

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PATLİCAN (*Solanum melongena* L.) BİTKİSİ TOHUMLARININ
ÇİMLENMESİNDE ÇİNKO (Zn) STRESİ İLE MEYDANA GELEN DNA
DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Shapour GHABELNEZAM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Shapour GHABELNEZAM tarafından hazırlanan “**Patlıcan (*Solanum Melongena* L.) Bitkisi Tohumlarının Çimlenmesinde Çinko (Zn) Stresi İle Meydana Gelen DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 23/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU
Gazi Üniversitesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. N.Münevver PINAR
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

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

23.01.2015

Shapour GHABELNEZAM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PATLİCAN (*Solanum melongena* L.) BİTKİSİ TOHUMLARININ ÇİMLENMESİNDE ÇİNKO (Zn) STRESİ İLE MEYDANA GELEN DNA DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Shapour GHABELNEZAM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Bitkilerin gelişip büyümelerini etkileyen birçok stres faktörü bulunmaktadır. Ağır metal kirliliği bu faktörlerden biridir. Günümüzde ağır metal kirliliği önemli çevresel problemlerden birisidir. Yüksek konsantrasyonlardaki bazı ağır metaller bitkileri ve bitkilerle beslenen insan ve hayvanları olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Hatta bu ağır metallerin bir kısmı düşük konsantrasyonda bile hücre ve dokularda toksik hasarlara neden olabilirler.

Bu çalışmada, çinko (Zn) konsantrasyonuna maruz kalan patlıcan (*Solanum melongena* L.) tohumlarında çimlenme aşamasında meydana gelen etkilerin moleküler düzeyde ve populasyon düzeyinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Artan Zn konsantrasyonu ile patlıcan tohumlarının kökünde büyümenin, kuru ağırlık ve toplam çözünür protein içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Ancak toksik sınırlara ulaşıldığında çimlenmenin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Ekotoksikolojide, RAPD analizi bitkiler için uygun bir biobelirteç olarak kabul edilmektedir. RAPD analizi için, 8 RAPD primerinin özgün polimorfik bant paterni gösterdiği bulunmuştur ve bunu takiben patlıcan tohumlarının kontrol örneklerinde belirlenen toplam 129 bant kullanılmıştır. Zn kontaminasyonundan sonar kontrol tohumlarına göre RAPD profilindeki değişiklikler çeşitli bant kazancı ve/veya kaybı içermiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki çeşitli çinko konsantrasyonlarında RAPD profiline göre genomik kalıp stabilitesi değişmiştir.

Ocak 2015, 31 sayfa

Anahtar Kelimeler: Patlıcan, ağırmetal, çinko, RAPD, genomik kalıp stabilit

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF DNA CHANGES IN EGGPLANT (AUBERGINE) (*Solanum melongena* L.) SEEDLINGS INDUCED BY ZINC STRESS

Shapour GHABELNEZAM

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

There are many stress factors affecting the development and growth of plants .heavy metal pollution is one of these factors. Recently, heavy metal pollution of major environmental problems. High concentrations of some heavy metals adversely affect plants and animals and human beings that are fed from plants and can cause toxic damage in cells and tissues.

The purpose of this study is to determine the effects occurred in the seeds of eggplant seeds (*solanum melongena* L.) during germination stage that are exposed to zinc (ZN) concentration exposed at a molecular level and population level. With increasing concentration of Zn in the growth of the roots of eggplant seeds, it has been determined that dry weight and total soluble protein content was increased. However, when toxic limits are reached it has been observed that germination did not occur. In Ecotoxicology RAPD analysis is considered as a suitable biomarker for plants. For RAPD analysis, 8 of the original RAPD primers were determined in control samples of eggplant seeds. After ZN contamination 129 tape was used that were determined in control seeds changes have contained various band gain and/or loss. These results showed that in various zinc concentration genomic mold stability has been changed according to RAPD profile.

January 2015, 31 pages

Key Words: Eggplant, heavy metal, zinc, RAPD, genomic mold stability

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında çalışmalarımı yönlendiren ve araştırmalarımın her aşamasında katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof.Dr. E.Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) içtenlikle teşekkür ederim .

Bilimsel çalışmaların yanında önemli katkılarda bulunan her aşamada bir hoca bir arkadaş olarak desteklerini esirgemeyen sayın hocam İlker BÜYÜK ve Ersin ALTUNKAYNAK'a içtenlikle teşekkür ederim .

Hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen aileme, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü öğretim elemanları ve değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Shapour GHABELNEZAM

Ankara, Ocak 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Moleküler Belirteçler.....	4
2.1.1 Hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri.....	5
2.1.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı).....	5
2.1.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)’a dayalı DNA belirteçleri.....	5
2.1.2.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – çoğaltılmış parça uzunluk farklılığı).....	6
2.1.2.2 SSR (Simple Sequence Repeat – Basit Dizi Tekrarları).....	7
2.1.2.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region – Dizin Karakterli Çoğaltılmış Bölge).....	7
2.1.2.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış DN Farklılığı).....	8
2.2 Kaynak Özeti.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1 Materyal.....	11
3.2 Yöntem.....	11
3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonu.....	11
3.2.2 Çimlendirme Yöntemi.....	11
3.2.3 Ölçüm ve analizler.....	11
3.2.3.1 Bitki kök boyu ve kuru ağırlık tayini.....	11

3.2.3.2 Toplam çözümlür protein içeriğinin belirlenmesi	12
3.2.3.3 DNA izolasyonu.....	12
3.2.3.4 RAPD-PCR uygulamaları.....	14
3.2.3.4.1 RAPD bileşenleri ve koşulları.....	14
3.2.3.4.2 Agaroz jel elektroforezi.....	15
3.2.3.5 Veri analizleri	15
3.2.3.5.1 İstatistiksel analizler	15
3.2.3.5.2 Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS).....	15
4. BULGULAR.....	16
4.1 Patlıcan Bitkisinin Kök Büyümesi Üzerine Çinko Stresinin Etkisi.....	16
4.2 Patlıcan Bitkisinin Kök Kuru Ağırlığı Üzerine Çinko Stresinin Etkisi.....	16
4.3 Patlıcan Bitkisinin Toplam Çözümlür Protein Miktarı Üzerine Çinko Stresinin Etkisi.....	17
4.4 Çinko Stresinin Patlıcan Bitkisinde RAPD Sonuçlarına Etkisi.....	18
4.5 Çinko Stresine Maruz Kalmış Patlıcan Örneklerinin Popülasyon Parametrelerinin İstatistiksel Analizi.....	21
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	22
KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ.....	31

SİMGELER DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyumhidroksit
Nm	Nanometre
°C	Santigrat
Rpm	Dakikada Devir
ppm	milyonda bir

Kısaltmalar

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
BSA	Bovine Serum Albumin
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
dNTP	Deoksi Nukleotid Trifosfat
EDTA	Etilen Daimin Tetraasetik Asit
GKS	Genomik Kalıp Stabilitesi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PVPP	Poli vinil Poli pirolidon
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SCAR	Dizin Karakterli Çoğaltılmış Bölge (Sequence Characterized Amplified Region)
SSR	Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats)
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetişen patlıcan bitkisine ait kök uzunlukları.....	16
Şekil 4.2 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetişen patlıcan bitkisine ait kök Kuru ağırlıkları.....	17
Şekil 4.3 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetişen patlıcan bitkisine ait toplam çözünür protein miktarları.....	17
Şekil 4.4 OPC 02 ve OPC 03 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol.....	19
Şekil 4.5 OPC 04 ve OPC 05 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol.....	19
Şekil 4.6 OPC 06 ve OPC 07 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol.....	20
Şekil 4.7 OPC 08 ve OPC 09 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Patlıcan bitkisine ait DNA'ların nanodrop ölçümleri.....	13
Çizelge 3.2 RAPD-PCR uygulamasında kullanılan primerler ve diziler.....	14
Çizelge 4.1 RAPD-PCR analizi sonunda örneklere ait bant farklılıklar.....	18
Çizelge 4.2 Populasyon parametrelerinin istatistiksel analizi.....	21

1. GİRİŞ

Çevrenin toksik metaller ile kirlenmesi endüstriyel devrimin başlangıcından bu yana hızlanmıştır (Nriogo 1979). Bu kirlenmenin esas kaynakları atık yakıtların yakılması, madencilik, maden cevheri dökümü, belediye atıkları, gübreler, böcek zehirleri ve kanalizasyondur (Kabata ve Pendias 1989). Toprak kirliliği açısından bakıldığında, ağır metallerin en önemli kirleticiler arasında olduğu görülmektedir.

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın hazırladığı 129 tane öncelikli çevre kirleticileri arasında yer alan ağır metaller, en önemli çevre kirleticiler gruplarından birini oluşturmaktadır. Kaynağı ne olursa olsun, çevre kirliliği bitkilerde strese yol açar. Bu durum bitkilerin fizyolojisini etkiler, onları genetik potansiyellerinden alıkoyar, verimliliklerini kısıtlar ve ölümlerine yol açarak büyük miktarlarda ürün kayıplarına neden olur. Tüm bitkiler, toprak ve sudan büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan ağır metalleri biriktirme yeteneğine sahiptirler. Bu metaller Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo ve Ni içerir (Langille ve Maclean 1976). Bunlar bitkiler için esansiyel elementlerdir. Örneğin bakır ve çinko gibi ağırmetallerin normal konsantrasyonları, bitkilerin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan protein ve enzimlerin yapısında kofaktör olarak görev alırlar (Steffens 1990, Moustakas vd. 1994). Mikrobesein elementi olsun veya olmasın ağır metallerin bitkide aşırı birikimi strese, büyüme ve gelişmede azalmaya sebep olur (Van Assche ve Clijters 1990, Ouzounidou 1994).

Bazı bitkiler bilinmeyen biyolojik fonksiyonları olan ağır metalleri biriktirme yeteneğine de sahiptir. Bunlar Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se ve Hg dir (Hanna ve Grant 1962, Baker ve Brooks 1989). Bununla birlikte, bu ağır metallerin aşırı birikimi birçok bitki için toksik olabilir. Bitkilerde ağır metal fazlalığı kök hücrelerine zarar verdiğinden kökün hayati faaliyeti azalır ve inorganik malzemelerin emilimini önler ve sonuçta klorozise neden olur (Shu vd. 1997).

Ağır metallerin bitkilerde hücre bölünmesi üzerinde etkileri vardır. Ancak bu etkiler farklılık gösterir ve ağır metallerin oranına ve türüne bağlıdır (Mo ve Li 1992). Duan ve Wang ve Wu (1995) tarafından gerçekleştirilen çalışmada fasulye bitkisi üzerinde

kadmiyum, kurşun ve çinko ağır metallerinin etkisi incelenmiş ve bunun sonucunda artan ağır metal konsantrasyonu ile hücre döngü süresinin uzadığı ve hücre bölünmesinde azalma meydana geldiği kaydedilmiştir.

Bitkilerde yüksek ağır metal konsantrasyonları hücre membranının geçirgenliğini değiştirir (Patra vd. 2004). Ağır metaller, bitkilerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu stres cevabı olarak teşvik etmektedir (Dietz vd. 1999). Ağır metaller, serbest radikal oluşumuna neden olarak da toksik etkilerini göstermektedir (Mallick 2004). Süperoksit (O_2) içeren oksijenden bağımsız radikaller, hidroksil radikaller (OH), ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikaller , ağır metal stresi boyunca zar lipidlerinin peroksidasyonu, iyon kaybı, protein bölünmesi, inaktivasyon ve hatta DNA bölünmesi gibi çoklu etkilere sebep olabilir (Reeves 1980, Aravind ve Prasad 2003). Hidroksil radikal hücredeki en reaktif oksidantlardandır ve tüm biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilir ve fazla miktarda üretildiğinde hücrelerin ölümüne sebep olur, hidrojen peroksit ise Oksitleyici özelliği var ve metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranır ve proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile reaksiyona girerek reaktif demir formlarını oluşturur ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna sebep olur (Haber vd. 1934, Asada vd. 1974).

Ağır metal iyonlarının DNA üzerinde etkileri vardır. Pozitif yüklü metal iyonları, DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları ve azot, oksijen gibi bazların elektron vericisi olan atomları ile bağlanır. Böylece, DNA'daki bazlar arasındaki zayıf H bağları kopmakta ve DNA'nın tek veya çift zincirinin hasarlanmasına neden olmaktadır (Anastassopoulou 2003).

Bitkilerin normal bir şekilde büyümeleri için ihtiyaç duydukları çinko (Zn) miktarı oldukça azdır. Bitkilerde Zn konsantrasyonu normalde $27-150 \text{ mg kg}^{-1}$ iken toksik seviye $100-400 \text{ mg kg}^{-1}$ arasındadır (Stevenson ve Cole 1999). Ancak, bitkiler için topraktaki Zn toksisitesinin kritik seviyesi, iklim faktörleri, toprak çeşitleri ve bitki genotipine bağlı olarak değişir. Diğer ağır metaller gibi fazla miktardaki Zn, elektron taşınması, zar geçirgenliği ve besleyici öğelerin yer değiştirmesinde önemli değişiklikler gösterir (Wang vd. 2009). Çinkonun fazlalığında bitkilerde kök ve sürgün büyümesi

azalır, kökler inceler, genç yapraklar kıvrılır, açık yeşilden sarıya döner (kloroz), hücre genişlemesini ve büyümesi engellenir, hücre organelleri parçalanır ve klorofil sentezi azalır (Rout ve Das 2003).

Diğer bir çalışmada çinko fazlalığının fasulye bitkisinin üzerine etkisi incelenmiş, artan çinko kontrasyonlarıyla ilişkili olarak kök, gövde ve yaprak büyümesinin azaldığı tespit edilmiştir (Zengin ve Munzuroğlu 2005).

Tez kapsamında model bitki olarak seçilen patlıcan (*Solanum melongena* L.) Solanaceae familyasının, *Solanum* L. cinsine dâhil olup ılık iklimlerde yıllık, tropik iklimlerde ise ufak bir ağaç şeklinde büyüyen birkaç yıllık bir kültür bitkisidir. Patlıcan, sıcak iklim sebzesidir, soğuklardan çok etkilenir. Yetiştirilme devresinde optimum sıcaklık isteği 25-30°C'dir. Hatta 35-40°C'de bile gelişme zararlanmadan devam eder.

Türkiye'de yıllık patlıcan üretimi 800-850 bin ton arasında değişmektedir. Üretim özellikle Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Marmara bölgelerine dağılmış olup bu bölgelerin Türkiye toplam üretimindeki payları sırasıyla %30, %25, %15, %10'dur. Yetiştirilen ürünün büyük bir bölümü iç pazarda taze olarak tüketilmekte, az bir kısmı ihraç edilmektedir. Sera yetiştiriciliğinde domates, hıyar ve biberden sonra yaklaşık %10'luk bir oranla patlıcan dördüncü sırada yer almaktadır (Abak 1993).

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Moleküler Belirteçler

Bitki ıslahında kullanılacak belirteç tipleri; morfolojik belirteçler, biyokimyasal belirteçler ve moleküler belirteçler olarak üçe ayrılırlar ki bunlar içinde en güvenilir ve en çok kullanılanı moleküler belirteçlerdir.

Moleküler belirteçler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Moleküler belirteçler, polimeraz zincir reaksiyonuna bağlı olmayanlar (RFLP) ve bağlı olanlar (RAPD, AFLP, SSR) olarak adlandırılmaktadır (Staub vd. 1996, Ridout ve Donini 1999).

Moleküler belirteçler, morfolojik ve biyokimyasal belirteçlere göre bir çok avantajlara sahiptirler (Botstein vd. 1980, Helentjaris vd. 1985, Williams vd. 1991).

Bunlar;

- Genoma bağlı olduklarından güvenilirlerdir,
- Tekrarlanabilir ve laboratuvarlar arasında standardize edilebilirler,
- Genomda çok bölgeyi belirleme imkanına sahiptirler,
- Çevresel ve genetik (epistasis) faktörlerden etkilenmezler,
- Dominat ve kodominat özellik göstermektedirler,
- Bütün dokularda tanımlanabilmektedirler,

Moleküler belirteçler, hibridizasyona dayalı ve PZR'ye dayalı belirteçler olmak üzere ikiye ayrılabilir.

2.1.1 Hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri

2.1.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı)

RFLP tekniğinde genomik DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir ve değişik uzunlukta DNA parçaları elde edilir. Bu parçaların tanımlanması için DNA parçaları agaroz jel elektroforezi ile ayrılır sonra nitroselüloz veya naylon membran üzerine geçirildiği Southern blot işlemi (Southern 1975) yapılır. Naylon membrana sabitlenen DNA, radyoaktif işaretlenmiş bir prob ile hibridize edilir. Problar genellikle küçük (500-3000 baz çifti) klonlanmış DNA (genomik ve ya cDNA) parçalarıdır. Radyoaktif DNA hibritleri otoradyografi ile bantlar halinde gözlemlenebilir. Bu bantlar RFLP'nin görsel hale geçmesidir ve kodominant belirteçlerdir (Staub vd. 1996). RFLP tekniği, PCR metoduyla birlikte, nDNA veya mtDNA üzerindeki bölgelerde kullanılabilmektedir.

RFLP yönteminin avantajları:

- Güvenilirliği fazla ve Sonuçlar farklı laboratuvar arası, aynıdır.
- Kodominant belirteçlerdir dolayısıyla heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonunda kullanılır.

RFLP yönteminin dezavantajları:

- İşçiliği fazla ve uzun zaman alır ve analizleri pahalıdır.
- Fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır.
- Radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır.

2.1.2 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı DNA belirteçleri

Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR), birçok büyüklük dizimi boyunca bir DNA parçasının tek veya birkaç kopyasını artırmak için kullanılan, belli bir DNA sekansının binlerce, milyonlarca kopyasını üreten, moleküler biyolojide kullanılan bilimsel bir

tekniktir. PZR artık tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında birçok uygulamada kullanılan yaygın ve vazgeçilmez bir tekniktir. PZR tekniği, genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti, moleküler klonlama, DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi, genetik akrabalık ve adli tıp vakalarının tespitinde kullanılmaktadır. PZR tekniğinde bulunan üç temel adım vardır: denatürasyon, yeniden birleştirme ve genişletme (Mohini Joshi 2011).

PZR, Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olup, moleküler biyolojinin hızlı bir şekilde gelişmesine büyük katkı sağlamıştır (Mullis ve Faloona 1987, Steffan ve Atlas 1991).

2.1.2.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Çoğaltılmış Parça Uzunluk Farklılığı)

AFLP tekniğinde genomic DNA iki restriksiyon enzimiyle (4 baz ve 6 baz) kesilmekte ve DNA'nın kesilmesi sonucu oluşan DNA parçacıklarına adaptörlerle birleştirme (ligasyon) yapılmaktadır. Birleştirilen bu adaptörlere uygun primerler ile restriksiyon fragmentlerin pre-amplifikasyonu yapılır. Oluşturulan fragmentlerin radyoaktif işaretli özel primerlerle selektif amplifikasyonları sağlanır. Elde edilen PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir (Vos vd. 1995, Ergül 2000).

AFLP yönteminin avantajları:

- Farklı laboratuvarlarda cihaz farklılığı sonucu etkilemez.

AFLP yönteminin dezavantajları:

- Radyoaktif işaretleme yapılır.
- Dominant belirteçlerdir.

2.1.2.2 SSR (Simple Sequence Repeat – Basit Dizi Tekrarları)

SSR, tekrarlanan ve ökaryotik genomlarda rastgele yayılan 1-6 nükleotid birimin uzantısıdır. SSR, tekrarlanan birimlerin sayısını etkileyen yüksek mutasyon oranı nedeniyle oldukça polimorfiktir. Bu tür uzunluk polimorfizmler, tekrarlanmayı destekleyen özgün bir çift primer kullanarak elde edilen PZR (polimeraz zincirleme reaksiyonu) ile sağlamlaştırılmış parçalar ile yüksek çözünürlü jellerde (sekanslama jeli) kolaylıkla belirlenebilir (Weber ve May 1989). Tekrarlanan bölgelere özgü spesifik primerler geliştirilmekte ve bu primerler ile PZR yapılmaktadır. PZR ürünleri, elektroforez yapıldıktan sonra EtBr veya gümüş nitrat kullanılarak boyandıktan sonra polimorfizm aranmaktadır. SSR'nin diğer moleküler işaretleyicilere göre birçok avantajı vardır. Örneğin, (i) mikro-uydular tek bir lokustaki birçok allelin tanımlanmasını sağlar, (ii) genomun her yerine eşit olarak dağılmışlardır, (iii) kodominantlardır, (iv) küçük bir DNA gerekir ve (v) analiz yarı otomatik ve radyoaktiviteye ihtiyaç duymadan gerçekleştirilmiş olabilir. SSR tekniğinin dezavantajları ise fazla iş gücü gerektirir ve maliyeti yüksektir (Guilford vd. 1997, Gianfranceschi vd. 1998, Maliepaard vd. 1998).

2.1.2.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region – Dizin Karakterli Çoğaltılmış Bölge)

Bu yöntemde, RAPD neticesi elde edilen DNA bandları klonlanmakta ve DNA baz dizilişleri belirlenmektedir. Bu değişiklik gösteren DNA parçacığının bir kısmına 18-24 baz uzunluğunda spesifik primerler dizayn edilmekte ve PCR çalışmasında faydalanılmaktadır. SCAR yöntemi genom kütüphanelerinin taranmasında ve gen haritalama çalışmalarında, değerlendirilmektedir (Weising vd. 1995).

SCAR, RAPD'e göre daha çok tekrarlanabilir ve elektroforeze eksikliğinin olmadığı var/yok dağılımlarına dönüştürülebilirler. SCAR'lar genelde dominant belirteçlerdir ama kodominant belirteçlere dönüştürülmesi için 4 baz çifti restriksiyon enzimleri ile kesilir ve DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ve ya SSCP (Single Strand Comformation Polymorphism) yöntemleri ile tanımlanarak dönüştürülebilirler (Rafalski ve Tingey 1993).

SCAR yönteminin avantajları:

- RAPD belirteçlerde istenmeyen amplifikasyon ürünleri elde edilirken SCAR belirteçler spesifiklik gösterir.
- Kodominant belirteçlerdir.

SCAR yönteminin dezavantajları:

- Fazla zaman alır ve iş gücü gerektirmektedir.

2.1.2.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)

RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde, bir primer kullanılır. Bu primerler rastgele hazırlanmış 6-10 baz uzunluğundaki oligonükleotid primerleridir. Primer genomik DNA üzerinde komplementeri olan, birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesinin amplifikasyonunu sağlar. Bu şekilde çoğaltılan DNA dizileri agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyanır. Karşılaştırılan örnekler arasında görünen aynı (monomorfik) ve farklı (polimorfik) DNA bantları sayılarak sonuçlar değerlendirilmektedir (Welsh 1990, Williams 1990).

RAPD yönteminin avantajları:

- Az miktarda DNA gerektirir.
- Radyoaktif değildir.
- Analizleri ucuzdur ve az iş gücü gerektirir ve hızlı bir tekniktir.

RAPD yönteminin dezavantajları:

- Güvenilirliği sınırlıdır, farklı laboratuvarlarda cihaz farklılığı farklı sonuç verebilir.
- Dominant belirteçlerdir.

2.2 Kaynak Özeti

Domates ve patlıcan bitkileri ile gerçekleştirilen çalışmada farklı konsantrasyonlarda kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) streslerinin etkileri incelenmiş ve patlıcan bitkisinde 150 ppm kurşun stresinin ve 3 ppm kadmiyum stresinin toksik etki yaratmak için yeterli olduğu gösterilmiştir (Khan ve Khan 1983).

Atık su ile sulamanın patlıcan bitkisi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada normal su ile sulandığında elde edilen ürün miktarının, atık su ile yapılan sulama sonucunda iki kat arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebi atık suyun azot, fosfor ve potasyum gibi besin maddeleri açısından zengin olması şeklinde açıklanmıştır. Ancak, patojeni mikroorganizmalarca da zengin olan bu suların sağlık açısından riskli olduğu bildirilmiştir (Al-Nakshabandi vd. 1997). Bunun yanı sıra Bletsos vd. (1999) atık su ile patlıcan bitkisi üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada bitkide biriken metal seviyesinin sınırın altında olduğunu ve atık suyun ürün yetiştirmede kullanılabilirliğini belirtmişlerdir.

Patlıcan tohumlarının civa (Hg) ve kadmiyum (Cd) stresi altında çimlendirildiği çalışmada yüksek konsantrasyonların toksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (Neelima ve Reddy 2003).

Sierra vd. (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada, toprakta civa birikimine (14.16 ppm) sebep olan madencilik endüstrisinin bulunduğu bölgede (Almaden) patlıcan bitkisinin kök ve gövde uzunluğu, yaş ve kuru ağırlık değerleri ve organlardaki metal seviyesi ölçümleri sonucunda bitkide herhangi bir toksisitenin oluşmadığını tespit etmişlerdir.

Birçok araştırmacı ağır metallerin genotoksik etkilerini belirlemek için RAPD tekniğini uygulamıştır (Mengoni vd. 2000, Atienzar vd. 2000). Yapılan çalışmalara göre ağır metallerin konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak PZR ürünlerindeki polimorfizm oranının arttığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, günümüzde önemli bir çevresel problem olan ağır metal kirliliğinin neden olduğu ağır metal stresine karşı patlıcan (*Solanum melongena* L.) tohumlarında meydana gelen etkilerin popülasyon parametreleri (kök uzunluğu, kuru ağırlık ve toplam çözüner protein seviyeleri) ve sıklıkla kullanılan moleküler belirteç tekniklerinden RAPD analizi ile incelenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle bu biyobelirteçlerin (popülasyon ve moleküler parametreler) kullanılabilirliği, biyoindikatör olarak kullanılan organizma ile kirliliğin biyolojik etkisi ve ortamın kirlilik seviyesi hakkında bilgi edinilebilir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmada, Biotek Tohumculuk'tan temin edilen Pala69 çeşidi patlıcan (*Solanum melongena* L.) tohumları kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonu

Deney öncesinde belirlenen tohum çeşidinden belli bir miktar alınarak yüzey sterilizasyonunu sağlamak amacıyla %30'luk teknik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile 20 dakika muamele edilmiş ve daha sonra distile su ile 3 kere yıkanmıştır.

3.2.2 Çimlendirme yöntemi

Plastik viyollere eşit miktarda steril perlit konulmuş ve her viyol kuyucuğuna eşit sayıda patlıcan tohumu ekilmiştir. Kontrol örneği yalnızca distile su ile sulanırken, diğer örnekler 20, 40, 80 ve 160 ppm Zn çözeltisi ile sulanmıştır. Tohumlar doğrudan farklı çinko çözeltilerine maruz bırakılarak 21 gün boyunca oda koşullarında çimlendirilmeleri sağlanmıştır.

3.2.3 Ölçüm ve analizler

3.2.3.1 Bitki kök boyu ve kuru ağırlık tayini

Ağır metal stresinin bitkiler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla üç haftanın sonunda bazı büyüme parametrelerinden kök uzunluğu (mm/tohum) milimetrik cetvel ile ölçülmüş ve kuru ağırlık ölçümleri (g/tohum) örnekler 70°C'ye ayarlanmış etüvde 48 saat kurutularak ve hassas terazide tartılarak belirlenmiştir.

3.2.3.2 Toplam çözüner protein içeriğinin belirlenmesi

0.08g tartılan kontrol ve muamele örnekleri sıvı azotla havanda ezilerek 700 µl fosfat tamponu (0.2 M, pH 7.0) ile homojenize edilmiş, 27000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatantlar yeni tüplere alınmıştır (Omran 1980). Örneklerin toplam çözüner protein konsantrasyonları, Bradford metoduna (Bradford 1976) göre belirlenmiştir. Bu yöntemle göre; 100 µl örnek çözeltisi ile 400 µl deiyonize su karıştırıldıktan sonra 5 ml 1X Bradford çözeltisine eklenmiştir. Kör olarak 500 µl deiyonize ve 5 ml 1X Bradford karışımı kullanılmıştır. Bu karışımlar ~10 saniye vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Hitachi U-1800) paralelli olarak köre karşı okunmuştur. Standart BSA (Bovin Serum Albumin) ile hazırlanmıştır.

Örneklerin Toplam Çözüner Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması:

Spektrofotometrede okunan değer X Dilüsyon faktörü

Standart eğrinin eğimi

Bradford çözeltisi; 0.5 g Coomassie Blue G'nin 50 ml suda çözülmesi, 250 ml %95'lik etanol ve 500 ml %85'lik fosforik asit eklenip karıştırılarak 1 L'ye tamamlanması ile 5X'lik solüsyon elde edilmiştir. Çözelti +4°C'de karanlıkta tutulmuştur.

3.2.3.3 DNA izolasyonu

21 gün boyunca çimlendirilen patlıcan bitkisi örnekleri hasat edilerek RAPD analizlerini gerçekleştirmek için ihtiyaç duyulacak DNA Aras ve Cansaran (2006) tarafından optimize edilmiş DNA izolasyon protokolüne göre elde edilmiştir. İzolasyon sonucunda 130-420 ng/µl aralığında değişen miktarlarda ve 1.78–1.97 aralığında saflık gösteren DNA elde edilmiştir(A260/280 absorpsiyon oranı)(NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Patlıcan bitkisine ait DNA'ların nanodrop ölçümleri

Örnek	ng/μl	260/280
Kontrol	267	1.82
20 ppm Zn	420	1.78
40 ppm Zn	178	1.91
80 ppm Zn	130	1.97

DNA izolasyonu aşağıdaki protokolle gerçekleştirilmiştir;

- Bitki materyali (0.1 g) toz haline gelinceye kadar sıvı azotta ezilir.
- Önceden ısıtılmış DNA ekstraksiyon tamponundan [50 mM Tris-HCl (pH 8), 50mM EDTA, 10 ml LiCl (4 M), %1 CTAB, %2 PVPP] her örneğe 1 ml eklenerek örnekler kısa bir süre tamponda ezilir.
- Örnekler 1.5 ml Eppendorf tüplerine alınır ve üzerlerine %0.2 [-merkapto etanol eklenir.
- Tüplerdeki solüsyonlar 65°C'da 15 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyon süresinin sonunda örneklerin oda sıcaklığına soğuması beklenir, tüplere 0.5 ml kloroform/izoamil alkol (24:1 [v/v]) eklenir ve vorteks kullanılmadan iyice karıştırılır.
- Daha sonra örnekler 17,000 x g'de (14,000 rpm) 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant (~0.8 ml) yeni tüplere aktarılır.
- Süpernatanta eşit hacimde izopropanol eklenir ve karışım birkaç defa hafifçe ters düz edilerek karıştırılır. DNA eldesinin etkinliğini arttırmak için örnekler buz üzerinde 15 dakika inkübe edilebilir.
- Daha sonra örnekler 17,000 x g'de (14,000 rpm) 2 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve üzerine 1 ml %70'lik etanol eklenir.
- Örnekler tekrar 17,000 x g'de (14,000 rpm) 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen pellet etanol tamamen uçana kadar oda sıcaklığında kurutulur.
- Daha sonra pellet üzerine uygun miktarda (30-60 μl) TE tamponu [10 mM Tris-HCl (pH: 8), 1 mM EDTA] eklenerek çözündürülür.
- Çözeltinin üzerine 1 μl ribonükleaz (RNaz, 10 mg/ml) eklenir, örnekler kullanılabilece kadar -20 °C'da saklanır.

3.2.3.4 RAPD-PCR uygulamaları

Sekiz farklı primer kullanılan (Çizelge 3.2) RAPD-PCR uygulamalarında, tüm işlemler Williams vd. (1990)'a göre optimize edilmiş şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyondan korunmak için steril ekipmanlar kullanılmış ve her RAPD-PCR işlemi için DNA örneği içermeyen negatif kontrol kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 RAPD-PCR uygulamasında kullanılan primerler ve dizileri

Primer	Nükleotid Dizisi (5' → 3')
OPC 02	GTGAGGCGTC
OPC 03	GGGGGTCTTT
OPC 04	CCGCATCTAC
OPC 05	GATGACCGCC
OPC 06	GAACGGACTC
OPC 07	GTCCCGACGA
OPC 08	TGGACCGGTG
OPC 09	CTCACCGTCC

3.2.3.4.1 RAPD bileşenleri ve koşulları

RAPD-PCR reaksiyonlarında her örnek için toplam 25µl'lık reaksiyon gerçekleştirilmiş, aşağıdaki bileşenlere standart hacme ulaşacak şekilde ultra distile su eklenmiştir.

- 200 ng genomik DNA,
- 10X reaksiyon tamponu,
- 2.5 mM MgCl₂,
- 20 µM dNTPs,
- 0.2 µM primer,
- 0.5 ünite Taq polimeraz

PCR döngü şartları;

- 94°C de 2 dakika ön denatürasyon
 - 94°C de 30 saniye (denatürasyon)
 - 36°C de 1 dakika (bağlanma)
 - 72°C de 1,45 dakika (uzama)
 - 72°C de 8 dakika (son uzama)
- } 35 Döngü

3.2.3.4.2 Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünleri ve DNA belirteçleri (marker) (DNA Ladder Plus, Promega, 100 bp) % 1.6 agaroz konsantrasyonu ve 0,5 µl/ml etidyum bromür içeren jellerde, 1xTBE (Tris Borat EDTA) tamponu varlığında 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 4 saat ayırma tabii tutulmuştur.

Jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş (Gene Genius, Syngene) ve fotoğrafları çekilmiştir (GyneSnap Software, Synoptics Ltd.).

3.2.3.5 Veri analizleri

3.2.3.5.1 İstatistiksel analizler

Populasyon parametrelerinden elde edilen verilere SPSS (Statistic Program for Social Sciences 15.0) paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır.

3.2.3.5.2 Genomik kalip stabilitesi (GKS)

RAPD profilindeki polimorfizm ortalamalarından belirlenir.

$$GKS = (1 - a/n) \times 100$$

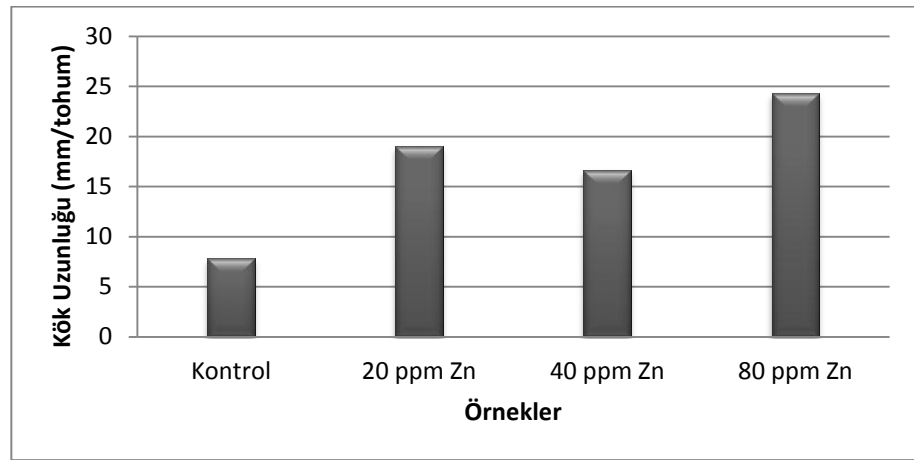
a : her örnekteki ortalama polimorfik bant sayısı

n : kontroldeki toplam bant sayısı

4. BULGULAR

4.1 Patlıcan Bitkisinin Kök Büyümesi Üzerine Çinko Stresinin Etkisi

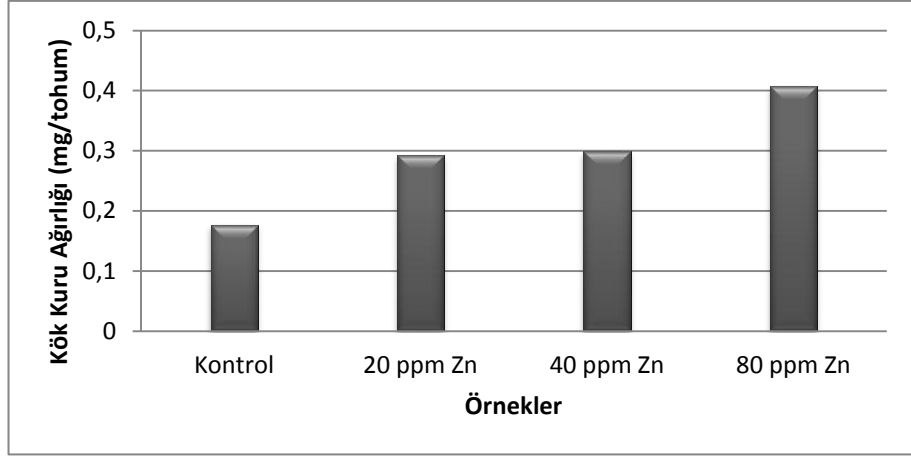
Farklı konsantrasyonlarda uygulanan çinko stresinin 21 günlük patlıcan bitkisinin kök uzunluğuna etkisi incelendiğinde; çinko konsantrasyonunun 80 ppm'e kadar kök uzunluğu üzerinde olumlu yönde etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetişen patlıcan bitkisine ait kök uzunlukları

4.2 Patlıcan Bitkisinin Kök Kuru Ağırlığı Üzerine Çinko Stresinin Etkisi

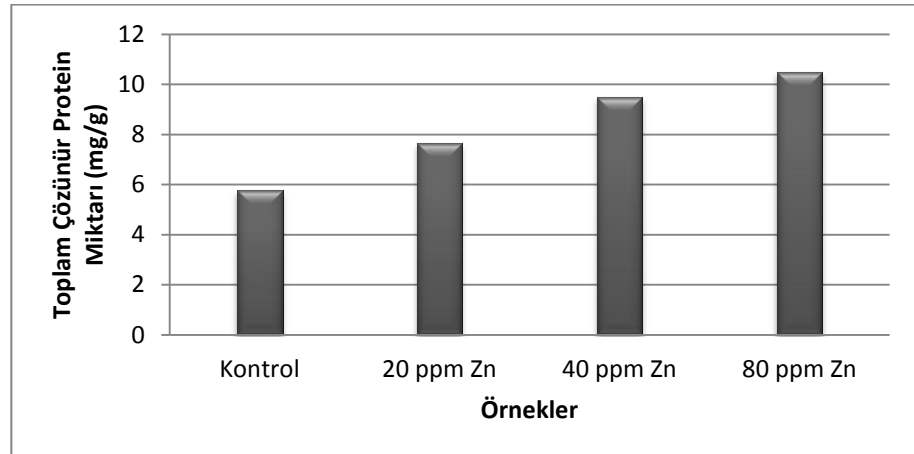
Farklı konsantrasyonlarda uygulanan çinko çözeltisinin kök kuru ağırlığı üzerine etkisi incelendiğinde artan çinko konsantrasyonuna bağlı olarak kök kuru ağırlığında kontrole göre artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetişen patlıcan bitkisine ait kök kuru ağırlıkları

4.3 Patlıcan Bitkisinin Toplam Çözünür Protein Miktarı Üzerine Çinko Stresinin Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan çinko çözeltisinin toplam çözünür protein miktarı üzerine etkisi incelendiğinde artan çinko konsantrasyonuna bağlı olarak toplam çözünür protein miktarı artış göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklı çinko konsantrasyonlarında yetişen patlıcan bitkisine ait toplam çözünür protein miktarlar

4.4 Çinko Stresinin Patlıcan Bitkisinde RAPD Sonuçlarına Etkisi

Deneyde kullanılan sekiz primer net ve tekrar edilebilir sonuç vermiştir. Her primer için polimorfizm hesaplamaları örneklerin bant paternleri kontrolün bant paternleriyle karşılaştırılarak yapılmıştır. Kontrolde bulunup örneklerde bulunmayan ve kontrole göre yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir.

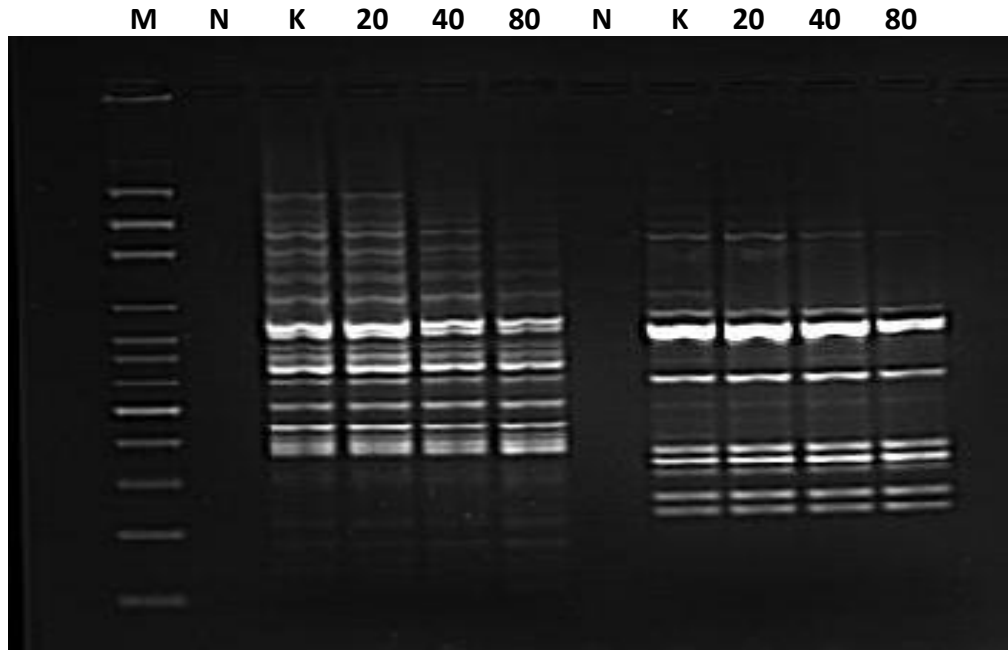
Polimorfizm yüzdeleri polimorfik bant sayısına toplam bant sayıları oranlanarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Çizelge 4.1 de a; kontrole göre yeni ortaya çıkan bantları belirtmek için, b; kaybolan kontrol bantlarını belirtmek için kullanılmıştır. Artan metal konsantrasyonuna bağlı olarak polimorfizm oranının arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.1 RAPD-PCR analizi sonunda örneklere ait bant farklılıkları

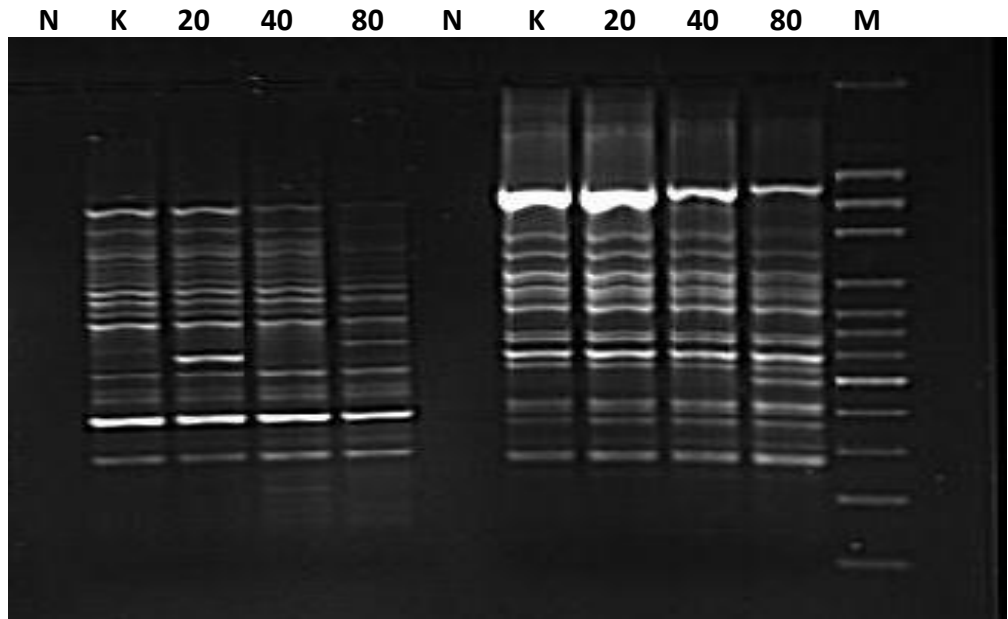
Primer	Kontrol	20 ppm Zn a/b	40 ppm Zn a/b	80 ppm Zn a/b
OPC 02	20	0/0	0/0	0/0
OPC 03	16	0/1	0/1	0/2
OPC 04	18	1/0	0/1	1/1
OPC 05	15	0/0	0/0	1/0
OPC 06	18	0/0	1/0	1/0
OPC 07	12	0/0	1/0	0/0
OPC 08	19	0/1	0/0	0/5
OPC 09	11	0/0	0/0	0/0
Total	129	3	4	11

a: Kontrole göre yeni oluşan bant

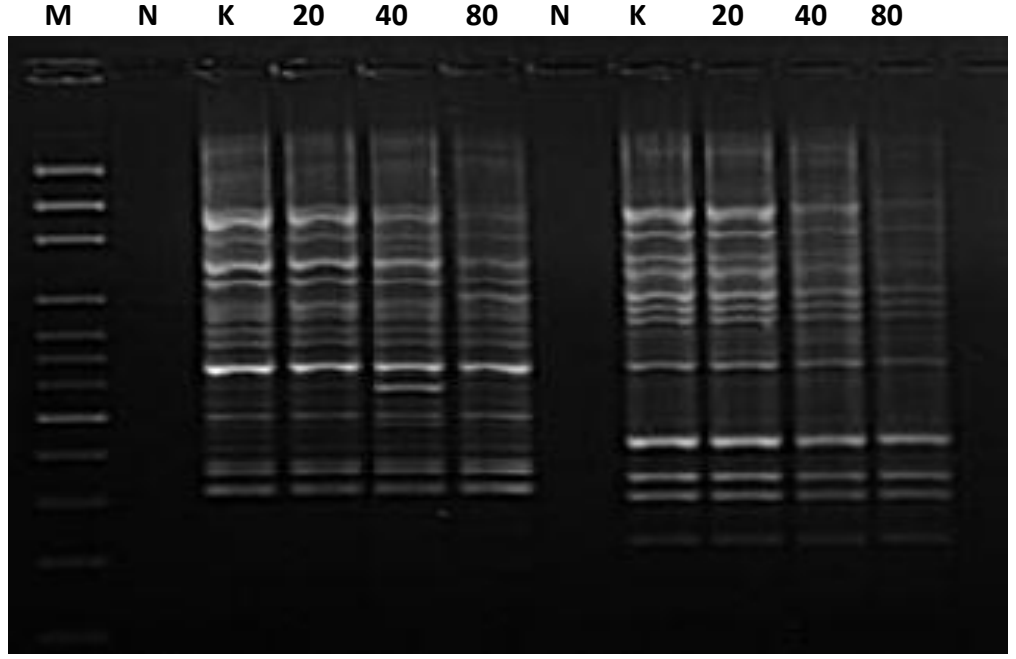
b: Kontrole göre kaybolan bant



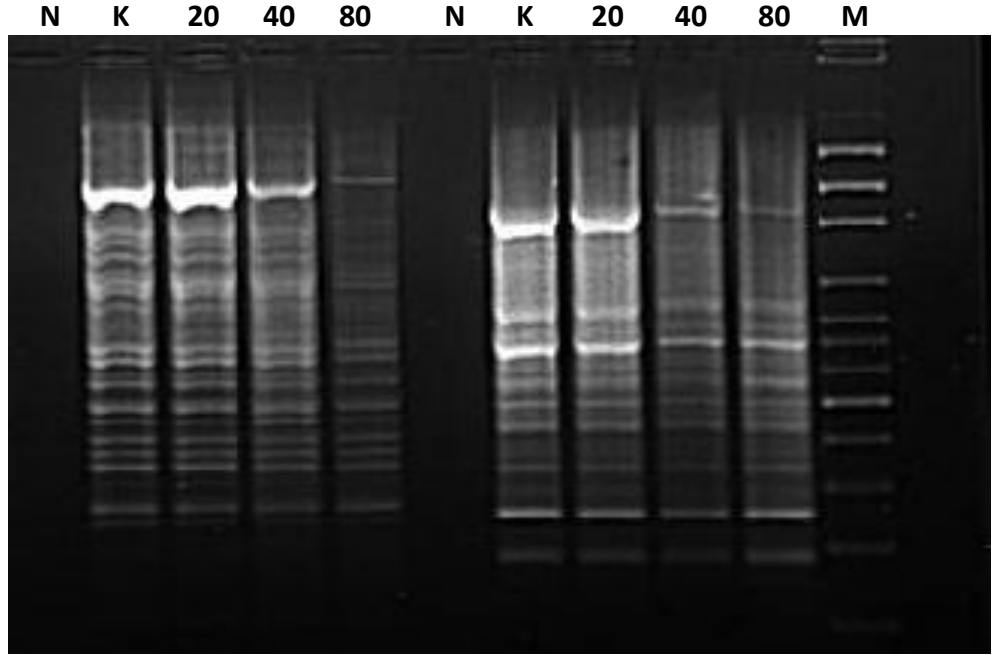
Şekil 4.4 OPC 02 ve OPC 03 primerlerine ait agarozjel elektroforez görüntüleri
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol



Şekil 4.5 OPC 04 ve OPC 05 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol



Şekil 4.6 OPC 06 ve OPC 07 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol



Şekil 4.7 OPC 08 ve OPC 09 primerlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri
M: Marker, K: Kontrol, N: Negatif Kontrol

4.5 Çinko Stresine Maruz Kalmış Patlıcan Örneklerinin Popülasyon Parametrelerinin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizler için SPSS paket programı kullanılmıştır. Her bir popülasyon parametresi (kök uzunluğu, kuru ağırlık, toplam çözünür protein miktarı) için farklı konsantrasyonlarda ve şartlarda çinko stresine maruz bırakılan örnekler arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Duncan testi yapılmıştır.

Çizelge 4.2 Populasyon parametrelerinin istatistiksel analizi

Örnek	Kök uzunluğu Mean $\pm$ SE	Kuru Ağırlık Mean $\pm$ SE	Toplam Çözünür Protein Mean $\pm$ SE
K	7,80 $\pm$ 4,14729 (a)	,00017667 $\pm$,000007638 (a)	5,7447 $\pm$,01361 (a)
20 ppm Zn	19,00 $\pm$ 7,83422 (b)	,00029267 $\pm$,000039171 (b)	7,6440 $\pm$,36528 (b)
40 ppm Zn	16,60 $\pm$ 6,55172 (b)	,00029900 $\pm$,000003000 (b)	9,4877 $\pm$,01361 (c)
80 ppm Zn	24,30 $\pm$ 8,63568 (b)	,00040700 $\pm$,000061490 (c)	10,4833 $\pm$,53201 (d)

Aynı sütunda farklı harfi alan değerler arasındaki farklılıklar önemlidir. (P < 0.05)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sanayileşme ve kentleşmenin doğada meydana getirdiği en önemli sorunlardan birisi çevre kirliliği olarak kabul edilmektedir (Bayçu 1997).

Günümüzde ağır metaller tarım endüstrisinde, yabancı otlar ve tarım zararlılarına karşı koymak için geliştirilmiş tarım ilaçlarında kullanılmaktadır. Ağır metaller fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu grubun içine kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal girmektedir. Bu ağır metallerden bakır, mangan ve çinko fungusitlere karşı geliştirilen tarım ilaçlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ağır metaller yüksek konsantrasyonlarda enzim özgüllüğünü değiştirirler, hücre membranına zarar verirler, hücre fonksiyonları ile girişim yaparak da gelişmelerini durdurabilirler ve DNA'nın yapısında hasara sebep olabilirler. Ağır metalin yarattığı toksisite ağır metalin türüne, konsantrasyonuna, pH'ına ya da metal iyonlarının çözünürlüğüne bağlıdır (Volesky 1990).

Yüksek yoğunluklarda toksik olmalarına rağmen, bakır (Cu) ve çinko (Zn), toksik ancak gerekli olmayan elementlerden olan civa (Hg) ve kurşundan (Pb) ayrı olarak fotosentetik elektron naklinde anahtar rol oynayan moleküllerin parçası ve çoğu enzim aktivitesi için gerekli mikro besin elementleridir (Raven vd. 1999).

Ağır metallerin toksik etkilerini moleküler düzeyde ve populasyon düzeyinde tespit etmek mümkündür. Moleküler düzeyinde SSR, AFLP, RFLP ve RAPD gibi moleküler belirteç analizleri kullanılabilir. Populasyon düzeyinde ise bitki boyu, biyokütle, toplam çözünür protein, prolin ve anti-oksidatif enzimlerin miktar değişimleri ile belirlemek mümkündür.

Tez kapsamında farklı konsantrasyonlarda uygulanan çinko metalinin, patlıcan tohumları üzerine etkileri populasyon düzeyinde kök uzunluğu, kuru ağırlık ve toplam çözünür protein; moleküler düzeyde RAPD-PCR ile incelenmiştir.

Birçok canlıda genotoksisitenin belirlenmesi için RAPD profili kullanılmaktadır (Liu vd. 2005, 2009). DNA hasarının belirlenmesinde RAPD yönteminin kullanılmasının pek çok avantajı vardır; Az miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır, Evrensel primer seti kullanılır, aynı anda birçok örnekle çalışmak mümkündür ve hızlı sonuç alınır.

Zn konsantrasyonu normalde bitkilerde 27-150 mg kg⁻¹ iken toksik seviye 100-400 mg kg⁻¹ arasındadır (Stevenson ve Cole 1999). Metal stresine karşı bitkilerin geliştirdiği direnç mekanizmalarından birinin, metallerin köklerde tutulması ve gövdeye dağılımının engellenmesi olduğu bilinmektedir (Fernandes ve Henriques 1991). Bu sebepten dolayı metal stresinden kökler diğer organlara göre daha fazla etkilenmektedir.

Toksinlerin kökte yaptığı etkilerden bir tanesi büyümesini engellemektedir. Çinko düşük miktarlarda bitkiler için gerekli bir besin elementi olduğundan ve tez kapsamında uygulanan çinko konsantrasyonları toksik sınırlar içinde olmadığından kök uzamasını artıran bir etki göstermiştir. 20, 40 ve 80 ppm çinko uygulamalarında kontrol örneğine göre kök uzamasında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (P<0.05). Çinko uygulamasının (30-70 ppm) *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinde kök uzunluğunu artırdığı tespit edilmiştir (Çavuşoğlu vd. 2009).

Kuru ağırlık ve toplam çözünür protein içeriklerinin de kontrol örneğine göre arttığı görülmüştür. Bu artışlar istatistiksel analizler sonucunda anlamlı bulunmuştur (P<0.05). Özcan vd. (2013) farklı çeltik çeşitleriyle gerçekleştirdikleri çalışmada çinko uygulaması ile kuru madde miktarı ve tohum ağırlığında yüksek oranda artış gördüklerini bildirmişlerdir.

Tez çalışması kapsamında 20, 40, 80 ve 160 ppm çinko uygulaması gerçekleştirilmiş, ancak 160 ppm çinko uygulamasında patlıcan tohumlarında çimlenme olmadığı gözlemlenmiştir. Bu da göstermektedir ki, maruz bırakılan çinko stresinin konsantrasyonları toksik değerler içinde yer aldığında populasyon parametreleri üzerinde negatif etki yaratmaktadır.

Genotoksik ajanların DNA üzerinde oluşturduğu hasarları yine DNA üzerinden parmakizi metodlarıyla inceleyen pek çok sayıda çalışma ortaya koyulmuştur. Çoğu parmakizi yöntemleri bakterilerden çiçekli bitkilere kadar nerdeyse tüm organizma sınıfı için kullanılabilir ve söz konusu bu yöntemler ile eş zamanlı olarak çok miktarda örnek incelenebilir. Bu özelliğiyle parmakizi yöntemleri, konsantrasyon ve maruz kalma süresi gibi, genotoksik ajanın farklı faktörlerle olan etkileşimini birden fazla örnek üzerinde incelemeye imkan tanır. RAPD gibi parmak izi yöntemlerinde ileri donanımlı biyolojik laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaması da önemli bir avantaj sağlar (Savva 2000, Theodorakis vd. 2001, Atienzar vd. 2002).

Birçok çalışmada RAPD yönteminden faydalanılarak değişik organizmalarda çeşitli genotoksik ajanların etkileri incelenmiştir. Bu çalışmaların bir bölümünde genotoksik ajanlar laboratuvar şartlarında kontrollü olarak uygulanmış, bir bölümünde genotoksik ajanlara doğal yaşam alanlarında maruz kalan organizmalar incelenmiştir.

Pirinç (*Oryza sativa* L.) ile yapılan çalışmada, tohumlara değişik konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) stresi uygulanmış ve yüksek konsantrasyonlara maruz kalan örneklerin kontrol örneğine göre RAPD bant paternlerinin değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Liu vd. 2007). Diğer koşullar sabit tutulduğunda kontrolün sahip olduğu bant paterninin ağır metale maruz kalmış örneklerde değişmekte olduğu, bu değişimin genotoksik ajanın (Cd) mutasyonel etkisiyle olduğu fikrini ortaya koymuştur.

RAPD analizinde kontrole göre farklı bant profillerinin gözlenmesinin nedenleri kalıp DNA üzerinde, primerlerin bağlanma bölgelerinde meydana gelmiş mutasyonlardır. Mutasyonlar primerlerin bu bölgeler ile eşleşmesini engelleyecek ve bu fragmanlar çoğaltılamayacaktır. Ayrıca; primer bağlanma bölgeleri arasında oluşmuş tek ya da çift zincirdeki kırıklar bu fragmanın çoğaltılmasını engelleyecektir. Kalıp DNA üzerinde meydana gelen baz mutasyonları primerler için yeni bağlanma bölgeleri de oluşturabilir. Tez kapsamında patlıcan (*Solanum melongena* L.) örneklerinde ağır metal kirliliğinin neden olabileceği etkiler populasyon ve moleküler parametrelerden RAPD ile incelenmiştir. RAPD analizlerinde kullanılan rastgele primerlerin örneklerle ait kalıp DNA'lar üzerinde bağlanma bölgelerinde değişimler (yeni bağlanma bölgelerinin

oluşması, varolan bağlanma bölgelerinin yok olması) meydana getirmesi örneklerin bant profillerinde polimorfizme sebep olmuştur.

Bant paternlerindeki farklılıklar en fazla OPC08 primerinde görülmektedir. Polimorfizm oranları çinko konsantrasyonunun artışına paralel olarak artmaktadır. Bu polimorfizm oranlarına bakıldığında 80 ppm çinko stresi uygulanan örnekte meydana gelen polimorfizmin en fazla olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, toksik değerlere ulaşmayan çinko uygulamasının populasyon parametrelerinde pozitif etki gösterebildiği ancak DNA'da mutasyonel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aras, S. and Cansaran, D. 2006. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen species. Turkish Journal of Botany, 30; 449-453.
- Anastassopoulou, J. 2003. Metal–DNA interactions. Journal of Molecular Structure, 651/653; 19–26.
- Aravind, P. and Prasad, M.N.V. 2003. Zinc alleviates cadmium-induced otive stress in Ceralophyllum demersum L.: A free floating fresh v;macrophytc. Plant Physiol. Biochem. 41 -391-397.
- Asada, K., Kiso, K. and Yoshikawa, K. 1974. Univalent reduction of molecular oxygen by on illumination. J Biol Chem, 249 (7):2175–81.
- Abak, K. 1993. Yazlık sebzeler ve örtü altı yetistirciligi raporu (Solanaceae,Cucurbitaceae, Leguminaceae ve Compositae) Türkiye bahçe bitkileri altsektörünün gözden geçirilmesi projesi, hazırlık çalışması: Bahçe bitkileri üretimininbölgesel özellikleri. Adana, 23s.
- Al-Nakshabandi, G.A., Saqqar, M.M., Shatanawi, M.R., Fayyad, M. and Al-Horani, H.1997. Some environmental problems associated with the use of treated wastewaterfor irrigation in Jordan. Agricultural Water Management, 34; 81-94.
- Atienzar, F.A., Venier, P., Jha, A.N. and Depledge, M.H. 2002. Evaluation of the randomamplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage andmutations. Mutation Research, 521; 151–163.
- .Bletsos, F.A., Gantidis, N.D. and Tsialtas, J.T. 1999. Heavy metal content of eggplant fruitsgrown on different levels of sewage sludge. International Symposium onComposting of Organic Matter 549.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72; 254-284.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R .1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulatemetallicelements- A review of their distribution,ecology and phytochemistry. Biorecovery 1: 81-126.
- Bayçu, G. 1997. "Picea abies'te Kadmiyum Toksisitesi ve Köklerde Kadmiyum Birikimi" XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi 17-20 Eylül 1996, İstanbul. Kongre Kitapçığı, Cilt:III, s:433-442.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Amer. J. Human Genet. 32:314-331.
- Çavuşoğlu, K. 2009. Effects of lead (Pb) pollution caused by vehicles on the anatomy of pine (Pinus nigra Arn. subsp. pallasiana) and cedar (Cedrus libani A. Rich.) leavesBioDiCon 2/3 92-98.

- Dietz, K. 1999. Free Radicals and Reactive Oxygen Species as Mediator of Heavy Metal Toxicity in Plants, pp.73-79, In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds), Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystem, Berlin, Springer.
- Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 159-160.
- Fernandes, J.C. and Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological and structural effect of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57; 246-273.
- Gianfranceschi, L. 1998. Simple Sequence Repeat for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet* (in press).
- Guilford, P. 1997. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple), abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet* 94 : 249-254.
- Haber, F. and Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by ion salts. *Proc R Soc*, 147(A): 332-51.
- Hanna, W.J. and Grant, C.L. 1962. Spectrochemical analysis of the foliage of certain trees and ornamentals for 23 elements. *Bull Torrey Bot Club* 89: 293-302.
- Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedenstrang, D. and Wegman, S. 1985. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5:109-118.
- Khan, S. and Khan, N.N. 1983. Influence of lead and cadmium on the growth and nutrient concentration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and egg-plant (*Solanum melongena*). *Plant and Soil*, 74; 387-394.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. 1989. Trace Elements in the Soil and Plants. Florida: CRC Press.
- Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H. and Yang, Y.S. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61; 158-167.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J. and Han, Y.P. 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *Journal of Hazardous Material*. 161; 878-883.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q.X., Xie, L.J., Li, P.J. and Sun, T.H. 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 67; 1155-1163.
- Langille, W.M. and Maclean, K.S. 1976. Some essential nutrient elements in forest plants as related to species, plant part, season and location. *Plant Soil* 45: 17-26.

- Mo, W. and Li, M.1992. Effects of cd on the cell division of root tip in bean seedlings.Bulletin of botani 9 (3) 30-34 (In Chinese with English abstract).
- Mengoni, A., Gonnelli, C., Galardi, F., Gabbrielli, R. and Bazzicalupo, M. 2000. Geneticdiversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L.(Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis. *MolecularEcology*, 9; 1319-1324.
- Mallick, N. 2004. Copper- Induced Oxidative Stress in the Chlorophycean Microalga *Chlorella vulgaris*: Response of the Antioxidant System. *J. Plant Physiol.*, 161: 591-597
- Maliepaard, C. 1998. Integrating male and female linkage maps of apple (*Malus x domestica* Borkh) using multi-allelic markers. *Theor Appl Genet* (in press).
- Mohini Joshi, J.D. 2011. Deshpande polymerase chain reaction: methods, principles and application [10.7439/ijbr.v2i1.83](https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83):
- Moustakas, M., Lanaras, T., Symeonidis, L. and Karataglis, S. 1994. “Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper ve lead stress”, *Photosynthetica*, 30: 389-396.
- Mullis, K.B. and Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 350–355.
- Neelima, P. and Reddy, K.J. 2003. Differential effect of cadmium and mercury on growth and metabolism of *Solanum melongena* L. seedlings. *Journal of Environmental Biology*, 24(14); 453-460.
- Nriogo, J.O. 1979. Global inventory of natural and anthropogenicemissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* 279: 409-411.
- Ouzounidou, G., Symeonidis, L., Babalonas, D. and Karataglis, S. 1994. Comparative responses of a copper-tolerant and a copper-sensitive population of *Minuartia hirsuta* to copper toxicity. *Journal of Plant Physiology*. 144, 109-115.
- Özcan, H., Taban, S. ve Koç, Ö. 2013. Çinko Uygulamasının Farklı Bin Tane Tohum Ağırlığına Sahip Çeltik Çeşitlerinde Bitki Gelişimi ve Çinko Kapsamları Üzerine Etkisi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Ankara. *Cilt:2 Sayı:2* (73-82).
- Rout, G.R. and Das, P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie.*, 23, 3-11
- Patra, M., Bhowmik, N. and Bandopadhyay, A. 2004. Comparison of Mercurry, Lead and Arsenic with Respect to Genotoxic Effects on Plant Systems and the Development of Genetic Tolerance. *Environmental and Experimental Botany.*, 52: 199- 223
- Raven, J.A., Evans, M.C.W. and Korb R.E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂- evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60:111-49.

- Ridout, C.R. and Donini, P. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science*. 4:76-79.
- Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding, RAPDs, microsatellites and machines. *TIG*, 9(8); 275-280.
- Reeves, S.G. and Hall, D.O. 1980. Higher plant chloroplasts and granas: general preparative procedures (excluding high carbon dioxide fixation ability chloroplasts). *Methods Enzymol.* 69 -85-104.
- Shu, W., Lan, C. and Zhang, Z. 1997. Analysis of major constraints on plant colonization at Fankou Pb/Zn mine tailings, *Chinese J Applied Ecology* 8 (3) 314-318 (In Chinese with English abstract).
- Savva, D. 2000. The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting to detect exposure to genotoxic chemicals. *Ecotoxicology*, 9; 341-353.
- Steffens, J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41, 553-5
- Steffan, R.J. and Atlas, R. M. 1991. Polymerase Chain reaction: Applications in Environmental Microbiology, *Annual Review of Microbiology*, 15; 137-161.
- Stevenson, F.J. and Cole, M.A. 1999. *Cycles of soil*. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gubta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*. 31: 729-740.
- Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B. and Grun, P. 1982. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107; 428-432.
- Sierra, M.J., Millán, R. and Esteban, E. 2008. Potential use of *Solanum melongena* in agricultural areas with high mercury background concentrations. *Food and Chemical Toxicology*, 46; 2143-2149.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98; 503-517.
- Theodorakis, C.W., Bickham, J.W. and Lamb, T. 2001. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20; 317-326.
- Van Assche, F. and Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ.* 13 -195-206.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21); 4407-4414.

- Volesky, B. 1990. Biosorption of Heavy Metals, CRC Press, Florida, 396p.
- Wang, X. and Wu, Y .1995 Effects of modification treatments on the behaviour of heavy metals in combined polluted soil. *Chinese J Applied Ecology* 6 (4) 440-444 (In Chinese with English abstract).
- Wang, H., Liu, R.L. and Jin, J.Y. 2009. Effects of zinc and soil moisture on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters of maize. *Biologia Plantarum*, 53: 191–194.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Pres, Inc. 322 p.
- Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44 : 388-396.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting Menomes using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Research*, 18; 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zhang, Y. 1997. The toxicity of heavy metal to barley (*Hordeum vullgare*). *Acta Scinetiae Circumstance* 17 (2) 199-204 (In Chinese with English abstract).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Shapour GHABELNEZAM

Doğum Yeri : BİLESAVAR, İRAN

Doğum Tarihi : 01/01/1979

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bahoner Lisesi (1999)

Lisans : İslami Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni bölümü (2003)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (Şubat 2010- Şubat 2015)