



**BUĞDAYDA(*Triticum aestivum L.*) KURŞUN
STRESİNE TOLERANSTA SALİSİLİK
ASİT, BAKIR VE ÇİNKO ETKİLERİNİN
GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ**

Selin Sipahi KULOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Güleray AĞAR
2017
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BUĞDAYDA (*Triticum aestivum L.*) KURŞUN STRESİNE
TOLERANSTA SALİSİLİK ASİT, BAKIR VE ÇİNKO
ETKİLERİNİN GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE
BELİRLENMESİ**

Selin Sipahi KULOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her Hakkı Saklıdır



T. C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BUĞDAYDA (*Triticum aestivum L.*) KURŞUN
STRESİNE TOLERANSTA SALİSİLİK
ASİT, BAKIR VE ÇİNKO ETKİLERİNİN
GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Selin Sipahi KULOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 28.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Üye : Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25/01/2018 tarih ve 4/20 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BUĞDAYDA(*Triticum aestivum* L.) KURŞUN STRESİNE TOLERANSTA SALİSİLİK ASİT, BAKIR VE ÇİNKO ETKİLERİNİN GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ

Selin Sipahi KULOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana bilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Bitkiler, biyotik ve abiyotik olmak üzere farklı streslere maruz kalmaktadırlar. Bunlardan biri de ağır metal stresidir. Ağır metal stresi bitkiye fizyolojik ve moleküler düzeylerde zararlar vermektedir. Bitkiler ise bu streslerle başa çıkabilmek için farklı mekanizmalara sahiptir. Bu çalışmada ağır metal stresine hassas olan *Triticum aestivum* L. cv. 'Çetinel 2000' buğday çeşidinde kurşuna (Pb) karşı, bakır, çinko (Cu, Zn) metal kombinasyonlarının ve salisilik asitin uygulanarak *MT2* (metallotiyonin2), *PR-1*(patojenle ilgili direnç geni) geni ve miR398'in hedef genlerinin (metallo-beta-laktamaz, F-Box protein, Bax-Inhibitor-1, protein kinaz, süperoksit dismutaz) kök ve yapraktaki ifade değişiklikleri qRT-PCR analizi ile araştırılmıştır. İlgili genlerin ifade değişikliklerinin dokuya göre farklılık gösterdiği ve *MT2* geni, *PR* geni ve miR398'in hedef genlerinin ağır metal uygulamasında rol oynadıkları ve salisilik asitin bu genlerin ifadesini etkilediği tespit edilmiştir. Salisilik asitin uygulamasının ağır metale hassas olan bitkinin strese karşı cevap vermesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

2017, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Metallotiyonin, miR398, PR geni, Salisilik Asit, Kurşun, Bakır, Çinko

ABSTRACT

MS. Thesis

DETERMINATION OF SALICYLIC ACID, COPPER AND ZINC EFFECTS ON GENE EXPRESSION LEVEL AT LEAD STRESS TOLERANCE IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Selin Sipahi KULOĞLU

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Plants are exposed to different stresses such as biotic and abiotic. One of them is heavy metal stress. Heavy metal stress is harmful for plants on physiological and molecular levels. Plants have different mechanisms to cope with these stresses. In this study, the expression changes of root and stem parts' target genes *MT2* (metallothionein2), *PR-1* (pathogen-related resistance gene) and miR398 (metallo-beta-lactamase, F-Box protein, Bax-inhibitor-1, protein kinase, superoxide dismutase) applying copper, zinc (Cu, Zn) metal combinations and salicylic acid against lead (Pb) were analyzed by qRT-PCR technique in heavy metal stress sensitive *Triticum aestivum* L. cv. 'Çetinel 2000' wheat variety. It has been determined that gene expressions have changed as per organ, and *MT2* gene, *PR* gene and miR398 target genes have played a role in heavy metal administration, and also salicylic acid affects the expression of these genes. This study showed that salicylic acid application to heavy metal stress sensitive plants was an effective response.

2017, 69 pages

Keyword: Metallothionein, miR398, PR gene, Salicylic acid, Lead, Copper, Zinc

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tez çalışmam boyunca çalışmalarımın titizlikle ilerlemesini sağlayan, her konuda bana yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a, araştırmalarımnda bana yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN'a, deneylerim süresince ve her konuda yanımda olan Sayın Arş. Gör. Esra ARSLAN'a, ihtiyacım olduğunda benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzm. Biyolog Burcu SİĞMAZ'a, Sayın Uzm. Biyolog Semra YAĞCI'ya, Sayın Arş. Gör. Dr. Gökçe KARADAYI'ya ve her durumda yanımda olan çalışma arkadaşım Sayın Biyolog Merve Yüce'ye ve ayrıca Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarında, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarında ve Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarında çalışan hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca bana destek olan, bana her zaman güvenen, sevgileriyle her zaman yanımda olan canım eşim Ersin Kuloğlu'na, canım anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Selin Sipahi KULOĞLU

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Bitki materyali	34
3.1.2. Araştırmada kullanılan cihazlar.....	34
3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	35
3.1.3.a. Salisilik Asit solüsyonunun hazırlanışı.....	35
3.1.3.b. Tohum sterilizasyonu için kullanılan çözeltiler	35
3.1.3.c. Besin çözeltilisinin hazırlanışı	35
3.1.3.d. Ağır metal çözeltileri ve hazırlanışı	35
3.1.3.e. Kullanılan Primerler ve Hazırlanışları.....	36
3.2. Yöntem	39
3.2.1. Tohum sterilizasyonu	39
3.2.2. Ağır metal uygulaması için gereken dozların belirlenmesi.....	39
3.2.3. Kullanılan bitkinin yetiştirilmesi ve metaller ile salisilik asit uygulaması	40
3.2.4. RNA izolasyonu	41
3.2.5. cDNA sentezi	42
3.2.6. qRT-PCR ile gen ifade analizi.....	42
3.2.7. Verilerin değerlendirilmesi.....	43
3.2.7. Verilerin Analizi.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55

5.1. Sonuç ve Öneriler.....	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	70



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
ABA	Absisik asit
Ag	Gümüş
ALAD	Delta-aminolevulinik asit dehidrataz
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbat
Bç	Baz çifti
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
Cr	Krom
Co	Kobalt
Cu	Bakır
Cys	Sistein
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metil transferazlar
Fe	Demir
g	Gram
GOPX	Guaikol peroksidaz
GPX	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfid
GST	Glutatyon-S- transferaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$\text{HO}_2\cdot$	Perhidroksil radikali
JA	Jasmonik asit
Kl a	Klorofil a
Kl b	Klorofil b

MT	Metallotiyonin
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mo	Molibden
Mn	Mangan
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
npcRNA	Protein kodlamayan RNA
Ni	Nikel
O ₂	Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
Pb	Kurşun
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PR	Patojenle ilgili direnç geni
RNA	Ribonükleik asit
RNAİ	RNA interferans
RNAp	RNA polimeraz
ROT	Reaktif Oksjen Türleri
SA	Salisilik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
TF	Transkripsiyon faktörü
U	Uranyum
W	Volfram
V	Vanadyum
Zn	Çinko
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkilerde MT'lerin bir model mekanizması.....	18
Şekil 1.2. miRNA'lar ve hedef genleri	20
Şekil 4.1. Buğday köklerinde seçilen genlerin qRT-PCR çalışma eğrileri.....	44
Şekil 4.2. Buğday yapraklarında seçilen genlerin qRT-PCR çalışma eğrileri.....	44
Şekil 4.3. Ağır metal ve SA uygulamasının <i>PR-1</i> geni ifadesindeki etkisi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	45
Şekil 4.4. Ağır metal ve SA uygulamasının <i>PR-1</i> geni ifadesindeki etkisi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	46
Şekil 4.5. Ağır metal ve SA uygulamasının bitki yaprağında <i>MT2</i> gen ifadesine etkisi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	47
Şekil 4.6. Ağır metal ve SA uygulamasının bitki kökünde <i>MT2</i> gen ifadesine etkisi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	47
Şekil 4.7. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan <i>CSD'nin</i> ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	48
Şekil 4.8. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan <i>CSD'nin</i> ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	49
Şekil 4.9. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan metallo-beta-laktamazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	50
Şekil 4.10. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan metallo-beta-laktamazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	50
Şekil 4.11. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan proteinkinazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	51
Şekil 4.12. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan proteinkinazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	52
Şekil 4.13. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan F-box proteinin ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	53
Şekil 4.14. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan F-box proteinin ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	53
Şekil 4.15. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan Bax-inhibitör-1'in ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	54

Şekil 4.16. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan

Bax-inhibitör-1'in ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı bitki türlerinde MT genlerinin fonksiyonları.....	31
Çizelge 3.1. Kullanılan ağır metal çözeltilerinin hazırlanması.....	36
Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin baz dizilimi	37
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan miR398 hedef genlerinin qRT-PCR için primer dizileri	38



1. GİRİŞ

Bitkiler hareket edemeyen canlılar olmaları nedeniyle buldukları yerin çevresel koşullarının optimum sınırlardan sapması durumunda, bu değişimin süresi ve şiddetine bağlı olarak bitkilerin normal metabolik faaliyetlerinde büyüme ve gelişme olaylarını olumsuz yönde etkileyen önemli değişiklikler meydana gelir. Bu duruma yol açan çevrenin her bir elemanına stres faktörü, bitkinin içine düştüğü bu tür durumlara da stres adı verilir. Biyolojik stresin en pratik tanımı, bitkiler gibi biyolojik bir sistemin normal işleyişini engelleyen olumsuz bir kuvvet veya bir durumdur. Bitkilerde stres biyotik ve abiyotik olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bunlar; patojenler (virüsler, bakteriler, mantarlar), böcekler, herbivorlar, kemirgenler gibi biyotik faktörler, kuraklık, tuzluluk, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, besin stresi ve radyasyon (ultraviyole ve görünür ışığın yüksek yoğunluğu) gibi abiyotik faktörlerdir. Tüm bu stres faktörleri, belirli bir süre ve şiddetin üzerinde olduğunda bitkiler için hayati tehlike oluşturmakta, bitkilerin genetik potansiyellerine ulaşmalarını engellemekte ve dünya çapındaki tarımsal verimliliği sınırlandırmaktadır. Abiyotik stresler, tarımsal verimliliği ve mahsul yetmezliğinde azalma nedeniyle her yıl büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu streslerin, tarım endüstrisinin sürdürülebilirliğini tehdit ettiği rapor edilmiştir (Mahajan and Tuteja 2005).

Abiyotik stresler bitkilerin hayatta kalmasını zorlaştırmakta, onlara fizyolojik ve moleküler düzeyde büyük zararlar vermektedirler. Bitkilerin, canlı grupları için önemi tartışılmayacak kadar önemli iken özellikle bitkileri etkilemekte olan bu streslerin zararlı etkilerinin insan ve diğer canlı türlerinin varlığını devam ettirebilmesi için mümkün olduğunca azaltılması gerekmektedir. Aslında, abiyotik stresler, tohum çimlenmesinin erken aşamasından olgunluğa kadar bitkilerdeki neredeyse tüm fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler işlemleri potansiyel olarak etkilemekte ve sonuçta tarımsal önemi olan bitkilerin veriminde önemli kayıplara neden olmaktadır.

Dünya nüfusu hızla artmakta ve Birleşmiş Milletler raporuna göre 2050 yılının sonuna kadar yaklaşık 10 milyara ulaşması beklenmektedir. Buna karşılık, çeşitli abiyotik stres

etmenlerinin etkisi nedeniyle gıda verimliliği azalmaktadır. Bu nedenle bu kayıpları en aza indirmek ve artan gıda gereksinimlerini karşılamak tüm uluslar için giderek daha da önemli bir konu haline gelmektedir (Mahajan and Tuteja 2005).

Buğday (*Triticum aestivum* L.) dünya nüfusu için potansiyel bir besin kaynağıdır. Her yıl milyonlarca ton buğday yetiştirilmektedir (Bhatt *et al.* 2013). Buğday, tüm ekin alanlarının %17'sinde yetiştirilmekte ve dünya nüfusunun temel gıda maddesinin %40'ını oluşturmaktadır (Lamhamdi *et al.* 2013). Dünya'da ekim alanı bakımından ilk sırada ve üretim miktarı bakımından mısır ve çeltikten sonra üçüncü sırada yer alan bir kültür bitkisidir (FAO 2017). Tanesindeki uygun beslenme değeri, taşınma, depolama ve işlenmesindeki kolaylıkla birlikte sahip olduğu geniş adaptasyon sınırları nedeniyle buğday günümüzün temel besin maddesi durumundadır. 2014 yılı FAO verilerine göre toplam 220,4 milyon hektar ekim alanından 729 milyon ton ürün elde edilmiş, ortalama verim ise 330,7 kg/da'dır. Ülkemizde ise 7,8 milyon hektar buğday ekim alanında 19 milyon ton buğday üretimi yapılmış olup ortalama verim ise 242,9 kg/da olarak gerçekleşmiştir (FAO 2017).

Gerek her türlü iklim ve koşullarına uyum sağlaması ve gerekse buğdaydan elde edilen sanayi ürün çeşitliliği sayesinde buğday günümüzde önemli bir besin kaynağı durumunda olup moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmalarda önemli bir materyaldir ve diğer pek çok bilimsel alan için de vazgeçilmez bir bitki türüdür.

Dünya nüfusunun giderek artmasına karşın gıda verimliliğinin de artırılması gerekirken abiyotik stres faktörleri, buğday ve daha birçok bitki verimliliğinin artırılmasına önemli bir engel teşkil etmektedir. Abiyotik stresler içinde yer alan ağır metal stresi bitkilere ve diğer canlılara oldukça zarar vermektedir. Sanayileşmenin artması nedeniyle toprakların ağır metalle kontamine olması çevredeki canlıları olumsuz etkilemektedir. Sanayileşme sonucunda ortaya çıkan atıklar bazı sentetik maddeleri içerdiği gibi ağır metalleri de içerebilmektedir. Toksik özellikte olan bu ağır metaller öncelikle bitki bünyesine oradan da diğer canlıların bünyesine geçmekte ve tüm canlılarda toksik etkilere yol açmaktadırlar. ABD Çevre Eylem Grubu'nun raporlarına göre, çeşitli metallerin neden

olduğu toksisitenin, sekiz ülkede (Çin, Dominik Cumhuriyeti, Hindistan, Kırgızistan, Peru, Rusya, Ukrayna ve Zambiya) 10 milyondan fazla kişinin sağlığını etkilediği ve tarım sistemini tehdit eden unsurlardan biri olduğu öne sürülmüştür (Khan *et al.* 2015).

Doğal olarak bulunan 90 elementten 53'ü ağır metallerdir. Fizyolojik koşullar altındaki çözünürlüklerine dayanarak, organizmalar ve ekosistemler için 17 ağır metal tanımlanmıştır. Bu metaller arasında, Demir (Fe), Molibden (Mo), Mangan (Mn), Çinko (Zn) ve Bakır (Cu) mikro besinler olarak canlılar için gereklidir. Nikel (Ni), Vanadyum (V), Kobalt (Co), Wolfram (W) ve Krom (Cr) ise toksik elementlerdir. Ağır metaller arasında Cıva (Hg), Gümüş (Ag), Kadmiyum (Cd), Kurşun (Pb) ve Uranyum (U)'un ise besin olarak bilinen bir işlevi yoktur ve bitkiler ve mikroorganizmalar için toksik olduğu bilinmektedir (Schutzendubel and Polle 2002). Ağır metal stresi, ağır metallerin buldukları ortamdaki yoğunluklarının 5 g/cm^{-3} üzerine çıktığı durumlarda söz konusu olur. Ancak böyle bir yoğunlukta iken canlılarda toksik etkilere yol açabilir ve ağır metal stresinden bahsedilebilir.

Metal toksisitesi bitkileri farklı yollarla etkilemektedir. 1. Metaller, tiyol, histidil ve karboksil gruplarına karşı afiniteleri nedeniyle bitki proteinleri ile doğrudan etkileşebilirler. 2. Hücrenin yapısal, katalitik ve nakil bölgelerini hedef alarak etkili olabilirler. 3. Antioksidan savunmayı bozarak ve oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesini teşvik edebilirler ve 4. Hücrede önemli katyonları spesifik bağlanma yerlerinden uzaklaştırarak, bunların işlevsiz kalmasına neden olarak etkili olabilirler (Wani *et al.* 2017).

Ağır metallerin toksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar arasında şüphesiz ki Pb'nin önemli bir yeri vardır. Pb, yeryüzünde doğal olarak bulunur ve normal seviyeleri 50 mg kg^{-1} 'in altında kalmaktadır. Pb topraklarda inorganik bileşenlerle (örn: HCO_3^- , CO_3^{2-} , $(\text{SO}_4)_2^-$, ve Cl^-) kompleks oluşturabildiği gibi serbest metal iyonu olarak veya organik ligandlar (örneğin, amino asitler, fulvik asitler, ve hümik asitler) halinde bulunabilirler (Pourrut *et al.* 2011).

Organik ve koloidal maddelerle kuvvetli bağlanması nedeniyle, topraktaki çok az miktarda Pb'nin çözünür olduğuna ve dolayısıyla bitki alımına açık olduğuna inanılmaktadır. Bitkilerin metal biriktirmesinin ana yolu, topraklardan kök yoluyla alınmasıdır. Toprakta varolan Pb'nin bir kısmı kökler vasıtasıyla bitkiye absorbe edilir ve daha sonra müsilaj üronik asitin karboksil gruplarına bağlanır veya direkt olarak Pb, rizoderm hücre yüzeyinin polisakaritlerine bağlanmaktadır. Rizodermden (kök yüzeyinden) absorbe edildiği zaman Pb, köklere pasif olarak girebilir ve yer değiştiren su akıntılarını takip edebilir. Bununla birlikte, emilen Pb, bitki kökleri boyunca homojen bir şekilde diffüze olmaz, bu nedenle kök apeksinden yukarı doğru azalan bir Pb konsantrasyon gradienti ortaya çıkar. Nitekim en yüksek Pb konsantrasyonlarına, köklerin uç kısmındaki, genç olan kök emici tüylerinin bulunduğu bölgede rastlanır. Üstelik kökün uç kısmındaki rizodermik alan pH'nın en düşük olduğu bölge olup, bu düşük pH topraktaki Pb'nin çözünürlüğünü daha da arttırıcı niteliktedir. Tüm bu bilgilere rağmen moleküler anlamda, Pb'nin köklerle emilim mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Pb köklerden çeşitli yollardan girebilir ve bilinen en iyi yollardan biri, rizoderm hücrelerinde güçlü bir negatif zar potansiyelini korumak için bir H⁺/ATPaz pompasının işleyişine bağlı olan iyonik kanallardır (Pourrut *et al.* 2011).

Köke giren Pb esas olarak apoplastik yolla diffuze olur ve su akımlarıyla beraber endodermise kadar gelir. Pb kök sistemine girdikten sonra, orada birikebilir veya bitkinin üst kısımlarına aktarılabilir. Çoğu bitki türü için, absorbe edilmiş Pb'nin çoğunluğu (yaklaşık %95 veya daha fazla) köklerde birikir ve absorbe edilen Pb'nin çok az bir kısmı bitkinin üst kısımlarına aktarılabilir. Pb'nin köklerden bitkinin üst kısımlarına taşınmasının sınırlı olmasının çeşitli nedenleri vardır. Bu sebepler, hücre duvarı içerisindeki negatif yüklü pektinlerin immobilizasyonu, hücreler arası boşluklarda çözünmeyen Pb tuzlarının çökmesi ve plazma membranlarında birikimidir (Pourrut *et al.* 2011).

Pb, çevre kirliliği ve toprak verimliliği üzerine toksik etkileri olan buğday üretimini ciddi olarak etkileyen başlıca toksik ağır metallere biridir. Pb, ROT oluşmasına ve hücre zarlarının geçirgenliğinin değişmesine neden olur, bu etkileri de mitokondri,

kloroplast, çekirdek gibi hücre organellerinde çeşitli hasarlara yol açmaktadır (Song *et al.* 2012).

Pb, farklı hücre membranlarının lipit kompozisyonunda belirgin değişikliğe neden olmaktadır. Lipidlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ve bunların esterleri ROT'a karşı yüksek duyarlılığa sahiptir. ROT'lar doymamış yağ asitlerinden hidrojeni uzaklaştırır böylece lipid radikalleri ve reaktif aldehytlerin oluşuma yol açar. Bunun sonucunda lipid yapısında bozulmaya neden olurlar (Pourrut *et al.* 2011). Bitki ise bu oluşan ROT'lara karşı önemli antioksidan enzimlerinin aktivitesini arttırarak strese karşı kendini korumaya çalışır.

Cd ve Pb stresine maruz kalan buğday fidelerinde antioksidan enzim aktivitelerinde ve lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişiklikler üzerine yapılan bir araştırmada, buğday fidelerine CdCl₂ (0-200 µM) ve Pb (NO₃)₂ (0-2000 µM) ayrı ayrı uygulanmış ve bu araştırma sonucunda buğday fidelerinin büyümesinin Cd ve Pb'nin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Cd için, 200 µM 'den itibaren tamamen bir büyüme inhibisyonu görülmüş; Pb için, kök ve sürgünlerin büyümesinin, en düşük konsantrasyonda (200 µM) bile önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. 2000µM Pb'nin, sürgün ve kök uzunluğunu ve büyümeyi tamamen engellendiği gözlenmiştir. Yine bu araştırmada, Pb stresi altında yetişen buğday bitkilerindeki üç antioksidan enzimin de aktivitelerinde değişiklikler görülmüş, süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POX) aktivitelerinin hem kök hem de sürgün dokularında artan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı, katalaz (CAT) aktivitesinin, Pb stresiyle önemli ölçüde azaldığı, ancak bu azalmanın köklerde sürgünlerden çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Dey *et al.* 2007).

Başka bir araştırmada ise Pb'nin buğday gelişimi üzerine olan zararlı etkisi iki buğday çeşidi, (Chakwal-97 ve Sehar-2006) üzerinde gösterilmiştir. Bu araştırmada Pb'nin yaprak, kök uzunluğu, taze kuru ağırlık verimi ve filiz sayısı gibi morfolojik parametrelerinde düşüşe yol açtığı tespit edilmiştir Ayrıca klorofil a (kl a), klorofil b (kl b) gibi fotosentetik pigmentlerde azalmaya, ancak karoten içeriğinde de artışa neden

olduğu saptanmıştır (Bhatt *et al.* 2013).

Pb'nin bir diğer toksik etkisi ise besin alımıyla ilgilidir. Birden fazla çalışmanın sonuçları, bitkilerdeki besin alımının Pb tarafından önemli derecede etkilenebileceğini göstermektedir. Bunula ilgili örnek bir çalışma buğday ve ıspanakta gözlenmiştir. Besin alımına ve metabolizmaya Pb etkilerini belirlemek için yapılan araştırmada, iki bitki türü olan ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) ve buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkilerine üç konsantrasyonda (1.5, 3 ve 15 mM) Pb(NO₃)₂ (kurşun nitrat) uygulanarak hidrofonic ortamda yetiştirilmiştir. 15 mM Pb'ye maruz bırakılan buğday ve ıspanak bitkilerinde, kontrollerle karşılaştırıldığında açık bir büyüme inhibisyonu olduğu, düşük konsantrasyonlarda bile Pb muamelesinin bitki büyümesini önemli seviyede engellediği görülmüştür (Lamhamdi *et al.* 2013).

Öte yandan, Pb'nin bitki tohumlarına çok düşük konsantrasyonlarda uygulanması halinde bile çimlenme ve sonrasında büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Çimlenmeyi önlemesinin, Pb'nin proteaz ve amilaz enzimlerini inhibe etmesinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Bitkilerde Pb'nin ayrıca fidelerin gelişimini ve sürgün oluşumunu oldukça sınırlandırdığı da bildirilmiştir (Pourrut *et al.* 2011). Ayrıca bitki biyokütlesinin yüksek dozlarda Pb'ye bağlı olarak azaldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, kurşunun bitki büyümesi üzerindeki toksik etkisi maruz kalma süresine, bitki türüne ve doza bağlıdır. Pb, bitki hücresi duvarındaki esnekliği azaltır ve böylece doku içindeki hücrenin turgor basıncını etkiler. Şeker ve aminoasit gibi hücre turgorunu kontrol eden moleküllerin konsantrasyonunda düşüşe yol açması, Pb'nin turgor basıncını azalttığı da ifadesidir. Hücrede aşırı turgor basıncından korunmak için, bitkiler, Pb stresi altında özellikle prolin sentezlerler. Ayrıca Pb'nin fotosentez inhibisyonunun da etkili olduğu bilinmektedir. Bu inhibisyonun Pb'nin dolaylı etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu dolaylı etkiler şunlardır;

- 1) Kloroplastın yapısındaki proteinlerinde bulunan azot (N) ve kükürt (S) elementlerine Pb afinitesinden dolayı kloroplast yapısının bozulması
- 2) Klorofil sentez inhibisyonunun kökeninde yer alan ferredoksin NADP⁺ redüktaz ve

delta-aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesinin Pb tarafından azaltılması

- 3) Plastokinon ve karotenoid sentezi inhibisyonu
- 4) Elektron taşıma sisteminin engellenmesi
- 5) Stoma kapanması nedeniyle karbon dioksitin yapraklara yeterince alınmaması
- 6) Mn ve Fe gibi esansiyel elementlerinin alımında bozulma
- 7) Calvin döngüsünde görev alan enzimlerin katalitik aktivitelerinin inhibisyonu
- 8) Klorofillaz aktivitesinde artış (Pourrut *et al.* 2011).

Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) büyüme, fotosentetik aktivite ve oksidatif stres ile ilgili parametreleri araştırmak için yapılan bir çalışmada Pb üç farklı konsantrasyonda [Pb (NO₃)₂ olarak 500, 1000 ve 2500 µM'de] toprağa uygulanmıştır. Buğdayın fide büyümesi uzunluk ve kuru ağırlık açısından ele alınmış ve Pb uygulanmış topraklarda olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Bu araştırmada 7 gün sonunda kök ve sürgün uzunluğunda azalmanın olduğu, ayrıca kurşunun fotosentetik aktivite üzerinde olumsuz etki yaptığı gözlenmiştir. Pb ile kontamine olmuş topraktaki buğday büyümesindeki azalmanın, oksidatif stresin indüklenmesi, hidrojen peroksit (H₂O₂) içeriğinde (%34-123) ve lipid peroksidasyonuna artış ve bunlara bağlı olarak malondialdehid (MDA) içeriğinin (%18-40) artması nedeniyle olduğu ifade edilmiştir. Yine bu araştırmada buğday köklerinde bazı enzimlerin, (SOD ve glutatyon peroksidazların (GPX)) aktivitesinde de değişiklikler gözlemlenmiştir (Kaur *et al.* 2012).

Çok sayıda araştırma, buğday fidelerinin Pb stresine karşı savunmasız ve hassas olduğunu göstermiştir. Pb'nin buğday fidelerinde birikimi, fide büyümesini ve buğday verimini ciddi oranda etkilemekle kalmaz, aynı zamanda bitkide birikim gösterdiğinden dolayı beslenme yoluyla insan ve hayvan sağlığına da zarar vermektedir. Bu nedenle, buğday fidesi büyüme ve gelişimi üzerine metallerin toksik etkileri ile ilgili araştırmalarda, Pb'nin buğdayda oluşturduğu stresin fizyolojik ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması hayati öneme sahiptir (Song *et al.* 2012).

Ağır metallerin yanı sıra bitkiler için gerekli olan metaller de gereken dozdan fazla bulunursa toksik etki yapabilirler. Bu gerekli olan metallere Zn ve Cu'dur.

Zn ve Cu'nun insanlar hayvanlar ve bitkiler üzerinde pek çok önemli metabolik işlevleri vardır. Bunlardan bazıları şöyledir:

- ❖ Cu, çoğunlukla, molekül ağırlığı düşük olan organik maddelerle ve vitaminlerle bileşik yapar.
- ❖ Cu, hem işlevi daha tam olarak çözülememiş bileşiklerde hem de hayati önem taşıyan enzimlerin yapısında rastlanmıştır.
- ❖ Cu, fotosentez, solunum, karbonhidrat parçalanması, azot kullanımı ve depolanması, hücre duvarı metabolizması gibi fizyolojik olaylarda önemli rol oynar.
- ❖ Cu, ksilem borularının iletim kapasitesini düzenler.
- ❖ Cu, DNA ve RNA'nın sentezini kontrol eder. Eksikliği durumunda bitki üremesi durur.
- ❖ Cu'nun, hastalıklara karşı, direnç mekanizmasında rolü vardır.

Cu'nun bitkiler üzerine olan etkisi ile ilgili oldukça fazla araştırma bulunmaktadır. Fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) bakırın farklı dozlarda (0.5-160.5 μ M) etkileri ile ilgili bir araştırmada; 0.5-1.5 μ M arasındaki Cu konsantrasyonlarının yetersiz, 1.5-10.5 μ M konsantrasyonları arasında optimal ve 10.5-160.5 μ M konsantrasyonları arasında ise bitki büyümesi için toksik olduğu ifade edilmiştir. Cu eksik olduğunda ve optimal büyüme koşulları altında, Cu öncelikli olarak yapraklarda bulunurken, Cu toksisitesinde, esas olarak köklerde birikim gösterdiği tespit edilmiştir. Cu'nun artmasıyla köklerde, saplarda ve yapraklarda Cu konsantrasyonları, köklerdeki Ca ve yapraklarda K ve Mg arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür. Yine klorofil konsantrasyonu, yaprakta artan Cu konsantrasyonuyla artarken, klorofil a/b oranının azaldığı gözlenmiştir. Cu toksisitesi altındaki bitkinin fotosentez verimliliğinde düştüğü tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Cu'nun bitkiler için belirli miktarda olması gerektiği fazlasının toksik etki gösterdiği yani zehirleyici olduğu sonucuna varılmıştır (Cook *et al.* 1998).

Cu zehirlenmesinin bazı etkilerini doku hasarı, kök yapısında bozulma ve bitki renginde koyulaşma, ayrıca membran geçirimsizliğinde bozulma sonucunda kök hücrelerinde iyon

kaybı, DNA'nın hasar görmesi sonucu fotosentez ve diğer metabolik olaylarda bozulma şeklinde sıralamak mümkündür. Bununla birlikte Cu, Zn gibi metallerin bazı enzimlerin kofaktörü olarak da gerekli olduğu bilinmektedir (Okcu vd 2009).

Zn, bitki metabolizması için çok gerekli bir mikroelementtir. İçinde yer aldığı enzimlere bakarak, karbonhidrat, protein ve RNA sentezinde görev aldığı söylenebilir. Membranların geçirgenliğinin de de rolü olduğu bulunmuştur. Ayrıca bakteri ve mantarların yol açtığı hastalıklara karşı bitkileri koruyucu etkisi olduğu da bilinmektedir. Bitkiler için Zn'nin suda çözünen formları bitkiye alınımı için en uygun formdur ve Zn'nin bitkiye alınımı, Zn'nin topraktaki konsantrasyonu arttıkça artar. Ayrıca bitkiler, topraktaki Zn değişimlerine çok çabuk tepki verirler. Zn'nin bitkiye alınım miktarı, bitkinin türüne olduğu kadar, bulunduğu ortama da bağlıdır. Yapraklarda oluşan klorosis ve yavaşlamış bitki gelişimi, Zn eksikliğinin ilk belirtilerinden sayılmaktadır. Öte yandan, bazı bitki türleri Zn fazlalığına karşı büyük bir toleransa sahip olmakla birlikte, diğer bitkiler için genel anlamda fazlalığı toksik etkiler göstermektedir. Ancak Zn zehirlenmelerinin etkisi her ne kadar diğer ağır metallerinkine benzese de Zn, diğer metaller kadar ölümcül anlamda zehirli değildir (Okcu vd 2009).

Zn'nin yaprak üzerinden uygulanarak buğday üzerinde etkileri ile ilgili yapılan çalışmada (Zn kaynağı olarak Çinko Sülfat Monohidrat ($ZnSO_4 \cdot H_2O$)) Zn'nin dört farklı konsantrasyonu (%0.0, %0.02, %0.04 ve %0.06) uygulanmış %0.04'e kadar olan Zn konsantrasyonlarının tane verimini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Bu bulgu ise, ilk olarak Zn'nin SOD enziminin aktivitesini artırarak ROT'ları yok edip fotooksidatif hasarı azaltmasıyla açıklanmıştır. Ayrıca bu çalışmanın sonunda Zn'nin su eksikliğinin verim üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı ve bu olumsuz koşullar altında dahi Zn'nin bitkilerin başarıyla büyümesine yardımcı olduğu ifade edilmiştir (Sultana *et al.* 2016). Bir başka çalışmada ise, domates bitkisinde Zn'nin Bor (B) elementinin toksisitesini azalttığı rapor edilmiştir (Güneş *et al.* 1999).

Yeryüzünde ağır metaller ve diğer birçok abiyotik stres faktörü bitkilere bu kadar zarar verirken, bazı bitki türleri de stres durumlarıyla başa çıkabilmek için değişik tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir

Stres, önce bitki hücrelerinin membranında bulunan reseptörler tarafından algılanır, daha sonra sinyal içeri doğru iletilir ve bu, kalsiyum, ROT ve inositol fosfatlar olmak üzere ikinci habercilerin ortaya çıkmasına neden olur. İnositol fosfatları gibi bu ikinci haberciler, hücre içi kalsiyum seviyesini düzenlerler. Sitosolik Ca^{2+} seviyesindeki bir bozulma, Ca^{2+} sensörleri olarak da bilinen kalsiyum bağlayıcı proteinler tarafından algılanır. Bu sensörler görünüşte herhangi bir enzimatik aktiviteden yoksundur ve yapılarını kalsiyuma bağımlı bir tarzda değiştirirler. Bu sensör proteinleri daha sonra sırayla karşılıklı etkileşen partnerleriyle sıklıkla fosforilasyon kademesi başlatırlar ve bu majör strese duyarlı genleri veya bu genleri kontrol eden transkripsiyon faktörlerini hedef alırlar. Bu stres genlerinin ürünleri nihayetinde bitki adaptasyonuna ve bitkinin hayatta kalmasına ve olumsuz şartları aşmasına yardımcı olur. Böylelikle bitki, streslere karşı bütün bir organizma olarak tepki verir. Gen ifadesindeki stres kaynaklı değişiklikler absisik asit (ABA), salisilik asit (SA) ve etilen gibi hormonların oluşumuna neden olabilir. Bu moleküller, başlangıç sinyalini güçlendirebilir ve aynı yol izleyebilir veya sinyal yolunun tamamen farklı bileşenlerini kullanan ikinci bir sinyal turu başlatabilirler (Mahajan and Tuteja 2005).

Fiziksel engeller, bitkilerde metallere karşı savunmanın ilk hatlarıdır. Kalın kütikül ve trikomlar gibi biyolojik olarak aktif dokular ve hücre duvarlarının yanı sıra mikorizal simbiyoz gibi bazı morfolojik yapılar, bitkilere ağır metal stresine karşı bariyer oluşturabilir. Örneğin, trikomlar, ya detoksifikasyon amacıyla ağır metal depolama yeri olarak hizmet edebilir ya da metallerin tehlikeli etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli ikincil metabolitleri salgırlar. Şayet, ağır metaller biyofiziksel engelleri ve diğer metal iyonlarının bariyerlerini aşarsa, yani dokulara ve hücrelere girerlerse, bu durumda bitkiler ağır metallerin olumsuz etkilerini bertaraf etmek veya zayıflatmak için bazı hücrel savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Mesela bazı hücrel biyomoleküllerin ve hormonların biyosentezi, metal toksisitesini tolere etmenin veya

nötralize etmenin başlıca yoludur. Bu nikotinamin, putresin, spermin, mugineik asitler, organik asitler, glutasyon, fitoşelatinler (PC) ve metallotiyoninler (MT) veya flavonoid ve fenolik bileşikler, protonlar, ısı şoku proteinleri, prolin ve histidin gibi spesifik aminoasitler ve de salisilik asit, jasmonik asit (JA) ve etilen gibi hormonların indüksiyonunu içerir. Bahsedilen bu yolla metal toksisitesi engellenemezse, bitkilerdeki hücrel redoks sistemlerinin dengesi bozulur ve bu da ROT'ların oluşumunu tetikler. Serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltmak için bitki hücreleri, SOD, CAT, askorbat peroksidaz (APX), GPX ve glutasyon redüktaz gibi enzimatik antioksidanlardan ve askorbat (AsA), glutasyon(GSH), karotenoidler, alkaloidler, tokoferoller, prolin ve fenolik bileşikler (flavonoidler, tanenler ve lignin) gibi nonenzimatik antioksidanlardan oluşan antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirirler (Emamverdian *et al.* 2015).

Pb'nin çok az miktarı bile kök hücre zarlarına nüfuz ettiği zaman hücrel bileşenlerle etkileşime girer ve hücre duvarının kalınlaşmasına yol açar. Bitki hücre duvarının bir bileşeni olan pektinin karboksil grupları ile Pb'nin kompleks oluşturması bitki hücrelerinin kurşun toksisitesine karşı direnç sağlayan bir tolerans şeklidir. Pb'nin JIM5-pektin'e (JIM5: düşük metil esterli homogalakturnon-hücre çeperi içinde bulunur ve bunun sonucunda kalınlaşma oluşturur) bağlanmasının, *Funaria hygrometrica* protonematasında ki plazma membranına Pb erişimini kısıtlayan fiziksel bir bariyer görevi gördüğü gözlemlenmiştir (Krzeslowska *et al.* 2009). Son zamanlarda birçok araştırmacı, metal iyonlarının ekstraselüler alanlara atılmasını sağlayarak metal detoksifikasyonun da önemli bir rol oynayan bitki hücreleri arasında bir çeşit taşıyıcı proteinin varlığını rapor etmişlerdir. Bazı transkriptom analizleri sayesinde Pb'nin bu taşıyıcı proteinlerinin gen ifadesini uyardığı belirlenmiştir. Pb'ye karşı toleransta bir diğer mekanizma hücrel sekestrasyondur. Bu olay bitkilerde metal homeostazı ve ağır metal detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bazı organik moleküller tarafından bağlanabilen Pb bitkinin bazı hücre kompartımanlarında tutulmaktadır. Yani Pb, vakuollerde, diktiyozom veziküllerinde, endoplazmik retikulum veziküllerinde ve plazmatübüllerinde depolanmaktadır. Bu şekilde bitki kendini savunmaya çalışmaktadır. Bilinen en iyi savunma şekillerinden biri de antioksidanlardır. Sistein ve GSH,

bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlardır. GSH, Pb kaynaklı ROT'u söndürerek bitkileri kurşun stresinden korumaktadır. Pb muamelesi, glutatyon sentetaz, -peroksidaz ve redüktaz ve glutamil sistein sentetaz da dahil olmak üzere farklı GSH genlerini indükleyebilir. GSH ayrıca, zarlar ve proteinlerdeki hasarın azaltılması ile bağlantılı olarak, stresli bitkilerde prolin birikimini de artırabilir. PC'ler bitki hücrelerinde en iyi karakterize edilmiş metal bağlama ligandlarından biridir. Bu ligandlar, sistein açısından zengin olup ağır metal bağlayıcı protein moleküllerinin bir grubunu oluşturmaktadır. Pb'nin PC üretimini teşvik ettiği ve fitoşelatin sentaz (PCS)'ı aktive ettiği bilinmektedir. PC'ler, sitoplazmada çözünür haldeki Pb'yi vakuollere ve kloroplastlara taşımadan önce kendilerine bağlamakta ve böylece hücrelerdeki Pb'nin zararlı etkisini azaltmaktadırlar. Ağır metale maruz kalma sonucunda artan ROT üretimine karşı bitki hücreleri farklı antioksidan enzim sistemlerine sahiptirler. Pb kaynaklı toksisite, Pb konsantrasyonuna bağlı olarak bu enzimlerin aktivitesini inhibe edebilir veya daha fazla sentezlenmesine neden olabilir. Genelde Pb enzimatik aktiviteleri inhibe etmektedir. Bu enzimlerin inhibisyonu enzimlerde bulunan -SH gruplarına karşı Pb'nin büyük bir afiniteye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu enzimlerin inaktivasyonu, Pb'nin katalitik bölgelerine veya proteinin herhangi bir yerine bağlanması ile üç boyutlu yapılarının değişmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Pb aynı zamanda enzimlerin protein-COOH gruplarına bağlanarakta aynı etkiyi oluşturabilmektedir (Pourrut *et al.* 2011).

Bitkilerde ağır metallere karşı bunlardan başka tolerans mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu mekanizmalar bitkinin türüne göre çeşitlilik göstermektedir. Buğdayda ağır metallere karşı verilen cevapta SA'nın sinyal molekülü olarak önemli bir yeri vardır. Zira SA bu özelliği sayesinde Pb gibi ağır metal stresi altındaki bitkide antioksidan metabolizmasını harekete geçirdiği ve böylece önemli enzimlerin aktivasyonunu arttırarak stresin şiddetini azaltabildiği bilinmektedir.

SA doğal olarak sentezlenen yedi karbonlu fenolik bir bileşiktir. Şikimik asit ve mevalonik asit yolu, bitki fenolik bileşiklerinin sentezini sağlayan iki metabolik yoldur. Şikimik asit yolu, çoğu fenolik bileşiklerin biyosentezinden sorumludur. SA öncülü, glikolizden ve pentoz fosfat yolundan türetilen basit karbonhidrat öncüllerini,

fenilalanin de dahil olmak üzere aromatik amino asitlere dönüştürmektedir (Khan *et al.* 2015).

Yukarıda da belirtildiği gibi SA, önemli bir sinyal molekülü olarak işlev gören, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik işlevleri etkileyen ve doğal olarak sentezlenen bitki hormonlarından biridir ve hem biyotik hem de abiyotik stresle tolerans olayında çeşitli rolleri vardır. Genellikle SA, tohum çimlenmesi, fide oluşumu, hücre büyümesi, solunum, stoma kapanması, senesens gibi olaylarda gen ifadesinin düzenlenmesinde, abiyotik streslere yanıtların oluşturulmasında, termotolerans sağlanmasında, baklagillerdeki nodülasyon olayında, çiçeklenme ve meyve oluşumunda, patojenlere karşı direncin sağlanmasında rolü olduğu, bu rolleri de transkripsiyonel düzenlemeler yaparak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Wani *et al.* 2017).

Salisilatlar (salisilik asit ve bunların türevleri, topluca salisilatlar olarak anılır) stres şartlarında bitki savunma genlerini aktive eden bitki tarafından sadece gerekli olan durumlarda üretilen sinyal ajanları olarak adlandırılır. Bu sinyaller yoğunlaştıkça, bitkiye koruma sağlayan allelokimyasal ve savunma proteinlerinin sentezinde de bir artış gerçekleşir. Kısaca büyük miktarlarda SA birikimi, bitkilerin çeşitli streslere karşı kendilerini savunmak için geliştirdikleri çeşitli mekanizmalardan biridir (Wani *et al.* 2017).

SA bitkiyi sadece patojenik streslere karşı değil ağır metal stresine karşı da koruma sağlamaktadır. Ağır metallerin yol açtığı ROT'lar oldukça kararsız bileşiklerdir ve bitkiye büyük hasarlar verebilirler. Bu durumda SA'nın antioksidan savunma sistemini harekete geçirerek bitkinin strese karşı kendini korumasında yardımcı olduğu bilinmektedir (Chen *et al.* 2016).

Vallisneria natans (Lour.) bitkisine SA (10 veya 100 μ M) ile Pb (50 μ M) uygulanmış ve yaprak içerisinde besin elementi içeriğinin, ROT seviyesinin ve antioksidan enzim aktivitelerinin değiştiği rapor edilmiştir. Bu olumlu değişikliğin, SA uygulamasının Pb alımını inhibe etmesi, dolayısıyla Pb kaynaklı oksidatif stresi azaltarak MDA

(malondialdehit) ve ROT artışını inhibe etmesi suretiyle ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Wang *et al.* 2011a).

Pb stresi altındaki çeltik fidelerinde SA'nın büyümedeki rolü ve H₂O₂'yi metabolize eden enzimler üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Pb stresi altında yetiştirilen çeltik fidelerinin biyokütlesinde ve yaprak klorofil içeriğinde azalma tespit edilmiştir. Çeltik fidelerine Pb stresinden 48 saat önce 0.1 mmol / L⁻¹ SA ile muamele edilmesi durumunda ise CAT ve APX aktivitesini baskı altına aldığı, SOD aktivitesinin arttığı ve böylece çeltik fidelerinin Pb toksisitesinden korunduğu bildirilmiştir (Chen *et al.* 2007).

Brassica juncea (L.) Czern. ve *Trigonella foenum-graecum* L. bitkilerinde SA'nın, Cd ve Pb stresi altındaki etkileri ile ilgili bir araştırmada SA'nın ağır metallere karşı iyileştirici (her iki bitki türünde de Cd ve Pb uygulanması sonucu H₂O₂ gibi ROT üretimini azaltmak) etkisinin olduğu, bu etkisini antioksidan savunma mekanizmasını düzenleyerek, (özellikle de SOD aktivitesini up regüle ederek ve CAT aktivitesini bastırarak) yerine getirdiği tespit edilmiştir (Goel 2012).

Dışarıdan uygulanan SA'nın bitkilerdeki toksik metal etkilerini yok etme etkisine sahip olduğu bilinmekte olup bu yöndeki etkileri aşağıdaki Çizelge 1.1'de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Metallere karşı ekzojen uygulanan salisilik asitin etkileri (Wani *et al.* 2017)

Ağır metal	Bitki	Stres altında toksik etki	Uygulanan SA dozu	SA uyguladıktan sonraki etki
Cd	Mısır (<i>Zea mays</i> L.)	Taze ağırlıkta, kök ve sürgün büyümesinde, fotosentez hızında, APX aktivitesi ve SOD aktivitesinde azalma, GPX aktivitesinde, prolin üretiminde ve lipid peroksidasyon hızlarında ve elektrolit sızıntılarında artış	0.5mM	Cd'nin bitki büyüme parametreleri üzerindeki olumsuz etkisinin hafifletilmesi, Cd'nin enzim aktivitesi, prolin üretimi, lipid peroksidasyon oranları ve elektrolit sızıntısı ve katalaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkisi, CO ₂ fiksasyonunda, APX aktivitesi ve SOD aktivitesinde artış.

Çizelge 1.1. (devam)

Cd	Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.)	SOD, CAT ve POX aktivitelerinde azalma, büyüme, pigment içeriği, ve nispi su içeriğinde azalma.	0.5mM	Cd'nin oluşturduğu stresin azaltılması ve bunun sebep olduğu olumsuz etkilerde belirgin iyileşme. Antioksidan savunma faaliyetlerinin ve yaprak anatomisinin geliştirilmesi.
B	Arpa (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	CO ₂ tüketimi, protein içeriği, klorofil (a+b) ve karbonhidrat içeriğinde azalma	1mM	CO ₂ tüketimi, protein içeriği, klorofil (a+b) ve karbonhidrat içeriği ve proteaz aktivitesinde artış.
Pb	Pirinç (<i>Oryza sativa</i> L.)	Bitki biyokütlesi ve klorofil içeriğinde azalma, H ₂ O ₂ seviyesinde artış	0.1mM	Klorofil içeriği ve SOD aktivitesinde artış, kök ve sürgünde uzama.
Pb	Lour (<i>Vallisneria natans</i>)	Klorofil a ve b de azalma, MDA, O ₂ ⁻ (süperoksit) ve H ₂ O ₂ içeriğinde artış	0.01-0.1mM	Malondialdehit, O ₂ ⁻ ve H ₂ O ₂ içeriğinde Pb kaynaklı artışın kısmen önlenmesi
Hg	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Hg'nin proteinlerin sülfhidril gruplarına bağlanarak protein yapısını bozması ve ROT oluşumu nedeniyle bitkilerin ölümü	0.2mM	Köklerde Hg'ye bağlı toksisiteyi hafifleme ve büyümelerini teşvik etme, Daha fazla, GSH ve prolin birikimi
As	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bitki biyokütlesinde ve klorofil içeriğinde azalma, lipid peroksidasyonunda, CAT, APX ve SOD aktivitelerinde artış	0.025mM	Bitki biyokütlesinde ve klorofil içeriğinde artış, lipid peroksidasyonunda, CAT, APX ve SOD aktivitelerinde azalma
Al	Pirinç (<i>Oryza sativa</i> L.)	Bitki canlılığında ve protein tiyol seviyesinde azalma, kök plazma zar bütünlüğünün kaybedilmesi. O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ , lipid peroksidasyonu ve protein karbonil içeriğindeki artış. Antioksidan enzimlerin aktivitesinde önemli değişiklikler.	0.06mM	Al alımı azaltılarak, kök membran bütünlüğü geri kazanılarak, ROT seviyesi ve ROT ile indüklenen oksidatif hasar azaltılarak ve antioksidatif enzim aktivitelerinin seviyesi düzenlenerek Al toksisitesinin hafifletilmesi.

Çizelge 1.1. (devam)

Ni	Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Büyüme özelliklerinde azalma (bitki boyu, taze ağırlık, kuru ağırlık ve yaprak alanı), Karbonik anhidraz aktivitesinin engellenmesi, Ni ve MDA birikimi.	0.5mM	Fotosentetik pigmentlerin (klorofil a ve klorofil b) iyileştirilmesi ve Ni stresi altındaki besleyin homeostazın sürdürülmesi
Mn	Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.)	Ciddi kloroza neden olur, Ca, Mg ve Zn emiliminde ve büyümede inhibisyon, hem sürgünlerde hem de köklerde Mn birikiminde artış, ROT birikiminde artış ve lipid peroksidasyonu.	0,1mM	Mn'nin köklerden sürgüne taşınmasında, toksisite semptomlarında, ROT, lipid peroksidasyonunda azalma ve Ca, Mg ve Zn emiliminin inhibisyonunun hafifletilmesi.
Cu	Pirinç (<i>Oryza sativa</i> L.)	Yapraklarda kloroz, nekroz, MDA, H ₂ O ₂ içeriği ve lipoksigenaz aktivitesinde artış, klorofil ve nispi su içeriğinin azalması,	0.1mM	Toksisite semptomlarında azalma ,lipoksigenaz aktivitesi, H ₂ O ₂ , MDA ve prolin içeriklerinde azalma, nispi su ve klorofil miktarında artış, SOD, APX, ve GPX aktivitelerinde artış.

SA'nın aynı zamanda hem abiyotik hem biyotik stres durumlarında *PR* genlerini etkilediği bilinmektedir. Bitki patogenezi ile ilgili (*PR*) proteinler, biyolojik patojenler (mantarlar, bakteriler, virüsler, nematodlar) ve böcekler tarafından saldırı gerçekleştikten sonra konakçı içerisinde indüklenen ve biriken çeşitli proteinlerden oluşur. *PR-1* proteinleri, ilk keşfedilen *PR* ailesini temsil eden ve patojen saldırılarında en fazla üretilen *PR* formudur. *PR-1* proteinleri çeşitli bitki türlerinde sentezlenmekte olup, bu protein grubunun homologları mantar, böcek, hayvan ve insanlar da dahil olmak üzere diğer organizmalarda da belirlenmiştir. Bütün *PR-1* benzeri proteinler, N-terminal bölgesinde bir sinyal peptidi (SP) ve bir "PR-1 fold" (veya SCP_PR-1_like bölgesi, cd05381) olarak adlandırılan korunmuş bir üç boyutlu yapı içermektedir. *PR-1* fold için fazla asidik pH gibi hücre dışı ortamlarda *PR-1* proteinlerinin stabilitesine

katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Lu *et al.* 2011).

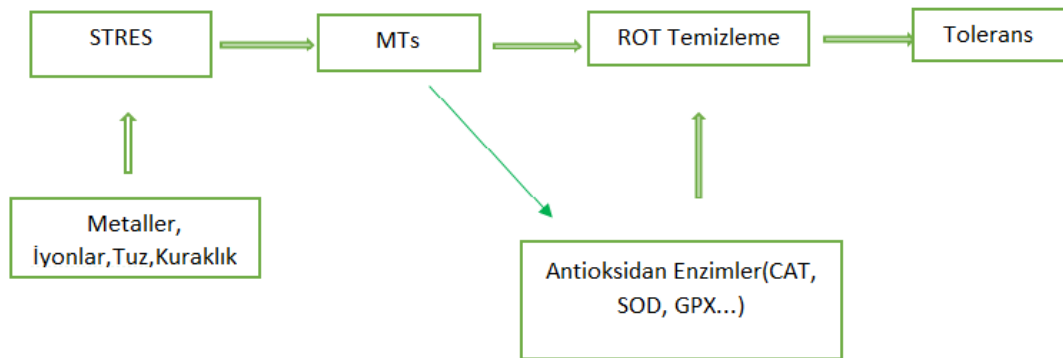
PR gen proteinleri, genellikle patojen saldırısı durumunda fazla miktarda üretilir. Fakat *PR* genlerinin sadece patojen istilası durumunda değil aynı zamanda ağır metal stresi altında da tolerans sağlamak üzere sentezlenmekte olduğu tespit edilmiştir. Nitekim arpa (*Hordeum vulgare* L.) fidelerinin gövdesinde Cd'nin protein ifadesi üzerine etkisi, yaprak apoplast proteinlerinin proteomik analizi ile araştırılmış ve Cd stresine maruz bırakılmış olan arpa fidelerinde, patojen stresinde olduğu gibi *PR* proteinlerinin (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4*, *PR5* ve *PR17* ailelerine ait proteinler) önemli seviyelerde sentezlendikleri görülmüştür (Pós *et al.* 2011). Yine başka bir çalışmada, Cu stresi altındaki *Phaseolus vulgaris* L.'in protein analizi sonucunda ise üç *PR* protein tipine rastlanmış ve Cu konsantrasyonunun artmasıyla bu protein seviyelerinde arttığı belirlenmiştir (Cuypers *et al.* 2005).

Ağır metallere karşı en önemli savunma tiplerinden bir diğeri ise *MT* genlerinin bitkiler tarafından aktive edilmesidir. Bu genler, metal bağlayıcı genler olarak bilinmekte olup, sistein kalıntıları sayesinde ağır metallerin toksik etkisini gidermesinde etkilidirler. Ağır metalleri kendilerine bağlayabilen bu proteinler, bitkilerde yaygın olan düşük molekül ağırlıklı (2~7 kDa), sistein açısından zengin (20%~30%) ve ısıya dayanıklıdır. *MT*, mantarlar, omurgasızlar, memeliler ve bitkiler gibi bazı ökaryotik ve bazı prokaryot organizmalarda tespit edilmiştir (Cobbett and Goldsbrough 2002). Son yıllarda, hayvanlarda ve mantarlarda olduğu gibi bitki *MT* genlerinin daha birçok önemli roller (apoptoz, büyüme, embriyonik gelişim, mikrospor gelişim, yaşlanma, meyve gelişimi, olgunlaşma ve streslere karşı tolerans sağlama) oynayabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bitkilerde, *MT*lerin ifade düzeylerinin, metal iyonları, ozmotik stres, kuraklık, karanlık nedenli senesens, ısı şoku, UV ışınlanması, oksidatif stres ve patojen saldırısından ve ayrıca çeşitli bitki hormonları ve bazı endojen faktörlerden etkilendiği saptanmıştır. *MT* genlerinin ifadesi, sadece Cu ve Zn gibi temel metaller tarafından değil aynı zamanda Cd gibi toksik metaller tarafından da indüklenmektedir. *MT* genlerinin bitkilerde ifadesi, ağır metal stresinde çeşitli uyaranlarla düzenlenmektedir (Kisa *et al.* 2016). Pb stresine maruz kalan ayçiçeği bitkisinde yapılan araştırmada *MT*

geninin ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu sonuç, *MT* geninin Pb detoksifikasyonunda rol aldığını düşündürmüştür (Wińska-Krysiak *et al.* 2015). *MT*lerin, çoğunlukla Cu ve Zn gibi metallerle kompleks oluştururken, Cd, Hg ve Pb gibi ağır metallerle de kompleks oluşturdukları bilinmektedir (Du *et al.* 2012).

İlk bitki *MT*leri, soya fasulyesinin köklerinde Casterline ve Barnett (1982) tarafından keşfedilmiştir (Du *et al.* 2012). *MT*ler, N ve C terminal bölgelerindeki sistein kalıntılarının *MT1*, *MT2*, *MT3* ve *MT4* olarak düzenlenmesine bağlı olarak dört kategoriye ayrılmıştır. Bu genler, çeşitli ağır metaller tarafından indüklenir ve bitki dokularında farklı seviyelerde ifade edilir. Tip1 *MT* genleri baskın olarak hem yapraklarda hem de köklerde ifade edilirken tip 2 *MT* genleri öncelikle yapraklar, saplar ve gelişmekte olan tohumda ifade edilmektedir. Tip 3 *MT* genleri yapraklarda veya olgunlaşan meyvelerde eksprese edilirken tip 4 *MT* genleri gelişmekte olan tohumda ve aynı zamanda üreme organları ve vejetatif dokularda da ifade edilmektedir (Kisa *et al.* 2016).

Son zamanlarda, bitki *MT*lerinin antioksidan özellikleri üzerine yapılan araştırmalar giderek artmaktadır. Bununla birlikte, metal bağlama ve ROT temizleme arasındaki etkileşim konusu halen net değildir. ROT temizleme işlemi sırasında, ROT türleri *MT*lerin Cys kalıntılarına bağlandığında metaller salınabilmektedir. Salınan metallerin ard arda sinyal oluşumuna katılabileceği ileri sürülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, bitkilerde *MT*lerin eylemlerinin bir model mekanizması önerilmektedir. (Şekil1.1)

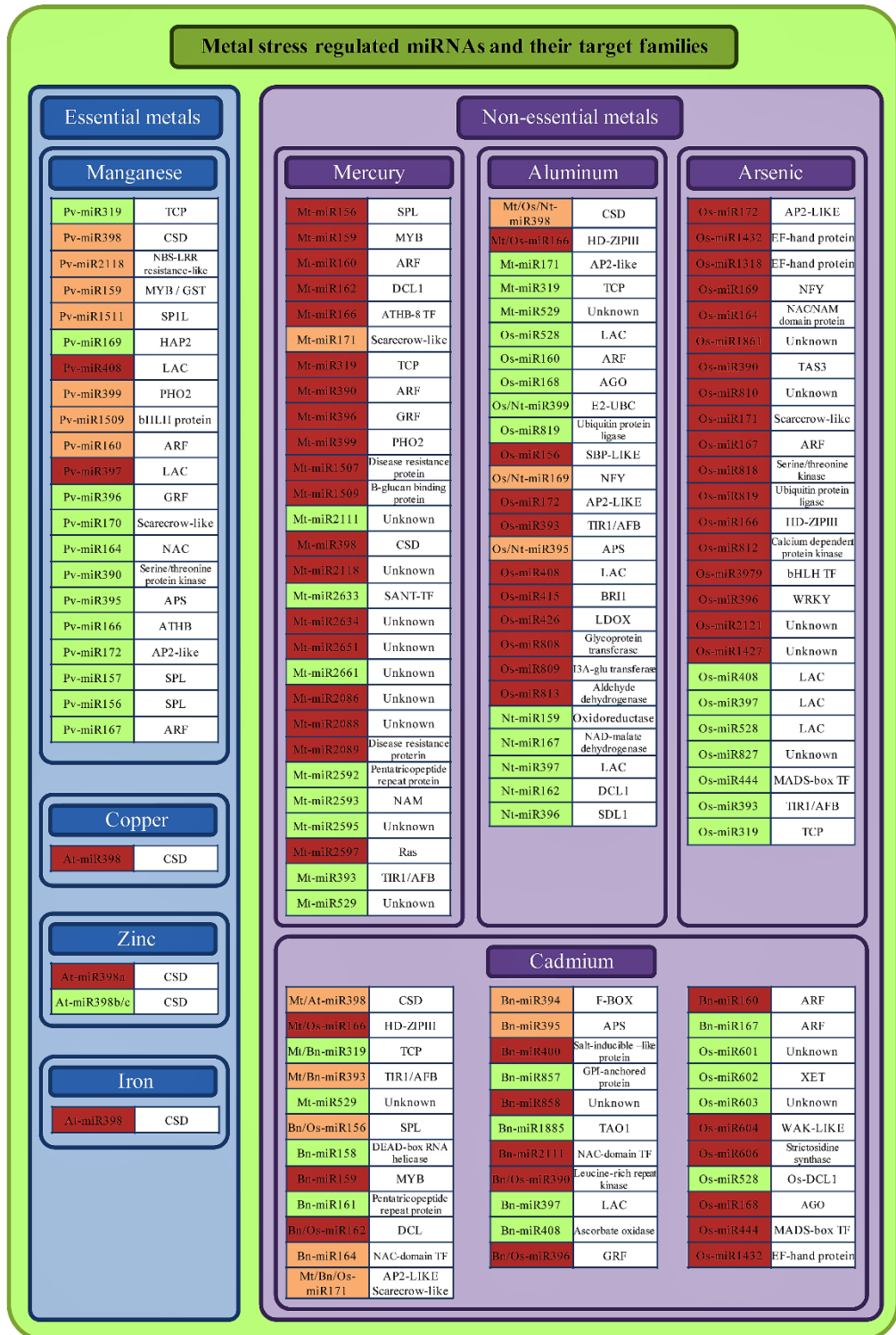


Şekil 1.1. Bitkilerde *MT*lerin bir model mekanizması (Du *et al.* 2012)

Yine yabani karpuzda (*Citrullus lanatus* sp.) yapılan bir çalışmada şiddetli kuraklık ve yüksek ışık stresi altında, *ClMT2* indüksiyonunun, yabani karpuzun (*Citrullus lanatus* sp.) hayatta kalmasına katkıda bulunduğu ve antioksidan özellikli bir bitki *MT*'sinin, bir ROT temizleyici olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür (Akashi *et al.* 2004).

Abiyotik streslerle başa çıkmaya çalışan bitkilerin eşsiz mekanizmalarından biride küçük RNA'lar (sRNA) dır. Bitkiler strese karşı yanıt verirken bazı genlerin aktivasyonu veya regülasyonu gerçekleşmektedir. Gen susturma işleviyle bilinen bu küçük RNA'lar, moleküler düzeydeki savunma mekanizmalarından biridir. Bu gen susturma mekanizması yani RNAi (RNA interferans) mekanizması iki önemli RNA türü sayesinde gerçekleşmektedir. Bunlar miRNA (mikro RNA) ve siRNA (küçük müdahaleci RNA)'dır. miRNA'lar, çoğu ökaryotik organizmada bulunan, büyüklüğü 20 ila 24 nükleotit arasında değişen, protein kodlamayan RNA (npc RNA) moleküllerinin bir riboregülatör sınıfıdır. miRNA'lar transkripsiyon sonrası seviyede, ya translasyon inhibisyonu ile ya da hedef geni parçalamasıyla sekansa özgü gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. miRNA'lar kuraklık, tuzluluk, ağır metal, soğuk, ısı, oksidatif stres ve UV radyasyonu gibi çeşitli abiyotik stres durumlarında bitkinin bu streslere karşı toleransı için bitki genlerinde regülasyonun sağlanmasında görev alırlar (Gupta *et al.* 2014).

Metal toksisitesine maruz kalan bitkilerde miRNA'lar ile ilgili pek çok çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda miRNA'lar ve hedefledikleri genlerin ifadelerine bakılarak miRNA'ların toksisiteye karşı bitkiyi korumada önemli rol oynadığı görülmüştür. miRNA'lar ve hedef genleri stres durumuna göre up veya down regüle olarak çeşitli yanıtlar oluşturabilirler. Şekil 1.2'de miRNA ve hedef genleri arasındaki ilişki gösterilmiştir (Gielen *et al.* 2012).



Abiyotik streslerle ilgili bazı miRNA tipleri ve bunların hedef genleri üzerine çok sayıda araştırmalar yapılmış ve bunlardan birtanesi de miR398'dir. miR398 oksidatif stresle tanımlanan ilk miRNA çeşididir. Hedefleri, Cu / Zn superoksit dismutaz (CSD) enzimleridir. Oksidatif stres sırasında *CSD1*(sitozolik CSD) ve *CSD2* (plastidik CSD) transkriptlerinin birikimi için gerekli olan miR398 down regüle olmaktadır. miR398, Fenton tipi reaksiyonlarda yer alır ve hidroksil radikalleri üretme potansiyeline sahiptir, Cu²⁺ ve Fe³⁺ gibi ağır metallere maruz kaldığında indirgenir. Buna ek olarak miR398, (genellikle *CSD1* ve *CSD2* transkriptlerinin seviyelerini arttırarak) yüksek ışık ve MV (metil viyologen)'e tepki olarak down regüle olmuştur (Mendoza-Soto *et al.* 2012).

Arabidopsis thaliana bitkisine Cu, Fe ve MV uygulanarak miR398 ve hedef genlerinin ifade düzeylerinin incelendiği bir araştırma sonucunda miR398'in down regüle olduğu ve hedef genlerinin ifadelerini (*CSD1* ve *CSD2*) arttırarak ağır metal stresinin sebep olduğu ROT'ları yok ettiği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda oksidatif strese cevap olarak *CSD1* ve *CSD2* tipi mRNA birikiminin, miR398 klavuzluğunda transkripsiyon sonrası regülasyonun bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Sunkar *et al.* 2006).

Medicago truncatula bitkisiyle yapılan bir başka çalışmada ise yine miR398 in ve hedef genlerinin oksidatif strese yanıtta etkili olduğu, Hg, Cd ve Al uygulanan bitkide miR398'in ağır metale karşı down regüle olduğu belirlenmiştir. miR398'in hedef genleri olan *CSD1* ve *CSD2* ifadelerinin miR398 tarafından düzenlendiği ve oksidatif strese karşı antioksidan sistemi harekete geçirerek bitkide bu ağır metallere karşı korumayı sağladığı bildirilmiştir (Zhou *et al.* 2008).

Daha önceki çalışmalar, farklı metallerin maruziyetine yanıt olarak yer alan birçok genin up-down regulesini göstermesine rağmen, bu düzenlenmenin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bitkilerde metal stresine karşı tolerans geliştirilebilmesi için ilk adımın, metal stresine cevap veren genleri ve bu genlerin düzenlenme mekanizmasının aydınlatılması olduğuna inanılmaktadır. Son yıllarda bitkilerde ağır metal toksisitesine verilen tepkiler arasında olan miRNA'ların ve hedef genlerinin ifadelerinin, strese toleransta önemli bir yerinin olduğu fikri giderek yaygın hale

gelmektedir. Bununla birlikte ağır metal toksisitesine tolerans sağlamada miRNA'ların rolünün önemli olduğu yönündeki bulgulara rağmen, maalesef miRNA'ların bu olaydaki rolünü nasıl gerçekleştirdiği konusu henüz kesinlik kazanmamıştır (Gupta *et al.* 2014).

Literatürde bitkilerin strese karşı olan savunma mekanizmalarıyla ilgili pek çok çalışma yer almaktadır. Fakat ağır metal stresine cevap olayı ile *MT* geni, *PR* geni ve miRNA'ların bu olayda ki rolleri hakkında yeterli bilgi henüz mevcut değildir. Dolayısıyla bu araştırmada buğdayda Pb stresinde *MT*, *PR* ve miR398'in hedef genlerinin ifade seviyelerinin, ayrıca mikro elementlerden Cu, Zn ile SA'nın bu genlerin ifade seviyelerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Buğday dünya nüfusunun kalori ihtiyacının yaklaşık %20'sini karşılayan önemli bir tarım bitkisidir. Uluslararası Gıda Politikası Araştırma Enstitüsü (IFPRI) tarafından yapılan tahminlere göre, dünya buğday talebi 2020'de 841 milyon tona ulaşacaktır. Mevcut azalan ekilebilir alan, küresel iklim değişikliği ve nüfusun sürekli büyümesi göz önüne alındığında, buğday üretiminin halen büyük zorluklarla karşı karşıya olduğunu göstermektedir (Yi *et al.* 2015).

Bitkiler çok sayıda abiyotik ve biyotik strese maruz kalmaktadır. Abiyotik stresler arasında ağır metal stresi bitkiler için büyük bir tehlike oluşturmaktadır.

Artan ağır metal kirliliği dünya çapında ciddi bir çevre sorunu haline gelmiştir. Bitkiler topraktan gerekli mineralleri almaktadırlar. Çoklu fizyolojik işlemler için temel metaller, örneğin Zn, Mn, Cu bitkiler için gereklidir, ancak bunlar yüksek seviyelerde toksik olabilir. Cd, Pb, Hg gibi diğer bazı metaller ise bitkiler için gerekli değildir ve oldukça toksiktir. Ağır metal toksisitesinin ayırt edici özellikleri, enzim sisteminin bozulması ve oksidatif strestir. Bitkilerde Cd veya Hg gibi metal iyonlarının yüksek birikimi, proteinlerin serbest sülfhidril gruplarıyla bağlandıkları için proteinlerin konformasyonel ve fonksiyonel olarak bozulmasına yol açtığından dolayı hücrelerdeki homeostazi de bozulur ve bu durum bitki gelişiminin engellenmesine, hatta ölümüne neden olabilir. Toksik metallerle temas etmiş olan bitkiler, güvenli gıda üretimi için büyük tehlike haline gelir. Bu nedenle, toprak ve bitkilerin artan metal iyonları ile kontaminasyonlarını azaltmak, hiç değilse bu ağır metallerin bitkilerdeki birikimini engellemek, dünyadaki tüm canlılar açısından büyük önem taşır. Ancak bitkilerdeki metal birikimini engellemek için, metal-duyarlı genlerin belirlenmesi ve ilişkili regülasyon ağlarının çok iyi anlaşılması gereklidir (Noman and Aqeel 2017).

Metal toksisitesini bertaraf etmek için (detoksifikasyon), bitkilerin, PC'ler ve MT'ler gibi farklı protein çeşitlerini sentezlemek gibi yanıtlar oluşturduğu bilinmektedir. Yine

sitrik, oksalik, malik - amino asit ve histidin gibi organik asitlerin köklerden rizosfere salınımı da detoksifikasyon amaçlı oluşturulan önemli bir fizyolojik tepkidir. Zira bu bileşikler de, ağır metallerle kompleks oluşturarak detoksifikasyon sağlamaktadır. Çeşitli metal taşıyıcıların ekspresyonu, metal toksisite toleransı için gereklidir.

Ağır metal stresi, ROT'ların birikimine yol açar ve bu stres nedeniyle up regüle edilen antioksidan enzimlerin aktivitesinin dengesizleşmesine neden olurlar. Bilindiği üzere, oksidatif stres, hücredeki lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın hasar görmesine neden olur. Metal toksisitesi gibi abiyotik bir stresle bitkinin başa çıkabilmesi için, ilgili genlerin ekspresyonlarının gerek transkripsiyonel ve gerekse post-transkripsiyonel basamaklarını çok hassas bir şekilde düzenleyebilmesi gereklidir. Söz konusu bu tip bir düzenlemede, miyeloblastoz proteini (MYB), bazik lösün fermuarı (bZIP), etilen yanıtı faktör (ERF) ve WRKY gibi farklı gen ailelerinden olan bazı transkripsiyon faktörlerinin (TF) rol aldığı bilinmektedir. Bundan başka, esasında protein kodlamakla görevli olmayan ve npcRNA (protein kodlamayan RNA) adı verilen RNA'larında, metal toksisite yanıtının düzenlenmesinde rol alabileceği rapor edilmiştir (Mendoza-Soto *et al.* 2012).

Bitkileri etkileyen yaygın kirleticiler arasında Pb en toksik ve sık karşılaşılanlardan biridir. Pb birçok endüstriyel proste halen yaygın olarak kullanılmakta olup, tüm çevre katmanlarında (toprak, su, atmosfer ve canlı organizmalar) kontaminant olarak görülmektedir. Pb'nin, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal kaynaklı olanlar da dahil olmak üzere tüm canlı organizmalar için geniş bir toksik etki sergilediği bilinmektedir. Bu ağır metal çeşiti, bitki büyümesi, kök uzaması, tohum çimlenmesi, fide gelişimi, transpirasyon, klorofil üretimi, kloroplasttaki lamel organizasyonu ve hücre bölünmesi gibi birçok hayati öneme sahip fizyolojik olayları inhibe etmektedir. Bununla birlikte, Pb'nin bitkideki etki derecesi, test edilen Pb konsantrasyonuna, maruz kalma süresine, başka bir stres tipinin varlığına, bitki gelişme evresine ve bitkinin organlarına bağlı olarak değişebilir.

Pb elementinin bitkiler üzerindeki toksik etkilerini belirlemek amacıyla birçok araştırma yapılmış olup, bunlardan bazıları aşağıda sunulmuştur:

Pb'nin ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) ve buğday (*Triticum aestivum* L.)'ın kuru ağırlıklarında azalmaya ve gayet net bir büyüme inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu semptomların temelde Pb'nin neden olduğu makroelement eksikliğinden (özellikle K, P, Ca ve Mg) kaynaklandığı ifade edilmiştir (Lamhamdi *et al.* 2013).

Pb'nin iki buğday çeşidinde, (Chakwal-97 ve Sehar-2006,) yaprak / kök uzunluğu, taze / kuru ağırlık verimi, sürgün sayısı gibi morfolojik parametreleri ve yine kl a, kl b gibi fotosentetik pigmentleri ve Na⁺, K⁺ iyonlarının içeriğinde azalmaya yol açtığı fakat karoten içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Bhatt *et al.* 2013).

Cd ve Pb stresine maruz kalan buğday fidelerinde antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişimlerin olduğu ve lipid peroksidasyonunda ciddi artışların olduğu ve sonuç itibariyle, Cd ve Pb ağır metallerinin bitkilerin büyümesine, kök ve sürgünlerde büyüme inhibisyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Dey *et al.* 2007).

Buğday (*Triticum aestivum*)'da Pb uygulamasının oksidatif strese yol açtığı, bu durumun da bitkide büyüme inhibisyonuna ve fotosentetik aktivitenin olumsuz etkilenmesine sebep olduğu sonucuna varılmıştır (Kaur *et al.* 2012).

Diğer taraftan, bitkiler, toksik metal stresine cevap vermek için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Bunlardan bazıları şunlardır; Seçici metal alımı, boşaltımı, spesifik ligandlarla kompleksler oluşturma ve köklere gelen bu metallerin üst kısımlara taşınmayıp kök dokularında depo edilmesidir (Pourrut *et al.* 2011). Bitkiler ağır metale maruz kaldıklarında bazı savunma sistemleri devreye girmektedir.

Bazı durumlarda ise metallerin bir arada bulunması antagonistik etki yaparak ağır metalin bitkide oluşturduğu hasarları hafifletebilmektedir

Nitekim *Sesbania drummondii* bitkisiyle Pb, Cu, Ni ve Zn'nin büyüme, metal alımı ve antioksidatif metabolizması üzerindeki kombine etkileri ile ilgili bir çalışmada, bitki gelişimi ve büyümesinin, metal uygulaması ile önemli derecede azaldığı ve köklerde sürgünlerden çok daha yüksek konsantrasyonlarda metal biriktiği belirlenmiştir. Metal alınımının, köklerde Pb > Cu > Zn > Ni sırasını; sürgünlerde ise Pb > Zn > Cu > Ni sırasını izlediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada enzimatik SOD, APX, GR ve enzimatik olmayan (GSH gibi) antioksidanlarda belirgin bir artış gözlenmiş ve enzim aktivitelerinde artışın, Cu > Ni > Pb > Zn sırasını izlediği belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda bir metalin alınımının diğer metallerin varlığından etkilendiği, metallerin birlikte bulunmasının oksidatif stresini arttırabileceği ortaya koyulmuştur (Israr *et al.* 2011). Ağır metallerin antagonistik ve sinerjik etkisi için yapılan başka bir çalışmada ise Cu, Cd ve Pb'nin *Cucumis sativus*'un büyümesi ve biyoakümüasyonu üzerine kombine etkisi araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda, Cd ve Pb'nin kombinasyon halinde sinerjik yanıt gösterdiği, üçlü kombinasyondaki Cu, Cd ve Pb toksisitesinin, tek tek uygulandığı durumla kıyaslandığında, daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır (An *et al.* 2004).

Buğdayda ise Cu, Zn ve Pb'nin tohum çimlenmesi, plumula ve radikula uzamasını engellediği ve inhibisyon sıralamasının Cu > Pb > Zn şeklinde olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada yaprak ve köklerde Cu'nun aşırı birikiminin Zn seviyesini azaltabileceği, Pb'nin birikmesinin, yaprak ve köklerde Cu veya Zn seviyesini azalttığı; Zn'nin aşırı birikiminin, yaprak ve köklerde Cu birikimleri üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, buğday fidesindeki ağır metal konsantrasyonu normal veya fitotoksik seviyelerden yüksek olduğunda, besin elementi olarak Zn veya Cu emilim prosesinin bundan etkilenmekte olduğu görülmüştür (Wang *et al.* 2011b). Benzer bir çalışma soya fasulyesi üzerinde yapılmış olup, bu çalışmada ise Cd, Pb ve As metallerinin kombinasyon halinde iken bitkide oluşturdukları fitotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu araştırma sonucunda, kombinasyon halinde uygulanan ağır metallerin sinerjistik ve antagonistik etkilerinin olabildiği, kök büyümesi açısından Pb ve As arasındaki etkileşimin antagonistik, Cd ile Pb ve Cd ile As kombinasyonlarının sinerjistik etkiler oluşturduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, sürgün büyümesi üzerine ikili kombinasyonların, Cd ve As birlikte uygulandığında

sinerjistik, Pb ve As birlikte uygulandığında ise antagonistik, üçlü kombinasyon olarak uygulandıklarında ise sinerjistik bir etkiye neden oldukları belirlenmiştir (Luan *et al.* 2008).

SA, monohidroksibenzoik asit bitkilerdeki çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları düzenleyen doğal olarak oluşan bir bitki hormonudur. Aynı zamanda, biyotik ve abiyotik streslere karşı tolerans göstermede önemli rolleri olan bir moleküldür. Şöyle ki; SA soğuk, ısı, ağır metaller, ozmotik stres ve tuzluluk gibi birçok abiyotik strese maruz kaldığında stres kaynaklı antioksidan sistemin aktivasyonunda yer alır. Patogenezle ilişkili gen ekspresyonunda, sistemik olarak kazanılmış dirençte ve aşuya duyarlılık olayında SA'nın rolü vardır. Önceki çalışmalarda, SA uygulamasının, bitki büyümesi ve verimi, antioksidan enzimlerin uyarılması ve bazı fotosentetik reaksiyonların düzenlemesi gibi çok çeşitli bitki süreçlerini etkilediği belirtilmiştir (Chen *et al.* 2016).

Bir tür organik asit olan SA'nın, Pb ve diğer ağır metal streslerinin neden olduğu hasarları hafifletici etkiye sahip olduğu, bitkilerde patojenlere karşı hastalık direncini arttırabildiği, çiçeklenmeyi teşvik edebildiği, kuraklık şartlarında transpirasyonu düşürebildiği ve gerektiğinde etilen sentezini inhibe edebildiği iyi bilinmektedir (Song *et al.* 2012).

SA'nın, bitkilerdeki ağır metal stresine karşı hafifletici etkisinin olduğuna dair bazı araştırma örnekleri aşağıda sunulmuştur:

Pb stresi maruz bırakılan altı farklı buğday genotipinde SA'nın, APX ve CAT aktivitesi, MDA ve prolin içeriği gibi parametreler üzerine etki etmek suretiyle stresin neden olduğu hasarları azalttığı rapor edilmiştir (Song *et al.* 2012).

SA uygulanarak karnabahardaki ağır metal (Co, Ni, Cd, Cr ve Pb) toksisitesinin azaltılması ile ilgili yapılan bir çalışmada SA'in antioksidan savunma sistemini harekete

geçirmek süretiyle ağır metal toksisitesinin oluşturduğu hasarları hafiflettiği yönünde bulgular elde edilmiştir (Sinha *et al.* 2015).

SA'nın bezelye bitkisinde Cd toksisitesine karşı Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz (RuBPC, E.C. 4.1.1.39) aktivitesini ve klorofil seviyelerini muhafaza etmek süretiyle fotosentezin devamlılığını sağlayabildiği ifade edilmiştir (Popova *et al.* 2008).

Cd stresine maruz bırakılan baklagil bitkisine SA uygulanmasının, bitkilerin büyümesi, fotosentetik verimliliği, prolin birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri gibi parametrelere etki ettiği ve verim özelliklerini iyileştirdiği belirtilmiştir (Alyemeni *et al.* 2014).

Cd ve Pb stresine altındaki *Brassica juncea* (L.) Czern. ve *Trigonella foenum-graecum* L. bitkilerine SA uygulamaları yapılarak bitkilerin büyüme ve antioksidan savunma sistemi parametrelerine bakılmış, nihayetinde SA'nın Cd ve Pb'nin toksik konsantrasyonlarına karşı antioksidan savunma mekanizmasını düzenleyerek bu bitkilerde toleransı artırabildiği sonucuna varılmıştır (Goel 2012).

Bitkiler sürekli abiyotik ve biyotik streslere maruz kalmaktadırlar. Bitkiler gen ifadesindeki hızlı değişimler sonucu patojen saldırılarına veya abiyotik streslere tepki verebilme özelliğindedir ve bu tepkilerden biri de, bazı spesifik proteinlerin (*PR* gibi) sentezlenmesini gerçekleştirmek şeklindedir.

Transgenik tütün bitkilerinde biber geni olan patojenez-bağlı protein 1 (*CABPR1*) geninin aşırı ifadesi, ağır metal ve patojen streslerine karşı direnci arttırdığı belirlenmiştir (Sarowar *et al.* 2005).

Arpa'da (*Hordeum vulgare* L.) Cd stresi altında *PR* proteinlerinin (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4*, *PR5* ve *PR17*) indüksiyonu ağır metal stresine yanıtın bir parçası olduğu ifade edilmiştir (Pos *et al.* 2011).

Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Cu stresiyle indüklenen *PR-10* ailesinin 3 üyesi tanımlanmış, fakat *PR-10* proteinlerinin savunma yanıtlarındaki rolü, bu proteinlerin ana işlevi kesin olarak belirtilmemiştir (Cuypers *et al.* 2005).

Abiyotik bir stres olan ağır metal stresi karşısında bitkilerin kendilerini korumaları için eşsiz mekanizmalarından birisi de *MT* genidir. *MT* geni insan, hayvan ve bitkilerde bulunmuş ve ağır metal stresiyle ilişkisi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır.

MT, sisteince zengin düşük molekül ağırlıklı proteinler olup, bunlar aromatik amino asit içermezler. *MT*'ler yüksek sistein içeriğinden dolayı ağır metallere karşı yüksek afiniteye sahiptirler ve ağır metallere kolayca bağlanırlar. Bu nedenle ağır metallere maruz kalan hücrelerde ve organellerde koruyucu bir rol oynadıkları düşünülmektedir (Brewer and Marcus 2007; Shi and Chance 2008).

MT'lerin metal stresine karşı tolerans sağladıklarına dair bazı araştırma örnekleri aşağıda sunulmuştur:

Cd'ye maruz bırakılan domates (*Solanum lycopersicum* L.)'de *MT* gen ifade analizi sonuçlarında *MT1*, *MT2*, *MT3* geni ifadelerinin arttığı gözlenmiştir (Kisa *et al.* 2016).

Karabuğday bitkisi ağır metale maruz bırakılmış ve stres altında *FeMT3* geni incelenmiştir. Çalışma sonunda *MT* geninin ağır metal bağlamasında önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur (Nikolic *et al.* 2010).

Pb stresi altındaki ayçiçeği bitkisiyle yapılan bir çalışmada, *MT1* geninin (*HaMT1*) ifade düzeyleri incelenmiş ve araştırma sonucunda *MT*'lerin, stresin düşük veya orta düzeyde olduğu durumlarda Pb detoksifikasyonunda etkili oldukları belirtilmiştir (Wińska-Krysiak M. *et al.* 2015).

Arabidopsis thaliana'da metalotiyoenin genlerinin (*MT1*, *MT2a* ve *MT2b*) ağır metallere indüklenebilirliğinin, bitkinin organlarına bağlı olarak değişmekte olduğu ifade edilmiştir (Zhou and Goldsbrough 1995). Tatlı patatestede (*Ipomoea batatas*) ise üç *MT* geninin (*ibMT1*, *ibMT2*, *ibMT3*), birçok değişik metal stresi (CaCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CdSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO})_3$, MgSO_4 ve MnSO_4) şartları altında iken ekspresyon seviyelerinin organa bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2014). Yine, *Silene vulgaris* ekotiplerinde, Cu stresi altında, *MT3* ekspresyonunun dokuya spesifik olarak değiştiği ve Cu toleransı ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Nevrtalova *et al.* 2014). Yüksek doz Zn'ye maruz bırakılan beyaz kavakta (*Populus alba*) *PaMT1*, *PaMT3* ve *PaMT2* gen ifade seviyelerinin organa bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Castiglione *et al.* 2007).

Cd ve Pb stresi uygulanan *Aegiceras corniculatum* bitkisinde *MT2* geninin ifade seviyelerinin arttığı ve bu genin kodladığı proteinin, Pb ve Cd'ye karşı bitkinin sahip olduğu savunma mekanizmalarından biri olabileceği belirtilmiştir (Li *et al.* 2013).

MT'lerle ilgili yapılan bir başka çalışma ise, *Ziziphus jujuba*'da tip1 *MT* (*ZjMT*) geni izole edilerek *Escherichia coli*'ye aktarılmış ve gen aktarılmış olan bu *Escherichia coli* hücrelerin, bu geni içermeyen kontrol hücrelerine kıyasla daha yüksek metal iyonu birikimi özelliği gösterdiği ve çok daha yüksek ağır metal toleransına sahip oldukları belirlenmiştir. Bu bulgulardan hareketle, *ZjMT* geninin metal iyonlarının detoksifikasyonuna katkıda bulunduğunu ve metal streslerine karşı bariz bir tolerans sağladığı sonucuna varılmıştır (Li *et al.* 2016).

Elsholtzia haichowensis, Cu'ya toleransı olan bir bitkidir. Bu bitkiden *EhMT1*, tip1 *MT* geni izole edilmiş ve çeşitli organdaki ekspresyon seviyesi incelendikten sonra *Escherichia coli*'ye aktarılmıştır. *EhMT1* geni aktarılmış *Escherichia coli*'nin Cu, H_2O_2 ve ısı şoku tarafından indüklenmesi durumunda, *EhMT1* geninin Cu iyonlarının neden olduğu toksisitesini hafifletmede önemli bir işlevi olduğu sonucuna varılmıştır (Xia *et al.* 2012).

Ağır metale toleransa sahip bir mangrov (*Kandelina candel*) bitkisinde ZnSO₄, CuSO₄, PbCl₂, HgCl₂ ve CdCl₂ streslerinin, *MT* geninin ifade seviyesinde değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir (Zhang *et al.* 2012).

MsMT2a ve *MsMT2b* geninin, Cd stresine karşı tolerans etkisi ile ilgili *Medicago sativa*'da yapılan bir araştırmada, *MsMT2a* geninin yoncanın tüm gelişim evrelerinde ifade edilmekte olduğu ve bu genin Cd toleransını indükleyici bir gen olabileceği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2011c).

Du ve arkadaşları (2012) *MT* grubu genlerden bazılarının hangi ağır metal streslerinde ekspresyona uğradıkları ve ne gibi fonksiyonlar üstlendikleri aşağıdaki çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Bazı bitki türlerinde *MT* genlerinin fonksiyonları (Du *et al.* 2012).

TÜR	GEN	FONKSİYON
<i>Arabidopsis thaliana L.</i>	<i>AtMT</i>	Senesens sırasında ve Cu'ya yanıt olarak dokuya spesifik ifade ve indüksiyon
	<i>AtMT1</i>	Mayada Cd'ye toleransı artırır.
	<i>AtMT2</i>	Kadmiyuma duyarlı mayada Cd'ye toleransı artırır.
	<i>AtMT2a</i>	<i>Vicia faba guard</i> hücrelerinde Cd'ye direnci artırır.
	<i>AtMT3</i>	<i>Vicia faba guard</i> hücrelerinde Cd'ye direnci artırır.
	<i>AtMT4a</i>	<i>A.thaliana</i> 'daki Cu ve Zn toleransını artırır.
<i>Brassica juncea L.</i>	<i>BjMT2</i>	<i>E. coli</i> ve <i>A. thaliana</i> 'da Cu ve Cd toleransını artırır.
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>CIMT2</i>	Kuraklık stresinde ifade olur
<i>Fagopyrum esculentum L.</i>	<i>FeMT3</i>	Karabuğdayda kuraklık ve oksidatif toleransı artırır.
<i>Gossypium hirsutum L.</i>	<i>GhMT3a</i>	Transgenik tütün ve mayada biyotik stres toleransını artırır.
<i>Oryza satival L.</i>	<i>OsMT1a</i>	Çinko homeostazında rol oynar ve transjenik pirinci kuraklığa toleransını artırır

Çizelge 2.1. (devam)

<i>Porteresia coarctata</i>	<i>PcMT3</i>	Cd, Cu ve Zn tarafından ifade olur
<i>Thlaspi caerulescens</i>	<i>MT2</i>	<i>T. caerulescens</i> 'in metal uyarlanmış fenotipe katkıda bulunur
	<i>MT3</i>	<i>T.caerulescens</i> 'de Cu homeostazisini sağlar
<i>Avicennia marina</i>	<i>AmMT2</i>	Transgenik <i>A. marina</i> 'da Zn, Cd, Cu, Pb toleranslarını artırır.
<i>Populus alba L.</i>	<i>MT1</i>	Zn tarafından indüklenir
	<i>MT2</i>	Cd, Cu, Zn tarafından ifade olur
	<i>MT3</i>	Su stresini indükler ve ROT'ları temizler
<i>Populus trichocarpas</i> × <i>deltoide</i>	<i>PdtMT1a</i>	Zn varlığında köklerde ifade olur
	<i>PdtMT1b</i>	Zn varlığında köklerde ifade olur
	<i>PdtMT2a</i>	Mayada Cd toleransını artırır, Zn varlığında kök, yaprak ve gövdede ifade olur
	<i>PdtMT2b</i>	Mayada Cd toleransını artırır, Zn varlığında kök, yaprak ve gövdede ifade olur
	<i>PdtMT3a</i>	Mayada Cd toleransını artırır, Zn varlığında kök, yaprak ve gövdede ifade olur
	<i>PdtMT3b</i>	Zn yaprak da gen ekspresyonunu indükler
<i>Tamarix hispida</i>	<i>ThMT3</i>	Transgenik mayada Cd, Zn, Cu ve NaCl toleransını artırır.

Bikilerde strese karşı savunma mekanizmalarında bilimsel ilerlemeler kaydedilmiş ve bu eşsiz, karmaşık mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Son zamanlarda, post-transkripsiyonel seviyede gen ifadesinin önemli düzenleyicileri olarak tanımlanan miRNA'lar savunma mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Strese duyarlı miRNA'lar arasında, miRNA398 (miR398), bitki stres düzenleyici ağıyla direkt olarak bağlantılı olduğu düşünülen miRNA çeşididir. Oksidatif stres, su stresi, tuz stresi, absisik asit stresi, ultraviyole stresi, bakır ve fosfat eksikliği, yüksek sukroz ve bakteriyel enfeksiyon gibi bitki yanıtlarını düzenleyen bir miRNA'dır. Bu yüzden miR398 ile yapılan araştırmalar bitkilerin strese karşı kendini savunmasında önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (Zhu *et al.* 2011).

Arabidopsis thaliana L. bitkisi Cu, Fe ve yüksek ışık stresine maruz bırakılarak miR398 ve hedef genlerin ifade seviyeleri incelenmiştir. Oksidatif stres altında miR398in down regüle olduğu, miR398'in hedef genleri olan *CSD1* ve *CSD2*'nin ifadeleri bu oksidatif stres karşısında arttığı belirlenmiştir (Sunkar *et al.* 2006).

Zn stresinin *Arabidopsis thaliana* L.'da oksidatif stresle ilgili olan *CSD1* mRNA seviyelerini artırdığı *CSD2* ise mRNA seviyelerini ise tüm konsantrasyonlar da azalttığı tespit edilmiştir (Remans *et al.* 2012).

Medicago truncatula'da Hg, Cd ve Al stresine maruz bırakılmış ve miRNA'ların analizi yapılmış, miR395 ve miR160'ın ifade seviyesinin değişmediği; miR171, miR319 ve miR393'ün up regüle olduğu; miR166 ve miR398'in ise down regüle oldukları belirlenmiştir (Zhou *et al.* 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen ve ağır metallere hassas olduğu bilinen *Triticum aestivum* L. cv. 'Çetinel 2000' çeşidi kullanılmıştır. Tohumlar çimlendirilmiş ve yetiştirilen buğday bitkisinin kök ve yapraklarından yararlanılmıştır.

3.1.2. Araştırmada kullanılan cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan cihazlar ve modelleri aşağıda verilmiştir.

Otoklav (Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)

Otomatik Pipetler (Eppendorf, GERMANY)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Spektrofotometre (Cecil, CE 5502)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00)

Santrifüj (Hettich, GERMANY, EBA-20)

PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Derin Dondurucu (Nuarie, U.S.A. , -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve solüsyonlar

Araştırma boyunca kullanılan kimyasallar ve hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir.

3.1.3.a. Salisilik Asit solüsyonunun hazırlanışı

Uygulama dozu olan 1mM SA için; 0.0138 g SA tartılmış ve 20 ml etil alkol de çözülmüştür. Daha sonra üzerine su eklenerek toplam hacim 100 ml olarak tamamlanmıştır.

3.1.3.b. Tohum sterilizasyonu için kullanılan çözeltiler

❖ %10'luk Sodyum hipoklorit (NaOCl):

%10'luk NaOCl için; ABC® marka çamaşır suyundan 10ml alınarak toplam hacim 100 ml olarak tamamlanmıştır.

❖ %70'lik Etil Alkol:

%100 lük etil alkolden 70 ml alınmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.c. Besin çözeltilisinin hazırlanışı

Denemede hazır olarak sağlanan Hoagland ve Arnon (1938) (Sigma H2395-10L) tuzu 10L saf su içerisinde çözülmüştür.

3.1.3.d. Ağır metal çözeltileri ve hazırlanışı

Çalışılan ağır metaller ve hazırlanışı aşağıdaki Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan ağır metal çözeltilerinin hazırlanması

Ağır metalin adı	Uygulanan Dozu	Hazırlanışı
PbSO₄: Kurşun (II) sülfat	5mM	1.516gr PbSO ₄ az miktar sodyum hidroksit(NaOH) içinde çözülmüş ve toplam hacim su eklenerek 1lt olarak tamamlanmıştır.
CuSO₄.5H₂O: Bakır (II) sülfatpentahidrat	1mM	0,249gr bakır sülfat tartılarak 1lt suda çözülmüştür.
ZnSO₄.7H₂O: Çinko sülfat heptahidrat	0,015mM	0,0043 gr çinko sülfat tartılarak 1lt suda çözülmüştür.

3.1.3.e. Kullanılan Primerler ve Hazırlanışları

Triticum aestivum L. genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ile ilgili veri tabanlarından yararlanılarak *MT*, *PR* ve miR398 hedef genleri için primer tasarımı yapılmıştır. Araştırmada kullanılan genler için Pfam (pfam.xfam.org) veritabanı kullanılarak genlerin erişim numaraları bulunmuştur. Daha sonra bitki genomik kaynağı olan Phytozom (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) veri tabanı kullanılmıştır. Veri tabanında *Triticum aestivum* L. bitki türü seçilmiş ve erişim numarası girilerek genlerin sekans dizilerine ulaşılmıştır. (miR398 hedef genleri için mirbase (<http://www.mirbase.org/>) veritabanı kullanılarak buğdayda miR398'in hedef genleri bulunmuş ve Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) veritabanı ile protein sekanslama yapılarak bu genlerin işlevlerine ulaşılmıştır. Son olarak seçilen bazı dizilerinden Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programı kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Araştırma sürecinde kullanılacak olan primerler elde edildikten sonra firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra yapılan hesaplamalar sonucunda 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan genlerin ifade düzeylerini incelemek için hazırlanan primerlerin baz dizilimleri Çizelge 3.2’de yer almaktadır. Ayrıca çalışmada referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin baz dizilimi

Primer-GEN	GEN ID	Forward Primer 5'→3'	Reverse Primer 5'→3'
Metallotiyonein (MT2)	543479	GGCTGCAACGACAAGTGC	GGTTGCACCCACAGTGCT
<i>PR-1.2</i> patogenez ile ilgili protein 1.2	543488	TCGCCTCAGGACTACCTCTC	CTCTGGTTGGCGTAGCTCTG
β -Aktin	AB 181991.1	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT	CAGAGTCGAGCACAATACTG

Çalışmada kullanılan miRNA ve hedef genlerinin ifade düzeylerini incelemek için hazırlanan primerler ise Çizelge 3.3’de yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan miR398 hedef genlerinin qRT-PCR için primer dizileri

Primer-miRNA	Hedef Gen ID:	Fonksiyonu	Forward Primer 5'→3'	Reverse Primer 5'→3'
<i>ath-miR398a-3p</i>	Traes_3B_E1131EA03.1	Metallo-beta-lactamaz (EC 3.5.2.6)	ACTCCTGTCGTCATTGCAGA	GCCATTGAAGCAAACCTCCT
<i>ath-miR398a-5p</i>	Traes_7BL_A04B4A50C.1	Protein kinaz (EC 2.7.11)	TGCCCATATAGAAGCGACTTG	GAGCTCTCTTGATGGCAACC
<i>ath-miR398a-5p</i>	Traes_5BL_DF8C0753E.1	Bax-Inhibitör1	GCGCTACTACCACCAGAAGC	CTCTTTGCAGCCCAGAAAGT
<i>bol-miR398a-5p</i>	Traes_2BS_B4F22F1BC.1	F-Box domain	TGGATACATTGTGGTGCTCA	CCAAATGAAGTGACCGCATA
<i>ptc-miR398a</i>	Traes_2DS_3C3A2A12A.2	Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1)	ATCCCCCTTACTGGACCAAA	CGTTTCCAGTGCTCTTGCTA

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohum sterilizasyonu

Ekim öncesi tohumlar aşağıdaki şekilde sterilize edilmiştir.

1-Çalışmada kullanılan *Triticum aestivum* cv. Çetinel 2000 çeşidine ait tohumlar ilk olarak musluk suyunda yıkanmıştır.

2-Daha sonra %70'lik alkolde 1 dakika karıştırılmış ve devamında steril suyla iyice çalkalanmıştır.

3-Sonrasında %10'luk NaOCl çözeltisiyle 10 dakika muamele edilmiştir.

4-Son olarak tohumlar 4 kez steril suyla iyice çalkalanmış ve kurutma kağıdında kurutulmuştur.

3.2.2. Ağır metal uygulaması için gereken dozların belirlenmesi

Uygun dozların bulunması için steril olan petri kaplarına buğday tohumları ekilmiştir. Her ağır metal ve konsantrasyonu için 4 tekrarlı olacak şekilde steril 12 cm çaplı cam petri kaplarının içine filtre kağıdı koyulmuş ve içlerine 25 tane sterilizasyonu yapılmış tohum ekilmiştir. Pb için 5mM, 10mM, 15mM, Cu için 1mM, 2mM, 3mM, Zn için 0.015mM, 0.03mM, 0.06mM olan dozlar denenmiştir.

Zn için *Thlaspi ochroleucum* bitkisinde 1mM Zn ve üzerinin toksik olduğu tespit edilmiştir (Shen *et al.* 1997). Çalışmada 1mM altındaki dozlar denenerek toksik olmayan doz bulunmuştur

Pb için 1mM'dan fazlasının toksik olduğu tespit edilmiştir (Verma and Dubey 2003). Çalışmada bu dozun üstündekiler denenerek uygun olan toksik doz seçilmiştir.

Cu, bitkilerde belirli dozda bulunması gerekmektedir. Gerekli dozu aşması halinde

toksik etki yapmaktadır. Bu yüzden hücrelerdeki Cu konsantrasyonlarının düşük seviyelerde tutulmalıdır. Çalışmada Cu için 3 doz denenmiş ve uygun olan doz tespit edilmiştir.

Pb için toksik doz belirlenirken Cu ve Zn için toksik olmayan doz belirlenmiştir. Her bir petri kabına bu dozlardaki solüsyonlardan 10 ml koyulmuştur. Kontrol gruplarına ise 10 ml distile su koyulmuştur. Ekim yapıldıktan sonra petri parafilm ile kapatılıp 1 hafta oda sıcaklığında gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Pb için en uygun dozun 5mM, Cu için 1 mM ve Zn için 0.015 mM olduğu tespit edilmiştir.

3.2.3. Kullanılan bitkinin yetiştirilmesi ve metaller ile salisilik asit uygulaması

Bitkilerin yetiştirilmesi ağır metal ve SA uygulaması hidrofonic sistemde yürütülmüştür. 3 L kapasiteli plastik kapların kapakları 51 mm çapındaki file saksıların gireceği şekilde 6 tane delik açılmış ve file saksıların içerisine hidroton eklenmiştir. Hidrotonun solüsyonla temas edecek şekilde plastik kaplara solüsyon eklenmiştir. Hidrofonic sistem kesintisiz bir şekilde elektrikli hava motoru kullanılarak havalandırılmıştır.

Her ağır metal ve kombinasyonları ve de SA uygulaması için 1 plastik kap kullanılmış ve her saksı 1 tekerrür olarak kabul edilmiştir. Steril edilen tohumlar nemlendirilmiş çimlendirme kağıdı içeren petri kutularına bırakılarak homojen bir çimlenme sağlamak için +4°C'de 48 saat süreyle bekletilmiştir. Bu tohumlardan ½ dozda Hoogland and Arnon (1938) solüsyonu içeren (pH=5,5-5,7) plastik kaplar üzerindeki her saksıya 10 tane olacak şekilde bırakılmış ve 20±1°C'de 16 saat ışık (Floresans lambası-300 Imol/m²s⁻¹) 8 saat karanlık şartlarda 14 gün süreyle büyütülmüştür. Çimlenen tohumlardan gelişen fidelerden her saksıda 5 tane kalacak şekilde homojen büyüme gösteren fideler bırakılarak bu fidelere ağır metal ve SA uygulaması yapılmıştır. 14 günlük fidelere yapraktan spreyle SA uygulamasını [0,0 (etil alkol) ve 1,0 mM] mütabiken iki gün sonra aşağıda verilen ağır metal ve/veya metal kombinasyonları Hoagland and Arnon (1938) solüsyonuna aktarılmış ve yine aynı kültür şartlarında 10 gün süreyle ağır metal stresine

maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda bitki örnekleri alınarak -80°C 'de çalışma yapılacağı güne kadar bekletilmiştir.

Uygulama	Açıklama
1	5mM PbSO ₄ (Pb)
2	1mM CuSO ₄ .5H ₂ O(Cu)
3	0,015 mM ZnSO ₄ .7H ₂ O(Zn)
4	Pb+Cu+Zn
5	Pb+Cu
6	Pb+Zn
7	KONTROL(Ağır metalsiz)

3.2.4. RNA izolasyonu

Araştırılan bitkinin yaprak ve köklerinden RNA izolasyonu Trizol reagent (Invitrogene, USA) ile yapılmıştır.

RNA izolasyon aşamaları:

- 1- 100 mg bitki örnekleri sıvı azot yardımıyla 1ml Trizol reaktifi (Invitrogene,USA) içinde 2 ml'lik steril tüplerde parçalanarak homojenize edilmiştir.
- 2- Bu örnekler 5 dk. Oda sıcaklığında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlanmıştır.
- 3- 1 ml Trizol reaktifi için 0.2 ml kloroform eklenmiştir.
- 4- Tüplerin kapakları iyice kapatılıp 15sn. elle kuvvetlice çalkalanıp 5dk. oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra 4°C 'de 10dk 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 5- Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarılıp isopropanolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlanmıştır.
- 6- Örnekler oda sıcaklığında 10dk bekletilip 15000 rpm'de 4°C 'de 10dk santrifüj edilmiştir.

7- RNA çökeltisi %75'lik etanol ile bir kez yıkanıp kullanılan her 1ml Trizol reaktifi için 1ml etanol eklenmiştir.

8- Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5dk. 1000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir.

9- İşlemler sonunda RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakılmış ve RNA 30µl steril su ile çözülüp ve 10dk 55-60°C'de bekletilip kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.5. cDNA sentezi

Miktarları eşitlenmiş olan RNA örnekleri Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti protokol üretici firmanın önerilerine uygun yapılmıştır. Protokol aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1- Steril tüpe miktarı 0,1ng-5µg olacak şekilde toplam RNA, 1 µl oligo (dT)₁₈ primer konulmuştur ve son hacim 12 µl'ye tamamlanmıştır.

2- Bu karışım hafif bir şekilde santrifüj edilmiştir ve 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Çıkarıldıktan sonra hemen buz üzerine alınmıştır.

3- Bu karışımın üzerine 4 µl 5X Reaksiyon Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT eklenmiştir ve son hacim 20 µl olmuştur.

4- Karışım hafif bir şekilde santrifüj edilmiş ve PCR'a konulmuştur. Termalcyler cihazında; 42°C'de 60 dk. inkübasyondan sonra 70°C'de 5 dk reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.2.6. qRT-PCR ile gen ifade analizi

qRT-PCR işlemini gerçekleştirmek için Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Kiti kullanılmıştır. Protokol üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır. Talimatlar aşağıda verilmiştir.

1- Kullanılacak tüm solüsyonlar hafif bir şekilde vortekslenmiştir.

2- Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

Maxima SYBR Green/ROX QPCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Forward Primer (0,3µM)	1,2 µl
Reverse Primer (0,3µM)	1,2 µl
Kalıp DNA (cDNA)	500ng
Steril su	Son hacim 25 µl'ye tamamlanır

3- Karışım PCR tüplerine aktarılmış ve hafifçe santrifüjlenmiştir.

4- Aşağıdaki PCR döngüsü uygulanmıştır.

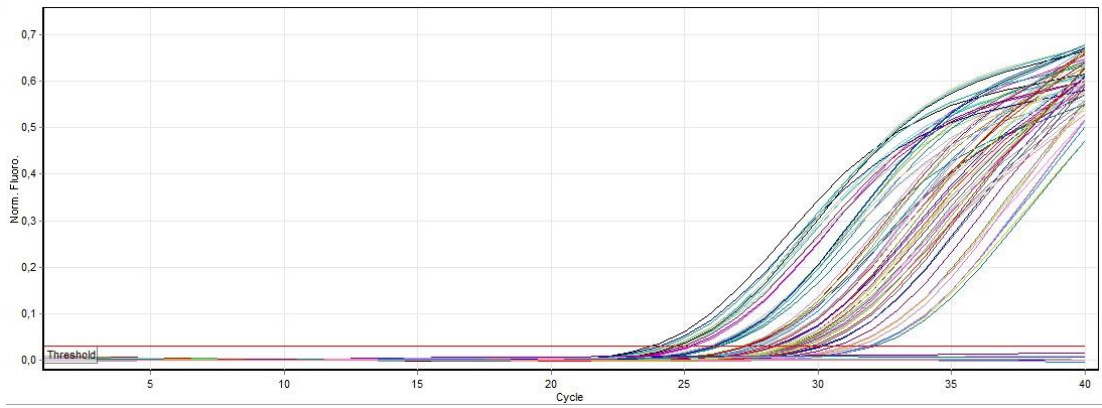
1)	10 dk	95°C	
2)	15 sn	95°C	
	30 sn	60°C	40 döngü
	30 sn	72°C	

3.2.7. Verilerin Analizi

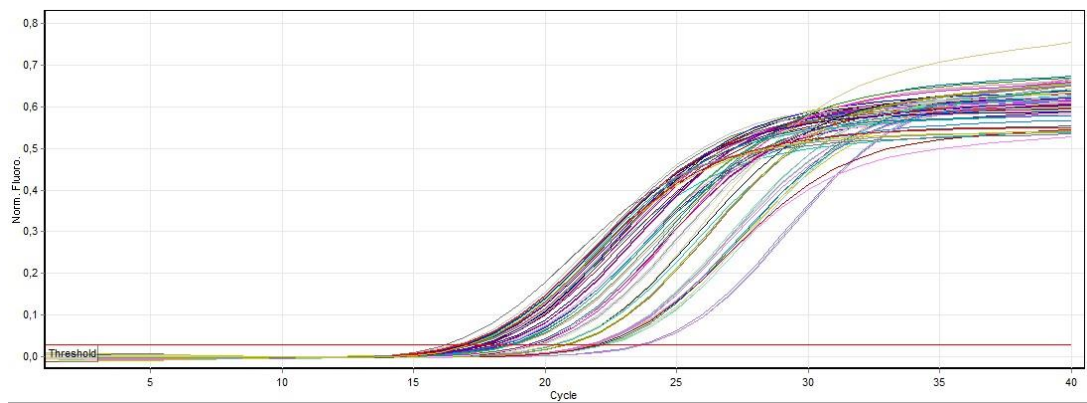
Gen ifade analizi sonucunda örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buğday çeşitlerine ait genlerin ifade oranları Livak and Schmittgen (2001) göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. qRT-PCR analizinde referans gen olarak buğday β -Aktin geni kullanılmış ve genlerin ifadesi referans gen ifadesine göre gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Pb, Cu ve Zn metallerinin ve bu metallerin kombinasyonlarının uygulandığı ortamda yetiştirilen buğdayda (*Triticum aestivum* L.) *MT2*, *PR-1* ve miR398'in hedef genlerinin toksisiteye karşı ifade değişimleri ve SA uygulamasında bu genlerin ifadesi üzerine olan etkileri aşağıda sunulmuştur. Herbir genin kök ve yaprakları için qRT-PCR amplifikasyonu sonucunda SYBR-Green sinyal grafiği Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



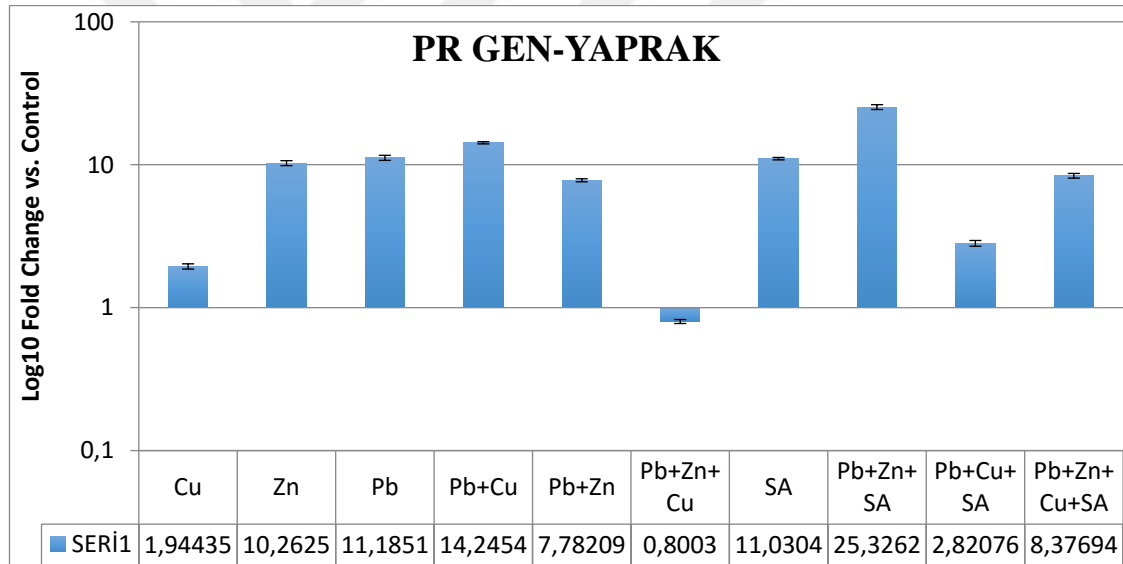
Şekil 4.1. Buğday köklerinde seçilen genlerin qRT-PCR çalışma eğrileri



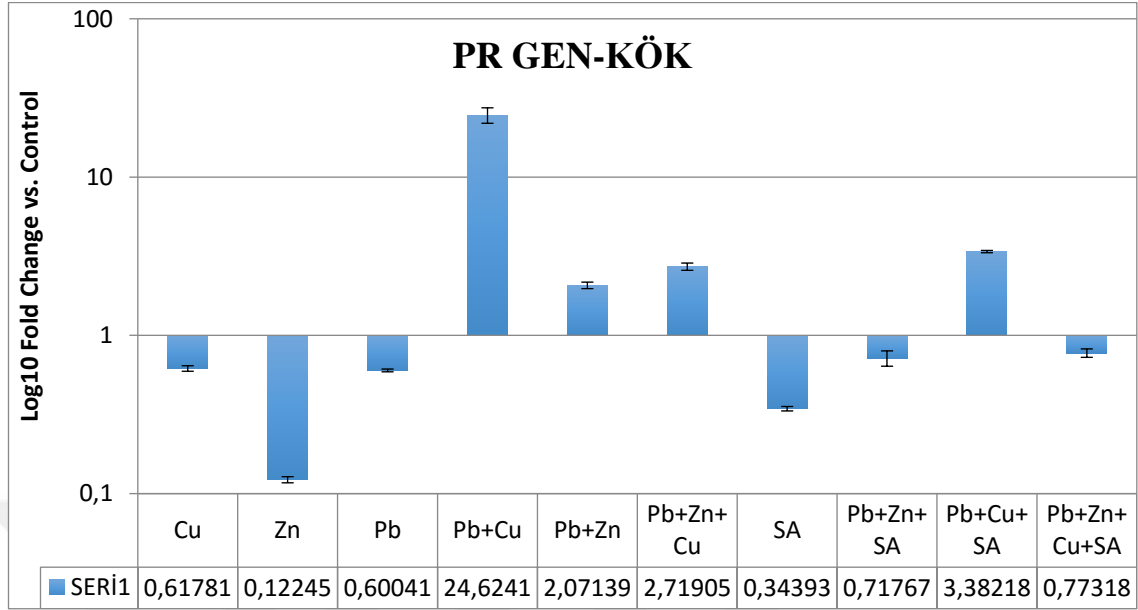
Şekil 4.2. Buğday yapraklarında seçilen genlerin qRT-PCR çalışma eğrileri

PR-1 geninin ifade analizi sonuçları şekil 4.3 ve şekil 4.4’de gösterilmiştir. Şekil 4.3 incelendiğinde yaprakta *PR-1* geninin Pb+Zn+Cu uygulaması hariç diğer uygulamalarda up regüle olduğu gözlenmiştir. En fazla ifade seviyesi Pb+Zn+SA uygulamasında belirlenirken, en düşük ifade seviyesi Pb+Zn+Cu uygulamasında tespit edilmiştir.

PR-1 geninin kökte Pb+Cu, Pb+Zn, Pb+Zn+Cu ve Pb+Cu+SA uygulamalarında up regüle olduğu, Cu, Zn, Pb, SA, Pb+Zn+SA ve Pb+Zn+Cu+SA uygulamalarında ise down regüle olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). En fazla ifade seviyesi Pb+Cu uygulamasında, en düşük ise Zn uygulamasında belirlenmiştir.



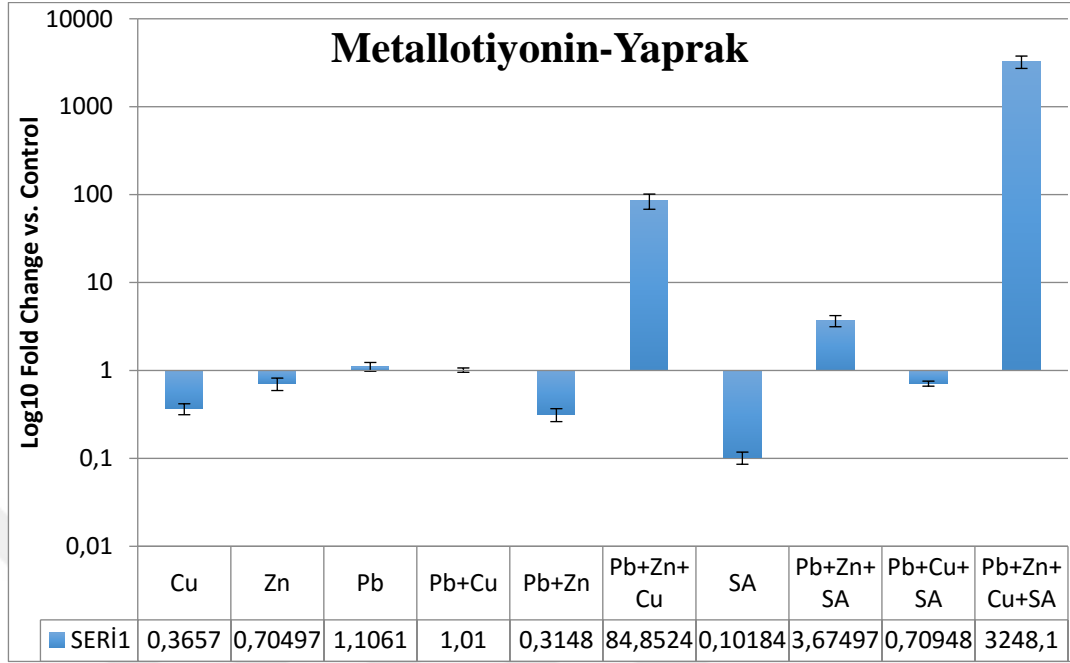
Şekil 4.3. Ağır metal ve SA uygulamasının *PR-1* geni ifadesindeki etkisi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)



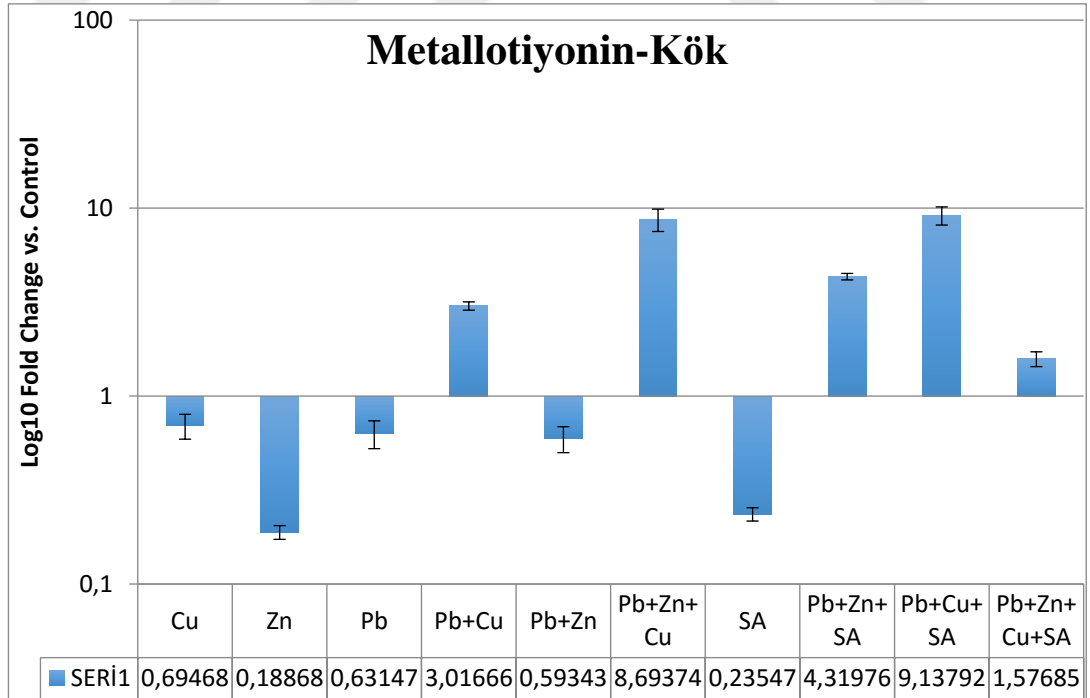
Şekil 4.4. Ağır metal ve SA uygulamasının *PR-I* geni ifadesindeki etkisi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Pb stresine karşı Cu, Zn ve SA uygulamalarının *MT2* geni ifadesinde yaptığı değişiklikler Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.5 incelendiğinde bitkinin yaprak kısmında elde edilen *MT2* gen ifade analizi sonuçlarına göre; Pb, Pb+Zn+Cu, Pb+Zn+SA ve Pb+Zn+Cu+SA uygulamalarında *MT* geninin up regüle olduğu diğer uygulamalarda ise genin ifadesinin down regüle olduğu gözlenmiştir. Yaprakta *MT* geninin en fazla Pb+Zn+Cu+SA uygulamasında up regüle olduğu; SA uygulamasında ise en fazla down regüle olduğu ise gözlenmiştir.

Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi kök kısmında elde edilen *MT2* gen ifade analizi sonuçlarına göre; Pb+Cu, Pb+Zn+Cu, Pb+Zn+SA, Pb+Cu+SA ve Pb+Zn+Cu+SA uygulamalarında *MT2* geninin up regüle olduğu gözlenirken, Pb, Zn, Cu, Pb+Zn ve SA uygulamalarında bu genin down regüle olduğu belirlenmiştir. *MT2* geninin Pb+Cu+SA uygulamasında en fazla up regüle olduğu; Zn uygulamasında ise en fazla down regüle olduğu gözlenmiştir. Kök ve yaprak birlikte ele alındığında *MT2* geninin ifade seviyesinin kökte daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



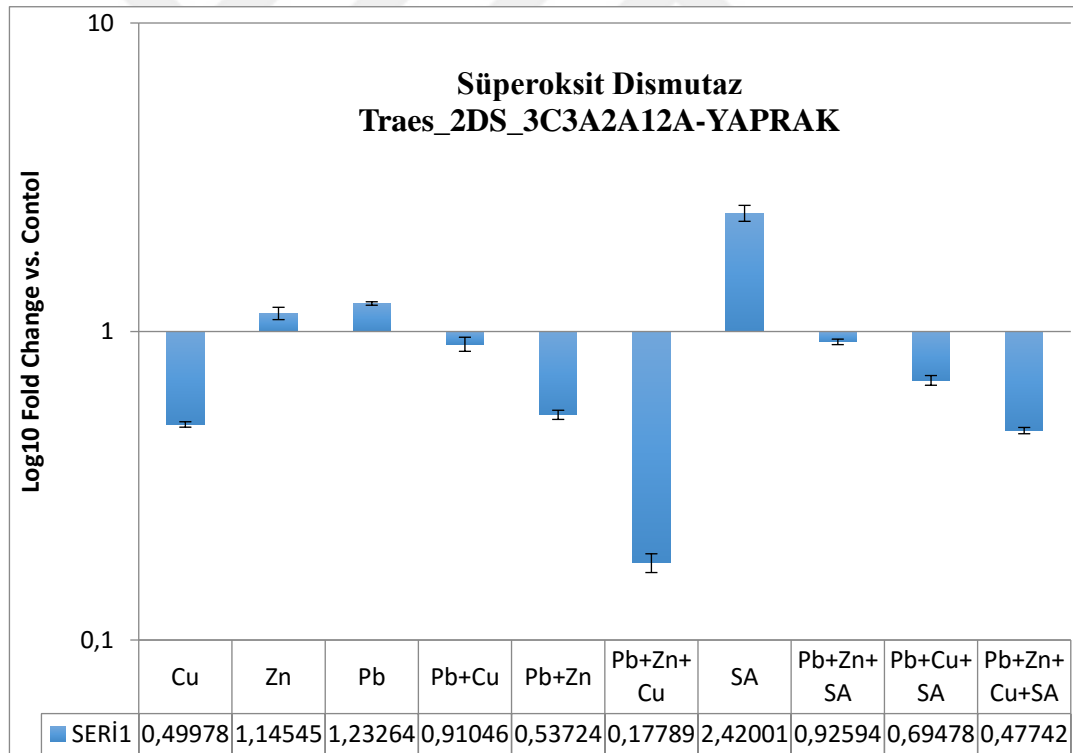
Şekil 4.5. Ağır metal ve SA uygulamasının bitki yaprağında *MT2* gen ifadesine etkisi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



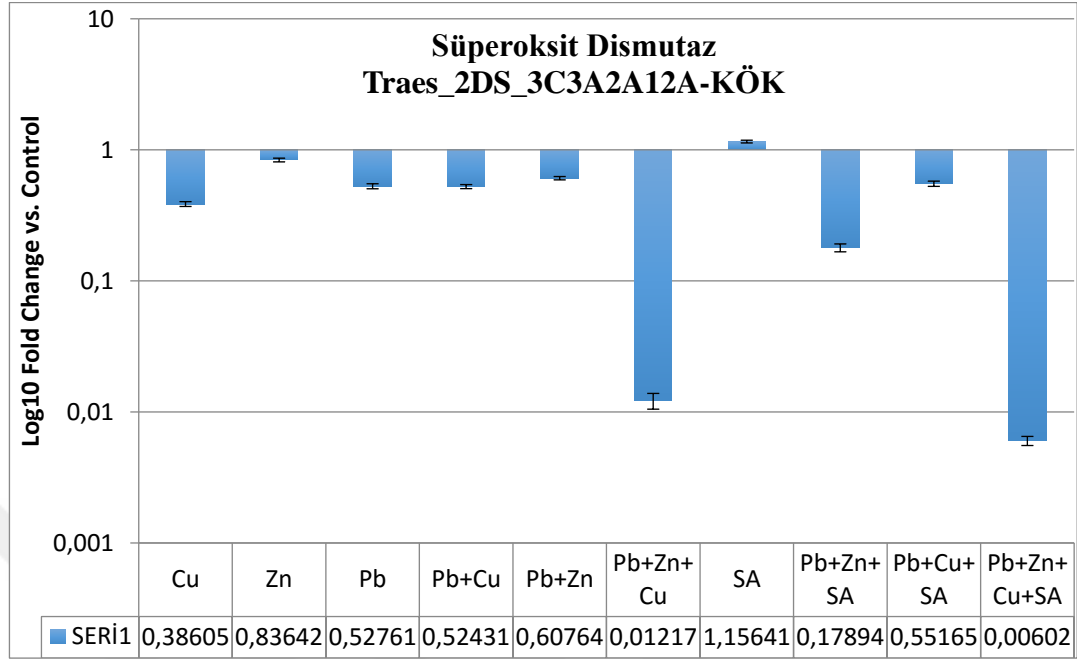
Şekil 4.6. Ağır metal ve SA uygulamasının bitki kökünde *MT2* gen ifadesine etkisi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Çalışmada incelenen bir diğer gen miR398'in hedef geni olan Cu / Zn superoksit dismutaz(CSD) genidir. Bitkinin kök ve yaprak kısmında elde edilen bu hedef genin ifade analizi sonuçları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'da verilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde; Zn, Pb ve SA uygulamalarında bu genin up regüle olduğu, diğer uygulamalarda ise down regüle olduğu tespit edilmiştir. SOD'un ifade seviyesinin SA uygulamasında en fazla olduğu; Pb+Zn+Cu uygulamasında ise en düşük olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.8 incelendiğinde ise kökte SA uygulaması hariç bu hedef genin tüm uygulamalarda down regüle olduğu gözlenmiştir. CSD'nin ifade seviyesinin en fazla SA uygulamasında; en düşük ifade oranının ise Pb+Zn+Cu+SA uygulamasında olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.7. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan CSD'nin ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

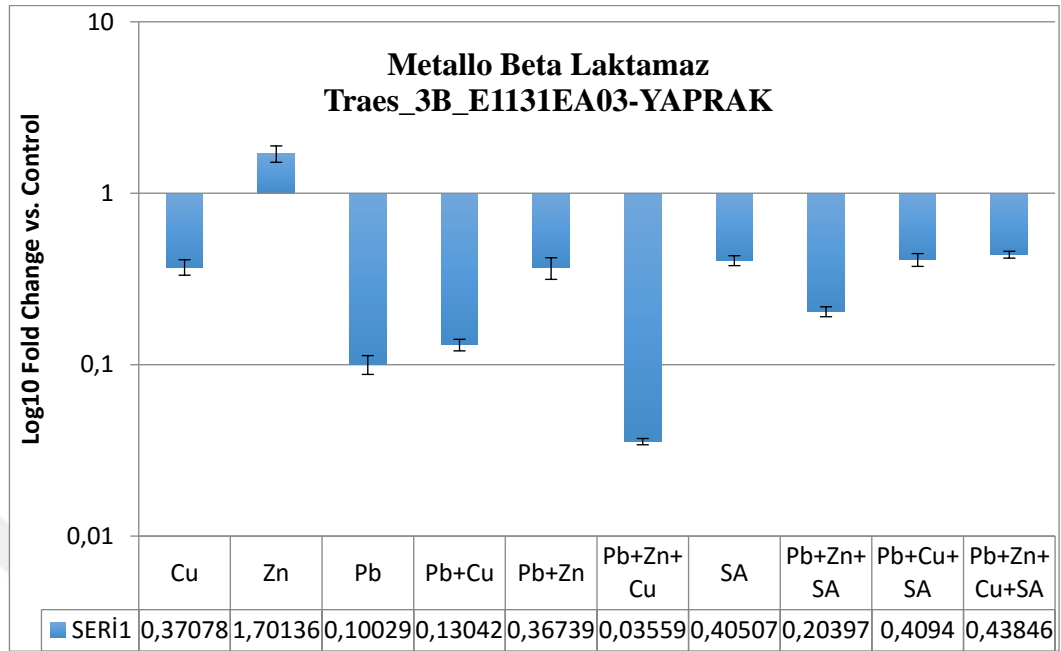


Şekil 4.8. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan *CSD*'nin ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

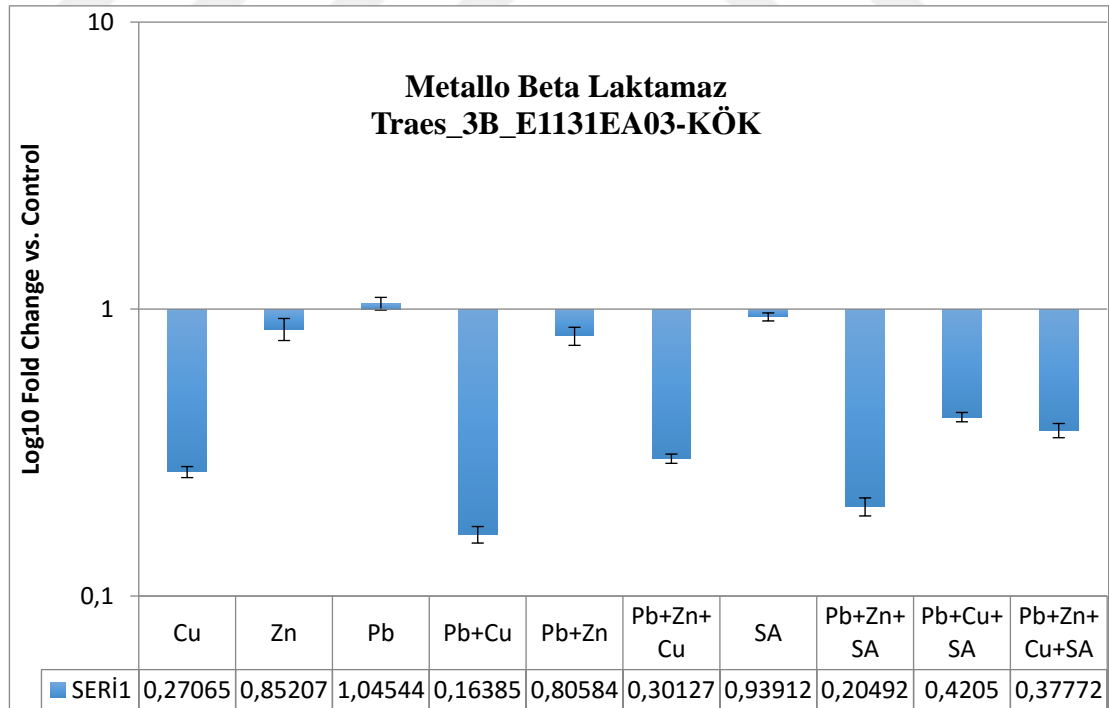
Çalışmada *CSD* dışında miR398'in diğer hedef genleri olan metallo-beta laktamaz, protein kinaz, F-box domaini ve Bax inhibitör1'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Metallo beta laktamaz enzimini kodlayan bir diğer hedef geninin bitkinin kök ve yaprak kısmında elde edilen ifade analizi sonuçları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Şekil 4.9 incelendiğinde, yapakta Zn uygulaması hariç bu genin diğer tüm uygulamalarda down regüle olduğu gözlenmiştir. Metallo beta laktamaz geninin ifade seviyesi en fazla Zn uygulamasında, en düşük ise Pb+Zn+Cu uygulamasında tespit edilmiştir.

Şekil 4.10 incelendiğinde ise kökte Pb uygulaması hariç diğer tüm uygulamalarda bu hedef genin down regüle olduğu tespit edilmiştir. Metallo beta laktamaz enzimini kodlayan hedef genin ifade seviyesi en fazla Pb uygulamasında, en düşük ifade oranı ise Pb+Cu uygulamasında gözlenmiştir.



Şekil 4.9. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan metallo-beta-laktamazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

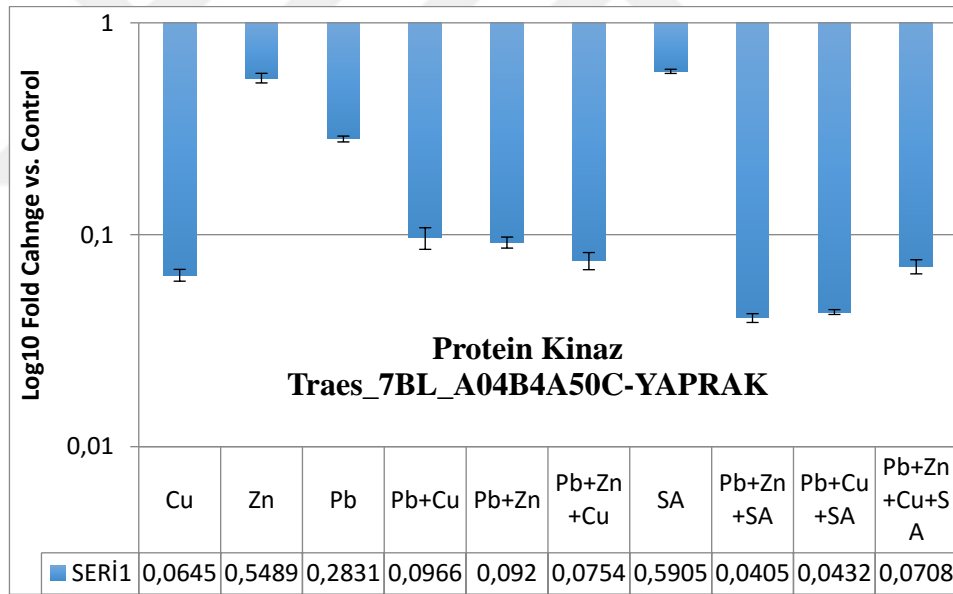


Şekil 4.10. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan metallo-beta-laktamazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

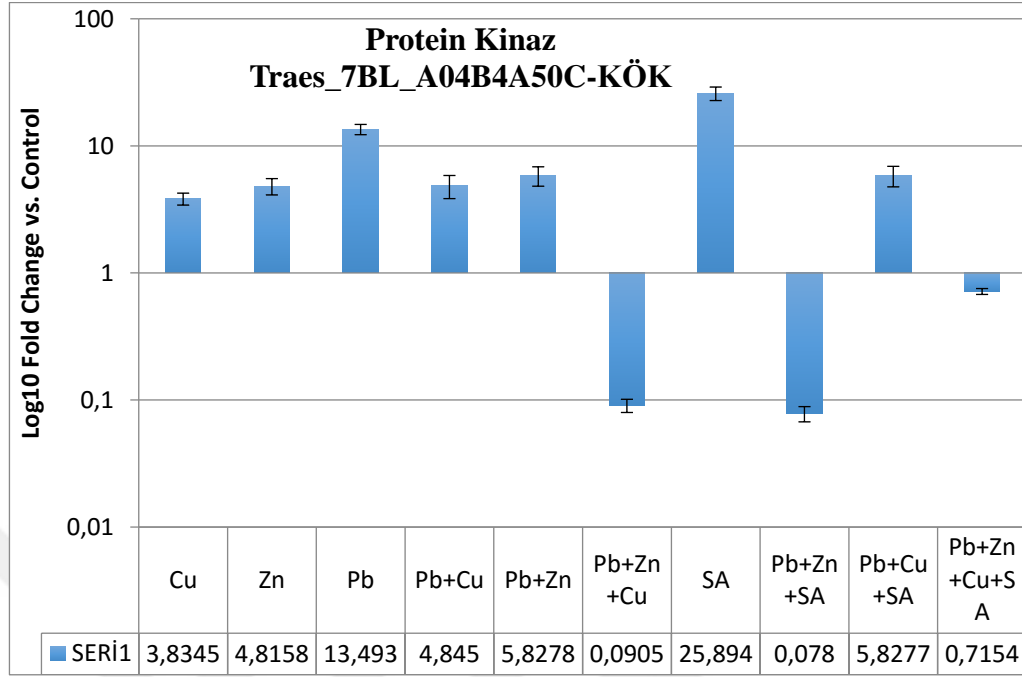
miR398'in bir başka hedef geni protein kinazlardır. Bitkinin kök ve yaprak kısmında elde edilen bu hedef genin ifade analizi sonuçları Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Şekil 4.11 incelendiğinde, yaprakta bu hedef genin tüm uygulamalarda down regüle olduğu, en düşük ifade seviyesinin Pb+Zn+SA uygulamasında olduğu saptanmıştır.

Bu hedef genin kökteki ifade seviyeleri incelendiğinde, Pb+Zn+Cu, Pb+Zn+SA ve Pb+Zn+Cu+SA uygulamaları hariç diğer tüm uygulamalarda up regüle olduğu gözlenmiştir (Şekil4.12). Bu hedef genin ifadesi en fazla SA uygulamasında, en düşük ise Pb+Zn+SA uygulamasında belirlenmiştir.



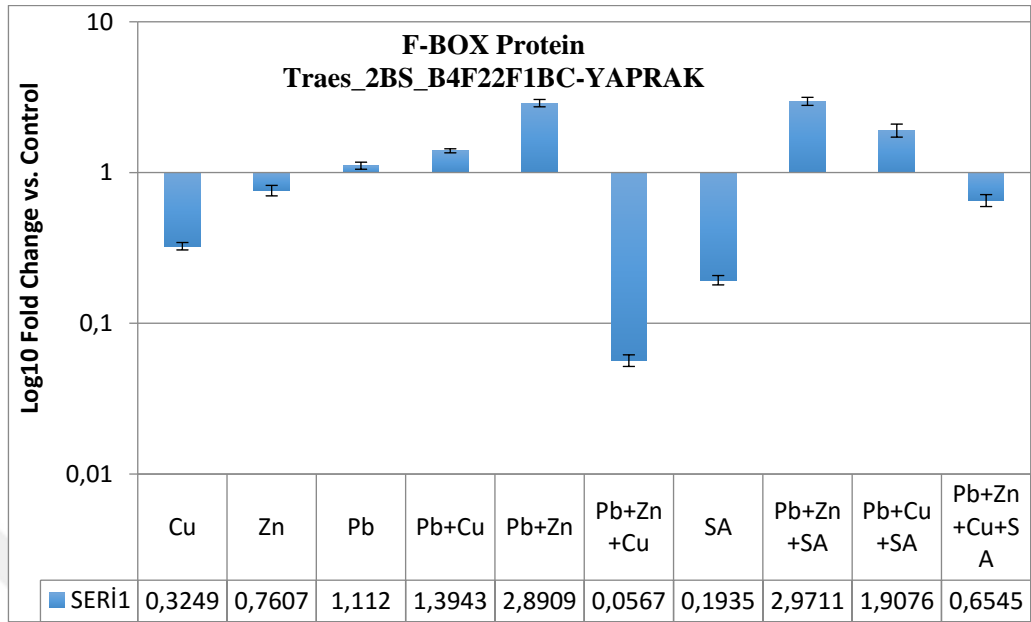
Şekil 4.11. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan proteinkinazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



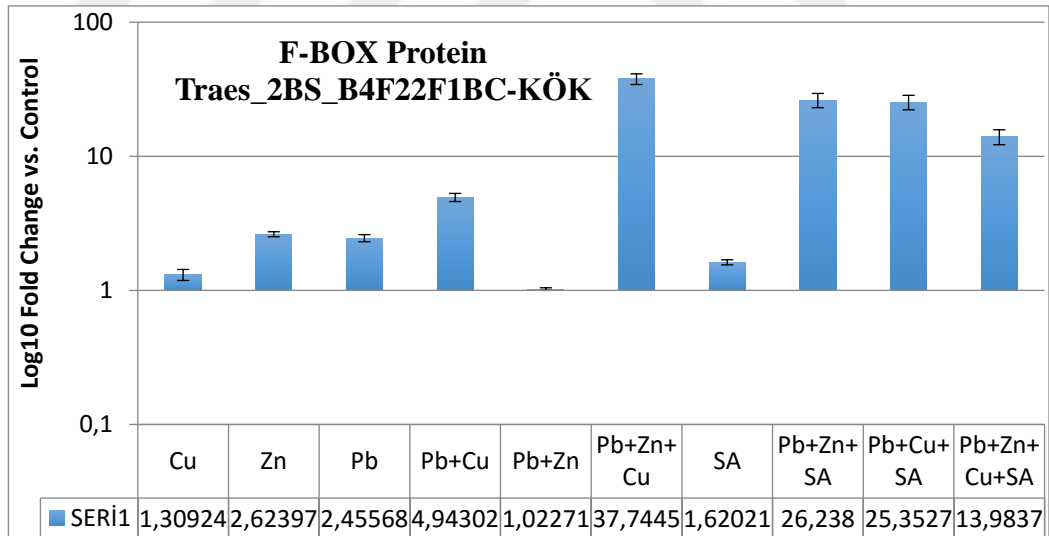
Şekil 4.12. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan proteinkinazın ifadesi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR398'in bir diğer hedef geni de F-box proteinleridir. Bitkinin kök ve yaprak kısmında elde edilen bu hedef genin ifade analizi sonuçları Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Şekil 4.13 incelendiğinde yaprakta bu hedef genin Pb, Pb+Cu, Pb+Zn, Pb+Zn+SA ve Pb+Cu+SA uygulamalarında up regüle olduğu, Cu, Zn, Pb+Zn+Cu, SA ve Pb+Zn+Cu+SA uygulamalarında ise down regüle olduğu gözlenmiştir. Bu hedef genin ifadesinin en fazla Pb+Zn uygulamasında, en düşük ise Pb+Zn+Cu uygulamasında gözlenmiştir.

Bu hedef genin kökte tüm uygulamalarda up regüle olduğu ve en yüksek ifade seviyesinin Pb+Zn+Cu uygulamasında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



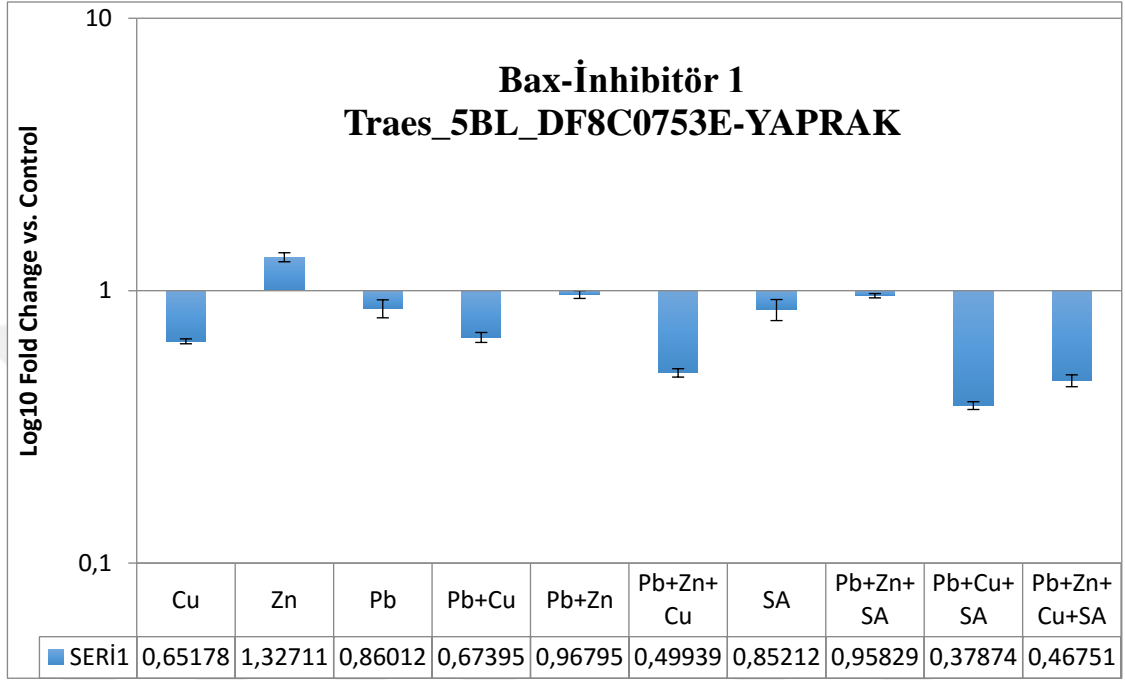
Şekil 4.13. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan F-box proteinin ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



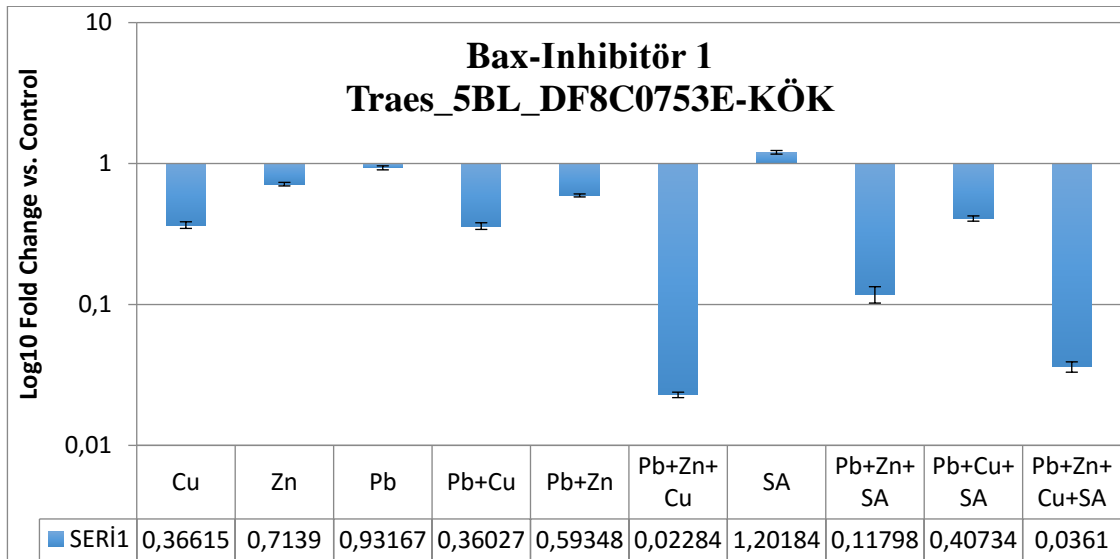
Şekil 4.14. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan F-box proteinin ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Son olarak miR398'in bir diğer hedef geni Bax-inhibitör-1'dir. Şekil 4.15 incelendiğinde yaprakta Zn uygulaması hariç bu hedef genin diğer uygulamalarda down regüle olduğu tespit edilmiştir. *Bax-inhibitör-1* geninin ifadesi en fazla Zn uygulamasında, en düşük ise Pb+Cu+SA uygulamasında gözlenmiştir.

Bax-inhibitör-1 geninin kökte tüm uygulamalarda down regüle olduğu, en düşük ifade seviyesi ise Pb+Zn+Cu uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan *Bax-inhibitör-1*'in ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



Şekil 4.16. Ağır metal ve SA uygulamasında miR398 hedef geni olan *Bax-inhibitör-1*'in ifadesi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ağır metaller, toksisite ve daha uzun yarılanma ömrü nedeniyle organizmalar için ana abiyotik stres faktörüdür. Bitkiler ağır metallerin hücre içine alınması, ağır metallerin mobilizasyonu ve hücrede konsantrasyonunun düzenlenmesi gibi moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarla toksisiteye karşı savunma yapmaktadırlar. *PR* genleri bitkilerde direnç genleri olup ağır metal stresi durumunda ifadeleri değişmektedir. Bitki patogenezi ile ilgili (*PR*) proteinler, mikrobiyal patojenler (mantarlar, bakteriler, virüsler ve nematodlar) veya böcekler tarafından saldırı gerçekleştikten sonra konakçı içerisinde indüklenen ve biriken çeşitli proteinlerden oluşur. *PR-1* proteinleri, ilk keşfedilen *PR* ailesini temsil eder ve iyi çalışılan bitki türlerinde gösterildiği üzere patojen saldırısı üzerine en bol şekilde üretilir. *PR-1* proteinleri çeşitli bitki türleri arasında korunur ve homologları mantar, böcek, hayvan ve insanlar da dahil olmak üzere diğer organizmalarda bulunur (Lu *et al.* 2011).

Araştırmada yaprakta ağır metale karşı *PR1* genlerinin ifadesinin arttığı ve SA'nın bunu daha fazla indüklediği görülmüştür. *Arachis hypogaea* bitkisinde *PR* gen ifadesi üzerine yapılan çalışmada *AhSIPR10* geninin tuz, ağır metal, soğuk stresi, kuraklık stres ortamları boyunca yerfıstığı kallus kültürlerinde *AhSIPR10* transkripsiyonunun hızla up regüle olduğu saptanmıştır. Ayrıca *AhSIPR10* ifadesi SA, metil jasmonat, ABA ve H₂O₂ tedavileri gibi savunma / stres sinyali moleküllerine de cevap vermiştir (Jain *et al.* 2011). Diğer taraftan buğday kökünde tek başına uygulanan metallerde, SA uygulamalarında ve üçlü metal ile SA uygulamasında genin down regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu durum bu gen ifadesinin bitkinin farklı dokularında farklı etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Fasulyede Cu stresi altında *PR* genlerinin ifade seviyelerinin organlara göre farklılık gösterdiği ve *PR* genlerinin ifadesinin kontrol köklerinde yüksekken birincil yapraklarda mevcut olmadığı tespit edilmiştir (Cuypers *et al.* 2005).

Ağır metallerin detoksifikasyonu için bitki stratejilerinden bir diğeri, metal iyonlarını en aza indirmek için şelatörleri sentezlemektir. *MT*'ler, bu tolerans mekanizmasında çok önemli roller oynamaktadırlar. *MT*'ler düşük molekül ağırlıklı ve sistein

aminoasitince zengin polimerlerdir. Fazla sistein içeriğinden dolayı ağır metallere afiniteleri yüksektir. Ağır metalleri bağlayarak bitkiyi korumada etkilidirler (Kisa *et al.* 2016). Şekerkamışı bitkisinde ağır metal stresine karşı *MT* geninin koruyucu rolü olduğu tespit edilmiştir (Guo *et al.* 2013).

Araştırma sonucunda buğday yaprağında *MT2* geninin ifadesinin Pb uygulamasında up regüle olduğu, kökte ise yaprağın tersine bu genin down regüle olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde domateste yapılan bir çalışmada *MT2* geninin Pb stresi altında yapraklarda up regüle olduğu; kökte ise önemli bir ifade değişikliğinin olmadığı belirlenmiştir (Kisa *et al.* 2016). Diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla birlikte, *MT* geninin, kurşun stresine ilişkili olduğunu söylemek mümkündür. Nitekim genel olarak tip 1 *MT* genlerinin köklerde, tip 2 *MT* genlerinin yapraklarda, tip 3 *MT* genlerinin olgunlaşan meyvelerde ve tip 4 *MT* genlerinin tohumlarda ifade edildiği bildirilmiştir (Du *et al.* 2012).

Bu çalışmada, buğdaya ayrı ayrı Cu ve Zn uygulandığında, kökte ve yaprakta *MT* geninin down regüle olduğu saptanmış, Pb+Cu+Zn uygulamasının ise *MT2* geninin ifadesini hem kökte, hem yaprakta istatistiksel olarak önemli seviyede arttırdığı tespit edilmiştir. Buğdayda yapılan başka bir çalışmada Pb, Cd ve As metallerinin üçlü kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği, yani bu ağır metallerin tek başlarına yaptıkları etkilere nispeten bitkide çok daha fazla toksik etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Luan *et al.* 2008). Bu çalışmada, üçlü kombinasyonun ilk bakışta, söz konusu edilen bu sinerjistik etkinin oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir. Ancak Luan ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada uyguladıkları kombinasyonların hepsi de ağır metal olup, hepsi de bitki için düşük dozlarda bile toksik etkiye sahiptir. Oysa bizim uyguladığımız elementlerden sadece biri ağır metal (Pb), diğer ikisi (Cu ve Zn) esansiyel element niteliğindedir ve bunlar da toksik olmayan dozlarda bitkiye uygulanmıştır. Suda çözünür formlarda olan Cu ve Zn'nin tek başlarında uygulandığında toksik etki göstermezken, Pb ile şiddetli bir toksisite göstermiş olmalarından dolayı, bunun, sinerjistik etkiden daha ziyade, her üç elementin aynı

ortamda bulunmaları nedeniyle ortaya çıkan osmotik stresten kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmada buğday kök ve yaprağında, Pb+Zn uygulaması bu genin down regüle olmasına neden olmuştur. Bunun nedeni Pb ve Zn'nin antagonistik etkisinden olabilir. Pb ve Zn metallerinin antagonistik etkileriyle ilgili literatürde çalışmalar bulunmaktadır. *Dianthus carthusianorum L.*, *Thymus serpyllum L. emend. Fr.*, *Senecio sylvaticus L.*, *Succisa pratensis Moench.* ve *Hypericum hirsutum L.* bitki türlerinde Pb ve Zn'nin antagonistik etkisi incelenmiş ve bitkilerin tüm organlarında Zn'nin, Pb alımını ve birikimini azalttığı bildirilmiştir (Musielinska *et al.* 2016).

Pb+Cu elementlerini buğday bitkilerine kombinasyon halinde uyguladığımızda, MT geninin ifadesinin yaprakta değişim göstermediği, fakat kökte ise bu genin önemli seviyede up regüle olduğu saptanmıştır. Köke giren Pb'nin apoplastik yolla endodermise kadar diffüze olabildiği, %95'inin köklerde birikim göstermesi kaydıyla, sadece %5'lik bir kısmının bitkinin gövdesi ve yapraklarına kadar taşınabildiği rapor edilmiştir (Pourrut *et al.* 2011) Bu bilgiye göre, bizim uyguladığımız Pb'nin buğdayın köklerinde birikmesinden dolayı, Pb'nin kökteki hücrelerde, daha fazla ROT oluşturduğunu, oluşan bu ROT'ların da sinyal ajanı olarak MT2 geninin ekspresyon seviyesini artırdığını söylemek mümkündür. Bununla birlikte, Zn'nin kurşunla birlikte iken kökte MT2 geni ekspresyonu üzerine down-regülasyon yapar iken, Cu ile up-regülasyon yapmış olması, Cu elementinin Pb toksisitesini önlemede, Zn'nin gösterdiği antagonistik etkiyi, en azından buğday köklerinde gösteremediği, sadece yaprağı için bunu söylemenin mümkün olabileceğini düşündürmüştür. Yaptığımız uygulamalar sonrası gözlemlerimizde, Pb+Cu uygulamasının, Pb+Zn kadar olmasa da, Pb'nin tek başına yaptığı ölümcül hasarları bir dereceye kadar hafifletmiş olduğu farkedilmiştir.

Tek başına SA uygulamasında hem kök hem yaprakta MT2 geninin down regüle olduğu belirlenmiştir. Herhangi bir ağır metal stresi yokken SA'nın MT2'nin ifadesini etkilemediğini düşündürmektedir. Nitekim *Brassica rapa*'da SA uygulamasının MT genlerinin (*BrMT1*, *BrMT2*, *BrMT3*) ifadesine etkisi araştırılmış, *BrMT1* geninin SA

tarafından up regüle edildiği *BrMT2* ve *BrMT3* geninin ise down regüle olduğu ifade edilmiştir (Ahn *et al.* 2012). Bu araştırmada elde edilen sonuçlar sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Araştırmada metal kombinasyonlarıyla birlikte SA uygulaması dikkate alındığında *MT2* geninin en fazla ifade seviyesi yaprakta Pb+Cu+Zn+SA uygulamasında görülmüştür. Kökte ise genin ifadesi yapraktaki kadar artmamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada SA'nın ağır metal stresinde *MT* gen ifadesini değiştirdiği rapor edilmiştir (Ahn *et al.* 2012).

MT2 geni bitki ağır metal stresinde görev alan, bitkinin yapısında bulunan eşsiz bir gendir. Araştırma sonucunda Pb toksisitesine karşı *MT* geninin etkili olduğu ve buna ek olarak ağır metale karşı iyileştirici sinyal molekülü olan SA'nın bu genin ifadesini daha da arttırdığı gözlenmiştir. Ağır metal toksisitesine karşı var olan mekanizmayı daha fazla harekete geçirmek ağır metale hassas bitkilerin tolerans kazanması açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

miRNA'lar, bitkilerde endojen, küçük, tek sarmallı RNA'lardır. miRNA'lar bitki büyümesi ve gelişimi için ana düzenleyiciler olarak kabul edilmektedir. Bitki miRNA'ları abiyotik ve biyotik stres tepkilerinde, bitki hormonal regülasyonu ve gelişim süreçlerinde önemli roller oynarlar. Bu miRNA'lar ya hedef mRNA'yı bölerek ya da traslasyonu baskılayarak geni sustururlar (Noman and Aqeel 2017).

Ağır metal stresi altında sentezlenen birçok miRNA keşfedilmiştir. Bunlardan birisi de miR398'dir. miR398 oksidatif stres ile düzenlenen ilk miRNA'dır. Hedefleri, Cu / Zn süperoksit dismutazlardır. *CSD*'ler ROT'u yok eden enzimlerdir (Mendoza-Soto *et al.* 2012).

SOD, süperoksit radikallerini hızlı bir şekilde H₂O₂ ve moleküler oksijene çevirerek ilk savunma hattını oluşturur. Kullanmış olduğu farklı metal kofaktörlerine göre, demir SOD (FeSOD), manganez SOD (MnSOD) ve bakır-çinko SOD (Cu / Zn SOD) olmak

üzere üç grupta sınıflandırılırlar. Bu enzimin aktivitesi sayesinde ise bitkiler ağır metale karşı kendilerini savunurlar (Sunkar *et al.* 2006).

miR398'in hedef geni ile ilişkisi aslında SOD aktivitesinden dolayı Cu ile ilişkilendirilmiştir. Cu fazla olduğu zaman miR398 down regüle olur ve hedef geni olan *CSD* mRNA birikimine yol açarak SOD aktivitesini artırır ve sonuç olarak ROT'ları yok eder. Cu eksikliğinde ise miR398 up regüle olur hedef geni *CSD1* down regüle olurken *FSD1* (demir süperoksit dismutaz) up regüle olup yine ROT'ları yok eder (Gupta *et al.* 2014).

Ayrıca miR398 hedef geni olan *CSD* metallerin homeostazisini düzenlemektedir. Son çalışmalarda, *Brassica juncea L.*, *Brassica napus L.*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa L.* ve *Phaseolus vulgaris L.* gibi bitkilerde ağır metallere (örneğin Al, As, Cd, Hg ve Mn) yanıt olarak birçok miRNA belirlenmiştir.

Araştırmada, hedef gen *CSD*'nin yaprakta Pb toksisitesine karşı up regüle olduğu, kökte down regüle olduğu tespit edilmiştir. Pamukta Pb stresinin miR398 üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir araştırmada kök ve yapraktaki ifadeleri kıyaslandığında, yaprakta miR398'in down regüle olduğu, kökte ise up regüle olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre miRNA'ların ifadesinin hem bitki türüne, hem dokuya, hem de metale göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (He *et al.* 2014). Ağır metal stresinde miR398 down regüle olmakta ve hedef geni olan *CSD* aktivitesini artırarak ROT'ları yok etmektedir (Gupta *et al.* 2014). Bu sonuçlara göre buğday yaprağında Pb toksisitesine karşı miR398 aracılı posttranskripsiyonel düzenleme mekanizması ile *CSD*'nin savunmada yer aldığı sonucuna varılmıştır. miR398 mekanizması ağır metallere karşı down veya up regüle olsada hedef geni *CSD*'yi etkileyerek ağır metal stresinde oluşan süper oksit radikallerini yok ederek antioksidan metabolizmasını düzenleyip strese cevap verdiği ve hedef genini etkilerken aslında metale özgü özel sinyal iletim yollarıyla tepki verdiği ifade edilmiştir (Yang and Chen 2013). Ayrıca araştırmamızda yaprakta ve kökte hedef genler ikili ve üçlü metal uygulamalarında down regüle olmuş ve en fazla down regülenin hem kökte hem yaprakta de üçlü metal uygulamasında

gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bunun nedeni muhtemelen bitki ile ağır metal türünden ve de ağır metallerin etkileşimlerinden kaynaklanmış olabilir. Yapılan araştırmalarda miRNA yanıtının metallere olan değişimi bitki ve metal türlerine bağlı olduğu görülmüştür. Bazı miRNA'lar çeşitli metal streslerine karşı up regüle olurken bazıları da down regüle olarak hedef genlerini etkilemektedir. miR398'in Cd, As ve Mn karşı up regüle olurken, Al ve Hg karşı down regüle olduğu tespit edilmiştir (Yang and Chen 2013).

Çalışmada SA'nın etkileri incelendiğinde ise hem kök hem yaprakta SA'nın metallerle beraber uygulanmasında *CSD* hedef genin down regüle olduğu saptanmıştır. Fakat tek başına uygulandığında hedef geni up regüle ettiği belirlenmiştir. Nitekim fasulyede yapılan dizi analizi sonuçlarında *CSD1* geninin promotörünün ASF-1 bölgesi içerdiği ve bu bölgenin SA ile aktifleşerek *CSD1* geninin ifadesini arttırdığı belirlenmiştir (Naya *et al.* 2014).

Araştırmamızda metallo beta laktamaz enzimini kodlayan miR398'in hedef geninin kökte sadece Pb toksisitesinde up regüle olduğu gözlenmiştir. Literatürde miR398'in bu hedef geninin ağır metalle etkileşimiyle ilgili çalışma yer almamaktadır. Diğer taraftan Pb bitkiye köklerin absorpsiyonu ile girmektedir. Kökler vasıtasıyla emilen Pb daha sonra direk rhizoderm hücre yüzeyindeki polisakkaritlere bağlanmaktadır. Metallo beta laktamaz enzimi ise hücre duvarındaki bu kısmı yıkmaktadır. Pb toksisitesinde, hücre duvarına bağlanabilen Pb toksisitesine karşı bitkide bu hedef genin miR398'in düzenlemesiyle up regüle olduğu ve hücre yüzeyindeki bu tutulumu karşı bu enzimin direnç sağladığını düşündürmektedir. Diğer koşullarda hedef gen down regüle olmuş ve miR398 bu hedef geni susturmuştur. Metal kombinasyonlarının Pb toksisitesini antagonistik etkiyle azaltabileceğinden bu hedef genin down regüle olması beklendik bir sonuçtur. Aynı şekilde SA uygulanmasının da bu genin ifadesinde bir etki yapmadığı saptanmıştır.

miR398'in bir başka hedef geni protein kinazlardır. Protein kinazların, özellikle MAPK (mitojen aktive protein kinaz)'ların ağır metallerle çeşitli bitki sistemlerinde aktive

olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada yaprakta Pb toksisitesine karşı hedef gen down regüle olurken kökte up regüle olmuştur. Ağır metal stresine karşı proteinkinaz enziminin aktivitesi artmış ve toleransta etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan bir çalışmada yoncada *MMK2*, *MMK3*, *SAMK*; mısırdaki *ZmMPK3* ve çeltikte *OsMSRMK2*, *OsMPK3*, *OsMPK4*, *OsMKK4* protein kinazlarının ağır metal ile aktive olduğu bildirilmiştir (Sinha *et al.* 2011). Ayrıca bu genin yaprak ve kökteki ifade farklılığının sebebi miRNA'ların ifadesinin hem bitki türüne, hem dokuya, hem de metale göre değişiklik göstermesinden kaynaklanmış olabileceği ifade edilmiştir (He *et al.* 2014). Yine kökte metal kombinasyonlarının etkisine bağlı olarak hedef genin up regüle olması ağır metal toleransında proteinkinazların etkili olduğunu göstermiştir.

SA uygulamasının ise kökte bu hedef genini up regüle ettiği saptanmıştır. SA önemli bir sinyal molekülü olarak hem biyotik hem abiyotik streslerde etkilidir. Stres altında bir MAPK olan SIPK aktivitesinin SA tarafından indüklendiği belirlenmiştir (Zhang and Liu 2001). Bu sonuçlara göre SA'nın hedef gen ifadesini up regüle ettiği tespit edilmiştir.

F-box proteinleri geniş bir protein ailesidir. Bitki F-box proteinleri, hormon algılaması ve sinyal verme, gelişme, çoğalma, savunma ve sirkadiyen saat gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde kilit rollere sahiptir.

Çalışmamızda kökte ve yaprakta bu hedef genin up regüle olduğu saptanmıştır. Kök ve yaprak kıyaslandığında bu genin en çok kökte eksprese olduğu gözlenmiştir. F-Box proteini olan *FBS1* ile ilgili yapılan bir çalışmada, soğuk ve tuz stresi altında bu genin en çok köklerde ifade olduğu ve olumsuz ortamlarda abiyotik ve biyotik stres genlerinin doğru şekilde ekspresyonu için *FBS1*'in gerekli olduğu ve bu nedenle F-Box'ın bir stres yanıt regülatörünü kodladığı bildirilmiştir. Ayrıca *FBS1*'in, JA ve ABA bitki stres hormonlarına cevap veren yüzlerce geni düzenleyerek bitki stres tepkilerini etkilediği ifade edilmiştir (Gonzales *et al.* 2017)

Yine başka bir çalışmada, F-box proteinlerinin C-terminal bölgelerinde (örn. LRR, Kelch, FBA ve PP2) birkaç fonksiyonel alana sahip olduğunu gösterilmiş ve bu bölgeler sayesinde abiyotik strese cevap verdiği bildirilmiştir. Gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre Hg stresinde birçok genin, köklerde ve yapraklarda up regüle veya down regüle olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca fidelerin SA ile işleme tabi tutulmasının, bazı genlerin up regülasyonu ile sonuçlandığında belirtilmiştir. Bu sonuçlar, F-Box genlerinden bazılarının, biyotik veya çevresel streslere karşı bitki yanıtını düzenleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca abiyotik streslerin sebep olduğu gen ekspresyonundaki fark, gen promotörlerinde duyarlı elementleri spesifik olarak uyararak çevresel sinyallere bağlanabilmektedir (Song *et al.* 2015).

Bax İnhibitörü-1 geni, H₂O₂ ve ER stres kaynaklı bitki hücre ölümünü bastırmakla görevlidir. Çalışmada miR398'in bu geni SA'nın tek başına uygulanması hariç yaprak ve kökte down regüle ettiği saptanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada *Bax İnhibitörü-1* geninin bu streslere tepkide olumsuz bir rol oynadığı söylenebilir. Araştırmadaki bulgularımızın aksine, *Arabidopsis* ve tütün gibi model dikot bitki türlerinde, *BI-1*'in aşırı ekspresyonunun, ısı ve sıcaklık gibi abiyotik streslere artan toleransı sağladığı tespit edilmiştir (Ramiro *et al.* 2016). Fakat başka bir çalışma da ağır metal stresine karşı *BAX1*'in up regüle olsa bile uzun süre ağır metale maruz kalması sonucunda genin transkript seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Isbat *et al.* 2009) Bu durum, ağır metal stresinin birçok gen tarafından düzenlendiği ve çalışmamızda olmayan genlerin bu durumu etkilediğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda *Bax İnhibitörü-1* geni ve miRNA'lar transkripsiyonel olarak hedef gen ekspresyonunu negatif olarak düzenlediği belirlenmiştir. Ayrıca SA tek başına uygulandığında hedef gen up regüle olmuştur. Bu sonuç da daha önce tütün bitkisinde *Bax İnhibitörü-1* geninin SA tarafından indüklenmesi ile yapılan çalışma ile uyumludur (Kawai-Yamada *et al.* 2004).

5.1. Sonuç ve Öneriler

Araştırmamızda elde edilen bulgular göz önüne alındığında buğdayda ağır metal stresine karşı *MT2* ve *PR* genlerinin etkili olduğu ve miR398 hedef genlerinin toleransta önemli rol oynadıkları sonucuna varılmıştır. Bitkilerin birçok savunma mekanizmaları mevcuttur. Fakat bu mekanizmada yer alan *MT* ve *PR* genlerinin SA ile daha fazla tetiklenmesi ağır metale hassas bitkinin aslında dışarıdan uygulamalarla daha güçlü olabileceğini göstermektedir. miRNA hedeflerini belirlemek, bitki büyümesi ve gelişiminin miRNA aracılı mekanizmalarını anlamak, çevresel streslere karşı bitki direncini ve ürün verimi artırmak için yeni miRNA ile ilgili stratejiler tasarlamak oldukça önemlidir. Ayrıca gen ifadelerinin yanında proteom analizleride sonuçların daha net anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahn, Y.O., Kim, S.H., Lee, J., Kim, H., Lee, H.S. and Kwak, S.S., 2012. Three Brassica rapa metallothionein genes are differentially regulated under various stress conditions. *Molecular Biology Reports*, 39 (3), 2059-2067.
- Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y. and Yokota, A., 2004. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical and biophysical research communications*, 323 (1), 72-78.
- Alyemeni, M.N., Hayat, Q., Wijaya, L. and Hayat, S., 2014. Effect of Salicylic Acid on the Growth, Photosynthetic Efficiency and Enzyme Activities of Leguminous Plant under Cadmium Stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42 (2), 440-445.
- An, Y.J., Kim, Y.M., Kwon, T.I. and Jeong, S.W., 2004. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment*, 326 (1-3), 85-93.
- Bhatt, K.H., Anwar, S., Nawaz, K., Hussain, K., Siddiqi, E.H., Sharif, R.U., Talat, A. and Khalid, A., 2013. Effect of Heavy Metal Lead (PB) Stress of Different Concentration on Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14 (2), 148-154.
- Brewer, T.M. and Marcus, R.K., 2007. Separation and determination of iron-containing proteins via liquid chromatography-particle beam/hollow cathode-optical emission spectroscopy. *Anal Chem*, 79 (6), 2402-11.
- Castiglione, S., Franchin, C., Fossati, T., Lingua, G., Torrigiani, P. and Biondi, S., 2007. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* L. cv. Villafranca). *Chemosphere*, 67 (6), 1117-26.
- Chen, J., Zhu, C., Li, L.P., Sun, Z.Y. and Pan, X.B., 2007. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *J Environ Sci (China)*, 19 (1), 44-9.
- Chen, R., Guo, W., Yin, Y. and Gong, Z.H., 2014. A novel F-box protein CaF-box is involved in responses to plant hormones and abiotic stress in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Int J Mol Sci*, 15 (2), 2413-30.
- Chen, Y.E., Cui, J.M., Yuan, M., Zhang, Z.W., Yuan, S. and Zhang, H.Y., 2016. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings *Biologia Plantarum*, 60 (1), 139-147.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 159-82.
- Cook, C.M., Kostidou, A., Vardaka, E. and Lanaras, T., 1998. Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of *Phaseolus* plants. *Photosynthetica*, 34 (2), 179-193.
- Cuypers, A., Koistinen, K.M., Kokko, H., Karenlampi, S., Auriola, S. and Vangronsveld, J., 2005. Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress. *J Plant Physiol*, 162 (4), 383-392.

- Dey, S.K., Dey, J., Patra, S. and Pothal, D., 2007. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (1), 53-60.
- Du, J., Yang, J.L. and Li, C.H., 2012. Advances in metallothionein studies in forest trees. *Plant Omics*, 5 (1), 46-51.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorani, F. and Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *ScientificWorldJournal*, 2015 (2015), 1-18.
- FAO, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.fao.org/faostat (14.12.2017)
- Gielen, H., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., 2012. MicroRNAs in metal stress: specific roles or secondary responses? *Int J Mol Sci*, 13 (12), 15826-47.
- Goel, S., 2012. Effect Of Salicylic Acid On Growth And Oxidative Metabolism Of Brassica Juncea And Trigonella Foenum Graceum Under Cadmium And Lead Stress. *Plant Archives*, 12, 173-180.
- Gonzalez, L.E., Keller, K., Chan, K.X., Gessel, M.M. and Thines, B.C., 2017. Transcriptome analysis uncovers Arabidopsis F-BOX STRESS INDUCED 1 as a regulator of jasmonic acid and abscisic acid stress gene expression. *BMC Genomics*, 18 (1), 533.
- Guo, J., Xu, L., Su, Y., Wang, H., Gao, S., Xu, J. and Que, Y., 2013. ScMT2-1-3, a metallothionein gene of sugarcane, plays an important role in the regulation of heavy metal tolerance/accumulation. *Biomed Research International*, 2013 (2013), 1-12.
- Gupta, O.P., Sharma, P., Gupta, R.K. and Sharma, I., 2014. MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. *Plant Molecular Biology*, 84 (1), 1-18.
- Güneş, A., Alpaslan, M., Çikili, Y. and Özcan, H., 1999. Effect of zinc on the alleviation of boron toxicity in tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 22 (7), 1061-1068.
- He, Q., Zhu, S. and Zhang, B., 2014. MicroRNA–target gene responses to lead-induced stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Functional & Integrative Genomics*, 14 (3), 507-515.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347, 347-353.
- Isbat, M., Zeba, N., Kim, S.R. and Hong, C.B., 2009. A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 166 (15), 1685-93.
- Israr, M., Jewell, A., Kumar, D. and Sahi, S.V., 2011. Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *J Hazard Mater*, 186 (2-3), 1520-6.
- Jain, S., Kumar, D., Jain, M., Chaudhary, P., Deswal, R., Neera and Sarin, B., 2011. Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 protein (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *109 (1)*, 19-31.
- Kaur, G., Singh, H.P., Batish, D.R. and Kohli, R.K., 2012. Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. *J Environ Biol*, 33 (2), 265-9.

- Kawai-Yamada, M., Ohori, Y. and Uchimiya, H., 2004. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell*, 16 (1), 21-32.
- Khan, R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A. and Khan, N.A., 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-17.
- Kim, S.H., Jeong, J.C., Ahn, Y.O., Lee, H.S. and Kwak, S.S., 2014. Differential responses of three sweetpotato metallothionein genes to abiotic stress and heavy metals. *Molecular Biology Reports*, 41 (10), 6957-6966.
- Kisa, D., Ozturk, L. and Tekin, S., 2016. Gene expression analysis of metallothionein and mineral elements uptake in tomato (*Solanum lycopersicum*) exposed to cadmium. *Journal of Plant Research*, 129 (5), 989-995.
- Krzeslowska, M., Lenartowska, M., Mellerowicz, E.J., Samardakiewicz, S. and Wozny, A., 2009. Pectinous cell wall thickenings formation-A response of moss protonemata cells to lead. *Environmental and Experimental Botany*, 65 (1), 119-131.
- Lamhamdi, M., El Galiou, O., Bakrim, A., Novoa-Munoz, J.C., Arias-Estevez, M., Aarab, A. and Lafont, R., 2013. Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20 (1), 29-36.
- Li, L.S., Meng, Y.P., Cao, Q.F., Yang, Y.Z., Wang, F., Jia, H.S., Wu, S.B. and Liu, X.G., 2016. Type 1 metallothionein (ZjMT) is responsible for heavy metal tolerance in *Ziziphus jujuba*. *Biochemistry-Moscow*, 81 (6), 565-573.
- Li, Y.H., Atagana, H., Liu, J.C., Wu, W.L. and Wu, S.J., 2013. cDNA sequence encoding metallothionein protein from *Aegiceras corniculatum* and its gene expression induced by Pb²⁺ and Cd²⁺ stresses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (12), 10201-10208.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25 (4), 402-8.
- Lu, S.W., Friesen, T.L. and Faris, J.D., 2011. Molecular characterization and genomic mapping of the pathogenesis-related protein 1 (PR-1) gene family in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 285 (6), 485-503.
- Luan, Z.Q., Cao, H.C. and Yan, B.X., 2008. Individual and combined phytotoxic effects of cadmium, lead and arsenic on soybean in Phaeozem. *Plant Soil and Environment*, 54 (9), 403-411.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 (2), 139-158.
- Mendoza-Soto, A., Sanchez, F. and Hernandez, G., 2012. MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Frontiers in Plant Science*, 3 (105), 1-6.
- Musielinska, R., Kowol, J., Kwapulinski, J. and Rochel, R., 2016. Antagonism between lead and zinc ions in plants. *Archives of Environmental Protection*, 42 (2), 78-91.
- Naya, L., Paul, S., Valdes-Lopez, O., Mendoza-Soto, A.B., Nova-Franco, B., Sosa-Valencia, G., Reyes, J.L. and Hernandez, G., 2014. Regulation of Copper

- Homeostasis and Biotic Interactions by MicroRNA 398b in Common Bean. *Plos One*, 9 (1), 1-13.
- Nevrtalova, E., Baloun, J., Hudzieczek, V., Cegan, R., Vyskot, B., Dolezel, J., Safar, J., Milde, D. and Hobza, R., 2014. Expression response of duplicated metallothionein 3 gene to copper stress in *Silene vulgaris* ecotypes. *Protoplasma*, 251 (6), 1427-1439.
- Nikolic, D.B., Samardzic, J.T., Bratic, A.M., Radin, I.P., Gavrilovic, S.P., Rausch, T. and Maksimovic, V.R., 2010. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 gene in heavy metal stress: protective role of the protein and inducibility of the promoter region under Cu(2+) and Cd(2+) treatments. *J Agric Food Chem*, 58 (6), 3488-94.
- Noman, A. and Aqeel, M., 2017. miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (11), 10068-10082.
- Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. and Pehlivan, M., 2009. Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri. 17, 14-26.
- Popova, L., Maslenkova, L., Yordanova, R., Krantev, A., Szalai, G. and Janda, T., 2008. Salicylic Acid Protects Photosynthesis Against Cadmium Toxicity In Pea Plants. *General and Applied Plant Physiology*, 34 (3-4), 133-148.
- Pós, V., Hunyadi-Gulyás, É., Caiazza, R., Jócsák, I., Medzihradzsky, K. and Lukács, N., 2011. Induction of pathogenesis-related proteins in intercellular fluid by cadmium stress in barley (*Hordeum vulgare* L.)—A proteomic analysis. *Acta Alimentaria*, 40 (Supplement 1), 164-175.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E., 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213 ed.*, Ed: D.M. Whitacre. Springer New York, New York, NY, 113-136.
- Ramiro, D.A., Melotto- Passarin, D.M., Barbosa, M.d.A., Santos, F.d., Gomez, S.G.P., Júnior, N.S.M., Lam, E. and Carrer, H., 2016. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor- 1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 14 (9), 1826-1837.
- Remans, T., Opdenakker, K., Guisez, Y., Carleer, R., Schat, H., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and Experimental Botany*, 84 (Supplement C), 61-71.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R. and Shin, J.S., 2005. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep*, 24 (4), 216-24.
- Schutzendubel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*, 53 (372), 1351-65.
- Shen, Z.G., Zhao, F.J. and McGrath, S.P., 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant Cell and Environment*, 20 (7), 898-906.
- Shi, W. and Chance, M.R., 2008. Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol Life Sci*, 65 (19), 3040-8.

- Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B. and Tuteja, N., 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav*, 6 (2), 196-203.
- Sinha, P., Shukla, A.K. and Sharma, Y.K., 2015. Amelioration of Heavy-Metal Toxicity in Cauliflower by Application of Salicylic Acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46 (10), 1309-1319.
- Song, J.B., Wang, Y.X., Li, H.B., Li, B.W., Zhou, Z.S., Gao, S. and Yang, Z.M., 2015. The F-box family genes as key elements in response to salt, heavy metal, and drought stresses in *Medicago truncatula*. *Funct Integr Genomics*, 15 (4), 495-507.
- Song, W.Y., Zheng, A.Z., Shao, H.B., Chu, L.Y., Brestic, M. and Zhang, Z.B., 2012. The alleviative effect of salicylic acid on the physiological indices of the seedling leaves in six different wheat genotypes under lead stress. *Plant Omics*, 5 (5), 486-493.
- Sultana, S., Naser, H., Shil, N., Akhter, S. and Begum, R., 2016. Effect of foliar application of zinc on yield of wheat grown by avoiding irrigation at different growth stages. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 41 (2), 323-334.
- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18 (8), 2051-2065.
- Verma, S. and Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164 (4), 645-655.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Qian, J., Ao, Y.H., Lu, J. and Li, L., 2011a. Salicylic acid involved in the regulation of nutrient elements uptake and oxidative stress in *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara under Pb stress. *Chemosphere*, 84 (1), 136-142.
- Wang, H., Zhong, G., Shi, G. and Pan, F., 2011b. Toxicity of Cu, Pb, and Zn on Seed Germination and Young Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.) *Computer and Computing Technologies in Agriculture IV* ed., Ed: Y.L. Daoliang Li, Yingyi Chen. 231-240.
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R. and Jin, L., 2011c. Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environ Pollut*, 159 (12), 3627-33.
- Wani, A.B., Chadar, H., Wani, A.H., Singh, S. and Upadhyay, N., 2017. Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters*, 15 (1), 101-123.
- Wińska-Krysiak M., Koropacka K. and S., G., 2015. Determination of the tolerance of sunflower to lead-induced stress. *Journal of Elementology*, 20 (2), 491-502.
- Xia, Y., Lv, Y.Y., Yuan, Y.X., Wang, G.P., Chen, Y.H., Zhang, H.S. and Shen, Z.G., 2012. Cloning and characterization of a type 1 metallothionein gene from the copper-tolerant plant *Elsholtzia haichowensis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34 (5), 1819-1826.
- Yang, Z.M. and Chen, J., 2013. A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, 5 (9), 1184-90.

- Yi, H., Qiong, W., Jian, Z., Tao, S., Guang-xiao, Y. and Guang-yuan, Y., 2015. Current status and trends of wheat genetic transformation studies in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 14 (3), 438-452.
- Zhang, F.Q., Wang, Y.S., Sun, C.C., Lou, Z.P. and Dong, J.D., 2012. A novel metallothionein gene from a mangrove plant *Kandelia candel*. *Ecotoxicology*, 21 (6), 1633-41.
- Zhang, S. and Liu, Y., 2001. Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell*, 13 (8), 1877-89.
- Zhou, J. and Goldsbrough, P.B., 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 248 (3), 318-328.
- Zhou, Z.S., Huang, S.Q. and Yang, Z.M., 2008. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and biophysical research communications*, 374 (3), 538-542.
- Zhu, C., Ding, Y. and Liu, H., 2011. miR398 and plant stress responses. *Physiol Plant*, 143 (1), 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Antalya'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2015 yılında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesini bitirdi. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

