

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**AĞIR METAL STRESİNE MARUZ KALMIŞ FASULYE ÇEŞİTLERİNDE  
CAMTA VE YABBY GENLERİNİN  
GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

**Evrım KOCAMAN**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**


**ANKARA  
2019**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

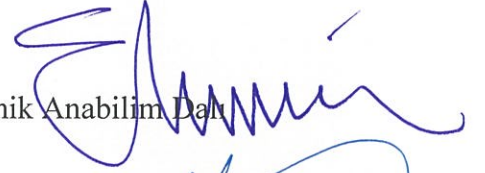
Evrım KOCAMAN tarafından hazırlanan “Ağır Metal Stresine Maruz Kalmış Fasulye eşitlerinde *CAMTA* ve *YABBY* Genlerinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi” adlı tez çalışması 31.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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



### Jüri Üyeleri:

**Başkan** : Prof. Dr. Ekrem GÜREL  
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Botanik Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Murat KAYA  
Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı



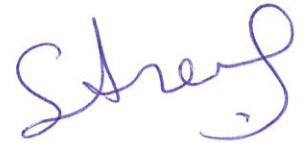
**Üye** : Doç. Dr. Demet Cansaran DUMAN  
Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY  
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı



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



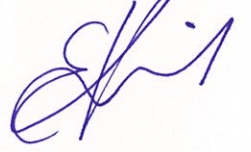
**Yukarıdaki sonucu onaylım.**

**Prof. Dr. Özlem YILDIRIM**  
Enstitü Müdür Vekili

## 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.

31.07.2019



Evrin KOCAMAN

# ÖZET

Doktora Tezi

## AĞIR METAL STRESİNE MARUZ KALMIŞ FASULYE ÇEŞİTLERİNDE CAMTA ve YABBY GENLERİNİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Evrin KOCAMAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Dünya nüfusundaki hızlı artış ve paralelinde gelişen gıda talebi doğrudan ekilebilir alanlarda verimlilik kontrolünün sağlanmasındaki etkenlerin incelenmesini ve bu değişkenlerle birlikte ortaya çıkan ve çıkabilecek olan problemlerin çözümü için yeni çalışmalar yapmanın gerekliliğini de beraberinde getirmektedir.

Ağır metallerin bitkilerde çeşitli mekanizmalar üzerinde toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir ve bu toksik etkilere bağlı gelişen cevaplarda stres koşullarına yönelik tepkilerin oluşmasında ve bu koşullara adaptasyon sürecinde transkripsiyon faktörlerinden bahsetmek bir zorunluluk halini almaktadır. Bitkilerin ağır metal toksisite tolerans sınırlarının bilinebilmesi için metal tür ve miktarına, zararın derecesine ve ayrıca zarar oluşum sürecine ait verilerin de bilinmesi gerekmektedir. Bu bilimsel verilerin bilinmesi ve ölçülmesi bitkilerin gelişimi ve canlılığı açısından oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında CAMTA ve YABBY genleri (transkripsiyon faktörleri) seçilerek, kurşun (Pb), bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) stresine maruz kalmış iki farklı fasulye çeşidinin (Akman-98- Önceler-98) gen ifade profillerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Farklı derişimlerde bakır (Cu), kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) stresleri uygulanmış iki farklı fasulye çeşidi yaprak örneklerinde ilgili genlerin, qRT-PCR metodu ile ifade düzeyleri belirlenmiş ve housekeeping gen olan aktin (ACT) genine göre normalizasyonu sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, iki farklı fasulye çeşidine ait yaprak dokularında farklı derişimlerde bakır (Cu), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) stresi uygulaması sonrasında hedef genlerin ifadesinde kontrole göre önemli farklılıklar meydana geldiğini ortaya koymuştur. Kurşun (Pb) derişiminde artışın Akman-98 çeşidinde CAMTA gen ekspresyonu üzerinde çok etkili olmadığı, belirlenmiştir. Bakır (Cu) derişiminin Akman-98 çeşidinde gen ifade düzeyinde artışa, Önceler-98 fasulye çeşidinde ise azalışa neden olduğu saptanmıştır. Kadmiyum (Cd) stresi uygulanan örneklerde, Akman-98 fasulye çeşidinde her iki gende de ifade artışı gözlenmiştir. Önceler-98 çeşidinde ise YABBY-7 genine ait ifade seviyesinde azalış, CAMTA-4 geninin ifade düzeyinde ise artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

Bitkilerde stres adaptasyonu oldukça kompleks cevap mekanizmalarından oluşmaktadır. Bu nedenle CAMTA ve YABBY gen ailelerinin iki farklı fasulye çeşidinde ağır metal stres toleranslarının belirlenmesi ve karşılaştırılması; bitkilerde abiyotik stres toleransında yer alan moleküler mekanizmaların daha derinden aydınlatılması ve stres cevap mekanizmalarında etkili oldukları bilinen iki gen ailesinin, kilit rollerinin belirlenmesi için oldukça önemlidir. Bu çalışma ile uygulanan stresler sonrasında iki farklı fasulye çeşidinin gen ifade profillerinin farklı seyretmesi, tolerans ve adaptasyon mekanizmalarının farklı evrimsel süreçler izlediğini göstermektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, CAMTA ve YABBY genlerinin bitkilerin çok değişkenli stresler altındaki rollerinin belirlenmesi ve potansiyel genetik belirteçler olarak kullanılabilmesi de mümkün görünmektedir.

**Temmuz 2019, 102 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal, CAMTA, YABBY, gen ifadesi.

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### INVESTIGATION OF *CAMTA* AND *YABBY* GENES AT GENE EXPRESSION LEVEL UNDER HEAVY METAL STRESS IN COMMON BEAN

Evrin KOCAMAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

The rapid increase in the world population and the growing food demand in parallel bring about the examination of the factors in ensuring efficiency control in the arable land and the need for new studies to solve the problems that may arise with these variables.

It is known that heavy metals have toxic effects on various mechanisms in plants and it becomes a necessity to consider transcription factors in the response to stress conditions and in the adaptation process of plants to these conditions. In order to know the range of tolerance of heavy metal toxicity in plants, various data such as the type and amount of metal, the degree of damage and also the process of damage formation should be available. Knowing and measuring these concepts is very important for the development and viability of plants.

In this study, gene expression profiles of two genes belonging to different transcription factor families; *CAMTA* and *YABBY*, were investigated in two different common bean varieties exposed to lead (Pb), copper (Cu) and cadmium (Cd) stress. Various concentrations of the heavy metals were applied to the leaves of two different common bean varieties (Akman-98 and Önceler-98) and, the expression levels of the genes were determined by qRT-PCR followed by a normalization procedure performed by using actin (*ACT*) as a housekeeping gene. Results revealed that mRNA levels of target genes show differences after lead (Pb), copper (Cu) and cadmium (Cd) stress exposure. Increasing the concentration in the lead (Pb) stress was not very effective in *CAMTA* genes on Akman-98 variety. It was determined that copper (Cu) concentration cause the increased gene expression level in Akman-98 bean variety and cause the decreased in Önceler-98 bean variety. Increasing the concentration of cadmium (Cd) caused an increase in expression levels in both genes in Akman-98 bean variety. Higher concentrations of cadmium (Cd) caused as the decrease in *YABBY-7* gene expression level and the increase in *CAMTA-4* gene expression level in Önceler-98 bean variety.

Stress adaptation in plants consists of highly complex response mechanisms. For this reason, determination and comparison of heavy metal stress tolerances of *CAMTA* and *YABBY* gene families in two different bean varieties are more important for the deeper elucidation of the molecular mechanisms involved in abiotic stress tolerance in plants and to determine the key roles of the two gene families which are known to be effective in stress mechanism mechanisms. The differences in gene expression profiles of two different bean varieties after the stresses applied by this study show that tolerance and adaptation mechanisms follow different evolutionary processes. Based on these findings, it is also possible to identify the roles of *CAMTA* and *YABBY* genes under multivariate stresses and to use them as potential genetic markers.

July 2019, 102 pages

**Key Words:** Heavy metal, *CAMTA*, *YABBY*, gene expression

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), hem tez hem de tez dışı bilimsel çalışmalarımın her aşamasında yardımcı olan sayın Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN ve sayın Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım sayın Recep KARAMAN'a, sayın Sinan Özgür AYDIN'a ve sayın F. Şeyma GÖKDEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Ve...

Akademik kariyerimin tüm aşamasında her türlü desteği esirgemeyen aileme ve biricik oğluma sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Evrin KOCAMAN

Ankara, Temmuz 2019

## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad
A	Adenin
ABA	Absisik Asit
ACT	Aktin
Al	Aluminyum
B	Bor
BADH	Betain aldehit dehidrogenaz
C	Karbon
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
CaM	Kalmodulin
CAMTA	Kalmodulin bağlayıcı transkripsiyon aktiviteörleri
CdCl <sub>2</sub>	Kadmiyum Klorür
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Cl <sup>-</sup>	Klor
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
cm <sup>3</sup>	santimetreküp
CMO	kolin betain aldehide kolin monooksijenaz
Cu	Bakır
Co	Kobalt
CRC	Crabs Claw
dk	Dakika
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtOH	Etil Alkol
Fe	Demir
FeEDTA	Demir Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<i>FIL</i>	Filamentous Flower
gr	Gram
GSA	Glutamik-γ-semialdehit
H	Hidrojen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HClO	Hipoklorit
Hsps	Isı Şoku Proteinleri
INO	Inner no Outer
K	Potasyum
kg	Kilogram
LEA-3	Late Abundant Protein-3
M	Milyon
mg	milligram
Mg	Magnezyum
ml	mililitre
mm	milimetre
Mn	Mangan

Mo	Molibden
mRNA	Haberci RNA
MYA	Million Years Ago
N	Azot
Na	Sodyum
Ni	Nikel
O	Oksijen
P	Fosfor
Ph	Hidrojen Gücü
ppm	Milyonda bir
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikada Devir Sayısı
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Real Time PCR
qPCR	Kantitatif PCR
S	Kükürt
Si	Silisyum
SOD	Süperoksit Dismutaz
TF	Transkripsiyon Faktörü
TBE	Tris Borat EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
Zn	Çinko
µg	mikrogram
µM	mikromolar
µl	mikrolitre



## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
<b>1 GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1 Tarihçesi .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2 Sınıflandırılması .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3 Dünyada ve Türkiye’de fasulyenin önemi ve üretimi .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4 İklim ve toprak istekleri.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Bitkilerde Stres ve Stres Çeşitleri.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1 Abiyotik stres çeşitleri.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1.1 Yüksek sıcaklık stresi .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1.2 Düşük sıcaklık stresi .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.3 Tuzluluk stresi.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.4 Besin stresi .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.5 Ağır metal stresi.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1.6 Oksidatif stres .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1.7 Kuraklık stresi .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2 Bitkilerin abiyotik strese cevap mekanizmaları .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2.1 Osmolitler .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2.2 Antioksidanlar ve detoksifikasyon genleri .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2.3 İyon taşınması .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2.4 Stresle ilişkili proteinler .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2.4.1 Isı şoku proteinleri.....</b>	<b>17</b>

1.2.2.4.2	Geç embriyogenez bağımlı proteinleri.....	18
1.3	Ağır Metaller .....	18
1.3.1	Ağır metallerin bitkilerdeki işlevi .....	19
1.3.2	Bitkilerde metal alınımı .....	20
1.3.3	Bitkilerde metal taşınımı.....	20
1.3.4	Ağır metal kirliliği .....	20
1.3.5	Metal birikiminin bitkilerde yol açtığı değişiklikler .....	21
1.3.5.1	Şekilsel değişiklikler .....	21
1.3.5.2	Biyokimyasal değişiklikler .....	21
1.3.5.3	Serbest radikal oluşumu .....	22
1.4	Bakır (Cu)'ın Bitkilere Etkisi .....	22
1.5	Kurşun (Pb)'un Bitkilere Etkisi .....	23
1.6	Kadmiyum (Cd)'un Bitkilere Etkisi .....	23
1.7	Transkripsiyon Faktörleri .....	24
1.7.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> genomunda transkripsiyon faktörü – gen içeriği .....	26
1.7.2	CAMTA gen ailesi .....	27
1.7.3	YABBY gen ailesi.....	28
2	KAYNAK ÖZETLERİ.....	30
2.1	Amaçlar .....	34
3	MATERYAL VE YÖNTEM .....	36
3.1	Tohum Temini .....	36
3.1.1	Akman-98 (Kuru fasulye) .....	36
3.1.2	Önceler-98 (Barbunya).....	36
3.2	Tohumun Sterilizasyonu ve Bitkinin Yetiştirilmesi .....	36
3.3	Hoagland Besin Çözeltisinin Hazırlanması .....	37
3.4	Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması .....	39
3.4.1	80 ppm -160 ppm kurşun (Pb) stresi.....	40
3.4.2	80 ppm -160 ppm bakır (Cu) stresi .....	40
3.4.3	80 ppm – 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi .....	40
3.5	Örnekler İçin Kodların Oluşturulması .....	41
3.6	Total RNA İzolasyonu .....	41
3.7	RNA Miktarının Belirlenmesi .....	42

3.8	cDNA Sentezi .....	43
3.9	Primer Dizayını.....	43
3.10	Real-Time PCR Reaksiyonu .....	44
3.11	Morfolojik ve Fizyolojik Parametre Ölçümler .....	45
3.11.1	Kuru-Yaş ağırlık ölçümleri.....	45
3.11.2	Protein tayini.....	46
3.12	Normalizasyon ve istatistiksel analiz .....	46
4	BULGULAR .....	48
4.1	Fasulye Çeşitlerinde Stres Uygulamaları .....	48
4.2	RNA İzolasyonu .....	49
4.3	cDNA Sentezi.....	49
4.4	Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	49
4.5	Yaş-Kuru Ağırlık Ölçümleri .....	51
4.5.1	Yaprak; yaş-kuru ağırlık ölçümleri.....	51
4.5.2	Kök; yaş-kuru ağırlık ölçümleri.....	54
4.5.3	Kök ve yaprak yaş-kuru ağırlıklarının karşılaştırılması.....	56
4.6	Real-Time PCR Uygulaması.....	58
4.7	RT-PCR Sonuçları, Sonuçların Normalizasyonu ve İstatistiksel Analizi.....	65
4.7.1	Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde <i>CAMTA-1</i> geni'nin mRNA kat değişimlerinin değerlendirilmesi .....	72
4.7.2	Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde <i>CAMTA-4</i> geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi... 73	
4.7.3	Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde <i>CAMTA-8</i> geni'nin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi .....	75
4.7.4	Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde <i>YABBY-4</i> geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi.... 76	
4.7.5	Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde <i>YABBY-5</i> geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi.... 77	
4.7.6	Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde <i>YABBY-7</i> geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi.... 78	

4.7.7	Genlere göre; Kurşun (Pb) (80 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi.....	79
4.7.8	Genlere göre; Kurşun (Pb) (160 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi.....	80
4.7.9	Genlere göre; Bakır (Cu) (80 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi.....	82
4.7.10	Genlere göre; Bakır (Cu) (160 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi.....	84
4.7.11	Genlere göre; Kadmiyum (Cd) (80 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi.....	85
4.7.12	Genlere göre; Kadmiyum (Cd) (160 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi.....	87
5	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	89
	KAYNAKLAR .....	92
	ÖZGEÇMİŞ.....	102

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. sınıflandırılması (Freitag ve Debouck 2002).....	4
Şekil 1.2	Kuru fasulyenin dünyadaki bölgelere göre üretim oranları (Anonim 2017).....	5
Şekil 1.3	Kuru fasulye üretiminde en iyi on ülke (Anonim 2017).....	5
Şekil 1.4	2010-2017 yılları arasında Türkiye’de kuru fasulye üretimi (Anonim 2017).....	6
Şekil 1.5	Stresle ilişkili genler ve metabolitler (Vinocur vd. 2005).....	13
Şekil 1.6	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.’de bulunan 8 <i>CAMTA</i> proteinine ait bilgiler (Büyük vd. 2019).....	28
Şekil 1.7	<i>Arabidopsis YABBY</i> gen ailesi (Bowman 2000).....	29
Şekil 3.1	Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’na ait iklimlendirme kabininde (25 <sup>0</sup> C - %70 nem) steril perlit içeren tepsilere ekimi yapılmış iki haftalık fideler.....	38
Şekil 3.1	Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’na ait iklimlendirme kabininde (25 <sup>0</sup> C - %70 nem) steril perlit içeren tepsilere ekimi yapılmış iki haftalık fideler (devam).....	38
Şekil 3.2	İstenilen büyüklüğe ulaşan bitkilerin perlitlerden ayıklanmasının ardından, stres uygulanabilmesi için ayrı kaplara konulmuş fasulye örnekleri.....	39
Şekil 3.3	Real Time PCR cihazı, Light Cycler Nano (Roche).....	44
Şekil 3.4	Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’na ait etüvde kurutulan yapraklar ve kökler.....	46
Şekil 4.1	İstenilen büyüklüğe ulaşan ve perlitlerden ayıklanmasının ardından, stres uygulanabilmesi için ayrı kaplara konulan fasulye örnekleri.....	48
Şekil 4.2	RNA izolasyonu sonrası örneklerin jel görüntüsü.....	49
Şekil 4.3	BSA standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği.....	50
Şekil 4.4	Akman-98 fasulye çeşidinde yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamaların karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.5	Önceler-98 fasulye örneklerinde yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.6	Akman-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.7	Önceler-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.8	Akman-98 ve Önceler-98 fasulye örneklerinde uygulanan streslere göre yaprak ve kök ağırlık ortalamalarının dağılımları.....	58
Şekil 4.9	Aktin ( <i>ACT</i> ) gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	59
Şekil 4.10	Aktin ( <i>ACT</i> ) geni için qRT-PCR’ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü.....	59

Şekil 4.11	<i>CAMTA-1</i> gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	60
Şekil 4.12	<i>CAMTA-1</i> geni için qRT-PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü .....	60
Şekil 4.13	<i>CAMTA-4</i> gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	61
Şekil 4.14	<i>CAMTA-4</i> geni için qRT-PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü .....	61
Şekil 4.15	<i>CAMTA-8</i> gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	62
Şekil 4.16	<i>CAMTA-8</i> geni için qRT-PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü .....	62
Şekil 4.17	<i>YABBY-4</i> gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	63
Şekil 4.18	<i>YABBY-4</i> geni için PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü.....	63
Şekil 4.19	<i>YABBY-5</i> gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	64
Şekil 4.20	<i>YABBY-5</i> geni için PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü .....	64
Şekil 4.21	<i>YABBY-7</i> gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği.....	65
Şekil 4.22	<i>YABBY-7</i> geni için PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü.....	65
Şekil 4.23	Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>CAMTA-1</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	73
Şekil 4.25	Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>CAMTA-4</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	74
Şekil 4.26	Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>CAMTA-4</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	74
Şekil 4.27	Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>CAMTA-8</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	75
Şekil 4.28	Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>CAMTA-8</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	75
Şekil 4.29	Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>YABBY-4</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	76
Şekil 4.30	Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>YABBY-4</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	76
Şekil 4.31	Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>YABBY-5</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	77
Şekil 4.32	Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>YABBY-5</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	77
Şekil 4.33	Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>YABBY-7</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	78

Şekil 4.34 Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve <i>YABBY-7</i> genine ait mRNA kat değişimleri.....	78
Şekil 4.35 Genlere göre; kurşun (Pb) 80 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları .....	80
Şekil 4.36 Genlere göre; kurşun (Pb) 160 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları .....	81
Şekil 4.37 Genlere göre; bakır (Cu) 80 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları.....	83
Şekil 4.38 Genlere göre; bakır (Cu) 160 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları .....	85
Şekil 4.39 Genlere göre; kadmiyum (Cd) 80 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları .....	86



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Bitkilerde stres ve çeşitleri (Maheswari vd. 2012) .....	7
Çizelge 1.2	Abiyotik stres-ROS ilişkisi (Gill vd. 2010) .....	15
Çizelge 1.3	Önemli bazı ağır metallerin gereklilik ve kirleticilik yönünden sınıflandırılması (Yıldız 2004).....	19
Çizelge 1.4	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.'de bulunan sekiz <i>YABBY</i> proteinine ait bilgiler (İnal vd. 2017) .....	29
Çizelge 3.1	Hoagland besin çözeltisi içerikleri.....	37
Çizelge 3.2	Örnekler için oluşturulan kodlar ve karşılıklarına ait örnekler .....	41
Çizelge 3.3	Genezol protokolü işlem basamakları.....	42
Çizelge 3.4	Toplam RNA ve primer karışımı .....	43
Çizelge 3.5	Aktin ve hedef <i>CAMTA</i> - <i>YABBY</i> genlerine ait primer tasarımları.....	44
Çizelge 3.6	Çalışmada kullanılan Real Time PCR protokolü.....	45
Çizelge 3.7	Çalışmada kullanılan Real Time PCR programı.....	45
Çizelge 4.1	Örneklerin, BSA standartlarının absorpsanlarına göre hesaplanan protein miktarları.....	50
Çizelge 4.2	Ortalama absorpsan ve ortalama konsantrasyon değerleri .....	51
Çizelge 4.3	Akman-98 fasulye çeşidinde yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması .....	52
Çizelge 4.4	Önceler-98 fasulye çeşidinin yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması .....	53
Çizelge 4.5	Akman-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması .....	54
Çizelge 4.6	Önceler-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamaların karşılaştırılması.....	55
Çizelge 4.7	Akman-98 ve Önceler-98 fasulye örneklerinde uygulanan streslere göre yaprak ve kök ağırlık ortalamalarının dağılımları .....	56
Çizelge 4.8	<i>CAMTA-1</i> ve <i>ACT</i> gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri .	66
Çizelge 4.9	<i>CAMTA-4</i> ve <i>ACT</i> gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri .	66
Çizelge 4.10	<i>CAMTA-8</i> ve <i>ACT</i> gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri .	67
Çizelge 4.11	<i>YABBY-4</i> ve <i>ACT</i> gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri...	67
Çizelge 4.12	<i>YABBY-5</i> ve <i>ACT</i> gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri...	68
Çizelge 4.13	<i>YABBY-7</i> ve <i>ACT</i> gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri...	68
Çizelge 4.14	Livak metodu ile elde edilen cq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları ( <i>CAMTA-1</i> )...	69



- Çizelge 4.15 Livak metodu ile elde edilen cq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (*CAMTA-4*)... 70
- Çizelge 4.16 Livak metodu ile elde edilen cq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (*CAMTA-8*)... 70
- Çizelge 4.17 Livak metodu ile elde edilen cq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (*YABBY-4*).... 71
- Çizelge 4.18 Livak metodu ile elde edilen cq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (*YABBY-5*).... 71
- Çizelge 4.19 Livak metodu ile elde edilen cq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (*YABBY-7*).... 72



## 1 GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Fabacea ailesine ait Türkiye’de ve dünyada tüketilen yemeklik baklagil çeşitleri arasında önemli yere sahip bir türdür. Hem protein değerinin yüksek olması açısından, hem de yetiştiği toprağın humus ve azot miktarını arttırmamasından dolayı tarımda tercih edilmektedir. Anavatanı Asya olarak kabul edilen fasulyenin Türkiye’de tescillenmiş 30’a yakın çeşidi bulunmaktadır (Tarım, Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı, Bülten 2017).

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde sıklıkla görülmekte olan; yenilenebilir enerji kaynaklarının öneminin henüz tam anlamıyla kavranamamış olması, kontrolsüz sanayileşme ve motorlu taşıtların yaygın kullanımı, insan kaynaklı birçok metal ve metal türevinin doğaya salınımına neden olmaktadır. Bu salınımına bağlı olarak da günümüzde metal toksisitesi en önemli çevresel problemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Metal toksisitesi, topraktaki birikimi ve ekosistem değişkenlerine olan etkisinin yanı sıra besin zinciriyle veya aerosol- toz bileşimi halinde solunumuyla da insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir. Yüksek konsantrasyondaki ağır metallerin bitkilerde fotosentez, mineral beslenme ve su ilişkileri gibi birçok fizyolojik süreç üzerinde zararlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Ali vd. 2013, Li vd. 2013).

Doğada sıkça rastladığımız ağır metallerin bazıları; Kobalt, bakır, mangan, nikel, molibden bitki gelişiminde önemli bir rol üstlenirken; kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), arsenik, alüminyum, civa bitki gelişimine zarar veren ağır metallere dendir. Ancak bu iki ağır metal grubunun bitkilerde aşırı birikimi çoğu zaman bitkinin generatif ve vejetatif gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Gür vd. 2004).

Ağır metaller bitkiler üzerinde önemli bir abiyotik stres faktörüdür. Bitkilerin stres koşullarına verdikleri tepkilerin ve ayrıca bu süreçte, mevcut koşullara uygun olarak geliştirdikleri adaptasyonların bilinmesi gerekmektedir (Abolghassem vd. 2015).

Birim alana düşen verim miktarının artırılması, ekolojik koşullara uygun bitki çeşitlerinin belirlenmesi ve biyoteknolojik gelişmelerden faydalanıp bitki çeşitlerinin çevresel etkilere daha hızlı ve daha fazla adapte olmasını sağlamaya bağlıdır.

Bu nedenle bitki çeşitlerinin stres koşullarına karşı geliştirdikleri savunma mekanizmalarının üzerine çalışılması ve bu mekanizmaların belirlenip aydınlatılması oldukça önemlidir (Büyük ve Aras 2016).

Bu mekanizmalar aydınlatılırken; metal türü ve miktarı ile birlikte bitki çeşidinin toksisite tolerans seviyesi ve zarar oluşum süreci gibi kavramların da bilinmesi ve üzerinde çalışılması gerekmektedir. Zira bu kavramların bilinmesi ve araştırılması bitkilerin gelişimi için oldukça büyük önem arz etmektedir (Paschke vd. 2005).

Bitkilerde stres koşullarına yönelik tepkilerin oluşması ve bu süreçte bitkinin uyumluluğu ve adaptasyon süreci denilince, transkripsiyon faktörlerinden bahsetmek bir zorunluluk haline almaktadır. Transkripsiyon faktörleri, genel bir ifade ile DNA'nın belli bölgelerine bağlanarak genin ifade seviyesine etki eden proteinler olarak tanımlanabilir. Bazı transkripsiyon faktörleri RNA polimeraz kompleksinin bağlanmasını etkilediği gibi bazı transkripsiyon faktörleri de kromatin yapısını değiştirmektedir. Gen ifadesini engelleyici transkripsiyon faktörlerine 'repressörler', gen ifadesini kolaylaştıran transkripsiyon faktörlerine ise 'aktivatörler' adı verilmektedir. Aktivatörler; RNA polimeraz kompleksini ve histon asetilesyonunu tetiklerler, repressörler ise tam tersi bir etkiyle histon deasetilesyonunu tetikleyebilmektedirler. Transkripsiyon faktörleri bitkilerde önemli regülatör moleküllerden olup ilgili genlerin promotor bölgelerinde *cis* elementleriyle bağlantı kurarak genin ifade seviyesine aktivatör veya repressör olarak etki etmektedirler (Agarwal vd. 2007). Düzenleyici olarak rol oynadıkları yollara; gelişim, bazal transkripsiyon regülasyonu, hücrelerarası sinyallere oluşan cevap, patojenezis, çevresel faktörlere cevap, hücre siklusunun kontrol edilmesi ve bitkilerde metabolit birikimi arttırmaya aracılık etmek gibi hayati hücreyel olaylar örnek olarak verilebilir (Wärnmark vd. 2003).

Genler bitkilerde stres koşullarına karşı verilen cevaplar dikkate alındığında erken ve geç cevap genleri olarak sınıflandırılabilir. Geç cevap genlerinde, yavaş indüklenme ve genelde devamlı bir ekspresyon söz konusuysen; erken cevap genlerinde, hızlı ama geçici bir indüklenmeden bahsedilir.

Bitkilerin stres etkenlerine verdikleri cevaplarda birçok sinyal iletim yolu bulunmaktadır ve değişen stres etkilerine bağlı olarak da birçok genin ekspresyonunda da değişimler görölmektedir (Zhu vd. 2002).

Yapılan son çalışmalarda, stres toleransı kavramı devreye girdiğinde bitki aleminde iki spesifik transkripsiyon faktörünün önemli olduğu görölmektedir. Bunlar, *CAMTA* (Calmodulin bağlayıcı transkripsiyon aktivatörleri) ve *YABBY*'dir. *CAMTA*'lar; hastalıklara karşı direnç, herbivor ataklara karşı direnç ve abiyotik stres toleransı gibi biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynarlar (Doherty vd. 2009). *YABBY* gen ailesi de özellikle yaprak, iek ve meyvenin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Han vd. 2015).

Daha önce fasulye bitkisinde farklı transkripsiyon faktörü aileleri ile yapılmış genom düzeyinde biyoinformatik çalışmalar mevcuttur (Büyük ve Aras. 2016, İnal vd. 2017). Ancak, *CAMTA* ve *YABBY* transkripsiyon faktörü ailelerinin, fasulye bitkisinde ağır metal stresi ile ilişkisinin incelendiği bir çalışma bilgimiz dahilinde bulunmamaktadır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının amacı, biri dirençli, diğeri hassas olmak üzere iki farklı fasulye çeşidinin ağır metal stresi altında *YABBY* ve *CAMTA* genlerinde meydana gelen gen ifadesi değişimlerini qRT-PCR ile mRNA düzeyinde incelemektir.

Bu alışma ile Türkiye'de büyük bir ticari öneme sahip olan fasulye çeşitlerinin dayanıklılık sınırlarının mukayese edilmesi ve ağır metal stresi sonrası bitki savunma mekanizması üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

## **1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)**

### **1.1.1 Tarihçesi**

Fasulyenin anavatanı kimi araştırmacılara göre Avustralya kimi araştırmacılara göre ise Afrika olarak belirtilmektedir. Ancak fasulyenin anavatanı olarak Amerika kabul edilmiştir. Amerika'dan sonra fasulye ilk önce Avrupa'da daha sonra da Asya'da yetiştirilmeye başlanmıştır.

Özellikle Meksika’da fasulye yetiştiriciliğinin uzun yıllar öncesine dayandığı bilinmektedir. Amerika ve Meksika’da fasulyenin birçok değişik formlarının olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’de ise fasulye yetiştiriciliğine diğer baklagillerden sonra başlandığı ve yaklaşık 200 yıla yakın süredir yetiştirildiği düşünülmektedir (Anlarsal 2005).

### 1.1.2 Sınıflandırılması

Fasulye *Phaseolus* cinsine bağlı bir türdür. En önemli türü olan *Phaseolus vulgaris* L.’nin sınıflandırılması Şekil 1.1’de belirtilmiştir (Freitag vd. 2002).

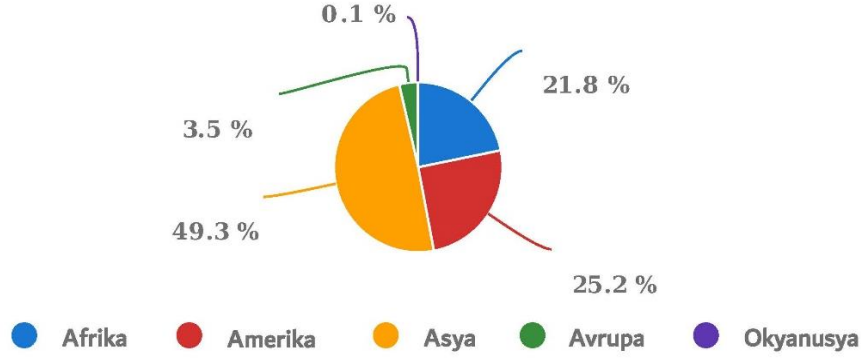
Domain..... Eukarya (Ökaryotikler)  
Alem.....Plantae  
Bölüm..... Magnoliophyta  
Sınıf.....Magnoliopsida  
Takım..... Fabales  
Aile.....Fabaceae (Baklagiller)  
Cins.....*Phaseolus* L.  
Tür.....*Phaseolus vulgaris* L.

Şekil 1.1 *Phaseolus vulgaris* L. sınıflandırılması (Freitag ve Debouck 2002)

### 1.1.3 Dünyada ve Türkiye’de fasulyenin önemi ve üretimi

Fasulye hem insanlar için hem de çiftçiler için fazlaca önem arz etmektedir. Fasulyenin besleyici bir bakliyat olması, mineral ve proteince zengin olması ayrıca insanlar tarafından tadının lezzetli bulunması sebebiyle önemli besinlerden biridir (Güvenç 1993). Fasulye yüksek protein içeriğinin (%18-30) yanı sıra fosfor, demir ve B1 vitamini bakımından da benzer gıdalar içerisinde ayrı bir öneme sahiptir. Tanesindeki protein, insan beslenmesinde mutlak gerekli olan lösin, lizin, izolösin, fenilalanin, valin, teronin, triptofan ve metiyonin gibi amino asitleri içermektedir (Önder ve Özkaynak 1994).

Kuru fasulye dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan baklagil türüdür. Kuru fasulyenin dünyada yetiştirilme oranları Şekil 1.2’de verilmiştir.



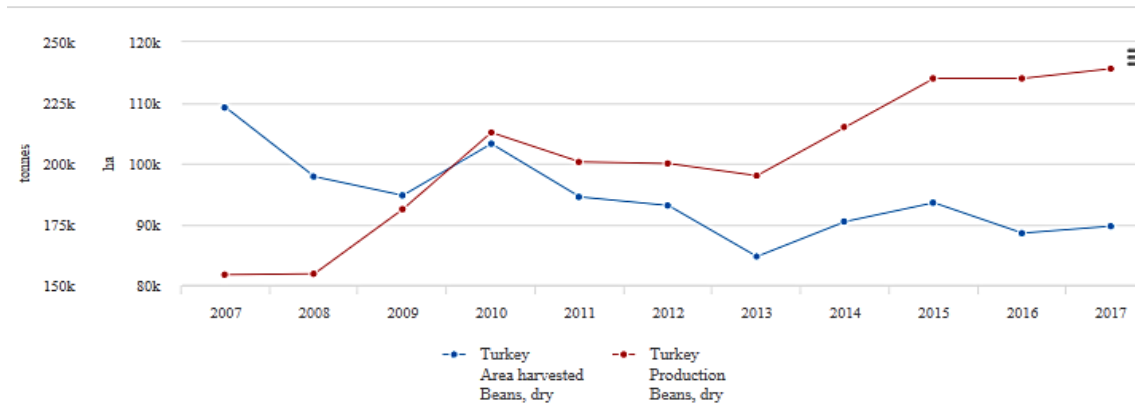
Şekil 1.2 Kuru fasulyenin dünyadaki bölgelere göre üretim oranları (Anonim 2017)

Ülkeler bazında kuru fasulye üretiminde ise verimlilikten dolayı 5 milyon ton ile Myanmar ilk sırada gelmektedir. Dünya ülkelerine göre fasulye üretiminde en iyi on üretici ülke Şekil 1.3’te verilmiştir.



Şekil 1.3 Kuru fasulye üretiminde en iyi on ülke (Anonim 2017)

Şekil 1.4’te verilen FAOSTAT verilerine göre 2010-2017 dönemi değerlendirildiğinde Türkiye’de ortalama 94.000 hektar alanda 201.000 ton kuru fasulye üretimi yapılmaktadır (Anonim 2017).



Şekil 1.4 2010-2017 yılları arasında Türkiye’de kuru fasulye üretimi (Anonim 2017)

Kuru fasulye yetiştirilen alanlar ve üretimi bakımından ülkemizde bulunan bölgeler değerlendirildiğinde İç Anadolu Bölgesi birinci sırada gelmektedir. Konya ili 70 bin ton üretimi ile tek başına üretimin %30’unu karşılamaktadır (Anonim 2018).

#### 1.1.4 İklim ve toprak istekleri

Fasulye üretiminde en uygun sıcaklık 15-20°C’dir. Fasulye çimlendikten sonra topraktan ilk çıkışı uygun koşullarda yedi-on gün arasında olmaktadır. İdeal sıcaklık olmaz ise bu süre yirmi-yirmi beş güne kadar çıkabilir. Vejetasyon süresi fasulyede 70-140 gün arasında değişmektedir. Fasulyenin sarılıcı veya bodur ayrıca, erkenci ya da geçici olmasında vejetasyon süresinin ve yetiştirilen bölgenin ekolojik şartları önemlidir (Özkorkmaz-Atıcı, F. vd. 2014).

Çiçeklenme süresi toprak nemine de bağlıdır. Düşük nemde çiçek tozlarının çimlenememesinden kaynaklı çiçek dökülmeleri görülmektedir. Yüksek sıcaklıkta da yine çiçeklerde dökülme görüldüğünden mahsul miktarı oldukça azalmaktadır. 0-25°C fasulyelerde en ideal çiçeklenme sıcaklığıdır. Fasulyelerin olgunlaşma zamanında ise hava kuru olmalıdır (Freytag and Debouck 2002, Özdem 2012).

#### 1.2 Bitkilerde Stres ve Stres Çeşitleri

Bitkilerde stres çeşitleri abiyotik ve biyotik olarak iki grup altında incelenebilmektedir. Bu iki grup Çizelge1.1’te verilmiştir (Maheswari vd. 2012).

Çizelge 1.1 Bitkilerde stres ve çeşitleri (Maheswari vd. 2012)

STRES ÇEŞİTLERİ	
BİYOTİK STRES	ABİYOTİK STRES
FUNĞI	KURAKLIK
BAKTERİ	TUZLULUK
PARAZİT	YÜKSEK VE DÜŞÜK SICAKLIK
VİRÜS	AĞIR METAL STRESİ
BÖCEK	OKSİDATİF STRES
PATOJEN	BESİN STRESİ

### 1.2.1 Abiyotik stres çeşitleri

#### 1.2.1.1 Yüksek sıcaklık stresi

Yüksek sıcaklık stresi bitkilerin çoğunluğunun iyi geliştiği 15-45°C sınırının üstündeki sıcaklıklarda ortaya çıkar. Dünya popülasyonunun 2050 yılına kadar 9.2 milyara ulaşması beklenmektedir. Bu artışla birlikte küresel ısınmanın da gittikçe artacağı düşünülmektedir. 2100 yılına kadar CO<sub>2</sub> miktarının ve diğer sera gazlarının miktarının yükselmesi sonucunda küresel hava sıcaklığının ortalama 1,5-4,5°C artacağı düşünülmektedir (Bahuguna vd. 2014). Bu yükselişten dolayı bitkilerin yüksek sıcaklık stresine bağlı sorunlarının da gün geçtikçe artması ve bu stres çeşidinin çok daha önemli bir sorun haline gelmesi kaçınılmaz görünmektedir.

Yüksek sıcaklık stresinde, bitkilerin yetiştirmeleri, metabolizmaları ve alınan ürünün kalitesi ve miktarları ciddi şekilde etkilenir. Yüksek sıcaklık sonucunda moleküllerin hareketleri hızlanır, büyük organik moleküller arasındaki bağlar gevşer ve biyolojik zarlar daha akışkan hale gelir. Bununla beraber yüksek sıcaklık, proteinlerin denatüre olmasına, enzimlerin aktivitesinin azalmasına, hücre yapı ve fonksiyonlarının değişmesine neden olur.

Diğer stres çeşitlerinde görüldüğü gibi yüksek sıcaklık stresinde de fotosentez oldukça etkilenmektedir. Yüksek sıcaklıkla birlikte lipitler arasındaki hidrojen bağları ve membran proteinlerinin polar grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin



zayıflaması nedeniyle bu strese maruz kalınması proteinlerin ve hem tilakoid hem de plazma membranların etkilenmesine neden olmaktadır (Sharp vd. 2004, Yasuda vd. 2008, Redondo-Gomez 2013).

Bitkiler yüksek sıcaklığa kompleks bir cevap gösterirler. Bu cevap uzun dönemde kendini gösteren evrimsel fenolojik ve morfolojik adaptasyonları içerirken aynı zamanda kısa dönemde görülen yaprak oryantasyonunun değişimi, transpirasyonun, membran lipid kompozisyonunun değişimi gibi kaçınma ve aklimatizasyon mekanizmalarını içerir (Redondo-Gomez, 2013).

### **1.2.1.2 Düşük sıcaklık stresi**

Soğuk stresi normalde 15-25°C'de yaşayan bitkilerde sıcaklık 0°C ve üstüdeyse görülen bir stres iken donma stresi sıcaklık 0°C altında düştüğü zaman görülen bir strestir. Düşük sıcaklık sonucunda bitkide bazı değişiklikler görülür. Bunlar; dokulardan elektrolit kaçağı olması sonucunda membran akışkanlığının azalması, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların yavaşlaması, su dengesinin ve mevcudiyetinin azalmasıdır (Redondo-Gomez, 2013).

Bitkilerde intraselüler buz kristalleri plazma membranına nüfuz ettiği takdirde direk ölümle sonuçlanır. Bitkiler sadece ekstraselüler donmayı tolere ederler ki bu da hücre dehidrasyonu ve hücre hacminin azalmasıyla ilişkilidir (Redondo-Gomez, 2013).

### **1.2.1.3 Tuzluluk stresi**

Dünyadaki ekim alanlarının %50'sinin ve tarımsal alanların %20'sinin tuz stresinde olduğu düşünülürken, her yıl bir milyon hektardan fazla arazinin de tuzluluğa maruz kaldığı tahmin edilmektedir (Yıldız vd. 2010).

Bu topraklarda büyümekte olan bitkiler ise tuz stresine gösterdikleri toleransa göre ikiye ayrılmaktadır. Tuzluluk oranı %20 olan topraklarda yetişebilenler yani halofit bitkiler ve tuz stresine sınırlı bir tolerans gösterebilen (tuzluluk oranı %0.01 olan topraklarda yaşayanlar) glikofit bitkilerdir (Redondo-Gomez, 2013).

Toprakta biriken tuz hem bitki fonksiyonunu hem de toprak yapısını bozmaktadır. Topraktaki yüksek tuz miktarı direkt olarak bitkilere zarar vermekte ve su geçirgenliğini azaltarak toprağın yapısını da bozmaktadır. Tuzluluk; iyon toksisitesi, bitki büyümesindeki değişimler, mineral bozukluklar, membran kararsızlığı, membran geçirgenliği, azalan fotosentez etkinliği gibi fizyolojik süreçleri etkilemektedir. Bunlarla birlikte tüm bitki seviyesinde gözlenen bodurluk, yaprakların küçülmesi ve hücre ölümleriyle birlikte görülen nekroz sonucunda büyüme uçlarında, yapraklarda ve tomurcuklarda gözlenen sarı lekeler gibi etkileri de mevcuttur (Flowers vd. 2008, Yıldız vd. 2010, Zhu, 2002).

Bitkiler tuz stresine iki farklı yolla tolerans gösterirler. Birincisi bitkiye giren tuz miktarının, ikincisi ise fotosentetik dokularda birikiminin ve sitoplazmadaki tuz konsantrasyonunun azaltılmasıdır. Bitkiler bu yolları temel alan tuzun atılması, tuzun hariç tutulması ve intraselüler iyon bölünmesi gibi ana tolerans mekanizmalarını geliştirmişlerdir (Redondo-Gomez, 2013).

#### **1.2.1.4 Besin stresi**

Bitkilerin besin ihtiyaçları 16 elementle karşılanmaktadır. Bunlar; mangan (Mn), demir (Fe), kalsiyum (Ca), hidrojen (H), oksijen (O), çinko (Zn), azot (N), fosfor (P), magnezyum (Mg), kükürt (S), karbon (C), bakır (Cu), potasyum (K), klor (Cl)'dur. Bitkiler için bu besinlerin arasındaki denge önemlidir (Chiou, 2007, McCauley, 2009).

Bitkilerin ihtiyaçlarını karşılamak ve gelişimlerini sağlamak için gerekli besin aralıkları vardır. Bu besin aralıkları bitkiden bitkiye değişiklik gösterir. Bu aralıklarının değişmesi sonucunda bitkinin gelişmesinde sorunlar ortaya çıkar ve fazla besin alınması durumunda ise toksisite görülür (Fujii vd. 2005).

Bitkilerdeki zararlar element eksikliğine göre farklılıklar gösterir. Örneğin; azot eksikliğinde yaprakların büyümesi yavaşlayıp nekroz görülürken, fosfat eksikliğinde yapraklar koyu yeşil renkte gözlenirler ve köklerinde çürüme gerçekleşir. Potasyum hayati yollarda görev aldığı için etkileri hemen gözle görülme de uzun vadede yapraklarda nekrozlar oluşur (McCauley, 2009).

### **1.2.1.5 Ağır metal stresi**

Sanayi ve tarımsal aktiviteler sonucunda toprakların, yer altı ve yer üstü sularının her geçen gün daha fazla kirlenmesi nedeniyle. ağır metal stresi gün geçtikçe daha önemli hale gelmektedir. Bitkilerin gelişiminde hayati öneme sahip olan kobalt, mangan, demir, çinko ve bakır gibi elementler bitkinin büyüme ortamında az miktarda bulunması gereken elementlerdir. Gerekenden fazla olmaları durumunda bitkide zamanla birikerek ciddi zararlara neden olmaktadır. Bu elementler hayati öneme sahip olan enzimlerin çalışmalarını inhibe etmekte, elektron aktarımında devreye girerek solunumu ve fotosentezi olumsuz yönde etkileyerek bitkiye ciddi zarar vermektedirler. Bitkiler ağır metal stresinden kaçınmak için bazı önlemler geliştirmişlerdir. Bunlardan bazıları; metale daha az dirençli bitki dokularından bu ağır metallerin ayrılması, metallerin tuz kristalleri içerisinde boşaltılması gibi mekanizmalardır (Maksymiec, 2007, Redondo-Gomez, 2013).

### **1.2.1.6 Oksidatif stres**

Hücrelere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitki hücrelerinde oluşması hücrede oksidatif strese sebep olmaktadır. Oksidatif stres; kuraklık, tuzluluk, UV ışınları, sıcak, soğuk, ağır metaller, besin eksikliği, yaralanma, hava kirliliği, patojen enfeksiyonu ve herbisitler gibi çevresel koşullarda meydana gelmektedir. Güçlü oksidantlar membran sistemlerinde ve DNA'da önemli hasarlar oluştururlar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikaller reaktif oksijen türleridir. Oksidatif hasarın önlenmesinde ve dengelenmesinde hem enzimatik olan hem de enzimatik olmayan antioksidatif sistemler önemli rol oynarlar. Enzimatik sistemde süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, fenol oksidaz ve askorbik asit oksidaz enzimleri rol almaktadır. Enzimatik olmayan sistemde ise glutatyon, fenoller, flavonoidler ve poliaminler gibi güçlü redükantlar bulunmaktadır (Mittler 2002, Apel vd. 2004, Gill vd. 2010).

### 1.2.1.7 Kuraklık stresi

Kuraklık stresi, %26'lık oranla en fazla görülen doğal stres faktörü olarak gözlenmiştir (Kalefetoğlu vd. 2005). Son yıllarda nüfus artışı ve küresel ısınmayla birlikte daha da önemli bir meteorolojik olay haline gelmektedir. Kuraklık; yağış miktarındaki azalmadan ya da düzensizlikten dolayı meydana gelen bir durumdur.

Yüksek sıcaklık, yağış yoğunluklarındaki değişiklikler, yağış mevsiminin gecikmesi, şiddetli rüzgar ve düşük nem miktarı kuraklığın oluşmasında rol alan önemli etkenler arasında sayılabilir. Kuraklığın oluşması oldukça yavaş olup etkinliği uzun süre devam etmektedir. Tarımsal kuraklık ise, bitkinin ihtiyacı olan suyun toprakta bulunmamasıdır. Bitkilerin gelişiminde yavaşlamaya ve ürün miktarında azalmaya neden olmaktadır (Miyashita vd. 2005, Çırak ve Esendal 2006).

Kuraklık, bitkiyi farklı seviyelerde, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda da olumsuz yönde etkilemektedir. Öncelikle kuraklık başladığında hücre genişlemesi ve büyümesinde azalmalar görülür. Kuraklıkta ilerleme devam ettiği takdirde bitkideki zarar miktarı da artar. Özellikle fotosentez bundan oldukça fazla etkilenir. Transpirasyon oranı düşer; dokularda ozmotik potansiyel ve solunum aktivasyonu azalır. Hüresel seviyede ise membranlar ve proteinler hidrasyonun azalmasıyla ve ROS artışıyla zarar görür (Redondo-Gomez 2013, Verma vd. 2013).

Kuraklık stresi altında turgor kaybı nedeniyle hücre büyümesi olumsuz olarak etkilenmekte ve hücreler küçük kalmaktadırlar. Kuraklık stresi ile tohumların çimlenme yeteneklerini de kaybettikleri görülmektedir. Suyun yeterli miktarda olmaması, ksilem ve floem aktivitelerini negatif yönde etkilediğinden meyvelerin küçük kalmasına ve ürün kalitesinin düşük olmasına sebebiyet vermektedir. Kuraklık boyunca fotosentez ve solunum yavaşlamakta, hatta durabilmektedir (Kalefetoğlu vd. 2005).

Stomaların kapanması ise kuraklığa karşı verilen ilk tepkilerdendir. Stomaların kapanmasıyla, kloroplastlara CO<sub>2</sub> girişi de kısıtlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda stomaların kapanmasının daha çok toprağın su potansiyeline bağlı olduğu gösterilmiştir (Mullet vd. 1996, Kalefetoğlu vd. 2005).

Bitkiler kuraklık stresinin üstesinden gelmek için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Öncelikle su kaybının azaltılması için stomalar kapatılır (Mullet vd. 1996, Kalefetoğlu vd. 2005, Redondo-Gomez 2013, Verma vd. 2013). Stomaların kapanması absisik asit (ABA) tarafından indüklenir. Bitki hormonu olan ABA, kuraklık stresinde stomal davranışın ve metabolizmanın regüle edilmesiyle görevlidir. Kökte sentezlenen ABA ksilem aracılığıyla serbest formuyla ya da glikozla konjuge halde yapraklara taşınmaktadır (Sauter vd. 2002).

Kuraklık devam ettiği takdirde yapraklar su kaybetmeye devam eder. Böylece yaprak dokularındaki turgor basıncı düşer ve yapraklar solmaya başlar. Bu durumla karşılaşıldığında bitki güneş ışınlarından korunabilmek için ilk olarak fotosentetik mekanizmayı koruma altına alır. Kloroplastlarla yapılan çalışmalar sonucunda iki fotosistemin özellikle de fotosistem II'nin kuraklık stresinden oldukça fazla etkilendiği görülmüştür. Fotosistem II'nin reaksiyon merkezinde olan ve fotoinhibisyonun en etkili olduğu alanlar olan D1 ve D2 proteinlerinin yüksek etkili stres altında degradasyonları gerçekleşmekte ve bunun sonucunda tüm fotosistem II parçalanmaktadır. Bunun olmaması için stomal koruma gerçekleştirilir, stomalar kapatılır ve CO<sub>2</sub> akışı sınırlandırılır (Giardi vd. 1996, Lu vd. 1999, Redondo-Gomez, 2013).

Ayrıca kuraklık stresinin üstesinden gelebilmek için düzenleyici proteinler de mevcuttur. Bu proteinler, stres sinyalinin transdüksiyonunu regüle ederler ve gen ekspresyonunu ayarlarlar. Kodlanan proteinlerin bazıları hücreleri kurumunun etkilerinden korurlar. Bu durum, çözünen maddelerin birikiminin yönetilmesini, membranlar arasındaki pasif taşınmayı, su taşınma sisteminde gerekli enerji ihtiyacının düzenlenmesini ve hücre yapısının kuruma ve ROS hasarından korunmasını içermektedir (Redondo-Gomez, 2013).

### **1.2.2 Bitkilerin abiyotik strese cevap mekanizmaları**

Bitkiler, çevresel ortam koşullarında meydana gelen değişiklikleri kontrol edememelerinden dolayı değişiklikler karşısında hayatta kalabilmek için iki önemli strateji geliştirmişlerdir. Bu iki strateji; stresten kaçınma ve stres toleransıdır. Bitkilerin hareket etme yetenekleri olmadığı için stresten kaçınma stratejisi yerine stresten

korunmak için daha çok tolerans mekanizmasını kullanırlar (Maheswari vd. 2012). Bitkilerin geliştirdiği bu mekanizma genelde benzer hücrel sinyal yollarını ve cevaplarını ortaya çıkarır. Stres proteinlerinin ortaya çıkması ve antioksidanların gen ifadelerinde artış olması bunlara örnek olarak verilebilir (Wang vd. 2003).

Bitkiler abiyotik stres çeşitlerine karşı hayatlarını devam ettirebilmek için tolerans ve adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Çevresel streslere karşı geliştirdikleri adaptasyon mekanizmaları moleküler ağ kaskatlarıyla kontrol edilirler. Bu durum stres cevap mekanizmalarını aktifleştirir; böylece homeostaz yeniden sağlanır ve hasar gören proteinlerin ve membranların tamiri ve korunması sağlanır. Ancak bu durumun kontrolü oldukça zordur. Çünkü bitkilerde abiyotik stres cevapları oldukça karmaşık mekanizmalardır ve multigeniktir (Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Hirayama vd. 2010, Cramer vd. 2011). Stresle ilişkili genler ve bu genlerin ekspresyonları bitkilerde abiyotik stres toleransının moleküler mekanizması ile ilgili genlerdir. Bu genler üç ana grupta incelenebilir. Bunlar; sinyal ve düzenleyici yollarda görevli genler (MAP kinazlar, fosfolipazlar ve transkripsiyon faktörleri), stres toleransı ile ilgili proteinleri kodlayan genler (ısı şoku proteinleri (Hsps) ve şaperonlar, geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri ve serbest radikal tutucuları) fonksiyonel ve yapısal metabolitlerin sentezlenmesinde görevli yollarda bulunan enzimlerdir (iyon taşıyıcıları) (Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Hirayama vd. 2010, Cramer vd. 2011). Stresle ilişkili genler ve proteinler ana gruplar halinde Şekil 1.5'te gösterilmiştir.

STRES İLE İLİŞKİLİ GENLER VE PROTEİNLER			
DİĞER STRES CEVAP MEKANİZMALARI	OSMOLİTLER-OSMOPROTEKTANLAR	POLİAMİNLER	İYON VE SU TAŞINMASI
↓	↓	↓	↓
<b>KAZANILMIŞ BİTKİ STRES TOLERANSI</b>			
↑	↑	↑	↑
ROS TEMİZLEYİCİLERİ VE DETOKSİFİKASYON	SİNYAL YOLAĞI BİLEŞENLERİ VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ	Hsps/ŞAPERONLAR ve LEA PROTEİNLERİ	KARBON METABOLİZMASI
STRES İLE İLİŞKİLİ GENLER VE PROTEİNLER			

Şekil 1.5 Stresle ilişkili genler ve metabolitler (Vinocur vd. 2005)

### 1.2.2.1 Osmolitler

Osmolitler; osmotik strese cevap olarak organizmalarda birikirler. Osmolitler; düşük moleküler ağırlığı olan oldukça fazla çözünebilir bileşiklerdir ve genellikle yüksek hücrel konsantrasyonlarda bile toksik değildirler. Genelde bitkileri; hücrel osmotik düzenlemenin ayarlanmasıyla, ROS detoksifikasyonu, membran bütünlüğünün korunmasıyla, kimyasal şaperon olarak görev almalarıyla ve enzimlerin/proteinlerin stabilizasyonunun sağlanmasıyla stresten korurlar. Aynı zamanda çoğu çözünen; bitkileri, hücrel bileşikler dehidrasyon hasarından korudukları için osmoprotektanlar olarak da adlandırılırlar. Osmolitler; üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; amino asitler (prolin), kuaterner aminler, çeşitli şekerler ve şeker alkolleridir (mannitol) (Chen vd. 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Ashraf ve Foolad, 2007, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

Prolin; glutamik- $\gamma$ -semialdehit (GSA) ve  $\Delta$ 1-pirolin-5-karboksilat (P5C) tarafından glutamattan sentezlenir. P5C sentaz (P5CS) glutamatın P5C'ye dönüşümünü katalizler, bunu P5C'nin P5C redüktaz (P5CR) tarafından proline dönüştürülmesi izler. Bitkide tuz stresi altında prolin birikiminin olduğu görülmüştür. Bu durum, prolin dehidrogenaz enziminin upregülasyonu ile sonuçlanır ve prolin seviyesi düşer. Prolin dehidrogenaz enziminin antisens veya duyarsız olduğu *Arabidopsis* bitkisinde serbest prolin miktarı artar ve bitki tuz stresi altında daha iyi bir tolerans gösterir (Chen vd, 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd, 2005, Ashraf ve Foolad, 2007, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

Bitkilerde glisin betain oldukça fazla çalışılan bir osmoprotektandır. Glisin betain kloroplastlarda kolinden iki adımlı bir süreçle sentezlenir. İlk adımda kolin betain aldehide kolin monooksijenaz (CMO) enzimiyle dönüştürülür ve bu adım kuraklık ve tuzlulukla indüklenir. İkinci adımda ise betain aldehit, betain aldehit dehidrogenaz (BADH) enzimi ile glisin betaine dönüştürülür. Pirinç, patates ve domates gibi birçok önemli bitki glisin betain birikimini gerçekleştirmez. Bu sebeple glisin betain biyosentezinin, genetik mühendisliğiyle bitkilerin stres koşullarına daha toleranslı hale getirilmesi son dönemlerde tercih edilen bir yaklaşımdır (Chen vd. 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Ashraf ve Foolad, 2007, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

Şeker alkolleri de bitkilerin tolerans mekanizmalarında önemlidir. Mannitol; tuz ve su stresi altında bitkide birikimi gerçekleşen bir şeker alkolüdür. Tarczynski vd. (1993), mannitol 1-fosfat dehidrogenaz kodlayan bakteriyel bir geni tütüne aktararak şeker mannitolünü sentezleyen ve biriktiren transgenik tütün bitkileri yetiştirmişlerdir. Bu sayede tuzluluğa toleransının arttığını rapor etmişlerdir. Trehalozun biyomoleküllerinin çevresel stresten koruduğu da düşünülmektedir (Chen vd. 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd, 2005, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

### 1.2.2.2 Antioksidanlar ve detoksifikasyon genleri

Bitkilerde abiyotik strese karşı verilen ilk cevaplardan biri ROS üretiminin gerçekleşmesidir. Özellikle tuz, kuraklık, sıcaklık ve bu gibi birincil stresler sonucunda oluşan ikincil bir stres olan oksidatif stres sebebiyle meydana gelen ROS membranlara ve makromoleküllere ciddi hasarlar verir hatta hücreyi ölüme bile götürebilirler (Çizelge 1.2). Bitkiler; ROS seviyesini kontrol altında tutabilmek ve ROS sonucunda oluşacak oksidatif hasarlanmadan kendilerini koruyabilmek amacıyla oldukça kompleks bir antioksidan savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bitkilerin geliştirdikleri bu mekanizma önemli bir tolerans mekanizmasıdır. Antioksidanlar yani ROS temizleyicileri; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimatik olabildikleri gibi askorbat, glutatyon, karotenoidler ve antosiyaninler gibi enzimatik olmayan moleküller de olabilir. Bu moleküllere ek olarak ROS temizleyicileri arasında osmolitler, bazı proteinler ve amfifilik moleküller de sayılabilir (Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Cramer vd. 2011, Gill vd. 2010, Mittler vd. 2004, Vinocur vd. 2005, Wang vd. 2003).

Çizelge 1.2 Abiyotik stres-ROS ilişkisi (Gill vd. 2010)





Transgenik tütün bitkilerinde over-eksprese olan Cu/Zn-SOD ile birlikte oksidatif strese karşı artan bir dayanıklılık elde edilmiştir. Başka bir çalışmada, kuraklık şartlarındaki transgenik alfalafa (*Medicago sativa*) bitkilerinin Mn-SOD eksprese ettikleri ve sonuçta hasarın azaldığı gösterilmiştir (Wang vd. 2003, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

### 1.2.2.3 İyon taşınması

Osmotik stres, topraktaki ve sulama suyundaki iyon toksisitesi ve tuzluluk özellikle de  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının dengesizliği sonucu bitkilerin gelişmesini yavaşlatan ve hasar veren bir durumdur. Bitkiler bu gibi koşullar altında iyonik ve osmotik homeostazı sağlamak amacıyla iyon taşınmasında seçici davranırlar. Hücrel iyon homeostazının sağlanmasında  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterları çok önemli bir rol oynar.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterları; membranda  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}^+$  değişimini katalizler ve böylece sitoplazmik pH'ın, sodyum seviyesinin ve hücre turgorunun dengelenmesi görevlerini de yerine getirirler (Wang vd. 2003, Zhu, 2003, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

*Arabidopsis*'te vakuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter geni olan *AtNHX1* geninin ifadesinin artmasıyla tuzluluk durumunda büyümenin ve gelişmenin gerçekleştiği gösterilmiştir. Tuzlu toprakta yetiştirilen transgenik domates bitkisinde yine aynı genin ifadesinin artması durumunda büyümenin, çiçek ve meyve üretiminin normal koşullardaki gibi gerçekleştiği gösterilmiştir (Wang vd. 2003, Zhu, 2003, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

Bitkiler iyon dengesinin bozulmaması için bir yol daha geliştirmişlerdir. Bitkilerde protonlar, iyon taşıma sisteminde iyonlara eşlik ederler. Bu durum hücre membranında bulunan proton pompaları sayesinde proton gradientinin oluşturulmasıyla sağlanır. Proton elektrokimyasal gradientinin oluşmasından üç proton pompası sorumludur. Bunlar; plazma membran H-ATPaz pompası (PM HATPaz), vakuolar tipli H-ATPaz pompası (V-ATPaz) ve vakuolar H pompalayan pirofosfataz pompasıdır (H-PPaz). PM H-ATPaz;  $\text{H}^+$ 'nin hücreden geçirilmesini sağlayarak proton harekete geçirme kuvvetini oluştururken V-ATPaz ve H-PPaz; vakuolar lümenin ve endo-membran bileşenlerini asitleştirirler (Zhu, 2002, Wang vd. 2003, Zhu, 2003).

#### **1.2.2.4 Stresle ilişkili proteinler**

Bitkiler stres koşulları altında yaşayabilmek için stresle ilişkili olan proteinleri kodlayan genleri aktif hale getirirler. Kuraklık, tuzluluk ve yüksek sıcaklık çoğu proteinin denatürasyonuna ve fonksiyonlarının kaybına neden olur. Isı şoku proteinleri (Hsps) ve geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri stres koşulları altında biriken stresle ilişkili iki önemli protein türüdür. Bu proteinler stres koşulları altında hücrel korunmada görev alırlar (Sun vd. 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Wahid vd. 2007, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

##### **1.2.2.4.1 Isı şoku proteinleri**

Bitkiler stres altında iken proteinler ve enzimler fonksiyonlarını yerine getiremezler. Stres altında hücrelerin sağ kalımı için proteinlerin fonksiyonlarını devam ettirebiliyor olması oldukça önemlidir. Stresle ilişkili birçok protein vardır. Fakat bunlardan en önemlisi Hsps'dir. Hsps kodlayan genlerin aktivasyonu yüksek sıcaklık altında organizmaların moleküler seviyede gösterdikleri en belirgin cevaptır. Hsps'ler; normal hücrel süreçte protein sentezinden, hedeflenmesinden, olgunlaşmasından ve degradasyonundan sorumlu olan moleküler şaperonlar gibi davranırlar. Bununla birlikte moleküler şaperonlar; proteinlerin ve membranların stabilizasyonunda ve proteinlerin stres şartları altında yeniden katlanmasında da fonksiyoneldirler (Sun vd. 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Wahid vd. 2007, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

Bitkilerde 5 korunmuş Hsps ailesi vardır. Bunlar; Hsp100, Hsp90, Hsp70 Hsp60 ve küçük Hsps'lerdir (sHsps). Bununla birlikte bitkilerde en etkili olan Hsps de sHsps'dir. Ayrıca birçok çalışmada da bitkilerde sHsps'nin sadece yüksek sıcaklık altında değil aynı zamanda kuraklık, tuzluluk, oksidatif stres ve düşük sıcaklıkta da ifade edildiğini göstermiştir (Sun vd. 2002, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Wahid vd. 2007, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

#### 1.2.2.4.2 Geç embriyogenez bağımlı proteinleri

Geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri de stresle ilişkili olan proteinlere örnektir. LEA proteinleri birçok bitkide kuraklığa, soğuğaa ve osmotik strese cevap olarak bulunur. LEA proteinlerinin görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte embriyogenezin geç evresi sırasında sentezleniyor olmaları, stresle uyarılmaları ve yapısal karakteristikleri (hidrofilik olmaları ve tekrar eden motifleri) bize fonksiyonu hakkında tahminde bulunma fırsatı verir.

LEA proteinlerinin iyon ayrılmasında su bağlayıcı moleküller gibi bir fonksiyonunun olduğu ve membran stabilizasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Grup II tip LEA proteini olan COR85'in soğuk stresinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Grup III tip LEA proteini olan HVA1'in ise kuraklık ve tuz stresinde etkili olduğu gösterilmiştir (Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Tunnacliffe vd. 2007, Vinocur vd. 2005, Wang vd. 2003).

### 1.3 Ağır Metaller

Bitkiler ihtiyaç duydukları tüm maddeleri kolayca kökleri aracılığı ile topraktan almaktadırlar. Ancak bazen bitkiler bu maddeleri dışarıdan alırken birçok olumsuz durum ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu negatif durumlar bitkiyi hayati derecede sıkıntıya sokabilmektedir. Besin elementlerinin farklı görevleri görevleri olduğu için, bitkide bunların dengeli halde bulunması çok önemlidir (Brohi vd. 1994).

Bitki besin elementleri, bitkilerin hayatlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan elementlerdir. Bahsedilen bu elementlerden Mg, Mn, H, O, Cl, S, Ca, Fe, Zn, Cu, C ve Mo bütün bitkiler için kesinlikle gereklidir. Ni, Al, Na, Co, ve V ise sadece bazı bitkiler için ya da hücresel işlevlerde ihtiyaç duyulduğu için yararlı element olarak kabul edilmektedir (Yıldız, 2003). Kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa en şiddetli toksik ağır metallerdir (epel, 1997). Bitki dokularına bakıldığında neredeyse tüm elementleri görmek mümkündür. Bitki bünyesine pasif olarak geçebilen ağır metaller, besin zincirine dahil olmaktadır. Bu nedenle bitkilere, insanlara ve hayvanlara zararlı etkiler

yapabilmektedirler (Lauwerys vd. 1993).

Önemli bazı elementlerin bitki-hayvan için gerekliliği ve ayrıca kirletici olup olmadığı Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3 Önemli bazı ağır metallerin gereklilik ve kirleticilik yönünden sınıflandırılması (Yıldız 2004)

Ağır Metal	Gereklilik	Kirleticilik
Gümüş	Gerekli değil	Kirletici
<b>Kadmiyum</b>	<b>Gerekli değil</b>	<b>Kirletici</b>
Krom	Gerekli	Kirletici
Kobalt	Gerekli	Kirletici
<b>Bakır</b>	<b>Gerekli</b>	<b>Kirletici</b>
Demir	Gerekli	Kirletici
Civa	Gerekli değil	Kirletici
Mangan	Gerekli	Kirletici değil
<b>Kurşun</b>	<b>Gerekli değil</b>	<b>Kirletici</b>
Nikel	Gerekli	Kirletici
Platin	Gerekli değil	Kirletici değil
Kalay	Gerekli değil	Kirletici
Çinko	Gerekli	Kirletici

Çevre kirliliği ile ortaya çıkan ağır metal tanımı genelde çok az konsantrasyonlarda dahi zehirli etkisi olan metaller şeklinde tanımlanmaktadır (Kahvecioğlu vd. 2007).

### 1.3.1 Ağır metallerin bitkilerdeki işlevi

Bitkiler gelişimleri için bazı ağır metallere düşük konsantrasyonlarda ihtiyaç duymaktadır. Bu ihtiyaçlarının en önemli nedenlerinden biri ağır metallerin enzim sisteminde kofaktör olarak bulunmasıdır. Örneğin, bakır (Cu) bitkilerde gerekli bir kofaktör olup, fotosentetik elektron transportunda rol oynar (Marschner 1995, Raven vd. 1999).

### **1.3.2 Bitkilerde metal alınımı**

Karada yaşayan bitkiler başta olmak üzere bitkiler metalleri genellikle kökleri aracılığı ile topraktan alırlar (Marschner 1995, Greger, 1999). Ancak yapılan son çalışmalarda bitkilerin, iyon ve gaz halinde bulunan metalleri de bünyesine gerek stomaları gerekse kutikula tabakasıyla alabildikleri gösterilmiştir (Lindberg vd. 1992, Marschner, 1995).

### **1.3.3 Bitkilerde metal taşınımı**

Bitkiler kökleri aracılığı ile metalleri almakta, ksilem ile gövde ve yapraklarına taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, ağır metallerin yapraklardan köklere uzanan bir taşınımının olmadığı saptanmıştır. Muhtemelen floemin, metalleri bağlayabilen iyon ve moleküllere sahip canlı hücre içermesi metallerin taşınmasını zorlaştırmaktadır (Greger 1999).

### **1.3.4 Ağır metal kirliliği**

Metal kirliliği doğada, (Li 1981, Goyer vd. 1989) fabrikalarda kullanılan ilaçlardan, koruyuculardan, fabrika bacalarından çıkan hava kirleticilerinden ve atıklarından, artan trafikten vb birçok farklı kaynaklardan olmaktadır (Peterson 1993, Li 1981, Goyer vd. 1989). Ağır metal kirliliği günümüzde özellikle hareket edemeyen topraklar üzerinde yaşayan bitkilerde birçok olumsuz etkilere sebebiyet vermektedir (Munzuroğlu ve Gür, 2000). Ağır metal kirliliği bitkilerin vejetatif ve generatif organlarına (Zheljazkov ve Nielsen, 1996), bitkinin büyümesine, (Fernandes ve Henriques 1991, Claire vd. 1991) mineral beslenmesine (Costa vd. 1994), transpirasyona (Lidon vd. 1993), fotosenteze (Nussbaum vd. 1988), enzim aktivitesine (Doncheva vd. 1996), nükleik asit yapısına (Somashekaraiyah vd. 1992) klorofil biyosentezine (Munzuroğlu ve Geçkil 2002) olumsuz etki ederek bitkideki birçok prosesin değişmesine sebep olmaktadır (Phalsson 1989). Bu nedenle ağır metal kirliliği görülen topraklar üzerinde çeşitli ıslah çalışmalarının yapılması çok önem arz etmektedir (Gieger vd. 1993).

### 1.3.5 Metal birikiminin bitkilerde yol açtığı değişiklikler

Aşırı metal stresinde bitkilerde gözle görülebilir ve ölçülebilir (morfolojik değişiklikler) düzeyde değişiklikler meydana gelir. Ancak bu değişikliklerin yanı sıra ortaya çıkan daha birçok değişikliğin saptanabilmesi ise karmaşık biyokimyasal analizler gerektirmektedir.

#### 1.3.5.1 Şekilsel değişiklikler

Metal birikimi, bitkilerde ilk göze çarpan etkiyi köklerde göstermektedir. Kökler fazlaca kısalmakta ve azalmaktadır. Metal alınımı sürdükçe etki gövde üzerinde de görünerek gövdenin kısa kalmasına neden olmaktadır (Peralta vd. 2000, Munzuroğlu ve Geçkil 2002, Stolt vd. 2003, Köleli vd. 2004, Sharma vd. 2004, Chaoui ve Ferjani 2005, Lombardi ve Sebastiani 2005).

#### 1.3.5.2 Biyokimyasal değişiklikler

Metaller, bitkilere hem doğrudan hem de dolaylı yoldan etki ederek biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Bitkilerdeki moleküllerin etkilenmesi doğrudan, serbest radikallerin oluşumu ise dolaylı yoldan etkidir.

Metaller, enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanarak **enzim inaktivasyonuna** sebep olurlar. Yapılan çalışmalarda Pb ve Cd'un fosforibulokinaz enzimlerini inhibe ettiği (Ros vd.1990) saptanmıştır.

Metal stresi, hücre zarını da etkilemektedir. Hücre zarındaki lipitlere bağlanarak **yapıyı ve fonksiyonları değiştirmektedir** (Lindberg ve Griffiths 1993, Jones ve Kochian 1997).

Bitkiler üzerinde ağır metal birikiminin yol açtığı zararlar araştırıldığında fotosentez bunların başında gelmektedir. Özellikle Cd'nin klorofil sentezini engellediği, ayrıca kloroplastlarında yapısal bozukluklara neden olduğu saptanmıştır (Gadallah 1995a, b, Ouzounidou 1998, Baszyński vd. 1980).

Prasad ve Strzalka'nın 1999 yılında yapmış olduğu çalışmada **Kalvin döngüsünde** bazı **enzimlerin** çeşitli metaller nedeniyle **inhibe** olduğu ortaya konulmuştur.

Stomaların açılıp kapanmasındaki değişiklikler fotosentez hızını etkilemektedir. Barceló ve arkadaşları (1986a, b) yaptıkları çalışmalarda, Cd'nin su ve iyon taşınımını değiştirdiğinden stoma açılmasının engellendiğini saptamışlardır. Metallerin aynı zamanda mitokondri zarlarında, elektron transport sisteminde, adenin nukleotit ve fosfat transportunda da olumsuz etki yaptığı gösterilmiştir (Brierley 1977, Taiz 1997 ve Lösch ve Köhl 1999).

### **1.3.5.3 Serbest radikal oluşumu**

Bitkilerde serbest radikallerin metal iyonundan elektron transferi ve metal iyonlarının metabolik tepkimeler ile etkileşimi sonucu ortaya çıktığı görülmektedir (Kalyanaram 1996, Dietz vd. 1999).

## **1.4 Bakır (Cu)'ın Bitkilere Etkisi**

Bakırın (Cu) bitkilerdeki görevi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar ile bakırın (Cu) bitki fizyolojisindeki rolü oldukça detaylı incelenmiştir.

Bunlar;

- ✓ Hayati önem taşıyan enzimlerin yapısında yer alması,
- ✓ Fotosentezde, solunumda, azot kullanımında ve depolanmasında, hücre duvarı metabolizmasında vb. önemli rol oynaması,
- ✓ Organik maddelerle bileşik yapması,
- ✓ Ksilemin damarlarının geçirgenliğini düzenlemesi,
- ✓ Hastalıklarda ve hastalıklara karşı dirençte rol oynaması,
- ✓ DNA ve RNA'nın üretimini kontrol etmesidir.

Bakır (Cu) eksiliğinde bitkilerde nelerin etkilendiği bilinmese de dolaylı olarak bitkilerin etkilendiği bilinmektedir. Bitkiler bakırın eksikliğinde göreceği zarar kadar

fazlalığında da zarar görmektedir. Aslında bakır (Cu) oldukça zehirli bir metaldir. Tarımsal ürünlere, suda yaşayan canlılara ve insanlara zehirli etkisi olabilmektedir (Vural 1993). Bitkilerin bakır (Cu) zehirlenmesinde, renkleri koyulaştığı, kökleri bozulduğu, membran geçirgenliği hasar gördüğünden kök hücrelerinde iyon kaybı yaşadığı, fotosentez işleminin bozulduğu belirtilmektedir (Çıngı 2007).

### **1.5 Kurşun (Pb)'un Bitkilere Etkisi**

Doğaya en çok zarar veren metallerin başında kurşun (Pb) gelmektedir ve çevre kirliliğine neden olan en önemli ağır metaldir. Kurşun, fabrika bacalarından, taşıtların egzoz gazlarından boya ve petrol sanayine ait atıklardan doğaya geçmektedir (Saygıdeğer 1995, Mark and Hendershot 1997, Aksoy 1995). Ancak kurşunun en fazla egzoz gazlarından kaynaklandığını görülmektedir (De Jonghe and Adams 1982, Servant 1982).

Kurşunun bitkilerdeki olumsuz etkileri incelenmiş ve bazıları aşağıda belirtilmiştir.

- ✓ kök sisteminin gelişiminin zarar görmesi
- ✓ bitkinin bodur kalmasına sebebiyet vermesi
- ✓ kloroza (yaprakların sarımtırak renk aldığı bitki hastalığı) neden olması
- ✓ enzim aktivitesinin engellenmesi
- ✓ hormonal durum bozukluğuna sebebiyet vermesi
- ✓ membran geçirgenliğinin dengesizleşmesine neden olması
- ✓ tohumların çimlenmesini engelleyerek çimlenme indeksini azaltması

(Sharma ve Dubey 2005).

### **1.6 Kadmiyum (Cd)'un Bitkilere Etkisi**

Kadmiyum (Cd), nadir bulunan, doğada saf olarak bulunmayan ve diğer metallere kıyasla çok daha fazla toksik bir metaldir. Biyolojik yarılanma ömrünün uzun olması ve çok düşük dozlarda dahi toksik olmasından dolayı çok önemli bir çevre kirleticisi elemettir (Goyer 1991, Lyons vd. 1996). İnsan, hayvan ve bitkiler için gerekli olmayan toksik bir elemettir (Jiang ve Li 1989, Çatak vd. 2000). Suda yüksek çözünen bir elemet



olduğundan bitki kökleri ile rahatça alınarak besin zincirine dahil olmaktadır (Dalcorso vd. 2010, Gill vd 2011). Kadmiyum (Cd) pillerde, gemi sanayisinde, çeliklerin kaplanması, boya ve elektrik sanayisinde kullanılır. En önemli kadmiyum (Cd) kaynakları; kömür yakılması, tarımda kullanılan gübreler ve baca gazlarıdır (Kahvecioğlu vd. 2007).

Kadmiyum (Cd) bitki bünyesinde;

- ✓ nitrat asimilasyonunu azaltır (Gouia vd. 2000).
- ✓ stomaların kapanmasına neden olmaktadır (Sheoran vd. 1990).
- ✓ fotosentez oranını ve klorofil sentezini azaltır (Sandalio vd. 2001).
- ✓ metabolizmalarını değiştirmekte ve enzimleri inaktive etmektedir (Sheoran vd. 1990).
- ✓ klorofil sentezinin azalmasına neden olur (Zengin ve Munzuroğlu, 2005).
- ✓ lipid peroksidasyonuna, N ve S metabolizmasının engellenmesine neden olur (Márquez-García vd. 2011).

## 1.7 Transkripsiyon Faktörleri

DNA'daki genetik bilginin okunup ifade edilmesinde görev alan protein gruplarından biridir. Transkripsiyon faktörleri, RNA polimeraz tarafından bir genin transkripsiyonuna aktivator veya repressor olarak etki etmektedir (Roeder 1996, Lee vd 2000).

Örneğin çoklu sinyal yollarını regüle ederler, bu durumda da gen transkripsiyonu ve onun downstream mekanizması aktive olur. Bitki genomu çok sayıda transkripsiyon faktörü (TF) içerir. Örneğin; *Arabidopsis* genomunun %5.9'u 1.500'den fazla transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu TF'lerinin çoğu *MYB*, *bZIP*, *WRKY* gibi birkaç büyük multigen ailesine aittir. Aynı aileye mensup olan TF'ler genelde farklı stres uyarılarına cevap verirken, bazı stres baskılayıcı genler de aynı TF'lerini kullanabilirler (Singh vd. 1985, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Hirayama vd. 2010).

Dehidrasyona duyarlı transkripsiyon faktörleri (*DREB*) ve C-tekrarlı bağlanma faktörleri (*CBF*); *DRE* ve *CRT* (C-tekrar) *cis*-aktif edici elementlerine bağlanırlar ki bunlar aynı motifi (CCGAC) içerirler. *CBF1*, *CBF2*, *CBF3* ya da *DREB1B*, *DREB1C* ve *DREB1A* gibi *CBF/DREB1* ailesinin üyeleri stresle uyarılırlar. *DREB/CBF* proteinleri *AP2/EREBF* (etilenden sorumlu element bağlayıcı protein) multigen ailesi tarafından kodlanır ve *KIN1*, *KIN2*, *ERD10*, *RD17*, *COR15A* gibi soğuk ve su stresiyle ilişkili bazı genlerin transkripsiyonlarıyla ilgilidir (Singh vd. 1985, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Hirayama vd. 2010).

Absisik asit (ABA) sinyali bitki stres cevabında çok önemli bir role sahiptir. Kuraklıkla uyarılan genlerin çalışmalarında bu genlerin ABA tarafından uyarıldığı gösterilmiştir. TF aileleri olan *bZIP* ve *MYB*; ABA sinyalinde ve onun gen aktivasyonunda görevlidir (Singh vd. 1985, Wang vd. 2003, Vinocur vd. 2005, Bhatnagar-Mathur vd. 2008, Hirayama vd. 2010).

Suyun sınırlı olduğu hücrel dehidrasyon koşullarında endojen ABA seviyesinin yükselmesi indüklenir. Bu durumda sinyal faktörlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin kodlandığı genlerin downstream hedefleri uyarılır. ABA ile ilişkili bitki stres toleransının kazanılması dehidrasyon stresi haricinde kuraklık stresinde de etkilidir. *ABF3* ve *ABF4* ekspresyonu; *Arabidopsis*'de *RAB18*, *ABI1* ve *ABI2* gibi ABA/stres-duyarlı genlerin ekspresyonlarının değişimiyle kuraklık toleransını artırmıştır (Wang vd. 2003, Bhatnagar-Mathur vd. 2008).

Tüm canlı organizmalarda olduğu gibi, bitkilerde de gen ifadesinin biyolojik kontrolünün düzenlenmesi esastır. Bitki organlarının planlanması, geliştirilmesi, farklılaşması, stomaların gelişimi, lateral organların oluşması, çiçek oluşumu ve çeşitli çevresel sinyallere verilen cevaplar gibi birçok fonksiyon için transkripsiyon faktörleri bitkilerin olmazsa olmazıdır (Yanagisawa, 1998). Bitkilerde gen ifadesini gerçekleştiren mekanizmaları açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda, bitki promotorları ile etkileşime giren çok sayıda DNA'ya bağlanan protein tanımlanmış ve bu proteinlere karşılık gelen DNA'lar klonlanmıştır (Katagiri vd. 1989, Tabata vd. 1989). Bu proteinlerin bazıları, hayvanlarda veya maya hücrelerinde karakterize edilmiş transkripsiyon faktörlerine benzerken, diğerleri bitkilere özgüdür. DNA'ya bağlanan

*AP2/EREBP*, *DOF* ve *GT1/GT2* proteinleri gibi bitki proteinleri hayvan ve mayalarla homoloji göstermeyen proteinlerdir (Yanagisawa 1998). Bu tez çalışmasında da ağır metal stresi uygulanmış fasulye çeşitlerinde *YABBY* ve *CAMTA* proteinlerine ait mRNA düzeyleri incelenmiştir.

### **1.7.1 *Phaseolus vulgaris* genomunda transkripsiyon faktörü – gen içeriği**

Bitkilere özgü transkripsiyon faktörleri (TF), çevresel stres uyaranlarına karşı tepki, bitkisel hastalık ve savunma yolları, yaşlanma, büyüme, hücre bölünmesi ve yanıtları da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen önemli rollere sahiptir. Çeşitli stres koşullarında, bitkide meydana gelebilecek fizyolojik ve metabolik tepkiler, sinyal iletimi oluşturarak, strese cevap veren gen/genlerin ifadesini başlatırlar. Transkripsiyon faktörleri stres koşulları altında, transgen kültür bitkilerinin üretiminde rol oynamakla birlikte, stresle başa çıkmada yüksek bir potansiyele sahiptirler (Yamaguchi ve Shinozaki 2006).

Transkripsiyon faktörleri, gelişmiş bitkilerde genomun yaklaşık %7'lik bir kısmı tarafından kodlanmaktadır (Udvardi vd. 2007).

Transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanma ve transkripsiyonel düzenleme bölgelerini içerir ve birden fazla hedef genin transkripsiyonunu düzenleyebilecek yeteneğe sahiptirler.

Yaygın olarak fasulye [*Phaseolus vulgaris* (L.)], 588MB küçük genom büyüklüğünde ve diploid genotiplidir ( $2n^{1/2}x^{1/2}22$ ) (Arumuganthan ve Earle 1991). Fasulye *Fabaceae* (Baklagiller) familyasının Papilionoideae alt familyasına ait bir türdür ve besin bileşenleri nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde oldukça fazla tüketilmektedir. Simbiyotik azot sabitleyici bakterilerin yardımı ile atmosferden yüksek azot fiksasyon kabiliyeti ile de bilinmektedir. Azot fiksasyon kabiliyeti ile sentetik mahsul gübrelerine duyulan ihtiyacı azaltması nedeniyle toprak yıkamasının neden olduğu su kirliliğini azaltmaktadır. Ayrıca fasulye, gelişmekte olan ülkelerde daha iyi insan beslenmesini sağlamaya yönelik gıda güvenliği planlarının hayati bir bileşenidir (Broughton vd. 2003). Aynı zamanda fasulye terapötik ve geleneksel bir ilaç kaynağı olarak da

önemlidir. Bu nedenle, *Phaseolus vulgaris* (L.) 'in ekimi hem ekonomik, hem sağlık hem de çevresel açıdan önemlidir (Borges vd. 2012, Ning vd. 2016).

Bununla birlikte, düşük hasat, ani iklim değişikliği ve çeşitli stres faktörleri üretimi olumsuz etkilediğinden talebi karşılamamaktadır. Bu nedenle strese toleranslı çeşitler üretme talebi artmaktadır. Transgenik bir ürün geliştirmek için, düzenleyici mekanizmalarda ve TF'lerin bitkilerde hem abiyotik hem de biyotik streslerde yer alan çeşitli moleküler mekanizmalarda ana düzenleyicilerin olduğu bilinmektedir (Borges vd. 2012, Ning vd. 2016).

### 1.7.2 CAMTA gen ailesi

Ca<sup>+2</sup> iyonları, ökaryotlarda hücre içi sinyal iletiminde ve gen transkripsiyonunda ikincil bir haberci olarak önemli rol oynamaktadır. Hücrede Ca<sup>+2</sup> stresine karşı birçok sensör proteini keşfedilmiştir. Bu proteinlerin arasında Kalmodulin (CaM), kalsiyum sinyal iletiminde rol oynadığı gösterilen, en çok çalışılan proteinlerden biridir (Wei vd. 2017).

Kalmodulin bağlama transkripsiyon aktivatörü (CAMTA) familyası, ilk defa hızlı yanıt stres proteinlerinden biri olduğu bilinen CaM bağlayıcı proteinlerin taranması sırasında tütünde (NtER1) gözlenmiştir. (Kim, M.C. vd. 2019) Son yıllarda; CAMTA genlerinin genom çapında tanımlanması birçok bitki türünde gerçekleştirilmiştir. Kalmodulin bağlayıcı transkripsiyon aktivatörleri (CAMTA), çeşitli biyotik ve abiyotik streslere cevap veren bitkilerde önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. Bugüne kadar, *Phaseolus* türlerinin genomlarındaki CAMTA genlerinin bileşimi hakkında bir çalışma yapılmamıştır. Biyoinformatik analizleri ile 23 *Phaseolus vulgaris* genotipinin farklı kuraklık stres düzeylerine morfolojik ve biyokimyasal tepkisi değerlendirilmiş ve duyarlı ve toleranslı genotiplerin yaprak dokularında Ph CAMTA1 ekspresyon desenleri analiz edilmiştir. Gen yapısı, protein alanı organizasyonu ve filogenetik analizler, *Phaseolus* CAMTA'larının yapısal olarak benzer olduğunu ve diğer bitki CAMTA'ları gibi üç gruba ayrılmıştır (Büyük vd. 2018).

Gene name	Transcript name	NCBI Locus ID	Chr. no.	Chr. location	Length (aa)	Mol. wt (kDa)	pI	Subcellular localization
<i>Pvul-CAMTA-1</i>	Phvul.002G209300.1	XP_007159108.1	2	36,924,678-36,935,363	1086	121.64	5.66	nucl: 12, cyto: 1
<i>Pvul-CAMTA-2</i>	Phvul.002G256500.1	XP_007159660.1	2	42,310,465-42,317,944	1105	125.26	5.57	nucl: 10, cyto: 2, vacu: 1
<i>Pvul-CAMTA-3</i>	Phvul.L002946.1	XP_007158673.1	2	32,095,502-32,104,715	987	109.53	5.68	nucl: 14
<i>Pvul-CAMTA-4</i>	Phvul.006G206400.1	XP_007148412.1	6	30,900,851-30,911,858	1076	121.66	5.82	nucl: 12, cyto: 1
<i>Pvul-CAMTA-5</i>	Phvul.003G119800.1	XP_007154445.1	3	29,859,348-29,867,209	997	112.12	7.43	nucl: 9, cyto: 3, chlo: 1
<i>Pvul-CAMTA-6</i>	Phvul.003G111900.1	XP_007154355.1	3	28,187,173-28,194,709	922	104.78	6.76	nucl: 11, cyto: 1, plas: 1
<i>Pvul-CAMTA-7</i>	Phvul.009G254500.1	XP_007138978.1	9	36,734,077-36,745,918	911	102.77	6.78	nucl: 9, cyto: 4
<i>Pvul-CAMTA-8</i>	Phvul.001G263000.1	XP_007163775.1	1	51,711,829-51,722,211	966	108.64	5.22	nucl: 13

Şekil 1.6 *Phaseolus vulgaris* L.'de bulunan 8 CAMTA proteinine ait bilgiler (Büyük vd. 2019)

### 1.7.3 YABBY gen ailesi

Bitki transkripsiyon faktörlerinden biri olan *YABBY* tohumlu bitkilere spesifiktir. *YABBY* gen ailesi; sürgün, çiçek, yaprak ve meyve gelişimine katkıda bulunmaktadır. Apikal ve çiçek meristemleriyle üretilen tüm lateral organlarda ifade edilmektedir (Bowman ve Smyth 1999, Siegfried vd. 1999).

*YABBY*, *Arabidopsis*'te sadece altı üyeye (*FIL*, *CRC*, *INO*, *YAB2*, *YAB3* ve *YAB5*), *Orzya sativa* da sekiz üyeye ve *Lycopersicon esculentum* da dokuz üyeye sahip küçük bir gen ailesinden oluşur (Huang vd. 2013). Bununla birlikte, etkilerinin moleküler temeli henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Sawa vd. 1999).

*YABBY* genlerinin ifade seviyeleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Huang vd. 2013, İnal vd. 2017). Çiçek oluşumunda ve yaprak gelişiminde *FIL* ya da *YABBY1* geni görevlidir (Yuan ve Perry 2011). Damarlanmanın gelişiminde ise *FIL* alt ailesine ait olan *YABBY4* düzenleyici olarak davranmaktadır (Liu vd. 2007). *CRABS CLAW (CRC)* ise *Arabidopsis*'te karpel ve nektarin gelişimini, haşhaşa ovül oluşumunu, oral meristem sonlanması ve dişi organların farklılaşmasında rol almaktadır (Orashakova vd. 2009). *INO* geni için *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışma ile ovülün dış integümentinin oluşumu ve asimetric büyümesinde rol aldığı tespit edilmiştir (Villanueva vd. 1999).

*YABBY* genlerinin ifade seviyelerinin ovüllerde yüksek çıkması, ovül gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca sıcak, soğuk, tuz ve kuraklık gibi abiyotik stresler altında *YABBY* genlerinin bir kısmında ifade seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir (X.C Yang vd. 2008).

Çizelge 1.4 *Phaseolus vulgaris* L.'de bulunan sekiz *YABBY* proteinine ait bilgiler (İnal vd. 2017)

Genler	Fitozom tanımı	Kromozom lokasyonu	Protein uzunluğu	Moleküler Ağırlığı (Da)
<i>PvulYABBY-1</i>	Phvul.002G069700.1	9553549..9556683	256	28916.8
<i>PvulYABBY-2</i>	Phvul.003G039800.1	4217179..4219619	173	18978.4
<i>PvulYABBY-3</i>	Phvul.003G061800.1	8393693..8395131	237	26412.2
<i>PvulYABBY-4</i>	Phvul.003G166100.1	37492965..37496762	186	20894.8
<i>PvulYABBY-5</i>	Phvul.003G217700.1	43407696..43410807	215	23982.3
<i>PvulYABBY-6</i>	Phvul.005G117600.1	33854923..33864003	185	20704.5
<i>PvulYABBY-7</i>	Phvul.010G079200.1	29466002..29468643	215	23915.2
<i>PvulYABBY-8</i>	Phvul.011G100300.1	10846106..10852521	183	20458.2

Gen Ailesi	İfade Düzeyi
<i>CRABS CLAW(CRC)</i>	Karpeller ve nektarinler
<i>FILAMENTOUS FLOWERS (FIL) (YABBY1, AFO)</i>	Kotiledonlar, yapraklar, sepaller, petaller, stamenlerde ve karpellerde
<i>YABBY2 (YAB2)</i>	Kotiledonlar, yapraklar, sepaller, petaller, stamenlerde ve karpellerde
<i>YABBY3 (YAB3)</i>	Kotiledonlar, yapraklar, sepaller, petaller, stamenlerde ve karpellerde
<i>INNER NO OUTER (INO)(YABBY4)</i>	Dış integument tabakası
<i>YABBY5(YAB5)</i>	Bilinmiyor

Şekil 1.7 *Arabidopsis* *YABBY* gen ailesi (Bowman 2000)

## 2 KAYNAK ÖZETLERİ

*Populus trichocarpa* genomunda her biri *CAMTA* proteinleri ile ilgili korunmuş alanlar içeren yedi *CAMTA* geninin tanımlandığı Wei, M. vd. (2017)'nin çalışmasında; *PtCAMTA*'ların kök ve yaprak dokularında ekspresyon modelleri analiz edilmiş olup, analiz sonuçlarında *CAMTA* geninin, stres veya fitohormonla ilişkili *cis*-elementler içerdiği bulunmuştur. Çalışmada tüm *PtCAMTA* genleri kopyalanmış bölgelere yerleştirilmiş ve *PtCAMTA1* ve *PtCAMTA7*'nin filogenetik ağacın aynı dalında yer aldığı sırasıyla kromozom I ve III'ün homolog bölgelerinde bulunduğu keşfedilmiştir. Bu bulgu iki genin homolojisi ile açıklanmıştır. Diğer türlerde karakterize edilen *CAMTA*'larda tespit edildiği gibi, *PtCAMTA*'ların yedi tanesinin de korunan alanlar içerdiği tespit edilmiştir. CaM Bağlanma Bölgeleri (CaMBD) içeren alt gruplardan birinde, *PtCAMTA2* ve *PtCAMTA3*'te diğer genlerde bulunmayan varyasyonu belirlenmiştir. Filogenetik ağaca dayanarak, *PtCAMTA2* ve *PtCAMTA3* arasında yakın bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. İlginç şekilde, *PtCAMTA2* ve 3'ün *AtCAMTA3* ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur.

*Phaseolus vulgaris*'deki *CAMTA* genlerinin in siliko genom çapında analiz yaklaşımıyla belirlendiği ve karakterize edildiği Büyük, İ. vd. (2019)'nin çalışmasında *Phaseolus vulgaris*'in 11 kromozomunun beşinde, toplam sekiz *CAMTA* geni tanımlanmıştır. Dört gen çiftinin segmental olarak kopyalandığı ve bu segmental kopyalama olaylarının 29.97 ila 92.06 MYA (Milyon Yıl Önce) arasında gerçekleştiği görülmüştür. *Phaseolus vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. Max*'a ait filogenetik ağaçta *CAMTA* homologlarının, homolojilerine ve *Pvul-CAMTA* genlerinin 11 ila 12 arasında değişen intron sayılarına göre üç grup oluşturduğu görülmüştür. *Phaseolus vulgaris* ve *G.max*'in *CAMTA* genleri, *A. thaliana*'ya kıyasla oldukça benzer genomlara sahip olduklarından daha yüksek benzerlik ortaya koymuştur. Bu çalışmada hem yaprak hem de kök dokularında, bazı *Pvul-CAMTA* genlerinin, tuz stresi koşulları altında farklı şekilde ekspresyon profili oluşturduğu görülmüştür. Tuz ile muamele edilmiş yaprak dokularındaki *Pvul-CAMTA-1*, -2, -3, -4, -5 ve -8 genlerinin ekspresyon seviyelerinin, muamele edilmemiş yaprak dokularına kıyasla arttığı gözlenmiştir. *Pvul-CAMTA-6* geni ise aynı ekspresyon seviyelerini korumuştur. Her iki koşulda da azalmış ekspresyon seviyesi gösteren tek gen, *Pvul-CAMTA-7* olmuştur. Kök dokularında *Pvul-CAMTA* genlerinin yarısının tuz

stresine cevap vermediği görülmüştür. Sadece üç *Pvul-CAMTA* (*Pvul-CAMTA-1*, *Pvul-CAMTA-2* ve *Pvul-CAMTA-4*) geninde, tuz stresine maruz bırakılan ve kontrol numuneleri arasındaki ekspresyon seviyesi açısından fark tespit edilmiştir.

Pirince ait bir *YABBY* geninin izole edilip, ekspresyon modellerinin ayrıntılı olarak analiz edildiği Liu, H. vd. (2007)'nin çalışmasında dizi karakterizasyonu ve filogenetik analizleri sonucunda, bu genin *FIL / YAB3* alt ailesine gruplanmış olan *OsYABBY4* geni olduğunu göstermiştir.  $\beta$ -glukuronidaz'ın raportör gen ve in situ analizleri tutarlı bir şekilde *OsYABBY4*'ün meristemlerde ve pirincin vasküler dokularında gelişmekte olduğunu, özellikle de floem dokusunda ifade edildiğini ve pirinç geninin fonksiyonunun angiosperm benzerlerinden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, ektopik olarak *OsYABBY4*'ü eksprese eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin, *FIL* veya *YAB3*'ü abaksial lateral organlarla aşırı eksprese edenlere çok benzer bir şekilde davrandığı görülmüştür.

Domates'te *SUN*, *OFP* ve *YABBY* gen familyalarının genom çapında tanımlandığı, filogeni ve ifade analizlerinin yapıldığı Huang, Z. vd. (2013)'nin çalışmasında domateste 34 *SISUN*, 31 *SIOFP* ve 9 *SIYABBY* geni tanımlanmış ve 12 kromozom üzerindeki pozisyonları tespit edilmiştir. Genom haritalama analizi, *SISUN*, *SIOFP* ve *SIYABBY* genlerinin, birkaç kromozomun çoğunlukla üst ve alt bölümlerinde yerleşim gösterdiği görülmüştür. *Arabidopsis* ve domates familyalarının üyelerinden (*Solanum peruvianum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*), sırasıyla *IQ67*, *OVATE* ve *YABBY* alanlarının protein sekanslarını temel alan üç filogenetik ağaç oluşturulmuş, *Arabidopsis* ve domates genlerinin en yakın varsayılan ortolojileri, filogenetik ağaç üzerindeki pozisyona ve dizi benzerliğine göre belirlenmiştir.

Domates'te yer alan tüm *YABBY* genlerinin gen ekspresyon seviyeleri ile meyve şekli arasındaki ilişkinin analiz edildiği Han H.Q. vd. (2015)'nin çalışmasında 24 türün genomunun taranmasıyla sekans analizi yapılmış olup, domates içerisindeki dokuz *YABBY* geni deneysel olarak tanımlanmıştır. Filogeni, bütün proteinlere veya *YABBY* domainine göre oluşturulmuş ve diğer angiospermelerde tarif edildiği gibi beş farklı çeşit gözlenmiştir. Domates çeşitlerinin ekspresyon paternlerinin meyve şekli ve/veya büyüklüğü bakımından büyük farklılıklar göstermesi, meyve gelişimi sırasında *YABBY*



genlerinin hem negatif hem de pozitif fonksiyonlara sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

*FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YABBY2* ve *YABBY* genlerinin açıklandığı Siegfried, K.R. vd. (1999)'nin çalışmasında genomik DNA hibridizasyon deneylerine dayanarak, *YABBY* gen ailesinin *Arabidopsis*'te 6-7 üye içerdiği tahmin edilmiştir. Ailenin dört ek üyesi (*YABBY1*, *YAB2*, *YAB3* ve *YAB5*) cDNA kütüphanesinden izole edilmiş olup, beşinci bir ek üye (*YAB4*)'ün sekansı *Arabidopsis* genom projesinden alınmıştır. Çalışmada *YAB1*, *YAB2*, *YAB3* ve *YAB5*'in *YABBY* domainin karboksil tarafında bazı sekans benzerlikleri sergilediği görülmüştür. *YABBY* ve çinko parmak bölgeleri arasında kalan bölge, aile üyeleri arasında genellikle değişkenlik göstermektedir, ancak *YAB1* ve *YAB3* arasında bazı yapısal benzerlikler saptanmıştır. Bu veriler, *YAB1* ve *YAB3*'ün ailedeki en son gen duplikasyonunu temsil ettiğini ve *YAB2* ve *YAB5*'in, *YAB1/3* ile CRC veya *YAB4*'ten daha yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Analizde *YAB1*'in *FIL*'e karşılık geldiği anlaşılmıştır. *FIL*, *YAB2* ve *YAB3*'e genlerinin benzer şekilde ifade edildikleri belirlenmiş ve bunun da benzer biyolojik fonksiyonlara sahip proteinleri kodlayabileceklerini gösterdiği ifade edilmiştir.

*C2C2-YABBY* gen ailesinin *Phaseolus vulgaris*'te genom çapında tanımlama ve karakterize edildiği Behçet, İ. vd. (2017)'nin çalışmasında tuz stresine maruz bırakılan iki fasulye çeşidinin (Yakutiye ve Zulbiye) yaprak ve köklerinde uzunlukları 173 ila 256 amino asit arasında değişen sekiz *PvulYABBY* proteini ortaya çıkartılmıştır. Tanımlanan sekiz *PvulYABBY* geni arasında üç bölümlü olarak duplike gen çifti tespit edilmiş ve bu gen çiftlerinin *PvulYABBY-1* / *PvulYABBY-3*, *PvulYABBY-5* / *PvulYABBY-7* ve *PvulYABBY-6* / *PvulYABBY-8* olduğu ifade edilmiştir.

Ağır metal stresine maruz bırakılan bitkilerde sinyal yanıtlarını araştıran Maksymiec, W. (2008)'in çalışmasında elde edilen veriler, özellikle jasmonat, etilen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile bağlantılı olanlar olmak üzere, sinyal yollarının indüksiyonu yoluyla dolaylı ağır metal etkisinin olasılığını göstermektedir. Ağır metallere etkilenen sinyal iletim yolları, uzun süre strese maruz kaldıktan sonra (genellikle bitki direncini azaltarak), büyüme işlemlerinde hızlı bir düşüşe yol açabildiği veya yaşlanmayı hızlandırabildiği sonucuna varılmıştır.

Fotosentez, transpirasyon, stoma iletkenliği ve klorofil floresans özelliklerinin brlce bitkilerinde incelendiği Miyashita, K. vd. (2004)'nin çalışmasında bitkilere kuraklık stresi uygulanmış ve tekrar su verilerek metabolik aktivitelerinin geri kazanımı araştırılmıştır. Suyun kesildiği 2 gün boyunca, fotosentez ve terleme hızı ile stoma iletkenliği hızla azalmıştır. Suyun kesildiği 7 gün boyunca,  $F_v / F_m$  klorofil flüoresans özellikleri hafifçe azalmıştır. Kuraklık stresi uygulanan gün sayısı arttıkça fotosentez, terleme ve stoma iletkenliğinde iyileşme oranı yavaş yavaş azalmıştır. İyileşme oranlarına daha detaylı bakıldığında ise kuraklık stresi sonrası fotosentez, terleme ve stoma iletkenliğinin iyileşme oranlarında kendi ilerinde de farklılıklar olduğu belirlenmiştir. İyileşme oranları karşılaştırıldığında en yüksek iyileşme oranının fotosentezde, en düşük iyileşme oranının ise stoma iletkenliğinde olduğu görülmüştür. Çalışma sonuçları, yaprak su potansiyeli ile fotosentez, terleme ve stoma iletkenliği geri kazanım seviyeleri arasında yakın bir ilişki olduğunu açıkça göstermektedir.

Kağıtağacı'nın soğuk stresi altında transkripsiyonel düzenlenmesinin ve transkripsiyon faktörlerinin kapsamlı bir analizle ortaya konuğu Peng, X. vd. (2015)'nin çalışmasında sonuçlar, 47 familyaya ait toplam 794 transkripsiyon faktnn %59'undan fazlasınının soğuk stresine verilen cevap mekanizmalarında rol oynadığını göstermiştir. Sırasıyla 95, 550 ve 149 TF içeren orta ve geç yanıt veren gruplar olmak üzere üç grup oluşturulmuş ve farklı şekilde ifade edilen bu TF'leri arasında, bir bHLH, iki *ERF* ve üç *CAMTA*, birincil sinyal transdksiyonunda çalışan kilit TF'ler olarak kabul edilmiştir. Çalışma sonucunda soğuk stresinin orta aşamasında, TF'ler tarafından düzenlenmiş temek iki biyolojik prosesin olduğu saptanmıştır bunlar, soğuk stres direnci ve apikal meristemin büyümesi/gelişmesidir.

Çevresel stresler; üretkenlik, hayatta kalma ve üreme biyolojisinde bitkilerin yanı sıra mahsuller için de önemli rol oynar. Bitkiler, iki yaygın alana dahil olabilen birçok çevresel strese maruz kalır: abiyotik (fiziksel evre) ve biyotik (rneğin patojenler, herbivor canlılar). Bununla birlikte, bitkiler stres etkileriyle başa çıkmak için farklı tolerans mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmalar fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve genetik değişiklikleri içeri, 2013 yılında "Molecular Stress Physiology of Plants" kitabında Redondo-Gomez, S. tarafından yazılan bu bölümde, bitkilerin hem abiyotik (kuraklık, yüksek sıcaklık, soğutma ve donma, UV-B radyasyonu, tuzluluk ve

ağır metaller) hem de biyotik çevresel stresleri tolere etmek için geliştirdiği başlıca mekanizmalara genel bir bakış sunmaktadır.

*Pennisetum glaucum*'daki stres indükleyebilen *DREB2A* transkripsiyon faktörü'nün analiz edildiği Agarwal, P. vd. (2007)'nin çalışmasında, DNA bağlama aktivitesi ile fosforilasyonu negatif olarak düzenleyen bir fosfoprotein olan *DREB TF*'ünün çok çalışılmamış olan *DREB2* çeşidine odaklanılmıştır. Transkripsiyon aktivasyon faktörü *DREB2A*'yı şifreleyen 332 amino asitlik cDNA, strese dayanıklı bir gıda tahıl ürünü olan *Pennisetum glaucum*'dan klonlanmıştır. Filogenetik ağaç, *PgDREB2A*'nın monokotlardan izole edilen *DREB*'lere (*DREB*'ler bağımsız bir dal oluşturmasına rağmen) daha yakın olduğunu ortaya koymuştur. Sonuçlar, *PgDREB2A*'nın soğuk stresi ile daha yüksek düzeyde bir regülasyon profili oluşturduğunu göstermektedir. Bu gözlemler, *Arabidopsis* ve pirinçte yer alan diğer *DREB2A*'lardan farklıdır ve *PgDREB2A* proteininin, ACCGAC'a sahip olan promotör bölgesi aşağı akış genlerini düzenleyebildiğini de ortaya koymaktadır. Ayrıca bu çalışma, *PgDREB2A*'nın transkripsiyon sonrası modifikasyonunun da bitkilerde stres kaynaklı DRE'ye bağımlı gen ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermektedir.

Sasaki vd. (2013) buğdayda (*Triticum aestivum*) soğuk toleransı ile ilgili yeni bir LEA proteini tanımlanmıştır. WC16 proteininin stres koşulları altında hem protein hem de DNA'yı koruduğunu belirlemiştir.

## 2.1 Amaçlar

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen *Phaseolus vulgaris* L. türleri ile stres çalışmalarında önemli transkripsiyon faktörlerinden *CAMTA* ve *YABBY* gen aileleri ile genom çapında tanımlama ve gen ifade profili oluşturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Buyuk vd 2019, İnal vd 2017).

Bu projede, Önceler-98 ve Akman-98 fasulye çeşitleri, doğada yaygın bir şekilde bulunan ağır metallerden olan kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve kurşun (Pb) streslerine farklı derişimlerde maruz bırakılmıştır. Böylelikle laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda öne çıkan ve karakterizasyonu sağlanan *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-*

8 ve *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* genlerinin ağır metal stresi altındaki fasulye bitkilerindeki gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması ve *Phaseolus vulgaris* L'in stres koşulları altında oluşturduğu moleküler ve biyokimyasal cevap mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır.



### 3 MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Tohum Temini

Bu tez çalışmasında ‘T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’ den temin edilen iki farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris*) çeşidi kullanılmıştır.

##### 3.1.1 Akman-98 (Kuru fasulye)

Yaprakları ve baklaları yeşil, çiçekleri ise beyazdır. Yapraklarının şekilleri oval sivri uçludur. 110-130 günde yetişen boyları 65-75 cm olan bodur kuru fasulye çeşididir. Yaklaşık bir baklasında 3-6 adet tane bulunmaktadır. Tanelerinde protein oranı % 22-27 arasında değişmektedir. Islatıldığı zaman yarım saatte pişmektedir. Akman-98 kuru fasulye’nin en belirgin özelliği virus ve bakteri hastalıklarına dirençli olmasıdır. (Anonim 2013).

##### 3.1.2 Önceler-98 (Barbunya)

Tescil ettirilmiş ilk barbunya türüdür. Yaprakları yeşil, baklaları açık yeşil, çiçekleri ise beyazdır. Yapraklarının şekilleri oval sivri uçludur. 105-115 günde yetişen boyları 40-50 cm bodur tipli barbunya çeşididir. Yaklaşık bir baklasında 3-5 adet tane bulunmaktadır. Tanelerinin şekli yuvarlağa yakın ve orta iriliktir. Pişme süresi ıslatılarak 30-35 dakika civarındadır. Önceler-98’in virus ve bakteri hastalıklarına orta derecede dirençlidir (Anonim 2013).

#### 3.2 Tohumun Sterilizasyonu ve Bitkinin Yetiştirilmesi

Çalışma kapsamında temin edilen *Phaseolus vulgaris* L. Akman-98 ve Önceler-98 çeşidine ait tohumlar ekilmeden önce sterilizasyon işleminden geçirilmiştir. Bu işlem çeker ocak altında ve bek alevi yakınında gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla; %5’lik sodyum hipoklorit (NaClO) ile 3 dk muamele edilen tohumlar, otoklavlanmış distile su ile (ddH<sub>2</sub>O) ile yine 3 dk boyunca yıkanmıştır. İşlem basamakları toplamda beş kez ard arda tekrar edilmiştir. Bu işlem sırasında, manyetik karıştırıcı ısıtıcı üzerinde, sabit

karıştırma hızında ve oda sıcaklığında çalışılmıştır. İşlem bitiminde tohumlar steril edilmiş kabın içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

Ekim işlemi yapılacak olan perlitler %1'lik NaClO ile yıkandıktan sonra ddH<sub>2</sub>O ile durulanmış ve 121°C'de 15 dk boyunca otoklavlanmıştır. Ardından 3-4 gün boyunca 70°C'de etüv içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

### 3.3 Hoagland Besin Çözeltisinin Hazırlanması

İki farklı çeşit tohum iki hafta boyunca Hoagland besin çözeltisi ile sulanan steril perlit içeren tepsilerde yetiştirilmiştir. Hoagland besin çözeltisi içeriği çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Hoagland besin çözeltisi içerikleri

<b>MAKRO BESİN ÇÖZELTİSİ</b>	KNO <sub>3</sub>	101,1 gr	<b>MİKRO BESİN ÇÖZELTİSİ</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 gr
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1 gr		MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,8 gr
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,5 gr		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,100 gr
	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	236,1 gr		NaMoO <sub>4</sub>	0,025 gr
	FeEDTA EDTA.2Na	10,4 gr		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,200 gr
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,8 gr		<b>Her bir bileşen 1L saf su içerisinde çözülür.</b>	
	KOH	56,1 gr			
	<b>Her bir bileşen 1L saf su içerisinde çözülür.</b>				

Hoagland çözeltisi hazırlamak için, Çizelge 3.1'de belirtilen miktarlarda kalsiyum nitrat (Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), potasyum fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>), magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, NaMoO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve ferrik EDTA çözeltisinden eklenip saf su ile 1 L'ye tamamlanır. Çözeltinin homojen olabilmesi için manyetik karıştırıcıda 5-10 dk boyunca karıştırılır. Bu işlem sırasında dikkat edilmesi gereken ise, eklenen FeEDTA çözeltisinin pH değerinin 5,5 olmasıdır. pH değerinin az ya da çok olması, bitki gelişimi üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Hazırlanan çözeltiler için, FeEDTA'nın ısı işlemler sonucunda bozunmaya uğraması ve ısıya karşı dayanıksız olması nedeniyle, yüksek sıcaklıkta çalışılmaması önerilmektedir.

Tescillenmiş fasulye çeşitleri arasından seçilen, daha önce açıklanan prosedüre uygun olarak steril edilmiş Önceler-98 ve Akman-98 çeşidi tohumlar, hazırlanan steril perlit

ortamında, 20 gün boyunca 22°C sıcaklık ve %70 nispi nem içeren Mikrotest iklim kabininde, 15 gün boyunca Hoagland besin çözeltisi ile sulanarak Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda, steril perlit içeren tepsilere ekimi yapılarak büyütüldü.



Şekil 3.1 Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'na ait iklimlendirme kabininde (25°C - %70 nem) steril perlit içeren tepsilere ekimi yapılmış iki haftalık fideler



Şekil 3.1 Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'na ait iklimlendirme kabininde (25°C - %70 nem) steril perlit içeren tepsilere ekimi yapılmış iki haftalık fideler (devam)

### 3.4 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması



Şekil 3.2 İstenilen büyüklüğe ulaşan bitkilerin perlitlerden ayıklanmasının ardından, stres uygulanabilmesi için ayrı kaplara konulmuş fasulye örnekleri



#### **3.4.1 80 ppm -160 ppm kurşun (Pb) stresi**

80 ppm'lik kurşun (Pb) solüsyonu için 1,6 gr kurşun (Pb) 1L distile su içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltiler elde edilmiştir. 500 ml Hoagland besi ortamına kurşun (Pb) son konsantrasyonu 80 ppm olacak şekilde 20 ml kurşun (Pb) solüsyonu eklenmiştir. 160 ppm'lik kurşun (Pb) solüsyonu için 3,2 gr kurşun (Pb) 1L distile su içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltiler elde edilmiştir. 500 ml Hoagland besi ortamına kurşun (Pb) son konsantrasyonu 1600 ppm olacak şekilde 40 ml kurşun (Pb) solüsyonu eklenmiştir. 15 günde yetiştirilen bitkilerden birer fide alınarak 80 ppm ve 160 ppm kurşun (Pb) içeren kaplara konulmuş, iklim ve geliştirme odasında tutularak 24. saatte yaprak ve kök dokularından örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Örnekler sıvı azot ile muamele edilerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### **3.4.2 80 ppm -160 ppm bakır (Cu) stresi**

80 ppm'lik bakır (Cu) solüsyonu için 1,25 gr bakır (Cu) 1L distile su içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltiler elde edilmiştir. 500 ml Hoagland besi ortamına Bakır (Cu) son konsantrasyonu 80 ppm olacak şekilde 20 ml Bakır (Cu) solüsyonu eklenmiştir. 160 ppm'lik Bakır (Cu) solüsyonu için 2,50 gr Bakır (Cu) 1L distile su içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltiler elde edilmiştir. 500 ml Hoagland besi ortamına Bakır (Cu) son konsantrasyonu 160 ppm olacak şekilde 40 ml Bakır (Cu) solüsyonu eklenmiştir. 15 günde yetiştirilen bitkilerden birer fide alınarak 80 ppm ve 160 ppm bakır (Cu) içeren kaplara konulmuş, iklim ve geliştirme odasında tutularak 24. saatte yaprak ve kök dokularından örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Örnekler sıvı azot ile muamele edilerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### **3.4.3 80 ppm – 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi**

80 ppm'lik kadmiyum (Cd) solüsyonu için 1,25 gr kadmiyum (Cd) 1L distile su içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltiler elde edilmiştir. 500 ml Hoagland besi ortamına kadmiyum (Cd) son konsantrasyonu 80 ppm olacak şekilde 20 ml kadmiyum (Cd) solüsyonu eklenmiştir. 160 ppm'lik kadmiyum (Cd) solüsyonu için 2,50 gr kadmiyum (Cd) 1L distile su içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltiler elde

edilmiştir. 500 ml Hoagland besi ortamına kadmiyum (Cd) son konsantrasyonu 160 ppm olacak şekilde 40 ml kadmiyum (Cd) solüsyonu eklenmiştir. 15 günde yetiştirilen bitkilerden birer fide alınarak 80 ppm ve 160 ppm kadmiyum (Cd) içeren kaplara konulmuş, iklim ve geliştirme odasında tutularak 24. saatte yaprak ve kök dokularından örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Örnekler sıvı azot ile muamele edilerek -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### 3.5 Örnekler İçin Kodların Oluşturulması

Çalışmada herhangi bir karışıklığa yol açmamak için fasulye örnekleri; çeşitlerine, ağır metal uygulamasına, konsantrasyona ve doku tiplerine göre kodlanmıştır. Bu kodlamada aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Örnekler için oluşturulan kodlar ve karşılıklarına ait örnekler

	24 SAAT						24 SAAT						24 SAAT	
	80 PPM						160 PPM						NA	
	Kurşun (Pb)		Bakır (Cu)		Kadmiyum (Cd)		Kurşun (Pb)		Bakır (Cu)		Kadmiyum (Cd)		Kontrol	
	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök
AKMAN-98	1A	8A	2A	9A	3A	10A	4A	11A	5A	12A	6A	13A	7A	14A
ÖNCELER-98	1Ö	8Ö	2Ö	9Ö	3Ö	10Ö	4Ö	11Ö	5Ö	12Ö	6Ö	13Ö	7Ö	14Ö

### 3.6 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu işlemi Genezole protokolüne (Çizelge 3.3.) göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA’larda miktar tayinin yapılması için Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılmıştır (Chomczynski ve Mackey 1995).

Çizelge 3.3 Genezol protokolü işlem basamakları

İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	2 ml'lik eppendorf tüpe 1 ml genezol eklenir.
2	Tüpün içerisine 100 - 150 mg örnek eklenir.
3	Pipetaj yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilir
4	Tüpün içerisine 200 µl kloroform eklenir, dikkatlice karıştırılır.
5	15.000 rpm'de 4°C'de 15 dk santrifüj edilir ve üst sıvı yeni tüpe aktarılır.
6	Tüpün içerisine 1:1 oranında 250 µl isopropanol eklenir ve hafif pipetaj yapılır.
7	Oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
8	15.000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilir, üst sıvı atılır, pellet tüp dibinde gözlenir.
9	Pellet üzerine %70 EtOH eklenir.
10	15.000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilir, üst sıvı atılır.
11	Pellete değmeden uzaklaştırılır ve 5-10 dk oda sıcaklığında kurutulur.
12	40 – 60 µl RNase free water eklenir.
13	5 dk 55°C'de inkübe edilir.

İzolasyon işleminden sonra RNA'lar ilk önce %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve daha sonra Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı ile saflığı ve miktarı belirlenmiştir.

### 3.7 RNA Miktarının Belirlenmesi

RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezleme işlemine geçmeden önce RNA'ların miktar ve saflık tayini yapılmıştır. 260/280 oranı 1,9–2,1; 260/230 oranı ise 2,0–2,5 arasında ise bu RNA'nın saf olduğunun göstergesidir.

## Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik agaroz jel hazırlamak için; 100 ml 1 x TBE içerisinde 1 g agaroz çözüldü ve mikrodalgada kaynatıldı. Çözelti, yaklaşık 65°C'ye geldikten sonra 10 mg/ml konsantrasyonundan 4 µl etidyum bromid eklenerek, agaroz jel tankına döküldü ve 30 dk boyunca donması beklendi. Etidyum bromid RNA'nın UV ışık altında görüntülenmesini sağlamaktadır. Daha sonra 1 µl yükleme boyası, 6x loading dye, 3 hacim RNA örneği 80-100 voltta, 30 dk boyunca yürütüldü. Jel UV-Transilimünatör'de gözlemlendi.

### 3.8 cDNA Sentezi

cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Biorad RNA örneklerinden cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit) kullanılarak gerçekleştirildi. Thermo Termalcyler PCR cihazında reaksiyon koşulları 25°C'de 5 dk, 46°C'de 20 dk ve 95°C'de 1 dk olacak şekilde sentezlendi. Sentezlenen cDNA'ların üzerine 90 µl su ddH<sub>2</sub>O su eklenerek 1/10 oranında seyreltildi. Çizelge 3.4'te cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA – primer karışımı içerisinde bulunan bileşenler ve son konsantrasyonları görülmektedir.

Çizelge 3.4 Toplam RNA ve primer karışımı

Bileşen	Son Konsantrasyon
Total RNA	10 ng – 5 µg total RNA
Primer (50 pmol/µl)	2.5 µM
Saf su	Toplam hacim 10 µl'ye ayarlanır

Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### 3.9 Primer Dizaynı

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen *Phaseolus vulgaris* L. türleri ile stres çalışmalarında önemli transkripsiyon faktörlerinden *CAMTA* ve *YABBY* gen aileleri ile

genom çapında tanımlama ve gen ifade profili oluşturma çalışmaları daha önce gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7*, *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8* genlerine ve housekeeping gen olan olarak kullanılan *ACT* (aktin) genine ait kullanılan primerler çizelgede verilmiştir (İlker vd. 2018, İnal vd. 2017).

Çizelge 3.5 Aktin ve hedef *CAMTA* - *YABBY* genlerine ait primer tasarımları

Primer Kod	İleri Primer	Geri Primer
<i>Pvul-CAMTA-1</i>	ATGAGCCCAACCAGCACTTT	ATCCATCGGCCCAAACTTT
<i>Pvul-CAMTA-4</i>	AGGGCTTGCAAATCTGGACA	GGTGACCTCTTACATGGGCC
<i>Pvul-CAMTA-8</i>	GCCACTTGTCATCCCTCACA	GCATCTTGTATCCGTGCAGC
<i>Pvul-YABBY-4</i>	TGGCAAGATGTTTCAGGGACC	TCTCGGGAGGCCTATTCACA
<i>Pvul-YABBY-5</i>	TTGCACTAACCTCCTGCCAG	AGGTTATGGGACGGGGAGAA
<i>Pvul-YABBY-7</i>	TTTCACCGGACCAACACCTC	TGGAGCAAGGAACACTCACC
<i>Actin</i>	TGAGCAAGGAGATTACAGCATTGG	CATACTCTGCCTTCGCAATCCAC

### 3.10 Real-Time PCR Reaksiyonu

cDNA sentezini takiben yapılacak olan Real-Time PCR çalışması için taraması yapılacak hedef genler olan *YABBY-3*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *CAMTA1* – *CAMTA4* ve *CAMTA-8* ve housekeeping olarak seçilmiş *ACT* genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapıldı. Uygulama için kullanılacak olan Real-Time PCR cihazı (Şekil 3.3) aracılığıyla Thermo Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.3 Real Time PCR cihazı, Light Cycler Nano (Roche)

Çalışmada ilk olarak optimizasyon için denemeler yapılmıştır. Yapılan reaksiyon denemeleri sayesinde en ideal primer ve cDNA derişimleri belirlenmiştir. Real-Time - PCR denemelerinde en erken cq (quantification cycle) değerini veren koşullar en ideal koşul olarak seçilmiştir. Çalışmada kullanılan Real-Time PCR protokolü ve Real Time PCR programı (tüm genler için) Çizelge 3.4 ve 3.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan Real Time PCR protokolü

<b>Bileşen</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
thermo Maxima SYBR Green/ROX qRT-PCR Master Mix	1X
Forward Primer	0,7 µM
Reserve Primer	0,7 µM
cDNA	2 µg
Toplam Hacim 12,5 µl'dir	

Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan Real Time PCR programı

<b>Program</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>
<b>Ön denatürasyon</b>	95 °C	10dk	1
<b>Denatürasyon</b>	95 °C	10s	
<b>Bağlama</b>	60 °C	30s	40
<b>Uzama</b>	72 °C	15s	

Real Time PCR'da Cq değerleri pik profilleri aracılığı ile belirlenmiştir. Bu Cq değerleri ve oluşturulmuş olan standart eğri grafikleri ile mRNA seviyeleri kantitatif olarak tespit edilmiştir.

### 3.11 Morfolojik ve Fizyolojik Parametre Ölçümler

#### 3.11.1 Kuru-Yaş ağırlık ölçümleri

Kontrol ve strese maruz bırakılan tüm örneklerden rastgele alınan yaprak ve kök örnekleri 1/10.000'lik hassas terazide ayrı ayrı tartılmış ve yaş ağırlıkları (g)

belirlenmiştir. Kuru ağırlıklarının belirlenebilmesi için ise, örnekler 700C’de etüvde 24 saat kurutulmuş ve yine 1/10.000’lik hassas terazide ayrı ayrı tartılarak ölçüm işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.4 Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’na ait etüvde kurutulan yapraklar ve kökler

### 3.11.2 Protein tayini

Çalışmada protein tayinleri Bradford yöntemine (Bradford 1976) göre yapıldı. Bradford yöntemi ile protein tayini yapılırken standart protein olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. Sıvı azot ile ezildikten sonra -80°C’de saklanan örneklerden 0.08 gr alınmış ve 0.7 ml sodyum-fosfat tamponunda (pH=7,2) homojenize edilmiştir. Homojenatlar ependorf tüplere konularak +4°C’de 12 dk 14.000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlardan 3 µl alınarak ELISA plateine konularak üzerine 117 µl Bradford boya eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra spektrofotometrede (UV-VIS) 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Belirlenen absorbans değerlerinden, standart ölçümler kullanılarak toplam çözünebilir protein miktarı saptanmıştır.

### 3.12 Normalizasyon ve istatistiksel analiz

Farklı ağır metal stresi uygulanmış bitkilerde *CAMTA* ve *YABBY* genine ait transkript profilleri, kontrol profilleri ve *ACT* ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin

istatistiksel olarak değerlendirilmesi Livak ve Schmittgen (2001)'in  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduna göre yapılmıştır. Araştırmacıların bir kontrol grubunun birden fazla deney grubu ile karşılaştırması gerektiğinde Dunnet testini kullanmaları önerilmektedir (Dunnet 1955). Post-Hoc testi ise (Multiple Comparisons Dependent Variable: Expression Dunnet T3) eğer varyans analizi sonucunda gruplar arasında bir fark bulunmuşsa, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için kullanılmaktadır (Roscoe 1975).

Cq değeri olarak belirlenen gen ekspresyonu sonuçları çalışmada housekeeping gen olarak kullanılan *ACT* (aktin) ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (SPSS 20) ile hesaplanmıştır. Bu şekilde ağır metal stresi altında yetirilmiş olan örneklerde *CAMTA* ve *YABBY* geni mRNA ifade seviyesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

Farklı derişimlerde ağır metal stresleri uygulanmış fasulye örneklerinde *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8* ve *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* genlerine ait farklılaşan ifade sonuçlarının, housekeeping gen olarak kullanılan *ACT* (aktin) genine göre  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi kullanılarak (Livak ve Schmittgen 2001) normalizasyonu sağlandı.

Bu verilere ait istatistiksel anlamlılık dereceleri, ortalamaları, standart sapma ve standart hataları için SPSS Ver. 20.0 yazılımı kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu, görsel ve analitik yöntemler ile (Kolmogrov-Smirnov/ Shapiro-Wilk testleri) incelendi.

Gen parametrelerinde normal dağılım görülmediğinden karşılaştırmalar Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı (Vengatesan vd. 2018). Test istatistiği (Sig. değeri) 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olarak değerlendirildi.



## 4 BULGULAR

### 4.1 Fasulye Çeşitlerinde Stres Uygulamaları

Önceler-98 ve Akman-98 fasulye çeşitlerine ait tohumlar 15 gün boyunca Hoagland ile sulanarak yetiştirilmiştir. Yetiştirilen bitkilere 80 ppm ve 160 ppm olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve kurşun (Pb) stresleri uygulanmış ve 24. saat sonunda alınan örnekler sıvı azot ile muamele edilerek -80°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

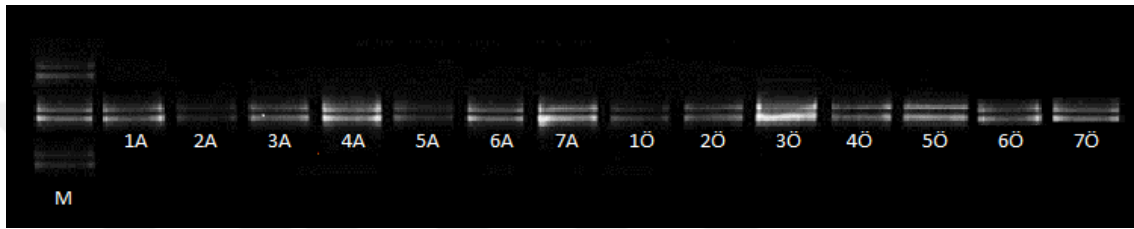


Şekil 4.1 İstenilen büyüklüğe ulaşan ve perlitlerden ayıklanmasının ardından, stres uygulanabilmesi için ayrı kaplara konulan fasulye örnekleri

## 4.2 RNA İzolasyonu

Bitki örneklerinin tümü stress uygulandıktan sonra sıvı azot ile ezilmiş ve ardından –80°C’lik derin dondurucuda saklanmıştır. RNA izolasyonu Genezol protokolüne göre yapılmış, RNA miktar ve saflık tayininde Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılmıştır (Chomczynski ve Mackey 1995).

RNA izolasyonu sonrası örneklerin jel görüntüsü aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.2 RNA izolasyonu sonrası örneklerin jel görüntüsü

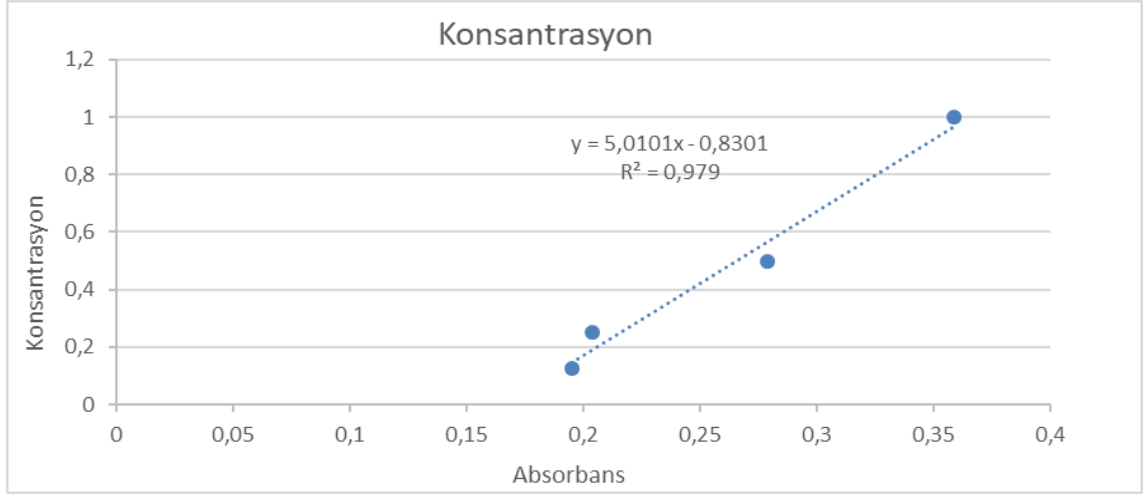
## 4.3 cDNA Sentezi

cDNA sentez kiti (Biorad RNA örneklerinden cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit) kullanılarak ve çalışılacak olan *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* ve housekeeping gen olan *ACT*’in uzunluklarının 400 bp’den büyük olması nedeniyle Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> ile çalışılmıştır.

## 4.4 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Çalışma kapsamında protein konsantrasyonları Bradford Yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford 1976).

Çalışmamızda standart eğri oluşturmak için sığır serum albümin (BSA) proteini kullanılmıştır. BSA proteinin 0,125µg/µL, 0,25µg/µL, 0,5µg/µL, 1µg/µL ve 2µg/µL olan konsantrasyonlarının 595nm’deki absorbansları ölçüldü ve standart eğri grafiği (Şekil 4.2) oluşturuldu. Konsantrasyonu bilinmeyen protein örneğinin absorbansı ile BSA standartının absorbansları karşılaştırılarak numunelerin miktarları belirlenmiştir. İlk önce regresyon eşitlik formülü elde edilmiştir.



Şekil 4.3 BSA standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği

Çizelge 4.1 Örneklerin, BSA standartlarının absorbanslarına göre hesaplanan protein miktarları

Örnekler	1.	1.	2.	2.	3.	3.	4.	4.	5.	5.	6. Absorbans	6.
	Absorbans Ölçümü (595 nm)	Konsantrasyon (µg/µL)	Absorbans Ölçümü (595 nm)	Konsantrasyon (µg/µL)	Absorbans Ölçümü (595 nm)	Konsantrasyon (µg/µL)	Absorbans Ölçümü (595 nm)	Konsantrasyon (µg/µL)	Absorbans Ölçümü (595 nm)	Konsantrasyon (µg/µL)	Ölçümü (595 nm)	Konsantrasyon (µg/µL)
1A	0,356	0,9534956	0,307	0,7080007	0,27	0,522627	0,325	0,982321	0,31	0,536106	0,298	0,6656963
2A	0,225	0,2971725	0,255	0,4474755	0,252	0,4324452	0,216	0,302152	0,27	0,445623	0,246	0,4293182
3A	0,329	0,8182229	0,342	0,8833542	0,304	0,6929704	0,318	0,715265	0,33	0,842683	0,327	0,8365995
4A	0,269	0,5176169	0,266	0,5025866	0,287	0,6077987	0,27	0,516662	0,277	0,601222	0,275	0,5101182
5A	0,259	0,4675159	0,27	0,522627	0,296	0,6528896	0,24	0,490326	0,284	0,649237	0,301	0,5034695
6A	0,278	0,5627078	0,259	0,4675159	0,255	0,4474755	0,255	0,555201	0,214	0,450198	0,323	0,4723002
7A	0,331	0,8282431	0,33	0,823233	0,338	0,8633138	0,327	0,497518	0,319	0,872366	0,353	1,1449059
1Ö	0,259	0,4675159	0,265	0,4975765	0,31	0,723031	0,27	0,431269	0,256	0,730115	0,308	0,5267394
2Ö	0,325	0,7981825	0,32	0,773132	0,297	0,6578997	0,316	0,801588	0,325	0,662958	0,301	0,7646682
3Ö	0,348	0,9134148	0,357	0,9585057	0,399	1,1689299	0,33	0,932156	0,36	1,061523	0,414	1,0471714
4Ö	0,356	0,9534956	0,382	1,0837582	0,384	1,0937784	0,345	0,939021	0,391	1,115583	0,386	1,0764282
5Ö	0,286	0,6027886	0,269	0,5176169	0,33	0,823233	0,275	0,605238	0,244	0,856223	0,366	0,4821775
6Ö	0,366	1,0035966	0,371	1,0286471	0,382	1,0837582	0,37	0,998563	0,382	0,996248	0,367	1,1211909
7Ö	0,372	1,0336572	0,382	1,0837582	0,374	1,0436774	0,371	0,984885	0,395	1,052363	0,362	1,1238448

Çizelge 4.2 Ortalama absorbans ve ortalama konsantrasyon değerleri

Örnekler	Ortalama Absorbans	Kontrol gruplarına göre anlamlılık derecesi (p)	Ortalama Konsantrasyon	Kontrol gruplarına göre anlamlılık derecesi (p)
	(595 nm)		(µg/µL)	
1A	0,311	0,078	0,7280411	0,522
2A	0,244	0,004	0,3923644	0,004
3A	0,325	0,261	0,7981825	0,522
4A	0,274	0,004	0,5426674	0,055
5A	0,275	0,004	0,5476775	0,025
6A	0,264	0,006	0,4925664	0,01
7A	0,333	-	0,8382633	-
1Ö	0,278	0,004	0,5627078	0,004
2Ö	0,314	0,004	0,7430714	0,004
3Ö	0,368	0,337	10,136,168	0,423
4Ö	0,374	0,81	10,436,774	0,936
5Ö	0,295	0,006	0,6478795	0,004
6Ö	0,373	0,467	10,386,673	0,47
7Ö	0,376	-	10,536,976	-

#### 4.5 Yaş-Kuru Ağırlık Ölçümleri

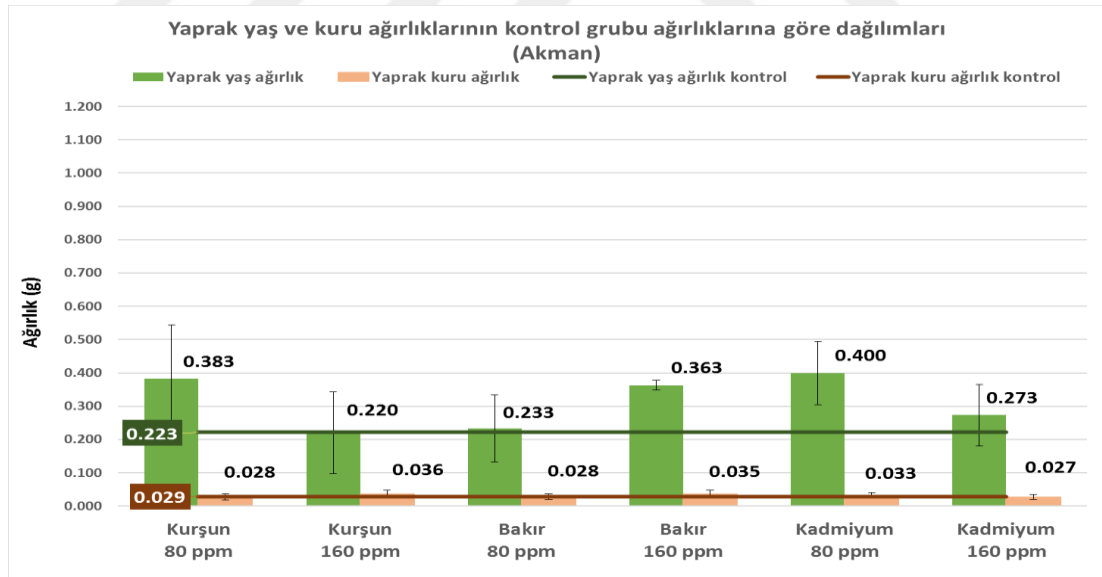
##### 4.5.1 Yaprak; yaş-kuru ağırlık ölçümleri

Akman-98 fasulye çeşidinin uygulanan stres sonrası yaprak yaş ve kuru ağırlıkları ile yaprak kontrol grubu yaş ve kuru ağırlıkları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3). Bakır (Cu) 160 ppm ve kadmiyum (Cd) 80 ppm derişiminde gözlenen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Diğer derişimlerde ise uygulanan stresler sonrası ağırlıkları ile kontrol grubu ağırlıkları ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Çizelge 4.3 Akman-98 fasulye çeşidinde yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması

UYGULANAN STRESLER	Yaş Ağırlık YAPRAK		Kuru Ağırlık YAPRAK	
	Mean ± Std. Dev.	p	Mean ± Std. Dev.	p
Kurşun (Pb) 80 ppm Kontrol	0,383 ± 0,161 0,223 ± 0,006	0,507	0,028 ± 0,009 0,029 ± 0,005	0,658
Kurşun (Pb) 160 ppm Kontrol	0,220 ± 0,123 0,223 ± 0,006	0,507	0,036 ± 0,012 0,029 ± 0,005	0,376
Bakır (Cu) 80 ppm Kontrol	0,233 ± 0,100 0,223 ± 0,006	0,507	0,028 ± 0,008 0,029 ± 0,005	0,827
Bakır (Cu) 160 ppm Kontrol	0,363 ± 0,015 0,223 ± 0,006	0,046	0,035 ± 0,012 0,029 ± 0,005	0,513
Kadmiyum (Cd) 80 ppm Kontrol	0,400 ± 0,095 0,223 ± 0,006	0,046	0,033 ± 0,007 0,029 ± 0,005	0,275
Kadmiyum (Cd) 160 ppm Kontrol	0,273 ± 0,093 0,223 ± 0,006	0,653	0,027 ± 0,007 0,029 ± 0,005	0,827

Akman-98 fasulye çeşidinde yaprak yaş ağırlıklarının uygulanan tüm stresler sonrasında kontrol grubu ortalama ağırlıklarının altında kaldığı görülmüştür. Yaprak kuru ağırlıklarının ise (çok belirgin farklar olmamakla birlikte) kontrol grubu ortalama ağırlıklarına yakın değerler aldığı görülmüştür.



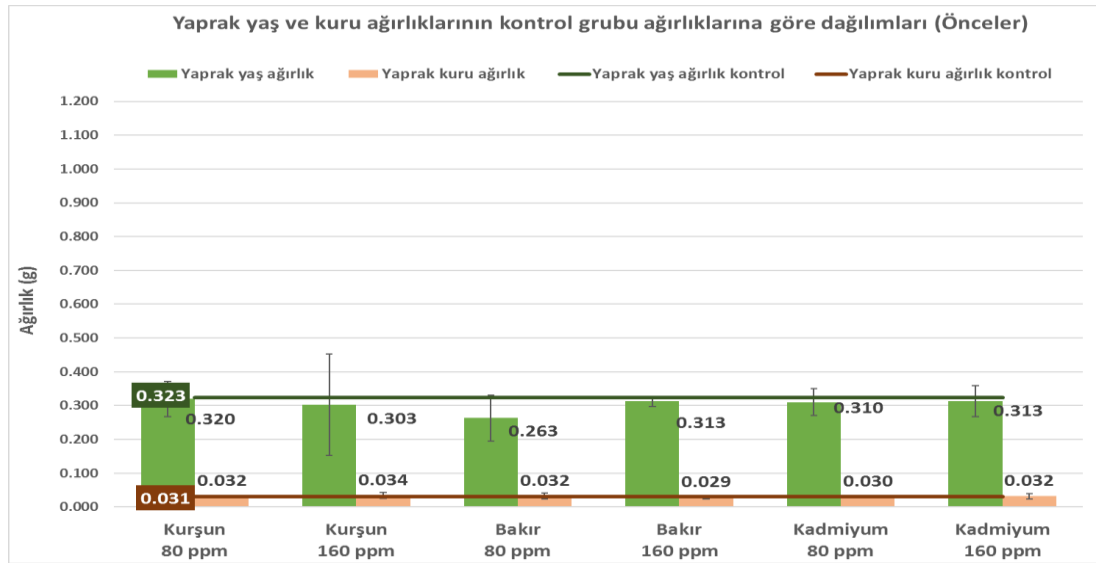
Şekil 4.4 Akman-98 fasulye çeşidinde yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamaların karşılaştırılması

Önceler-98 fasulye çeşidinin yaprak yaş ve kuru ağırlıklarına uygulanan stress uygulamaları sonrası ağırlıkları ile kontrol grubu ortalamaları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4). İstatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.4 Önceler-98 fasulye çeşidinin yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması

UYGULANAN STRESLER	Yaş Ağırlık YAPRAK		Kuru Ağırlık YAPRAK	
	Mean ± Std. Dev.	p	Mean ± Std. Dev.	p
Kurşun (Pb) 80 ppm	0,320 ± 0,052	0,825	0,032 ± 0,002	0,507
Kontrol	0,323 ± 0,076		0,031 ± 0,014	
Kurşun (Pb) 160 ppm	0,303 ± 0,150	0,827	0,034 ± 0,009	0,827
Kontrol	0,323 ± 0,076		0,031 ± 0,014	
Bakır (Cu) 80 ppm	0,263 ± 0,068	0,261	0,032 ± 0,009	0,827
Kontrol	0,323 ± 0,076		0,031 ± 0,014	
Bakır (Cu) 160 ppm	0,313 ± 0,015	0,513	0,029 ± 0,006	0,999
Kontrol	0,323 ± 0,076		0,031 ± 0,014	
Kadmiyum (Cd) 80 ppm	0,310 ± 0,040	0,827	0,030 ± 0,003	0,999
Kontrol	0,323 ± 0,076		0,031 ± 0,014	
Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,313 ± 0,046	0,817	0,032 ± 0,008	0,999
Kontrol	0,323 ± 0,076		0,031 ± 0,014	

Önceler-98 fasulye örneklerinde yaprak yaş ağırlıklarının uygulanan tüm streslerde ortalama ağırlıkların, (kurşun (Pb) 80 ppm hariç) kontrol grubu ortalama ağırlıklarının üzerinde değerler verdiği görülmüştür. Yaprak kuru ağırlıklarının ise (çok belirgin farklar olmamakla birlikte) kontrol grubu ortalama ağırlıklarına yakın değerler verdiği görülmüştür. Bakır (Cu) derişimi arttırıldığında yaprak yaş ağırlığında belirgin bir artış görülmüştür. Kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) derişimlerinin arttırılmasında bu durumun tam tersi bir değişim gözlenmiştir (şekil 4.5).



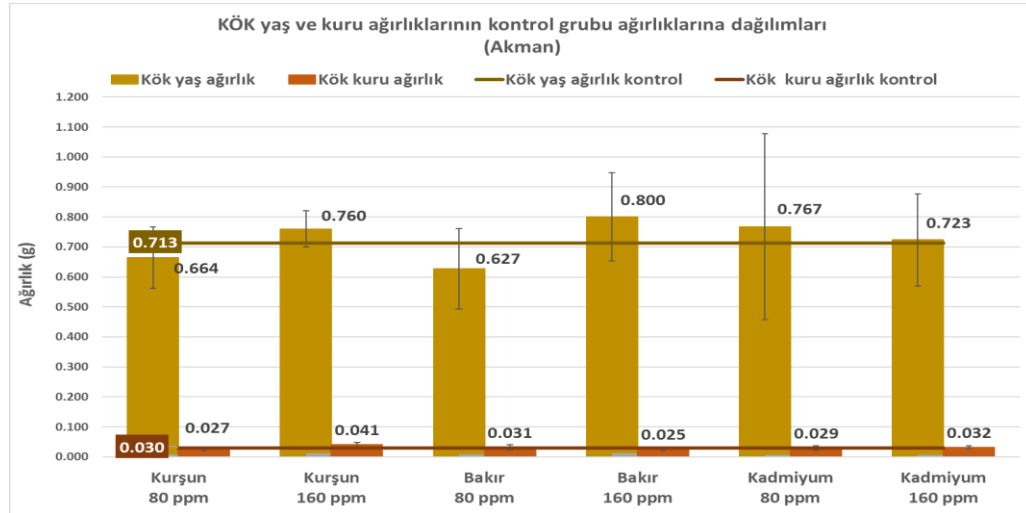
Şekil 4.5 Önceler-98 fasulye örneklerinde yaprak; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması

#### 4.5.2 Kök; yaş-kuru ağırlık ölçümleri

Akman-98 fasulye örneklerinde kök, yaş ve kuru ağırlıklarına uygulanan stresler sonrası ağırlıkları ile kontrol grubu ortalamalarının karşılaştırılmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). kuru ağırlık ortalamalarında da kontrol grup ortalaması ile aynı seviyede olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Akman-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması

UYGULANAN STRESLER	Yaş Ağırlık KÖK		Kuru Ağırlık KÖK	
	Mean $\pm$ Std. Dev.	p	Mean $\pm$ Std. Dev.	p
Kurşun (Pb) 80 ppm	0,664 $\pm$ 0,102	0,622	0,027 $\pm$ 0,007	0,586
Kontrol	0,713 $\pm$ 0,125		0,030 $\pm$ 0,005	
Kurşun (Pb) 160 ppm	0,76 $\pm$ 0,06	0,591	0,041 $\pm$ 0,007	0,096
Kontrol	0,713 $\pm$ 0,125		0,03 $\pm$ 0,005	
Bakır (Cu) 80 ppm	0,627 $\pm$ 0,134	0,459	0,031 $\pm$ 0,009	0,84
Kontrol	0,713 $\pm$ 0,125		0,03 $\pm$ 0,005	
Bakır (Cu) 160 ppm	0,8 $\pm$ 0,147	0,481	0,025 $\pm$ 0,005	0,334
Kontrol	0,713 $\pm$ 0,125		0,03 $\pm$ 0,005	
Kadmiyum (Cd) 80 ppm	0,767 $\pm$ 0,31	0,796	0,029 $\pm$ 0,008	0,907
Kontrol	0,713 $\pm$ 0,125		0,03 $\pm$ 0,005	
Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,723 $\pm$ 0,153	0,934	0,032 $\pm$ 0,005	0,613
Kontrol	0,713 $\pm$ 0,125		0,03 $\pm$ 0,005	



Şekil 4.6 Akman-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması

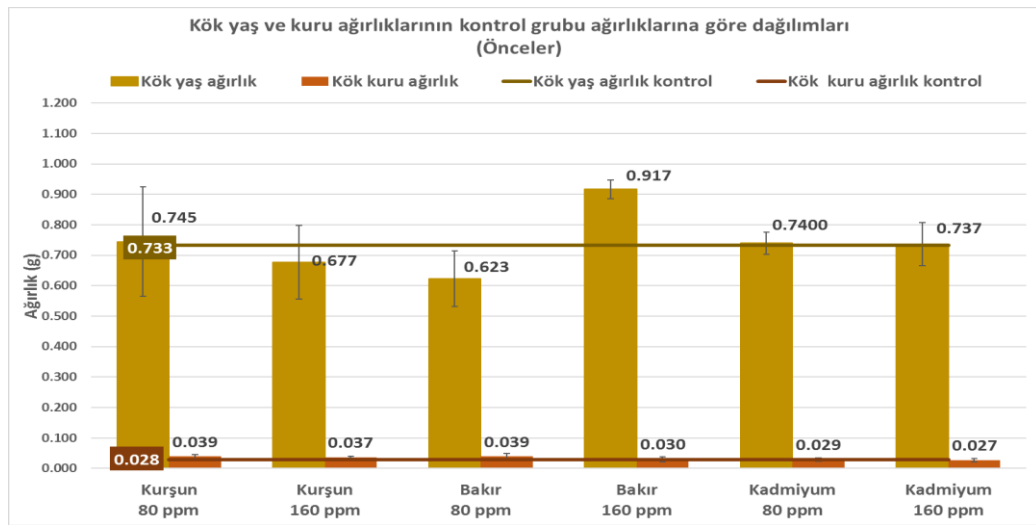
Önceler-98 fasulye örneklerinin kök yaş ve kuru ağırlıklarına uygulanan stresler sonrası ağırlıkları ile kontrol grubu ortalamalarının karşılaştırılmalarında, bakır (Cu) 160 ppm

derişiminde farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.6). Diğer derişimlerde ise uygulanan stresler sonrası ağırlıkları ile kontrol grubu ağırlıkları ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ).

Çizelge 4.6 Önceler-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamaların karşılaştırılması

UYGULANAN STRESLER	Yaş Ağırlık Kök		Kuru Ağırlık Kök	
	Mean $\pm$ Std. Dev.	p	Mean $\pm$ Std. Dev.	p
Kurşun (Pb) 80 ppm	0,745 $\pm$ 0,179	0,827	0,039 $\pm$ 0,006	0,275
Kontrol	0,733 $\pm$ 0,121		0,028 $\pm$ 0,009	
Kurşun (Pb) 160 ppm	0,677 $\pm$ 0,121	0,513	0,037 $\pm$ 0,002	0,275
Kontrol	0,733 $\pm$ 0,121		0,028 $\pm$ 0,009	
Bakır (Cu) 80 ppm	0,623 $\pm$ 0,092	0,268	0,039 $\pm$ 0,010	0,127
Kontrol	0,733 $\pm$ 0,121		0,028 $\pm$ 0,009	
Bakır (Cu) 160 ppm	0,917 $\pm$ 0,031	0,05	0,030 $\pm$ 0,008	0,827
Kontrol	0,733 $\pm$ 0,121		0,028 $\pm$ 0,009	
Kadmiyum (Cd) 80 ppm	0,740 $\pm$ 0,036	0,827	0,029 $\pm$ 0,005	0,513
Kontrol	0,733 $\pm$ 0,121		0,028 $\pm$ 0,009	
Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,737 $\pm$ 0,071	0,827	0,027 $\pm$ 0,005	0,999
Kontrol	0,733 $\pm$ 0,121		0,028 $\pm$ 0,009	

Kök yaş ağırlıklarında kurşun (Pb) ve bakır (Cu) derişimleri arttırıldığında ağırlıklarda bir artış görülürken, kadmiyum (Cd) derişimin arttırılmasında ağırlıkta bir düşüş görülmüştür. Kuru ağırlık ortalamalarında da kontrol grup ortalaması ile aynı seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.7 Önceler-98 fasulye örneklerinde kök; yaş ve kuru ağırlıklarının kontrol grubu ağırlıklarına göre ortalamalarının karşılaştırılması



#### 4.5.3 Kök ve yaprak yaş-kuru ağırlıklarının karşılaştırılması

Akman-98 ve Önceler-98 fasulye örneklerinde uygulanan stresler sonrası yaprak ve köklerin yaş-kuru ağırlık ortalamalarının karşılaştırılmasında (Çizelge 4.7); bakır (Cu) 160 ppm derişiminde yaş yaprak ağırlıkları ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (p:0,050). Diğer stres derişimlerinde yaprak ve köklerin yaş ve kuru ağırlıkları ortalamalarında birbirine yakın değerler gözlenmiştir. Bu değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).

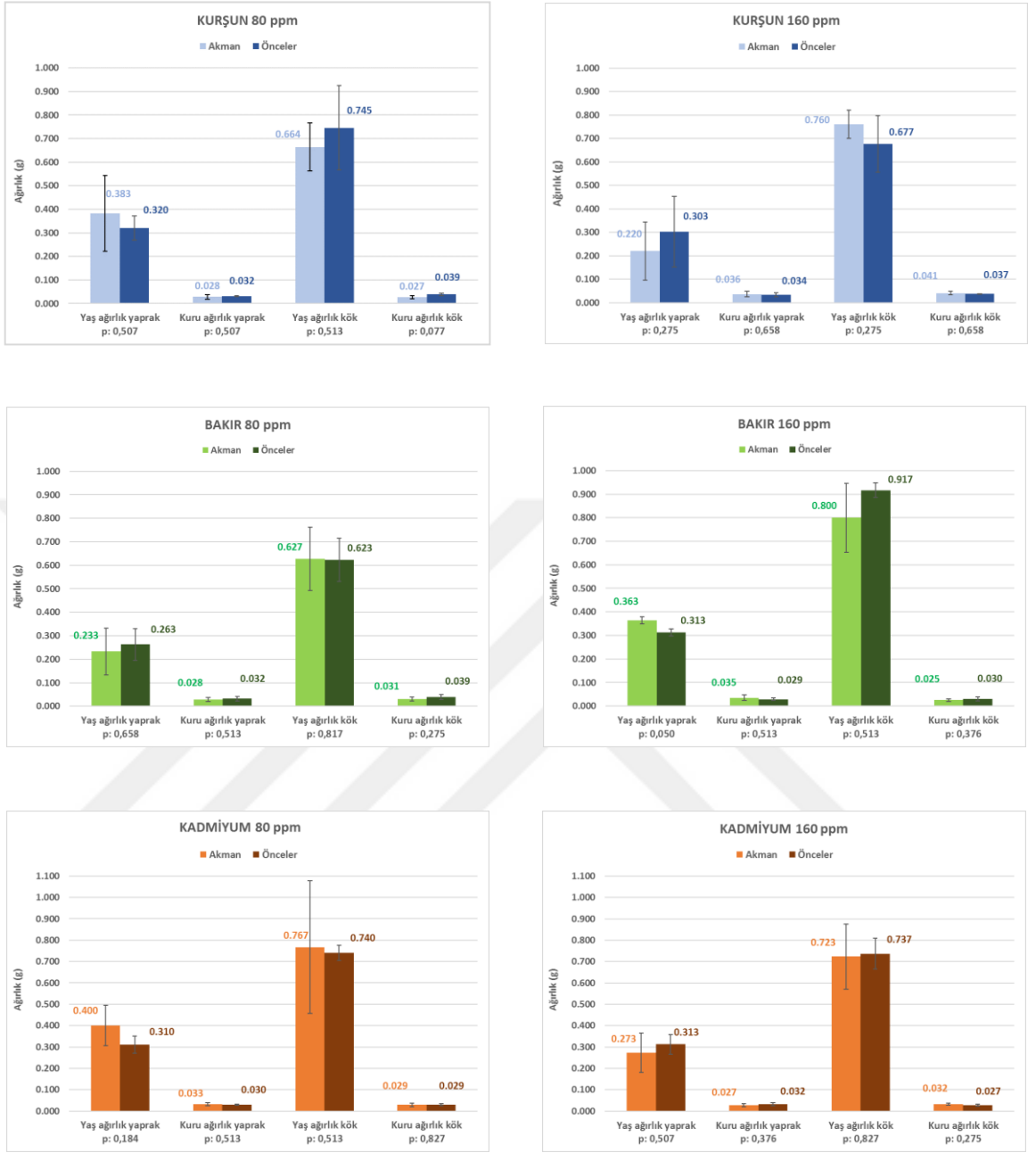
Çizelge 4.7 Akman-98 ve Önceler-98 fasulye örneklerinde uygulanan streslere göre yaprak ve kök ağırlık ortalamalarının dağılımları

		Uygulanan Stres	Mean ± Std. Dev.	p
Kürşun (Pb) 80 ppm	Yaş Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,383 ± 0,161	0,507
		Önceler-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,32 ± 0,052	
	Yaş Ağırlık Kök	Akman-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,664 ± 0,102	0,513
		Önceler-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,745 ± 0,179	
	Kuru Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,028 ± 0,009	0,507
		Önceler-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,032 ± 0,002	
Kuru Ağırlık Kök	Akman-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,027 ± 0,007	0,077	
	Önceler-98 Kürşun (Pb) 80 ppm	0,039 ± 0,006		
Bakır (Cu) 80 ppm	Yaş Ağırlık Yaprak	Akman-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,233 ± 0,1	0,658
		Önceler-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,263 ± 0,068	
	Yaş Ağırlık Kök	Akman-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,627 ± 0,134	0,817
		Önceler-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,623 ± 0,092	
	Kuru Ağırlık Yaprak	Akman-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,028 ± 0,008	0,513
		Önceler-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,032 ± 0,009	
Kuru Ağırlık Kök	Akman-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,031 ± 0,009	0,275	
	Önceler-98 Bakır (Cu) 80 ppm	0,039 ± 0,01		
Kadmium (Cd) 80 ppm	Yaş Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,4 ± 0,095	0,184
		Önceler-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,31 ± 0,04	
	Yaş Ağırlık Kök	Akman-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,767 ± 0,31	0,513
		Önceler-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,74 ± 0,036	
	Kuru Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,033 ± 0,007	0,513
		Önceler-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,03 ± 0,003	
Kuru Ağırlık Kök	Akman-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,029 ± 0,008	0,827	
	Önceler-98 Kadmium (Cd) 80 ppm	0,029 ± 0,005		

Çizelge 4.7. Akman-98 ve Önceler-98 fasulye örneklerinde uygulanan streslere göre yaprak ve kök ağırlık ortalamalarının dağılımları (devam)

		Uygulanan Stres	Mean ± Std. Dev.	p
<b>Kurşun (Pb) 160 ppm</b>	Yaş Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,22 ± 0,123	0,275
		Önceler-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,303 ± 0,15	
	Yaş Ağırlık Kök	Akman-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,76 ± 0,06	0,275
		Önceler-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,677 ± 0,121	
	Kuru Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,036 ± 0,012	0,658
		Önceler-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,034 ± 0,009	
Kuru Ağırlık Kök	Akman-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,041 ± 0,007	0,658	
	Önceler-98 Kurşun (Pb) 160 ppm	0,037 ± 0,002		
<b>Bakır (Cu) 160 ppm</b>	Yaş Ağırlık Yaprak	Akman-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,363 ± 0,015	0,050
		Önceler-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,313 ± 0,015	
	Yaş Ağırlık Kök	Akman-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,8 ± 0,147	0,513
		Önceler-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,917 ± 0,031	
	Kuru Ağırlık Yaprak	Akman-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,035 ± 0,012	0,513
		Önceler-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,029 ± 0,006	
Kuru Ağırlık Kök	Akman-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,025 ± 0,005	0,376	
	Önceler-98 Bakır (Cu) 160 ppm	0,03 ± 0,008		
<b>Kadmiyum (Cd) 160 ppm</b>	Yaş Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,273 ± 0,093	0,507
		Önceler-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,313 ± 0,046	
	Yaş Ağırlık Kök	Akman-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,723 ± 0,153	0,827
		Önceler-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,737 ± 0,071	
	Kuru Ağırlık Yaprak	Akman-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,027 ± 0,007	0,376
		Önceler-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,032 ± 0,008	
Kuru Ağırlık Kök	Akman-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,032 ± 0,005	0,275	
	Önceler-98 Kadmiyum (Cd) 160 ppm	0,027 ± 0,005		

Uygulanan stres derişimlerinin arttırılması sonucunda kurşun (Pb) stresinde yaş ağırlık yaprak ve kök ağırlıklarında değişiklikler gözlenirken (istatistiksel olarak anlamlı değildir) diğer streslerde yaprak-kök kuru ve yaş ağırlıklarında (bakır (Cu) 160 ppm hariç) belirgin bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.7).

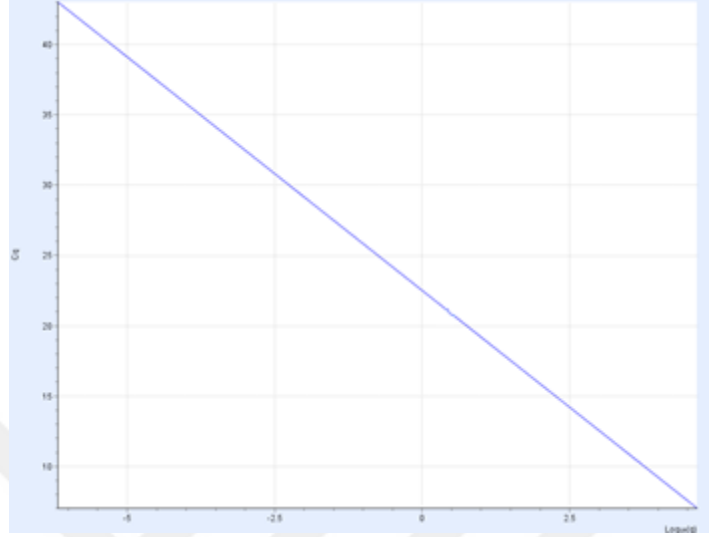


Şekil 4.8 Akman-98 ve Önceler-98 fasulye örneklerinde uygulanan streslere göre yaprak ve kök ağırlık ortalamalarının dağılımları

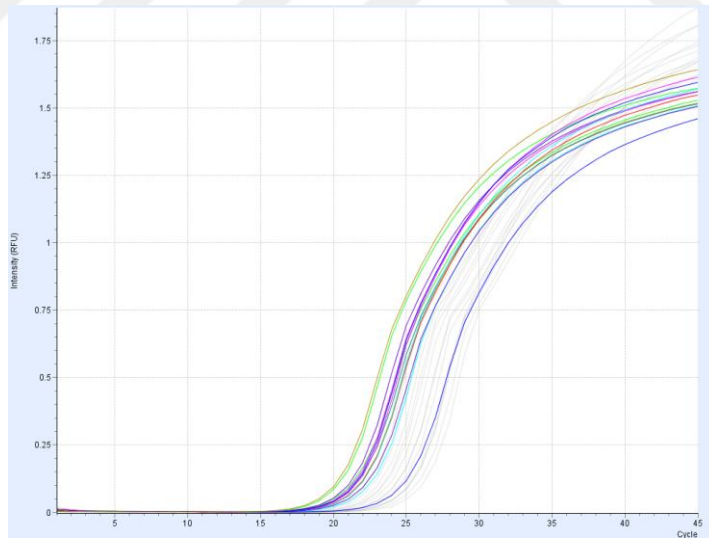
#### 4.6 Real-Time PCR Uygulaması

cDNA sentezini takiben yapılacak olan Real-Time PCR çalışması için taraması yapılacak hedef genler olan *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* ve housekeeping olarak seçilmiş *ACT* genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve iyi ön denemeleri yapılmıştır. Şekil 4.8-4.21’de hedef genler ve *ACT* genleri için

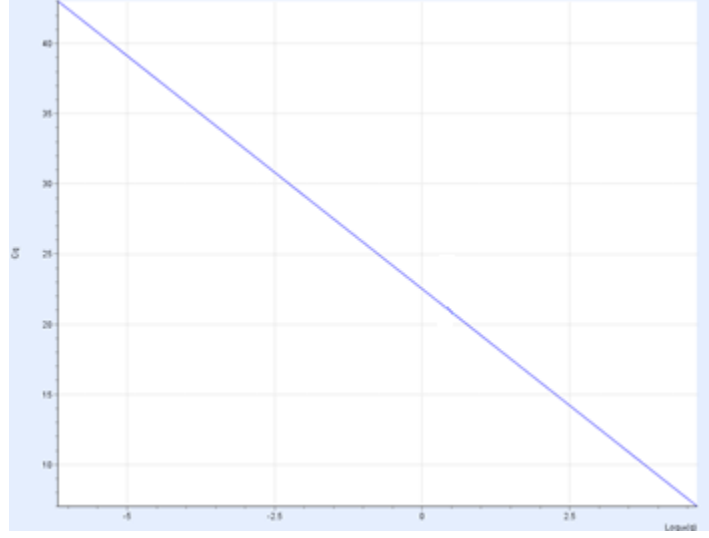
oluşturulan standart eğri grafikleri ve bu grafiklere ait validasyon değerleri gösterilmiştir.



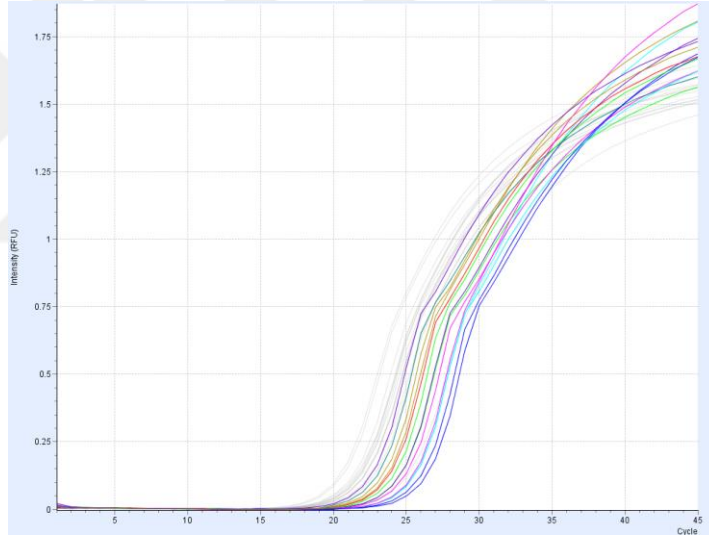
şekil 4.9 Aktin (*ACT*) gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği



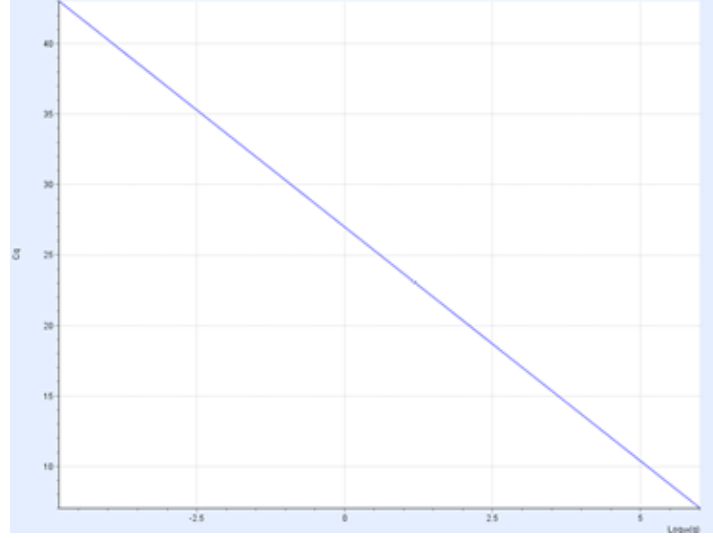
şekil 4.10 Aktin (*ACT*) geni için qRT-PCR'ı yapılan cDNA seri diluşyonlarının pik görüntüsü



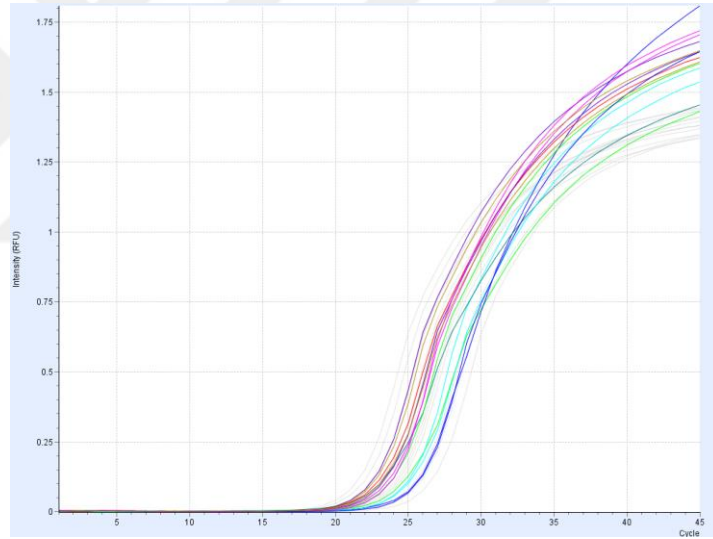
Şekil 4.11 *CAMTA-1* gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği



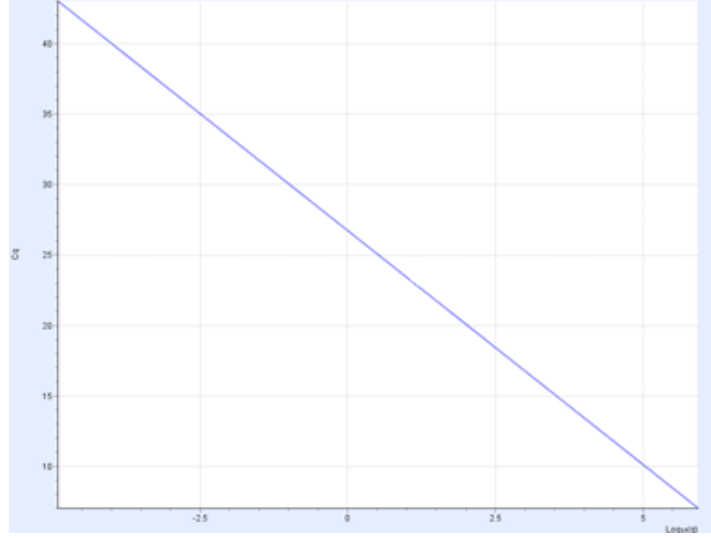
Şekil 4.12 *CAMTA-1* geni için qRT- PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü



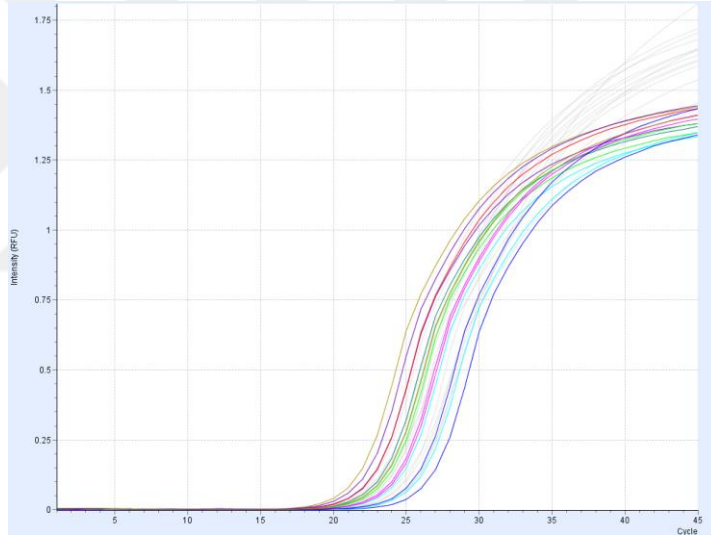
Şekil 4.13 *CAMTA-4* gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği



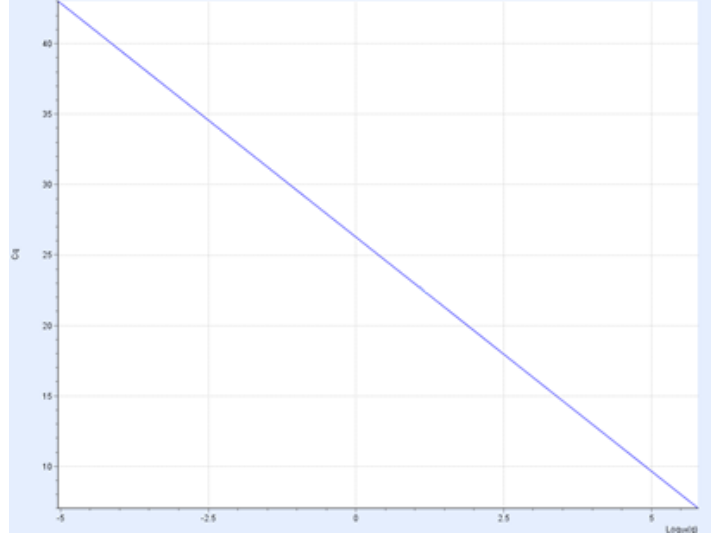
Şekil 4.14 *CAMTA-4* geni için qRT-PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü



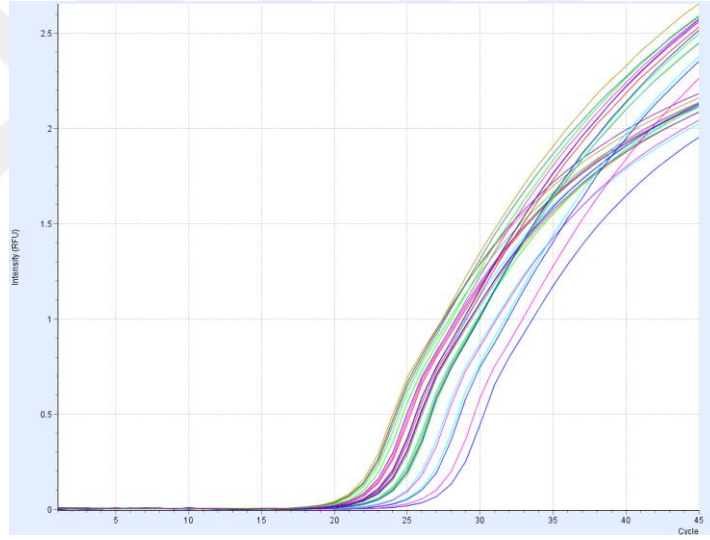
Şekil 4.15 *CAMTA-8* gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği



Şekil 4.16 *CAMTA-8* geni için qRT-PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü

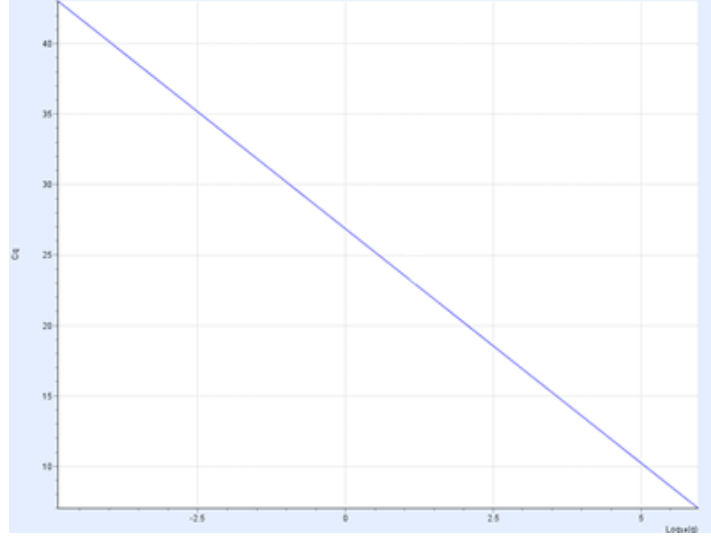


Şekil 4.17 *YABBY-4* gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği

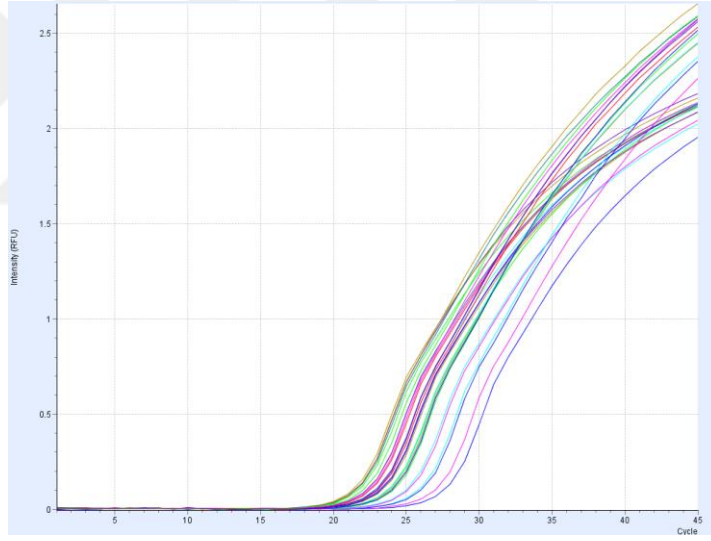


Şekil 4.18 *YABBY-4* geni için PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü

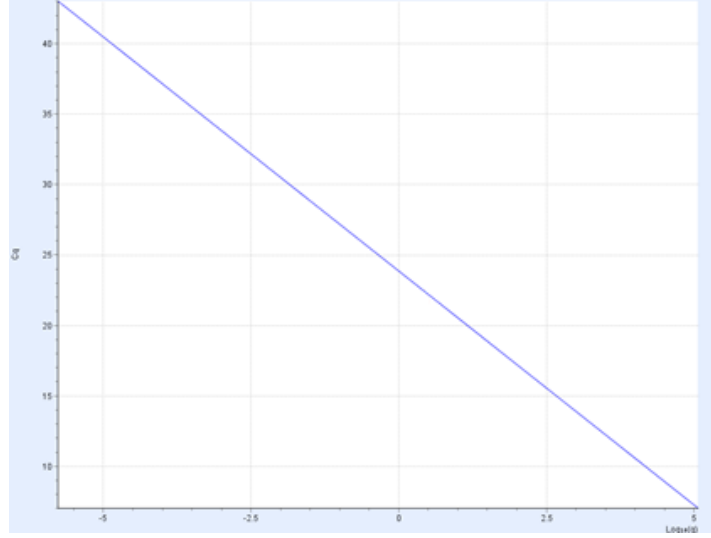




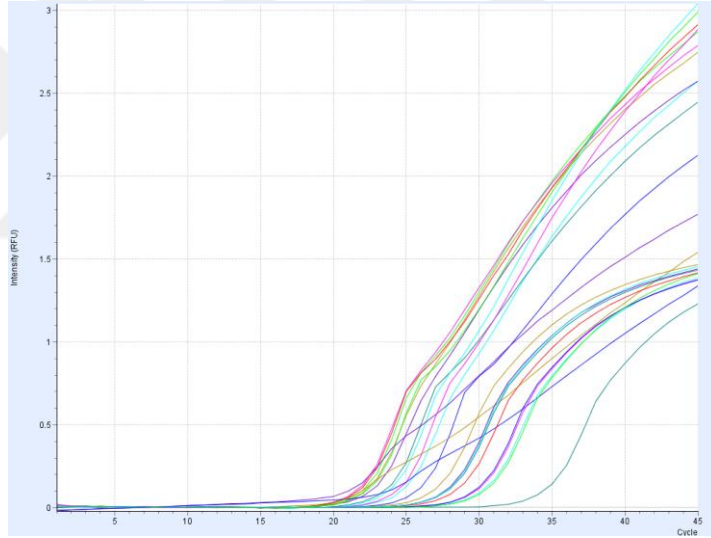
Şekil 4.19 *YABBY-5* gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği



Şekil 4.20 *YABBY-5* geni için PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü



Şekil 4.21 *YABBY-7* gen amplifikasyonu ve crossing point sonuçlarına göre oluşturulan standart eğri grafiği



Şekil 4.22 *YABBY-7* geni için PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonlarının pik görüntüsü

#### 4.7 RT-PCR Sonuçları, Sonuçların Normalizasyonu ve İstatistiksel Analizi

*CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* ve *ACT* genlerine ait belirlenen Cq değerleri aşağıda yer alan çizelgelerde sunulmuştur.

Çizelge 4.8 *CAMTA-1* ve *ACT* gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri

Örnekler	<i>ACT</i> Cq değerleri		<i>CAMTA-1</i> Cq değerleri	
1A	20,85	20,108	23,55	23,218
	20,562	20,24222	22,548	21,25964
	20,365	19,64431	22,864	23,14016
2A	20,876	22,446	23,859	24,897
	21,352	20,75272	24,453	24,89685
	21,55	21,43004	24,006	24,86457
3A	20,335	20,123	22,468	24,266
	20,251	20,41114	22,169	24,94601
	20,681	19,43451	23,146	24,49402
4A	20,325	20,725	23,335	24,111
	20,56	21,376	23,67	22,34074
	20,886	21,03675	23,468	23,87745
5A	23,952	24,072	25,534	24,822
	23,567	24,94015	25,854	25,03875
	23,888	25,32638	25,305	26,52491
6A	20,884	21,122	22,453	22,493
	21,336	22,64325	22,1685	21,99506
	21,562	20,69363	21,896	22,54944
7A	20,889	20,597	21,634	22,006
	20,568	20,08748	21,52	20,48203
	20,883	20,52404	21,933	21,42427

Çizelge 4.9 *CAMTA-4* ve *ACT* gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri

Örnekler	<i>ACT</i> Cq değerleri		<i>CAMTA-4</i> Cq değerleri	
1A	20,85	20,108	23,955	24,237
	20,562	20,24222	23,456	23,66304
	20,365	19,64431	21,568	24,25509
2A	20,876	22,446	23,496	24,624
	21,352	20,75272	24,799	23,2842
	21,55	21,43004	25,16	24,80852
3A	20,335	20,123	21,795	21,451
	20,251	20,41114	20,988	22,0088
	20,681	19,43451	22,1	21,39054
4A	20,325	20,725	22,566	22,962
	20,56	21,376	22,381	23,52037
	20,886	21,03675	22,039	22,99953
5A	23,952	24,072	24,671	24,829
	23,567	24,94015	24,699	24,69292
	23,888	25,32638	24,055	24,11302
6A	20,884	21,122	21,63	22,006
	21,336	22,64325	22,755	22,41424
	21,562	20,69363	21,445	21,11221
7A	20,889	20,597	22,444	22,89
	20,568	20,08748	21,976	23,07255
	20,883	20,52404	22,415	21,89905

Çizelge 4.10 *CAMTA-8* ve *ACT* gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri

Örnekler	<i>ACT</i> Cq değerleri		<i>CAMTA-8</i> Cq değerleri	
1A	20,85	20,108	20,455	24,949
	20,562	20,24222	23,496	20,73344
	20,365	19,64431	22,279	22,47078
2A	20,876	22,446	22,654	24,51
	21,352	20,75272	23,79	24,50834
	21,55	21,43004	22,43	25,49526
3A	20,335	20,123	22,415	20,849
	20,251	20,41114	21,635	21,88885
	20,681	19,43451	22,15	21,8311
4A	20,325	20,725	23,785	22,673
	20,56	21,376	21,966	22,39492
	20,886	21,03675	23,43	23,69313
5A	23,952	24,072	26,112	25,17
	23,567	24,94015	25,163	25,88053
	23,888	25,32638	25,469	25,65315
6A	20,884	21,122	21,496	19,696
	21,336	22,64325	22,365	21,62338
	21,562	20,69363	20,171	20,21329
7A	20,889	20,597	22,096	22,354
	20,568	20,08748	22,43	21,87626
	20,883	20,52404	22,178	22,86723

Çizelge 4.11 *YABBY-4* ve *ACT* gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cq değerleri

Örnekler	<i>ACT</i> Cq değerleri		<i>YABBY-4</i> Cq değerleri	
1A	20,85	20,108	21,469	20,241
	20,562	20,24222	28,698	11,60281
	20,365	19,64431	21,425	19,25554
2A	20,876	22,446	24,167	24,027
	21,352	20,75272	24,063	25,70077
	21,55	21,43004	25,236	24,32892
3A	20,335	20,123	21,165	20,077
	20,251	20,41114	20,3978	20,54273
	20,681	19,43451	20,421	20,20018
4A	20,325	20,725	22,063	21,093
	20,56	21,376	21,435	21,17265
	20,886	21,03675	21,974	20,77226
5A	23,952	24,072	27,145	26,285
	23,567	24,94015	27,685	25,45046
	23,888	25,32638	26,072	26,11519
6A	20,884	21,122	22,387	22,607
	21,336	22,64325	24,197	20,54788
	21,562	20,69363	22,0123	23,60282
7A	20,889	20,597	20,068	22,878
	20,568	20,08748	20,684	21,97756
	20,883	20,52404	21,579	21,77261

Çizelge 4.12 *YABBY-5* ve *ACT* gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cç değerleri

Örnekler	<i>ACT</i> Cq değerleri		<i>YABBY-5</i> Cq değerleri	
1A	20,85	20,108	23,632	18,696
	20,562	20,24222	22,578	20,66402
	20,365	19,64431	23,112	19,40974
2A	20,876	22,446	24,751	25,141
	21,352	20,75272	24,886	24,36745
	21,55	21,43004	24,675	24,99733
3A	20,335	20,123	22,154	21,888
	20,251	20,41114	22,364	22,31678
	20,681	19,43451	22,687	23,0493
4A	20,325	20,725	22,245	20,659
	20,56	21,376	22,487	21,35209
	20,886	21,03675	22,323	21,09803
5A	23,952	24,072	24,547	25,697
	23,567	24,94015	24,963	25,34933
	23,888	25,32638	26,141	24,01315
6A	20,884	21,122	22,661	23,405
	21,336	22,64325	23,209	23,74313
	21,562	20,69363	23,045	23,66109
7A	20,889	20,597	21,193	20,215
	20,568	20,08748	21,674	19,58552
	20,883	20,52404	20,222	21,58136

Çizelge 4.13 *YABBY-7* ve *ACT* gen bölgesi amplifikasyonlarına ait tüm cç değerleri

Örnekler	<i>ACT</i> Cq değerleri		<i>YABBY-7</i> Cq değerleri	
1A	20,85	20,108	21,459	20,497
	20,562	20,24222	20,546	19,07347
	20,365	19,64431	19,638	20,9299
2A	20,876	22,446	22,787	24,725
	21,352	20,75272	23,872	23,5763
	21,55	21,43004	25,031	22,31509
3A	20,335	20,123	20,943	22,451
	20,251	20,41114	22,364	21,32752
	20,681	19,43451	21,78	22,19734
4A	20,325	20,725	21,468	19,842
	20,56	21,376	20,451	20,1203
	20,886	21,03675	20,1	21,23225
5A	23,952	24,072	25,784	23,814
	23,567	24,94015	25,678	23,1105
	23,888	25,32638	23,616	26,13775
6A	20,884	21,122	21,654	20,848
	21,336	22,64325	21,675	20,66228
	21,562	20,69363	21,986	20,30186
7A	20,889	20,597	23,098	22,082
	20,568	20,08748	22,361	22,34508
	20,883	20,52404	22,693	22,40001

Hedef *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* genlerinin ifadelerine ait sonuçlar housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan *ACT* (aktin) ve

kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmış ve örneklerin kontrollerine göre farklılaşan gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi kullanılarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerin *ACT* genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile hedef genlere ait ifade düzeylerini gösteren grafikler çizilmiştir.

Çizelge 4.14 Livak metodu ile elde edilen *cq* değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (*CAMTA-1*)

<b>Örnekler</b>	<b><i>CAMTA-1</i> Mean</b>	<b><i>CAMTA-1</i> Std. Dev.</b>	<b><i>CAMTA-1</i> Std. Hata</b>	<b><i>CAMTA-1</i> Anlamlılık derecesi (<i>p</i> değeri)</b>
<b>1A</b>	0,364	0,174	0,100	0,024
<b>2A</b>	0,235	0,097	0,056	<0,001
<b>3A</b>	0,185	0,049	0,028	0,001
<b>4A</b>	0,306	0,079	0,046	<0,001
<b>5A</b>	0,811	0,122	0,071	0,055
<b>6A</b>	1,059	0,386	0,223	0,815
<b>7A</b>	1,000	-	-	-
<b>1Ö</b>	4,718	2,498	1,442	0,061
<b>2Ö</b>	1,297	0,861	0,497	0,611
<b>3Ö</b>	0,980	0,214	0,123	0,884
<b>4Ö</b>	9,733	2,297	1,326	0,003
<b>5Ö</b>	0,769	0,163	0,094	0,133
<b>6Ö</b>	0,710	0,352	0,203	0,29
<b>7Ö</b>	1,000	-	-	-

Çizelge 4.15 Livak metodu ile elde edilen çq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (CAMTA-4)

Örnekler	CAMTA-4 Mean	CAMTA-4 Std. Dev.	CAMTA-4 Std. Hata	CAMTA-4 Anlamlılık derecesi (p değeri)
1A	0,396	0,106	0,061	0,01
2A	0,513	0,245	0,141	0,075
3A	1,445	0,595	0,344	0,265
4A	0,965	0,180	0,104	0,751
5A	3,195	0,845	0,488	0,011
6A	2,553	0,445	0,257	0,004
7A	1,000	-	-	-
1Ö	4,190	1,000	0,577	0,031
2Ö	1,150	0,324	0,187	0,508
3Ö	1,117	0,091	0,053	0,156
4Ö	4,344	1,297	0,749	0,047
5Ö	0,743	0,485	0,280	0,455
6Ö	5,087	1,245	0,719	0,03
7Ö	1,000	-	-	-

Çizelge 4.16 Livak metodu ile elde edilen çq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (CAMTA-8)

Örnekler	CAMTA-8 Mean	CAMTA-8 Std. Dev.	CAMTA-8 Std. Hata	CAMTA-8 Anlamlılık derecesi (p değeri)
1A	0,787	0,258	0,149	0,29
2A	0,596	0,165	0,095	0,052
3A	1,098	0,199	0,115	0,439
4A	0,847	0,596	0,344	0,7
5A	1,399	0,464	0,268	0,211
6A	4,662	1,810	1,045	0,073
7A	1,000	-	-	-
1Ö	6,726	2,499	1,443	0,058
2Ö	1,473	0,623	0,360	0,319
3Ö	0,986	0,343	0,198	0,952
4Ö	10,113	3,560	2,055	0,047
5Ö	1,178	0,457	0,264	0,568
6Ö	0,673	0,210	0,121	0,115
7Ö	1,000	-	-	-

Çizelge 4.17 Livak metodu ile elde edilen çq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (YABBY-4)

<i>Örnekler</i>	<i>YABBY-4 Mean</i>	<i>YABBY-4 Std. Dev.</i>	<i>YABBY-4 Std. Hata</i>	<i>YABBY-4 Anlamlılık derecesi (p değeri)</i>
1A	1,740	0,577	0,333	0,156
2A	0,216	0,084	0,048	<0,001
3A	1,577	0,284	0,164	0,072
4A	1,287	0,426	0,246	0,363
5A	0,453	0,227	0,131	0,014
6A	0,913	0,541	0,312	0,806
7A	1,000	-	-	-
1Ö	2,673	1,168	0,674	0,131
2Ö	0,063	0,010	0,006	<0,001
3Ö	1,058	0,207	0,119	0,677
4Ö	1,258	0,169	0,097	0,117
5Ö	0,173	0,033	0,019	0,001
6Ö	0,862	0,194	0,112	0,344
7Ö	1,000	-	-	-

Çizelge 4.18 Livak metodu ile elde edilen çq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (YABBY-5)

<i>Örnekler</i>	<i>YABBY-5 Mean</i>	<i>YABBY-5 Std. Dev.</i>	<i>YABBY-5 Std. Hata</i>	<i>YABBY-5 Anlamlılık derecesi (p değeri)</i>
1A	0,538	0,063	0,036	<0,001
2A	0,105	0,007	0,004	<0,001
3A	0,250	0,076	0,044	0,003
4A	0,611	0,088	0,051	0,017
5A	0,646	0,189	0,109	0,032
6A	0,308	0,114	0,066	0,009
7A	1,000	-	-	-
1Ö	1,103	0,135	0,078	0,258
2Ö	0,155	0,074	0,043	0,003
3Ö	0,910	0,229	0,132	0,532
4Ö	1,245	0,413	0,238	0,413
5Ö	0,045	0,016	0,009	<0,001
6Ö	0,248	0,162	0,094	0,015
7Ö	1,000	-	-	-



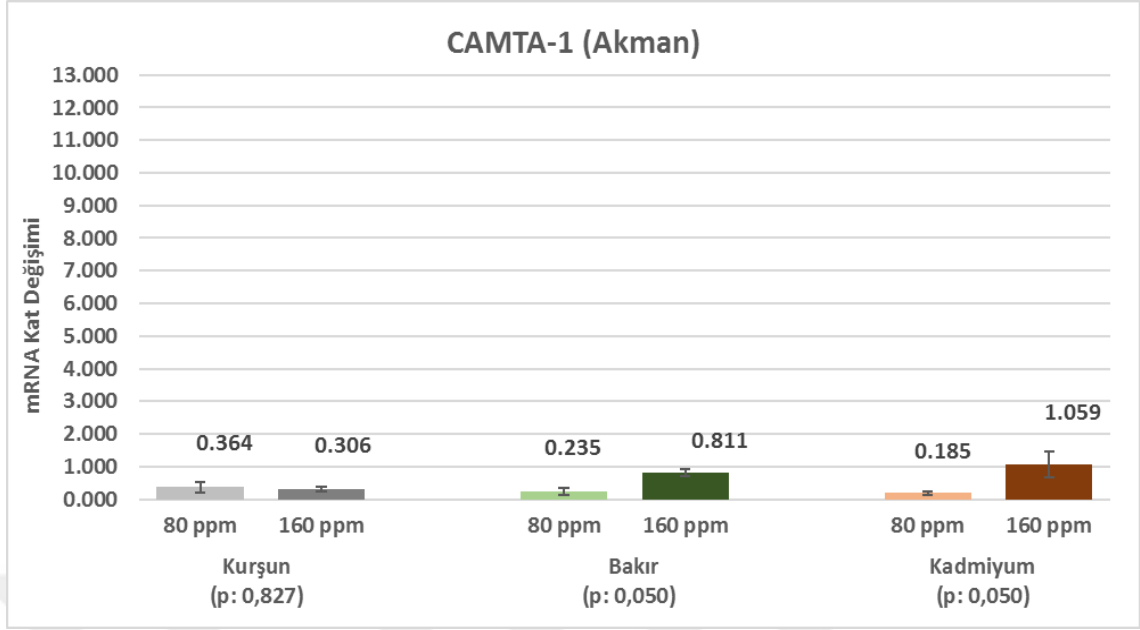
Çizelge 4.19 Livak metodu ile elde edilen çq değerlerine ait standart sapma, ortalama, standart hata ve kontrole göre istatistiksel analiz sonuçları (YABBY-7)

Örnekl er	YABBY-7 Mean	YABBY-7 Std. Dev.	YABBY-7 Std. Hata	YABBY-7 Anlamlılık derecesi (p değeri)
1A	3,880	1,966	1,135	0,127
2A	0,757	0,106	0,061	0,058
3A	1,222	0,251	0,145	0,266
4A	4,741	1,649	0,952	0,017
5A	2,918	0,805	0,465	0,015
6A	4,589	2,268	1,310	0,111
7A	1,000	-	-	-
1Ö	16,595	9,675	5,586	0,108
2Ö	2,319	0,297	0,171	0,016
3Ö	4,003	1,754	1,013	0,041
4Ö	15,519	2,274	1,313	<0,001
5Ö	1,009	0,182	0,105	0,933
6Ö	0,604	0,132	0,076	0,007
7Ö	1,000	-	-	-

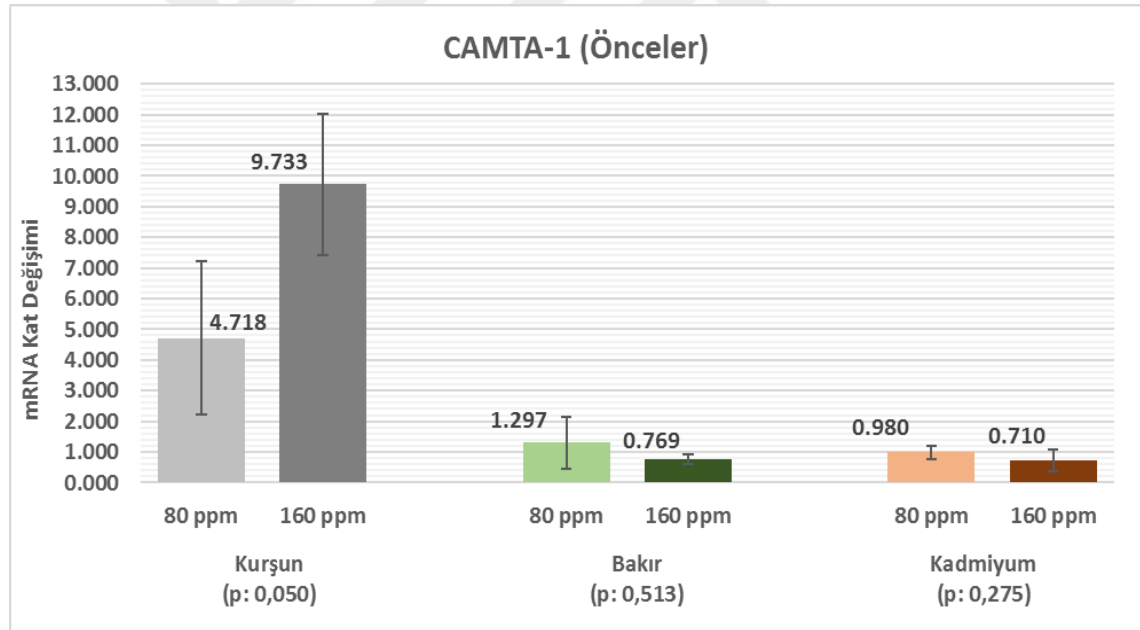
p>0.05 İstatistiki olarak anlamsız

#### 4.7.1 Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde *CAMTA-1* geni'nin mRNA kat değişimlerinin değerlendirilmesi

*CAMTA* genlerinde uygulanan streslerin derişimlerinin arttırılmasının mRNA kat değişimleri üzerindeki etkileri; Akman-98 fasulye çeşidinde *CAMTA-1* geninde kurşun (Pb) ve *CAMTA-4* geninde kadmiyum (Cd) dışındaki diğer streslerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Önceler-98 fasulye çeşidinde ise Akman-98 fasulye çeşidinin tersine, *CAMTA-1* geninde kurşun (Pb) ve *CAMTA-4* geninde kadmiyum (Cd) stresinde anlamlı bir etkiye sahip oldukları görülmüştür. *CAMTA* geninin mRNA kat değişiminin Akman-98 fasulye çeşidinde istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.23 Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve *CAMTA-1* genine ait mRNA kat değişimleri

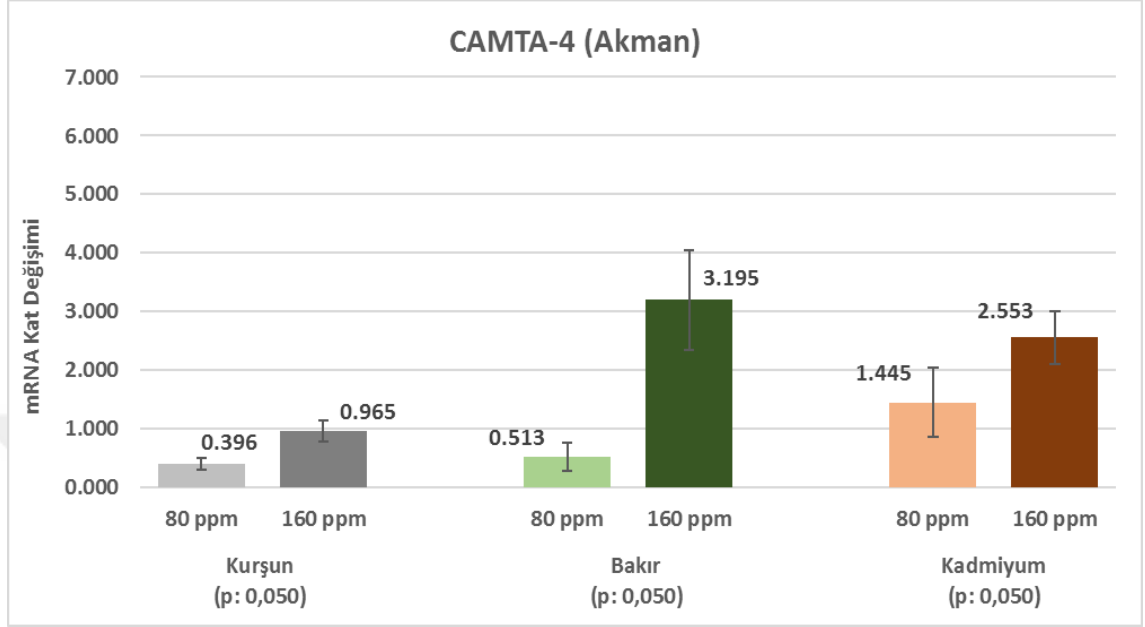


Şekil 4.24 Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve *CAMTA-1* genine ait mRNA kat değişimleri

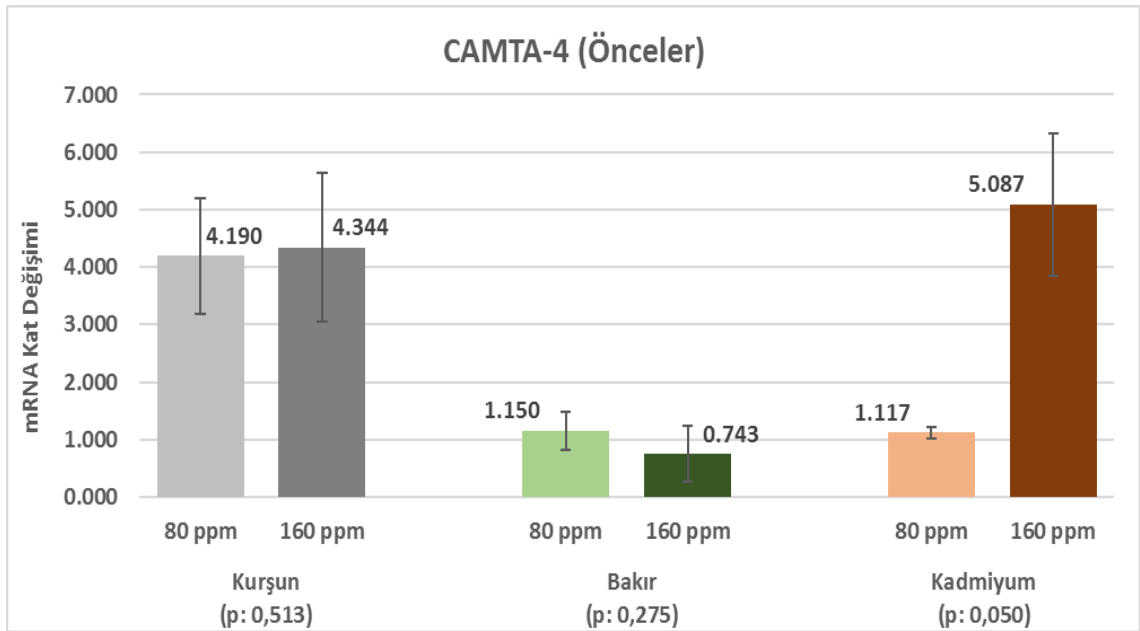
#### 4.7.2 Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde *CAMTA-4* geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi

*CAMTA-4* geninde stres derişimlerinin arttırılması Akman-98 fasulye çeşidinde, mRNA Kat Değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. Önceler-98

fasulye çeşidinde ise mRNA kat değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı olan stresin kadmiyum (Cd) olduğu görülmüştür.



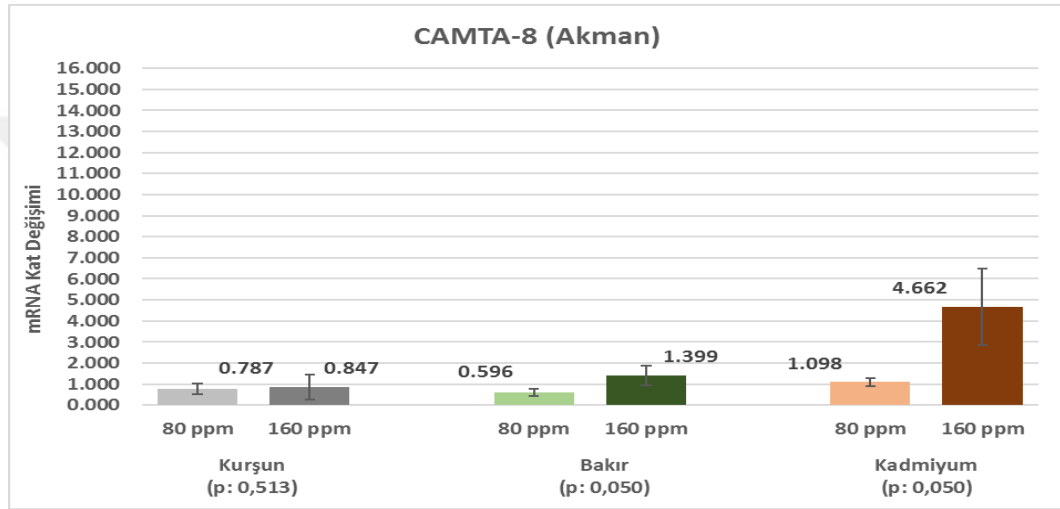
Şekil 4.25 Akman-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *CAMTA-4* genine ait mRNA kat değişimleri



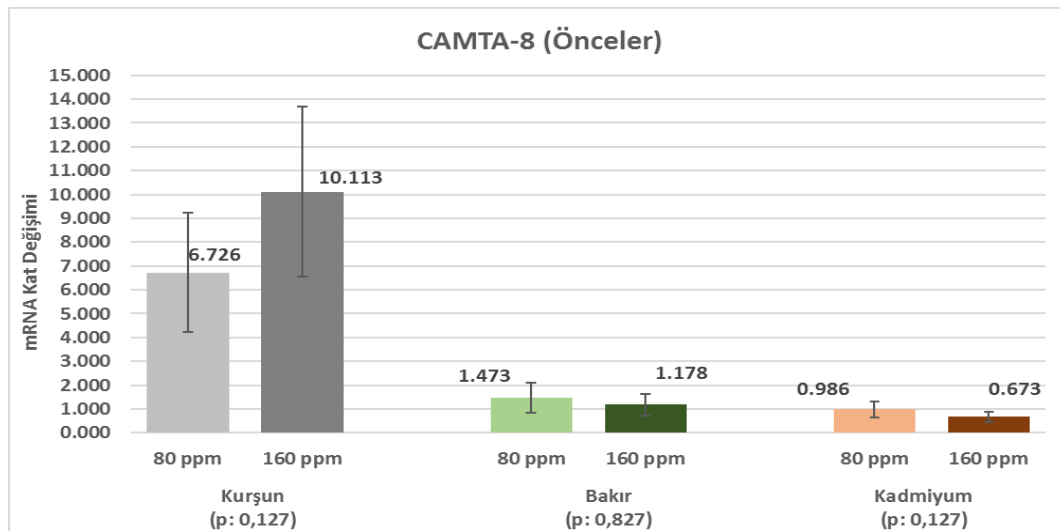
Şekil 4.26 Önceler-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *CAMTA-4* genine ait mRNA kat değişimleri

#### 4.7.3 Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde *CAMTA-8* geni'nin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi

*CAMTA-8* geninde uygulanan tüm streslerde derişimlerinin arttırılması Akman-98 fasulye çeşidinde, mRNA kat değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. Önceler-98 fasulye çeşidinde ise mRNA kat değişimlerinde kurşun (Pb) stresinde artış, bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) streslerinde azalış olarak ölçülse de bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



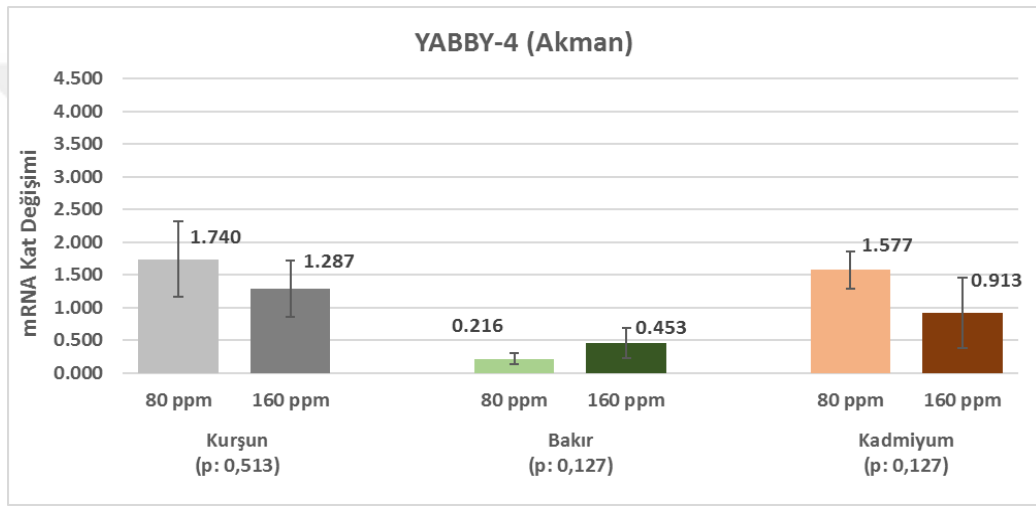
Şekil 4.27 Akman-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve *CAMTA-8* genine ait mRNA kat değişimleri



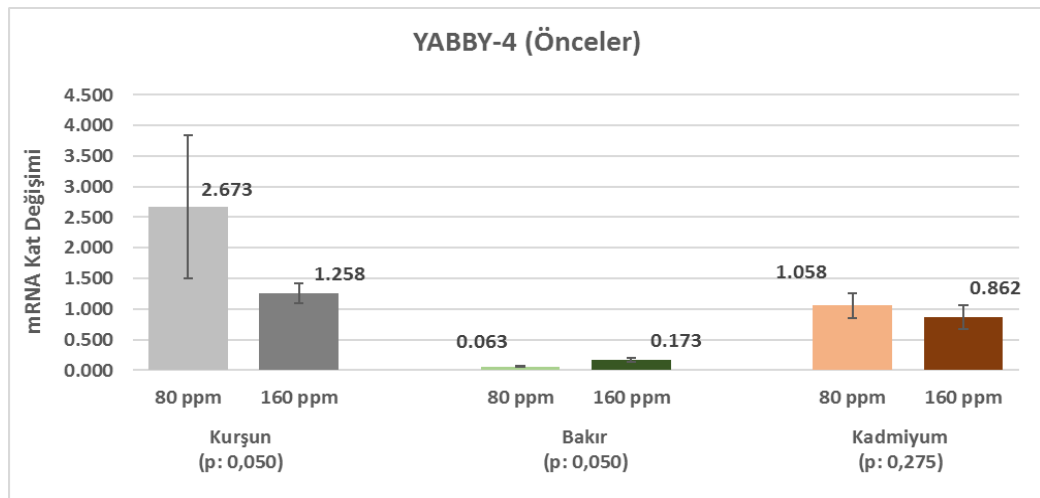
Şekil 4.28 Önceler-98 fasulye çeşidine uygulanan stresler ve *CAMTA-8* genine ait mRNA kat değişimleri

#### 4.7.4 Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde *YABBY-4* geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi

*YABBY-4* geninde uygulanan stresler her iki fasulye çeşidinde de aynı yönlü artış ve azalışlara sebep olmuştur. Akman-98 fasulye çeşidinde mRNA kat değişiminde farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, Önceler-98 fasulye çeşidinde kurşun (Pb) ve bakır (Cu) stresleri altındaki değişimler anlamlıdır. *YABBY-4* geni *CAMTA-1* geninde olduğu şekilde artış ve azalışlar gösterse de artış-azalış oranları ile bu oranların anlamlılığı açısından fark göstermektedir.



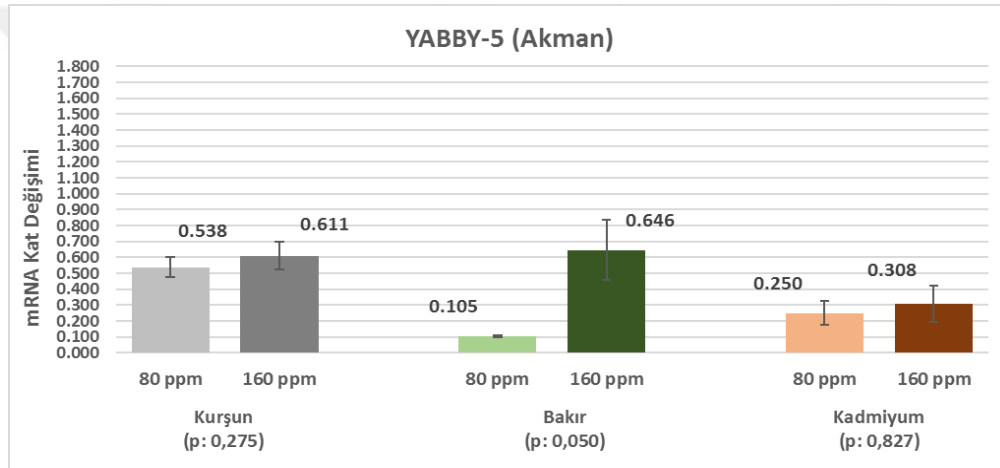
Şekil 4.29 Akman-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *YABBY-4* genine ait mRNA kat değişimleri



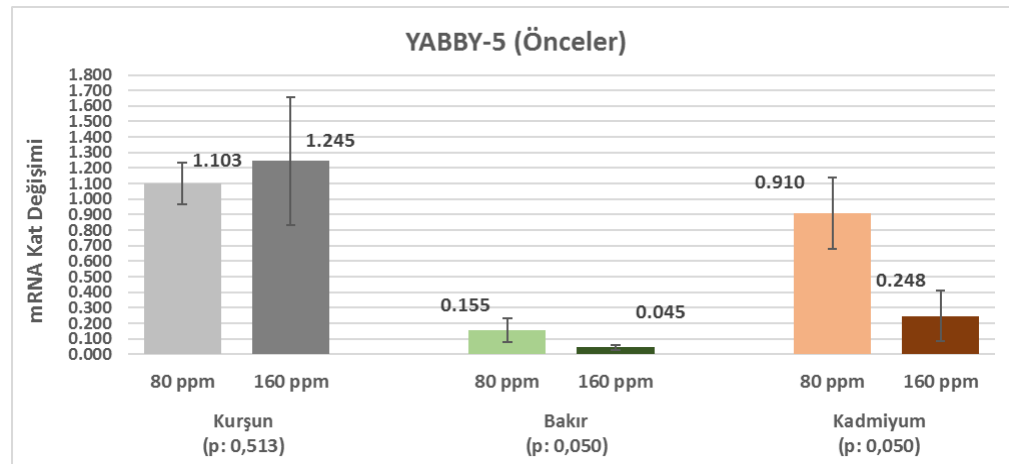
Şekil 4.30 Önceler-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *YABBY-4* genine ait mRNA kat değişimleri

#### 4.7.5 Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde *YABBY-5* geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi

*YABBY-5* geninde uygulanan kurşun (Pb) stresinde her iki fasulye çeşidinde de aynı yönlü artış görülmüştür ancak bu artış mRNA kat değişimi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Akman-98 fasulye çeşidinde mRNA kat değişiminde bakır ve kadmiyum (Cd) streslerindeki artış, Önceler-98 fasulye çeşidinde aynı stresler üzerinde azalış olarak ölçülmüştür. Önceler-98 fasulye çeşidinde bu gözlenen azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Akman-98 fasulye çeşidinde sadece bakır (Cu) stresinde görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



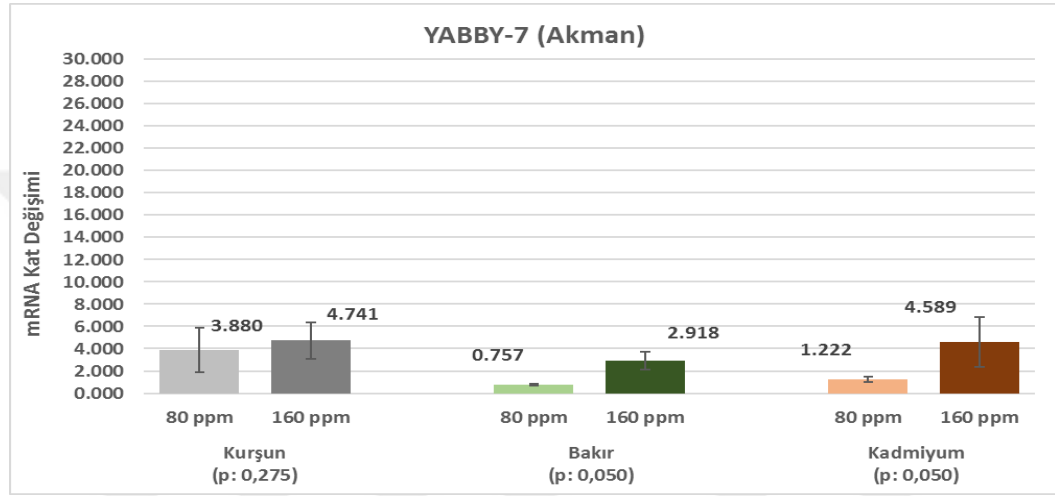
Şekil 4.31 Akman-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *YABBY-5* genine ait mRNA kat değişimleri



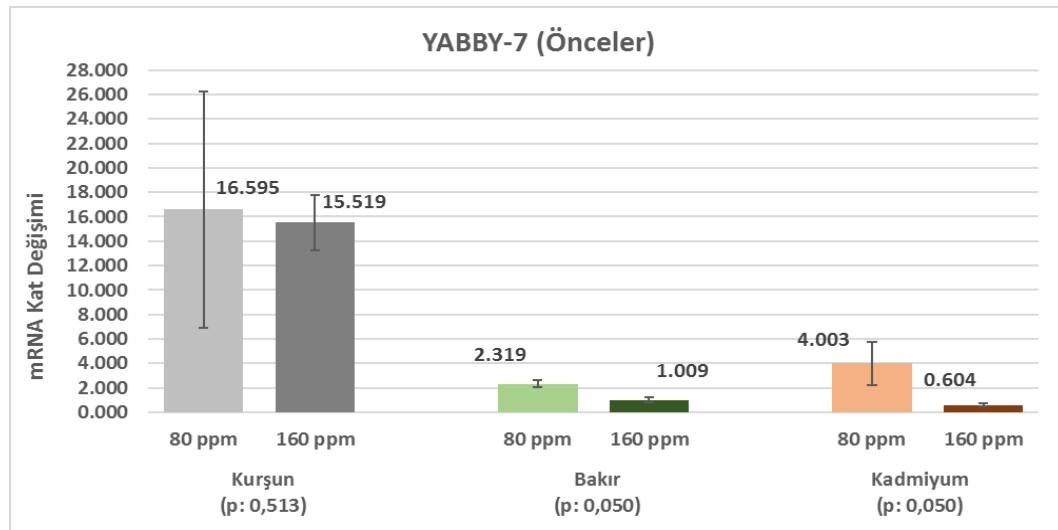
Şekil 4.32 Önceler-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *YABBY-5* genine ait mRNA kat değişimleri

#### 4.7.6 Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), Bakır (Cu) stresi altındaki fasulye çeşitlerinde *YABBY-7* geninin mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi

*YABBY-7* geninde uygulanan streslerde derişimin arttırılması Akman-98 fasulye çeşidinde mRNA kat değışimleri üzerinde artış olarak ölçülmüştür. Önceler-98 fasulye çeşidinde ise azalış olarak ölçülmüştür. Bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) stresleri her iki fasulye çeşidinde de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.33 Akman-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *YABBY-7* genine ait mRNA kat değışimleri



Şekil 4.34 Önceler-98 fasulye çeşidinde uygulanan stresler ve *YABBY-7* genine ait mRNA kat değışimleri

#### 4.7.7 Genlere göre; Kurşun (Pb) (80 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi

Sonuçlara göre, *CAMTA-1* gen ifadesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Akman-98'da 0,364 kat, Önceler-98'de 4,718 kat artmıştır. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*CAMTA-4* gen ifadesi kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,396 kat, Önceler-98'de 4,19 kat artış göstermiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

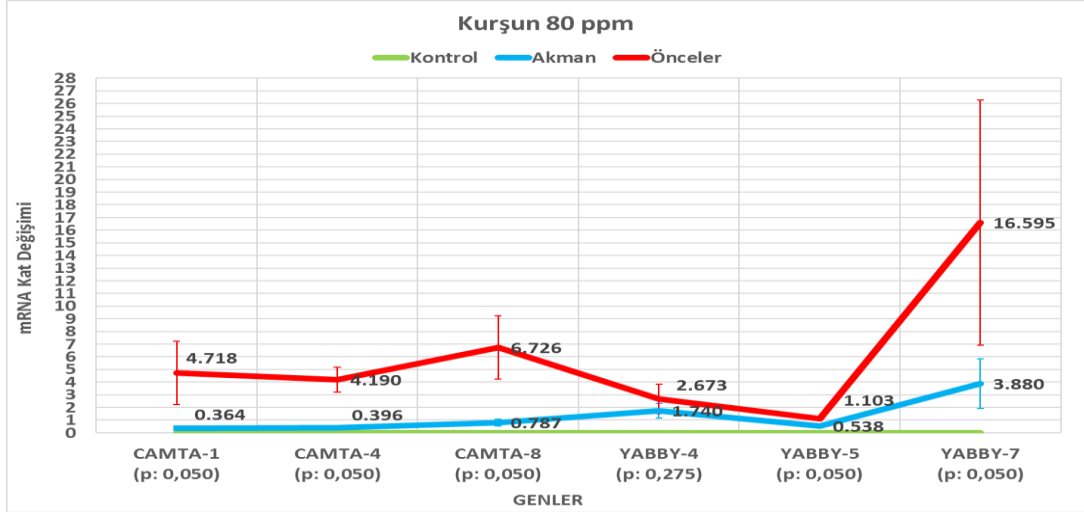
*CAMTA-8* gen ifadesinin kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,787 kat, Önceler-98'de 6,726 kat yüksek olduğu gözlenmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*YABBY-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 1,740 kat, Önceler-98'de 2,673 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,275)

*YABBY-5* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,538 kat, Önceler-98'de 1,103 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*YABBY-7* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 3,880 kat, Önceler-98'de 16,595 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)





Şekil 4.35 Genlere göre; kurşun (Pb) 80 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları

İfade seviyeleri karşılaştırıldığında; Uygulanan 80 ppm kurşun (Pb) stresinin neden olduğu en yüksek ortalama ifade değeri Önceler-98 örneklerinde *YABBY-7* geni için gözlenmiş (16,595 kat) ve en düşük ortalama ifade değeri ise *YABBY-5* geni için (1,103 kat) görülmüştür. Akman-98 örneklerinde ise en yüksek ortalama değerine *YABBY-7* geninde ulaştığı (3,880 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *CAMTA-1* geninde ulaştığı (0,364 kat) görülmüştür.

Akman-98’da uygulanan stresin, *CAMTA-1*, *CAMTA-4* ve *CAMTA-8* genlerine ait mRNAlarda kat değişimlerine etkisi birbirine yakın oranda gerçekleşirken *YABBY* genlerinde belirgin farklılıklar göstermiştir.

#### 4.7.8 Genlere göre; Kurşun (Pb) (160 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi

*CAMTA-1* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 0,306 kat, Önceler-98’de 9,733 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*CAMTA-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 0,965 kat, Önceler-98’de 4,344 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm

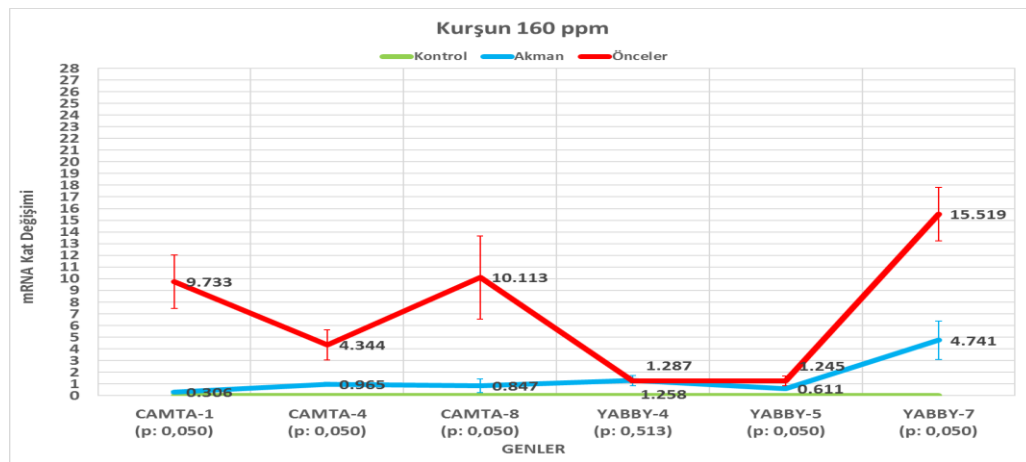
kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**CAMTA-8** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,847 kat, Önceler-98'de 10,113 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-4** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 1,258 kat, Önceler-98'de 1,287 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,513)

**YABBY-5** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,611 kat, Önceler-98'de 1,245 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-7** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 4,741 kat, Önceler-98'de 15,519 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kurşun (Pb) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)



Şekil 4.36 Genlere göre; kurşun (Pb) 160 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değışim dağılımlarının karşılaştırmaları

Önceler-98'de *YABBY-4* ve *YABBY-5* genlerinde uygulanan stres (kurşun (Pb) 160 ppm) birbirine yakın oranda etki ederken *YABBY-7* geninde en yüksek artışı göstermiştir.

Uygulanan kurşun (Pb) 160 ppm stresinin Önceler-98'de en yüksek ortalama değerine *YABBY-7* geninde ulaştığı (15,519 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *YABBY-5* geninde ulaştığı (1,245 kat) görülmüştür. Akman-98'larda ise en yüksek ortalama değerine *YABBY-7* geninde ulaştığı (4,741 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *CAMTA-1* geninde ulaştığı (0,306 kat) görülmüştür.

#### **4.7.9 Genlere göre; Bakır (Cu) (80 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi**

*CAMTA-1* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,235 kat, Önceler-98'de 1,297 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

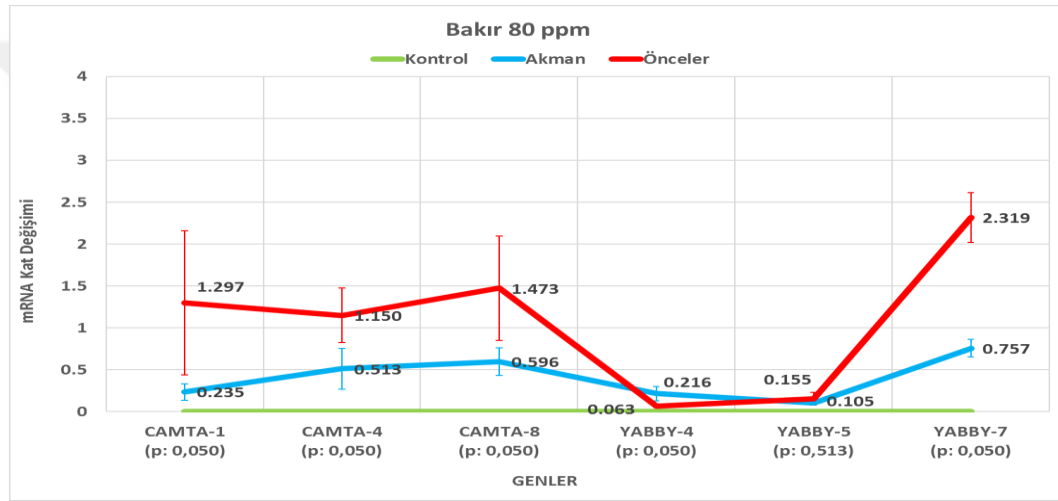
*CAMTA-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,513 kat, Önceler-98'de 1,150 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak çok yakın olmasına rağmen anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*CAMTA-8* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,596 kat, Önceler-98'de 1,473 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*YABBY-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,216 kat, Önceler-98'de 0,063 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-5** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,105 kat, Önceler-98'de 1,155 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,513)

**YABBY-7** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,757 kat, Önceler-98'de 2,319 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)



Şekil 4.37 Genlere göre; bakır (Cu) 80 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değışim dağılımlarının karşılaştırmaları

Uygulanan Kurşun (Pb) 80 ppm stresinin Önceler-98'de en yüksek ortalama değerine **YABBY-7** geninde ulaştığı (2,319 kat) ve en düşük ortalama değerine ise **YABBY-4** geninde ulaştığı (0,063 kat) görülmüştür.

Akman-98'lerde ise en yüksek ortalama değerine **YABBY-7** geninde ulaştığı (0,757 kat) ve en düşük ortalama değerine ise **YABBY-5** geninde ulaştığı (0,105 kat) görülmüştür. Uygulanan stres tüm genlerde farkı artışlar göstermiştir.

#### **4.7.10 Genlere göre; Bakır (Cu) (160 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi**

**CAMTA-1** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,811 kat, Önceler-98'de 0,769 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,827)

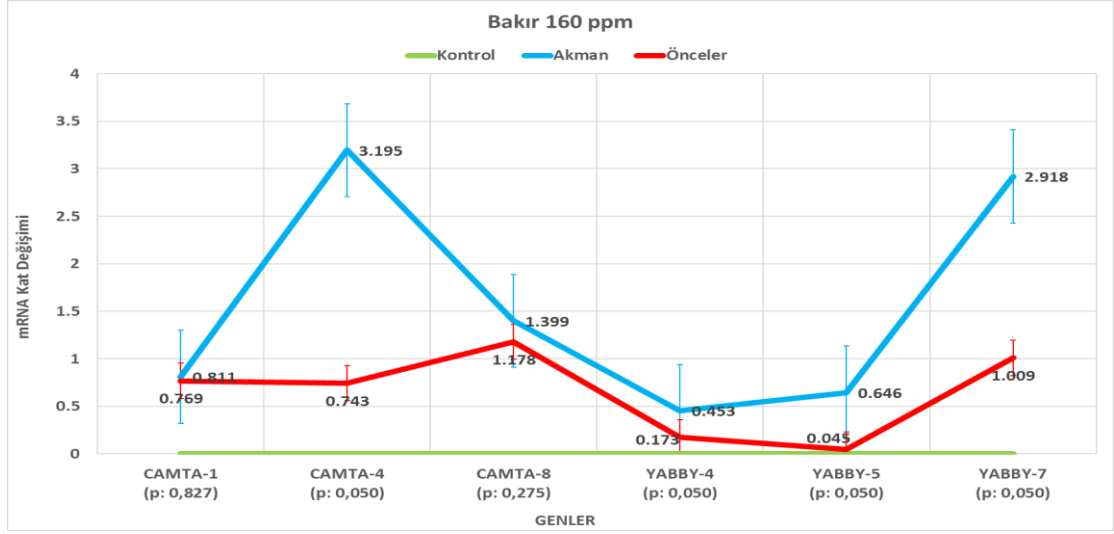
**CAMTA-4** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 3,195 kat, Önceler-98'de 0,743 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**CAMTA-8** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 1,399 kat, Önceler-98'de 1,178 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,275)

**YABBY-4** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,453 kat, Önceler-98'de 0,173 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-5** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,646 kat, Önceler-98'de 0,045 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-7** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 2,918 kat, Önceler-98'de 1,009 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm bakır (Cu) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)



Şekil 4.38 Genlere göre; bakır (Cu) 160 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değışim dağılımlarının karşılaştırmaları

Uygulanan bakır (Cu) 160 ppm stresinin Önceler-98’de en yüksek ortalama değere *CAMTA-8* geninde ulaştığı (1,178 kat) ve en düşük ortalama değere ise *YABBY-5* geninde ulaştığı (0,045 kat) görülmüştür. Akman-98’larda ise en yüksek ortalama değere *CAMTA-4* geninde ulaştığı (3,195 kat) ve en düşük ortalama değere ise *YABBY-4* geninde ulaştığı (0,453 kat) görülmüştür.

#### 4.7.11 Genlere göre; Kadmiyum (Cd) (80 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değışim ortalamalarının analizi

*CAMTA-1* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 0,185 kat, Önce’lerde 0,980 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

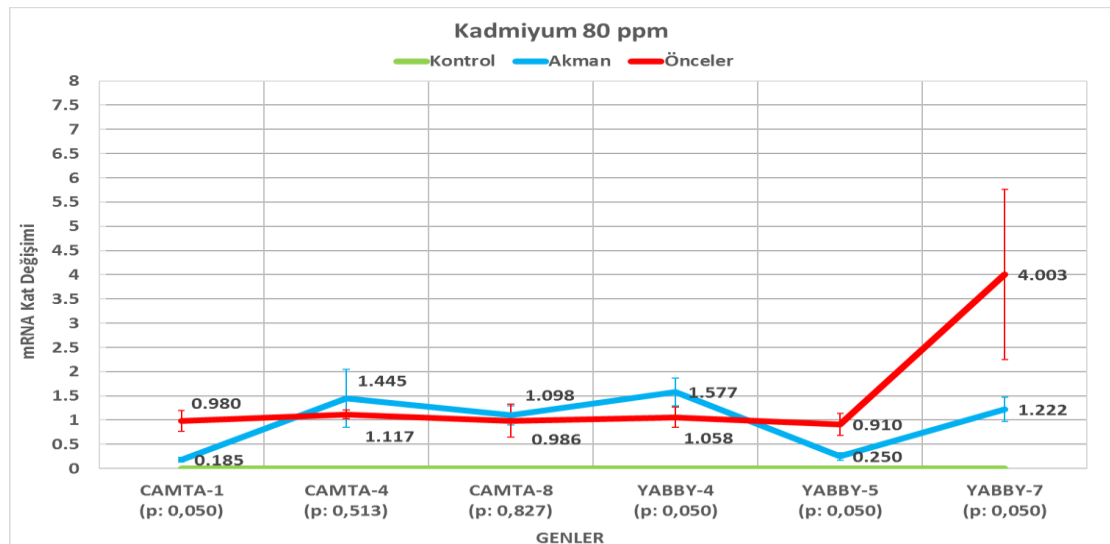
*CAMTA-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 1,445 kat, Önce’lerde 1,117 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,513)

**CAMTA-8** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 1,098 kat, Önce'lerde 0,986 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,827)

**YABBY-4** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 1,577 kat, Önce'lerde 1,058 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-5** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 0,250 kat, Önce'lerde 0,910 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

**YABBY-7** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98'da 1,222 kat, Önce'lerde 4,003 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 80 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)



Şekil 4.39 Genlere göre; kadmiyum (Cd) 80 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim dağılımlarının karşılaştırmaları

Uygulanan Kurşun (Pb) 80 ppm stresinin ÖNCELER’de en yüksek ortalama değerine *YABBY-7* geninde ulaştığı (4,003 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *YABBY-5* geninde ulaştığı (0,910 kat) görüldü. Akman-98’larda ise en yüksek ortalama değerine *YABBY-4* geninde ulaştığı (1,577 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *CAMTA-1* geninde ulaştığı (0,185 kat) görüldü.

Önceler-98 ’de *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4* ve *YABBY-5* genlerinde uygulanan stres (Kadmiyum (Cd) 80 ppm) mRNA kat değişimine birbirine yakın oranda etki ederken *YABBY-7* geninde en yüksek artışı göstermiştir.

#### **4.7.12 Genlere göre; Kadmiyum (Cd) (160 ppm) stresi altında Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değişim ortalamalarının analizi**

*CAMTA-1* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 1,059 kat, Önce’lerde 0,710 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,275)

*CAMTA-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 2,553 kat, Önce’lerde 5,087 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

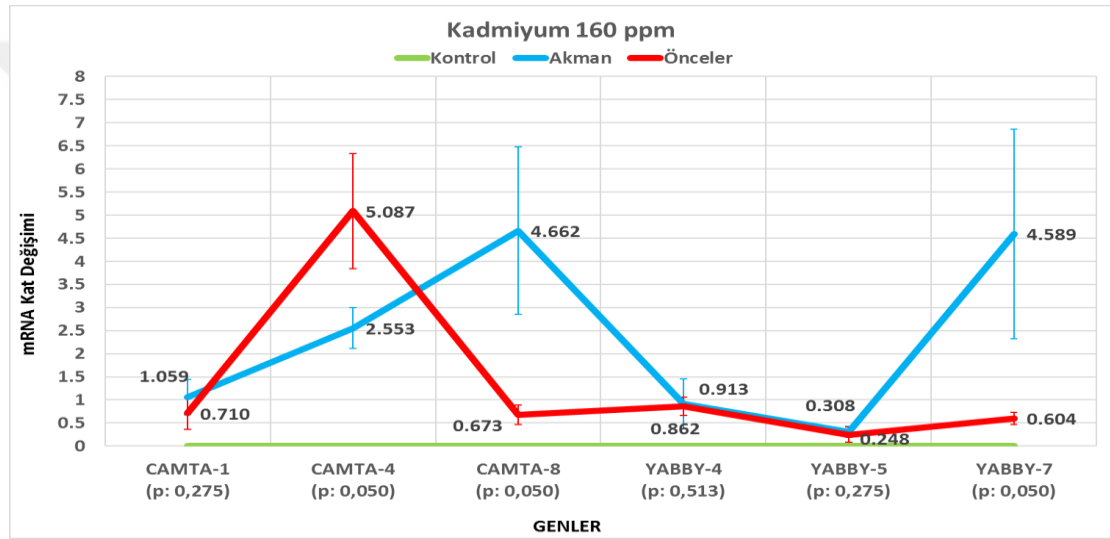
*CAMTA-8* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 4,662 kat, Önce’lerde 0,673 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)

*YABBY-4* geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 0,913 kat, Önce’lerde 0,862 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,513)



**YABBY-5** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 0,308 kat, Önce’lerde 0,248 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. (p:0,275)

**YABBY-7** geninde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre; Akman-98’da 4,589 kat, Önce’lerde 0,604 kat etki etmiştir. Akman-98 ve Önceler-98 arasında 160 ppm kadmiyum (Cd) stresi altında grup ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. (p:0,050)



Şekil 4.40 Genlere göre; kadmiyum (Cd) 160 ppm derişiminde Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde mRNA kat değışim dağılımlarının karşılaştırmaları

Uygulanan kadmiyum (Cd) 160 ppm stresinin Önceler-98’de en yüksek ortalama değerine *CAMTA-4* geninde ulaştığı (5,087 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *YABBY-5* geninde ulaştığı (0,248 kat) görülmüştür. Akman-98’larda ise en yüksek ortalama değerine *CAMTA-8* geninde ulaştığı (4,662 kat) ve en düşük ortalama değerine ise *YABBY-5* geninde ulaştığı (0,308 kat) görülmüştür.

Uygulanan kadmiyum (Cd) 160 ppm stresinin Akman-98’da *CAMTA-8* ve *YABBY-7* geninde birbirine yakın değerde etki ettiği görülmüştür.

## 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada; farklı derişimlerde bakır (Cu), kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) stresleri uygulanmış iki farklı fasulye çeşidinde (*Phaseolus vulgaris* L.) stres cevap ve tolerans mekanizmasında ilişkili olduğu düşünölen *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* genlerinin yapraktaki mRNA kat değışimleri incelenmiş, strese karşı geliştirilen cevap mekanizmasındaki rolleri araştırılmıştır.

Hoagland besi ortamında yetiştirilen ve farklı derişimlerde bakır (Cu), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) stresleri uygulanmış Akman-98 ve Önceler-98 çeşitlerinin yapraklarından alınan örnekler ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve çalışmada protein tayinleri Bradford yöntemine (Bradford 1976) göre yapılmıştır. (Çizelge 4.1)

Akman-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerine uygulanan stresler sonrası yaş-kuru yaprak ve kökler için ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında; bakır (Cu) 160 ppm derişiminde Akman-98 fasulye çeşitleri için yaş yaprak ağırlıkları ortalamalarının kontrol grubuna göre arttığı, Önceler-98 fasulye çeşitleri için yaş yaprak ağırlıkları ortalamalarının kontrol grubuna göre azaldığı görölmüştür. Önceler-98 ve Akman-98 fasulye çeşitleri yaş yaprak ağırlıkları ortalamalarındaki arasındaki bu artış ve azalış karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p:0,050$ ). Bu bulguların literatür ile uyduğu gözlemlenmiştir. Bouazizi vd. (2010) yüksek dozda bakır (Cu) stresine maruz bırakılan fasulyelerin kuru ağırlık değerlerinde düşüşler olduğunu bildirmiştir. Diğer stres derişimlerinde yaprak ve köklerin yaş ve kuru ağırlıkları ortalamalarında birbirine yakın değerler gözlenmiştir. Bu değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).

Uygulanan stres derişimlerinin arttırılması sonucunda kurşun (Pb) stresi uygulaması sonucunda, yaprak ve kök yaş ağırlıklarında az oranda değışiklikler gözlenirken (istatistiksel olarak anlamlı değildir) diğer streslerde yaprak-kök kuru ve yaş ağırlıklarında (Bakır (Cu) 160 ppm hariç) belirgin bir değışim görölmemiştir.

İki farklı *Phaseolus vulgaris* L. çeşidinde gen ifadesi analizleri için Real-time PCR yöntemi kullanılmıştır. Hedeflenen genlerin stres sonrasında ifadeleri genlerin

etkinliklerinin ve stres ile ilişkilerinin belirlenmesine olanak tanıyan qRT-PCR yöntemiyle incelenmiştir.

Çalışmada, Real-Time PCR denemelerinde SYBR Green I boyası kullanılmıştır. qRT-PCR analiz sonuçlarına göre, *CAMTA-1*, *CAMTA-4*, *CAMTA-8*, *YABBY-4*, *YABBY-5*, *YABBY-7* genlerinin, iki farklı fasulye çeşidinin yaprak dokularından alınan örneklerde, gen ifadelerinin, kontrole göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.7).

Sonuç olarak; uygulanan stresler sonucunda fasulye çeşitlerinde ilgili genlerin mRNA kat değişimleri incelendiğinde, kurşun (Pb) stresinde derişimin arttırılmasının Akman-98 fasulye çeşitleri üzerinde *CAMTA* genleri ifade seviyesinde çok etkili olmadığı, kurşun (Pb) stresi derişiminin arttırılması sonrasında Akman-98 fasulye çeşidindeki mRNA kat değişiminde çok fazla bir artış olmadığı görülmüştür. Kurşun (Pb) stresinde en fazla mRNA kat değişiminin her iki fasulye çeşidinde de *YABBY-7* geninde olduğu görüldü.

Bakır (Cu) stresinde derişimin arttırılması Akman-98 fasulye çeşidi için tüm genlerde mRNA kat değişimlerinin artmasına, Önceler-98 fasulye çeşidi için ise mRNA kat değişiminin azalmasına neden olmuştur. Bakır (Cu) stresi derişiminin arttırılması Akman-98 fasulye çeşidinde gen ifade düzeyinde artışa Önceler-98 fasulye çeşidinin gen ifade düzeyinde azalışa neden olduğu söylenebilir.

Kadmiyum (Cd) stresinde derişimin arttırılması Akman-98 fasulye çeşidi için tüm genlerin ifadesinde artışa neden olmuştur. Önceler-98 fasulye çeşidinde ise derişimin arttırılması *YABBY-7* geninin ifadesinde azalışa, *CAMTA-4* geninin ifadesinde ise artışa neden olmuştur. Diğer genlerin ifade seviyelerinde birbirine yakın değerler gözlenmiştir.

Bitkilerde stres adaptasyonu oldukça kompleks cevap mekanizmalarından oluşmaktadır. Bu nedenle *CAMTA* ve *YABBY* gen ailelerinin iki farklı fasulye çeşidinde ağır metal stres toleranslarının belirlenmesi ve karşılaştırılması; bitkilerde abiyotik stres toleransında yer alan moleküler mekanizmaların daha derinden aydınlatılması ve stres cevap mekanizmalarında etkili oldukları bilinen iki gen ailesinin, kilit rollerinin belirlenmesi için oldukça önemlidir. Bu çalışma ile uygulanan stresler sonrasında iki

farklı fasulye çeşidinin gen ifade profillerinin farklı seyretmesi, tolerans ve adaptasyon mekanizmalarının farklı evrimsel süreçler izlediğini göstermektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, *CAMTA* ve *YABBY* genlerinin bitkilerin çok değişkenli stresler altındaki rollerinin belirlenmesi ve potansiyel genetik belirteçler olarak kullanılabilmesi de mümkün görünmektedir.



## KAYNAKLAR

- Agarwal, P.K., Nair, S., Sopory, S.K. and Reddy, M.K. 2007. Stress-inducible *DREB2A* Transcription Factor from *Pennisetum glaucumis* a Phosphoprotein and Its Phosphorylation Negatively Regulates Its DNA-binding Activity. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 189-198
- Aksoy, A. 1995. Kayseri-Kırşehir Karayolu Kenarında Yetişen Bitkilerde Ağır Metal Kirlenmesi. II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Programı, Kayseri.
- Anlarsal, E. 2005. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Yemelik Tane Baklagiller Ders Notları.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004): 373-399.
- Arumuganthan, K., and Earle, E. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 208–218.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206–216.
- Bahuguna, N., Jagadish, K., Coast, O., Wassmann, R. 2014. Plant Abiotic Stress: Temperature Extremes. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* 4: 330-334.
- Barceló, J., and Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *J. Plant Nutr.* 13, 1-37.
- Barceló, J., Cobot, C., and Poschenrieder, C. 1986a. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Contender). II. Effects of Cd on the endogenous abscisic acid level. *J. Plant Physiol.* 125, 27-34.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., Andreu, I. and Gunse, B. 1986b. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *J. ASPB.* 125, 17-25.
- Baszyński, T., Wajda, L., Król, M., Wolińska, D., Krupa, Z., and Tukendorf, A. 1980. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Plant Physiol.* 48, 365-370.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., Sharma, K. 2008. Transgenic Approaches for Abiotic Stress Tolerance in Plants: Retrospect and Prospects. *Plant Cell Rep* 27: 411–424.
- Borges, A., Tsai, S.M., and Caldas, D.G. 2012 Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep.*, 31, 827–838.

- Bouazizi H., Jouili H., Geitmann A., ElFerjani E. 2010. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. Elsevier Inc. Ecotoxicology and Environmental Safety 73 1304–1308.
- Bowman, J.L. 2000. The *YABBY* gene family and abaxial cell fate. Plant Biology, Pages 17-22.
- Bowman, J.L. and Smyth, D.R. 1999. CRABS CLAW a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. The Company of Biologists Ltd Development 126, 2387-2396.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248254.
- Brohi, A., Akgün, A., Rüştü M. ve Sabit K.E. 1994. Bitki Besleme. Gaziosmanpaşa Üniversitesi.
- Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant Soil, 252, 55–128.
- Büyük, I., Aras, S. 2016. Genome-wide in silico identification, characterization and transcriptional analysis of the family of growth-regulating factors in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to polyethylene glycol-induced drought stress. Arch Biol Sci. 2017;69(1):5-14.doi:10.2298/ABS160204033B
- Büyük, I., İlhan, E., Sener, D., Ozsoy, A.U., Aras, S. 2019. Genome-wide identification of *CAMTA* gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. Springer Nature doi: 10.1007/s11033-019-04716-8.
- Candan, F. 2013. Some observations on plant karyology and investigation methods, Current Progress in Biological Research, 394 p.
- Chaoui, A. and Ferjani, E. 2005. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. C. R. Biologies 328, 23-31.
- Chen, T., Murata, N. 2002. Enhancement of Tolerance of Abiotic Stress by Metabolic Engineering of Betaines and Other Compatible Solutes. Current Opinion in Plant Biology 5: 250–257.
- Chiou, T.J. 2007. The Role of microRNAs in Sensing Nutrient Stress. Plant, Cell and Environment 30: 323–332.
- Claire, L.C., Adriano D.C., Sajwan K.S., Abel S.L., Thoma, D.P. and Driver J.T. 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. Water, Air and Soil Pollution, 59, 231-240 pp.

- Costa, G., Michaut, J.C. and Morel, J.L. 1994. Influence of cadmium on water relations and gas exchanges in phosphorus deficient *Lupinus alba*. *Plant Physiol. and Biochem.*, 32: 105
- Cramer, G., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. 2011. Effects of Abiotic Stress on Plants: A Systems Biology Perspective. *BMC Plant Biology* 11: 1-14.
- Çatak, E., Güler Ç., Süleyman T. ve Orhan B. 2000. Bazı Domates ve Tütün Genotiplerinde Kadmiyum Etkilerini İnceleyen İstatistiksel Bir Çalışma. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2 (1).
- Çepel, N. 1997. Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar. *TEMA Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayınları* No:14 İstanbul.
- Çıngı, F., 2007. Eser elementler. (erişim adresi: [www.firochromis.com](http://www.firochromis.com), erişim tarihi: 12.04.2007).
- Çırak, C., Enver, E. 2006. Soyada Kuraklık Stresi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi* 2 (2006): 231-237.
- Dalcorso, G, Farinati, S, and Furini, A. 2010 Regulatory networks of cadmium stress in plants *Plant Signal Behav* 5(6): 663–667.
- Dietz, K.J., Baier, M. ve Krämer, U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems*, Eds: M.N.V. Prasad ve J. Hagemeyer, ss.73-98, Springer-Verlag, Berlin.
- Doncheva, S., Nicolov B. and Ogneva V. 1996. Effect of copper excess on the morphology of the nucleus in maize root meristem cell, *Physiol. Plantarum*, 96: 118-122.
- Fernandes, J.C. and Henriques F.S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57, 246-273 pp.
- Flowers, Timothy. Colmer, Timotht. 2008. Salinity Tolerance in Halophytes. *New Phytologist* 179: 945-963.
- Freytag, G.F. and Debouck, D.G. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. *Sida Botanical Miscellany*, 23, 1–300.
- Fujii, H., Chiou, T.J., Lin, S.I., Aung, K., Zhu, J.K. 2005. A miRNA Involved in Phosphate-Starvation Response in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15 (2005): 2038-2043.
- Gadallah, M.A.A. 1995a,b. Interactive effect of heavy metals and temperature on the growth and chlorophyll, saccharides and soluble nitrogen in *Phaseolus* plants. *Bio. Plant.* 36, 373-382.

- Giardi, M.T. Cona, A. Geiken, B. Kucera, T. Masojidek, J. Mattoo, A. K. 1996. Long-term Drought Stress Induces Structural and Functional Reorganization of Photosystem II. *Planta* 199: 118-125.
- Gill, SS., Khan, NA., Anjum, NA., Tuteja N. 2011. Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. *Plant Stress* 5 (Special Issue 1): 1-23.
- Gill, SS., Tuteja, N.2010. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gouia, H., Gorbil, M.H., and Meyer, C. 2000. Effects of cadmium on the activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in the bean. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38:629-638.
- Goyer, R. A. 1991. Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York,1032.
- Goyer, R.A., Miller C.R., Zhu S.Y. and Victory W. 1989. Non-metallothionein bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephropathy in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 101: 232-244.
- Greger, M. 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to the ecosystem, Eds: M.N.V. Prasad, ve J. Hagemeyer, ss. 1-27, Springer-Verlag, Berlin
- Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö ve Çobanoğlu, D. 2004. Ağır Metal İyonlarının ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ) *Clivia* sp. Bitkisi Polenlerinin Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi Üzerine Etkileri. *F.Ü. Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*, 16(2), 177-182.
- Güvenç, Ş. 1993. Farklı Sulama Seviyelerinin Erzurum'da Yetiştirilen Fasulye (*Phaseolus vulgaris* cv. Kızılhaç)'de Bitki Gelişmesine, Verime ve Bazı Mineral madde İçeriğine Etkisi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi, 130s
- Han H.Q., Y. Liu, M.M. Jiang, H.Y. Ge and H.Y. Chen. 2015. Identification and expression analysis of *YABBY* family genes associated with fruit shape in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Genet. Mol. Res.* 14 (2): 7079-7091.
- Hirayama, T., Shinozak, K. 2010. Research on Plant Abiotic Stress Responses in The Post-Genome Era: Past, Present and Future. *The Plant Journal* 61: 1041–1052.
- Huang, Z., Houten, J.V., Gonzalez, G., Xiao, H. and Knaap, E. 2013. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of SUN, OFP and YABBY gene family in tomato. Springer-Verlag Berlin Heidelberg doi.10.1007/s00438-013-0733-0



- İnal, B., Büyük, I., İlhan, E. and Aras, S. 2017. Genomewide analysis of *Phaseolus vulgaris* C2C2-YABBY transcription factors under salt stress conditions. 3 Biotech, 7(5): 302.
- Jiang, W.Z. and Li J.L., 1989. Effects of Cadmium on Photosynthetic Characteristics of Tobacco. Plant Physiology Communications, 6: 27-31
- Jones, D.L. and Kochian, L.V. 1997. Aluminum (Al) interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. FEBS Lett. 400, 51-57.
- K. Vengatesan, S.B., Mahajan, P., Sanjeevikumar, R., Mangrule, V.K. 2018. Performance Analysis of Gene Expression Data Using Mann–Whitney U Test. Springer Nature Singapore, 442, [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4762-6\\_67](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4762-6_67)
- K.R. Siegfried, Y. Eshed, S.F. Baum, D. Otsuga, G.N. Drews, J.L. Bowman. 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. The Company of Biologists Ltd Development 126: 4117-4128.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A. ve Timur S. 2007. Metallerin Çevresel Etkileri –I. (erişim adresi: [www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136\\_4753.pdf](http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf), erişim tarihi: 13.05.2007).
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y., 2005. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms. G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi 18 (2005): 723-740.
- Kalyanaram, B. 1996. Thiol radicals in biological systems: significant or trivial? Biochem. Soc. Symp. 61, 55-63
- Katagiri, F., Lam, E., and Chua, N. H. 1989. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. Nature, 340(6236), 727.
- Lauwerys, R.P., Bernard A.M., Buchnet J.R. and Raels H.H., 1993. Assessment of the health impact of environmental exposure to cadmium: Contribution of epidemiologic studies carried out in Belgium. Environ. Res., 62: 200-206
- Lee, T.I., Young, R.A. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. Annu.Rev. Genet., 34, 77–137.
- Lidon, F.C., Ramalho J. and Henriques F.S., 1993. Copper (Cu) inhibition of rice Photosynthesis. J. Plant Physiol., 142:12-17.
- Lindberg, S. and Griffiths, G. 1993. Aluminum effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. J. Exp. Bot. 44, 1543-1550.
- Lindberg, S., Meyers, T.P., Taylor G.E.Jr., Turner, R.R. ve Schroeder, W.H. 1992. Atmosphere-surface exchange of mercury in a forest: results of modeling and gradient approaches. J. Geophys Res. 97, 2519-2528.

- Liu, H., Xu, YX., Chong, K. 2007. A rice *YABBY* gene, *OsYABBY4*, preferentially expresses in developing vascular tissue. Springer-Verlag Berlin Heidelberg doi. 10.1007/s00427-007-0173-0
- Lombardi, L. and Sebastiani L. 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci.*, 168, 797-802.
- Lösch, R. and Köhl, K.I. 1999. Plant respiration under the influence of heavy metals. *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems*, Eds: M.N.V. Prasad ve. Hagemeyer, ss.139-156, Springer-Verlag, Berlin.
- Lyons-Alcantara, M., Tarazona J.V. and Mothersill C. 1996. The differential effect of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell Biol. and Toxicol.*, 12: 29-38.
- Maheswari, M., Yadav, S. K., Shanker, A.K.M., Kumar, A., Venkateswarlu, B. 2012. Overview of Plant Stresses: Mechanisms, Adaptations and Research Pursuit. *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies 1*: 1-18.
- Maksymiec, W., 2007. Signaling Responses in Plants to Heavy Metal Stress. *Acta Physiol Plant* 29: 177-187.
- Mark, K.F. and Hendershot H. 1997. Trace Metals in Montreal Urban Soils and the Leaves of *Taraxacum officinale*. *Can. J. Soil. Sci.*, 79:385-387.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd edition. Academic Press London 899 p.
- Marschner, H., 1995, *Mineral nutrition of higher plants*, Academic Press
- McCauley, A., Jones, C., Jacobsen, Jeff. 2009. Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms. *Nutrient Management Module 9*: 1-16.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V.. 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science* 9: 405-410.
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., Kimura, K., 2005. Recovery Responses of Photosynthesis, Transpiration, and Stomatal Conductance in Kidney Bean Following Drought Stress. *Environmental and Experimental Botany* 53: 205–214.
- Mullet, John E. Whitsitt, Mark S. 1996. Plant Cellular Responses to Water Deficit. *Plant Growth Regulation* 20: 119-124.
- Munzuroğlu, Ö. and Geçkil, H., 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Environ. Cont. and Toxi.*, 43: 203-213.

- Munzuroğlu, Ö. ve Nazmi G. 2000. Ağır Metallerin Elma (*Malus slyvestris* Miller cv. Golden)'da Polen Çimlenmesi ve Polen Tüpü Gelişimi Üzerine Etkileri. Turk J.Biol. (24) 677-684. TÜBİTAK.
- Ning, W., En-Hua, X. and Li-Zhi, G. 2016. Genome-wide analysis of WRKY family of transcription factors in common bean, *Phaseolus vulgaris* chromosomal localization, structure, evolution and expression divergence. Plant Gene, 5, 22–30.
- Nussbaum, S., Shetmutz, D. and Brunold, C. 1988. Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium *Zea mays* L. Plant Physiology, 88:1407.
- Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S., Becker, A. 2009. The *CRABS CLAW* ortholog from California poppy (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae), *EcCRC*, is involved in floral meristem termination, gynoecium differentiation and ovule initiation. Plant Journal, 58(4): 682-693.
- Ouzounidou, G., Ilias, I., Tranopoulou, H. and Karataglis, S. 1998. Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology, Journal of Plant Nutrition, 21, 2089-2101.
- Özdem, M.A. 2012. Dünya ve Türkiye’de Kuru Baklagiller. TEPGE Bakış, 1303-8346, Ankara.
- Özkorkmaz-Atıcı, F., Yılmaz, N., Öner, F. 2014 Determination Of Some Morphological And Phenological Characteristics Of Local Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes, Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue: 2.
- Paschke, M.W., Valdecantos, A and Redente, E.F. 2005. Manganese toxicity thresholds for restoration grass species. Environmental Pollution, 135:313-322.
- Peng, X., Wu, O., Teng, L., Tang, F., Pi, Z., Shen, S. 2015. Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. Plant Biology 15:108 doi: 10.1186/s12870-015-0489-2
- Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.L., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E. and Parsons, J.G. 2000. Study on the effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*) grown in solid media. Proceedings of 2000 Conference on Hazardous Waste Research, ss. 135-140.
- Peterson, P.J. 1993. Plant Adaptation to Environmental Stress: Metal Pollution Tolerance. Fowden, L., Mansfield, T., Stoddart, J., Chapman&Hall, p:171-188.
- Raven, J.A., Evans, M.C.W. and Korb, R.E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms, Photosynth. Res., 60, 111-149.
- Redondo-Gomez, S., 2013 Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants. Molecular Stress Physiology of Plants 1, 1-20.

- Roeder, R.G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21/9. 327-35.
- Ros, R., Cooke D.T., Burden, R.S. and James C.S. 1990. Effect of herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium, and nickel, on the lipid composition, Mg-ATPase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* cv. Bahia shoots. *J. Exp. Bot.* 41, 457-467.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Puertas-Romero, M.C, and del Rio, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52 (362): 2115-2126.
- Sauter, A. Dietz, K. J. Hartung, W. 2002. A Possible Stress Physiological Role of Abscisic Acid Conjugates in Root-To-Shoot Signalling.” *Plant, Cell and Environment* 25: 223-228
- Sawa, S., Ito, T., Shimura, Y. and Okada, K. 1999. FILAMENTOUS FLOWER controls the formation and development of Arabidopsis inflorescences and floral meristems. *Plant Cell* 11, 69-86.
- Saygıdeğer, S. 1995. *Lycopersicum esculentum* L. Bitkisinin çimlenmesi ve gelişimi üzerine kurşunun etkileri. 2. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. Ankara. 588-597.
- Servant, J. 1982. Airbone lead in the enviromental in France., 595-619., France.
- Sharma, P., Dubey, RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. and Plant Physiol.*, 17:35-52
- Sharma, S.S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K.C., Finkemeier, I. ve Dietz, K.J. 2004. Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. *Plant Sci.* 166, 1287-1295.
- Sharp, Robert E. Poroyko, Valeriy. Hejlek, Lindsey G. Spollen, William G. Springer, Gordon K. Bohnert, Hans J. Nguyen, Henry T. 2004. Root Growth Maintenance During Water Deficits: Physiology to Functional Genomics.” *Journal of Experimental Botany* 55: 2342-2351.
- Sheoran, I.S., Singal, H.R and Singh, R. 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23, 345-351
- Singh, N.K., Handa, A.K., Hasegaura, P.M. and Bressan, R.A. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol*, 79, 126-37.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja K. and Prasad A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation’ *Plant Physiol. Plantarum*, 85:85-89.
- Stolt, J.P., Sneller, F.E.C., Bryngelsson, T., Lundborg, T., ve Schat, H. 2003. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environ. Exp. Bot.* 49, 21-28.

- Sun, W., Montagu, M.V., Verbruggen, N. 2002. Small Heat Shock Proteins and Stress Tolerance in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577: 1-9.
- Tabata, T., Takase, H., Takayama, S., Mikami, K., Nakatsuka, A., Kawata, T. and Iwabuchi, M. 1989. A protein that binds to a cis-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. *Science*, 245(4921), 965-967.
- Tarczynski, M.,C., Jensen, R.G., Bohnert, H. J. 1993. Stress Protection of Transgenic Tobacco by Production of the Osmolyte Mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Tunnacliffe, A., Wise, M.J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins.” *Naturwissenschaften* 94: 791–812.
- Verma, S., Nizam, S., Verma, P.K. 2013. Biotic and Abiotic Stress Signaling in Plants. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective* 1: 25-49.
- Villanueva, J.M., Broadhvest, J., Hauser, B.A., Meister, R.J., Schneitz, K., Gasser, C.S. 1999. Inner no outer regulates abaxial–adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes and Development*, 13(23): 3160-3169.
- Vinocur, B., and Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 123-132.
- Vural, H. 1993. Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler. *Ekoloji* 8, 3-8.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad. M.R. 2007. Heat Tolerance in Plants: An Overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199–223.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. 2003. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering For Stress Tolerance. *Planta* 218 1–14.
- Wärnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P., Gustafsson, J.A. 2003. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology*. 17(10):1901-9.
- Wei, M., Xu, X.M., Li, C.H. 2017. Identification and expression of *CAMTA* genes in *Populus trichocarpa* under biotic and abiotic stress. *Sci Rep* 7:17910. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18219-8>
- Yanagisawa, S., and Sheen, J. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 10(1), 75-89.
- Yang, X.C., and Hwa, C.M. 2008. Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. *Nature*, 396–404.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., Nakashita, H. 2008.

Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1678-1692.

Yıldız, M., Terzi, H., Cenkcı, S., Arıkan T, E. S., Uruşak, B., 2010. Bitkilerde Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik ve Biyokimyasal Markörleri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 1-33.

Yıldız, N. 2003. Toprak Kirletici Ağır Metaller ve Toprak Bitki İlişkileri. I. Ulusal Çevre Sempozyumu. Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Müdürlüğü Erzurum.

Yıldız, N. 2004. Toprak ve Bitki Ekosistemindeki Ağır Metaller. ZT-531. Yüksek Lisans Ders Notları. Erzurum.

Yuan, L., and Perry, S.L.,2011. *Plant Transcription Factors: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 358 pp.

Zengin, K.F., ve Munzuroğlu, Ö. 2005. Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) Klorofil ve Karotenoid Miktarı Üzerine Bazı Ağır Metallerin ( $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) Etkileri. *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 17(1); 164-172.

Zheljaskov, V.D., and Nielsen N.E. 1996. Effect of Heavy Metals on Peppermint and Commint. *Plant and Soil*. 178 (1): 59-66.

Zhu, J.K.. 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247-73.

Zhu, J.K.. 2003. Regulation of Ion Homeostasis Under Salt Stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 441-445.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Evrim Kocaman Doğum Yeri : Ankara  
Doğum Tarihi : 20.11.1982  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Esenevler Süper Lisesi (2000)  
Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004)  
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya  
A.B.D. (2008)  
Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D. (2019)

### Çalıştığı Kurumlar/Yıl

Genar Toplum Sağlığı ve Genom Bilim Araştırmaları Enstitüsü (2007-2009)

CRM Tıbbi İlaç Araştırma Org.Eğt.Dan.Tic.Ltd. Şti., 2009- Halen devam etmekte.

### Yayımlar (SCI)

1. Karaca Sefayet, Cesuroglu Tomris, **Kocaman Evrim** (2010). MALDI-TOF MS Based Genotyping of Single Nucleotide Variations Predisposing to Cardiovascular Disease: Prevalence in Turkey. IX National Medical Genetics Congress. Clinical Genetics., 78(S1).
2. Evrim Kocaman, E. Sumer Aras (2019) General Overview of The Studies with Maldi-Tof. Ankara University Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C: Biology.Volume 28, Number 1, Pages 1-9 (2019) DOI: 10.1501/commuc\_0000000225