

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAKIR ( $\text{Cu}^+$ ), KURŞUN ( $\text{Pb}^{+2}$ ) ve KADMİYUM ( $\text{Cd}^{+2}$ ) AĞIR METAL  
STRESLERİNE MARUZ KALMIŞ ASPİR (*Carthamus tinctorius* L.)  
ÇEŞİTLERİNDE *FAD2* GENİ mRNA İFADE SEVİYELERİNİN  
BELİRLENMESİ

Ekrem BÖLÜKBAŞI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2018

Her hakkı saklıdır

## TEZ ONAYI

Ekrem BÖLÜKBAŞI tarafından hazırlanan “**Bakır (Cu<sup>+</sup>), Kurşun (Pb<sup>2+</sup>) ve Kadmiyum (Cd<sup>2+</sup>) Ağır Metal Streslerine Maruz Kalmış Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşitlerinde *FAD2* Geni mRNA İfade Seviyelerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 03/08/2018 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 Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Füsun EYİDOĞAN  
Başkent Üniversitesi Sınıf Öğretmenliği Anabilim Dalı

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

**Üye** : Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN  
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

**Üye** : Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

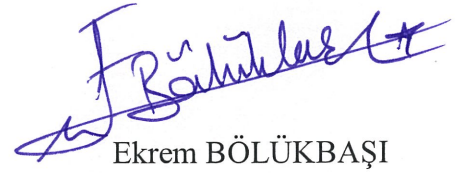
**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN**  
Enstitü Müdürü

## ETİK

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

03/08/2018

  
Ekrem BÖLÜKBAŞI

## ÖZET

Doktora Tezi

BAKIR (Cu<sup>+</sup>), KURŞUN (Pb<sup>+2</sup>) ve KADMİYUM (Cd<sup>+2</sup>) AĞIR METAL STRESLERİNE MARUZ KALMIŞ ASPİR (*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİTLERİNDE *FAD2* GENİ mRNA İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Ekrem BÖLÜKBAŞI

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Ağır metal kirliliği tüm dünyada büyük bir çevresel problemdir. Toprak ve suda yüksek konsantrasyonlarda biriken ağır metallerin genotoksisiteye ve fonksiyonel biyomoleküllerin çoğuna zarar verdiği bilinmektedir. Örneğin, düşük konsantrasyonlarda bakır tüm organizmalar için gerekliyken, yüksek konsantrasyonda bakır, kadmiyum ve kurşun bitkilerden insanlara kadar tüm canlıları olumsuz yönde etkileyen gereksiz ve tehlikeli elementlerdir. Aspir bitkisi tohum ve tohumdan elde edilen yağı için yetiştirilen önemli bir tarım bitkisidir. Aspir yağı, gıda ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan önemli bir oleik asit ve linoleik asit kaynağıdır. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal streslerine maruz bırakılan dört farklı aspir çeşidinin (BALCI, BDYAS-4, LİNAS ve ASOL) kök, kotiledon ve yaprak örneklerinde oleik asitin linoleik aside dönüşümünden sorumlu *CtFAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin ifade düzeyleri Real-Time PCR ile belirlenmiştir. Aspir çeşitleri 21 gün süreyle iklimlendirme kabininde yetiştirildikten sonra 24 saat farklı konsantrasyonlardaki (0, 40, 80, 160, 320, 640 mg/L) bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal stresine maruz bırakılmıştır. 24 saat süre ile ağır metal streslerine maruz kalan aspir çeşitlerinin kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR analizi yapılmıştır. Artan bakır konsantrasyonlarına maruz kalan aspir çeşitlerinde *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde azalma olurken, 160 mg/L ve 320 mg/L'den sonra yeniden artışın olduğu görülmüştür. Kurşun stresinde kontrol grubuna göre 160 mg/L'ye kadar genel bir düşüş olurken, 320 mg/L konsantrasyonda en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Kadmiyum stresinde ise *FAD2* genlerinin ifade düzeylerinin 160 mg/L'de en yüksek seviyelere ulaştığı ve sonraki konsantrasyonlarda düştüğü tespit edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar *FAD2* genlerinin aspir bitkisinde ağır metal streslerine karşı savunma mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir.

**Ağustos 2018, 172 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Aspir, bakır stresi, kurşun stresi, kadmiyum stresi, *FAD2* genleri.

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION of *FAD2* GENE mRNA EXPRESSION LEVELS IN SAFFLOWER (*Carthamus tinctorius* L.) VARIETIES EXPOSED TO COPPER (Cu<sup>+</sup>), LEAD (Pb<sup>+2</sup>) and CADMIUM (Cd<sup>+2</sup>) HEAVY METAL STRESS

Ekrem BÖLÜKBAŞI

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

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Heavy metal contamination is a major environmental problem all over the world. It is known that high concentration of heavy metals in soils and waters cause genotoxicity and damage most of the functional bio-molecules. For instance, although low concentration of copper is essential for all organisms but high concentration of copper, cadmium and lead are non-essential elements that negatively affect every living organism from plants to humans. Safflower is an important agricultural plant which is being grown for the seeds and seed oil. Safflower oil constitutes an important source of oleic acid and linoleic acid which can be used for food and industrial applications. In this study, we investigated the expression levels of *CtFAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genes which are important for conversion of oleic acid (Omega-9) to linoleic acid (Omega-6) at root, cotyledon and leaf tissues of four Turkish safflower varieties (BALCI, BDYAS-4, LİNAS and ASOL) subjected to copper, lead and cadmium heavy metals stress conditions by qRT-PCR. Safflower species which were grown in perlite for 21 days in a controlled environmental growth chamber were exposed to 24 hours of different concentration (0, 40, 80, 160, 320, 640 mg/L) of copper, lead and cadmium heavy metal stress. RNA isolation, cDNA synthesis and Real Time PCR analysis were performed with root, cotyledon and leaf tissues which were subjected to 24 hours of all stress conditions. It was found that the expression levels of *FAD2* genes have decreased in the safflower varieties which were exposed to increasing concentrations of copper, but increased again after 160 mg/L and 320 mg /L. Under lead stress conditions, expression levels of *FAD2* genes revealed a general decrease pattern up to 160 mg / L compared to the control group and then they reached the highest level of expression at 320 mg/L concentration. Under cadmium stress conditions, expression levels of *FAD2* genes were found to reach the highest expression level at 160 mg/L and following decreased at subsequent concentrations. All results suggest that *FAD2* gene plays a key role in defence mechanism against heavy metal stresses.

August 2018, 172 pages

**Key Words:** Safflower, copper stress, lead stress, cadmium stress, *FAD2* genes.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında yanımda olan, hem bilimsel desteğini hem de deneyimlerini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. E. Sümer ARAS (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)'a hoşgörü ve her türlü anlayışı için tüm içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim. Tez İzleme Komisyonunda bulunan, bilgi ve tavsiyeleriyle tezime yön veren değerli hocalarım Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)'a ve Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)'a teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarında birlikte çalıştığım ve her zaman desteğini gördüğüm Araş. Gör. Dr. Cumhuri AVŞAR ve Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e; tecrübelerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Sevgi MARAKLI (Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, hayatım ve doktora sürecim boyunca maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme ve kardeşlerime, her zaman desteğiyle yanımda olan değerli eşime ve canım oğlum Mehmet Eren'ime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi tarafından 16L0430009 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

TÜBİTAK BİDEB tarafından 1059B281300057 numaralı 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Programı (2013-1) bursiyeri olarak desteklendiğim için ayrıca teşekkür ederim.

Ekrem BÖLÜKBAŞI

Ankara, Ağustos 2018

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Aspir Bitkisinin Sistematik Yeri .....	1
1.2 Aspir Bitkisinin Botanik Özellikleri .....	1
1.3 Aspir Bitkisi, Tarihi ve Genel Özellikleri .....	3
1.3.1 Dünya genelinde aspir bitkisinin tarihi, üretimi, kullanım alanları ve önemi .....	4
1.3.2 Türkiye’de aspir bitkisinin tarihi, üretimi, kullanım alanları ve önemi.....	9
1.4 Aspir Bitkisinin Tarımı .....	12
1.4.1 Aspir tarımında yabancı ot kontrolü .....	14
1.5 Çevre Kirliliği ve Etkileri .....	14
1.5.1 Çevre kirliliği .....	14
1.5.2 Çevre kirliliğinin canlılar üzerine etkileri.....	15
1.6 Ağır Metaller .....	17
1.6.1 Bakır (Cu) ağır metali ve etkileri.....	19
1.6.1 Kurşun (Pb) ağır metali ve etkileri .....	20
1.6.2 Kadmiyum (Cd) ağır metali ve etkileri.....	21
1.7 Ağır Metallerin Canlılar Üzerine Etkileri .....	23

<b>1.8 Bitkilerde Ağır Metal Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar .....</b>	<b>24</b>
<b>1.8.1 Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri.....</b>	<b>24</b>
<b>1.8.2 Lipid peroksidasyonu .....</b>	<b>26</b>
<b>1.9 Bitkilerde Ağır Metallerin Detoksifikasyon (Giderim) Mekanizmaları .....</b>	<b>27</b>
<b>1.9.1 Organik asitler .....</b>	<b>28</b>
<b>1.9.2 Antioksidant bileşikler .....</b>	<b>28</b>
<b>1.9.3 Prolin birikimi.....</b>	<b>29</b>
<b>1.9.4 Metallotiyoneinler ve fitoşlatinler .....</b>	<b>29</b>
<b>1.9.5 Alternatif oksidaz yolu .....</b>	<b>30</b>
<b>1.9.6 Stres proteinleri .....</b>	<b>30</b>
<b>1.10 Yağ Asitleri ve Yağ Asidi Desatürazlar (Dönüştürücüler).....</b>	<b>31</b>
<b>1.10.1 Yüksek bitkilerde yağ asidi desatürazlar ve sorumlu genler .....</b>	<b>33</b>
<b>1.11 Aspir Bitkisi ve <i>FAD2</i> Geni.....</b>	<b>33</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Materyal Temini.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Besi Ortamının Hazırlanması .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Stres Uygulaması Yapılacak Ağır Metal Çözeltilerinin Hazırlanması .....</b>	<b>50</b>
<b>3.4 Aspir Bitkisinin Yetiştirilmesi.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5 Ağır Metal Streslerinin Aspir Fide Çeşitlerine Uygulanması .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Analiz Esnasında Kullanılacak Çalışma Kodların Oluşturulması.....</b>	<b>52</b>
<b>3.7 Total RNA İzolasyonu .....</b>	<b>54</b>
<b>3.8 DNaz Uygulaması.....</b>	<b>55</b>
<b>3.9 Agaroz Jel Elektroforezi.....</b>	<b>56</b>
<b>3.10 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi .....</b>	<b>56</b>
<b>3.11 Primer Dizaynı .....</b>	<b>57</b>



3.12 Real-Time PCR Reaksiyonu .....	59
3.13 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz .....	60
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>62</b>
4.1 Aspir Bitkisinde Ağır Metal Stresi Uygulamaları.....	62
4.1.1 Bakır (Cu) stresi .....	62
4.1.2 Kadmiyum (Cd) stresi .....	62
4.1.3 Kurşun (Pb) stresi .....	62
4.2 Total RNA İzolasyonu .....	64
4.3 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi .....	64
4.4 Real-Time PCR Reaksiyonu .....	71
4.5 Real-Time PCR Sonuçlarının Normalizasyonu ve İstatistiksel Analizi.....	72
4.5.1 Bakır (Cu) stresi sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi .....	73
4.5.1.1 BALCI çeşidi .....	73
4.5.1.2 BDYAS-4 çeşidi .....	79
4.5.1.3 LİNAS çeşidi .....	85
4.5.1.4 ASOL çeşidi .....	91
4.5.2 Kurşun (Pb) stresi sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi .....	97
4.5.2.1 BALCI çeşidi .....	97
4.5.2.2 BDYAS-4 çeşidi .....	103
4.5.2.3 LİNAS çeşidi .....	109
4.5.2.4 ASOL çeşidi .....	115
4.5.3 Kadmiyum (Cd) stresi sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi .....	121
4.5.3.1 BALCI çeşidi .....	121
4.5.2.2 BDYAS-4 çeşidi .....	127
4.5.2.3 LİNAS çeşidi .....	133

<b>4.5.2.4 ASOL çeşidi .....</b>	<b>139</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>146</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>152</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>168</b>



## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
bç	Baz çifti
CdCl <sub>2</sub>	Kadmiyum klorür
cm <sup>3</sup>	Santimetre küp
ct	Cycle Treshold
Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Bakır (I) sülfat
dH <sub>2</sub> O	Distile su
dk	Dakika
EtOH	Etanol
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
Mm	Milimolar
ng	Nanogram
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit anyonu
OH <sup>-</sup>	Hidroksil
Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Kurşun nitrat

## Kısaltmalar

cDNA	Tamamlayıcı DNA
ctFAD	<i>Carthamus tinctorius</i> fatty acid desaturase
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
FAD	Fatty acid desaturase
MDA	Malandialdehitler
MT	Metallotiyoneinler
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Aspir bitkisinin genel görünüşü, çiçeği, tarlası ve tohumu.....	2
Şekil 1.2 Aspir bitkisinin olgun çiçeği ve aspir yağı .....	4
Şekil 1.3 Aspir bitkisinden elde edilen ekstrakt ve ticari tablet hali .....	5
Şekil 1.4 Aspirden elde edilen boyayla ipliklerin boyanması .....	6
Şekil 1.5 Seçilmiş yıllara göre dünya geneli aspir üretim miktarı .....	8
Şekil 1.6 2016 yılı verilerine göre dünya aspir üretiminin kıtalara göre dağılımı .....	9
Şekil 1.7 2006 yılından itibaren Türkiye aspir ekim alanındaki değişim .....	10
Şekil 1.8 Baharat olarak satılan kurutulmuş aspir çiçekleri .....	11
Şekil 1.9 Aspir ekimi yapılan farklı şehirlerdeki ekim alanları .....	12
Şekil 1.10 Hasat zamanı gelmiş aspir örnekleri .....	12
Şekil 1.11 Aspir bitkisinin olgunlaşma safhaları .....	13
Şekil 1.12 Bakır ağır metalinin kimyasal özellikleri.....	19
Şekil 1.13 Kurşun ağır metalinin kimyasal özellikleri.....	20
Şekil 1.14 Kadmiyum ağır metalinin kimyasal özellikleri .....	22
Şekil 1.15 Reaktif oksijen türlerinin etkileyebileceği yapılar .....	24
Şekil 1.16 Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu.....	25
Şekil 1.17 Ağır metal bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu .....	26
Şekil 1.18 Hidroksil radikalının oluşumu ve etkileri .....	26
Şekil 1.19 Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyon mekanizması .....	27
Şekil 1.20 Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin moleküler yapıları .....	31
Şekil 1.21 <i>FAD2</i> geninin aspir bitkisinin farklı dokularındaki karşılaştırmalı ifade düzeyleri .....	34
Şekil 3.1 İklimlendirme kabini ve aspir bitki çeşitlerinin yetiştirilmesi .....	51
Şekil 3.2 Aspir fidelerine ağır metal (kadmiyum) uygulaması hazırlık safhası.....	52

Şekil 3.3 24 saat süre ile ağır metal stresine alınan bazı aspir çeşitleri .....	52
Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan <i>FAD2</i> genlerinin aspir bitkisinin farklı dokularındaki karşılaştırmalı ifade düzeyleri .....	58
Şekil 4.1 24 saat ağır metal stresi uygulanmış bazı aspir örnekleri .....	63
Şekil 4.2 İzole edilen RNA'lerden bazılarına ait % 1,2'lik agaroz jel görüntüleri .....	64
Şekil 4.3 Çalışılan bazı örneklerde <i>ACT</i> ve <i>FAD2</i> genlerinin erime eğrisi analizi.....	71
Şekil 4.4 Çalışılan bazı örneklerde <i>ACT</i> ve <i>FAD2</i> genlerinin Real Time PCR pik profilleri.....	72
Şekil 4.5 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	77
Şekil 4.6 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	78
Şekil 4.7 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	79
Şekil 4.8 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	83
Şekil 4.9 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	84
Şekil 4.10 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	85
Şekil 4.11 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	89
Şekil 4.12 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	90
Şekil 4.13 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	91
Şekil 4.14 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	95
Şekil 4.15 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	96
Şekil 4.16 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	97

Şekil 4.17 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	101
Şekil 4.18 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	102
Şekil 4.19 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	103
Şekil 4.20 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	107
Şekil 4.21 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	108
Şekil 4.22 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	109
Şekil 4.23 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	113
Şekil 4.24 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	114
Şekil 4.25 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	115
Şekil 4.26 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	119
Şekil 4.27 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri .....	120
Şekil 4.28 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	121
Şekil 4.29 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	125
Şekil 4.30 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	126
Şekil 4.31 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	127
Şekil 4.32 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	131
Şekil 4.33 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	132

Şekil 4.34 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	133
Şekil 4.35 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	137
Şekil 4.36 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	138
Şekil 4.37 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	139
Şekil 4.38 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	143
Şekil 4.39 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	144
Şekil 4.40 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı <i>FAD2</i> genlerinin ifade düzeyleri.....	145

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Dünyada aspir üretimi yapan ülkelerin, 6 farklı zaman dilimindeki üretim (ton) miktarları .....	8
Çizelge 1.2 Türkiye’de 2000 yılı ve sonrasında yıllara göre aspir üretimi .....	10
Çizelge 1.3 Ağır metallerin çevreye yayınımda en etkin olan endüstriyel faaliyetler.....	17
Çizelge 1.4 Bazı önemli ağır metallerin ekolojik sınıflandırması.....	18
Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan aspir bitkisinin çeşitleri ve özellikleri .....	48
Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamında bulunan makro ve mikro besin çözeltileri ve içerikleri .....	49
Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamı içerisindeki bileşenlerin son konsantrasyonları .....	49
Çizelge 3.4 Bakır ağır metaline maruz kalan BALCI aspir çeşidinin kodlaması .....	53
Çizelge 3.5 Kadmiyum ağır metaline maruz kalan LiNAS aspir çeşidinin kodlaması .....	53
Çizelge 3.6 Kurşun ağır metaline maruz kalan BDYAS-4 aspir çeşidinin kodlaması .....	54
Çizelge 3.7 Total RNA ve primer karışımının bileşenleri ve son konsantrasyonları .....	56
Çizelge 3.8 Ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	57
Çizelge 3.9 Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program .....	57
Çizelge 3.10 <i>FAD2</i> gen ailesine ait çalışmada kullanılan genlerin bilgileri .....	58
Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan genler için tasarlanan Real-Time PCR primer dizileri .....	58
Çizelge 3.12 Optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR bileşenleri ve bunların konsantrasyonları .....	59
Çizelge 3.13 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program.....	60
Çizelge 4.1 Bakır (Cu) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Balcı (2), BDYAS-4 (3)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA’lardan sentezlenmiş cDNA’ların saflık ve miktar tayinleri .....	65



Çizelge 4.2 Bakır (Cu) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Linas (5), ASOL (7)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri .....	66
Çizelge 4.3 Kadmiyum (Cd) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Balcı (2), BDYAS4 (3)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri .....	67
Çizelge 4.4 Kadmiyum (Cd) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Linas (5), ASOL (7)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri .....	68
Çizelge 4.5 Kurşun (Pb) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerinden [Balcı (2), BDYAS-4 (3)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri .....	69
Çizelge 4.6 Kurşun (Pb) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerinden [Linas (5), ASOL (7)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri .....	70
Çizelge 4.7 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	74
Çizelge 4.8 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	75
Çizelge 4.9 Bakır stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	76
Çizelge 4.10 Bakır stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	78
Çizelge 4.11 Bakır stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	79
Çizelge 4.12 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	80
Çizelge 4.13 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	81
Çizelge 4.14 Bakır stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	82
Çizelge 4.15 Bakır stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	83

Çizelge 4.16 Bakır stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	84
Çizelge 4.17 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	86
Çizelge 4.18 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	87
Çizelge 4.19 Bakır stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	88
Çizelge 4.20 Bakır stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	89
Çizelge 4.21 Bakır stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	90
Çizelge 4.22 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	92
Çizelge 4.23 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	93
Çizelge 4.24 Bakır stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	94
Çizelge 4.25 Bakır stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	95
Çizelge 4.26 Bakır stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	96
Çizelge 4.27 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	98
Çizelge 4.28 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	99
Çizelge 4.29 Kurşun stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	100
Çizelge 4.30 Kurşun stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	101
Çizelge 4.31 Kurşun stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	102

Çizelge 4.32 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	104
Çizelge 4.33 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	105
Çizelge 4.34 Kurşun stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	106
Çizelge 4.35 Kurşun stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	107
Çizelge 4.36 Kurşun stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	108
Çizelge 4.37 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	110
Çizelge 4.38 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	111
Çizelge 4.39 Kurşun stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	112
Çizelge 4.40 Kurşun stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	113
Çizelge 4.41 Kurşun stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	114
Çizelge 4.42 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	116
Çizelge 4.43 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	117
Çizelge 4.44 Kurşun stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	118
Çizelge 4.45 Kurşun stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi.....	119
Çizelge 4.46 Kurşun stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	120
Çizelge 4.47 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	122

Çizelge 4.48 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	123
Çizelge 4.49 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	124
Çizelge 4.50 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	125
Çizelge 4.51 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	126
Çizelge 4.52 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .	128
Çizelge 4.53 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	129
Çizelge 4.54 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	130
Çizelge 4.55 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	131
Çizelge 4.56 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	132
Çizelge 4.57 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	134
Çizelge 4.58 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	135
Çizelge 4.59 Kadmiyum stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	136
Çizelge 4.60 Kadmiyum stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	137
Çizelge 4.61 Kadmiyum stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	138
Çizelge 4.62 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verileri .....	140

Çizelge 4.63 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş <i>FAD2</i> genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri .....	141
Çizelge 4.64 Kadmiyum stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	142
Çizelge 4.65 Kadmiyum stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	143
Çizelge 4.66 Kadmiyum stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi .....	144



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Aspir Bitkisinin Sistematik Yeri

**Sınıf** : Magnoliopsida (İki çenekliler)

**Takım** : Asterales

**Familya** : Asteraceae (Papatyagiller)

**Cins** : *Carthamus*

**Tür** : *Carthamus tinctorius* (Aspir)

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisi papatyagiller (Asteraceae) familyasına ait bir türdür. Aspir bitkisinin dünya geneline dağılmış yaklaşık 25 yabancı türü vardır ve bu yabancı türlerden bazıları (*Carthamus lanatus* L., *Carthamus dentatus* Vahl., *Carthamus persicus* Willd, *Carthamus glaucus* Bieb, *Carthamus tenuis* Bois ve Balansa) ülkemizde de doğal ortamlarda yayılış göstermektedir (Davis 1975, Singh ve Nimbkar 2006).

## 1.2 Aspir Bitkisinin Botanik Özellikleri

- **Kök:** 1-3 metreye kadar uzayabilen kazık kök sistemine sahiptir. Kazık kökün etrafında çok sayıda ikincil (yan) kökler oluşmaktadır. Bu yan kökler 60-90 cm kadar uzayabilmektedir.
- **Sap (Gövde kısmı):** Gövde kısmı oldukça kuvvetlidir. Gövde yapısı silindirik yapıda olup, gövdenin dip kısımları oldukça kalınlaşmıştır. Gövde kısmı uzadıkça incelerek, tüysüz, daha düz ve açık gri veya yeşilimsi beyaz renk alır. Ana gövde 15-20 cm uzunluğunda yan dallara ayrılır.
- **Yaprak:** Yaprak yapısı çeşitler arasında oldukça farklılık göstermektedir. Yaprak genişliği oldukça fazla olup 2,5-5 cm, yaprak uzunluğu ise 10-15 cm arasında değişmektedir. Çiçeklerin etrafını saran brakteler yumurta şeklinde ve sert yapıdadır. Bazı çeşitlerinde yapraklar dikenlidir.

- **Çiçek:** Aspir bitkisinin çiçekleri sarı, kırmızı, turuncu, beyaz ve krem renklerde olabilmektedir. Bitkideki çiçek tabla sayısı 5-50 arasında değişmekte ve her çiçek tablasında yaklaşık 100 çiçek bulunmaktadır.
- **Tohum:** Aspir tohumları kalın, sert ve lifli yapıya sahiptir. Genel olarak bakıldığında bir tohum tanesindeki kabuk oranı % 50 civarındadır. Tohum kabuğu genel olarak beyaz, krem rengindedir. Bazı tohumlarda koyu renkte çizgiler mevcuttur (Singh ve Nimbkar 2006, Yaydı 2010, Kayaçetin vd. 2012) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Aspir bitkisinin genel görünüşü, çiçeği, tarlası ve tohumu  
([www.uni-marburg.de](http://www.uni-marburg.de) 2007, [www.pref.saitama.lg.jp](http://www.pref.saitama.lg.jp) 2011,  
[www.agroscope.admin.ch](http://www.agroscope.admin.ch) 2013, [www.indiamart.com](http://www.indiamart.com) 2015)

### 1.3 Aspir Bitkisi, Tarihi ve Genel Özellikleri

Önemli bir yağ bitkisi olan Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) papatyagiller (Asteraceae) familyasının ticari öneme sahip önemli üyelerinden biridir. Amerikan safranı, boyacı safran, kır safranı, boyacı aspiri ve zaferan olarak adlandırılmaktadır. Ticari kullanımda safran bitkisiyle sık sık karıştırıldığından “yalancı safran” da denilmektedir. Aspir bitkisi geniş yapraklara sahip sarı, kırmızı, turuncu, beyaz ve krem renklerinde çiçekleri olan tek yıllık bir bitkidir. Dikenli ve dikensiz formları bulunan aspir bitkisi yaklaşık 50-100 cm arasında boylanabilmektedir. Kurak iklime dayanaklı bir bitkidir. Ortalama yağ oranı % 30-50 arasında değişkenlik göstermektedir (Babaoğlu 2005).

Aspir bitkisinin kullanımının milattan önceye dayandığı ve yaklaşık 3500 yıllık bir geçmişe sahip olduğu kayıtlardan anlaşılmaktadır (Weiss 1971, Johnson vd. 2001). Güney Asya'dan orijin aldığı daha sonra Ortadoğu bölgesinde ve Akdeniz kıyılarına doğru yayıldığı bilinmektedir (Ashri 1973, Yenice ve Bayraktar 1996). Bu tarihlerden beri Mısır, Çin, Hindistan ve Japonya'da ekimi yapılmaktadır. İlk kullanım amacı tıbbi içerikli olup sonraları çiçekleri kullanılarak gıda ve kumaş boyası olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda ise tohumundaki yağ içeriğinin yüksek olması sebebiyle önemli bir yağ bitkisi olarak kullanılmaya başlanmış ve pek çok çeşidi kültüre alınmıştır (Dajue ve Mündel 1996, Babaoğlu 2007, Ahwalat 2008, Anonim 2010a, Anonim 2010c, Anonim 2011a, Er vd. 2011).

Önemli bir yağ bitkisi olan aspirin tohumları yaklaşık % 30-50 oranında kaliteli yağ içermektedir. Aspir yağının soya, ayçiçeği ve mısır gibi farklı yağ bitkilerinden elde edilen yağlardan çok daha kaliteli olduğu ifade edilmektedir (Bayrak 1997). Linoleik (omega-6) ve oleik (omega-9, zeytinyağ kalitesine sahip) yağ içeriği bakımından zengin olan aspir son zamanlarda yemeklik yağ olarak kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 1.2). Aspir bitkisinden elde edilen yağ içeriğinde özellikle insan sağlığı açısından önemi büyük olan toplam doymamış yağ asitleri oranı oldukça yüksektir. Bu oran ayçiçeği bitkisinde yaklaşık olarak % 80-85 civarındayken aspirde bu oran % 90-93 civarındadır. Beslenme açısından düşünüldüğünde oleik asidin (omega-9) önemi aşıkardır. Günümüzde en kaliteli yağ olarak kabul gören zeytinyağında oleik yağ asidi oranı %



55-85 civarındayken aspirdeki oleik yağ asidi oranının % 90'larda olması aspir bitkisinin ve elde edilen yağın ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu da aspir yağının en az zeytinyağı kadar kaliteli ve değerli olduğunun ispatıdır (Öztürk vd. 2007).



Şekil 1.2 Aspir bitkisinin olgun çiçeği ve aspir yağı (www.underthesunseeds.com 2003, www.naturesgardencandles.com 2018)

### 1.3.1 Dünya genelinde aspir bitkisinin tarihi, üretimi, kullanım alanları ve önemi

Aspir bitkisinin dünya geneline dağılmış yaklaşık 25 yabancı türü vardır ve bu yabancı türlerden bazıları kültüre alınarak pek çok amaca yönelik kullanılmaktadır (Davis 1975, Singh ve Nimbkar 2006).

Aspir tarımı çok uzun zamanlardan beri Çin, Japonya, Hindistan, Mısır ve İran gibi ülkelerde yapılmaktadır. Ortaçağ döneminde ise Avrupa'ya yayılmış; İtalya, Fransa ve İspanya gibi ülkelerde tarımına başlanmıştır (Dajue ve Mündel 1996). Amerika kıtasının keşfinden sonra da aspir tarımı oraya taşınmıştır. Özellikle Çin'de yoğun olarak tarımı yapılan aspir bitkisi pek çok amaçla kullanılmıştır (Weiss 1971).

Aspirin çiçekleri pek çok hastalığın tedavisinde tıbbi amaçla kullanılırken, çay olarak da tüketilmiştir. Aspirin çiçeğinde yoğun olarak bulunan bazı aminoasitler, mineraller ve özellikle B1, B2, B12, C ve E vitaminleri çay olarak tüketilmesinin önemli sebeplerindendir. Aspir bitkisi kadınlarda regl dönemlerinin düzenli ve ağrısız geçmesinde, kalp-damar hastalıklarının tedavisinde ve pek çok ağrı ve şişliklerin

giderilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Son zamanlarda yapılan klinik araştırmalarda bu etkilerinin doğruluğunu destekler niteliktedir. Yüksek tansiyona karşı da etkili olduğu klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca aspir çiçeklerinde (yoğun olarak sarı renktekilerde) antioksidanların varlığı da yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Singh ve Nimbkar 2006, Babaoğlu 2007, Delshad vd. 2018) (şekil 1.3).

## Aspir ekstraktı



şekil 1.3 Aspir bitkisinden elde edilen ekstrakt ve ticari tablet hali (www.imaherb.com 2017)

Tıbbi amaçla kullanımından başka yine Ortadoğu ve Asya lkelerinde aspir bitkisinin farklı kısımları gıda maddesi olarak kullanılmaktadır. Çiçekleri yemeklere, mezelere, çorba ve diğer gıdalara renk vermesi (sarı-parlak renk) amaçıyla tercih edilmiş ve edilmektedir. Peynir yapımında peynirin mayalanması ve hoş bir koku kazanmasından, tohumlarının çerez olarak tüketilmesine, yeşil yaprak ve genç fidelerinin salata yapımında kullanımına kadar pek çok farklı şekilde gıda maddesi olarak tüketilmiş ve tüketilmektedir. Etiyopya’da ise çok çok ince olacak şekilde öğütülmüş aspir tohumları su ile karıştırılarak belli bir süre sonra yöresel olarak ‘Fitfit’ adı verilen iki eldesinde kullanılmaktadır (Babaoğlu 2007).

Bilindiği üzere aspir bitkisinin dikenli ve dikensiz olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. Dikensiz eşitleri Japonya, Çin, İspanya, İtalya ve Amerika’da iekilikte, park ve bahçelerin düzenlenmesinde ss bitkisi olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu 2007).

Yeşil, taze haldeyken de hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra yağı işlendikten sonra kalan posası yüksek oranda protein içermesinden dolayı küspe olarak hayvancılıkta kullanılmaktadır (Babaoğlu 2005).

Aspir bitkisi sanayinin de gözdesi olan bir bitkidir. Boya, vernik, yem, ilaç, kozmetik ve margarin gibi pek çok sektörde kullanılmaktadır. Kâğıt sanayisinde özellikle ambalaj yapımında, tuğla ve seramik üretiminde aspir tohumlarının kabukları tercih edilmektedir. Boya sanayisinde boyar madde olarak kullanılan aspiden iki farklı madde elde edilmektedir. Bunlar boya üretiminde kırmızı rengi sağlayan Carthamin ve sarı rengi veren Carthamidin maddeleridir. Bu maddeler tekstil sanayisinde, boya ve gıda sanayisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca aspiden yüksek oranda elde edilen linoleik asit (omega-6) kolayca kuruyabilen yağlardan olduğundan boya sanayisinde tercih edilmektedir (Babaoğlu 2007, Şahin ve Taşlıgil 2016) (Şekil 1.4).



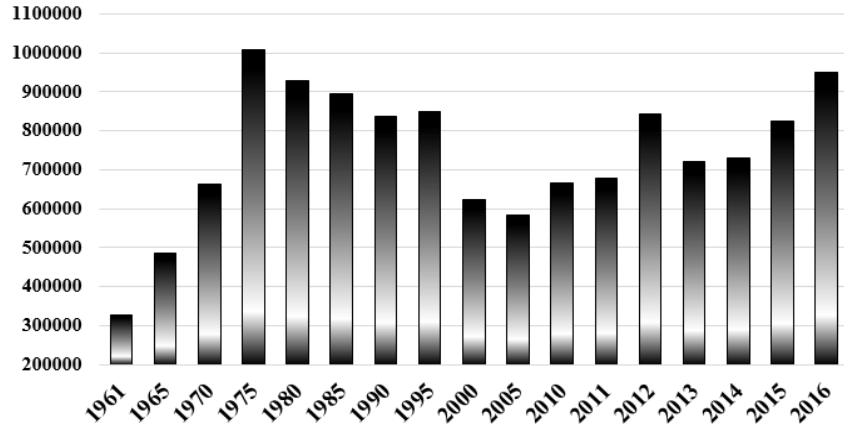
Şekil 1.4 Aspiden elde edilen boyayla ipliklerin boyanması (www.imaherb.com 2017, Şahin ve Taşlıgil 2016'dan değiştirilerek alınmıştır)

Gelişen teknolojiyle beraber gündeme gelen diğer bir konu ise biyodizel üretimidir. Biyodizel; bitkisel, hayvansal ve çeşitli organik atık yağlardan elde edilebilen petrol

kullanımına alternatif geleceğin yakıtı konumundadır (Karabaş 2013). Fosil kaynaklı petrol, doğalgaz ve kömür gibi yakıtların zamanla tükeneceği göz önünde bulundurulduğunda bu tip yakıtların önemi giderek artmaktadır. Bitkiler açısından düşünüldüğünde biyodizel üretiminin temel ham maddesi de yağlı tohumlara sahip bitkilerdir. Biyodizel yapımında kullanılan yaklaşık 50'ye yakın bitki türü bulunmaktadır. Bunların başında şeker kamışı, soya, sorgum, konola ve mısır gibi bitkiler gelmektedir. Yapılan pek çok çalışmada aspirin biyodizel üretiminde değerlendirilecek önemli potansiyele sahip olduğu anlaşılmıştır. Son yıllarda üretilen aspir tohumlarının kullanımı bu yönde gerçekleşmiştir (Anonim 2011b, Tortopoğlu 2011, Şahin ve Taşlıgil 2016).

Ayrıca biyodizel üretiminin yanında yağlı tohumlardan elde edilen diğer bir ham madde ise gliserindir. Biyodizelin yan ürünü olarak elde edilmektedir. Elde edilen bu gliserin pek çok petro-kimya ürünlerinin yerine ham madde olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde kalp stentlerinin yapımında petro-kimya ürünlerinin yerine gliserin kullanılmaktadır (Berk ve Yaşar 2008).

Bütün bu özelliklerinden dolayı günümüzde aspirin bitkisinin önemi anlaşılmış ve giderek artan alanlarda üretimi/tarımı yapılmaya başlanmıştır. Dünya geneli aspirin üretimine bakıldığında 1961 yılında yaklaşık 326 bin tonluk üretim yapılırken, bu sayı 1975 yılına kadar sürekli artış göstermiştir. 1979 yılında yaklaşık 1,2 milyon tonluk üretimle zirve yapmıştır. 2000'li yıllara kadar aspirin üretimi yıllara göre artan ve azalan sayılarda gerçekleşmiştir. 2005 yılında yaklaşık 582 bin ton civarında üretim yapılmıştır. Son 10-15 yıl içerisinde yapılan pek çok araştırma sonucunda aspirin değeri ve önemi anlaşılmış ve bu da üretimin artmasına sebep olmuştur. 2010 yılı itibariyle 660 bin ton üretim yapılırken, 2014 yılı 730 bin ton, 2015 yılı 825 bin ton, 2016 yılı itibariyle yaklaşık 950 bin ton olarak aspirin üretimi gerçekleşmiştir (Anonymous 2016) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Seçilmiş yıllara göre dünya geneli aspirin üretim miktarı (ton) (Anonymous 2016)

Dünya genelinde aspirin üretimi yapılan bazı ülkelerin belirlenmiş 6 farklı zaman dilimindeki üretim miktarları çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1 Dünyada aspirin üretimi yapan ülkelerin, 6 farklı zaman dilimindeki üretim (ton) miktarları (Anonymous 2016)

Ülke/Yıl	1975	1990	2000	2014	2015	2016
Kazakistan	-	-	25340	135430	148839	168000
Meksika	532297	159384	96438	144412	126395	122000
Hindistan	211900	486500	260400	113000	90000	53000
ABD	180000	120000	128160	94640	97180	100000
Rusya	-	-	1770	81747	153710	287000
Arjantin	3330	15870	30800	3090	28600	52000
Türkiye	1350	124	18	62000	70000	58000
Çin	-	-	39000	32261	32428	33000
Özbekistan	-	-	1100	21397	28880	30000
Tanzanya	-	-	6238	13502	14394	15000
Kırgızistan	-	-	10880	10634	13608	11000
Etiyopya	25000	36473	6466	6325	7420	8000
Avustralya	18163	10477	9000	3175	2685	2500
Kanada	-	561	6700	-	-	-
Tacikistan	-	-	68	2550	1301	2000
Diğer	34533	7984	2360	5304	9162	7016
<b>TOPLAM</b>	<b>1006573</b>	<b>837373</b>	<b>624738</b>	<b>729467</b>	<b>824602</b>	<b>948516</b>

Kıtalararası üretime bakıldığında ise 2016 yılı değerlerine göre Asya kıtasındaki üretim 360 bin ton ile ilk sırada yer almaktadır. Asya kıtasına sırasıyla Avrupa (290 bin ton) ve

Amerika (273 bin ton) takip etmektedir. Afrika kıtasındaki üretimi (22,5 bin ton) ise çok sınırlı olup son sırada yer almaktadır (Anonymous 2016).



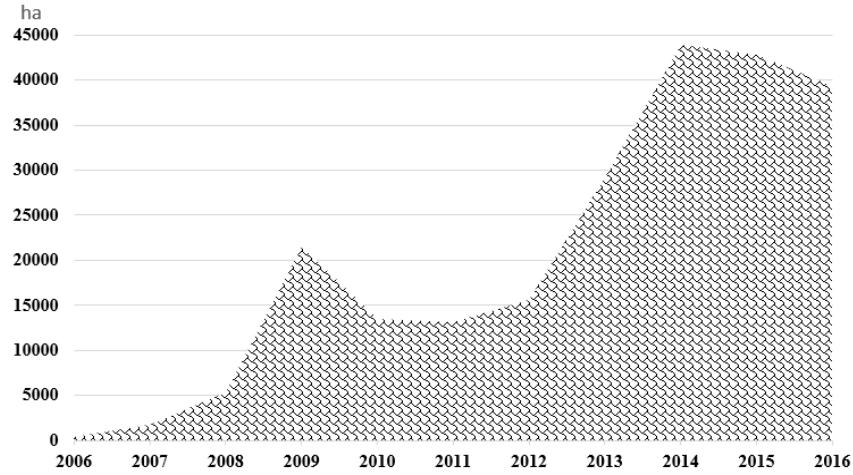
Şekil 1.6 2016 yılı verilerine göre dünya aspirin üretiminin kıtalara göre dağılımı (Anonymous 2016)

### 1.3.2 Türkiye’de aspirin bitkisinin tarihi, üretimi, kullanım alanları ve önemi

Aspirin bitkisinin ülkemize ilk gelişi Orta Asya’dan göç eden Türkler sayesinde olmuştur. (Koç 2001, Berber 2007). 1940-50’li yıllarda balkanlardan gelen göçmenler sayesinde ülkemize getirilen aspirin tarımı yapılmaya başlanmıştır. İlk ıslah çalışmaları 1930’lu yıllarda Eskişehir’de başlamıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en iyi performansı gösteren aspirin çeşidi “Yenice-1813” ismiyle çiftçilere dağıtılarak tarımı teşvik edilmiştir (Dinçer 1964, Günel 2001, Berber, 2007).

1960’lı yıllarda artan nüfusa bağlı olarak yağ ihtiyacını karşılayabilmek için Tarım Bakanlığı tarafından çalışmalar yeniden başlatılmıştır. 2004 yılından sonra yapılan çalışmalar sonucunda aspirin sadece yemeklik yağ olarak kullanımından başka biyodizel olarak da kullanımı söz konusu olmuştur. Aspirin üretimi yapılan şehir sayısı 2006 yılında 8 iken, 2007 yılında 19’a, 2008’de 28 şehre, 2009 yılında ise 35’e çıkmıştır. 2016 yılı itibariyle bu sayı 40’a ulaşmıştır (Anonymous 2016, Anonim 2017a). Aspirin üretiminin yapıldığı tarım arazilerindeki artış şekil 1.7’de verilmiştir.





Şekil 1.7 2006 yılından itibaren Türkiye aspir ekim alanındaki değişim (Anonymous 2016)

1960'lı yılların başından itibaren üretimi az da olsa yapılmaya başlanan aspir, 1965 yılında 900 ton, 1980 yılında 535 ton, 1990 yılında 125 ton ve 2000 yılında 18 ton olarak gerçekleşmiştir. Fakat 2005 yılından sonra önem ve değerinin giderek anlaşılmasıyla birlikte ilk olarak 2006 yılında aspir üretimi devlet teşviki kapsamına alınarak çiftçiye farklı kalemlerde destekler verilmiş, bu da üretime artış olarak yansımıştır. 2010 yılında 26 bin ton olan aspir üretimi, 2014 yılında 62 bin ton, 2015 yılında 70 bin tona ulaşmıştır. 2016 yılı üretim miktarı ise 58 bin tondur (Anonymous 2016) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Türkiye'de 2000 yılı ve sonrasında yıllara göre aspir üretimi (Anonymous 2016)

Yıl	Üretim (Ton)	Yıl	Üretim (Ton)
2000	18	2009	20076
2001	25	2010	26000
2002	25	2011	18228
2003	170	2012	19500
2004	150	2013	45000
2005	215	2014	62000
2006	395	2015	70000
2007	2280	2016	58000
2008	7068		

Ülkemiz ve insanımız için yağ denildiğinde ilk akla gelen zeytinyağı ve ayçiçeği yağı olduğundan aspir yağı çok az yemeklik yağ olarak kabul görmüştür. Yemeklik yağ olarak da kullanımı yöresel ya da bölgesel olarak sınırlı kalmıştır. Hâlbuki ülkemizde yıllık yağ tüketimi 1,4-1,6 milyon ton arasındayken üretim sadece 750 bin ton civarındadır (2014 yılı için). Bu da göstermektedir ki Türkiye yağ açısından neredeyse yarı yarıya dışa bağımlı bir ülke konumundadır. Aspir yağının bu açığı kapatabilme potansiyeli çok yüksekken hala önemi ve değeri ülkemiz ve insanımız açısından anlaşılmalı durumda değildir (Anonim 2017b).

Aspir ülkemizde özellikle Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde baharat olarak kullanılmaktadır. Bu bölgelerde “Haspir” olarak adlandırılan aspir çiçekleri bazı yemeklerde renk ve aroma vermesi için kullanılmaktadır (Şahin ve Taşlıgil 2016) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 Baharat olarak satılan kurutulmuş aspir çiçekleri (Gaziantep) (Şahin ve Taşlıgil 2016)

Son yıllarda aspir tarımı devlet desteği kapsamına alınmıştır. Devlet ve devlet destekli kuruluşlar tarafından yapılan ıslah çalışmaları sonucunda pek çok aspir çeşidinin tarımı teşvik edilmiştir. 2013 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Enerji Bakanlığı arasında yapılan protokolle, çiftçiye ürettiği aspiri alma güvencesi verilmiştir. Ayrıca aspirin biyodizel yapımında kullanılmasıyla ilgili olarak ülkemizde gerekli yasal



düzenlemeler de son zamanlarda yapılmıştır. Bu yasal düzenlemede yer alan maddelere göre akaryakıt olarak kullanılacak motorin çeşitlerinde yerli tarım ürünlerinde üretilmiş yağ asidi metil esteri (YAME) kullanımı zorunlu hale getirilmiştir. Üretimde kullanılacak olan yağ asidi metil esteri oranının 2014 yılı itibariyle en az % 1, 2015 yılı itibariyle en az % 2, 2016 yılı itibariyle de en az % 3 olması zorunluluğu getirilmiştir. Bu durum hali hazırda yemeklik yağ olarak yetmeyen yağ üretimi konusunda alternatif kaynaklara yönelmeyi zorunlu kılmıştır. Böylelikle aspir bitkisinin önemi ve değeri anlaşılmaya başlanmıştır (Anonim 2011b, Tortopoğlu 2011) (Şekil 1.9, 1.10).



Şekil 1.9 Aspir ekimi yapılan farklı şehirlerdeki ekim alanları  
(www.altinekindernegi.org 2012, www.gapgundemi.com 2016)



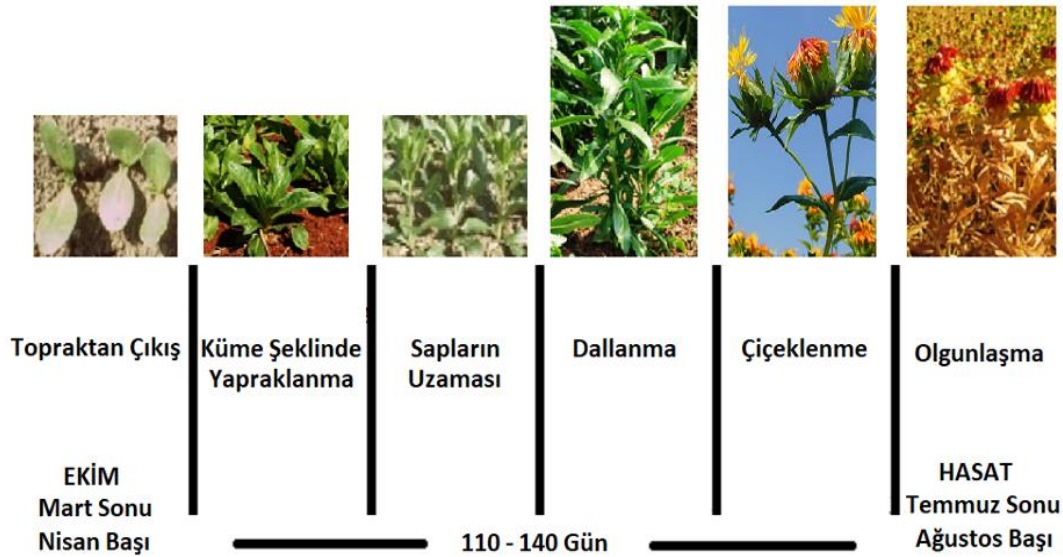
Şekil 1.10 Hasat zamanı gelmiş aspir örnekleri (www.eziraatci.com 2010a)

#### 1.4 Aspir Bitkisinin Tarımı

Aspir bitkisi; diğer yağ bitkileri olan soya, kolza, kanola, ayçiçeği ve yerbıstığı gibi çok fazla suya ihtiyaç duymadığı için ülkemizde pek çok alanda tarıma elverişli bir bitkidir.

(Gilbert 2008). Özellikle ülkemizde yer alan kurak bölgelerde ekimi çok rahat yapılabilmektedir. Düzenli sulama sonucunda da önemli derecede verim artışı olmaktadır. Aspir bitkisinin en verimli ekim dönemi mart sonu nisan başı gibidir. Yaklaşık olarak 110-140 gün içerisinde olgunlaşmakta ve temmuz sonu ağustos başı gibi hasadı yapılmaktadır. Aspir bitkisi için en uygun iklim aralığı bu tarihlerdir (Babaoğlu 2007) (Şekil 1.11).

Toprak yapısı bakımından özel gereksinimlere ihtiyaç duymamaktadır. Su tutma kapasitesi yüksek, pH'sı 5-7 ya da nötr olan topraklarda aspir tarımı/üretimi kolaylıkla yapılabilmektedir. Kıraç topraklarda da çok kolay şekilde gelişebilmekte ancak bu durum verimi etkilemektedir. Aspir bitkisinin tarımı için ideal nem aralığı ise % 60 civarındadır. Diğer yağlı tohumları olan bitkiler gibi yüksek oranlardaki nem, gelişimini ve verimi olumsuz yönde etkilemektedir (Dajue ve Mündel 2006, Babaoğlu 2007, Anonim 2010b).



Şekil 1.11 Aspir bitkisinin olgunlaşma safhaları (Dajue ve Mündel 2006'dan değiştirilerek alınmıştır)

Aspir tarımındaki en önemli avantaj diğer yağlı tohumların işlenmesinde kullanılan makinelerin herhangi bir değişime ihtiyaç duymadan aspir tohumlarının işlenmesinde de kullanılabilir olmasıdır. Toprağın ekim için hazırlanmasından hasat edilmesine, hasat

edilen ürünün depolanmasına kadar olan evrelerde kullanılan bütün alet, ekipman ve makineler kolaylıkla aspir içinde kullanılabilir (Köse 2014).

#### **1.4.1 Aspir tarımında yabancı ot kontrolü**

Aspir tarımında en önemli unsurlardan biri ekimi yapılacak arazideki yabancı ot kontrolüdür. Aspir bitkisi gelişiminin ilk evresi olan 3-4 haftalık dönem içerisinde arazide var olan yabancı otlara karşı oldukça hassastır. Yabancı otlarla rekabeti oldukça düşüktür. Bu durumdan dolayı aspir ekimi yapılmadan önce araziye herbisit (ot ilacı) uygulaması önerilmektedir. Uygulama hem toprak yüzeyine yapılabilirken hem de toprağa karıştırma şeklinde de olabilmektedir. Aspir bitkisinin toprak yüzeyine çıkmasını takiben bu ilacın tekrar toprak yüzeyine uygulanması gerekmektedir (Babaoğlu 2007, Anonim 2010b, 2010c). Bu zirai ilaçların başında ise; Trifluralin, Metolachlor, EPTC, Barban, Profluralin ve Paraquat gibi herbisitler gelmektedir. Bunlar oldukça etkili kimyasal formüllere sahip herbisitlerdir. Bu herbisitlerin bazal yapısında bulunan kimyasal maddeler ise (bakır etilendiamin sülfat tuzları, bakır trietanolamin kompleksi, bakır hidrazinium sülfat, bakır sülfat, kurşunarsenit, bakır arsenit vb.) canlıları olumsuz yönde etkilemektedir (Anonymous 2006, Mastin ve Rodgers 2014).

### **1.5 Çevre Kirliliği ve Etkileri**

#### **1.5.1 Çevre kirliliği**

Çevre; dünya üzerinde yaşamını sürdürmekte olan tüm canlılarının hayatları boyunca birbirleriyle ilişkilerini sürdürdüğü dış ortamdır. Çevre kirliliği ise, çevrenin doğal yapısına uygun olmayan şekilde insan eliyle bozulmasıdır. Bu doğal olmayan bozulmalar ekosistemin yani çevrenin kirlenmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Çevre kirliliği ilk olarak kentsel yaşam için alanlar oluşturma mecburiyeti sonucunda yaşam alanları oluşturma amacıyla ortaya çıkmıştır. Gelişen teknolojiyle birlikte ilerleyen sanayi ve endüstriyel atılımlar çevre kirliliğinin giderek artmasına ve daha hızlı kirlenmesine neden olmuştur. Özellikle 1950'li yıllardan sonra nüfusun hızla artması ve buna paralel gelişen ihtiyaçlara cevap verebilmek için geliştirilen teknolojiler yaşam

için gerekli tüm doğal kaynaklarımızın daha fazla kirlenmesine neden olmuştur. Günümüz dünyasında ise ekosistemin kirlenmesi/bozulması çok daha ciddi bir hal almıştır (Şanlı 1984, Yarsan vd. 2000).

İnsan, hayvan, bitki ve diğer mikroorganizmalar ekosistemin biyolojik unsurlarını oluştururken toprak, su ve hava ekosistemi oluşturan fiziksel unsurlardır. Ekosistemin en önemli fiziksel unsurunu oluşturan su ortamı, atık-kirli sular ve diğer atıkların yaşam alanlarından temizlenmesi için kullanıldığından ekosistemin diğer fiziksel unsurları olan hava ve toprak ekosisteminden çok daha fazla kirlenmeye maruz kalmaktadır. Ekosistemdeki doğal dengeyi bozan ve çevre kirliliğine neden olan kirleticiler şu şekilde gruplandırılabilir (Hammand ve Beliles 1980, Detlefsen 1988, Hapke 1991).

- ✓ Yapay organik atıklar,
- ✓ Endüstriyel ve sanayii atıkları,
- ✓ Petro-Kimya ürünleri/türevleri ve atıkları,
- ✓ Tarımsal (Yapay-Kimyasal bazlı) gübreler,
- ✓ Tarımsal ilaçlar,
- ✓ Deterjanlar, temizlik maddeleri,
- ✓ Radyoaktivite ve atıkları,
- ✓ Pestisitler, herbisitler, fungusitler vb.,
- ✓ İnorganik tuzlar,
- ✓ Kimyasal çeşitli maddeler,
- ✓ Atık ısı.

### **1.5.2 Çevre kirliliğinin canlılar üzerine etkileri**

Canlılar hayatlarını devam ettirebilmek için ekosistemin fiziksel unsurlarıyla sürekli olarak ilişki halindedir. Canlılar yaşadıkları çevrelerinde oluşabilecek herhangi bir değişime karşı olumsuz durumlarla karşılaşabilirler. İnsanlar ve hayvanlar oluşan olumsuzluğa karşı daha hızlı tepki verebilirken ya da ortamdaki uzaklaşması daha kolayken bitkilerde bu durum tam tersidir. Bitkiler çevresinde oluşabilecek olumsuzluklara karşı tamamen açık durumdadır. Oluşan olumsuzluklara direkt olarak maruz kalırlar. Besin zinciri içerisinde insanların en önemli doğal besin kaynakları

bitkiler olduğundan bu olumsuzluklardan dolayı olarak insanlar da zarar görebilmektedir (Lichtenhaler 1996).

Bitkilerin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyen çevre şartlarında meydana gelen farklılıklar, bitkilerde bir takım değişimlere neden olur. Bitkilerde meydana gelen bu değişimler sonucunda çevreye karşı verdiği cevaba genel anlamda stres denir. Bu olay sadece bitkilerde meydana gelen bir durum değildir. Ekosistemde yer alan tüm canlılarda olumsuz etkilere sebep olan dış kaynaklı faktörlerin tamamı stres olarak tanımlanabilir. Doğaları ve sesil yaşamları gereği bu durumdan en çok etkilenen ekosistemin canlı unsuru bitkilerdir (Büyük vd. 2012).

Bitkiler sahip oldukları özellikler ve geliştirdikleri bir takım mekanizmalar sayesinde pek çok stres faktörüne karşı farklı yeteneklere/toleranslara sahiptir. Stres faktörüne karşı oluşturulan cevap bitkinin türüne, karşılaştığı stres faktörüne, stresin süresine ve strese karşı koymaya çalışan organının sahip olduğu özelliklerle ilgilidir (Koç vd. 2012). Bitkiler doğal yapısı gereği yaşamları boyunca pek çok farklı stres faktörüyle karşılaşmakta ve stres koşullarında yaşamak zorunda kalmaktadır. Yapılan pek çok sınıflandırmaya göre stres faktörleri abiyotik ve biyotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Levitt 1972).

Abiyotik faktörler ekosistemin fiziksel unsurlarını oluşturan su kirliliği, hava kirliliği, toprak kirliliği ve bunlara neden olan faktörler arasında yer alan organik ya da sentetik kimyasallar, çeşitli atıklar, zirai ilaçlar, deterjanlar vb. gibi unsurlardır. Biyotik faktörler ise mantar, bakteri, virüs gibi canlılardan kaynaklı hastalıklar ve buna bağlı oluşan enfeksiyonlardır. Ayrıca hayvanlar ve insanlar da bitkiler için birer biyotik stres faktörüdür (Lichtenhaler 1996).

Çeşitli atıklar, zirai ilaçlar, deterjanlar ve farklı kimyasalların alt basamağında yer alan ağır metaller ekolojik dengeyi en fazla tehdit eden ve olumsuz yönde etkileyen abiyotik faktörlerdir. Ağır metaller sadece bitkiler için değil hayvanlar ve insanlar için de önemli bir stres faktörüdür. Ayrıca ağır metaller insanlar için önemli hastalık etmenidir (Kırbağ ve Munzuroğlu 2006).

## 1.6 Ağır Metaller

Ağır metaller için farklı tanımlamalar mevcuttur. Bu tanımlamalarda bazen yoğunluk bazen de atomik ağırlık söz konusu iken bazı tanımlamalarda kimyasal özellik ve toksisite özelliği kullanılmıştır. Bu anlamda düşünüldüğünde genel kabul gören iki tanım öne çıkmaktadır. Birincisi, fiziksel açıdan yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten büyük olan ve moleküler ağırlıkları 63,5 ve 200,6 g olan metaller olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir tanım ise 'yüksek yoğunluğa sahip olan ve düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etkileri olan metal' olarak tarif edilmektedir (Hapke 1991, Duffus 2002).

Bu tanımları birlikte düşündüğümüzde ağır metallere en başta verebileceğimiz örnekler; kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko gibi metallerdir. Bu örneklerle birlikte varlığı bilinen 60'dan fazla ağır metal bulunmaktadır. Ağır metaller moleküler yapılarından dolayı genellikle sülfür bileşikleri, silikat ve silikatlar içinde bağlı olarak ya da karbonat halinde bulunmaktadırlar (Kahvecioğlu vd. 2007, Okçu vd. 2009).

Ağır metaller Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından yayımlanan ve çevre kirliliğine sebep olan öncelikli ve tedbir alınması gereken kirleticiler içerisinde yer alan en önemli çevre kirleticileridir (Yu 2005). Bazı ağır metallerin çevreye yayılımında en etkin olan endüstriyel alanlar çizelge 1.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.3 Ağır metallerin çevreye yayılımında en etkin olan endüstriyel faaliyetler (Rether 2002)

Endüstri	Cd (Kadmiyum)	Cu (Bakır)	Pb (Kurşun)	Zn (Çinko)	Hg (Cıva)
Kağıt Endüstrisi	—	+	+	+	+
Petrokimya	+	—	+	+	+
Klor-Alkali Üretimi	+	—	+	—	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+
Demir Çelik Sanayi	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+

EPA tarafından yayımlanan liste içerisinde yaklaşık 70 kadar element yer almaktadır. Bu elementler içerisinde önem ve etkileri bakımından yaklaşık 20 element dikkat çekmektedir (Fe, Mn, Zn, Cu, V, Mo, Co, Ni, Cr, Pb, Be, Cd, Tl, Sb, Se, Sn, Ag, As, Hg, Al ). Bu listede yer alan bazı elementler bitkiler ve hayvanlar için hayati önem taşımaktadır ve mikro besin elementi (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni) olarak alınması gerekmektedir. Bu elementlerin bulunduğu ortam ya da canlıdaki birikimi belirli sınırları aşmadığı sürece toksik etki yapmamaktadır (Yıldız 2004, Okçu vd. 2009). Demir, bakır, çinko, mangan gibi ağır metaller grubuna dahil edilen bu elementler belli seviyelerde bitkiler tarafından alınması gereken esansiyel elementlerdir (Yu 2005, Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4 Bazı önemli ağır metallerin ekolojik sınıflandırması (Yıldız 2001)

Element	Özgül Ağırlık (g/cm <sup>3</sup> )	Bitki ve hayvan İçin Gereklilik Durumu	Çevreyi kirletici olup olmadığı
<b><u>Bakır (Cu)</u></b>	8.9	<b>Gerekli</b>	<b>Kirletici</b>
<b><u>Kurşun (Pb)</u></b>	11.3	---	<b>Kirletici</b>
<b><u>Kadmiyum (Cd)</u></b>	8.5	---	<b>Kirletici</b>
Krom (Cr)	7.2	Gerekli	Kirletici
Kobalt (Co)	8.9	Gerekli	Kirletici
Gümüş (Ag)	10.5	---	Kirletici
Demir (Fe)	7.9	Gerekli	Kirletici
Civa (Hg)	13.6	---	Kirletici
Mangan (Mn)	7.4	Gerekli	---
Molibden (Mo)	10.2	Gerekli	Kirletici
Nikel (Ni)	8.9	Gerekli	Kirletici
Platin (Pt)	21.5	---	---
Talyum (Tl)	11.9	---	Kirletici
Kalay (Sn)	7.3	---	Kirletici
Uranyum (U)	19.1	Gerekli	Kirletici
Vanadyum (V)	6.1	Gerekli	Kirletici
Tungstem (W)	19.3	Gerekli	Kirletici
Çinko (Zn)	7.1	Gerekli	Kirletici

### 1.6.1 Bakır (Cu) ağır metali ve etkileri

Bakır (Cu), atom sayısı 29, atom ağırlığı 63,54, yoğunluğu ise 8.91 g/cm<sup>3</sup> olan bir metaldir. Bakır doğada serbest ya da bileşik durumda bulunan, iletkenliği çok iyi olan ve kolay işlenebilmesi açısından tercih edilen bir metaldir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Bakır ağır metalinin kimyasal özellikleri

Bakır, yüksek bitkilerde normal metabolizmanın sürdürülmesinde önemli bir metal ve mikro besin maddesidir. Bakırın bitkiler açısından önemiyle ilgili yapılan pek çok çalışmada bakırın organik maddelerle ve vitaminlerle bileşik oluşturarak metabolik olaylarda kontrolör olarak görev yaptığı ifade edilmiştir. Özellikle enzim yapısına kofaktör olarak katılmaktadır. Bakır ve çinko gibi ağır metaller bitki büyüme ve gelişimindeki metabolik yollarda yer alan pek çok protein ve enzimlerde kofaktör olarak işlev görmektedir. Bitkiler için hayati önem taşıyan fotosentez, solunum ve hücre çeperi gibi metabolik ve fizyolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Ksilem borularında suyun taşınması bakır ağır metalinin kontrolünde gerçekleşmektedir. Ayrıca DNA ve RNA gibi hücresel kalıtım materyallerinin üretimini yine görev yaptığı enzimler vasıtasıyla kontrol etmektedir. Eksikliğinde ise DNA ve RNA üretimi aksayabildiği gibi aynı zamanda durabilir. Bu da bitki hücre üremesini olumsuz etkiler. Bunlara ek olarak hastalıklara karşı bitkiye direnç kazandıran metabolik olaylarda yine başrolde (Allan 1997, Raven vd. 1999, Okçu vd. 2009).

Bakırın bitkiler için bu derece önemli olmasıyla birlikte eksikliği durumunda yukarıda verilen metabolik olaylarda aksamalar olmaktadır. Aynı şekilde çok çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde yer almasına rağmen fazla Cu birikmesi bu



metabolik olayların işlevinin durmasına neden olmaktadır. Çünkü bakır oldukça toksik bir metaldir. Fazlalığı durumunda bitkilerde pek çok doku hasarlarına neden olur. Köklerde aşırı birikimi sonucunda su ve iyon alışverişini olumsuz etkileyerek köklerde gelişim bozukluğu ve gerilemesi gibi olaylara sebep olur. Fazla birikmesiyle oluşan toksik etkisi yüzünden oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) DNA’da hasar oluşmasına ve genel anlamda bitkilerin ölümüne neden olur (Upadhyay ve Panda 2009, Nzengue vd. 2011).

### 1.6.1 Kurşun (Pb) ağır metali ve etkileri

Kurşun (Pb), atom sayısı 82, atom ağırlığı 207,19, yoğunluğu ise 11,3 g/cm<sup>3</sup> olan bir metaldir. Kurşun doğada organik ve inorganik halde bulunan, yumuşak kolay işlenebilen, mavimsi gri renkte bir elementtir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 Kurşun ağır metalinin kimyasal özellikleri

Ekosistem içerisinde çeşitli sanayi ve endüstriyel faaliyetler esnasında yoğun olarak kullanılan kurşun, doğaya en çok zararı veren ağır metaller içerisinde ön sıralarda gelmektedir (Karademir ve Toker 1995, Saygıdeğer 1995).

Çevreye inorganik ya da organik bileşikler halinde çok kolay yayılabildiği için her durumda toksik etki yaratmaktadır. Kurşun ağır metali inorganik halde atmosferde partiküller halinde bulunabilmektedir. Organik halde de uçucu olabileceği için pek çok gıda maddesine ve içme sularına kolaylıkla bulaşabilmektedir. Bu sebepten dolayı organik halde bulunan kurşun ağır metal bileşikleri bitki, hayvan ve insan hayatı için ciddi tehlike oluşturmaktadır. En bilinen örnek olan kurşunlu benzin bu duruma iyi bir

örnektir. Kurşun ağır metali petrol ürünlerinde bulunduğu gibi çoğu boya ürünlerinin ham maddelerinde de bulunmaktadır. Kozmetik ürünlerinden, su borularının yapımına, kurşun içeren evsel ürünlerden sigara ve böcek ilaçlarına kadar pek çok alanda ve üründe kurşun ağır metali yoğun olarak kullanılmakta ve bulunmaktadır. Endüstriyel alanlarda; kâğıt ve altın sanayisi, petro-kimya sanayisi, gübre sanayisi gibi pek çok alandan çevreye kurşun ağır metalinin salınımı olmaktadır. Yani neredeyse hayatın her yerinde mevcuttur. Bütün bu kaynaklardan salınan kurşun kirliliği bitkiler, hayvanlar ve insanlar için çok tehlikeli bir hale dönüşmüştür. Kurşun, insanlar için direkt olarak kanserojen bir ajandır (De Jonghe ve Adams 1982, Karademir ve Toker 1995).

Bitkiler açısından değerlendirildiğinde diğer bazı ağır metallere kıyasla hiçbir faydası olmamakla beraber oldukça toksikdir. Metabolik ya da fizyolojik süreçlerin hiçbir yerinde kullanılmamaktadır. Bitki morfolojisi, büyüme ve fotosentez süreçleri üzerinde olumsuz etkileri vardır. Yüksek miktarlarda bulunması durumunda enzim aktivitelerini inhibe etmektedir. Hücre membran geçirgenliğini bozarak besin ve mineral alınımını bozmaktadır (Sharma ve Dubey 2005). Diğer ağır metallerde olduğu gibi bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak oksidatif stresi tetiklemekte ve DNA hasarına neden olmaktadır (Reddy vd. 2005).

### **1.6.2 Kadmiyum (Cd) ağır metali ve etkileri**

Kadmiyum (Cd), atom sayısı 48, atom ağırlığı 112,41, yoğunluğu ise 8,6 g/cm<sup>3</sup> olan bir metaldir. Toksik ağır metallerden biri olan kadmiyum doğada saf olarak bulunmaz. Kadmiyum doğada çinkoyla beraber bulunan, kolay işlenebilen bir elementtir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14 Kadmiyum ağır metalinin kimyasal özellikleri

Çinko üretiminin yanında elde edilir. Biyolojik yarılanma süresinin çok uzun olması ve çok düşük konsantrasyonlarda bile aşırı toksik olduğu için önemli bir kirleticidir (Stobart vd. 1985, Greger ve Bertell 1992).

Sanayi ve endüstriyel kullanımı bakımından nikel ve kadmiyum pil üretim sanayisi, gemi sanayisinde yüzey kaplamada, boya sanayisi, PVC üretimi, elektronik sanayisi ve seramik sanayisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca petrol türevlerinde, deterjan üretiminde ve özellikle fosfatlı zirai gübrelerin imalatında da kullanılmaktadır (Larsson vd. 1998). Bitkileri etkileyen en önemli kadmiyum kaynakları su boruları, fosil yakıtlar, tohumların saklanması için kullanılan çeşitli ilaçlar ve ekim aşaması ya da sonrasında kullanılan zirai gübrelerdir (Kahvecioğlu 2007).

Kadmiyum ağır metali bitkiler için de oldukça toksik bir metaldir. Kadmiyum tohum çimlenmesinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Klorofil sentezinin inhibisyonu ve klorofil-a/klorofil-b protein kompleksi ile fotosentez, karbonhidrat ve azot metabolizmalarını etkileyerek bitki büyümesini olumsuz yönde etkilemektedir (Zhang vd. 2003). Ayrıca solunum ve enzim aktiviteleri üzerine de negatif etki yapmaktadır. Diğer ağır metallerde olduğu gibi bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak oksidatif stresi tetiklemekte ve DNA hasarı ile DNA ve RNA üretiminde anormalliklere sebep olmaktadır (Lindberg ve Wingstrand 1985, Rauser 1987, Marrs ve Walbot 1997, Haag-Kerver vd. 1999).

## 1.7 Ağır Metallerin Canlılar Üzerine Etkileri

Canlılar değişen miktarlarda ağır metal olarak adlandırılan elementlere ihtiyaç duyarlar. İnsanlarda özellikle demir, alınması gereken çok önemli bir elementtir. Ayrıca kobalt, bakır, mangan, molibden ve çinko gibi metallere de gereksinim vardır. Fakat bu metallerin hepsinin aşırı miktarda alınması organizmaya zarar verebilir. Ekosistem içerisinde yoğun bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller ekosistemin canlı unsurları olan bitkilerden hayvanlara ve insanlara kadar hemen her çeşit organizma için tehlike oluşturmaktadır (Kırbağ ve Munzuroğlu 2006).

Son yıllarda teknolojinin gelişmesi, sanayi ve endüstriyel malzemelerin hızla üretilmesini sağlamıştır. Kaliteli bir yaşam için gerekli çoğu araç gerecin üretiminde kullanılan ağır metal içerikli ham maddelerin kullanım alanları giderek artmaktadır. Bu artışta sadece sanayi ve endüstriyel üretim sorumlu değildir. Tarımsal alanlarda pek çok faktöre karşı kullanılan zirai mücadele ilaçları, verimi artırmak için kullanılan çeşitli yapay organik bileşikler de önemli paya sahiptir (Yarsan vd. 2000, Kırbağ ve Munzuroğlu 2006, Koç vd. 2012).

Tıbbi açıdan düşünüldüğünde ağır metal zehirlenmesi demir, mangan, alüminyum ve arsenik gibi metallerin aşırı miktarda alınmasıyla meydana gelmektedir. Toksik etki oluşturan bütün metaller ağır metal zehirlenmesi içerisinde değerlendirilmemektedir. Örneğin bizmut en ağır elementlerden biri olmasına karşın toksisitesi düşük olduğundan bu grupta yer almamaktadır (Duffus 2002).

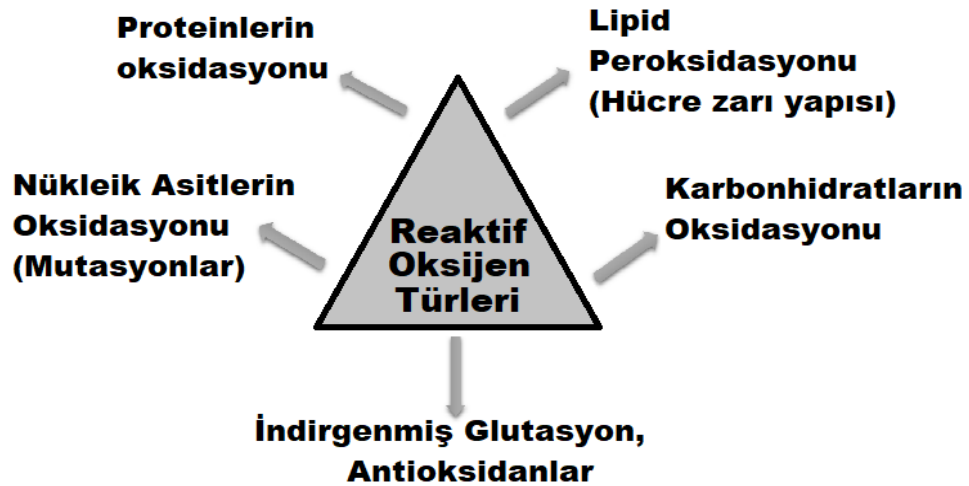
Ağır metal kirliliği tarımsal alanlarda ürün kalitesinin ve verimin düşmesine sebep olmaktadır. Fakat bu metallerin yine toprakta bulunduğu miktar toksisitesi açısından önemlidir. Örneğin; krom, nikel ve kurşun ağır metalleri toprakta 10-100 mg/kg arasında, kadmiyum ise 1 mg/kg'ın altında ise toksik etki yaratmamaktadır. Bu oran bakır için 0,1 mg/kg'dır. Bu elementlerin topraktaki miktarları bu rakamların üzerine çıkmadıkları sürece olumsuz etkileri görülmemektedir. Bu sınırlar aşıldığı zaman kadmiyum ve kurşun çok önemli bir kirlenici halini almaktadır (Kırbağ vd. 2005, Okçu vd. 2009).

Genel olarak düşünülduğünde toprak ya da sudaki ağır metal kirliliğinden en çok etkilenen canlı grubu bitkilerdir. Ağır metaller bitkilerde de fonksiyonel bir çok biyomoleküle zarar vererek oksidatif strese neden olmaktadır. Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) veya hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna sebep olmakta bu da tüm canlılarda olduğu gibi bitkilerde de genetik materyalde hasar oluşması yani genotoksisiteye yol açmaktadır (Assche ve Clijters 1990, Conte vd. 1998, Savva 1998, Steinkellner vd. 1998, Hall 2002, Burzynski ve Klobus 2004, Koç vd. 2012).

## 1.8 Bitkilerde Ağır Metal Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar

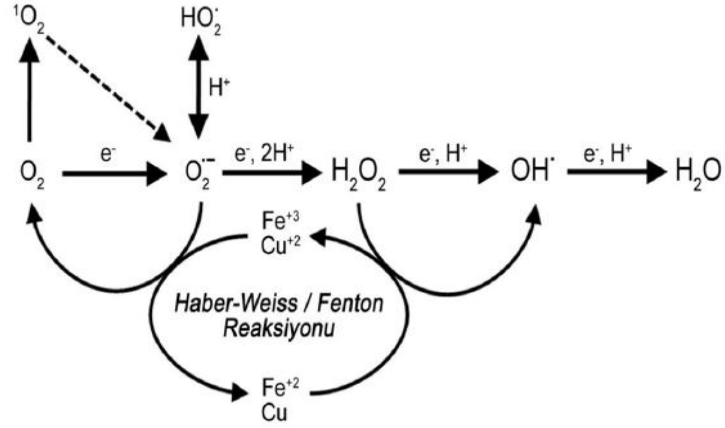
### 1.8.1 Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu bitkilerin normal yaşamı boyunca süre gelen bir olaydır ve seviyesi % 1 civarındadır. Fakat herhangi bir stres karşısında bu oluşum çok fazla artarak hücrel iç dengeyi bozmaktadır. Bitkilerde ağır metallerin sebep olduğu stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda artışa neden olmaktadır. Aşırı enerjiye sahip oksijen molekülüne farklı sayıda elektron transferi sonucunda süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) veya hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır (Mithofer 2004, Moller 2007) (Şekil 1.15).



Şekil 1.15 Reaktif oksijen türlerinin etkileyebileceği yapılar (Donaldson, 1994'ten değiştirilerek alınmıştır)

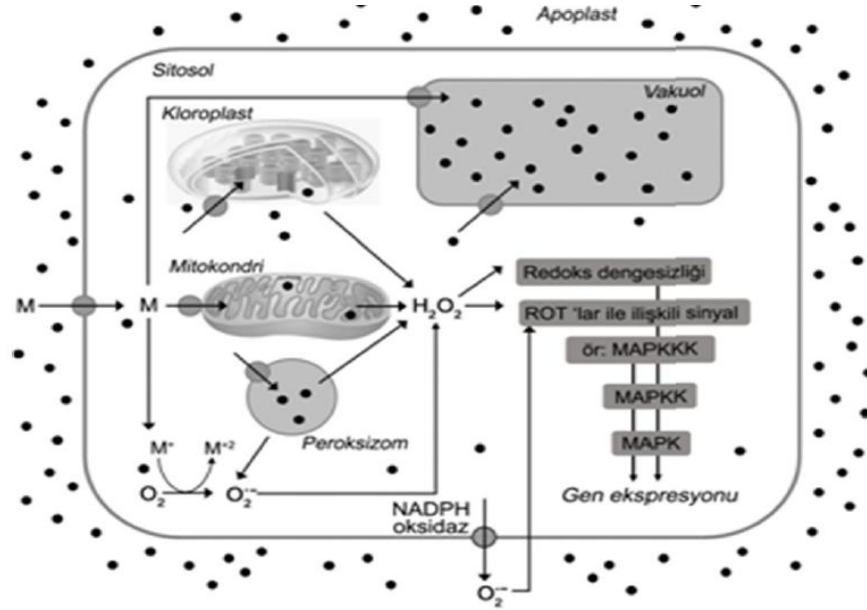
Hücre içerisinde yükseltgenmiş formlarda bulunan metal iyonları ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ),  $\text{O}_2$  - varlığında indirgenerek  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in  $\text{OH}^\cdot$  radikaline dönüşümünü katalizler (Dietz 1999, Vranova 2002) (Şekil 1.16).



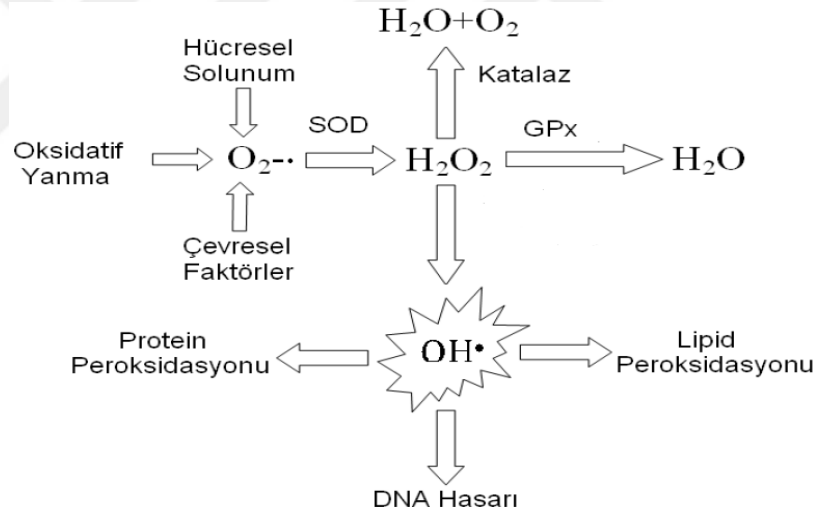
Şekil 1.16 Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu (Vranova vd. 2002, Yıldız vd. 2011)

Bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS), kloroplast ve mitokondri gibi organellerde elektron transfer sürecinde ve peroksizomlar da oluşmaktadır. Kısacası fotosentez, solunum ve bazı metabolik olaylar esnasında üretilmektedir (Yıldız vd. 2011).

Ağır metaller, yapılarına özgü çeşitli taşıyıcılar yoluyla hücre içine alınmakta ve çeşitli ağır metal redoks tepkimeleriyle metabolizmayı etkileyerek organeller de reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olmaktadır (Yıldız vd. 2011) (Şekil 1.17, 1.18).



Şekil 1.17 Ağır metal bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu (Sharma 2008, Yıldız vd. 2011).



Şekil 1.18 Hidroksil radikalinin oluşumu ve etkileri (www.biozentrum.uni-frankfurt.de 2008)

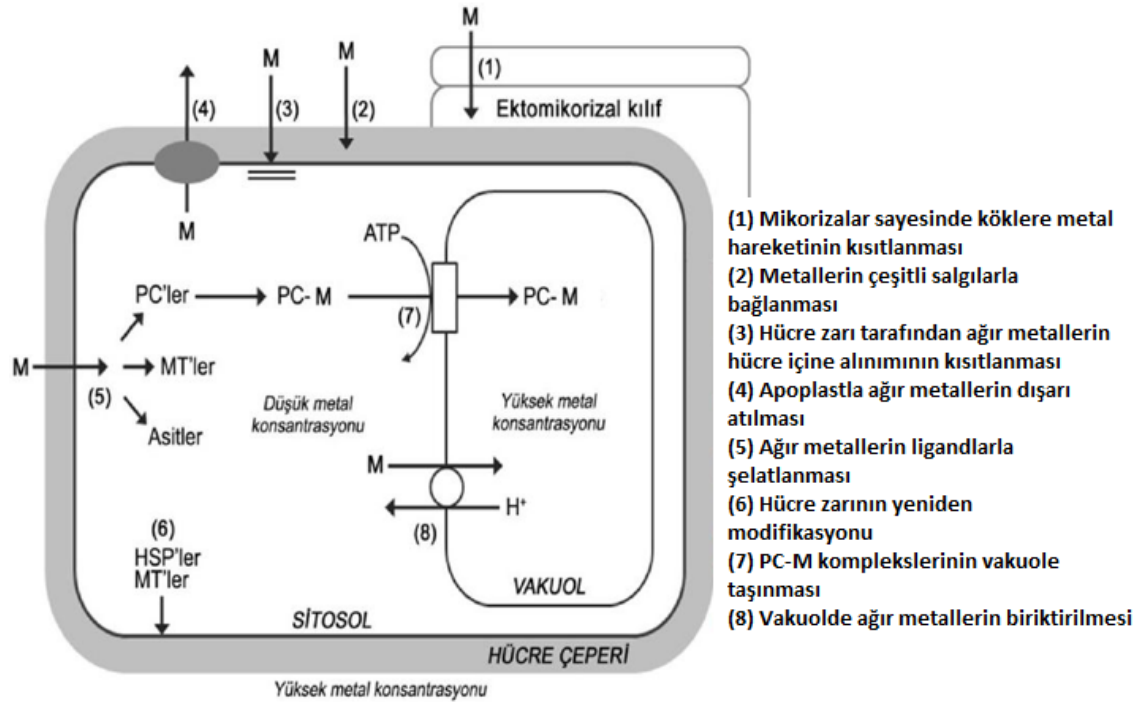
## 1.8.2 Lipid peroksidasyonu

Bitkilerde ağır metal stresi lipid peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırmaktadır. Lipid peroksidasyonu; hücredeki yapısal lipidlerin ve özellikle hücre membranının doğal yapısında bulunan lipidlerin (bileşimlerdeki doymamış yağ asitlerinin) oksijenle yükseltgenmesi olup bunun

sonucu aldehit, keton, hidroksi asitler gibi yapıların oluşmasıdır. Bu oluşumu metaller katalize etmektedir. Hücre membranındaki lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığının ve membran potansiyelinin azalmasına, organellerin ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açabilir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehitler (MDA) DNA ve çoğu yapısal proteinin yapısının bozulmasına neden olmaktadır (Belitz ve Grosch 1987).

### 1.9 Bitkilerde Ağır Metallerin Detoksifikasyon (Giderim) Mekanizmaları

Bitkiler, ağır metallerin detoksifikasyonu (giderimi) konusunda pek çok mekanizma geliştirmişlerdir. Ağır metallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak ya da en aza indirmek için bitkilerin geliştirdiği mekanizmalar bitki köklerinden salgılanan organik asitler sayesinde bağlanması, metalotiyoneinler (MT'ler) tarafından şelatlanarak alıkonulması, metal stresine karşı üretilen özel proteinler, antioksidant bileşikler, prolin birikimi ve alternatif oksidaz yollarının tercihi gibi mekanizmalardır (Cobbett vd. 2002, Hall 2002, Mittler 2002, Yıldız vd. 2011) (Şekil 1.19).



Şekil 1.19 Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyon mekanizması (Marschner 2002, Yıldız vd. 2011)



### 1.9.1 Organik asitler

Bitki kökleri tarafından salgılanan sitrik asit, malik asit, karboksilik asitler ve histidin gibi aminoasitler toprakta bulunan metallerin detoksifikasyonu için potansiyel ligandlardır. Kök etrafına salgılanan bu organik asitler metalleri bağlayarak etkilerini kaldırmakta ya da en aza indirmektedir (Rauser vd. 1999, Diwan vd. 2010)

### 1.9.2 Antioksidant bileşikler

Bitkilerin ağır metal stresine karşı geliştirdikleri antioksidant bileşikler çok sayıda farklı enzimlerden ve enzimatik olmayan moleküllerden oluşmaktadır. Bitkilerdeki antioksidant enzimlerin ve moleküllerin bazıları şunlardır: (Noctor vd. 1998, Gupta vd. 2005).

- Süperoksit dismutaz (SOD),
- Katalaz (CAT),
- Askorbat peroksidaz (APX),
- Glutatyon redüktaz (GR),
- Dehidroaskorbat,
- Redüktaz (DHAR),
- Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR),
- Glutatyon (GSH),
- Askorbik asit (AsA),
- $\alpha$ -tokoferol,
- Lipoik asit,
- Karotenoidler'dir.

### 1.9.3 Prolin birikimi

Bitkilerde stres aminoasidi olarak da bilinen prolin, bitkilerin karşılaştığı pek çok strese (tuz, kuraklık, soğuk vb.) karşı savunma mekanizmasının bir parçasıdır. Prolinin ağır metal stresine karşı artan reaktif oksijen türlerinin giderilmesinde rol aldığı ifade edilmektedir. Prolin hücrede pek çok önemli metabolik olaylarda kritik fonksiyonlara sahip bir aminoasittir. Bu yüzden her türlü streste hücre içi birikimi artarak iç dengenin korunmasında ya da yeniden düzenlenmesinde görev alır. Prolinin hücrede olağan dışı birikimi sadece stresten değil stresin sebep olduğu olaylardan da kaynaklanabilir. Örneğin; lipid peroksidasyonu sonucu oluşan hücresel zarar sonucunda prolin sentezi aktif hale geçer. Yani dolaylı yoldan etkilenmiş olur. Prolin metalleri bağlayabilme yeteneğine sahip bir aminoasittir. Ağır metalleri şelatlama yoluyla etkisiz hale getirebilmektedir. Ayrıca ağır metalleri bağlayan proteinlerde şaperon görevi yaparak bu proteinlerin yapısını korur (Siripornadulsil 2002).

### 1.9.4 Metalloiyoneinler ve fitoşlatinler

Metalloiyoneinler sistein aminoasidince zengin çok uzun olmayan polipeptidlerden oluşan tiyol grupları sayesinde metal bağlayıcı proteinlerdir (Kagi 1991). Metalloiyoneinler sisteinin durumuna göre gruplandırılmaktadır. Bitki metalloiyoneinleri sisteince zengin 2 işlevsel bölgeye sahiptirler. Sisteinin pozisyonuna göre 4 gruba ayrılırlar. 1. 2. ve 3. grup metalloiyoneinler bakır ağır metaline karşı homeostazisi sağlamakla görevlidir. 4. grup metalloiyoneinler ise çinko ağır metaline karşı fonksiyonel olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Sadece bakır ve çinkoya karşı değil esansiyel olmayan diğer metallere karşı da bağlayıcı görev yaptıkları ifade edilmiştir (Guo vd. 2003).

Metalloiyoneinler hakkında pek çok çalışma olmasıyla birlikte Cobbett ve Goldsbrogg (2002) ve Mir vd. (2004)'nin araştırmalarında metalloiyoneinlerin genel anlamda homeostaziste görev aldıkları ve ağır metallere karşı direnç geliştirme konusunda fonksiyonel olduklarını belirtmişlerdir. Özellikle ağır metal stresine maruz kalan

bitkilerde metallothioneinlerin yoğun şekilde transkripte oldukları gözlemlenmiştir (Cobbett ve Goldsbrogg 2002, Mir vd. 2004).

Fitoşelatinler ise metallothioneinlere kıyasla nispeten daha küçük metal bağlayıcı polipeptidler olup ağır metal varlığında fitoşelatin sentaz enzimi tarafından glutatyon kullanılarak sentezlenmektedir. Fitoşelatin glutamin, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir polipeptittir. Fitoşelatinlerin de metallothioneinler gibi ağır metalleri bağlayarak zararlarını en aza indirmek için görevli yapılar olduğu pek çok çalışmada belirtilmiştir (Iglesia-Turino vd. 2006, Guo vd. 2008, Clemens ve Persoh 2009).

### **1.9.5 Alternatif oksidaz yolu**

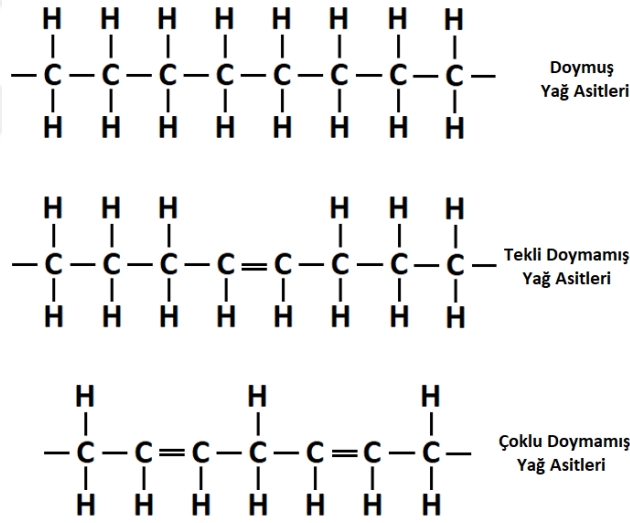
Bitkilerde solunum esnasında reaktif oksijen türlerinin üretiminin engellenebilmesi için mitokondriyal ve kloroplast elektron taşıma sistemindeki aktif halde bulunan elektronlar normal  $O_2$ 'nin  $O_2^-$ 'ye değil de suya indirgenmesi için alternatif oksidaz yoluna saptırırlar. Bu sayede reaktif oksijen türlerinin üretimi azaltılmaktadır (Maxwell 1999, Juszczuk ve Rychter 2003). Ağır metal stresine maruz kalmış bitkilerde alternatif oksidaz yolunun fonksiyonel olarak yoğunlaştığını ifade eden çalışmalar mevcuttur. Fakat ağır metal ve alternatif oksidaz yolu arasındaki ilişki tam olarak açığa kavuşturulmuş değildir (Castro-Guerrero 2008, Prado 2010).

### **1.9.6 Stres proteinleri**

Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde pek çok proteinin üretimi artmaktadır. Genel stres proteinleri olarak bilinen ısı-şok proteinleri (HSP) ağır metal stresine karşı üretimi artan proteinlerden biridir. Üretiminin artması ağır metale karşı stres cevabı olarak ifade edilmiştir (Delhaize 1989, Hall 2002).

### 1.10 Yağ Asitleri ve Yağ Asidi Desatürazlar (Dönüştürücüler)

Doğal yağlar yapısal olarak gliserol ve yağ asitlerinden oluşmaktadır. Gliserol bütün yağlarda sabitken diğer bileşen olan yağ asitleri farklı bitkilerde değişik kompozisyonlarda bulunmaktadır (Baydar 2000). Bu yağ asitleri doymuş yağ asitleri (saturated fatty acid) ve doymamış yağ asitleri (unsaturated fatty acid) olarak 2 grupta sınıflandırılırlar. Doymuş yağ asitleri karbon atomları arasında tek bir bağ olan, normalde oda koşullarında katı halde bulunan yağ asitleridir. Bu yağlara doymuş yağlar da denir. Doymamış yağ asitleri ise karbon zinciri üzerinde karbon atomları arasında bir ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitleridir (Şekil 1.20). Bu yağ asitlerince zengin olan yağlara doymamış yağlar denirken oda koşullarında sıvı halde bulunurlar. Bu doymamış yağlar vücuda dışarıdan alınması gereken yağ asitleri olup genellikle bitkisel kaynağıdır (Nas vd. 2001, Kümeli 2006).



Şekil 1.20 Doymuş ve doymamış (tekli ve çoklu) yağ asitlerinin moleküler yapıları

Doymamış yağ asitleri kendi içerisinde tekli doymamış (yapısında tek çift bağ bulunan) ve çoklu doymamış (birden çok çift bağ bulunan) yağ asitleri olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Palmitoleik asit (C16:1) ile oleik asit (C18:1) tekli doymamış yağların en önemli üyesidir. Linoleik (C18:2) ve  $\alpha$ -linolenik (C18:3) yağ asitleri ise çoklu doymamış yağ asitlerine örnektir (Nas vd. 2001, Kayahan 2003).

Yağ asidi desatürazlar; bir yağ asidi zincirinde iki karbon atomu arasındaki tekli bağı (C-C), çift bağı (C=C) dönüştüren enzimlerdir. Oluşan bu çift bağı genellikle doymamış olarak adlandırılır ve bu reaksiyon desatüraz enzimleri tarafından katalize edilir. Bu reaksiyonun olması için oksijen gereklidir yani aerobik koşullarda gerçekleşir. Evrensel özellik taşıyan yağ asidi desatürazlar *Escherichia coli* gibi bazı bakteriler hariç incelenen tüm organizmalarda bulunmuştur (Harwood 1980, Stumpf 1980, Jaworski 1987).

Yağ asitleri bitkilerde kloroplastlarda, insan, hayvan, maya ve mantarlarda ise sitoplazmada asetatlardan sentezlenmektedir. Her iki tipte yağ asidi sentezi, doymuş yağ asitleri olarak üretilir ve bunlar doymamış yağ asitlerine, desatürazlar tarafından katalize edilen reaksiyonlar aracılığıyla dönüştürülür (Schweizer vd. 1978, Tsukamoto vd. 1983).

Üç tür yağ asidi desatürası vardır: Bunlar; asetil-CoA, asetil-ACP (asetil taşıyıcı proteinler) ve asetil-lipid desatürazlardır (Murata ve Wada 1995).

Bitkilerde ve siyanobakterilerde çoğu desatürasyon reaksiyonu yağ asitlerine doymamış bağlar getiren asetil-lipid desatürazlar tarafından katalize edilir. Bitki hücrelerinin plastidlerinde asetil-ACP desatürazlar da vardır ve asetil taşıyıcı proteinlere (ACP) bağlanan yağ asitlerindeki çift bağı oluşumunu katalizler. Asetil-CoA desatürazlar ise hayvan, maya ve mantar hücrelerinde bulunur ve koenzim A'ya (CoA) bağlı olan yağ asitlerini doymamış yağ haline getirirler. Her yağ asidi desatürası, bir yağ asetil zincirinde, örneğin  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  veya  $\Delta 6$  gibi belirli bir pozisyonda doymamış bir bağı oluşturur (Murata vd. 1992, Macartney 1994, Murata ve Wada 1995).

Aspir bitkisi de yüksek kaliteli yenilebilir yağları için yetiştirilen yağlı tohumlu bir bitkidir. Oleik asit (C18: <sup>1</sup> $\Delta 9$ ) ve linoleik asit (C18: <sup>2</sup> $\Delta 9, 12$ ) aspir yağında bulunan iki ana yağ asidi olup toplam yağ asitlerinin yaklaşık % 90'ını oluşturur. Geleneksel aspir yağı, nispeten yüksek linoleik asit içeriği ile diğer yağlı tohumlu ürünlerin çoğuna kıyasla yaklaşık % 70 ile karakterizedir. Son otuz yılda, çeşitli çalışmalar ve çiftçiler tarafından

yüksek seviyelerde oleik asit (% 75-84) veya linoleik asit (% 71-89) içeren çok sayıda aspir bitkisi kültüre alınmıştır (Babaoğlu 2007).

### 1.10.1 Yüksek bitkilerde yağ asidi desatürazlar ve sorumlu genler

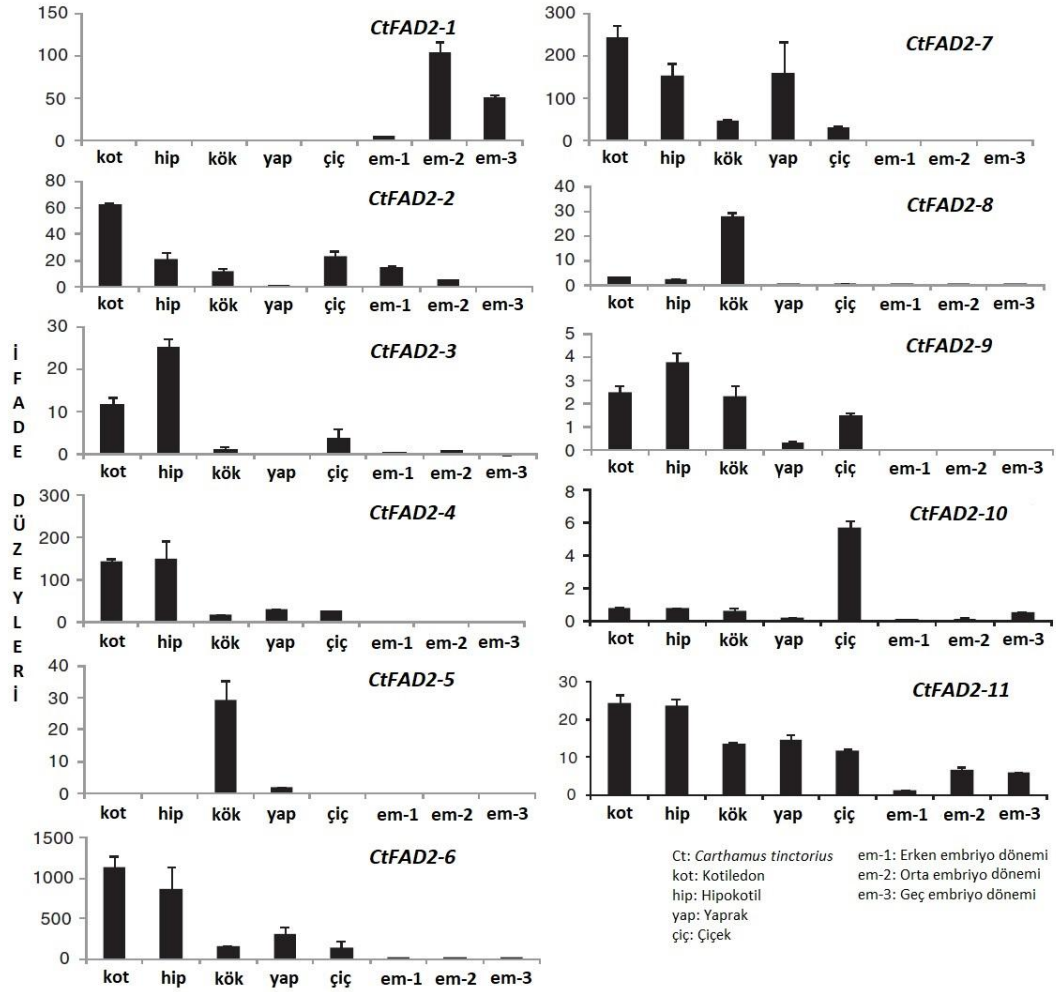
Bitkilerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) ana fraksiyonları doymamış yağ asitleridir. Bu doymamış yağ asitlerinin desatürazlar ile reaksiyonu sonucu linoleik (LA: C18: <sup>2</sup>Δ<sup>9</sup>Δ<sup>12</sup>) ve α-linolenik (C18: <sup>3</sup>Δ<sup>9</sup>Δ<sup>12</sup> Δ<sup>15</sup>) yağ asitleri olmak üzere 2 grup çift bağlı yağ asitleri oluşur. Bu 2 bileşik, ökaryotik hücrelerde membran lipidleri ve depolama lipidlerinin önemli yapısal bileşenleridir. Önemli fizyolojik rollerine ek olarak, LA ve ALA insan sağlığı ve beslenmesi için de gereklidir ve dışarıdan alınması gerekmektedir (Ohlrogge ve Browse 1995, Falcone vd. 2004, Tang vd. 2005).

Yüksek bitkilerde çoklu doymamış yağ asitlerinin kloroplast ve endoplazmik retikulumda bir grup yağ asidi desatüraz enzimi sayesinde dönüşümü yapılmaktadır. Bu dönüşüm bitkilerin farklı organlarında farklı desatürazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Örneğin; aspir bitkisinde FAD3 (fatty acid desaturase-3) çiçek kısmında yağ asitlerinin dönüşümünü gerçekleştirmektedir. FAD7 ve FAD8 desatürazlar ise yaprak, kök ve az da olsa çiçek kısmında desatürasyondan sorumlu enzimlerdir (Guan vd. 2012a, b).

### 1.11 Aspir Bitkisi ve *FAD2* Geni

*FAD2* genleri tarafından kodlanan FAD2 enzimleri, çoklu doymamış yağ asitlerinin biyosentez yolağında yer alan yağ asidi desatürazlardan biridir. İlk olarak *FAD2* geni *Arabidopsis thaliana* bitkisinden izole edilmiştir (Okuley vd. 1994). Daha sonra yapılan çalışmalar neticesinde *FAD2* geni soya fasülyesi, kolza, pamuk, yer fıstığı, keten gibi bir çok yağ bitkisinden de izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. *Arabidopsis*'te tek bir *FAD2* geni bulunmaktayken diğer bitki türlerinde *FAD2* küçük gen aileleri tarafından kodlanmaktadır. Soya fasülyesinde *FAD2* genini kodlayan dört farklı üye varken, pamukta 3 farklı *FAD2* geni mevcuttur (Scheffler vd. 1997, Heppard vd. 1999, Liu 1999a, b, Pirtle vd. 2001, Li vd. 2007, Zhang vd. 2009).

Bütün bu bilgiler dahilinde Cao vd. (2013) aspir bitkisinin farklı organlarında farklı düzeylerde kodlanan *FAD2* gen ailesine ait 11 farklı *FAD2* genini izole etmişlerdir. 11 farklı *FAD2* geninin filogenetik analizi yapılmış ve bunların genomik yapısal özellikleri belirtilmiştir. Tespit edilen bu 11 farklı *FAD2* geninin aspir bitkisinin farklı organlarındaki ekspresyonu şekil 1.20’de verilmiştir (Cao vd. 2013).



Şekil 1.21 *FAD2* geninin aspir bitkisinin farklı dokularındaki karşılaştırmalı ifade düzeyleri (Cao vd. 2013’ten değiştirilerek alınmıştır)

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Aspir konusunda yapılan literatür taramasında gerek dünya genelinde gerekse Türkiye’de yapılan araştırmaların oldukça sınırlı olduğu görölmüştür. Literatür taraması sonucu elde edilen bilgiler çalışmamızın konusuna paralel olarak üç ana kısımda toparlanarak sunulmuştur. İlk bölümde aspir bitkisinin önemi ele alınırken, ikinci bölümde çalışmanın konusunu oluşturan ağır metaller ve ağır metallerin aspir bitkisiyle ilgili olan çalışmalar değerlendirilmiştir. Üçüncü ve son bölümde ise çalışmamızın asıl kısmını oluşturan aspir bitkisiyle yapılmış moleküler biyolojik çalışmalar incelenmiştir.

Aspir bitkisi yağlı tohumlara sahip önemli bir yağ bitkisidir. Neredeyse son on yıla kadar aspir bitkisinin önemi anlaşılamamış, dünya genelinde tarıma ve ekonomiye olabilecek katkısı tam olarak sağlanamamıştır. Bunun nedenleri arasında aspir bitkisinin tarımının sınırlı alanlarda sadece bölgesel yapılmış olması ve ekimiyle ilgili istatistiksel bilgilerin tutulmaması gösterilmektedir. Çok uzun bir geçmişi olmasına rağmen aspir bitkisiyle alakalı bilgilerin sınırlı olması bu nedene dayanmaktadır (Gilbert 2008).

Esendal (2001) aspir bitkisinin Türkiye’deki durumunu değerlendirmiş ve yapılan araştırmalarının yetersiz olduğunu vurgulamıştır. Uzunca bir süredir aspir tarımının yapılıyor olmasına rağmen verilerin çok az olmasına, ekim alanlarının bölgesel ve sınırlı olmasından dolayı üretiminin azlığına ve ekonomik açıdan girdilerinin çok az olduğuna dikkat çekmiş ve öneminin bu yüzden anlaşılamadığını belirtmiştir.

Önemli bir yağ bitkisi olan aspir (*Carthamus tinctorius* L.) amerikan safranı, boyacı safran, kır safranı, boyacı aspiri, haspir ve zaferan olarak adlandırılmaktadır. Ticari kullanımda safran bitkisiyle karıştırıldığından ‘yalancı safran’ da denilmektedir. Aspir bitkisinin kullanımının milattan önceye dayanan ve yaklaşık 3500 yıllık bir geçmişe sahip olduğu kayıtlardan anlaşılmaktadır. Güney Asya’dan orijin aldığı daha sonra Ortadoğu bölgesinde ve Akdeniz kıyılarına doğru yayıldığı bilinmektedir. Bu tarihlerden beri Mısır, Çin, Hindistan ve Japonya’da ekimi yapılmaktadır (Weiss 1971, Ashri 1973, Yenice ve Bayraktar 1996, Johnson vd. 2001).



Singh ve Nimbkar (2006), Babaoğlu (2006) ve Uher (2008) yaptıkları çalışmalarda aspir bitkisinin çok amaçlı kullanımının olduğunu belirtmişlerdir. Bitkisel yağ olarak kullanımından, yem sanayisine, çiçekçilikte kullanımından boya sanayisine, ilaç sektöründen kozmetik, kâğıt ve margarin gibi pek çok sektörde kullanımının olduğunu vurgulamışlardır.

Son zamanlarda ise tohumlarındaki yağ içeriğinin yüksek olması sebebiyle önemli bir yağ bitkisi olarak kullanılmaya başlandığı ve pek çok çeşidinin bu amaçla kültüre alındığı bildirilmiştir (Dajue ve Mündel 1996, Babaoğlu 2007, Ahwalat 2008, Anonim 2010, Anonim 2011, Er vd. 2011).

Johnson ve Jimmerson (2003) aspir bitkisinin yağ bitkisi olarak önemini vurgulamışlardır. İçerdiği ortalama yağ oranı % 30-45 arasında değişebilen aspir bitkisinin yağ içeriğinde 2 önemli yağ asidi bulunmaktadır. Birincisi; linoleik (Omega-6) yağ asidi olup kimya ve yem sanayinde önemli hammadde kaynağıdır. Diğeri ise oleik (Omega-9, zeytinyağı kalitesine yakın) yağ asit olup, yemeklik olarak kullanılabilir kaliteli bir yağ çeşididir.

Kaya vd. (2009)'nin yaptıkları çalışmada Edirne Keşan ve Lüleburgaz'daki verim denemelerindeki orta oleik aday ve standart yüksek oleik hibritlerde, oleik asit oranlarının aynı tarlada ekilen normal tiplerden etkilenme durumlarının belirlenmesi amacıyla her bir denemedeki hibritlerin tablaları çiçeklenmeden önce bez torbayla kapatılmıştır. Bu kapatılan ve açıldıkları bitkilerden örnekler alınmış ve oleik asit oranları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda oleik asit oranlarında açıldıkları bitkilerde bez torbayla kapalı olanlara göre kontrol çeşitlerinde ortalama % 3,9 aday çeşitlerde ise % 3,8 oranında bir düşüş belirlenmiştir.

Babaoğlu (2006), Mündel (2008) ve Kartha (2010) insan sağlığı açısından önemi yüksek olan doymamış yağ asidi oranının aspir bitkisinde oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayçiçeğinde % 86 civarında olan bu oranın aspir bitkisinde % 90-93 seviyelerinde olduğu rapor edilmiştir. Omega 9 (oleik yağ asidi) içerdiğinden aspir

yağının en az zeytinyağı kadar kaliteli ve sağlıklı olduğu da vurgulanmıştır (Babaoğlu 2006, Mündel 2008, Kartha, 2010).

Gelişen teknolojiyle beraber gündeme gelen diğer bir konu ise biyodizel üretimidir. Biyodizel yapımında kullanılan yaklaşık 50'ye yakın bitki türü bulunmaktadır. Bunların başında gelen aspir bitkisinin biyodizel üretiminde değerlendirilecek önemli potansiyele sahip olduğu ve son yıllarda üretilen aspir tohumlarının kullanımının da bu yönde olduğu belirtilmektedir (Karabaş 2013).

Akınerdem ve Öztürk (2008) yaptıkları çalışmada Türkiye'de tescilli olan Remzibey-05 ve Dinçer çeşitlerinin tohumlarının sahip olduğu yağları içerik ve özellik bakımından normal kullanımda olan motorin ile karşılaştırmasını yapmışlardır.

Bergman ve Charles (2008)'in yaptıkları çalışmada aspirin biyodizel olarak kullanılan diğer yağ bitkilerinden daha fazla avantajlarının olduğuna ve biyodizel hammaddesi konusunda aspirin ekonomik getirilerinin diğerlerine kıyasla daha fazla olacağına vurgu yapmışlardır.

Babaoğlu (2005, 2006, 2007) tarafından yapılan araştırmalarda aspir bitkisinin Türkiye'nin değişik bölgelerinde rahatlıkla ekiminin yapılabileceği belirtilmiştir. Yetiştirilme şartları açısından ülkemizin coğrafi yapısına çok uygun olduğu, aspir bitkisinin az yağış alan ülkemizde neredeyse sulama yapmadan bile üretiminin mümkün olabileceği bildirilmiştir.

Coşge vd. (2007)'nin yaptıkları çalışmada ekim zamanının tohumdaki yağ içeriğine olan etkisini üç farklı aspir çeşidinde (Remzibey-05, Dinçer ve Yenice) araştırmışlardır. Ekim zamanlarını kış ve ilkbahar ekimi olarak belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, çeşitlerin tohum içeriğindeki yağ oranının değiştiği ve kış ekiminde yağ artışının en fazla Remzibey çeşidinde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada birçok faktörün aspirin tohumunda yağ içeriğini etkilediği de gösterilmiştir.

Asgarpanah ve Kazemivash (2013)'ın yaptığı geniş kapsamlı araştırmada aspir bitkisinin farmakolojik özellikleri ele alınmıştır. Aspir bitki ekstraktlarının ve yağının dünya çapında ilaç sektöründe çok amaçlı kullanımı değerlendirilmiştir. Aspirin analjezik, antipiretik, antioksidan, anti-inflamatuar ve antidiyabetik aktiviteleri ve zehirlenmeye karşı bir panzehir etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Kimyasal içerik değerlendirmesinde kartamin, kartamidin, izokartamidin, hidroksisafran sarı A, safran sarı-A, safflamin-C ve luteolin gibi maddelerin elde edilen ana bileşikler olduğu belirtilmiştir. Ayrıca karyofilen, p-alliltoluen, 1-asetoksitetralin ve henoksan gibi bileşiklerin aspir bitkisinin çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ içeriğinde bulunduğu tespit edilmiştir.

Serim vd. (2015)'nin yaptıkları çalışmada aspir ekiminde çok önemli olan yabancı otlarla mücadeleden bahsetmişlerdir. Aspir bitkisinin gelişiminin ilk 3-4 haftalık döneminde yabancı otlarla rekabet etmesi oldukça zordur. Bu yüzden yabancı otlardan çok etkilenir. Bu sebeple, ekimden önce tarlanın bir herbisit (ot ilacı) ile ilaçlanması ve ilacın toprağa karıştırılması gerekir veya çıkıştan hemen önce tarla yüzeyine uygulanması gerekmektedir. Yapılan çalışmada Ankara ilinde aspir tarımının yapıldığı alanlarda sıklıkla rastlanan yabancı otlar belirlenmiş ve bu otlarla mücadelede kullanılacak herbisitlerin tespit edilen yabancı ot florasına özgü olabileceğini ve bu sayede herbisitlerin aspir üzerindeki olumsuz etkilerinin daha az olabileceğini belirtmişlerdir.

Öğüt vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada Remzibey-05 ve Balcı çeşitlerinden elde edilen yağlardan biyodizel üretimi üzerine fosfor gübre uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada hektar başına farklı miktarlarda fosfor gübrelemesi yapılmıştır. Daha sonra bu çeşitlerden elde edilen yağlardan fosfor uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yağların kompozisyonu belirlenmiş ve üretilen biyodizelin teknik özellikleri belirlenmiştir. Değerlendirme sonucunda fosfor gübrelemesinin biyodizel üretimi ve kalitesi açısından önemli olduğu, tohum ve yağdaki fosfor oranının azaltılarak biyodizel üretim maliyetinin düşürülebileceği vurgulanmıştır.

Şahin ve Taşlıgil (2016)'in yaptıkları çalışmada aspirin Türkiye için stratejik öneme sahip yağlı tohumlu bir bitki olduğunu belirtmişlerdir. Aspir bitkisiyle ilgili pek çok konuya değinen araştırmacılar gerek kullanım alanı gerekse elde edilen ürün çeşitliliği açısından ilerleyen yıllarda aspirin Türk tarım hayatında adından çokça söz edileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca aspirin pek çok alanda kullanımının olmasının yanı sıra potansiyel bir enerji (biyo-dizel) bitkisi olduğunu, bu konuda pek çok çalışmaların yapıldığını ve ilerlemelerin kaydedildiğini belirtmişlerdir.

Öz (2016) çalışmasında dört farklı aspir çeşidinin mevsimsel ekim farklılıklarının aspir bitkisi üzerindeki etkisini pek çok parametreyi kıyaslayarak değerlendirmiştir. 2013-2015 yılları arasında gerçekleştirdiği çalışmada aspir ekiminde ilkbahar ve sonbahar mevsimleri arasında verimsel açıdan farklılık olduğunu en iyi verimin sonbahar ekiminde alındığını belirtmiştir. Bunu da sonbaharda ekilen aspir bitkisinin kış mevsimi boyunca kök gelişiminin daha iyi olmasına bağlamıştır. Ayrıca dört farklı aspir çeşidi arasında sonbaharda ekimi yapılan Remzibey çeşidinin en yüksek tohum verimini verdiğini rapor etmiştir.

Genel olarak düşünüldüğünde toprak ya da sudaki ağır metal kirliliğinden en çok etkilenen canlı grubu bitkilerdir. Ağır metaller bitkilerde de fonksiyonel birçok biyo-moleküle zarar vererek oksidatif strese neden olmaktadır ve bu da bitkilerde genetik materyalde hasar oluşmasına yani genotoksisiteye yol açmaktadır (Assche ve Clijters 1990, Conte vd. 1998, Savva 1998, Steinkellner vd. 1998, Hall 2002, Burzynski ve Klobus 2004, Koç vd. 2012).

Houshmandfar ve Moraghebi (2011) yaptıkları çalışmada kadmiyum, bakır, nikel ve çinko ağır metallerinden oluşan çözeltinin aspir bitkisi tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu ağır metal çözeltisinin aspir bitkisi üzerinde toksik etkiler yarattığını ve buna bağlı olarak tohum çimlenmesi ve fide büyümesinin olumsuz yönde etkilendiğini vurgulamışlardır.

Madaan vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada aspir bitkisi üzerine selenyum (Se) ve civa (Hg) ağır metallerinin etkileri araştırılmıştır.  $10^{-4}$  M konsantrasyondaki selenyum ve civa ağır metal streslerine 8 gün boyunca maruz kalan aspir bitkisinin kök ve olgun yapraklarında meydana gelen değişimler ağır metal birikimi açısından incelenmiştir. Köklerin gelişiminde önemli ölçüde gerileme olurken toprak üstü organlarda gelişime etkisi daha olmuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler, sürgünlerde biriken civa ve selenyum miktarının, köklerdekilere göre çok daha az olduğunu ortaya koymuştur.

Namdjoan vd. (2012a)'nin yaptıkları çalışmada kadmiyum ağır metalinin aspir bitkisinin farklı dokularında antioksidant bileşikler olan  $\alpha$ - tokoferol, fitoşelatin, glutatyon ve bazı non-protein tiyoller üzerine etkileri araştırılmıştır. Kadmiyum stresine bağlı olarak köklerde fitoşelatin ve non-protein tiyol seviyelerinde artış olduğunu,  $\alpha$ - tokoferol ve glutatyon sentezinin azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca aspir bitkisinin kadmiyum için hiperakümülatör olabileceğini de vurgulamışlardır.

Namdjoan vd. (2012b)'nin yaptıkları diğer bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda (0-100  $\mu$ M) kadmiyum ağır metal stresine maruz bırakılan aspir bitkisinin kallus yapısına etkileri, kadmiyum birikimleri ve antioksidatif yanıtlar incelenmiştir. 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M konsantrasyonlarındaki kadmiyum stresi kallus büyümesini sırasıyla % 25 ve % 46 oranında inhibe etmiştir. Kalluslardaki kadmiyum birikimi de artan konsantrasyonla birlikte artış göstermiştir. Kalluslarda 100  $\mu$ M konsantrasyonda biriken kadmiyum miktarı 334 mg/kg olarak ölçülmüştür. 75  $\mu$ M konsantrasyona kadar glutatyon (GSH) ve antioksidan enzim aktivitesinin yükseldiği daha sonra da azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca  $\alpha$ - tokoferol düzeyi ise artan kadmiyum konsantrasyonuna paralel olarak artış göstermiştir.

Moosavi vd. (2012) elektronik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) ağır metallerinin kanola, buğday ve aspir tohumlarının çimlenme yüzdesine kök ve sürgünlerin uzamasına olan etkilerini araştırmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda (50, 200, 350, 500 ve 1000 ppm) ağır metal içeren çözeltilerdeki işlemlerden sonra tohumlar çimlendirilmiştir. Sonuçlara göre tüm uygulamalarda ağır metal çözeltilisinin konsantrasyonu arttıkça tohum çimlenme yüzdesinin, kök ve sürgün

uzunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle 500 ppm kadmiyum ağır metal stresinden sonra çimlenme olmazken 350 ve 500 ppm konsantrasyonlarında fide büyüme ve gelişmesinin olmadığı belirtilmiştir.

Azevedo vd. (2005) ile Moradi ve Ehsanzadeh (2015) tarafından yapılan çalışmalarda, kadmiyum (Cd) ağır metalinin aspir bitkisinde fotosentez ve fide gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre stres etkisinin fotosentez mekanizmasında yer alan pek çok yolağı olumsuz etkilediğini bunun da fotosentez oranını önemli düzeyde düşürdüğü ve buna bağlı olarak fide gelişiminin kontrol gruplarına kıyasla azaldığını belirtmişlerdir.

Li vd. (2015) çalışmalarında bakır (Cu) ve kurşun (Pb) ağır metal streslerinin aspir bitkisine olan etkilerini araştırmışlardır. Aspir fide büyüme ve gelişme esnasında, dallanma ve çiçeklenme aşamalarında, glutatyon (GSH) düzeylerinin değişimleri ve gen ifadesi incelenmiştir. Bakır ağır metalinin düşük konsantrasyonlarında fide boyu ve kök uzunluğunda artış olmuştur. Bitki boyu, kök uzunluğu ve yan kök sayıları artan Cu ve Pb konsantrasyonlarıyla kademeli olarak azalmıştır. Düşük Cu konsantrasyonuna maruz kalan örneklerde fide ve dallanma aşamalarında GSH içeriğinde hafif bir artış gözlemlenmiştir. Fakat artan ağır metal konsantrasyonlarında GSH içeriği hem köklerde hem de yapraklarda önemli ölçüde azalmıştır. RT-PCR analizi sonucu *GSH* ekspresyon seviyelerinde ve artan metal konsantrasyonları arasında negatif bir korelasyon olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak aspir bitkisinin düşük Cu konsantrasyonlarına kısa süre maruz kalması, normal bitki büyümesini korumak için GSH sentezinde bir artışa neden olurken, uzun süreli maruz kalma ve artan Cu ve Pb konsantrasyonları GSH metabolik zincirini olumsuz etkilemiş ve aspir bitkisi açısından ciddi toksisite oluşturmuştur.

Palizban vd. (2016) Isfahan (İran) demir çelik fabrikası çevresindeki çiftliklerde yetiştirilen kanola (*Brassica napus*) ve aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkilerinde kurşun ve kadmiyum ağır metallerinin kontaminasyonu ve bu bitkilerden elde edilen yağları karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Geleneksel yöntemle elde edilen yağlarda kanola bitkisine kıyasla aspirden elde edilen yağlarda kurşun oranının daha

fazla olduğu bildirilmiştir. Her iki bitki t¼r¼nden elde edilen yağlarda kadmiyum ağır metal kontaminasyonunun olmadığı da belirtilmiştir.

Gautam vd. (2016) aspir bitkisi üzerine bakır ağır metalinin farklı konsantrasyonlardaki (25, 50, 100 µM) etkilerini araştırmışlardır. 20 g¼nl¼k bakır stres uygulamasının ardından artan bakır konsantrasyonlarında aspir bitkisinin b¼y¼mesinde, taze ve kuru ağırlığında azalma olmuştur. Polifenol ve flavonoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanlarda önemli derecede artış gözlemlenmiştir. Yapraklarda strese bağlı olarak prolin birikimi artmıştır. Aşırı bakır konsantrasyonuna yanıt olarak, MDA içeriğinin de seviyesi artmıştır. Ayrıca, aspir yapraklarında artmış prolin birikimi gözlenmiştir. Sonuç olarak bakırın bitkiler tarafından kullanılmasına karşı toksik etkisinin zamana ve doza bağlı olduğu vurgulanmıştır.

Badpa vd. (2016) alışmalarında aspir fidelerinde salisilik asit (SA)'in kadmiyum (Cd) ağır metal stresine karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Kadmiyum ve salisilik asit'in aspir tohum çimlenmesi ¼zerindeki etkisini değerlendirmek için farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 mM) ve salisilik asit (0, 0,3, 0,6 ve 0,9 mM) içeren deney tasarlamışlardır. Sadece kadmiyum stresi uygulanan ¼rneklerle kıyasla kadmiyum stresinin b¼t¼n dozlarında 0,9 mM'lık salisilik asit uygulamasının tohum çimlenmesinde, k¼klerin gelişiminde ve kuru ağırlığın artışında kadmiyumun etkisini azalttığı ifade edilmiştir.

Namdjoan vd. (2017), Badpa vd. (2016)'nin yaptığı çalışmaya benzer şekilde aspir fidelerinde salisilik asit (SA) ve sodyum azotprusit (SNP)'in çinko ağır metal stresine karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. 21 g¼n s¼re ile b¼y¼t¼len aspir fideleri on g¼n boyunca çinko stresine (500 µM) maruz bırakılmıştır. Bu on g¼n içerisinde sadece çinko stresi olan grupta k¼k gelişiminin ve biyok¼tlenin azaldığı g¼r¼lm¼řt¼r. Çinko stresiyile beraber ayrı ayrı uygulanan salisilik asit (SA) ve sodyum azotprusit (SNP) olan gruplarda çinko stresine rağmen k¼klerde ve biyok¼tle de artış olmuştur. SA, SNP eklemesi sonucunda k¼kten diğer bitki kısımlarına çinkonun taşınması azalmış ve yapraklarda glutasyon (GSH) ile askorbat (ASC) d¼zeyi önemli ¼l¼de artmıştır. SA ve SNP takviyesi yapılan ve çinko ile muamele edilmiş bitkilerin, sadece Zn stresine maruz

kalan bitkilere kıyasla savunma sisteminde yer alan enzim (askorbat, glutasyon vb.) döngülerini geliştirilmiş olabileceği rapor edilmiştir. Bu bulguların yani SA veya SNP'nin eksojen (dışarıdan) uygulamasının Zn'nin aspir bitkileri üzerindeki negatif etkilerini antioksidan savunma sistemlerini uyararak azalttığı ifade edilmiştir.

Hafizi ve Nasr (2018) tarafından yapılan çalışmada çinko oksit nanopartiküllerinin aspir bitkisinin büyüme ve fizyolojisi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çinko oksit nanopartiküllerin guaikol peroksidaz (hidrojen peroksidin etkisini azaltır), polifenol oksidaz (özellikle kadmiyum stresine karşı serbest radikallerin yayılmasını önler), dehidrojenaz (bitkilerde su emiliminden ve biyokütle artışından sorumlu enzim grubu) ve malondialdehid (lipid peroksidasyonuna bağlı üretilir ve oksidatif strese neden olur) konsantrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bütün konsantrasyonlarda uygulaması yapılan çinko oksit nanopartiküllerinin malondialdehid enziminin aktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir. 100 ppm'de guaikol peroksidaz, 1000 ppm'de dehidrojenaz ve 500 ppm'de ise polifenol oksidaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Yağ asiti desaturaz-2 (*FAD2*) enzimleri; *FAD2* genleri tarafından kodlanan ve çoklu doymamış yağ asitlerinin biyosentez yolağında yer alan yağ asidi desatürazlardan biridir. İlk olarak *FAD2* geninin *Arabidopsis thaliana* bitkisinden izole edildiği rapor edilmiştir (Okuley vd. 1994).

Daha sonra yapılan çalışmalar neticesinde *FAD2* geni soya fasülyesi, kolza, pamuk, yer fıstığı, keten gibi birçok yağ bitkisinden de izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. *Arabidopsis*'te tek bir *FAD2* geni bulunmaktayken diğer bitki türlerinde *FAD2* küçük gen aileleri tarafından kodlanmaktadır. Soya fasülyesinde *FAD2* genini kodlayan dört farklı üye varken pamukta 3 farklı *FAD2* geni mevcuttur (Heppard vd. 1996, Scheffler vd. 1997, Liu 1999a, b, Pirtle vd. 2001, Li vd. 2007, Zhang vd. 2009).

Heppard vd. (1996) soya fasülyesinde *FAD2-1* ve *FAD2-2* genlerini analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre omega 6 desaturazı kodlayan *FAD2-2* geninin vejetatif dokularda ve gelişen tohumlarda çoklu doymamış yağ asidi (linoleik) üretiminden sorumlu olduğunu bulmuşlardır. Tohumda ifade olan *FAD2-1*'in ise tohum gelişimi



esnasında lipitlerin depolanması ve oleik asidin linoleik aside çevriminin kontrolünde etkin görev aldığını ileri sürmüşlerdir.

Schlueter vd. (2006) soya fasulyesinde yaptıkları çalışmada omega 6 yağ asidi türevi olan *FAD2* gen ailesi tanımlanmış ve genom üzerinde 4 bölgeden ve en az 5 üyeden oluştuğu belirlenerek bu *FAD2* gen ailesinin oleik asidi linoleik aside dönüştürdüğü saptanmıştır.

Zhang vd. (2009)'nin yaptıkları çalışmada pamuk bitkisinde *FAD2* gen ailesine yeni bir üye karakterize edilmiştir. *FAD2-4* olarak isimlendirilen bu genin karakterizasyonu ile birlikte pamuk bitkisinde membran lipit desaturasyonunun kompleks bir düzenlemeyle gerçekleştiği saptanmıştır.

Hernandez vd. (2009)'nin yaptıkları çalışmada farklı zeytin çeşitlerinde *FAD2-1*, *FAD2-2* ve *FAD6* genlerinin ifade düzeyleri taranmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *FAD2-2* geninin zeytinyağında linoleik asit içeriğinden sorumlu en temel gen olduğu bulunmuştur.

Pham vd. (2010) mutant *FAD2-1A* ve *FAD2-1B* alellerini bileştirilerek soya tohumunda yüksek oleik asit miktarının üretimini incelemişlerdir. Hata mutasyonu sonucunda her iki mutant gendeki aminoasit değişikliğine bakılmıştır. Çalışma sonucunda *FAD2-1B* alelinin oleik asit seviyesini arttırdığı gözlenmiştir. Fakat *FAD2-1B* alelinin tek başına oleik asit seviyesini düzenlemediği ancak *FAD2-1B* aleli ile birlikte yüksek oleik asit seviyesini düzenledikleri belirtilmiştir.

Zhang vd. (2012) *Arabidopsis* bitkisinde abiyotik strese karşı savunma cevabında önemli olduğu düşünülen *FAD2* geninin, tuz stresine karşı olan cevaptaki rolünü araştırmışlardır. Çalışmanın sonunda *FAD2* geninin tuz stresi altında tohumun çimlenmesi ve erken gelişiminde gerekli olduğunu bulmuşlardır.

Guan vd. (2012)'nin çalışmalarında daha önce izole edilen tohum tipi *FAD2* (*CtFAD2-1*) genine ek olarak iki mikrozomal oleat desaturazı kodlayan *FAD2* (*CtFAD2-2* ve *CtFAD2-3*) geninin izolen edildiğini bildirmişlerdir. Real-Time PCR analizi sonucunda, *CtFAD2-2* geninin hem bitkisel dokularda hem de gelişmekte olan tohumlarda, köklerde, gövdelerde ve yaprak saplarında daha yüksek transkript seviyeleri ile yapısal olarak ifade edildiğini göstermiştir. *CtFAD2-3* transkriptinin, bitkilerin dokularında düşük seviyelerde ifade olduğu gelişmekte olan tohumlarda kuvvetli bir şekilde ifade edildiği saptanmıştır. Ayrıca düşük sıcaklık stresine yanıt olarak *CtFAD2-2* geninin ifadesi kök, gövde ve yaprakta önemli ölçüde azalırken *CtFAD2-3* bu dokularda önemli bir artış göstermiştir. Yapraklarda ise düşük sıcaklıkta *CtFAD2-2*'nin kuvvetli bir şekilde ifade edildiği *CtFAD2-3* transkriptinde ise az bir azalma görüldüğü bildirilmiştir.

Yang vd. (2012)'nin yaptıkları çalışmada kanola (*Brassica napus*)'da *FAD2* ve *FAD3* genlerinin oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olan temel genler olduğunu belirterek bu genleri yapı ve lokus dağılımları açısından araştırmışlardır.

Lee vd. (2013)'nin yaptıkları çalışmada kanola bitkisinde (*Brassica napus*) 4 adet *FAD2* geninin fonksiyonel analizi ve doku spesifik ifade düzeylerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olan *FAD2* genlerinden *BnFAD2-1*, *BnFAD2-2* ve *BnFAD2-4*'ün fonksiyonel enzimleri kodladığını *BnFAD2-3*'ün ise fonksiyonel olmayan bir enzim kodladığını belirlemişlerdir.

Cao vd. (2013)'nin yaptıkları çalışmada aspir bitkisinde (*Carthamus tinctorius* L.) *FAD2* genlerini tanımlamışlardır. Bu çalışma sonucunda aspir bitkisinde *FAD2* genlerinin geniş bir gen ailesi olduğunu belirtmişlerdir ve 11 adet *FAD2* geni üyesi (*CtFAD2-1*, *CtFAD2-2*, *CtFAD2-3*, *CtFAD2-4*, *CtFAD2-5*, *CtFAD2-6*, *CtFAD2-7*, *CtFAD2-8*, *CtFAD2-9*, *CtFAD2-10* ve *CtFAD2-11*) tanımlamışlardır. Bu genlerin bitkinin farklı kısımlarındaki ifade düzeyleri taranarak *FAD* genlerinin biyoteknolojide oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu genler olduğu belirtilmiştir. Çalışmada gen ifadesi düzeylerinin tespitinde SYBR Green boyası ve Real-Time PCR tekniği kullanılmıştır.

Yüksek bitkilerde çoklu doymamış yağ asitlerinin kloroplast ve endoplazmik retikulumda bir grup yağ asidi desaturaz enzimi sayesinde dönüşümü yapılmaktadır. Bu dönüşüm bitkilerin farklı organlarında farklı desaturazlar tarafından gerçekleşmektedir. Örneğin; aspir bitkisinde *FAD3* (fatty acid desaturase-3) geninin en yüksek ifade edildiği kısım çiçektir ve *FAD3* enzimi çiçeklerde yağ asitlerinin dönüşümünden sorumludur. *FAD7* ve *FAD8* desaturazlar ise yaprak, kök ve az da olsa çiçek kısmında desaturasyondan sorumlu enzimlerdir (Guan vd. 2014).

Uygun referans genler (RG'ler) gen ekspresyonunun doğru, hızlı ve karşılaştırmalı miktar tayini analizi için gerekli olan genlerdir. Li vd. (2015) aspir bitkisinde çoklu metabolik yollarında yer alan 15 aday RG'nin tanımlamasını yapmıştır. Bu referans genler *ABCS*, *60SRPL10*, *RANBP1*, *UBCL*, *MFC*, *UBCE2*, *EIF5A*, *COA*, *EF1-β*, *EF1*, *GAPDH*, *ATPS*, *MBF1*, *GTPB* ve *GST* genleridir. Seçilen RG'lerin validasyonunu doğrulamak için soğuk stres altında farklı gelişim aşamalarında aspir tohumlarında 7 *CtFAD2* geninin ekspresyon analizi, normalizasyon için RT-qPCR deneylerinde farklı RG'ler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre seçilen genlerin aspride daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasına yardımcı olacağı bildirilmiştir.

Ketencik bitkisi (*Camelina sativa*) çoklu doymamış linoleik (18: 2 <sup>Δ9,12</sup>) ve α-linolenik (18: 3 <sup>Δ9,12,15</sup>) asitlerce zengin olan bir yağ bitkisidir. Bu yağ asitleri iki farklı mikrozomal desaturaz oleat-12 desaturaz (*FAD2*) ve linoleat-15 desaturaz (*FAD3*) tarafından endoplazmik retikulumda oleik (18:1<sup>Δ9</sup>) asidin ardışık desaturasyonu ile elde edilir. Rodriguez vd. (2016)'nin yaptığı çalışmada bu iki genin (*FAD2* ve *FAD3*) karakterizasyonunu ve ketencik tohumunun yağ bileşimine etkisini araştırmışlardır.

Birçok yağ bitkisinde oleik asidin linoleik aside biyolojik olarak değiştirilmesi, *FAD2* (yağ asidi desaturaz-2) enzimleri olarak sınıflandırılan desaturazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Dar vd. (2017)'nin yaptıkları araştırmada *FAD2* geninin bitkilerdeki oluşumu, düzenlenmesi ve rolleri ayrıntılı olarak işlenmiştir. Araştırmada *FAD2* geninin ifade edildiği yani *FAD2* desaturazların bulunduğu 31 farklı bitki türü değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda bitkilerde yağ kalitesinin ve farklı stres

dirençlerinin geliştirilmesine yardımcı olacağı düşüncesiyle *FAD2* geninin kapsamlı olarak çalışması gerektiği ifade edilmiştir.

Xue vd. (2017a, b)'nin yaptıkları iki farklı çalışmadan birincisinde; *Perilla* (*Perilla frutescens*) bitkisinden *FAD2* genine ait iki *P. frutescens* çeşidi izole edilmiştir. Bunlar 3956 baz uzunluğunda *PfFAD2a* ve 3959 baz uzunluğunda *PfFAD2b* genleridir. İkinci çalışmada ise Çiya (*Chia: Salvia hispanica*) bitkisinden *ShFAD2-1* ve *ShFAD2-2* olmak üzere iki farklı *FAD2* geni izole edilmiştir.

DOXC enzimi, aspirde renkli flavonoidlerin ve bitki hormonlarının biyosentezinde yer alan 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenaz (2OGD)'dir. Tu vd. (2018) çalışmalarında DOXC sınıfı 2OGD'lerin karakterizasyonu üzerine analizler yapmışlardır. Analiz sonucunda etilen biyosentez yolağında *DOXC1* ve *DOXC2*, indol-3-asetik asit yolağında *DOXC3*, *DOXC4* ve *DOXC5*, flavonoidlerin biyosentez yolağında *DOXC6*, *DOXC7* ve *DOXC8* ve skopolamin yolağında *DOXC9* ve *DOXC10* olmak üzere 10 farklı 2OGD'lerin tespiti yapılmıştır. Böylece DOXC sınıfı 2OGD'lerin çeşitlendirilmesinin aspir hatlarının farklı fenotipleri ve kemotiplerinde uzmanlaşmış metabolitlerin çeşitliliğinden kısmen sorumlu olduğu ifade edilmiştir (Tu vd. 2018).

Şakayık ya da ağaç şakayığı (Tree peony: kültür ismi) olarak bilinen bitki türleri (*Paeonia rockii*, *P. potaninii* ve *P. lutea*) toplam yağa oranla % 45 oranında  $\alpha$ -linolenic asit (ALA) içermesinden dolayı son zamanlarda yağ eldesi ve bilimsel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Zhang vd. (2018)'nin yaptıkları çalışmada içerisinde *FAD3* ve *FAD2* genlerinin de bulunduğu 5 yeni yağ sentez genini bu bitki türlerinde tanımlamışlardır. Özellikle *P. potaninii* ve *P. lutea*'ya kıyasla *P. rockii* türünde *FAD3* geninin daha fazla ifade olduğunu ve  $\alpha$ -linolenic asit (ALA) üretiminin *FAD3* desaturaz enzimi kontrolünde gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal Temini

Çalışmamızda kullanılan Aspir bitkisinin çeşitleri Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan 4 farklı aspir çeşidinden üçü yerli iken (BALCI, ASOL ve LİNAS) biri Amerika (BDYAS-4) menşelidir. Çalışmamızda kullanılan aspir çeşitleri ile bunların morfolojik ve teknolojik özellikleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan aspir bitkisinin çeşitleri ve özellikleri

ASOL (TR)	LİNAS (TR)
Tescil yılı: 2015 Islah metodu: Seleksiyon <u>Morfolojik Özellikler:</u> Bitki boyu: 90-100 cm Dallanma: İyi Yapraklar: Orta Dikenlilik: Dikenli Çiçek rengi: Sarı Tohum rengi: Krem <u>Teknolojik Özellikler:</u> Protein (%): 14 Yağ oranı (%): 40-41	Tescil yılı: 2013 Islah metodu: Seleksiyon <u>Morfolojik Özellikler:</u> Bitki boyu: 85-90 cm Dallanma: İyi Yapraklar: Orta Dikenlilik: Dikenli Çiçek rengi: Turuncu Tohum rengi: Krem <u>Teknolojik Özellikler:</u> Protein (%): 14 Yağ oranı (%): 37-38
BALCI (TR)	BDYAS-4 (ABD)
Tescil yılı: 2011 Islah metodu: Seleksiyon <u>Morfolojik Özellikler:</u> Bitki boyu: 55-70 cm Dallanma: İyi Yapraklar: Orta Dikenlilik: Dikenli Çiçek rengi: Sarı Tohum rengi: Krem <u>Teknolojik Özellikler:</u> Protein (%): 14 Yağ oranı (%): 39-41	Tescil yılı: 2016 (Göktürk) <u>Morfolojik Özellikler:</u> Bitki boyu: 80-100 cm Dallanma: Yüksek Yapraklar: Orta Dikenlilik: Dikenli Çiçek rengi: Önce sarı sonra turuncu Tohum rengi: Beyaz <u>Teknolojik Özellikler:</u> Protein (%): 14-16 Yağ oranı (%): 34-36

### 3.2 Besi Ortamının Hazırlanması

Aspir fidelerinin 21 gün süre ile yetiştirilmesinde 1/10'luk (1X) Hoagland besisi ortamı kullanılmıştır. Hoagland besisi ortamının hazırlanmasında kullanılan makro ve mikro besin içerikleri çizelge 3.2'de ve bunların çözeltideki son konsantrasyonları çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Hoagland besisi ortamında bulunan makro ve mikro besin çözeltileri ve içerikleri

Makro Besin Çözeltisi		Mikro Besin Çözeltisi	
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	15.7 g	<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0.124 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2.7 g	<b>MnSO<sub>4</sub></b>	0.066 g
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	24 g	<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.100 g
<b>Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O</b>	47.23 g	<b>NH<sub>4</sub>Mo</b>	0.048 g
<b>KCl</b>	0.0746 g	<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.1553 g
2 L saf su içerisinde çözülür		2 L saf su içerisinde çözülür	

Çizelge 3.3 Hoagland besisi ortamı içerisindeki bileşenlerin son konsantrasyonları

Çözelti içerisindeki iyonların son konsantrasyonları			
<b>Ca</b>	2 mM	<b>Mn</b>	10 <sup>-6</sup> M
<b>NO<sub>3</sub></b>	4 mM	<b>Cu<sup>2+</sup></b>	10 <sup>-7</sup> M
<b>Mg</b>	1 mM	<b>NH<sub>4</sub></b>	10 <sup>-8</sup> M
<b>K</b>	2 mM	<b>Zn</b>	10 <sup>-6</sup> M
<b>P</b>	0.2 mM	<b>Fe</b>	10 <sup>-4</sup> M
<b>B</b>	10 <sup>-6</sup> M		

Her 10L 10X makro besin ortamı için 50 ml makro besin bileşeni karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözelti 1/10 oranında seyreltilmiş ve her 1L 1X konsantrasyondaki solüsyona 1 ml 1000X FeEDTA solüsyonu eklenmiştir (1000X FeEDTA hazırlayabilmek için 365 g FeEDTA 1L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülmüştür).

### 3.3 Stres Uygulaması Yapılacak Ağır Metal Çözeltilerinin Hazırlanması

Aspir çeşitlerine uygulanacak ağır metal solüsyonlarının hazırlanmasında bakır ağır metali için  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Bakır (I) sülfat; 19,716 g) bileşiği, kurşun ağır metali için  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Kurşun nitrat; 8,955 g) bileşiği ve kadmiyum ağır metali için  $\text{CdCl}_2$  (Kadmiyum klorür; 7,164 g) bileşiği belirtilen oranlarda 1X'lik Hoagland solüsyonunda çözülerek hazırlanmıştır. Böylece aspir çeşitlerinin 21 gün süre ile yetiştirilmesinde kullanılan besi ortamının sabit kalması sağlanmıştır.

Ağır metal solüsyonlarının stok çözeltileri 4000 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Aspir çeşitlerinin yetişmesini takip eden sürede maruz kalacakları konsantrasyonlar (40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L) seyreltilerek hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak da herhangi bir ağır metal içermeyen 1X'lik Hoagland solüsyonu kullanılmıştır.

### 3.4 Aspir Bitkisinin Yetiştirilmesi

Tez çalışmasında kullanılacak olan aspir tohumlarının yüzey sterilizasyonunu (% 70 alkol, % 30 sodyum hipoklorit) yapıldıktan sonra steril perlit içeren bitki yetiştirme kaplarına (viyollere) ekimi yapılmıştır. Ekim esnasında viyolün her bir bölmesine eşit sayıda tohumun gelmesine ve homojen şekilde dağılmasına dikkat edilmiştir. Ekimi yapılan 4 farklı aspir çeşidi 21 günlük süre ile iklimlendirme kabininde 24 saatlik periyot içerisinde 16 saat (25 °C, % 70 nem) gündüz, 8 saat (22 °C, % 60 nem) gece döngüsünde, hazırlanan 1X Hoagland çözeltisiyle belli aralıklarda sulanarak yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 İklimlendirme kabini ve aspir bitki çeşitlerinin yetiştirilmesi

### 3.5 Ağır Metal Streslerinin Aspir Fide Çeşitlerine Uygulanması

21 gün süre ile iklimlendirme kabininde büyütülen aspir çeşitleri, 21. günün sonunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L) ağır metal solüsyonu içerisine alınmıştır. Kontrol grubu olarak ağır metal içermeyen 1X Hoagland solüsyonu kullanılmıştır. Böylece kontrol grubuna karşın 5 farklı konsantrasyondan oluşan deney düzeneği kurulmuştur (Şekil 3.2).





Şekil 3.2 Aspir fidelerine ağır metal (örn: kadmiyum) uygulaması hazırlık safhası

Her bir kabın (3 farklı) içerisinde 10'ar adet aspir fidesi gelecek (üç biyolojik tekrar) şekilde ayarlanmıştır. Ağır metal stres uygulaması 24 saat süre ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). 24 saatin sonunda ağır metal stresinden alınan fideler saf su ile yıkanarak suyu alınmış ve örneklem alımı yapılmıştır. Örneklem alımı kök, kotiledon ve yaprak olmak üzere 3 farklı dokudan gerçekleştirilmiş olup alınan örnekler sıvı azot ile muamele edilmiş ve RNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C dondurucuya kaldırılmıştır.



Şekil 3.3 24 saat süre ile ağır metal stresine alınan bazı aspir çeşitleri

### 3.6 Analiz Esnasında Kullanılacak Çalışma Kodlarının Oluşturulması

Tez çalışmasının farklı analiz basamaklarında herhangi bir karışıklık oluşmaması için aspir çeşitleri, stres tipleri ve örneğin alındığı doku tipi parametreleri için birer sembol

belirlenmiştir. Bu semboller kullanılarak kodlar oluşturulmuştur. Bu kodların oluşturulmasında ilk olarak aspir çeşitlerinin maruz bırakıldığı ağır metal stresini sembolize eden bir harf kullanılmıştır. Bakır ağır metali için “B” harfi, kurşun için “L” harfi ve kadmiyum için “K” harfi kullanılmıştır. Farklı aspir çeşitlerini sembolize etmek için rakam kullanılmıştır. Balcı için “2” rakamı, BDYAS-4 için “3” rakamı, Linas için “5” rakamı ve ASOL için “7” rakamı kullanılmıştır. Kodlamada kullanılan 3. sembol aspir çeşitlerinin hangi konsantrasyona maruz kaldığını göstermektedir. Örneğin “40”; 40 mg/L ve “80” ise 80 mg/L gibi. Kodlamadaki son harf ise aspir çeşitlerinin örneklem olarak alınan farklı dokularını ifade etmektedir. Kök için “R” harfi, kotiledon için “C” harfi ve yaprak dokuları için de “Y” harfi kullanılmıştır. Bütün bu sembollerden oluşan kodlar ayrıntılı olarak çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Bakır ağır metaline maruz kalan BALCI aspir çeşidinin kodlaması

		<b>BAKIR (B)</b>		
		Kök (R)	Kotiledon (C)	Yaprak (Y)
<b>BALCI (2)</b>	Kontrol	B-2KR	B-2KC	B-2KY
	40 mg/L	B-240R	B-240C	B-240Y
	80 mg/L	B-280R	B-280C	B-280Y
	160 mg/L	B-2160R	B-2160C	B-2160Y
	320 mg/L	B-2320R	B-2320C	B-2320Y
	640 mg/L	B-2640R	B-2640C	B-2640Y
*BDYAS-4 için “3”, LİNAS için “5”, ASOL için “7”				

Çizelge 3.5 Kadmiyum ağır metaline maruz kalan LiNAS aspir çeşidinin kodlaması

		<b>KADMİYUM (K)</b>		
		Kök (R)	Kotiledon (C)	Yaprak (Y)
<b>LİNAS (5)</b>	Kontrol	K-5KR	K-5KC	K-5KY
	40 mg/L	K-540R	K-540C	K-540Y
	80 mg/L	K-580R	K-580C	K-580Y
	160 mg/L	K-5160R	K-5160C	K-5160Y
	320 mg/L	K-5320R	K-5320C	K-5320Y
	640 mg/L	K-5640R	K-5640C	K-5640Y
*BALCI için “2”, BDYAS-4 için “3”, ASOL için “7”				

Çizelge 3.6 Kurşun ağır metaline maruz kalan BDYAS-4 aspir çeşidinin kodlaması

		KURŞUN (L)		
		Kök (R)	Kotiledon (C)	Yaprak (Y)
BDYAS-4 (3)	Kontrol	L-3KR	L-3KC	L-3KY
	40 mg/L	L-340R	L-340C	L-340Y
	80 mg/L	L-380R	L-380C	L-380Y
	160 mg/L	L-3160R	L-3160C	L-3160Y
	320 mg/L	L-3320R	L-3320C	L-3320Y
	640 mg/L	L-3640R	L-3640C	L-3640Y
*BALCI için "2", LİNAS için "5", ASOL için "7"				

### 3.7 Total RNA İzolasyonu

24 saat süre ile ağır metal stresine maruz kalan farklı aspir çeşitlerinden alınan kök, kotiledon ve yaprak örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen bu örneklerden RNA izolasyonu Trizol (TRIGent) protokolüne (Chomczynski ve Mackey 1995) göre gerçekleştirilmiş ve sonrasında RNA miktar ve saflığı Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Chomczynski ve Mackey 1995).

Uygulanan Trizol Protokolü şu şekildedir:

- 1- Örnekler havan içerisinde sıvı azot yardımıyla ezilir.
- 2- Yaklaşık 300-500 mg ezilmiş örnek 2 ml’lik eppendorf tüpe aktarılır.
- 3- Örneğin aktarıldığı eppendorf tüpün üzerine 1 ml trizol eklenir.
- 4- Eppendorf tüp kuvvetli bir şekilde sallanarak (elle) karışım sağlanır. Daha sonra vortekslenir. Örnekler oda sıcaklığında yaklaşık 10 dk bekletilir.
- 5- Tüp üzerine 250 µl kloroform eklenir, dikkatlice karıştırılır.
- 6- Yeniden oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
- 7- Tüpler 14.000 rpm’de 4 °C’de 10 dk santrifüj edilir.
- 8- Santrifüj sonunda üst sıvı (süpernetant) yeni tüpe dikkatlice aktarılır.
- 9- Süpernetantın aktarıldığı yeni tüp üzerine 250 µl 1.2 M NaCl, 250 µl 0.8 M Na-sitrat ve 250 µl isopropanol eklenir.

- 10- Tüpler 10 dk oda koşullarında (tercihen -20 °C’de 10 saat veya gece boyu) bekletilir.
- 11- 14.000 rpm’de 4 °C’de 10 dk santrifüj edilir.
- 12- Süpernetant yani üst sıvı dikkatlice uzaklaştırılır/atılır. Pellet (RNA) tüp dibinde gözlemlenir.
- 13- Pellet %70 EtOH ile birkaç sefer yıkanır ve dikkatlice soğuk zincirden uzaklaşmadan kurutulur.
- 14- 30-50 µl DEPC (Diethylpirokarbonat) ile muamele edilmiş su eklenir.
- 15- Örnekler 10 dk 55 °C’de inkübe edilir.
- 16- Sonrasında -80 °C’de saklanır.

Trizol protokolüne göre izole edilen RNA’ların saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca izole edilen RNA’ların kalitesi % 1,2’lik agaroz jel elektroforezi yardımıyla da teyit edilmiştir.

### 3.8 DNaz Uygulaması

İzole edilen tüm RNA örnekleri oluşabilecek DNA kontaminasyonuna karşı DNase enzimi (Thermo Scientific EN0521) ile muameleye tabii tutulmuştur. DNaz uygulama basamakları aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- a) RNase free tüpe aşağıdaki tabloda yer alan bileşenler sırasıyla eklenir.

Bileşenler	Miktar
RNA	3 µL (1 µg)
10 X Reaksiyon tamponu (MgCl <sub>2</sub> ’lü)	1 µL
DNase enzimi (1U)	1 µL
DEPC2li ultra saf su ile son hacim 10 µL’ye tamamlanır	

- b) 37 °C’de 1 saat inkübe edilir.
- c) Üzerine 1 µL 50 mM EDTA eklenir.
- d) Daha sonra DNase inhibasyonu için 65 °C’de 10 dk inkübe edilir.

### 3.9 Agaroz Jel Elektrofözezi

İzole edilen RNA'lar kontrol ve teyit amaçlı % 1,2 agaroz konsantrasyonu ve 0,5 µl/ml etidyum bromür içeren jelde, 1X TBE (Tris borat EDTA) tamponu içerisinde 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 1-1,5 saat koşturulmuştur. Jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş (Gene Genius, Syngene) ve fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.10 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

cDNA sentezi, ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (BioLabs Inc.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *FAD2* ve aktin (ACT) gen bölgelerinin uzun olması nedeni ile anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primeri kullanılmıştır. Çizelge 3.7'de cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA-primer karışımı ve bu karışımın içerisinde bulunan bileşenler ve son konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 3.7 Total RNA ve primer karışımının bileşenleri ve son konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyonlar
Total RNA	1-6 µL (1µg'a kadar)
anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> (50µM)	2 µL
ddH <sub>2</sub> O	Toplam hacim 8 µL'ye tamamlanır

cDNA sentez protokolü aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- Çizelge 3.7'de verilen bileşenler soğuk zincir içinde 0,2 mL'lik tüpe sırasıyla eklenmiştir.
- Total RNA-primer karışımı Biorad marka ısı döngü cihazında 65 °C' de 10 dk bekletilmiş ve RNA'nın ikincil yapısının denatürasyonu sağlanmıştır.
- Sonrasında örnekler hemen buz üzerine alınmıştır. Ters transkripsiyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için çizelge 3.8'de verilen diğer bileşenler sırasıyla buz üzerinden almadan eppendorf tüpe eklenmiştir.

Çizelge 3.8 Ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	10 µL
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	2 µL

- d) Yukarıda belirtilen bileşenlerle hazırlanan tüpler pipetaj işleminden sonra santrifüj edilmiştir.
- e) Ters transkripsiyon reaksiyonu çizelge 3.9’de verilen program kullanılarak, Biorad marka ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.9 Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

<b>Primer</b>	<b>Hedef mRNA</b>	<b>İnkübasyon Süresi</b>
Anchored-oligo(dT)18 primer	4 kb’a kadar	70 °C’de 5 dk
		42 °C’de 60 dk
		80 °C’de 5 dk

- f) Elde edilen cDNA’lar Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### 3.11 Primer Dizaynı

Tez çalışmasında housekeeping gen olarak kullanılan Aktin (*ACT*) ve *FAD2* gen bölgelerine ait primerlerin tasarımı gen bankasında (NCBI; National Center for Biotechnology Information) bulunan aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisine ait diziler kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımı için yağ asitleri desaturaz ilişkili genlere (*FAD2*) ait bilgiler gen bankasından (NCBI) alınmıştır. Bu genlere ait bilgiler çizelge 3.10’de verilmiştir. Bu genlere ait diziler belirlenmiş ve en uygun primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 3.11).

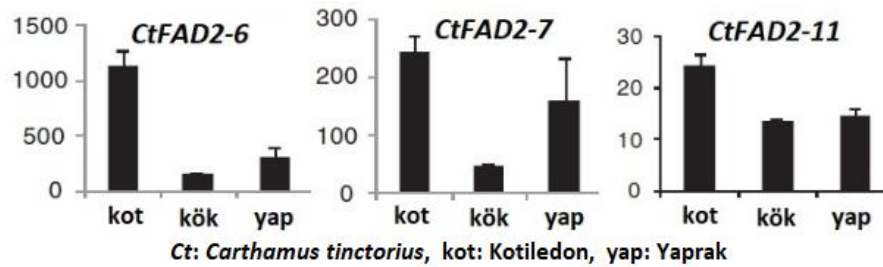
Çizelge 3.10 *FAD2* gen ailesine ait çalışmada kullanılan genlerin bilgileri

Genin Adı	Uzunluğu	GenBank Numarası
<i>FAD2-6</i>	1148 bç	KC257452.1
<i>FAD2-7</i>	1210 bç	KC257453.1
<i>FAD2-11</i>	1213 bç	KC257457.1
<i>ACTIN</i>	1678 bç	KJ634809.1

Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan genler için tasarlanan Real-Time PCR primer dizileri

Primer	Sekans	Primer Uzunluğu (bç)	Bağlanma Sıcaklığı (TM)
<i>CtFAD2-6</i>	F: 5'ACCAATGCAGTCAAGCCCAT 3'	20	60 °C
	R: 5'TCTGCACCTTCATCTGGCTC 3'	20	60 °C
<i>CtFAD2-7</i>	F: 5'CGCAAACCATTTCTACCGC 3'	20	60 °C
	R: 5'CGTCGATTCAGGCCTTGGA 3'	20	60 °C
<i>CtFAD2-11</i>	F: 5'ACGCCTTATTTTCGCCTGGAA 3'	20	60 °C
	R: 5'TCGCGATCTTGACTTACGT 3'	20	60 °C
<i>ACTIN</i>	F: 5'GGCGTGACCTTACAGATTC 3'	19	60 °C
	R: 5'CAAGCTCTTGCTCGTAGTC 3'	19	60 °C

Çalışmada kullanılacak olan üç farklı *FAD2* geninin seçiminde aspir bitkisinin kök, kotiledon ve yaprak dokularında ortak olarak ifade ediliyor olmasına dikkat edilmiştir (Cao vd. 2013) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan *FAD2* genlerinin aspir bitkisinin farklı dokularındaki karşılaştırmalı ifade düzeyleri (Cao vd. 2013'ten değiştirilerek alınmıştır)

### 3.12 Real-Time PCR Reaksiyonu

cDNA sentezini takiben Real-Time PCR uygulamaları Light Cycler Nano (Roche) cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada belirlenen hedef genlere ait diziler NCBI veritabanından araştırılmış/belirlenmiş ve bu bölgelere özgü primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler ticari olarak sentezletirilmiştir. Ayrıca normalizasyon işlemine kullanılmak üzere housekeeping gen olarak Actin (*ACT*) geni seçilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu esnasında SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilen kantitasyonu (miktar belirleme = ekspresyon miktarının tespiti) takiben PCR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi yapılmıştır.

Çalışmalara başlamadan önce reaksiyon koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Bunun için ön denemeler yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda en uygun primer ile cDNA konsantrasyonları belirlenmiştir. Real-Time PCR ön denemeleri esnasında belirlenen koşullar arasında en iyi cq (quantification of cycle) değerini veren koşullar çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Elde edilen optimal koşullar kullanılarak Real-Time PCR reaksiyonları üç teknik tekrar gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonları esnasında kullanılan bileşenleri ve konsantrasyonları (Çizelge 3.12) ile kullanılan koşullarının (Çizelge 3.13) verildiği çizelgeler aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.12 Optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR bileşenleri ve bunların konsantrasyonları

Bileşen	Son Konsantrasyon
cDNA	3 µL (~1,5-2,0 µg)
Forward Primer	1 µM
Reverse Primer	1 µM
Light Cycler® SYBR Green 1 Master	1X
Toplam hacim 20 µl'dir.	



Çizelge 3.13 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

Primer	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 s	40
Bağlanma	60 °C	20 s	
Uzama	72 °C	20 s	
Erime Eğrisi Analizi	60 °C	Sürekli Okuma	1

Farklı konsantrasyonlarda bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal stresine maruz kalan aspir çeşitlerinin kök, kotiledon ve yaprak dokularından alınmış örneklerde *FAD2* ve *ACT* genlerinin Real-Time PCR reaksiyonu eş zamanlı olarak izlenmiş ve pik profilleri kaydedilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda Ct (Cycle Treshold) değeri reaksiyona ait pik profilinde logaritmik artış fazına geçilen döngüyü (ilk noktayı) ifade etmektedir. Her bir örneğe ait Ct değerleri elde edilen bu pik profilleri sayesinde belirlenmiştir. Sentezlenen gen ürünlerinin mRNA seviyeleri elde edilen bu Ct değerleri ve Erime Eğrisi Analizi aracılığıyla kantitatif olarak tespit edilmiştir.

### 3.13 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz

Dört farklı aspir çeşidi yirmibir gün süreyle yetiştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki her bir ağır metal stresi için 3 ayrı kaba 10'ar bitki gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Stres uygulamaları esnasında her bir aspir çeşidi farklı konsantrasyonlara sahip 3 değişik ağır metal stresine 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. 24 saatlik stres uygulamasının ardından her bir aspir çeşidinin farklı dokularından örnekler alınarak elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılarak Real-Time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Ct değeri olarak belirlenen gen ekspresyonu sonuçları housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan *ACT* (aktin) ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Üç farklı ağır metal stresine maruz bırakılan aspir çeşitlerinin kök, kotiledon ve yaprak örneklerine ait transkript profillerinin housekeeping gen olarak seçilen aktinle (*ACT*) karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen

veriler Livak ve Schmittgen'in  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001).

Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (IBM SPSS Statistic-21) ile hesaplanmıştır.

Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için ANOVA, Tukey ve Dunnett çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. Varyansların homojenliği ise Levene testiyle belirlenmiştir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda bir kontrol grubu birden fazla deney grubu ile karşılaştırılıyorsa Dunnett testinin kullanılması önerilmektedir (Dunnett 1955). Bu amaçla, varyansları homojen dağılım gösteren değişkenlere post-hoc Tukey HSD ve (sonuçları teyit etmek için ayrıca Dunnett testi), homojen dağılım göstermeyen değişkenlere ise Dunnett's T3 testi uygulanmıştır (Roscoe 1975).

Bu tez çalışmasında; bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal streslerinin farklı konsantrasyonlarına (**Kontrol, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L**) maruz bırakılan aspir çeşitlerinin (**BALCI, ASOL, LİNAS VE BDYAS-4**) kök, kotiledon ve yaprak doku örneklerinde *FAD2* gen ailesine (*FAD2-6, FAD2-7, FAD2-II*) ait mRNA ifade seviyelerindeki değişimler karşılaştırmalı olarak tespit edilmeye çalışılmıştır.

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Aspir Bitkisinde Ağır Metal Stresi Uygulamaları**

#### **4.1.1 Bakır (Cu) stresi**

21 gün süre ile iklimlendirme kabiniinde büyütülen aspir çeşitleri, 21. günün sonunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (Kontrol, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L) bakır ağır metal solüsyonu içerisine alınmıştır. Kontrol grubu olarak sadece 1X Hoagland solüsyonu kullanılmıştır. Bakır stres uygulaması 24 saat süre ile yine iklimlendirme kabiniinde gerçekleştirilmiştir. 24 saatin sonunda örneklem alımı kök, kotiledon ve yaprak olmak üzere 3 farklı dokudan gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). Alınan örnekler RNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### **4.1.2 Kadmiyum (Cd) stresi**

21 gün süre ile iklimlendirme kabiniinde büyütülen aspir çeşitleri, 21. günün sonunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (Kontrol, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L) kadmiyum ağır metal solüsyonu içerisine alınmıştır. Kontrol grubu olarak sadece 1X Hoagland solüsyonu kullanılmıştır. Kadmiyum stres uygulaması 24 saat süre ile yine iklimlendirme kabiniinde gerçekleştirilmiştir. 24 saatin sonunda örneklem alımı kök, kotiledon ve yaprak olmak üzere 3 farklı dokudan gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). Alınan örnekler RNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### **4.1.3 Kurşun (Pb) stresi**

21 gün süre ile iklimlendirme kabiniinde büyütülen aspir çeşitleri, 21. günün sonunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (Kontrol, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L) kurşun ağır metal solüsyonu içerisine alınmıştır. Kontrol grubu olarak

sadece 1X Hoagland solüsyonu kullanılmıştır. Kurşun stres uygulaması 24 saat süre ile yine iklimlendirme kabinde gerçekleştirilmiştir. 24 saatin sonunda örneklem alımı kök, kotiledon ve yaprak olmak üzere 3 farklı dokudan gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). Alınan örnekler RNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

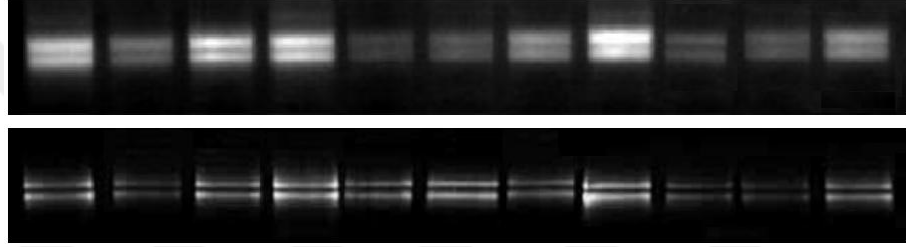


Şekil 4.1 24 saat ağır metal stresi uygulanmış bazı aspir örnekleri

## 4.2 Total RNA İzolasyonu

24 saat süre ile üç farklı ağır metal stresine maruz kalan aspir çeşitlerinden alınan kök, kotiledon ve yaprak doku örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen bu örneklerden RNA izolasyonu Trizol (TRIGent) protokolüne göre yapılmış ve sonrasında RNA miktar ve saflığı Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

İzole edilen RNA'lar teyit amaçlı % 1,2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 İzole edilen RNA'lardan bazılarına ait % 1,2'lik agaroz jel görüntüleri

## 4.3 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

cDNA sentezi, ProtoScript-II First Strand cDNA Synthesis Kit (BioLabs Inc.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *FAD2* ve aktin (*ACT*) gen bölgelerinin uzun olması (400 bp'den uzun) nedeni ile Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primeri tercih edilmiştir. Çizelge 4.1-4.6'da farklı ağır metal stresi uygulanmış aspir çeşitlerinin kök, kotiledon ve yaprak doku örneklerinden elde edilen cDNA'ların saflık ve miktar ölçümleri verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bakır (Cu) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Balcı (2), BDYAS-4 (3)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L	No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L
1a	B-2-KR	1,82	1505,67	19a	B-3-KR	1,81	1546,53
1b	B-2-KR	1,82	1562,34	19b	B-3-KR	1,82	1532,38
2a	B-2-40R	1,83	1531,21	20a	B-3-40R	1,83	1543,95
2b	B-2-40R	1,82	1582,14	20b	B-3-40R	1,82	1575,24
3a	B-2-80R	1,82	1511,34	21a	B-3-80R	1,81	1527,27
3b	B-2-80R	1,82	1534,74	21b	B-3-80R	1,82	1552,08
4a	B-2-160R	1,84	1529,08	22a	B-3-160R	1,81	1465,29
4b	B-2-160R	1,82	1514,38	22b	B-3-160R	1,82	1431,14
5a	B-2-320R	1,86	1552,42	23a	B-3-320R	1,83	1550,73
5b	B-2-320R	1,82	1501,00	23b	B-3-320R	1,82	1500,72
6a	B-2-640R	1,83	1558,96	24a	B-3-640R	1,83	1523,56
6b	B-2-640R	1,82	1587,95	24b	B-3-640R	1,81	1538,10
7a	B-2-KC	1,84	1559,59	25a	B-3-KC	1,82	1505,50
7b	B-2-KC	1,82	1526,65	25b	B-3-KC	1,82	1527,16
8a	B-2-40C	1,85	1484,78	26a	B-3-40C	1,83	1422,76
8b	B-2-40C	1,82	1421,05	26b	B-3-40C	1,82	1436,25
9a	B-2-80C	1,82	1501,33	27a	B-3-80C	1,82	1520,49
9b	B-2-80C	1,81	1595,13	27b	B-3-80C	1,83	1581,85
10a	B-2-160C	1,82	1493,48	28a	B-3-160C	1,82	1493,78
10b	B-2-160C	1,81	1435,41	28b	B-3-160C	1,81	1524,77
11a	B-2-320C	1,82	1412,37	29a	B-3-320C	1,84	1499,87
11b	B-2-320C	1,82	1484,52	29b	B-3-320C	1,83	1468,39
12a	B-2-640C	1,83	1446,56	30a	B-3-640C	1,82	1579,41
12b	B-2-640C	1,82	1405,74	30b	B-3-640C	1,82	1586,28
13a	B-2-KY	1,84	1553,46	31a	B-3-KY	1,84	1596,65
13b	B-2-KY	1,82	1556,29	31b	B-2-KY	1,83	1619,61
14a	B-2-40Y	1,82	1584,89	32a	B-3-40Y	1,82	1594,43
14b	B-2-40Y	1,85	1553,11	32b	B-3-40Y	1,82	1528,02
15a	B-2-80Y	1,82	1552,31	33a	B-3-80Y	1,82	1509,86
15b	B-2-80Y	1,85	1535,26	33b	B-3-80Y	1,81	1493,38
16a	B-2-160Y	1,82	1524,36	34a	B-3-160Y	1,82	1525,24
16b	B-2-160Y	1,82	1568,36	34b	B-3-160Y	1,82	1535,75
17a	B-2-320Y	1,84	1496,35	35a	B-3-320Y	1,83	1531,25
17b	B-2-320Y	1,82	1521,37	35b	B-3-320Y	1,83	1556,02
18a	B-2-640Y	1,85	1587,45	36a	B-3-640Y	1,81	1568,97
18b	B-2-640Y	1,84	1498,92	36b	B-3-640Y	1,80	1537,91
B: bakır stresi, K: kontrol, R: kök, C: kotiledon, Y: yaprak							

Çizelge 4.2 Bakır (Cu) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Linac (5), ASOL (7)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL	No	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL
1a	B-5-KR	1,83	1529,22	19a	B-7-KR	1,81	1447,87
1b	B-5-KR	1,82	1522,23	19b	B-7-KR	1,82	1454,75
2a	B-5-40R	1,81	1553,72	20a	B-7-40R	1,83	1435,42
2b	B-5-40R	1,82	1512,62	20b	B-7-40R	1,83	1475,66
3a	B-5-80R	1,81	1566,01	21a	B-7-80R	1,84	1531,75
3b	B-5-80R	1,82	1576,98	21b	B-7-80R	1,84	1581,17
4a	B-5-160R	1,82	1547,91	22a	B-7-160R	1,81	1550,73
4b	B-5-160R	1,83	1582,04	22b	B-7-160R	1,82	1504,58
5a	B-5-320R	1,82	1653,06	23a	B-7-320R	1,82	1547,56
5b	B-5-320R	1,82	1567,84	23b	B-7-320R	1,83	1538,29
6a	B-5-640R	1,83	1437,91	24a	B-7-640R	1,82	1552,84
6b	B-5-640R	1,82	1431,75	24b	B-7-640R	1,82	1496,39
7a	B-5-KC	1,82	1536,48	25a	B-7-KC	1,83	1552,08
7b	B-5-KC	1,82	1580,58	25b	B-7-KC	1,84	1533,65
8a	B-5-40C	1,84	1586,63	26a	B-7-40C	1,82	1500,08
8b	B-5-40C	1,84	1538,79	26b	B-7-40C	1,82	1532,22
9a	B-5-80C	1,82	1493,39	27a	B-7-80C	1,84	1525,22
9b	B-5-80C	1,84	1523,79	27b	B-7-80C	1,82	1485,92
10a	B-5-160C	1,82	1541,29	28a	B-7-160C	1,82	1475,98
10b	B-5-160C	1,81	1535,12	28b	B-7-160C	1,82	1530,24
11a	B-5-320C	1,82	1514,85	29a	B-7-320C	1,82	1478,47
11b	B-5-320C	1,82	1588,19	29b	B-7-320C	1,81	1543,47
12a	B-5-640C	1,81	1444,88	30a	B-7-640C	1,82	1536,17
12b	B-5-640C	1,82	1466,43	30b	B-7-640C	1,82	1573,99
13a	B-5-KY	1,84	1430,67	31a	B-7-KY	1,86	1512,98
13b	B-5-KY	1,84	1477,74	31b	B-7-KY	1,86	1536,17
14a	B-5-40Y	1,82	1559,18	32a	B-7-40Y	1,85	1509,37
14b	B-5-40Y	1,82	1540,21	32b	B-7-40Y	1,85	1525,13
15a	B-5-80Y	1,84	1566,83	33a	B-7-80Y	1,83	1468,29
15b	B-5-80Y	1,84	1527,96	33b	B-7-80Y	1,84	1480,56
16a	B-5-160Y	1,85	1545,09	34a	B-7-160Y	1,85	1523,96
16b	B-5-160Y	1,84	1540,24	34b	B-7-160Y	1,85	1533,65
17a	B-5-320Y	1,84	1549,69	35a	B-7-320Y	1,83	1509,01
17b	B-5-320Y	1,82	1534,71	35b	B-7-320Y	1,83	1529,77
18a	B-5-640Y	1,85	1544,53	36a	B-7-640Y	1,81	1490,77
18b	B-5-640Y	1,85	1553,14	36b	B-7-640Y	1,80	1499,41

B: bakır stresi, K: kontrol, R: kök, C: kotiledon, Y: yaprak



Çizelge 4.3 Kadmiyum (Cd) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Balcı (2), BDYAS4 (3)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL	No	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL
1a	K-2-KR	1,82	1542,17	19a	K-3-KR	1,81	1525,67
1b	K-2-KR	1,82	1563,99	19b	K-3-KR	1,82	1522,34
2a	K-2-40R	1,83	1512,98	20a	K-3-40R	1,83	1531,21
2b	K-2-40R	1,82	1536,17	20b	K-3-40R	1,82	1582,14
3a	K-2-80R	1,82	1509,37	21a	K-3-80R	1,81	1511,34
3b	K-2-80R	1,82	1525,13	21b	K-3-80R	1,82	1534,74
4a	K-2-160R	1,84	1468,29	22a	K-3-160R	1,81	1529,08
4b	K-2-160R	1,82	1480,56	22b	K-3-160R	1,82	1514,38
5a	K-2-320R	1,86	1523,96	23a	K-3-320R	1,83	1552,42
5b	K-2-320R	1,82	1533,65	23b	K-3-320R	1,82	1501,00
6a	K-2-640R	1,83	1509,01	24a	K-3-640R	1,83	1558,96
6b	K-2-640R	1,82	1505,67	24b	K-3-640R	1,81	1536,17
7a	K-2-KC	1,84	1562,34	25a	K-3-KC	1,82	1573,99
7b	K-2-KC	1,82	1531,21	25b	K-3-KC	1,82	1505,67
8a	K-2-40C	1,85	1582,14	26a	K-3-40C	1,83	1562,34
8b	K-2-40C	1,82	1511,34	26b	K-3-40C	1,82	1531,21
9a	K-2-80C	1,82	1534,74	27a	K-3-80C	1,82	1582,14
9b	K-2-80C	1,81	1529,08	27b	K-3-80C	1,83	1511,34
10a	K-2-160C	1,82	1514,38	28a	K-3-160C	1,82	1534,74
10b	K-2-160C	1,81	1552,42	28b	K-3-160C	1,81	1529,08
11a	K-2-320C	1,82	1501,00	29a	K-3-320C	1,84	1514,38
11b	K-2-320C	1,82	1558,96	29b	K-3-320C	1,83	1552,42
12a	K-2-640C	1,83	1587,95	30a	K-3-640C	1,82	1501,00
12b	K-2-640C	1,82	1559,59	30b	K-3-640C	1,82	1558,96
13a	K-2-KY	1,84	1526,65	31a	K-3-KY	1,84	1587,95
13b	K-2-KY	1,82	1484,78	31b	K-2-KY	1,83	1559,59
14a	K-2-40Y	1,82	1421,05	32a	K-3-40Y	1,82	1526,65
14b	K-2-40Y	1,85	1501,33	32b	K-3-40Y	1,82	1484,78
15a	K-2-80Y	1,82	1595,13	33a	K-3-80Y	1,82	1421,05
15b	K-2-80Y	1,85	1493,48	33b	K-3-80Y	1,81	1501,33
16a	K-2-160Y	1,82	1435,41	34a	K-3-160Y	1,82	1595,13
16b	K-2-160Y	1,82	1536,17	34b	K-3-160Y	1,82	1493,48
17a	K-2-320Y	1,84	1573,99	35a	K-3-320Y	1,83	1435,41
17b	K-2-320Y	1,82	1512,98	35b	K-3-320Y	1,83	1412,37
18a	K-2-640Y	1,85	1536,17	36a	K-3-640Y	1,81	1484,52
18b	K-2-640Y	1,84	1509,37	36b	K-3-640Y	1,80	1446,56

K: kadmiyum stresi, K: kontrol, R: kök, C: kotiledon, Y: yaprak



Çizelge 4.4 Kadmiyum (Cd) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerine [Linac (5), ASOL (7)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L	No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L
1a	K-5-KR	1,83	1612,17	19a	K-7-KR	1,81	1404,58
1b	K-5-KR	1,82	1603,99	19b	K-7-KR	1,82	1447,56
2a	K-5-40R	1,81	1512,98	20a	K-7-40R	1,83	1538,29
2b	K-5-40R	1,82	1536,17	20b	K-7-40R	1,83	1552,84
3a	K-5-80R	1,81	1509,37	21a	K-7-80R	1,84	1496,39
3b	K-5-80R	1,82	1525,13	21b	K-7-80R	1,84	1552,08
4a	K-5-160R	1,82	1468,29	22a	K-7-160R	1,81	1533,65
4b	K-5-160R	1,83	1480,56	22b	K-7-160R	1,82	1500,08
5a	K-5-320R	1,82	1523,96	23a	K-7-320R	1,82	1532,22
5b	K-5-320R	1,82	1533,65	23b	K-7-320R	1,83	1525,22
6a	K-5-640R	1,83	1509,01	24a	K-7-640R	1,82	1485,92
6b	K-5-640R	1,82	1536,17	24b	K-7-640R	1,82	1475,98
7a	K-5-KC	1,82	1573,99	25a	K-7-KC	1,83	1530,24
7b	K-5-KC	1,82	1512,98	25b	K-7-KC	1,84	1536,17
8a	K-5-40C	1,84	1536,17	26a	K-7-40C	1,82	1573,99
8b	K-5-40C	1,84	1504,58	26b	K-7-40C	1,82	1512,98
9a	K-5-80C	1,82	1547,56	27a	K-7-80C	1,84	1536,17
9b	K-5-80C	1,84	1538,29	27b	K-7-80C	1,82	1509,37
10a	K-5-160C	1,82	1552,84	28a	K-7-160C	1,82	1525,13
10b	K-5-160C	1,81	1496,39	28b	K-7-160C	1,82	1468,29
11a	K-5-320C	1,82	1552,08	29a	K-7-320C	1,82	1480,56
11b	K-5-320C	1,82	1533,65	29b	K-7-320C	1,81	1523,96
12a	K-5-640C	1,81	1500,08	30a	K-7-640C	1,82	1533,65
12b	K-5-640C	1,82	1532,22	30b	K-7-640C	1,82	1509,01
13a	K-5-KY	1,84	1504,58	31a	K-7-KY	1,86	1536,17
13b	K-5-KY	1,84	1547,56	31b	K-7-KY	1,86	1573,99
14a	K-5-40Y	1,82	1538,29	32a	K-7-40Y	1,85	1512,98
14b	K-5-40Y	1,82	1552,84	32b	K-7-40Y	1,85	1536,17
15a	K-5-80Y	1,84	1496,39	33a	K-7-80Y	1,83	1509,37
15b	K-5-80Y	1,84	1552,08	33b	K-7-80Y	1,84	1525,13
16a	K-5-160Y	1,85	1533,65	34a	K-7-160Y	1,85	1504,58
16b	K-5-160Y	1,84	1500,08	34b	K-7-160Y	1,85	1547,56
17a	K-5-320Y	1,84	1480,56	35a	K-7-320Y	1,83	1538,29
17b	K-5-320Y	1,82	1523,96	35b	K-7-320Y	1,83	1552,84
18a	K-5-640Y	1,85	1533,65	36a	K-7-640Y	1,81	1496,39
18b	K-5-640Y	1,85	1509,01	36b	K-7-640Y	1,80	1552,08

K: kadmiyum stresi, K: kontrol, R: kök, C: kotiledon, Y: yaprak

Çizelge 4.5 Kurşun (Pb) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerinden [Balcı (2), BDYAS-4 (3)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L	No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L
1a	L-2-KR	1,82	1526,66	19a	L-3-KR	1,81	1513,99
1b	L-2-KR	1,82	1563,65	19b	L-3-KR	1,82	1511,98
2a	L-2-40R	1,83	1509,01	20a	L-3-40R	1,83	1536,17
2b	L-2-40R	1,82	1536,17	20b	L-3-40R	1,82	1504,58
3a	L-2-80R	1,82	1573,99	21a	L-3-80R	1,81	1547,56
3b	L-2-80R	1,82	1512,98	21b	L-3-80R	1,82	1538,29
4a	L-2-160R	1,84	1536,17	22a	L-3-160R	1,81	1523,96
4b	L-2-160R	1,82	1504,58	22b	L-3-160R	1,82	1533,65
5a	L-2-320R	1,86	1547,56	23a	L-3-320R	1,83	1509,01
5b	L-2-320R	1,82	1538,29	23b	L-3-320R	1,82	1536,17
6a	L-2-640R	1,83	1552,84	24a	L-3-640R	1,83	1573,99
6b	L-2-640R	1,82	1496,39	24b	L-3-640R	1,81	1512,98
7a	L-2-KC	1,84	1552,08	25a	L-3-KC	1,82	1536,17
7b	L-2-KC	1,82	1533,65	25b	L-3-KC	1,82	1504,58
8a	L-2-40C	1,85	1500,08	26a	L-3-40C	1,83	1547,56
8b	L-2-40C	1,82	1532,22	26b	L-3-40C	1,82	1538,29
9a	L-2-80C	1,82	1504,58	27a	L-3-80C	1,82	1536,17
9b	L-2-80C	1,81	1547,56	27b	L-3-80C	1,83	1573,99
10a	L-2-160C	1,82	1538,29	28a	L-3-160C	1,82	1512,98
10b	L-2-160C	1,81	1552,84	28b	L-3-160C	1,81	1536,17
11a	L-2-320C	1,82	1496,39	29a	L-3-320C	1,84	1504,58
11b	L-2-320C	1,82	1573,99	29b	L-3-320C	1,83	1547,56
12a	L-2-640C	1,83	1512,98	30a	L-3-640C	1,82	1538,29
12b	L-2-640C	1,82	1536,17	30b	L-3-640C	1,82	1552,84
13a	L-2-KY	1,84	1504,58	31a	L-3-KY	1,84	1496,39
13b	L-2-KY	1,82	1547,56	31b	L-2-KY	1,83	1552,08
14a	L-2-40Y	1,82	1538,29	32a	L-3-40Y	1,82	1533,65
14b	L-2-40Y	1,85	1536,17	32b	L-3-40Y	1,82	1500,08
15a	L-2-80Y	1,82	1573,99	33a	L-3-80Y	1,82	1532,22
15b	L-2-80Y	1,85	1512,98	33b	L-3-80Y	1,81	1504,58
16a	L-2-160Y	1,82	1536,17	34a	L-3-160Y	1,82	1547,56
16b	L-2-160Y	1,82	1504,58	34b	L-3-160Y	1,82	1538,29
17a	L-2-320Y	1,84	1547,56	35a	L-3-320Y	1,83	1552,84
17b	L-2-320Y	1,82	1538,29	35b	L-3-320Y	1,83	1496,39
18a	L-2-640Y	1,85	1573,99	36a	L-3-640Y	1,81	1523,96
18b	L-2-640Y	1,84	1512,98	36b	L-3-640Y	1,80	1533,65

L: kurşun stresi, K: kontrol, R: kök, C: kotiledon, Y: yaprak

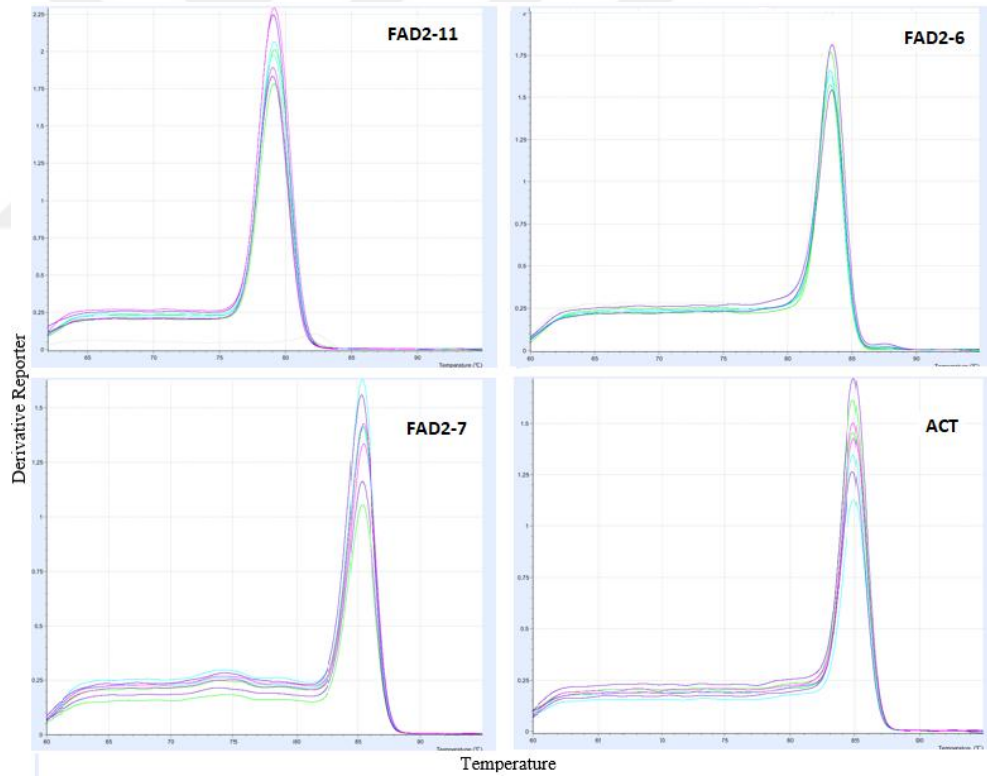
Çizelge 4.6 Kurşun (Pb) stresi uygulanmış farklı aspir çeşitlerinden [Linaz (5), ASOL (7)] ait kök, kotiledon ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lerden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L	No	Stres Uygulaması	260/280	ng/ $\mu$ L
1a	L-5-KR	1,83	1563,99	19a	L-7-KR	1,81	1666,17
1b	L-5-KR	1,82	1522,98	19b	L-7-KR	1,82	1663,99
2a	L-5-40R	1,81	1576,17	20a	L-7-40R	1,83	1512,98
2b	L-5-40R	1,82	1544,58	20b	L-7-40R	1,83	1536,17
3a	L-5-80R	1,81	1557,56	21a	L-7-80R	1,84	1504,58
3b	L-5-80R	1,82	1558,29	21b	L-7-80R	1,84	1547,56
4a	L-5-160R	1,82	1536,17	22a	L-7-160R	1,81	1573,99
4b	L-5-160R	1,83	1573,99	22b	L-7-160R	1,82	1512,98
5a	L-5-320R	1,82	1512,98	23a	L-7-320R	1,82	1536,17
5b	L-5-320R	1,82	1536,17	23b	L-7-320R	1,83	1504,58
6a	L-5-640R	1,83	1504,58	24a	L-7-640R	1,82	1547,56
6b	L-5-640R	1,82	1547,56	24b	L-7-640R	1,82	1538,29
7a	L-5-KC	1,82	1573,99	25a	L-7-KC	1,83	1536,17
7b	L-5-KC	1,82	1512,98	25b	L-7-KC	1,84	1573,99
8a	L-5-40C	1,84	1536,17	26a	L-7-40C	1,82	1512,98
8b	L-5-40C	1,84	1504,58	26b	L-7-40C	1,82	1536,17
9a	L-5-80C	1,82	1547,56	27a	L-7-80C	1,84	1504,58
9b	L-5-80C	1,84	1538,29	27b	L-7-80C	1,82	1547,56
10a	L-5-160C	1,82	1536,17	28a	L-7-160C	1,82	1538,29
10b	L-5-160C	1,81	1573,99	28b	L-7-160C	1,82	1536,17
11a	L-5-320C	1,82	1512,98	29a	L-7-320C	1,82	1573,99
11b	L-5-320C	1,82	1536,17	29b	L-7-320C	1,81	1512,98
12a	L-5-640C	1,81	1504,58	30a	L-7-640C	1,82	1536,17
12b	L-5-640C	1,82	1547,56	30b	L-7-640C	1,82	1504,58
13a	L-5-KY	1,84	1538,29	31a	L-7-KY	1,86	1547,56
13b	L-5-KY	1,84	1573,99	31b	L-7-KY	1,86	1538,29
14a	L-5-40Y	1,82	1512,98	32a	L-7-40Y	1,85	1573,99
14b	L-5-40Y	1,82	1536,17	32b	L-7-40Y	1,85	1536,17
15a	L-5-80Y	1,84	1536,17	33a	L-7-80Y	1,83	1573,99
15b	L-5-80Y	1,84	1573,99	33b	L-7-80Y	1,84	1512,98
16a	L-5-160Y	1,85	1512,98	34a	L-7-160Y	1,85	1536,17
16b	L-5-160Y	1,84	1536,17	34b	L-7-160Y	1,85	1504,58
17a	L-5-320Y	1,84	1504,58	35a	L-7-320Y	1,83	1547,56
17b	L-5-320Y	1,82	1547,56	35b	L-7-320Y	1,83	1573,99
18a	L-5-640Y	1,85	1573,99	36a	L-7-640Y	1,81	1512,98
18b	L-5-640Y	1,85	1512,98	36b	L-7-640Y	1,80	1536,17

L: kurşun stresi, K: kontrol, R: kök, C: kotiledon, Y: yaprak

#### 4.4 Real-Time PCR Reaksiyonu

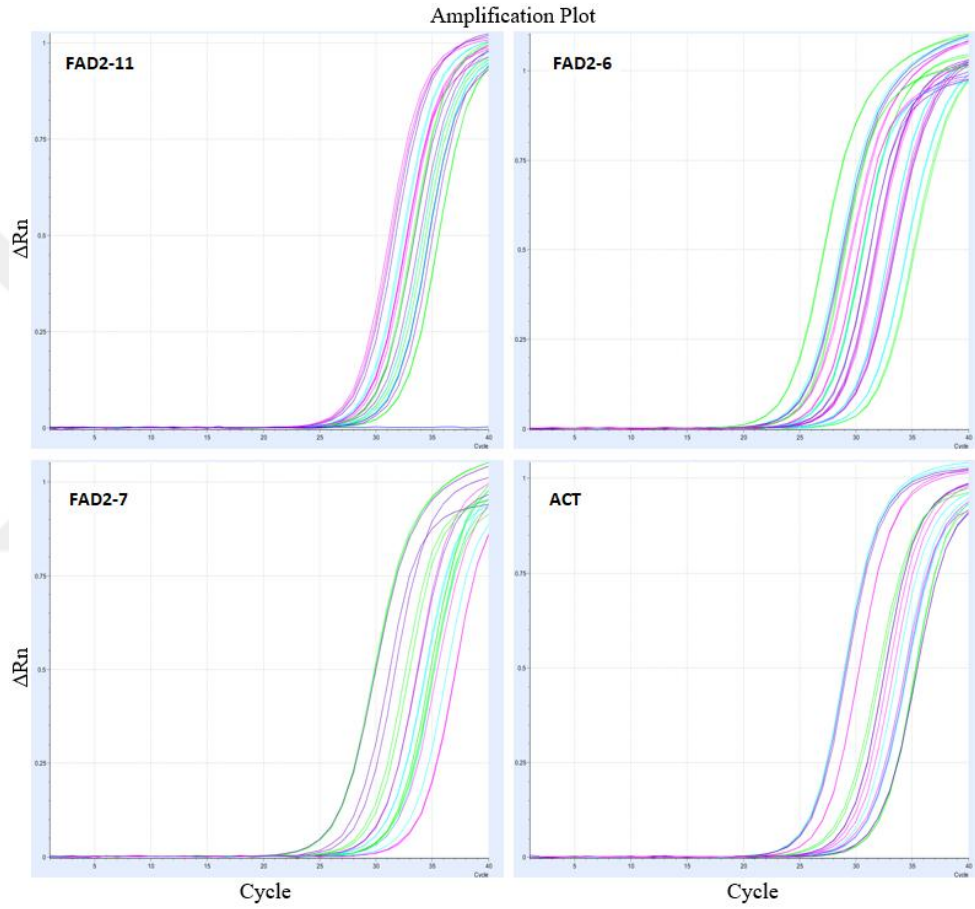
Real-Time PCR reaksiyonu üç tekrarlı olacak şekilde Light Cyler Nano (Roche) cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *FAD* genlerine ait mRNA ifadelerinin normalizasyon işlemi için kullanılmak üzere housekeeping gen olarak Actin (*ACT*) geni seçilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu esnasında SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilen kantitasyonu (miktar belirleme=ekspresyon miktarının tespiti) takiben PCR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla Melting Curve (Erime Eğrisi) analizi yapılmıştır. Stres faktörleri, aspir çeşitleri ve farklı dokulara ait çalışılan bütün genler için bazı örneklere ait olan erime eğrisi (Melting Curve) analiz sonuçları şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Çalışılan bazı örneklerde *ACT* ve *FAD2* genlerinin erime eğrisi analizi

Real-Time PCR reaksiyonunda farklı konsantrasyonlarda bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal stresine maruz kalan farklı aspir çeşitlerinin kök, kotiledon ve yaprak dokularına ait örneklerde *ACT* ve *FAD2* genlerinin Real-Time PCR reaksiyonu eş

zamanlı olarak izlenmiş ve pik profilleri kaydedilmiştir. PCR reaksiyonunda Ct (Cycle Treshold) değeri; reaksiyona ait pik profilinde logaritmik artış fazına geçilen döngüyü (ilk önemli artış olan noktayı) ifade etmektedir. Her bir örneğe ait Ct değerleri elde edilen bu pik profilleri sayesinde belirlenmiştir. Stres faktörleri, aspir çeşitleri ve farklı dokulara ait çalışılan bütün genler için bazı örneklere ait olan Real-Time PCR pik profilleri şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4 Çalışılan bazı örneklerde *ACT* ve *FAD2* genlerinin Real Time PCR pik profilleri

#### 4.5 Real-Time PCR Sonuçlarının Normalizasyonu ve İstatistiksel Analizi

Üç farklı ağır metal stresine maruz bırakılan aspir çeşitlerinin kök, kotiledon ve yaprak dokularına ait transkript profilleri ve kontrol profillerinin housekeeping gen olarak seçilen aktin (*ACT*) ile karşılaştırması yapılmıştır. Elde edilen veriler Livak ve Schmittgen'in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001).

Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (IBM SPSS Statistic-21) ile hesaplanmıştır.

Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için ANOVA, Tukey ve Dunnett çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. Varyansların homojenliği ise Levene testiyle belirlenmiştir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda bir kontrol grubu birden fazla deney grubu ile karşılaştırılıyorsa Dunnett testinin kullanılması önerilmektedir (Dunnett 1955). Bu amaçla, varyansları homojen dağılım gösteren değişkenlere post-hoc Tukey HSD ve (sonuçları teyit etmek için ayrıca Dunnett testi), homojen dağılım göstermeyen değişkenlere ise Dunnett's T3 testi uygulanmıştır (Roscoe 1975).

#### **4.5.1 Bakır (Cu) stresi sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi**

##### **4.5.1.1 BALCI çeşidi**

Farklı konsantrasyonlarda bakır (Cu) stresi uygulanan BALCI çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerinin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri, housekeeping gen olarak kullanılan aktin (*ACT*) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.7). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,032600	0,023067	0,028756	0,040107	0,028776	0,037839	0,075415	0,047104	0,064794
	<b>80 mg/L</b>	0,015474	0,022036	0,015625	0,010598	0,013697	0,009705	0,196554	0,297714	0,245705
	<b>160 mg/L</b>	0,012789	0,012648	0,014408	0,032240	0,023831	0,033960	0,385019	0,396942	0,325787
	<b>320 mg/L</b>	0,025737	0,026060	0,027092	0,015389	0,014488	0,014579	0,007840	0,004996	0,007468
	<b>640 mg/L</b>	0,036524	0,032622	0,030543	0,045154	0,031973	0,032622	0,068251	0,055169	0,066708

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,030586	0,029770	0,028301	0,212274	0,197921	0,199575	4,190145	4,569385	3,972370
	<b>80 mg/L</b>	0,018402	0,023732	0,024552	0,044936	0,051976	0,050136	4,086880	4,118160	3,923116
	<b>160 mg/L</b>	0,018389	0,019317	0,022021	0,219760	0,228458	0,219608	3,508854	4,198867	3,501565
	<b>320 mg/L</b>	0,036348	0,035427	0,034891	0,178130	0,343885	0,285785	0,841479	0,763659	0,490730
	<b>640 mg/L</b>	0,043525	0,050660	0,061811	0,062500	0,073302	0,081616	0,693515	0,990343	0,982821

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,108518	0,149270	0,138696	1,783857	2,297397	2,219139	0,237665	0,228458	0,218242
	<b>80 mg/L</b>	0,071893	0,067452	0,139952	1,088997	1,051173	1,063633	20,477959	10,913183	15,562479
	<b>160 mg/L</b>	0,194791	0,203627	0,196827	2,363623	2,635360	2,536783	0,545632	0,498616	0,578745
	<b>320 mg/L</b>	0,241819	0,242827	0,229251	0,498270	0,487002	0,475659	0,500694	0,517632	0,399980
	<b>640 mg/L</b>	0,125000	0,131488	0,143488	0,859756	0,959264	0,791686	1,223488	1,967004	2,852051

Çizelge 4.8 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	15,64965	10,22171	2,39775	5,05895	1,68295	0,42246	2,92079	0,97165	0,24391
	<b>80 mg/L</b>	9,52709	3,25869	9,78642	1,22671	0,61054	3,12453	0,70824	0,35249	1,80395
	<b>160 mg/L</b>	7,25209	8,64408	14,34087	1,13818	1,72735	2,08053	0,65713	0,99729	1,20119
	<b>320 mg/L</b>	14,36040	4,26039	0,26121	2,11419	0,15802	0,05815	1,22063	0,09123	0,03357
	<b>640 mg/L</b>	18,31624	10,45389	2,46048	4,52803	1,53114	0,37356	2,61426	0,88400	0,21568
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	13,63664	17,65678	18,59443	1,25539	2,12837	1,51181	0,72480	1,22882	0,87285
	<b>80 mg/L</b>	10,21834	4,23551	17,75621	1,44590	0,24112	1,75852	0,83479	0,13921	1,01528
	<b>160 mg/L</b>	9,19766	19,27982	16,32068	1,28658	1,33311	0,93925	0,74281	0,76967	0,54228
	<b>320 mg/L</b>	16,41403	22,97337	3,08384	1,51342	5,65527	0,96597	0,87377	3,26507	0,55771
	<b>640 mg/L</b>	24,00828	6,27329	3,86109	4,94038	0,92114	0,46993	2,85233	0,53182	0,27131
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	25,25063	52,05280	1,07139	3,66284	4,82043	0,33793	2,11474	2,78308	0,19511
	<b>80 mg/L</b>	17,76059	26,60507	68,94573	7,51593	2,07409	1,96295	4,33933	1,19748	1,13331
	<b>160 mg/L</b>	37,97217	62,40647	2,52341	0,78094	1,53874	0,68661	0,45087	0,88839	0,39641
	<b>320 mg/L</b>	45,55923	12,12712	2,24263	2,06927	0,87661	0,89004	1,19469	0,50611	0,51386
	<b>640 mg/L</b>	25,49977	21,60077	9,80563	1,39320	1,37903	5,03193	0,80436	0,79619	2,90519



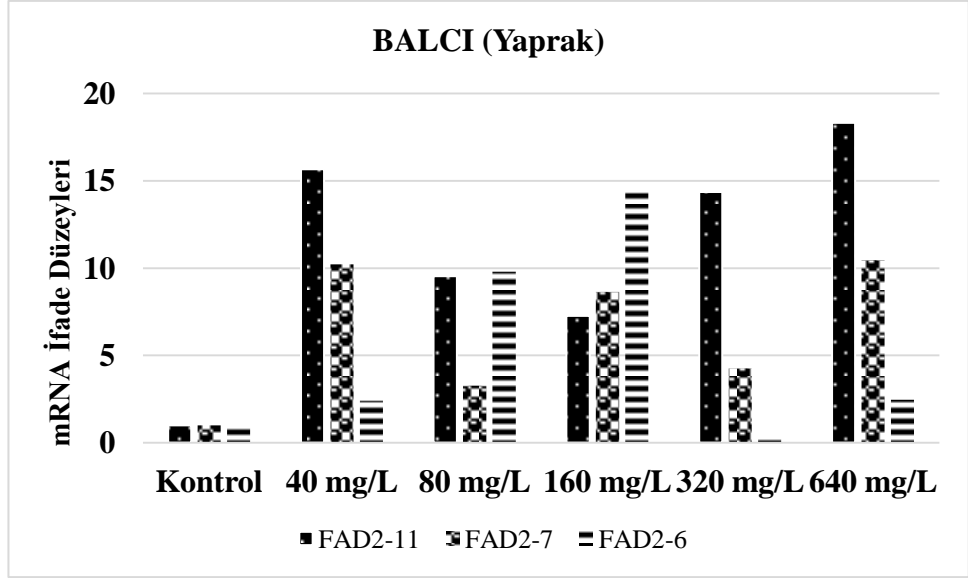
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.5’de verilmiştir. *FAD2-11* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 40 mg/L’de yaklaşık 15 katlık ani bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 160 mg/L’ye kadar azalırken, 320 mg/L konsantrasyonda tekrar artmaya başlayarak 640 mg/L’de yaklaşık 18 kat artış ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. *FAD2-7* gen ifade seviyesi 40 mg/L’de yaklaşık 10 katlık ani bir artışa ulaşmış sonrasında ise 320 mg/L konsantrasyona kadar artan ve azalan bir eğilim göstermiştir. 640 mg/L’de ise en yüksek seviyeye ulaşmıştır. *FAD2-6* gen ifade düzeyi 160 mg/L konsantrasyona kadar artan bir grafik gösterirken, 320 mg/L’de ani bir düşüşle kontrol grubuna göre oldukça azalmış, 640 mg/L’de ise yeniden artmıştır (Çizelge 4.8). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-7*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Bakır stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	*	Ns	**	***	*
<i>FAD2-7</i>	***	Ns	***	*	***
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	*	*

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



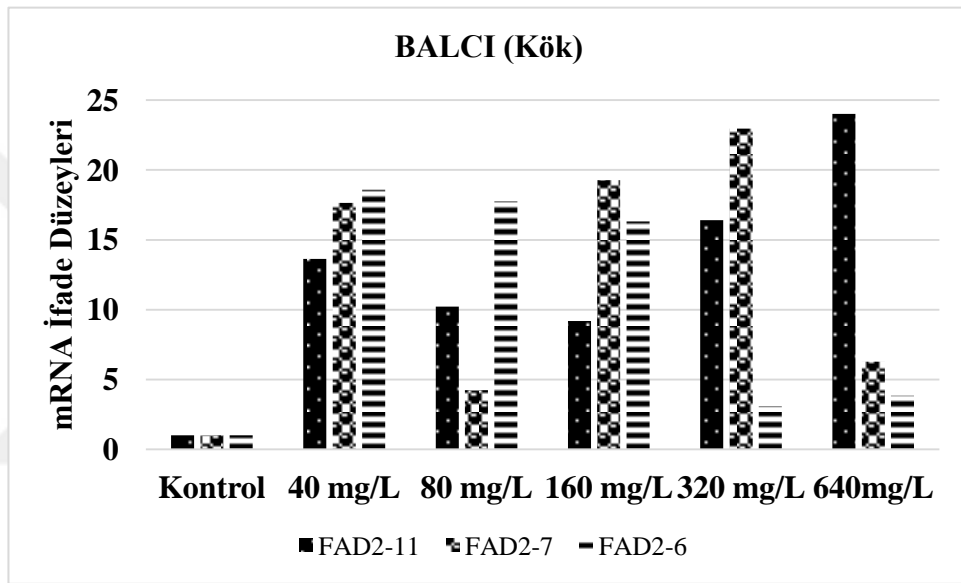
Şekil 4.5 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.6'de verilmiştir. *FAD2-11* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna kıyasla 40 mg/L'de yaklaşık 13 katlık ani bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 160 mg/L'ye kadar azalırken, 320 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 16 kat artmış, 640 mg/L'de ise 24 kat artış ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. *FAD2-7* gen ifade seviyesi 40 mg/L'de yaklaşık 18 katlık ani bir artışa ulaşmıştır. 80 mg/L konsantrasyonda ise yeniden düşmüştür. Fakat 320 mg/L'ye kadar oldukça yükselerek yaklaşık 23 kata ulaşmış ve 640 mg/L'de yeniden düşmüştür. *FAD2-6* gen ifade düzeyinde 40 mg/L'de yaklaşık 19 katlık ani bir artış tespit edilmiş ve artan konsantrasyonlarda bu seviye giderek azalmıştır (Çizelge 4.8). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-7*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Bakır stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	*	*	*	***	*
<i>FAD2-7</i>	***	Ns	***	***	Ns
<i>FAD2-6</i>	*	**	*	Ns	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



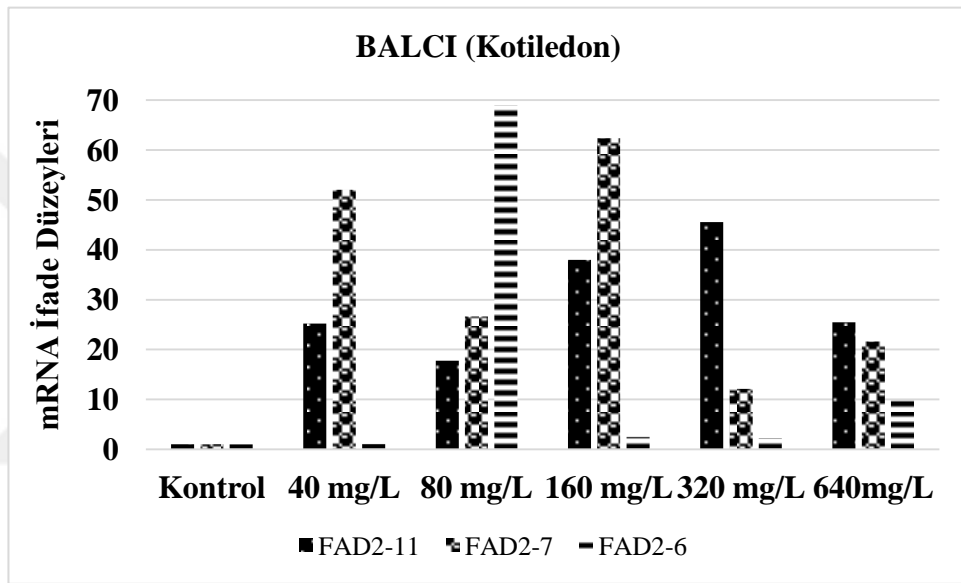
Şekil 4.6 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.7’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 45 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 18 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 320 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 80 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.8). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-7*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Bakır stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	*	Ns	**	*	*
<i>FAD2-7</i>	***	**	***	Ns	*
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	Ns	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.7 Bakır stresi uygulanan BALCI çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.1.2 BDYAS-4 çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda bakır (Cu) stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.12). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.12 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,018776	0,017051	0,016689	0,010821	0,012878	0,012183	0,026571	0,041637	0,019627
	<b>80 mg/L</b>	0,005187	0,005172	0,004766	0,000255	0,000235	0,000206	0,114705	0,201521	0,115743
	<b>160 mg/L</b>	0,093558	0,087717	0,115743	0,004623	0,003396	0,005314	0,173379	0,172659	0,220523
	<b>320 mg/L</b>	0,314036	0,308000	0,388557	0,025862	0,023749	0,028129	0,017936	0,014589	0,017484
	<b>640 mg/L</b>	0,004198	0,004553	0,004496	0,000434	0,000462	0,000506	0,021051	0,017170	0,022406

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	2,005553	1,953417	3,240014	1,997229	2,581125	3,427128	21,068271	17,243730	32,356867
	<b>80 mg/L</b>	1,038859	0,976709	1,410298	1,820078	0,868140	0,936272	1,444930	0,762072	1,145518
	<b>160 mg/L</b>	0,295044	0,241317	0,251739	0,541863	0,548286	0,566835	4,307946	4,907540	4,242751
	<b>320 mg/L</b>	4,296018	5,105315	3,340352	0,930450	1,691145	1,497961	23,506698	25,794651	19,093372
	<b>640 mg/L</b>	0,961927	1,867360	0,987601	2,443586	3,670560	1,917199	0,198609	0,366021	0,216885

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,379718	0,616426	0,374750	0,177883	0,181495	0,177145	0,120910	0,158439	0,066754
	<b>80 mg/L</b>	0,821880	0,638164	0,936921	0,820742	0,731029	0,657471	0,255430	0,243501	0,342933
	<b>160 mg/L</b>	0,346758	0,778085	0,483974	0,928517	1,345367	0,740207	0,490390	0,509799	0,411796
	<b>320 mg/L</b>	1,159096	1,145518	1,290562	0,633317	0,707107	0,618995	0,659754	0,601235	0,643941
	<b>640 mg/L</b>	1,365094	1,548638	1,184272	0,515127	0,416388	0,448133	0,315344	0,417544	0,440435

Çizelge 4.13 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,20602	0,90926	0,70442	0,02916	0,02739	0,18699	0,01684	0,01581	0,10796
	<b>80 mg/L</b>	0,05922	0,01776	3,44860	0,00641	0,00264	0,60798	0,00370	0,00152	0,35102
	<b>160 mg/L</b>	1,15899	0,34140	4,69802	0,16282	0,08823	1,05221	0,09400	0,05094	0,60749
	<b>320 mg/L</b>	3,94107	1,98152	0,41915	0,46491	0,25692	0,11314	0,26842	0,14833	0,06532
	<b>640 mg/L</b>	0,05169	0,03562	0,50805	0,00165	0,00297	0,13908	0,00095	0,00172	0,08030
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,55033	1,56057	2,57069	0,07128	0,45185	0,66367	0,04115	0,26088	0,38317
	<b>80 mg/L</b>	0,26578	0,69412	0,12194	0,03492	0,26990	0,02906	0,02016	0,15583	0,01678
	<b>160 mg/L</b>	0,06304	0,32170	0,50149	0,01676	0,01936	0,09590	0,00968	0,01118	0,05537
	<b>320 mg/L</b>	1,06525	0,80694	2,55612	0,51007	0,26483	0,62659	0,29449	0,15290	0,36176
	<b>640 mg/L</b>	0,32814	1,56911	0,02966	0,22424	0,58741	0,01384	0,12947	0,33914	0,00799
<b>KOTILEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	1,83898	0,76723	1,13290	0,44195	0,04145	0,52609	0,25516	0,02393	0,30374
	<b>80 mg/L</b>	3,27540	3,14683	2,68838	0,79194	0,18088	0,38939	0,45722	0,10443	0,22482
	<b>160 mg/L</b>	2,15452	4,28460	4,55956	0,77066	1,22941	0,79458	0,44494	0,70980	0,45875
	<b>320 mg/L</b>	4,88732	2,79960	6,11191	0,58131	0,20280	0,21916	0,33562	0,11709	0,12653
	<b>640 mg/L</b>	5,53135	1,96931	3,77943	0,43000	0,18402	0,74524	0,24826	0,10624	0,43026

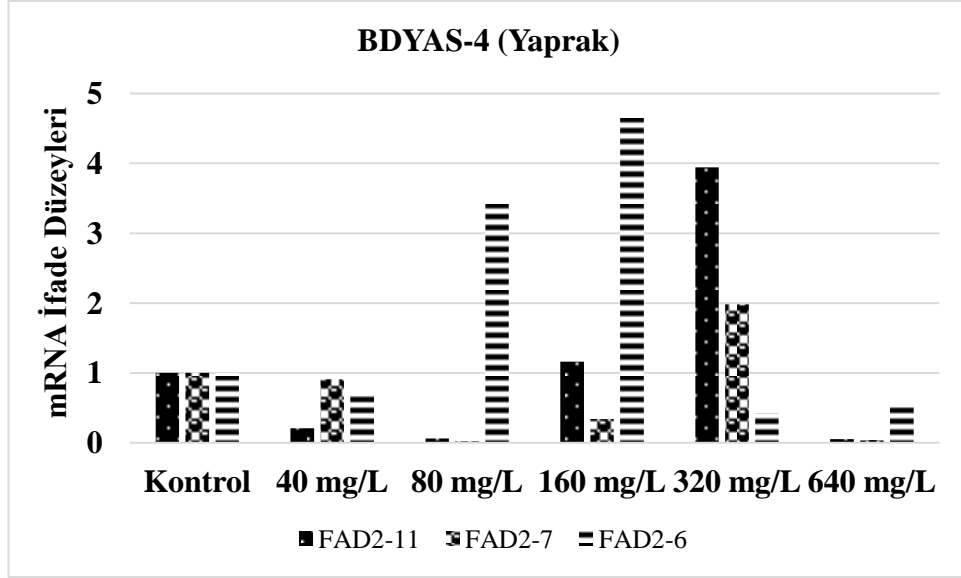
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.8’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 4 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.13). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-7*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 Bakır stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	**	Ns	*	**
<i>FAD2-7</i>	Ns	***	***	***	***
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	Ns	Ns

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.8 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

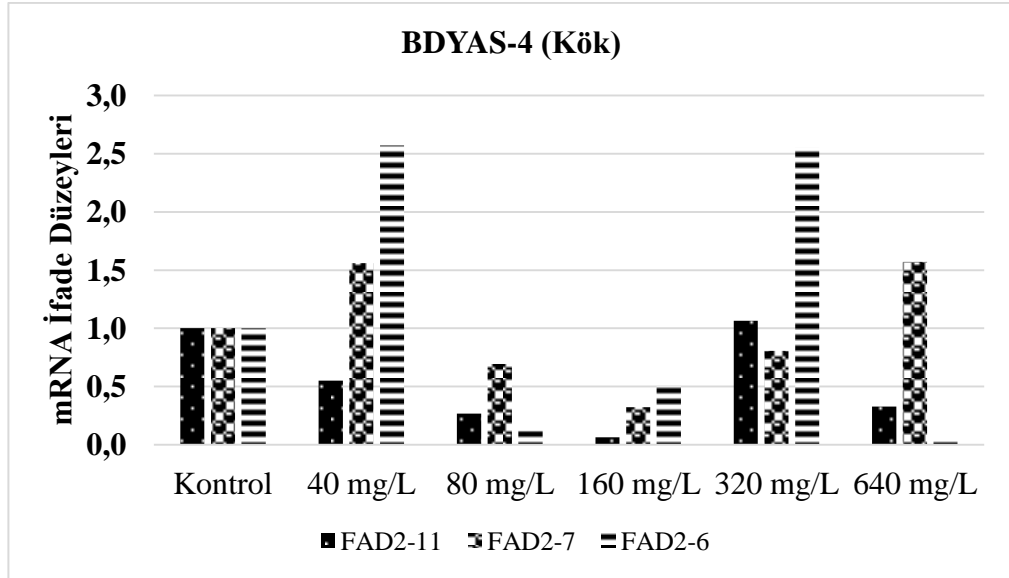
Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.9’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 2,5 kat ile en yüksek 40 mg/L ve 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 40 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 640 mg/L’dir (Çizelge 4.13). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-7* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-11*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 Bakır stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	*	**	***	Ns	**
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	**	Ns	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	**	*	*	**

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)





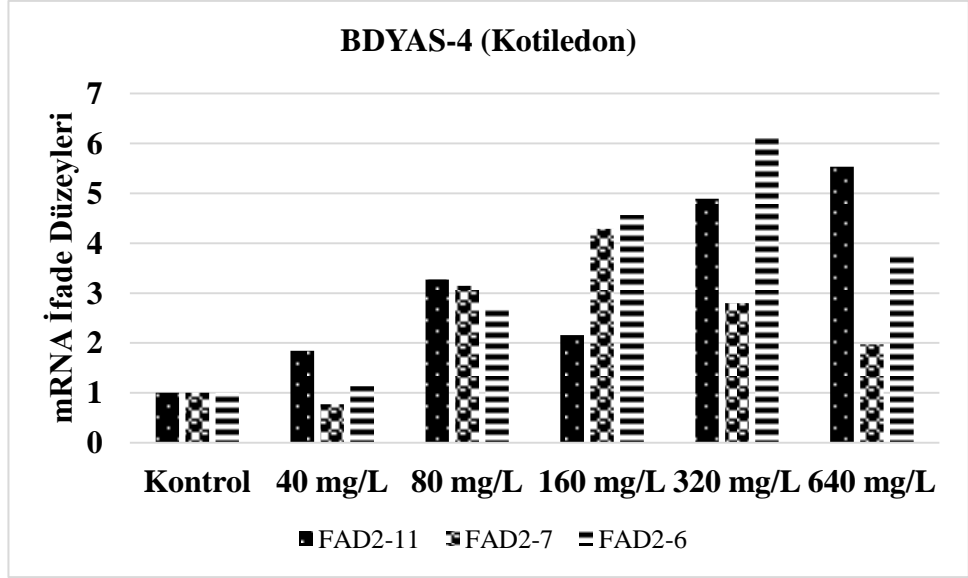
Şekil 4.9 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.10'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 6 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 40 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 2 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 40 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 40 mg/L'dir (Çizelge 4.13). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 (*FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 Bakır stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	**	Ns	***	***
<i>FAD2-7</i>	Ns	**	Ns	*	*
<i>FAD2-6</i>	Ns	**	***	***	***

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.10 Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.1.3 LİNAS çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda bakır (Cu) stresi uygulanan LİNAS çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.17). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.17 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,576343	0,570777	0,546389	0,398596	0,334250	0,336342	0,628071	0,545254	0,562529
	<b>80 mg/L</b>	0,047828	0,047531	0,048732	0,037760	0,031099	0,033539	0,070024	0,057035	0,065789
	<b>160 mg/L</b>	0,083389	0,083563	0,077913	0,076203	0,083795	0,091696	0,156909	0,163913	0,110109
	<b>320 mg/L</b>	0,474671	0,459456	0,517274	0,278548	0,262066	0,310787	0,495515	0,302918	0,460413
	<b>640 mg/L</b>	0,418123	0,435577	0,349654	0,450938	0,426613	0,327826	0,151669	0,177883	0,220523

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,627201	0,632002	0,607097	0,249827	0,421031	0,266277	0,125087	0,163119	0,077697
	<b>80 mg/L</b>	0,016654	0,034008	0,033796	0,157782	0,266462	0,179120	0,086689	0,306934	0,191312
	<b>160 mg/L</b>	0,023831	0,024197	0,049412	0,080716	0,086810	0,170755	0,148960	0,158329	0,301243
	<b>320 mg/L</b>	0,147829	0,238490	0,196146	0,340329	0,535144	0,480630	0,365768	0,316439	0,320856
	<b>640 mg/L</b>	0,089374	0,091062	0,114546	0,170873	0,206326	0,137071	0,279709	0,224845	0,285983

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,759436	1,114966	0,794985	0,095061	0,082184	0,109728	0,064614	0,071744	0,041349
	<b>80 mg/L</b>	0,904379	0,677362	0,443191	0,110644	0,101391	0,067827	0,034435	0,033773	0,035378
	<b>160 mg/L</b>	0,199851	0,201102	0,289373	0,115904	0,122089	0,120742	0,061214	0,046263	0,067172
	<b>320 mg/L</b>	0,203204	0,307360	0,261159	0,097328	0,111259	0,086150	0,050695	0,082412	0,089622
	<b>640 mg/L</b>	0,069156	0,083216	0,037395	0,080159	0,068251	0,045563	0,049071	0,068441	0,044780

Çizelge 4.18 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Hata			Standart Sapma		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	8,39685	9,71704	7,75369	0,41647	1,43460	1,23540	0,24045	0,82827	0,71326
	<b>80 mg/L</b>	0,71418	0,92850	0,85593	0,01962	0,11416	0,09517	0,01133	0,06591	0,05495
	<b>160 mg/L</b>	1,21438	2,27720	1,97064	0,07615	0,19837	0,69643	0,04397	0,11453	0,40208
	<b>320 mg/L</b>	7,18868	7,68719	5,49709	0,33927	0,12300	0,79313	0,19588	0,07101	0,45791
	<b>640 mg/L</b>	5,97464	11,04703	2,44064	0,81481	2,66538	0,45699	0,47043	1,53886	0,26384
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	21,72537	24,98494	9,65203	4,88303	11,92643	2,81343	2,81922	6,88573	1,62434
	<b>80 mg/L</b>	0,96684	15,99135	15,31854	0,38203	7,29866	7,75784	0,22057	4,21388	4,47899
	<b>160 mg/L</b>	1,06279	8,10906	16,47391	0,22857	0,90857	7,72605	0,13196	0,52456	4,46064
	<b>320 mg/L</b>	6,80145	34,98766	26,90692	2,47309	11,65494	3,49816	1,42784	6,72898	2,01966
	<b>640 mg/L</b>	3,35926	13,84117	21,29567	0,31249	5,81812	4,10248	0,18041	3,35909	2,36857
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	58,49239	23,45923	30,16695	21,16872	4,62733	7,48355	12,22177	2,67159	4,32063
	<b>80 mg/L</b>	47,31467	22,55803	17,67609	28,05617	4,29628	1,22927	16,19824	2,48046	0,70972
	<b>160 mg/L</b>	14,46213	29,21194	29,95519	2,03249	2,23540	6,75816	1,17346	1,29061	3,90183
	<b>320 mg/L</b>	16,57346	23,90170	37,78259	4,79114	2,31777	9,95296	2,76617	1,33816	5,74635
	<b>640 mg/L</b>	4,38973	15,61766	27,47067	2,36646	3,45049	4,94963	1,36628	1,99214	2,85767

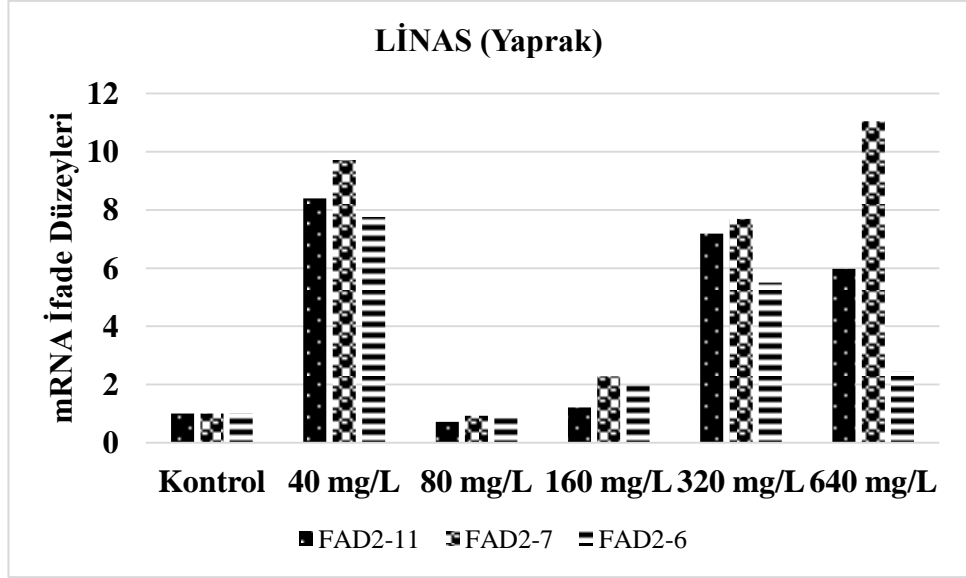
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.11’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 9 kat ile en yüksek 40 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 80 mg/L’dir (Çizelge 4.18). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Bakır stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	*	*	**	*
<i>FAD2-7</i>	*	Ns	*	*	*
<i>FAD2-6</i>	**	Ns	Ns	Ns	Ns

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



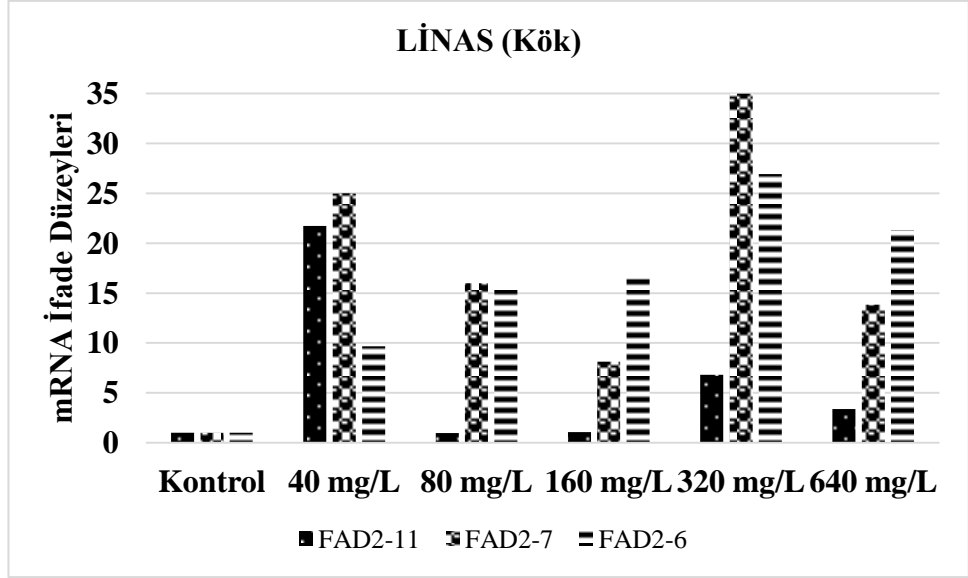
Şekil 4.11 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler Şekil 4.12’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 21 kat ile en yüksek 40 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 160 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 40 mg/L’dir (Çizelge 4.18). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 Bakır stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidinde ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	Ns	Ns	***	***
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	*	*	***	**

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



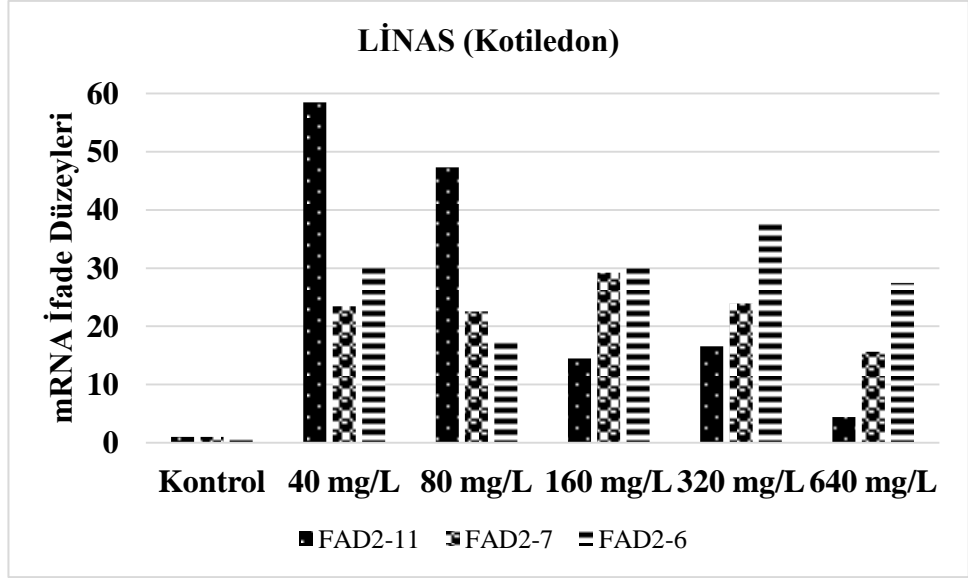
Şekil 4.12 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.13’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 58 kat ile en yüksek 40 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 5 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 640 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 80 mg/L’dir (Çizelge 4.18). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21 Bakır stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
<i>FAD2-7</i>	*	Ns	**	*	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	**	*	Ns	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.13 Bakır stresi uygulanan LİNAS çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.1.4 ASOL çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda bakır (Cu) stresi uygulanan LİNAS çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.22). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.23).



Çizelge 4.22 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,269807	0,229092	0,256317	0,186597	0,134158	0,157782	0,294023	0,218848	0,263888
	<b>80 mg/L</b>	0,341510	0,341510	0,416677	0,269620	0,223446	0,286777	0,500000	0,409802	0,562529
	<b>160 mg/L</b>	0,204617	0,202361	0,230526	0,186986	0,202922	0,271307	0,385019	0,396942	0,325787
	<b>320 mg/L</b>	0,386623	0,380245	0,390664	0,226880	0,216885	0,234718	0,403601	0,250694	0,347720
	<b>640 mg/L</b>	0,813943	0,793884	0,548286	0,877822	0,777546	0,514057	0,295248	0,324210	0,345798

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,125434	0,153680	0,093363	0,124913	0,203063	0,098755	0,062543	0,078672	0,028816
	<b>80 mg/L</b>	0,180116	0,306934	0,385553	0,315563	0,272816	0,255962	0,173379	0,314253	0,273384
	<b>160 mg/L</b>	0,087900	0,084202	0,073404	0,161432	0,191312	0,165282	0,297921	0,348928	0,291587
	<b>320 mg/L</b>	0,785673	0,916369	0,609205	0,170164	0,303549	0,273194	0,182884	0,179493	0,182378
	<b>640 mg/L</b>	0,134530	0,208627	0,129139	0,341747	0,410086	0,250694	0,139855	0,111723	0,130761

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,189859	0,308213	0,187375	0,177883	0,181495	0,177145	0,120910	0,158439	0,066754
	<b>80 mg/L</b>	0,821880	0,638164	0,936921	0,820742	0,731029	0,657471	0,255430	0,243501	0,342933
	<b>160 mg/L</b>	0,346758	0,778085	0,483974	0,928517	1,345367	0,740207	0,490390	0,509799	0,411796
	<b>320 mg/L</b>	0,289774	0,286379	0,645281	0,633317	0,707107	0,618995	0,659754	0,601235	0,643941
	<b>640 mg/L</b>	0,170637	0,193580	0,148034	0,515127	0,416388	0,448133	0,315344	0,417544	0,440435

Çizelge 4.23 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,94471	1,09166	0,86755	0,03336	0,14549	0,08108	0,01926	0,08400	0,04681
	<b>80 mg/L</b>	1,38013	1,77597	1,63842	0,18419	0,06263	0,05936	0,10634	0,03616	0,03427
	<b>160 mg/L</b>	0,79980	1,50553	1,26841	0,07320	0,22608	0,34370	0,04226	0,13053	0,19843
	<b>320 mg/L</b>	1,45178	1,55396	1,10833	0,07061	0,09066	0,14029	0,04077	0,05234	0,08099
	<b>640 mg/L</b>	2,70180	5,02902	1,09384	0,55771	1,55321	0,21495	0,32199	0,89675	0,12410
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,64670	1,71509	1,16894	0,35075	0,78337	0,56124	0,20250	0,45228	0,32403
	<b>80 mg/L</b>	1,40036	3,33172	5,15668	0,57889	0,39082	1,51112	0,33422	0,22564	0,87245
	<b>160 mg/L</b>	0,41051	2,05439	6,37747	0,15490	0,34300	0,88083	0,08943	0,19803	0,50854
	<b>320 mg/L</b>	3,97649	2,97248	3,69325	1,99933	0,97376	0,15779	1,15431	0,56220	0,09110
	<b>640 mg/L</b>	0,82241	3,99797	2,58932	0,49176	1,21514	0,28162	0,28392	0,70156	0,16259
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,93895	0,76723	1,02895	0,25466	0,04145	0,38016	0,14703	0,02393	0,21948
	<b>80 mg/L</b>	3,31570	3,14683	2,52863	0,72804	0,18088	0,54151	0,42033	0,10443	0,31264
	<b>160 mg/L</b>	2,20366	4,28460	4,22510	0,84889	1,22941	0,42375	0,49011	0,70980	0,24465
	<b>320 mg/L</b>	1,69938	2,79960	5,71746	0,91610	0,20280	0,53747	0,52891	0,11709	0,31031
	<b>640 mg/L</b>	0,70364	1,96931	3,50550	0,07094	0,18402	0,53785	0,04096	0,10624	0,31053

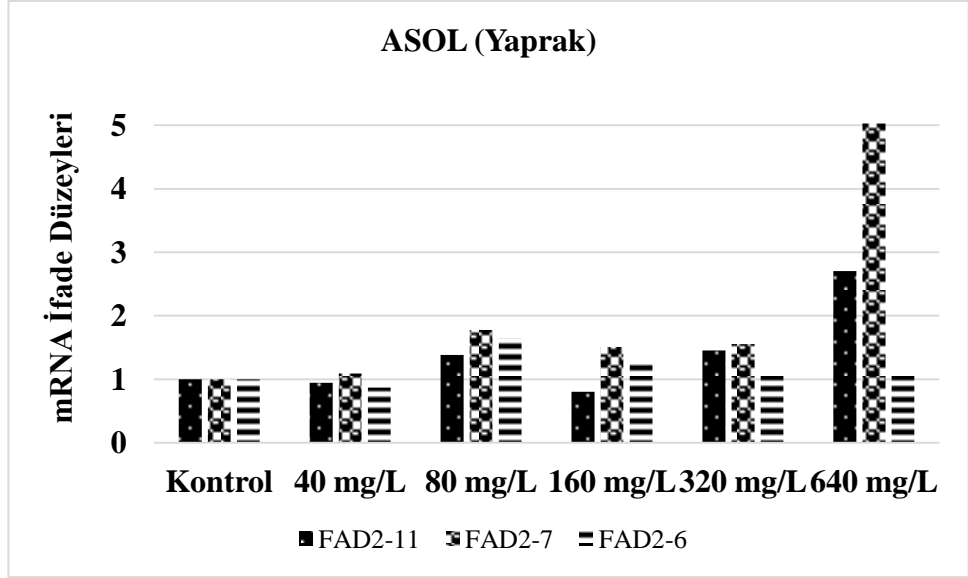
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.14'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 3 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 40 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 80 mg/L ve 40 mg/L'dir (Çizelge 4.23). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 (*FAD2-11*, *FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.24 Bakır stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	*	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	Ns	*	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	***	Ns	Ns	Ns

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



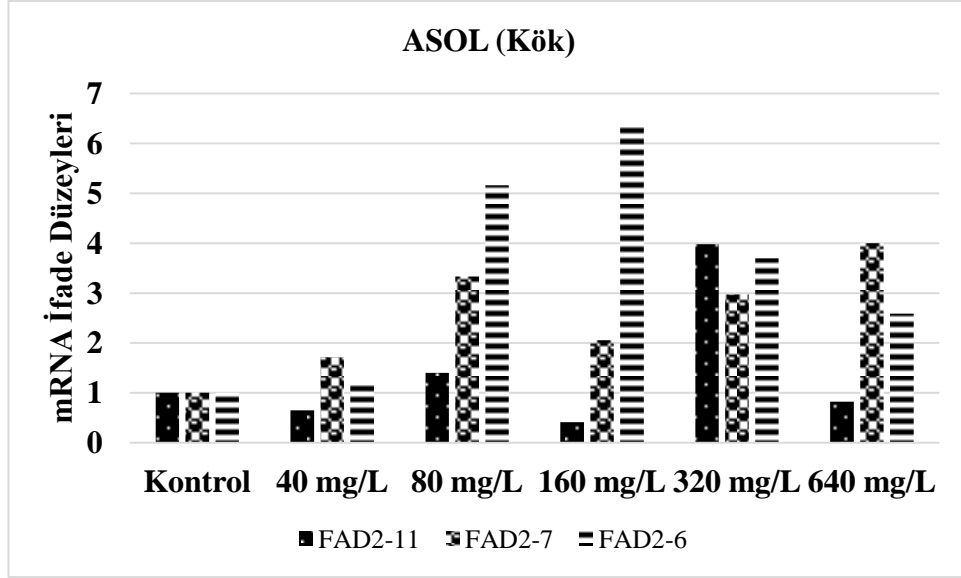
Şekil 4.14 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.15’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 4 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 40 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 40 mg/L’dir (Çizelge 4.23). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-11* ve *FAD2-7*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.25 Bakır stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	***	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	**	Ns	*	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	***	*

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



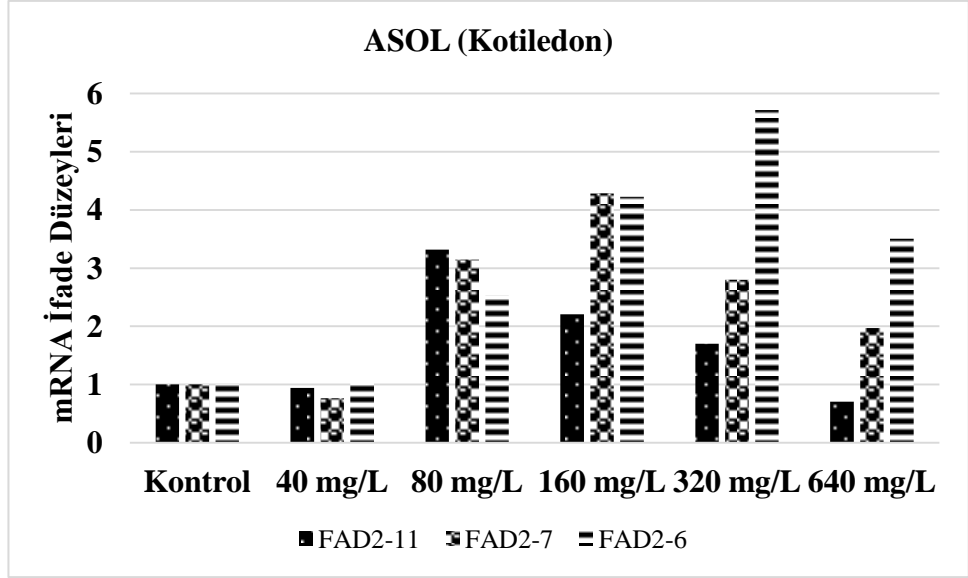
Şekil 4.15 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.16'da verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 3 kat ile en yüksek 80 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 40 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 40 mg/L'dir (Çizelge 4.23). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 (*FAD2-11*, *FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26 Bakır stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	**	Ns	*	*
<i>FAD2-6</i>	Ns	**	***	***	***

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.16 Bakır stresi uygulanan ASOL çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2 Kurşun (Pb) stresi sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi

##### 4.5.2.1 BALCI çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kurşun (Pb) stresi uygulanan BALCI çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.27). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.27 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,498270	0,506980	0,465870	0,613017	0,632440	0,613017	1,152686	1,035265	1,049717
	<b>80 mg/L</b>	0,000553	0,000570	0,000559	0,000379	0,000354	0,000347	0,007022	0,007694	0,008790
	<b>160 mg/L</b>	0,013194	0,012656	0,013773	0,033262	0,023848	0,032464	0,397217	0,397217	0,311434
	<b>320 mg/L</b>	1,485553	1,507335	1,453973	0,888227	0,837987	0,782412	0,452503	0,288972	0,400813
	<b>640 mg/L</b>	0,003482	0,004222	0,004115	0,004304	0,004138	0,004395	0,006506	0,007139	0,008987

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,432568	0,416388	0,441046	3,002158	2,768299	3,110184	59,260545	63,911339	61,905685
	<b>80 mg/L</b>	0,005933	0,005567	0,005680	0,014488	0,012191	0,011598	1,317680	0,965936	0,907519
	<b>160 mg/L</b>	0,015198	0,018149	0,021838	0,181621	0,214641	0,217789	2,899894	3,944931	3,472561
	<b>320 mg/L</b>	0,128425	0,117522	0,142398	0,629379	1,140764	1,166349	2,973166	2,533269	2,002775
	<b>640 mg/L</b>	0,001596	0,001786	0,001622	0,002292	0,002584	0,002142	0,025436	0,034915	0,025791

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,111491	0,126219	0,118915	1,832737	1,942615	1,902637	0,244177	0,193178	0,187115
	<b>80 mg/L</b>	0,000553	0,000552	0,001126	0,008373	0,008603	0,008555	0,157454	0,089312	0,125173
	<b>160 mg/L</b>	0,131124	0,157891	0,158329	1,591073	2,043440	2,040609	1,469169	1,546493	1,862190
	<b>320 mg/L</b>	1,304051	1,422077	1,429985	2,687007	2,852051	2,966990	0,337509	0,378929	0,623733
	<b>640 mg/L</b>	0,005205	0,005183	0,005929	0,035797	0,037812	0,032713	0,050942	0,038768	0,058924

Çizelge 4.28 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,92267	0,60891	0,14279	0,20562	0,02228	0,00819	0,11871	0,01286	0,00473
	<b>80 mg/L</b>	0,00105	0,00035	0,00105	0,00020	0,00002	0,00021	0,00012	0,00001	0,00012
	<b>160 mg/L</b>	0,02481	0,02928	0,04884	0,00516	0,00465	0,00756	0,00298	0,00268	0,00437
	<b>320 mg/L</b>	2,78462	0,82175	0,04988	0,57802	0,05378	0,00719	0,33372	0,03105	0,00415
	<b>640 mg/L</b>	0,00730	0,00420	0,00101	0,00069	0,00006	0,00024	0,00040	0,00004	0,00014
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	2,13184	2,75812	2,90723	0,10186	0,21624	0,07410	0,05881	0,12485	0,04278
	<b>80 mg/L</b>	0,02838	0,01188	0,05039	0,00111	0,00145	0,01229	0,00064	0,00084	0,00710
	<b>160 mg/L</b>	0,09132	0,19053	0,16177	0,01798	0,01863	0,02135	0,01038	0,01075	0,01233
	<b>320 mg/L</b>	0,64235	0,91064	0,11852	0,07451	0,28058	0,02678	0,04302	0,16199	0,01546
	<b>640 mg/L</b>	0,00826	0,00218	0,00135	0,00042	0,00017	0,00024	0,00024	0,00010	0,00014
<b>KOTILEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,89085	1,83915	0,93892	0,08504	0,01671	0,12140	0,04910	0,00965	0,07009
	<b>80 mg/L</b>	0,00551	0,00827	0,56492	0,00222	0,00008	0,17069	0,00128	0,00005	0,09855
	<b>160 mg/L</b>	1,11653	1,83498	7,54264	0,13012	0,21220	2,42528	0,07512	0,12251	1,40023
	<b>320 mg/L</b>	10,37166	2,75451	2,12765	0,71131	0,08553	1,15780	0,41067	0,04938	0,66846
	<b>640 mg/L</b>	0,04064	0,03446	0,23051	0,00185	0,00263	0,08595	0,00107	0,00152	0,04963



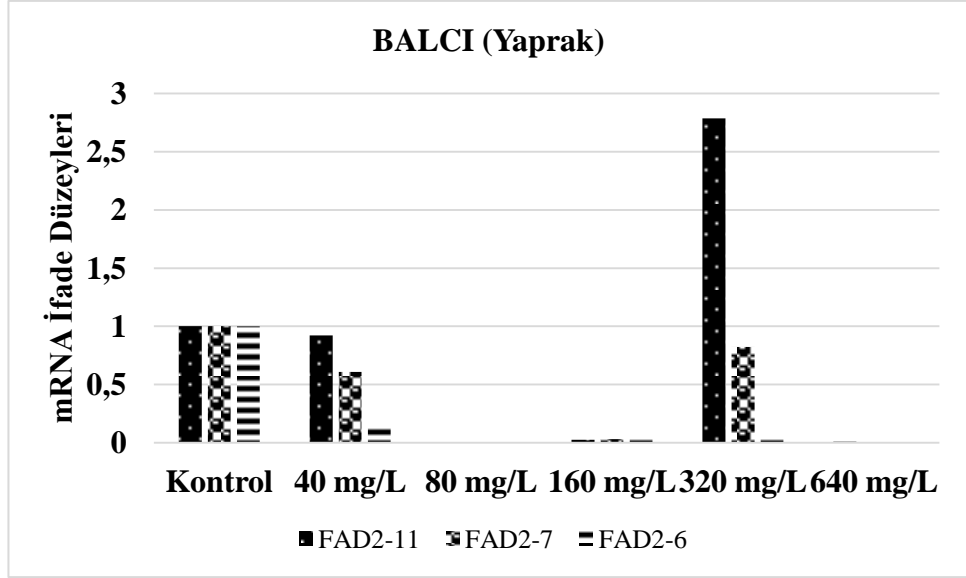
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kurşun stresi uygulanan Balcı çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.17’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 3 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 80 mg/L’dir (Çizelge 4.28). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.29 Kurşun stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	*	*	*	*
<i>FAD2-7</i>	***	***	***	Ns	***
<i>FAD2-6</i>	*	*	*	*	*

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



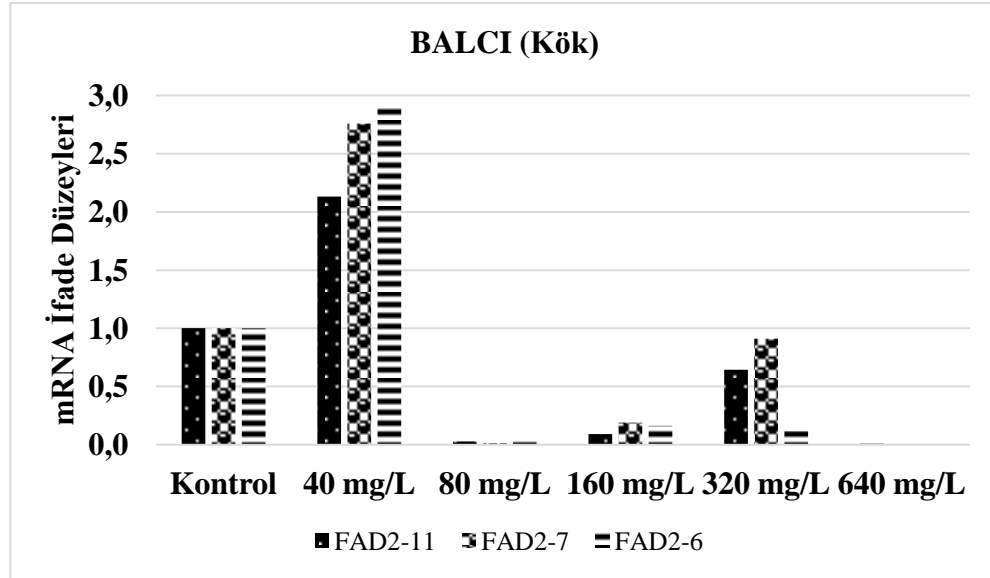
Şekil 4.17 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan Balcı çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.18’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 2 kat ile en yüksek 40 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 40 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 640 mg/L’dir (Çizelge 4.28). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.30 Kurşun stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	**	***	*	**
<i>FAD2-7</i>	*	**	***	Ns	**
<i>FAD2-6</i>	**	**	***	***	**

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



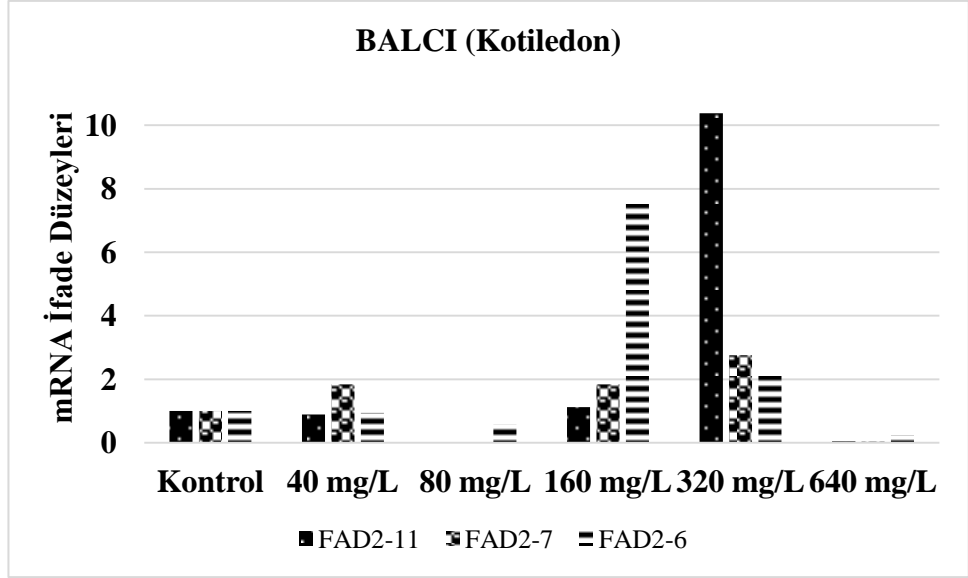
Şekil 4.18 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan Balcı çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.19’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 10 kat ile en yüksek 80 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 640 mg/L’dir (Çizelge 4.28). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31 Kurşun stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	**	Ns	**	**
<i>FAD2-7</i>	Ns	**	Ns	**	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	Ns	*

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.19 Kurşun stresi uygulanan BALCI çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2.2 BDYAS-4 çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kurşun (Pb) stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-8*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.32). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.33).

Çizelge 4.32 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	3,528365	3,391680	3,482202	0,323312	0,329648	0,317758	0,793884	1,065847	0,511923
	<b>80 mg/L</b>	3,403455	3,171137	3,202059	0,000425	0,000409	0,000358	0,190782	0,350868	0,200823
	<b>160 mg/L</b>	3,448574	3,160165	3,410540	0,014308	0,010881	0,014131	0,536630	0,553249	0,586417
	<b>320 mg/L</b>	10,182359	11,352987	10,740580	1,979313	2,056228	1,953417	1,372684	1,263127	1,214195
	<b>640 mg/L</b>	25,089295	24,743883	24,017266	0,023051	0,022468	0,023617	1,118062	0,834509	1,046810

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	2,265768	2,928171	2,455471	2,256364	3,869105	2,597277	0,714002	0,707107	0,740207
	<b>80 mg/L</b>	0,275667	0,477973	0,417544	0,482968	0,424842	0,277200	0,067358	0,070267	0,134904
	<b>160 mg/L</b>	0,282829	0,241317	0,251739	0,519430	0,548286	0,566835	0,004313	0,004450	0,004776
	<b>320 mg/L</b>	5,897077	5,692254	3,450965	1,277214	1,885569	1,547565	0,150413	0,154856	0,167589
	<b>640 mg/L</b>	1,074749	1,614402	0,987601	2,730187	3,173335	1,917199	0,221903	0,247929	0,216885

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,362990	0,616426	0,374750	0,170046	0,181495	0,177145	0,115583	0,158439	0,066754
	<b>80 mg/L</b>	7,295465	6,983741	7,738211	7,285359	#DEĞER!	5,430180	2,267339	2,664750	2,832351
	<b>160 mg/L</b>	2,125791	3,647733	3,871788	5,692254	6,307201	5,921653	3,006323	2,389982	3,294364
	<b>320 mg/L</b>	13,278313	13,642158	14,270856	7,255123	8,421049	6,844760	7,557976	7,160201	7,120606
	<b>640 mg/L</b>	2,164449	2,488023	1,742308	0,816769	0,668964	0,659297	0,500000	0,670821	0,647970

Çizelge 4.33 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,07536	0,33973	0,26891	0,00686	0,02761	0,08042	0,00396	0,01594	0,04643
	<b>80 mg/L</b>	0,07089	0,00042	0,08263	0,00790	0,00006	0,01622	0,00456	0,00003	0,00936
	<b>160 mg/L</b>	0,07265	0,01388	0,19343	0,00822	0,00310	0,03117	0,00475	0,00179	0,01799
	<b>320 mg/L</b>	0,23302	2,09483	0,44735	0,00500	0,15221	0,10205	0,00289	0,08788	0,05892
	<b>640 mg/L</b>	0,53483	0,02423	0,35244	0,04626	0,00250	0,10882	0,02671	0,00144	0,06283
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,41371	1,13094	0,97394	0,12591	0,26002	0,05624	0,07269	0,15012	0,03247
	<b>80 mg/L</b>	0,06286	0,15446	0,12391	0,02355	0,03927	0,05672	0,01360	0,02267	0,03275
	<b>160 mg/L</b>	0,04160	0,21434	0,00611	0,00918	0,01804	0,00053	0,00530	0,01041	0,00031
	<b>320 mg/L</b>	0,83463	0,61375	0,21324	0,35484	0,09203	0,01948	0,20487	0,05313	0,01125
	<b>640 mg/L</b>	0,20308	1,01552	0,30905	0,09242	0,19485	0,01960	0,05336	0,11250	0,01132
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,64211	0,24959	0,41137	0,46200	0,11804	0,36605	0,26673	0,06815	0,21134
	<b>80 mg/L</b>	9,54700	10,01816	8,46860	3,33247	5,96747	4,83372	1,92400	3,44532	2,79075
	<b>160 mg/L</b>	4,38983	8,51508	8,87587	2,46760	4,23091	3,21240	1,42467	2,44271	1,85468
	<b>320 mg/L</b>	18,03508	10,85094	23,43140	7,03141	6,03379	12,21063	4,05959	3,48361	7,04981
	<b>640 mg/L</b>	2,89687	0,98213	2,03087	1,59895	0,37336	1,30329	0,92316	0,21556	0,75245

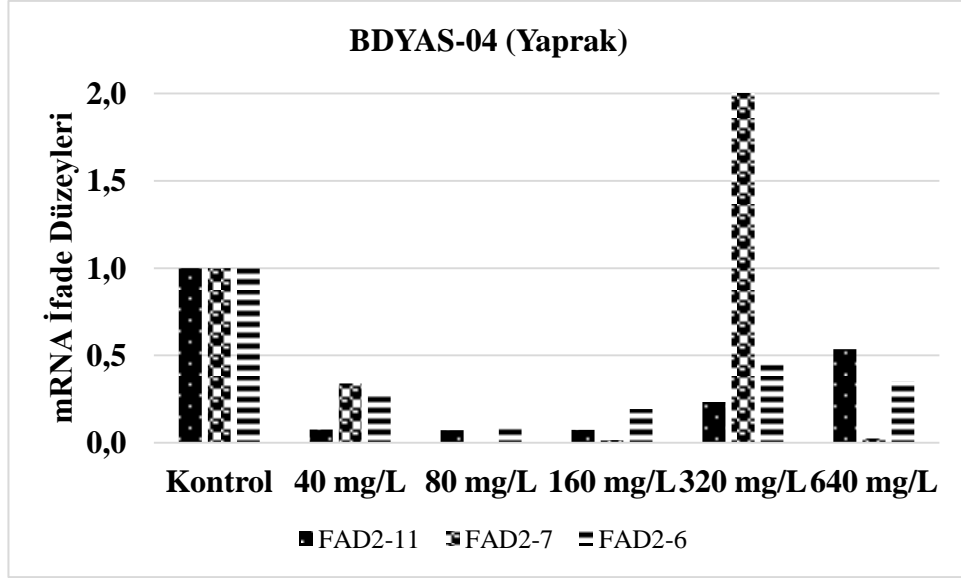
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.20’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 80 mg/L’dir (Çizelge 4.33). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-11*, *FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.34).

Çizelge 4.34 Kurşun stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	**	**	**	*
<i>FAD2-7</i>	*	*	*	**	*
<i>FAD2-6</i>	***	***	***	***	***

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.20 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

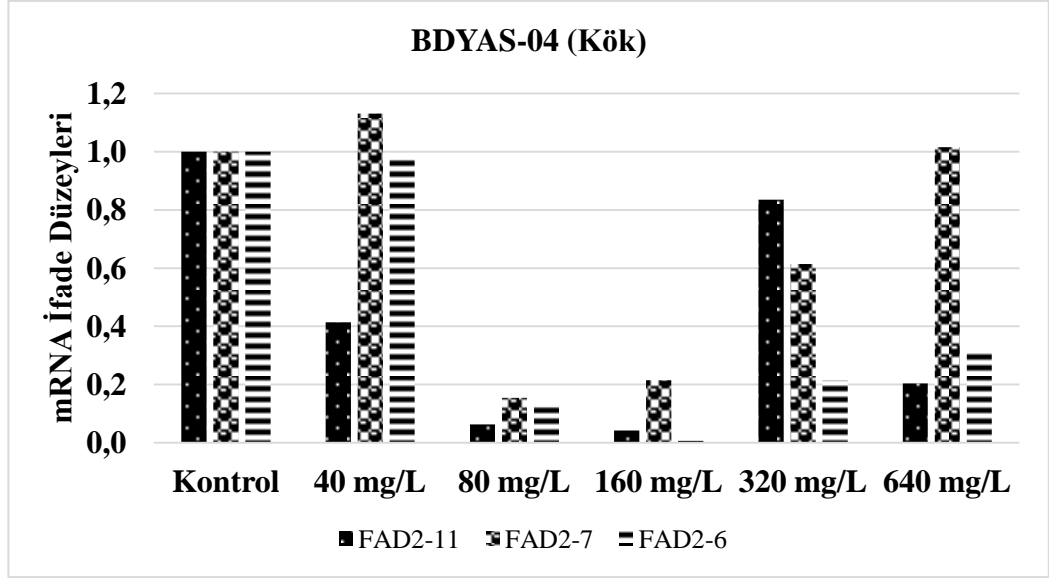
Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.21’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 40 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 160 mg/L’dir (Çizelge 4.33). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.35 Kurşun stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	**	**	Ns	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	***	**	**	***

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)





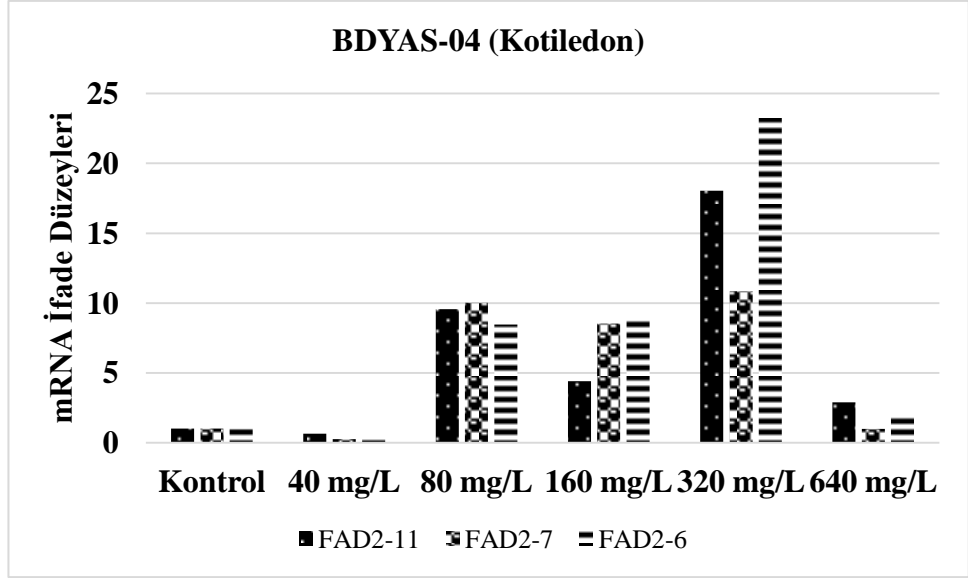
Şekil 4.21 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.22’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 18 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 40 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 40 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 40 mg/L’dir (Çizelge 4.33). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-11*, *FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.36).

Çizelge 4.36 Kurşun stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	***	***	***	*
<i>FAD2-7</i>	Ns	*	***	*	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	***	***	***	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.22 Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2.3 LİNAS çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kurşun (Pb) stresi uygulanan LİNAS çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.37). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.38).

Çizelge 4.37 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,398596	0,399980	0,386355	0,275667	0,234230	0,237830	0,434371	0,382094	0,397768
	<b>80 mg/L</b>	0,092911	0,094470	0,045029	0,073353	0,061811	0,030991	0,136030	0,113361	0,060791
	<b>160 mg/L</b>	0,145189	0,145491	0,135654	0,132678	0,145895	0,159652	0,273194	0,285389	0,191710
	<b>320 mg/L</b>	0,022813	0,032804	0,025173	0,013387	0,018711	0,015124	0,023815	0,021627	0,022406
	<b>640 mg/L</b>	0,021508	0,022282	0,018287	0,023196	0,021823	0,017146	0,007802	0,009099	0,011534

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	1,499000	2,528006	2,428390	0,597082	1,684126	1,065108	0,298955	0,652477	0,310787
	<b>80 mg/L</b>	0,110032	0,034008	0,033796	1,042466	0,266462	0,179120	0,572759	0,306934	0,191312
	<b>160 mg/L</b>	0,292600	0,193580	0,197647	0,991030	0,694478	0,683020	1,828930	1,266634	1,204972
	<b>320 mg/L</b>	0,193983	0,238490	0,196146	0,446583	0,535144	0,480630	0,479965	0,316439	0,320856
	<b>640 mg/L</b>	0,022640	0,022766	0,014024	0,043285	0,051582	0,016781	0,070854	0,056211	0,035012

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,607518	1,040300	0,794434	0,076045	0,076680	0,109652	0,051689	0,066939	0,041320
	<b>80 mg/L</b>	3,479789	2,948538	1,957483	0,425727	0,441351	0,299577	0,132494	0,147011	0,156258
	<b>160 mg/L</b>	1,056286	1,079228	1,118062	0,612593	0,655197	0,466516	0,323536	0,248273	0,259535
	<b>320 mg/L</b>	0,850274	1,284316	1,147107	0,407254	0,464902	0,378404	0,212127	0,344363	0,393654
	<b>640 mg/L</b>	0,323312	0,369847	0,248101	0,374750	0,303338	0,302289	0,229410	0,304181	0,297096

Çizelge 4.38 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
YAPRAK	Kontrol	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	40 mg/L	5,76622	6,64928	5,31662	0,37102	0,75733	0,81996	0,21421	0,43724	0,47341
	80 mg/L	1,13099	1,50242	1,39000	0,41967	0,64946	0,61242	0,24229	0,37497	0,35358
	160 mg/L	2,07456	3,89567	3,36465	0,15074	0,44184	1,21042	0,08703	0,25509	0,69883
	320 mg/L	0,39600	0,42469	0,29739	0,09999	0,11505	0,04747	0,05773	0,06642	0,02740
	640 mg/L	0,30226	0,55724	0,12409	0,03899	0,12353	0,02644	0,02251	0,07132	0,01527
KÖK	Kontrol	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	40 mg/L	45,56407	50,92761	19,80113	22,69707	28,21560	9,28928	13,10416	16,29028	5,36317
	80 mg/L	1,03451	18,92782	14,98828	0,42693	14,17411	3,25155	0,24649	8,18343	1,87728
	160 mg/L	4,40750	33,73914	68,07173	0,76195	2,67816	29,35496	0,43991	1,54624	16,94809
	320 mg/L	4,24551	21,61145	17,79799	1,38489	5,70495	8,14372	0,79957	3,29375	4,70178
	640 mg/L	0,38225	1,55906	2,39715	0,07513	0,71439	0,48159	0,04337	0,41245	0,27805
KOTİLEDON	Kontrol	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	40 mg/L	14,41884	5,89735	7,42254	5,27731	1,70272	1,57902	3,04685	0,98307	0,91165
	80 mg/L	52,68731	25,78899	20,31605	26,98569	4,12072	1,83980	15,58020	2,37910	1,06221
	160 mg/L	19,30420	38,40436	38,80327	5,10546	5,32455	6,24697	2,94764	3,07413	3,60669
	320 mg/L	19,21773	27,81580	44,27723	5,43514	3,09310	13,29053	3,13798	1,78580	7,67329
	640 mg/L	5,78142	21,71542	38,67946	2,39252	1,39506	5,45629	1,38132	0,80544	3,15019

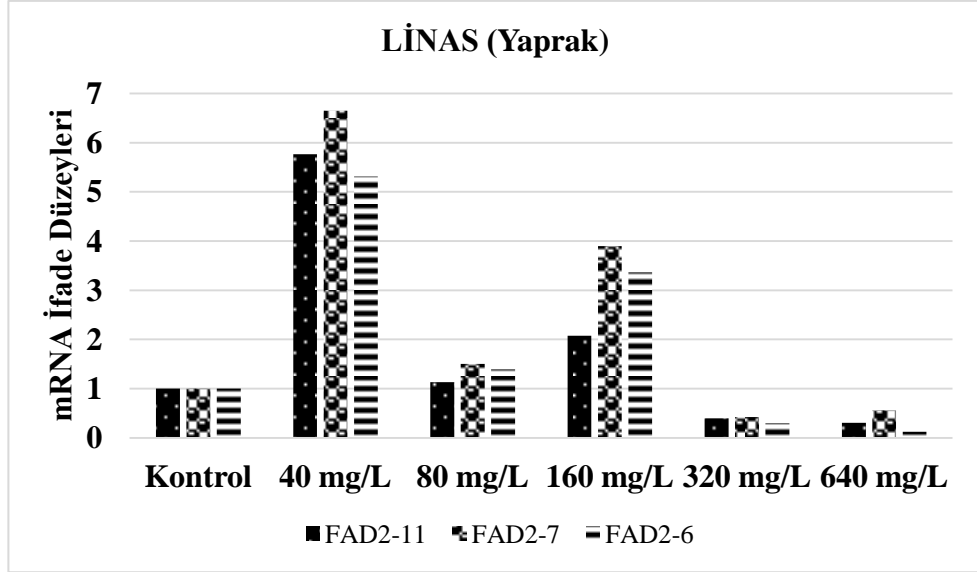
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.23’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 6 kat ile en yüksek 40 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 40 mg/L ve en düşük 320 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 640 mg/L’dir (Çizelge 4.38). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.39).

Çizelge 4.39 Kurşun stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	Ns	**	**	**
<i>FAD2-7</i>	*	Ns	*	*	*
<i>FAD2-6</i>	***	Ns	Ns	Ns	Ns

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



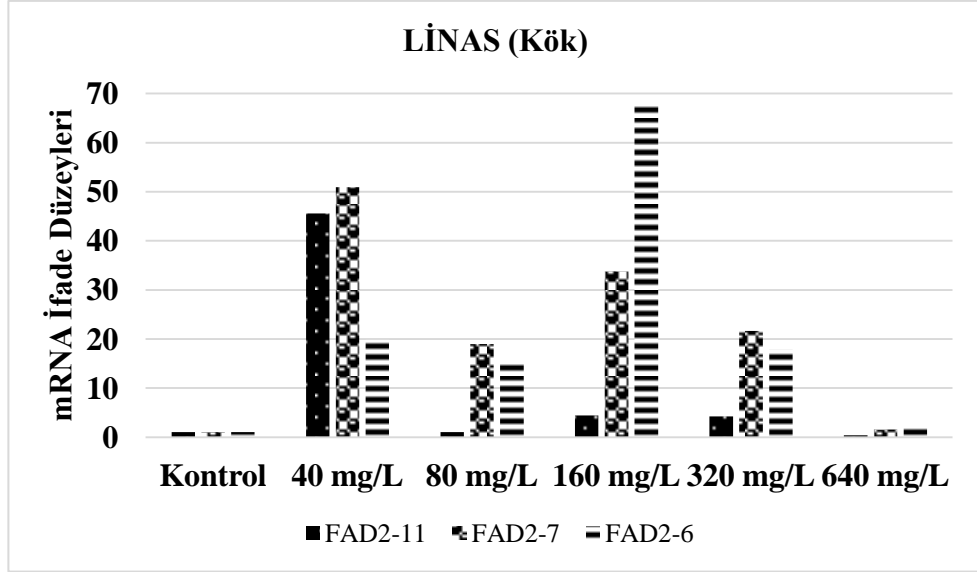
Şekil 4.23 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.24’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 45 kat ile en yüksek 40 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 40 mg/L ve en düşük 640 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 640 mg/L’dir (Çizelge 4.38). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.40).

Çizelge 4.40 Kurşun stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	*	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	Ns	*	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	Ns	*	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



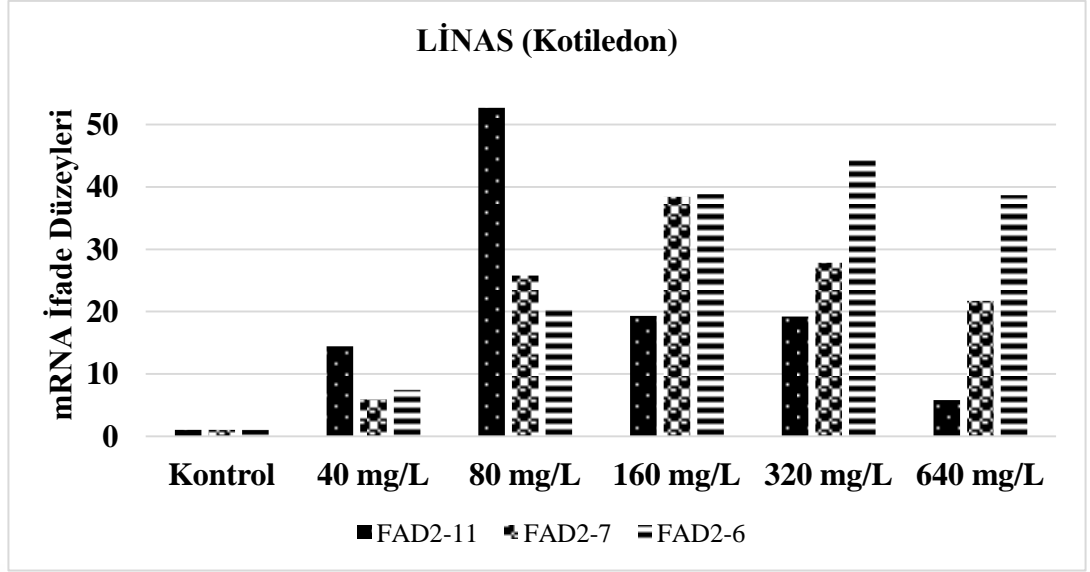
Şekil 4.24 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.25’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 52 kat ile en yüksek 80 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 6 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 40 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 320 mg/L ve 40 mg/L’dir (Çizelge 4.38). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.41).

Çizelge 4.41 Kurşun stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	***	*	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	*	*	*
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	Ns	*

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.25 Kurşun stresi uygulanan LİNAS çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2.4 ASOL çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kurşun (Pb) stresi uygulanan ASOL çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.42). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.43).



Çizelge 4.42 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,098961	0,099235	0,092783	0,121751	0,123793	0,122089	0,228933	0,202641	0,209062
	<b>80 mg/L</b>	0,002593	0,002816	0,002577	0,001776	0,001751	0,001601	0,032940	0,038049	0,040526
	<b>160 mg/L</b>	0,000742	0,000784	0,000749	0,001870	0,001478	0,001766	0,022328	0,024620	0,016945
	<b>320 mg/L</b>	0,348686	0,354044	0,361734	0,208483	0,196827	0,194656	0,106211	0,067874	0,099718
	<b>640 mg/L</b>	0,000769	0,001011	0,001093	0,000951	0,000991	0,001168	0,001437	0,001710	0,002388

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,267758	0,262247	0,266831	1,858321	1,743516	1,881652	36,681990	40,252319	37,452757
	<b>80 mg/L</b>	0,003972	0,004623	0,004880	0,009699	0,010125	0,009964	0,882091	0,802181	0,779705
	<b>160 mg/L</b>	0,028676	0,028439	0,035599	0,342696	0,336342	0,355027	5,471741	6,181684	5,660777
	<b>320 mg/L</b>	0,786762	0,822450	0,972655	3,855719	7,983382	7,966798	18,214304	17,728518	13,680035
	<b>640 mg/L</b>	0,001301	0,001424	0,001469	0,001868	0,002060	0,001940	0,020732	0,027834	0,023357

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTİLEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,060791	0,062587	0,064704	0,999307	0,963262	1,035265	0,677362	0,659754	0,696406
	<b>80 mg/L</b>	0,002425	0,002191	0,004515	0,036727	0,034149	0,034315	0,310572	0,147624	0,147011
	<b>160 mg/L</b>	0,260616	0,240815	0,227195	3,162356	3,116658	2,928171	18,635737	17,243730	17,231782
	<b>320 mg/L</b>	0,368567	0,406126	0,380772	0,759436	0,814508	0,790041	3,550445	3,914967	3,721799
	<b>640 mg/L</b>	0,046007	0,044718	0,048969	0,316439	0,326239	0,270181	0,298334	0,238325	0,258100

Çizelge 4.43 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	5,20499	3,43871	0,80648	1,12345	0,14708	0,05202	0,64862	0,08492	0,03003
	<b>80 mg/L</b>	0,14213	0,04797	0,14214	0,02495	0,00347	0,02977	0,01441	0,00200	0,01719
	<b>160 mg/L</b>	0,04051	0,04770	0,08094	0,00709	0,00420	0,01964	0,00409	0,00242	0,01134
	<b>320 mg/L</b>	18,95759	5,60860	0,34116	3,36988	0,20340	0,05349	1,94560	0,11743	0,03088
	<b>640 mg/L</b>	0,05013	0,02906	0,00708	0,00163	0,00309	0,00234	0,00094	0,00179	0,00135
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,80054	1,03480	1,09432	0,00736	0,03883	0,08169	0,00425	0,02242	0,04717
	<b>80 mg/L</b>	0,01353	0,00562	0,02362	0,00135	0,00012	0,00270	0,00078	0,00007	0,00156
	<b>160 mg/L</b>	0,09307	0,19513	0,16563	0,01126	0,00349	0,01384	0,00650	0,00201	0,00799
	<b>320 mg/L</b>	2,59217	3,72868	0,47721	0,27204	1,31622	0,09474	0,15706	0,75992	0,05470
	<b>640 mg/L</b>	0,00421	0,00111	0,00069	0,00025	0,00006	0,00011	0,00014	0,00003	0,00006
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	3,55588	7,38637	0,75816	0,15271	0,77784	0,03845	0,08817	0,44909	0,02220
	<b>80 mg/L</b>	0,17340	0,25903	0,22601	0,07587	0,02567	0,10735	0,04380	0,01482	0,06198
	<b>160 mg/L</b>	13,77206	22,63226	19,79717	0,97197	1,56641	1,12935	0,56116	0,90437	0,65203
	<b>320 mg/L</b>	21,82925	5,80763	4,16674	0,71812	0,29955	0,14459	0,41461	0,17295	0,08348
	<b>640 mg/L</b>	2,64228	2,23828	0,29650	0,17555	0,16934	0,03852	0,10136	0,09777	0,02224

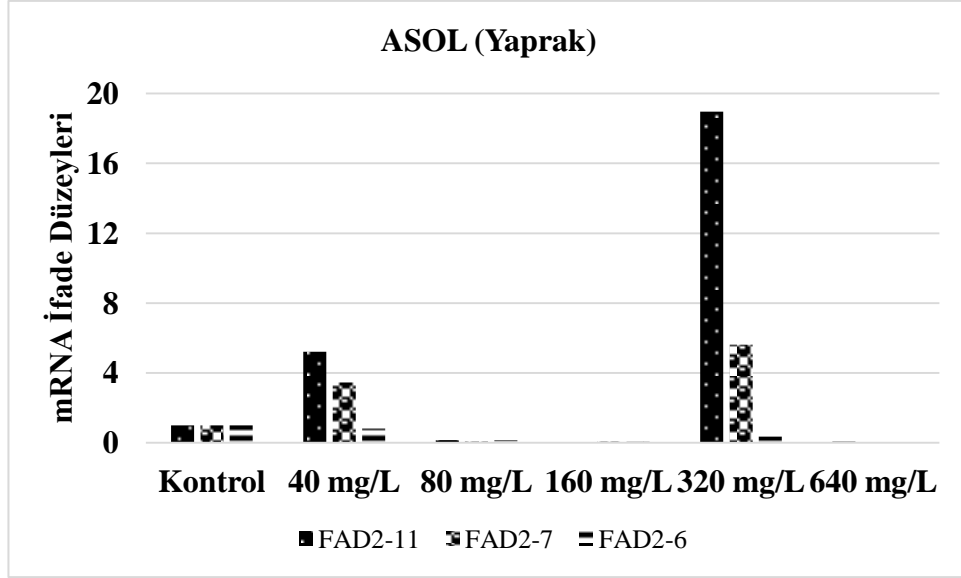
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.26'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 19 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 640 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 640 mg/L'dir (Çizelge 4.43). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.44).

Çizelge 4.44 Kurşun stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	Ns	*	***	*
<i>FAD2-7</i>	***	**	**	**	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	*	*	*	*

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



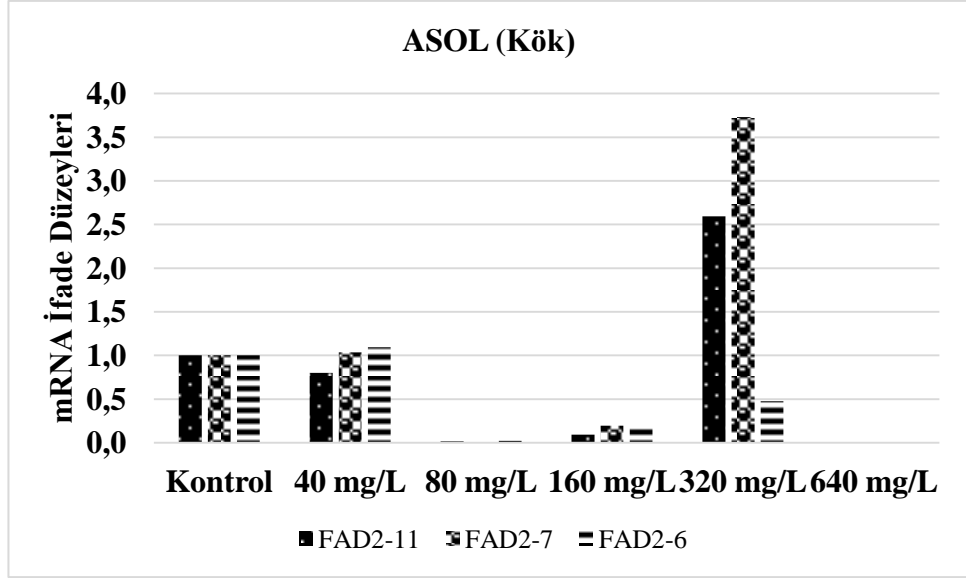
Şekil 4.26 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.27’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 3 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 640 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 640 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 640 mg/L’dir (Çizelge 4.43). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.45).

Çizelge 4.45 Kurşun stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	***	***	*	***
<i>FAD2-7</i>	Ns	***	***	Ns	***
<i>FAD2-6</i>	Ns	**	**	**	**

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



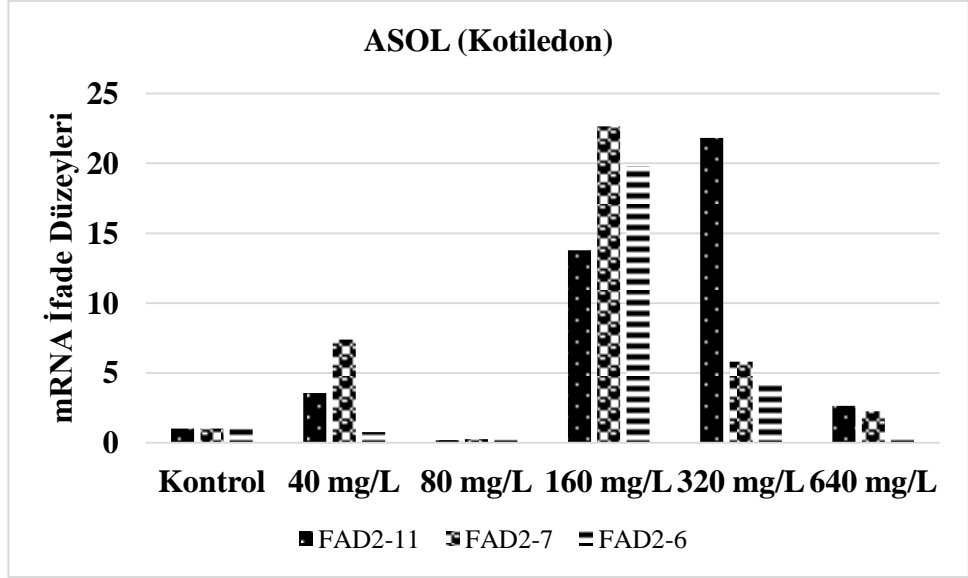
Şekil 4.27 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kurşun stresi uygulanan LINAS çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.28’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 22 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 80 mg/L’dir (Çizelge 4.43). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.46).

Çizelge 4.46 Kurşun stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	**	**	**	**
<i>FAD2-7</i>	**	**	**	**	*
<i>FAD2-6</i>	**	**	**	**	***

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.28 Kurşun stresi uygulanan ASOL çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.3 Kadmiyum (Cd) stresi sonuçlarının normalizasyonu ve istatistiksel analizi

##### 4.5.3.1 BALCI çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) stresi uygulanan BALCI çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.47). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.48).

Çizelge 4.47 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,121751	0,123793	0,122089	0,228933	0,202641	0,209062	0,228933	0,202641	0,209062
	<b>80 mg/L</b>	0,001776	0,001751	0,001601	0,316878	0,278355	0,299370	0,032940	0,038049	0,040526
	<b>160 mg/L</b>	0,001870	0,001478	0,001766	0,022328	0,024620	0,016945	0,022328	0,024620	0,016945
	<b>320 mg/L</b>	0,208483	0,196827	0,194656	0,106211	0,067874	0,099718	0,106211	0,067874	0,099718
	<b>640 mg/L</b>	0,000951	0,000991	0,001168	0,022988	0,027356	0,038208	0,001437	0,001710	0,002388

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	5,144390	5,201761	5,010658	0,534403	0,549046	0,528143	20,449590	21,406841	21,811242
	<b>80 mg/L</b>	9,540071	2,370186	2,465705	0,750540	0,692075	0,777546	3,703784	15,977835	7,738211
	<b>160 mg/L</b>	0,750540	1,185093	0,600402	3,708922	3,120982	1,484524	21,082879	15,454981	14,520306
	<b>320 mg/L</b>	21,481160	23,884454	24,100647	1,452965	1,717131	0,217789	69,166426	38,854236	84,214690
	<b>640 mg/L</b>	2,629886	2,411616	2,577549	0,629379	1,140764	1,166349	2,973166	2,533269	2,002775

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	1,242288	1,330529	1,279872	1,832737	1,942615	1,902637	0,244177	0,193178	0,187115
	<b>80 mg/L</b>	0,070805	0,037188	0,036651	0,008373	0,008603	0,008555	0,157454	0,089312	0,125173
	<b>160 mg/L</b>	9,376178	11,305869	12,008633	1,591073	2,043440	2,040609	1,469169	1,546493	1,862190
	<b>320 mg/L</b>	12,562050	13,708511	13,977166	2,687007	2,852051	2,966990	0,337509	0,378929	0,623733
	<b>640 mg/L</b>	0,033749	0,027623	0,031250	0,035797	0,037812	0,032713	0,050942	0,038768	0,058924

Çizelge 4.48 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	3,43871	2,90775	0,80648	0,147082	0,542825	0,052017	0,084918	0,313400	0,030032
	<b>80 mg/L</b>	0,04797	4,04993	0,14214	0,003467	0,675613	0,029766	0,002002	0,390065	0,017185
	<b>160 mg/L</b>	0,04770	0,29799	0,08094	0,004195	0,112451	0,019643	0,002422	0,064924	0,011341
	<b>320 mg/L</b>	5,60860	1,21289	0,34116	0,203403	0,154024	0,053486	0,117435	0,088926	0,030880
	<b>640 mg/L</b>	0,02906	0,39503	0,00708	0,003094	0,083339	0,002335	0,001786	0,048116	0,001348
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,93407	1,37906	0,42743	0,797292	0,108121	0,289554	0,460317	0,062423	0,167174
	<b>80 mg/L</b>	0,16452	5,14517	0,80622	0,056357	2,116881	0,196659	0,032537	1,222182	0,113541
	<b>160 mg/L</b>	4,52571	2,08623	3,01947	0,322209	1,463939	1,070182	0,186027	0,845205	0,617870
	<b>320 mg/L</b>	0,49641	1,82128	0,11852	0,028450	0,561154	0,026784	0,016425	0,323982	0,015464
	<b>640 mg/L</b>	0,00367	0,00435	0,00135	0,000246	0,000330	0,000243	0,000142	0,000191	0,000140
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,18963	1,83915	0,93892	0,013122	0,016711	0,121396	0,007576	0,009648	0,070088
	<b>80 mg/L</b>	0,00711	0,00827	0,56492	0,002875	0,000083	0,170690	0,001660	0,000048	0,098548
	<b>160 mg/L</b>	1,60699	1,83498	7,54264	0,198058	0,212202	2,425277	0,114349	0,122515	1,400235
	<b>320 mg/L</b>	1,97946	2,75451	2,12765	0,130804	0,085532	1,157800	0,075520	0,049382	0,668456
	<b>640 mg/L</b>	0,00455	0,03446	0,23051	0,000372	0,002634	0,085954	0,000215	0,001520	0,049626



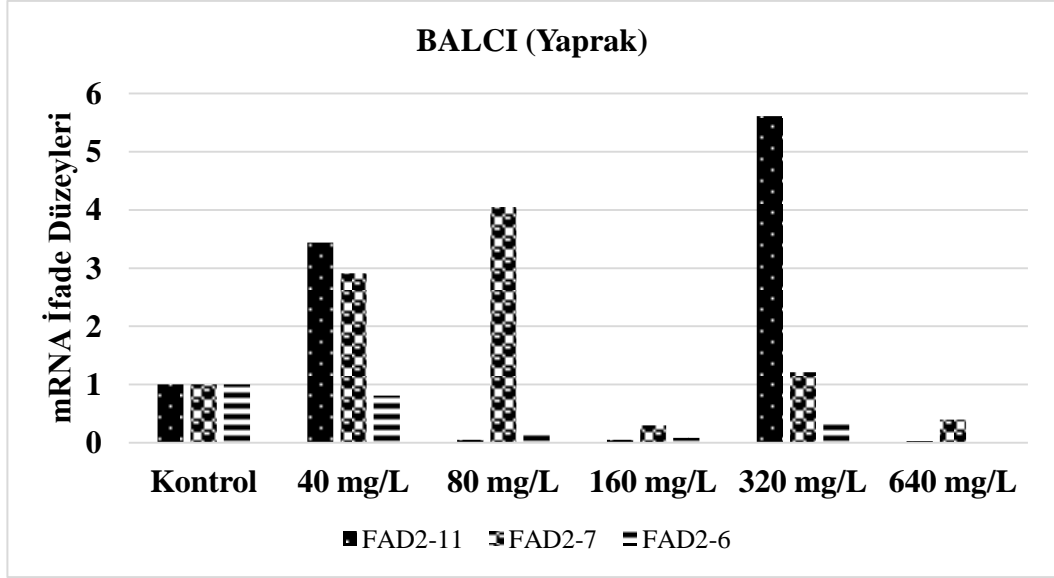
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.29’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 18 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 7 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.48). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-7*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.49).

Çizelge 4.49 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	**	**	*	**
<i>FAD2-7</i>	***	***	**	Ns	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	*	*	*	*

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



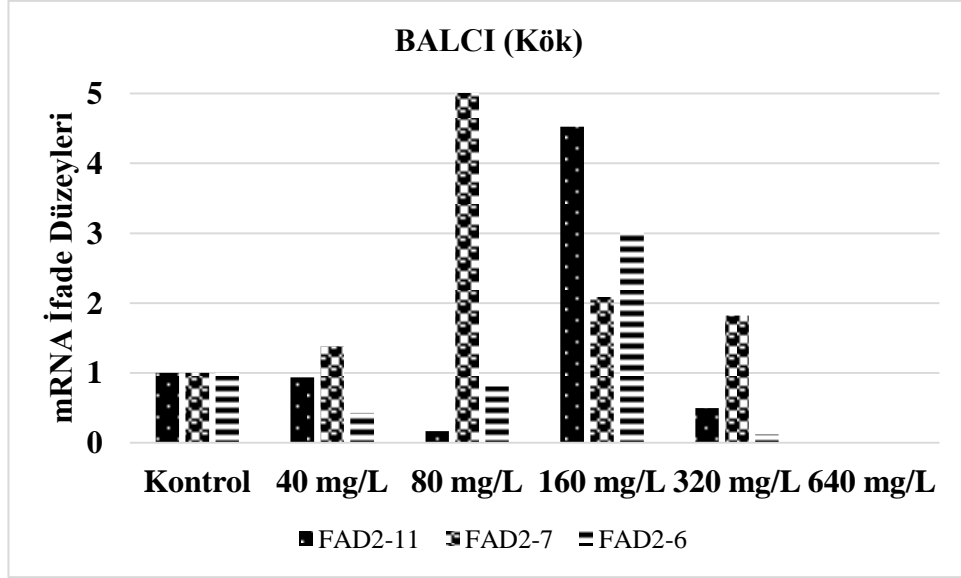
Şekil 4.29 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler Şekil 4.30'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 24 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 9 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 320 mg/L'dir (Çizelge 4.48). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.50).

Çizelge 4.50 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	**	**	***	**
<i>FAD2-7</i>	*	Ns	Ns	Ns	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	Ns	***	**

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



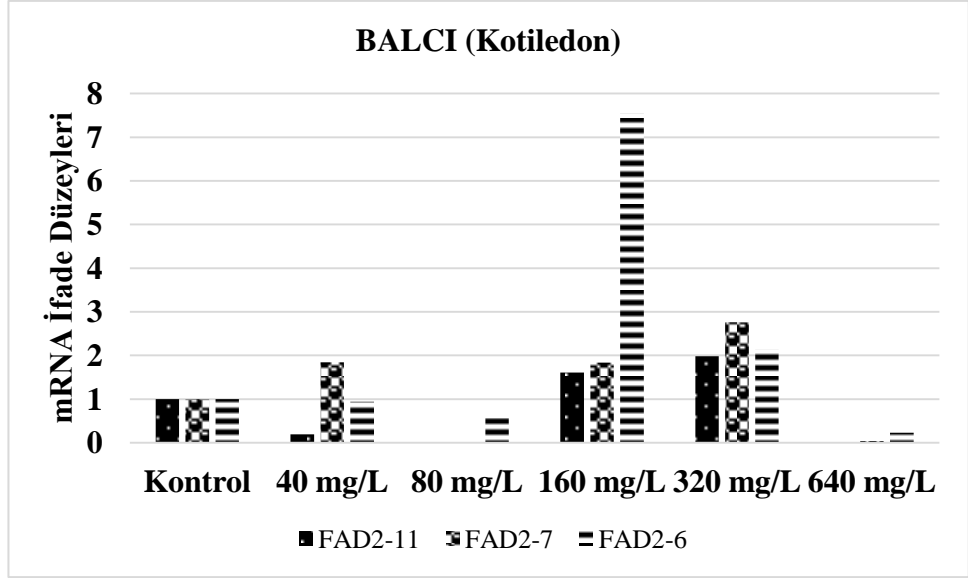
Şekil 4.30 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.31’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 45 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 18 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 320 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 80 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.48). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.51).

Çizelge 4.51 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BALCI çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	**	Ns	**	**
<i>FAD2-7</i>	Ns	**	Ns	**	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	*	Ns	*

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.31 Kadmiyum stresi uygulanan BALCI çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2.2 BDYAS-4 çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.52). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.53).

Çizelge 4.52 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	1,328686	1,291457	1,319508	0,121751	0,125521	0,120408	0,298955	0,405845	0,193983
	<b>80 mg/L</b>	10,217710	8,681835	9,520254	0,001275	0,001120	0,001065	0,572759	0,960595	0,597082
	<b>160 mg/L</b>	11,753349	10,800304	10,338823	0,048765	0,037188	0,042837	1,828930	1,890804	1,777685
	<b>320 mg/L</b>	1,780151	1,802501	1,747146	0,346037	0,326465	0,317758	0,239982	0,200545	0,197510
	<b>640 mg/L</b>	0,978742	1,023137	0,993092	0,000899	0,000929	0,001008	0,043616	0,034506	0,043285

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,610050	0,790589	0,652930	0,607518	1,044636	0,690637	0,192243	0,190915	0,196827
	<b>80 mg/L</b>	1,986185	3,326488	2,948538	3,479789	2,956725	1,957483	0,485317	0,489032	0,952638
	<b>160 mg/L</b>	0,575146	0,473029	0,496546	1,056286	1,074749	1,118062	0,008771	0,008723	0,009420
	<b>320 mg/L</b>	3,925836	3,877159	2,557971	0,850274	1,284316	1,147107	0,100134	0,105477	0,124223
	<b>640 mg/L</b>	0,509093	0,752623	0,511214	1,293249	1,479388	0,992404	0,105112	0,115583	0,112267

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,090747	0,145996	0,111491	0,042512	0,042986	0,052702	0,028896	0,037525	0,019860
	<b>80 mg/L</b>	1,823866	1,759298	2,073402	1,821340	2,015308	1,454981	0,566835	0,671286	0,758910
	<b>160 mg/L</b>	0,531448	0,888843	0,676893	1,423063	1,536875	1,035265	0,751581	0,582367	0,575944
	<b>320 mg/L</b>	3,319578	3,446185	3,477378	1,813781	2,127265	1,667862	1,889494	1,808759	1,735077
	<b>640 mg/L</b>	0,541112	0,592546	0,416677	0,204192	0,159320	0,157672	0,125000	0,159762	0,154963

Çizelge 4.53 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	2,34525	10,57869	8,36358	0,02901	0,14403	2,41283	0,01675	0,08315	1,39305
	<b>80 mg/L</b>	16,90875	0,09951	19,76175	1,17601	0,00839	3,97611	0,67897	0,00484	2,29561
	<b>160 mg/L</b>	19,57034	3,70890	51,90747	1,00577	0,52500	4,00676	0,58068	0,30311	2,31331
	<b>320 mg/L</b>	3,17302	28,48861	6,06166	0,06306	1,04826	1,15839	0,03641	0,60522	0,66880
	<b>640 mg/L</b>	1,78334	0,08169	1,15709	0,06194	0,00691	0,24711	0,03576	0,00399	0,14267
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	2,99959	4,07525	3,50335	0,99109	0,97416	0,04180	0,57221	0,56243	0,02413
	<b>80 mg/L</b>	11,91743	14,79701	11,61962	4,40722	4,46640	4,77775	2,54451	2,57868	2,75844
	<b>160 mg/L</b>	2,23815	5,71178	0,16255	0,59536	0,32652	0,00608	0,34373	0,18851	0,00351
	<b>320 mg/L</b>	15,50392	5,72879	1,99136	6,43655	0,88494	0,21455	3,71614	0,51092	0,12387
	<b>640 mg/L</b>	2,62589	6,59779	2,01099	1,12944	1,15543	0,08719	0,65208	0,66709	0,05034
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,45782	0,19295	0,27462	0,10842	0,03814	0,11265	0,06260	0,02202	0,06504
	<b>80 mg/L</b>	7,45974	7,32099	6,25381	1,03093	1,13264	1,19429	0,59521	0,65393	0,68952
	<b>160 mg/L</b>	2,75794	5,51548	5,92808	0,70136	0,98448	0,71136	0,40493	0,56839	0,41070
	<b>320 mg/L</b>	13,47890	7,78718	16,97316	0,93724	1,16514	1,95277	0,54111	0,67269	1,12743
	<b>640 mg/L</b>	2,02799	0,71780	1,38378	0,27453	0,04656	0,30753	0,15850	0,02688	0,17755

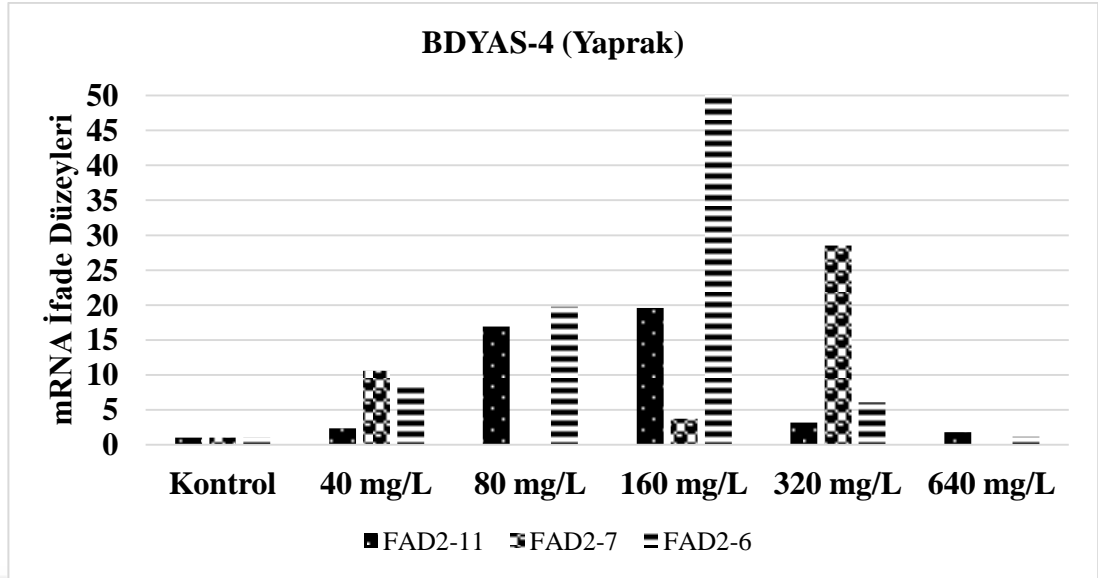
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.32’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 18 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 7 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.53). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.54).

Çizelge 4.54 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	**	**	***	**
<i>FAD2-7</i>	**	***	*	**	**
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	**	*	Ns

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.32 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

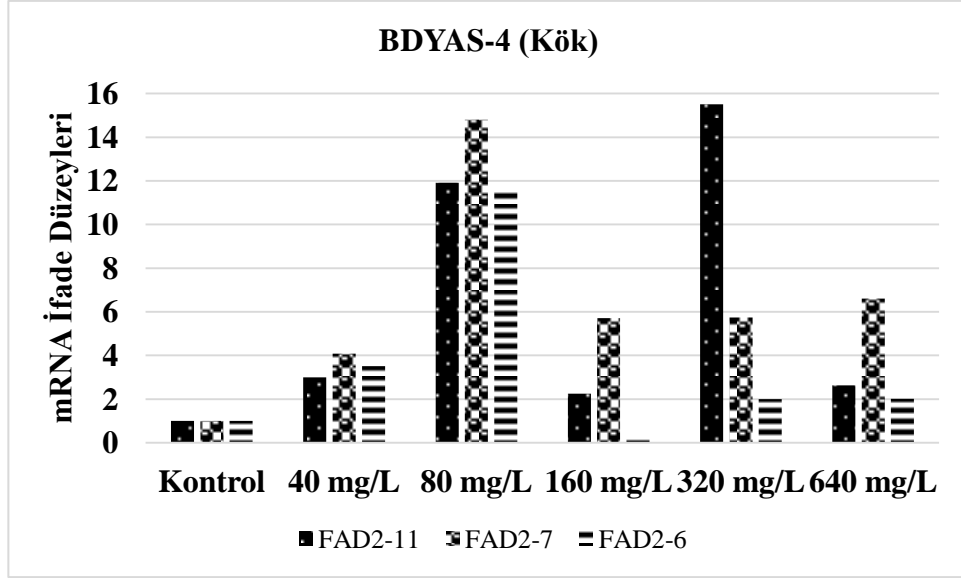
Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.33'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 24 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 9 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 320 mg/L'dir (Çizelge 4.53). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.55).

Çizelge 4.55 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	*	Ns	*	Ns	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	**	Ns	Ns
<i>FAD2-6</i>	**	Ns	***	Ns	**

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)





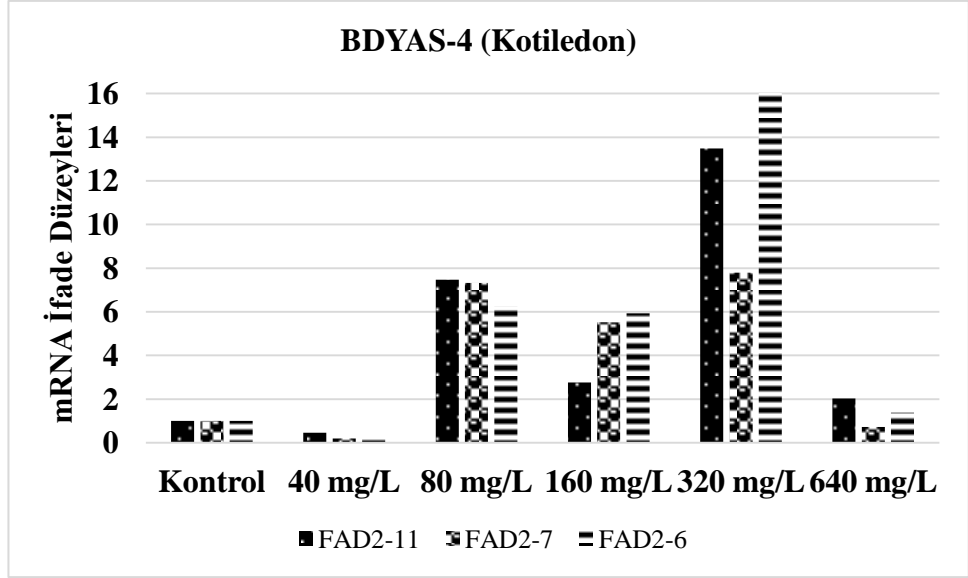
Şekil 4.33 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.34'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 45 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 18 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 320 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 80 mg/L ve 320 mg/L'dir (Çizelge 4.53). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 (*FAD2-7*) ve Tukey HSD (*FAD2-11* ve *FAD2-6*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.56).

Çizelge 4.56 Kadmiyum stresine maruz bırakılan BDYAS-4 çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	***	**	***	Ns
<i>FAD2-7</i>	*	*	Ns	*	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	***	***	***	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.34 Kadmiyum stresi uygulanan BDYAS-4 çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2.3 LİNAS çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) stresi uygulanan LİNAS çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.57). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.58).

Çizelge 4.57 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,398596	0,399980	0,386355	0,275667	0,234230	0,237830	0,434371	0,382094	0,397768
	<b>80 mg/L</b>	0,092911	0,094470	0,045029	0,073353	0,061811	0,030991	0,136030	0,113361	0,060791
	<b>160 mg/L</b>	0,145189	0,145491	0,135654	0,132678	0,145895	0,159652	0,273194	0,285389	0,191710
	<b>320 mg/L</b>	0,022813	0,032804	0,025173	0,013387	0,018711	0,015124	0,023815	0,021627	0,022406
	<b>640 mg/L</b>	0,021508	0,022282	0,018287	0,023196	0,021823	0,017146	0,007802	0,009099	0,011534

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,374750	0,316001	0,607097	0,149270	0,210516	0,266277	0,074739	0,081560	0,077697
	<b>80 mg/L</b>	0,110032	0,034008	0,033796	1,042466	0,266462	0,179120	0,572759	0,306934	0,191312
	<b>160 mg/L</b>	2,340797	1,548638	1,514666	0,991030	0,694478	0,683020	1,828930	1,266634	1,204972
	<b>320 mg/L</b>	0,193983	0,238490	0,196146	0,446583	0,535144	0,480630	0,479965	0,316439	0,320856
	<b>640 mg/L</b>	0,022640	0,022766	0,014024	0,043285	0,051582	0,016781	0,070854	0,056211	0,035012

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,607518	1,040300	0,794434	0,076045	0,076680	0,109652	0,051689	0,066939	0,041320
	<b>80 mg/L</b>	3,479789	2,948538	1,957483	0,425727	0,441351	0,299577	0,132494	0,147011	0,156258
	<b>160 mg/L</b>	1,056286	1,079228	1,118062	0,612593	0,655197	0,466516	0,323536	0,248273	0,259535
	<b>320 mg/L</b>	0,850274	1,284316	1,147107	0,407254	0,464902	0,378404	0,212127	0,344363	0,393654
	<b>640 mg/L</b>	0,323312	0,369847	0,248101	0,374750	0,303338	0,302289	0,057352	0,076045	0,074274

Çizelge 4.58 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Hata			Standart Sapma		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
YAPRAK	Kontrol	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	40 mg/L	5,76622	6,64928	5,31662	0,37102	0,75733	0,81996	0,21421	0,43724	0,47341
	80 mg/L	1,13099	1,50242	1,39000	0,41967	0,64946	0,61242	0,24229	0,37497	0,35358
	160 mg/L	2,07456	3,89567	3,36465	0,15074	0,44184	1,21042	0,08703	0,25509	0,69883
	320 mg/L	0,39600	0,42469	0,29739	0,09999	0,11505	0,04747	0,05773	0,06642	0,02740
	640 mg/L	0,30226	0,55724	0,12409	0,03899	0,12353	0,02644	0,02251	0,07132	0,01527
KÖK	Kontrol	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	40 mg/L	3,27675	1,80172	0,71405	0,74549	0,55144	0,12777	0,43041	0,31837	0,07377
	80 mg/L	0,44194	4,33279	3,07530	0,27813	3,97908	1,20132	0,16058	2,29732	0,69358
	160 mg/L	13,95820	6,91271	12,78682	3,32497	2,05250	1,15614	1,91967	1,18501	0,66750
	320 mg/L	1,68565	4,33180	3,32285	0,63024	1,47885	0,37949	0,36387	0,85381	0,21910
	640 mg/L	0,15987	0,35237	0,47635	0,06841	0,23377	0,09386	0,03950	0,13497	0,05419
KOTİLEDON	Kontrol	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	40 mg/L	8,82051	5,89735	6,43834	1,80686	1,70272	3,14313	1,04319	0,98307	1,81469
	80 mg/L	30,31338	25,78899	16,59415	7,57827	4,12072	4,73708	4,37532	2,37910	2,73495
	160 mg/L	11,91950	38,40436	32,62143	1,59815	5,32455	13,61705	0,92269	3,07413	7,86181
	320 mg/L	11,93516	27,81580	34,90081	2,29477	3,09310	10,16685	1,32488	1,78580	5,86983
	640 mg/L	3,39385	21,71542	7,90074	0,32488	1,39506	2,49704	0,18757	0,80544	1,44167

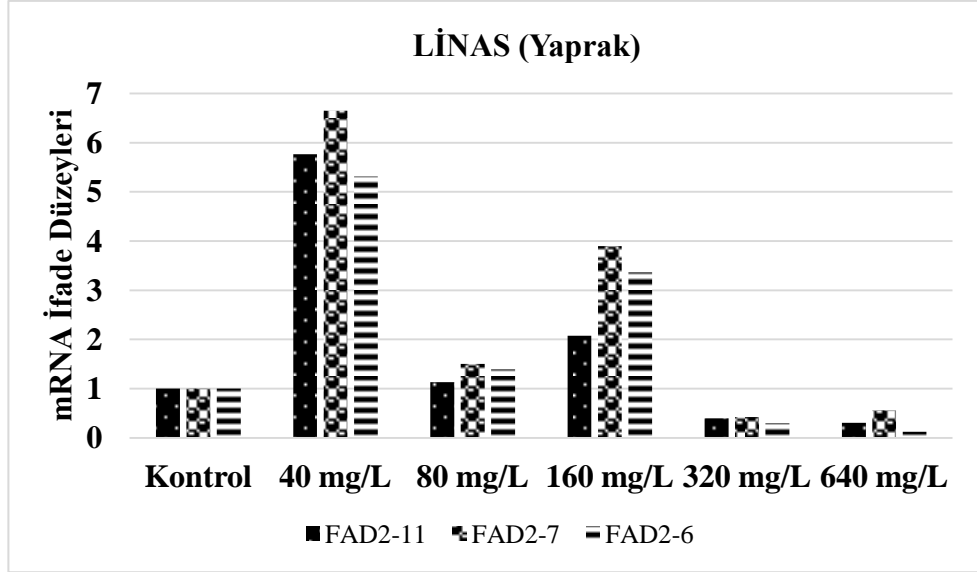
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.35’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 18 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 7 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.58). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.59).

Çizelge 4.59 Kadmiyum stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	Ns	**	**	*
<i>FAD2-7</i>	*	Ns	*	*	*
<i>FAD2-6</i>	**	Ns	Ns	Ns	*

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



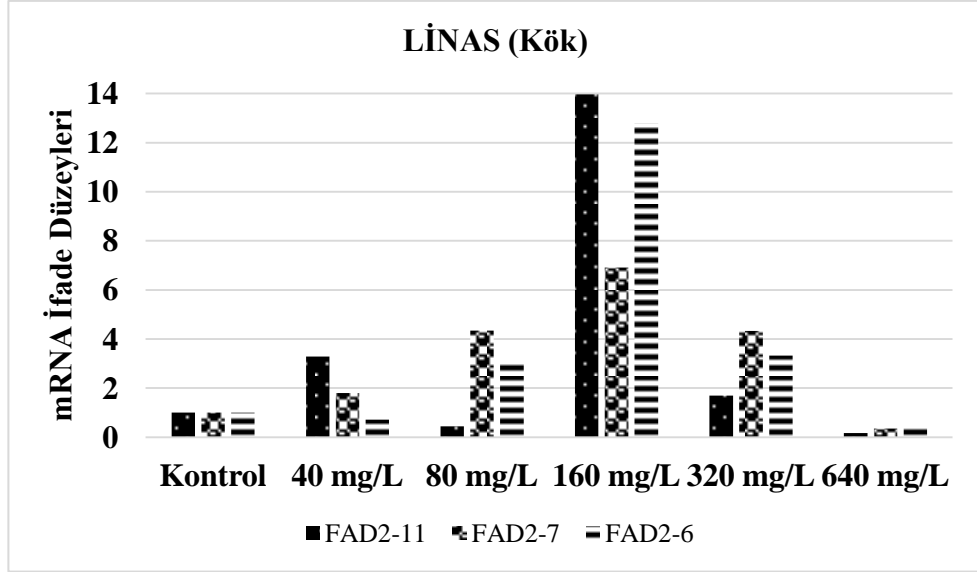
Şekil 4.35 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.36'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 24 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 9 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 320 mg/L'dir (Çizelge 4.58). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.60).

Çizelge 4.60 Kadmiyum stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	Ns	**	Ns
<i>FAD2-6</i>	Ns	Ns	Ns	*	Ns

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



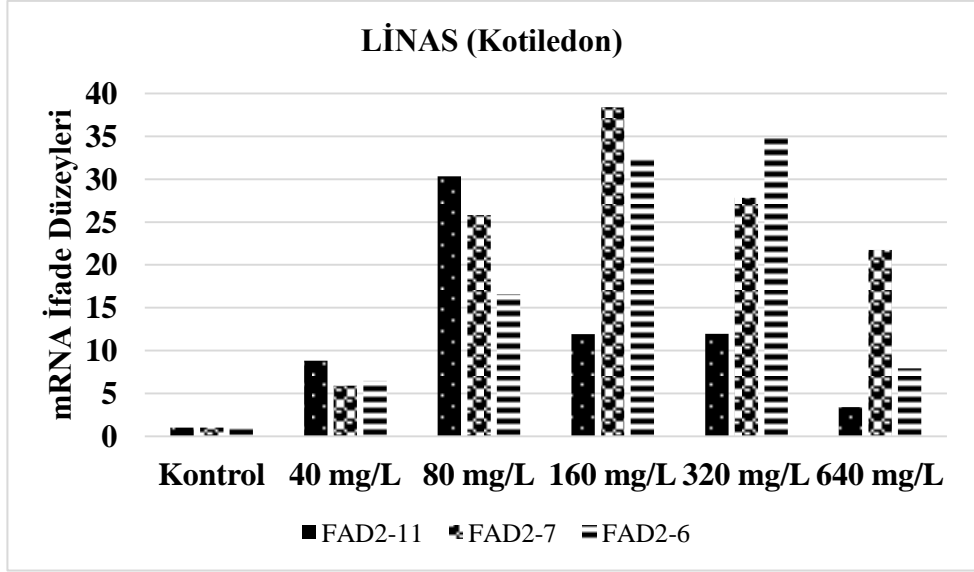
Şekil 4.36 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.37’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 45 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 18 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 320 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 80 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.58). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.61).

Çizelge 4.61 Kadmiyum stresine maruz bırakılan LİNAS çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	Ns	Ns	***	Ns	Ns
<i>FAD2-7</i>	Ns	Ns	*	*	*
<i>FAD2-6</i>	Ns	**	*	Ns	*

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.37 Kadmiyum stresi uygulanan LİNAS çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

#### 4.5.2.4 ASOL çeşidi

Farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) stresi uygulanan ASOL çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerin *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerine ait mRNA ifade profilleri housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) ve kontrol şartları dikkate alınarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Çizelge 4.62). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.63).



Çizelge 4.62 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verileri

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>YAPRAK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,052592	0,053179	0,048597	0,129408	0,132678	0,127892	0,973329	0,868742	0,875998
	<b>80 mg/L</b>	0,017289	0,018867	0,017763	0,011842	0,011727	0,011033	0,219608	0,254899	0,279322
	<b>160 mg/L</b>	0,057352	0,059457	0,057631	0,144586	0,112033	0,135842	1,726679	1,866066	1,303147
	<b>320 mg/L</b>	0,431969	0,413798	0,423373	1,033114	0,920188	0,911301	0,526316	0,317318	0,466840
	<b>640 mg/L</b>	0,004613	0,006041	0,006070	0,005703	0,005921	0,006484	0,008621	0,010216	0,013258

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KÖK</b>	<b>40 mg/L</b>	0,267758	0,262247	0,266831	1,858321	1,743516	1,881652	0,709070	0,721965	0,718470
	<b>80 mg/L</b>	0,003972	0,004623	0,004880	0,009699	0,010125	0,009964	0,005437	0,004910	0,004856
	<b>160 mg/L</b>	0,028676	0,028439	0,035599	0,342696	0,336342	0,355027	0,033866	0,024775	0,032151
	<b>320 mg/L</b>	0,786762	0,822450	0,972655	3,855719	7,983382	7,966798	4,469149	2,237674	4,610745
	<b>640 mg/L</b>	0,001301	0,001424	0,001469	0,001868	0,002060	0,001940	0,002152	0,002047	0,002507

Doku	Konsantrasyon	<i>FAD2-11</i>			<i>FAD2-7</i>			<i>FAD2-6</i>		
<b>KOTILEDON</b>	<b>40 mg/L</b>	0,030395	0,031293	0,032352	0,249827	0,240815	0,258816	0,677362	0,659754	0,696406
	<b>80 mg/L</b>	0,002425	0,002191	0,004515	0,036727	0,034149	0,034315	0,310572	0,147624	0,147011
	<b>160 mg/L</b>	0,260616	0,240815	0,227195	3,162356	3,116658	2,928171	18,635737	17,243730	17,231782
	<b>320 mg/L</b>	0,368567	0,406126	0,380772	0,759436	0,814508	0,790041	3,550445	3,914967	3,721799
	<b>640 mg/L</b>	0,046007	0,044718	0,048969	0,316439	0,326239	0,270181	0,298334	0,238325	0,258100

Çizelge 4.63 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin farklı doku örneklerine ait normalize edilmiş *FAD2* genlerinin ekspresyon verilerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Konsantrasyon	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
		<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>	<i>FAD2-11</i>	<i>FAD2-7</i>	<i>FAD2-6</i>
<b>YAPRAK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	2,07804	2,72871	2,55723	0,53723	0,11637	0,08920	0,31017	0,06719	0,05150
	<b>80 mg/L</b>	0,71993	0,24223	0,71559	0,14406	0,01588	0,13455	0,08318	0,00917	0,07768
	<b>160 mg/L</b>	2,33683	2,74464	4,62648	0,51870	0,35774	0,99145	0,29947	0,20654	0,57242
	<b>320 mg/L</b>	17,08100	20,05714	1,22077	4,34890	1,85730	0,21663	2,51084	1,07231	0,12507
	<b>640 mg/L</b>	0,21921	0,12651	0,03051	0,01456	0,00483	0,00815	0,00841	0,00279	0,00470
<b>KÖK</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	0,80054	1,03480	0,56620	0,00736	0,03883	0,00636	0,00425	0,02242	0,00367
	<b>80 mg/L</b>	0,01353	0,00562	0,00401	0,00135	0,00012	0,00027	0,00078	0,00007	0,00015
	<b>160 mg/L</b>	0,09307	0,19513	0,02395	0,01126	0,00349	0,00406	0,00650	0,00201	0,00235
	<b>320 mg/L</b>	2,59217	3,72868	2,98993	0,27204	1,31622	1,08154	0,15706	0,75992	0,62443
	<b>640 mg/L</b>	0,00421	0,00111	0,00177	0,00025	0,00006	0,00021	0,00014	0,00003	0,00012
<b>KOTİLEDON</b>	<b>Kontrol</b>	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	<b>40 mg/L</b>	1,77794	1,84659	0,75816	0,07636	0,19446	0,03845	0,04408	0,11227	0,02220
	<b>80 mg/L</b>	0,17340	0,25903	0,22601	0,07587	0,02567	0,10735	0,04380	0,01482	0,06198
	<b>160 mg/L</b>	13,77206	22,63226	19,79717	0,97197	1,56641	1,12935	0,56116	0,90437	0,65203
	<b>320 mg/L</b>	21,82925	5,80763	4,16674	0,71812	0,29955	0,14459	0,41461	0,17295	0,08348
	<b>640 mg/L</b>	2,64228	2,23828	0,29650	0,17555	0,16934	0,03852	0,10136	0,09777	0,02224

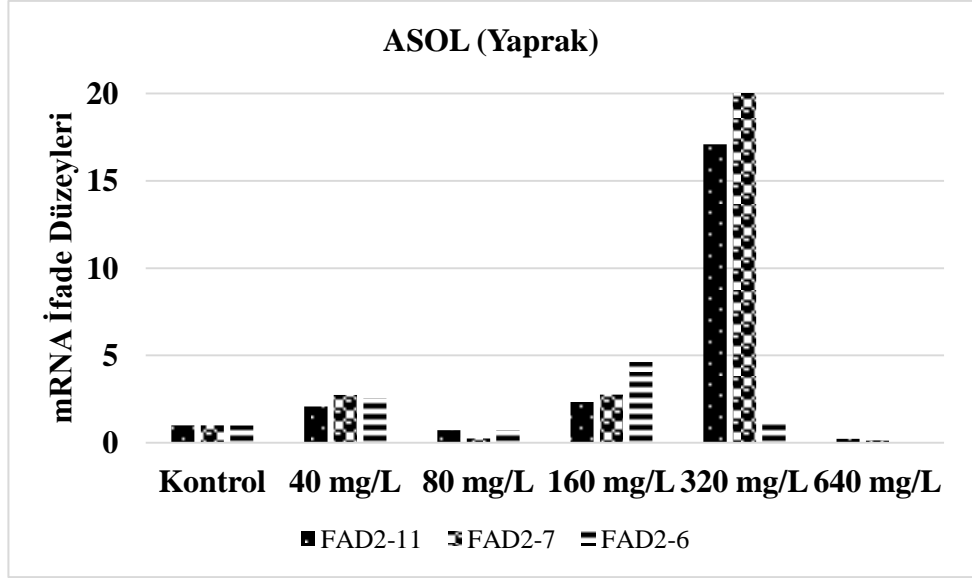
Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre her bir aspir çeşidinin farklı dokularında meydana gelen *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7*, *FAD2-11*) genlerinin konsantrasyona bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.38’de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 18 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 7 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 640 mg/L ve en düşük 80 mg/L’de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 160 mg/L ve 320 mg/L’dir (Çizelge 4.63). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan yaprak örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p<0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett’s T3 (*FAD2-7* ve *FAD2-6*) ve Tukey HSD (*FAD2-11*) testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.64).

Çizelge 4.64 Kadmiyum stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait yaprak örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	Ns	***	***	**
<i>FAD2-7</i>	***	**	*	**	**
<i>FAD2-6</i>	**	Ns	Ns	Ns	*

\*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



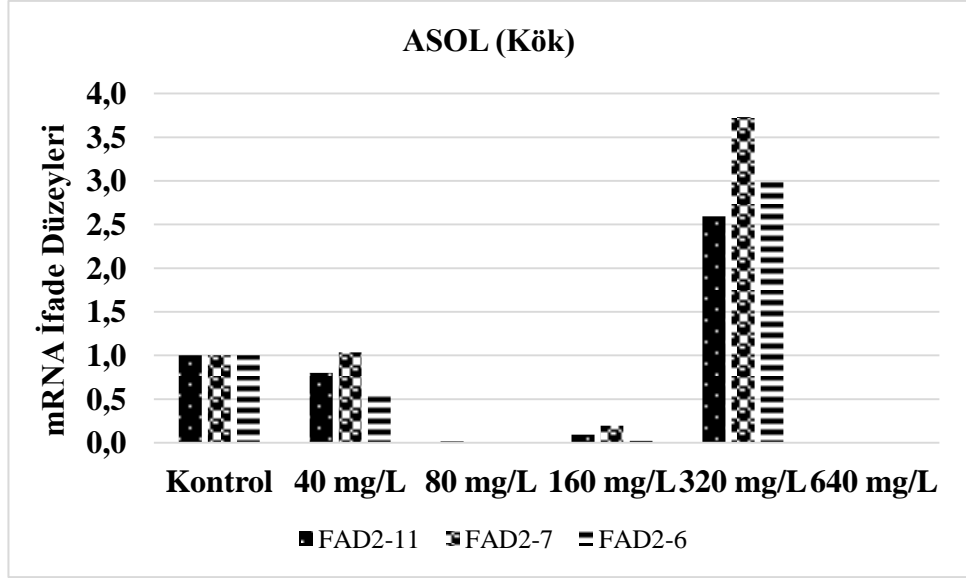
Şekil 4.38 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidi yaprak örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.39'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 24 kat ile en yüksek 640 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 160 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 9 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 320 mg/L ve en düşük 80 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 40 mg/L ve 320 mg/L'dir (Çizelge 4.63). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kök örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.65).

Çizelge 4.65 Kadmiyum stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kök örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	***	***	***	*	***
<i>FAD2-7</i>	Ns	***	***	Ns	***
<i>FAD2-6</i>	***	***	***	Ns	***

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



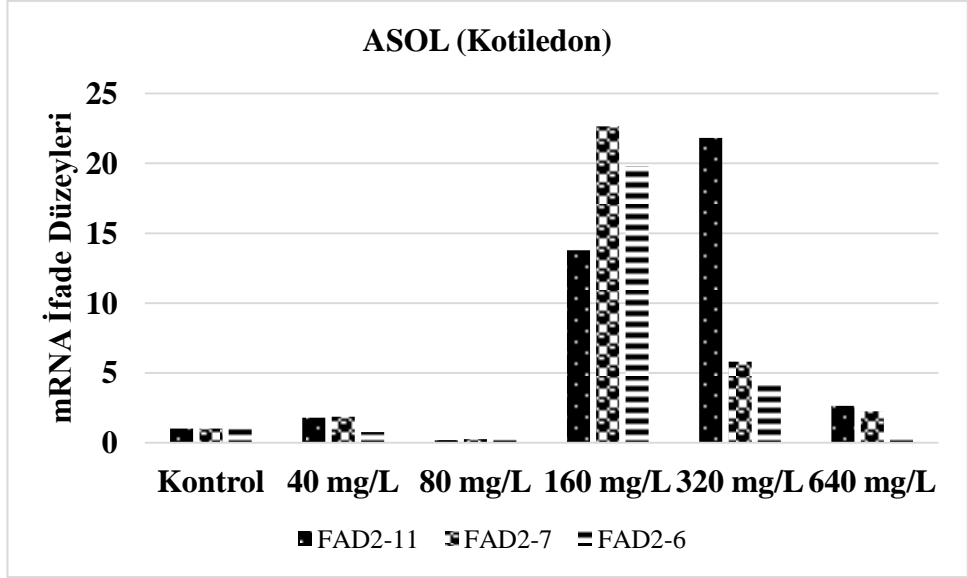
Şekil 4.39 Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidi kök örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

Kadmiyum stresi uygulanan ASOL çeşidinin kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler şekil 4.40'de verilmiştir. Kontrole göre *FAD2-11* gen ifade düzeyi yaklaşık 45 kat ile en yüksek 320 mg/L konsantrasyonda, en düşük ise 80 mg/L konsantrasyonda yaklaşık 18 kat şeklinde ifade olmuştur. *FAD2-7* geni en yüksek 160 mg/L ve en düşük 320 mg/L'de ifade olurken *FAD2-6* geninin en yüksek ve en düşük ifade edildiği konsantrasyonlar sırasıyla 80 mg/L ve 320 mg/L'dir (Çizelge 4.63). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır stresi uygulanan kotiledon örneklerinde elde edilen *FAD2* genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu bulunmuş ve bu durum Dunnett's T3 testi ile doğrulanmıştır (Çizelge 4.66).

Çizelge 4.66 Kadmiyum stresine maruz bırakılan ASOL çeşidine ait kotiledon örneklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyi

Genler	Konsantrasyonlar				
	40 mg/L	80 mg/L	160 mg/L	320 mg/L	640 mg/L
<i>FAD2-11</i>	**	**	**	**	**
<i>FAD2-7</i>	Ns	*	**	**	*
<i>FAD2-6</i>	**	*	**	**	***

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Ns: Anlamsız (non significant)



Şekil 4.40 Kadmium stresi uygulanan ASOL çeşidi kotiledon örneklerinde konsantrasyona bağlı *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında; bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal streslerinin farklı konsantrasyonlarına (Kontrol, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L ve 640 mg/L) maruz bırakılan aspir çeşitlerinin (BALCI, ASOL, LİNAS ve BDYAS-4) kök, kotiledon ve yaprak dokularından alınan örneklerde oleik asidin (C18:1) linoleik aside (C18:2) çeviriminden sorumlu FAD enzimlerini kodlayan *FAD2* gen ailesine ait ve çalışılan bütün dokularda ortak olarak ifade edilen *FAD2-6*, *FAD2-7* ve *FAD2-11* genlerine ait mRNA ifade seviyeleri tespit edilmiştir. Bu genlerin ifade seviyelerindeki farklılıklar Real-Time PCR ile belirlenerek aspir bitkisinin maruz kaldığı ağır metal stresine ilişkili olup olmadıkları ve strese karşı savunma mekanizmasındaki etkileri hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

Real-Time PCR yöntemi genlerin tespit edilmesi, fonksiyonlarının belirlenmesi, sınanması ve çeşitli streslerle olan ilişkilerini belirlemede oldukça etkin bir yöntemdir (Kubista vd. 2006). Tez çalışmasında hedeflenen genlerin ağır metal stres koşulları altında ifade düzeylerindeki meydana gelen değişimler Real-Time PCR yöntemiyle tespit edilmiştir.

Literatürde *FAD2* genleriyle alakalı diğer abiyotik streslerle ilgili yapılmış çalışmalar olmasına karşın, ağır metal stresinin etkilerinin araştırıldığı her hangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan tez çalışması konuyla ilgili olarak ilk olma niteliği taşımaktadır. Bu yüzden çalışmadan elde edilen veriler *FAD2* genlerinin yağ asitleri mekanizmasındaki rolleri esas alınarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda tuz ve soğukluk stresine karşı *FAD* genlerinin savunmada kritik görevler üslendiği ve yağ asitlerinin dönüşümü, modifikasyonu ve yeniden yapılanması gibi işlevlerde aktif olarak görev aldığı bilgisi mevcuttur. Çalışma sonucunda elde edilen veriler *FAD2* genlerinin ağır metal stresine karşı da benzer tepkiler verdiğini destekler niteliktedir.

*FAD2* genleri en kritik desaturaz enzimlerini kodlayan genlerden biridir ve tüm dokularda olduğu gibi fotosentetik olmayan dokularda da oleik asidin (C18:1) linoleik aside (C18:2) dönüşümden sorumludur (Okuley vd. 1994). Hücre membranında çoklu doymamış yağ asit seviyelerinin *FAD* genlerinin regülasyonu yoluyla, bitkilere kuraklık, tuz ve soğuk stresine karşı tolerans sağladığı belirtilmiştir (Im vd. 2001, Zhang vd. 2005).

Literatürde yer alan çalışmalarda; *FAD* genlerinin olumsuz çevre koşullarında ifade seviyelerini artırarak savunmada rol aldığı belirtilmiştir (Heppard vd. 1996, Falcone vd. 2004, Tang vd. 2005). Domates bitkisinde *FAD3* geninin aşırı ifadesi domates fidelerinin tuz stresine karşı toleransını artırırken (Wang 2014), *FAD3*, *FAD8* ve *FAD7* genlerinin aşırı ifadesi tütün bitkisinin kuraklığa (Zhang 2005) ve soğuk stresine karşı toleransını artırmıştır (Khodakovskaya 2006). Ayciçeğinde (*Helianthus annuus*) *FAD2* genlerinin tuz stresine karşı savunma mekanizmasında yer aldığı tespit edilmiştir. (Rodríguez-Vargas vd. 2007).

Ayrıca *Arabidopsis* fidelerinde tuz stresine karşı *FAD2* ve *FAD6* genlerinin ifade düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Zhang 2009, 2012). Yapılan başka bir çalışmada *Arabidopsis* bitkisinde karanlık, sıcaklık ve tuz gibi stres faktörlerine karşı *FAD2* geninin aktif ve duyarlı olduğu bulunmuştur. *Arabidopsis* bitkisinin çeşitli dokularında ifade edilen *FAD2* geninin bitkinin büyüme ve üreme dönemi boyunca işlev gördüğü ve abiyotik streslere karşı savunmada rol aldığı belirtilmiştir (Yuan vd. 2012)

Literatürde yer alan diğer çalışmalarda, *Arabidopsis* bitkisinde (Kargiotidou vd. 2008, Maeda vd. 2008) ve soya fasulyesi tohumunda (Tang vd. 2005) *FAD2* geninin çoklu doymamış yağ asitlerinin üretilmesi yoluyla sıcaklık değişimine karşı adaptasyonu sağladığı belirtilmiştir. Mısır (Berberich vd. 1998) ve keten tohumunda (Vrinten vd. 2005) *FAD2* gen ifadesinin, soğuk stresine yanıt olarak arttığı belirlenmiştir.

Feng vd. (2017) farklı tuz ve soğuk stresine maruz bırakılan pamuk (*Gossypium hirsutum*) bitkisinin farklı dokularında *FAD2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artışın meydana geldiğini belirtmiştir. Tez çalışmasında kullanılan *FAD2* (*FAD2-6*,



*FAD2-7* ve *FAD2-11*) genleriyle aynı gen ailesinde yer alan *FAD2-3* ve *FAD2-4* genlerinin tuz ve soğuk stresine karşı membran adaptasyonuna katıldığını ve hücre membranının bu yolla muhafaza edildiğini vurgulamışlardır. Benzer şekilde *FAD8*'in aşırı ifadesi de soğuk stresinin hasarını azaltmaktadır (Wang 2006). Soya fasulyesinde *FAD2-3* geniyle ilgili çalışmada soğuk stresi altındaki doymamış yağ asidi kompozisyonunda ve *FAD2-3* ile *FAD2-4* genlerinin mRNA ifade seviyelerinde artışın tespiti yapılmıştır (Li vd. 2006).

Ağır metal stresi; bitkilerde tilakoid membranlardan fotosentez için gerekli olan protein ve lipit bileşenlerinin salınımı ve klorofildeki ( $Mg^{+2}$ ) metal değişimi gibi pek çok biyolojik olayı doğrudan etkilemektedir (Maksymiec 2007). Ayrıca ağır metal stresi reaktif oksijen türlerinin de (ROS) artmasını tetiklemektedir. Ağır metal kaynaklı ROS birikmesi ve lipit peroksidaz aktivitesi sonucunda bitki membran lipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyona uğrayarak membran bütünlüğünün zarar görmesine ve kaybına yol açmaktadır (Mithofer vd. 2004).

Ağır metal stresine maruz kalan bitkiler çeşitli lipitlerin ve lipit yapısına katılan yağ asitlerinin yapısında ve miktarında değişiklikler yaparak stresle başa çıkma yoluna gitmektedirler (Mithofer vd. 2004, Koeduka vd. 2005, Maksymiec 2007).

Literatürde yer alan pek çok çalışmada; bitkilerde bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) ağır metal streslerine karşı tolerans, hücre membranlarındaki artan yağ asidi doymamışlığı ile artmaktadır (Howlett ve Avery 1997). Tez çalışmasında kullanılan *FAD2* genlerinin ifade düzeylerinde meydana gelen artışın, ağır metal stresine karşı yağ asiti miktarını artırmaya yönelik olduğu düşünülmektedir.

Li vd. (2015) bakır (Cu) ve kurşun (Pb) ağır metal streslerinin aspir bitkisinin fide büyüme ve gelişimi ile glutatyon (*GSH*) gen ifadesi düzeylerine olan etkilerini araştırmışlardır. Bakır ağır metalinin düşük konsantrasyonlarında fide gelişimi ve *GSH* ekspresyon seviyelerinin arttığı belirtilmiştir. Fide gelişimi ve *GSH* ekspresyon seviyesi, artan Cu ve Pb konsantrasyonlarıyla önemli ölçüde azalmıştır. Sonuç olarak aspir bitkisinin düşük Cu konsantrasyonlarına kısa süre maruz kalması normal bitki

büyümesini korumak için GSH sentezinde artışa neden olmuştur. Aspir bitkisinin yüksek Cu ve Pb streslerine uzun süreli maruz kalması ise GSH metabolik zincirini olumsuz etkilemiş ve aspir bitkisi açısından ciddi toksisite oluşturmuştur. Bu çalışmada tespiti yapılan *GSH* ekspresyon seviyesindeki değişim, tez çalışmasında elde edilen *FAD2* genlerinin ekspresyon seviyesindeki değişimle benzer niteliktedir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar yukarıda belirtilen literatür çalışmalarıyla birbirini destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda kullanılan çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı *FAD* genlerinin ifade düzeylerinde artışlar tespit edilmiştir. Böylece yağ asidi metabolizmasının yeniden regülasyonu sağlanarak strese karşı tolerans artırılmıştır. Ağır metallerin oluşturduğu stresin, diğer abiyotik ya da biyotik stres faktörleriyle benzer mekanizmaları tetiklediği göz önünde bulundurulduğunda, aspir bitkisinde ağır metallerin stresine karşı *FAD2* genlerinin ifade düzeylerindeki yukarı yönlü değişim belirtilen çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak tez çalışmasından elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde bakır stresi uygulanan aspir çeşitlerinde *FAD2* genlerinin ifade düzeylerinin düşük konsantrasyonlarda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde yer alan çalışma sonuçlarına benzer şekilde elde edilen bu sonucun bakırın bitkiler tarafından mikro besin elementi olarak kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gautam vd. (2016) bakırın bitkiler tarafından mikro besin elementi olarak kullanılmasına rağmen toksik etkisinin zamana ve doza bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Tez çalışmasında; artan bakır konsantrasyonlarında *FAD2* genlerinin ifadelerinin düşmesi ve kritik nokta olarak kabul edilebilecek olan 160 mg/L ile 320 mg/L'den sonra yeniden artış göstermesi, oluşan strese karşı savunma mekanizmasının devreye girdiğini ve *FAD2* genlerinin strese karşı savunmada rol aldığına göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Kurşun ağır metal stresine maruz bırakılan aspir çeşitlerinde *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri kontrol grubuna göre stres uygulamasının başladığı 40 mg/L'den 160 mg/L'ye kadar genel bir düşüş yaşarken, 160 mg/L ve 320 mg/L konsantrasyonlarda en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu yükselişin *FAD2* genlerinin kurşun stresinin etkilerini en aza indirmek için olduğu düşünülmektedir. Bu noktalarda *FAD2* genlerinin savunma

mekanizmasında kritik rol aldığı görülmektedir. En son değer olan 640 mg/L'de ise *FAD2* genlerinin ifadesi kontrol grubunun da altına gerilemiştir. Kritik değer olarak değerlendirilebileceğimiz 320 mg/L konsantrasyondan sonra kurşun stresine bağlı oluşan oksidatif stresin hücresel pek çok biyokimyasal ve fizyolojik olayı bloke ettiği literatür değerlendirmesinde de anlaşılmaktadır (Mithofer vd. 2004, Koeduka vd. 2005, Maksymiec 2007). Bu da strese karşı savunma mekanizmasının yeterli olmadığını göstermektedir.

Kadmiyum ağır metal stresine maruz bırakılan aspir çeşitlerinde ise *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri değerlendirildiğinde, oluşan strese daha erken yanıt verdiği tespit edilmiştir. Buna paralel olarak, 40 mg/L ve 80 mg/L konsantrasyonlarda yükselişe geçen ifade düzeylerinin 160 mg/L'de en yüksek seviyelere ulaştığı görülmektedir. Kadmiyum stresine karşı savunma mekanizması diğer streslere göre daha erken yanıt vermiştir. 320 mg/L ve 640 mg/L değerlerinde ise *FAD2* genlerinin ifade düzeyi, kurşun stresinde olduğu gibi yeniden düşüşe geçmiştir. Bu da kadmiyum ağır metaline karşı verilen stres cevabının yetersiz kaldığını göstermektedir.

Ek olarak literatürde yapılan bazı çalışmalar, çeşitli genlerin ifade profillerinin dokuya spesifik olduğunu bildirmişlerdir (Yang vd. 2012, Büyük vd. 2016, Xue vd. 2017). Tez çalışmasında bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metal streslerine maruz kalan 4 farklı aspir çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak dokularında *FAD2* genlerinin farklı ifade düzeylerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde kök, kotiledon ve yaprak dokularında yapısal olarak *FAD2* (*FAD2-6*, *FAD2-7* ve *FAD2-11*) genlerinin aktif olduğu (Cao vd. 2013) ve dokuya spesifik stres cevabında etkin rol aldığı gösterilmiştir.

Stratejik öneme sahip ve önemli bir yağ bitkisi olan aspir bitkisinde oleik asidin linoleik aside çeviriminden sorumlu olan *FAD2* genleri ile ilgili böyle bir çalışma daha önce yapılmamış olup, aspir bitkisinin ağır metal streslerine karşı göstermiş olduğu tepkinin genetik mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bu çalışma ile ağır metal stres faktörleri varlığında *FAD2* genlerinin ekspresyonlarındaki değişimler tespit edilmiştir.

Bu sayede strese karşı savunma mekanizmalarının açığa çıkarılmasına katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde *FAD* genleri, membran lipitlerinde yağ asidi mekanizmalarını düzenleyerek olumsuz koşullara karşı bitki toleransını geliştirmektedir. *FAD2* genlerinin regülasyonu, bitki gelişimi ve farklı abiyotik streslere karşı verilen cevabın anlaşılmasında önemlidir. *FAD2* geninin daha kapsamlı çalışılması, bitkilerde yağ kalitesinin ve stres direncinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Yapılan tez çalışmasından elde edilen bulgular; *FAD2* genlerinin aspir çeşitlerinde ağır metal stresine karşı savunmada kritik rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışma ile *FAD2* geninin aspir bitkisinde ileride yapılabilecek çalışmalar için iyi bir aday gen olduğu da gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Ahlawat, I.P.S. 2008. Agronomy-Rabi Crops Safflower. Division of Agronomy Indian Agricultural Research Institute, 10, New Delhi/India.
- Akinerdem, F. and Öztürk, Ö. 2008. Safflower and biodiesel quality in Turkey. 7. International Safflower Conference. Australian Oilseeds Federation, Wagga Wagga, Australia.
- Allan, R. 1997. Introduction: mining and metals in the environment. J. Geochem. Expl, 58, 95-100.
- Anonim. 2010a. Web sitesi: <https://eziraatci.com/aspir-yetistirciligi-tarimi.html>. Erişim tarihi: 04/07/2018.
- Anonim. 2010b. Aspir raporu. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, Basılmamış bilgisayar kayıtları, Ankara.
- Anonim. 2010c. Aspir tarımı. Broşür, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim. 2011a. Aspir tarımı (*Carthamus tinctorius* L.). Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Eskişehir. Web sitesi: [www.albiyobir.org.tr/files/img\\_etc/e06-1008-aspartarimi.ppt](http://www.albiyobir.org.tr/files/img_etc/e06-1008-aspartarimi.ppt), Erişim tarihi: 08/06/2018.
- Anonim. 2011b. Piyasaya arz edilecek benzin türlerinin, yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanol ve yağ asidi metil esteri içeriği. 27 Eylül 2011 tarih ve 28067 sayılı Resmi Gazete.
- Anonim. 2012. Web sitesi: [http://www.altinekindernegi.org/web/altinekin\\_ekon\\_bilgi.html#aspir](http://www.altinekindernegi.org/web/altinekin_ekon_bilgi.html#aspir), Erişim tarihi: 04.07.2018.
- Anonim. 2016. Web sitesi: [http://gapgundemi.com/haber-aspir\\_bitkisi\\_urfa%E2%80%99yi\\_sevdi-23407.html](http://gapgundemi.com/haber-aspir_bitkisi_urfa%E2%80%99yi_sevdi-23407.html), Erişim tarihi: 05.07.2018.
- Anonim. 2017a. Web sayfası: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001), Erişim tarihi: 21.06.2018.
- Anonim. 2017b. Web sayfası: <http://www.bysd.org.tr/HaberGoruntule.aspx?ID=179>, Erişim tarihi: 21.06.2018.
- Anonymous. 2003. Web sitesi: <https://underthesunseeds.com/products/orange-safflower-seeds-carthamus-tinctorius-10-seeds>, Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Anonymous. 2006. Web sayfası: <http://wssa.net/weed/herbicides/>, Erişim tarihi: 10.06.2018.

- Anonymous. 2007. [https://www.uni-marburg.de/fb17/fachgebiete/ botanik\\_mykologie/ spezbot/ carthamus\\_tinctorius](https://www.uni-marburg.de/fb17/fachgebiete/botanik_mykologie/spezbot/carthamus_tinctorius), Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Anonymous. 2008. Web sitesi: [http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/ index](http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index), Erişim Tarihi: 10.05.2018.
- Anonymous. 2011. Web sitesi: <https://www.indiamart.com/proddetail/safflower-seed-16285347097.html>, Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Anonymous. 2013. Web sitesi: [https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/en/home/topics/plant-production/field\\_crops/kulturarten/alternative-kulturpflanzen/safflor.html](https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/en/home/topics/plant-production/field_crops/kulturarten/alternative-kulturpflanzen/safflor.html), Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Anonymous. 2015. Web sitesi: <https://www.pref.saitama.lg.jp/chokotabi-saitama/eng/things/flower/07.html>, Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Anonymous. 2016. Web sitesi: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Erişim tarihi: 10.07.2018.
- Anonymous. 2017. Web sitesi: <http://www.imaherb.com/safflower-extract.html>, Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Anonymous. 2018. Web sitesi: <https://www.naturesgardencandles.com/safflower-oil>, Erişim tarihi: 26.06.2018.
- Asgarpanah, J. and Kazemivash, N. 2013. Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Properties of *Carthamus tinctorius* L. Chin J. Integr. Med, 19(2); 153-159.
- Ashri, A. 1973. Divergen ce and Evolution in The S afflower Genus *Carthamus* L.: Final Research Report, pp. 360, Hebrew University of Jerusalem, Israel.
- Assche, V. and Clijters, H., 1990. Effect of metal on enzyme activity on plants, Plant Cell Environ, 13, 195-206.
- Azevedo, H., Pinto, C.G.G., Fernandes, J., Loureiro, S. and Santos, C. 2005. Cadmium Effects on Sunflower Growth and Photosynthesis. Journal of Plant Nutrition, 28, 2211-2220.
- Babaoğlu, M. 2005. Aspir Tarımı (*Carthamus tinctorius* L.). Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü M¼d¼rl¼đ¼, s. 7, Edirne.
- Babaoğlu, M. 2006. D¼nya'da ve T¼rkiye'de aspir bitkisinin tarihi, kullanım alanları ve ¼nemi. Broř¼r. Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstit¼s¼, Edirne.
- Babaoğlu, M. 2007. Aspir ve tarımı. Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstit¼s¼, Edirne.

- Badpa, K., Dehnavi, M.M. and Yadavi, A. 2016. Response of Safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv. Soffe) seed germination under cadmium nitrate stress to salicylic acid priming. Iranian Journal of Seed Research, 2(2); 185-192.
- Baydar, H. 2000. Bitkilerde yağ sentezi, kalitesi ve kaliteyi artırmada ıslahın önemi. Ekin Dergisi, 11, 50-57.
- Bayrak, A. 1997. Ankara ve Şanlıurfa'da denenen yazlık-kışlık Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) çeşit ve hatlarının yağ asitleri bileşiminin araştırılması. Gıda Dergisi, 22(4); 269-277.
- Belitz, H.D. and Grosch, W. 1987. Food Chemistry. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Londra, Tokyo.
- Berber, S. 2007. Aspir (*Carthamus tinctorious* L.) tohumlarının aerodinamik özelliklerinin belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (yayınlanmış), 62, Tokat.
- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K. and Kusano, T. 1998. Two maize genes encoding x-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. Plant Mol. Biol., 36, 297-306.
- Bergman, J.W and Charles, R.F. 2008. Evaluation of safflower and other oilseed crops grown in the United States Northern Plains Region for biofuels/biobased products. 7. International Safflower Conference. Australian Oilseeds Federation, Wagga Wagga, Australia.
- Berk, A. and Yaşar, B. 2008. Biodiesel production opportunities in rural areas in Turkey. Acta Scientiarum Polonorum, Oeconomia, 7(4); 17-25.
- Burzynski, M. and Klobus, G. 2004. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd and Pb stress. Photosynth, 42(4); 505-510.
- Büyük İ, Soydam-Aydın S. ve Aras S.E. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. Türk Hij. Den. Biyol. Derg, 2(69); 97-110.
- Büyük, İ., Bölükbaşı, E. and Aras, E.S. 2016. Expression of *CtFAD2* gene for early selection in safflower oleic linoleic oil content. Journal of Animal and Plant Sciences, 26(5); 1383-1388.
- Cao, S., Zhou, X.R., Wood, C.C., Green, A.G., Singh, S.P., Liu, L. and Liu, Q. 2013. A large and functionally diverse family of *FAD2* genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). BMC Plant Biology, 13(5); 1-18.
- Castro-Guerrero, N.A. 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd<sup>2+</sup> stress in euglena. J. Bioenerg. Biomembr, 40, 227-235.

- Chomczynski, P. and Mackey, K. 1995. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques Short technical report*, 19(6); 942-945.
- Clemens, S. and Persoh, S. 2009. Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Science*, 177, 266-271.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P.B. 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol*, 53, 159-182.
- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G.R.G., Maestri, E. and Marmiroli, N. 1998. DNA fingerprint analysis by PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, 37, 2739-2749.
- Çoşge, B., Gürbüz, B. and Kıralan, M. 2007. Oil content and fatty acid composition of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in spring and winter. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3); 11-15.
- Dajue, L., Mündel, H.H. 1996. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). In: Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7. Gatersleben, Rome: Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, International Plant Genetic Resources Institute.
- Dar, A.A., Choudhury, A.R., Kancharla, P.K. and Arumugam, N. 2017. The *FAD2* gene in plants: occurrence, regulation, and role. *Frontiers in plant science*, 8, 1789-1798.
- Davis, P.H. 1975. Flora of Turkey and The East Aegeans Islands. Vol: 5, The University Press. Edinburg, England.
- De Jonghe, W.R.A. and Adams F.C. 1982. Biochemical cycling of organic lead compounds. *Ecotoxicology*, 561-593.
- Delhaize, E. 1989. effects of cadmium on gene expression in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive datura innoxia cells. *Plant Mol. Biol*, 12, 487-497.
- Delshad, E., Yousefi, M., Sasannezhad, P., Rakhshandeh, H. and Ayati, Z. 2018. Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): A comprehensive review from traditional medicine to modern medicine. *Electronic Physician*, 10(9); 6672-6681.
- Detlefsen, V. 1988. Status report on aquatic pollution problems in Europe. *Aquatic toxicol*, 11, 259-286.



- Dietz, K.J. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediator of heavy metal toxicity in plants, 73-79, In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds), Heavy metal stress in plants, From Molecules to Ecosystem, Berlin, Springer.
- Dinçer, N. 1964. Aspir, Tarım Bakanlığı Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü Yayın No: D-2, Ankara.
- Diwan, H. 2010. Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regul*, 61, 97-107.
- Donaldson, W.E. 1994. Nutritional factors. Introduction to biochemical toxicology. Second edition. Edited by: E. Hodgson and P.E. Levi. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut.
- Duffus, J.H. 2002. Heavy metals a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807.
- Dunnett, C.W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
- Er, C., Başalma, D., Ekiz, H. ve Sancak, C. 2011. Tarla Bitkileri-II., Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2254, I. Baskı, 235, Eskişehir.
- Esendal, E. 2001. Safflower production and research in Turkey. 5th International Safflower Conference, Book of Abstracts, July 23-27, 203-206, Willinston, N.D., USA.
- Falcone, D.L., Ogas, J.P. and Somerville, C.R. 2004. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology*, 4, 17.
- Feng, J., Dong, Y., Liu, W., He, Q., Daud, M.K., Chen, J. and Zhu, S. 2017. Genome wide identification of membrane-bound fatty acid desaturase genes in *Gossypium hirsutum* and their expressions during abiotic stress. *Scientific Reports*, 7, 1-12.
- Gautam, S., Anjani, K. and Srivastava, N. 2016. In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). *Physiol Mol Biol Plants*, 22(1); 121-129.
- Gilbert, J. 2008. International safflower production-An Overview. 7. International Safflower Conference. Australian Oilseeds Federation. Wagga Wagga, Australia.
- Greger, M. and G. Bertell. 1992. Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*, 43(247); 167-173.

- Guan, L.L., Wang, Y.B., Shen, H. and Hou, K. 2012a. Molecular cloning and expression analysis of genes encoding two microsomal oleate desaturases (*FAD2*) from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant mol. Boil. Rep*, 30, 139-148.
- Guan, L.L., Wu, W., Hu, B., Li, D., Chen, J.W., Hou, K. and Wang, L. 2014. Developmental and growth temperature regulation of omega-3 fatty acid desaturase genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genet Mol Res*, 13(3); 6623-6637.
- Guan, L.L., Xu, Y.W., Wang, Y.B. and Chen, L. 2012b. Isolation and characterization of temperature-regulated microsomal oleate desaturase gene (*FAD2*) from normal type and high oleic safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 391-402.
- Guo, W.J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P.B., 2003. Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: Tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist*, 159, 369-381.
- Gupta, K.J. 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J. Exp. Bot*, 56, 2601-2609.
- Günel, N. 2001. Türkiye’de ekim alanı daralan bir yağ bitkisi: Aspir. *Marmara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Öneri Dergisi*, 4(16); 101-105.
- Haag-Kerver, A., Schafer, H., Heiss, S., Walter, C. and Rausch, T. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 50(341); 1827-1835.
- Hafizi, Z. and Nasr, N. 2018. The effect of zinc oxide nanoparticles on safflower plant growth and physiology. *Engineering, Technology and Applied Science Research*, 8(1); 2508-2513.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1-11.
- Hammand, P.B. and Beliles, R.P. 1980. Metals. In: J. Doull, C.D. Klaassen and Amdur, M.O. ed. *Toxicology 2th Ed.* McMillan Publishing Co. Inc. 409-462, New York.
- Hapke, H.J. 1991. Effects of metals on domestic animals. VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Harwood, J.L. 1980. Plant acyl lipids: structure, distribution, and analysis, in: P.K. Stumpf, E.E. Conn (Eds.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 4, Academic Press, 55, New York,.

- Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L. and Miao, G.H. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal [omega]-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol*, 110, 311-319.
- Hernandez, M.L., Padilla, M.N., Jose, M.M. and MartiNez-Rivas, M. 2009. Expression analysis identifies *FAD2-2* as the olive oleate desaturase gene mainly responsible for the Linoleic Acid content in virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem*, 57, 6199-6206.
- Houshmandfar, A. and Moraghebi, F. 2011. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc on seed germination and seedling growth of safflower. *African Journal of Agricultural Research*, 6(6); 1463-1468.
- Howlett, N.G. and Avery, S.V. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2971-2976.
- Iglesia-Turino, S., Febrero, A., Jauregui, O., Caldelas, C., Araus, J.L. and Bort, J. 2006. Detection and quantification of unbound phytochelatin 2 in plant extracts of *Brassica napus* grown with different levels of mercury. *Plant Physiology*, 142, 742-749.
- Im Y.J., Han, O., Chung, G.C. and Cho, B.H. 2001. Antisense expression of an *Arabidopsis* omega-3 fatty acid desaturase gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecular Cell*, 13, 264-271.
- Jaworski, J.G. 1987. Biosynthesis of monoenoic and polyenoic fatty acids, in: P.K. Stumpf (Ed.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 9, Academic Press, 159-174, Orlando.
- Johnson, B.J. and Jimmerson, J. 2003. Safflower. Briefing No:58. Agricultural marketing policy center. Montana State University, Montana, USA.
- Johnson, R.C., Ghorpade, P.B. and Bradley, V.L. 2001. Evaluation of the USDA core safflower collection for seven quantitative traits. Vth International Safflower Conference, Williston, North Dakota and Sidney, July 23-27, 149-152, USA.
- Juszczuk, I.M. and Rychter, A.M. 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim. Pol.*, 50, 1257-1271.
- Kagi, J.H.R. 1991. Overview of metallothioneins. *Method. Enzymol*, 205, 613-626.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven, A. ve Timur, S. 2007. Metallerin çevresel etkileri-I. Web sayfası: [www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136\\_4753.pdf](http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf). Erişim Tarihi: 13.06.2018.

- Karabaş, H. 2013. Ülkemiz ıslahçı çeşitlerinden Remzibey-05 Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) tohumlarından üretilen biyodizelin yakıt özelliklerinin incelenmesi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27(1); 9-17.
- Karademir, M. ve Toker M.C. 1995. Ankara'nın bazı kavşaklarında yetişen çim ve bitkilerde egzoz gazlarından gelen kurşun birikimi. II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 699-711. Ankara.
- Kartha, D. 2010. Safflower oil benefits. Web sitesi: <http://www.buzzle.com/articles/safflower-oil-benefits.html>. Erişim tarihi: 10.06.2018.
- Kaya, Y., Evcı, G., Kaya, V. ve Kaya, M. 2007. Oleik tip ayçiçeği tarımı ve gelecekteki yönü. 1. Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu. 134-140.
- Kayaçetin, F., Katar, D. ve Arslan, Y. 2012. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)' in dölleme biyolojisi ve çiçek yapısı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 21(2); 75-80.
- Kayahan, M. 2003. Yağ Kimyası. ODTÜ Yayıncılık, 3, Ankara.
- Kırbağ, F. and Munzuroğlu, O. 2006. Toxic effects of cadmium (Cd<sup>++</sup>) on metabolism of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. Acta Agric Scand, Section B-Soil and Plant Sci, 3(56); 224-229.
- Kırbağ, F., Koçak, A. ve Munzuroğlu, Ö. 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) fidelerinde kök, gövde ve yaprak ile yaprak disklerinin absisik asit düzeyleri üzerine cıvanın (Hg<sup>++</sup>) etkileri. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri dergisi, 1(4); 645-653.
- Khodakovskaya, M., McAvoy, R., Peters, J., Wu, H. and Li, Y. 2006. Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. Planta, 223, 1090-1100.
- Koç, E, Üstün, A.S. and Arıcı, Y. 2012. Biber (*Capsicum annuum* L.) fidelerinde farklı çinko konsantrasyonlarının total protein, hidrojen peroksit içeriği ve peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 13(2); 205-212.
- Koç, H. 2001. Yağ Bitkileri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitapları Serisi No: 22, Tokat.
- Koeduka, T., Matsui, K., Hasegawa, M., Akakabe, Y. and Kajiwara, T. 2005. Rice fatty acid a-dioxygenase is induced by pathogen attack and heavy metal stress: activation through jasmonate signaling. J. Plant Physiol., 162, 912-920.

- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsaftaris, A. and Farmaki, T. 2008. Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (*FAD2*) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). The Journal of Experimental Botany, 59, 2043-2056.
- Köse, T.F., Köse, A. ve Karaman, Y. 2008. Kurak koşullarda aspir bitkisinin alternatif olarak değerlendirilmesi. Türkiye III. Tohumculuk Kongresi, 25-28 Haziran 2008, 141-146, Nevşehir.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka R., Sjöback, R. and Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol. Aspects Med., 2(3); 95-125.
- Kümeli, T. 2006. Yağlar. Web sayfası: [www.taylankumeli.com](http://www.taylankumeli.com). Erişim tarihi: 29.06.2018.
- Larsson, E., Bornman, J. and Asp, H. 1998. Influence of UV-B radiation and Cd<sup>2+</sup> on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content. Journal of Experimental Botany 49(323); 1031-1039.
- Lee, K.R., Sohn, S., Jung, J.H., Kim, S.H., Roh, K.H., Kim, J.B., Suh, M.C. and Kim, H.U. 2013. Functional analysis and tissue differential expression of four *FAD2* genes in amphidiploid *Brassica napus* derived from *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. Gene, 531, 253-262.
- Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental Stresses. London: Academic Press, 697, New York.
- Li, D., Hu, B., Wang, Q., Liu, H., Pan, F. and Wu, W. 2015. Identification and evaluation of reference genes for accurate transcription normalization in safflower under different experimental conditions. PloS One, 10(10); 1-16.
- Li, L.Y., Wang, X.L., Gai, J.Y. and Yu, D.Y. 2007. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. J Plant Physiol, 164, 1516-1526.
- Li, S., Zhang, G., Gao, W., Zhao, X., Deng, C. and Lu, L. 2015. Plant Growth, Development and Change in Gsh Level in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Exposed to Copper and Lead. Arch. Biol. Sci, 67(2); 385-396.
- Lichtenhaler, H.K. 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. J. Plant Physiol, 148, 4-14.
- Lindberg, S. and Wingstrand, G. 1985. Mechanism of Cd<sup>2+</sup> inhibition of (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) ATPase activity and K<sup>+</sup> (86Rb<sup>+</sup>) uptake in young roots of sugar beet (*Beta vulgaris*). Physiologia Plantarum, 63, 181-186.

- Liu, Q., Singh, S.P., Brubaker, C.L. and Green, A.G. 1999b. Cloning and sequence analysis of a novel member (accession No. Y10112) Of the microsomal  $\omega$ -6 fatty acid desaturase family from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Physiol*, 120, 330-339.
- Liu, Q., Singh, S.P., Brubaker, C.L., Sharp, P.J., Green, A.G. and Marshall, D.R. 1999a. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a microsomal  $\omega$ -6 fatty acid desaturase from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Funct Plant Biol*, 26, 101-106.
- Livak, J.K. and Schmittgen, D.T. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Macartney, A., Maresca, B. and Cossins, A.R. 1994. Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition, in: A.R. Cossins (Ed.), *Temperature Adaptation of Biological Membranes*, Portland Press, pp. 129-139, London.
- Madaan, N., Mudgal, V., Mishra, S., Srivastava, A.K. and Singh, R.B. 2011. Studies on biochemical role of accumulation of heavy metals in Safflower. *The Open Nutraceuticals Journal*, 4, 199-204.
- Maeda, H., Sage, T.L., Isaac, G., Welti, R. and Dellapenna, D. 2008. Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. *The Plant Cell*, 20, 452-70.
- Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant*, 29, 177-187.
- Marrs, K. and Walbot, V. 1997. Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiology*, 113, 93-102.
- Marschner, H. 2002. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
- Mastin, B.J. and Rodgers, J.H. 2014. Toxicity and bioavailability of copper herbicides (Clearigate, Cutrine-Plus, and Copper Sulfate) to freshwater animals. *Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 445-51.
- Maxwell, D.P. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96, 8271-8276.
- Mir, G., Domenech, J., Huguet, G., Guo, W.J., Goldsbrough, P., Atrian, S. and Molinas, M. 2004. A plant type 2 mt from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2483-2493.
- Mithofer, A. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: Evidence for Common Signals. *FEBS Lett*, 566, 1-5.

- Mittler, R. 2002. Oxidative Stress. Trends Plant Sci., 7, 405-410.
- Moller, I.M. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Ann. Rev. Plant Biol, 58, 459- 48.
- Moosavi, S.A., Gharineh, M.H., Afshari, R.T. and Ebrahimi, A. 2012. Effects of some heavy metals on seed germination characteristics of Canola (*Brassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus tinctorius*) to evaluate phytoremediation potential of these crops. Journal of Agricultural Science, 4(9); 11-19.
- Moradi, L. and Ehsanzadeh, P. 2015. Effects of Cd on photosynthesis and growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. Photosynthetica, 53(4); 506-518.
- Murata, N. and Wada, H. 1995. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. Biochem. J, 308, 1-8.
- Murata, N., Wada, H. and Gombos, Z. 1992. Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. Plant Cell Physiol, 33, 933-941.
- Mündel, H.H. 2008. Major achievements in safflower breeding and future challenges. 7. International Safflower Conference. Australian Oilseeds Federation, Wagga Wagga, Australia.
- Namdjoyan, S., Kermanian, H., Soorki, A.A., Tabatabae, S.M. and Elyasi, N. 2017. Interactive effects of Salicylic acid and nitric oxide in alleviating zinc toxicity of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Ecotoxicology, 26, 752-761.
- Namdjoyan, S., Khavari-Nejad, R. and Bernard, F. 2012b. The effect of cadmium on growth and antioxidant responses in the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) callus. Turk. J. Bot, 36, 145-152.
- Namdjoyan, S., Namdjoyan, S. and Kermanian H. 2012a. Induction of phytochelatin and responses of antioxidants under cadmium stress in safflower (*Carthamus tinctorius*) seedlings. Turk. J. Bot, 36, 495-502.
- Nas, S., Gökalp, Y.H. ve Ünsal, M. 2001. Bitkisel Yağ Teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi, Mimarlık Fakültesi Matbaası, 322, Denizli.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 49, 249-279.
- Nzengue, Y., Candeias, S.M., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A., Rachidi, W. and P. Guiraud. 2011. The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. J. Trace Elem. Med. Biol, 25, 171-180.

- Ohlrogge, J. and Browse, J. 1995. Lipid Biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 957-970.
- Okçu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M. ve Pehlivan, M. 2009. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri. *Alinteri*, 17, 14-26.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E. and Browse, J. 1994. *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell*, 6, 147-158.
- Öğüt, H., Oğuz, H., Şahin, S., Gezgin, S., Aydın, F., Özen, D., Özdemir, S. ve Dayıoğlu, R. 2015. Enerji amaçlı aspir tarımında farklı fosfor uygulamalarının biyodizel kalitesine etkileri. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 29(2); 61-68.
- Öz, M. 2016. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)’de ekim zamanı, çeşit ve verim ilişkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1); 71-81.
- Öztürk, Ö., Akınerdem, F., Bayraktar, N. ve Ada, R. 2007. Konya koşullarında bazı aspir çeşitlerinin verim, verim unsurları ve yağ oranlarının incelenmesi. I. Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu, 28-31 Mayıs, 191-202, Samsun.
- Palizban, A.A., Asghari, G.H., Badiee, A., Mardani-Nafchi, H. and Kazemi, A.R. 2016. Determination of contamination of Lead and Cadmium in Canola and safflower in around of Isfahan Still Company (ESCO) and Compare this pollution with oil extracted from them. *J. Shahrekord Univ. Med. Sci*, 18(5); 94-102.
- Pham, A.T., Lee, J.D., Shannon, J.G. and Bilyeu, K.D. 2010. Mutant alleles of *FAD2-1A* and *FAD2-1B* combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. *BMC Plant Biology*, 10, 195-206.
- Pirtle, I.L., Kongcharoensuntorn, W., Nampaisansuk, M., Knesek, J.E., Chapman, K.D. and Pirtle, R.M. 2001. Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2*). *Biochim Biophys Acta*, 1522, 122-129.
- Prado, C. 2010. Uptake of Chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. *J. Hazard. Mater*, 177, 546-553.
- Rausser, W.E. 1987. Comportamental efflux analysis and removal of extracellular cadmium from roots. *Plant Physiology*, 85, 62-65.
- Rausser, W.E. 1999. The structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biol. Biophys*, 31, 19-48.



- 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.
- Reddy, A.M., Kumar, S.G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S. and Sudhakar, C. 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60, 97-104.
- Rether, A. 2002. Entwicklung und charakterisierung wasserlöslicher benzoylthioharnstoffunktionalisierter polymere zur selektiven abtrennung von schwermetallionen aus abwassern und prozesslösungen. PhD thesis. Münih Technical University.
- Rodriguez Rodriguez, M.F., Salas, J.J., Venegas Caleron, M., Garces, R. and Martinez Force, E. 2016. Molecular cloning and characterization of the genes encoding a microsomal oleate  $\Delta$ 12 desaturase (*CsFAD2*) and linoleate  $\Delta$ 15 desaturase (*CsFAD3*) from *Camelina sativa*. *Industrial Crops and Products*, 89, 405-415.
- Rodríguez-Vargas, S., Sánchez-García, A., Martínez-Rivas, J.M., Prieto, J.A. and Rande-Gil, F. 2007. Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 110-116.
- Roscoe, J.T. 1975. *Fundamental research statistics for the behavioral sciences*. New York: Holt, Rinehart and Winston, Inc. 63.
- Sanlı, Y. 1984. Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 2, 17-37.
- Savva, D. 1998. Use of the DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicol. Environ. Safely*, 41, 103-106.
- Saygıdeğer, S. 1995. *Lycopersicum esculentum* L. bitkisinin çimlenmesi ve gelişimi üzerine kurşunun etkileri. 2. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. 588-597, Ankara.
- Scheffler, J.A., Sharpe, A.G., Schmidt, H., Sperling, P., Parkin, I.A., Lühs, W., Lydiate, D.J. and Heinz, E. 1997. Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. *Theor Appl Genet*, 94, 583-591.
- Schlueter, J.A., Vasylenko-Sanders, I.F., Deshpande, S., Yi, J., Siegfried, M., Roe, B.A., Schlueter, S.D., Scheffer, B.E. and Shoemaker, R.C. 2007. The *FAD2* gene family of Soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. *Crop Sci*, 47, 23-36.
- Schweizer, E., Werkmeister, K. and Jain, M.K. 1978. Fatty acid biosynthesis in yeast. *Mol. Cell. Biochem*, 21, 95-107.

- Serim, A.T., Asav, Ü. ve Türkseven, S. 2015. Ankara ili Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) ekiliş alanlarında bulunan yabancı otların tespiti. Turkish Journal of Weed Science, 18(1); 19-23.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol, 17, 35-52.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.J. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. Trends Plant Sci., 14, 43-50.
- Singh, V. and Nimbkar, N. 2006. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Chap. 6. In: Singh RJ (ed) Genetic resource, chromosome engineering, and crop improvement, Vol 4, 167-194, New York.
- Siripornadulsil, S. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell, 14, 2837-2847.
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.H., Kundi, M. and Knasmüller, S. 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. Environ. Mol. Mutag, 31, 183-191.
- Stobart, A., Griffiths, W., Bukhari, I. and Sherwood, P. 1985. The effect of Cd<sup>2+</sup> on biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiologia Plantarum, 63, 293-298.
- Stumpf, P.K. 1980. Biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids, in: P.K. Stumpf, E.E. Conn (Eds.), Biochemistry of Plants, Vol. 4, Academic Press, 177-204, New York.
- Şahin, G. ve Taşlıgil, N. 2016. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.): An industrial plant with increasing strategical importance. Türk Coğrafya Dergisi, 66, 51-62.
- Tang, G.Q., Novitzky, W.P., Griffin, H.C., Huber, S.C. and Dewey, R.E. 2005. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. The Plant Journal, 44, 433-446.
- Tortopoğlu, A.İ. 2011. Benzin ve motorinde kullanılacak biyoyakıt üretimi için gerekli eşdeğer tarım arazisi miktarı. Hasad Aylık Tarım Dergisi, 27(319); 17-32.
- Tsukamoto, Y., Wong, H., Mattick, J.S. and Wakil, S.J. 1983. The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. J. Biol. Chem, 258, 15312-15322.
- Tu, Y., Li, D., Fan, L., Jia, X., Guo, D., Xin, H. and Guo, M. 2018. DOXC-class 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in safflower: Gene characterization, transcript abundance, and correlation with flavonoids. Biochemical Systematics and Ecology, 80, 14-20.

- Uher, J. 2008. Safflower in European Floriculture: A review. 7. International Safflower Conference. Australian Oilseeds Federation, Wagga Wagga, Australia.
- Upadhyay, R.K. and Panda, S.K. 2009. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). C.R. Biol. 332, 623-632.
- Vranova, E. 2002. Signal Transduction During Oxidative Stress. J. Exp. Bot, 53, 1227-1236.
- Wang, H.S. 2014. A tomato endoplasmic reticulum (ER)-type omega-3 fatty acid desaturase (*LeFAD3*) functions in early seedling tolerance to salinity stress. Plant Cell Rep., 33, 131-142.
- Wang, J.W. 2006. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast omega-3 fatty acid desaturase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 340, 1209-1216.
- Weiss, E.A. 1971. Castor Sesame and Safflower. Published: Barnes and Noble, 901, New York.
- Wu, C.A., Yang, G.D., Meng, Q.W. and Zheng, C.C. 2004. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plays an important role in salt stress. Plant Cell Physiolog, 45, 600-607.
- Xue, Y., Yin, N., Chen, B., Liao, F., Win, A.N., Jiang, J. and Chai, Y. 2017. Molecular cloning and expression analysis of two *FAD2* genes from chia (*Salvia hispanica*). Acta physiologiae plantarum, 39(4); 82-95.
- Xue, Y., Zhang, X., Wang, R., Chen, B., Jiang, J., Win, A.N. and Chai, Y. 2017. Cloning and expression of *Perilla frutescens* *FAD2* gene and polymorphism analysis among cultivars. Acta Physiologiae Plantarum, 39(3); 84-95.
- Vrinten, P., Hu, Z., Munchinsky, M.A., Rowland, G. and Qiu, X. 2005. Two *FAD3* desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. Plant Physiol., 139, 79-87.
- Yang, Q., Fan, C., Guo, Z., Qin, J., Wu, J., Li, Q., Fu, T. and Zhou, Y. 2012. Identification of *FAD2* and *FAD3* genes in *Brassica napus* genome and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents. Theor. Appl. Genet, 125, 715-729.
- Yarsan, E., Bilgili, A. and Türel, I., 2000. Heavy metal levels in mussels (*Unio stevenianus* Krynicki) obtained from Van Lake. Turk J. Vet. Animal Science, 24, 93-96.
- Yaydı, K. 2010. Tarla Bitkileri, Anadolu Üniversitesi Yayınları No. 2256, Eskişehir.

- Yenice, N. ve Bayraktar, N. 1996. Yerli Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarında Karyotip Analizi. Tarım Bilimleri Dergisi, 2(2); 81-86.
- Yıldız, M., Terzi, H. ve Uruşak, B. 2011. Bitkilerde krom toksisitesi ve hücrel cevaplar. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27(2); 163-176.
- Yıldız, N. 2001. Toprak kirletici bazı ağır metallerin (Zn, Cu, Cd, Pb, Co ve Ni) belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 32(2); 207-213.
- Yıldız, N. 2004. Toprak ve bitki ekosistemindeki ağır metaller. ZT-531. Yüksek Lisans Ders Notları. Erzurum.
- Yu, M.H. 2005. Environmental toxicology: Biological and health effects of pollutants. CRC press, Boca Raton.
- Yuan, S., Wu, X., Liu, Z., Luo, H. and Huang, R. 2012. Abiotic stresses and phytohormones regulate expression of FAD2 gene in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Integrative Agriculture, 11(1); 62-72.
- Zhang, F., Shi, W., Jin, Z. and Shen, Z. 2003. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to toxicity. Journal of Plant Nutrition, 26(9); 1779-1788.
- Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta-Dahan, Y., Leikin-Frenkel, A., Salts, Y., Shabtai, S. and Ben-Hayyim, G. 2005. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct  $\omega$ -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. Plant J., 44, 361-371.
- Zhang, D.Y., Pirtle, I.L., Park, S.J., Nampaisansuk, M., Neogi, P., Wanjie, S.W., Pirtle, R.M. and Chapman, K.D. 2009. Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2-4*) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants. Plant Physiol Biochem, 47, 462-471.
- Zhang, J., Liu, H., Sun, J., Li, B., Zhu, Q., Chen, S. and Zhang, H. 2012. *Arabidopsis* fatty acid desaturase *FAD2* is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth. PloS one, 7(1); 303-313.
- Zhang, Q.Y., Yu, R., Xie, L.H., Rahman, M.M., Kilaru, A., Niu, L.X. and Zhang, Y.L. 2018. Fatty acid and associated gene expression analyses of three tree peony species reveal key genes for  $\alpha$ -linolenic acid synthesis in seeds. Frontiers in plant science, 9, 106-117.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ekrem BÖLÜKBAŞI

Doğum Yeri : Kayseri

Doğum Tarihi : 01.12.1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Nuh Mehmet BALDÖKTÜ Anadolu Lisesi (2004)

Lisans : Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2013)

Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2013-2018)

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2011-)

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2011-2018)

### SCI ve diğer dergilerde yayınlanan makaleler

**Bölükbaşı, E., Bölükbaşı, A. and Aras, E.S.** 2018. Determination of physiological, biochemical and molecular effects of zinc stress on the growth of sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, 3(2); 530-536.

Karakaş, M. and **Bölükbaşı, E.** 2017. Bio-insecticide effect of black cumin against Granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) Coleoptera Curculionidae on stored wheat. International Journal of Entomology Research, 2(4); 38-40.

Büyük, İ., **Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2016. Expression of *ctFAD2* gene for early selection in Safflower oleic linoleic oil content. Journal of Animal and Plant Sciences, 26(5); 1383-1388.

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2016. Determination of DNA methylation levels with CRED-RA technique in the genome of sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.) subjected to zinc stress. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, 1(3); 438-444.

**Bölükbaşı, E.**, Bölükbaşı, A. and Aras, E.S. 2016. Evaluation of Zinc  $Zn^2$  stress on protein content DNA and changes in DNA methylation models in sunflower seed germination. Journal of Biotechnology, 231, 76-77.

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2015. Third Generation DNA Sequencing Technologies. International Journal of Scientific and Technological Research, 1(3); 14-21.

Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., **Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2012. Defence responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) contaminated with different concentration of  $Cu^2$ . Journal of Biotechnology, 161, 30.

### **Uluslararası Kongreler**

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2017. Toxic effect of copper heavy metal on stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Plants. International Ecology Symposium, 1(1); 832-832. (Poster sunumu)

Karakaş, M. and **Bölükbaşı, E.** 2017. Bio-insecticide effect of black cumin against granary weevil (*Sitophilus granarius*) on stored wheat. International Ecology Symposium, 1(1); 459-459. (Poster sunumu)

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2017. Effect of zinc heavy metal stress on *FAD2* genes in safflower plants (*Carthamus tinctorious* L.). International Ecology Symposium, 1(1); 136-136. (Sözlü sunum)

Karakaş, M. and **Bölükbaşı, E.** 2017. Model organisms and molecular applications. International DNA Day and Genome Congress, 1(1); 128-128. (Poster sunumu)

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2017. Detection of physiological and DNA changes in the Genome of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) subjected to copper stress. International DNA Day and Genome Congress, 1(1); 25. (Sözlü sunum)

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2017. Innovative approaches for third generation DNA sequencing technology. International DNA Day and Genome Congress, 1(1); 126. (Poster sunumu)

Karakaş, M., **Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2017. Expression of stress related genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants exposed to zinc stress. International DNA Day and Genome Congress, 1(1), 26. (Sözlü sunum)

**Bölükbaşı, E.** 2016. Gene transfer methods and applications in plants. International Conference on Biological Sciences, 1, 122. (Poster sunumu)

**Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2016. Influence of cadmium stress on DNA methylation levels in the genome of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. International Conference on Biological Sciences, 1, 121. (Poster sunumu)

**Bölükbaşı, E.,** Bölükbaşı, A., Aras, E.S. 2016. Evaluation of Zinc  $Zn^2$  stress on protein content DNA and changes in DNA methylation models in sunflower seed germination. European Biotechnology Conference, 231(s), 76-77. (Sözlü sunum)

Kurt, L., Bölükbaşı, A., Özbey, B.G., Özdeniz, E. and **Bölükbaşı, E.** 2016. Gypsicole Vegetation of Turkey. Gypnet Meetings. Spain. (Davetli Konuşmacı)

Büyük, I., **Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2012. Defence responses in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) contaminated with different concentration of Cu<sup>2</sup>. Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium, 161, 30. (Poster sunumu)

**Bölükbaşı, E.** 2009. Effect of nutrient enrichment on lead uptake by aquatic plant *Lemna minor* L. International Conference on Plants Environmental Pollution. 172. (Poster sunumu)

### **Ulusal Kongreler**

**Bölükbaşı, E.** 2011. Elmalı Dağı (Kayseri) ve çevresinde yayılış gösteren bazı endemik bitkilerin tehlike kategorilerinin belirlenmesi. X. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Çanakkale. (Poster sunumu)

### **Yazılan Ulusal/Uluslararası Kitaplar**

**Bölükbaşı, E.** 2017. Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri. LAP; Lambert Academic Publishing, ed.; P. Petrachi, s:77, ISBN:978-3-659-74130-2.

Karakaş, M. ve **Bölükbaşı, E.** 2017. Sinaps Fizyolojisi. LAP; Lambert Academic Publishing, ed.; M. Col, s: 68, ISBN:978-3-330-03974-2.

### **Projeler**

Bakır (Cu<sup>+</sup>), Kurşun (Pb<sup>+2</sup>) ve Kadmiyum (Cd<sup>+2</sup>) ağır metal streslerine maruz kalmış aspir (*Carthamus tinctorious* L.) çeşitlerinde oleik asidin (Omega-9) linoleik aside (Omega-6) çevriminden sorumlu olan *FAD2* geni mRNA ifade seviyelerinin Real-Time PCR aracılığıyla analizi (Proje No: 16L0430009). Ankara Üniv. BAP Lisansüstü Tez Projesi. **Araştırmacı**, 2016-2018.



Yerli ve yabancı aspir (*Carthamus tinctorius* L.) çeşitlerinde oleik asidin (omega-9) linoleik aside (omega-6) çevriminden sorumlu olan ve kaliteli yağ üretiminde rol sahibi olduğu düşünülen *FAD2* genlerinin Real-Time PCR aracılığıyla analizi (Proje No: 14A0430002). Ankara Üniv. BAP Altyapı Projesi. **Araştırmacı**, 2014-2016.

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinde *Whirly* ve *ARR-B* genlerinin genom düzeyinde tanımlanması, karakterizasyonu ve biyotik stres cevabı ile olan ilişkilerinin gen ifadesi düzeyinde belirlenmesi. Tübitak 1002 Hızlı Destek, **Araştırmacı**, Değerlendirmede.

Amasya Üniversitesi, Aşı Teknolojileri Laboratuvarı Alt Yapı Projesi. Kalkınma Bakanlığı, **Araştırmacı**, Değerlendirmede.

### **Üniversite Dışı Deneyim**

Laborant-Biyolog: Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastaneleri, Merkez Lab., 2007-2009.

Biyoloji Sınav Uzmanı: ÖSYM, Sınav Uzmanı, 2011, Ankara.

Araştırmacı : Centre for Plant Biotechnology and Genomics U.P.M.-I.N.I.A., 25 Haziran-25 Eylül 2013, Madrid-İSPANYA.

### **Ödüller**

Bölüm Birinciği: Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü. 2009.

Başarı Bursu: Tubitak-Yurtiçi Doktora Başarı Bursu (2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Programı), 2013-2017.