



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ARPA DOKU KÜLTÜRLERİNDE GENETİK VE
EPIGENETİK VARYASYONLAR**

Aslıhan TEMEL

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Haziran, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ARPA DOKU KÜLTÜRLERİNDE GENETİK VE
EPİGENETİK VARYASYONLAR**

Aslıhan TEMEL

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Haziran, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 10/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversite
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet ZEHİR
Marmara Üniversite
Fen Fakülte

Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU
Marmara Üniversite
Mühendislik Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 2183 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her konuda benden sevgi, destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Avni KURU ve Prof. Dr. Ahmet ZEHİR hocalarıma, değerli katkı, öneri ve eleştirilerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan, İ.Ü., Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünün tüm öğretim üyelerine, teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım tüm çalışma arkadaşlarıma özellikle doktora öğrencisi Sibel YILMAZ'a, doktora öğrencisi Araş. Gör. Kaniye ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren, yanımda olan çok sevgili AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2011

Aslıhan TEMEL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2. 1. ARPA	3
2. 2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	5
2. 3. SOMAKLONAL VARYASYON.....	7
2. 3. 1. Kromozom Anomalileri	10
2. 3. 2. DNA Dizi Değişimleri	11
2. 3. 3. Metillenme Değişimleri	12
2. 3. 4. Transpozon Hareketleri	16
2. 4. BRASSİNOSTEROİDLER	19
3. MALZEME VE YÖNTEM	22
3. 1. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ.....	22
3. 1. 1. Besiyeri Hazırlanması.....	22
3. 1. 2. Kallus Kültürlerinin Kurulması.....	23
3. 1. 3. Homobrassinolid Uygulaması.....	23
3. 1. 4. Rejenerasyon	23

3. 2. FİZYOLOJİK ANALİZLER.....	24
3. 2. 1. Ekstre Hazırlanması.....	24
3. 2. 2. Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi.....	24
3. 2. 3. DNA Miktarının Belirlenmesi.....	25
3. 2. 4. SOD Aktivitesinin Belirlenmesi.....	26
3. 2. 5. Fizyolojik Verilerin Değerlendirilmesi.....	28
3. 3. MOLEKÜLER MARKIR ANALİZLERİ.....	28
3. 3. 1. Genomik DNA İzolasyonu.....	28
3. 3. 2. Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP).....	30
3. 3. 3. Methylation-Sensitive Restriction Fingerprinting (MSRF).....	32
3. 3. 4. Restriksiyon Kesimi.....	34
3. 3. 5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3. 3. 6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	36
3. 3. 7. Gümüş Boyama.....	37
3. 3. 8. Moleküler Markır Verilerinin Değerlendirilmesi.....	37
4. BULGULAR	40
4. 1. KALLUS KÜLTÜRLERİ.....	40
4. 2. SOMAKLONAL VARYASYONUN ARAŞTIRILMASI.....	41
4. 2. 1. Genomik DNA Örneklerinin Elektforetik Analizi.....	41
4. 2. 2. Retrotransposon Değişimleri.....	41
4. 2. 3. Metillenme Değişimleri.....	46
4. 3. BRASSİNOSTEROİDİN KALLUS KÜLTÜRLERİNE ETKİLERİ.....	49
4. 3. 1. Morfolojik Etkileri.....	50
4. 3. 2. Fizyolojik Etkileri.....	50
4. 3. 3. Metillenmeye Etkileri.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Bitkilerde steroid sinyal iletimi.....	20
Şekil 3.1	: Çalışmada kullanılan DNA uzunluk markırları.....	36
Şekil 4.1	: Çalışmada kullanılan bitki dokularının görünümü.....	40
Şekil 4.2	: İki hafta süreyle rejenerasyon ortamında tutulan kallusların görünümü.....	41
Şekil 4.3	: Çalışmada kullanılan genomik DNA karışımlarının agaroz jeldeki görünümü.....	41
Şekil 4.4	: Kontrol fide dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait 3'LTR×3'LTR kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü.....	43
Şekil 4.5	: Kontrol fide dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait 3'LTR×5'LTR2 kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü.....	44
Şekil 4.6	: Kontrol fide dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait 3'LTR×LTR6150 kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü.....	45
Şekil 4.7	: Şekil 4. 7. Kontrol fide dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait, LTR6149×Suk kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü.....	46
Şekil 4.8	: Kontrol fide dokusu (K), 15- ve 30-günlük kallusların metillenme görünümleri.....	47
Şekil 4.9	: Kontrol fide dokusu ve 30-günlük kallus dokularına ait A1×A3 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü.....	48
Şekil 4.10	: Kontrol fide dokusu ve 30-günlük kallus dokularına ait A1×A4 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü.....	49
Şekil 4.11	: HBL uygulanan kallusların görünümleri.....	50
Şekil 4.12	: HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallusların taze ağırlığına etkisi.....	51
Şekil 4.13	: Konsantrasyonları bilinen BSA çözeltilerinin 660 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik.....	51
Şekil 4.14	: HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallusların çözünebilir protein içeriğine etkisi.....	52
Şekil 4.15	: Konsantrasyonları bilinen DNA çözeltilerinin 595 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik.....	52
Şekil 4.16	: HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallusların DNA içeriğine etkisi.....	53
Şekil 4.17	: HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kalluslardaki SOD aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 4.18	: Kontrol ve 0.5 µM HBL uygulanmış kallusların metillenme görünümleri.....	54

Şekil 4.19 : Kontrol kallus dokusu ve 0.5 μ M HBL uygulanmış kallus dokularına ait A1×A3 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü.....	55
Şekil 4.20 : Kontrol kallus dokusu (K) ve 0.5 μ M HBL uygulanmış kallus dokularına ait A1×A4 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü.....	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: SOD miktarının belirlenmesinde kullanılan substratın içeriği	27
Tablo 3.2	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	30
Tablo 3.3	: Çalışmada kullanılan IRAP primerleri.....	31
Tablo 3.4	: Çalışmada kullanılan IRAP primer kombinasyonları.....	31
Tablo 3.5	: IRAP-PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları.....	31
Tablo 3.6	: IRAP-PCR koşulları.....	32
Tablo 3.7	: MSRF’de kullanılan restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri	33
Tablo 3.8	: Çalışmada kullanılan MSRF primerleri.....	33
Tablo 3.9	: MSRF-PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları.....	34
Tablo 3.10	: MSRF-PCR koşulları	34
Tablo 3.11	: <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> enzimlerinin, sitozin metillenmesi durumlarına göre kesim özellikleri.....	35
Tablo 3.12	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	36
Tablo 3.13	: PAGE bileşenleri.....	37
Tablo 3.14	: Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler.....	37
Tablo 3.15	: MSRF sonuçlarının jeldeki görünüşleri ve yorumları.....	39
Tablo 4.1	: Kontrol 4-günlük fide dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularındaki IRAP sonuçları.....	42
Tablo 4.2	: Kontrol fide dokusu ile 15-günlük ve 30-günlük kallus dokularında elde edilen MSRF sonuçları.....	47
Tablo 4.3	: Kontrol kallus dokusu (K) ile 0.5 µM BR uygulanmış kallus (BR) dokularına ait MSRF sonuçları.....	56

SEMBOL LİSTESİ

A	: absorbans
APS	: sabit sayı
bç	: baz çifti
BR	: brassinosteroid
BSA	: sığır serum albumini “Bovine serum albumin”
CTAB	: “cetyltrimethylammonium bromide”
CV	: değişim katsayısı “coefficient of variation”
DEPC	: dietil pirokarbonat
DNA	: deoksiribonukleik asit
dNTP	: deoksinukleotid trifosfat
EDTA	: etilen diamin tetraasetik asit
EtBr	: etidyum bromür
EtOH	: etanol
gDNA	: genomik DNA
HBL	: homobrassinolide
IRAP	: inter-retrotransposon amplified polymorphism
µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
M	: molar
MgCL₂	: magnezyum klorür
mL	: mililitre
mM	: milimolar
MSRF	: methylation-sensitive restriction fingerprinting
Na₂HPO₄	: disodyum hidrojenfosfat
NaH₂PO₄	: sodyum dihidrojenfosfat
NaOH	: sodyum hidroksit
nm	: nanometre
OD	: optik densite
PAGE	: poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
PCR	: polimerize zincir reaksiyonu
pmol	: pikomol
PVPP	: “polyvinylpolypyrrolidone”
r	: korelasyon katsayısı “Correlation coefficient”
RAPD	: “random amplified polymorphic DNA”
RNA	: ribonukleik asit
rRNA	: ribozomal RNA
SD	: standart sapma “standard deviation”
SDS	: sodyum dodesil sulfat
SE	: standart hata “Standard error”
TAE	: tris-asetat-EDTA
TBE	: tris-borat-EDTA

TEMED : tetrametiletilendiamin
UV : Morötesi ışık “Ultraviolet”

ÖZET

ARPA DOKU KÜLTÜRLERİNDE GENETİK VE EPIGENETİK VARYASYONLAR

Bu çalışmada, 15- ve 30-günlük arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160) kallusları arasındaki genetik ve epigenetik varyasyonlar sırasıyla IRAP “Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism” ve MSRF “Methylation Sensitive Restriction Fingerprinting” teknikleri ile araştırıldı. Dört-günlük arpa fideleri kontrol olarak seçildi. Olgun embriyolar, 4 mg l⁻¹ Dicamba içeren Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde 30 gün boyunca kültüre alındı. Embriyogenik kalluslar, rejenerasyon için 0.5 mg l⁻¹ trans-zeatin riboside içeren MS besiyerine aktarıldı. Dokular, *BARE-1* ve *Sukkula* gibi arpa retroelementlerinden geliştirilen dört IRAP kombinasyonu ile analiz edildi. *BARE-1* polimorfizmi gözlenmesine rağmen; *Sukkula* elementinin hareketsiz kaldığı gözlemlendi. Olgun embriyolardan kallus gelişimi sırasında, epigenetik varyasyonların en önemlilerinden biri kabul edilen metillenme değişimlerinin meydana geldiği anlaşıldı. MSRF verilerine göre, 30-günlük kallus DNA’sı, fide DNA’sına göre daha fazla metillenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, Homobrassinolide (HBL)’in, kallus gelişimine ve rejenerasyona etkileri araştırıldı. Otuz-günlük kalluslar, bir ay boyunca, iki farklı konsantrasyonda (0.5 µM and 1 µM) 22(S),23(S)-Homobrassinolide (HBL) uygulamasına maruz bırakıldı. Hem kontrol (hormon içermeyen) hem de HBL grupları, taze ağırlık miktarında ve SOD aktivitesinde azalmaya; total çözünebilir protein ve DNA içeriğinde artışa yol açtı. 0.5 µM grubu en yüksek değerleri oluştururken; en düşük SOD aktivitesi, 1 µM HBL grubunda gözlemlendi. HBL uygulamasının 14-15. gününde, HBL-uygulanmış ve uygulanmamış kalluslar, yeşil hücre kümeleri ve sürgün şeklinde rejenerasyon belirtileri gösterdi. Kontrol ve özellikle 0.5 µM hormon gruplarındaki kallusların, daha büyük, sert ve ufalanabilir oldukları gözlemlendi. En uzun sürgünlerin, 0.5 µM grubundaki kalluslarda geliştiği görüldü. Kontrol ve 0.5 µM hormon gruplarındaki metillenme değişimleri, MSRF tekniği ve iki primer kombinasyonu ile araştırıldı. HBL uygulamasının, genomda metillenme artışına yol açtığı görüldü.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, kallus gelişimi sırasında genetik ve epigenetik varyasyonlar meydana gelmektedir. HBL metillenmede artışa yol açmakta ve rejenerasyonu olumlu etkilemektedir. Bu çalışmanın, doku kültürü kaynaklı varyasyonların anlaşılmasında ve HBL’nin, doku kültürlerinde kullanılmasında yararlı olması beklenmektedir.

SUMMARY

GENETIC AND EPIGENETIC VARIATIONS IN BARLEY TISSUE CULTURE

In this study, genetic and epigenetic variations between 15- and 30-days-old barley (*Hordeum vulgare* L.) calli were investigated with IRAP “Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism” and MSRF “Methylation Sensitive Restriction Fingerprinting” techniques, respectively. Four-days-old seedling was used as control. Mature embryos were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 4 mg l⁻¹ dicamba for 30 days. Embryogenic calli were transferred to regeneration medium, MS containing 0.5 mg l⁻¹ trans-zeatin riboside. Tissues were analyzed with four IRAP primer combinations, which were designed according to barley retroelements *BARE-1* and *Sukkula*. *BARE-1* polymorphisms were detected however, *Sukkula* elements remained inactive. Methylation alterations, which is one of the most prominent epigenetic variations, occurred during callus formation from mature embryos. According to MSRF data, 30-days-old callus DNA was much more methylated than seedling DNA.

In the second part of the study, effects of Homobrassinolide (HBL) on callus growth and regeneration were investigated. Thirty-days-old calli were treated with two different concentrations (0.5 μM and 1 μM) of 22(S),23(S)-Homobrassinolide for one month. Both control (hormone-free) and HBL media caused decrease in fresh weight and SOD (EC 1.15.1.1) activity and increase in total soluble protein and DNA content. 0.5 μM group exhibited the highest protein and DNA levels and the least decrease in fresh weight. However, minimum SOD activity was measured in 1 μM HBL group. At the 14-15th day of the HBL treatment, HBL-treated and non-treated calli started to regenerate. Green cell clusters and as well as shoots were observed. Control and especially 0.5 μM group calli were bigger, harder and more friable than 1 μM group calli. Longest shoots developed in 0.5 μM group. Methylation alterations between control and 0.5 μM group were investigated with MSRF with two primer combinations. HBL treatment caused increase in genome-wide methylation.

Data indicate that genetic and epigenetic variations occurred during callus formation. HBL treatment caused increase in methylation and favoured regeneration. These results may be useful for exploration of tissue culture-induced variation and use of HBL in tissue cultures.

1. GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) en önemli tahıl bitkilerinden biri olup; hayvan yemi ve insan besini olarak tüketilmekte ve bira yapımında kullanılmaktadır. Genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında model organizma olarak önem taşımaktadır. Arpa ıslah çalışmalarındaki başlıca amaç verimi ve dane kalitesini arttırmaktır. Günümüzde, transgenik teknolojileri ile geliştirilmiş ve patenti alınmış arpa kültür varyeteleri bulunmaktadır. Doku kültürü sisteminin optimizasyonu, transformasyon çalışmalarındaki ilk adımdır (Gozukirmizi ve Temel, 2011). Doku kültürü koşullarının genetik, kromozomal ve morfolojik varyasyonlara yol açabileceği saptanmıştır (Heinz ve Mee, 1971). Doku kültürü koşullarının uyardığı varyasyonlar somaklonal varyasyon olarak adlandırılmıştır (Larkin ve Scowcroft, 1981). Eksplant çıkarımı sırasındaki yaralama, sterilizasyonda kullanılan maddeler, kültür ortamı ve koşulları, kültüre alınan hücrelerin genomlarında hasar oluşturur ve bu durumun, eksplanttan gelişen dokularda ve bitkilerdeki varyasyonların kaynağı olabileceği düşünülmektedir (Cassells ve Curry, 2001). Gürel ve diğ. (2009), 4 mg L⁻¹ Dicamba içeren MS (Murashige ve Skoog, 1969) besiyerinin, arpa olgun embriyolarından, embriyogenik kallus eldesinde oldukça iyi sonuçlar verdiğini gözlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da, 4 mg L⁻¹ (18 µM) Dicamba içeren MS besiyerinde gelişen kallus dokuları arasındaki genetik ve epigenetik varyasyonlar araştırıldı. Kontrol doku olarak 4-günlük arpa fideleri kullanıldı. Dört-günlük fide, 15-günlük ve 30-günlük kallus dokularına ait genomik DNA karışımlarında “Bulk”, 4 primer kombinasyonu ile “Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism” (IRAP) ve 2 primer kombinasyonu ile “Metillenmeye Duyarlı Restriksiyon Parmakizi” (Methylation-Sensitive Restriction Fingerprinting, MSRF) analizleri gerçekleştirildi. Tezin ikinci kapsamında, 30-günlük kalluslara farklı konsantrasyonlarda (0.5 ve 1 µM) uygulanan 28-Homobrassinolid’in (HBL), kallus gelişimine etkileri araştırıldı. Uygulamanın başından itibaren, 1 hafta arayla kallusların taze ağırlıkları kaydedildi. HBL uygulamasının sonunda, kalluslardaki total çözünebilir protein, DNA miktarları ve

SOD aktivitesi araştırıldı. Kontrol grubu ve 0.5 μ M HBL uygulanan kalluslar arasındaki metillenme farklılıkları MSRF yöntemi ile araştırıldı.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırılarak, kullanılan kültür koşullarının somaklonal varyasyon oluşturma özelliği ve HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallus gelişimine ve rejenerasyona etkileri ve 0.5 μ M HBL'nin ne yönde metillenme değişimleri oluşturduğu incelendi. Bulguların, transformasyon çalışmalarına sağlayabileceği katkılar, HBL'in genoma ve kallus hücrelerine etki mekanizması, literatür bilgileri ile birlikte değerlendirildi, yorumlandı ve tartışıldı.

2. GENEL KISIMLAR

2. 1. ARPA

Arpa (*Hordeum vulgare* spp.), *Gramineae* (*Poaceae*) ailesinin “Familya” *Hordeum* cinsine “Genus” aittir. *Hordeum*, diploid ($2n=2x=14$), tetraploid ($2n=4x=28$) ve hexaploid ($2n=6x=42$) genotipe sahip 32 türden oluşur (Bothmer ve diğ., 1995). Türkiye, İran, Suriye, Filistin ve Ürdün gibi ülkeleri kapsayan Bereketli Hilal “Fertile Crescent” isimli bölgede bulunan arpa tohumlarının kalıntıları incelendiğinde, arpanın yaklaşık 10000 sene önce bu bölgede kültüre alındığı anlaşılmıştır (Ivandić ve diğ., 2002). Arpanın atası, Türkiye’de, Alman botanikçi Carl Koch tarafından teşhis edilmiş ve ayrı bir tür olarak, *H. spontaneum* olarak isimlendirilmiştir (Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007). Günümüzde ise, kültüre alınan arpa (*H. vulgare* ssp. *vulgare* L.) ve yabani atası (*H. vulgare* ssp. *spontaneum* C. Koch.) diploid özellikte, tek yıllık bir tür altında sınıflandırılır (Bothmer ve diğ., 2003). Yabani ve kültüre alınmış formlar arasında doğal ve yapay çaprazlamalar yapılmaktadır (Asfaw ve Bothmer, 1990) ancak bazı durumlarda kromozomal translokasyonlar ve kısırlık oluşmaktadır (Ahokas, 1999). İki takson (yabani ve kültüre alınmış) morfolojik olarak birbirlerine benzemelerine karşın bazı farklılıklar bulunmaktadır. *H. vulgare* ssp. *spontaneum* her zaman iki-sıralı “Two-rowed” olup, ssp. *vulgare*’den daha uzundur (Backes ve diğ., 2003). İki- ve altı-sıralı arpada başak ekseninin her boğumunda 3 adet çiçek “Floret” bulunur ancak iki-sıralı bitkilerde yalnızca ortadaki çiçek fertildir (tohum oluşturabilir); altı-sıralı bitkilerde ise tüm çiçekler fertildir. Böylece, altı-sıralı bitkiler daha fazla tohum üretir ancak iki-sıralı bitkiler daha fazla sayıda kardeş oluşturur (<http://oregonstate.edu/instruct/css/330/five/BarleyOverview.htm>). Kültüre alınmış altı-sıralı arpanın atası ise *H. agriocrithon* Aberg’dir (Shao ve diğ., 1982). Tanno ve diğ. (2002) *vrs1* “Row type gene” lokusundaki çekinik bir mutasyon sonucunda altı-sıralı arpanın oluştuğunu açıklamışlardır. Altı-sıralı başak oluşumundan sorumlu *vrs1* geni Komatsuda ve diğ. (2007) tarafından izole edilmiştir. Dominant *vrs1* alleli, boğumda

yanlardaki çiçeklerde anlatım yapan bir transkripsiyon faktörünü (VRS1) kodlar. VRS1 proteini, lateral çiçeklerin gelişimini baskılar. VRS1 işlevinin kaybı, altı-sıralı fenotip oluşumuna yol açar. İki-sıralı fenotipe yol açan dominant mutasyon doğada ender olarak görülmektedir (Singh, 2006). Yabani ve kültüre alınmış formlar arasındaki diğer bir farklılık yabani türün kırılğan eksen yapısına sahip oluşudur. Eksenin kırılğan yapıda olması, tohumların doğaya yayılmasını kolaylaştırır. Kırılğan olmayan yapı ise tohum kaybı olmadan daha etkili bir hasat yapılmasını sağlar (Backes ve diğ., 2006). Yabani ssp. *spontaneum* kuraklık dayanıklılığına sahiptir (van Rijn ve diğ., 2000) ve arpa ıslahında allel kaynağı olarak görülmektedir (Ellis ve diğ., 2000; Backes ve diğ., 2003). Arpa, deniz seviyesinin 350-1500 metre yukarısında yetiştirilir (Shao ve diğ., 1982). Serin (15-30°C) hava sıcaklıkları ve orta derecede yağış (500-1000 mm yıllık), arpanın gelişimi için en uygun koşullardır (<http://barleyworld.org/whatisbarley.php>). Asidik ortam ve nemli koşullara duyarlı olmasına karşın soğuk, kuru, tuzlu, alkali toprak türlerine ve kuraklık gibi stres koşullarına diğer tahıl türlerinden daha dayanıklıdır (Bothmer ve diğ., 1995; Shakhatareh ve diğ., 2010). Arpa, tüm dünyada, 54 milyon hektar alanda, senede 150 milyon ton üretilir. Üretim miktarlarına göre, arpa, mısır (*Zea mays* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.) ve pirinçten (*Oryza sativa* L.) sonra dördüncü sıradadır (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, FAO 2009 İstatistikleri).

Başlıca arpa üreticisi ülkeler sırasıyla Rusya Federasyonu, Kanada ve Almanyadır (FAO). Üretilen arpanın %55'i hayvan yemi olarak; %39'u malt üretiminde; %3.5'i tohum olarak; %1.7'si ise insan besini olarak kullanılmaktadır (<http://barleyworld.org/whatisbarley/BarleyProduction.php>). Beta-glukan içeriğinin yüksek olduğunun anlaşılması ile, besin olarak daha fazla önem kazanmıştır (Ware ve diğ., 2002). Yağ ve kolesterolün sindirim sisteminde emilimini azaltan lif ve kandaki kolesterol miktarını düşüren tokotrienol (E vitamini) yönünden zengindir (<http://www.albertabarley.com/food/healthbenefits.shtml>). Arpa üretimini kısıtlayan başlıca etmenler arasında “Barley yellow dwarf virus (BYDV)”, “*Fusarium* head blight (FHB)”, “Russian wheat aphid (RWA)” gibi patojen ve hastalıklar yer alır (<http://barleyworld.org/whatisbarley/BarleyDiseasesPests.php>).

Arpa, %80'i tekrarlı dizilerden oluşan, günümüz koşullarında genom dizileme çalışmalarına elverişli olmayan oldukça büyük bir genoma (~5500 MB) sahiptir (Sreenivasulu ve diğ., 2008). “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” veritabanında arpaya ait 501,620 ESTs bulunmaktadır (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*,

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). 2006 yılının ağustos ayında kurulan “International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC)” Amerika Birleşik Devletleri (USDA-Agricultural Research Service), Almanya (IPK-Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research), Büyük Britanya (Scottish Crop Research Institute), Finlandiya (MTT Agrifood Research ve University of Helsinki), Japonya (National Institute of Agrobiological Sciences) ve Avustralya (Australian Centre for Plant Functional Genomics) gibi ülkelerdeki arpa genetiği üzerine çalışmalar yapan enstitüleri biraraya getiren bir oluşumdur. Bu oluşumun amacı “Bacterial Artificial Chromosome (BAC)” kitaplıklarını oluşturmak ve arpa genomunun dizisini elde etmektir (<http://www.gramene.org/whatsnew.html>).

Arpa ekonomik olarak önemli olmasının yanısıra, genetik ve fizyolojik çalışmalar için model organizma olarak görülmektedir (Koornneef ve diğ., 1997; Forster ve diğ., 2000). Arpa çalışmaları genellikle azot, karbon ve fosfat metabolizmalarının anlaşılmasına (Warner ve Kleinhofs, 1992; Kronzucker ve diğ., 1999; Vidmar ve diğ., 2000; Huang ve diğ., 2008), çeşitli hormonların üretimi ve algılanması bakımından kusurlu mutantların ve hormon metabolizmasında iş gören genlerin belirlenmesine (Chandler ve diğ., 2008) tohumların transkript içeriğinin ve çimlenme sırasında gerçekleşen reaksiyonların anlaşılmasına (Bradford ve diğ., 2008; Gendreau ve diğ., 2008; Shahpiri ve diğ., 2008), tohum içeriğini değiştirerek kaliteyi arttırmaya (Hang ve diğ., 2007; Hansen ve diğ., 2007), biyotik (Finnie ve diğ., 2002; Atienza ve diğ., 2004; Nirmala ve diğ., 2007) ve abiyotik (Chen ve diğ., 2007a; Chen ve diğ., 2007b; Reid, 2007) strese yanıt oluşturmada etkili genlerin bulunmasına, dayanıklı çeşitlerin moleküler markır yöntemleri ile belirlenmesine “Marker-assisted breeding” ve geliştirilmesine yöneliktir (Dunwell, 1986; Close ve diğ., 2004; Varshney ve diğ., 2007; Talame ve diğ., 2008).

2. 2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü, ana bitkiden alınan hücre, doku veya organların yapay besiyerinde geliştirilmesidir. Mikroçoğaltım ve transformasyon, bitki doku kültürünün başlıca kullanım alanlarıdır. Bitki hücrelerini, dokularının veya tek bir bitki hücrelerinin, steril koşullarda, besiyerinde kültüre alınması ile *in vitro* (laboratuvar ortamında) olarak tüm

bir bitki elde edilebilir (Cardoza, 2008). Bitki doku kültürü, çok hücreli canlılardaki her hücrenin, uygun koşullarda gelişim gösterebilme yeteneğine dayanır (White, 1954). Totipotent hücre, tüm bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip olan bir hücredir (Krikorian and Berquam, 1969). Arpa kültürlerinin rejenerasyon kapasitesi genotipe bağlı olmasına karşın kültür koşullarından (Goldstein ve Kronstad, 1986; Bregitzer, 1992; Dahleen, 1995; Dahleen, 1999; Dahleen ve Bregitzer, 2002; Chang ve diğ., 2003; Sharma ve diğ., 2005) da etkilenir. Etkili ve rejenerasyon gösteren bir doku kültürü sisteminin varlığı, transformasyon çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Transformasyon teknolojisi ile ekonomik değeri olan bir karakterin, istenen bir türe aktarılması mümkündür. Döl verebilen “fertile” transgenik arpa, *Agrobacterium*-aracılığı ile (Matthews ve diğ., 2001), elektroporasyon ile (Ritala ve diğ., 2002), partikül bombardımanı ile (Choi ve diğ., 2002), polietilenglikol (PEG) yöntemi ile (Nobre ve diğ., 2000) elde edilebilmiştir. Günümüze kadar, arpa genomuna çok sayıda gen aktarılmıştır (Horvath ve diğ., 2001; Manoharan ve Dahleen, 2002; Bregitzer ve Tonks, 2003). Transformasyon veya başka bir deyişle genetik mühendisliğinde, yabancı bir gen “alien gene”; seçici “marker” bir gen, haberci “reporter” bir gen ve genoma giriş için gerekli olan diğer DNA dizileri ile birlikte, totipotent özelliğe sahip hücre veya hücrelere aktarılır. Transformasyonun başarılı biçimde tamamlanması, aktarılan genin genoma girmesi, anlatım yapması, transforme edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda çoğalması ve rejenerasyon olmasına bağlıdır (Singh, 2002). Bu yüzden, genetik mühendisliği ve somaklonal varyasyon çalışmalarında ilk adım, *in vitro* kültüre alınan hücrelerden bitki gelişimine olanak tanıyan sistemin kurulmasıdır (Sharma ve diğ., 2005). Olgunlaşmamış embriyoların, doku kültürü açısından “Recalcitrant” olarak kabul edilen arpa gibi monokotil bitkilerde, rejenerasyon için en uygun eksplant kaynağı olmasına karşın (Vasil, 1994); olgun embriyoların da çeşitli tahıl türlerinin (Torbert ve diğ., 1998) doku kültürü açısından elverişli olabileceği belirtilmektedir. Arpada, olgunlaşmamış embriyo (Rikiishi ve diğ., 2008), olgun embriyo (Lupotto, 1984; Temel ve diğ., 2008), anter ve mikrospor (Bednarek ve diğ., 2007; Obert ve diğ., 2008), ovül ve ovaryum (Holme ve diğ., 2008), hücre süspansiyonu (Lührs ve Nielsen, 1992) ve protoplast (Lazzeri ve diğ., 1991) gibi çeşitli kültürlerin optimizasyonuna yönelik pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Arpa doku kültürü çalışmaları genellikle kallus oluşumunun (Şener ve diğ., 2008), transformasyonun (Holme ve diğ., 2008) ve rejenerasyonun optimizasyonuna (Sharma ve diğ., 2005; He ve Jia, 2008) ve doku kültürü sırasında

meydana gelebilecek değişimlerin belirlenmesine, ortadan kaldırılmasına ve altında yatan nedenlerin anlaşılmasına (Gaponenko ve diğ., 1988; Choi ve diğ., 2000a,b; Bregitzer ve Campbell, 2001; Bednarek ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2007; Bregitzer ve diğ., 2008; Temel ve diğ., 2008; Evrensel ve diğ., 2011) yöneliktir.

İlk doku kültürü deneyleri, yüksek yapılı bitkilerden alınan doku parçalarında gerçekleştirilmiş ve kültüre alınan doku parçalarında kallus oluşumu ile sonuçlanmıştır (Rechinger, 1893). Kallus, parenkima hücre yığına olup, doğada genellikle kök veya gövdedeki yaralanan bölgelerde gelişir (Dodds ve Roberts, 1985). Bitki doku kültürlerinde gelişen kallus dokuları rejenerasyon kapasitelerine göre embriyogenik ve embriyogenik olmayan şekilde 2 gruba ayrılır. Embriyogenik kalluslar, hızlı büyüme gösterirler; sert yapılı, kompakt, opak görünüme sahiptirler. Embriyogenik kallusların diğer bir tipi ise gevrek veya ufalanabilir “Friable” yapıya sahip olup, süspansiyon kültürler için en uygun bitki materyalidir. Embriyogenik olmayan kallus ise, sulu, şeffaf, yapışkan bir görünüme sahip olan, geniş hücreleren oluşan ve yavaş büyüyen kallus tipini belirtir. Embriyogenik kalluslar, rejenerasyon için uygun koşullar altında farklılaşma göstererek, tüm bir bitkiyi verebilirler. Dikotiledonlarda oksin/sitokininin oranının değiştirilmesi, monokotiledonlarda ise oksin yokluğu organogenezi uyarır (Lambe ve diğ., 1997).

2. 3. SOMAKLONAL VARYASYON

Doku kültürü eşeysiz üreme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Buna göre, bir bitkiden alınan herhangi bir parçadan “eksplant” doku kültüründe gelişen tüm bitkilerin, ana bitkiyle özdeş olması gerekmektedir. Ancak, doku kültüründe gelişen bitkilerin “Somaclone” tümü birbiriyle veya ana bitkiyle özdeş değildir ve genetik değişiklikler gösterir. Bu bitkilerdeki, doku kültürünün neden olduğu değişimlere somaklonal varyasyon adı verilmiştir (Larkin ve Scowcroft, 1981; Mohan, 2001; Joyce ve Cassells, 2002). Kültüre alınan hücrelerde ve rejenere olan bitkilerde varyasyonlar olabileceği ilk kez Heinz ve Mee (1969, 1971) ve Heinz ve diğ. (1969) tarafından bildirilmiştir. Şeker pancarında gerçekleştirilen bu çalışmalarda, kültüre alınan hücrelerde kromozom sayı değişikliklerinin olduğu; rejenere olan bitkilerde ise kromozomal, morfolojik ve

enzimatik varyasyonlar gerçekleştiği gözlenmiştir. Somaklonal varyasyonun iki nedeni olabileceği ileri sürülmüştür. İlk olarak, hücrelerde önceden var olan genetik değişikliklerin somaklonal varyasyon şeklinde gözlenebileceği düşünülmüştür (Skirvin ve Janick, 1976). Daha sonraları ise, doku kültürü koşullarının somaklonal varyasyona neden olabileceği düşünülmüştür (Lorz ve Scowcroft, 1983). Doku kültürü koşulları ve özellikle kallus gelişimi, normal gelişim düzenini bozan bir strese yol açmaktadır (Müller ve diğ., 1990; Phillips ve diğ., 1994; Cassells ve Curry, 2001). Doku kültürü sırasında, eksplant olarak alınan hücrelerden, farklılaşma kaybı “Dedifferentiation” sonucunda kallus gelişir. Kültür ilerledikçe, kültür bileşenlerinin de etkisiyle eksplant ve kallus dokusu farklılaşarak “Redifferentiation” bitki gelişimine yönelir. Genomun yeniden düzenlenmesini “Reprogramming” gerektiren bu durum yani doku kültürü, hücreye travmatik bir deneyim yaşatır. Genomun yeniden düzenlenmesi, transpozisyon, kromozom kırıkları ve epigenetik değişimlerle sağlanır (McClintock, 1984). Doku kültüründe kullanılan hormonlar, bitki büyüme düzenleyicileri gibi maddeler (Takeda ve diğ., 1999), eksplant çıkarılması sırasında dokunun yaralanması (Grandbastien, 1998) ve yüzey sterilizasyonu sırasında kullanılan hipoklorit gibi maddeler doku kültürünün stresinin nedenleri arasındadır (Madlung ve Comai, 2004). Somaklonal varyasyon incelenen tüm bitki türlerinde gözlenmiştir. Bazı genotiplerde değişim gözlenmemesinin nedeni, örnek sayısının veya incelemenin yetersiz oluşudur. Bitki türünün veya genotipin, *in vitro* ortamdaki büyüme ve rejenerasyon yeteneği, kültüre alınan eksplantın strese maruz kalmadığını gösterir ve bu durum varyasyonun az olması şeklinde görülür (Phillips ve diğ., 1994). Farklılaşmış dokuları kültüre almanın somaklonal varyasyonu azalttığı gösterilmiştir (Bregitzer ve diğ., 2002).

Bitki doku kültüründe kültür başlatma ve alt kültürleme sırasındaki yaralama (Yahraus ve diğ., 1995) ve yüzey sterilizasyonunda kullanılan hipoklorit (Wiseman ve Halliwell, 1996) gibi maddeler oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres (Gille ve Siegler, 1995; Bartosz, 1997), süperoksit iyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonunu (OH^-) kapsayan reaktif oksijen türlerindeki “Reactive oxygen species” (ROS) artış olarak tanımlanır. Pek çok stres türünün, ROS miktarında artışa yol açtığı bilinmektedir (Gille ve Siegler, 1995). Oksijenli solunum sırasında, oksijen molekülüne (O_2), 4 elektron aktarılır. Bir elektron aktarıldığı zaman O_2^- , iki elektron aktarıldığı zaman H_2O_2 , 3 elektron aktarıldığı zaman OH^- açığa çıkar (Cassells ve Cury, 2001). ROS, protein ve nükleik asitlerle reaksiyona girer (Gille ve Siegler, 1995), mutasyonlara yol

açar (Bohr ve Dianov, 1999). Oksidatif stresin etkileri hücrede, metillenme seviyelerinde değişim (Kaepler ve Phillips, 1993a; Tilghman, 1993; Wiseman ve Halliwell, 1996; Cerda ve Weitzman, 1997; Wacksman, 1997), kromozom sayı ve yapı değişimleri ve DNA baz değişimleri ve delesyonlar (Gille ve diğ., 1994; Czene ve Harms-Ringdahl, 1995; Hagege, 1995) olarak açığa çıkar. ROS, antioksidan savunma mekanizması tarafından etkisiz hale getirilir (Hippeli ve Elstner, 1996). Antioksidan savunma, enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde gerçekleşir. Enzimatik olmayan sistemi, glutatyon, askorbik asit, karotenoid gibi antioksidan moleküller; enzimatik savunma sistemini ise süperoksit dismutaz, katalaz, askorbik asit peroksidaz gibi enzimler oluşturur (Tsang ve diğ., 1991; Gille ve Siegler, 1995). Organogenez ve somatik embriyogenez gibi doku kültürü aşamaları ile antioksidan enzimlerin aktivitelerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gupta ve Datta, 2003/2004; Libik ve diğ., 2005; Konieczny ve diğ., 2008). En çok açığa çıkan ROS O_2^- 'dir. Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) enzimi, O_2^- , H_2O_2 'ye dönüştürür. Süperoksit aktivitesinin, stres koşulları altındaki bitkilerde arttığı gösterilmiştir (Meloni ve diğ., 2003).

Doku kültüründe meydana gelen değişimler genetik veya epigenetik özellikte olabileceği gibi; somatik hücrelere aktarılabilir veya mayoz ile sonraki nesle aktarılabilir özellikte olabilir (Evans, 1989; Kaepler ve diğ., 2000). Somatik hücrelere aktarılabilen değişimler, isminden de anlaşılabilirdiği gibi kültürde ilk gelişen dokularda gözlenir ve sonraki nesillerde görülmez. Mayoz ile aktarılan değişimler ise doku kültüründe gözlenen kalıcı değişimlerdir ve hem gelişen bitkilerde hem de sonraki nesillerde gözlenebilirler (Kaepler ve diğ., 2000). Önceleri, epigenetik değişimlerin geçici özellikte olduğu ve rejenere olan bitkilerin bir sonraki nesillerinde görülmeyeceği düşünülmekteydi (Evans, 1989). Daha sonraları ise epigenetik değişimlerin DNA dizi değişimlerinden bağımsız olarak gen anlatımını etkilediği ve mayoz ile sonraki nesillere aktarılabilirdiği anlaşılmıştır (Kaepler ve diğ., 2000). Ayrıca, doku kültürü dışında gelişen epigenetik değişimlerin de stabil olabileceği belirtilmiştir (Cubas ve diğ., 1999). Somaklonal varyasyonun hem olumlu hem de olumsuz yönleri bulunmaktadır. Değişimlerin sonraki nesillere aktarılamaması ve ilgilenilen karakterlerde veya transformasyonda kullanılan hücrelerde meydana gelmesi olumsuz yönlerini oluşturur (Phillips ve diğ., 1994; Bregitzer ve Poulson, 1995; Fütterer ve Potrykus, 1995; Kooter ve diğ., 1999; Jain, 2001). Genetik stoklara zarar verebilecek olması özelliğinden dolayı, doku kültürü tekniklerinin gen bankalarında kullanılması neredeyse tamamen

yasaklanmıştır (Jain, 2001). Singh (2006), somaklonal varyasyonun, üstün genotip elde etmede kullanışlı bir yöntem olmadığını ileri sürmüştür. Ancak, somaklonal varyasyonun, ıslah yöntemi olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür (Skirvin ve diğ., 2000). Değişimler tuz stresine dayanıklılık gibi bazı istenen özellikleri kazandırmakta ve yeni bitki çeşitlerinin oluşumuna yol açabilmektedir (Skirvin ve Janick, 1976; Müller ve diğ., 1990; Duncan, 1997; Veilleux ve Johnson, 1998). Kole ve Chawla (1993), doku kültürü koşullarında, verimi yüksek ve *Helminthosporium sativum*'a dayanıklı arpa bitkileri elde etmişlerdir. Tatlı patatesin “Scarlet” çeşidi (Moyer ve Collins, 1983), tuza ve sıcaklığa dayanıklı keten çeşidi “ANDRO” (O'Connor ve diğ., 1991) ve domates bitkisinin UC82B varyetesinin, *Fusarium*'a dayanıklılık gösteren somaklonu olan DNAP-17 (Evans, 1989) doku kültürü ile geliştirilen stabil bitki çeşitlerine örnek olarak verilebilir. *Paulownia tomentosa*'nın “Somaclonal Snowstorm” çeşidi ise stabil olmayan somaklonlara örnektir (Marcotrigiano ve Jaganathan, 1988). Somaklonal varyasyon; kromozom anomalileri, DNA dizi değişimleri, metillenme değişimleri ve transpozon hareketleri şeklinde meydana gelir (Phillips ve diğ., 1994).

2. 3. 1. Kromozom Anomalileri

Kromozom anomalileri, kültüre alınan dokularda, bitki doku kültüründe gelişen bitkilerde ve rejenerasyon alan bitkilerin sonraki nesillerinde görülmektedir (Kaeppeler ve diğ., 2000). Bazı durumlarda, kromozom anomalilerine, fenotipik değişimler de eşlik etmektedir. Kültüre alınmış hücrelerin kromozomal stabilitesi ile rejenerasyon kapasitesi arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (Mahfouz ve diğ., 1983). Altkültür periyotları (Bayliss, 1980), kültür süresi (Lee ve Phillips, 1988) ve besiyeri bileşenleri, özellikle de hormonlar (Torrey, 1961), kültürdeki hücrelerin sitogenetik özelliklerini etkilemektedir. Kromozom anomalileri genellikle kallus gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Bayliss, 1980). Bitki doku kültüründe meydana gelen kromozom anomalileri genellikle sayı anomalileridir. Sitogenetik anomaliler genellikle poliploidi ve anöploidi gibi kromozom sayı değişimleridir. Bitki doku kültüründe yaygın biçimde kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kromozom sayı değişimlerini uyarıcı etkileri bulunduğu gösterilmiştir (Nair ve Seo, 1995). Hücre döngüsü, DNA replikasyonunu, hücre bölünmesi izleyecek biçimde düzenlenir. Bitki doku kültürünün, hücre

döngüsünün düzenini bozarak; poliploidi, anöploidi gibi sayısal veya kromozom kırıklarına bağlı olarak translokasyon, delesyon, inversiyon veya duplikasyon gibi yapısal anomalilere yol açtığı ileri sürülmüştür (Phillips ve diğ., 1994). Kromozom anomalileri *in vitro* kültüre alınan pek çok bitki türünde (Sacristan, 1971; McCoy ve diğ., 1982; Murata ve Orton, 1983; Karp ve Maddock, 1984; Lapitan ve diğ., 1984; Ramulu ve diğ., 1986; Sanal Kumar ve Mathur, 2004) ve arpa bitkisinde (Mix ve diğ., 1978; Orton, 1980; Singh, 1986; Gaponenko ve diğ., 1988; Gözükırmızı ve diğ., 1990; Ziauddin ve Kasha, 1990; Hang ve Bregitzer, 1993) detaylı biçimde araştırılmıştır ve gösterilmiştir. Gozukırmızı ve diğ. (1990) gelişiminin farklı evrelerindeki arpa kalluslarını incelemişler ve kromozom sayısı ve yapı anomalilerinin kallus yaşı ile doğru orantılı olduğunu; kallus yaşı ile rejenerasyon yeteneğinin ise ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. On-günlük kalluslarda incelenen tüm hücrelerin diploid ve yapısal olarak normal olduğunu; 540 günlük kalluslarda ise incelenen hücrelerin %60'ının kromozom anomalileri gösterdiğini ve 540-günlük kallusların rejenerasyon kapasitesini yitirdiğini bildirmişlerdir. Hang ve Bregitzer (1993) olgunlaşmamış embriyo kökenli arpa kalluslarından bitki rejenerasyonunun genotip, kültür süresine ve kallus hücresindeki sitogenetik değişimlere bağlı olduğunu; kültür süresi uzadıkça kromozomal anomalilerin özellikle de ploidi değişimlerinin arttığını ve bitki rejenerasyonunun azaldığını göstermişlerdir. Patates bitkisinde yapılan bir çalışmada (Ramulu ve diğ., 1986) ise genotipin ve ploidi düzeyinin de varyasyonu etkilediği gösterilmiştir. Dihaploid ve tetraploid patateslerde protoplastlardan bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Dihaploid protoplastlardan rejenere olan bitkilerin tamamında kromozom sayısı değişimleri gözlenirken, bu bitkilerin sadece bir kısmı morfolojik farklılık göstermiştir. Tetraploidlerde ise rejenere olan bitkilerin %60'ında kromozom sayısı değişimlerine rastlanmasına karşın, tümünde fenotipik değişimler gözlenmiştir.

2. 3. 2. DNA Dizi Değişimleri

Doku kültürü koşullarında oluşan DNA dizi değişimleri başta “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) ve “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) olmak üzere, çeşitli moleküler markır yöntemleri veya protein elektroforezi ile belirlenebilir. DNA replikasyonu veya onarımı mekanizmalarındaki duyarlılığın kaybı

veya metilsitozinin deaminasyona uğraması, DNA dizi değişimlerinin nedenleri arasında görülmektedir (Phillips ve diğ., 1994). Mısırdaki yapılan bir çalışmada (Brettell ve diğ., 1986) doku kültüründe rejenere edilen bitkiler taranmış ve alkol dehidrogenaz (*Adh1*) geni bakımından mutant bir birey saptanmıştır. Bu bireyde, genin altıncı eksonundaki bir baz değişiminin, proteinin amino asit dizisini ve elektroforetik hareketini değiştirdiği belirlenmiştir. Breiman ve diğ. (1985) Southern melezleme ve SDS-PAGE tekniklerini kullanarak, olgun olmayan *H. spontaneum* embriyolarından kökenlenen kalluslardan gelişen bitkilerdeki rRNA'ları kodlayan genlerin ve hordein genlerinin dizilerini incelemişler ve her 2 lokusta da dizi değişimleri gerçekleştiğini göstermişlerdir. Shimron-Abarbanell ve Breiman (1991), Southern melezleme tekniği ile, skutellumdan kökenlenen kalluslardan rejenere olan *H. maritimum* bitkilerini incelemişler ve bitkilerin, hem nükleus hem de mitokondri genomlarındaki kodlama yapmayan dizilerinde varyasyonlar saptamışlardır. Temel ve diğ. (2008) eksplant olan olgun embriyo dokuları kontrol olarak kullanarak, 24-haftalık kallus dokularını incelediklerinde, kallus gelişimi sırasında hem genetik hem de epigenetik değişimler meydana geldiğini göstermişlerdir. Campbell ve diğ. (2010) ise "Inter-simple Sequence Repeat" ISSR tekniğini kullanarak, doku kültüründe rejenere olan arpa bitkilerindeki DNA varyasyonlarını belirlemişlerdir. Doku kültüründe, metillenme değişimleri, dizi değişimlerine göre daha sıklıkla meydana gelmektedir. Mısırdaki yapılan bir çalışmada (Kaepler ve Phillips, 1993b) kontrol ve rejenere olan bitkiler arasında dizi farklılığı saptanmamasına karşın; metillenme düzeyinde değişim gözlenmiştir. Doku kültürünün metillenme düzeyine etkileri *Petunia* (Anderson ve diğ., 1990), pirinç (Brown ve diğ., 1990), mısır (Brown ve diğ., 1991; Kaepler ve Phillips, 1993b), *Arabidopsis thaliana* (Bardini ve diğ., 2003), patates (Komarova ve diğ., 2004), tütün (Koukalova ve diğ., 2005), *Codonopsis lanceolata* (Guo ve diğ., 2007) gibi bitkilerde araştırılmıştır.

2. 3. 3. Metillenme Değişimleri

DNA dizisini değiştirmeden gen anlatımını etkileyen değişimlere epigenetik değişimler adı verilir (Madlung ve Comai, 2004). Epigenetik kelimesi, bilinen, geleneksel genetiğin dışında kalan "Outside conventional genetics" anlamına gelmektedir (Jaenisch ve Bird, 2003). DNA metillenmeleri ve histon metillenmesi, asetillenmesi,

fosforillenmesi ve ubikitinlenmesi epigenetik değişimlere örnek olarak verilebilir. Bu modifikasyonlar, geri dönüşebilir özellikte olmalarına karşın sonraki nesillere de aktarılabilir (Madlung ve Comai, 2004). DNA metillenmesi, adenin veya sitozin bazının yapısına metil grubu eklenmesi ile gerçekleşir ve metillenme sonucu sırasıyla 6mA (6-metiladenin) ve 5mC (5-metilsitozin) meydana gelir. Organizmanın 5mC içeriğinin türe ve dokuya özgü olduğu (Vanyushin ve diğ., 1973); hormonlar tarafından düzenlendiği (Vanyushin ve Kirnos, 1988) ve yaşı bağlı olarak değişkenlik gösterdiği (Berdushev ve diğ., 1967) anlaşılmıştır. Metillenme, prokaryot genomu, restriksiyon enzimleri tarafından tanınmasını sağlayarak, korur (Wilson, 1988). Ökaryotlarda ise, genomun transpozonlardan korunmasını sağlayan bir gen sessizleşme mekanizmasıdır (Martienssen ve Colot, 2001). *Arabidopsis thaliana*'da, metillenmedeki azalmanın transpozon hareketlerini arttırdığı görülmüştür (Miura ve diğ., 2001). İlk kez 1963 yılında varlığı belirlenen DNA metiltransferaz enziminin, verici S-adenozil-L-metionin (SAM) molekülünden aldığı metil grubunu, yeni replike olmuş DNA molekülündeki adenin veya sitozin bazlarına aktardığı belirlenmiştir (Gold ve Hurwitz, 1964). Memelilerdeki sitozinlerin %2-8'inin; bitkilerde ise yaklaşık %50'sinin metillenmiş durumda bulunmasına karşın; *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ile *Caenorhabditis elegans* gibi türlerde ve erişkin *Drosophila melanogaster*'de 5mC varlığına rastlanmamıştır (Doerfler, 1983). 5mC miktarındaki değişimler, metillenme ve metillenme kaybı olmak üzere 2 yolla meydana gelir (Finnegan ve diğ., 1998). Metillenme kendi içinde *de novo* (başlangıç olarak) ve sürekli olmak üzere 2 şekilde gerçekleşir. Sürekli metillenme yapan enzimler, her replikasyon sonrasında, öncü DNA molekülündeki metillenme düzenini, oluşan yeni DNA moleküllerine kopyalarlar. DNMT3 "DNA Methyltransferase" ve DRM2 "Domain Rearranged Methyltransferase 2" sırasıyla memelilerde ve bitkilerde bulunan, sürekliliği sağlayan enzimlerdir (Bestor, 2000; Chan ve diğ., 2005). *De novo* metillenme ise canlı gelişiminin erken evrelerinde (Okano ve diğ., 1999) ve kanser varlığında (Baylin ve Herman, 2000) meydana gelir ve canlıdaki her dokuya ve hücreye özgü 5mC düzeyinin kurulmasını sağlar. DNMT1 ve MET1, sırasıyla memelilerde ve bitkilerde bulunan *de novo* metiltransferazlardır. CMT3 "Chromodomain methyltransferase 3" ise bitkilere özgü olan ve her 2 metillenme türünde de etkili olan bir metiltransferaz enzimidir. Metillenme kaybı, belirli genlerin aktifleşmesinin gerekli olduğu durumlarda meydana gelir ve kendi içinde aktif veya pasif olarak sınıflandırılır. Pasif metillenme kaybı, sürekli metillenme sağlayan

enzimlerin inaktif olması durumunun sonucudur ve replikasyon sonucu oluşan DNA molekülünde metillenme gerçekleşmez. Aktif metillenme kaybında ise, 5mC, DNA ipliğinin yapısından, bir enzim kompleksinin işlevi ile çıkarılır. Bitkilerde gerçekleşen metillenme kaybında, 5mC DNA glikozilaz enzimi, 5mC ile deoksiriboz arasındaki glikozit bağı parçalar ve 5mC DNA yapısından ayrılır. 5mC'nin çıkışı ile, apirimidinik (AP) veya abazik bir bölge oluşur. AP endonukleaz enzimi, abazik bölgedeki deoksiribozu çıkarır. En sonunda, DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimlerinin işlevi ile yapıya yeni bir sitozin (metillenmemiş) katılır. Memelilerde gerçekleşen mekanizma bitkilerdekine benzemekle birlikte, öncelikle 5mC deaminaz enzimi tarafından, amino grubunun çıkışı ile 5mC, timin bazına dönüştürülür. Daha sonra, timin DNA glikozilaz enzimi, timin bazını DNA'nın yapısından çıkarır (Zhu, 2009). Sitozin metillenmeleri memelilerde CG dinukleotidlerinde gerçekleşirken (Bird, 2002); bitkilerde CG dinukleotidlerinde veya CNG (N; herhangi bir nukleotid olabilir) ve CHG (H; A, C ve T nukleotidlerinden birisi olabilir) trinukleotidlerinde gerçekleşebilir (Chan ve diğ., 2005).

Sitozin metillenmesi, transkripsiyonda iş gören proteinlerin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek ve metillenmiş DNA'ya bağlanan proteinlerin bağlanmasını sağlayarak, gen anlatımının baskılanmasına ve kapalı kromatin yapısının oluşumuna neden olur (Bird, 2002). Gen anlatımı yönünden sessiz olarak kabul edilen heterokromatin genellikle metillenmiş durumda bulunur (Madlung ve Comai, 2004). Bitki (Bennetzen, 1996) ve memeli genomunda (Yoder ve diğ., 1997) bulunan 5mC'inin büyük bir kısmı, retrotranspozonların içindedir. Sitozin metillenmesi ökaryotlarda, dokuya özgü gen anlatımı, X kromozomunun inaktivasyonu, kanser, yaşlanma, gelişim ve genomun stabilitesinin korunması gibi pek çok işlevde etki gösterir (Bird, 2002). Metillenme düzeyindeki değişimlerin hücreye etkileri, kanser hücrelerinde detaylı biçimde araştırılmıştır (Irizarry ve diğ., 2009; Jiang ve diğ., 2009). Kanser hücrelerinde genom düzeyinde metillenme azalmış iken, tümör baskılayıcı genler genellikle metillenmiş durumda bulunur (Baylin ve diğ., 1998). Bitkilerde plastid genomlarının metillenmesine ilişkin çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, adenin ve özellikle sitozin metillenmesinin kloroplast genomunda da meydana geldiği ancak gen anlatımının ve fenotipin etkilenmediği bildirilmiştir (Jaffe ve diğ., 2008; Ahlert ve diğ., 2009).

Stres koşulları, metillenme düzeylerini değiştirebilmekte ve bazı durumlarda metillenme değişimleri ile gen anlatımını etkileyebilmektedir. *Pseudomonas syringae* tarafından enfekte edilen *Arabidopsis* bitkilerindeki sentromer dizilerinde, metillenmenin azaldığı gözlenmiştir (Pavet ve diğ., 2006). Bitki doku kültürü koşulları da metillenme düzeylerini sıklıkla etkilemektedir (Brown ve diğ., 1990; Kaeppler ve Phillips, 1993a, b). Doku kültürünün neden olduğu metillenme değişimleri, rejenere olan pirinç (Brown ve diğ., 1990) ve mısır (Brown ve diğ., 1991) bitkilerinde ve sonraki nesillerinde gösterilmiştir. Doku kültürü koşullarının genellikle metillenmede azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (Kaeppler ve diğ., 2000). Bitki doku kültüründe kullanılan hormon ve büyüme düzenleyicilerin metillenme düzeylerini etkilediği; 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) gibi oksinlerin metillenmeyi arttırdığı (LoSchiavo ve diğ., 1989; Phillips ve diğ., 1994); kinetin gibi sitokininlerin ise etkilemediği (LoSchiavo ve diğ., 1989) görülmüştür.

Metillenmedeki artışın kromozom kırıklarının nedeni olabileceği ileri sürülmüştür. Heterokromatin, hemen hemen tüm bitki dokularında metillenmiş durumda bulunmaktadır (Bennetzen ve diğ., 1994). Metillenmedeki artışın DNA replikasyonunu geciktirebileceği ve bu durumun, kromozom kırıkları gibi anormalilere yol açabileceği düşünülmüştür (Phillips ve diğ., 1994). Mısır ve yulaf doku kültürlerinde yapılan çalışmalar sonucunda, kromozom kırıklarının genellikle heterokromatinde gerçekleştiği bildirilmiştir (Johnson ve diğ., 1987). Tahıl bitkilerinde, heterokromatinin büyük bir kısmını retrotranspozonlar oluşturmaktadır (Bennetzen, 2000). Sitozin metillenmelerinin, transpozon hareketleri ile doğrudan ilişkili oluşu (Chomet ve diğ., 1987; Banks ve diğ., 1988); doku kültüründe gerçekleşen metillenmedeki azalmanın, transpozonların aktivitesini arttırabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Kaeppler ve diğ., 2000). Yapılan bir çalışmada (Brettell ve Dennis, 1991), kültüre alınan bitkilerin, *Activator* elementinin inaktif formunu taşımalarına karşın; kültürde rejenere olan bitkilerde metillenme düzeyinin azaldığı ve elementin aktif hale geçtiği görülmüştür.

Doku kültüründe gelişen bitkilerdeki metillenme değişimleri pek çok bitki türünde (Shimron-Abarbanell ve Breiman, 1991; Bednarek ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2007; Temel ve diğ., 2008; Baranek ve diğ., 2010) araştırılmıştır. Shimron-Abarbanell ve Breiman (1991), doku kültüründe rejenere olan *H. maritimum* bitkisinin rRNA genlerinde metillenme değişimleri saptamışlardır. Bednarek ve diğ. (2007), olgunlaşmamış embriyo ve anter dokularını eksplant olarak kullanarak bitki rejenerasyonu elde etmişler

ve iki farklı şekilde gelişen bitkilerdeki metillenme düzeylerini karşılaştırmışlardır. İki grupta gerçekleşen ortalama varyasyon oranının %6 olduğunu; bu değer in %1.7'sini nukleotid mutasyonlarının, geri kalan kısmını ise metillenme değişimlerinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Li ve diğ. (2007), arpa başak parçalarından gelişen kalluslardaki ve bu kalluslardan rejenere olan bikilerdeki metillenme değişimlerini araştırmışlar ve değişimlerinin, protein kodlayan genlerde ve retrotranspozonlarda gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

2. 3. 4. Transpozon Hareketleri

Transpozonlar, genomdaki konumlarını değiştirebilen hareketli yapılar olup, ilk kez mısır bitkisinde bulunmuşlardır (McClintock, 1948). McClintock'un transpozabl elementleri (TE) keşfi, mısırdaki kromozom kırıklarıyla yaptığı çalışmalara dayanır. McClintock, mısırdaki 9. kromozomda kırık meydana geldiğini gözlemlemiş ve kırılmanın olduğu bölgeyi *Ds* lokusu "*Dissociation*" olarak adlandırdıktan sonra; *Ds* lokusundaki kırık oluşumunun başka bir lokus tarafından uyarıldığını belirleyip, bu lokusu da *Ac* "*Activator*" olarak isimlendirmiştir (<http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/transelem/trans1.htm>). Önceleri bencil DNA veya parazit olarak tanımlanan TE'nin (Orgel ve Crick, 1980), genom projelerinin başlamasıyla birlikte bitki genomlarının oluşumunda önemli rol oynadıkları görülmüştür. TE, *Plasmodium falciparum* dışındaki hemen tüm ökaryotlarda bulunmaktadır (Adams ve diğ., 2000; IHGSC, 2001; IRGSP, 2005). TE, insan genomunun yaklaşık % 46'sını (Lander ve diğ., 2001); tahıl genomlarının ise %70'den fazlasını (Wessler, 2006) oluşturmaktadır. McClintock (1949), TE, gen ve/veya genom yapısında değişikliklere yol açma ve gen anlatımını etkileme gibi özelliklerinden dolayı, kontrol edici elementler olarak tanımlamıştır. TE, hareket mekanizmalarına göre DNA transpozonları (Tip II) ve retrotranspozonlar (Tip I) olmak üzere başlıca 2 sınıfa ayrılırlar. DNA transpozonları bitkilerde ilk keşfedilen TE olup, gen anlatımında ve fenotipte değişikliklere yol açarlar (Bennetzen, 2000). "Kes-yapıştır (cut-and-paste)" mekanizması ile orijinal konumundan, yeni bir konuma hareket ederler (Hannah ve Weil, 2004). Mısır bitkisinde bulunan *Ac/Ds*, *Spm/dspm* (*En/I*) and *Mutator* sistemleri

Tip II elementlere örnek olarak verilebilir (Kunze ve diğ., 1997). Uzunlukları birkaç yüz bç ile 10 Kb arasında değişkenlik gösterir (Bennetzen, 2000).

Tip I TE olarak da isimlendirilen retroelementler “Copy-and-paste (Kopyala-yapıştır)” şeklinde, RNA molekülü aracılığıyla genomda bir bölgeden, başka bir bölgeye hareket ederler ve monokotil genomlarının yaklaşık %80 kadarını oluştururlar (IRGSP, 2005). Transpozisyon mekanizmalarından dolayı genom çeşitliliğini ve büyüklüğünü etkileyen en önemli etmenlerden biridirler (Vitte ve Panaud, 2005). Ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) genomunun yaklaşık %3.1’ini; *Arabidopsis thaliana* genomunun %2’sini ve pirinç (*Oryza sativa*) genomunun ise %8.3’ünü retroelementler oluşturmaktadır (Schulman ve diğ., 2004). Bitki genomunda varlığı keşfedilen ilk retroelement mısır bitkisinde bulunan *Cin 1* elementi iken (Shepherd ve diğ., 1984); ilk aktif retroelement mısır bitkisinde bulunan *Bs1* elementidir (Johns ve diğ., 1985). Retroelementler, LTR-içeren ve LTR-içermeyen “non-LTR” şeklinde 2’ye ayrılırlar. LTR içermeyen elementler “Retroposons”, “Long interspersed elements” (LINE), “Short interspersed elements” (SINE), DIRS-benzeri elementler ve *Penelope*-benzeri elementler (PLE) gibi birimlere ayrılırlar (Wicker ve diğ., 2007). LINE elementleri LTR-içeren retroelementlerin öncüsü olarak görülürler (Xiong ve Eickbush, 1990; Eickbush, 1992). LINE elementleri, kapsid-benzeri proteini (CP), endonukleaz aktivitesi gösteren aspartik proteinaz enzimini (EN, AP), ters transkriptaz enzimini (RT), RNaz H enzimini kodlayan genleri içerirler (Kumar ve Bennetzen, 1999). İnsan genomunun yaklaşık %20’sini oluşturan L1 elementi (Kazazian ve Goodier, 2002; Wicker ve diğ., 2007) ile pirinç bitkisinde doku kültürünün etkisiyle aktifleştigi görülen Karma elementi LINE’ye örnek olarak verilebilir (Komatsu ve diğ., 2003). LINE elementleri yaklaşık 1 Kb ile 9 Kb uzunluğunda olup; haploid bitki genomunda 250.000 kopya sayısına ulaşabilmektedir (Bennetzen, 1996; Kumar ve Bennetzen, 1999). SINE elementleri ise 80-500 bç uzunluğunda olup (Wicker ve diğ., 2007); RNA polimeraz III enziminin ürünlerinin (5S rRNA, tRNA) ters transkripsiyon geçirmesi sonucu oluşurlar (Deragon ve Capy, 2000). 4.5S RNA’yı (7SL) kodlayan genin duplikasyonu sonucu oluşan *Alu* elementleri (Schmid, 1996) insan genomunda 500.000’den fazla kopya sayısına sahiptir (Rowold ve Herrera, 2000). Protein kodlama işlevleri olmadığı için, LINE elementleri aracılığıyla çoğalırlar (Eickbush, 1992; Lenoir ve diğ., 2001). Pirinç bitkisinin genomunda bulunan p-SINE-1 filogenetik markır olarak kullanılır (Cheng ve diğ., 2002). SINE elementleri haploid bitki genomunda 50.000 kopya sayısına

ulaşabilmektedir (Bennetzen, 1996). DIRS-benzeri elementler “*Dictyostelium discoideum* transposon” integras enzimi yerine tirozin rekombinaz enzimini kodlarlar (Cappello ve diğ., 1985). PLE ilk kez *Drosophila virilis*’te bulunmuştur. Kodladıkları RT enzimi telomeraz enzimine; endonukleaz enzimi ise bakterilerde, DNA onarımında iş gören UvrC proteinine homoloji gösterir (Wicker ve diğ., 2007). LTR-içeren retroelementler, bitki genomlarında, LTR-içermeyen retroelementlere göre daha baskın olarak bulunurlar. Birkaç yüz bç ile bazı durumlarda 22 Kb uzunluğunda bulunabilirler (Neumann ve diğ., 2003). LTR- elementlerinin, bitki genom büyüklüklerinin, yakın türler arasında büyük farklılık göstermesinin nedeni olduğu düşünülmektedir. Genomda yüksek kopya sayılarına ulaşarak, bitki genom büyüklüğünün artmasına yol açarlar (Vitte ve Panaud, 2005). LTR dizileri, “5’ TG...CA 3” şeklinde yapı gösterirler ve *Tos17*’deki gibi (Hirochika ve diğ., 1992) yaklaşık 100 bç uzunluğunda veya *Sukkula*’daki gibi (Shirasu ve diğ., 2000) 5 Kb’den daha uzun olabilirler (Schulman ve diğ., 2004). LTR-elementleri, kapsid proteinini, aspartik proteinaz enzimini, ters transkriptaz enzimini, RNaz H enzimini ve integras enzimi kodlayan genleri içerirler (Wicker ve diğ., 2007). Tahıllardaki retrotranspozon transkriptleri, EST veritabanlarının yaklaşık %0.1’ini oluştururlar (Echenique ve diğ., 2002). Dizi analizi yapılan ilk retrotranspozon, 12088 bç uzunluğundaki *BARE-1* “Barley Retroelement 1” elementidir (GenBank No: Z17327). Arpa genomunun %3’ünü oluşturan *BARE-1* elementi, genomda 14000 kopya sayısı ile tüm kromozomlara dağılmış halde bulunur (Manninen ve Schulman, 1993). Kuraklık ve sıcaklık stresinin *BARE-1* kopya sayısını arttırdığı gözlenmiştir (Kalendar ve diğ., 2000).

Stres koşulları ve doku kültürünün, retrotranspozonları aktifleştirdiği düşünülmekte olup (Wessler, 1996; Grandbastien, 1998); bu ilişki mısır (Peschke ve diğ., 1987), pirinç (Hirochika ve diğ., 1996) ve tütünde (Hirochika, 1993; Takeda ve diğ., 1998) ayrıntılı biçimde araştırılmıştır. Peschke ve diğ. (1987), eksplant kaynağında aktif *Ac* elementi olmamasına karşın, doku kültüründe rejenere edilen mısır bitkilerinde aktif *Ac* elementinin varlığını saptamışlar ve transpozon aktivasyonunun doku kültürü kaynaklı genetik varyasyonun nedenlerinden biri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bir retrotranspozonun, bitki doku kültüründe aktifleştiği ilk kez Hirochika (1993) tarafından gösterilmiştir. *Tto1*, *Tto2*, *Tnt1* elementlerinin kopya sayılarının, farklı varyeteler arasında değişmediğini ancak protoplast oluşumunun kopya sayısını arttırdığını belirtilmiştir. Hirochika ve diğ., (1996), sessiz elementlerin, doku kültürü koşullarında

aktif hale geçtiğini ve kopya sayısının kültür süresi ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir.

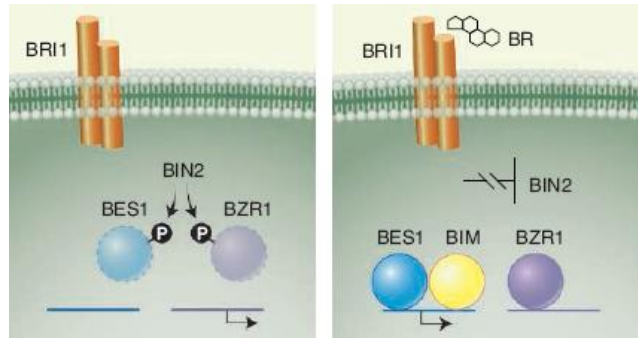
Retrotranspozonların, genomda yüksek kopya sayılarına ulaşabilme; kromozomlara dağılmış halde bulunma ve tür içi ve türler arası polimorfizm gösterme gibi özelliklerinden dolayı markır olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Kumar ve diğ., 1997). Retrotranspozonlar, pek çok farklı bitki türünde genetik çeşitliliğin araştırılmasında ve haritalama çalışmalarında kullanılmıştır (Purugganan ve Wessler, 1995; Kalendar ve diğ., 1999). *Tnd-1* elementinin kara kök “black root” hastalığına karşı dayanıklılık sağlayan gen ile bağlantılı olduğu da gösterilmiştir (Kenward ve diğ., 1999).

2. 4. BRASSİNOSTEROİDLER

Bitkiler, steroid hormonlar aracılığıyla, bazı genlerin anlatımlarını değiştirerek gelişimlerini düzenlerler. Ancak, bitkilerdeki steroid sinyali algılama ve yanıt verme mekanizmaları hayvanlardakinden farklıdır. Hayvanlarda, steroid hormona bağlanan nuklear reseptör, nukleusa geçerek gen anlatımını doğrudan düzenler. Bitkilerde ise steroid hormon öncelikle hücre yüzeyindeki bir reseptöre bağlanır ve düzenleyici proteinlerin defosforilasyonunu kapsayan basamaklar ile sinyal iletilir (Sablowski ve Harberd, 2005). Kolza (*Brassica napus*) polenlerinden saflaştırılan Brassinolid (BL), bilinen ilk bitki steroid hormonudur (Grove ve diğ., 1979). Pek çok bitkide bulunan BL analogları Brassinosteroid (BR) olarak isimlendirilmiştir. Bitki tarafından sentezlenen, sentezlendiği organdan diğer organlara taşınabilen ve çok az miktarlarda bile bitkide fizyolojik yanıt oluşturabilen maddeler hormon olarak isimlendirilmektedir (Salisbury ve Ross, 1991). BR'nin özellikle yapraklarda oldukça düşük miktarda ($0.01-0.1 \text{ ng g}^{-1}$) bulunması (Takatsuto, 1994) köklere uygulanan Brassinolidin hipokotili de etkilemesi (Takatsuto ve diğ., 1983), hormon olarak kabul edilmesine dayanak oluşturmaktadır. Dokudan dokuya farklılık göstermesine karşın genç dokular genellikle daha fazla BR içerir (Yokota ve Takahashi, 1986). $1-100 \text{ ng g}^{-1}$ miktarla polen başlıca BR kaynağıdır (Takatsuto, 1994).

BR; hücre genişlemesi, tohum çimlenmesi ve iletim dokusu gelişimi gibi pek çok sürecin kontrolünü sağlar (Wang ve He, 2004). Hücre çeperine esneklik kazandırarak,

hücre uzamasını uyarırlar. BR üretmeyen ve BR'e duyarsız mutantlar, tohum çimlenmesinde gerileme, cücelik, koyu yeşil renkli yaprak oluşumu ve deetiolyon gibi fenotipik özellikler gösterirler (Bishop ve Koncz, 2002). Brassinazole (BZR) gibi BR biyosentezinin inhibitörleri de benzer fenotip oluşturur (Asami ve diğ., 2000). BR biyosentez enzimlerinin ve BR reseptörünün aşırı anlatımı ise bitki büyümesinde ve hücre uzamasında artışa neden olur (Choe ve diğ., 2001). BR üretmeyen mutantlarda, dışardan BR verilmesiyle fenotip değiştirilebilir (Altmann, 1999). BR, hücre çeperinin dışına uzanan, lösince zengin tekrar "Leucine rich repeat" (LRR) yapısı içeren bir reseptör kinaz olan BRI1 "BR insensitive" tarafından algılanır (Şekil 2. 1). Yanıt olarak BRI1, BIN2 "BR insensitive" proteinini inhibe eder. BIN2, BES1 "BRI1-EMS suppressor" ve BZR1 "Brassinazole resistant" nuklear proteinlere fosfat grubu ekleyerek parçalanmalarına neden olan bir proteindir. BIN2'nin inhibe olması BES1 ve BZR1 proteinlerinin nukleusta birikmesine yol açar. Böylece, BES1, hücre duvarını parçalayarak, hücre genişlemesini sağlayan enzimleri kodlayan genleri uyarır; BZR1 ise BR biyosentezinde iş gören *CPD* "Constitutive photomorphogenesis and dwarfism" ve *DWF4* "Dwarf" genlerinin anlatımını baskılar. Yapılan çalışmalar BES1 ve BZR1 proteinlerinin transkripsiyon faktörleri olduğunu ortaya koymuştur. He ve diğ. (2005) BZR1'in *CPD* genindeki belirli dizilere bağlandığını ve transkripsiyonu baskıladığını; Yin ve diğ. (2005) ise BES1'in, DNA'ya bağlanma özelliği olan BIM "BES1 interacting MYC-like protein" proteini ile genlerin anlatımını uyardığını göstermişlerdir.



Şekil 2. 1. Bitkilerde steroid sinyal iletimi. Solda, BIN2, steroid yokluğunda, BES1 ve BZR1 proteinlerine fosfat grupları ekleyerek parçalanmalarına yol açar. Böylece, BES1 tarafından anlatımı uyarılan genler sessiz kalırken; BZR1 tarafından baskılanan genler anlatım yapmaya devam eder. Sağda, BR'nin hücre yüzeyindeki reseptörüne (BRI1) bağlanması BIN2'yi inhibe eder. Böylece BZR1 hedef genlerine doğrudan bağlanarak baskılar, BES1 ise ikici bir protein (BIM) ile hedef genlerine bağlanarak uyarır (Sablowski ve Harberd, 2005).

BR uygulamasının, bitki büyümesini (Sakurai ve Fujioka, 1993) ve tohum çimlenmesini (Sasse ve diğ., 1995; Jones-Held ve diğ., 1996; Leubner-Metzger, 2001; Steber ve McCourt, 2001; Hayat ve Ahmad, 2003) uyardığı, nitrat redüktaz gibi enzimlerin aktivitesini arttırdığı (Hayat ve Ahmad, 2003) ve hücre duvarının esnekliğini artırarak, hücre uzamasına yol açtığı (Bajguz, 2000); kök uzamasını uyardığı (Kartal ve diğ., 2009) anlaşılmıştır. BR'nin bitkilerde düşük (Dhaubhadel ve diğ., 1999) ve yüksek sıcaklıklara (Dhaubhadel ve diğ., 2002); ağır metallere (Bajguz, 2000; Hayat ve diğ., 2007; Ali ve diğ., 2008), tuzluluğa (Anuradha ve Rao, 2001; Özdemir ve diğ., 2004; Anuradha ve Rao, 2007; Hayat ve diğ., 2010) dayanıklılığı arttırdığı gösterilmiştir. BR'nin, doku kültürlerindeki etkileri ise protoplastlardaki hücre bölünmesini artırma (Nakajima ve diğ., 1996; Oh ve Clouse, 1998); süspansiyon kültürlerinde hücrelerin genişlemesini sağlama (Bellincampi ve Morpurgo, 1988); somatik embriyogenezi (Azpeitia ve diğ., 2003; Aydın ve diğ., 2006) ve sürgün rejenerasyonunu (Sasaki, 2002; Lu ve diğ., 2003; Nunez ve diğ., 2004) uyarma şeklindedir. BR'nin, bitki gelişimi ve stres koşullarına etkilerinin incelendiği çalışmalarda, protein miktarı (Vardhini ve Rao, 1998; Anuradha ve Rao, 2001; Kartal ve diğ., 2009); DNA ve RNA miktarı (Vardhini ve Rao, 1998; Anuradha ve Rao, 2001); karbohidrat miktarı (Vardhini ve Rao, 1998); antioksidan enzim aktivitesi (Ali ve diğ., 2008; Kartal ve diğ., 2009; Yuan ve diğ., 2010) gibi özellikler araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında; kallus gelişimi sırasında meydana gelebilecek varyasyonları ve Homobrassinolid uygulamasının, kallus gelişimine, rejenerasyona ve kültürde meydana gelen varyasyonlara etkilerini araştırmak amaçlandı.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden sağlanan arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160) tohumları kullanıldı.

3. 1. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

3. 1. 1. Besiyeri Hazırlanması

Olgun embriyolardan kallus eldesi için 4 mg l⁻¹ Dicamba (yapay bir oksin) içeren Murashige ve Skoog (MS) besiyeri kullanıldı. Bunun için 4.33 g l⁻¹ olacak şekilde MS besiyeri (Murashige ve Skoog, 1962) makro- ve mikro-nutrientleri içeren tuz karışımı (Sigma, M5524) ve 30 g l⁻¹ olacak şekilde sukroz distile suda çözüldü. Besiyerinin pH'ı 1N NaOH ile 5.7'ye ayarlandı. Distile su ile 250 ml'ye (son hacim) tamamlanan besiyerine 9 g l⁻¹ olacak şekilde katılaştırıcı madde (Agar, Sigma, A7002) eklendi. Hazırlanan besiyeri otoklavda (121 °C, 1.2 atmosfer basıncı, 15 dakika) steril edildi. Oda sıcaklığına getirilen besiyerine son konsantrasyonu 1× olacak şekilde 1000× MS vitamini (Sigma, M3900) ve 4 mg l⁻¹ (18 µM) olacak şekilde 1 mg ml⁻¹ (4.52 mM) Dicamba çözeltisi eklendi ve 9 cm çapındaki steril petrilere 25 ml besiyeri dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Dicamba çözeltisi hazırlamak için 10 mg Dicamba (Sigma, D5417), 10 ml distile suda çözüldü ve 0.20 µm por açıklığına sahip filtre (Sartorius, 16534) ile steril edildi. Dicamba çözeltisi kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Steril besiyerine bitki büyüme düzenleyicisi ve vitamin eklenmesi ve besiyerinin petrilere dökülmesi aşamaları dikey hava akışlı kabinde (Nüve) gerçekleştirildi. Tüm doku kültürü çalışmalarından önce, dikey hava akışlı kabinin iç yüzeyleri %70 etanol ile silindi.

3. 1. 2. Kallus Kùltürlerinin Kurulması

Arpa (*Hordeum vulgare* cv. Zafer-160) tohumları yüzey sterilizasyonu amacıyla, steril beher içerisinde, %20'lik ticari çamaşır suyunda 15 dakika bekletildi. Steril distile su ile yıkanan tohumlar, şişmeleri için steril distile suda 30 dakika bekletildi ve steril bistüri ile embriyoları çıkarıldı. Embriyolar saf alkolde 30 saniye bekletildikten sonra steril distile suyla 3 kere durulandı. Steril kaba filtre kağıdının üzerinde kurutulan embriyolar, 4 mg l⁻¹ dicamba içeren katı MS besiyerlerine, her bir petride 12 embriyo olacak şekilde ekildi. Embriyolar, bitki büyütme kabininde (25⁰C, %40 nem, 16/8 ışık periyodu, Angelantoni) kültüre alındı. Tüm doku kültürü aşamaları dikey hava akışlı kabinde gerçekleştirildi.

Kallus kültürlerinin analizinde kontrol dokusu olarak 4-günlük arpa fideleri kullanıldı. Arpa tohumları, cam petri içinde, distile su ile nemlendirilmiş kaba filtre kağıdının üzerinde, karanlıkta 4 gün boyunca çimlendirildi.

3. 1. 3. Homobrassinolid Uygulaması

Otuz günlük kalluslar, 2 farklı konsantrasyonda (0.5 ve 1 µM) Homobrassinolid (HBL) içeren besiyerlerinde 1 ay boyunca kültürlendi. Altı cm çapındaki petrilere, 10 ml, hormon içermeyen, agarlı MS besiyeri döküldü. Katılaştıran besiyerinin üzerine, uygun boyutlarda kesilmiş, steril filtre kağıdı yerleştirildi. Filtre kağıdının tam ortasına son konsantrasyonu 0.5 ve 1 µM olacak şekilde HBL çözeltisi (1 mM) eklendi. HBL çözeltisi hazırlamak için; 1 mg HBL (22(S),23(S)-Homobrassinolide, H1267, Sigma) 2 ml saf etanolde çözüldü. HBL çözeltisi kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Kalluslar filtre kağıdının ortasına, birbirlerine temas edecek şekilde yerleştirildi. HBL uygulanan kallusların analizinde kontrol grubunu elde etmek için, filtre kağıdının ortasına saf etanol (10 µl) damlatıldı. Kalluslar, HBL uygulamasının 0. 7. ve 14. günlerinde steril petri içinde tartıldı. Tüm HBL uygulama çalışmaları dikey hava akışlı kabinde gerçekleştirildi.

3. 1. 4. Rejenerasyon

Otuz-günlük kalluslar, rejenerasyon için 0.5 mg l⁻¹ trans-zeatin ribosid (tZR) içeren MS besiyerinde 1 ay boyunca tutulduktan sonra, kök gelişiminin sağlanması için hormon

içermeyen MS besiyerine aktarıldı. HBL'nin rejenerasyona etkilerini araştırmak için kallusların bir kısmı HBL içeren ve kontrol besiyerinde 1 ay tutulduktan sonra, hormon içermeyen MS besiyerine aktarıldı. tZR stok çözeltisi (1 mg ml^{-1}) hazırlamak için, 5 mg tZR (tZR, Z3541, Sigma), 5 ml 1N NaOH içinde çözüldü ve $0.20 \text{ } \mu\text{m}$ por açıklığına sahip filtre ile steril edildi. tZR çözeltisi kullanılmaya kadar -20°C 'de saklandı.

3. 2. FİZYOLOJİK ANALİZLER

3. 2. 1. Ekstre Hazırlanması

Kontrol, $0.5 \text{ } \mu\text{M}$ ve $1 \text{ } \mu\text{M}$ HBL uygulanmış kalluslardan, total protein, DNA miktarlarının ve SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmak üzere ekstre hazırlandı. Kallus dokusu, 100 mg taze doku için $250 \text{ } \mu\text{l}$ olacak miktarda soğuk fosfat tamponu (0.1 M , pH 7.0) yardımıyla, soğuk porselen havan ve havaneli kullanılarak parçalandı. Oluşan homojenatın yarısı DNA miktarının belirlenmesinde kullanılmak üzere buzda tutulurken; geriye kalan yarısı, buzda soğutulmuş 1.5 ml 'lik tüplere aktarıldı ve 14000 rpm hızda, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan üst sıvı, pipet yardımıyla yeni bir tüpe aktarıldı. Tüpün dibinde kalan çökeltinin üzerine eşit hacim fosfat tamponu eklenip, karıştırıldıktan sonra, tüp aynı koşullarda santrifüj edildi. Santrifüj aşamaları sonucu oluşan üst sıvılar birleştirilerek; total protein miktarının ve SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaya kadar, donmayacak şekilde buzda saklandı. Fosfat tamponu hazırlamak için, 39 ml 0.2 M monobazik sodyum fosfat (Sodyum dihidrojenfosfat, NaH_2PO_4) çözeltisine, 61 ml 0.2 M dibazik sodyum fosfat (Disodyum hidrojenfosfat, Na_2HPO_4) eklendi ve oluşan karışımın pH değeri ölçüldü. Uygun pH (7.0) değeri elde edilene kadar karışıma NaH_2PO_4 eklendi.

3. 2. 2. Çözünabilir Protein Miktarının Belirlenmesi

Otuz-günlük kallus, kontrol, $0.5 \text{ } \mu\text{M}$ ve $1 \text{ } \mu\text{M}$ HBL uygulanmış kalluslardaki çözünabilir protein içeriğinin belirlenmesinde Lowry ve diğ. (1951) yöntemi kullanıldı. Örneklerdeki total protein miktarını belirlemek için; bir kat sulandırılmış ekstre örneğinden $100 \text{ } \mu\text{l}$ alınarak, $100 \text{ } \mu\text{l}$ 2 N NaOH ile karıştırılıp, kaynayan su banyosunda 10 dakika bekletildi. Oda sıcaklığına getirilen örneğe 1 ml taze hazırlanmış kompleks

oluşturma reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda, örneğe 100 µl, bir kat sulandırılmış Folin belirteci (31740, Molychem) eklenip hızlıca mikrotüp karıştırıcı ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika bekletilen örneğin 660 nm dalga boyundaki absorbanı (A_{660}) ölçüldü (µquant, Bio-Tek Instruments, Inc.). Standart protein çözeltilerinin (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.625, 1 mg ml⁻¹) absorban değerlerinden yararlanılarak, Microsoft Excel programında standart grafik çizildi. Standard grafiğe özgü kesme noktası “y-intercept” ve eğim “Slope” gibi değerler, Microsoft Excel programındaki “KESMENOKTASI” ve “EĞİM” işlevleri ile hesaplandı. Bu değerler ve örneğin 660 nm dalga boyundaki absorbanı aşağıdaki formülde kullanılarak, her örnekteki protein konsantrasyonu (mg ml⁻¹) hesaplandı.

$$\text{Konsantrasyon} = (A_{660} - \text{kesme noktası}) / \text{eğim}$$

Her örnekte 2 kere ölçüm yapıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Örneğin protein miktarını (mg g⁻¹) belirlemek için, aşağıdaki formül kullanıldı.

$$[\text{Ekstrenin protein Konsantrasyonu (mg ml}^{-1}\text{)} \times \text{Ekstre hazırlanmasında kullanılan tamponun hacmi (ml)}] / \text{Ekstre hazırlanan materyalin ağırlığı (g)} = \text{Örneğin protein miktarı (mg g}^{-1}\text{)}$$

Sığır serum albumini (A9418, Sigma) “Bovine serum albumin” (BSA) steril distile su ile çözümlenerek, standart protein çözeltileri hazırlandı. Kompleks oluşturma reaktifi hazırlamak için, 100 hacim %2 w/v sodyum karbonat (Na₂CO₃), 1 hacim %1 w/v bakır sülfat (CuSO₄·5H₂O) ve 1 hacim %2 w/v potasyum sodyum tartarat (KNaC₄H₄O₆) çözeltileri, kullanımdan hemen önce karıştırıldı.

3. 2. 3. DNA Miktarının Belirlenmesi

Otuz-günlük kallus, kontrol, 0.5 µM ve 1 µM HBL uygulanmış kalluslardaki DNA miktarı Kumar ve Garg (2005) yöntemine göre belirlendi. Asetik asit ve sülfürik asit, DNA molekülündeki fosfodiester bağlarını ve glikozidik bağları parçalarlar. Ortamdaki serbest deoksiriboz, dehidrasyon reaksiyonu geçirerek “ω-hydroxyl levulinyl aldehyde” oluşturur ve bu aldehidin, difenilamin ile etkileşmesi sonucu, 595 nm dalga boyunda maksimum absorban yapan mavi renkli bir kompleks meydana gelir (Nigam ve Ayyagari, 2007). Mavi rengin koyuluğu, örnekteki deoksiriboz içeriği ile doğru

orantılıdır. Santrifüj edilmemiş homojenattan 100 µl alınarak üzerine 100 µl %5 v/v perklorik asit eklenip, 70°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Oda sıcaklığına getirilen örneğin üzerine taze hazırlanmış 400 µl difenilamin belirteci eklenip, karıştırıldı. Kaynayan su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirilen örneğin 595 nm dalga boyundaki absorbansı (A_{595}) ölçüldü (μ quant, Bio-Tek Instruments, Inc.). Standart DNA çözeltilerinin (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5 mg ml⁻¹) absorbans değerlerinden yararlanılarak, Microsoft Excel programında standard grafik çizildi. Standard grafiğe özgü kesme noktası “y-intercept” ve eğim “Slope” gibi değerler, Microsoft Excel programındaki “KESMENOKTASI” ve “EĞİM” işlevleri ile hesaplandı. Bu değerler ve örneğin 595 nm dalga boyundaki absorbansı 3. 2. 2’de gösterilen formül ile birlikte kullanılarak, ekstrenin DNA konsantrasyonu (mg ml⁻¹) hesaplandı.

$$\text{Konsantrasyon}=(A_{595}\text{-kesme noktası})/\text{eğim}$$

Her örnekte 2 kere ölçüm yapıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Örneğin DNA miktarını (mg g⁻¹) belirlemek için, aşağıdaki formül kullanıldı.

$$[\text{Ekstrenin DNA Konsantrasyonu (mg ml}^{-1}\text{) x Ekstre hazırlanmasında kullanılan tamponun hacmi (ml)] / \text{Ekstre hazırlanan materyalin ağırlığı (g)} = \text{Örneğin DNA miktarı (mg g}^{-1}\text{)}$$

Standard DNA çözeltilerini hazırlamak için, ringa balığına “Herring” ait, düşük moleküler ağırlıklı DNA (K1089, Fluka AG) kullanıldı. DNA, 70°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilerek, steril distile su içinde çözüldü. Difetilamin çözeltisi hazırlamak için, 0.25 g difetilamin (443654, Carlo Erba) 25 ml asetik asit içinde çözüldü ve üzerine 687 µl konsantre sülfürik asit eklendi.

3. 2. 4. SOD Aktivitesinin Belirlenmesi

Otuz-günlük kallus, kontrol, 0.5 µM ve 1 µM HBL uygulanmış kalluslardaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sairam ve diğ. (2002) yöntemine göre fotokimyasal olarak belirlendi. Bu yöntemde göre riboflavin ve L-metionin ışık varlığında süperoksit (O_2^-) oluştururlar. Nitroblue tetrazolium (NBT), O_2^- ile reaksiyona girerek mavi renkli formazon kristalleri oluşturur. Ekstrede bulunan ve antioksidant enzimlerden biri olan

süperoksit dismutaz, O_2^- radikallerini ortamdan uzaklaştırarak formazon oluşumunu inhibe eder. SOD aktivitesi, NBT'den formazon oluşumunun inhibisyonu ile belirlenir. Diğer bir deyişle, ışık etkisiyle mavi-mor renk oluşumu, SOD enziminin aktivitesi ile ters orantılıdır. SOD aktivitesinin belirlenmesi için, 5 kat sulandırılmış 2 μ l ekstre, 1 ml substrat tamponu (Tablo 3. 1) ile karıştırılıp üzerine son konsantrasyonu 2 μ M olacak şekilde riboflavin (0.2 mM) eklendikten sonra 30 dakika süreyle 15 W'lık floresan ışık altında bekletildi. Sürenin sonunda örneklerin üzeri, karanlık ortamın sağlanması için alüminyum folyo ile kapatıldı ve örneklerin 560 nm dalga boyundaki absorbansı (A_{560}) ölçüldü (μ quant, Bio-Tek Instruments, Inc.).

Tablo 3. 1. SOD miktarının belirlenmesinde kullanılan substratın içeriği

Bileşen	Stok	Final	Hacim
Distile su	-	-	421,6
Fosfat tamponu	100 mM	50 mM	500 μ l
Sodyum karbonat	2 M	50 mM	25 μ l
EDTA	500 mM	100 μ M	0.2 μ l
L-Metionin	300 mM	13 mM	43.2 μ l
NBT	7.5 mM	75 μ M	10 μ l
Toplam	-	-	1000 μ l

Negatif kontrolü oluşturacak örneğe, ekstre yerine 2 μ l 100 mM fosfat tamponu (pH 7.0) eklendi ve 30 dakika boyunca karanlıkta tutuldu ve kör örnek "Blank" olarak isimlendirildi. Pozitif kontrolü oluşturacak örneğe, ekstre yerine 2 μ l 100 mM fosfat tamponu (pH 7.0) eklendi. Pozitif kontrol, SOD içermediği için inhibe olmamış reaksiyon olarak kabul edildi ve reaksiyon değeri 100 olarak alındı. Örneğin A_{560} değerinden, kör örneğin absorbansı çıkarıldıktan sonra kalan değer, aşağıdaki formülde yerine konarak, örnekteki % inhibisyon değeri hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Örnek } A_{560} - \text{Blank } A_{560}) \times 100}{(\text{Pozitif kontrol } A_{560} - \text{Blank } A_{560})}$$

NBT'den formazon oluşumu reaksiyonunu %50 oranında inhibe eden SOD miktarı 1 U (Ünite) olarak kabul edilir. Buna göre, örneklerdeki SOD aktivitesini (U/μ g protein.min⁻¹) hesaplamak için, örneğin % inhibisyon değerine göre hesaplanan SOD miktarı (U), kullanılan ekstredeki protein miktarına (μ g) ve süreye (30 dak) bölündü.

3. 2. 5. Fizyolojik Verilerin Değerlendirilmesi

Çözünebilir protein ve DNA miktarının ve SOD aktivitesinin hesaplanmasında; deneyler aynı koşullarda, farklı örnekler kullanılarak 3 tekrarlı “Number of observations” (Ölçüm sayısı, n) olarak gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları “Arithmetic mean” (μ) ve standart sapmaları “Standard deviation” (SD), Microsoft Excel programındaki sırasıyla “ORTALAMA” ve “STDSAPMA” işlevleri ile; standart hataları “Standard error” (SE) ve % değişim katsayıları “Coefficient of variation” (CV) ise aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$SE = SD / (n^{1/2})$$

$$\% CV = (SD / \mu) \times 100$$

Farklı gruplar arasındaki verilerin istatistik açısından önemi, Microsoft Excel programındaki “TTEST” işlevi kullanılarak değerlendirildi. TTEST işlevi, $p \leq 0.05$ anlamlılık düzeyinde, iki-kuyruklu “Two-tailed” ve tip 3 “Type 3” olarak gerçekleştirildi. Fizyolojik parametreler arasındaki, HBL uygulaması etkisindeki ilişkiyi gösteren korelasyon katsayısı “Correlation coefficient” Microsoft Excel programındaki “KORELASYON” işlevi kullanılarak hesaplandı. Korelasyon katsayısı (r) değeri “0-0.250” olan parametreler bağımsız, ilişkisiz, “0.250-0.500” olan parametreler az ilişkili, “0.500-0.750” olan parametreler orta derecede ilişkili, “0.750-1” olan parametreler yüksek derecede ilişkili olarak yorumlandı. r değeri 0’dan küçük olan parametreler negatif korelasyon “Negative correlation”; 0’dan büyük olan parametreler pozitif korelasyon “Positive correlation” göstermektedir.

3. 3. MOLEKÜLER MARKIR ANALİZLERİ

3. 3. 1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA (gDNA) izolasyonu için Kidwell ve Osborn (1992) yöntemi değiştirilerek kullanıldı. DNA izolasyonu yapılacak doku, sıvı azot yardımıyla, porselen havan ve porselen havaneli kullanılarak parçalanıp, toz haline getirildi. Sıvı azotun içinde soğutulmuş 1.5 ml’lik tüpe aktarılan tozun üzerine, 50 mg doku için, 65°C’ye kadar ısıtılmış, 500 μ l ekstraksiyon tamponu (Tablo 3. 2) eklenip, karıştırıldı. Tüp, 60°C’lik su banyosunda en az 1 saat bekletildi. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra

buzda 5 dakika tutulan tüpe, eşit hacimde (yaklaşık 500 µl) kloroform:izoamil alkol eklendi. Tüp, en az 50 defa tersyüz edildikten sonra, 2000 rpm hızda, oda sıcaklığında, 20 dakika santrifüj edildi (WiseSpin CF-10, Daihan). Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı (yaklaşık 500 µl) yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı, üzerine 0.1 hacim (50 µl) CTAB/NaCl çözeltisi eklenip, bir kaç defa tersyüz edilen tüpler, 60°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkarılan tüp, buzda 5 dakika bekletildikten sonra, tüpün içine eşit hacim (yaklaşık 550 µl) kloroform:izoamil alkol eklendi. Tüp, 30 defa tersyüz edildikten sonra, 2000 rpm hızda, oda sıcaklığında, 20 dakika santrifüj edildi (WiseSpin CF-10, Daihan). Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı (yaklaşık 550 µl) yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı, tüpteki üst sıvının üzerine eşit hacim izopropanol (-20°C) eklendikten sonra, tüp birkaç defa tersyüz edildi ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Bekleme aşamasından sonra tüp, 13500 rpm hızda, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Çökeltinin üzerine 100 µl %70 etanol (-20°C) eklenip, 13500 rpm hızda, 2 dakika boyunca santrifüj edilerek çökelti yıkandı. Yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Tüp oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilerek, tüpteki etanol uzaklaştırıldı ve çökelti 50 µl "High-salt" TE tamponu eklenerek çözüldü ve 37°C'de 30 dakika bekletildi. Üzerine 50 kloroform:izoamil alkol eklenen tüp, 10000 rpm hızda, 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Yeni bir tüpe aktarılan üst sıvının üzerine, 100 µl saf etanol (-20°C) eklenip, 70°C'de 30 dakika bekletildikten sonra, 13500 rpm hızda, 10 dakika santrifüj edildi. Çökeltinin üzerine 100 µl EtOH/NH₄Ac eklenip, oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Tüp, 13500 rpm hızda, 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra oluşan üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökeltinin üzerine 100 µl %70 etanol (-20°C) eklenip, 13500 rpm hızda, 2 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra oluşan üst sıvının tamamı uzaklaştırıldı. Tüp, oda sıcaklığında, düzgün ve ağzı açık biçimde bırakılarak, çökeltinin kuruması sağlandı. Kuruyan çökeltinin üzerine 30 µl 10 mM Tris çözeltisi (pH 8.0) eklendi ve tüp, gDNA'nın çözünmesi için 60°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. gDNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3. 2. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
Ekstraksiyon Tamponu	100 mM Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane, 154563, Sigma), 25 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, E5134, Sigma), pH 8.0, 1.4 M NaCl (Sodium chloride, S3014, Sigma), %2 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide, H9151, Sigma)
Kloroform:İzoamil alkol	24 Hacim Kloroform (Chloroform, C7559, Sigma): 1 Hacim İzoamilalkol (Isoamylalcohol, W205702, Sigma)
CTAB/NaCl	% 10 CTAB, 0.7 M NaCl
High-salt TE Tamponu	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 8.0), 1 M NaCl
EtOH/NH ₄ Ac	%76 EtOH, 10 mM NH ₄ Ac (101115, Merck)
%70 EtOH	7 Hacim Etanol, 3 Hacim distile su

Genomik DNA örneklerinin saflığı ve miktarı NanoDrop 2000 (Thermo) cihazında ölçülerek belirlendi. gDNA örneklerinin, 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbansları ($A_{230,260,280}$) ölçüldü. Proteinlerin ve özellikle fenolik maddelerin 230 nm dalga boyunda absorpsiyon yaptığı bilinmektedir. DNA örneklerinin saflığı, OD_{260} değerinin hem OD_{280} değerine oranı hem de OD_{230} değerine oranı gözönüne alınarak belirlendi. Bu oranların 1.7'den düşük oluşu, saflaştırılan DNA örneğindeki fenolik madde ve protein kontaminasyonuna işaret etmektedir. Ve bu durumun, PCR çalışmalarında hatalı sonuç oluşturabileceği düşünülerek; yalnızca, OD_{260}/OD_{280} değeri 1.7-2.0 arasında olan ve OD_{260}/OD_{230} değeri 1.7'den büyük olan gDNA örnekleri kullanıldı. gDNA örneklerinin kalitesi ise agaroz jel elektroforezi (Bölüm 3. 3. 5) ile belirlendi. gDNA örneğinden 1 μ l alınarak, 0.2 μ l yükleme tamponu (Tablo 3. 5) ile karıştırıldı. Örnekler, %0.8'lik agaroz jelde, 80 V sabit güçte, 2 saat boyunca yürütülüp, UV ışık altında görüntülendi. DNA uzunluk markırı ile karşılaştırılarak, 10 Kb veya daha yukarısında kalın, belirgin ve parlak bant görünümü oluşturan gDNA örnekleri, kırılmamış, bütün olarak kabul edildi. Moleküler çalışmalarda kırılmamış gDNA örnekleri kullanıldı. IRAP, restriksiyon kesimi ve MSRF çalışmaları için her gruptan 3 adet gDNA örneği seçildi. Seçilen gDNA örnekleri eşit miktarlarda karıştırılarak "Bulk" oluşturuldu.

3. 3. 2. Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP)

Kontrol gövde dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularından izole edilen gDNA karışımlarında "Bulk" IRAP analizleri gerçekleştirildi. IRAP analizlerinde Saeidi ve diğ. (2008) çalışmasından elde edilen 5 adet 20-33-mer primer (Tablo 3. 3) kullanıldı.

Tablo 3. 3. Çalışmada kullanılan IRAP primerleri

Adı	Dizisi 5'3'
3'LTR →	TGTTTCATGCGACGTTCAACA
5'LTR2 ←	ATCATTCTCTAGGGCATAATTC
LTR6149 ←	CTCGCTCGCCACTACATCAACCGCGTTATT
LTR6150 →	CTGGTTCGGCCATGTCTATGTATCACACATGTA
Sukkula →	GATAGGGTTCGCATCTTGGGCGTGAC

IRAP primer kombinasyonları (Tablo 3. 4) ise Saeidi ve diğ. (2008) çalışmasına göre seçildi. Kombinasyonların bağlanma sıcaklıkları Tablo 3. 4'de gösterilmektedir.

Tablo 3. 4. Çalışmada kullanılan IRAP primer kombinasyonları

Primer 1	Primer 2	Bağlanma sıcaklığı (°C)
3'LTR	3'LTR	64
3'LTR	5'LTR2	66
3'LTR	LTR6150	62
Sukkula	LTR6149	47

IRAP-PCR'da kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları Tablo 3. 5'de gösterilmektedir.

Tablo 3. 5. IRAP-PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları

Bileşen	Stok	Son	Miktar (µl)
Distile su	-	-	12.5
DMSO	% 100	%5	1
Tampon*	10×	1×	2
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	1.6
dNTP karışımı	10 mM	0.1 mM	0.4
Forward primer	10 µM	0.25 µM (5 pmol)	0.5
Reverse primer	10 µM	0.25 µM (5 pmol)	0.5
Taq polimeraz**	1 U/µL	0.5 U (0.025 U/µL)	0.5
Kalıp DNA	20 ng/µL	20 ng gDNA (1 ng/µL)	1
Toplam	-	-	20

*50 mM Tris-HCl, 15 mM (NH₄)₂SO₄ and 0.1 % Triton® X-100, pH 9.0

**DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase, Deneme boyu, Finnzymes

Tablo 3. 5'de gösterilen IRAP-PCR bileşenleri, 0.2 ml'lik PCR tüpünde biraraya getirildikten sonra, PCR cihazına (TC4000, Techne) "Thermal cycler" yerleştirilerek Tablo 3. 6'de belirtilen döngülerden geçirildi.

Tablo 3. 6. IRAP-PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	5d	1
Denatürasyon	94°C	1d	35
Bağlanma	-°C,	1d	
Uzama	72°C	2d	
Son Uzama	72°C	10d	1

d:Dakika, s:Saniye

IRAP çoğaltım ürününün üzerine 4 µL yükleme tamponu eklenip 65°C`de 10 dakika bekletildikten sonra buza alındı. Buzda 5 dakika tutulan çoğaltım ürünleri, %6`lık poliakrilamid jelde, 200 V`ta, 7 saat yürütüldü. Bantların gözlenmesi için gümüş boyama yapıldı.

3. 3. 3. Metillenmeye Duyarlı Restriksiyon Parmakizi (MSRF)

Kontrol gövde dokusu ve 30-günlük kallus dokularından hazırlanan gDNA karışımları “Bulk” ile HBL kontrol ve 0.5 µM HBL uygulanmış kallus gDNA karışımlarında “Bulk” “Methylation Sensitive Restriction Fingerprinting” (MSRF) analizleri gerçekleştirildi. Her dokudan hazırlanan gDNA karışımı 2 gruba ayrıldı. Bir gruba ait DNA örneği sadece *MseI* (Tablo 3. 7) restriksiyon enzimiyle kesilirken, diğer gruba ait DNA örneği hem *MseI* hem de *BstUI* enzimiyle birlikte “Double digest” kesildi. Tekli *MseI* restriksiyon kesimi için, 1 µg gDNA, 2 µl (10×) enzim tamponu “Buffer R” (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA) ve 1 µl (10 U/µl) *MseI* (*TruII*, ER0981, Fermentas) enzimi, 1.5 ml`lik tüpte biraraya getirilip, son hacim steril distile su ile 20 µl`ye tamamlandı. Karışımın üzerine 30 µl steril mineral yağ damlatıldı ve tüpler 65°C`de bir gece boyunca (Yaklaşık 15 saat) inkübe edildi. İkili kesim için, 0.5 µg gDNA, 2 µl (10×) enzim tamponu “Buffer R” ve 2 µl (10 U/µl) *BstUI* (*Bsh1236I*, ER0921, Fermentas) enzimi 1.5 ml`lik tüpte biraraya getirildi, son hacim steril distile su ile 20 µl`ye tamamlandı ve karışım 37°C`de 2 saat boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda buza alınan reaksiyon karışımına 1 µl (10 U/µl) *MseI* enzimi eklendi. Hafifçe karıştırılan ve üzerine 30 µl steril mineral yağ damlatılan tüpler 65°C`de bir gece boyunca (yaklaşık 15 saat) inkübe edildi. *MseI* enziminin, yüksek sıcaklık uygulaması ile inaktive edilemediği üretici firma tarafından belirtildiğinden, kesim ürünleri kit (High Pure PCR Product Purification Kit, 11 732 668 001, Roche)

kullanılarak saflaştırıldı. Kesim ürünlerinin üzerine 250 µl “bağlama tamponu” eklenip, mikrotüp karıştırıcı ile iyice karıştırıldı. Kite bulunan kolona aktarılan karışım, 13500 rpm hızda, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolon, 400 µl “yıkama tamponu” ile 2 kere, 13500 rpm hızda, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Yeni bir 1.5 ml’lik tüpe aktarılan kolona 40 µl “çözme tamponu” eklenip, oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra, 13500 rpm hızda, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüj edilerek, kolondaki DNA örnekleri tüpe aktarıldı.

Tablo 3. 7. MSRF’de kullanılan restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri

<i>MseI</i>	<i>BstUI</i>
5` T/TAA 3`	5` CG/CG 3`
3` AAT/T 5`	3` GC/GC 5`

Saflaştırılan kesim ürünleri MSRF-PCR’da kalıp olarak kullanıldı. MSRF primerlerinin dizi bilgileri (Tablo 3. 8) Davies (2004)’den alındı. PCR’da A1 primeri ile birlikte A2, A3 veya A4 primeri kullanıldı.

Tablo 3. 8. Çalışmada kullanılan MSRF primerleri

Primerin Adı	Dizisi 5’-3’
A1	AGCGGCCGCG
A2	ACCCAGCCG
A3	TGGTCGGCGC
A4	GCACCCGACG

Tablo 3. 9’da gösterilen MSRF-PCR bileşenleri 0.2 ml’lik PCR tüpünde biraraya getirildi.

Tablo 3. 9. MSRF-PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları

Bileşen	Stok	Son	Miktar (µl)
Distile su	-	-	8.2
Dimetilsülfoksit	% 100	% 5	1
Tampon*	5×	1×	4.0
dNTP karışımı	10 mM	0.2 mM	0.4
A1	10 µM	0.4 µM (10 pmol)	0.8
A2/A3/A4	10 µM	0.4 µM (10 pmol)	0.8
Taq polimeraz**	2.5 U µL ⁻¹	1 U (0.02 U µL ⁻¹)	0.8
Kalıp DNA	1 µg/20 µL kesilmiş DNA	4 µl Kesim ürünü (~80 ng)	4
Toplam	-	-	20.0

*10×: 600 mM Tris-SO₄, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 30 % Glycerol, 0.6 % NP-40, 0.5 % Tween-20, 20 mM MgSO₄, pH 9.0

**LongAmp® Taq DNA Polymerase, M0323S, New England Biolabs

Tüp, PCR cihazına (TC4000, Techne) yerleştirilerek Tablo 3. 10'da belirtilen döngülerden geçirildi. MSRF çoğaltım ürününün üzerine 4 µl yükleme tamponu eklenip 65°C`de 10 dakika bekletildikten sonra buza alındı. Buzda 5 dakika tutulan çoğaltım ürünleri, %6 poliakrilamit jelde, 200 V gerilimde, 4 saat boyunca yürütüldü. Bantların gözlenmesi için gümüş boyama yapıldı.

Tablo 3. 10. MSRF-PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	2d	1
Denatürasyon	94°C	1d	35
Bağlanma	38°C	1d	
Uzama	72°C	2d	
Son Uzama	72°C	10d	1

3. 3. 4. Restriksiyon Kesimi

Kontrol gövde dokusu ve 30-günlük kallus dokularından hazırlanan gDNA karışımları "Bulk" ile HBL kontrol ve 0.5 µM HBL uygulanmış kallus gDNA karışımlarında "Bulk", *HpaII* ve *MspI* restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesildi. *HpaII* ve *MspI* izoşizomer çifti olup, her iki enzim de aynı tanıma bölgesine (5` CCGG 3`) özgündür. Ancak, tanıma bölgesindeki sitozin bazlarının metillenme durumuna göre enzimlerin kesim özellikleri değişkenlik gösterir (Tablo 3. 11). Bu durum, farklı DNAlar arasındaki

metillenme düzeylerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Farklı dokular arasındaki metillenme düzeylerini incelemek amacıyla; 1 µg gDNA, 1 µl (10×) enzim tamponu (FastDigest® Buffer) ve 1 µl (1 FDU) *HpaII* (FastDigest® *HpaII*, FD0514, Fermentas) veya *MspI* (FastDigest® *MspI*, FD0544, Fermentas) enzimi 0.5 ml'lik tüpte biraraya getirilip, son hacim steril distile su ile 10 µl'ye tamamlandı. Tüpler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun sonrasında 2 µl yükleme boyası eklenen tüpler, 65°C'de 10 dakika bekletildikten sonra buza alındı. Buzda 5 dakika bekletilen örnekler %1'lik agaroz jelde, 80V'ta, 1 saat boyunca yürütülüp, UV ışık altında görüntülendi.

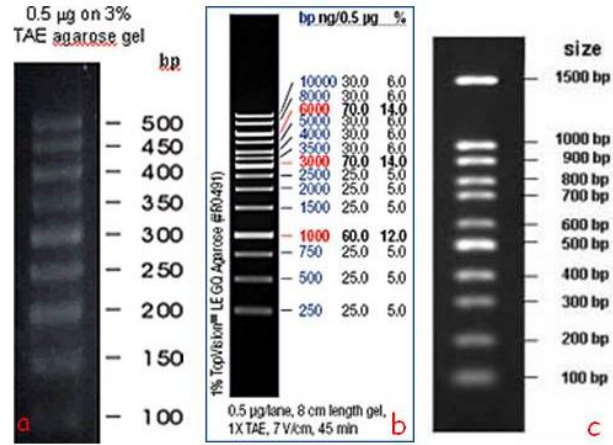
Tablo 3. 11. *HpaII* ve *MspI* enzimlerinin, sitozin metillenmesi durumlarına göre kesim özellikleri

Tanım Bölgesi	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
CC/GG GG/CC	+	+
C _m CGG GGCC	+	+
C _m CGG GG _m CC	-	+
_m CCGG GGCC	+	-
_m CCGG GGC _m C	-	-

_mC: Metilsitozin, +: Aktif (Kesim yapabilir), -: İnaktif (Kesim yapamaz)

3. 3. 5. Agaroz Jel Elektrofrez

gDNA, plazmit, koloni-PCR ve restriksiyon kesimi ürünleri agaroz jel elektrofrez ile görüntülendi. gDNA ve gDNA restriksiyon ürünleri için 0.8 (%1), koloni-PCR ve plazmit restriksiyon ürünleri için 1.2 (%1.5) gram agaroz, stok 50× Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponunun (Tablo 3. 12) sulandırılmasıyla hazırlanan, 80 ml 1× TAE tamponuna eklenerek mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığında ılınan jelle son konsantrasyonu 0.5 ng µl⁻¹ olacak şekilde 4 µl EtBR eklenip, karıştırıldı. Jel, yatay elektrofrez sistemine (EasyCast Mini Gel System, B1, Thermo Scientific Owl) dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Katılaşan agaroz jel, 1× TAE tamponu içeren yatay elektrofrez tankının içine yerleştirildi. Örnekler, uygun miktarda yükleme boyası (Tablo 3. 12) ile karıştırıldıktan sonra, agaroz jeldeki kuyulara yüklenerek, sabit gerilimde, uzunluk markırı ile birlikte (Şekil 3. 1) yürütüldü.



Şekil 3. 1. Çalışmada kullanılan DNA uzunluk markırları. a: 50 bp markır (FALA 50, Favorgen); b: 1 Kb marker (SM0311, Fermentas); c: DNA 100 bp Ladder marker (M1070-1, Biobasic).

Tablo 3. 12. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
50× TAE tamponu	2 M Tris, 1 M asetik asit, 50 mM EDTA, (pH 8.0)
10 mg ml ⁻¹ EtBr	5 mg EtBR, 1 ml distile su içinde
6× Yükleme tamponu	100 mM EDTA (pH 8.0), %1 SDS, %60 gliserol (G5516), %0.03 Bromofenol mavisi (B0126, Sigma), %0.03 Ksilen cyanol (X4126, Sigma)

3. 3. 6. Poliakrilamit Jel Elektroforezi (PAGE)

IRAP ve MSRF reaksiyon ürünleri poliakrilamit jel elektroforezi “Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (PAGE) yöntemiyle yürütülüp, görüntülendi. %6’lık poliakrilamit jel hazırlamak için Tablo 3. 13`de verilen bileşenler, beher içerisinde, tabloda gösterildiği sırayla, hava kabarcığı oluşmayacak biçimde karıştırılıp, temiz bir şırınga ile 20 cm uzunluğa, 20 cm genişliğe sahip PAGE sisteminin (PROTEAN II xi Cell, 20 cm, 0.75 mm spacers, 15-well combs, 165-1814, Bio-Rad) cam kasetine hızlıca döküldü ve sistemde bulunan tarak cam yüzeyler arasına yerleştirildi. Jel, polimerize olması için oda sıcaklığında en az 20 dakika bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra, tarak sistemden çıkarıldı ve oluşan kuyular, 5× Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 1× TBE tamponu ile yıkandı. PCR ürünleri 200 V sabit gerilimde yürütüldükten sonra, jel gümüş boyama yöntemi le boyanarak bantlar görünür hale getirildi. Jel, beyaz ışık kaynağı altında görüntülendi ve incelendi.

Tablo 3. 13. PAGE bileşenleri

Adı	Miktar
Distile su	48 ml
5× TBE (445 mM Tris, 445 mM borik asit, 10 mM EDTA, pH 8.0)	8 ml
% 40 Akrlamid (A8887, Sigma)/Bis (M7279, Sigma) (19:1)	6 ml
%25 APS (0.25 g amonyum persülfat (A3678), 1 ml distile su)	80 µl
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, T8133, Sigma)	40 µl
Toplam	40 ml

3. 3. 7. Gümüş Boyama

Poliakrilamit jelde yürütülen PCR ürünleri gümüş boyama ile görünür hale getirildi. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, sistemden çıkarılan jel plastik bir kaba yerleştirildi ve 30 dakika boyunca fikse edildi. Bir dakika boyunca distile su ile yıkanan jel, boyama çözeltisi içinde 30 dakika boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Distile su ile yıkanan jelin üzerine geliştirme çözeltisi eklendi ve jel bu çözeltinin içinde bantlar tamamen görünür hale gelinceye kadar (yaklaşık 5-8 dakika) tutuldu. Geliştirme çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra jel durdurma çözeltisi içinde 5 dakika bekletilerek, boyama işlemi durduruldu. Jel, bu aşamadan sonra distile su içinde saklanabilir. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler Tablo 3. 14'de gösterilmektedir. Tüm çözeltiler boyamanın yapılacağı gün hazırlanmıştır ve gümüş nitrat ile geliştirme çözeltileri soğutulduktan sonra kullanılmıştır.

Tablo 3. 14. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
Fiksasyon	% 10 etanol, % 0.5 asetik asit, distile su içinde
Boyama	% 1 gümüş nitrat (A3904, Biomatik), distile su içinde
Geliştirme	% 1.5 sodyum hidroksit, %0.01 sodyum borohidrat (S9125, Sigma), % 0.4 formaldehit (F8775, Sigma), distile su içinde
Durdurma	% 0.75 sodyum karbonat (S7795, Sigma), distile su içinde

3. 3. 8. Moleküler Markır Verilerinin Değerlendirilmesi

IRAP ve MSRF çalışmalarının sonucunda, aynı gDNA kalıbında tekrarlanabilen ve belirgin bantlar değerlendirmeye alındı. Bantların boyutları, elektroforezde kullanılan DNA uzunluk markırı ile karşılaştırılarak belirlendi. IRAP analizlerinde elde edilen bantlar, buldukları doku türüne göre (30-günlük kallusa özgü, 15-günlük ve 30-günlük kalluslarda ortak) gruplandı. Belirli bir bantın bulunması (1), bulunmaması (0)

olarak değerlendirilerek ikili “binary” veri matrisi “Binary data matrix” oluşturuldu. Bu matristeki veriler kullanılarak, Jaccard benzerlik katsayısına (Jaccard, 1908) göre “Jaccard similarity coefficient” benzerlik indeksleri “similarity index” hesaplandı. Jaccard benzerlik katsayısının, IRAP gibi dominant markır sistemi için uygun olduğu belirtildiği (http://biolinx.bios.niu.edu/t80maj1/sim_matrix.htm) için, Jaccard benzerlik katsayısı, bu çalışmada tercih edilmiştir.

$$J (\text{Jaccard Benzerlik Katsayısı}) = \frac{M_{11}}{M_{01} + M_{10} + M_{11}}$$

M_{01} : A nesnesinin (doku tipi) 0, B nesnesinin 1 olduğu niteliklerin (bant) sayısı

M_{10} : A nesnesinin 1, B nesnesinin 0 olduğu niteliklerin sayısı

M_{11} : Hem A hem de B nesnesinin 1 olduğu niteliklerin sayısı

IRAP analizlerinde kullanılan her primer kombinasyonunun “Polymorphism Information Content” (PIC) ve “Effective Multiplex Ratio” (EMR) değerleri aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplandı. PIC değeri, moleküler markırların ne kadar kullanışlı olduklarının anlaşılmasında kullanılır (Botstein ve diğ., 1980). PIC değeri, allel sıklıklarının karelerinin, 1’den çıkarılması ile hesaplanır ve markırın popülasyondaki polimorfizm saptama kapasitesini gösterir (Liu ve Cordes, 2004). EMR değeri de PIC değeri gibi markırın değerlendirilmesinde gözönüne alınan bir özelliktir. EMR değeri, bir moleküler markır için polimorfik lokus sayısının, toplam lokus sayısına oranı şeklinde hesaplanır (Nagaraju ve diğ., 2001).

$$PIC = 1 - \sum P_i^2; P_i: i \text{ allelinin sıklığı}$$

$$EMR = n_p(n_p/n); n_p: \text{Polimorfik lokus sayısı}; n: \text{Toplam lokus sayısı.}$$

MSRF analizlerinde elde edilen bantlar Tablo 3. 15’de gösterilen şekilde yorumlandı. HBL uygulanmamış kallus ve 4-günlük-fide kontrol gruplarını, 0.5 μ M HBL uygulanmış kallus ve 30-günlük-kallus deney gruplarını temsil etmektedir. Buna göre, deney grubunun gDNA örneğinin *MseI/BstUI* kesiminde mevcut olan bir bantın, kontrol grubunun *MseI/BstUI* kesiminde bulunmaması, o banta ilişkin genom bölgesinde deney grubu örneklerinde metillenme gerçekleştiğini göstermektedir.

Tablo 3. 15. MSRF sonuçlarının jeldeki görünümü ve yorumları

Görünüm	K/M	K/MB	30(HBL)/M	30(HBL)/MB	Yorum
I	—		—		Metillenme yok, değişim yok
II	—	—	—	—	Metillenme var, değişim yok veya <i>Bst</i> UI dizisi yok
III	—		—	—	Metillenmede artış var
IV	—	—	—		Metillenmede azalma var

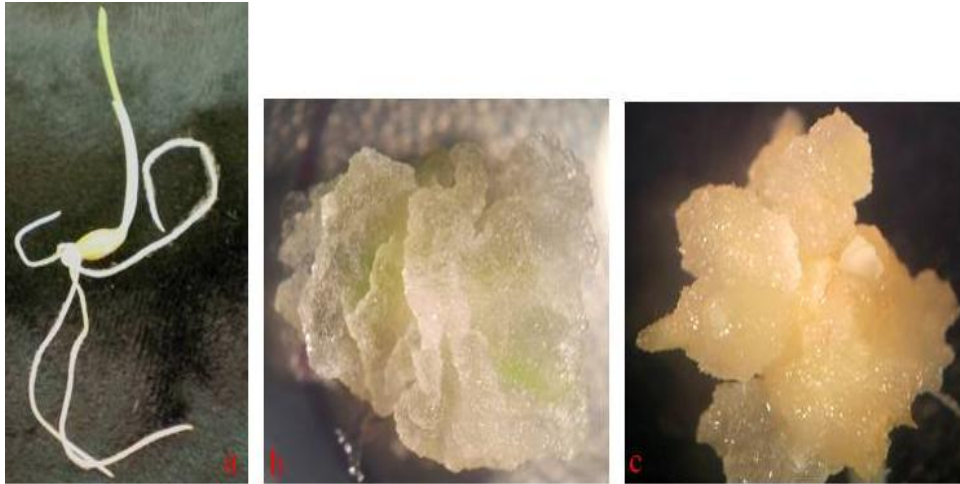
K: Kontrol doku (Gövde dokusu veya BR uygulanmamış kallus), 30: 30-günlük-kallus, BR: 0.5 µM BR uygulanmış kallus, M:

*Mse*I, B: *Bst*UI, —: Bant var.

4. BULGULAR

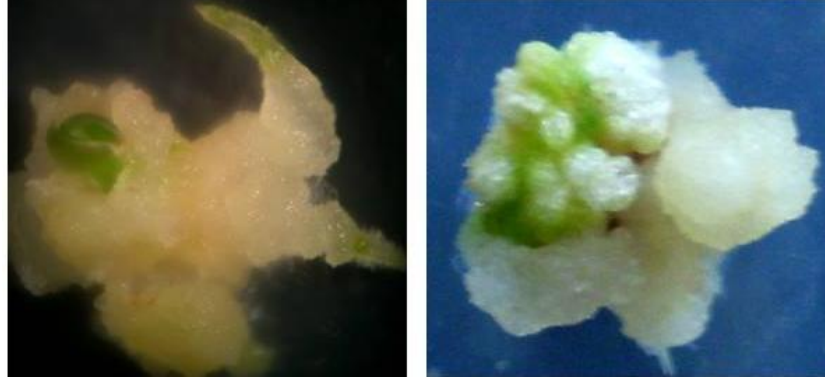
4. 1. KALLUS KÜLTÜRLERİ

Arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160) tohumlarından steril koşullarda çıkarılan olgun embriyolar, 4 mg l⁻¹ (18 µM) Dicamba içeren MS besiyerinde kültüre alındı. Embriyolardan kallus gelişiminin kültürün 4-6. gününde başladığı görüldü. Gelişiminin erken evresinde beyaz renkli, sulu ve yapışkan özellikteki kallusların bir kısmının, 15-16. günden sonra sarımsı, sert ve sıkı bir yapı kazandığı gözlemlendi ve bu özelliklere sahip kalluslar embriyogenik olarak nitelendirildi (Şekil 4. 1b, c). Kallus oluşturma değeri % 67 (±7.79, %20, p>0.05) iken, embriyogenik kallus oluşturma değeri %42 (±0.45, %1.8, p>0.05)'dir. Kallus oluşturma değeri, kallus gelişimi gözlenen embriyo sayısının, toplam embriyo sayısına oranının, 100 ile çarpılması ile hesaplandı. Embriyogenik kallus oluşturma değeri; embriyogenik özelliğe sahip kallus sayısının, toplam embriyo sayısına oranının, 100 ile çarpılması ile hesaplandı. Kallus gelişimi sırasında meydana gelebilecek değişimlerin belirlenmesinde kontrol doku olarak, 2 kat, nemli filtre kağıdının arasında çimlendirilmiş, 4 günlük arpa fideleri (Şekil 4. 1a) kullanıldı.



Şekil 4. 1. Çalışmada kullanılan dokuların görüntüleri. a: 4-günlük fide; b: 15-günlük kallus (10× büyütme); c: 30-günlük kallus (10× büyütme, Leica).

Otuz-günlük kalluslar, rejenerasyon için 0.5 mg l⁻¹ tZR içeren MS besiyerine aktarıldı. Embriyogenik özellikte olmayan kalluslarda hiçbir değişim gözlenmedi. Embriyogenik kallusların % 63'ü (±0.88, %4.07, p>0.05) rejenerasyon besiyerine alındıktan 14-15 gün sonra rejenerasyon belirtileri gösterdi. Rejenerasyon belirtileri, yeşil hücre kümeleri ve yeşil veya renksiz nodular yapılarıdır (Şekil 4. 2).



Şekil 4. 2. İki hafta süreyle rejenerasyon ortamında tutulan kallusların görünümü (10× büyütme, Leica)

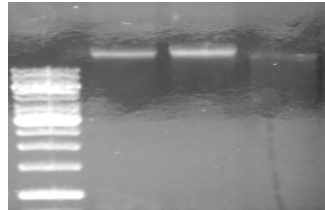
4. 2. SOMAKLONAL VARYASYONUN ARAŞTIRILMASI

Kallus başlangıcı ve gelişimi sırasında meydana gelebilecek somaklonal varyasyonların değerlendirilmesi için, kontrol fide dokuları ile 15- ve 30-günlük kalluslar kullanıldı.

4. 2. 1. Genomik DNA Örneklerinin Elektroforetik Analizi

Kontrol fide dokusundan, 15-günlük ve 30-günlük kalluslardan, BR kontrol kallus dokusundan ve 0.5 µM BR uygulanmış kalluslardan izole edilen genomik DNA (gDNA) örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütülüp, UV ışık altında incelendi (Şekil 4. 3). İzole edilen tüm gDNA örneklerinde, kalın, parlak bir bant oluşumu gözlemlendi.

M K 15 30



Şekil 4. 3. Çalışmada kullanılan genomik DNA karışımlarının agaroz jeldeki görünüşleri. 4: 4-günlük fide dokusu; 15: 15-günlük kallus; 30: 30-günlük kallus.

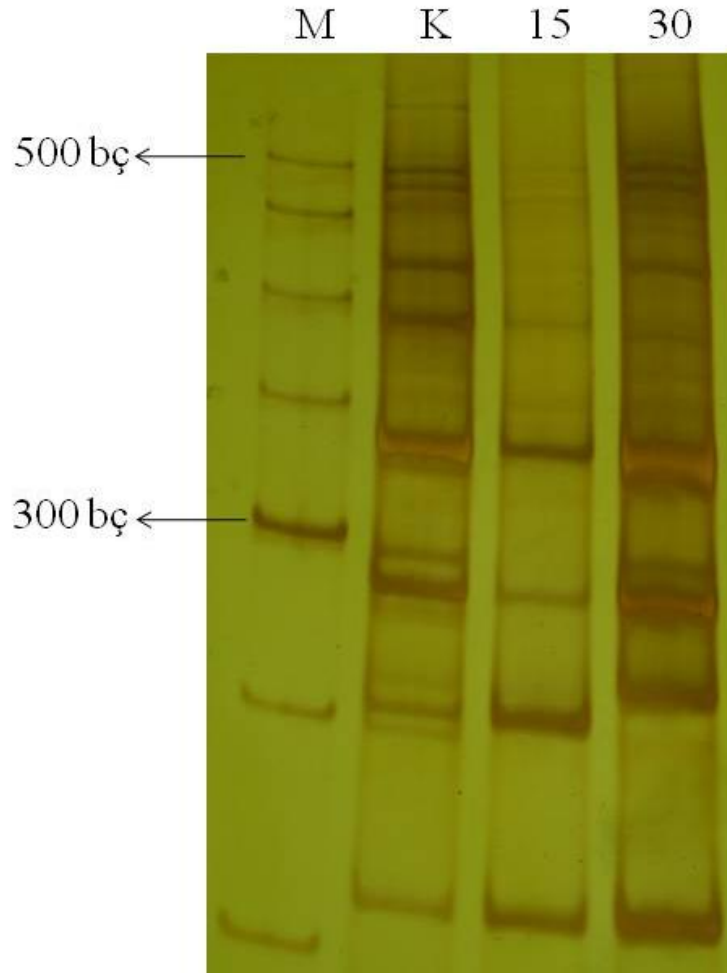
4. 2. 2. Retrotransposon Değişimleri

Kontrol fide dokusu, 15-günlük ve 30-günlük kallus dokuları arasında, doku kültürü koşullarının etkisiyle meydana gelebilecek retrotranspozon değişimleri, hareketleri “Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism” (IRAP) tekniği ile araştırıldı. Dört

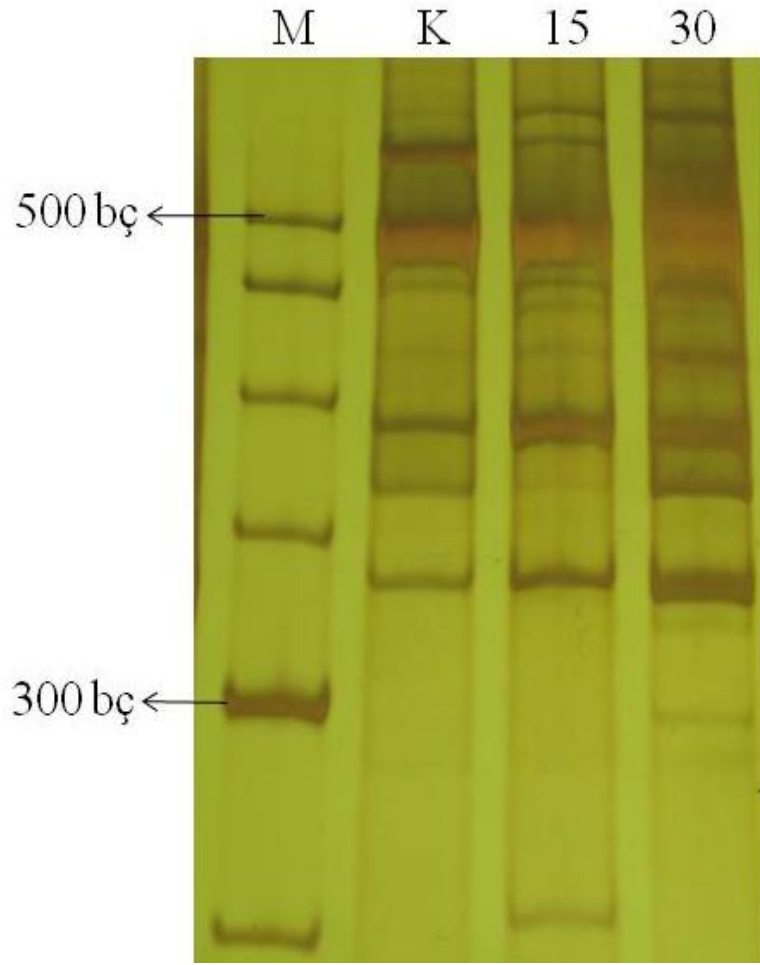
adet primer kombinasyonu ile elde edilen sonuçlara (Tablo 4. 1 ve Şekil 4. 4, Şekil 4. 5, Şekil 4. 6, Şekil 4. 7) göre farklı dokular arasındaki benzerlik oranları hesaplandı. Kontrol fide ile 15-günlük kallus arasındaki benzerlik oranı % 73 iken; kontrol fide ile 30-günlük kallus arasındaki benzerlik oranı % 76, 15-günlük kallus ile 30-günlük kallus arasındaki benzerlik oranı %82'dir. 3'LTR×LTR6150 kombinasyonu en yüksek (0.981, 5.3); LTR6149×Suk kombinasyonu en düşük (0.954, 0.28) PIC ve EMR değerlerini oluşturmuştur.

Tablo 4. 1. Kontrol 4-günlük fide dokusu, 15- ve 30-günlük kallus dokularındaki IRAP sonuçları

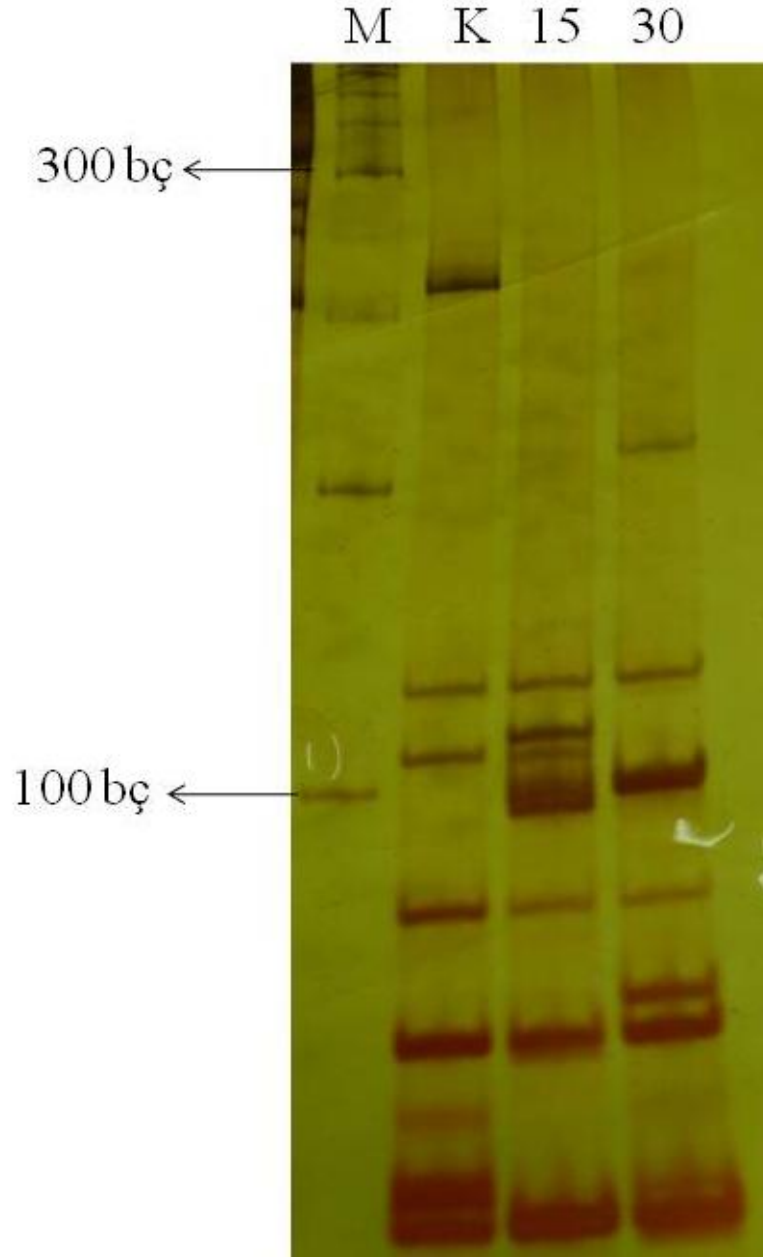
	3'LTR x 3'LTR	3'LTR x 5'LTR	3'LTR x LTR6150	LTR6149 x SUKKULA	Toplam
Kontrol fide	1	2	3	1	7
15-günlük kallus	0	2	2	0	4
30-günlük kallus	0	0	2	0	2
K ile 15-günlük	0	2	1	0	3
K ile 30-günlük	1	2	0	0	3
15- ile 30-günlük	1	0	0	1	2
Ortak	7	4	4	12	27
Toplam	10	12	12	14	48
PIC	0.971	0.977	0.981	0.954	-
EMR	0.9	5.3	5.3	0.28	-
% Polimorfizm	30	66.6	66.6	14.2	43.7
Bant Aralığı (Bç)	210-490	250-700	60-220	120-500	60-700



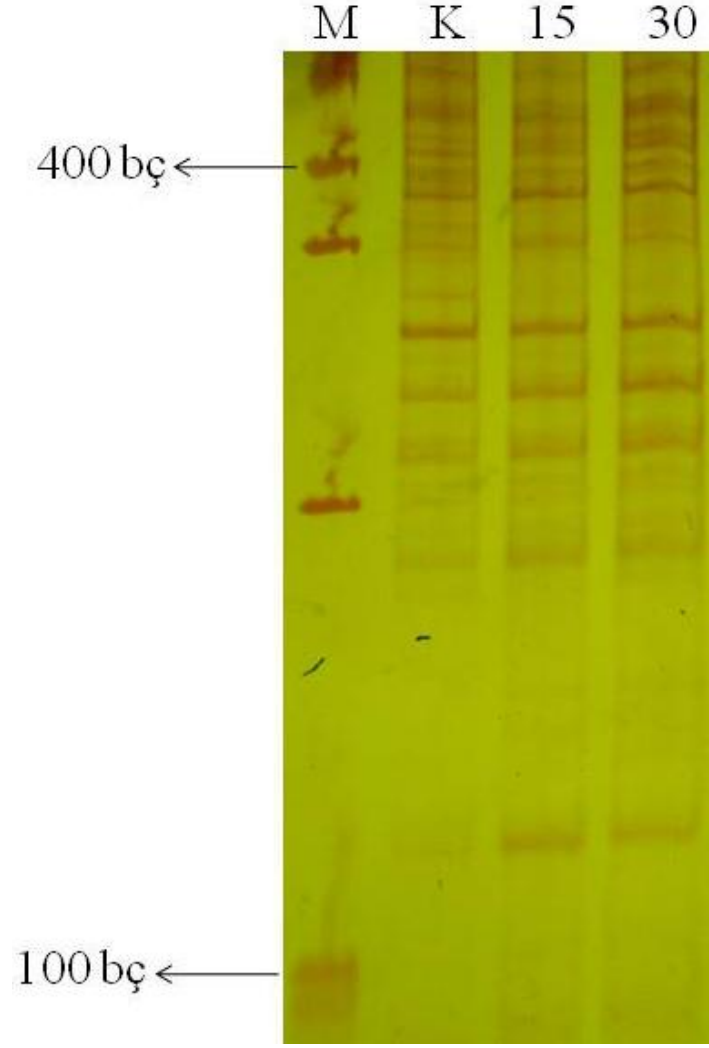
Şekil 4. 4. Kontrol fide dokusu (K), 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait 3'LTR×3'LTR kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü. M: 50-bp marker (Favorgen); K: Kontrol fide dokusu; 15: 15-günlük kallus dokusu; 30: 30-günlük kallus dokusu.



Şekil 4. 5. Kontrol fide dokusu (K), 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait 3'LTR×5'LTR2 kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü. M: 50-bp marker (Favorgen); K: Kontrol fide dokusu; 15: 15-günlük kallus dokusu; 30: 30-günlük kallus dokusu.



Şekil 4. 6. Kontrol fide dokusu (K), 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait, 3'LTR×LTR6150 kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü. M: 50-bp marker (Favorgen); K: Kontrol fide dokusu; 15: 15-günlük kallus dokusu; 30: 30-günlük kallus dokusu.

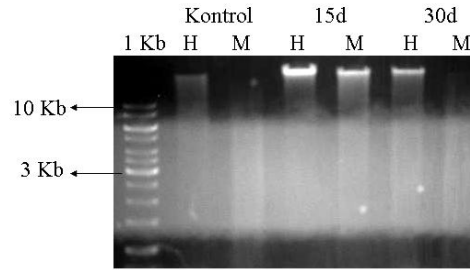


Şekil 4. 7. Kontrol fide dokusu (K), 15- ve 30-günlük kallus dokularına ait, LTR6149×Suk kombinasyonu ile elde edilen IRAP sonuçlarının PAGE görünümü. M: 50-bp marker (Favorgen); K: Kontrol fide dokusu; 15: 15-günlük kallus dokusu; 30: 30-günlük kallus dokusu.

4. 2. 3. Metillenme Değişiklikleri

Kontrol 4-günlük fide dokusu ve 15- ve 30-günlük kallus dokuları arasındaki metillenme değişimleri, metillenmeye duyarlı enzim kesimi ve metillenmeye duyarlı restriksiyon parmakizi yöntemi ile araştırıldı. Enzim kesiminde, gDNA örnekleri, metillenme duyarlılıkları farklı izoşizomer enzimler olan *HpaII* ve *MspI* enzimleri ile tekli kesime bırakıldı. Kesim sonucuna (Şekil 4. 8) göre, kontrol ve 30-günlük kallus gDNA örneklerinin *MspI* kesimlerinde geniş aralığa (1-6 Kb) sahip “smear” yapısı gözlenirken; *HpaII* kesimlerinde “smear” yapısına ek olarak tek bir bant yapısı da gözlemlendi. On beş-günlük kallus dokusunun *HpaII* ve *MspI* kesimlerinde 10 Kb’dan daha

büyük kalın bir bant; *MspI* kesiminde kalın bant görünümüne ek olarak “smear” yapısı da gözlenmiştir.

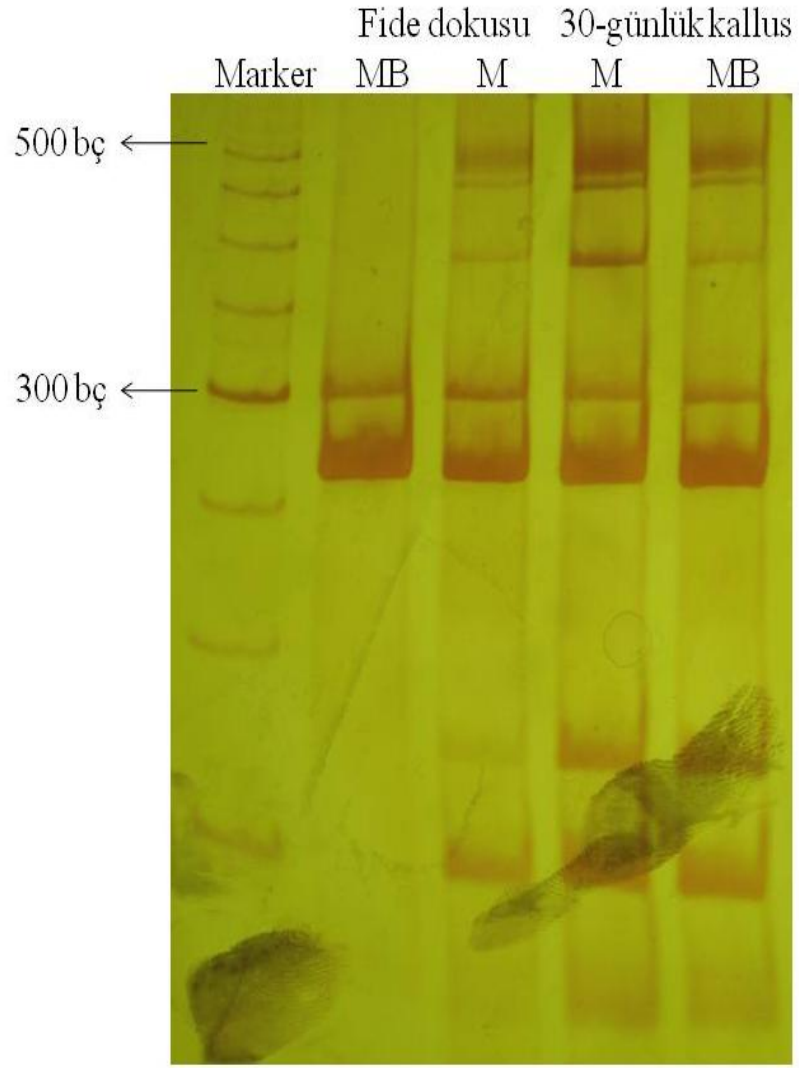


Şekil 4. 8. Kontrol fide dokusu (K), 15- ve 30-günlük kallusların metillenme görünümleri. H: *HpaII*, M: *MspI*.

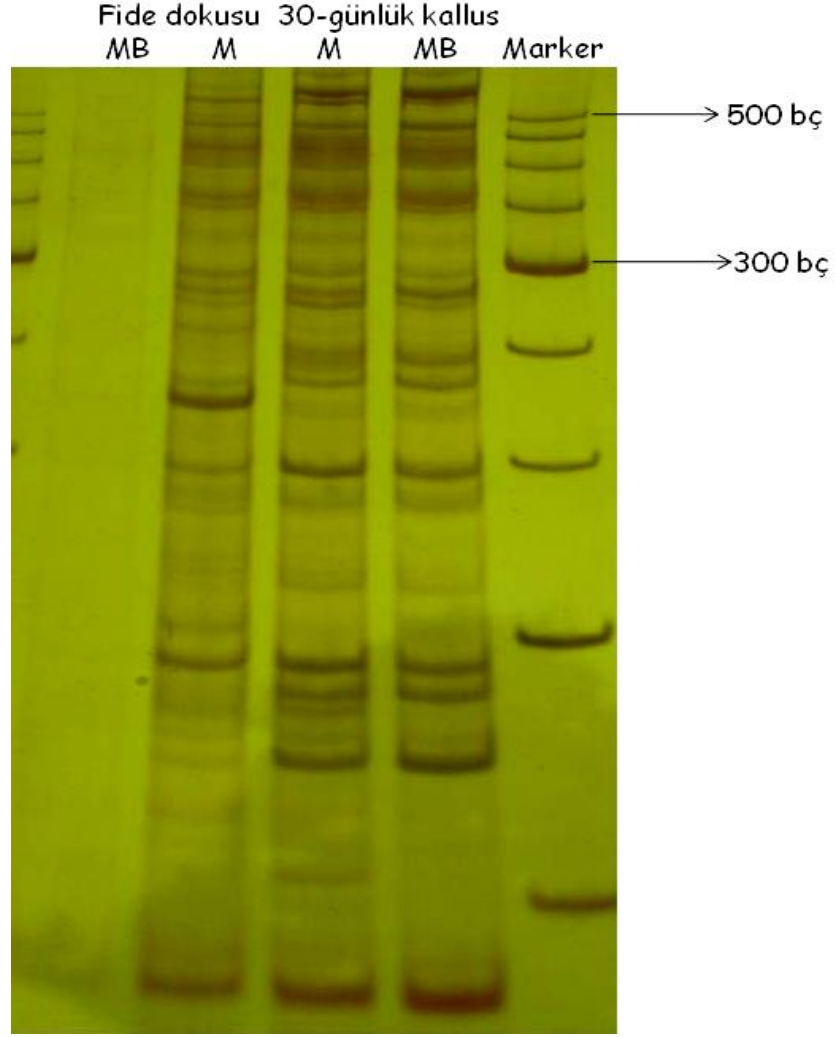
MSRF tekniğinde, kontrol fide dokusu ile 30-günlük kallus dokularından izole edilen gDNA örnekleri, 2 gruba ayrıldı. Bir grup, *MseI* enzimi ile kesilirken; diğer grup *MseI* ve *BstUI* enzimleri ile ikili kesime bırakıldı. Kesim ürünleri kit kullanılarak saflaştırıldıktan sonra, 3 adet primer kombinasyonu kullanılarak çoğaltıldı. A1×A2 primer kombinasyonu ile değerlendirilebilecek görünüm elde edilemedi. A1×A3 ile A1×A4 primer kombinasyonları 7 bant oluşturuldu (Tablo 4. 2). Embriyodan 30-günlük kallus gelişimi sırasında metillenme düzeyinde artış gözlenmiştir. A1×A4 kombinasyonunda ise kontrol grubunun *MseI/BstUI* kesiminde bant çoğaltılamamıştır (Şekil 4. 9, Şekil 4. 10).

Tablo 4. 2. Kontrol fide dokusu (K) ve 30-günlük kallus (30) dokularına ait MSRF sonuçları.
K/M: Kontrol fide dokusunun *MseI* kesimi; K/MB: Kontrol fide dokusunun *MseI* ile *BstUI* kesimi; 30/M: 30-günlük kallus dokusunun *MseI* kesimi; 30/MB: 30-günlük kallus dokusunun *MseI* ile *BstUI* kesimi.

Kombinasyon	Bant (bp)	K/M	K/MB	30/M	30/MB	Durum
A1×A3	500	+	-	+	+	III
	460	+	-	+	+	III
	390	+	-	+	+	III
	300	+	+	+	+	II
	260	+	+	+	+	II
	175	+	-	+	+	III
	150	+	-	+	+	III



Şekil 4. 9. Kontrol fide dokusu ve 30-günlük kallus dokularına ait A1×A3 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü. Marker: 50-bp marker (Favorgen); M: *MseI*; B: *BstUI*;



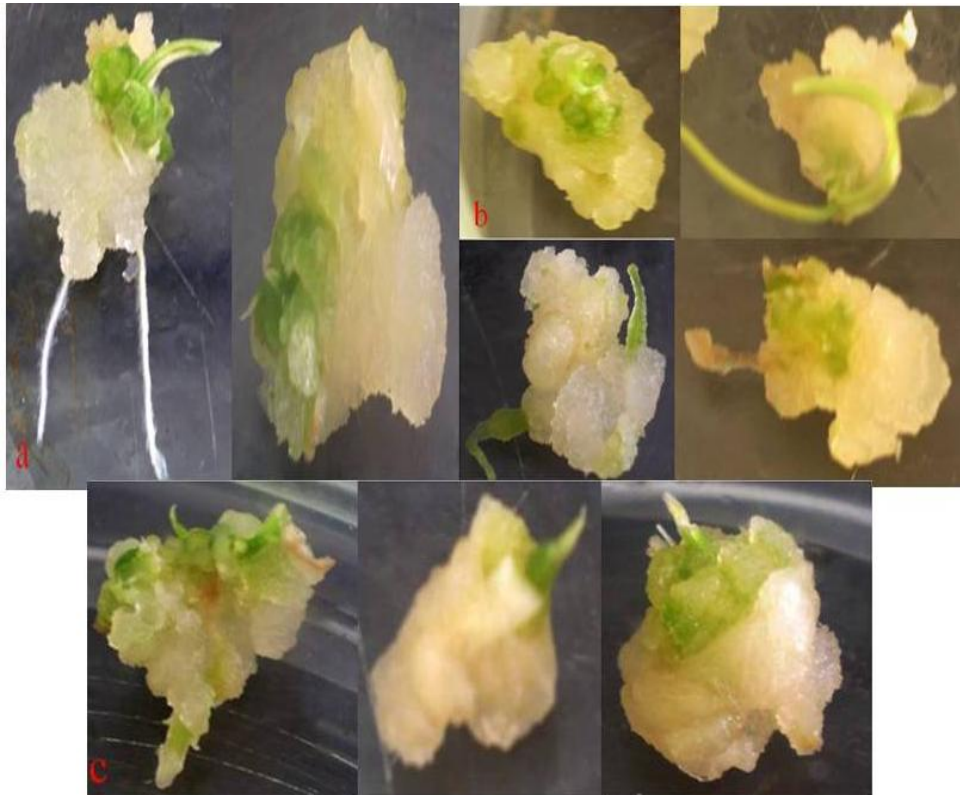
Şekil 4. 10. Kontrol fide dokusu ve 30-günlük kallus dokularına ait A1×A4 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü. M: *MseI*; B: *BstUI*; Marker: 50-bp marker (Favorgen).

4. 3. BRASSINOSTEROİDİN KALLUS KÜLTÜRLERİNE ETKİLERİ

Otuz-günlük kallus dokuları, 1 ay boyunca, 2 ayrı konsantrasyonda (0.5, 1 μ M) Homobrassinolide (HBL) içeren MS besiyerinde kültüre alındı. HBL uygulanan ve kontrol kalluslardaki, morfolojik ve fizyolojik değişimler (taze ağırlık değişimi, protein ve DNA miktar ve SOD aktivitesi değişimi) araştırılarak; en belirgin değişimin gözlendiği hormon konsantrasyonu belirlendi. Kontrol kalluslarda ve en fazla değişim gösteren hormon konsantrasyon grubundaki kalluslarda, metillenme düzeylerindeki farklılıklar araştırıldı.

4. 3. 1. Morfolojik Etkileri

İki hafta boyunca HBL uygulanan kallusların (Şekil 4. 11), kontrol grubu kalluslara oranla daha sert ve kırılğan yapıda oldukları görüldü. Kontrol ve HBL grubu kalluslar, uygulamanın 14-15. gününde yeşil hücre kümeleri şeklinde rejenerasyon belirtileri gösterdi. Uygulamanın son gününde incelendiklerinde ise, kontrol ve özellikle 0.5 μM grubundaki kallusların, 1 μM grubuna oranla daha büyük, sert ve ufalanabilir özellikte olduğu; tüm gruplarda az sayıda da olsa sürgün geliştiği ancak en uzun sürgünlerin 0.5 μM grubunda olduğu ve sadece kontrol grubunda sürgün ve yeşil hücre kümelerinin yanısıra kök gelişimi de olduğu gözlemlendi.

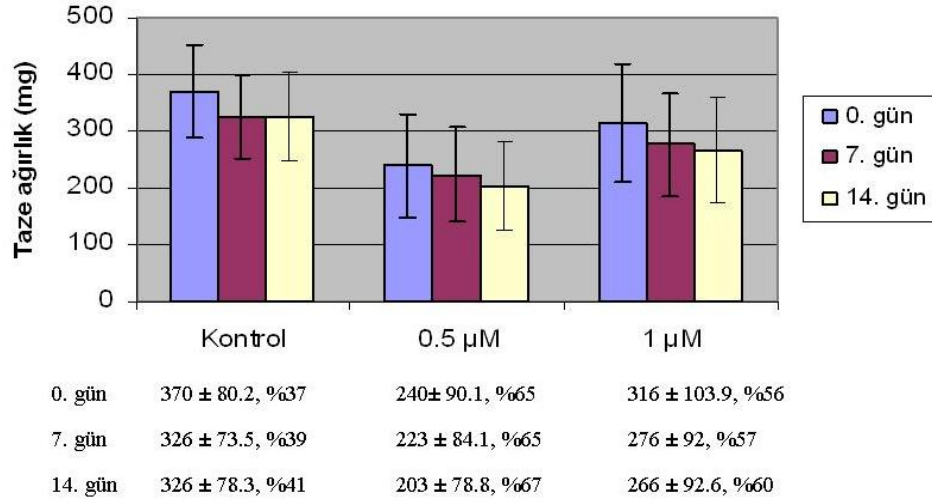


Şekil 4. 11. HBL uygulanan kallusların görünüşleri. a: Kontrol; b: 0.5 μM ; c: 1 μM .

4. 3. 2. Fizyolojik Etkileri

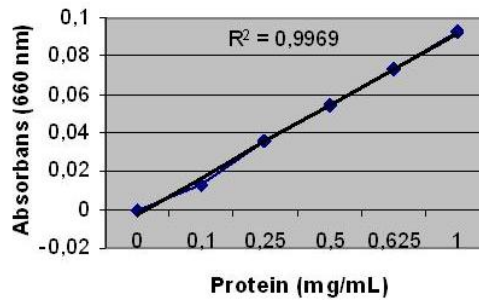
İki hafta süreli HBL uygulaması boyunca, kontrol grubu, 0.5 μM ve 1 μM HBL uygulanmış kalluslardaki taze ağırlık değişimi araştırıldı. Kalluslar, uygulamanın 0. 7. ve 14. (son) gününde, steril koşullar altında tartılarak taze ağırlık miktarları (Şekil 4. 12) belirlendi. Kontrol grubunda 44 mg; 0.5 μM grubunda 37 mg; 1 μM grubunda 50 mg

azalma gerçekleşti. Bir μM HBL grubundaki taze ağırlık değişiminin kontrol grubu ($r(1)=0.910$, $p>0.05$) ile aynı yönde yüksek derecede ilişkili “Positive correlation” olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 12. HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallusların taze ağırlığına etkisi. Taze ağırlık miktarları birbiri ile anlamlı ($p>0.05$) değildir. mg \pm standart hata, % varyasyon katsayısı

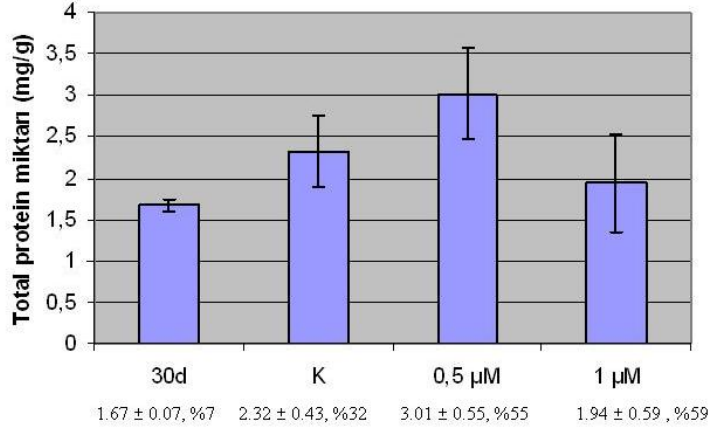
İki hafta süreli HBL uygulamasının sonunda, 30-günlük kalluslardan ve kontrol grubu, 0.5 μM ve 1 μM HBL uygulanmış kalluslardan ekstre hazırlandı ve bu ekstrelerdeki total çözünebilir protein miktarları (mg g^{-1} taze ağırlık), Lowry (1951) yöntemine göre, standart grafik (Şekil 4. 13) kullanılarak belirlendi.



Şekil 4. 13. Konsantrasyonları bilinen BSA çözeltilerinin 660 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik

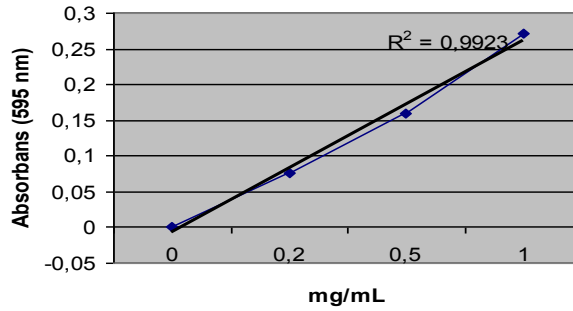
Otuz-günlük kalluslar hormon içermeyen veya 2 farklı konsantrasyonda (0.5, 1 μM) HBL içeren besiyerine aktarıldığında, total çözünebilir protein miktarının arttığı ve en

fazla artışın, 0.5 μM HBL içeren ortamda gerçekleştiği görüldü (Şekil 4. 14). Bir μM HBL grubundaki protein miktarının kontrol grubu ($r(1)=0.997$, $p=0.05$) ile aynı yönde yüksek derecede ilişkili olduğu gözlemlendi.



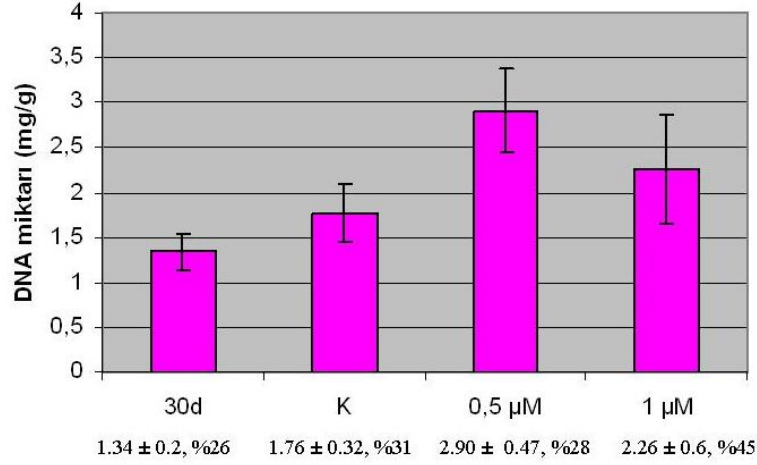
Şekil 4. 14. HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallusların total çözünebilir protein içeriğine etkisi. Total protein miktarları birbiri ile anlamlı ($p>0.05$) değildir. $\text{mg.g}^{-1} \pm$ standart hata ($n=3$), % varyasyon katsayısı

İki hafta süreli HBL uygulamasının sonunda, 30-günlük kalluslardan ve kontrol grubu, 0.5 μM ve 1 μM HBL uygulanmış kalluslardan hazırlanan ekstrlerdeki DNA miktarları (mg g^{-1} taze ağırlık) Kumar ve Garg (2005) yöntemine göre, standart grafik (Şekil 4. 15) kullanılarak belirlendi.



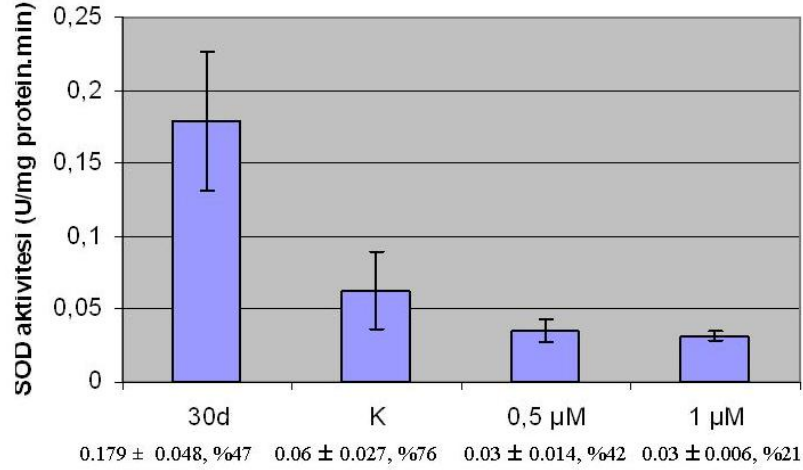
Şekil 4. 15. Konsantrasyonları bilinen DNA çözeltilerinin 595 nm dalga boyundaki absorban değerlerine göre çizilen standart grafik

Otuz-günlük kalluslar hormon içermeyen veya 2 farklı konsantrasyonda (0.5, 1 μM) HBL içeren besiyerine aktarıldığında, DNA miktarının arttığı ve en fazla artışın, 0.5 μM HBL içeren ortamda gerçekleştiği görüldü (Şekil 4. 16). Bir μM HBL grubundaki DNA miktarının kontrol grubu ($r(1)=0.998$, $p<0.05$) ile aynı yönde yüksek derecede ilişkili olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 16. HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kallusların DNA içeriğine etkisi. Otuz-günlük (30d) kalluslar ve 0.5 µM HBL uygulanmış kallusların DNA miktarları anlamlı ($p=0.05$) iken, diğer değerler birbiri ile anlamlı ($p>0.05$) değildir. mg.g^{-1} , \pm standart hata ($n=3$), % varyasyon katsayısı

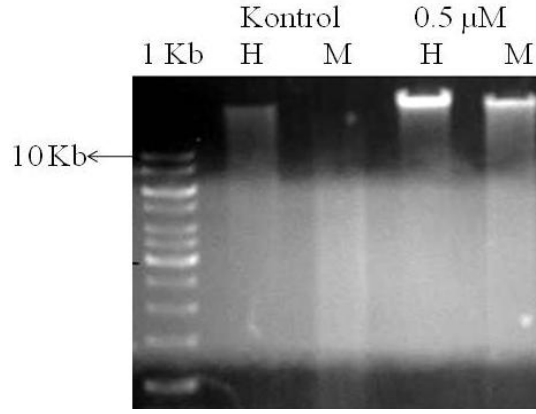
Otuz-günlük kalluslar hormon içermeyen veya 2 farklı konsantrasyonda (0.5, 1 µM) HBL içeren besiyerine aktarıldığında, SOD aktivitesinin ($\text{U } \mu\text{g}^{-1} \text{ total protein.min}^{-1}$) azaldığı ve en belirgin azalmanın, 1 µM HBL içeren ortamda gerçekleştiği görüldü (Şekil 4. 17). Bir µM HBL grubundaki SOD aktivitesinin kontrol grubu ($r(1)=0.876$, $p>0.05$) ile aynı yönde yüksek derecede ilişkili olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 17. HBL'nin farklı konsantrasyonlarının kalluslardaki SOD aktivitesine etkisi. Değerler birbiri ile anlamlı ($p>0.05$) değildir. $\text{U.}\mu\text{g protein}^{-1}.\text{dak}^{-1}$ \pm standart hata, % varyasyon katsayısı

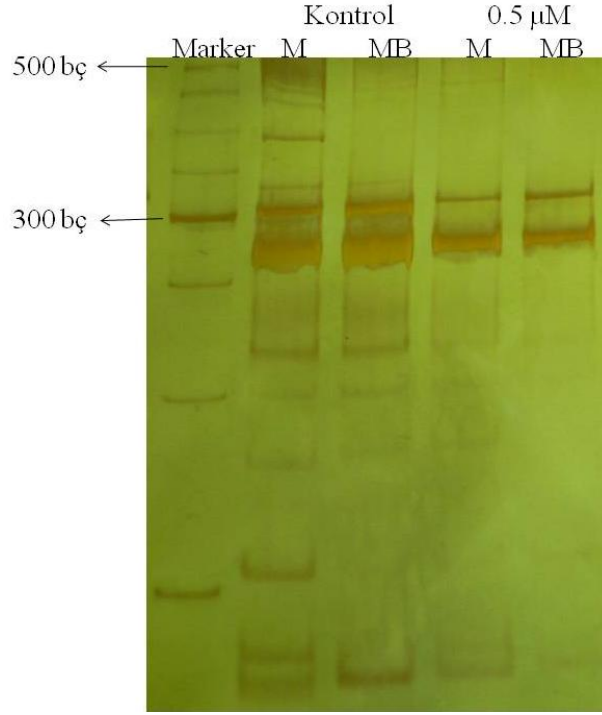
4. 3. 3. Metillenmeye Etkileri

Taze ağırlık, total çözünebilir protein, DNA miktarı ve SOD aktivitesi gibi fizyolojik ölçümlerde, en belirgin farklılıklar 0.5 μ M HBL uygulanmış kalluslarda gözleendiği için; HBL'nin metillenmeye etkileri kontrol ve 0.5 μ M HBL gruplarında araştırıldı. Kontrol kallus ve 0.5 μ M HBL uygulanmış kallus dokusu arasındaki metillenme değişimleri, metillenmeye duyarlı enzim kesimi ve metillenmeye duyarlı restriksiyon parmakizi yöntemi ile araştırıldı. Enzim kesiminde, gDNA örnekleri, metillenme duyarlılıkları farklı izoşizomer enzimler olan *HpaII* ve *MspI* enzimleri ile tekli kesime bırakıldı. Kesim sonucuna (Şekil 4. 18) göre, 0.5 M grubunda *HpaII* ve *MspI* kesimleri arasında farklılık gözlenmedi.

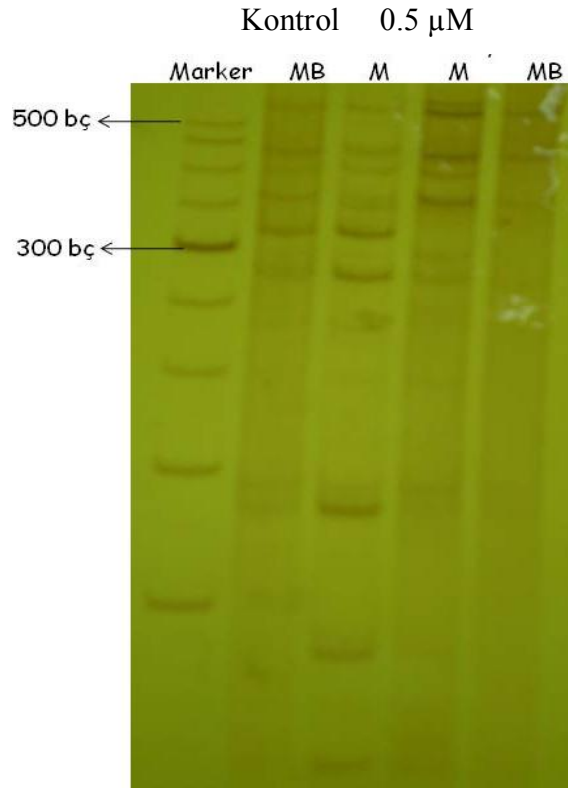


4. 18. Kontrol ve 0.5 μ M HBL uygulanmış kallusların metillenme görünümüleri. H: *HpaII*, M: *MspI*.

MSRF tekniğinde, kontrol kallus ile 0.5 μ M HBL uygulanmış kallus dokularından izole edilen gDNA örnekleri, 2 gruba ayrıldı. Bir grup, *MseI* enzimi ile kesilirken; diğer grup *MseI* ve *BstUI* enzimleri ile ikili kesime bırakıldı. Kesim ürünleri kit kullanılarak saflaştırıldıktan sonra, 3 adet primer kombinasyonu kullanılarak çoğaltıldı. A1×A2 primer kombinasyonu ile değerlendirilebilecek görünüm elde edilemedi. A1×A3 ve A1×A4 primer kombinasyonları ile 4 grupta toplam 15 adet bant elde edilmiştir (Tablo 4. 3). Bir adet bantta, metillenme düzeyinde azalma gözlenmiştir. Beş adet bantta ise metillenme düzeyinde değişim olmadığı görülmüştür (Şekil 4. 19, Şekil 4. 20).



Şekil 4. 19. Kontrol kallus dokusu ve 0.5 µM HBL uygulanmış kallus dokularına ait A1×A3 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü. M: *MseI*; B: *BstUI*; Marker: 50-bp marker (Favorgen).



Şekil 4. 20. Kontrol kallus dokusu ve 0.5 µM HBL uygulanmış kallus dokularına ait A1×A4 kombinasyonu ile elde edilen MSRF sonuçlarının PAGE görünümü. M: *MseI*; B: *BstUI*; Marker: 50-bp marker (Favorgen)

Tablo 4. 3. Kontrol kallus dokusu (K) ile 0.5 μ M BR uygulanmış kallus (BR) dokularına ait MSRF sonuçları.

Kombinasyon	Bant	K/M	K/M+B	BR/M	BR/M+B	Durum
A1×A3	400	+	-	-	-	Mutasyon
	300	+	+	+	+	II
	275	+	+	+	+	II
	215	+	+	-	-	Mutasyon
	200	+	+	-	-	Mutasyon
	160	+	-	-	-	Mutasyon
	135	+	-	-	-	Mutasyon
	125	+	+	+	+	II
A1×A4	430	+	+	+	+	II
	400	+	+	+	-	IV
	350	+	+	+	+	II
	310	+	+	-	-	Mutasyon
	275	+	+	-	-	Mutasyon
	135	+	-	-	-	Mutasyon
	85	+	-	-	-	Mutasyon

K/M: Kontrol kallus dokusunun *MseI* kesimi; K/M+B: Kontrol kallus dokusunun *MseI* ile *BstUI* kesimi; BR/M: 1 μ M BR uygulanmış kallus dokusunun *MseI* kesimi; BR/M+B: 1 μ M BR uygulanmış kallus dokusunun *MseI* ile *BstUI* kesimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 15- ve 30-günlük arpa kallusları arasındaki retrotranspozon hareketleri ve metillenme değişimleri, sırayla IRAP “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” ve MSRF “Methylation Sensitive Restriction Fingerprinting” yöntemleri ile araştırıldı. Tezin ikinci kısmında, HBL’nin, kallus gelişimine ve rejenerasyona etkileri araştırıldı. Ondört gün boyunca, HBL içeren besiortamında tutulan kalluslardaki taze ağırlık miktar değişimleri, total protein, DNA miktarları, SOD aktivitesi ve metillenme değişimleri araştırıldı. Çalışmada ilk olarak etkin bir kallus oluşumu ve dolaylı bitki rejenerasyon sistemi kuruldu. Arpanın (*H. vulgare* L.) Zafer-160 varyetesine ait olgun embriyolar, 4 mg l⁻¹ Dicamba içeren Murashige ve Skoog besiyerinde kültüre alındılar. Kültürün 30. gününde, kallus oluşturma değeri % 67 (±7.79); embriyogenik kallus oluşturma değeri %42 (±0.45) olarak hesaplandı. Otuz-günlük kalluslar, 0.5 mg l⁻¹ trans-zeatin ribosid (tZR) içeren MS besiyerine aktarıldı. Kallusların % 63 (±0.88)’ü, yeşil hücre kümeleri şeklinde rejenerasyon belirtileri gösterdi. tZR içeren besiortamında 30 gün boyunca tutulan kalluslar, kök gelişimi için hormon içermeyen MS besiortamına aktarıldılar. Ancak, kallusların hiçbirinde kök gelişimi gözlenemedi. Sharma ve diğ. (2005), çeşitli arpa varyetelerine ait olgun embriyoların %6 maltoz ve 6 mg l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerindeki kallus oluşturma değerlerini araştırmışlar ve 8 varyetenin, kallus oluşturma değerini %41-74; embriyogenik kallus oluşturma değerini %22-55 olarak hesaplamışlardır. 2,4-D yerine Picloram (Pic) ve Dicamba (Dic) kullanmanın, Golden Promise varyetesinin kallus oluşturma oranını etkilemediğini belirtmişlerdir. 2,4-D (Ziauddin ve Kasha, 1990;

Castillo ve diğ., 1998; Bregitzer ve diğ., 1995; Chang ve diğ., 2003; Halamkova ve diğ., 2004; Sahrawat ve Chand, 2004; Abumhadi ve diğ., 2005) ile birlikte Dic (Castillo ve diğ., 1998; Lührs ve Lörz, 1998; Chang ve diğ., 2003; Przetakiewicz ve diğ., 2003; Halamkova ve diğ., 2004; Gürel ve diğ., 2009) arpada kallus eldesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Dicamba, yapı ve işlev bakımından 2,4-D'ye benzerlik gösteren yapay bir oksin ve herbisittir. İlk kez 1975 yılında Dudits ve diğ. tarafından, buğdayda kallus eldesinde kullanılmıştır. Bregitzer ve diğ. (1995), 2,4-D'nin totipotensi kaybı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Castillo ve diğ., (1998), arpa varyetelerinde embriyogenik kallus gelişimi için en iyi sonucu 9 μM Dic ile elde ettiklerini belirtmişlerdir. Akula ve diğ. (1999), 2,4-D ve Pic gibi yapay oksinlere yanıt vermeyen, 2 arpa varyetesinin, kallus gelişimi için Dic'e gereksinim duyduğunu gözlemlemişlerdir. Bahieldin ve diğ. (2000), kallus eldesinde Dic'in, 2,4-D'den daha etkili olabileceğini ileri sürmüştür. Przetakiewicz ve diğ. (2003), rejenerasyon kapasitesi en yüksek olan kallusların, Dic içeren ortamda geliştiğini gözlemlemişlerdir. Gürel ve diğ. (2009), en fazla kallus gelişiminin 4 mg l⁻¹ Dic içeren ortamda gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Papenfuss ve Carman (1987), Dic içeren ortamda gelişen kallusların, 2,4-D ortamında yetişenlere oranla daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğunu görmüşler ve bu durumu, Dic'in, bitki hücreleri tarafından daha hızlı metabolize edildiği şeklinde değerlendirmişlerdir. 2,4-D'nin, kromozomal anomalilere (Karp, 1994) ve rejenerasyon kapasitesinin kaybına yol açabileceği ileri sürülmüştür (Castillo ve diğ., 1998). Rejenerasyon kaybı, uzun süreli bitki doku kültürlerinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Monokotil bitki dokuları, yüksek oksin konsantrasyonunda kültüre alındıklarında kallus gelişimi gözlenir. Kallus, oksin içermeyen ortama aktarıldığında, organogenez başlar. Bu durum, kallus hücrelerinin totipotensi yeteneğinin sonucudur. Genellikle uzun süreli kültürlerde kalluslar, oksin içermeyen ortamda dahi çoğalmaya devam ederler ve rejenerasyon belirtisi göstermezler. "Habituation" olarak da isimlendirilen totipotensi kaybı (Meins, 1989), monokotil bitkilerde geri dönüşmeyen özelliğe sahiptir (Lambe ve diğ., 1997). Kallus morfolojisi, rejenerasyon kapasitesi ile ilişkilidir. Gevşek ve sulu görünüme sahip kallusların, sıkı ve nodular görünüme sahip olanlara göre daha az farklılaşmış (Fransz ve Schel, 1990) ve totipotensi yeteneğini kaybetmiş oldukları (Lambe ve diğ., 1997) ve bazı durumlarda sadece adventif kök oluşturabildikleri (Mott ve Cure, 1978) anlaşılmıştır. Castillo ve diğ. (1998), olgunlaşmamış arpa embriyolarını, Dic, 2,4-D veya Pic içeren ortamda kültüre almışlar

ve gelişen kallusları, bakır sülfat içeren ortama aktardıklarında, %93 oranında rejenerasyon gözlemlenmiştir. Chang ve diğ. (2003), 2,4-D içeren ortamda, farklı boyutlarda kesilmiş, olgunlaşmamış embriyolardan gelişen kallusları, 0.5 mg l^{-1} BA içeren ortama aktardıklarında, embriyo başına 4.8 sürgün elde etmişlerdir. Halamkova ve diğ. (2004), 2.5 mg dm^{-3} Dic veya 2,4-D içeren besiyerinde, olgunlaşmamış embriyolardan gelişen kallusları, rejenerasyon için hormon içermeyen besiyerine aktarmışlar ve kalluslardan, embriyo başına 149-99 bitkinin rejenerasyon olduğunu gözlemlenmiştir. Gürel ve diğ. (2009), benzer şekilde, Dic içeren besiyerinde gelişen kallusları, 0.5 mg l^{-1} tZR içeren ortama aktarmışlar ve 2 hafta sonunda, kalluslardan somatik embriyo ve sürgün geliştiğini görmüşlerdir.

Rejenerasyon kapasitesindeki kaybın, kültür sırasında gerçekleşen epigenetik (Meins, 1989) veya genetik varyasyonların sonucu olabileceği düşünülmektedir (Lambe ve diğ., 1997). Uzun süreli kültürlerde gerçekleşen kromozom sayısı ve yapı anomalilerinin, transpozon aktivasyonunun ve mutasyonların, kültüre alınan hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik varyasyonlara yol açtığı (Brettel ve diğ., 1986; Lee ve Phillips, 1988) bilinmektedir. DNA metillenme değişimlerinin, totipotensi kaybındaki ilk adım olduğu düşünülmektedir (Lambe ve diğ., 1997). Çalışmada, 15- ve 30-günlük kallusların, retrotranspozon hareketleri ve DNA metillenme düzeyleri karşılaştırıldı. Kontrol doku olarak, 2 kat filtre kağıdının arasında, 4 gün boyunca çimlenmeye bırakılmış tohumlardan gelişen fideler kullanıldı. Retrotranspozon hareketleri IRAP yöntemi ile araştırıldı. Arpa genomunda çok kopyalı halde bulunduğu bilinen *BARE-1* ve *Sukkula* retroelementlerinden tasarlanan 5 adet primer ile 4 kombinasyon (Saeidi ve diğ., 2008) oluşturuldu. Fide dokusundan, 15-günlük ve 30-günlük kallus dokularından izole edilen genomik DNA'lar, 4 primer kombinasyonu ile çoğaltıldı. Toplam 48 adet bandın, %63.7'si polimorfiktir. PCR ürünleri, PAGE ile ayrıldı ve gümüş boyama ile görüntülendi. Çoğaltım sonuçlarına göre farklı dokular arasındaki Jaccard benzerlik indeksleri hesaplandı. En yüksek benzerlik oranı (%82) 15-günlük kallus ile 30-günlük kallus arasında iken; en düşük benzerlik oranı (%73) kontrol doku ile 15-günlük kallus arasındadır. Bu sonuçlara göre, 30-günlük kallus, 15-günlük kallusa oranla, kontrol dokuya daha fazla benzerlik (%76) göstermektedir. Kullanılan primer kombinasyonları 0.954-0.981 arasında değişen "Polymorphism information content" PIC ve 0.28-5.3 arasında değişen "Effective multiplex ratio" EMR değerlerini oluşturdu. Lightbourn ve Veilleux (2002) patatesten yaptıkları bir çalışmada, protoplast füzyonu ile elde edilen

somaklonları, IRAP tekniği ile analiz ettiklerinde, somatik hibritlerde, kontrollerde olmayan bantlar bulunduğunu göstermişlerdir. Muhammad ve Othman (2005), doku kültüründe gelişen ve *Fusarium*'a dayanıklılıkları bakımından farklı 2 ayrı varyeteye ait muz klonları arasındaki varyasyonları IRAP yöntemi ile araştırmış ve %12'si polimorfik olmak üzere toplam 85 bant çoğaltmışlardır. Hem aynı varyetenin klonları hem de farklı 2 varyete arasında retrotranspozon hareketleri bakımından farklılıklar saptamışlardır. Duyarlı varyeteden geliştirilen dayanıklı varyetede, retrotranspozon kopya sayısının arttığını görmüşler bu durumu retrotranspozonların ıslah sırasında aktifleştiği şeklinde yorumlamışlardır. Smykal ve diğ. (2007), kültürde 24 sene tutulan bezelye sürgünlerinin genetik stabilitelerini IRAP yöntemi ile araştırdıklarında, kültür koşullarının retrotranspozon hareketlerini arttırmadığını görmüşlerdir. Campbell ve diğ. (2010), 3 farklı arpa varyetesine ait olgunlaşmamış embriyolardan kallus aracılığıyla rejeneren bitkiler arasındaki varyasyonları IRAP yöntemi ile araştırmışlardır. Üç varyete için toplam 1448 bant ve %12 polimorfizm elde etmişler ve IRAP tekniğinin, doku kültüründe gerçekleşen varyasyonların saptanmasında kullanışlı olabileceğini belirtmişlerdir. Evrensel ve diğ. (2011), 30-, 45- ve 60-günlük arpa kallusları arasındaki varyasyonları IRAP tekniği ile araştırmışlardır. %66'sı polimorfiktir, toplam 197 bant elde etmişlerdir. En yüksek benzerlik oranının (%84) 30- ve 45-günlük kalluslar arasında; en düşük benzerlik oranının (%76) ise 45- ve 60-günlük kalluslar arasında bulunduğunu belirtmişlerdir. *In vitro* koşullarda gelişen bitkiler arasındaki, retroelement hareketlerini araştırmak için REMAP (Peredo ve diğ., 2009) ve S-SAP (Melayah ve diğ., 2001; Li ve diğ., 2007; Kour ve diğ., 2009) gibi markırlar da kullanılmaktadır. Retrotranspozonların tüm genoma dağıldığı durumlarda, 2 primer arasında kalan bölge, *Taq* polimeraz tarafından çoğaltılamayacak veya elektroforez sistemlerinde ayrılamayacak kadar büyük olabilir. Ancak, retrotranspozonlar genomda genellikle kümelenmiş ve bazen birbirinin içine geçmiş halde bulunurlar. Bu yüzden, *BARE-I* dizisine özgü primerler ile yapılan IRAP çalışmalarında, 100-10000 bç arasında çoğaltım ürünleri elde edilebilmektedir (Kalendar ve Schulman, 2006). Bu çalışmada, 4 primer kombinasyonu ile 60-700 bç arasında bant çoğaltılmıştır. IRAP tekniğinin kullanıldığı diğer çalışmalarda çoğaltılan bant aralıkları, 200-2500 bç (Nair ve diğ., 2005), 100-4000 bç (Leigh ve diğ., 2003), 1100-1500 bç (Muhammad ve Othman, 2005), 400-1700 bç (Pereira ve diğ., 2005), 180-3200 bç (Saeidi ve diğ., 2008), 250-5000 bç (Carvalho ve diğ., 2010), 70-1300 bç (Evrensel ve diğ., 2011) arasında

değişkenlik göstermektedir. Agaroz jel elektroforezinin, IRAP çoğaltım ürünlerinin ayrılmasında yeterli olduğu belirtildiği için (Kalender ve Schulman, 2006); bu çalışmada, çoğaltım ürünlerinin ayrıştırılması için, öncelikle %2 ve %3'lük agaroz jel elektroforezi denenmiştir. Ancak yeterli ayırışım sağlanamadığı için PAGE tercih edilmiştir. Leigh ve diğ. (2003) de bazı durumlarda, IRAP çoğaltım ürünlerinin yürütülmesi için PAGE'nin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen çoğaltım ürünlerinin boyutu, daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha küçüktür. *Taq* polimeraz enzimi, enzim tamponu, $MgCl_2$ konsantrasyonu, DNA örneklerinin saflığı ve PCR cihazı, PCR sonuçlarını ve çoğaltım ürünlerinin boyutunu etkilemektedir.

Kontrol fide dokusu ve 30-günlük kallus arasındaki metillenme farklılıkları MSRF yöntemi ile araştırıldı. MSRF, Huang ve diğ. (1997) tarafından, kanser hücrelerindeki metillenme değişimlerini araştırmak ve genomun metillenme değişimi gösteren bölgelerini saptamak amacı ile geliştirilmiştir. MSRF tekniği insan hücrelerinde başarı ile kullanılmasına karşın (Wu ve Ho, 2004; Oka ve diğ., 2008); bitki hücrelerinde henüz kullanılmamıştır. $A1 \times A2$ kombinasyonu ile yalnızca "smear" görüntüsü elde edilirken; $A1 \times A3$ kombinasyonu ile 150-500 bç arasında bant elde edildi. $A1 \times A4$ kombinasyonu ile kontrol dokusunun *MseI/BstUI* kesiminde çoğaltım ürünü elde edilemedi. Bant profillerine göre, olgun embriyolardan kallus gelişimi sırasında metillenmede artış meydana gelmektedir. Doğal ve özellikle 2,4-D gibi yapay oksinlerin metillenmeyi arttırdığı gözlenmiştir (LoSchiavo ve diğ., 1989). Chakrabarty ve diğ. (2003), ginseng bitkisinde, kallus aracılığıyla somatik embriyogenez sırasındaki metillenme değişimlerini araştırmışlardır. Embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallus dokularındaki metillenme düzeylerini HPLC ve MSAP teknikleri ile karşılaştırdıklarında, embriyogenik kalluslardaki metillenme düzeyinin, embriyogenik olmayanlarınkinden daha düşük olduğunu görmüşlerdir. Daha önceki çalışmalarda 10 U kullanıldığı için; bu çalışmada *BstUI* enziminin miktarı başlangıçta 10 U olarak seçildi. Ancak, çoğaltım ürünleri PAGE ile yürütüldüğü zaman "smear" yapısının yanısıra az sayıda ve 1 Kb'dan daha büyük bantlar gözlendi. PCR koşullarının pek çoğu ($MgCl_2$ konsantrasyonunun yüksek, kalıp miktarının yüksek oluşu) "smear" görünümüne yol açmaktadır. $MgCl_2$ optimizasyonu görünümü değiştirmede. Daha önceki çalışmaların insan hücrelerinde gerçekleştirildiği ve arpa genomunun (5000 Mbç), insan genomundan (2910 Mbç) daha büyük olduğu bilgisi ile 20 U *BstUI* enzimi kullanıldı.

Bağlanma sıcaklığı 40°C olarak seçildiğinde çoğaltımın gerçekleşmediği gözlemlendi. Bunun için, 34-39°C arasındaki sıcaklıklar denendi ve en iyi çoğaltımın 38°C'de gerçekleştiği görüldü. Primerlerin, insan genomunda 40°C bağlanma sıcaklığında çoğaltım yapmak üzere geliştirilmiş oluşu bu durumu açıklayabilir.

Çalışmanın ikinci kısmında, HBL'nin, kallus gelişimine ve rejenerasyona etkileri incelendi. Bu amaçla, hormon içermeyen kontrol besiyerine ve 0.5 µM, 1 µM HBL içeren besiyerine aktarılan kalluslardaki taze ağırlık değişimi, total protein ve DNA miktarı ve SOD aktivitesi araştırıldı. HBL uygulamasının 14. gününde, kontrol, 0.5 µM ve 1 µM HBL gruplarında, taze ağırlık miktarının sırasıyla 44 mg, 37 mg ve 50 mg azaldığı gözlemlendi. Total protein ve DNA miktarlarının, HBL etkisiyle arttığı görüldü. En yüksek değerler 0.5 µM HBL grubunda; en düşük değerler ise 30-günlük kalluslarda kaydedildi. En yüksek SOD aktivitesi, 30-günlük kalluslarda ölçüldü. HBL konsantrasyonu ile SOD aktivitesinin ters orantılı olduğu gözlemlendi. MSRF analizi ile, HBL uygulamasının, metillenmeyi artırıcı özellikte olduğu görülmüştür. Kontrol ve HBL grubu kalluslar, uygulamanın 14-15. gününde yeşil hücre kümeleri şeklinde rejenerasyon belirtileri gösterdi. HBL uygulanan kallusların, kontrol grubu kalluslara oranla daha sert yapıda oldukları görüldü. Uygulamanın son gününde incelendiklerinde ise, kontrol ve özellikle 0.5 µM grubundaki kallusların, 1 µM grubuna oranla daha büyük sert ve ufalanabilir özellikte olduğu; tüm gruplarda az sayıda da olsa sürgün geliştiği ancak en uzun sürgünlerin 0.5 µM grubunda olduğu ve sadece kontrol grubunda sürgün ve yeşil hücre kümelerinin yanısıra kök gelişimi de olduğu gözlemlendi. Daha önceki çalışmalarda BRlerin tohum çimlenmesini uyardığı (Leubner-Metzger, 2001), protein (Vardhini ve Rao, 1998; Anuradha ve Rao, 2001), DNA (Vardhini ve Rao, 1998; Anuradha ve Rao, 2001), RNA (Vardhini ve Rao, 1998; Anuradha ve Rao, 2001) ve karbohidrat (Vardhini ve Rao, 1998) miktarlarını, SOD (Ali ve diğ., 2008; Yuan ve diğ., 2010) ve diğer antioksidan enzimlerin (Ali ve diğ., 2008; Yuan ve diğ., 2010) aktivitesini arttırdığı, taze ve kuru ağırlık miktarlarını arttırdığı (Anuradha ve Rao, 2007) ve stresin olumsuz etkilerini ortadan kaldırdığı (Sairam, 1994; Anuradha ve Rao, 2001; Vardhini ve Rao, 2003; Fariduddin ve diğ., 2004; Singh ve Shono, 2005; Anuradha ve Rao, 2007; Ali ve diğ., 2008) gözlemlenmiştir. Kartal ve diğ. (2009) ise HBL uygulamasının, total protein miktarını, SOD, CAT, POX aktivitelerini azalttığını görmüşlerdir. BRlerin, doku kültüründeki etkilerini araştıran çalışmalar (Roth ve diğ., 1989; Gaudinova ve diğ., 1995; Lu ve diğ., 2003; Nunez ve diğ., 2004; Aydın ve diğ.,

2006) daha sınırlıdır. Lu ve diğ. (2003), düşük konsantrasyondaki BL uygulamasının, sürgün gelişimini uyardığı, taze ve kuru ağırlık miktarlarını arttırdığını; yüksek konsantrasyonlarda ise ters etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Nunez ve diğ. (2004), BR analoglarının, kallus gelişimini ve rejenerasyonu uyardığını görmüşlerdir. Sasaki (2002) de benzer şekilde BL'nin sürgün rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini gözlemlemişlerdir. Aydın ve diğ. (2006) ise BL uygulamasının taze ağırlık miktarını azalttığını ve somatik embriyogenezi uyardığını belirtmişlerdir. Kim ve diğ. (2008) de BL'nin, düşük konsantrasyonlarda sürgün gelişimini uyardığını bildirmişlerdir. SOD ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerinin, organogenez yeteneğini kaybetmiş “non-organogenic” kalluslarda, “organogenic” kalluslara oranla daha yüksek olduğu Hagege ve diğ. (1992) tarafından bildirilmiştir. Bu durum; bu çalışmada elde edilen ve HBL uygulanan kalluslardaki SOD aktivitesinin, kontrol ve özellikle 30-günlük kalluslara oranla oldukça düşük olduğu yönündeki bulgular ile uyumludur. 2,4-D'nin hayvan hücrelerinde oksidatif strese yol açtığı (Mi ve diğ., 2007) ve bitkilerde süperoksit radikalinde artışa neden olduğu (Romero-Puertas ve diğ., 2004) anlaşılmıştır. Bu durum, 30-günlük kalluslardaki yüksek SOD aktivitesini açıklayabilir. Metillenme düzeyi ile rejenerasyon kapasitesi arasındaki olası ilişkiyi araştırmak için, kontrol ve 0.5 μM gruplarındaki metillenme değişimleri, MSRF tekniği ve 2 primer kombinasyonu ile araştırıldı. HBL uygulamasının, genomda metillenme artışına yol açtığı görüldü. Bu sonuç, metillenmedeki artışın, rejenerasyon kapasitesini olumlu yönde etkilemiş olabileceği şeklinde yorumlandı. Santos ve Feveireiro (2002), metillenmeyi azalttığı bilinen “5-azacytidine” maddesinin, Medicago bitkisinde, kallustan somatik embriyo oluşumunu baskıladığını görmüşlerdir. Benzer şekilde, LoSchiavo ve diğ. (1989) de 5-azacytidine'in, somatik embriyogenezi durdurduğunu gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada, arpa doku kültürlerinde meydana gelen varyasyonlar ve HBL'nin doku kültürlerine ve varyasyonlara etkileri araştırıldı. Çalışmada, kallus gelişimi sırasında retroelementlerin aktif hale geçtiği ve metillenmede artış meydana geldiği; HBL'nin özellikle 0.5 μM konsantrasyonda, metillenmeyi artırıcı özellikte olduğu ve kallus gelişimini baskılayıp; sürgün oluşumu şeklindeki rejenerasyonu olumlu etkilediği anlaşıldı. Çalışmanın, her 2 kısmında elde edilen polimorfik bantların, dizi analizi ile karakterize edilmesi ve varyasyonların rejener bitkilerde ve mümkün ise sonraki nesillerde incelenmesi ve çalışmada kullanılan dokuların daha fazla sayıda parametre ile

analiz edilmesi çalışmada elde edilen sonuçların daha iyi anlaşılmasına olanak tanıyacaktır.

KAYNAKLAR

<http://www.albertabarley.com/food/healthbenefits.shtml>, Ziyaret tarihi: 08.05.2011.

<http://barleyworld.org/northamericanbarley.php>: Ziyaret tarihi: 07.05.2011.

<http://barleyworld.org/whatisbarley.php>: Ziyaret tarihi: 08.05.2011.

<http://www.fao.org/>: Ziyaret tarihi: 08.05.2011.

<http://www.gramene.org/whatsnew.html>: Ziyaret tarihi: 08.04.2010.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html: Ziyaret tarihi: 07.05.2011.

<http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/transelem/trans1.htm>: Ziyaret tarihi: 08.04.2010.

<http://oregonstate.edu/instruct/css/330/five/BarleyOverview.htm>: Ziyaret tarihi: 08.05.2011

Abumhadi, N., Kamenarova, K., Todorovska, E., Dimov, G., Trifonova, A., Gecheff, K. Atanassov, A., 2005, Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (*Hordem vulgare* L.), *Biotech. Biotechnol. Equip.*, 19(3): 32-38.

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., ve diğ., Venter, J.C., 2000, The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 287(5461): 2185-2195.

Ahlert, D., Stegemann, S., Kahlau, S., Ruf, S., Bock, R., 2009, Insensitivity of chloroplast gene expression to DNA methylation, *Mol. Genet. Genomics*, 282(1): 17-24.

Ahokas, H., 1999, On the territorial distribution of chromosomal interchanges in wild barley, *Hordeum vulgare* spp. *spontaneum*, *Barley Genet. Newslett.*, 29: 40-42.

Akula, C., Akula, A., Henry, R., 1999, Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars, *Biol. Plant.*, 42(4): 505-513.

Ali, B., Hasan, S.A., Hayat, S., Hayat, Q., Yadav, S., Fariduddin, Q., Ahmad, A., 2008, A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek), *Environ. Exp. Bot.*, 62(2): 153-159.

Anderson, S., Lewis-Smith, A.C., Smith, S.M., 1990, Methylation of ribosomal RNA genes in *Petunia hybrida* plants, callus cultures and regenerated shoots, *Plant Cell Rep.*, 8(9): 554-557.

Anuradha, S., Rao, S.S.R., 2001, Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Growth Reg.*, 33(2): 151-153.

Anuradha, S., Rao, S.S.R., 2007, The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress, *Plant Soil and Environ.*, 53(11): 465-472.

Asami, T., Min, Y.K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I., Yoshida, S., 2000, Characterization of Brassinazole, a Triazole-Type Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor, *Plant Physiol.*, 123(1): 93-100.

Asfaw, Z., von Bothmer, R., 1990, Hybridization between landrace varieties of Ethiopian barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) and the progenitor of barley (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*), *Hereditas*, 112: 57-64.

Atienza, S.G., Jafary, H., Niks, R.E., 2004, Accumulation of genes for susceptibility to rust fungi for which barley is nearly a nonhost results in two barley lines with extreme multiple susceptibility, *Planta*, 220(1): 71-79.

Aydin, Y., Talas-Ogras, T., Ipekçi-Altas, Z., Gözükrırmızı, N., 2006, Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis, *Biol. Plant.*, 61(3): 289-293.

Azpeitia, A., Chan, J.L., Saenz, L., Oropeza, C., 2003, Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*, *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 78(5): 591-596.

- Backes, G., Madsen, L.H., Jaiser, H., Stougaard, J., Herz, M., Mohler, V., Jahoor, A., 2003, Localisation of genes for resistance against *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and *Puccinia graminis* in a cross between a barley cultivar and a wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) line, *Theor. Appl. Genet.*, 106: 353-362.
- Backes, G. Orabi, J., Fischbeck, G., Jahoor, A., 2006, Barley, In: C. Kole, (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Volume 1: Cereals and Millets*, (1st Edition, 155-210) Heidelberg: Springer.
- Bahieldin, A., Dyer, W.E., Qu, R., 2000, Concentration effects of dicamba on shoot regeneration in wheat, *Plant Breed.*, 119(5): 437-439.
- Bajguz, A., 2000, Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*, *Plant Physiol. Biochem.*, 38(3): 209-215.
- Banks, J.A., Masson, P., Federoff, N., 1988, Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize *Suppressor* transposable element, *Genes and Dev.*, 2: 1364-1380.
- Baranek, M., Krizan, B., Ondrusikova, E., Pidra, M., 2010, DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 101(1): 11-22.
- Bardini, M., Labra, M., Winfield, M., Sala, F., 2003, Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Tiss. Org.*, 72: 157-162.
- Bartosz, G., 1997, Oxidative stress in plants, *Acta Physiol. Plant.*, 19: 47-64
- Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000, DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics, *Trends Genet.*, 16: 168-174.
- Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M., Issa, J.P., 1998, Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia, *Adv. Cancer Res.*, 72: 141-196.
- Bayliss, M.W., 1980, Chromosomal variation in tissue culture, *Int. Rev. Cytol.-Supplement*, 1A: 113-144.
- Bednarek, P.T., Orłowska, R., Koebner, R.M.D., Zimny, J., 2007, Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.), *BMC Plant Biol.*, 7: 10.
- Bellincampi, D., Morpurgo, G., 1988, Stimulation of growth in *Daucus carota* L. cell cultures by brassinosteroid, *Plant Sci.*, 54(2): 153-156.
- Bennetzen, J.L., 1996, The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution, *Trends Microbiol.*, 4: 347-353.

- Bennetzen, J.L., 2000, Transposable element contributions to plant gene and genome evolution, *Plant Mol. Biol.*, 42(1): 251-269.
- Bennetzen, J.L., Schrick, K., Springer, P.S., Brown, W.E., San-Miguel, P., 1994, Active maize genes are unmodified and flanked by diverse classes of modified, highly repetitive DNA, *Genome*, 37: 565-576.
- Berdushev, G. D., Korotaev, G. K., Boyarskikh, G.V., Vanyushin, B. F., 1967, Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of pink salmon and its changes in the course of spawning, *Biokhimiya*, 32: 988-993.
- Bestor, T. H., 2000, The DNA methyltransferases of mammals, *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2395-2402.
- Bird, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, 16: 6-21.
- Bishop, G.J., Koncz, C., 2002, Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, *Plant Cell*, 14: S97-S110.
- Bohr, V.A., Dianov, G.L., 1999, Oxidative DNA damage processing in nuclear and organellar DNA, *Biochimie*, 81: 155-160.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3): 314-331.
- Bradford, K.J., Benech-Arnold, R.L., Côme, D., Corbineau, F., 2008, Quantifying the sensitivity of barley seed germination to oxygen, abscisic acid, and gibberellin using a population-based threshold model, *J. Exp. Bot.*, 59(2): 335-347.
- Bregitzer, P., 1992, Plant regeneration and callus type in barley: Effect of genotype and culture media, *Crop Sci.*, 32: 1108-1112.
- Bregitzer, P., Campbell, R.D., 2001, Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus, *Crop Sci.*, 41: 173-179.
- Bregitzer, P., Campbell, R.D., Wu, Y., 1995, Plant regeneration from barley callus: Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and phenylacetic acid, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43: 229-235.
- Bregitzer, P., Dahleen, L.S., Neate, S., Schwarz, P., Mancharan, M., 2008, A single backcross effectively eliminates agronomic and quality alterations caused by somaclonal variation in transgenic barley, *Crop Sci.*, 48(2): 471-479.
- Bregitzer, P., Halbert, S.E., Lemaux, P.G., 1998, Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley, *Theor. Appl. Genet.*, 96: 421-425.

Bregitzer, P., Poulson, M., 1995, Agronomic performance of barley lines derived from tissue culture, *Crop Sci.*, 35: 1144-1148.

Bregitzer, P., Tonks, D., 2003, Inheritance and expression of transgenes in barley, *Crop Sci.*, 43: 4-12.

Bregitzer, P., Zhang, S., Cho, M.J., Lemaux, P.G., 2002, Reduced somaclonal variation in barley is associated with culturing highly differentiated meristematic tissues, *Crop Sci.*, 42: 1303-1308.

Breiman, A., 1985, Plant regeneration from *hordeum spontaneum* and *hordeum bulbosum* immature embryo derived calli, *Plant Cell Rep.*, 4(2): 70-73.

Brettell, R.I.S., Dennis, E.S., 1991, Reactivation of a silent *Ac* following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern, *Mol. Gen. Genet.*, 229: 365-372.

Brettell, R.I.S., Dennis, E.S., Scowcroft, W.R., Peacock, W.J., 1986, Molecular analysis of a somaclonal variant of alcohol dehydrogenase, *Mol. Gen. Genet.*, 202: 335-344.

Brown, P.T.H., Gobel, E., Lorz, H., 1991, RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants, *Theor. Appl. Genet.*, 81: 227-232.

Brown, P.T.H., Kyojuka, J., Sukekiyo, Y., Kimura, Y., Shimamoto, K., Lorz, H., 1990, Molecular changes in protoplast-derived rice plants, *Mol. Gen. Genet.*, 223: 324-328.

Campbell, B.C., LeMare, S., Piperidis, G., Godwin, I.D., 2010, IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley, *Mol. Breed.*, 27(2): 193-206.

Cappello, J., Handelsman, K., Lodish, H.F., 1985, Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence, *Cell*, 43(1): 105-115.

Cardoza, V., 2008, Tissue culture: The manipulation of plant development, In: C. N. Stewart Jr. (Ed.), *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques and applications*, (1st Edition, 112-134). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.

Carvalho, A., Guedes-Pinto, H., Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., 2010, Genetic variability of Old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers, *Ann. Appl. Biol.*, 156(3): 337-345.

Cassells, A.C., Curry, R.F., 2001, Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 64: 145-157.

Castillo, A.M., Egana, B., Sanz, J.M., Cistuo, L., 1998, Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grow in Spain, *Plant Cell Rep.*, 17: 902-906.

- Cerda, S., Weitzman, S.A., 1997, Influence of oxygen radical injury on DNA methylation, *Mutation Res.*, 386: 141-152.
- Chakrabarty, D., Yu, K.W., Paek, K.Y., 2003, Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*), *Plant Sci.*, 165(1): 61-68.
- Chan, S.W., Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., 2005, Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*, *Nat. Rev. Genet.*, 6: 351-360.
- Chandler, P.M., Harding, C.A., Ashton, A.R., Mulcair, M.D., Dixon, N.E., Mander, L.N., 2008, Characterization of Gibberellin Receptor Mutants of Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Mol. Plant*, 1(2): 285-294.
- Chang, Y., von Zitzewitz, J. Hayes, P.M., Chen, T.H.H., 2003, High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex), *Plant Cell Rep.*, 21(8): 733-738.
- Chen, Z., Cuin, T.A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B.P., Shabala, S., 2007a, Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance, *J. Exp. Bot.*, 58(15-16): 4245-4255.
- Chen, Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., Shabala, S., 2007b, Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley, *Plant Physiol.*, 145: 1714-1725.
- Cheng, C., Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E., 2002, Evolutionary relationships among rice species with AA genome based on SINE insertion analysis, *Genes and Genet. Syst.*, 77: 323-334.
- Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., Feldman, K.A., 2001, Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 26(6): 573-582.
- Choi, H.W., Lemaux, P.G., Cho, M.J., 2000a, High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avena sativa* L.) plants, *Plant Sci.*, 156: 85-94. [erratum: 160(4):761-772].
- Choi, H.W., Lemaux, P.G., Cho, M.J., 2000b, Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants, *Crop Sci.*, 40: 524-533.
- Choi, H.W., Lemaux, P.G., Cho, M.J., 2002, Use of fluorescence in situ hybridization for gross mapping of transgenes and screening for homozygous plants in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 106: 92-100.

Chomet, P.S., Wessler, W., Dellaporta, S.L., 1987, Inactivation of the maize transposable element *Activator (Ac)* associated with DNA modification, *EMBO J.*, 6: 295-302.

Close, T.J., Wanamaker, S.I., Caldo, R.A., Turner, S.M., Ashlock, D.A., Dickerson, J.A., Wing, R.A., Muehlbauer, G.J., Kleinhofs, A., Wise, R.P., 2004, A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age, *Plant Physiol.*, 134: 960-968.

Cubas, P., Vincent, C., Coen, E., 1999, An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry, *Nature*, 401: 157-161.

Czene, S., Harms-Ringdahl, M., 1995, Detection of single-strand breaks and formamidopyrimidine-DNA glycosylase-sensitive sites in DNA of cultured human fibroblasts, *Mutation Res.*, 336: 235-242.

Dahleen, L. S., 1995, Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43: 267-269.

Dahleen, L.S., 1999, Donor-plant environment effects on regeneration from barley embryo-derived callus, *Crop Sci.*, 39(3): 682-685.

Dahleen, L.S., Bregitzer, P., 2002, An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars, *Crop Sci.*, 42: 934-938.

Deragon, J.M., Capy, P., 2000, Impact of transposable elements on the human genome, *Ann. Med.*, 32: 264-273.

Dhaubhadel, S., Browning, K.S., Gallie, D.R., Krishna, P., 2002, Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress, *Plant J.*, 29(6): 681-691.

Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F., Krishna, P., 1999, Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings, *Plant Mol. Biol.*, 40(2): 333-342.

Dodds, J.H., Roberts, L.W., 1985, Experiments in plant tissue culture, Cambridge University Press, New York.

Doerfler, W., 1983, DNA methylation and gene activity, *Annu. Rev. Biochem.*, 52: 93-124.

Dudits, D., Nemet, G., Haydu, Z., 1975, Studies of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures, *Can. J. Bot.*, 53: 957-963.

Duncan, R.R., 1997, Tissue culture-induced variation and crop improvement, *Adv. Agron.*, 58: 201-240.

Dunwell, J.M., 1986, *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 4*, MacMillan & Co, London, 0-02-947940-1.

Echenique, V., Stamova, B., Wolters, P., Lazo, G., Carollo, L., Dubcovsky, J., 2002, Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the Triticeae EST databases, *Theor. Appl. Genet.*, 104: 840-844.

Eickbush, T.H., 1992, Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements, *New Biol.*, 4: 430-440.

Ellis, R.P., Forster, B.P., Robinson, D., Handley, L.L., Gordon, D.C., Russell J.R., Powell, W., 2000, Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *J. Exp. Bot.*, 51(342): 9-17.

Evans, D.A., 1989, Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications, *Trends Genet.*, 5: 346-350.

Evrensel, C., Yilmaz, S., Temel, A., Gozukirmizi, N., 2011, Variations in BARE-1 insertion patterns in barley callus cultures, *Genet. Mol. Res.*, Baskıda.

Fariduddin, Q., Ahmad, A., Hayat, S., 2004, Responses of *Vigna radiata* to foliar application of 28-Homobrassinolide and Kinetin, *Biol. Plant.*, 48(3): 465-468.

Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J., Dennis, E. S., 1998, DNA methylation in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 223-247.

Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., Svensson, B., 2002, Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley, *Plant Physiol.*, 129(3): 1308-1319.

Forster, B.P., Ellis, R.P., Thomas, W.T.B., Newton, A.C., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R.A., Bahri, M.H., Ben Salem, M., 2000, The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley, *J. Exp. Bot.*, 51: 19-27.

Fransz, P.F., Schel, J.H.N., 1990, Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*), *Can. J. Bot.*, 69: 26-33.

Fütterer, J., Potrykus, I., 1995, Transformation of Poaceae and gene expression in transgenic plants, *Agronomie*, 15: 309-319.

Gaponenko, A.K., Petrova, T.F., Iskakov, A.R., Sozinov, A.A., 1988, Cytogenetics of *in vitro* cultured somatic cells and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 75(6), 905-911.

Gaudinova, A., Süssenbekova, H., Vojtechova, M., Kamínek, M., Eder, J., Kohout, L., 1995, Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue, *Plant Growth Reg.*, 17(2): 151-156.

- Gendreau, E., Romaniello, S., Barad, S., Leymarie, J., Benech-Arnold, R., Corbineau, F., 2008, Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration, *J. Exp. Bot.*, 59(2): 203-212.
- Gille, G., Siegler, K., 1995, Oxidative stress and living cells, *Folia Microbiol.*, 40: 131-152.
- Gille, J.J.P.O., Van Berkel, C.G.M., Joenje, H., 1994, Mutagenicity of oxygen radicals in mammalian cell cultures, *Carcinogenesis*, 15: 2695-2699.
- Gold, M., Hurwitz, J., 1964, The enzymatic methylation of ribonucleic and deoxyribonucleic acid: 5. Purification and properties of the deoxyribonucleic acid-methylating activity of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 239: 3858-3865.
- Goldstein, C.S., Kronstad, W.E., 1986, Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*, *Theor. Appl. Genet.*, 71(4): 631-636.
- Gozukirmizi, N., Ari, S., Oraler, G., Okatan, Y., Palavan, N., 1990, Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley, *Acta Bot. Neerl.*, 39(4): 379-387.
- Gozukirmizi, N., Temel, A., 2011, Advances in barley biotechnology: Tissue culture and molecular markers, In: Barley: Production, Cultivation and Uses, Eds. (Elfson, S.B.), Nova Science Publishers.
- Grandbastien, M.A., 1998, Activation of plant retrotransposons under stress conditions, *Trends Plant Sci.*, 3: 181-187.
- Green, C.E., Phillips, R.L., 1975, Plant regeneration from tissue cultures of maize, *Crop Sci.*, 15: 417-421
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., Carter Cook, J., 1979, Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature*, 281: 216-217.
- Guo, W. L., Wu, R. Zhang, Y.F., Liu, X.M., Wang, H.Y., Gong, L., Zhang, Z.H., Liu, B., 2007, Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f, *Plant Cell Rep.*, 26: 1297-1307.
- Gupta, S.D., Datta, S., 2003/2004, Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration, *Biol. Plant.*, 47: 179-183.
- Gürel, F., Karakaş, Ö., Albayrak, G., Arı, Ş., 2009, Regeneration capacity of mature embryo-derived callus in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Acta Biol. Hung.*, 60(3): 309-319.

Hagege, D., 1995, Habituation in plant cell cultures: adaptation to free radical attacks, *CR Soc. Biol.*, 189: 1183-1190.

Hagege, D., Kevers, C., Salabert, P., Gaspar, T., 1992, Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganogenic sugarbeet calluses, *In Vitro Cell Dev.-Pl.*, 28(3): 143-147.

Hang, A., Bregitzer, P., 1993, Chromosomal variations in immature embryo-derived calli from six barley cultivars, *J. Hered.*, 84: 105-108.

Hang, A., Obert, D., Gironella, A.I.N., Burton, C.S., 2007, Barley amylose and β -glucan: their relationships to protein, agronomic traits, and environmental factors, *Crop Sci.*, 47: 1754-1760.

Hannah, L.C., Weil, C., 2004, Transposons and allelic diversity, Eds. Goodman, R., Dkker, M., in *Encyclopedia of Plant and Crop Plant Science*, Update 1, New York, 978-0-8247-0943-3.

Hansen, M., Lange, M., Friis, C., Dionisio, G., Holm, P.B., Vincze, E., 2007, Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition, *J. Exp. Bot.*, 58(14): 3987-3995.

Hayat, S., Ahmad, A., 2003, Nitrate reductase activity and yield of *Lens culinaris* sprayed with 28-homobrassinolide, *Acta Agron. Hung.*, 51(4): 381-387.

Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A., Ahmad, A., 2007, Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*, *Environ. Exp. Bot.*, 60(1): 33-41.

Hayat, S., Hasan, S.A., Yusuf, M., Hayat, Q., Ahmad, A., 2010, Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*, *Environ. Exp. Bot.*, 69(2): 105-112.

He, J.X., Gendron, J.M., Sun, Y., Gampala, S.S.L., Gendron, N., Sun, C.Q., Wang, Z.Y., 2005, BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses, *Science*, 307(5715): 1634-1638.

He, T., Jia, J.F., 2008, High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hk. f.) under endosperm-supported culture, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 95(2): 251-254.

Heinz, D.J., Mee, G.W.P., 1969, Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species, *Crop Sci.*, 9: 346-348.

Heinz, D.J., Mee, G.W.P., Nickell, L.G., 1969, Chromosome number of some *Saccharum* species hybrids and their cell suspension cultures, *Amer. J. Bot.*, 56: 450-456.

- Heinze, D.J., Mee, G.W.P., 1971, Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones derived from callus culture, *Amer. J. Bot.*, 58: 257-262.
- Hirochika H., 1993, Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture, *EMBO J.*, 12: 2521-2528.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M., 1996, Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 7783-7788.
- Hirochika, H., Fukuchi, A., Kikuchi, F., 1992, Retrotransposon families in rice, *Mol. Gen. Genet.*, 233: 209-216.
- Holme, I.B., Brinch-Pedersen, H., Lange, M., Holm, P.B., 2008, Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of *in vitro* cultured ovules, *Plant Cell Rep.*, 27(12): 1833-1840.
- Horvath, H., Jensen, L.G., Wong, O.T., Kohl, E., Ullrich, S.E., Cochran, J., Kannangara, C.G., von Wettstein, D., 2001, Stability of transgene expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines, *Theor. Appl. Genet.*, 102: 1-11.
- Huang, T.H.M., Laux, D.E., Hamlin, B.C., Tran, P., Lubahn, D.B., 1997, Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique, *Cancer Res.*, 57: 1030-1034.
- Huang, C.Y., Roessner, U., Eickmeier, I., Genc, Y., Callahan, D.L., Shirley, N., Langridge, P., Bacic, A., 2008, Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate-deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.), *Plant and Cell Physiol.*, 49(5): 691-703.
- IHGSC “International Human Genome Sequencing Consortium”, 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409: 860-921.
- IRGSP “International Rice Genome Sequencing Project”, 2005, The map-based sequence of the rice genome, *Nature*, 436: 793-780.
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J. B., Sabunciyar, S., Feinberg, A. P., 2009, The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores, *Nat. Genet.*, 41: 178-186.
- Ivandic, V., Hackett, C.A., Nevo, E., Keith, R., Thomas, W.T.B., Forster, B.P., 2002, Analysis of sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time, *Plant Mol. Biol.*, 48: 511-527.

- Jaccard, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 44: 223-270.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet.*, 33: 245-254.
- Jaffe, B., Kovacs, K., Andras, C., Bodi, Z., Liu, Z., Fray, R.G., 2008, Methylation of chloroplast DNA does not affect viability and maternal inheritance in tobacco and may provide a strategy towards transgene containment, *Plant Cell Rep.*, 27(8): 1377-1384.
- Jain, S.M., 2001, Tissue culture-derived variation in crop improvement, *Euphytica*, 118: 153-166.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L. P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y., Maciejewski, J. P., 2009, Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML, *Blood*, 113(6): 1315-1325.
- Johns, M.A., Mottinger, J., Freeling, M., 1985, A low copy number, *Copia*-like transposon in maize, *EMBO J.*, 4: 1093-1102.
- Johnson, S.S., Phillips, R.L., Rines, H.W., 1987, Possible role of heterochromatin in chromosome breakage induced by tissue culture in oats (*Avena sativa* L.), *Genome*, 29: 439-446.
- Jones-Held, S., VanDoren, M., Lockwood, T., 1996, Brassinolide application to *Lepidium sativum* seeds and the effects on seedling growth, *J. Plant Growth Reg.*, 15(2): 63-67.
- Joyce, S.M., Cassells, A.C., 2002, Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation, *Plant Cell Tiss. Org.*, 70: 125-137.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y., 2000, Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, *Plant Mol. Biol.*, 43: 179-188.
- Kaeppler, S.M., Phillips, R.L., 1993a, DNA methylation and tissue culture induced variation in plants, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29: 125-130.
- Kaeppler, S.M., Phillips, R.L., 1993b, Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8773-8776.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A., 1999, IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques, *Theor. Appl. Genet.*, 98: 704-711.
- Kalendar, R., Schulman, A.H., 2006, IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting, *Nat. Protoc.*, 1(5): 2478-2484.

- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E., Schulman, A.H., 2000, Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6603-6607.
- Karp, A., Maddock, S.E., 1984, Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos, *Theor. Appl. Genet.*, 67(2-3): 249-255.
- Kartal, G., Temel, A., Arican, E., Gozukirmizi, N., 2009, Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division, *Plant Growth Reg.*, 58(3): 261-267.
- Kazazian, H.H., Jr., Goodier, J.L., 2002, LINE drive: Retrotransposition and genome instability, *Cell*, 110: 277-280.
- Kenward, K.D., Bai, D., Ban, M.R., Brandle, J.E., 1999, Isolation and characterisation of *Tnd-1*, a retrotransposon marker linked to black root resistance in tobacco, *Theor. Appl. Genet.*, 98: 387-395.
- Kidwell, K.K., Osborn, T.C., 1992, Simple plant DNA isolation procedures, In: *Plant Genomes: Methods for Genetic and Physical Mapping*, Eds., Beckmann, J.S., Osborn, T.C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kim, S.L., Lee, Y., Lee, S.H., Kim, S.H., Han, T.J., Kim, S.K., 2008, Brassinolide influences the regeneration of adventitious shoots from cultured leaf discs of tobacco, *J. Plant Biol.*, 51: 221-226.
- Kole, P.C., Chawla, H.S., 1993, Variation of Helminthosporium resistance and biochemical and cytological characteristics in somaclonal generations of barley, *Biol. Plant.*, 35: 81-86.
- Komarova, N.Y., Grabe, T., Huigen, D.J., Hemleben, V., Volkov, R.A., 2004, Organization, differential expression and methylation of rDNA in artificial *Solanum* allopolyploids, *Plant Mol. Biol.*, 56: 439-463.
- Komatsu, M., Shimamoto, K., Kyozuka, J., 2003, Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon Karma, *Plant Cell*, 15: 1934-1944.
- Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundqvist, U., Fujimura, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Yano, M., 2007, Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(4): 1424-1429.
- Konieczny, R., Libik, M., Tuleja, M., Niewiadomska, E., Miszalski, Z., 2008, Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower, *Acta Physiol. Plant.*, 30: 71-79.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., 1997, Genetic approaches in plant physiology, *New Phytol.*, 137: 1-8.

Kooter, J.M., Matzke, M.A., Meyer, P., 1999, Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control, *Trends Plant Sci.*, 9: 340-347.

Koukalova, B., Fojtova, M., Lim, K.Y., Fulnecek, J., Leitch, A.R., Kovarik, A., 2005, Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations, *Plant Physiol.*, 139: 275-286.

Kour, G., Kour, B., Kaul, S., Dhar, M.K., 2009, Genetic and epigenetic instability of amplification-prone sequences of a novel B chromosome induced by tissue culture in *Plantago lagopus* L., *Plant Cell Rep.*, 28(12): 1857-1867.

Krikorian, A.D., Berquam, D.L., 1969, Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt, *The Botanical Review*, 35(1): 59-67.

Kronzucker, H.J., Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y., 1999, Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley analysis of component fluxes, *Plant Physiol.*, 120: 283-291.

Kumar, A., Bennetzen, J.L., 1999, Plant retrotransposons, *Annu. Rev. Genet.*, 33: 479-532.

Kumar, A., Garg, 2005, Isolation, purification and quantitation of nucleic acids, In: Genetic Engineering, Nova Science Publishers, 159454753X

Kumar, A., Pearce, S.R., McLean, K., Harrison, G., Heslop-Harrison, J.S., 1997, The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation evolution and use as molecular markers, *Genetica*, 100: 205-217.

Kunze, R., Saedler, H., 1997, Plant transposable elements, *Advances in Botanical Research*, 27: 331-470.

Lambe, P., Mutambel, H.S.N., Fouche, J.G., Deltour, R., Foidart, J.M., Gaspar, T., 1997, DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? 33(3): *In Vitro. Cell. Dev. Biol.-Plant.*, 33: 155-162.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., ve diğ., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409: 860-921.

Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Gill, B.S., 1984, Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture, *Theor. Appl. Genet.*, 68(6): 547-554.

Larkin, P.J., Scowcroft, W.R., 1981, Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.

Lazzeri, P.A., Brettschneider, R., Luhrs, R., Lorz, H., 1991, Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts, *Theor. Appl. Genet.*, 81(4): 437-444.

- Lee, M., Phillips, R.L., 1988, The chromosomal basis of somaclonal variation, *Annu. Rev. Plant Phys.*, 39: 413-437.
- Leigh, F., Kalendar, R., Lea, V., Lee, D., Donini, P., Schulman, A.H., 2003, Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques, *Mol. Genet. Genomics*, 269(4): 464-474.
- Lenoir, A., Lavie, L., Prieto, J.L., Goubely, C., Cote, J.C., Pelissier, T., Deragon, J.M., 2001, The evolutionary origin and genomic organization of SINEs in *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Biol. Evol.*, 18: 2315-2322.
- Leubner-Metzger, G., 2001, Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways, *Planta*, 213(5): 758-763.
- Li, X.L., Yu, X.M., Wang, N.N., Feng, Q.Z., Dong, Z.Y., Liu, L.X., Shen, J.L., Liu, B., 2007, Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link), *Plant Cell Tiss. Org.*, 90(2): 153-168.
- Libik, M., Konieczny, R., Pater, B., Slesak, I., Miszalski, Z., 2005, Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant, *Plant Cell Rep.*, 23: 834-841.
- Lightbourn, G., Veilleux, R., 2002, Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato, *Acta Hort.*, 619: 35-43.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004, DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture*, 238(1-4): 1-37.
- Lorz, H., Scowcroft, W.R., 1983, Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of *Su/su* heterozygotes of *Nicotiana tabacum*, *Theor. Appl. Genet.*, 66(1): 67-75.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M., 1989, DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs, *Theor. Appl. Genet.*, 77: 325-331.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fair, A. L., Randall, R. J., 1951, *Protein measurement with the Folin reagent*, *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- Lu, Z., Huang, M., Ge, D.P., Yang, Y.H., Cai, X.N., Qin, P., She, J.M., 2003, Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 73(1): 87-89.
- Lupotto, E., 1984, Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos, *Ann. Bot.*, 54: 523-529.

- Lührs, R., Lörz, H., 1987, Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring- and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties, *Theor. Appl. Genet.* 75: 16-25.
- Lührs, R., Nielsen, K., 1992, Microspore cultures as donor tissue for the initiation of embryogenic cell suspensions in barley, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 31(2): 169-178.
- Madlung, A., Comai, L., 2004, The effect of stress on genome regulation and structure, *Ann. Bot.*, 94(4): 481-495.
- Mahfouz, M.N., de Boucand, M.T., Gaultier, J.M., 1983, Caryological analysis of single cell clones of tobacco; relation between the ploidy and the intensity of the callogenesis, *Z. Pflanzenphysiol.*, 109: 251-257.
- Manoharan, M., Dahleen, L.S., 2002, Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus, *Plant Cell Rep.*, 21: 76-80.
- Manninen, I., Schulman, A.H., 1993, *BARE-1*, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Mol. Biol.*, 22: 829-846.
- Marcotrigiano, M., Jaganathan, L., 1988, *Paulownia tomentosa*, cultivar somaclonal Snowstorm, *HortSci.*, 226-227.
- Martienssen, R.A., Colot, V., 2001, DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi, *Science*, 293: 1070-1074.
- Matthews, P.R., Wang, M.B., Waterhouse, P.M., Thornton, S., Fieg, S.J., Gubler, F., Jacobsen, J.V., 2001, Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector, *Mol. Breed.*, 7: 195-202.
- McClintock, B., 1948, Mutable loci in maize, *Year B Carnegie Inst. Wash.*, 47: 155-169.
- McClintock, B., 1949, Mutable loci in maize, *Year B Carnegie Inst. Wash.*, 48: 142-154.
- McClintock, B., 1984, The significance of responses of the genome to challenge, *Science*, 226: 792-801.
- McCoy, T.J., Phillips, R.L., Rives, H.W., 1982, Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures: high frequency of partial chromosome loss, *Genome*, 24, 37-50.
- Meins, F., 1989, Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones, *Annu. Rev. Genet.*, 23: 395-408.

- Melayah, D., Bonnivard, E., Chalhoub, B., Audeon, C., Grandbastien, M.A., 2001, The mobility of the tobacco *Tnt1* retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors, *Plant J.*, 28(2): 159-168.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J., 2003, Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environ. Exp. Bot.*, 49(1): 69-76.
- Mi, Y., Zhang, C., Taya, K., 2007, Quercetin protects spermatogonial cells from 2,4-D-induced oxidative damage in embryonic chickens, *J. Reprod. Develop.*, 53(4): 749-754.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., Kakutani, T., 2001, Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*, *Nature*, 411: 212-214.
- Mix, G., Wilson, H.M., Foroughi-Wehr, B., 1978, The cytological status of plants of *Hordeum vulgare* L. regenerated from microspore callus, *Z. Pflanzenzuchtung*, 80: 89-99.
- Mohan, J.S., 2001, Tissue culture-derived variation in crop improvement, *Euphytica* 118: 153-166.
- Mott, R.L., Cure, W.W., 1978, Anatomy of maize tissue cultures, *Physiol. Plant.* 42: 139-145.
- Moyer, J.W., Collins, W.W., 1983, 'Scarlet' sweet potato, *HortSci.*, 18: 111-112.
- Murata, M., Orton, T.J., 1983, Chromosome structural changes in cultured celery cells, *In Vitro*, 19(2): 83-89.
- Müller, E., Brown, P.T.H., Hartke, S., Lörz, H., 1990, DNA variation in tissue-culture derived rice plants, *Theor. Appl. Genet.*, 80: 673-679.
- Nagaraju, J., Damodar Reddy, K., Nagaraja, G.M., Sethuraman, B.N., 2001, Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*, *Heredity*, 86: 588-597.
- Nair, A.S., Seo, B.B., 1995, Hormonal effects on chromosomal variability among the regenerated plants in *Allium senescens* L. var. Minor. Indian, *J. Exp. Biol.*, 33: 533-536.
- Nair, A.S., Teo, C.H., Schwarzacher, T., Heslop Harrison, P., 2005, Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers, *Euphytica*, 144: 285-290.
- Nakajima, N., Shida, A., Toyama, S., 1996, Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage [*Brassica chinensis*] mesophyll protoplasts, *Jpn. J. Crop Sci.*, 65(1): 114-118.

Neumann, P., Pozarkova, D., Macas, J., 2003, Highly abundant pea LTR retrotransposon Ogre is constitutively transcribed and partially spliced, *Plant Mol. Biol.*, 53: 399-410.

Nigam, A., Ayyagari, A., 2007, To estimate DNA by diphenylamine method, In: Lab Manual in Biochemistry, Immunology and Biotechnology, McGraw-Hill Education (India), 0070077452.

Nirmala, J., Dahl, S., Steffenson, B.J., Kannangara, C.G., von Wettstein, D., Chen, X., Kleinhofs, A., 2007, Proteolysis of the barley receptor-like protein kinase RPG1 by a proteasome pathway is correlated with Rpg1-mediated stem rust resistance, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104 (24): 10276-10281.

Nobre, J., Davey, M.R., Lazzeri, P.A., Cannell, M.E., 2000, Transformation of barley scutellum protoplasts: regeneration of fertile transgenic plants, *Plant Cell Rep.*, 19: 1000-1005.

Nunez, M., Siqueira, W.J., Hernandez, M., Zullo, M.A.T., Robaina, C., Coll, F., 2004, Effect of spirostane analogues of Brassinosteroids on callus formation and plant regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 78(1): 97-99.

Obert, B., Middlefell-Williams, J., Millam, S., 2008, Genetic transformation of barley microspores using anther bombardment, *Biotechnol. Lett.*, 30(5): 945-949.

Oh, M.H., Clouse, S.D., 1998, Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*, *Plant Cell Rep.*, 17: 921-924.

Oka, M., Rodic, N., Graddy, J., Chang, L.J., Terada, N., 2008, CpG sites preferentially methylated by Dnmt3a *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, 281: 9901-9908.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999, DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development, *Cell*, 99(3): 247-257.

Orgel, L.E., Crick, F.H.C., 1990, Selfish DNA: the ultimate parasite, *Nature*, 284: 604-607.

Orton, T.J., 1980, Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*, *Theor. Appl. Genet.*, 56(3): 101-112.

Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T., Türkan, İ., 2004, Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress, *Plant Growth Reg.*, 42: 203-211.

Papenfuss, J.M., Carman, J.G., 1987, Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin, *Crop Sci.*, 27(3): 588-593.

Pavet, V., Quinterno, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L., Alvarez, M.E., 2006, Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of

heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19: 577-587.

Pereira, H.S., Barao, A., Delgado, M., Morais-Cecilio, L., Viegas, W., 2005, Genomic analysis of *Grapevine Retrotransposon 1 (Gret1)* in *Vitis vinifera*, *Theor. Appl. Genet.*, 111(5): 871-878.

Peschke, V.M., Phillips, R.L., Gengenbach, B.G., 1987, Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants, *Science*, 238: 804-807.

Phillips, R.L., Kaeppler, S.M., Olhoft, P., 1994, Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 5222-5226.

Phillips, T., 2008, The role of methylation in gene expression, *Nature Education*, 1(1).

Pourkheirandish, M., Komatsuda, T., 2007, The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective, *Ann. Bot.*, 100(5): 999-1008.

Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A., 2003, The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 73: 245-256.

Purugganan, M.D., Wessler, S.R., 1995, Transposon signatures-species-specific molecular markers that utilise a class of multiple-copy nuclear-DNA, *Mol. Ecol.*, 4: 265-269.

Ramage, R.T., 1985, Cytogenetics, In Barley, D.C. Rasmusson, Ed. American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science of America, Madison, WI, pp. 127-154.

Ramulu, K.S., Dijkhuis, P., Roest, S., Bokelmann, G.S., de Groot, B., 1986, Variation in phenotype and chromosome number of plants regenerated from protoplasts of dihaploid and tetraploid potato, *Plant Breed.*, 97(2): 119-128.

Rechinger, C., 1893, *Untersuchungen iber die Grenzen der Theilbarkeit im Pflanzenreiche, Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*, 43: 310-334.

Reid, R., 2007, Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley, *Plant and Cell Physiol.*, 48(12): 1673-1678.

Rengel, Z., 1987, Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultured *Hordeum vulgare* mature embryos, *Plant Physiol. Biochem.*, 25: 43-48.

Rikiishi, K., Matsuura, T., Maekawa, M., Takeda, K., 2008, Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos, *Breed. Sci.*, 58(2), 129-135.

Ritala, A., Nuutila, A.M., Aikasalo, R., Kauppinen, V., Tammisola, J., Ritala, A., 2002, Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley, *Crop Sci.*, 42: 278-285.

Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., Gomez, M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Del Rio, L.A., Palma, J.M., 2004, Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Plant Cell Environ.*, 27(9): 1135-1148.

Roth, P.S., Bach, T.J., Thompson, M.J., 1989, Brassinosteroids: Potent inhibitors of growth of transformed tobacco callus cultures, *Plant Sci.*, 59(1): 63-70.

Rowold, D.J., Herrera, R.J., 2000, Alu elements and the human genome, *Genetica*, 108: 57-72.

Sablowski, R., Harberd, N.P., 2005, Plant genes on steroids, *Science*, 307: 1569-1570.

Sacristan, M.D., 1971, Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr., *Chromosoma*, 33(3): 273-283.

Saeidi, H., Rahiminejad, M.R., Heslop-Harrison, J.S., 2008, Retroelement Insertional Polymorphisms, Diversity and Phylogeography within Diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) Sub-taxa in Iran, *Ann. Bot.*, 101(6): 855-861.

Sairam, P.K., 1994, Effect of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture stress conditions of two wheat varieties, *Plant Growth Reg.*, 14: 173-181.

Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, G.C., 2002, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Sci.*, 163(5): 1037-1046.

[Sakurai, A., Fujioka, S., 1993, The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids, *Plant Growth Reg.*, 13\(2\): 147-159.](#)

Salisbury, F., Ross, C., 1991, *Plant Physiology*, 4th edition, Brooks Cole, 0534151620.

Sanal Kumar, P., Mathur, V.L., 2004, Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 78(3): 267-271.

Santos, D., Fevereiro, P., 2002, Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 70(2): 155-161.

Sasaki, H., 2002, Brassinolide promotes adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 71: 111-116.

Sasse, J.M., 1997, Recent progress in brassinosteroid research, *Physiol. Plant.*, 100(3): 696-701.

Schmid, C.W., 1996, Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA, *Prog. Nucleic Acid Res.*, 53: 283-319.

Schulman, A.H., Gupta, P.K., Varshney, R.K., 2004, Organization of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes, (Eds.) P.K. Gupta and R.K. Varshney, Cereal Genomics, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Shahpiri, A., Svensson, B., Finnie, C., 2008, The NADPH-dependent thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase, *Plant Physiol.*, 146: 789-799.

Shao, Q., Li, C.S., Chiren, B., 1982, Origin and evolution of cultivated barley: wild barley from Western Szechuan and Tibet China, *Barley Genet Newslett*, 12: 37-42.

Sharma, V.K., Hansch, R., Mendel, R.R., Schulze, J., 2005, Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.), *J. Exp. Bot.*, 56(417): 1913-1922.

Shepherd, N.S., Schwarz-Sommer, Z., von Spalve, J.B., Gupta, M., Wienand, U., Saedler, H., 1984, Similarity of the *Cin1* repetitive family of *Zea mays* to eukaryotic transposable elements, *Nature*, 307: 185-187.

Shimron-Abarbanell, D., Breiman, A., 1991, Comprehensive molecular characterization of tissue-culture-derived *Hordeum marinum* plants, *Theor. Appl. Genet.*, 83(1): 71-80.

Shirasu K., Schulman, A.H., Lahaye, T., Schulze-Lefert, P., 2000, A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion, *Genome Res.*, 10: 908-915.

Shoyama, Y., Zhu, X.X., Nakai, R., Shiraishi, S., Kohda, H., 1997, Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets, *Plant Cell Rep.*, 16: 450-453.

Singh, R.J., 1986, Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 72(5): 710-716.

Singh, R.J., 2002, Plant Cytogenetics, CRC Press, 0849323886.

Singh, R.J., 2006, Utilization of genetic resources for barley improvement, In: Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement: Cereals, Eds. Singh, R.J., Jauhar, J.J., Taylor & Francis Group, 0-8493-1432-1

Singh, I., Shono, M., 2005, Physiological and molecular effects of 24-Epibrassinolide, a Brassinosteroid on thermotolerance of tomato, *Plant Growth Reg.*, 47(2-3): 111-119.

Skirvin, R.M., Coyner, M., Norton, M.A., Motoike, S., Gorvin, D., 2000, Somaclonal variation: do we know what causes it? *AgBiotechNet*, 2(048): 1-4.

- Skirvin, R.M., Janick, J., 1976, Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101: 281-290.
- Smykal, P., Valledor, L., Rodriguez, R., Griga, M., 2007, Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.), *Plant Growth Reg.*, 26(11): 1985-1998.
- Sreenivasulu, N., Graner, A., Wobus, U., 2008, Barley genomics: An overview, *International Journal of Plant Genomics*, 13 pages.
- Steber, C.M. McCourt, P., 2001, A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 125(2): 763-769.
- Şener, O., Can, E., Arslan, M., Çeliktaş, N., 2008, Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.), *Biotech. Biotechnol. Equip.*, 22(4): 915-920.
- Takatsuto, S., Yazawa, N., Ikekawa, N., Takematsu, T., Takeuchi, Y., Koguchi, M., 1983, Structure-activity relationship of brassinosteroids, *Phytochemistry*, 22: 2437-2441.
- Takatsuto, S., 1994, Brassinosteroids: distribution in plants, bioassay and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 658(1): 3-15.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H., Hirochika, H., 1999, A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors, *Plant J.*, 18: 383-393.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H., Hirochika, H., 1998, Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate, *Plant Mol. Biol.*, 36: 365-376.
- Talame, V., Bovina, R. Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., Lundqvist, U., Salvi, S., 2008, TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley, *Plant Biotechnol. J.*, 6(5): 477-485.
- Tanno, K., Taketa, S., Takeda, K., Komatsuda, T. 2002, A DNA marker closely linked to *vrs1* locus (row type gene) indicates multiple origins of six-rowed cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 104, 54-60.
- Temel, A., Kartal, G., Gözükırmızı, N., 2008, Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures, *Biotech. Biotechnol. Equip.*, 22(4): 911-914.
- Tilghman, S.M., 1993, DNA methylation: a phoenix rises, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8761-8762.

Torbert, K.A., Rines, H.W., Somers, D.A., 1998, Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures, *Crop Sci.*, 38: 226-231.

Torrey, J.G., 1961, Kinetin as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells, *Exp. Cell Res.*, 23: 281-299.

Tsang, E.T.W., Bowler, C., Herouart, D., Van Kamp, W., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1991, Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress, *Plant Cell*, 3: 783-792.

van Rijn, C.P.E., Heersche, I., van Berkel, Y.E.M., Nevo, E., Lambers, H., Poorter, H., 2000, Growth characteristics in *Hordeum spontaneum* populations from different habitats, *New Phytol.*, 146: 471-481.

Vanyushin, B.F., Kirnos M.D., 1988, DNA methylation in plants, *Gene*, 74: 117-121.

Vanyushin, B.F., Mazin, A. L., Vasiliev, V.K., Belozersky, A.N., 1973, The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity, *Biochim. Biophys. Acta.*, 299: 397-403.

Vardhini, B.V., Rao, S.S.R., 1998, Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*, *Phytochemistry*, 48(6): 927-930.

Vardhini, B.V., Rao, S.S.R., 2003, Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum, *Plant Growth Reg.*, 41(1): 25-31.

Varshney, R.K., Langridge, P., Graner, A., 2007, Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley, *Adv. Genet.*, 58: 121-155.

Vasil, I.K., 1994, Molecular improvement of cereals, *Plant Mol. Biol.*, 25: 925-937.

Veilleux, R.E., Johnson, A.T., 1998, Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization, *Plant Breed. Rev.*, 16: 229-268.

Vidmar, J.J., Zhuo, D., Siddiqi, M.Y., Schjoerring, J.K., Touraine, B., Glass, A.D.M., 2000, Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley, *Plant Physiol.*, 123: 307-318.

Vitte, C., Panaud, O., 2004, LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model, *Cytogenet. Genome Res.*, 110(1-4): 91-107.

von Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jorgensen, R.B., Linde-Laursen, I., 1995, An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. 2nd edn. Rome: International Plant Genetic Resources Institute; Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 7.

von Bothmer, R., Sato, K., Komatsuda, T., Yasuda, S., Fischbeck, G., 2003, The domestication of cultivated barley. In: von Bothmer R, Hintum Tv, Knüpffer H, Sato K, editors. Diversity in barley (*Hordeum vulgare*) Amsterdam: Elsevier; 2003. pp. 9–27.

Wacksman, J.T., 1997, DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis, *Mutation Res.*, 375: 1-8.

Wang, Z.Y., He, J.X., 2004, Brassinosteroid signal transduction-choices of signals and receptors, *Trends Plant Sci.*, 9(2): 91-96.

Ware, D., Jaiswal, P., Ni, J., Pan, X., Chang, K., Clark, K., Teytelman, L., Schmidt, S., Zhao, W., Cartinhour, S., McCouch, S., Stein, L., 2002, Gramene: a resource for comparative grass genomics, *Nucleic Acids Res.*, 30: 103-105

Warner, R.L., Kleinhofs, A., 1992, Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants, *Physiol. Plant*, 85: 245-252.

Wessler, S.R., 1996, Turned on by stress. Plant retrotransposons, *Curr. Biol.*, 6: 959-961.

Wessler, S.R., 2006, Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(47): 17600-17601.

White, P.R., 1954, The cultivation of animal and plant cells, Ronald Press Co., New York.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., Schulman, A.H., 2007, A unified classification system for eukaryotic transposable elements, *Nat. Rev. Genet.*, 8: 973-982.

Wilson, G.G., 1988, Type II restriction-modification systems, *Trends Genet.*, 4: 314-318.

Wiseman, H., Halliwell, B., 1996, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochem. J.*, 313: 17-29.

Wu, M., Ho, S.M., 2004, *PMP24*, a gene identified by MSRF, undergoes DNA hypermethylation-associated gene silencing during cancer progression in an LNCaP model, *Oncogene*, 23: 250-259.

Yahraus, T., Chandra, S., Legendre, L., Low, P.S., 1995, Evidence for a mechanically induced oxidative burst, *Plant Physiol.*, 109: 1259-1266.

Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., 2005, A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis, *Cell*, 120(2): 249-259.

Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H., 1997, Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites, *Trends Genet.*, 13: 335-340.

Yokota, T., Takahashi, N., 1986, Chemistry, physiology, and agricultural application of brassinolide and related steroids, *In* Bopp, M., ed, *Plant Growth Substances*, Springer-Verlag, Berlin.

Yuan, G.F., Jia, C.G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L.P., Liu, N., Wang, Q.M., 2010, Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress, *Sci. Hortic-Amsterdam*, 126(2): 103-108.

Xiong, Y., Eickbush, T.H., 1990, Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences, *EMBO J.*, 9: 3353-3362.

Zhu, J.K., 2009, Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases, *Annu. Rev. Genet.*, 43: 143-166.

Ziauddin, A., Kasha, K.J., 1990, Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*): auxin effects on culture initiation and maintenance, *Euphytica*, 48: 171-176.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi Sarıyer İlköğretim okulunda, orta ve lise öğrenimimi Vefa Lisesinde tamamladım. 2000 yılında başladığım İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl başladığım, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programındaki yüksek lisans eğitimimi, Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı'nın danışmanlığında, 2007 yılında tamamladım. Aynı sene, İ. Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında, Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı'nın danışmanlığında doktora eğitimime başladım. Yükseköğretim Kurulunun yurtdışı doktora araştırma bursundan yararlanarak, 2009 Eylül-2009 Aralık ile 2010 Ocak-2010 Eylül tarihleri arasında, Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) araştırma enstitüsünde misafir araştırmacı olarak bulundum. 2009 yılının ocak ayından bu yana, İ. Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.