinde çalışmaya dahil edilerek araştırmaların devam edilmesinde yarar görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada alanında altın bir metot olan bisülfid sekanslama yöntemi için altmışa yakın markır denenmesine rağmen sadece beş tanesinin bisülfid sekanslama çalışmalarına uygun olduğu ancak yeni lokuslarla bisülfid çalışmalarının devam ettirilmesi gerektiği öngörülmektedir.

Bu çalışmanın heterosis ve metilasyonun ilişkilendirilebileceği ile ilgili ümit var sonuçlar verdiği bu nedenle de bu tür metotların kullanılması gerektiği belirlenmiştir. DNA metilasyon farklılıklarını ortaya koymak için kullanılan diğer yöntemlerden daha net sonuçlar alabilmek için ise daha fazla sayıda lokusla çalışmaların yapılması gerektiği açıktır.

6. KAYNAKLAR

- Aina, R., Sgorbati, S., Santagostino, A., Labra, M., Ghiani, A. and Citterio, S. 2004. Specific Hypomethylation of DNA is Induced by Heavy Metals in White Clover and Industrial Hemp. *Physiologia Plantarum*, 121, 472-480.
- Akel, W., Thorwarth, P., Mirdita, V., Weissman, E.A., Liu, G.Z., Wuerschum, T. and Longin, C.F.H. 2018. Can Spelt Wheat be Used as Heterotic Group for Hybrid Wheat Breeding? *Theoretical and Applied Genetics*, 131, 973-984.
- Al-Lawati, A., Al-Bahry, S., Victor, R., Al-Lawati, A.H. and Yaish, M.W. 2016. Salt Stress Alters DNA Methylation Levels in Alfalfa (*Medicago spp*). *Genetics and Molecular Research*, 15, 1. doi: 10.4238/gmr16039879.
- Alonso, C., Perez, R., Bazaga, P., Medrano, M.I. and Herrera, C.M. 2015. MSAP Markers and Global Cytosine Methylation in Plants: A Literature Survey and Comparative Analysis for a Wild-Growing Species. *Molecular Ecology*, 16, 80-90.
- Angers, B., Castonguay, E. and Massicotte, R. 2010. Environmentally Induced Phenotypes and DNA Methylation: How to Deal with Unpredictable Conditions Until the Next Generation and After. *Molecular Ecology*, 19, 1283-1295.
- Anonim 2016. FAO. Mısır bitkisinin ekim alanları ve üretim miktarları. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. (Son erişim tarihi: 5 Ekim 2018)
- Anonim 2016. UHK. Mısır bitkisinin tane ve silajlık oranları. uhk.org.tr. (Son erişim tarihi: 10 Ekim 2016)
- Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. 2002. Oxidative Stress and Antioxidative Systems in Plants. *Current Science*, 82, 1227-1238.
- Aydinoğlu, B., Karaca M., Çakmakçı, S., İnce, A.G. ve Elmasulu, S.Y. 2005. DNA Minisatellit Markırlarından Yararlanılarak Fiğde (*Vicia sativa* L.) Tane Veriminin Önceden Belirlenmesi Olanakları. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18, 169-174.
- Barciszewka, M.Z., Barciszewka, A.M. and Rattan, S.I. 2007. TLC-Based Detection of Methylated Cytosine: Application to Aging Epigenetics. *Biogerontology*, 8, 673-678.
- Bardakçı, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biolog*, 25, 185-196.
- Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23-58.
- Bestor, T.H. 2000. Chromatin Challenges During DNA Replication and Repair, Human Molecular. *Genetics*, 9, 2395-2402.

- Bharadwaj, R., Roy, M., Ohyama, T., Sivan-Loukianova, E., Delannoy, M., Lloyd, T.E., Zlatić, M., Eberl, D.F. and Kolodkin, A.L. 2013. Cbl-Associated Protein Regulates Assembly and Function of Two Tension-Sensing Structures in *Drosophila*. *Development*, 140, 627-638.
- Birchler, A.J., Donald, L., Auger, L.D. and Riddle, C.N. 2003. In Search of the Molecular Basis of Heterosis. *The Plant Cell*, 15, 2236-2239.
- Bird, A. 2002. DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes and Development*, 16, 6-21.
- Cao, D.H., Gao, X., Liu, J., Kimatu, J.N., Geng, S.J., Wang, X.P., Zhao, J. and Shi, D.C. 2011. Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) Reveals That Alkali Stress Triggers More DNA Hypomethylation Levels in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Roots Than Salt Stress. *African Journal of Biotechnology*, 10, 18971-18980.
- Chaing, M.S. and Smith, J.D. 1967. Diallel Analysis of Inheritance of Quantitative Characters in Grain Sorghum Heterosis and Inbreeding Depression. *Canadian Journal Genetics*, 9, 44-51.
- Charcosset, A. and Essioux, L. 1994. The Effect of Population Structure on the Relationship Between Heterosis and Heterozygosity at Marker Loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 336-343.
- Charcosset, A.M., Lefort-Buson, M. and Gallais, A. 1991. Relationship Between Heterosis and Heterozygosity at Marker Loci: Theoretical Computation. *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 571-575.
- Chen, Z.J. 2013. Genomic and Epigenetic Insights into the Molecular Bases of Heterosis. *Nature Reviews Genetics*, 14, 471-482.
- Choi, C.S. and Sano, H. 2007. Abiotic-Stress Induces Demethylation and Transcriptional Activation of a Gene Encoding a Glycerophosphodiesterase-Like Protein in Tobacco Plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 589-600.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M. and Jakopsen, S.E. 2008. Shotgun Bisulphite Sequencing of the *Arabidopsis* Genome Reveals DNA Methylation Patterning. *Nature*, 452, 215-219.
- Demirkıran, A. 2012. Doku Kültüründe Tuz (NaCl) Stres Koşullarında Yetiştirilen Arpa (*Hordeum vulgare*) Bitkilerinde Genetik ve Epigenetik Analizler. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 59 s.
- de Vienne, D., Leonardi, A., Damerval, C. and Zivy, M. 1999. Genetics of Proteome Variation for QTL Characterization: Application to Drought-Stress Responses in Maize. *Journal of Experimental Botany*, 50, 303-309.

- Fan, H.H, Wei, J., Li, T.C., Li, Z.P., Guo, N., Cai, Y.P. and Lin, Y. 2013. DNA Methylation Alterations of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*) in Response to Cold Stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2445-2453.
- Farooq, M., Hussaian, M., Wakeel, A., Siddique, K.H.M. 2015. Salt Stress in Maize: Effects, Resistance Mechanisms, and Management. A review. *Agronomy*, 35, 461-481.
- Feys, K., Demuynck, K., De Block, J., Bisht, A., De Vlieghe, A., Inze, D., Nelissen, H. 2018. Growth Rate Rather Than Growth Duration Drives Growth Heterosis in Maize B104 Hybrids. *Plant Cell and Environment*, 41, 374-382.
- Fieldes, M.A, Amyot, L.M. 1999. Epigenetic Control of Early Flowering in Flax Lines Induced by 5-Azacytidine Applied to Germinating Seed. *Journal of Heredity*, 90, 199-206.
- Fieldes, M.A., Harvey, C.G. 2004. Differences in Developmental Programming and Node Number at Flowering in the 5-Azacytidine-Induced Early Flowering Flax Lines and Their Controls. *The University of Chicago. Press Journals*, 165, 695–706.
- Fieldes, M.A. 1994. Heritable Effects of 5-Azacytidine Treatments on the Growth and Development of Flax (*Linum usitatissimum*) Genotypes and Genotypes. *Genome*, 37, 1-11.
- Fu, H., Dooner, H.K. 2002. Intraspecific Violation of Genetic Colinearity and Its Implications in Maize. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 99, 9573-9578.
- Fuelnecek, J. and Kovarik, A. 2014. How to Interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) Profiles? *BMC Genetics*, 15, 2-9.
- Furrow, R.E., Christiansen, F.B. and Feldman, M.W. 2011. Environment-Sensitive Epigenetics and the Heritability of Complex Diseases. *Genetics*, 189, 1377.
- Gao, W., Li, S., Li, Z., Huang, Y., Deng, C. and Lu, L. 2014. Detection of Genome DNA Methylation Change in Spinach Induced by 5-azaC. *Molecular and Cellular Probes*, 28, 163–166.
- Gohlke, A., Ingelman, C.J., Nürnberg, G., Weitzel, J.M., Hammon, H.M., Görs, S., Starke, A., Wolfram, S. 2013. Influence of 4-week Intraduodenal Supplementation of Quercetin on Performance, Glucose Metabolism, and mRNA Abundance of Genes Related to Glucose Metabolism and Antioxidative Status in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 6986-7000.
- Gorelick, R. 2003. Evolution of Dioecy and Sex Chromosomes Via Methylation Driving Muller’s Ratchet. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 353-368.
- Groszmann, M., Greaves, I.K., Albert, N., Fujimoto, R., Helliwell, C.A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. 2011. Epigenetics in Plants-Vernalisation and Hybrid Vigour. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809, 427–437.

- Gruntman, E., Qi, Y., Slotkin, R. K., Roeder, T., Martienssen, R.A. and Sachidanandam, R. 2008. Kismeth: Analyzer of Plant Methylation States Through Bisulfite Sequencing, *BMC Bioinformatics*, 9, 371.
- Guangyuan, L., Xiaoming, W., Biyun, C., Gao, G. and Kun, X. 2007. Evaluation of Genetic and Epigenetic Modification in Rapeseed (*Brassica napus*) Induced by Salt Stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 1599-1607.
- Güvercin, R.Ş. 2011. Pamukta (*Gossypium* spp.) F₁ Melezlerinin Lif Verimine Etkili Bazı Karakterlerde Heterosis, Heterobeltiosis ve Ekonomik Heterosis. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 17, 113-121.
- Hageman, R.H., Lambert, R.J. 1988. The Use of Physiological Traits for Corn Improvement. *Alliance of Crop, Soil, and Environmental Science Societies*, 2, 431-461.
- Hamed, K.B., Castagna, A., ElkahouI, S., RanierI, A. and Abdelly, C. 2007. Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) Under Salinity Conditions: A Comparison of Leaf and Root Antioxidant Responses. *Plant Growth Regulation*, 53, 185–194.
- He, S.P., Sun, J.L., Zhang, C. and Du, X.M. 2011. Identification of Exotic Genetic Components and DNA Methylation Pattern Analysis of Three Cotton Introgression Lines From *Gossypium bickii*. *Molecular Biology*, 45, 204-210.
- Hegarty, M.J., Batstone, T.G., Barker, L., Edwards, K.J., Abbott, R.J. and Hiscock, S.J. 2011. Nonadditive Changes to Cytosine Methylation as a Consequence of Hybridization and Genome Duplication in Senecio (*Asteraceae*). *Molecular Ecology*, 20, 105-113.
- Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. 2008. Tandem Repeats Upstream of the *Arabidopsis* Endogene SDC Recruit non-CG DNA Methylation and Initiate siRNA Spreading. *Genes and Development*, 22, 1597-1606.
- Hetzl, J., Foerster, A.M., Raidl, G. and Mittelsten, S.O. 2007. CyMATE: A New Tool for Methylation Analysis of Plant Genomic DNA After Bisulphite Sequencing. *Plant Journal*, 51, 526-536.
- Hochholdinger, F., Marcon, C., Baldauf, J.A., Yu, P. and Frey, F.P. 2018. Proteomics of Maize Root Development. *Frontiers in Plant Science*, 9, 143.
- Holiday, R. 1990. Mechanisms For the Control of Gene Activity During Development. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 65, 431-471.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W. and Matzke, M. 2006. Endogenous Targets of RNA-Directed DNA Methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 25, 2828-2836.
- İnce A.G. 2010. Doku/Organ Spesifik Mikrosatellit DNA Gen İçeriklerinin *Capsicum* cDNA Kütüphanelerinde *in silico* ve *in vitro* Yaklaşımlarla Belirlenmesi. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 331 s.

- İnce, A.G., Karaca, M. and Onus, A.N. 2009. Development and Utilization of Diagnostic DAMD-PCR Markers for *Capsicum* Accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 211-221.
- Ince, A.G. and Karaca, M. 2017. Development and Utilization of Bisulfite Specific Primer Pairs for Epigenetic Studies in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 4, 145-153.
- Jeffreys, A.J., Royle, N.J., Wilson, V. and Wong Z. 1985. Spontaneous Mutation Rates to New Length Alleles at Tandem-Repetitive Hypervariable Loci in Human DNA. *Nature*, 332, 278-281.
- Ji, T., Liu, P. and Nettleton, D. 2014. Estimation and Testing of Gene Expression Heterosis. *Journal of Agriculture, Biological, Environmental Statics*, 19, 319–337.
- Kalinka, A., Achrem, M. and Poter, P. 2017. The DNA Methylation Level Against the Background of the Genome Size and Theterochromatin Content in Some Species of the Genus *Secale* L. *PeerJ*, 24,5:e2889.
- Kara, Ş.M. 2001. Mısır Kendilenmiş Hatlarında Verim ve Verim Öğelerinin Değerlendirilmesi, I.Heterosis ve Uyum Yeteneklerinin Line x Tester Analizi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25, 383-391.
- Karaca, M. 2001. Characterization of *Cynodon* spp. and *Gossypium* spp. Genomes Using Molecular and Cytological Techniques. Ph.D. Dissertation, Mississippi State Universty, Mississippi State, 219 p.
- Karaca, M., Ince, A.G., Elmasulu, S.Y., Onus, A.N. and Turgut, K. 2005. Coisolation of Genomic and Organelle DNAs from 15 Genera and 31 Species of Plants. *Analytical Biochemistry*, 343, 353-355.
- Karaca, M. and Ince, A.G. 2008. Minisatellites as DNA Markers to Classify Bermuda Grasses (*Cynodon* spp.): Confirmation of Minisatellite in Amplified Products. *Journal of Genetics*, 87, 83-86.
- Karaca, M., Ince, A.G. 2017. Bazı Bitki Gruplarında CG, CHG, CHH Metilasyon Düzeyleri ve Epigenetik Sonuçları Üzerine Bir Araştırma: *in silico* ve *in vitro* Çalışmalar. TÜBİTAK-1001, 113O935.
- Karaca, M., Ince, AG., Uygur-Gocer, E. and Aydın, A. 2016. Exonic and Intronic DNA Methylation Differences in a Fiber Specific Gene of Pima Cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 478-486.
- Kawanabe, T., Ishikura, S., Miyaji, N., Li Min Wu, T.S., Wu, L.M., Itabashi, E., Takada, S., Shimizu, M., Takasaki-Yasuda, T., Osabe, K., Peacock, W.J., Dennis, E.Z. and Fujimoto, R. 2016. Role of DNA Methylation in Hybrid Vigor in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 6704-6711.

- Kenichi, S., Setsuko, F. and Hiroshi, T. 2009. RNA-directed DNA methylation Induces Transcriptional Activation in Plants. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 106, 1660-1665.
- Keyte, A.L., Ryan, P., Bao, L. and Wendel, J.F. 2006. Intraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Heredity*, 97, 444-450.
- Kilaru, A. and Chapman, K.D. 2012. N-Acylated Phospholipid Metabolism and Seedling Growth Insights From Lipidomics Studies in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 1200-1202.
- King, G.K. 1995. Morphological Development in *Brassica oleracea* is Modulated by In vivo Treatment with 5-azacytidine. *Journal of Horticultural Science*, 79, 333-342.
- Konak, C., Ünay, A., Serter E. ve Başal, H. 1999. Estimation of Combining Ability Effects, Heterosis and Heterobeltiosis by Linex Tester Method in Maize. *Turkish Journal of Field Crops*, 4, 1-9.
- Kondo, H., Shiraya, T., Wada, K.C. and Takeno, K. 2006. Induction of Flowering by DNA Demethylation in *Perilla frutescens* and *Silene armeria*: Heritability of 5-Azacytidine Induced Effects and Alteration of the DNA Methylation State by Photoperiodic Conditions. *Physiologia Plantarum*, 127, 130-137.
- Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T. and Sakagami, Y. 2010. Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant Cell Physiology*, 51, 1-8.
- Konuskan, O. 2000. Hatay Koşullarında İkinci Ürün Olarak Yetiştirilen Bazı Melez Mısır Hibritlerinin Bitki Yoğunluğunun Verim ve Verim Karakterleri Üzerindeki Etkileri. Mustafa Kemal Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
- Kovarik, A.K.B., Bezdek, M. and Opatrn, Z. 1997. Hypermethylation of Tobacco Heterochromatic Loci in Response to Osmotic Stress. *Theoretical Applied Genetics*, 95, 301-306.
- Kumar, S., Beena, A.S., Awana, M. and Singh A. 2017. Physiological, Biochemical, Epigenetic and Molecular Analyses of Wheat (*Triticum aestivum*) Genotypes with Contrasting Salt Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1151. doi: 10.3389/fpls.2017.01151.
- Labra, M.G.A., Citterio, S., Sgorbati, S., Sala, F., Vannini, C., Ruffini-Castiglione, M., Bracale, M., 2002. Analysis of Cytosine Methylation Pattern in Response to Water Deficit in Pea Root Tips. *Plant Biology*, 4, 694-699.
- Lariepe, A., Mangin, B., Jasson, S., Combes, V., Dumas, F., Jamin, P., Lariagon, C., Jollivot, D., Madur, D., Fievet, J., Gallais, A., Dubreuil, P., Charcosset, A. and Moreau, L. 2012. The Genetic Basis of Heterosis: Multiparental Quantitative Trait

- Loci Mapping Reveals Contrasted Levels of Apparent Overdominance Among Traits of Agronomical Interest in Maize (*Zea mays* L.). *Genetics*, 190, 795–835.
- Lauria, M., Piccinini, S., Pirona, R., Lund, G., Viotti, A. and Motto, M. 2014. Epigenetic Variation, Inheritance, and Parent-of-Origin Effects of Cytosine Methylation in Maize (*Zea mays*). *Genetics*, 196, 653–666.
- Lauss, K., Wardenaar, R., Oka, R., van Hulten, M.H.A., Guryev, V., Keurentjes, J.J.B., Stam, M. and Johannes, F. 2018. Parental DNA Methylation States are Associated with Heterosis in Epigenetic Hybrids. *Plant Physiology*, 176, 1627–1645.
- Lee, J., Lee, B., Shin, D., Kwak, S.S., Bahk, J.D., Lim, C.O. and Yun, D.J. 2002. Carnitine Uptake by AGP2 in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Dependent on Hog1 MAP Kinase Pathway. *Molecules and Cells*, 13, 407–412.
- Lele, L., Ning, D., Cuiping, P., Xiao, G. and Weihua, G. 2018. Genetic and Epigenetic Variations Associated with Adaptation to Heterogeneous Habitat Conditions in a Deciduous Shrub. *Ecology and Evolution*, 8, 2594–2606.
- Lewin, B. 1997. Simple Sequence DNA. Genes VI. Chapter 25 Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo, 727–741.
- Li, L., Miles, S., Melville, Z., Prasad, A., Bradley, G. and Breeden, L.L. 2013. Key Events During the Transition From Rapid Growth to Quiescence in Budding Yeast Require Posttranscriptional Regulators. *Molecular Biology of the Cell*, 24, 3697–709.
- Li, S.F., Zhang, G.J., Yuan, J.H., Deng, C.L., Lu, L.D. and Gao, W.J. 2015. Effect of 5-azaC on the Growth, Flowering Time and Sexual Phenotype of Spinach. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62, 670–675.
- Li, T., Fan, H., Li, Z., Wei, J., Cai, Y. and Lin, Y. 2011. Effect of Different Light Quality on DNA Methylation Variation for Brown Cotton (*Gossypium hirsutum*). *African Journal of Biotechnology*, 10, 6220–6226.
- Li, X., Wang, X., He, K., Ma, Y., Su, N., He, H., Stolc, V., Tongprasit, W., Jin, W., Jiang, J., Terzaghi, W., Li, S. and Deng, X.W. 2008. High-Resolution Mapping of Epigenetic Modifications of the Rice Genome Uncovers Interplay Between DNA Methylation, Histone Methylation, and Gene Expression. *Plant Cell*, 20, 259–276.
- Liu, X., Hua X., Guo, J., Qi, D., Wang, L., Liu, Z., Jin, Z., Chen, S. and Liu, G. 2008. Enhanced Tolerance to Drought Stress in Transgenic Tobacco Plants Overexpressing VTE1 for Increased Tocopherol Production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters*, 30, 1275–1280.
- Liu, T.J., Sun, L.F., Shan, X.H., Wu, Y., Su, S.Z., Li, S.P., Liu, H.K., Han, J.Y. and Yuan, Y.P. 2014. Analysis of DNA Methylation Patterns and Levels in Maize Hybrids and Their Parents. *Genetics and Molecular Research*, 13, 8458–8468.

- Long, N.M., Ford, S.P. and Nathanielsz, P.W. 2011. Maternal Obesity Eliminates the Neonatal Lamb Plasma Leptin Peak. *Journal of Physiology*, 589, 1455-1462.
- Lopez-Maury, L., Marguerat, S. and Bahler, J. 2008. Tuning Gene Expression to Changing Environments: From Rapid Responses to Evolutionary Adaptation. *Nature Reviews Genetics*. 9, 583-593.
- Lu, Y., Rong, T. and Cao, M. 2007. Analysis of DNA Methylation in Different Maize Tissues. *Journal of Genetics and Genomics*, 35, 41-48.
- Lukens, L.N. and Zhan, S. 2007. The Plant Genome's Methylation Status And Response to Stress: Implications for Plant Improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 317-322.
- Ma, K.F., Song, Y.P., Yang, X.H., Zhang, Z.Y. and Zhang, D.Q. 2013. Variation in Genomic Methylation in Natural Populations of Chinese White Poplar. *PLoS One*, 8, e63977.
- Ma, Q., Hedden, P. and Zhang, Q. 2011. Heterosis in Rice Seedlings: Its Relationship to Gibberellin Content and Expression of Gibberellin Metabolism and Signaling Genes. *Plant Physiology*, 156, 1905-1920.
- Messedı, D., Labıdı, N., Grignon, C. and Abdelly C. 2004. Limits Imposed by Salt to the Growth of the Halophyte *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167, 720–725.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M. and Kumlin, E. 1987. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science*, 235, 1616-1622.
- Paun, O., Bateman, R.M., Michael, F.F., Hedren, M., Civeyrel, L. and Chase, M.W. 2010. Stable Epigenetic Effects Impact Adaptation in Allopolyploid Orchids (*Dactylorhiza: Orchidaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, 27, 2465-2473.
- Russell, W.A. and Halluer, A.R. 1980. Hybridization of Crop Plants. *American Society of Agronomy*. 299-312.
- Saferstein, R. 2004, Criminalistics: An Introduction to Forensic DNA Analyses. 2. Edition Pearson Prentice Hall New Jersey, 34-50
- Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V. and Manzanares-Dauleux, M.J. 2008. *Brassica oleracea* Displays a High Level of DNA Methylation Polymorphism. *Plant Science*, 174, 61-70.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, M.A., Gomes, A.C., Santos, M.C., Caretto L.C. and Moura, G.R. 2011. The Genetic Code of the Fungal CTG Clade. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 607-11.

- Schmitz, R.J., Amasino, R.M. 2007. Vernalization: A Model for Investigating Epigenetics and Eukaryotic Gene Regulation in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 269-275.
- Seifert, F., Thiemann, A., Grant-Downton, R., Edelmann, S., Rybka, D., Schrag, T. A., Frisch, M., Dickinson, H. G., Melchinger, A. E. and Scholten, S. 2018. Parental Expression Variation of Small RNAs Is Negatively Correlated with Grain Yield Heterosis in a Maize Breeding Population. *Frontiers in Plant Science*, 9, 13.
- Seymour, G., Poole, M., Manning, K. and King, G. 2008. Genetics and Epigenetics of Fruit Development and Ripening. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 58-63.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J. and Qiu, J.L. and Gao, C. 2013. Targeted Genome Modification of Crop Plants Using A CRISPR-Cas System. *National Biotechnology*, 31, 686–688.
- Shkute, N. and Stivrina, N. 2005. 5-Azacytidine Decreases Fragmentation of Nuclear DNA and Pigment Formation in First Leaf Cells of Barley Seedlings. *Cell Biology International*. 29, 1025-1031.
- Sing, P. 2001. Essential of Plant Breeding. Kalyani Publishers, New Delhi, 146-150.
- Smith, J.S.C. 1988. Diversity of Hybrid Maize Germplasm: Isozymic Cromatographic Evidence. *Crop Science*, 28, 63-69.
- Smulders, M.J.M. and de Klerk, G.J. 2011. Epigenetics in Plant Tissue Culture. *Plant Growth Regulation*, 63, 137-146.
- Soengas, P., Ordas, B., Malvar, R.A., Revilla, P. and Ordas, A. 2003. Heterotic Patterns Among Flint Maize Populations. *Crop Science*, 43, 844-849.
- Sun, L.F., Liu, T.J., Shan, X.H., Su, S.Z., Li, S.P., Yuan, Y.P. and Zhang, J. 2015. Analysis of DNA Cytosine Methylation Patterns in Maize Hybrids and Their Parents. *Biologia Plantarum*. 59, 266–272.
- Süzer, S. 1992. Buğday Tarımında Yüksek Verim Almanın Yolları. *Marmara'da Tarım Dergisi*, 51, 5-7.
- Swanson-Wagner, R.A., Yi, J., DeCook, R., Borsuk, L.A., Nettleton, D. and Schnable, P.S. 2006. All Possible Modes of Gene Action Are Observed in a Global Comparison of Gene Expression in a Maize F₁ Hybrid and Its Inbred Parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of America*, 103, 6805-6810.
- Taba, S. 1995. Use of Exotic Germplasm and Long-term Gene Pool Development for Andean Highland Maize Improvement. *CIMMYT Maize Program Internal Document*.
- Tan, M.P. 2010. Analysis of DNA Methylation of Maize in Response to Osmotic and Salt Stress Based on Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism. *Plant Physiol Biochemistry*. 48, 21-26.

- Tani, E., Polidoros, A.N., Nianiou-Obeidat, I. and Tsaftaris, A.S. 2012. DNA Methylation Patterns are Differently Affected by Planting Density in Maize Inbreds and Their Hybrids. *Maydica* 50, 19-23.
- Tatra, G.S., Miranda, J., Chinnappa, C.C. and Reid, D.M. 2000. Effect of Light Quality and 5-Azacytidine on Genomic Methylation and Stem Elongation in Two Ecotypes of *Stellaria longipes*. *Physiologia Plantarum*, 109, 313–321.
- Tchurikov, N.A. 2005. Molecular Mechanisms of Epigenetics. *Biochemistry*. 70, 406-423.
- Tekin, S., OK, E. ve Cücer, N. 2003. DNA Metilasyon Faktörünün Meme Kanseri Oluşumundaki Rolünün Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12, 35-43.
- Tsaftaris, A.S., Kafka, M. and Polidoros, A. 1997. Epigenetic Modifications of Total Genomic Maize DNA: The Role of Growth Conditions. Genetics, Biotechnology and Breeding of Maize and Sorghum. *The Royal Society of Chemistry*, 30, 125-130.
- Turkan, I. and Demiral, T. 2008. Salinity Tolerance Mechanisms of Higher Plants. In: Khan, N.A., (Eds: Singh, S.), Abiotic Stress and Plant Responses. I.K. International Publishing House, New Delhi, 105–123.
- Turkan, I. and Demiral, T., 2009. Recent Developments in Understanding Salinity Tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 2–9.
- Uhr, D.V. and Goodman, M.M. 1995. Temperate Maize in Breds Derived from Tropical Germplasm. I. Test Cross Yield Trials. *Crop Science*, 35, 779–784.
- Uygur-Gocer, E. and Karaca, M. 2016. Genetic Characterization of Some Commercial Cotton Varieties Using Td-DAMD-PCR Markers. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 487-494.
- van Ijzendoorn, M.H., Bakermans-Kranenburg, M.J. and Ebstein, R.P. 2011. Methylation Matters in Child Development: Toward Developmental Behavioral Epigenetic. *Child Development Perspectives*, 5, 305-310.
- Vanyushin, B.F. and Ashapkin, V.V. 2011. DNA Methylation in Higher Plants: Past, Present and Future. *Biochimica Biophysica Acta*, 8, 360-368.
- Vanyushin, B.F. 2006. DNA Methylation and Epigenetics. *Russian Journal of Genetics*. 42, 985-997.
- Veitia, R.A. and Vaiman, D. 2010. Exploring the Mechanistic Bases of Heterosis from the Perspective of Macromolecular Complexes. *The Federation of American Societies For Experimental Biology, Journal*, 25, 1-7.

- Virmani, S.S., Sun, Z.X., Mou, T.M., Jauhar, A. and Mao, C.X. 2003. Two-Line Hybrid Rice Breeding Manual. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, 88.
- Wang, B., Zhang, M., Fu, R., Qian, X., Rong, P., Zhang, Y., Jiang, P., Wang, J., Lu, X., Wang, D., Ye, W. and Zhu, X. 2016. Epigenetic Mechanisms of Salt Tolerance and Heterosis in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Revealed by Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism Analysis. *Euphytica*, 208, 477-491.
- Wang, W., Huang, F., Qin, Q., Zhao, X., Li, Z. and Fu, B. 2015. Comparative Analysis of DNA Methylation Changes in Two Rice Genotypes Under Salt Stress and Subsequent Recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465, 790-796.
- Wang, J., Marowsky, N.C. and Fan, C. 2014. Divergence of Gene Body DNA Methylation and Evolution of Plant Duplicate Genes. *PLoS ONE*, 9, e110357.
- Wang, J., Wang, C., Long, Y., Hopkins, C., Kurup, S., Liu, K., King, G.J. and Meng, J. 2011. Universal Endogenous Gene Controls for Bisulphite Conversion in Analysis of Plant DNA Methylation. *Plant Methods*, 7, 39.
- Warden, C.D., Lee, H., Tompkins, J.D., Li, X.J., Wang, C., Riggs, A.D., Yu, H., Jove, R. and Yuan, Y.C. 2013. COHCAP: An Integrative Genomic Pipeline for Single-Nucleotide Resolution DNA Methylation Analysis. *Nucleic Acids Research*, 41, 117.
- Waters, E., de Silva-Sangiorski, A., Hall, B.J., Brown, T., Campbell, K.J., Gao, Y., Armstrong, R., Prosser, L. and Summerbell, C.D. 2011. Interventions Preventing Obesity in Children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD001871.
- Waugh, R. and Poewll, W. 1992. Using RAPD Markers for Crop Improvement. *Trends Biotechnology*, 10, 186-191.
- Weinhold, B., 2006, Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives*, 114, 160-167.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R, Livak, K.J., Ravalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wollmann, H. and Berger, F., 2012, Epigenetic Reprogramming During Pant Reproduction and Seed Development. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 63–69.
- Wu, C.T. and Morris, J.R. 2001. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science*, 5532, 1103-1105.

- Wu, Y.S., Zhou, C.C. and Yuan, Q. 2018. Role of DNA and RNA N-6-Adenine Methylation in Regulating Stem Cell Fate. *Current Stem Cell. Research & Therapy*, 13, 31-38.
- Xiao, J., Yuan, L. and Tanksley, S.D. 1995. Dominance is the Major Genetic Basis of Heterosis in Rice as Revealed by QTL Analysis Using Molecular Markers. *Genetics*, 140, 745-754.
- Xu, Y., Lee, A., Wu, W.L., Liu, X. and Birkholz, P. 2013. Human Vocal Attractiveness as Signaled by Body Size Projection. *PLoS ONE*, 8, e62397.
- Yaish, M.W., Al-Lawati, A., Al-Harrasi, I. and Patankar, H.V. 2018. Genome-Wide DNA Methylation Analysis in Response to Salinity in the Model Plant Caliph Medic (*Medicago truncatula*). *BMC Genomics*, 19, 78.
- Yang, W., Yu, X., Yang, W. and Liu, B. 2011. Parental Epigenetic Difference in DNA Methylation-Level may Play Contrasting Roles for Different Agronomic Traits Related to Yield Heterosis in Maize. *African Journal of Biotechnology*, 10, 9253-926.
- Yang, X., Kundariya, H., Xu, Y.Z., Sandhu, A., Yu, J., Hutton, S. F., Zhang, M. and Mackenzie, S.A. 2015. MutS HOMOLOG1-Derived Epigenetic Breeding Potential in Tomato. *Plant Physiology*, 168, 222-232.
- Yeşilkaya, Ö. 2013. Farklı Heterotik Gruplar Arasındaki Tekli ve Üçlü Melez At Dışı Mısır (*Zea mays* var. *indentata* sturt.) Populasyonlarında Verim ve Bazı Verim Komponentlerinin Değerlendirilmesi. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 103 s.
- Yong, W., Xu, Y., Xu, W., Wang, X., Li, N., Wu, J., Liang, T., Chong, K., Xu, Z., Tan, K. and Zhu, Z. 2003. Vernalization-Induced Flowering in Wheat is Mediated by a Lectin-Like Gene VER2. *Planta*, 217, 261-270.
- Yu, S.B., Li, J.X., Tan, Y.F., Gao, Y.J., Li, X., Zhang, Q. and Maroof, M.A.S. 1997. Importance of Epistasis as the Genetic Basis Heterosis in An Elite Rice Hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9226-9231.
- Yurtseven, E. ve Baran, H.Y. 2000. Sulama Suyu Tuzluluğu ve Su Miktarlarının Brokkolide (*Brassica oleracea*) Verim ve Mineral Madde İçeriğine Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 24, 185-190.
- Zha, R.M., Zha, Y.H., Ling, Z.L., Yang, F.M., Zhao, B.Q., Zhong, R., Xie, X.C. and Sang, G.H. 2008. Prediction of Hybrid Grain Yield Performances in Indica Rice (*Oryza sativa* L.) with Effect- Increasing Loci. *Molecular Breeding*, 22, 467-476.
- Zhang, E.T., He, Y., Grob, P., Fong, Y.W., Nogales, E. and Tjian, R. 2015 Architecture of the Human XPC DNA Repair and Stem Cell Coactivator Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 14817-22.

- Zhao, Y.L., Yu, S.X., Ye, W.W., Wang, H.M., Wang, J.J. and Fang, B.X. 2010. Study on DNA Cytosine Methylation of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genome and Its Implication for Salt Tolerance. *Agricultural Sciences in China*, 9, 783-791.
- Zhong, L., Xu, Y. and Wang J. 2009. DNA-Methylation Changes Induced by Salt Stress in Wheat *Triticum aestivum*. *African Journal of Biotechnology*, 8, 6201-6207.
- Zhu, J.K. 2009. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annual Review of Genetics*, 43, 143-166.
- Zhu, J.K. 2001. Plant Salt Tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 66-71.



ÖZGEÇMİŞ

Emine UYGUR GÖÇER

uygrgocer@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi
2009-2012	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tokat
Lisans	Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi
2005-2009	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tokat

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Iğdır Üniversitesi
2010-2013	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Iğdır
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2013-2019	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

ESERLER

SCI kapsamında hakemli dergilerde taranan yayınlar

Uygur Göçer, E., and Karaca, M., 2016. Cleaved minisatellite locus (CML) markers for fingerprinting of cotton cultivars grown in Turkey. *FEBS Journal*, 283, 335-335.

Aydın, A., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Karaca, M. 2018. Cotton single seed DNA extraction without the use of enzymes and liquid nitrogen. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 6722-6726.

SCI kapsamı dışında Uluslararası hakemli dergilerde taranan yayınlar

Karaca, M., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2016. Exonic and Intronic DNA Methylation Differences in a Fiber Specific Gene of Pima Cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 478-486.

Karaca, M., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2016. Bisulfite Primer Pairs for Analysis of Cotton (*Gossypium* spp.) DNA Methylation. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 656-662.

Karaca, M., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2017. Microsatellite Distribution and Densities in Promoter and Gene Body Entities of Some Plant Genes. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 4, 154-163.

Ince, A.G., Karaca, M., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2017. Descriptive Statistics and PIC Values of Genomic and Transcriptomic-Microsatellites in Several Plant Species. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 4, 236-246.

Uygur Göçer, E., Karaca, M. 2016. Genetic Characterization of Some Commercial Cotton Varieties Using Td-DAMD-PCR Markers. *The Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 487-494.

Kongreler, Sempozyumlar

Aydın, A., Göçer, Uygur, E., Ince, A.G., Karaca M. 2014. Do Short Fiber Cells of Upland and Pima Cotton Show Different Levels of DNA Methylation? Global Biotechnology Congress, 16-19 June/2014, Boston, USA

Karaca, M., Ince, A.G., Aydın, A., Uygur Göçer, E. 2014. Cytosine Methylation Differences Between Long and Short Fiber Cells of Upland Cotton. Global Biotechnology Congress 16-19 June/2014, Boston, USA

Karaca, M., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2015. Organelle Genome Diversity in Species of *Origanum* and *Thymus* Naturally Occurring in Turkey. 4 th International Conference on Biodiversity, 15-17 June/2015, Las Vegas, USA

Uygur Göçer, E., Karaca, M., Ince, A.G. 2015. Transferability of Genomic and Genic Microsatellites within Some Species of *Lamiaceae* Family. 4 th International Conference on Biodiversity, 15-17 June/2015, Las Vegas, USA

Aydın, A., Uygur Göçer, E. 2015. DNA Metilasyon Yöntemleri. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül/2015, Çanakkale/TÜRKİYE

- Karaca, M., Ince, A.G., Uygur Göçer, E. 2017. Development of Microsatellite Markers for the World's Most Expensive Spice Saffron. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life", 10-12 Mayıs/2017, Konya/TÜRKİYE
- Uygur Göçer, E., Karaca, M., Ince, A.G. 2017. Cross-Genera Transferability of Chloroplast Microsatellite Markers in the Genera of *Lamiaceae*. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life", 10-12 Mayıs/2017, Konya/TÜRKİYE
- Uygur Göçer, E., Karaca, M., Ince, A.G. 2017. Application of Single Primer Amplification Reaction (SPAR) Markers in Fingerprinting Studies of Aromatic Plants. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life", 10-12 Mayıs/2017, Konya/TÜRKİYE
- Ince, A.G., Karaca, M., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2017. Genic Microsatellite Primer Pairs in *Ipomea batatas* (L.) Lam. (*Convolvulaceae*). VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 Aralık/2017, Afyon/TÜRKİYE
- Karaca, M., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Aydın, A. 2017. Comparison of Bisulfite Sequencing and Whole Genome Bisulfite Sequencing for Epigenetic Research in Plants. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 Aralık/2017, Afyon/TÜRKİYE
- Uygur Göçer, E., Ince, A.G., Aydın, A., Karaca, M. 2017. A set of Multiplex Panel of Microsatellite Markers for Economical and Rapid Molecular Characterization of Maize Varieties. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 Aralık/2017, Afyon/TÜRKİYE
- Uygur Göçer, E., Ince, A.G., Aydın, A., Karaca, M. 2017. Investigating the Role of DNA Methylation for Hybrid Vigor (Heterosis) in Maize. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 Aralık/2017, Afyon/TÜRKİYE
- Aydın, A., Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Karaca, M. 2017. Dominant and Codominant Scoring of Microsatellite Markers Affect Spatial Relationships Among Cotton Varieties. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 Aralık/2017, Afyon/TÜRKİYE
- Karaca, M., Uygur Göçer, E., Ince, A.G., 2018. Microsatellite Allele Patterns of Maize Genomic DNA Templates Extracted from Seeds and Leaves. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE
- Ince, A.G., Aydın, A., Uygur Göçer, E., Karaca, M. 2018. Nuclear and Cytoplasmic Genetic Diversity in *Salvia* L. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE

- Karaca, M., Aydın, A., Uygur Göçer, E., Ince, A.G. 2018. Low Chloroplast SSR Diversity in *Origanum* L. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE
- Ince, A.G., Karaca, M., Aydın, A., Uygur Göçer, E. 2018. Analysis of EST Databases and Development of e-Microsatellite Markers for *Primula*. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE
- Ince, A.G., Aydın, A., Uygur Göçer, E., Karaca, M. 2018. A Modified DNA Extraction Method for Cotton Seed. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs 2018, Konya/TÜRKİYE
- Ince, A.G., Uygur Göçer, E., Aydın, A., Karaca, M. 2018. Development of Transcribed Tri-Nucleotide SSR Primer Pairs for Licorice. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE
- Ince, A.G., Karaca, M., Aydın, A., Uygur Göçer, E. 2018. Development of Transcriptomic Markers in *Vaccinium corymbosum* L. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE
- Karaca, M., Uygur Göçer, E., Aydın, A., Ince, A.G. 2018. Mining and Analyzing Passiflora Databases for Marker Development. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE
- Aydın, A., Uygur Göçer, E., Ince, A.G., Karaca, M. 2018. Chlorotypes of Some *Sideritis* Species Naturally Occurring in Antalya Region. 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, 10-12 Mayıs/2018, Konya/TÜRKİYE

Projeler

- Bazı Bitki Gruplarında CG, CHG, CHH Metilasyon Düzeyleri ve Epigenetik Sonuçları Üzerine Bir Araştırma: *in silico* ve *in vitro* Çalışmalar. Bursiyer, TÜBİTAK-1001, 113O935, 2015-2017.
- Mısır Bitkisinde (*Zea mays* L.) DNA Metilasyon Kalıtım Modlarının Belirlenmesi ve Heterosis ile İlişkileri Üzerine Bir Araştırma. Araştırmacı, TÜBİTAK-1002, 118O488, 2018-2019.
- Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde DNA Metilasyonu ve Heterosis İlişkileri Üzerine Bir Araştırma. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), Yardımcı Araştırmacı FDK-2018-3741 (Doktora TEZ projesi).

Kurs/Toplantı/Çalıştay

- Epigenetics: from bench to bedside Konferans, Workshop. Vilnius, LİTVANYA, 30-31 Ekim 2013