



T.C

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIR METAL (Cu) VE ASİT YAĞMURU STRESLERİNİN ASPİR
(*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİTLERİNDE, OLEİK ASİDİN LİNOLEİK
ASİDE ÇEVİRİMİNDEN SORUMLU OLAN *FAD2* GENİNİN MRNA
İFADE SEVİYELERİ VE BAZI EKOFİZYOLOJİK ÖZELLİKLER
ÜZERİNE MUHTEMEL ETKİLERİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİLAY YILDIRIM

OCAK 2022

NİLAY YILDIRIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2022

**AĞIR METAL (Cu) VE ASİT YAĞMURU STRESLERİNİN ASPİR
(*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİTLERİNDE, OLEİK ASİDİN LİNOLEİK
ASİDE ÇEVİRİMİNDEN SORUMLU OLAN *FAD2* GENİNİN MRNA İFADE
SEVİYELERİ VE BAZI EKOFİZYOLOJİK ÖZELLİKLER ÜZERİNE
MUHTEMEL ETKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

Nilay YILDIRIM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Neslihan KARAVİN

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

Nilay YILDIRIM tarafından hazırlanan “Ağır Metal (Cu) ve Asit Yağmuru Streslerinin Aspir (Carthamus tinctorius L.) Çeşitlerinde, Oleik Asidin Linoleik Aside Çevriminden Sorumlu Olan FAD2 Geninin Mrna İfade Seviyeleri ve Bazı Ekofizyolojik Özellikler Üzerine Muhtemel Etkilerin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Biyoloji Anabilim Dalı,

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan :

Biyoloji Anabilim Dalı,

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye :

Biyoloji Anabilim Dalı,

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 20/01/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nilay YILDIRIM

29.12.2021

AĞIR METAL (Cu) VE ASİT YAĞMURU STRESLERİNİN ASPİR (*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİTLERİNDE, OLEİK ASİDİN LİNOLEİK ASİDE ÇEVİRİMİNDEN SORUMLU OLAN *FAD2* GENİNİN MRNA İFADE SEVİYELERİ VE BAZI EKOFİZYOLOJİK ÖZELLİKLER ÜZERİNE MUHTEMEL ETKİLERİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Nilay YILDIRIM

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Bu çalışmada, ağır metal (Cu) ve asit yağmuru streslerinin bazı aspir (*Carthamus tinctorious* L.) çeşitlerinde (LİNAS, BALCI ve BDYAS-04), oleik asidin linoleik aside dönüşümünü sağlayan *FAD2* geninin mRNA ifade seviyeleri ve stres öncesi ve sonrası bitki boyu, toprak üstü ve altı taze ve kuru ağırlığı, kök uzunluğu, toprak üstü ve altı su içeriği, klorofil a ve b ve toplam karotenoid özellikleri üzerindeki etkileri araştırılarak; bitkilerin bu stres faktörlerinden nasıl ve ne düzeyde etkilendiği belirlenmeye çalışılmıştır. Moleküler analizler için kullanılacak aspir bireyleri iklim kabininde; ekofizyolojik özelliklerin belirlenmesi için kullanılacak aspir bireyleri de iklim odasında, perlit içeren saksılarda yetiştirilmiştir. Besin olarak 1X Hoagland çözeltisi kullanılmıştır. Bakır ve asit yağmuru streslerinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla kontrol grubu, farklı konsantrasyonlarda bakır çözeltisi uygulanan deney grubu, farklı pH derecelerinde asit yağmuru simülasyonu uygulanan deney grubu ve bakır ve asit yağmuru streslerinin birlikte etkisine maruz bırakılan deney grubu olmak üzere dört farklı deney seti oluşturulmuştur. Denemeler sonucunda, Cu ve asit yağmuru streslerinin aspir çeşitlerinde incelenen özelliklerde önemli değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir. Aspir bireyleri bakır ve asit yağmuru streslerinin her ikisine birden maruz bırakıldığında, incelenen özellikler üzerinde daha çok olumsuz etki meydana geldiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar, yüksek konsantrasyonlarda bakır ve asit yağmuru simülasyonu uygulamalarının, bitkilerde su stresi yaratarak da ekstra bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Sayfa Adedi : 148

Anahtar Kelimeler : Ağır metal, asit yağmuru, aspir, bakır, ekofizyoloji, *FAD2*.

Danışman : Doç. Dr. Neslihan KARAVİN

POSSIBLE EFFECTS OF HEAVY METAL (Cu) AND SIMULATED ACID RAIN
STRESSES ON MRNA EXPRESSION LEVELS OF *FAD2* GENE RESPONSIBLE FOR
LINOLEIC ACID TRANSDUCTION OF OLEIC ACID AND SOME
ECOPHYSIOLOGICAL TRAITS IN SAFFLOWER (*Carthamus tinctorius* L.)
(M. Sc. Thesis)

Nilay YILDIRIM

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
AMASYA UNIVERSITY

January 2022

ABSTRACT

In this study, the effects of heavy metal (Cu) and acid rain stresses on mRNA expression levels of the *FAD2* gene, which is responsible for the conversion of oleic acid to linoleic acid, and plant height before and after stress, fresh and dry weight, root length, water content, chlorophyll a, b and total carotenoid content were determined in some safflower (*Carthamus tinctorious* L.) cultivars (LİNAS, BALCI and BDYAS-04). Also, it was tried to specified how and to what extent plants are affected by these stress factors. Safflower individuals used for molecular analyzes were grown in the climate cabinet, and individuals used for the determination of ecophysiological characteristics were grown in the climate chamber; in pots containing perlite. In order to determine the effects of copper and acid rain stresses, four different experimental sets were formed: the control group, the experimental group in which different concentrations of copper solution were applied, the experiment group in which acid rain simulation was applied at different pH levels, and the experimental group that was exposed to the combined effect of copper and acid rain stresses. As a result of the experiments, it was determined that Cu and acid rain stresses caused significant changes in the investigated properties of safflower cultivars. It was observed that when safflower individuals are exposed to both copper and acid rain stresses, more negative effects occurred on the investigated traits. The results suggest that high concentrations of copper and acid rain simulation applications also have an extra effect by creating water stress in plants.

Page number : 148

Key Words : Acid rain, copper, ecophysiology, *FAD2*, heavy metal, safflower.

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan KARAVİN

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem akademik hem insani olarak tüm bilgi birikimleri ve tecrübelerinden faydalanmamı sağlayan, daima sabır ve hoşgörüyle beni her alanda yönlendiren, tüm imkân ve olanaklarını benden esirgemeyen, kendisini her yönüyle örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan KARAVİN' e yürekten teşekkür ederim.

Tez çalışmamın moleküler analizleri için çalışma yaptığım Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım, yardım ve desteklerinden faydalandığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ekrem BÖLÜKBAŞI' a gönülden teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar çalışması ve ekofizyolojik analiz kısımlarında bana yardımcı olan Suluova Meslek Yüksekokulu Müdürü Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat KARAVİN başta olmak üzere, çalışmama destek olan Dr. Öğr. Üyesi Veli ÇELİKTAŞ ve Doç. Dr. Ferda ESER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Sadece eğitim öğretim sürecinde değil hayatımın her anında yanımda olan, özellikle pandemi sürecinde tezimin her aşamasında beni destekleyen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını FMB-BAP 19-0423 No'lu proje ile destekleyen Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve üyelerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Çevre Kirliliği.....	3
2.1.1. Ağır metal kirliliği.....	3
2.1.1.1. Bakır (Cu)'ın bitki gelişimindeki yeri.....	5
2.1.1.2. Bitkilerin ağır metal stresine karşı oluşturduğu tepkiler.....	6
2.1.2. Asit yağmurları.....	8
2.1.3. Küresel iklim değişikliği.....	9
2.2. Bitkilerde Stres.....	10
2.3. Aspir Bitkisinin Genel Özellikleri.....	11
2.4. Aspir Bitkisinde <i>FAD2</i> Geni.....	13

	Sayfa
3. LİTERATÜR ÖZETİ.....	15
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
4.1. Materyal Temini.....	20
4.2. Ekofizyolojik Etkilerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan Deney Planı.....	20
4.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi.....	21
4.2.2. Cu ve asit yağmuru streslerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	22
4.2.3. Cu ve asit yağmuru simülasyonu uygulamaları.....	23
4.3. Ekofizyolojik Parametrelerin Ölçümü.....	25
4.3.1. Çimlenen tohum sayısı.....	25
4.3.2. Bitki boyu ölçümleri.....	25
4.3.3. Yaş ve kuru ağırlık ölçümü.....	25
4.3.4. Klorofil-a, b ve karotenoid miktarının belirlenmesi.....	26
4.4. Moleküler Analizler İçin Deney Planı.....	27
4.4.1. Total RNA izolasyonu.....	27
4.4.2. DNaz uygulaması.....	29
4.4.3. cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	30
4.4.4. Primer dizaynı.....	31
4.4.5. Real-Time PCR reaksiyonu.....	32
4.4.6. Normalizasyon.....	33
4.4.7. İstatistiksel analiz.....	34

Sayfa

5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	35
5.1. Ekofizyolojik Özelliklere Ait Bulgular.....	35
5.1.1. Cu stresinin ekofizyolojik özellikler üzerine etkileri.....	35
5.1.2. Asit yağmuru simülasyonunun ekofizyolojik özellikler üzerine etkileri....	45
5.1.3. Cu stresinin ve asit yağmuru simülasyonunun ekofizyolojik özellikler üzerine birlikte etkileri.....	55
5.1.4. Ekofizyolojik özelliklerin deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	65
5.1.4.1. Çimlenen tohum sayısı.....	65
5.1.4.2. Bitki boyu.....	67
5.1.4.3. Toprak üstü taze ve kuru ağırlık.....	69
5.1.4.4. Kök uzunluğu.....	73
5.1.4.5. Klorofil miktarı.....	75
5.1.4.6. Karotenoid miktarı.....	77
5.1.4.7. Su içeriği.....	79
5.2. Moleküler Analizlere Ait Bulgular.....	81
5.2.1. Bakır (Cu) stresi.....	81
5.2.2. Asit yağmuru simülasyonu ve uygulaması.....	81
5.2.3. Total RNA izolasyonu.....	82
5.2.4. cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	82
5.2.5. Real-Time PCR reaksiyonu.....	89
5.2.6. RT-PCR sonuçlarının normalizasyonu ve analizi.....	90

	Sayfa
5.3. Cu uygulamalarına ait verilerin normalizasyonu ve analizi.....	91
5.3.1. BALCI çeşidi.....	91
5.3.2. BDYAS-04 çeşidi.....	96
5.3.3. LİNAS çeşidi.....	101
5.4. Bakır (Cu) ve Asit Yağmuru Simülasyonu Verilerinin Normalizasyonu Ve Analizi.....	106
5.4.1. BALCI çeşidi.....	106
5.4.2. BDYAS-04 çeşidi.....	113
5.4.3. LİNAS çeşidi.....	120
5.5. Asit Yağmuru Simülasyonu Verilerinin Normalizasyonu ve Analizi.....	127
5.5.1. BALCI çeşidi.....	127
5.5.2. BDYAS-04 çeşidi.....	130
5.5.3. LİNAS çeşidi.....	133
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	136
KAYNAKLAR.....	139
ÖZGEÇMİŞ.....	148

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Ekofizyolojik özelliklerin incelenmesi için oluşturulan deney düzeneği...	20
Çizelge 4.2. Moleküler analiz için oluşturulan deney düzeneği.....	28
Çizelge 4.3. RNase free tüpe eklenecek bileşenler ve miktarları.....	29
Çizelge 4. 4. Primer karışıma ait içerik ve derişim değerleri.....	30
Çizelge 4.5. Ters transkripsiyon reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları.....	31
Çizelge 4.6. Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirileceği program.....	31
Çizelge 4.7. FAD2 genlerinin gen numaraları ve uzunlukları.....	31
Çizelge 4. 8. Tasarlanan Real-Time PCR primer dizilerine ait bilgiler.....	32
Çizelge 4.9. Optimize edilen kullanılacak Real- Time PCR bileşenleri ve bunların konsantrasyonları.....	32
Çizelge 4.10. Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştirileceği program.....	33
Çizelge 5.1. BDYAS-04 çeşidinde Cu stresi uygulanan aspir bireylerinde ölçülen ekofizyolojik özelliklere ait bulgular.....	37
Çizelge 5.2. BDYAS-04 çeşidinde Cu stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler	39
Çizelge 5.3. LİNAS çeşidinde Cu stresi uygulanan aspir bireylerinde ölçülen ekofizyolojik özelliklere ait bulgular.....	42
Çizelge 5.4. LİNAS çeşidinde Cu stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler	44
Çizelge 5.5. BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler.....	47
Çizelge 5.6. BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru simülasyonu ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler	49
Çizelge 5.7. LİNAS çeşidinde asit yağmuru simülasyonu uygulanan aspir bireylerinde ölçülen ekofizyolojik özelliklere ait bulgular.....	51
Çizelge 5.8. LİNAS çeşidinde asit yağmuru simülasyonu ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler	54

Sayfa

Çizelge 5.9. BDYAS-04 çeşidinde Cu ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulanmasının ekofizyolojik özelliklere etkisi.....	58
Çizelge 5.10. LİNAS çeşidinin Cu ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulanmasının ekofizyolojik özellikler üzerine etkisi.....	63
Çizelge 5.11. Cu uygulanan BDYAS-04 çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları..	83
Çizelge 5.12. Cu uygulanan BALCI çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	83
Çizelge 5.13. Cu uygulanan LİNAS çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	84
Çizelge 5.14. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	84
Çizelge 5.15. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	86
Çizelge 5.16. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	87
Çizelge 5.17. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	88
Çizelge 5.18. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	89
Çizelge 5.19. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları.....	89
Çizelge 5.20. Cu uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri..	92
Çizelge 5.21. Cu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	97
Çizelge 5.22. Cu uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.	102
Çizelge 5.23. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	107
Çizelge 5.24. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	109
Çizelge 5.25. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	111

Sayfa

Çizelge 5.26. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	114
Çizelge 5.27. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	116
Çizelge 5.28. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	118
Çizelge 5.29. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	121
Çizelge 5.30. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	123
Çizelge 5.31. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	125
Çizelge 5.32. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	128
Çizelge 5.33. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	131
Çizelge 5.34. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri.....	134

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 5.1. BDYAS-04 çeşidinde çimlenen tohum sayısının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	66
Şekil 5.2. LİNAS çeşidinde çimlenen tohum sayısının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	67
Şekil 5.3. BDYAS-04 çeşidinde stres öncesi ve Cu ve asit yağmuru simülasyonu sonrası bitki boylarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	68
Şekil 5.4. LİNAS çeşidinde stres öncesi ve Cu ve asit yağmuru simülasyonu sonrası bitki boylarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	69
Şekil 5.5. BDYAS-04 çeşidinde toprak üstü taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	70
Şekil 5.6. BDYAS-04 çeşidinde toprak altı taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	71
Şekil 5.7. LİNAS çeşidinde toprak üstü taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	72
Şekil 5.8. LİNAS çeşidinde toprak altı taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	73
Şekil 5.9. BDYAS-04 çeşidinde kök uzunluğunun deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	74
Şekil 5.10. LİNAS çeşidinde kök uzunluğunun deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	75
Şekil 5.11. BDYAS-04 çeşidinde klorofil a ve b miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	76
Şekil 5.12. LİNAS çeşidinde klorofil a ve b miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	77
Şekil 5.13. BDYAS-04 çeşidinde karotenoid miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	78
Şekil 5.14. LİNAS çeşidinde karotenoid miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	79
Şekil 5.15. BDYAS-04 çeşidinde toprak altı ve toprak üstü dokulardaki su miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	80

Sayfa

Şekil 5.16. LİNAS çeşidinde toprak altı ve toprak üstü dokulardaki su miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi.....	81
Şekil 5.17. İzolasyonu sağlanmış RNA'ların agoroz jel görüntüleri.....	82
Şekil 5.18. Kullanılan genler ve Melting Curve analiz sonuçları.....	90
Şekil 5.19. Cu uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	93
Şekil 5.20. Cu uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri..	94
Şekil 5.21. Cu uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	95
Şekil 5.22. Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	98
Şekil 5.23. Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	99
Şekil 5.24. Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	100
Şekil 5.25. Cu uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	103
Şekil 5.26. Cu uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri..	104
Şekil 5.27. Cu uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	105
Şekil 5.28. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	108
Şekil 5.29. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	108
Şekil 5.30. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	108
Şekil 5.31. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	110
Şekil 5.32. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	110

Sayfa

Şekil 5.33. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	110
Şekil 5.34. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	112
Şekil 5.35. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	112
Şekil 5.36. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	112
Şekil 5.37. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	115
Şekil 5.38. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	115
Şekil 5.39. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	115
Şekil 5.40. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	117
Şekil 5.41. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	117
Şekil 5.42. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	117
Şekil 5.43. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	119
Şekil 5.44. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	119
Şekil 5.45. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	119
Şekil 5.46. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	122
Şekil 5.47. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	122
Şekil 5.48. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	122

Sayfa

Şekil 5.49. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	124
Şekil 5.50. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	124
Şekil 5.51. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	124
Şekil 5.52. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	126
Şekil 5.53. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	126
Şekil 5.54. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	126
Şekil 5.55. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	129
Şekil 5.56. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	129
Şekil 5.57. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	129
Şekil 5.58. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	132
Şekil 5.59. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	132
Şekil 5.60. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	132
Şekil 5.61. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	134
Şekil 5.62. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	135
Şekil 5.63. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri.....	135

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Aspir bitkisi ve aspir yağı.....	12
Resim 2.2. Aspir bitkisi.....	12
Resim 4.1. Ekofizyolojik etkilerin incelenmesi için oluşturulan deney düzeneği.....	21
Resim 4.2. Aspir tohumlarının ekimi.....	21
Resim 4.3. Aspir bireylerinin yetiştirilmesi.....	22
Resim 4.4. Aspir bireyleri hasat edildikten sonra toprak üstü ve kök uzunluğu ölçümü.	25
Resim 4.5. Numunelerin kurutma işlemi.....	26
Resim 4.6. Total RNA İzolasyonu işlemleri.....	29
Resim 5.1. 25, 50, 100 ppm Cu stresine maruz kalan BDYAS-04 çeşidi örnekleri	35
Resim 5.2. 25, 50 ve 100 ppm Cu stresine maruz kalan LİNAS çeşidi örnekleri.....	40
Resim 5.3. 2,5; 3,5 ve 4,5 pH değerlerinde asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan BDYAS-04 çeşidi örnekleri.....	45
Resim 5.4. 2,5; 3,5 ve 4,5 pH değerlerinde asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan LİNAS çeşidi örnekleri.....	50
Resim 5.5. 50 ppm+3,5 pH; 50 ppm+4,5 pH ve 100 ppm+3,5 pH değerindeki strese maruz kalan BDYAS-04 çeşidi örnekleri.....	55
Resim 5.6. 100 ppm+ 2,5 pH; 100 ppm +3,5 pH ve 100 ppm+4,5 pH değerlerinde Cu+asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan LİNAS çeşidi örnekleri....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
cm	Santimetre
g	Gram
mg	Miligram
L	Litre
ml	Mililitre
mmol	Milimol
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre
NO ₂	Azot dioksit
CO	Karbon monoksit
CO ₂	Karbondioksit
SO ₂	Kükürt dioksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HNO ₃	Nitrik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
%	Yüzde
ATP	Adenozin Tri Fosfat

Kısaltmalar	Açıklama
Cu	Bakır
CuSO ₄	Bakır sülfat
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
ACT	Aktin
FAD	Fatty acid desaturase
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	Cycle Treshold
mRNA	Messenger RNA
cq	Quantification of Cycle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ROS	Reactive Oxygen Species

1. GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada yaşam koşulları ve teknolojinin gelişmesine paralel olarak, çevre kirliliğinde önemli oranda artış meydana gelmekte, karasal ve denizel ekosistemlerde görülen çevre kirliliği canlı yaşamını olumsuz etkilemektedir. Ağır metaller ve asit yağmurları önemli çevresel kirleticiler arasında yer almaktadır. Özellikle bitkiler hareket kabiliyetine sahip olmadıkları için çevre koşullarından maksimum düzeyde etkilenmektedirler. Ağır metaller ve asit yağmurları, bitkilerin metabolik faaliyetlerinde bozulmalara neden olarak; büyüme ve gelişmelerine zarar vermektedirler.

Ağır metal kirliliği genellikle lokal kaynaklı olmakla birlikte, sularda bulunan ağır metaller taşınarak toprağa, toprakta bulunan ağır metaller taşınarak suya karışabilmektedir. Ağır metaller, genellikle çözünmüş iyon halinde toprakta bulunarak toprak faunası ve pH'ını değiştirebilmekte, bunun sonucunda canlı yaşamını olumsuz etkileyebilmektedir. Özellikle toprakta bulunan ağır metaller, bitkiler tarafından kökleriyle alınarak bitkinin diğer dokularına ulaşabilmekte ve dokularda birikmektedirler. Ağır metaller bitkilerin büyüme ve gelişimini olumsuz etkilemekte, bitkinin klorofil yapısı, miktarı, gen yapısı ve özellikleri gibi bazı özelliklerini de değiştirmektedirler (Tunç ve Şahin, 2015; Zeid, Ghazi ve Nabawy, 2013; Yerli, Çakmakçı, Şahin ve Tüfenkçi, 2020).

Çevre kirliliğinin bir sonucu olarak meydana gelen aynı zamanda çevre kirliliğine de neden olan asit yağmurları, arabaların egzozlarından, fosil yakıtlardan ve fabrika bacalarından çıkan NO_2 , SO_2 ve CO_2 gibi bileşenlerin atmosferde su buharı ile birleşmesi sonucu oluşan ve çeşitli yağış şekilleri ile yeryüzüne inen yağış olayı şeklinde tanımlanmaktadır. PH'ı yaklaşık 5-5,7 arasında değişiklik gösteren asit yağmurları hareket kabiliyeti olmayan bitkilere ulaştığında bitkinin dokularına kadar nüfuz etmekte ve bunun sonucunda bitkinin yapısında birtakım değişikliklere sebep olabilmektedirler. Asit yağmurları bitkilerin anatomik, fizyolojik ve morfolojik yapısına ciddi zararlar vermenin yanında, bitkide toksik etkiye de sebep olabilmektedir. Asit yağmurları bitkilerde kurumaya, fotosentez reaksiyonlarında olumsuz birtakım değişikliklere ve yaprak sitoplazmasının asitleşmesine sebep olabilmektedirler (Kant ve Aydın, 2002). Çevre kirliliğinin günümüzün en önemli sorunlarından biri olması nedeniyle, ağır metal kirliliği ve asit yağmurlarının etkileri

üzerine yapılan bilimsel çalışmalar da önem kazanmış ve bu konularda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, asit yağmuru ve ağır metal (Cu) streslerinin seçilen aspir (*Carthamus tinctorious L.*) çeşitlerinde (LİNAS, BALCI ve BDYAS-04) oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olan *FAD2* geninin mRNA ifade seviyelerine ve bazı ekofizyolojik özellikler üzerine etkileri araştırılarak, bu etkilerin işaret ettiği mekanizmaların ağır metal ve asit yağmuru streslerinden nasıl etkilenebileceği belirlenmeye çalışılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çevre Kirliliği

Canlı ve cansız tüm varlıkların birbiriyle karşılıklı etkileşim içinde olduğu doğanın, çeşitli nedenlerle doğal yapısının bozulması çevre kirliliği olarak tanımlanmaktadır. Teknolojinin hızlı gelişmesine bağlı olarak endüstriyel faaliyetlerin ve sanayi kuruluşlarının artması, nüfus artışı, trafik yoğunluğu vb. gibi pek çok etken çevre kirliliğinin önemli ölçüde artmasına sebep olmaktadır. Çevre kirliliği, canlı yaşamını tehdit etmekle birlikte, ekosistemlerin bozulmasına da neden olarak yeryüzünün devamlılığını da olumsuz etkilemektedir.

Çevre kirliliği çeşitli şekillerde bozulmalara neden olarak bitkilerin metabolik faaliyetlerinde değişimlere yol açmaktadır. Sahip oldukları özelliklerin ve ekolojik toleranslarının farklı olması nedeniyle, bitkilerin çevre kirliliğinden etkilenme biçimleri birbirlerinden farklı olabilmektedir. Havadaki toz parçacıkları bitkilerin yüzeylerinde birikerek hem güneş ışınlarının geri yansımaya neden olmakta hem de stomaları kapatarak bitkinin gaz alışverişini engellemektedir ve dolayısıyla fotosentez reaksiyonu etkilenmektedir. Toprakta kirliliğin fazla olması, bitkinin alması gereken besin elementlerini topraktan yeteri kadar alamamasına sebep olmakta ve böylece bitkinin büyüme ve gelişimini olumsuz etkilemektedir (Kantarcı, 1995; Küpe ve Köse, 2013). Bazı tarım ilaçlarının ve atıkların toprağa karışması toprak kirliliğine, sentetik maddelerin ve zararlı kimyasalların direkt veya toprakların yıkanması yoluyla suya karışması su kirliliğine, sanayi kuruluşları ve endüstriyel faaliyetlerin sonucunda atmosfere karışan zararlı gazların atmosfer kirliliğine sebep olması ve daha niceleri çevre kirliliğinin kökenini oluşturmaktadır.

2.1.1. Ağır metal kirliliği

Periyodik sistemde genellikle atom numarası 20'den büyük olan ve B grubu elementleri olarak bilinen bazı elementler ağır metal olarak tanımlanmaktadır. Ağır metallerin özgül ağırlıkları genellikle 5 g/cm^3 'ten daha fazladır ve bazıları bitkiler ve diğer canlılar için mikro besin elementi olarak yaşamsal öneme sahiptir (Azevedo, Prasad, Cardoso, Lea ve

Gratao, 2005; Kahvecioğlu, Kartal, Güven ve Timur, 2004; Stobrawa ve Plucinska, 2008). Bununla birlikte, bu elementler yüksek konsantrasyonlarda canlılar için toksik etki göstermekte ve çeşitli bozulmalara yol açmaktadır.

Çevre kirliliğinin önemli sebeplerinden biri olan ağır metaller, toprak, su ya da hava yoluyla canlı bünyesine alınarak olumsuz etkilere sebep olabilmektedirler (Okçu, Tozlu, Kumlay ve Pehlivan, 2009). Metaller toprakta karmaşık yapılar meydana getirerek canlılar için daha toksik hale gelmektedir. Metaller topraktaki mikroorganizmaların faaliyetlerini olumsuz etkilemekte ve toprak faunasının bozulmasına, nitrifikasyon mekanizmasının toprak solunumu ve mineralizasyonunun bozulmasına yol açmaktadır. Böylece, topraklar verimsizleşmekte ve özellikleri değişmektedir. Bu durum bitki gelişimine yansiyarak bitki sağlığını olumsuz etkilemekte, verimi ve kaliteyi de azaltmaktadır. Toprakta bulunan ağır metaller bitkiler tarafından kökleri ile alındığında bitkilerin büyümesini, gelişmesini, klorofil yapısı ve miktarını hatta gen özelliklerini de değiştirebilmektedirler (Yerli ve diğerleri, 2020; Zeid ve diğerleri, 2013). Ağır metallerin bitki bünyesine alınmasını etkileyen faktörler arasında ağır metal ve bitki türü, ağır metalin bitki bünyesine alınma miktarı ve süresi yer almaktadır (Topdemir, Munzuroğlu, Gür ve Çobanoğlu, 2004). Toprakta biriken ağır metaller, bitkinin ihtiyacı olan temel besin maddesinin bitki tarafından alınmasına engel olabilmektedir. Bunun sonucunda besin elementi yetersizliğinden dolayı bitkinin kök ve gövde büyümesinde azalma görülebilmektedir. Ağır metallerin kök uzamasındaki bu etkisi hücre zarı ve epitel hücrelerin zarar görmesine ve kök hücrelerinde bölünmenin engellenmesine sebep olmaktadır (Souza-Santos, Ramos, Ferreira ve Carvalhalvesi, 2001; Soudek, Katrusakova, Sedlacek ve Petrova, 2010).

Ağır metallerin bazıları enzimlerin kofaktörü olarak çalışmaktadır. Ancak, yüksek konsantrasyondaki ağır metallerin alınımı sonucu enzim aktivitesinde azalma meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak bitkilerdeki enzimatik reaksiyonlar olumsuz etkilenmektedir (Ralph ve Burchett, 1998). Ağır metaller ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşumunu artırarak lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu zar enzimlerinin aktivitesinin bozulmasına, akışkanlığının azalmasına ve hücre zarının yapı ve işleyişinin olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır (Smeets, Cuypers, Lambrechts ve Semane, 2005). Yüksek oranda ağır metale maruz kalan bitkilerin RuBisCo ve diğer fotosentez proteinlerinde azalma gözlemlenmekte, buna bağlı olarak klorofil üretiminde azalma ve fotosentez inhibisyonu görülebilmektedir. Ağır metal stresi bitkide ATP'nin

azalmasına ve buna bağlı olarak yıkım (katabolik) reaksiyonlarının olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır (Kieffer, Dommes, Hoffmann ve Hausman, 2008; Ahsan, Lee, Kim ve Alam, 2010; Hossain, Makino ve Komatsu, 2012).

2.1.1.1. Bakır (Cu)'ın bitki gelişimindeki yeri

Bakır, periyodik cetvelde 4. periyot 11. grupta (1B Grubu) bulunan ve atom numarası 29 olan bir geçiş elementidir. Bakırın atom ağırlığı 63,546 gramdır. Bakır, bitkilerin metabolik faaliyetleri için oldukça önemli bir elementtir. Bitkinin ihtiyacı kadar alınması halinde, bitki metabolizmasında meydana gelen solunum, fotosentez, hücre çeperi metabolizmasının işlevlerinin yerine getirilmesi için gereklidir. Bakır, odun borusunun geçirirli olmasını sağlayan önemli faktörlerdendir. Bunların yanı sıra, bitkinin DNA ve RNA üretiminin kontrol edilmesini sağlayan bakır, yeterli miktarda alınmadığında ya da fazla miktarda alındığında bitkinin hücre üretimini etkileyebilmektedir (Allan, 1997; Raven, Evans ve Korb, 1999; Okçu ve diğerleri, 2009).

Bakırın bitki bünyesine yeterince alınmaması durumunda, özellikle genç yapraklarda klorozis görülmekte ve bu eksiklik bodur büyüme, geç olgunlaşma gibi etkilere sebep olabilmektedir. Buna bağlı olarak mahsul üretiminde düşüş yaşanabilmektedir (McCauley, Jones ve Jacobsen, 2009). Bakır, bitkinin dış faktörlerden etkilenerek geçirebileceği çeşitli hastalıklara engel olması açısından da oldukça önemlidir. Enzimlerin yapısına katılarak, bitkilerin enzimatik reaksiyonlarında da rol oynamaktadır (Boşgelmez, Savaşçı, Paslı ve Kaynaş, 2001; McCauley ve diğerleri 2009; Vatansever, Özyiğit ve Filiz, 2017).

Bitkiler, bünyelerinde bakırın eksik olması kadar fazla olması durumlarında da zarar görebilmektedirler. Bakırın fazla olması durumunda bitkilerde doku hasarı, pigment azlığı, yaprak genişliğinde azalma, bitki köklerinde bozulma gözlemlenmekle birlikte; bitkinin zar geçirirliliğinin bozulmasına bağlı olarak köklerde iyon kaybı ve DNA'nın hasar görmesiyle, fotosentez reaksiyonunda meydana gelen olumsuz etkiler de oluşabilmektedir. Bitki bünyesindeki fazla bakır, hücresel temel bileşenlerin yapısında bozulmalara yol açarak işleyişini de anormal derecede etkileyebilmektedir. (Sossé, Genet, Dunand ve Toussaint, 2004; Zhang, Liu, Ma ve Yang, 2019). Bakırın iyon halinde (Cu^+ veya Cu^{+2} şeklinde) alınmasıyla ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşumu gözlemlenebilmekte, hidroksil radikallerin artmasıyla serbest kalan köklerin DNA, RNA, protein gibi önemli

biyomolekülleri oksitlenebilmekte ve buna bağlı olarak yok edilebilmektedir. ROS üretimi bitkide lipid peroksidasyonu oluşturmakta ve oksidatif strese sebep olmaktadır (Lillo, Ginocchio, Ulriksen ve Dovletyarova, 2019; Kapoor, Sing, Kumar ve Romero, 2019).

Bitkinin yüksek oranda bakıra maruz kalması durumunda, bakır hücre proteinlerinin sülfidril gruplarına bağlanarak hücredeki enzim aktivesini engellemeye, azot başta olmak üzere temel besin maddelerinin alınmasında azalmaya, protein metabolizmasında bozulmaya sebep olmaktadır (Demirevska-Kepova, Simova-Stoilova, Stoyanova ve Holzer, 2004).

Bitkide yüksek oranda bakır bulunması toksik etki oluşturabilmektedir. Toksik etkiye bağlı olarak bitkinin stoma hareketleri, fotosentez, çimlenme, protein sentezi gibi yapım (anabolik) olaylarının, hormonal ve enzimatik dengenin bozulmasına yol açmaktadır (Yıldız, Terzi ve Uruşak, 2011).

2.1.1.2. Bitkilerin ağır metal stresine karşı oluşturduğu tepkiler

Bitkiler ağır metal stresine karşı çeşitli şekillerde tepki oluşturmaktadırlar. Bu tepkiler, bitki ve ağır metal türüne, ağır metale maruz kalma süresine, bitkinin habitatına, içerisinde bulunduğu ekolojik koşullara, bitkinin ağır metale maruz kalan organ, doku ya da kısımlarına göre değişiklik göstermektedirler. Bitkilerin ağır metal stresine karşı verdiği tepkilerin başında gelen kaçınma yöntemi ile, bitkiler tarafından rizosfere karbondioksit veya bazı organik asitlerle şelatlar salınarak toprağın pH değerinin düşmesi sağlanmakta ve bitkinin topraktan metal alması engellenmektedir. Ayrıca, bitki tarafından salınan organik asitler metal iyonları ile birleşerek metal ligandı oluşturmakta ve böylece metallerin hareket ve biyolojik olarak uygunluğunu değiştirebilmektedir. Metallerin hareket ve biyolojik olarak elverişliliğinin değişmesi bitkinin bünyesine metal alınımını zorlaştırmakta hatta engelleyebilmektedir. Bunların yanı sıra, metallerin bitki hücresine alınmasında hücre zarı taşıyıcılarının ifade düzeylerinin de oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Siedlecka, Tukendorf, Skorzynska-Polit ve Maksymiec, 2001; Wojcik, Gonnellix, Selvix ve Dresler, 2017; Clemens, 2001; Hall, 2002; Bakacak, 2010).

Bitkiler bünyelerine aldıkları metallerin zehirli etkilerini en aza indirmek için çeşitli tolerans mekanizmalarını kullanmaktadırlar. Bitkiler metallerin zehirli etkilerine maruz

kalmak istemediklerinden bu etkileri yok etmek amacıyla ağır metalleri ligandlara (fitoşelatinler, metallothioneinler ve bazı organik asitler) bağlayarak hücre boşluklarında depo etmekte ya da metallerin taşınmasında kullanmakta yani ligand bağlama mekanizması geliştirmektedirler (Baran, 2018). Bitkiler yaşamsal faaliyetlerinden fotosentez ve solunum reaksiyonlarına bağlı olarak ROT'lar (süperoksit, hidroksit radikali, H_2O_2 gibi) sentezleyebilmekte ve sentezledikleri ROT'lar bitkinin yapısal bileşenlerini oksitleyerek bitkinin hücrelerinin zarar görmesine sebep olmaktadır. Bitkiler hücrelerinin zarar görmesini engellemek amacıyla antioksidan enzim kapasitesini strese karşı savunma mekanizması olarak kullanmaktadır (Baran, 2018).

Bitkiler ağır metallerin hücre çeperine bağlanması, hücre çeperindeki vokuollerde ağır metal depolanması, köklerdeki ağır metallerin diğer organlara taşınmasının engellenmesi, organik asitlere bağlanarak farklı formlarda bileşik oluşturması gibi pek çok şekilde ağır metallere karşı savunma mekanizmaları oluşturmuştur (Emamverdian, Ding, Mokhberdoran ve Xie, 2015; Aksu ve Yıldız, 2004; Yerli ve diğerleri, 2020). Bitki bünyesine fazla miktarda ağır metal alınması, normal şartlarda da bitkinin oluşturduğu ROS miktarının artmasına sebep olmakta ve bu bitkideki iç dengeyi bozmaktadır. Oksijen atomuna farklı sayılarda elektron bağlanmasıyla hidroksil radikalleri veya hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri yani ROS oluşmaktadır (Bölükbaşı, 2018; Mithofer, Schulze ve Boland, 2004; Moller, Jensen ve Hansonn, 2007). Bitkilerde ağır metal streslerinin oluşturduğu lipid peroksidasyonu da ROS oluşumunu artırmaktadır. Hücre yapısında bulunan lipidlerin oksijen ile yükseltgenmesi sonucu keton, aldehit gibi türevlerin oluşması lipid peroksidasyonu anlamına gelmekte ve ağır metalin artması bu olayı tetiklemektedir.

Zar akışkanlığı ve yapısını bozan lipid peroksidasyonu hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olan etkenlerden bir tanesidir (Bölükbaşı, 2018; Belitz ve Grosch 1987).

Bitkiler ağır metale maruz kaldıklarında çeşitli tepkiler ve stratejiler oluşturmakta ve farklı davranış şekilleri gösterebilmektedirler. İndikatör bitkiler çevresel etkenlere karşı çok duyarlı olduklarından ağır metalleri toprak üstü dokularında biriktirerek toprağın ağır metal içeriğini belirlemektedir. Metal tutucu bitkiler ise geniş bir alanda bulunan ve toksik etkiye sahip olan ağır metallerin alınımını sınırlandırarak ağır metallerin köklerinden bitkinin

toprak üstü kısım ve dokularına ulaşmasına engel olmaktadır (Baker ve Brooks, 1989; Wenzel, Bunkowski, Puschenrerter ve Horak, 2003; Bakacak, 2010).

2.1.2. Asit yağmurları

Nüfusun hızlı artışına bağlı olarak şehirlerde ve endüstriyel faaliyetlerde ısınma ve enerji üretimi amacıyla fosil yakıtların kullanılması, sanayileşmenin artmasıyla fabrikaların çoğalması, gelir durumu ve konfor göz önünde bulundurulduğunda her bireyin kendine ait özel aracının olması vb. durumlar sebebiyle NO₂, SO₂ ve CO₂ gazlarının salınımında artış yaşanmaktadır. Atmosfere normalden daha fazla karışan bu gazlar su buharı ile birleştiğinde sülfürik asit, nitrik asit, karbonik asit gibi birtakım kuvvetli asitlere dönüşmektedirler (Kant ve diğerleri, 2002; Müezzinoğlu, 1987; Turan ve Gökalp, 1993). Atmosferde oluşan bu kuvvetli asitler yağmur, kar, dolu gibi çeşitli şekillerde yağışlarla yeryüzüne ulaşmaktadırlar. Yeryüzüne ulaşan bu asit yağmurlarının pH dereceleri yaklaşık olarak 5,6 değerinden daha düşüktür. Dolayısıyla, temas ettikleri canlıların ya da cansız maddelerin olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır. Asit yağmurları göl, deniz, okyanus gibi sulak alanlara temas ettiğinde bu ortamlarda yaşayan birçok canlı üzerinde etkili olmaktadır. Hem su kirliliğine sebep olmakta hem de uzun vadede ekolojik dengenin bozulmasına yol açmaktadırlar (Veziroğlu, 1998).

Toprağa karışan asit yağmurları toprağın pH derecesini yani asitlik-bazlık dengesini bozmaktadırlar. Buna bağlı olarak, toprağın mineral bakımından fakirleşmesine neden olmakta ve böylece topraktan alınacak makro ve mikro elementlerin derişiminin azalmasına yol açmaktadırlar. Dolayısıyla, bitkilerin ya da genel anlamda tarımın kalite ve verimini düşürmektedirler. Asit yağmurlarına herhangi bir şekilde maruz kalan bitkilerin yapraklarında epidermis ve palizat parankiması hücrelerinde çöküş, sünger parankiması hücrelerinde hipertrofi, fenolik bileşiklerin ve nişasta taneciklerinin biriktiği gözlemlenmekle birlikte, kutikula tabakasında parçalanma ve bekçi hücrelerinde de plazmoliz (büzülme) olayı görülebilmektedir. Asit yağmurları stomalarda da olumsuz etkilere sebep olarak fotosentez oranlarında düşüş meydana getirebilmektedirler. Asit yağmuruna maruz kalan bitkilerin biyomas oranlarında ciddi azalmalar meydana gelmektedir (Sant'Anna-Santos, Silva, Azevedo ve Aguiar, 2006; Fan ve Wang, 2000). Düşük pH koşullarına karşı daha duyarlı olan genç kök, yaprak ve sürgünler asit yağmurlarının toprak suyu, besin elementi bileşimi ve yapısını da bozmasından dolayı

zarar görebilmektedirler (Wood ve Borman, 1977). Kısaca özetlemek gerekirse, asit yağmuruna maruz kalan bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde azalma, kök uzunluğu ve boy uzunluğunda azalma, biyomas içeriğinde azalma, polen veya tohum çimlenmesinde azalma, bitkinin bağışıklığını düşürerek patojenlere karşı bitkiyi güçsüz bırakma, bitkinin fotosentez mekanizmasında bozulmalara yol açarak besin üretimini azaltma gibi pek çok olumsuz sonuç gözlemlenebilmektedir.

Asit yağmurları sulak alanların, toprağın, bitkilerin, hayvanların, insanların ve tarihi eserlerin olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır. Asit yağmurlarını oluşturan gaz partiküllerinin solunması halinde partiküller alveollerden kana karışarak akciğer kanamalarına sebep olmaktadır. Böylelikle insanlarda akciğer ve solunum yolu hastalıklarının meydana gelmesine sebep olan asit yağmurları insan sağlığı için ciddi bir önem arz etmektedir (Müezzinoğlu, 1987; Turan ve Gökalp, 1993). Asit yağmurları tarihi eserlerin ve cansız maddelerin boya ve yüzeylerinde aşınmalara sebep olmaktadır. Mermer, kireç gibi maddelerden yapılan tarihi eserlerin dış yüzeyleri asit yağmurunun aşındırıcı etkisi sebebiyle bozulmaya uğramaktadır (Eflatun, 1994).

2.1.3. Küresel iklim değişikliği

Küresel iklim değişikliği, dünya genelinde sıcaklık değerlerinin yükselmesine bağlı olarak hava hareketlerinin (yağış, nem ve kuraklık gibi) ve iklim öğelerinin değişmesi anlamına gelmektedir (Çepel, 2003). Nüfusun ve nüfusa bağlı tüketimin artması, fosil yakıt tüketiminde artış meydana gelmesi ve insan kaynaklı faaliyetler sebebiyle sera gazlarının atmosferde daha fazla birikmesi küresel iklim değişikliğine sebep olmaktadır. Küresel iklim değişikliğine sebep olan sera gazlarının atmosferde daha fazla birikmesine bağlı olarak yeryüzü ve atmosferin alt tabakalarında oluşan sıcaklık giderek artmaktadır. Küresel iklim değişikliği sonucunda kar ve buzullarda erime, deniz seviyelerinde yükselme, yağış çeşitleri, şiddetleri ve rejimlerinde değişimler meydana gelmektedir (Bayraç ve Doğan, 2016).

Küresel iklim değişikliğinden bitkiler önemli oranda etkilenmektedirler. Bitkilerin büyümesinde sıcaklık, yağış ve CO₂ konsantrasyonu doğrudan ilişkili olduğundan iklimde görülen değişiklikler sonucunda bu koşullar da ciddi oranda etkilenmektedir. Bazı bitki

türleri sıcaklık artışından olumlu yönde etkilenirken bazıları tam tersi olumsuz şekilde etkilenebilmektedir (Bakkenes, Eickhout ve Alkemade 2006; Clarke, 2007).

Çevre kirliliği ve küresel iklim değişikliğinin etkileri birleştiğinde canlıların yaşam koşullarının daha da bozulacağı öngörüsü, bu etkilerin belirlenmesine yönelik çalışmaların önemini açıkça ortaya koymaktadır.

2.2. Bitkilerde Stres

Bitkilerin hayatlarını sürdürdükleri alanlarda, büyüme ve gelişimlerini kısıtlayan, engelleyen ya da olumsuz etkileyen çevre koşulları bitkiler için stres faktörlerini oluşturmaktadır ve bu stres faktörleri bitkilere bağlı olarak uzun veya kısa süreli olabilmektedir (İnternet 1, t.y.). Bitkilerde su stresi, tuz stresi, sıcaklık stresi, hava kirliliği stresi ve ağır metal stresi gibi stres çeşitleri görülebilmektedir.

Su stresi, toprakta yeterli miktarda faydalı suyun bulunamaması veya toprak çözeltisinde tuz ve çözünen madde miktarının artmasına bağlı olarak bitkinin sudan yeterli miktarda yararlanamamasıdır. (Levitt, 1980; İnternet 1, t.y.). Su stresi bitkilerde, kök gelişiminin hızlanmasına bağlı olarak gövde ve toprak üstü kısımların gelişimini azaltmakta, yapraklarda sarı lekeler (nekroz) ve kloroz oluşturabilmekte ve böylece bitkinin büyüme ve gelişimini olumsuz etkilemektedir (Yüksel ve Aksoy, 2017; İnternet 1, t.y.).

Tuz stresi, toprakta bulunan çözünmüş tuz miktarının bitkinin tolerans sınırının üzerine çıkması durumunda oluşan strestir. Toprakta tuz içeriğinin artmasına bağlı olarak bitkinin su alımını kısıtlanmaktadır (Glenn, Brown ve Khan, 1997; İnternet 1, t.y.). Bitkide tuz stresi sonucunda kök büyümesi, tomurcuk oluşumu ve toprak üstü gelişiminde azalma meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra protein sentezi olumsuz etkilenmekte, zar geçirgenliği azalmakta ve bitkinin büyüme ve gelişimi olumsuz etkilenerek bitkinin verim ve kalitesi de önemli ölçüde azalmaktadır (Kwon, Mekapogu ve Kim, 2019).

Sıcaklık stresi, bitkilerin optimum düzeyin üstünde veya altındaki değerlerde sıcaklığa maruz kalmasıdır. Yüksek sıcaklık bitkilerde, nekroz (sarı lekelenme) oluşumuna, enzim aktivasyonunun bozulmasına, hücre yapılarının değişmesine sebep olmaktadır (Marcum, 1998). Düşük sıcaklık ise bitkinin hücreleri arasındaki boşlukta bulunan suyun donmasına

sebeup olarak suyun doku ve organlara taşınmasını olumsuz etkileyerek bitkinin su eksikliği yaşamasına sebeup olmaktadır (Korkmaz ve Durmaz, 2017).

Kirletici gazların belli bir eşik değerin üzerinde olduğu durumlarda bu gazlar bitki için stres oluşturmaktadır. Kirletici gazların konsantrasyonu arttıķa bitkiye verdikleri zarar da o derece artmaktadır (Nuhoğlu, 1996). Kirlilik bitkinin yapraklarında nekroza, klorofil miktarını azaltarak fotosentez reaksiyonlarında azalmaya sebeup olmakta ve boylice bitkinin büyüme ve gelişimini olumsuz etkilemektedirler (Pandey ve Agrawal, 1994).

2.3. Aspir Bitkisinin Genel zellikleri

Papatyagiller (Asteraceae) familyasına ait olan iki çenekli (Magnoliopsida) ve tek yıllık bir bitki olan aspir (*Carthamus tinctorius* L.); sarı, beyaz, krem gibi renkli çiçeklere sahiptir, fakat bitkinin olgunlaşma evrelerinde çiçeklerin tonları değişebilmektedir. Kazık kök sistemine sahip olan aspir bitkisinin kökleri yaklaşık 100-150 cm derine kadar inebilmektedir. Aspir bitkisinin yaprakları ana sap ve yan dallar üzerinde karşılıklı olarak dizilmektedirler. Yaprakların şekli dar ve uzun ayrıca kenarları testere şeklinde ve koyu renklidir, yapraklarda orta damar belirgindir (İnternet 2, t.y.).

Genellikle kurağa dayanıklı olan aspir, yaklaşık olarak %40'ın üzerinde yağ oranına sahip, oldukça verimli bir bitkidir (Babaoğlu, 2007). Aspir tohumlarındaki yağ içeriği çevresel koşullara, aspir tohumunun genotipine ve yapılan tarım koşullarına göre değişmektedir. Aspir tohumlarından elde edilen yağ diğer yağların içeriğinden daha kalitelidir. Aspir içeriğinden elde edilen doymamış yağ asidi insan sağlığı açısından önemli olup aspirdeki oranı oldukça yüksektir ve Linoleik yağ asidi (Omega-6) ve Oleik yağ asidi (Omega-9) olmak üzere iki önemli yağ asidi içermektedir. Linoleik (Omega-6) yağ asidi, yem ve kimya endstisinde kullanılan önemli bir ham maddedir. Oleik asit (Omega- 9) ise yapı itibariyle zeytinyağına yakın olup, yemek yapımında da kullanılabilecek niteliktedir (Babaoğlu, 2007; Koutroubas, Papakosta ve Doitsinis, 2009; Bölükbaşı, 2018).



Resim 2.1. Aspir bitkisi ve aspir yağı (İnternet 3, 2015).

Aspirin günümüzde henüz bilinen yaklaşık 25 yabani türü bulunmakla birlikte; bu yabani türlerden bazıları ülkemizde geniş alanlarda yayılış göstermektedir (Patel, J.S. ve Narayana, 1935; İlkdoğan, 2012). Aspir kendi kendine döllenebilen bir bitki olmasının yanı sıra, genotip çeşitleri ve çevre koşullarının değişimine bağlı olarak yabancı dölleme de gerçekleştirebilen bir kültür bitkisidir (Li ve Mündel, 1996).



Resim 2.2. Aspir bitkisi (Kayaçetin, Katar ve Aslan, 2012)

Genellikle ılıman bölgeleri tercih etse de kurak bölgelerde de yaşamını sürdürebilen aspir uzun gün bitkisidir. Aspirin yetiştirildiği yükseklik artırıldığında bitkinin veriminde ve yağ oranında azalma meydana gelmektedir (Quilantan , Villareal, Burgos ve Santos, 1977). Ayrıca, aspirin su tutma kapasitesi iyi olduğundan daha çok killi topraklarda yetiştirilmesi uygun bulunmaktadır (Bayramin, 2006). Aspirin yetiştirilebilmesi için toprağın pH değerinin 5-7 arasında olması, su tutma kapasitesinin yüksek ve derin olması gerekmekte ve iyi drenaja sahip kumlu veya killi topraklarda iyi yetiştirilebildiği bilinmektedir. Aspir ekildiği zamandan itibaren neme ihtiyaç duyduğu için iyi drenaja sahip olan ve

sıcaklık değeri yeterli olan toprak veya benzeri ortamlarda gelişimi olumlu yönde etkilenmektedir (Duke, 1983). Aspir bitkisi genellikle fide döneminde soğuğa, çiçeklenme döneminde sıcağa karşı hassasiyet göstermektedir (Yazdi- Samadi, Sarafi ve Zali, 1975).

Aspir, günümüzde tıbbi malzeme ve gıda sektöründe, tekstil, boya sanayi, kozmetik ürünler ve daha birçok alanda kendisini göstermektedir. Ayrıca, biyodizel üretiminde tercih edilen yağlı bitkiler arasındadır. Aspirin 100 kg'lık yağından yaklaşık 45 kg mazot, 15 kg benzin elde edilmesi, aspir bitkisinin stratejik öneminin artacağını göstermektedir (Taşlıgil ve Şahin, 2016). Aspir, yüksek yağ içeriği sebebiyle üretimi yapılan ülkelerde ekonomik açıdan da oldukça önem kazanmıştır. Ülkemizde aspir ithalatının neredeyse tamamı Rusya Federasyonu'ndan karşılanmaktadır (İnternet 5, 2019).

2.4. Aspir Bitkisinde *FAD2* Geni

FAD2 geni, bitkilerde oleik asidi (18:1 *cis*-9) linoleik aside (18:2 *cis*-9,12) çevirmekten sorumlu olan ve endoplazmik retikulumda görev alan *Delta-12 desatüraz*'ın kodlanmasından sorumlu olan bir gendir. *FAD2* geni ilk olarak *Arabidopsis thaliana* bitkisinden elde edilmiştir (Okuley, Lightner, Feldmann ve Yadav, 1994). *FAD2* geni keten, pamuk, pirinç, kolza gibi pek çok yağ içerikli bitkiden izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (Bölükbaşı, 2018). *FAD2* geninin ekspresyonunun engellenmesi gibi durumlar pek çok bitkide linoleik asitte azalmaya sebep olabilmektedir (Bölükbaşı, 2018).

FAD2 geni linoleik asidin üretiminden sorumlu, bitkilerin özellikle tohum gelişiminde tohumda yağ depolanmasını ve oleik asidin linoleik aside çevriminde oldukça etkilidir (Heppard, Kinney, Stecca ve Miao, 1996). *FAD2* geni aynı zamanda bitkilerde genellikle abiyotik streslere karşı bitkinin savunma mekanizmalarından biri olarak da etkinlik göstermektedir. Özellikle tuz stresine karşı tohum çimlenmesi ve erken gelişimde *FAD2* geninin olumlu etkisi gözlemlenmektedir (Zhang, Güneşi ve Li, 2012). Doymamış yağ asitlerinin birbirine dönüşümünü sağlayan bu gen ailesi, yüksek ifade değerleri bitkinin farklı organ ve dokularında olabilmektedir. *FAD3* geni genellikle bitkinin çiçeğinde, *FAD7* ve *FAD8* daha çok yaprak ve köklerde yüksek ifade değerine sahiptir (Guan, Wu, Hu ve Li 2014; Bölükbaşı 2018).

FAD2 gen ailesindeki genlerin mutasyona uğramaları sonucunda oluşan ve fonksiyonlarını kaybeden yeni gen formlarında tuz stresine karşı aşırı duyarlılık oluşmaktadır. Bu duyarlılık vakuol ve plazmada Na^+/H^+ aktivitesinde azalma meydana getirmekte ve bu formlarda sitosolik sodyum (Na^+) birikimi oluşmaktadır. *FAD2* gen ailesi, tuz stresi ve osmotik streslere karşı fazla duyarlı olduğundan özellikle *Arabidopsis thaliana* türünde vakuol ve plazma zarının Na^+/H^+ aktivitesinde rol oynayarak sitosolde Na^+ derişiminin azalmasına sebep olmaktadır. Bu durum tohum çimlenmesi ve erken fide gelişimi esnasında bitkinin tuza karşı dayanıklılık kazanmasını sağlamaktadır (Zhang ve diğerleri, 2012).



3. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu çalışmada, asit yağmuru ve ağır metal (Cu) streslerinin seçilen aspir (*Carthamus tinctorious L.*) çeşitlerinde (LİNAS, BALCI ve BDYAS-04) oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olan *FAD2* geninin mRNA ifade seviyelerine ve bazı ekofizyolojik özellikler üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürde kısmen araştırma konusu ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, özellikle asit yağmurlarının bitkiler üzerine etkileri konusunda az sayıda çalışma olduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan araştırmaların pek çoğu ağır metal stresinin etkileri konusunda yoğunlaşmıştır.

Çalışma konusunun bir bölümünü oluşturan asit yağmuru simülasyonunun aspir üzerine etkilerinin çalışıldığı Gadallah (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, HCl ve H₂SO₄ çözeltileri püskürtülen aspir bireylerinde klorofil, çözünür şeker, hidrolize edilebilir karbonhidrat, çözünür protein, toplam serbest amino asit miktarlarının ve sürgün ve kök biyomasının daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak, HNO₃ çözeltisi uygulanan bitkilerde bunun tersi olmuştur.

Gilbert, Knights ve Potter (2008) yaptıkları çalışmada aspirin dünyadaki yetiştirilme bölgelerini araştırmış, ayrıca mahsul sistemlerinde üstlendiği rolü açıklamış ve mahsulün performans ve yönetimini karşılaştırmıştır. Çalışmada Kuzey ve Güney Yarım Küre’de 23 ve 50 derece enlemleri arasında aspir yetiştirilebileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Baran (2018) yaptığı çalışmada aspirin yerel ve atasal tohumlarının genotipinde nikel toleransını araştırmıştır. Çalışma sonucunda, aspir genotiplerinde nikel birikiminin fazla olmasına bağlı olarak köklerde daha fazla olmakla birlikte sürgün biyokütlesinde de azalış meydana geldiği saptanmıştır. Aynı zamanda, aspirin nikeli köklerinde biriktirme oranının fazla olması sebebiyle nikel oranı fazla olan toprakların remediasyonunda kullanılmalarının mümkün olabileceği sonucuna da ulaşılmıştır.

Gülmezoğlu ve Aytaç (2016) aspir bireylerine toprak ve yapraktan uygulanan çinko ve çinko sülfat kaynağının aspir bitkisinin verimi ve çinko içeriğine etkisini araştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre farklı çinko kaynakları ve uygulamalarının asperde tane verimini artırdığı belirlenmiştir.

Angelova, Perifanova-Nemska, Uzunova ve Kolentsova (2016) aspirin vejetatif ve genaratif organlarında ağır metal birikimini incelemiş ve buna bağlı olarak fitoremediasyon amaçlı kullanım için karşılaştırmalar yapmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre aspirin ağır metallerle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonunda oldukça kullanışlı olacağı ifade edilmiştir.

Namjooyan, Khavarinejad, Bernard ve Namdjoyan (2012) çalışmalarında, farklı konsantrasyonlardaki kadmiyum muamelesi ile yetiştirdikleri aspir kültürlerinde büyüme, kadmiyum birikimleri ve antioksidatif yanıtları araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda antioksidan enzim aktivitesinin 75 μ M Cd konsantrasyonuna kadar önemli ölçüde arttığı ve Cd ile tedavi edilen kallilerde artan bu antioksidan seviye ve antioksidan enzim aktivitesinin, aspir kallusundaki kadmiyum detoksifikasyonunun ve birikiminin bu mekanizmaların etkinliği ile ilişkili olabileceğini göstermekte olduğu sonucuna varılmıştır.

Moosavi, Gharineh, Afshari ve Ebrahimi (2012) yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlardaki ağır metal çözeltilerinin aspir, buğday ve kanola çeşitlerinde tohum çimlenme özellikleri ve fitoremediasyon potansiyeli üzerine araştırma yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada 50, 200, 350, 500 ve 1000 ppm değerlerine sahip ağır metal solüsyonlarında yetiştirilen bu üç bitkinin tüm uygulamalarda konsantrasyonun artmasına bağlı olarak tohum çimlenme yüzdesi ve kök ve sürgün uzunluklarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Hatta 1000 ppm değerine sahip ağır metal solüsyonunda bitki büyümesine rastlanmadığına dair sonuçlar belirtilmiştir.

Li, Zhang, Gao ve Zhao, (2015) çalışmalarında aspir bitkisinin maruz kaldığı bakır ve kurşun oranı ve buna bağlı olarak aspir bitkisinde meydana gelen değişimleri araştırmıştır. Fide, dallanma ve çiçeklendirme aşamalarında bitki büyümesi ve gelişimi, GSH seviyesi ve GSH_2 ifade hızı incelenmiştir. Bu çalışmada bakır içeren ağır metal konsantrasyonunun düşük olduğu değerlerde bitki boyunda ve kök uzunluğunda artış gözlemlenirken bakır konsantrasyonunun artmasıyla bitki boyu, kök uzunluğu ve yanal kök sayılarında kademeli olarak azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Konsantrasyon değeri düşük tutulan bakır çözeltisi uygulanan örneklerin fide aşamasında ve dallanma sırasında GSH içeriğinde artış görülmüş ancak ağır metal konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak kök ve yapraklarda GSH içeriğinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

Real Time-PCR analiz sonucu incelendiğinde artan metal konsantrasyonu ve ifade seviyeleri arasında negatif korelasyon olduğu saptanmış ve sonuç olarak aspir bitkisi düşük konsantrasyonda kısa süreli maruz kaldığı ağır metal solüsyonlarında normal bitki büyümesini korumak için GSH sentezini artırırken yüksek konsantrasyon ve uzun süreli ağır metale maruz kalması durumunda GSH sentezini azalttığı gözlemlenmiş ve ağır metalin bitkide toksisite meydana getirdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Sayyad, Afyuni, Mousavi ve Abbaspour (2009) tarafından yapılan çalışmada farklı köklenme sistemlerine sahip olan aspir ve buğday bitkilerinde toprakta ağır metale karşı bitkilerin yetiştirilmesindeki etkiler incelenmiştir. Çalışma aynı birim toprakta bulunan aspir ve buğday tarlasından elde edilen 50 cm bozulmamış toprak kolonları kullanılarak gerçekleştirilmiş ve 15, 585, 117 ve 1094 mg/kg konsantrasyonlardaki ağır metallerle muamele edilmiştir.

Gautam, Anjani ve Srivastava (2016) yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 μ M) bakır uygulamalarının aspir bireylerinin gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu uygulamada 20 gün boyunca bitkilere bakır stresi uygulanmış ve etkiler incelenmiştir. Uygulama sonunda bakır konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak aspir bireylerinde bitki büyümesi, taze ve kuru ağırlıklarda azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, enzimatik olmayan antioksidanlarda (flavonoidler ve polifenol) önemli derece artış meydana geldiği ve yapraklarda prolin birikiminin arttığı saptanmıştır. Bitkiler tarafından kullanılan bakırın bitkide meydana getirdiği toksik etki ve değişikliklerin bakır miktarına ve maruz kalma süresine bağlı olarak değiştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Kafkasyalı (2021) yaptığı çalışmada yüksek konsantrasyonlardaki bakırın bitki morfolojisi, fizyolojisi ve biyokimyası üzerindeki etkilerini araştırmıştır ve bunun yanı sıra bakır toksisitesinin transkripsiyonel seviyede etkilerini incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda, bakırın temel ve toksik seviyelerinin, farklı redoks durumları ve çeşitli toprak koşullarının bitki türlerine göre farklılık gösterebileceği tespit edilmiştir. Ayrıca Cu^+ ve Cu^{+2} arasındaki biyotransformasyon ve bununla ilişkili toksisitenin farklı bitki türleri arasında büyük ölçüde farklılık gösterdiği de belirtilmiştir.

Kocaman (2019) yaptığı doktora tez çalışmasında iki farklı fasulye çeşidinde kurşun, bakır ve kadmiyum streslerine bağlı olarak gen ifade profillerini karşılaştırmayı amaçlamış ve bu

bağlamda CAMTA ve YABBY genlerini tercih etmiştir. Bakır streslerinde farklı konsantrasyon değerleri kullanmış ve iki farklı fasulye çeşidinden alınan yaprak örnekleri qr-PCR metoduyla gen ifade düzeyleri belirlenerek aktin genine göre normalizasyonu sağlanmıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen sonuçlara göre farklı bakır konsantrasyonlarına maruz kalan örneklerin hedef genlerin ifadesinde kontrol grubuna göre önemli farklılıklar meydana geldiği gözlemlenmiş ve bakır stresinin Akman-98 çeşidi olan fasulye çeşidinde gen ifade düzeyinde artış meydana getirdiği ancak Önceler-98 fasulye çeşidinde azalışa neden olduğu belirtilmiştir.

Bölükbaşı (2018) doktora tezinde farklı konsantrasyon değerlerine sahip bakır stresine maruz kalan 4 farklı aspir çeşidinde kök, kotiledon ve yaprak örneklerindeki oleik asidin linoleik aside dönüşmesinden sorumlu olan *FAD2* geninin ifade düzeylerini Real-Time PCR yöntemi ile incelemiştir. Bitki yetiştirme kabinde 21 günlük süreyle yetiştirilen aspir çeşitlerine farklı konsantrasyon değerlerinde (0, 40, 80, 160, 320, 640 mg/L) bakır stresi uygulanmış ve örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR analizleri yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgulara göre, bakır konsantrasyonlarının artmasına paralel olarak gen ifade seviyelerinde azalma gözlenmiş; ancak 160 ve 320 mg/L olan bakır konsantrasyon değerlerinde gen ifade seviyelerinde artış meydana geldiği belirtilmiştir. Aspirde ağır metal streslerine karşı oluşturulan savunma mekanizmasında *FAD2* geninin de önemli rol oynadığının tespit edildiği belirtilmiştir.

Fu ve Tian (2006) yaptıkları çalışmada asit yağmurlarının bitkiler üzerindeki morfolojik etkilerini, bitki fizyoloji ve biyokimyasını ve aynı zamanda stres fizyolojisini ne şekilde etkilediğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre, asit yağmurlarının bitkinin yapraklarındaki organeller üzerine etkili olduğu, mezofil dokularını ve bitkinin çiçeklerini aşındırarak tahrip ettiği, bitkinin fotosentez reaksiyonlarında ve azot metabolizması üzerinde önemli etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca çalışma sonuçlarında asit yağmuru simülasyonunun bitkinin üreme fonksiyonlarının inhibisyonunu sağladığı belirtilmektedir.

Sosse ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada salatalık bireylerini 5 günlük bakır stresine maruz bırakmış ve bakırın bitki gelişiminde meydana getirdiği etkileri incelemişlerdir. Uygulama sonuçlarına bakıldığında, bakır miktarının fazla olduğu yaprakta yaprak genişliğinin azaldığı ve buna bağlı olarak fotosentez hızında daha belirgin bir düşüş

olduğu, köklerde nişasta ve sakkaroz yapılarının istenilen düzeyde oluşmadığı ancak yapraklarda sınırlı düzeyde oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, kökler ve yaprak arasındaki iyon geçişlerinin (K^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2}) taşınma yönünün bakır miktarına göre değışkenlik gösterebileceğı ve buna bağılı olarak potasyum iyon alımının azalmasının yaprak genişliğı inhibisyonunda önemli derecede etkili olduğu sonucuna ulaşıldığı belirtilmiştir.

Maksymiec ve Krupa (2007) ağır metal stresleri ile muamele edilen bitkilerin bu streslere karşı verecekleri yanıtları incelemek üzere çalışmalarında çalı fasulyesi, soğan ve mısır bitkilerini kullanarak bu bitkileri 25 ve 150 μM Cu çözeltisi ve 50 μM metil jasmonat çözeltisine maruz bırakmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, her iki stres faktörü de bitkilerde kök büyümesini önemli oranda azaltmış ve bu streslerin bitki büyümesinde önemli bir engelleyici etken olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, bu streslerin bitki direncini kırarak bitkinin yaşlanmasını da hızlandırdığını belirtmişlerdir.

Houshmandfar ve Moraghebi (2011) yaptıkları çalışmada ağır metal streslerinin aspir tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimine etkilerini araştırmak üzere kadmiyum (Cd), bakır (Cu), nikel (Ni) ve çinko (Zn) gibi ağır metaller kullanarak ağır metal stresi oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, ağır metallerin aspir fidelerinde ölümcül etkiler yarattığına ulaşılmış, buna bağılı olarak da ağır metallerin toksik etki oluşturarak tohum çimlenmesi ve fide büyümesinde son derece olumsuz etkiler yarattığı sonucuna ulaşılmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal Temini

Aspirin günümüzde bilinen 25 yabancı türü bulunmaktadır. Ancak yerli türleri de mevcuttur. Yerli türlerine örnek olarak Yenice, Dinçer, Yekta, Remzibey-05, Balcı, Linas verilebilmektedir (İnternet 6, t.y.). Bu çalışmada materyal olarak aspir çeşitleri tercih edilmiştir. BALCI, LİNAS ve BDYAS-04 olmak üzere 3 farklı aspir çeşidi kullanılmış ve bu aspir çeşitleri Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden alınmıştır (Bölükbaşı, 2018). Ekofizyolojik parametrelere ait bulgular için kurulan deney setinde, iklim odası koşullarında en iyi gelişen LİNAS ve BDYAS-04 çeşitleri kullanılmıştır. Moleküler çalışmalar için ise deney setlerinde BALCI, LİNAS ve BDYAS-04 çeşitleri kullanılmıştır.

4.2. Ekofizyolojik Etkilerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan Deney Planı

Cu ve asit yağmuru streslerinin seçilen ekofizyolojik özellikler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 4.1'de gösterilen şekilde deney seti kurulmuştur. Böylece, ekofizyolojik özelliklerin incelenmesi için iki farklı aspir çeşidi ve toplam 78 saksı kullanılarak deney düzeneği oluşturulmuştur.

Çizelge 4.1. Ekofizyolojik özelliklerin incelenmesi için oluşturulan deney düzeneği

ASPIR ÇEŞİTLERİ	KONTROL GRUBU	Cu STRESİ GRUBU	ASİT YAĞMURU STRESİ GRUBU	Cu STRESİ + ASİT YAĞMURU GRUBU	
LİNAS	3 tekrar	25 ppm x 3 tekrar	2,5 pH x 3 tekrar	50 ppm + 2,5 pH x 3 tekrar	100 ppm + 2,5 pH x 3 tekrar
		50 ppm x 3 tekrar	3,5 pH x 3 tekrar	50 ppm + 3,5 pH x 3 tekrar	100 ppm + 3,5 pH x 3 tekrar
		100 ppm x 3 tekrar	4,5 pH x 3 tekrar	50 ppm + 4,5 pH x 3 tekrar	100 ppm + 4,5 pH x 3 tekrar
BDYAS-04	3 tekrar	25 ppm x 3 tekrar	2,5 pH x 3 tekrar	50 ppm + 2,5 pH x 3 tekrar	100 ppm + 2,5 pH x 3 tekrar
		50 ppm x 3 tekrar	3,5 pH x 3 tekrar	50 ppm + 3,5 pH x 3 tekrar	100 ppm + 3,5 pH x 3 tekrar
		100 ppm x 3 tekrar	4,5 pH x 3 tekrar	50 ppm + 4,5 pH x 3 tekrar	100 ppm + 4,5 pH x 3 tekrar



Resim 4.1. Ekofizyolojik etkilerin incelenmesi için oluşturulan deney düzeneği

4.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Ekofizyolojik özelliklerin belirlenmesi amacıyla kullanılan LİNAS ve BDYAS-04 aspir çeşidi tohumlarında, %70 alkol, %30 sodyum hipoklorit kullanılarak tohum yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Distile su yardımı ile ıslatılan ve havalandırılan perlitler kullanılacak plastik saksılara doldurulmuş ve plastik saksıların altları delinmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılan aspir tohumları her saksıda 15'er adet olacak şekilde homojen olmasına dikkat edilerek perlit içeren saksılara ekilmiştir.



Resim 4.2. Aspir tohumlarının ekimi

Ekim işlemi tamamlandıktan sonra, LİNAS ve BDYAS-04 aspir çeşitleri 19 gün sürecek büyüme dönemi için iklim odasında ilk 48 saati karanlığa, sonraki günlerde ise 16 saat (25 °C, %70 nem) ışığa, 8 saat (22 °C, %60 nem) karanlığa maruz bırakılmıştır. Aspir çeşitleri ilk 5 sulamada ağır metal içermeyen 1X Hoagland çözeltisi ile, son 4 sulamada ise belirlenen konsantrasyonlardaki (Cu stresi, asit yağmuru simülasyonu ve Cu stresi+ asit yağmuru simülasyonu) streslere bağlı olarak iki günde bir olacak şekilde sulanmış ve 19 günlük sürede yetiştirilmiştir.

Çalışmanın moleküler analizleri için tercih edilen LİNAS, BALCI ve BDYAS-04 tohumlarının tohum yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlar distile su yardımıyla ıslatılıp havalandırılan perlit malzemesinin bulunduğu 3 farklı kabın her birine homojen dağılma gösterecek şekilde ekilmiş ve bitki büyütme kabininde 16 saat (25 °C, %70 nem) gündüz, 8 saat (22 °C, %60 nem) gece döngüsü şeklinde ağır metal içermeyen 1X Hoagland solüsyonu ile gün aşırı sulanarak 21 günlük sürede yetiştirilmiştir.



Resim 4.3. Aspir bireylerinin yetiştirilmesi

4.2.2. Cu ve asit yağmuru streslerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Aspir tarımında kullanılan kimyasallar içerisinde yoğun miktarda bakır olması sebebiyle ağır metal stresi için bakır tercih edilmiştir.

Cu çözeltilerinin hazırlanması: Ekofizyolojik çalışmalar için bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) katısı 1X Hoagland çözeltisinde 1 litreye tamamlanacak şekilde çözdürülmüş ve 500 ppm değerinde bakır çözeltisi stoğu oluşturulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda uygulanacak olan Cu çözeltileri $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü kullanılarak hazırlanmıştır. Formülde:

C1: Stok çözeltinin konsantrasyon değeri,

V1: İstenilen konsantrasyonda hazırlanacak çözeltinin hacmi,

C2: İstenilen çözeltinin konsantrasyon değeri,

V2: 1 litrelik 1X Hoagland çözeltisi hacim değeridir. Bu formüle göre istenilen konsantrasyonda hazırlanacak Cu çözeltileri için gerekli hacimler ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Moleküler analizlerde kullanılan Cu çözeltilerinin hazırlanması: Mavi kapaklı cam şişe içerisine bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) katısından 7,86 g tartılıp üzerine distile su eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır. Oluşan bu stok çözeltinin konsantrasyon değeri 2000 ppm şeklindedir. Oluşturulan stok bakır çözeltisinden deneyde kullanılacak farklı konsantrasyon değerlerine göre (25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L ve 1000 mg/L) 1X Hoagland çözeltisinde seyreltme işlemi yapılarak istenilen konsantrasyonlarda bakır çözeltisi hazırlanmıştır.

Asit yağmuru simülasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanması: Asit yağmuru simülasyonu için toplamda 5 litrelik asit yağmuru stoğu hazırlanmıştır. Bu stok 4:1 oranında 1 mmol/L⁻¹ sülfürik asit (H_2SO_4) ve 1mmol/L⁻¹ nitrik asit (HNO_3) karışımı ile oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılacak asit yağmuru konsantrasyonları 2,5 pH, 3,5 pH ve 4,5 pH olacak şekilde, asit yağmuru stok çözeltisini 1X Hoagland çözeltisi ile seyreltme işlemi uygulanarak hazırlanmıştır.

4.2.3. Cu ve asit yağmuru simülasyonu uygulamaları

Cu ve asit yağmuru simülasyonlarının ilgili aspir çeşitlerinde seçilen ekofizyolojik özellikler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için kurulan deney düzeneğinde aspir fidelerine Cu ve asit yağmuru simülasyonu uygulanmıştır. Bitkilerin sulanmaya başlamasından itibaren 5. Sulama işlemi dahil olmak üzere tüm gruplar yalnızca 50 ml 1X Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. 6. sulama işleminde kontrol grubu 100 ml Hoagland çözeltisi ile, Cu stresine maruz kalacak gruplar (deney düzeneğinde belirlenen

konsantrasyonlara göre) 100 ml Cu çözeltisi ile, asit yağmuru + Cu içeren karma gruplar (belirlenen konsantrasyon ve çeşitlere göre) 50 ml Cu çözeltisi + 50 ml asit yağmuru çözeltisi ile, asit yağmuru simülasyonuna maruz kalacak gruplar da (belirlenen pH değerleri konsantrasyonlarına göre) 100 ml asit yağmuru çözeltisi ile sulanmıştır. 7. sulama işleminden itibaren bitkiler; kontrol grubu 50 ml 1X Hoagland çözeltisi ile, Cu stresine maruz kalacak gruplar (belirtilen konsantrasyon farklarına göre) 50 ml Cu çözeltisi ile, asit yağmuru simülasyonuna maruz kalacak gruplar (belirlenen pH değeri konsantrasyonlarına göre) 50 ml asit yağmuru ile, asit yağmuru+ Cu içeren karma gruplar (belirlenen konsantrasyon ve çeşitlere göre) 25 ml Cu çözeltisi+ 25 ml asit yağmuru çözeltisi ile sulanmıştır. Böylece bitkiler son 8 günde 4 kez strese maruz bırakılacak şekilde toplamda 9 defa sulanmıştır.

Moleküler analizler için bitki büyütme kabinde 21 gün süre büyütülen aspir çeşitleri 21. günün sonunda bitki büyütme kabinden çıkarılarak 3 farklı kaba alınmış ve her bir kaba 10 tane aspir bireyi konularak 3'er tekrar yapılmıştır. LİNAS , BALCI ve BDYAS-04 çeşitleri 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm olan farklı konsantrasyonlardaki Cu stresi, Cu çözeltisi+ asit yağmuru çözeltisi içeren karma gruplar uygulanan asit yağmuru ve Cu stresi (2,5 pH+250 ppm Cu çözeltisi, 2,5 pH+500 ppm Cu çözeltisi, 2,5 pH+1000 ppm Cu çözeltisi; 3,5 pH+250 ppm Cu çözeltisi, 3,5 pH+500 ppm Cu çözeltisi, 3,5 pH+1000 ppm Cu çözeltisi; 4,5 pH+250 ppm Cu çözeltisi, 4,5 pH+500 ppm Cu çözeltisi ve 4,5 pH+1000 ppm Cu çözeltisi) ve 2,5 pH, 3,5 pH ve 4,5 pH konsantrasyonlarındaki asit yağmuru simülasyonları için ayrılarak kaplar etiketlenmiş ve bu etiketlemelere göre aspir çeşitleri 24 saat boyunca Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonlarına maruz bırakılmıştır. 24 saatlik bu stres uygulamasının ardından konsantrasyon ve streslere göre etiketlenen fideler saf su yardımıyla yıkanarak hasat edilmiştir. Daha sonra aspir fidelerinin yaprak, kök ve kotiledon kısımlarından doku örnekleri alınmış ve sıvı azot ile muamele edilip stres ve konsantrasyon değerlerine göre hangi dokuya ait olduğu da dikkate alınmak suretiyle yeni bir etiketleme işlemi yapılmıştır. Alınan örnekler -80°C'de RNA izolasyon işlemine kadar saklanmıştır.

4.3. Ekofizyolojik Parametrelerin Ölçümü

4.3.1. Çimlenen tohum sayısı

Deney setlerinde yer alan her saksıdaki çimlenen tohum sayıları deney sonuna kadar takip edilerek belirlenmiştir.

4.3.2. Bitki boyu ölçümleri

LİNAS ve BDYAS-04 çeşitlerinin stres öncesi ve stres sonrası bitkilerin boy uzunlukları cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir. 19. gün sonunda bitkiler hasat edilmiş saf suyla yıkanarak perlitlerden ayrılmıştır. Her gruptaki bitkilerin tek tek toprak üstü ve toprak altı boy uzunlukları ölçülmüş ve kaydedilmiştir.



Resim 4.4. Aspir bireyleri hasat edildikten sonra toprak üstü ve kök uzunluğu ölçümü

4.3.3. Yaş ve kuru ağırlık ölçümü

Her bir deney setinde aspir bireylerinin toprak üstü yaş ağırlıklarının belirlenmesi için her saksıdan 3 adet fide alınarak hemen hasat sonrası hassas terazi yardımıyla ölçülüp ağırlıkları kaydedilmiştir. Fidelerin toprak altı kısımları da hassas terazi yardımıyla ölçülerek ağırlıkları belirlenmiştir. Yaş ağırlık ölçümleri yapıldıktan sonra toprak altı ve toprak üstü kısımlar hazırlanan kese kağıtlarına konarak kuru ağırlık ölçümü için sabit

ağırlığa gelinceye kadar etüvde 65 °C’de kurutulmuştur. Kurutulan numuneler hassas terazi ile ölçülüp kuru ağırlıklar kaydedilmiştir.



Resim 4.5. Numunelerin kurutma işlemi

4.3.4. Klorofil-a, b ve karetenoid miktarının belirlenmesi

Her grup için aspir bireylerinden 0,20 g taze yaprak örneği tartılarak cam tüplerine konulmuştur. Daha sonra içerisine 2 ml %96 aseton konularak homojenizatör ile çözelti haline getirilmiştir. Homojen hale getirilen çözelti içerisine 8 ml daha aseton eklenerek 10 ml’ye tamamlanmıştır. Elde edilen numuneler mavi bant filtre kâğıdı ile süzülerek çözelti elde edilmiştir. Çözeltilerin absorbans değerleri (A: 662, 645 ve 470 nm) spektrofotometrede okunmuş ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. Klorofil a, b ve karetenoid miktarları aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Lichtenthaler ve Wellburn, 1983; Akçin, 2017).

$$\text{Klorofil a (Kla)} = (11.75 \times A_{662} - 2.35 \times A_{645}) \times 10 / 200 \text{ mg TA}$$

$$\text{Klorofil b (Klb)} = (18.61 \times A_{654} - 3.96 \times A_{662}) \times 10 / 200 \text{ mg TA}$$

$$\text{Total Karotenoid} = (1000 \times a_{470} - 2.227 \times K_{la} - 81. \times K_{lb}) / 227 \times 10 / 200 \text{ mg TA}$$

4.4. Moleküler Analizler İçin Deney Planı

Moleküler deneylerde kullanılmak üzere LİNAS, BALCI ve BDYAS-04 aspir çeşitleri tercih edilmiştir. LİNAS, BALCI ve BDYAS-04 çeşitleri için 1'er saksı kontrol grubu oluşturulmuştur. Moleküler analizler için oluşturulan deney düzeneği Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

4.4.1. Total RNA izolasyonu

-80 °C'lik dondurucuda muhafaza edilen örnekler total RNA izolasyon işlemi için hazırlanmıştır. Öncelikle her deney grubu için kök, kotiledon ve yaprak dokularından yaklaşık 100 -150 mg kadar alınarak havanda sıvı azot eklenerek ezilmiştir. Ezilen her örnek 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktararak üzerine 1 ml Nucleozol eklenmiş ve etiketlenmiştir. Etiketlenen bu örnekler kuvvetlice (elle) sallanarak içerisindeki numunenin karışması sağlanmıştır. Bu işlemden sonra vortekslenip oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 300 µl kloroform eklenerek her biri en az 10'ar saniye kadar vorteks ile karıştırılmıştır. Vorteks işlemine maruz bırakılan tüm örnekler sınıflandırılarak 16.000 rpm'de 4 °C'de 15 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerde üç faz görülmektedir. Bu üç fazdan üstteki şeffaf olan faz alınarak yeni tüpe aktarılmış ve üzerine 400 µl izopropil alkol eklenmiştir. Bu işlemden sonra örnekler tekrar yaklaşık 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra tekrar 16.000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüjleme işlemi yapılmış ve tüpün dibindeki pellete (beyaz) dikkat edilerek sıvı kısım dökülmüştür. 0,75 ml %70'lik EtOH hazırlanarak örneklerin bulunduğu tüpler içerisine aktarılıp vortekslenmiştir. Alkol konulan bu örneklerle tekrar 16.000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Tüm bu işlemlerden sonra tüplerin içerisindeki alkol boşaltılarak tüplerin ağzı açık kalacak şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplerin içerisine 100 µl duble distile su (ddH₂O) eklenerek pelletin suda çözünmesi (55 °C'de 15 dk inkübasyon yapılarak) sağlanmıştır (Chomczynski ve Mackey, 1995 TRIGent protokolü esasına dayalı yapılmıştır). Bu işlemlerden sonra tüm örnekler -40 °C'de dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Çizelge 4.2. Moleküler analiz için oluşturulan deney düzeneği

ASİR ÇEŞİTLERİ	KONTROL GRUBU	Cu STRESİ GRUBU		ASİT YAĞMURU STRESİ GRUBU	Cu+ASİT YAĞMURU STRESİ GRUBU		
LİNAS	1 SAKSI	25 ppm x 1 saksı	250 ppm x 1 saksı	2,5 pH x 1 saksı	250 ppm+2,5 pH x 1 saksı	500 ppm+2,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+2,5 pH x 1 saksı
		50 ppm x 1 saksı	500 ppm x 1 saksı	3,5 pH x 1 saksı	250 ppm+3,5 pH x 1 saksı	500 ppm+3,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+3,5 pH x 1 saksı
		100 ppm x 1 saksı	1000 ppm x 1 saksı	4,5 pH x 1 saksı	250 ppm+4,5 pH x 1 saksı	500 ppm+4,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+4,5 pH x 1 saksı
BALCI	1 SAKSI	25 ppm x 1 saksı	250 ppm x 1 saksı	2,5 pH x 1 saksı	250 ppm+2,5 pH x 1 saksı	500 ppm+2,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+2,5 pH x 1 saksı
		50 ppm x 1 saksı	500 ppm x 1 saksı	3,5 pH x 1 saksı	250 ppm+3,5 pH x 1 saksı	500 ppm+3,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+3,5 pH x 1 saksı
		100 ppm x 1 saksı	1000 ppm x 1 saksı	4,5 pH x 1 saksı	250 ppm+4,5 pH x 1 saksı	500 ppm+4,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+4,5 pH x 1 saksı
BDYAS-04	1 SAKSI	25 ppm x 1 saksı	250 ppm x 1 saksı	2,5 pH x 1 saksı	250 ppm+2,5 pH x 1 saksı	500 ppm+2,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+2,5 pH x 1 saksı
		50 ppm x 1 saksı	500 ppm x 1 saksı	3,5 pH x 1 saksı	250 ppm+3,5 pH x 1 saksı	500 ppm+3,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+3,5 pH x 1 saksı
		100 ppm x 1 saksı	1000 ppm x 1 saksı	4,5 pH x 1 saksı	250 ppm+4,5 pH x 1 saksı	500 ppm+4,5 pH x 1 saksı	1000 ppm+4,5 pH x 1 saksı



Resim 4.6. Total RNA İzolasyonu işlemleri

RNA'lar izole edilirken Nukleozol protokolü dikkate alınmıştır. Elde edilen RNA'ların Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılarak saflık ve miktar tayinleri belirlenmiş ve izole edilen RNA'lar için %1,2'lik agaroz jel elektrofezi kullanılarak RNA'ların kalitesi belirlenmiştir (Chomczynski ve Mackey 1995; Bölükbaşı 2018).

4.4.2. DNaz uygulaması

Total RNA izolasyonu işlemlerinden elde edilen RNA örnekleri karşılaşılabilecek herhangi bir DNA bulaşmasına karşı DNase enzimi (Thermo Scientific EN0521) ile muamele edilmiştir. Muamele işleminden sonra Çizelge 4.3'te gösterilen bileşenler RNase free tüpe aynı sıra ile eklenmiştir.

Çizelge 4.3. RNase free tüpe eklenecek bileşenler ve miktarları

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

Bileşenler eklendikten sonra RNase free tüpler 37 °C’de yaklaşık 60 dk bekletilmiş ve bekletilen tüplere 1 µL 50 mM EDTA eklenmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra DNase inhibasyonu için 65 °C sıcaklıkta 10 dakika bekletme işlemi gerçekleştirilmiştir (Bölükbaşı, 2018).

Agaroz konsantrasyonu %1,2 ve 0,5 µl/ml etidyum bromür içeren jel kullanılmış, 1X TBE (Tris borat EDTA) tamponunda 5V/cm şeklinde takriben 75 dk koşturularak Agaroz jel elektroforezi analizi yapılmıştır. RNA’larda bu işlemin yapılmasında kontrol ve teyit etme amaçlanmıştır.

4.4.3. cDNA (Komplementer DNA) sentezi

ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (BioLabs Inc.) kullanılarak cDNA sentezi işlemi yapılmıştır. Çalışmada tercih edilen Anchored-oligo(dT)₁₈ primerinin kullanılmasındaki amaç; *FAD2* ve aktin (ACT) genlerinin uzun olmasından kaynaklanmaktadır. cDNA sentezi işleminde ilk aşamada total RNA primer karışımı oluşturulmuş ve oluşturulan karışımın içeriği ve uygulanan derişim değerleri soğuk zincir içinde 0,2 mL’lik tüplere Çizelge 4.4’te gösterildiği şekil ve sırayla eklenmiştir (Bölükbaşı, 2018).

Çizelge 4. 4. Primer karışıma ait içerik ve derişim değerleri

İçerik	Son Derişimler
anchored-oligo(dT) ₁₈ (50µM)	2 mikrolitre
Total RNA	1-6 mikrolitre
ddH ₂ O	Toplam hacim 8 mikrolitre’ye tamamlanır

RNA’nın ikincil yapısının denatürasyonunu sağlamak amacıyla Total RNA-primer karışımı 65 °C’ de 10 dk. boyunca Biorad markalı ısı döngü cihazında bekletilmiş ve elde edilen örneklerin buz üzerine alınması sağlanarak ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirmek üzere Çizelge 4.5’te belirtilen bileşenler buz üzerinden alınmamasına dikkat edilerek sırasıyla eppendorf tüplere aktarılmıştır.

Çizelge 4.5. Ters transkripsiyon reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları

Maddeler	Miktar
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	2 mikrolitre
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	10 mikrolitre

Yukarıdaki çizelgede gösterilen bileşenler kullanılarak hazırlanmış olan tüpler pipetaj işlemi uygulandıktan sonra santrifüj işlemine tabii tutulmuş ve Biorad marka ısı döngü cihazında Çizelge 4.6'daki program kullanılarak ters transkripsiyon işlemi yapılmıştır.

Çizelge 4.6. Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirileceği program

Primer	Hedef mRNA	Bekletme Süresi
Anchored-oligo(dT)18 primer	4 kb'a kadar	70 °C'de 5 dk
		42 °C'de 60 dk
		80 °C'de 5 dk

Ters transkripsiyon işlemi sonucunda oluşan cDNA örnekleri Real-time PCR reaksiyon işlemine başlanıncaya kadar -20 °C sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

4.4.4. Primer dizaynı

Çalışmada Aktin ve *FAD2* gen bölgeleri housekeeping gen olarak kullanılmış ve gen bankasındaki (NCBI; National Center for Biotechnology Information) aspir bitkisine ait olan veriler yardımıyla bu gen bölgelerine ait primerlerin dizaynı yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak genler (*FAD2*) gen bankasından (NCBI) alınarak bu genlere ait diziler belirlenmiş ve gen bilgileri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Gen dizilerine en uygun primerler tasarlanarak Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. *FAD2* genlerinin gen numaraları ve uzunlukları

Genin Adı	Uzunluğu	GenBank Numarası
<i>FAD2-2</i>	1486 bç	KC257448.1
<i>FAD2-4</i>	1309 bç	KC257450.1
<i>FAD2-9</i>	1269 bç	KC257454.1
ACTIN	1678 bç	KJ634809.1

Çizelge 4. 8. Tasarlanan Real-Time PCR primer dizilerine ait bilgiler

Primer	Sekans	Primer Uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (TM)
<i>CtFAD2-2</i>	F: 5'CCCCATCTACTCGAACCGTG 3'	20	58-60°C
	R: 5'CAAGAAACCCGTTGACCACG 3'	20	58-60°C
<i>CtFAD2-4</i>	F: 5'GGAATCACGAGCCACTTTT 3'	19	58-60°C
	R: 5'CAACGCAAGACGGTAGACA 3'	19	58-60°C
<i>CtFAD2-9</i>	F: 5' TTGCTTCAATGTTTCCGGCC 3'	20	58-60°C
	R: 5' TAAGGCCAGTTTGTAGAGCC 3'	20	58-60°C
<i>ACTIN</i>	F: 5' GCGTGACCTTACAGATTC 3'	19	58-60°C
	R: 5' CAAGCTCTTGCTCGTAGTC 3'	19	58-60°C

4.4.5. Real-Time PCR reaksiyonu

Çalışmalara başlamadan önce ön denemeler yapılarak reaksiyon koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Yapılan bu denemeler sonucunda cDNA sentezi için gerekli olan cDNA konsantrasyon değerleri en ideal olan primerler kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere PCR ön denemelerinde cq (quantification of cycle) değeri açısından en iyi sonucu veren şartlar tercih edilmiş ve Real Time PCR uygulamaları uygun koşulların sağlanmasıyla üç teknik tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.9'da Real time PCR uygulamalarında kullanılan bileşen ve konsantrasyon değerleri ile Çizelge 4.10'da bu uygulamalarda kullanılan koşullar gösterilmiştir.

Tez çalışmasında aspir bireylerinden alınan yaprak, kök ve kotiledon dokularında *FAD2* gen seçiminin aynı olmasına dikkat edilmek üzere örneklem alımı yapılmıştır (Cao ve ark., 2013; Bölükbaşı 2018).

Çizelge 4.9. Optimize edilen kullanılacak Real- Time PCR bileşenleri ve bunların konsantrasyonları

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

Çizelge 4.10. Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştirileceği program

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

Çalışmada belirlenen hedef genlere ait diziler NCBI veri tabanından belirlenerek bu bölgelere özel primerler tasarlanmıştır. Housekeeping gen olarak Aktin geni seçilmiş ve normalizasyon işleminde kullanılmıştır. Real-Time PCR uygulama işlemleri yapılırken Light Cycler Nano (Roche) cihazı ile SYBR Green I Master boyası kullanmak suretiyle gerçekleştirilen kantitasyonunun (miktar belirleme = ekspresyon miktarının tespiti) yanı sıra Melting Curve (Erime Eğrisi) analizi yapılarak PCR'ın etkinliğini ve oluşabilecek ya da oluşan dimer oluşumunu belirlemek amaçlanmıştır.

Farklı konsantrasyon değerlerinde Cu ve asit yağmuru streslerine maruz bırakılmış LİNAS, BALCI ve BDYAS-04 bireylerinin yaprak, kök ve kotiledon dokularından alınan örneklerle ait *FAD2* ve *ACT* genleri eş zamanlı olacak şekilde Real- Time PCR reaksiyonu izlenerek gerçekleştirilmiş ve pik profilleri kaydedilmiştir. Aspir örneklerinden her birine ait Ct (Cycle Treshold) değerleri de oluşturulan pik profilleri yardımıyla belirlenmiş, elde edilen Ct değerleri ve Erime Eğrisi Analizleri kullanılarak Real Time PCR işlemi ile elde edilen gen ürünlerinin mRNA seviyeleri niceleyici olarak belirlenmiştir (Bölükbaşı, 2018).

4.4.6. Normalizasyon

Üç farklı aspir çeşidi (LİNAS, BDYAS-04 ve BALCI) 21 gün süre ile bitki büyütme kabininde yetiştirilmiştir. Farklı konsantrasyon değerlerine sahip her bir ağır metal ve asit yağmuru stresleri için 3 ayrı saksıya tohumlar homojen dağılacak şekilde yerleştirilmiştir. 24 saat uygulanacak olan stres simülasyonları sırasında aspir çeşitleri için konsantrasyon değerleri farklı olan Cu ve farklı konsantrasyonlarda asit yağmuru simülasyonu uygulanmıştır. Bu uygulamanın sonunda her bir aspir çeşidinin yaprak, kök ve kotiledon

dokularından örnekler alınmış ve elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi yapılmıştır. Yapılan Real- Time PCR reaksiyonları ve cDNA sentezi işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada housekeeping gen olarak seçilen ACT (aktin) geni Ct değeri olarak belirlenmiş ve uygun şartlarda normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Asit yağmuru ve Cu stresi uygulanan aspir çeşitlerinin yaprak, kök ve kotiledon örneklerine ait transkript profilleri aktin (ACT) geni ile karşılaştırılmıştır. Ulaşılan verilerin normalize edilmesinde Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001; Bölükbaşı, 2018).

Çalışmada; asit yağmuru ve Cu streslerinin farklı konsantrasyonlarına (Kontrol, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm; 2,5 pH+250 ppm Cu çözeltisi, 2,5 pH+500 ppm Cu çözeltisi, 2,5 pH+1000 ppm Cu çözeltisi; 3,5 pH+250 ppm Cu çözeltisi, 3,5 pH+500 ppm Cu çözeltisi, 3,5 pH+1000 ppm Cu çözeltisi; 4,5 pH+250 ppm Cu çözeltisi, 4,5 pH+500 ppm Cu çözeltisi ve 4,5 pH+1000 ppm Cu çözeltisi, pH 2,5; pH 3,5 ve pH 4,5) maruz bırakılan LİNAS, BALCI ve BDYAS-04 aspir çeşitlerinin yaprak, kök ve kotiledon doku örneklerinde *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait mRNA ifade seviyelerindeki değişimlerin belirlenerek karşılaştırılması yapılmıştır.

4.4.7. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin IBM SPSS Statistic-21 istatistik programı kullanılarak standart sapma değerleri, ortalama değerleri ve istatistiksel açıdan anlamlılık dereceleri hesaplanarak belirlenmeye çalışılmıştır. (Bölükbaşı, 2018). ANOVA testi kullanılarak deney grupları arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Levene testi kullanılıp varyansların homojenliği tespit edilmiştir. Homojen dağılıma sahip varyans değerleri olan değişkenler için pot-hoc Tukey HSD testi, varyansları homojen dağılım göstermeyen değişkenler için ise Dunnet' T3 ve Welch testleri uygulanmıştır (Roscoe, 1975). Parametreler arasındaki ilişkiler Pearson Correlation analizi ile belirlenmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Ekofizyolojik Özelliklere Ait Bulgular

5.1.1. Cu stresinin ekofizyolojik özellikler üzerine etkileri



25 ppm Cu stresi

50 ppm Cu stresi

100 ppm Cu stresi

Resim 5.1. 25, 50, 100 ppm Cu stresine maruz kalan BDYAS-04 çeşidi örnekleri

BDYAS-04 çeşidinin 25, 50 ve 100 ppm'lik Cu stresine maruz kalması sonucunda bireylerin morfolojik görünümü Resim 5.1'de gösterilmiştir. 25 ve 50 ppm Cu stresi uygulamalarında yaprak yüzeyinde önemli bir değişiklik görülmezken, 100 ppm'lik Cu stresine maruz kalan BDYAS-04 bireylerinin yapraklarında kahverengi lezyonlar ve yapraklarda solma gözlemlenmiştir.

BDYAS-04 çeşidi bireylerinde ölçülen ortalama stres öncesi ve sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kuru toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kök uzunluğu, çimlenen tohum sayısı, klorofil a, klorofil b, toplam karotenoid değerleri, toprak üstü ve altı su içeriği ve önemlilik değerleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Stres sonrası bitki boyu, istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Cu konsantrasyonu arttıkça bitki boyunun kademeli olarak azaldığı görülmüştür. En düşük bitki boyu 100 ppm'lik Cu stresi uygulanan bireylerde ölçülmüştür. En yüksek bitki boyu ise kontrol

grubunda ölçülmüştür. Buna göre Cu stresinin bitki boyunu olumsuz etkilediği görülmektedir.

Taze toprak üstü ağırlık, istatistiksel olarak önemlidir. Cu stresi uygulanan deney setlerinde Cu konsantrasyonu arttıkça BDYAS-04 çeşidi bireylerinin taze toprak üstü ağırlıkları kademeli olarak azalma eğilimi göstermiştir. En yüksek taze toprak üstü ağırlık değeri kontrol grubunda, en düşük taze toprak üstü ağırlık değeri 100 ppm'lik Cu stresi uygulanan bireylerde ölçülmüştür.

Kuru toprak altı ağırlık değerleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, Cu stresi uygulamasının kuru toprak altı ağırlığı bir miktar artırdığı gözlemlenmiştir. Kök biyomasındaki bu artış üretilen organik maddenin Cu stresine bağlı olarak daha çok köklerde biriktirildiğini ifade etmektedir. Aspirin daha çok toprak üstü organlarının çeşitli alanlarda hammadde olarak kullanıldığı düşünüldüğünde, biyomasın daha çok köklere ayrılması bitkiden elde edilecek verimin azalmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Toprak üstü su içeriği istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yüksek Cu konsantrasyonuna bağlı olarak toprak üstü su içeriğinin kademeli olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bitkilerde gelişim, hücre ve dokulardaki su içeriği ile yakından ilişkilidir. Doku ve hücrelerdeki su eksikliği bitkilerde fizyolojik işleyişleri bozarak; bitki büyümesini ve verimini etkilemektedir (Baştuğ ve Kanber, 1989). Yine, su miktarının azalması bitkide su stresinin ortaya çıkmasına ve solmaya neden olabilmektedir. Ayrıca, abiyotik stres etmenlerinin de su içeriğinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da bitkiler morfolojik olarak değerlendirildiğinde yüksek Cu uygulamalarına maruz kalan aspir fidelerinin solduğu ve dikliğini kaybettiği gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışma olarak, Gautam ve ark. (2016) farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100) bakır uygulamalarının aspir bireylerinin gelişimi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, bakır konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak aspir bireylerinde bitki büyümesi, taze ve kuru ağırlıklarda azalma gözlemlenmiştir. Bitkiler tarafından kullanılan bakırın bitkide meydana getirdiği toksik etki ve değişikliklerin bakır miktarına ve maruz kalma süresine bağlı olarak değiştiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada da yüksek konsantrasyon değerlerinde bitkinin taze ve kuru ağırlığı, su içeriği ve bitki büyümesinin azalması Gautam ve ark. (2016) ile benzer sonuçlara ulaşıldığını göstermektedir.

Çizelge 5.1. BDYAS-04 çeşidinde Cu stresi uygulanan aspir bireylerinde ölçülen ekofizyolojik özelliklere ait bulgular

BDYAS-04		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	P
Bitki Boyu (Stres öncesi) (cm)	Kontrol	6,67 $\pm$ 0,28 a	0,079
	25	7,66 $\pm$ 0,44 a	
	50	7,45 $\pm$ 0,47 a	
	100	7,31 $\pm$ 0,41 a	
Bitki Boyu (Stres sonrası) (cm)	Kontrol	17,13 $\pm$ 0,46 a	0,000
	25	14,92 $\pm$ 1,98 ab	
	50	12,08 $\pm$ 0,76 b	
	100	8,59 $\pm$ 0,52 c	
Taze toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	1,21 $\pm$ 0,23 a	0,017
	25	1,15 $\pm$ 0,43 a	
	50	0,68 $\pm$ 0,11 ab	
	100	0,40 $\pm$ 0,05 b	
Taze toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,18 $\pm$ 0,02 a	0,056
	25	0,30 $\pm$ 0,11 a	
	50	0,18 $\pm$ 0,01 a	
	100	0,15 $\pm$ 0,04 a	
Kuru toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	0,08 $\pm$ 0,02 a	0,064
	25	0,12 $\pm$ 0,02 a	
	50	0,09 $\pm$ 0,02 a	
	100	0,08 $\pm$ 0,01 a	
Kuru toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,01 $\pm$ 0,01 a	0,026
	25	0,03 $\pm$ 0,01 b	
	50	0,02 $\pm$ 0,00 ab	
	100	0,02 $\pm$ 0,00 ab	
Kök uzunluğu (cm)	Kontrol	7,69 $\pm$ 0,32 a	0,254
	25	9,85 $\pm$ 1,48 a	
	50	8,43 $\pm$ 1,32 a	
	100	8,55 $\pm$ 1,35 a	
Çimlenen tohum sayısı	Kontrol	10,33 $\pm$ 1,16 a	0,723
	25	10,33 $\pm$ 3,51 a	
	50	12,33 $\pm$ 2,52 a	
	100	10,67 $\pm$ 2,08 a	
Klorofil a (mg/g TA)	Kontrol	0,93 $\pm$ 0,42 a	0,320
	25	1,10 $\pm$ 0,12 a	
	50	1,09 $\pm$ 0,11 a	
	100	0,72 $\pm$ 0,28 a	
Klorofil b (mg/g TA)	Kontrol	0,28 $\pm$ 0,17 a	0,417
	25	0,34 $\pm$ 0,07 a	
	50	0,34 $\pm$ 0,03 a	
	100	0,21 $\pm$ 0,10 a	

Çizelge 5.1. devamı

Toplam karotenoid (mg/g TA)	Kontrol	78,91 ± 35,55 a	0,274
	25	97,27 ± 13,59 a	
	50	103,82 ± 10,29 a	
	100	66,92 ± 25,47 a	
Toprak üstü su içeriği (g)	Kontrol	1,13 ± 0,22 a	0,017
	25	1,03 ± 0,43 a	
	50	0,58 ± 0,11 ab	
	100	0,33 ± 0,04 b	
Toprak Altı Su İçeriği (g)	Kontrol	0,16 ± 0,01 a	0,063
	25	0,27 ± 0,10 a	
	50	0,16 ± 0,01 a	
	100	0,13 ± 0,04 a	

BDYAS-04 çeşidinde Cu stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkileri gösteren önemlilik değerleri Çizelge 5.2’de verilmiştir. Buna göre, Cu uygulamalarının stres sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ağırlık ve toprak üstü su içeriği üzerinde etkili olduğu açıkça görülmektedir. Bu ilişkilerin tümünde parametreler arasında negatif korelasyon vardır. Yani; uygulanan Cu konsantrasyonu arttıkça bu ekofizyolojik özelliklere ait ortalamaların düştüğü görülmektedir.

Li ve ark. (2015), aspir bireylerinin maruz kaldığı bakır ve kurşun oranı ve buna bağlı olarak aspir bireylerinde meydana gelen değişimleri araştırdıkları çalışmalarında fide, dallanma ve çiçeklenme aşamalarında bitki büyümesi ve gelişimini incelemişlerdir. Bu araştırma sonucunda, bakır konsantrasyonunun düşük olduğu değerlerde bitki boyunda ve kök uzunluğunda artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, bakır konsantrasyonunun artmasıyla bitki boyu, kök uzunluğu ve yanal kök sayılarında kademeli olarak azalma olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları ve Li ve ark. (2015) arasında bu bulgular açısından benzerlik bulunmaktadır.

Çizelge 5.2. BDYAS-04 çeşidinde Cu stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler (TTÜA: Taze toprak üstü ağırlık, TTAA: Taze toprak altı ağırlık, KTÜA: Kuru toprak üstü ağırlık, KTAA: Kuru toprak altı ağırlık, TUSu: Toprak üstü su içeriği)

BDYAS-04	Bitki Boyu (Stres Öncesi)	Bitki Boyu (Stres Sonrası)	TTÜA	TTAA	KTÜA	KTAA	Kök Uzunluğu	Çimlenen Tohum Sayısı	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Karotenoid	Toprak Üstü Su İçeriği	Toprak Altı Su İçeriği
Cu konsantrasyonu	0,387	-0,957**	-0,823**	-0,289	-0,240	0,258	0,102	0,154	-0,268	-0,234	-0,136	-0,830**	-0,325
Bitki boyu (stres öncesi)	1	-0,253	-0,214	0,340	0,176	0,538	0,544	0,061	0,112	0,115	0,159	-0,229	0,315
Bitki boyu (stres sonrası)	-0,253	1	0,920**	0,472	0,317	-0,131	0,069	-0,321	0,246	0,193	0,116	0,925**	0,507
TTÜA	-0,214	0,920**	1	0,646*	0,454	0,018	0,307	-0,506	0,090	0,022	-0,023	0,999**	0,678*
TTAA	0,340	0,472	0,646*	1	0,632*	0,675*	0,717**	-0,495	0,186	0,135	0,120	0,626*	0,998**
KTÜA	0,176	0,317	0,454	0,632*	1	0,598*	0,554	-0,382	0,262	0,263	0,261	0,408	0,617*
KTAA	0,538	-0,131	0,018	0,675*	0,598*	1	0,678*	-0,199	0,445	0,455	0,465	-0,015	0,630*
Kök uzunluğu	0,544	0,069	0,307	0,717**	0,554	0,678*	1	-0,486	-0,017	-0,018	-0,007	0,284	0,700*
Çimlenen tohum sayısı	0,061	-0,321	-0,506	-0,495	-0,382	-0,199	-0,486	1	0,455	0,455	0,513	-0,496	-0,505
Klorofil a	0,112	0,246	0,090	0,186	0,262	0,445	-0,017	0,455	1	0,992**	0,984**	0,077	0,160
Klorofil b	0,115	0,193	0,022	0,135	0,263	0,455	-0,018	0,455	0,992**	1	0,980**	0,007	0,105
Karotenoid	0,159	0,116	-0,023	0,120	0,261	0,465	-0,007	0,513	0,984**	0,980**	1	-0,038	0,088
TUSu	-0,229	0,925**	0,999**	0,626*	0,408	-0,015	0,284	-0,496	0,077	0,007	-0,038	1	0,660*

**Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.01$ seviyesinde önemlidir.

*Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir.



25 ppm Cu stresi

50 ppm Cu stresi

100 ppm Cu stresi

Resim 5.2. 25, 50 ve 100 ppm Cu stresine maruz kalan LİNAS çeşidi örnekleri

LİNAS bireylerinde 25, 50 ve 100 ppm'lik Cu stresine maruz kalan bireylerin morfolojik görünümü Resim 5.2'de gösterilmiştir. 25 ve 50 ppm'lik Cu stresi uygulamalarında yaprak yüzeyinde önemli bir değişiklik görülmezken, 100 ppm'lik Cu stresine maruz kalan LİNAS çeşidi bireylerinin yapraklarında kahverengi lezyonlar görülmüştür.

LİNAS çeşidi fidelerinde ölçülen ortalama stres öncesi ve stres sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kuru toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kök uzunluğu, çimlenen tohum sayısı, klorofil a, klorofil b ve toplam karotenoid değerleri, toprak üstü ve altı su içeriği ve önemlilik değerleri Çizelge 5.3'te gösterilmiştir.

Stres sonrası bitki boyu, istatistiksel açıdan önemlidir. BDYAS-04 çeşidinde gözlenen duruma paralel olarak, LİNAS çeşidinde de uygulanan Cu konsantrasyonu arttıkça stres sonrası ölçülen bitki boyunun kademeli olarak önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. En düşük bitki boyu 100 ppm'lik Cu stresi uygulanan bireylerde, en yüksek bitki boyu ise kontrol grubunda ölçülmüştür. Buna göre Cu stresinin bitki boyunu olumsuz etkilediği görülmektedir.

Sönmez, Kaplan ve Kaya (2006)'nın Cu uygulamalarının domateste ürün verimi üzerine yaptıkları çalışmada, Cu uygulamalarının bitki boyunda azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Sönmez ve ark. (2006) tarafından elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Taze toprak üstü ağırlık, istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. LİNAS çeşidinde Cu uygulanan aspir bireylerinin taze toprak üstü ağırlıkları konsantrasyon artışına bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. BDYAS-04 çeşidinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek taze toprak üstü ağırlık değeri kontrol grubunda, en düşük taze toprak üstü ağırlık değeri ise 100 ppm'lik Cu stresi uygulanan grupta gözlemlenmiştir.

Toprak üstü su içeriği, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Cu stresi uygulanan LİNAS çeşidi bireylerinde toprak üstü su içeriğinin konsantrasyon artışına paralel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bitkide su miktarının azalması bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda bu durum bitkinin su stresi yaşamasına ve dolayısıyla bitkide solmaya neden olmaktadır.

Moosavi ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlardaki kurşun ve kadmiyum çözeltilerinin aspir, kanola ve buğday çeşitlerinde çimlenen tohumların özellikleri üzerine etkilerini araştırmışlar. 50, 200, 350, 500 ve 1000 ppm'lik solüsyonlarda yetiştirilen bu üç bitkinin tüm uygulamalarda ağır metal konsantrasyonun artmasına bağlı olarak tohum çimlenme yüzdesinde ciddi anlamda azalma olduğunu hatta 500 ppm değerine sahip kadmiyum ağır metal solüsyonunda bitki büyümesine rastlanmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda Cu konsantrasyonuna bağlı biyomas ve fide uzunluğunda kademeli olarak azalma gözlemlenmesi Moosavi ve ark. (2012) tarafından elde edilen sonuçları desteklemektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki bakırın bitkinin tohum çimlenmesini, toprak üstü taze ağırlığını ve su içeriğini azaltarak bitki büyümesini olumsuz etkileyebileceği, bitkide stres yaratarak su içeriğinin azalmasına ve dolayısıyla metabolik faaliyetlere de etki edebileceği düşünülmektedir. Diğer bir benzer çalışma olarak Gong ve ark. (2019) çalışmalarında ıspanak bitkisini 100 ppm'lik Cu stresi ile muamele etmiş ve bakırın ıspanak bitkisinde kök uzunluğunu değiştirmedığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da 100 ppm'lik Cu konsantrasyonuna maruz kalan bireylerde kontrol grubuna kıyasla bitki kökü uzunluğunun azaldığı; ancak en düşük kök uzunluğunu 50 ppm'lik bakır stresinde ölçüldüğü görülmektedir. Yani bu çalışmayla benzer şekilde kök uzunlukları arasında Cu uygulamalarına bağlı olarak istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmemiştir.

Çizelge 5.3. LİNAS çeşidinde Cu stresi uygulanan aspir bireylerinde ölçülen ekofizyolojik özelliklere ait bulgular

LİNAS		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	P
Bitki Boyu (Stres öncesi) (cm)	Kontrol	6,72 $\pm$ 0,82 a	0,519
	25	5,75 $\pm$ 0,79 a	
	50	6,36 $\pm$ 0,74 a	
	100	6,27 $\pm$ 0,70 a	
Bitki Boyu (Stres sonrası) (cm)	Kontrol	16,71 $\pm$ 1,93 a	0,004
	25	14,24 $\pm$ 2,13 a	
	50	12,30 $\pm$ 2,47 ab	
	100	7,86 $\pm$ 1,22 b	
Taze toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	2,11 $\pm$ 0,80 a	0,038
	25	1,07 $\pm$ 0,53 ab	
	50	0,88 $\pm$ 0,31 ab	
	100	0,63 $\pm$ 0,32 b	
Taze toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,70 $\pm$ 0,55 a	0,246
	25	0,37 $\pm$ 0,30 a	
	50	0,36 $\pm$ 0,11 a	
	100	0,21 $\pm$ 0,01 a	
Kuru toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	0,12 $\pm$ 0,01 a	0,724
	25	0,10 $\pm$ 0,05 a	
	50	0,10 $\pm$ 0,02 a	
	100	0,09 $\pm$ 0,04 a	
Kuru toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,03 $\pm$ 0,01a	0,343
	25	0,05 $\pm$ 0,02 a	
	50	0,04 $\pm$ 0,01 a	
	100	0,03 $\pm$ 0,02 a	
Kök uzunluğu (cm)	Kontrol	13,86 $\pm$ 0,45 a	0,183
	25	12,69 $\pm$ 2,83 a	
	50	10,29 $\pm$ 2,12 a	
	100	11,72 $\pm$ 0,78 a	
Çimlenen tohum sayısı	Kontrol	9,00 $\pm$ 0,00 a	0,235
	25	6,67 $\pm$ 2,08 a	
	50	9,00 $\pm$ 1,00 a	
	100	7,33 $\pm$ 2,08 a	
Klorofil a (mg/g TA)	Kontrol	1,04 $\pm$ 0,25 a	0,084
	25	0,71 $\pm$ 0,16 a	
	50	0,60 $\pm$ 0,10 a	
	100	0,68 $\pm$ 0,21 a	

LİNAS çeşidinde Cu stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkileri gösteren önemlilik değerleri Çizelge 5.4'te verilmiştir. LİNAS çeşidinden elde edilen verilere uygulanan korelasyon analizi sonuçlarına göre, Cu uygulamaları ile stres sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ağırlık, klorofil a ve toprak üstü su içeriği arasında negatif ilişkiler olduğu tespit edilmiştir. Klorofil a ortalaması ile deney setleri ortalamaları arasında gözlenen varyasyon istatistiksel olarak önemli bulunmamasına karşın, bu ilişki analizinde Cu uygulamasının klorofil a miktarı üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Cu konsantrasyonu arttıkça klorofil a miktarının azaldığı belirlenmiştir. Yerli ve ark. (2020)'nin bildirdiğine göre bakır yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstererek kloroplast yapısını bozmakta ve klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır. Bu durumda azalan klorofil miktarına bağlı olarak, bitki dokularında özellikle yapraklarda klorozis gözlemlenmektedir. Bu çalışmada, Cu uygulaması sonrasında aspir bireyleri morfolojik olarak incelenmiş ve yapraklarda özellikle yüksek konsantrasyonlarda Cu uygulanan bireylerde klorozis olduğu gözlemlenmiştir. Yerli ve ark. (2020) aynı zamanda Cu uygulamalarının kökler üzerinde etkili olarak bitki- su dengesini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Bu bilgiler bu çalışmadan elde edilen sonuçları desteklemektedir. Yine bu konu ile ilgili yapılan diğer bir çalışma olarak Houshmandfar ve Moraghebi (2011), yaptıkları çalışmada ağır metal streslerinin aspir tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimine etkilerini araştırmak üzere kadmiyum, bakır, nikel ve çinko gibi ağır metaller kullanarak ağır metal stresi oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, ağır metallerin aspir fidelerinde ölümcül etkiler yarattığına ulaşılmış, buna bağlı olarak da ağır metallerin toksik etki yaparak tohum çimlenmesi ve fide büyümesinde son derece olumsuz etkiler yarattığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada kullanılan konsantrasyon değerleri daha yüksek tutulduğunda benzer sonuçlara ulaşılabileceği öngörülmektedir. Çünkü, bu çalışmanın ön hazırlığında muamele edilen daha yüksek dozlardaki bakır uygulamalarında bitkilerin daha az çimlendiği ve yaprak oluşumundan hemen sonra öldüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 5.4. LİNAS çeşidinde Cu stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler (TTÜA: Taze toprak üstü ağırlık, TTAA: Taze toprak altı ağırlık, KTÜA: Kuru toprak üstü ağırlık, KTAA: Kuru toprak altı ağırlık, TÜSu: Toprak üstü su içeriği)

LİNAS	Bitki Boyu (Stres Öncesi)	Bitki Boyu (Stres Sonrası)	TTÜA	TTAA	KTÜA	KTAA	Kök Uzunluğu	Çimlenen Tohum Sayısı	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Karotenoid	Toprak Üstü Su İçeriği	Toprak Altı Su İçeriği
Cu konsantrasyonu	-0,114	-0,879**	-0,730**	-0,521	-0,349	-0,189	-0,498	-0,183	-0,585*	-0,551	-0,530	-0,734**	-0,510
Bitki boyu (stres öncesi)	1	0,358	0,251	-0,218	0,605*	-0,231	0,106	0,689*	0,223	0,252	0,271	0,233	-0,213
Bitki boyu (stres sonrası)	0,358	1	0,751**	0,387	0,573	0,268	0,541	0,316	0,588*	0,487	0,554	0,747**	0,370
TTÜA	0,251	0,751**	1	0,721**	0,590*	-0,009	0,620*	0,372	0,713**	0,574	0,684*	0,999**	0,718**
TTAA	-0,218	0,387	0,721**	1	0,089	0,031	0,473	0,327	0,577*	0,428	0,542	0,735**	0,999**
KTÜA	0,605*	0,573	0,590*	0,089	1	0,163	0,520	0,518	0,201	0,091	0,234	0,563	0,077
KTAA	-0,231	0,268	-0,009	0,031	0,163	1	0,475	-0,208	0,098	0,084	0,075	-0,016	-0,018
Kök uzunluğu	0,106	0,541	0,620*	0,473	0,520	0,475	1	0,117	0,671*	0,493	0,673*	0,615*	0,448
Çimlenen tohum sayısı	0,689*	0,316	0,372	0,327	0,518	-0,208	0,117	1	0,179	0,116	0,232	0,362	0,333
Klorofil a	0,223	0,588*	0,713**	0,577*	0,201	0,098	0,671*	0,179	1	0,921**	0,991**	0,722**	0,568
Klorofil b	0,252	0,487	0,574	0,428	0,091	0,084	0,493	0,116	0,921**	1	0,913**	0,584*	0,419
Karotenoid	0,271	0,554	0,684*	0,542	0,234	0,075	0,673*	0,232	0,991**	0,913**	1	0,692*	0,533
TÜSu	0,233	0,747**	0,999**	0,735**	0,563	-0,016	0,615*	0,362	0,722**	0,584*	0,692*	1	0,732**

**Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.01$ seviyesinde önemlidir.

*Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir.

5.1.2. Asit yağmuru simülasyonunun ekofizyolojik özellikler üzerine etkileri



2,5 pH asit yağ. simülasyonu 3,5 pH asit yağ. simülasyonu 4,5 pH asit yağ. simülasyonu

Resim 5.3. 2,5; 3,5 ve 4,5 pH değerlerinde asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan BDYAS-04 çeşidi örnekleri

BDYAS-04 çeşidinde sırasıyla 2,5; 3,5 ve 4,5 pH değerindeki asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan bireylerin morfolojik görünüşleri Resim 5.3'te verilmiştir. BDYAS-04 çeşidi bireylerinin düşük pH değerinde (2,5 pH) yapraklarında kırılma ve hafif hasar gözlemlenirken 3,5 ve 4,5 pH değerindeki asit yağmurunda önemli bir değişim görülmemiştir.

Asit yağmuru simülasyonunun stres öncesi ve stres sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ve toprak altı ağırlığı, kuru toprak üstü ve toprak altı ağırlığı, kök uzunluğu, çimlenen tohum sayısı, klorofil a ve b, toplam karotenoid, toprak üstü ve toprak altı su içeriği ortalamaları, standart sapmaları ve önemlilik değerleri Çizelge 5.5'te gösterilmiştir.

Kuru toprak altı ağırlık değerleri istatistiksel olarak önemlidir. BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru simülasyonuna maruz bırakılan aspir bireylerinde kontrol grubuna kıyasla kuru toprak altı ağırlık değerlerinin arttığı görülmektedir. En düşük kuru toprak altı ağırlık değerleri kontrol grubunda ölçülmüştür. En yüksek kuru toprak altı ağırlık değerleri ise 2,5 pH değerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulanan bireylerde ölçülmüştür. Asidite artışının toprak altı biyoması artırdığı belirlenmiştir. İstatistiki olarak önemli olmamasına

karşın kuru toprak üstü ağırlık değerlerinin de benzer şekilde arttığı gözlemlenmektedir. Asidik koşulları sevdiği bilinen asperde asit yağmuru simülasyonunun üretim üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların aksine Yalçın (1999), buğday ve mısırdaki asit yağmurlarının biyoması azalttığını bildirmiştir. Singh ve Agrawal (1996, 2007) *Tricum aestivum* (buğday)'ın Malviya 234 çeşidinde asit yağmuru simülasyonuna bağlı olarak toplam biyomasın azaldığını başka bir çalışmada inceledikleri diğer türlerde ise asit yağmuru uygulamalarının biyoması istatistiksel olarak değiştirmediklerini bildirmişlerdir. Asit yağmuru simülasyonunun bitkiler üzerindeki etkilerinin, bitki türlerinin asidofil olup olmama durumuna ve asiditeye karşı göstermiş oldukları ekolojik toleransa bağlı olduğu göz önüne alındığında bitkilerin asit yağmuruna karşı oluşturduğu tepkileri tür içinde değerlendirmenin daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Kök uzunluğunun istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru simülasyonuna maruz bırakılan asper bireylerinde uygulanan pH derecelerine bağlı olarak kök uzunluğunun arttığı gözlemlenmektedir. Singh ve Agrawal (2007) buğdayda asit yağmuru uygulamaları sonrasında kök uzunluğunun azaldığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde sürgün uzunluğunda da azalma olmuştur. Asidik koşullarda yaklaşık olarak 5-7 pH değerine sahip topraklarda daha iyi gelişim gösterdiği ifade edilen asper bireylerinde asit yağmuru simülasyonunun kök uzunluğunu artırması normal bir tepki olarak düşünülebilir.

Bitkilerin son durumu morfolojik açıdan değerlendirildiğinde ise asit yağmuru simülasyonunun bitkinin yapraklarında solma ve kırılma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Fu ve ark. (2006) yaptıkları çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmanın sonuçlarına göre, asit yağmurlarının bitkinin yapraklarındaki organeller üzerine etkili olduğu, mezofil dokularını ve bitkinin çiçeklerini aşındırarak tahrip ettiği, bitkinin fotosentez reaksiyonlarında ve azot metabolizması üzerinde önemli etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca çalışma sonuçlarında asit yağmuru simülasyonunun bitkinin üreme fonksiyonlarının inhibisyonunu sağladığı belirtilmektedir. Bu çalışmada da düşük pH değerlerinde asit yağmuru simülasyonunun morfolojik olarak benzer etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 5.5. BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru stresi ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler

BDYAS-04		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	P
Bitki Boyu (Stres öncesi) (cm)	Kontrol	6,67 $\pm$ 0,28 a	0,209
	2,5	6,51 $\pm$ 0,39 a	
	3,5	7,14 $\pm$ 0,12 a	
	4,5	6,96 $\pm$ 0,52 a	
Bitki Boyu (Stres sonrası) (cm)	Kontrol	17,13 $\pm$ 0,46 a	0,296
	2,5	15,47 $\pm$ 1,18 a	
	3,5	14,68 $\pm$ 1,73 a	
	4,5	15,54 $\pm$ 2,02 a	
Taze toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	1,21 $\pm$ 0,23 a	0,849
	2,5	1,13 $\pm$ 0,49 a	
	3,5	0,87 $\pm$ 0,50 a	
	4,5	1,08 $\pm$ 0,64 a	
Taze toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,18 $\pm$ 0,02 a	0,224
	2,5	0,37 $\pm$ 0,18 a	
	3,5	0,25 $\pm$ 0,09 a	
	4,5	0,24 $\pm$ 0,06 a	
Kuru toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	0,08 $\pm$ 0,02 a	0,826
	2,5	0,10 $\pm$ 0,02 a	
	3,5	0,09 $\pm$ 0,04 a	
	4,5	0,09 $\pm$ 0,04 a	
Kuru toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,01 $\pm$ 0,01a	0,004
	2,5	0,06 $\pm$ 0,01b	
	3,5	0,04 $\pm$ 0,02 bc	
	4,5	0,03 $\pm$ 0,00 ac	
Kök uzunluğu (cm)	Kontrol	7,69 $\pm$ 0,32 a	0,001
	2,5	11,97 $\pm$ 0,25 b	
	3,5	10,83 $\pm$ 0,11 b	
	4,5	11,57 $\pm$ 1,23 b	
Çimlenen tohum sayısı	Kontrol	10,33 $\pm$ 1,15 a	0,296
	2,5	9,67 $\pm$ 2,08 a	
	3,5	12,33 $\pm$ 2,08 a	
	4,5	9,00 $\pm$ 2,65 a	
Klorofil a (mg/g TA)	Kontrol	0,93 $\pm$ 0,42 a	0,135
	2,5	1,28 $\pm$ 0,16 a	
	3,5	0,93 $\pm$ 0,08 a	
	4,5	0,87 $\pm$ 0,15 a	

Çizelge 5.5. devamı

Klorofil b (mg/g TA)	Kontrol	$0,28 \pm 0,17$ a	0,260
	2,5	$0,38 \pm 0,08$ a	
	3,5	$0,27 \pm 0,03$ a	
	4,5	$0,24 \pm 0,05$ a	
Toplam karotenoid (mg/g TA)	Kontrol	$78,91 \pm 35,55$ a	0,184
	2,5	$106,05 \pm 15,47$ a	
	3,5	$75,29 \pm 5,11$ a	
	4,5	$87,20 \pm 18,83$ a	
Toprak üstü su içeriği (g)	Kontrol	$1,13 \pm 0,22$ a	0,833
	2,5	$1,02 \pm 0,47$ a	
	3,5	$0,78 \pm 0,46$ a	
	4,5	$0,99 \pm 0,61$ a	
Toprak Altı Su İçeriği (g)	Kontrol	$0,16 \pm 0,01$ a	0,372
	2,5	$0,31 \pm 0,18$ a	
	3,5	$0,21 \pm 0,07$ a	
	4,5	$0,21 \pm 0,06$ a	

BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru simülasyonu ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkileri gösteren önemlilik değerleri Çizelge 5.6'da verilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru simülasyonu uygulamaları ile diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde asit yağmuru uygulamaları ile kök uzunluğu arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.6. BDYAS-04 çeşidinde asit yağmuru simülasyonu ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler (TTÜA: Taze toprak üstü ağırlık, TTAA: Taze toprak altı ağırlık, KTÜA: Kuru toprak üstü ağırlık, KTAA: Kuru toprak altı ağırlık, TUSu: Toprak üstü su içeriği)

BDYAS-04	Bitki Boyu (Stres Öncesi)	Bitki Boyu (Stres Sonrası)	TTÜA	TTAA	KTÜA	KTAA	Kök Uzunluğu	Çimlenen Tohum Sayısı	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Karotenoid	Toprak Üstü Su İçeriği	Toprak Altı Su İçeriği
Asit yağmuru Simülasyonu	0,440	-0,416	-0,173	0,071	0,062	0,228	0,665*	-0,071	-0,232	-0,262	-0,031	-0,185	0,038
Bitki boyu (Stres öncesi)	1	0,072	-0,285	-0,267	-0,254	-0,109	-0,027	0,311	-0,132	-0,053	0,197	-0,283	-0,277
Bitki boyu (Stres sonrası)	0,072	1	0,613*	0,197	0,234	-0,270	-0,502	-0,574	-0,135	-0,143	0,078	0,628*	0,267
TTÜA	-0,285	0,613*	1	0,346	0,792**	0,129	0,032	-0,859**	-0,156	-0,241	-0,263	0,999**	0,361
TTAA	-0,267	0,197	0,346	1	0,368	0,659*	0,497	-0,498	0,305	0,169	0,209	0,340	0,991**
KTÜA	-0,254	0,234	0,792**	0,368	1	0,477	0,429	-0,688*	0,167	0,063	-0,076	0,769**	0,322
KTAA	-0,109	-0,270	0,129	0,659*	0,477	1	0,722**	-0,140	0,474	0,382	0,373	0,107	0,549
Kök uzunluğu	-0,027	-0,502	0,032	0,497	0,429	0,722**	1	-0,236	0,284	0,178	0,193	0,008	0,420
Çimlenen tohum sayısı	0,311	-0,574	-0,859**	-0,498	-0,688*	-0,140	-0,236	1	0,093	0,196	0,044	-0,858**	-0,527
Klorofil a	-0,132	-0,135	-0,156	0,305	0,167	0,474	0,284	0,093	1	0,986**	0,768**	-0,173	0,253
Klorofil b	-0,053	-0,143	-0,241	0,169	0,063	0,382	0,178	0,196	0,986**	1	0,793**	-0,256	0,118
Karotenoid	0,197	0,078	-0,263	0,209	-0,076	0,373	0,193	0,044	0,768**	0,793**	1	-0,271	0,165
TUSu	-0,283	0,628*	0,999**	0,340	0,769**	0,107	0,008	-0,858**	-0,173	-0,256	-0,271	1	0,358

**Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.01$ seviyesinde önemlidir.

*Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir



2,5 pH asit yağ. simülasyonu 3,5 pH asit yağ. simülasyonu 4,5 pH asit yağ. simülasyonu
Resim 5.4. 2,5; 3,5 ve 4,5 pH değerlerinde asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan LİNAS çeşidi örnekleri

LİNAS çeşidi bireylerinde sırasıyla 2,5; 3,5 ve 4,5 pH değerindeki asit yağmuru simülasyonuna maruz bırakılan bitkilerin morfolojik görünüşleri Resim 5.4'te verilmiştir. LİNAS çeşidi bireylerinin yapraklarında 2,5 pH değerindeki asit yağmuru simülasyonu sonrası hasar olduğu gözlemlenmiştir; ancak diğer pH değerlerinde yapraklarda önemli derecede tahribat ya da lezyon gözlenmemiştir.

Asit yağmuru simülasyonunun stres öncesi ve stres sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ve toprak altı ağırlığı, kuru toprak üstü ve toprak altı ağırlığı, kök uzunluğu, çimlenen tohum sayısı, klorofil a ve b, toplam karotenoid, toprak üstü ve toprak altı su içeriği değerleri Çizelge 5.7'de gösterilmiştir.

Taze toprak üstü ağırlık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Asit yağmuru simülasyonunun LİNAS çeşidi bireylerinde taze toprak üstü ağırlık değerlerinde varyasyona neden olduğu belirlenmiştir. Özellikle 2,5 pH değerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulamalarına maruz kalan bireyler ile 4,5 pH değerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulanan bireyler arasındaki fark oldukça önemlidir. En yüksek taze toprak üstü ağırlık kontrol grubunda, en düşük taze toprak üstü ağırlık ise 4,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan bireylerde görülmüştür. Veriler genel olarak değerlendirildiğinde düşük pH değerlerinde asit yağmurunun taze toprak üstü ağırlığı artırdığı belirlenmiştir.

Kuru toprak üstü ağırlık değerleri de asit yağmuru simülasyonuna bağlı olarak istatistiki açıdan önemli varyasyon göstermiştir. Kuru toprak üstü ağırlıkta gözlenen trend de taze toprak üstü ağırlıkta gösteren ile aynı seyretmektedir. En düşük kuru toprak üstü ağırlık değeri 4,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan bireylerde, en yüksek kuru toprak üstü ağırlık değeri de 2,5 pH değerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulanan bireylerde ölçülmüştür. Her iki parametre birlikte değerlendirildiğinde pH seviyelerindeki düşüşe paralel olarak biyomasın arttığı görülmektedir. Asidik koşulların aspir türünde üretimi ve verimi olumsuz yönde etkilemediği söylenebilir. Bu durum aspir tarımı açısından önemli ve olumlu bir sonuçtur. Son yıllarda daha da önemli hale gelen çevre kirliliği ve küresel iklim değişikliği sebebiyle öngörülen toprakların asitliğinin artması bu bitkide önemli verim düşüşüne neden olmayacak gibi görünmektedir.

Çizelge 5.7. LİNAS çeşidinde asit yağmuru simülasyonu uygulanan aspir bireylerinde ölçülen ekofizyolojik özelliklere ait bulgular

LINAS		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	p
Fide Boyu (Stres öncesi) (cm)	Kontrol	6,72 $\pm$ 0,82 a	0,918
	2,5	6,56 $\pm$ 0,66 a	
	3,5	6,78 $\pm$ 0,17 a	
	4,5	6,49 $\pm$ 0,44 a	
Fide Boyu (Stres sonrası) (cm)	Kontrol	16,71 $\pm$ 1,93 a	0,388
	2,5	16,83 $\pm$ 0,40 a	
	3,5	17,00 $\pm$ 2,38 a	
	4,5	17,68 $\pm$ 0,51 a	
Taze toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	2,11 $\pm$ 0,80 ab	0,011
	2,5	1,74 $\pm$ 0,05 a	
	3,5	1,39 $\pm$ 0,32 ab	
	4,5	1,36 $\pm$ 0,07 b	
Taze toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,69 $\pm$ 0,55 a	0,753
	2,5	0,39 $\pm$ 0,06 a	
	3,5	0,35 $\pm$ 0,11 a	
	4,5	0,35 $\pm$ 0,09 a	
Kuru toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	0,12 $\pm$ 0,01 ab	0,031
	2,5	0,15 $\pm$ 0,02 a	
	3,5	0,12 $\pm$ 0,02 ab	
	4,5	0,10 $\pm$ 0,01 b	

Çizelge 5.7. devamı

Kuru toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,03 ± 0,01 a	0,330
	2,5	0,03 ± 0,01 a	
	3,5	0,03 ± 0,01 a	
	4,5	0,02 ± 0,01 a	
Kök uzunluğu (cm)	Kontrol	13,86 ± 0,45 a	0,331
	2,5	11,15 ± 0,67 a	
	3,5	11,36 ± 3,77 a	
	4,5	10,54 ± 2,14 a	
Çimlenen tohum sayısı	Kontrol	9,00 ± 0,00 a	0,522
	2,5	8,00 ± 01,00 a	
	3,5	9,67 ± 2,31 a	
	4,5	9,33 ± 1,16 a	
Klorofil a (mg/g TA)	Kontrol	1,04 ± 0,25 a	0,121
	2,5	1,39 ± 0,12 a	
	3,5	0,96 ± 0,20 a	
	4,5	0,89 ± 0,42 a	
Klorofil b (mg/g TA)	Kontrol	0,29 ± 0,08 a	0,135
	2,5	0,45 ± 0,07 a	
	3,5	0,28 ± 0,07 a	
	4,5	0,27 ± 0,14 a	
Toplam karotenoid (mg/g TA)	Kontrol	85,73 ± 19,55 a	0,150
	2,5	120,98 ± 15,16 a	
	3,5	82,17 ± 17,73 a	
	4,5	75,78 ± 34,82 a	
Toprak üstü su içeriği (g)	Kontrol	2,00 ± 0,81 a	0,209
	2,5	1,59 ± 0,04 a	
	3,5	1,27 ± 0,33 a	
	4,5	1,26 ± 0,07 a	
Toprak Altı Su İçeriği (g)	Kontrol	0,66 ± 0,55 a	0,455
	2,5	0,36 ± 0,06 a	
	3,5	0,32 ± 0,10 a	
	4,5	0,33 ± 0,09 a	

LİNAS çeşidinde asit yağmuru simülasyonu ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkileri gösteren önemlilik değerleri Çizelge 5.8’de verilmiştir. Buna göre, asit yağmuru simülasyonu ile ekofizyolojik özellikler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde taze toprak üstü ağırlık ve toprak üstü su içeriğinin asit yağmuru simülasyonu ile negatif ilişkili olduğu görülmektedir. Bu da pH değerleri yükseldikçe üretimin ve su içeriğinin azaldığını ifade

etmektedir. Yani düşük pH değerlerinde üretimin ya da su potansiyelinin daha iyi olduğu söylenebilir. Ancak kuru ağırlıklarda benzer ilişkilerin bulunmaması bu durumun daha çok su ekonomisi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.



Çizelge 5.8. LİNAS çeşidinde asit yağmuru simülasyonu ve diğer ekofizyolojik parametreler arasındaki ilişkiler (TTÜA: Taze toprak üstü ağırlık, TTAA: Taze toprak altı ağırlık, KTÜA: Kuru toprak üstü ağırlık, KTAA: Kuru toprak altı ağırlık, TUSu: Toprak üstü su içeriği)

LİNAS	Bitki Boyu (Stres Öncesi)	Bitki Boyu (Stres Sonrası)	TTÜA	TTAA	KTÜA	KTAA	Kök Uzunluğu	Çimlenen Tohum Sayısı	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Karotenoid	Toprak Üstü Su İçeriği	Toprak Altı Su İçeriği
Asit yağmuru Simülasyonu	-0,103	0,257	-0,627*	-0,437	-0,414	-0,527	-0,496	0,231	-0,331	-0,239	-0,298	-0,608*	-0,424
Bitki boyu (Stres öncesi)	1	0,201	-0,344	-0,506	0,206	0,049	-0,102	-0,043	-0,339	-0,364	-0,344	-0,355	-0,509
Bitki boyu (Stres sonrası)	0,201	1	0,033	-0,190	-0,320	0,058	0,342	-0,464	0,267	0,265	0,252	0,049	-0,192
TTÜA	-0,344	0,033	1	0,891**	0,072	0,227	0,586*	-0,379	0,410	0,303	0,337	0,999**	0,887**
TTAA	-0,506	-0,190	0,891**	1	-0,097	0,095	0,532	-0,196	0,147	0,032	0,073	0,898**	1,000**
KTÜA	0,206	-0,320	0,072	-0,097	1	0,471	-0,126	-0,430	0,239	0,254	0,233	0,024	-0,109
KTAA	0,049	0,058	0,227	0,095	0,471	1	0,398	-0,456	0,060	0,079	0,077	0,204	0,069
Kök uzunluğu	-0,102	0,342	0,586*	0,532	-0,126	0,398	1	-0,613*	0,262	0,146	0,201	0,593*	0,523
Çimlenen tohum sayısı	-0,043	-0,464	-0,379	-0,196	-0,430	-0,456	-0,613*	1	-0,388	-0,351	-0,344	-0,359	-0,184
Klorofil a	-0,339	0,267	0,410	0,147	0,239	0,060	0,262	-0,388	1	0,982**	0,992**	0,400	0,146
Klorofil b	-0,364	0,265	0,303	0,032	0,254	0,079	0,146	-0,351	0,982**	1	0,994**	0,292	0,030
Karotenoid	-0,344	0,252	0,337	0,073	0,233	0,077	0,201	-0,344	0,992**	0,994**	1	0,326	0,072
TUSu	-0,355	0,049	0,999**	0,898**	0,024	0,204	0,593*	-0,359	0,400	0,292	0,326	1	0,894**

**Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.01$ seviyesinde önemlidir.

*Parametreler arasındaki ilişki $p \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir.

5.1.3. Cu stresinin ve asit yağmuru simülasyonunun ekofizyolojik özellikler üzerine birlikte etkileri



50 ppm+3,5 pH asit yağ.
simülasyonu

50 ppm+ 4,5 pH asit yağ.
simülasyonu

100 ppm+ 3,5 pH asit yağ.
simülasyonu

Resim 5.5. 50 ppm+3,5 pH; 50 ppm+4,5 pH ve 100 ppm+3,5 pH değerindeki strese maruz kalan BDYAS-04 çeşidi örnekleri

BDYAS-04 çeşidi bireylerinin Cu ve asit yağmuru simülasyonuna birlikte maruz kalan aspir bireylerinin morfolojik görünümü Resim 5.5'te gösterilmiştir. 50 ppm+3,5 pH , 50 ppm+4,5 pH ve 100 ppm+3,5 pH değerlerindeki BDYAS-04 bireylerinde yaprak yüzeyinde kahverengi lezyonlar ve yapraklarda deformasyon gözlemlenmiştir.

BDYAS-04 çeşidi fidelerinde ölçülen ortalama stres öncesi ve sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kuru toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kök uzunluğu, çimlenen tohum sayısı, klorofil a, klorofil b ve toplam karotenoid değerleri, toprak üstü ve altı su içeriği ve önemlilik değerleri Çizelge 5.9'da verilmiştir.

Stres sonrası bitki boyu istatistiksel olarak önemlidir. Bitki boyunun artan Cu konsantrasyonu ve azalan pH değerleri bir araya geldiğinde en düşük değere ulaştığı görülmektedir. Yüksek Cu konsantrasyonlarının düşük pH değerine sahip asit yağmuru stresi ile birleştiğinde bitki gelişimini olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Bu deney setlerinde bitki boyu kontrol grubundan önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bitki boyunun çift stres etkisiyle neredeyse yarı yarıya azaldığı tespit edilmiştir.

Taze toprak üstü ağırlık istatistiksel olarak önemlidir. BDYAS-04 çeşidinde taze toprak üstü ağırlığın Cu ve asit yağmuru streslerinin birlikte etkisi nedeniyle önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu azalma hem Cu konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak hem de asit yağmurunun pH değerindeki düşüşe paralel olarak gerçekleşmiştir. Olumsuz çevre koşullarının birden fazla stres faktörüne bağlı olarak var olduğu durumlarda aspirin gelişiminin daha olumsuz yönde etkilenebileceği görülmektedir. Dolayısıyla tek bir stres faktörünü tolere edebilen bitki bireyleri birden fazla stres faktörü bir araya geldiğinde daha çok zarar görmektedir.

BDYAS-04 çeşidinde Cu ve asit yağmuru stresleri birlikte etkili olduğunda taze toprak altı ağırlık değerlerinin Cu konsantrasyonu artışı ve düşük pH değerlerine bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar iki stres faktörü birleştiğinde köklere ayrılan biyomas miktarının arttığını ifade etmektedir. Bu artış hem organik madde miktarının hem de su içeriğinin fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Kuru toprak altı ağırlık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. BDYAS-04 çeşidinde Cu ve asit yağmuru stresleri birlikte etkili olduğunda kuru toprak altı ağırlık değerlerinin arttığı saptanmıştır. En yüksek kuru toprak altı ağırlık değerleri 100 ppm'lik Cu çözeltisi ve 2,5 pH değerine sahip asit yağmuru uygulamalarının birlikte yapıldığı deney setinde ölçülmüştür. Taze toprak altı ağırlık değerlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir ve bu iki stres faktörünün birlikte etkisiyle köklere ayrılan organik madde miktarının arttığı söylenebilir.

Kök uzunluğu istatistiksel olarak önemlidir. BDYAS-04 çeşidinde kontrol grubuna kıyasla Cu stresi ve asit yağmuru stresinin birlikte uygulandığı aspir bireylerinde kök uzunluğunun arttığı belirlenmiştir. Kök uzunluğundaki artış bitki gelişimi için suya ulaşımın kolaylaşması açısından pozitif yönde olumlu bir özellik olmaktadır. Bunun yanı sıra bazı kaynaklarda su stresi nedeniyle bitkinin kök uzunluğunu artırdığı da bildirilmiştir. Yerli ve ark. (2020)'nin ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde besin elementi eksikliğine, oksidatif strese, hücrelerin membran yapılarının zarar görmesine ve kök yüzeyindeki epidermal hücrelerin zarar görmesine bağlı olarak kök uzunluğunun azaldığını bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2016) pirinçte yapmış oldukları çalışmada asit yağmuru uygulamalarına (pH 3,5 ve 5) bağlı olarak kök tüyü yoğunluğunun ve kök hacminin arttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte kuvvetli asit yağmuru uygulamalarında (pH 2,5)

ise kök uzunluğunun azaldığını ifade etmişlerdir. Zhang ve ark. (2016) sonuçları ile kıyaslandığında bu çalışmadan elde edilen asiditenin artmasına bağlı olarak kök uzunluğunun da artması, aspirin asidik ortamlarda daha iyi gelişim göstermesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda su stresinin ortalama kök uzunluğunu artırdığını bildirmektedir (Bo, Tian, Wang ve Pan, 2008; Zhang ve diğerleri, 2016). Yüksek konsantrasyonlarda uygulanan Cu çözeltisi ve güçlü asit yağmuru simülasyonunun bitkide su stresi yaratmış olabileceği ve bunun sonucunda da ortalama kök uzunluğunun artmış olabileceği düşünülmektedir.

Toprak üstü su içeriği istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. BDYAS-04 çeşidinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında toprak üstü su içeriği Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonu uygulanan aspir bireylerinde önemli ölçüde kademeli olarak azalmıştır. En düşük toprak üstü su içeriği 100 ppm'lik Cu çözeltisi ve 2,5 pH derecesine sahip asit yağmuru uygulanan deney setinde ölçülmüştür. Bu sonuçlar, yüksek konsantrasyonda Cu uygulamasının ve güçlü asit yağmuru simülasyonunun aspir bireylerinde su stresi oluşturduğunu düşündürmektedir. Kök uzunluğunun artması da bunun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Toprak altı su içeriği istatistiksel olarak önemlidir. Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonuna maruz bırakılan BDYAS-04 çeşidi bireylerinde toprak altı su içeriği, toprak üstü su içeriğinin aksine kontrol grubuna kıyasla stres uygulanan deney setlerinde önemli oranda artış göstermiştir. Sonuçlar Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte etki ederek toprak üstü dokularda su stresi yarattığı ve suyun kök bölgesinde daha çok tutulmasına neden olduğunu göstermektedir. Su stresi, bitkinin toprak üstü organlarında gelişmeyi azaltarak suyun kök bölgesinde kullanılmasına dolayısıyla da kök uzunluğunun artmasını sağlayarak kökün derinlere inmesine avantaj sağlar (Yüksel ve Aksoy, 2017; İnternet 7, t.y.).

Çizelge 5.9. BDYAS-04 çeşidinde Cu ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulanmasının ekofizyolojik özelliklere etkisi

BDYAS-04		Mean Std. Deviation	P
Fide Boyu (Stres öncesi) (cm)	Kontrol	6,67 ± 0,28 a	0,204
	50+2,5	7,23 ± 0,29 a	
	50+3,5	6,87 ± 0,21 a	
	50+4,5	7,05 ± 0,44 a	
	100+2,5	7,30 ± 0,45 a	
	100+3,5	7,42 ± 0,40 a	
	100+4,5	7,08 ± 0,31 a	
Fide Boyu (Stres sonrası) (cm)	Kontrol	17,13 ± 0,46 a	0,000
	50+2,5	12,57 ± 1,78 bc	
	50+3,5	13,33 ± 0,92 b	
	50+4,5	13,57 ± 1,61 b	
	100+2,5	9,88 ± 1,08 cd	
	100+3,5	10,99 ± 1,32 bcd	
	100+4,5	8,92 ± 0,19 d	
Taze toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	1,21 ± 0,23 a	0,005
	50+2,5	0,85 ± 0,19 ab	
	50+3,5	0,88 ± 0,21 ab	
	50+4,5	0,88 ± 0,38 ab	
	100+2,5	0,46 ± 0,10 b	
	100+3,5	0,59 ± 0,15 b	
	100+4,5	0,45 ± 0,03 b	
Taze toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,18 ± 0,02 a	0,023
	50+2,5	0,21 ± 0,03 ab	
	50+3,5	0,19 ± 0,07 ab	
	50+4,5	0,32 ± 0,15 ab	
	100+2,5	0,28 ± 0,03 ab	
	100+3,5	0,26 ± 0,02 b	
	100+4,5	0,21 ± 0,03 ab	
Kuru toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	0,08 ± 0,02 a	0,142
	50+2,5	0,09 ± 0,03 a	
	50+3,5	0,11 ± 0,04 a	
	50+4,5	0,08 ± 0,03 a	
	100+2,5	0,07 ± 0,02 a	
	100+3,5	0,06 ± 0,02 a	
	100+4,5	0,06 ± 0,01 a	

Çizelge 5.9. devamı

Kuru toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,01 ± 0,01 a	0,001
	50+2,5	0,02 ± 0,01 ab	
	50+3,5	0,02 ± 0,01 ab	
	50+4,5	0,03 ± 0,01 bc	
	100+2,5	0,04 ± 0,01 c	
	100+3,5	0,03 ± 0,01 ab	
	100+4,5	0,02 ± 0,01 ab	
Kök uzunluğu (cm)	Kontrol	7,69 ± 0,32 a	0,003
	50+2,5	9,33 ± 0,14 ab	
	50+3,5	10,58 ± 1,87 ab	
	50+4,5	12,33 ± 1,72 b	
	100+2,5	12,53 ± 1,17 b	
	100+3,5	10,59 ± 1,46 ab	
	100+4,5	9,97 ± 0,38 ab	
Çimlenen Tohum Sayısı	Kontrol	10,33 ± 1,16 a	0,304
	50+2,5	10,33 ± 0,58 a	
	50+3,5	12,00 ± 1,00 a	
	50+4,5	12,00 ± 3,46 a	
	100+2,5	8,67 ± 3,06 a	
	100+3,5	13,00 ± 1,73 a	
	100+4,5	10,33 ± 2,52 a	
Klorofil a (mg/g TA)	Kontrol	0,93 ± 0,42 a	0,666
	50+2,5	1,22 ± 0,06 a	
	50+3,5	1,12 ± 0,40 a	
	50+4,5	1,31 ± 0,44 a	
	100+2,5	0,94 ± 0,30 a	
	100+3,5	0,95 ± 0,26 a	
	100+4,5	0,97 ± 0,14 a	
Klorofil b (mg/g TA)	Kontrol	0,28 ± 0,17 a	0,724
	50+2,5	0,37 ± 0,03 a	
	50+3,5	0,39 ± 0,19 a	
	50+4,5	0,41 ± 0,19 a	
	100+2,5	0,30 ± 0,11 a	
	100+3,5	0,28 ± 0,08 a	
	100+4,5	0,28 ± 0,05 a	

Çizelge 5.9. devamı

Toplam Karoteniod (mg/g TA)	Kontrol	78,91 ± 35,55 a	0,750
	50+2,5	105,19 ± 6,37 a	
	50+3,5	101,03 ± 39,61 a	
	50+4,5	113,13 ± 41,12 a	
	100+2,5	88,99 ± 28,83 a	
	100+3,5	82,90 ± 23,90 a	
	100+4,5	85,55 ± 11,25 a	
Toprak Üstü Su İçeriği (g)	Kontrol	1,13 ± 0,22 a	0,004
	50+2,5	0,76 ± 0,17 ab	
	50+3,5	0,77 ± 0,18 ab	
	50+4,5	0,80 ± 0,36 ab	
	100+2,5	0,39 ± 0,08 b	
	100+3,5	0,54 ± 0,14 b	
	100+4,5	0,39 ± 0,03 b	
Toprak Altı Su İçeriği (g)	Kontrol	0,16 ± 0,01 a	0,016
	50+2,5	0,19 ± 0,03 ab	
	50+3,5	0,16 ± 0,07 ab	
	50+4,5	0,28 ± 0,15 ab	
	100+2,5	0,24 ± 0,04 ab	
	100+3,5	0,23 ± 0,01 b	
	100+4,5	0,18 ± 0,02 ab	



100 ppm+ 2,5 pH asit yağ.
simülasyonu

100 ppm+ 3,5 pH asit yağ.
simülasyonu

100 ppm+ 4,5 pH asit yağ.
simülasyonu

Resim 5.6. 100 ppm+ 2,5 pH; 100 ppm +3,5 pH ve 100 ppm+4,5 pH değerlerinde Cu+asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan LİNAS çeşidi örnekleri

Farklı değerlerdeki Cu ve asit yağmuru simülasyonuna birlikte maruz kalan LİNAS bireylerinin morfolojik görünümü Resim 5.6'da gösterilmiştir. 100 ppm+2,5 pH, 100 ppm+ 3,5 pH ve 100 ppm+4,5 pH değerindeki Cu ve asit yağmuru simülasyonuna birlikte maruz kalan aspir bireylerinin yapraklarında kahverengi lezyonlar ve yaprak ön ve sırt kısımlarında yaralanmalar gözlemlenmiştir.

LİNAS çeşidi fidelerinde ölçülen ortalama stres öncesi ve sonrası bitki boyu, taze toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kuru toprak üstü ve toprak altı ağırlık, kök uzunluğu, çimlenen tohum sayısı, klorofil a, klorofil b ve toplam karotenoid, toprak üstü ve toprak altı su içeriği ortalamaları, standart sapmaları ve önemlilik değerleri Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Stres sonrası bitki boyu istatistiksel olarak önemlidir. LİNAS çeşidinde kontrol grubuna kıyasla Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulandığı aspir bireylerinde stres sonrası bitki boyu önemli ölçüde kademeli olarak azalmıştır. En düşük bitki boyu 100 ppm Cu çözeltisi ve 2,5 pH değerine sahip asit yağmuru simülasyonunun birlikte etkisine maruz kalan aspir bireylerinde ölçülmüştür. Bitki boyu bu bireylerde %50'den daha fazla oranda azalmıştır. BDYAS-04 çeşidinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Orada da ifade edildiği gibi bu durum su stresinin ortaya çıkmasına bağlı olarak toprak üstü sürgün gelişiminin azaltılması olarak açıklanabilir.

Taze toprak üstü ağırlık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. LİNAS çeşidinde de BDYAS-04 çeşidi bireylerinde olduğu gibi Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte etkisi ile taze toprak üstü ağırlık miktarı kontrol grubuna kıyasla azalma eğilimi göstermiştir.

Taze toprak altı ağırlık istatistiksel olarak önemlidir. Taze toprak altı ağırlık da toprak üstü organlarda olduğu gibi Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonuna bağlı olarak azalma eğilimi göstermiştir. Bu sonuçlar ile ilgili açıklamalar ilgili parametrelerde açıklanmıştır.

Kök uzunluğu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. BDYAS-04 çeşidinin tersine LİNAS çeşidinde kök uzunluğu Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonu uygulamalarının birlikte etkisi nedeniyle azalma eğilimi göstermiştir. Bu sonuçlar stres faktörlerine karşı LİNAS çeşidinin daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarda da stres nedeniyle kök uzunluğunda azalma bildirilmiştir. Kök uzunluğunda azalma daha çok güçlü stres koşullarında meydana gelmektedir.

Toprak üstü su içeriği istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. LİNAS çeşidinde Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte etkisi nedeniyle toprak üstü su içeriğinin kontrol grubuna kıyasla %50'ye varan oranlarda azaldığı belirlenmiştir. Bu stres faktörleri nedeniyle bitkide su stresinin de ortaya çıktığı ve buna bağlı olarak toprak üstü gelişiminin azaltıldığı ve kök gelişiminin artışı için suyun kök bölgesinde daha çok kullanıldığı düşünülmektedir.

Toprak altı su içeriği BDYAS-04 çeşidine tezat olarak LİNAS çeşidi bireylerinde kök bölgesinde de Cu ve asit yağmuru streslerinin birlikte etkisi nedeniyle toprak altı su içeriğinde azalma kaydedilmiştir. Bu sonuçlar BDYAS-04 çeşidine göre LİNAS çeşidinde bu stres faktörlerinin daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Çünkü kök gelişimi de inhibe olmuştur.

Çizelge 5.10. LİNAS çeşidinin Cu ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulanmasının ekofizyolojik özellikler üzerine etkisi

LİNAS		Mean	Std. Deviation	P
Bitki Boyu (Stres öncesi) (cm)	Kontrol	6,72 ± 0,82 a		0,185
	50+2,5	5,78 ± 0,90 a		
	50+3,5	6,78 ± 0,39 a		
	50+4,5	6,11 ± 0,8 a		
	100+2,5	6,14 ± 0,05 a		
	100+3,5	6,98 ± 0,34 a		
	100+4,5	7,20 ± 0,95 a		
Bitki Boyu (Stres sonrası) (cm)	Kontrol	16,71 ± 1,93 a		0,000
	50+2,5	12,70 ± 3,18 ab		
	50+3,5	15,42 ± 0,71 ab		
	50+4,5	16,20 ± 1,36 ab		
	100+2,5	7,50 ± 0,47 c		
	100+3,5	11,63 ± 2,44 bc		
	100+4,5	13,09 ± 0,83 ab		
Taze toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	2,11 ± 0,80 a		0,002
	50+2,5	1,08 ± 0,69 ab		
	50+3,5	1,54 ± 0,36 ab		
	50+4,5	1,40 ± 0,10 ab		
	100+2,5	0,65 ± 0,07 b		
	100+3,5	0,86 ± 0,71 ab		
	100+4,5	1,26 ± 0,15 ab		
Taze toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	0,69 ± 0,55 ab		0,014
	50+2,5	0,22 ± 0,04 ab		
	50+3,5	0,28 ± 0,03 ab		
	50+4,5	0,47 ± 0,07 a		
	100+2,5	0,15 ± 0,04 b		
	100+3,5	0,25 ± 0,07 ab		
	100+4,5	0,36 ± 0,05 a		
Kuru toprak üstü ağırlık (g)	Kontrol	0,12 ± 0,01 a		0,188
	50+2,5	0,10 ± 0,06 a		
	50+3,5	0,15 ± 0,02 a		
	50+4,5	0,12 ± 0,02 a		
	100+2,5	0,09 ± 0,01 a		
	100+3,5	0,09 ± 0,05 a		
	100+4,5	0,11 ± 0,03 a		

Çizelge 5.10. devamı

Kuru toprak altı ağırlık (g)	Kontrol	$0,03 \pm 0,01$ a	0,060
	50+2,5	$0,03 \pm 0,01$ a	
	50+3,5	$0,03 \pm 0,01$ a	
	50+4,5	$0,04 \pm 0,01$ a	
	100+2,5	$0,02 \pm 0,01$ a	
	100+3,5	$0,07 \pm 0,06$ a	
	100+4,5	$0,03 \pm 0,01$ a	
Kök uzunluğu (cm)	Kontrol	$13,86 \pm 0,45$ a	0,002
	50+2,5	$11,49 \pm 1,03$ ab	
	50+3,5	$12,88 \pm 2,34$ ab	
	50+4,5	$13,67 \pm 1,01$ a	
	100+2,5	$9,61 \pm 1,32$ b	
	100+3,5	$9,97 \pm 0,54$ b	
	100+4,5	$11,31 \pm 0,25$ ab	
Çimlenen Tohum Sayısı	Kontrol	$9,00 \pm 0,00$ a	0,115
	50+2,5	$7,67 \pm 2,31$ a	
	50+3,5	$9,67 \pm 1,16$ a	
	50+4,5	$6,33 \pm 0,58$ a	
	100+2,5	$9,33 \pm 1,53$ a	
	100+3,5	$7,00 \pm 1,73$ a	
	100+4,5	$8,00 \pm 1,73$ a	
Klorofil a (mg/g TA)	Kontrol	$1,04 \pm 0,25$ a	0,781
	50+2,5	$0,88 \pm 0,23$ a	
	50+3,5	$0,84 \pm 0,13$ a	
	50+4,5	$0,85 \pm 0,36$ a	
	100+2,5	$0,90 \pm 0,18$ a	
	100+3,5	$0,86 \pm 0,17$ a	
	100+4,5	$0,70 \pm 0,26$ a	
Klorofil b (mg/g TA)	Kontrol	$0,29 \pm 0,08$ a	0,888
	50+2,5	$0,24 \pm 0,08$ a	
	50+3,5	$0,24 \pm 0,03$ a	
	50+4,5	$0,26 \pm 0,11$ a	
	100+2,5	$0,27 \pm 0,06$ a	
	100+3,5	$0,24 \pm 0,04$ a	
	100+4,5	$0,21 \pm 0,07$ a	

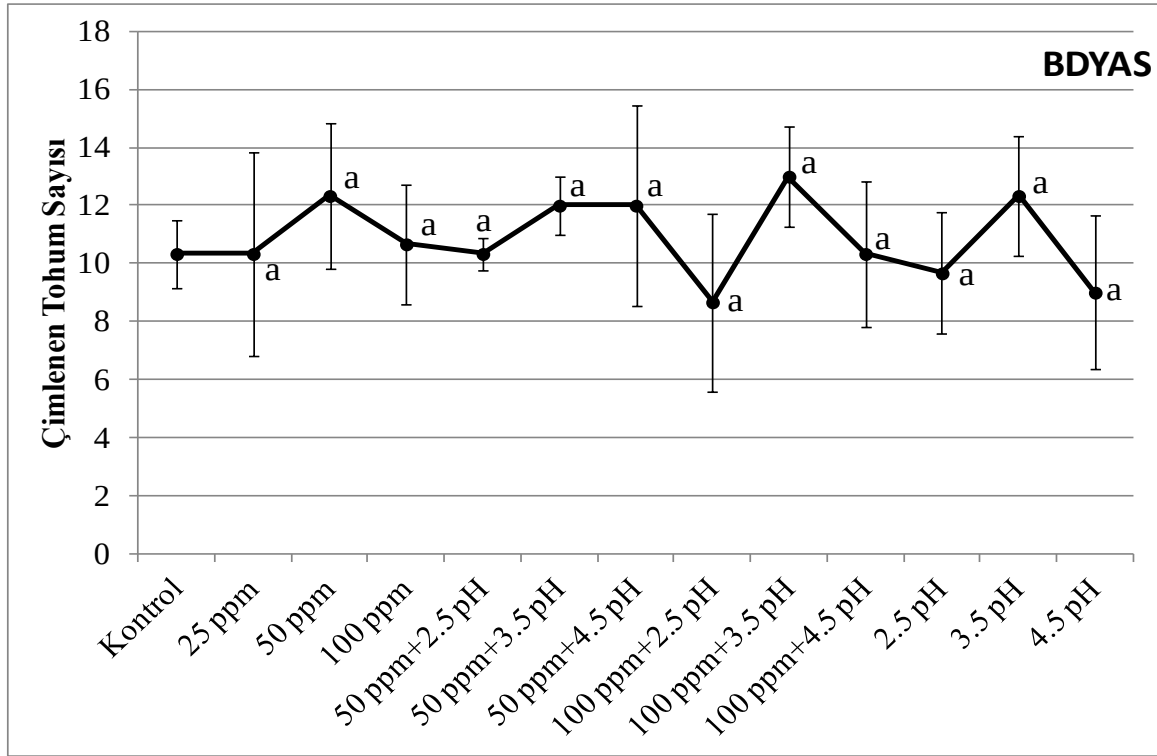
Çizelge 5.10. devamı

Toplam Karoteniod (mg/g TA)	Kontrol	85,73 ± 19,55 a	0,861
	50+2,5	75,80 ± 14,12 a	
	50+3,5	71,08 ± 10,74 a	
	50+4,5	73,42 ± 29,37 a	
	100+2,5	80,66 ± 16,39 a	
	100+3,5	75,45 ± 12,66 a	
	100+4,5	64,13 ± 21,03 a	
Toprak Üstü Su İçeriği (g)	Kontrol	2,00 ± 0,81 a	0,002
	50+2,5	0,98 ± 0,64 ab	
	50+3,5	1,39 ± 0,36 ab	
	50+4,5	1,28 ± 0,10 ab	
	100+2,5	0,55 ± 0,07 b	
	100+3,5	0,77 ± 0,66 ab	
	100+4,5	1,15 ± 0,14 ab	
Toprak Altı Su İçeriği (g)	Kontrol	0,66 ± 0,55 ab	0,015
	50+2,5	0,19 ± 0,04 a	
	50+3,5	0,25 ± 0,03 ab	
	50+4,5	0,43 ± 0,06 b	
	100+2,5	0,14 ± 0,04 a	
	100+3,5	0,18 ± 0,12 ab	
	100+4,5	0,32 ± 0,05 ab	

5.1.4. Ekofizyolojik özelliklerin deney setlerine göre değerlendirilmesi

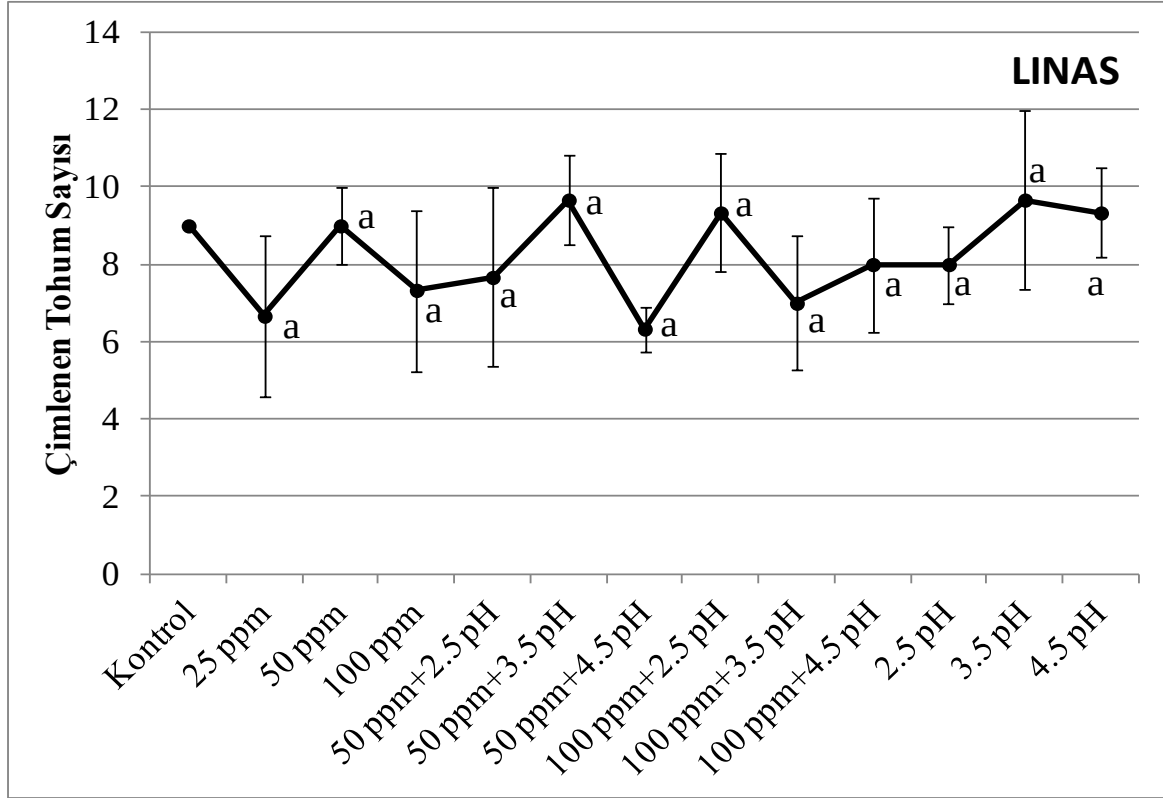
5.1.4.1. Çimlenen tohum sayısı

BDYAS-04 çeşidinde deney setlerine göre çimlenen tohum sayısı Şekil 5.1’de gösterilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, çimlenen tohum sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek çimlenme oranı 100 ppm+3,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük çimlenme oranı ise 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru (karma) grubu simülasyonu uygulanan saksılarda görülmektedir.



Şekil 5.1. BDYAS-04 çeşidinde çimlenen tohum sayısının deney setlerine göre değerlendirilmesi

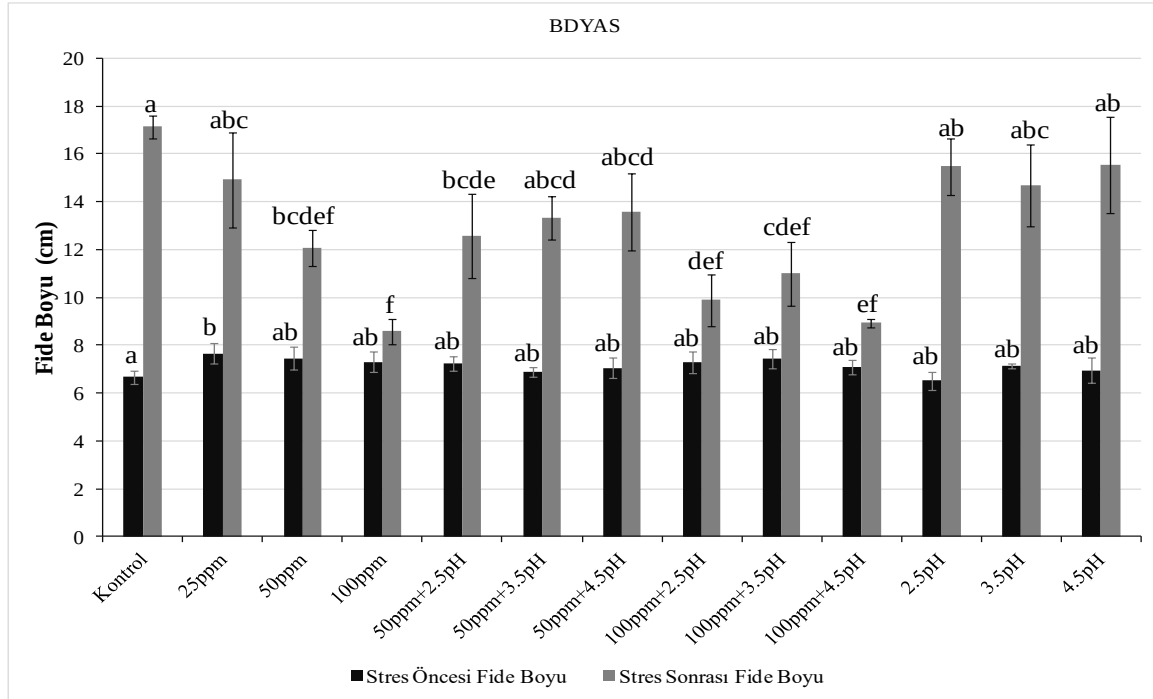
LİNAS çeşidinde deney setlerine göre çimlenen tohum sayıları Şekil 5.2’de gösterilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, çimlenen tohum sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. LİNAS çeşidi için en yüksek çimlenme oranı 50 ppm+3,5 pH asit yağmuru(karma) simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük çimlenme oranı ise 50 ppm+4,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda görülmektedir.



Şekil 5.2. LİNAS çeşidinde çimlenen tohum sayısının deney setlerine göre değerlendirilmesi

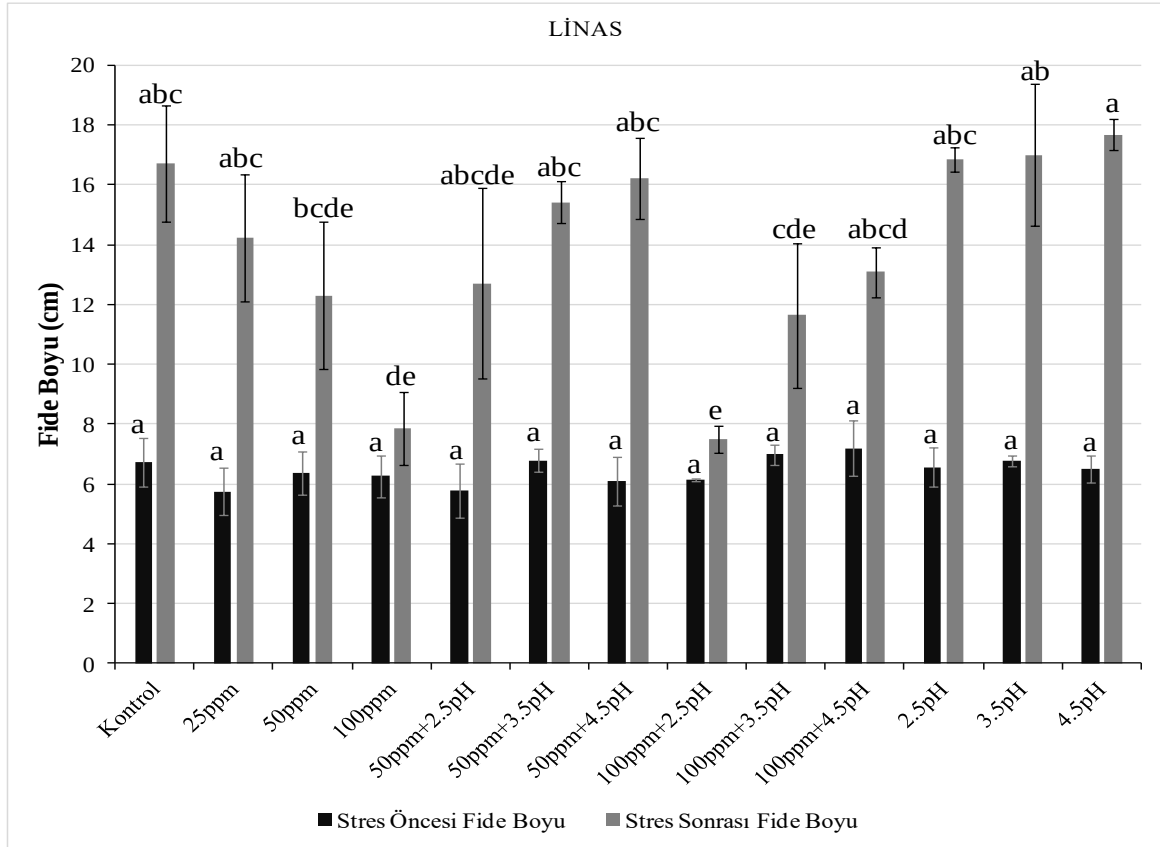
5.1.4.2. Bitki boyu

BDYAS-04 çeşidinde stres öncesi ve stres sonrası bitki boyları Şekil 5.3'te gösterilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, stres öncesi ve sonrası bitki boyları bakımından 100ppm, 100 ppm+2,5; 100 ppm+3,5 ve 100 ppm+4,5 pH asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan gruplardaki varyasyonların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek bitki boyu kontrol grubunda, en düşük bitki boyu ise 100 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır. Bu sonuçlar aspir çeşitlerinin yüksek Cu konsantrasyonlarında bitki büyümesinin olumsuz etkilendiğini göstermektedir.



Şekil 5.3. BDYAS-04 çeşidinde stres öncesi ve Cu ve asit yağmuru simülasyonu sonrası bitki boylarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

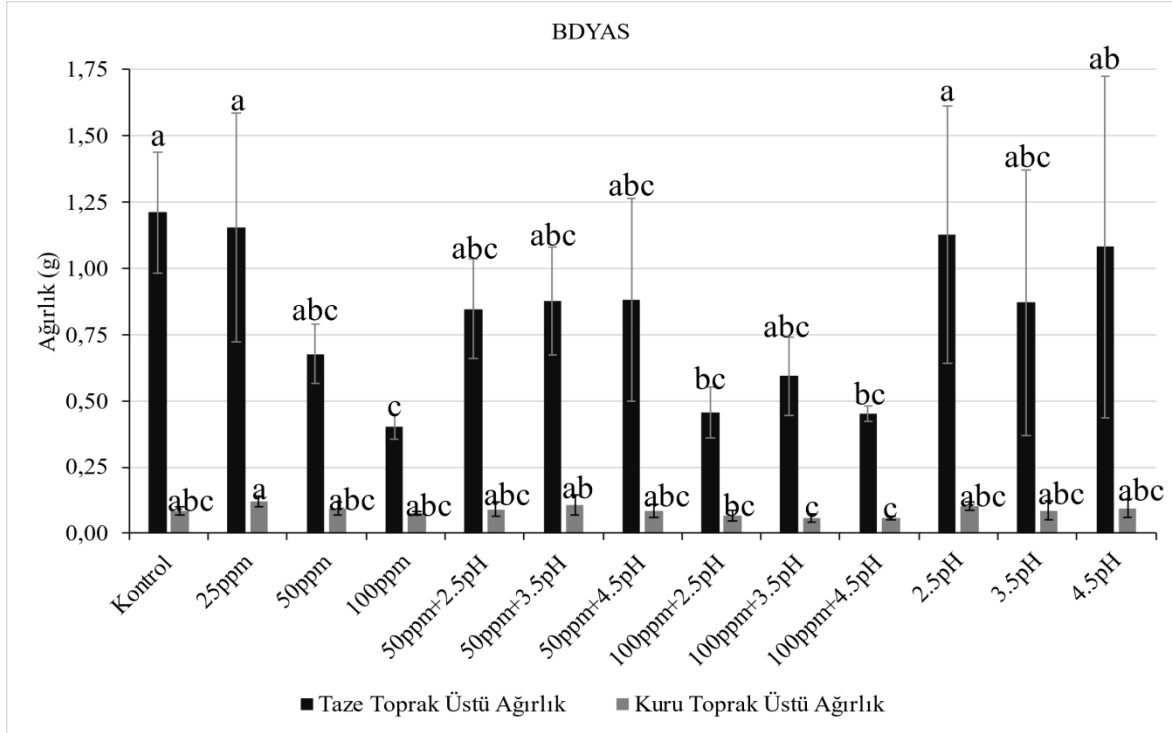
LİNAS çeşidinde stres öncesi ve stres sonrası bitki boyları Şekil 5.4'te gösterilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, stres öncesi ve sonrası bitki boyları bakımından 50 ppm, 100 ppm, 100 ppm+2,5 pH ve 100 ppm+3,5 pH asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan gruplar karşılaştırıldığında elde edilen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LİNAS çeşidi için en yüksek bitki boyu 4,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksıda, en düşük bitki boyu ise 100 ppm+ 2,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılardadır. Bu sonuçlar aspir bitkisinin LİNAS çeşidinin asidik ortamda normal değer ve üzerinde büyüme gösterebildiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 5.4. LİNAS çeşidinde stres öncesi ve Cu ve asit yağmuru simülasyonu sonrası bitki boylarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

5.1.4.3. Toprak üstü taze ve kuru ağırlık

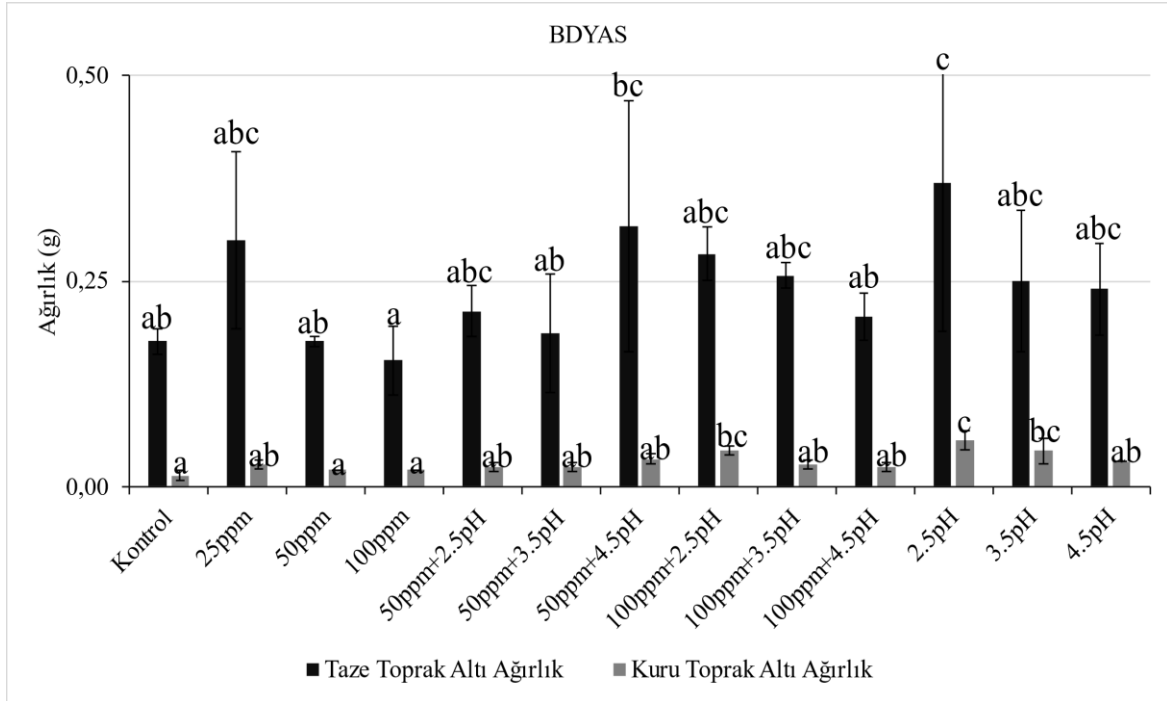
BDYAS-04 çeşidinde deney setlerine göre toprak üstü taze ve kuru ağırlık değerleri Şekil 5.5'te gösterilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, taze toprak üstü ağırlık ve kuru toprak üstü ağırlık değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek toprak üstü taze ağırlık kontrol grubunda, en düşük toprak üstü taze ağırlık ise 100 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek toprak üstü kuru ağırlık 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksıda, en düşük ise 100 ppm+3,5 pH ve 100 ppm+4,5 pH asit yağmuru (karma) uygulanan saksılarda görülmektedir.



Şekil 5.5. BDYAS-04 çeşidinde toprak üstü taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi

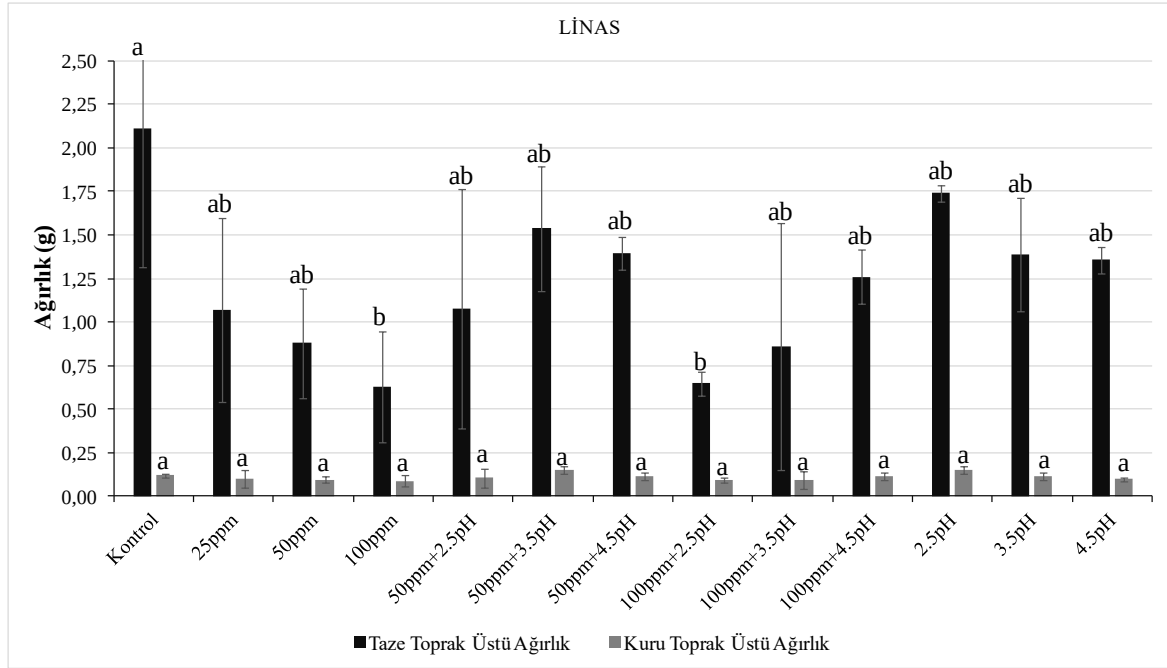
BDYAS-04 çeşidinde deney setlerine göre toprak altı taze ve kuru ağırlık değerleri Şekil 5.6'da gösterilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, taze toprak altı ağırlık ve kuru toprak altı ağırlık değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek toprak altı taze ağırlık 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksıda, en düşük toprak altı taze ağırlık ise 100 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek toprak altı kuru ağırlık 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksıda, en düşük toprak altı kuru ağırlık ise kontrol grubunda görülmektedir.

Fu ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada asit yağmurlarının bitkilerin yapraklarındaki organeller üzerine etkili olduğu, mezofil dokularını ve bitkinin çiçeklerini aşındırarak tahrip ettiği, bitkinin fotosentez reaksiyonlarında ve azot metabolizması üzerinde önemli etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada, bitkilerin yapraklarının aşınması ve toprak üstü biyomasın azalması ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.



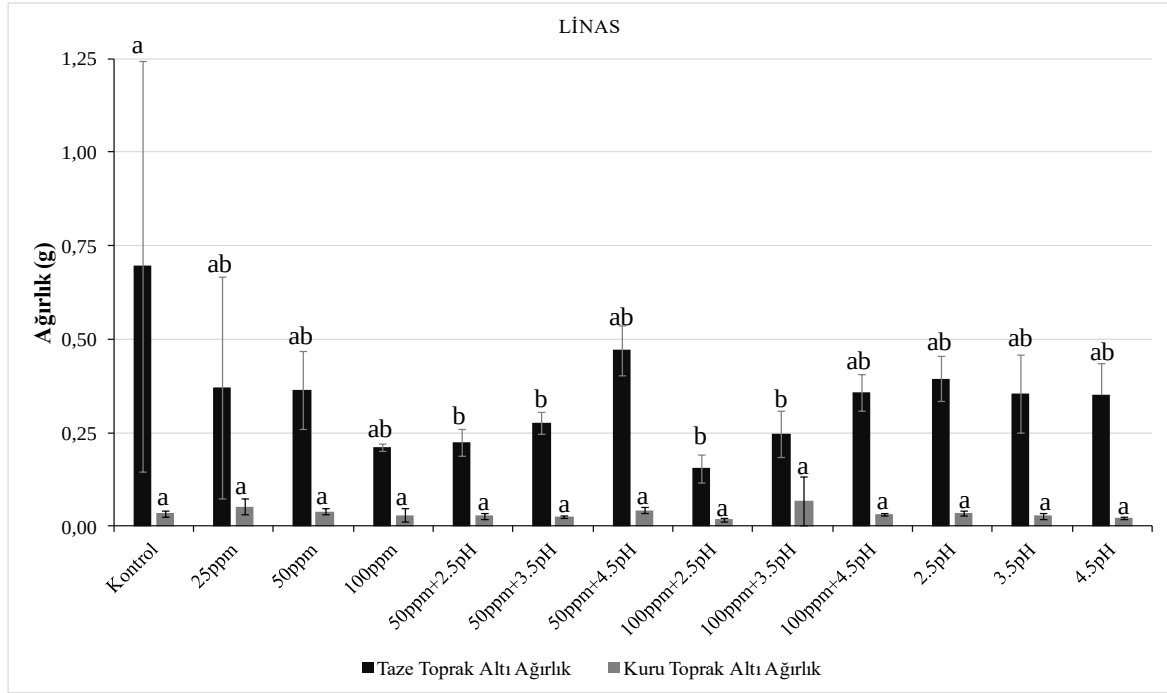
Şekil 5.6. BDYAS-04 çeşidinde toprak altı taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi

LİNAS çeşidinde deney setlerine göre toprak üstü taze ve kuru ağırlık değerleri Şekil 5.7’de gösterilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, toprak üstü taze ve kuru ağırlık değerleri bakımından 100 ppm Cu stresi ve 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan gruplarda elde edilen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LİNAS çeşidi için en yüksek taze toprak üstü ağırlık kontrol grubunda, en düşük taze toprak üstü ağırlık ise 100 ppm ve 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılardır. LİNAS çeşidi için en yüksek kuru toprak üstü ağırlık 50 ppm+3,5 pH ve 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük kuru toprak üstü ağırlık ise 100 ppm Cu stresi, 100 ppm+ 2,5 pH ve 100 ppm+ 3,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda görülmektedir.



Şekil 5.7. LİNAS çeşidinde toprak üstü taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi

LİNAS çeşidinde deney setlerine göre toprak altı taze ve kuru ağırlık değerlerini gösteren grafik Şekil 5.8’de gösterilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, toprak altı taze ve kuru ağırlık bakımından 50 ppm+2,5 pH, 50 ppm+3,5 pH, ve 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru simülasyonuna maruz kalan gruplardaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LİNAS çeşidi için en yüksek taze toprak altı ağırlık kontrol grubunda, en düşük taze toprak altı ağırlık ise 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılardadır. LİNAS çeşidi için en yüksek kuru toprak altı ağırlık 100 ppm+3,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük kuru toprak altı ağırlık ise 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılardadır.

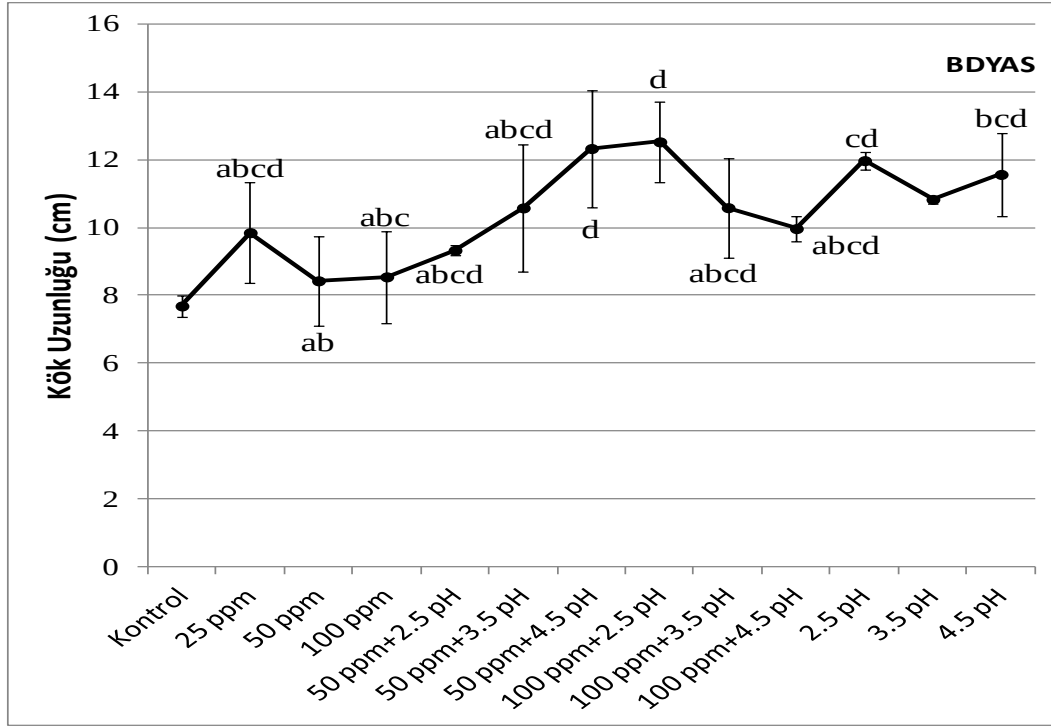


Şekil 5.8. LİNAS çeşidinde toprak altı taze ve kuru ağırlığın deney setlerine göre değerlendirilmesi

5.1.4.4. Kök uzunluğu

BDYAS-04 çeşidinde deney setlerine göre kök uzunluğu değerleri Şekil 5.9’da gösterilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, kök uzunluğu bakımından 50 ppm, 100 ppm, 50 ppm+ 4,5 pH, 100 ppm+ 2,5 pH ve 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan grupların değerleri arasındaki varyasyonun istatistiksel anlamda önemli olduğu tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek kök uzunluğu 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük kök uzunluğu ise kontrol grubunda tespit edilmiştir.

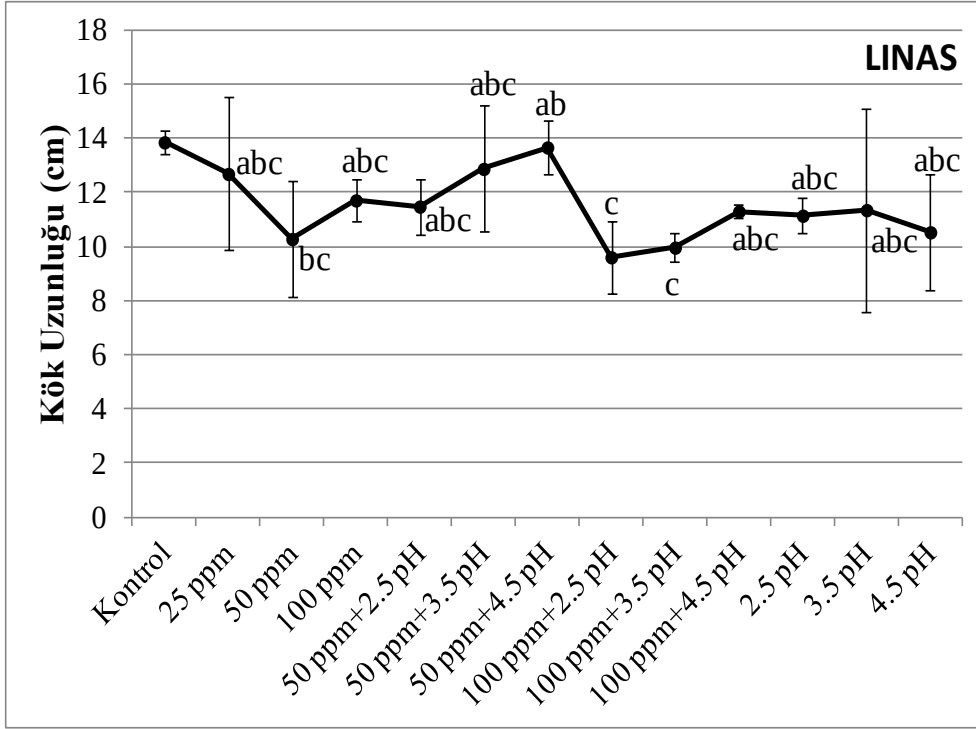
Maksymiec ve Krupa (2007) ağır metal stresleri ile muamele edilen bitkilerin bu streslere karşı verecekleri yanıtları incelemek üzere yaptıkları çalışmada çalı fasulyesi, soğan ve mısır bitkilerini kullanarak bu bitkileri 25 ve 150 μM Cu çözeltisi ve 50 μM metil jasmonat çözeltisine maruz bırakmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, her iki stres faktörü de bitkilerde kök büyümesini önemli oranda azaltmış ve bitki büyümesinde önemli bir engelleyici etken olduğu kanısına varılmıştır. Tez çalışmasında ise Maksymiec ve Krupa (2007)’nin sonuçlarından farklı olarak en düşük kök uzunluğunun kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.9. BDYAS-04 çeşidinde kök uzunluğunun deney setlerine göre değerlendirilmesi

LİNAS çeşidinde deney setlerine göre kök uzunluğu değerleri Şekil 5.10'da gösterilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında kök uzunluğu bakımından 50 ppm+4,5 pH asit yağmuru grubu ile 100 ppm+ 2,5 pH ve 100 ppm+3,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan gruplar arasındaki varyasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmaktadır. LİNAS çeşidi için en yüksek kök uzunluğu kontrol grubunda, en düşük kök uzunluğu ise 100 ppm+2,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılardadır.

Baker ve ark. (1989), çalışmalarında kirli topraklarda artan bakır konsantrasyonunun kara kavak bitkisindeki etkilerini incelemişlerdir. Eşik değerin üzerindeki ağır metal konsantrasyonlarının bitkinin kök ve sürgün uzamalarını, kalınlaşma ve ince kök hacmini azalttığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da kontrol grubuna kıyasla Cu stresine maruz kalan bitkilerde kök uzamasının azalması, Baker ve ark. (1989)'nın sonuçlarını desteklemektedir.

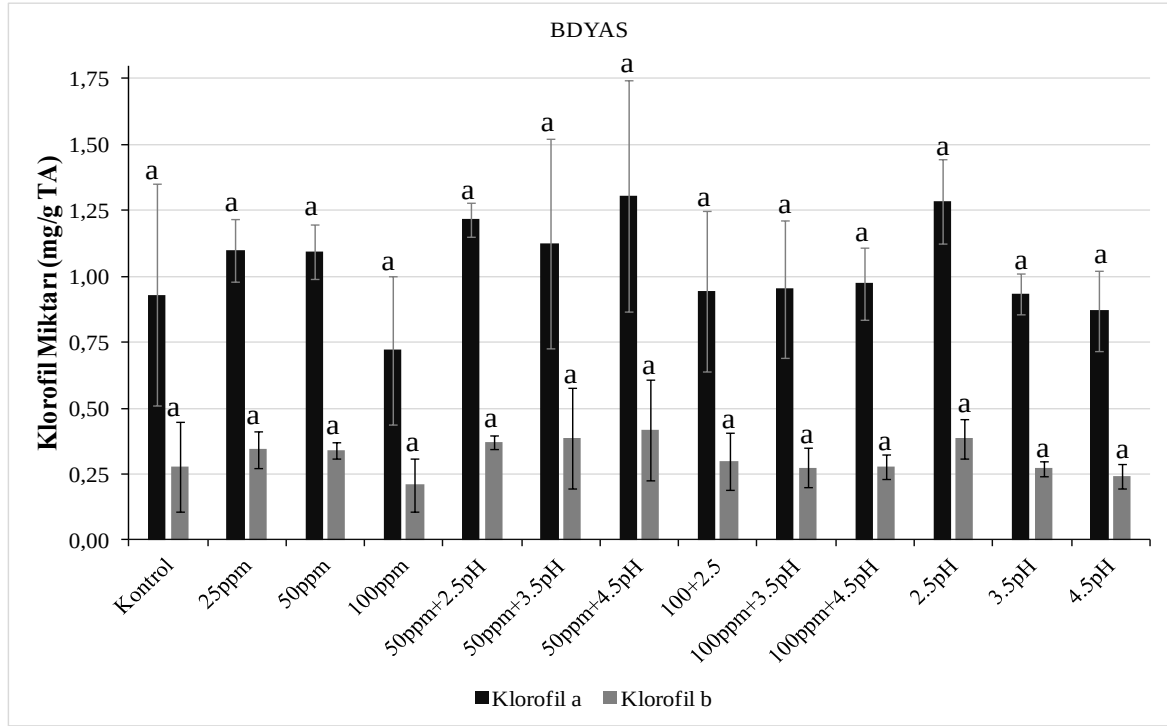


Şekil 5.10. LİNAS çeşidinde kök uzunluğunun deney setlerine göre değerlendirilmesi

5.1.4.5. Klorofil miktarı

BDYAS-04 çeşidinde klorofil a ve klorofil b miktarının deney setlerine göre elde edilen değerleri Şekil 5.11’de gösterilmektedir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, klorofil miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek klorofil miktarı 50 ppm+ 4,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük klorofil miktarı ise 100 ppm’lik Cu stresi uygulanan saksılardadır. Buna göre Cu konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak klorofil miktarında azalma gözlemlenmektedir. Bu durum fotosentez miktarının azalacağını ve organik madde üretiminde düşüşe neden olacağını düşündürmektedir.

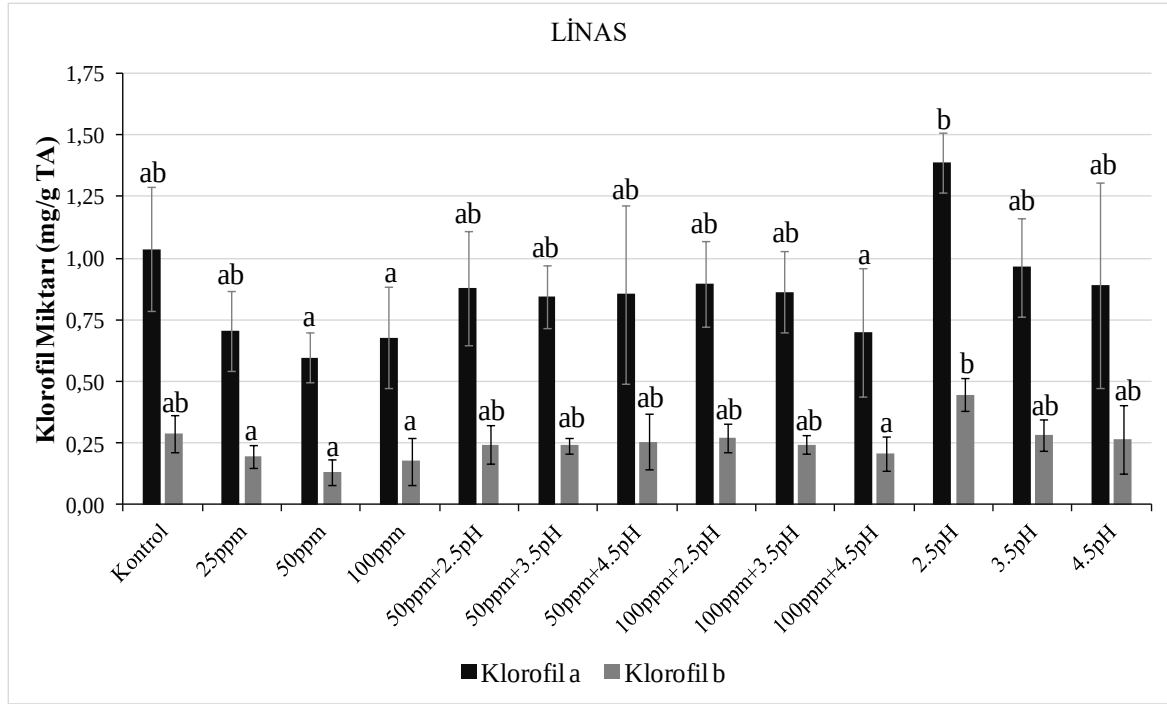
Nazir ve ark. (2019) çalışmalarında domates bitkilerine 40 gün süre ile 100 ppm’lik Cu stresi uygulamış ve bu uygulama sonunda yüksek konsantrasyonlardaki Cu stresine karşı bitkinin fotosentez ve stoma aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da en düşük klorofil miktarının 100 ppm Cu uygulanan bireylerde görülmesi, Nazir ve ark. (2019)’nın bulgularını desteklemektedir.



Şekil 5.11. BDYAS-04 çeşidinde klorofil a ve b miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

LİNAS çeşidinde klorofil a ve klorofil b miktarının deney setlerine göre elde edilen değerleri Şekil 5.12’de gösterilmektedir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, klorofil miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. LİNAS çeşidi için en yüksek klorofil miktarı 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük klorofil miktarı ise 50 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır. Buna göre asitli ortamda bitkide klorofil miktarının artmasına paralel olarak fotosentez ve besin üretiminin de arttığı, bakır ağır metalinin ise fotosentez ve besin üretimini azalttığı söylenebilir.

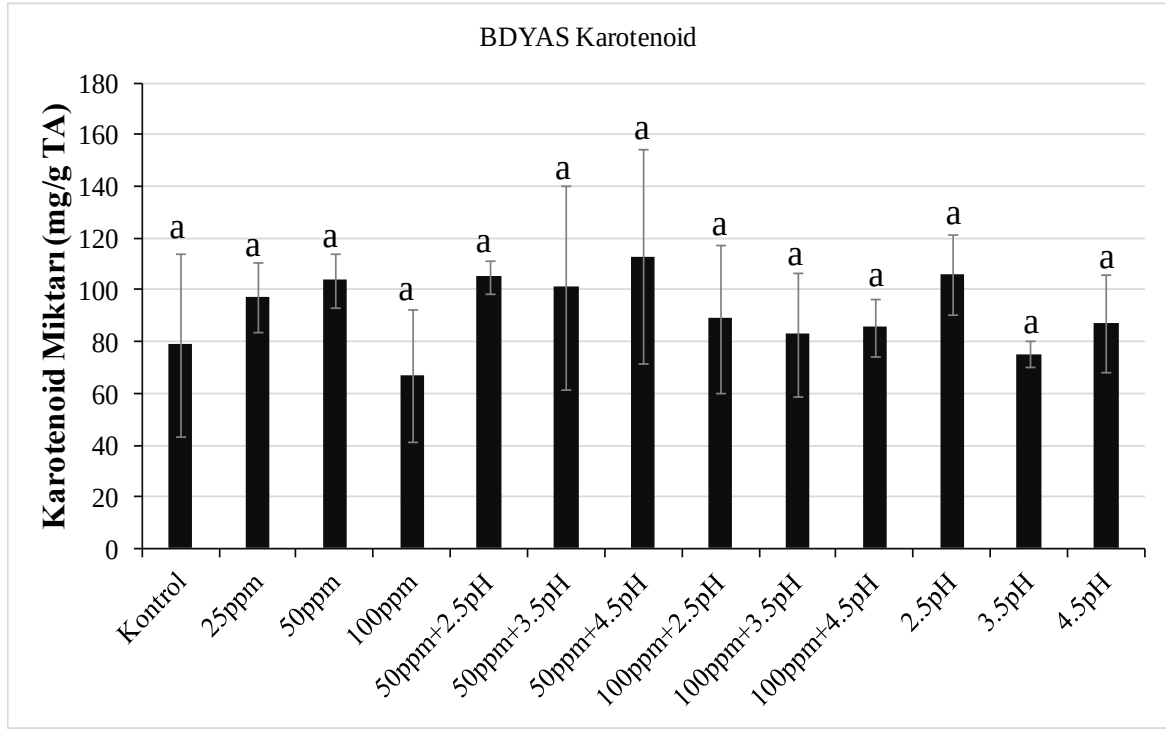
Dunand ve ark. (2002), hıyar bitkisinde meydana gelen fotosentez reaksiyonlarının bakır toksisitesine bağlı değişimini inceledikleri çalışmalarında 0 ve 10 µg/g konsantrasyona sahip çözeltilerle bitkiyi sulamış ve çalışma sonucunda fotosentezin olgun yapraklarda %52, genç yapraklarda %27 azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu azalmanın temel sebebi olarak yapraklarda stomaya bağlı hareketlerin doğrultusunda CO₂ asimilasyonunun genç yapraklarda yüksek oranda azalması olduğu kanısına varmışlardır.



Şekil 5.12. LİNAS çeşidinde klorofil a ve b miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

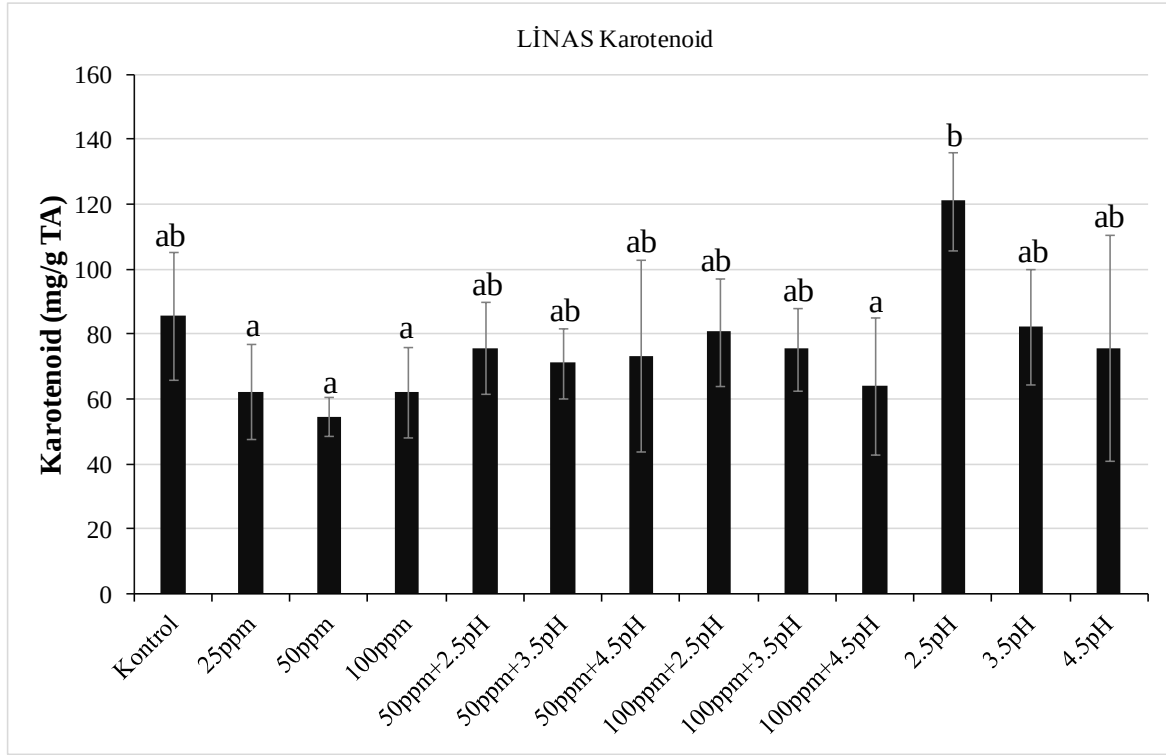
5.1.4.6. Karotenoid miktarı

BDYAS-04 çeşidinde karotenoid miktarının deney setlerine göre elde edilen değerleri Şekil 5.13'te verilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, karotenoid miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek karotenoid miktarı 50 ppm+4,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılarda, en düşük karotenoid miktarı ise 100 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır. Buna göre yüksek konsantrasyon değerindeki Cu stresi, karotenoid miktarının azalmasına neden olmuştur.



Şekil 5.13. BDYAS-04 çeşidinde karotenoid miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

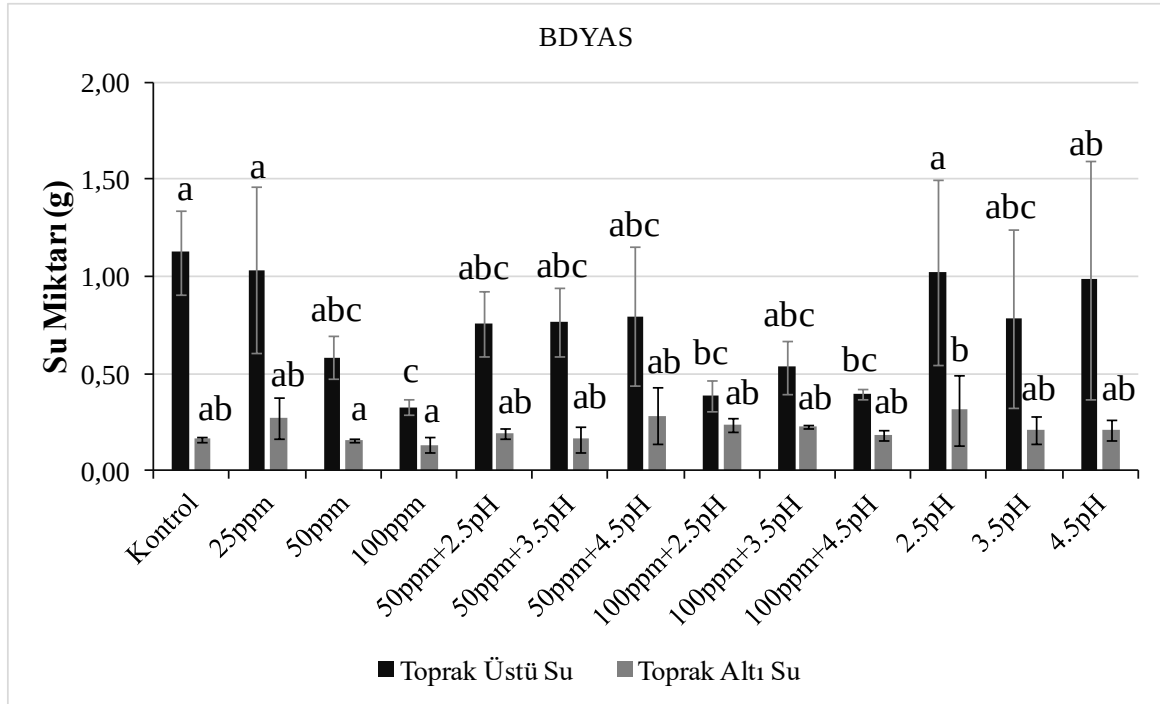
LİNAS çeşidinde karotenoid miktarının deney setlerine göre elde edilen değerleri Şekil 5.14'te verilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, karotenoid miktarı bakımından 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksılar ile 25, 50, 100 ppm ve 100 ppm+4,5 pH asit yağmuru (karma) simülasyonu uygulanan saksılar arasındaki varyasyon istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. LİNAS çeşidi için en yüksek karotenoid miktarı 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan saksılarda en düşük karotenoid miktarı ise 50 ppm Cu stresi uygulanan saksılarda görülmektedir.



Şekil 5.14. LİNAS çeşidinde karotenoid miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

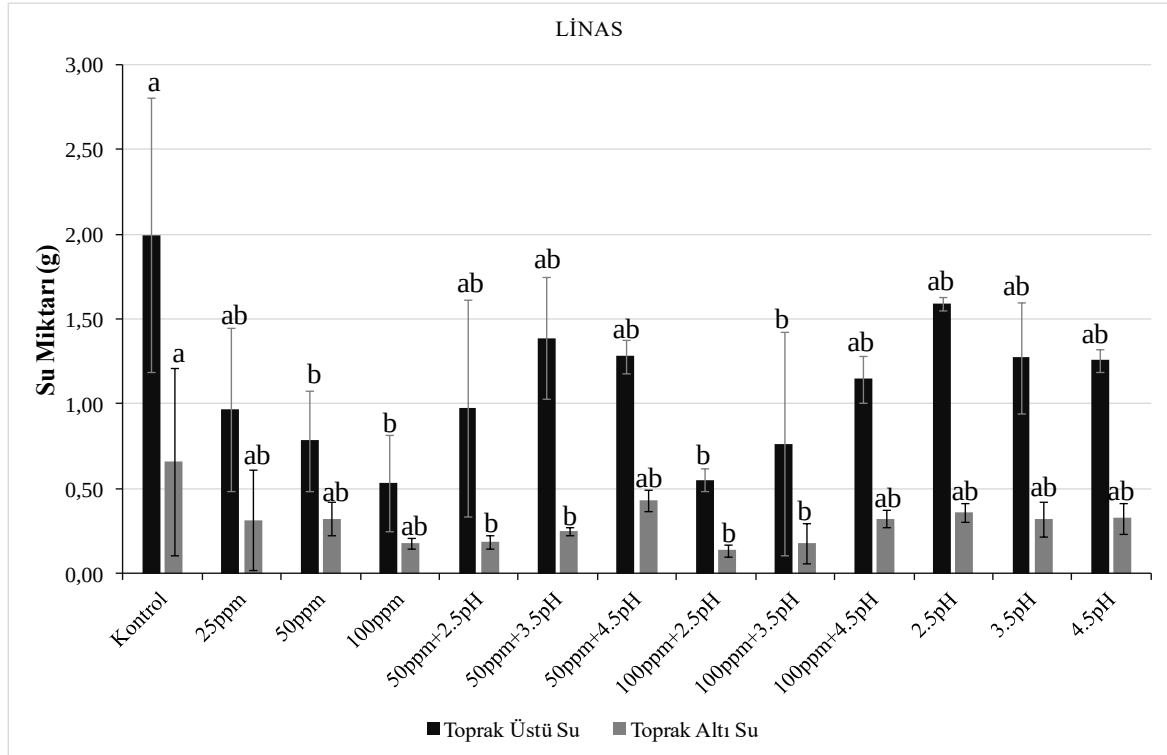
5.1.4.7. Su içeriği

BDYAS-04 çeşidinde toprak altı ve toprak üstü dokulardaki su içeriğine ait değerler Şekil 5.15'te gösterilmiştir. BDYAS-04 çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, su içeriği bakımından 100 ppm Cu stresine maruz bırakılan grubun toprak üstü ve toprak altı su içeriğinin kendi aralarındaki varyasyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 2,5 pH asit yağmuru simülasyonu uygulanan grubun toprak üstü ve toprak altı su içeriğinin kendi aralarındaki farklılığın da istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu tespit edilmiştir. BDYAS-04 çeşidi için en yüksek su içeriği kontrol grubunda, en düşük su içeriği ise 100 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır.



Şekil 5.15. BDYAS-04 çeşidinde toprak altı ve toprak üstü dokulardaki su miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

LİNAS çeşidinde toprak altı ve toprak üstü dokulardaki su içeriğine ait değerler Şekil 5.16’da gösterilmiştir. LİNAS çeşidinde farklı stres işlemlerine maruz bırakılan aspir bireyleri arasında, su içeriği bakımından kontrol grubu ile 100 ppm+2,5 pH ve 100 ppm+3,5 pH değerlerinde elde edilen varyasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LİNAS çeşidi için en yüksek su içeriği kontrol grubunda, en düşük su içeriği ise 100 ppm Cu stresi uygulanan saksılardadır.



Şekil 5.16. LİNAS çeşidinde toprak altı ve toprak üstü dokulardaki su miktarının deney setlerine göre değerlendirilmesi

5.2. Moleküler Analizlere Ait Bulgular

5.2.1. Bakır (Cu) stresi

Aspir çeşitleri 21 gün boyunca bitki büyütme kabinde yetiştirilmiştir. Yetiştirilen aspir çeşitleri (LİNAS, BALCI ve BDYAS-04) 21. günde hasat edilerek farklı derişimlerde hazırlanan (Kontrol, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm) bakır çözeltisi içerisinde konulmuştur. Kontrol grubunda yalnızca 1X Hoagland çözeltisi kullanılmıştır. Cu uygulamaları bitki büyütme kabinde 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. 24 saatin ardından aspir çeşitlerinin yaprak, kök ve kotiledon dokularından örneklem alımı yapılmıştır.

5.2.2. Asit yağmuru simülasyonu ve uygulaması

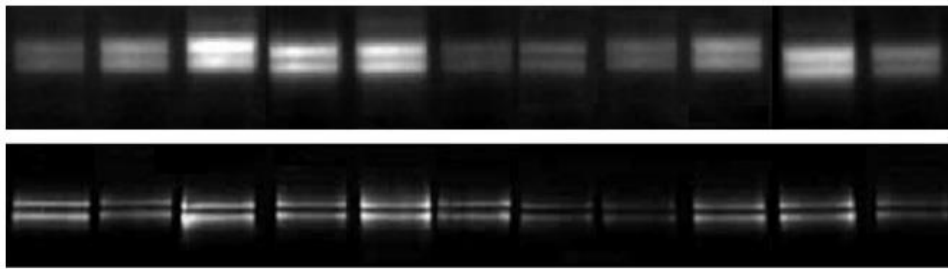
Aspir çeşitleri 21 gün boyunca bitki büyütme kabinde yetiştirilmiş ve konsantrasyon değerleri birbirinden farklı olan (Kontrol, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm) Cu stresi ve farklı pH'larda hazırlanan asit yağmuru solüsyonlarının

kombine olarak kullanıldığı (pH:2,5 pH:3,5 ve pH:4,5) solüsyonların içerisine konulmuştur. Kontrol grubu olarak belirlenen gruplarda yalnızca 1X Hoagland çözeltisi kullanılmıştır. Aspir çeşitlerine iklimlendirme kabiniinde 24 saat boyunca Cu stresi+ asit yağmuru simülasyonu uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda aspir çeşitlerinin yaprak, kök ve kotiledon kısımlarından örneklem alımı yapılmıştır. Ayrıca 21. günün sonunda yetiştirilen bitkilere farklı pH değerlerinde (2,5 pH; 3,5 pH ve 4,5 pH) asit yağmuru simülasyonu da uygulanarak yine bu stres muamelesinin ardından üç farklı dokudan (kök, yaprak ve kotiledon) örneklem alımı yapılmıştır.

5.2.3. Total RNA izolasyonu

Cu stresi ve asit yağmuru simülasyonuna 24 saat boyunca maruz kalan aspir çeşitlerinden alınan farklı doku örnekleri, -80 °C'lik dondurucuda izolasyon işlemine kadar saklanmış, daha sonra bu örneklerden Trizol (TRIGent) protokolü aşamaları uygulanarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi sonrasında Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılarak RNA'ların miktar ve saflık değerleri belirlenmeye çalışılmıştır (Bölükbaşı, 2018).

İzole edilen RNA'ların kontrolü amacıyla %1,2'lik agoroz jel elektrofezinde yürütme işlemine tabii tutularak kontrolü sağlanmıştır. (Şekil 5.17).



Şekil 5.17. İzolasyonu sağlanmış RNA'ların agoroz jel görüntüleri

5.2.4. cDNA (Komplementer DNA) sentezi

İzole edilen RNA'lardan ProtoScript-II First Strand cDNA Synthesis Kit (BioLabs Inc.) kullanılarak cDNA sentezi işlemi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.11-5.19'da farklı ağır metal stresi ve asit yağmuru simülasyonu uygulanmış aspir çeşitlerinin farklı kısımlarından alınan cDNA'ların saflık ölçümleri ve miktarları verilmiştir (Bölükbaşı, 2018).

Çizelge 5.11. Cu uygulanan BDYAS-04 çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,82	1653,06
L	25 ppm	1,82	1567,84
L	50 ppm	1,83	1437,91
L	100 ppm	1,82	1431,75
L	250 ppm	1,82	1536,48
L	500 ppm	1,82	1580,58
L	1000 ppm	1,84	1586,63
R	KONTROL	1,84	1538,79
R	25 ppm	1,82	1493,39
R	50 ppm	1,84	1523,79
R	100 ppm	1,82	1541,29
R	250 ppm	1,81	1535,12
R	500 ppm	1,82	1514,85
R	1000 ppm	1,82	1588,19
C	KONTROL	1,81	1444,88
C	25 ppm	1,82	1466,43
C	50 ppm	1,84	1430,67
C	100 ppm	1,84	1477,74
C	250 ppm	1,82	1559,18
C	500 ppm	1,82	1540,21
C	1000 ppm	1,84	1566,83
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak			

Çizelge 5.12. Cu uygulanan BALCI çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,82	1505,67
L	25 ppm	1,82	1562,34
L	50 ppm	1,83	1531,21
L	100 ppm	1,82	1582,14
L	250 ppm	1,82	1511,34
L	500 ppm	1,82	1534,74
L	1000 ppm	1,84	1529,08
R	KONTROL	1,82	1514,38
R	25 ppm	1,86	1552,42
R	50 ppm	1,82	1501,00
R	100 ppm	1,83	1558,96
R	250 ppm	1,82	1587,95
R	500 ppm	1,84	1559,59
R	1000 ppm	1,82	1526,65

Çizelge 5.12. devamı

C	KONTROL	1,85	1484,78
C	25 ppm	1,82	1421,05
C	50 ppm	1,82	1501,33
C	100 ppm	1,81	1595,13
C	250 ppm	1,82	1493,48
C	500 ppm	1,81	1435,41
C	1000 ppm	1,82	1412,37
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak			

Çizelge 5.13. Cu uygulanan LİNAS çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	Stres Uygulaması	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,83	1523,56
L	25 ppm	1,81	1538,10
L	50 ppm	1,82	1505,50
L	100 ppm	1,82	1527,16
L	250 ppm	1,83	1422,76
L	500 ppm	1,82	1436,25
L	1000 ppm	1,82	1520,49
R	KONTROL	1,83	1581,85
R	25 ppm	1,82	1493,78
R	50 ppm	1,81	1524,77
R	100 ppm	1,84	1499,87
R	250 ppm	1,83	1468,39
R	500 ppm	1,82	1579,41
R	1000 ppm	1,82	1586,28
C	KONTROL	1,84	1596,65
C	25 ppm	1,83	1619,61
C	50 ppm	1,82	1594,43
C	100 ppm	1,82	1528,02
C	250 ppm	1,82	1509,86
C	500 ppm	1,81	1493,38
C	1000 ppm	1,82	1525,24
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak			

Çizelge 5.14. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	Bakır stresi + pH:2,5 AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,83	1543,95
L	250 ppm	1,82	1575,24
L	500 ppm	1,81	1427,27
L	1000 ppm	1,82	1352,08
R	KONTROL	1,81	1465,29
R	250 ppm	1,82	1431,14
R	500 ppm	1,83	1350,73
R	1000 ppm	1,82	1300,72

C	KONTROL	1,83	1323,56
C	250 ppm	1,81	1338,10
C	500 ppm	1,82	1305,50
C	1000 ppm	1,82	1327,16
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.14. devamı

Part	Bakır stresi + pH:3,5 AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,83	1543,95
L	250 ppm	1,84	1559,59
L	500 ppm	1,82	1526,65
L	1000 ppm	1,85	1484,78
R	KONTROL	1,81	1465,29
R	250 ppm	1,82	1501,33
R	500 ppm	1,81	1595,13
R	1000 ppm	1,82	1493,48
C	KONTROL	1,83	1323,56
C	250 ppm	1,82	1412,37
C	500 ppm	1,82	1484,52
C	1000 ppm	1,83	1446,56
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.14. devamı

Part	Bakır stresi + pH:4,5 AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,83	1543,95
L	250 ppm	1,82	1579,41
L	500 ppm	1,82	1586,28
L	1000 ppm	1,84	1596,65
R	KONTROL	1,81	1465,29
R	250 ppm	1,82	1594,43
R	500 ppm	1,82	1528,02
R	1000 ppm	1,82	1509,86
C	KONTROL	1,83	1323,56
C	250 ppm	1,82	1525,24
C	500 ppm	1,82	1535,75
C	1000 ppm	1,83	1531,25
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.15. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	Bakır stresi + pH:2,5 AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,85	1484,78
L	250 ppm	1,82	1421,05
L	500 ppm	1,82	1301,33
L	1000 ppm	1,81	1395,13
R	KONTROL	1,82	1493,48
R	250 ppm	1,81	1435,41
R	500 ppm	1,82	1412,37
R	1000 ppm	1,82	1484,52
C	KONTROL	1,81	1543,47
C	250 ppm	1,82	1205,74
C	500 ppm	1,84	1253,46
C	1000 ppm	1,82	1256,29
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.15. devamı

Part	Bakır stresi + pH:3,5 AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,85	1484,78
L	250 ppm	1,81	1335,12
L	500 ppm	1,82	1414,85
L	1000 ppm	1,82	1488,19
R	KONTROL	1,82	1493,48
R	250 ppm	1,82	1466,43
R	500 ppm	1,84	1530,67
R	1000 ppm	1,84	1477,74
C	KONTROL	1,81	1543,47
C	250 ppm	1,82	1240,21
C	500 ppm	1,84	1366,83
C	1000 ppm	1,84	1527,96
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.15. devamı

Part	Bakır stresi + pH:4,5 AY	260/280	ng/ μ L
L	KONTROL	1,85	1484,78
L	250 ppm	1,82	1500,08
L	500 ppm	1,82	1532,22
L	1000 ppm	1,84	1525,22
R	KONTROL	1,82	1493,48
R	250 ppm	1,82	1475,98
R	500 ppm	1,82	1530,24
R	1000 ppm	1,82	1478,47
C	KONTROL	1,81	1543,47
C	250 ppm	1,82	1536,17
C	500 ppm	1,82	1573,99
C	1000 ppm	1,86	1512,98
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.16. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	Bakır stresi + pH:2,5 AY	260/280	ng/ μ L
L	KONTROL	1,81	1566,01
L	250 ppm	1,82	1576,98
L	500 ppm	1,82	1547,91
L	1000 ppm	1,83	1582,04
R	KONTROL	1,82	1484,52
R	250 ppm	1,82	1567,84
R	500 ppm	1,83	1437,91
R	1000 ppm	1,82	1431,75
C	KONTROL	1,82	1556,29
C	250 ppm	1,82	1580,58
C	500 ppm	1,84	1586,63
C	1000 ppm	1,84	1538,79
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.16. devamı

Part	Bakır stresi + pH:3,5 AY	260/280	ng/ μ L
L	KONTROL	1,81	1566,01
L	250 ppm	1,82	1552,84
L	500 ppm	1,82	1496,39
L	1000 ppm	1,83	1552,08
R	KONTROL	1,82	1484,52

R	250 ppm	1,82	1500,08
R	500 ppm	1,82	1532,22
R	1000 ppm	1,84	1525,22
C	KONTROL	1,82	1556,29
C	250 ppm	1,82	1475,98
C	500 ppm	1,82	1530,24
C	1000 ppm	1,82	1478,47
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.16. devamı

Part	Bakır stresi + pH:4,5	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,81	1566,01
L	250 ppm	1,82	1493,48
L	500 ppm	1,81	1435,41
L	1000 ppm	1,82	1412,37
R	KONTROL	1,82	1484,52
R	250 ppm	1,83	1446,56
R	500 ppm	1,82	1405,74
R	1000 ppm	1,84	1553,46
C	KONTROL	1,82	1556,29
C	250 ppm	1,82	1584,89
C	500 ppm	1,85	1553,11
C	1000 ppm	1,82	1552,31
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.17. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,83	1543,95
L	2,5	1,87	1354,25
L	3,5	1,80	1800,36
L	4,5	1,79	1769,45
R	KONTROL	1,81	1465,29
R	2,5	1,84	1567,48
R	3,5	1,82	1467,48
R	4,5	1,86	1338,94
C	KONTROL	1,83	1323,56
C	2,5	1,77	1457,54
C	3,5	1,89	1506,12
C	4,5	1,84	1199,76
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

Çizelge 5.18. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,85	1484,78
L	2,5	1,78	1654,25
L	3,5	1,84	1448,65
L	4,5	1,85	1458,58
R	KONTROL	1,82	1493,48
R	2,5	1,80	1125,32
R	3,5	1,88	1253,69
R	4,5	1,82	1555,06
C	KONTROL	1,81	1543,47
C	2,5	1,79	1478,98
C	3,5	1,80	1475,36
C	4,5	1,78	1238,58
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

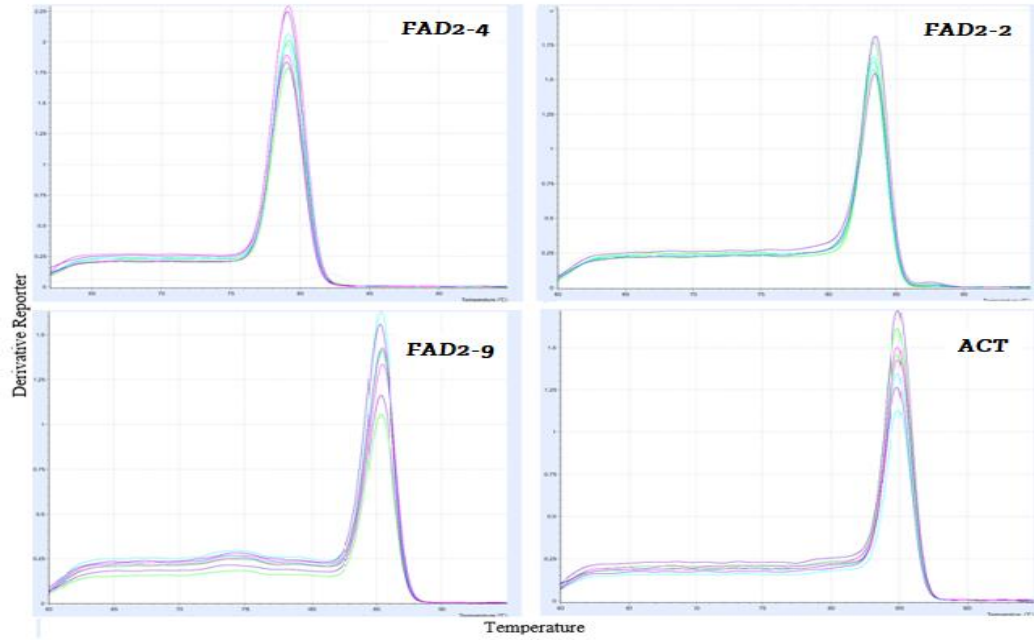
Çizelge 5.19. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidine ait cDNA'ların miktar ve saflıkları

Part	AY	260/280	ng/μL
L	KONTROL	1,81	1566,01
L	2,5	1,88	1458,65
L	3,5	1,85	1536,24
L	4,5	1,87	1278,98
R	KONTROL	1,82	1484,52
R	2,5	1,77	1536,24
R	3,5	1,80	1701,96
R	4,5	1,81	1497,69
C	KONTROL	1,82	1556,29
C	2,5	1,86	1325,65
C	3,5	1,76	1296,85
C	4,5	1,80	1378,64
R: kök, C: kotiledon, L: yaprak AY: Asit Yağmuru			

5.2.5. Real-Time PCR reaksiyonu

Real-Time PCR işlemi SYBR Green I Master boyası kullanılarak Light Cycler Nano (Roche) cihazı ile üç biyolojik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak Actin (ACT) geni seçilerek mRNA ifadeleri için *FAD* genlerine ait normalizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra SYBR Green I boyası kullanılarak Real-Time PCR reaksiyonu sırasında gerçekleştirilen miktar belirleme/ekspresyon miktarının tespiti

işlemini takiben PCR’da oluşabilecek dimerin varlığı ve PCR etkinliğini saptamak için Melting Curve (Erime Eğrisi) analizi gerçekleştirilmiştir (Bölükbaşı, 2018). Melting Curve analizin sonuçları ve kullanılan genler Şekil 5.18’de verilmiştir.



Şekil 5.18. Kullanılan genler ve Melting Curve analiz sonuçları

Farklı konsantrasyon değerlerinde Cu ve asit yağmuru simülasyonuna maruz bırakılan aspir çeşitlerinden alınan farklı doku örneklerinin ACT ve *FAD2* genlerine ait Real Time PCR reaksiyonu eşzamanlı olarak izlenmiş ve bu sırada pik profilleri kaydedilmiştir. Reaksiyondaki ilk önemli artışa sahip olan noktayı ifade eden Ct değeri her bir örnekten ayrı ayrı elde edilen pik profilleri sayesinde belirlenmeye çalışılmıştır (Bölükbaşı, 2018)

5.2.6. RT-PCR sonuçlarının normalizasyonu ve analizi

Cu uygulanmış olan üç farklı aspir çeşidinin bitki örneklerinden alınan farklı dokularına ait transkript ve kontrol profilleri, housekeeping gen olarak seçilen aktin (*ACT*) geni ile karşılaştırması yapılmıştır. Elde edilen verilerin analizleri Livak ve Schmittgen’in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre yapılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001; Bölükbaşı, 2018).

Çalışmada housekeeping gen olarak kullanılan ACT (aktin) geni ve uygun şartlar göz önüne alınarak elde edilen Ct değeri gen ekspresyon sonuçları normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). IBM SPSS Statistic-21 programı kullanılarak elde edilen verilerin

ortalama değerleri, standart sapma değerleri ve standart hata değerleri hesaplanarak tespit edilmeye çalışılmıştır.

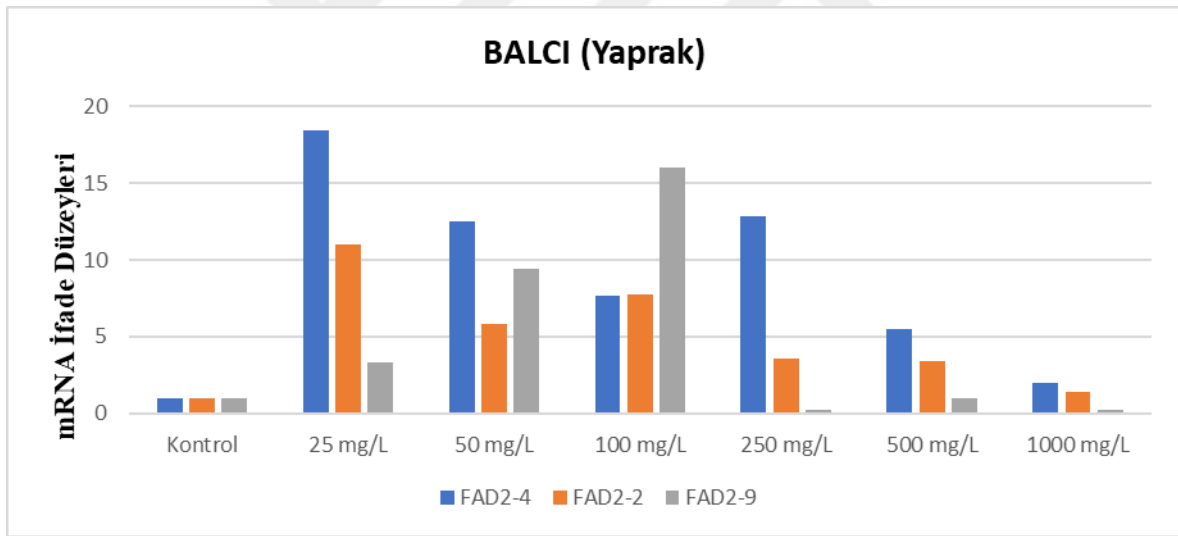
5.3. Cu Uygulamalarına Ait Verilerin Normalizasyonu ve Analizi

5.3.1. BALCI eşidi

Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna gore normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde Cu uygulanan BALCI eşidinin yaprak,kok ve kotiledon rneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri izelge 5.20’de gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

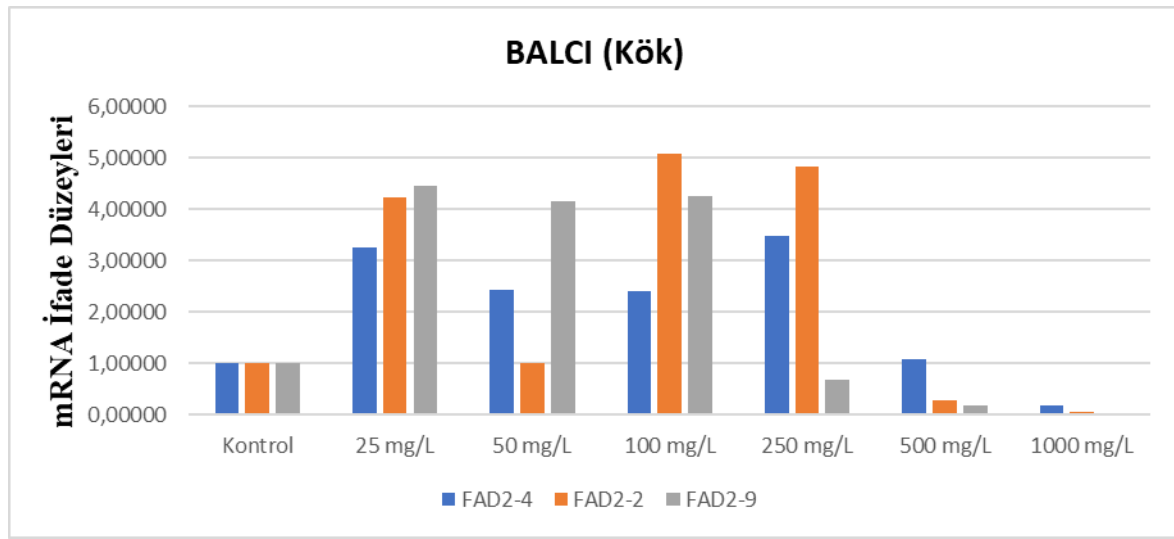
Cu uygulanan BALCI bireylerinin yapraklarında farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerine ait ifade seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.19'da verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 18 kat ile en yüksek 25 ppm konsantrasyonda, en düşük ise hemen hemen 1,9 kat ile 1000 ppm konsantrasyonda gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 25 ppm değerindeki Cu uygulamalarında, en düşük ise 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyesi ise en yüksek 100 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir. (Çizelge 5.20).



Şekil 5.19. Cu uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki *FAD2* ifade seviyeleri

BALCI çeşidinde yaprak organında *FAD2* gen ifade düzeyleri (*FAD2-9* geni 250-500 ve 1000 ppm değerleri hariç) tüm konsantrasyon değerlerinde kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Bu durumda yaprağın yağ asidi dönüşümünde bakırın olumsuz bir etkide bulunmadığı söylenebilir. Ayrıca belirli konsantrasyon değerlerinde (100-250 ppm değerleri arasında) *FAD2* gen ifade düzeylerinin savunmada rol aldığı da düşünülmektedir.

Cu uygulanan BALCI bireylerinin köklerinde farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.20’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi yaklaşık 3 kat ile en yüksek 250 ppm konsantrasyonda, en düşük ise yaklaşık 0,18 kat ile 1000 ppm konsantrasyonda ifade olduğu gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 100 ppm ve en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyesi ise en yüksek 25 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.20).

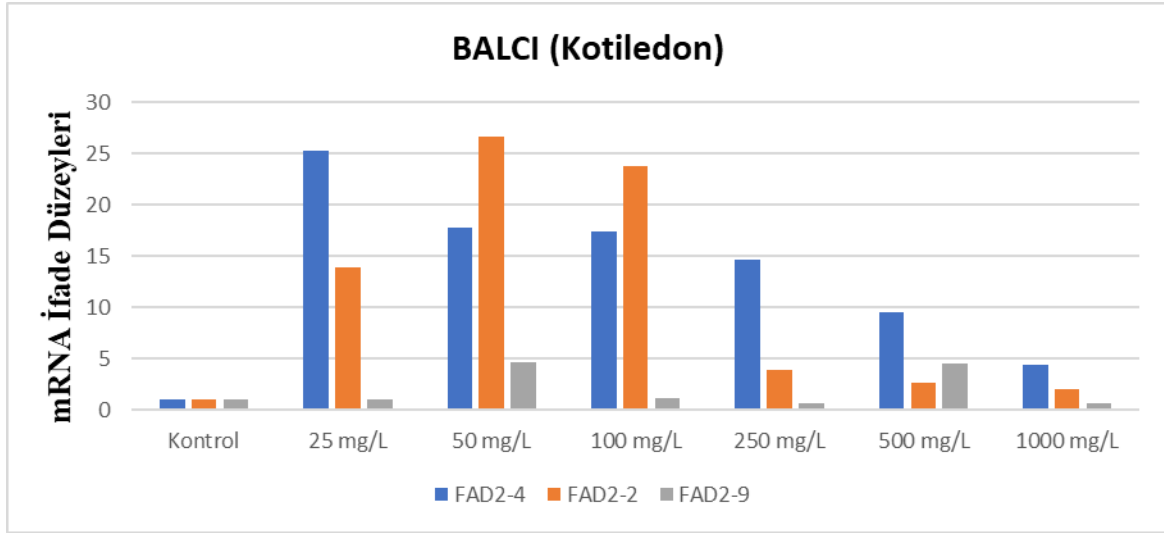


Şekil 5.20. Cu uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki *FAD2* ifade seviyeleri

Cu uygulamalarından en yüksek düzeyde etkilenen bitki organının kök olduğu görülmektedir. Özellikle 1000 ppm değerindeki Cu stresinde *FAD2* gen ifade düzeylerinde yağ asidi dönüşümünün neredeyse bittiği düşünülmektedir. Ayrıca 500-1000 ppm konsantrasyon değerleri arasında *FAD2* genlerinin savunmada da yetersiz kaldığı söylenebilir. Düşük konsantrasyondaki Cu stresinin bitkide *FAD2* gen ifade seviyelerini olumlu etkilediği tespit edilmiştir.

Cu uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokularında farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.21’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 25 kat ile en yüksek 25 ppm konsantrasyonda, en düşük ise hemen hemen 4 kat ile 1000 ppm konsantrasyonda ifade olduğu gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 50 ppm ve en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9*

geninin ifade seviyesi ise en yüksek 50 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.20).



Şekil 5.21. Cu uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

BALCI çeşidinin kotiledon örneklerinde düşük konsantrasyon değerlerindeki Cu stresinde *FAD2* gen ifade düzeylerinde artış meydana gelmiştir. Yüksek konsantrasyon değerlerinde ise *FAD2* gen ifade seviyeleri azalmıştır. 250-500 ppm konsantrasyonları arasında gen seviyesinde aniden görülen artış sebebiyle *FAD2-9* geninin savunmada yer aldığı düşünülmektedir.

Li ve ark. (2015), aspir bitkisinin maruz kaldığı bakır ve kurşun oranı ve buna bağlı olarak aspir bitkisinde meydana gelen değişimleri araştırdıkları çalışmalarında fide, dallanma ve çiçeklendirme aşamalarında bitki büyümesi ve gelişimi, GSH seviyesi ve GSH₂ ifade hızını incelenmiştir. Düşük konsantrasyondaki Cu stresi uygulanan örneklerin fide ve dallanma dönemlerinde GSH içeriğinin arttığı görülmüş ancak ağır metal konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak kök ve yapraklarda GSH içeriğinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Real Time-PCR analiz sonucu incelendiğinde artan metal konsantrasyonu ve ifade seviyeleri arasındaki ilişkinin negatif olduğu saptanmış ve bunun sonucunda aspir bitkisi düşük konsantrasyonda kısa süreli maruz kaldığı ağır metal solüsyonlarında normal bitki büyümesini korumak için GSH sentezini artırırken yüksek konsantrasyon ve uzun süreli ağır metale maruz kalması durumunda GSH sentezini azalttığı gözlemlenmiş ve ağır metalin bitkide toksisite meydana getirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bitki, strese maruz

kaldığında kendini korumak amacıyla GSH sentezlemektedir. Bitki yüksek konsantrasyon değerindeki strese maruz kaldığında GSH seviyesini daha fazla artırmaktadır. Böylece stresin toksik etkisini en aza indirmeye çalışmaktadır. Bu çalışmada özellikle *FAD2-9* geninde 250-500 ppm konsantrasyon değerleri arasında *FAD2* seviyesini artırarak bitkide savunmaya da katıldığı düşünülmektedir. Her iki çalışmada da yüksek konsantrasyon değerinde strese maruz kalan bitkilerin savunma için ifade düzeylerinin artırdığı ve bu genleri savunmada kullandığı sonucuna ulaşılmıştır.

5.3.2. BDYAS-04 çeşidi

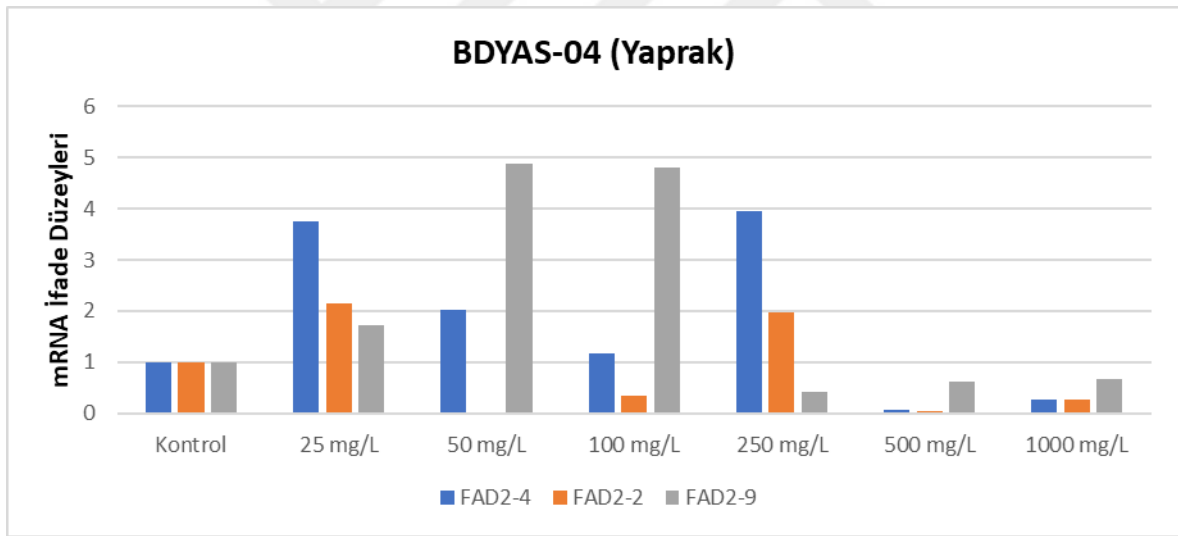
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde Cu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin yaprak,kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri Çizelge 5.21’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.21. Cu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

		Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	25	3,74722	2,15465	1,72266	2,78098	1,38007	1,42326	1,60560	0,79678	0,82172
	50	2,01989	0,02355	4,87311	0,76499	0,00943	3,04466	0,44167	0,00544	1,75784
	100	1,18256	0,34882	4,79741	0,17511	0,09336	1,11232	0,10110	0,05390	0,64220
	250	3,94107	1,98152	0,41915	0,46491	0,25692	0,11314	0,26842	0,14833	0,06532
	500	0,06117	0,04185	0,61615	0,01805	0,01092	0,29647	0,01042	0,00631	0,17117
	1000	0,26692	0,27011	0,66322	0,12487	0,05372	0,21860	0,07210	0,03102	0,12621
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	25	1,01657	2,70200	2,49523	0,77099	1,65942	1,57208	0,44513	0,95807	0,90764
	50	0,87799	2,28614	0,38226	0,61572	1,63330	0,23759	0,35549	0,94299	0,13717
	100	0,04903	1,50013	0,38613	0,01648	2,18993	0,06362	0,00952	1,26436	0,03673
	250	0,89742	2,82852	1,25543	0,27588	0,59662	1,07517	0,15928	0,34446	0,62075
	500	0,78693	0,77197	0,07759	0,08130	0,23280	0,01485	0,04694	0,13441	0,00858
	1000	0,35212	0,12319	0,09767	0,23331	0,00311	0,01987	0,13470	0,00180	0,01147
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	25	1,83898	5,94231	4,90386	0,44195	4,96105	0,95705	0,25516	2,86427	0,55255
	50	6,44556	3,14683	2,68838	4,77005	0,18088	0,38939	2,75399	0,10443	0,22482
	100	2,15452	4,28460	4,55956	0,77066	1,22941	0,79458	0,44494	0,70980	0,45875
	250	4,88732	2,79960	6,11191	0,58131	0,20280	0,21916	0,33562	0,11709	0,12653
	500	1,35120	0,75991	0,70166	0,72733	0,16400	0,44128	0,41993	0,09468	0,25477
	1000	0,68551	0,07826	0,41324	0,08127	0,02376	0,06650	0,04692	0,01372	0,03840

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

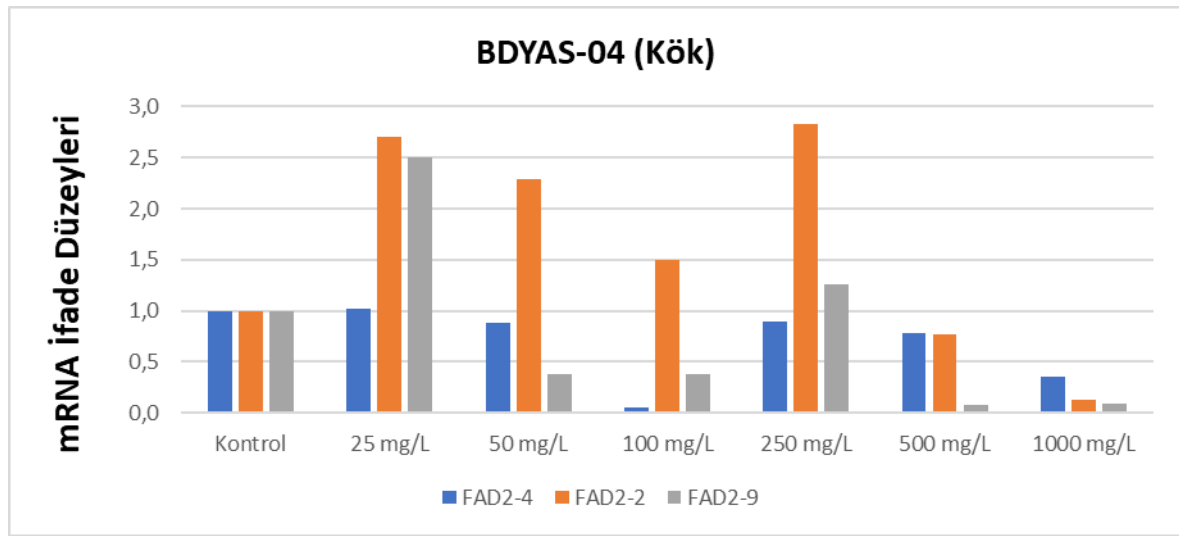
Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yapraklarında farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.22’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 4 kat ile en yüksek 250 ppm konsantrasyonda, en düşük ise 500 ppm konsantrasyonda gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 25 ppm değerindeki Cu uygulamalarında, en düşük ise 50 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyesi ise en yüksek 50 ppm, en düşük 250 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.21).



Şekil 5.22. Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki *FAD2* ifade seviyeleri

Yüksek konsantrasyon değerindeki Cu stresinde BDYAS-04 çeşidi bireylerinin yapraklarında *FAD2* gen ifade düzeylerinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durum Cu stresinin yüksek konsantrasyonlarının bitkide toksik etkiye sebep olabileceğini düşündürmektedir. Hatta *FAD2-4* geninin 100-250 ppm değerleri arasında savunmada yer aldığı ancak artan konsantrasyona bağlı olarak savunma için bile yetersiz kaldığı sonucuna ulaşılabilir.

Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin köklerinde farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.23'te verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 1,01 kat ile en yüksek 25 ppm konsantrasyonda, en düşük ise 100 ppm konsantrasyonda ifade olduğu gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 250 ppm ve en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyesi ise en yüksek 25 ppm, en düşük 500 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.21).

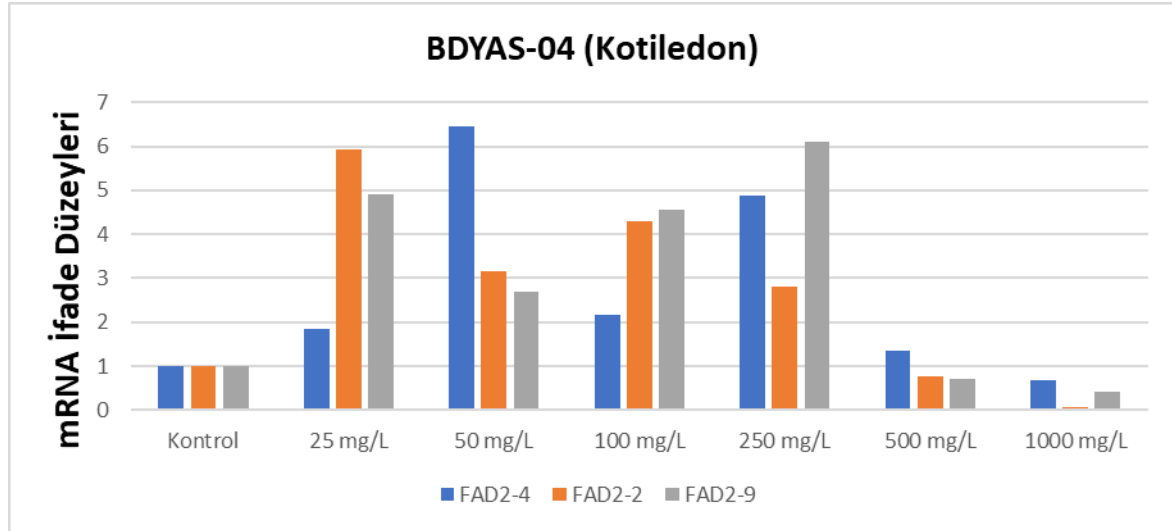


Şekil 5.23. Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki *FAD2* ifade seviyeleri

BDYAS-04 çeşidinin kök örneğinden elde edilen *FAD2* genlerinin ifade düzeyleri incelendiğinde, düşük konsantrasyon değerlerinde Cu uygulamasında *FAD2* gen ifade düzeylerinin arttığı, yüksek konsantrasyon değerlerinde ise azaldığı tespit edilmiştir. Özellikle 500 ppm ve sonrasında bakır stresinin bitkide toksik etkiye sebep olduğu görülmektedir.

Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokularında farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.24'te verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 6,5 kat ile en yüksek 50 ppm konsantrasyonda, en düşük ise hemen hemen 0,68 kat ile 1000 ppm konsantrasyonda ifade olduğu gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 25 ppm ve en düşük 1000 ppm değerindeki Cu

uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyesi ise en yüksek 250 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.21).



Şekil 5.24. Cu uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

Düşük konsantrasyon değerlerinde Cu stresine maruz bırakılan bitkilerin *FAD2* genlerinin ifade düzeylerinde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Bakır elementinin bitkiler için mikro besin elementi olarak gerekli olduğunu yapılan bu çalışmada *FAD2* gen düzeylerinin ifade seviyelerinin düşük konsantrasyon değerlerinde yüksek ifadesi sonucunu baz alarak söylemek mümkündür. Bitkide toksik etki yaratmasının bakır metalinin konsantrasyonuna ve bitkinin ne kadar süre bakıra maruz kaldığına bağlı olduğu bu çalışma ile de desteklenmektedir (Gautam ve diğerleri, 2016).

Bölükbaşı (2018) doktora tezinde farklı konsantrasyon değerlerine sahip bakır stresi ile simüle edilen dört farklı aspir çeşidine ait farklı bitki kısımlarındaki oleik asidin linoleik aside dönüşümünü sağlayan *FAD2* geninin ifade düzeylerini Real-Time PCR yöntemini kullanarak incelemiştir. Bitki yetiştirme kabininde 21 günlük süreyle yetiştirdiği aspir çeşitlerine farklı konsantrasyon değerlerinde (0, 40, 80, 160, 320, 640 mg/L) bakır stresi uygulamış ve örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time analizlerini yapmış. elde ettiği bulgulara göre, bakır konsantrasyonlarının artmasına paralel olarak gen ifade seviyelerinde azalma gözlemlenmiş; ancak 160 ve 320 mg/L olan bakır konsantrasyon değerlerinde gen ifade seviyelerinde artış meydana geldiğini belirtmiştir. Aspride ağır

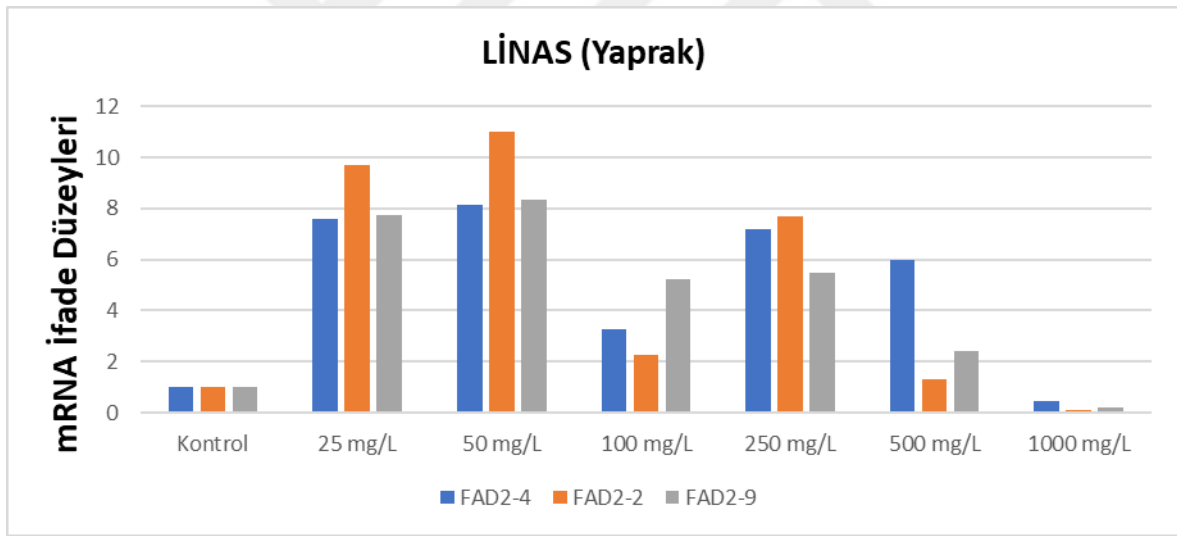
metal streslerine karşı oluşturulan savunma mekanizmasında *FAD2* geninin de önemli rol oynadığının tespit edildiğini belirtmiştir. Bu çalışmada elde edilen bakır konsantrasyonlarının artmasına bağlı ifade seviyelerinde düşüş olması yapılan tez çalışması ile paralellik göstermektedir. Ancak bu çalışmada 160 ve 320 mg/L olan bakır konsantrasyonunun gen seviyelerini artırmış olsa da tez çalışmasında aspir çeşit ve dokularında 500 ve 1000 mg/L olan bakır konsantrasyonlarına bağlı *FAD2* gen ifade düzeyi artmamış; 100 ve 250 mg/L olan bakır konsantrasyonunda oranı az da olsa bazı çeşit ve dokularında *FAD2* gen ifade düzeyinde artış yaşanarak bu çalışma ile yine benzerlik göstermiştir.

5.3.3. LİNAS çeşidi

Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde Cu uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak, kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait *FAD2* ekspresyon verileri Çizelge 5.22’de gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

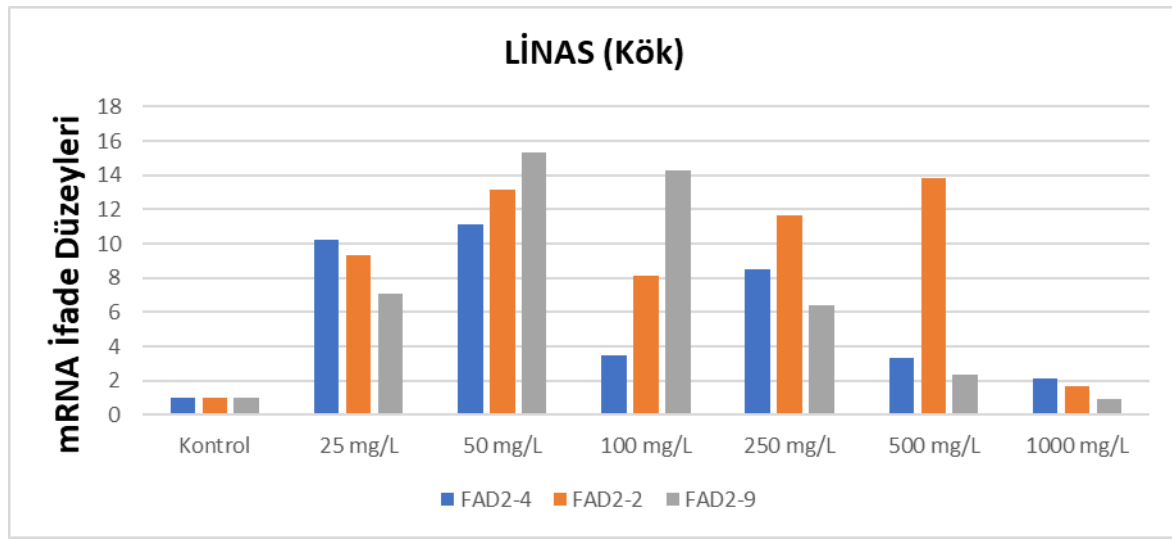
Cu uygulanan LİNAS bireylerinin yapraklarında farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.25'te verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 8 kat ile en yüksek 50 ppm konsantrasyonda, en düşük ise 1000 ppm konsantrasyonda gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyeleri en yüksek 50 ppm değerindeki Cu uygulamalarında, en düşük ise 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyeleri ise en yüksek 50 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.22).



Şekil 5.25. Cu uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki *FAD2* ifade seviyeleri

Düşük konsantrasyon değerlerinde *FAD2* gen ifade düzeylerinde artış meydana geldiği görülmektedir. LİNAS çeşidi yaprak örneklerinde *FAD2* genlerinde (*FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9*) kritik noktada ani bir azalma meydana geldiği bu konsantrasyon değerinden sonra (100-250 ppm arasında) *FAD2* genlerinde hızlı bir artış meydana gelmesi genlerin savunmada rol oynadığını göstermektedir. Ancak özellikle 1000 ppm değerindeki genlerin yağ dönüşümünde önemli oranda azalma meydana geldiği görülmüş ve savunmanın bu konsantrasyon değerinde devam edemediği tespit edilmiştir.

Cu uygulanan LİNAS bireylerinin köklerinde farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.26'da verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 11 kat ile en yüksek 50 ppm konsantrasyonda, en düşük ise 1000 ppm konsantrasyonda gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyeleri en yüksek 500 ppm değerindeki Cu uygulamalarında, en düşük ise 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyeleri ise en yüksek 50 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.22).

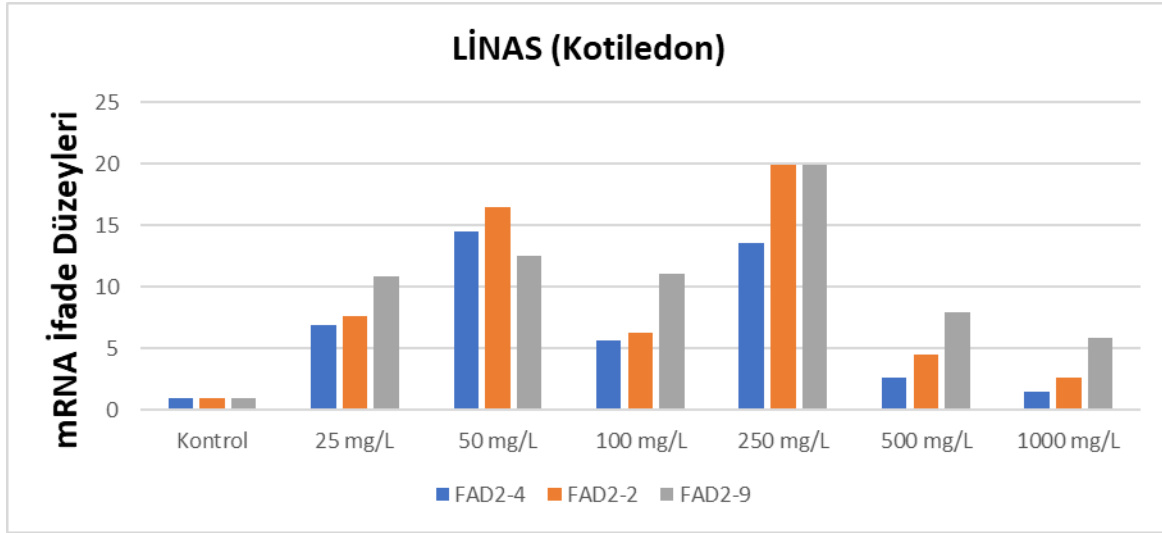


Şekil 5.26. Cu uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki *FAD2* ifade seviyeleri

LİNAS çeşidinin kök örneklerinde tüm konsantrasyon değerlerindeki Cu stresinin *FAD2* gen ifade seviyelerinin kontrol grubunun ifade seviyelerinden yüksek olduğu görülmektedir. Ancak 1000 ppm değerinde uygulanan Cu stresinin bitkide yağ asidi dönüşümünü önemli oranda azalttığı görülmüştür.

Cu uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledonlarında farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 5.27'de verilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *FAD2-4* genine ait ifade düzeyi hemen hemen 14 kat ile en yüksek 50 ppm konsantrasyonda, en düşük ise hemen hemen 1,5 kat ile 1000 ppm konsantrasyonda gözlemlenmiştir. *FAD2-2* geninin ifade seviyesi en yüksek 250 ppm değerindeki Cu uygulamalarında, en düşük ise 1000 ppm değerindeki Cu

uygulamalarında; *FAD2-9* geninin ifade seviyeleri en yüksek 250 ppm, en düşük 1000 ppm değerindeki Cu uygulamalarında gözlemlenmiştir (Çizelge 5.22).



Şekil 5.27. Cu uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

LİNAS bireylerinin kotiledonlarında tüm konsantrasyon değerlerinde *FAD2* gen ifade seviyeleri kontrol grubu ifade seviyelerinden daha yüksek ölçülmüştür. Özellikle 100-250 ppm değerleri arasında bitkide yağ asidi dönüşümünde ciddi bir oranda artış meydana gelmiştir. *FAD2* genlerinde meydana gelen bu artışa bağlı olarak *FAD2* genlerinin savunmada yer aldığı ancak bu değerden daha yüksek konsantrasyon değerlerinde *FAD2* genlerinin savunma için yetersiz kaldığı sonucuna ulaşılmıştır.

Kocaman (2019) yaptığı doktora tez çalışmasında iki farklı fasulye çeşidinde bakır stresine bağlı olarak gen ifade profillerini karşılaştırmak amacıyla CAMTA ve YABBY genlerini tercih ederek araştırma yapmıştır. Bakır streslerinde farklı konsantrasyon değerleri kullanılmış ve iki farklı fasulye çeşidinden alınan yaprak örnekleri qr-PCR metoduyla gen ifade düzeyleri belirlenerek aktin genine göre normalizasyonu sağlanmıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen sonuçlara göre farklı bakır konsantrasyonlarına maruz kalan örneklerin hedef genlerin ifadesinde kontrol grubuna göre önemli farklılıklar meydana geldiği gözlemlenmiş ve bakır stresinin Akman-98 çeşidi olan fasulye çeşidinde gen ifade düzeyinde artış meydana getirdiği ancak Önceler-98 fasulye çeşidinde azalışa neden olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmaya bakıldığında bakır stresinin gen ifade düzeylerindeki etkisinin bitki çeşidine bağlı olarak da değiştiği söylenebilmektedir. Tez çalışmasında

LİNAS , BALCI ve BDYAS-04 çeşitlerinde daha çok düşük konsantrasyonlardaki Cu stresinin bitkilerin *FAD2* gen ifade seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı görülmektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyon değerleri aspir çeşitlerinde *FAD2* gen ifade düzeyini azaltmıştır. Bu sonuca göre yapılan çalışma ve tez çalışmasında elde edilen bulguların benzerlik gösterdiği söylenebilir.

5.4. Bakır (Cu) ve Asit Yağmuru Simülasyonu Verilerinin Normalizasyonu Ve Analizi

5.4.1. BALCI çeşidi

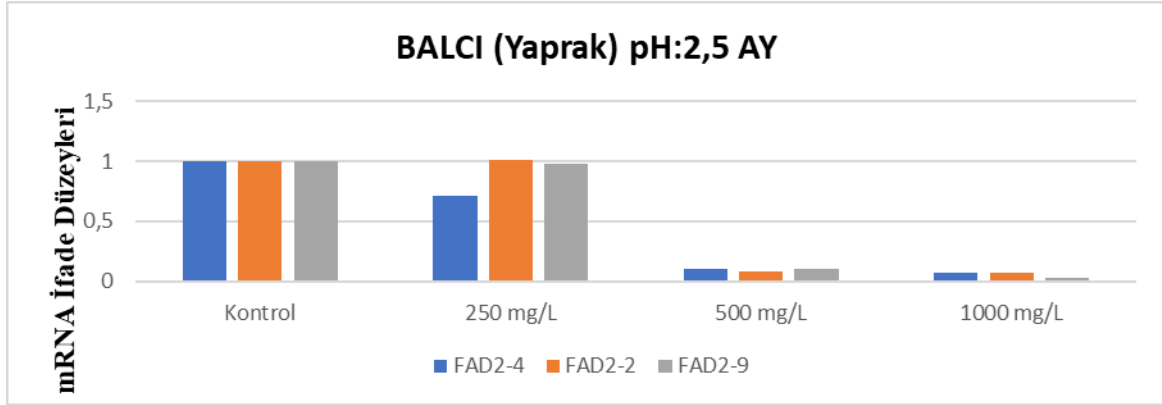
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde Cu uygulamaları (Kontrol, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm) ve farklı pH'larda hazırlanan asit yağmuru solüsyonları (pH:2,5 pH:3,5 ve pH:4,5) ile stres uygulanan BALCI çeşidinin yaprak, kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri Çizelge 5.23, Çizelge 5.24 ve Çizelge 5.25'te gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

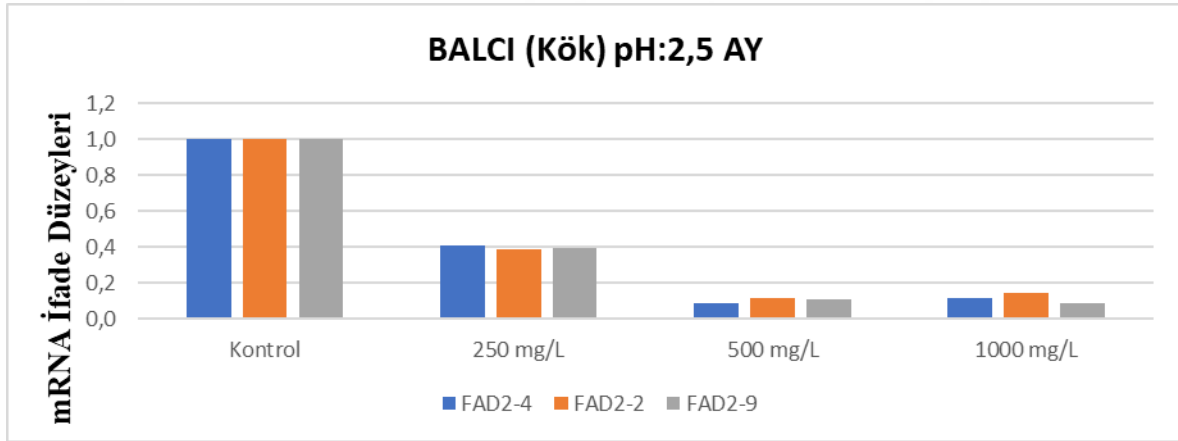
Çizelge 5.23. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:2,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,71719	1,01040	0,98137	0,34614	0,55173	0,65316	0,19984	0,31854	0,37710
	500	0,10635	0,08315	0,10266	0,05613	0,01590	0,13446	0,03241	0,00918	0,07763
	1000	0,06852	0,06823	0,02659	0,02106	0,01401	0,00878	0,01216	0,00809	0,00507
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,40764	0,38767	0,39688	0,43627	0,46678	0,61498	0,25188	0,26949	0,35506
	500	0,08407	0,11889	0,10760	0,01700	0,05746	0,04286	0,00982	0,03317	0,02474
	1000	0,11820	0,14829	0,08905	0,04330	0,14190	0,13187	0,02500	0,08192	0,07613
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,56616	0,56189	0,50034	0,41475	0,58857	0,35334	0,23945	0,33981	0,20400
	500	0,55212	0,43966	0,07628	0,39700	0,05130	0,01311	0,22921	0,02962	0,00757
	1000	0,44447	0,10621	0,07010	0,30562	0,10796	0,04457	0,17645	0,06233	0,02573

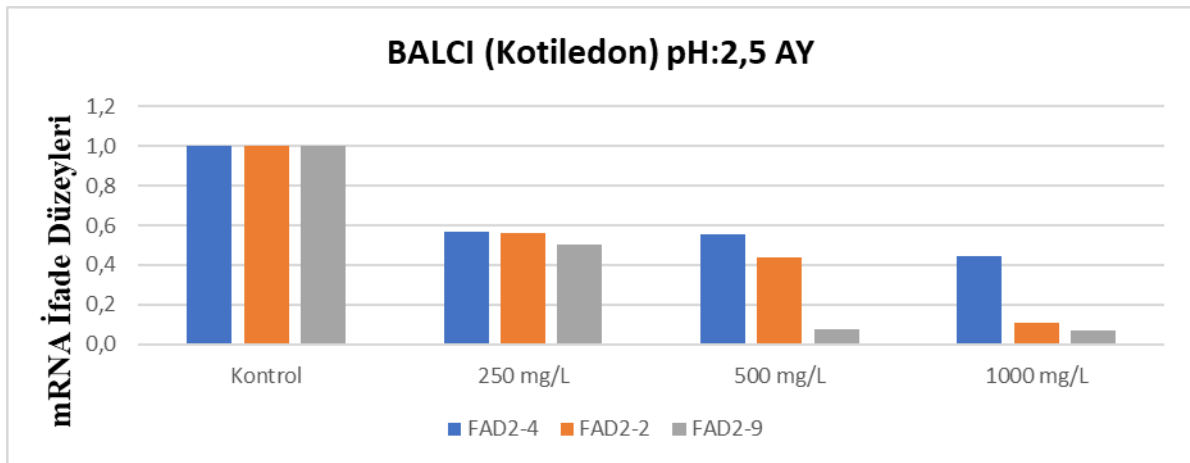
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:2,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Yüksek konsantrasyonda Cu ve kuvvetli asitin birlikte etkisi *FAD2* gen ifade seviyelerinde (özellikle yaprak örneğinde) ciddi oranda azalmaya sebep olmuştur.



Şekil 5.28. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.29. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

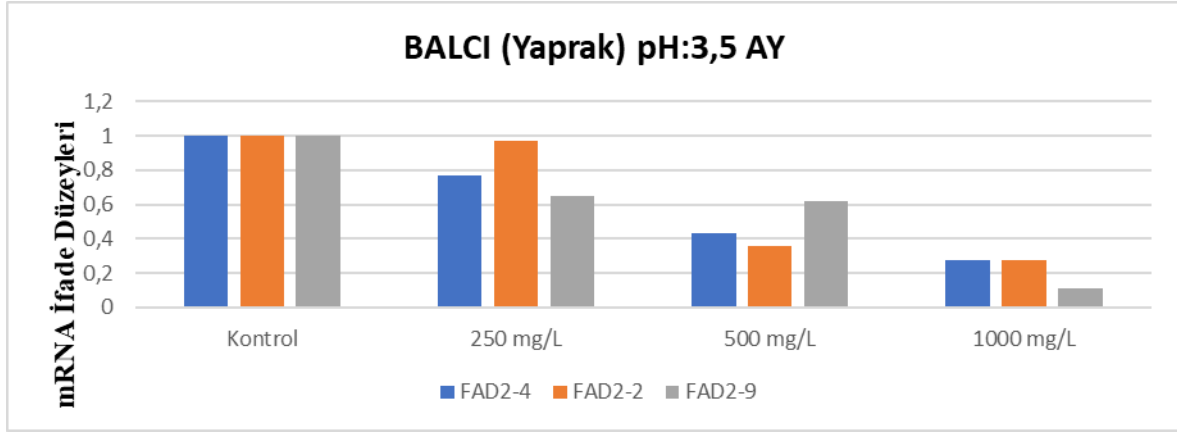


Şekil 5.30. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

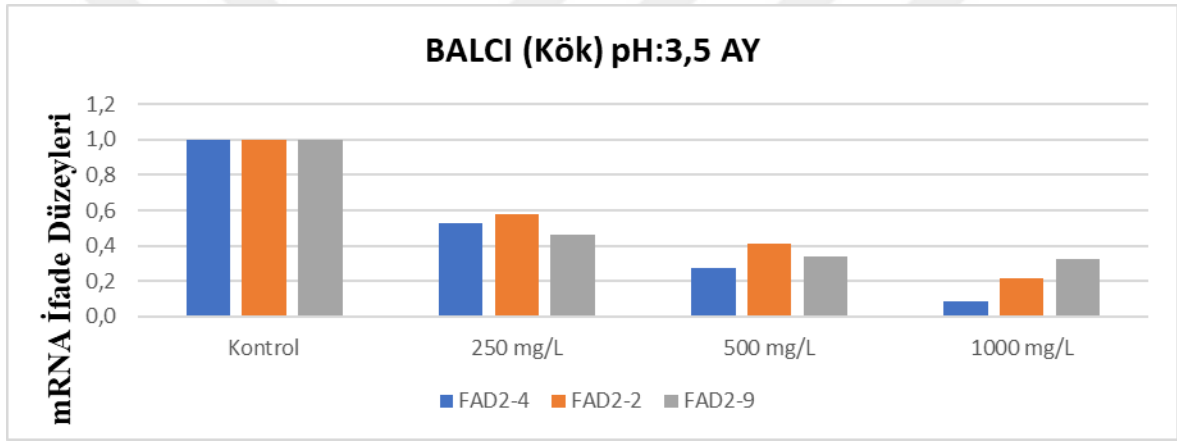
Çizelge 5.24. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:3,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,76651	0,97241	0,64653	0,46717	0,92279	0,26024	0,26972	0,53277	0,15025
	500	0,43416	0,35809	0,61903	0,26070	0,11858	0,91693	0,15052	0,06846	0,52939
	1000	0,27653	0,27753	0,10777	0,05628	0,02599	0,03024	0,03249	0,01501	0,01746
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,53092	0,58171	0,46022	0,13009	0,29880	0,55777	0,07511	0,17251	0,32203
	500	0,27503	0,40848	0,33693	0,06217	0,26184	0,08340	0,03589	0,15117	0,04815
	1000	0,08588	0,21385	0,32196	0,00862	0,14808	0,52094	0,00497	0,08550	0,30076
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,92455	0,82410	0,51106	0,20775	0,26900	0,28268	0,11995	0,15531	0,16321
	500	0,52361	0,48429	0,08743	0,40371	0,33227	0,06138	0,23308	0,19184	0,03544
	1000	0,23470	0,13393	0,07663	0,12989	0,11204	0,04872	0,07499	0,06469	0,02813

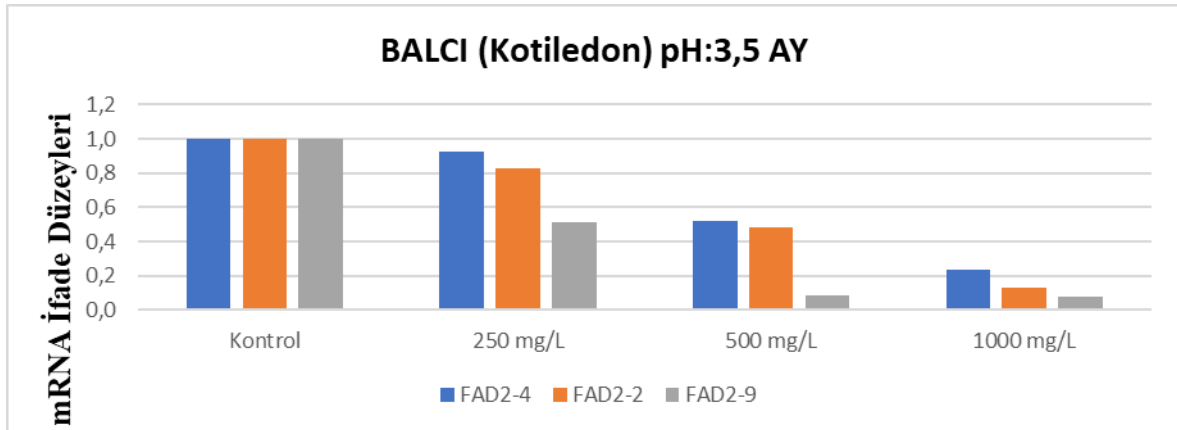
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:3,5 asit yağmuru simülasyonu uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Özellikle yüksek konsantrasyon değerindeki Cu stresi ve asit yağmurunun birlikte uygulanmasına bağlı olarak yağ asidi dönüşümünde azalma meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 5.31. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.32. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

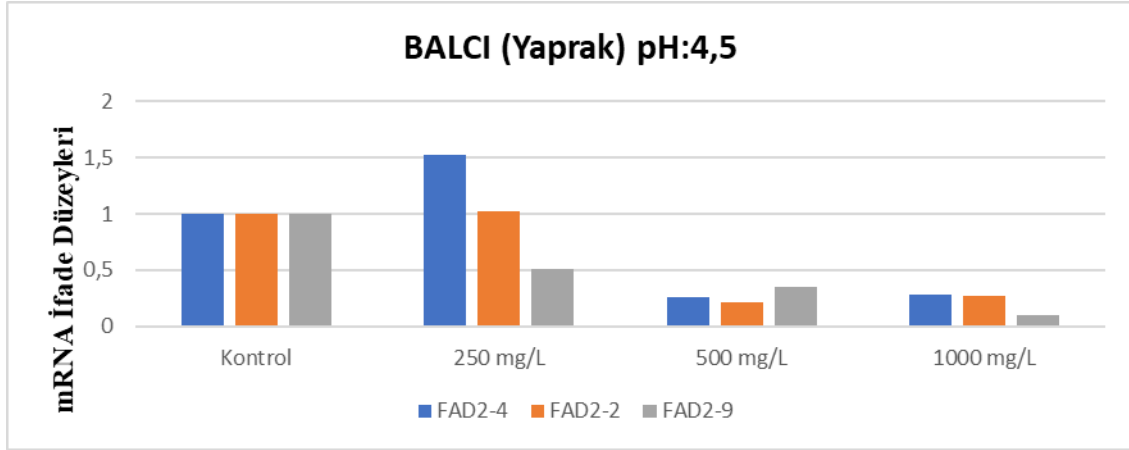


Şekil 5.33. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

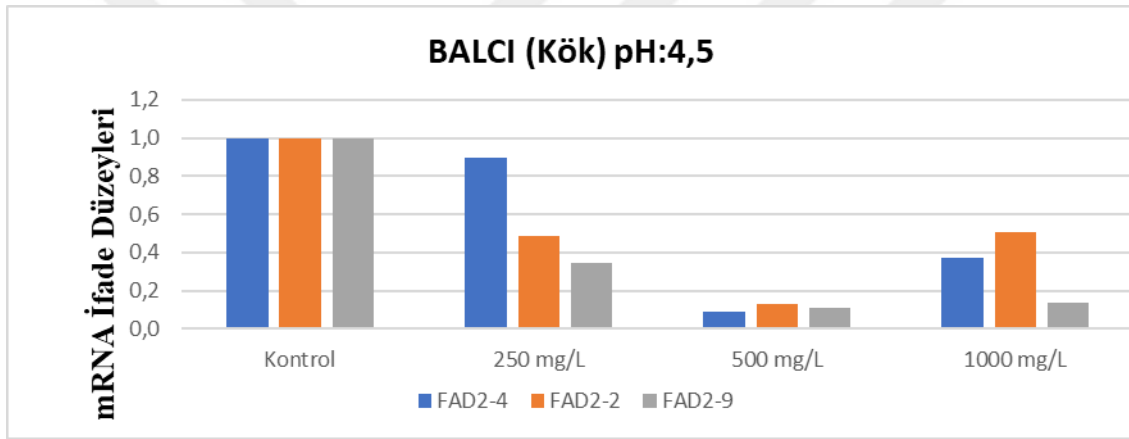
Çizelge 5.25. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:4,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,52116	1,02052	0,50768	1,60035	0,69740	0,57185	0,92396	0,40264	0,33016
	500	0,26446	0,21273	0,34777	0,16887	0,06133	0,50558	0,09750	0,03541	0,29190
	1000	0,27733	0,27203	0,10435	0,19068	0,16454	0,06398	0,11009	0,09500	0,03694
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,89696	0,48493	0,34529	0,70752	0,28061	0,33217	0,40849	0,16201	0,19178
	500	0,08733	0,12890	0,10753	0,01724	0,08062	0,02635	0,00995	0,04655	0,01521
	1000	0,37213	0,50406	0,13567	0,37272	0,54888	0,13724	0,21519	0,31690	0,07924
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,39252	0,34199	0,43995	0,34001	0,29470	0,50790	0,19630	0,17015	0,29324
	500	1,03948	0,68303	0,12771	1,31282	0,47461	0,10245	0,75796	0,27402	0,05915
	1000	1,87297	0,15505	0,20296	2,39699	0,04932	0,15282	1,38390	0,02847	0,08823

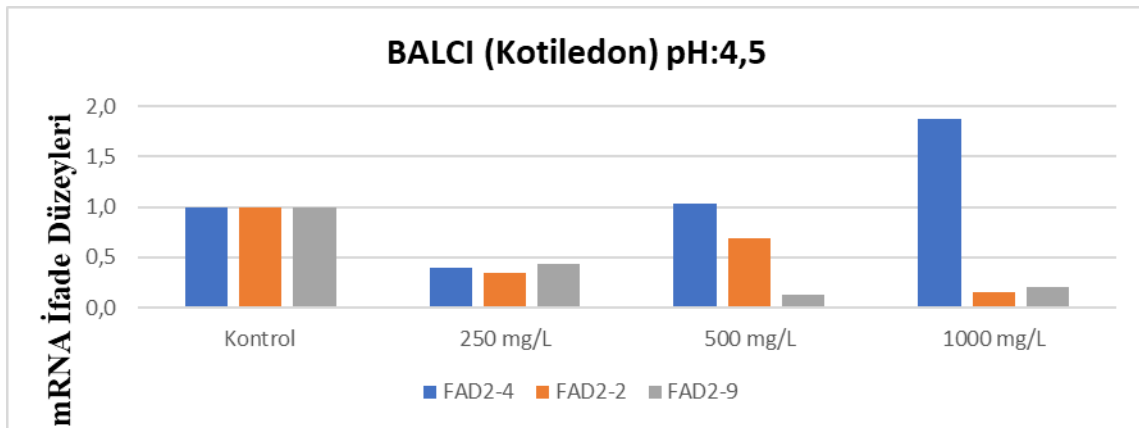
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:4,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. 250 ppm değerindeki Cu stresi ile yaprak örneğinde, 500-1000 ppm arasındaki konsantrasyon değerinde ise kotiledon örneklerinde *FAD2-4* genlerinde bir artış meydana geldiği görülmüştür. Bu durum bitkinin strese karşı savunma mekanizması geliştirdiğini düşündürmektedir.



Şekil 5.34. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.35. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.36. Cu ve asit yağmuru uygulanan BALCI bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

5.4.2. BDYAS-04 eşidi

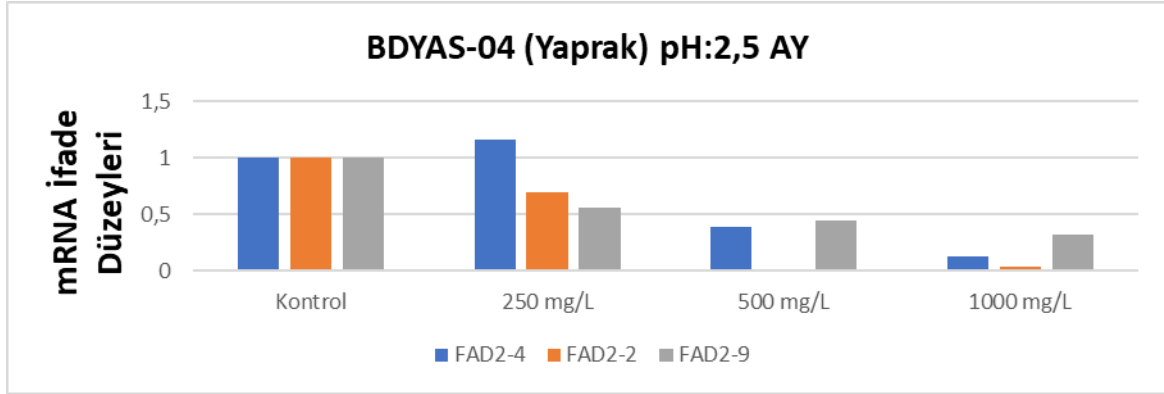
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde Cu uygulamaları (Kontrol, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm) ve farklı pH'larda hazırlanan asit yağmuru solüsyonları (pH:2,5 pH:3,5 ve pH:4,5) ile stres uygulanan BDYAS-04 eşidinin yaprak,kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri izelge 5.26, izelge 5.27 ve izelge 5.28'de gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

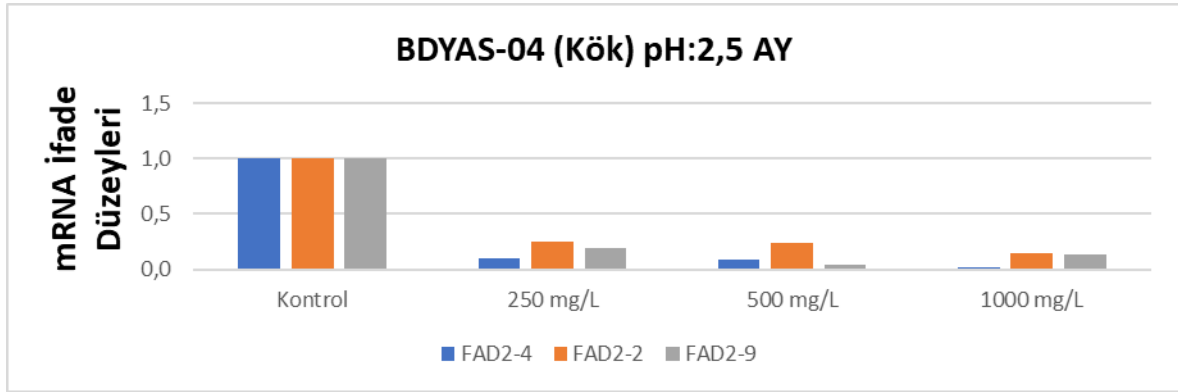
Çizelge 5.26. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:2,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,16335	0,69399	0,56046	0,51332	0,21671	0,29461	0,29637	0,12512	0,17010
	500	0,38452	0,00953	0,44061	0,03435	0,00796	0,37824	0,01983	0,00459	0,21837
	1000	0,12155	0,03587	0,31403	0,04534	0,01618	0,19308	0,02618	0,00934	0,11148
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,09910	0,24879	0,19556	0,09058	0,19495	0,02795	0,05230	0,11256	0,01614
	500	0,09026	0,23496	0,04089	0,02210	0,09978	0,01038	0,01276	0,05761	0,00599
	1000	0,01544	0,14827	0,13088	0,01336	0,06202	0,10923	0,00771	0,03581	0,06307
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,87848	0,75220	0,85368	0,55521	0,58959	0,59485	0,32055	0,34040	0,34344
	500	0,63088	0,38180	0,31190	0,81218	0,37174	0,30566	0,46891	0,21463	0,17647
	1000	0,03303	0,06528	0,06803	0,01970	0,03543	0,02797	0,01137	0,02046	0,01615

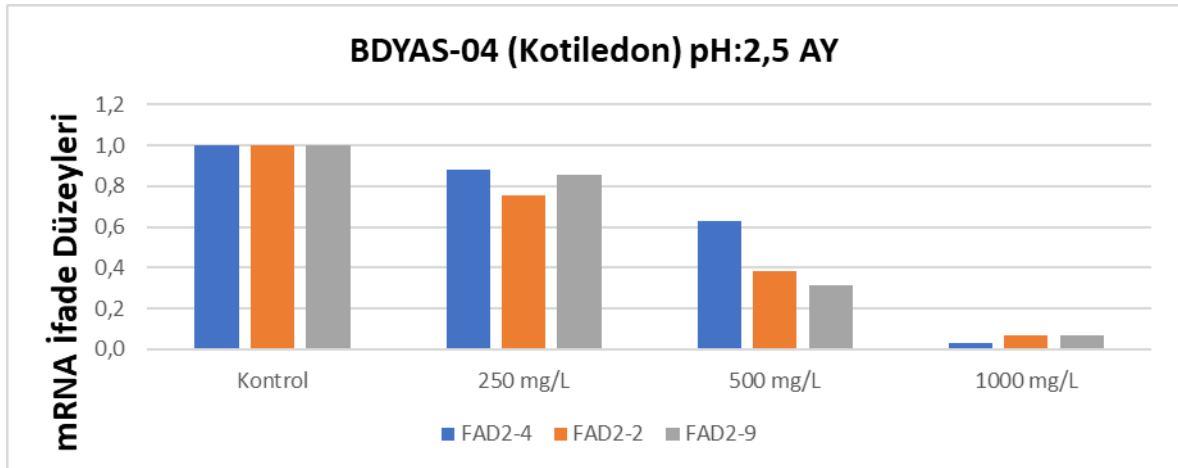
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:2,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Yüksek konsantrasyon değerindeki Cu stresi ve kuvvetli asit derecesindeki strese birlikte maruz kalan BDYAS-04 çeşidinin örneklerinde *FAD2* ifade seviyelerinin daha fazla azaldığı gözlemlenmiştir. Yaprak örneğinde 500 ppm'de *FAD2-2* ve kökte 1000 ppm'de *FAD2-4* geninde yağ asidi dönüşümünün neredeyse inhibe olduğu görülmüştür.



Şekil 5.37. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.38. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

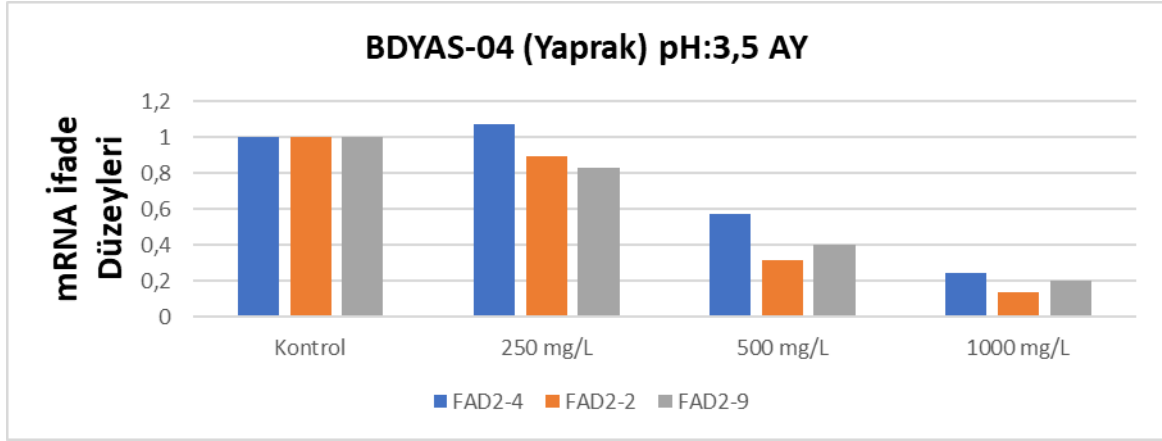


Şekil 5.39. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

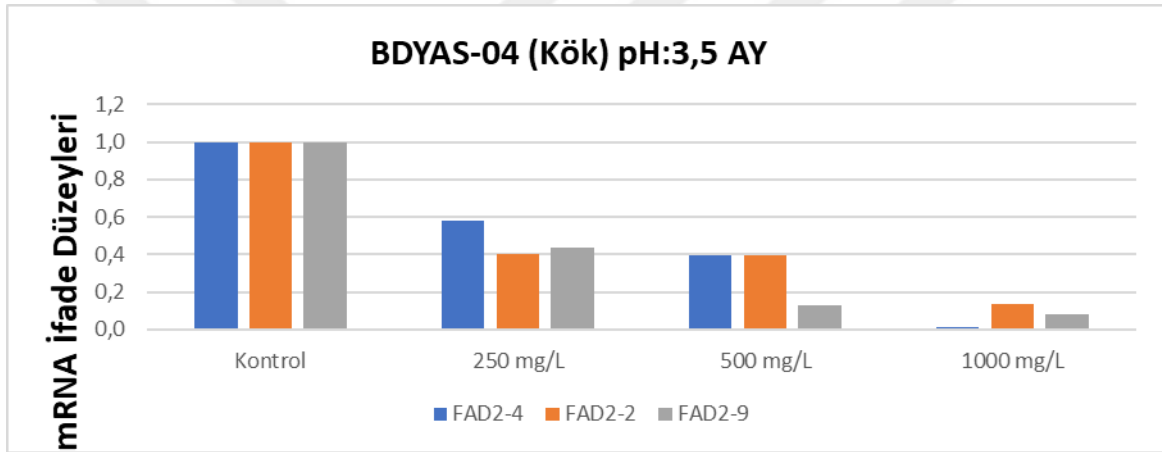
Çizelge 5.27. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:3,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,07602	0,89637	0,83120	0,44348	0,63647	0,22086	0,25604	0,36747	0,12752
	500	0,57084	0,31380	0,40211	0,59391	0,35008	0,17453	0,34290	0,20212	0,10077
	1000	0,24135	0,13664	0,20193	0,15646	0,12974	0,11533	0,09033	0,07490	0,06659
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,58158	0,39869	0,43349	0,78447	0,05321	0,23101	0,45292	0,03072	0,13338
	500	0,39783	0,39651	0,12854	0,00883	0,43804	0,11156	0,00510	0,25290	0,06441
	1000	0,00916	0,13620	0,07844	0,00398	0,11999	0,04201	0,00230	0,06928	0,02425
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,30388	1,09494	0,66343	0,27027	0,96981	0,48976	0,15604	0,55992	0,28277
	500	0,17943	0,58844	0,49361	0,08196	0,68500	0,56107	0,04732	0,39548	0,32394
	1000	0,12717	0,25392	0,25655	0,13248	0,24836	0,22139	0,07649	0,14339	0,12782

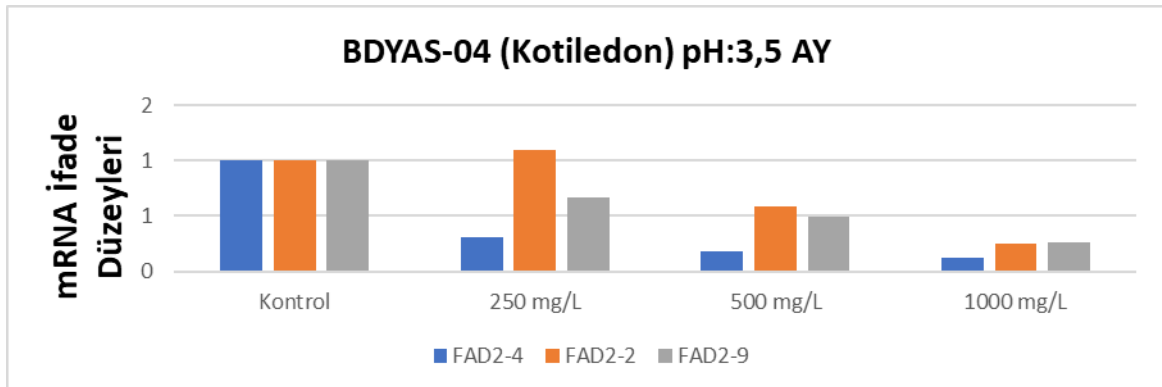
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:3,5 asit yağmuru simülasyonu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Yüksek konsantrasyon değerindeki Cu stresi ve düşük pH değerindeki asit yağmuru stresinin birlikte uygulanması sonucu *FAD2* gen ifade seviyelerinde ciddi oranda azalma meydana gelmiştir.



Şekil 5.40. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.41. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

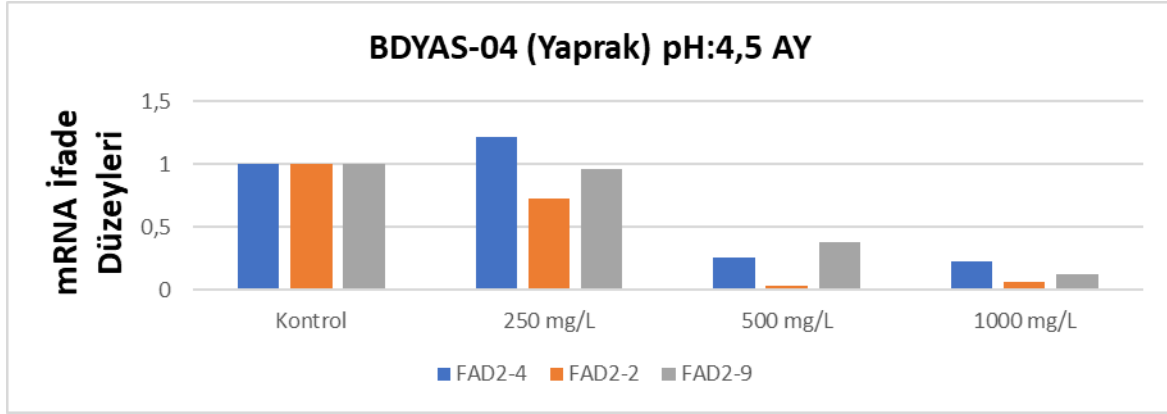


Şekil 5.42. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

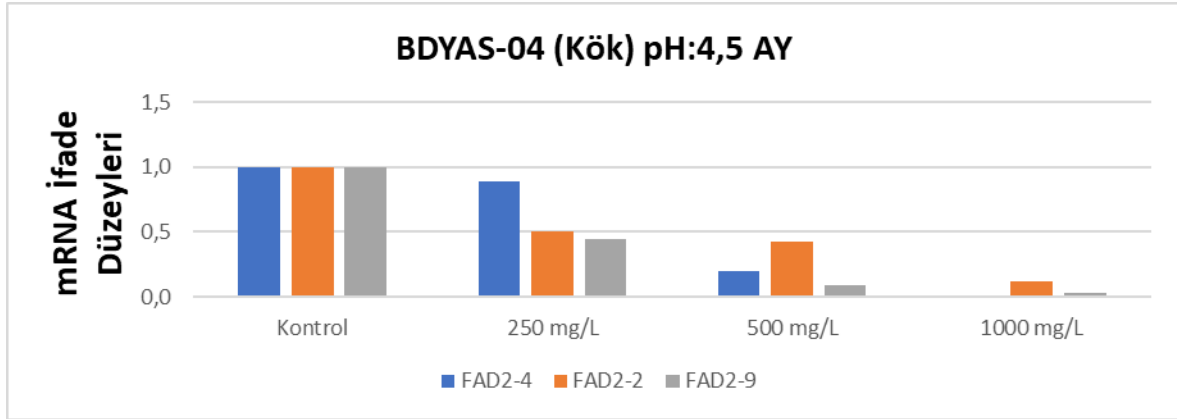
Çizelge 5.28. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:4,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,21226	0,72394	0,95825	1,30309	0,36519	0,66177	0,75234	0,21084	0,38207
	500	0,25689	0,03403	0,37346	0,02470	0,00584	0,33051	0,01426	0,00337	0,19082
	1000	0,22328	0,06503	0,12571	0,07801	0,02607	0,05432	0,04504	0,01505	0,03136
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,88953	0,50049	0,44871	1,05424	0,35689	0,64493	0,60867	0,20605	0,37235
	500	0,20001	0,42821	0,09274	0,03073	0,31820	0,02664	0,01774	0,18372	0,01538
	1000	0,01024	0,11485	0,03414	0,00894	0,16106	0,00646	0,00516	0,09299	0,00373
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,05593	0,89186	0,61688	0,74926	0,92177	0,15537	0,43258	0,53218	0,08970
	500	0,22317	0,50813	0,39829	0,02658	0,34807	0,22834	0,01535	0,20096	0,13183
	1000	0,09560	0,17254	0,18062	0,07181	0,11355	0,11788	0,04146	0,06556	0,06806

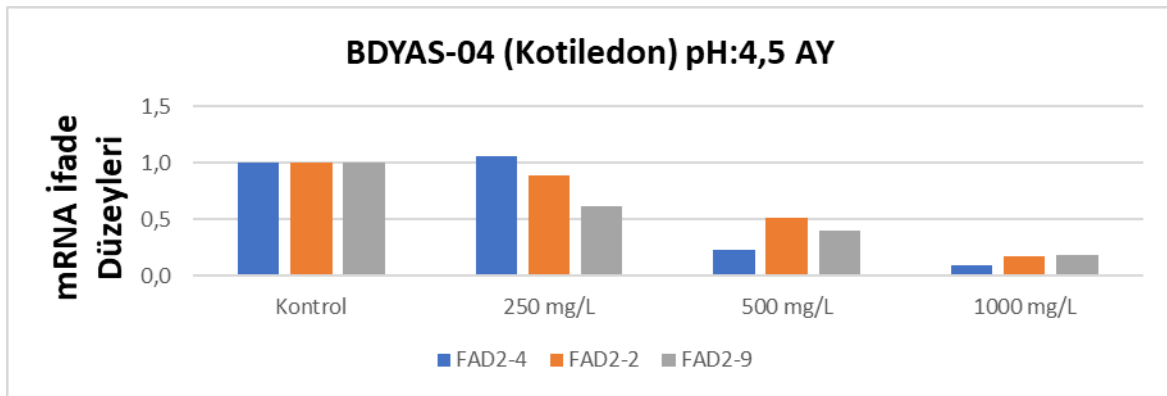
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:4,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Yaprak ve kotiledon örneklerinde 250 ppm’lik Cu stresi ve 4,5 pH değerinde asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulanması ile *FAD2-4* yağ asidi dönüştürücüsünün kontrol grubundakine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Cu konsantrasyonun yüksek olduğu değerlerde *FAD2* ifade seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.43. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.44. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.45. Cu ve asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

5.4.3. LİNAS çeşidi

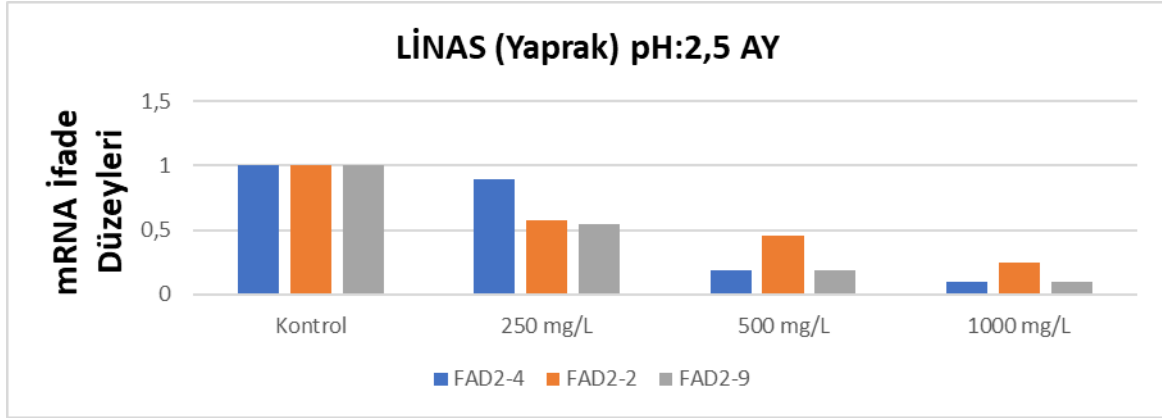
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde Cu uygulamaları (Kontrol, 250 ppm, 500 ppm ve 1000 ppm) ve farklı pH'larda hazırlanan asit yağmuru solüsyonları (pH:2,5 pH:3,5 ve pH:4,5) ile stres uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak, kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri Çizelge 5.29, Çizelge 5.30 ve Çizelge 5.31'de gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

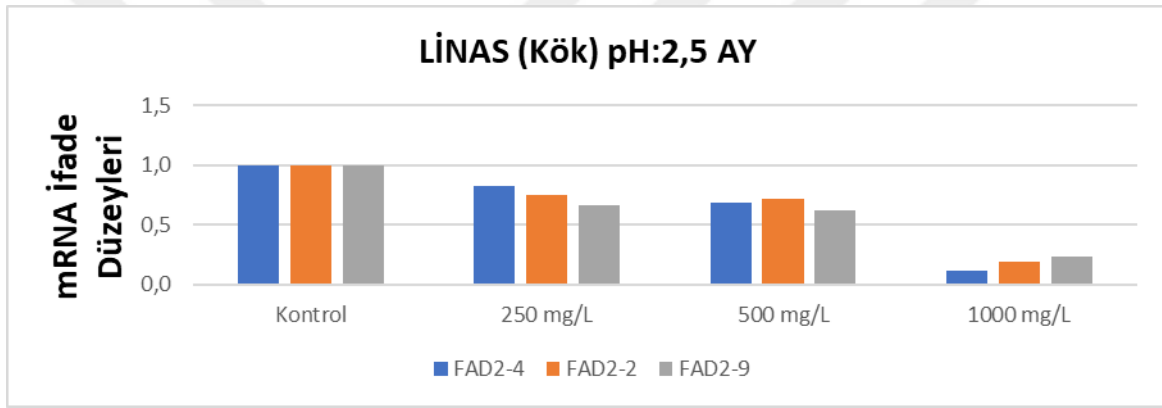
Çizelge 5.29. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:2,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,89737	0,57852	0,54324	0,35121	0,29527	0,19373	0,20277	0,17047	0,11185
	500	0,18747	0,45469	0,18521	0,08685	0,32481	0,10856	0,05014	0,18753	0,06268
	1000	0,09617	0,24461	0,09781	0,02704	0,10495	0,10234	0,01561	0,06060	0,05909
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,82007	0,75422	0,66803	0,29657	0,13249	0,61853	0,17123	0,07649	0,35711
	500	0,67917	0,71628	0,62480	0,60655	0,60682	0,35309	0,35019	0,35035	0,20386
	1000	0,11848	0,18669	0,22699	0,17616	0,12974	0,10402	0,10171	0,07490	0,06006
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,71479	0,73707	0,63764	0,76810	0,44063	0,63822	0,44346	0,25440	0,36848
	500	0,36955	0,38898	0,42074	0,22871	0,23599	0,33830	0,13205	0,13625	0,19532
	1000	0,21850	0,12617	0,10911	0,04100	0,13099	0,04058	0,02367	0,07563	0,02343

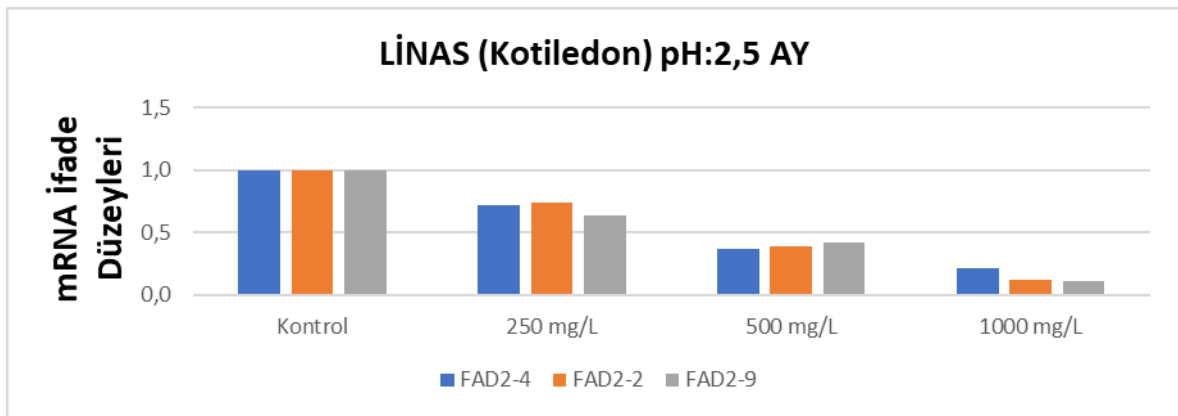
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:2,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Özellikle yüksek konsantrasyon Cu ve yüksek asidite bitkinin tüm dokularında *FAD2* gen ifade seviyelerini ciddi oranda azaltarak yağ asidi dönüşümünü olumsuz etkilemektedir.



Şekil 5.46. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.47. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

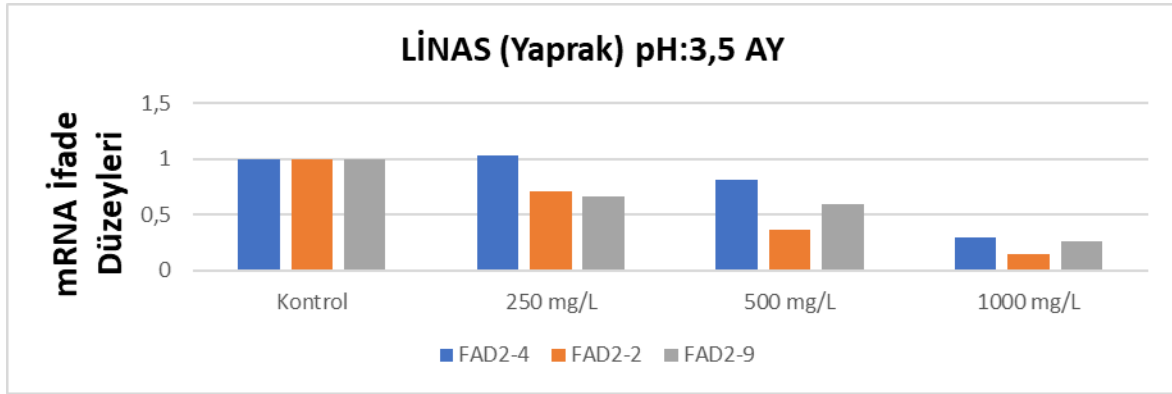


Şekil 5.48. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

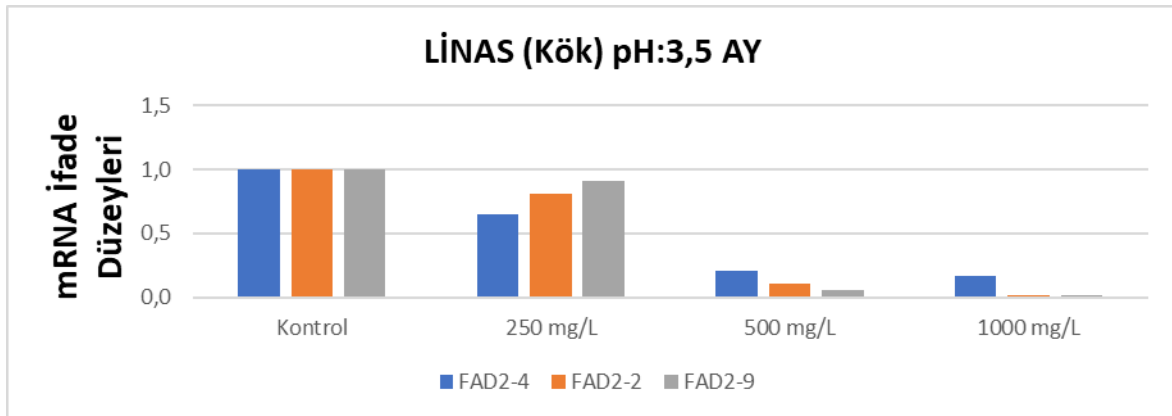
Çizelge 5.30. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:3,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,02623	0,70665	0,66632	0,40919	0,24536	0,15472	0,23624	0,14166	0,08933
	500	0,81087	0,37024	0,59007	0,49681	0,25280	0,64930	0,28683	0,14595	0,37487
	1000	0,29458	0,14645	0,26555	0,30681	0,15930	0,22754	0,17714	0,09197	0,13137
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,64734	0,81074	0,90744	0,17176	0,55837	0,26164	0,09916	0,32237	0,15106
	500	0,20293	0,11070	0,05654	0,03581	0,07054	0,03234	0,02067	0,04073	0,01867
	1000	0,16918	0,01480	0,01976	0,21354	0,00405	0,00804	0,12329	0,00234	0,00464
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,02048	0,82882	0,51645	0,30432	0,75069	0,21861	0,17570	0,43341	0,12622
	500	0,56062	0,57280	0,24579	0,25990	0,54820	0,03206	0,15005	0,31651	0,01851
	1000	0,02920	0,09373	0,06566	0,01596	0,02837	0,07963	0,00921	0,01638	0,04597

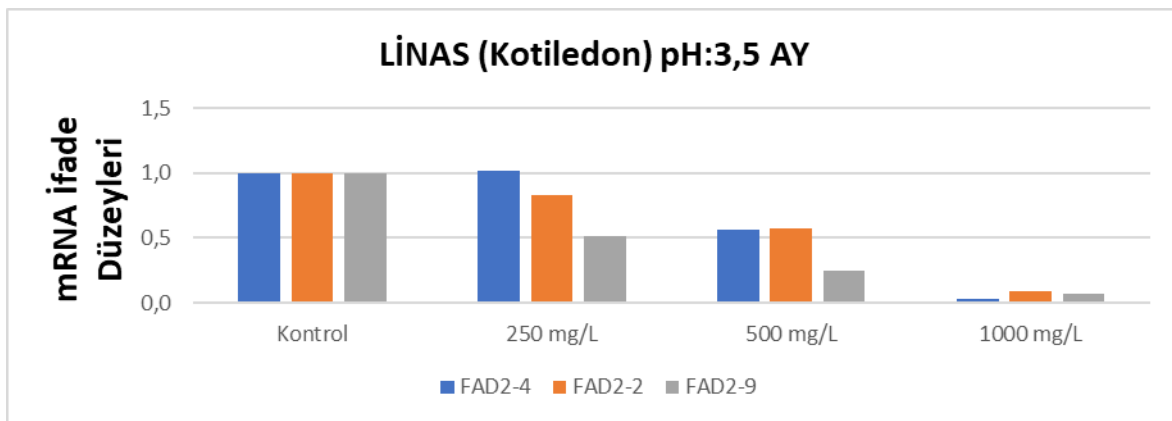
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:3,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Yaprak ve kotiledon örneklerinde 250 ppm değerindeki Cu ve 3,5 pH değerindeki asit yağmurunun birlikte muamelesi sonucunda *FAD2-4* geninin ifade düzeyi kontrol grubuna göre daha fazladır. Yüksek konsantrasyon değerinde Cu ve düşük pH değerindeki asitin özellikle LİNAS kök örneğinde neredeyse yağ asidi dönüşümünü inhibe ettiği açıkça görülmektedir.



Şekil 5.49. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.50. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

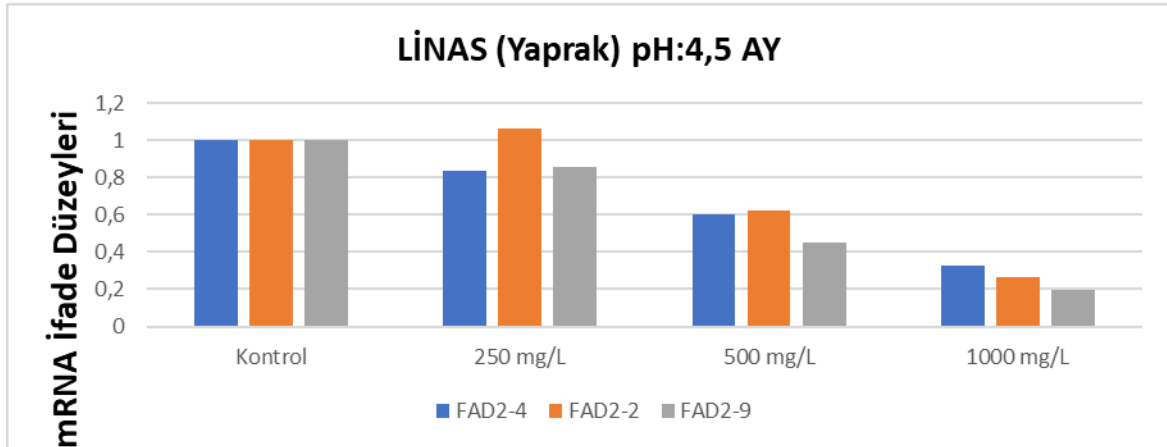


Şekil 5.51. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

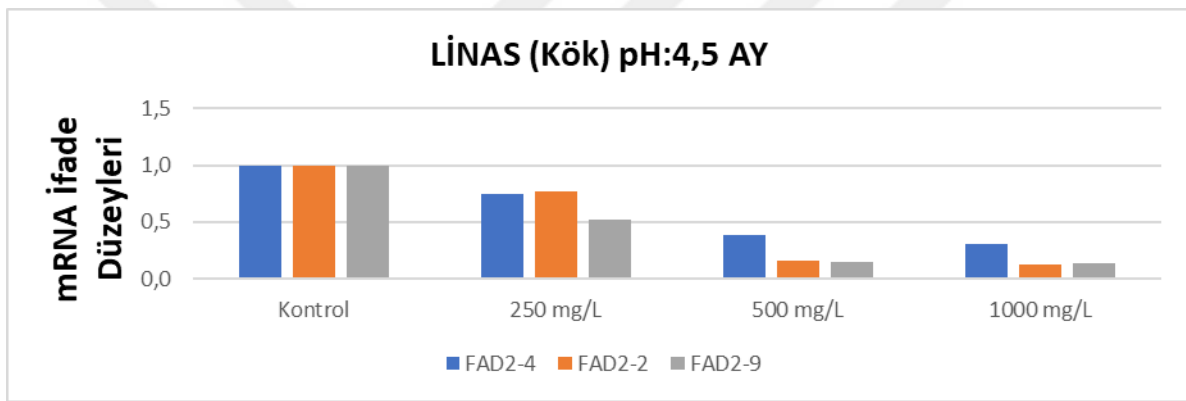
Çizelge 5.31. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

	pH:4,5	Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
	mg/L	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
YAPRAK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,83429	1,06717	0,85612	0,19396	0,06563	0,13463	0,11198	0,03789	0,07773
	500	0,60512	0,62489	0,44912	0,33743	0,94421	0,61993	0,19482	0,54514	0,35792
	1000	0,32830	0,26396	0,19631	0,26815	0,06965	0,03715	0,15482	0,04021	0,02145
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	0,74916	0,76631	0,51820	0,96953	0,76297	0,20887	0,55976	0,44050	0,12059
	500	0,39047	0,15711	0,15228	0,20645	0,10891	0,01593	0,11920	0,06288	0,00920
	1000	0,30944	0,12381	0,13482	0,04814	0,06763	0,02771	0,02779	0,03905	0,01600
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	250	1,07001	1,18574	0,85986	0,37080	0,70330	0,08799	0,21408	0,40605	0,05080
	500	0,97561	0,90436	0,67851	1,14215	1,25763	0,63791	0,65942	0,72609	0,36830
	1000	0,35331	0,58947	0,39755	0,10816	0,50590	0,43106	0,06245	0,29208	0,24887

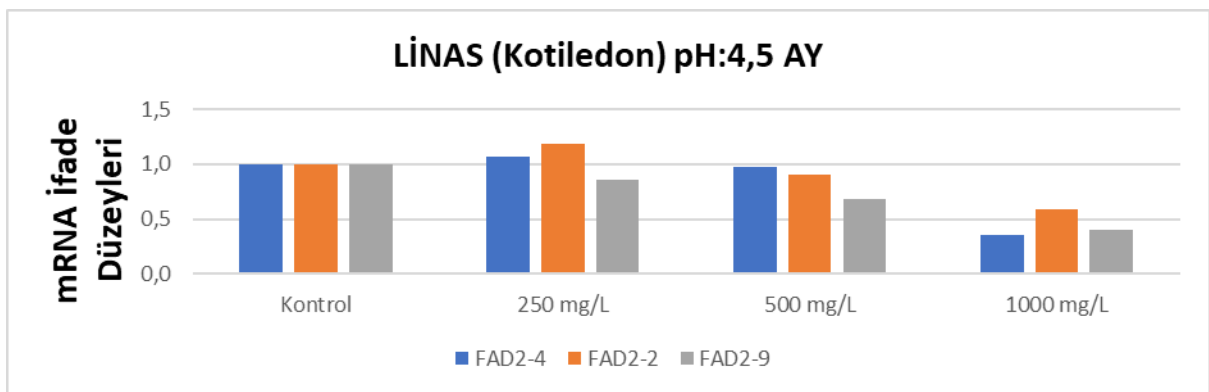
Belirlenen farklı Bakır (Cu) konsantrasyonlarıyla beraber pH:4,5 Asit yağmuru simülasyonu uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (***FAD2-2***, ***FAD2-4***, ***FAD2-9***) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. 250 ppm değerindeki Cu ve 4,5 pH değerindeki asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulandığı yaprak ve kotiledon örneklerinde *FAD2-2* geninin ifade düzeyinin kontrol grubundaki ifade düzeyinden yüksek olduğu görülmektedir. Yüksek konsantrasyonda Cu ve asit yağmurunun bitkide yağ asidi dönüşümünü azalttığı görülmektedir.



Şekil 5.52. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.53. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.54. Cu ve asit yağmuru uygulanan LİNAS bireylerinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

5.5. Asit Yağmuru Simülasyonu Verilerinin Normalizasyonu ve Analizi

5.5.1. BALCI çeşidi

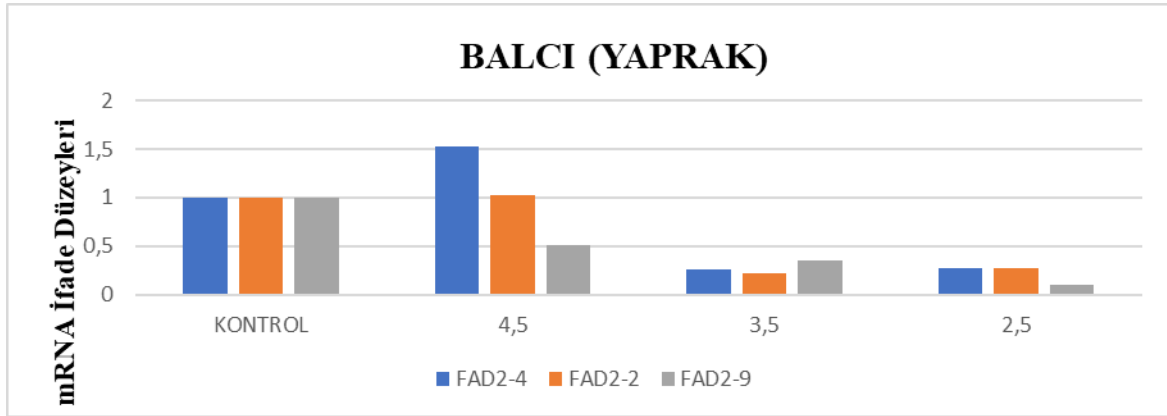
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde asit yağmuru simülasyonu (Kontrol, 2,5 pH; 3,5 pH ve 4,5 pH) uygulanan BALCI çeşidinin yaprak, kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri Çizelge 5.32’de gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

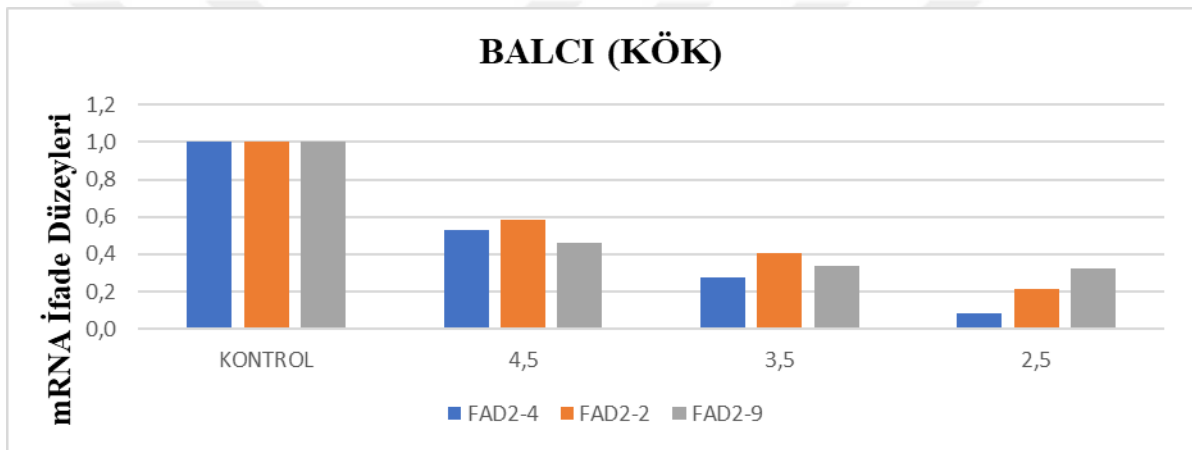
Çizelge 5.32. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

		Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
YAPRAK	pH	FAD2-4	FAD2-2	FAD2-9	FAD2-4	FAD2-2	FAD2-9	FAD2-4	FAD2-2	FAD2-9
	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	1,52116	1,02052	0,50768	1,60035	0,69740	0,57185	0,92396	0,40264	0,33016
	3,5	0,26446	0,21273	0,34777	0,16887	0,06133	0,50558	0,09750	0,03541	0,29190
	2,5	0,27733	0,27203	0,10435	0,19068	0,16454	0,06398	0,11009	0,09500	0,03694
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	0,53092	0,58171	0,46022	0,13009	0,29880	0,55777	0,07511	0,17251	0,32203
	3,5	0,27503	0,40848	0,33693	0,06217	0,26184	0,08340	0,03589	0,15117	0,04815
	2,5	0,08588	0,21385	0,32196	0,00862	0,14808	0,52094	0,00497	0,08550	0,30076
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	0,56616	0,56189	0,50034	0,41475	0,58857	0,35334	0,23945	0,33981	0,20400
	3,5	0,55212	0,43966	0,07628	0,39700	0,05130	0,01311	0,22921	0,02962	0,00757
	2,5	0,44447	0,10621	0,07010	0,30562	0,10796	0,04457	0,17645	0,06233	0,02573

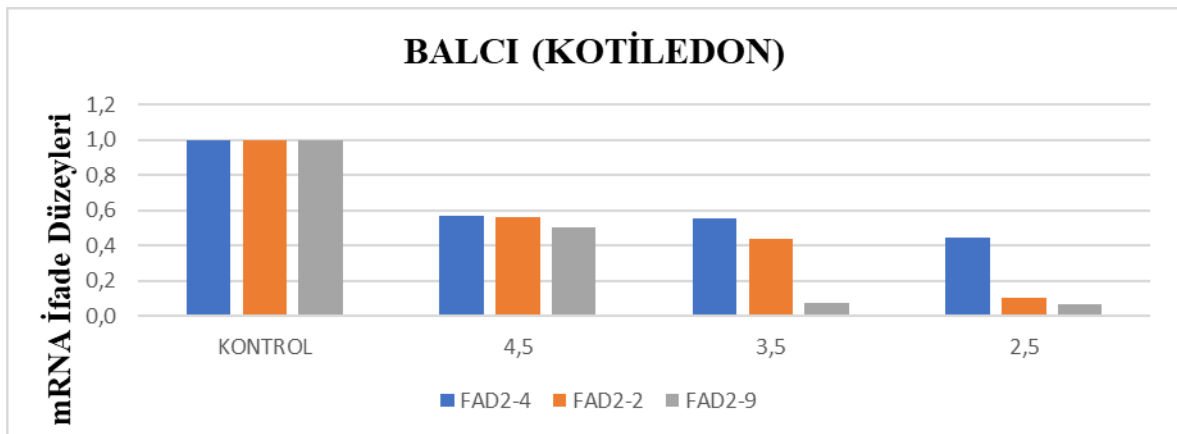
Belirlenen farklı pH değerlerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulanan BALCI çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. BALCI çeşidinin 4,5 pH değerinde asit yağmuruna maruz kalan yaprak örneğinde *FAD2-4* gen ifadesinin kontrol grubundan yüksek olduğu görülmektedir. Yani 4,5 pH değerindeki asit yağmuru, yaprak örneğinde yağ asidi dönüşümünü artırmıştır. Asitliğin artmasına bağlı olarak üç doku örneğinde de *FAD2* gen ifade düzeylerinin kademeli olarak azaldığı tespit edilmiştir. Kuvvetli asidik ortama veya strese maruz kalan bitkinin yağ dönüşümü ve savunma mekanizmasının olumsuz etkilendiği düşünülmektedir.



Şekil 5.55. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.56. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.57. Asit yağmuru uygulanan BALCI çeşidinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

5.5.2. BDYAS-04 çeşidi

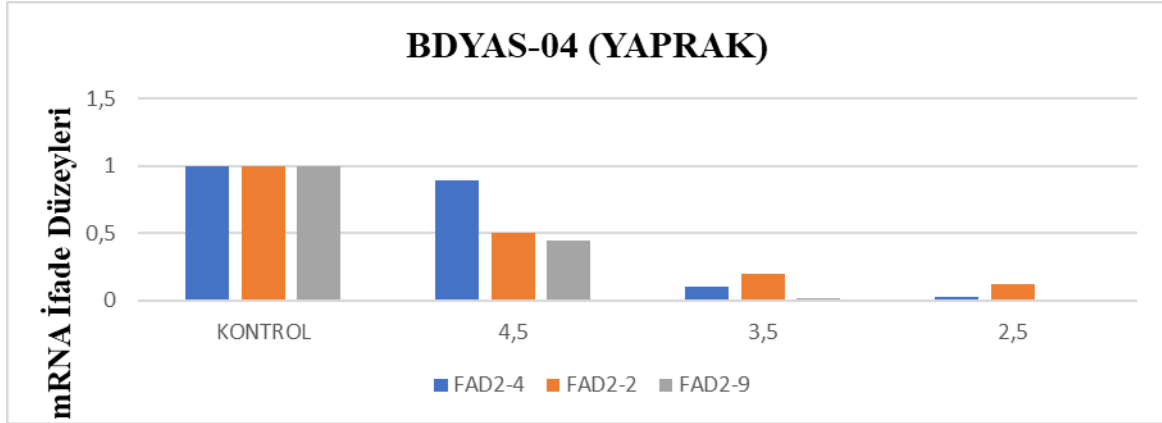
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde asit yağmuru simülasyonu (Kontrol, 2,5 pH; 3,5 pH ve 4,5 pH) uygulanan BDYAS-04 çeşidinin yaprak, kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri Çizelge 5.33'te gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

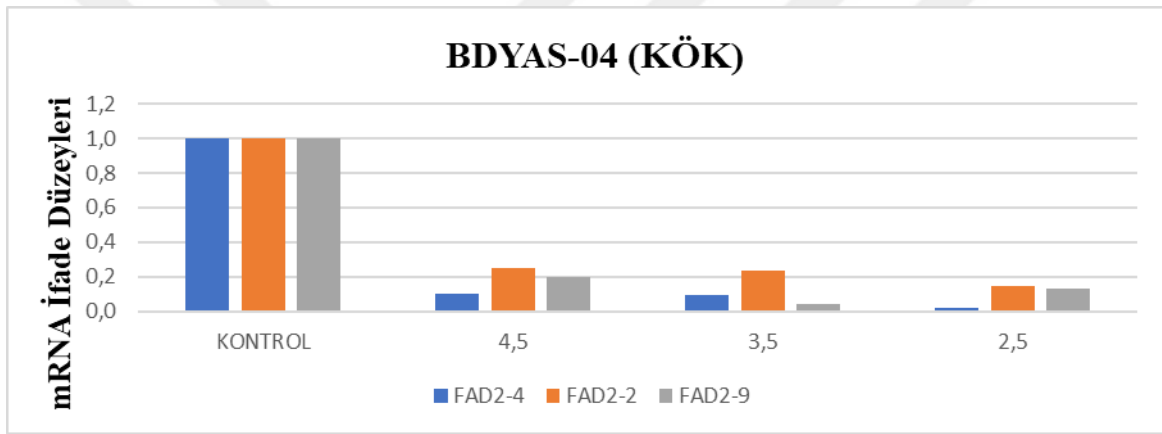
Çizelge 5.33. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

		Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
YAPRAK	pH	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	0,88953	0,50049	0,44871	1,05424	0,35689	0,64493	0,60867	0,20605	0,37235
	3,5	0,10682	0,20185	0,01279	0,08018	0,18701	0,00394	0,04629	0,10797	0,00227
	2,5	0,02350	0,12553	0,00819	0,00621	0,09553	0,00510	0,00358	0,05515	0,00294
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	0,09910	0,24879	0,19556	0,09058	0,19495	0,02795	0,05230	0,11256	0,01614
	3,5	0,09026	0,23496	0,04089	0,02210	0,09978	0,01038	0,01276	0,05761	0,00599
	2,5	0,01544	0,14827	0,13088	0,01336	0,06202	0,10923	0,00771	0,03581	0,06307
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	1,05593	0,89186	0,61688	0,74926	0,92177	0,15537	0,43258	0,53218	0,08970
	3,5	0,22317	0,50813	0,39829	0,02658	0,34807	0,22834	0,01535	0,20096	0,13183
	2,5	0,09560	0,17254	0,18062	0,07181	0,11355	0,11788	0,04146	0,06556	0,06806

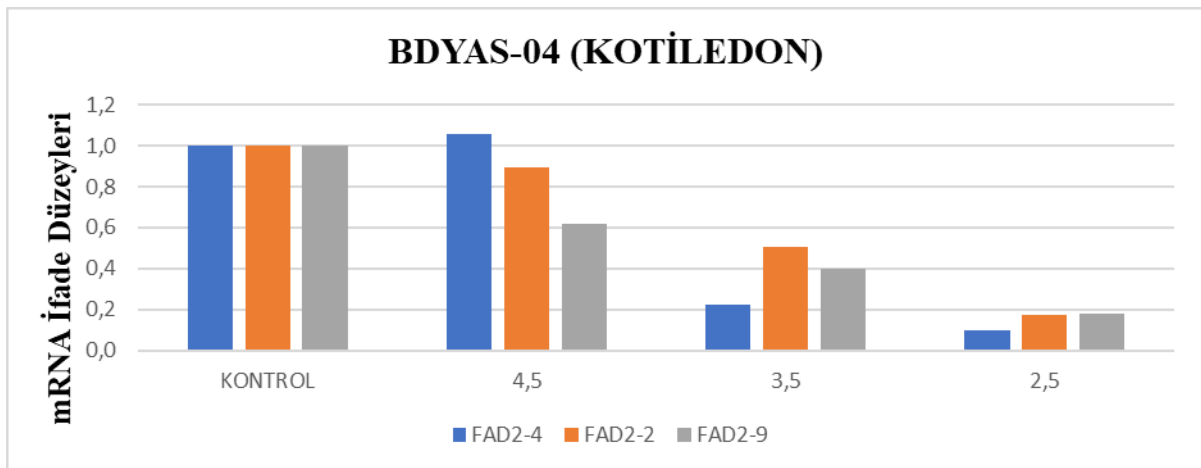
Belirlenen farklı pH değerlerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulanan BDYAS-04 çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verileri kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir. Asitliğin artmasına bağlı olarak üç doku örneğinde de ifade düzeylerinin kademeli olarak azaldığı görülmektedir. BDYAS-04 çeşidinin yaprak örneğinde *FAD2-9* geninin ve kök örneğinde *FAD2-4* geninin kuvvetli asite bağlı olarak yağ asidi dönüşümünü neredeyse gerçekleştiremediği görülmektedir. Bu durum yüksek asiditenin yağ asidi dönüşümü üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu ve bitkinin strese karşı *FAD2* genlerinin savunma için yetersiz kaldığını göstermektedir.



Şekil 5.58. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.59. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.60. Asit yağmuru uygulanan BDYAS-04 çeşidinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

5.5.3. LİNAS çeşidi

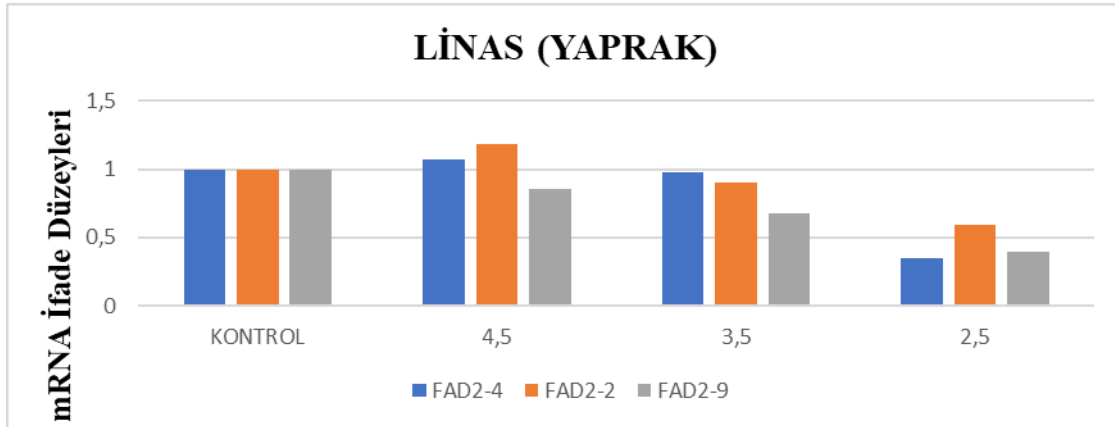
Housekeeping gen olarak kullanılan aktin geni ve uygun şartların sağlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilen mRNA ifade seviyelerinde farklı konsantrasyon değerlerinde asit yağmuru simülasyonu (Kontrol, 2,5 pH; 3,5 pH ve 4,5 pH) uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak,kök ve kotiledon örneklerinin *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerine ait ekspresyon verileri Çizelge 5.34'te gösterilmiştir.

Elde edilen genlerin normalizasyonunun sağlandığı gen ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak, her aspir çeşidine ait farklı dokulardaki *FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9* genlerinin farklı konsantrasyon değerlerine bağlı olarak ifade seviyelerindeki değişimlere ait grafik çizimleri gerçekleştirilmiştir.

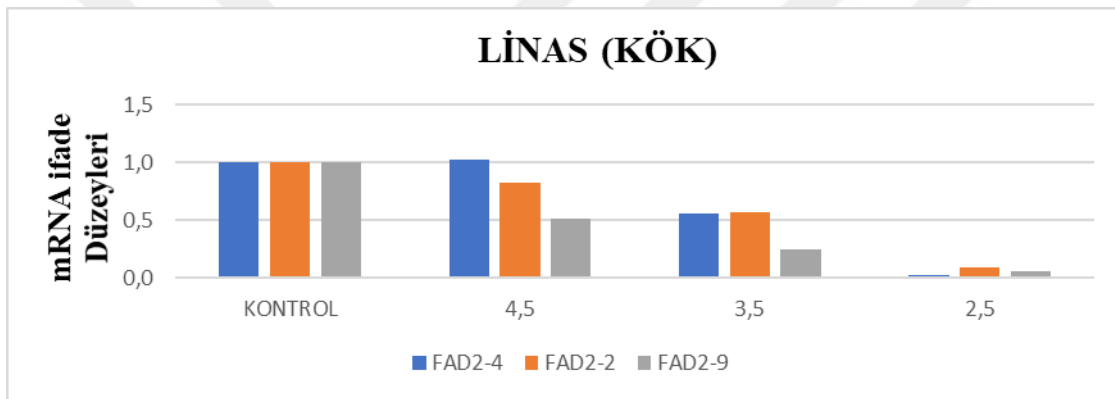
Çizelge 5.34. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin FAD2 genlerine ait ekspresyon verileri

		Ortalama			Standart Sapma			Standart Hata		
YAPRAK	pH	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>	<i>FAD2-4</i>	<i>FAD2-2</i>	<i>FAD2-9</i>
	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	1,07001	1,18574	0,85986	0,37080	0,70330	0,08799	0,21408	0,40605	0,05080
	3,5	0,97561	0,90436	0,67851	1,14215	1,25763	0,63791	0,65942	0,72609	0,36830
	2,5	0,35331	0,58947	0,39755	0,10816	0,50590	0,43106	0,06245	0,29208	0,24887
KÖK	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	1,02048	0,82882	0,51645	0,30432	0,75069	0,21861	0,17570	0,43341	0,12622
	3,5	0,56062	0,57280	0,24579	0,25990	0,54820	0,03206	0,15005	0,31651	0,01851
	2,5	0,02920	0,09373	0,06566	0,01596	0,02837	0,07963	0,00921	0,01638	0,04597
KOTİLEDON	K	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	4,5	0,83429	1,06717	0,85612	0,19396	0,06563	0,13463	0,11198	0,03789	0,07773
	3,5	0,60512	0,62489	0,44912	0,33743	0,94421	0,61993	0,19482	0,54514	0,35792
	2,5	0,32830	0,26396	0,19631	0,26815	0,06965	0,03715	0,15482	0,04021	0,02145

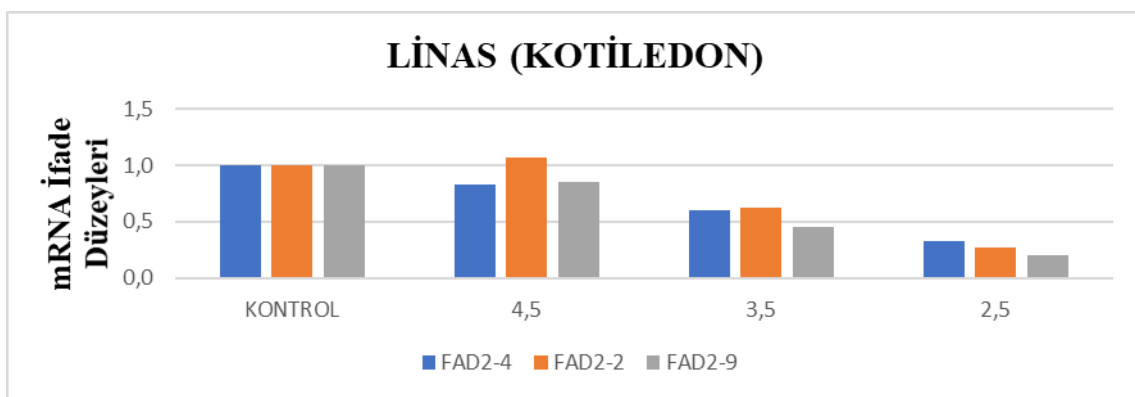
Belirlenen farklı pH değerlerine sahip asit yağmuru simülasyonu uygulanan LİNAS çeşidinin farklı doku örneklerine (yaprak, kök, kotiledon) ait ekspresyon verilerine bakıldığında genel anlamda bütün konsantrasyonlarda *FAD2* (*FAD2-2*, *FAD2-4*, *FAD2-9*) genlerinin ekspresyon verilerinin kontrol grubuna göre düşüş gösterdiği açıkça görülmektedir. LİNAS çeşidinde *FAD2* gen ifade düzeylerinin asitliğin artmasına bağlı olarak üç doku örneğinde de kademeli olarak azaldığı görülmüş ve LİNAS çeşidinin kuvvetli asit stresinden en fazla etkilenen dokusunun kök olduğu tespit edilmiştir. Ancak düşük asit konsantrasyonlarında (4,5 pH) LİNAS çeşidinin yaprak örneğinde *FAD2-4* ve *FAD2-2*; kök örneğinde *FAD2-4* ve kotiledon örneğinde *FAD2-2* genlerinin ifade düzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 5.61. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin yaprak dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.62. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin kök dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri



Şekil 5.63. Asit yağmuru uygulanan LİNAS çeşidinin kotiledon dokusundaki FAD2 ifade seviyeleri

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Cu ve asit yağmuru streslerinin bazı aspir (*Carthamus tinctorious* L.) çeşitlerinde (LİNAS, BALCI VE BDYAS-04), oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olan *FAD2* geninin mRNA ifade seviyeleri ve stres öncesi ve sonrası bitki boyu, toprak üstü ve altı taze ve kuru ağırlığı, kök uzunluğu, toprak üstü ve altı su içeriği, klorofil a ve b ve toplam karotenoid özellikleri üzerindeki etkileri araştırılarak; bitkilerin bu stres faktörlerinden nasıl ve ne düzeyde etkilendiği belirlenmeye çalışılmıştır. Bakır ve asit yağmuru streslerinin ekofizyolojik özellikler üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deney setinde, Cu stresinin uygulanan konsantrasyon artışına bağlı olarak LİNAS ve BDYAS-04 çeşitlerinde stres sonrası bitki boyu, toprak üstü taze ağırlık ve toprak üstü su içeriğini önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, BDYAS-04 çeşidinde kuru toprak altı ağırlığı ise artırdığı gözlemlenmiştir. Cu stresi uygulamaları sonrasında bitkinin toprak üstü su içeriğinin azalması, kök uzunluğunun ve kuru toprak altı ağırlığın artması bitkide su stresinin oluştuğunu ifade etmektedir. Su stresi, toprak üstü gelişimin yavaşlatılarak; suyun ve besin elementlerinin toprak üstü dokulardan toprak altı dokulara taşınmasını, kök gelişiminin artırılmasını teşvik etmektedir. Bu nedenle, strese maruz kalan aspir bireylerinde su stresi nedeniyle bitki boyu, toprak üstü taze ağırlık ve toprak üstü su içeriğinin azaldığı ve toprak altı biyomasının ve su içeriğinin arttığı düşünülmektedir. Bu durum diğer deney setlerinde de gözlenmiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyondaki Cu uygulamaları sonucunda özellikle LİNAS çeşidinde klorofil miktarındaki azalmaya bağlı olarak yapraklarda klorozis ve yer yer solma meydana geldiği görülmüştür.

Asit yağmuru simülasyonu uygulamalarında, pH değerlerindeki düşüşe paralel olarak BDYAS-04 çeşidinde kuru toprak üstü ağırlık ve kök uzunluğunda artışa; LİNAS çeşidinde ise toprak üstü taze ve kuru ağırlıkta artışa neden olmuştur. Genel olarak asit yağmuru, bitkilerin asit sevip sevmemesine bağlı olarak bitkilerde farklı etkilere sebep olmaktadır. Hafif asidik topraklarda daha iyi yetiştiği bilinen aspir bireylerinde gözlenen bu parametrelerdeki artış bitkinin daha asidik ortamlarda da iyi yetişebileceğini göstermektedir.

Bitkiler tek bir stres faktörüne maruz bırakıldıklarında bu stresi tolere edebilseler de, birden fazla stres faktörüne birlikte maruz kaldıklarında bu tolerans düzeyi azalmakta ve

bitki bu koşullardan daha fazla etkilenmektedir. Özellikle yüksek konsantrasyon değerinde Cu ve düşük pH değerinde asit yağmuru bitkilere birlikte uygulandığında, bitkilerin boylarının neredeyse yarı yarıya azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyon değerinde Cu ve düşük pH değerinde asit yağmurunun birlikte uygulanması sonucunda aspir çeşitlerinin toprak üstü biyomasında ciddi bir azalma gözlemlenmiştir. Bu azalmaya bağlı olarak asit yağmurunun bitkide su stresine sebep olarak; bitkinin toprak altı biyomasını ve kök uzunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Toprak altı biyomasının artması, organik maddelerin daha çok kök bölgesine gönderildiğini ve böylece suya ulaşmak amacıyla köklerin uzamasının sağlandığını göstermektedir. Ayrıca, Cu ve asit yağmurunun yüksek konsantrasyonlarda birlikte uygulanması durumunda bitkide yine su stresi oluşmuş ve bitkilerin yapraklarında suyun azalmasına bağlı olarak solmalar meydana gelmiştir. Bitkinin yapraklarında fotosentez için de gerekli olan suyun yeteri miktarda bulunmaması, bu stres faktörlerinin fotosentez reaksiyonları üzerinde olumsuz etkiye sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Cu ve asit yağmuru streslerinin moleküler özellikler üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kurulan deney setinde, aspir çeşitlerinin strese maruz bırakıldıktan sonra ifade düzeylerinde ortaya çıkabilecek değişimleri incelemek amacıyla Real- Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Aspir çeşitlerinin bakır stresine bağlı kök, kotiledon ve yapraklarındaki değişimler incelendiğinde, yüksek konsantrasyon değerlerindeki bakır stresinin aspir bireylerinin *FAD2* genlerinin ifade seviyelerini (*FAD2-2*, *FAD2-4* ve *FAD2-9*) düşürdüğü gözlemlenmiştir. Düşük konsantrasyon değerlerindeki Cu stresine maruz kalan çeşitlerde *FAD2* genlerinin ifade seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu artışın bakırın mikroelement olarak bitki bünyesine katılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda bitkilere uygulanan Cu (bakır) ve kadmiyum (Cd) stresleri bitkilerin ağır metallere karşı toleransının artmasına bağlı olarak, hücre zarındaki yağ asidi dönüşümünün de paralel olarak arttığını ifade etmektedir (Howlett ve Avery 1997). Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak aspir çeşitlerinin dokularında *FAD2* gen ailesinin ifade seviyelerinde ani bir düşüşten sonra hızlı bir yükselme görüldüğü noktalarda, *FAD2* genlerinin bitkide strese karşı savunma mekanizmasında görev aldığı düşünülmektedir. Belirlenen farklı Cu ve asit yağmuru konsantrasyonlarının aspir çeşitlerine birlikte uygulandığı bu çalışmada BALCI, LİNAS ve BDYAS-04 çeşitlerinden alınan farklı doku örneklerine ait ekspresyon verileri incelenmiş, bu stres uygulamalarından elde edilen *FAD2* gen ifade seviyelerinin kontrol grubu gen ifade seviyelerine göre genel anlamda daha

düşük olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle yüksek konsantrasyon ve düşük pH değerine sahip asit yağmuru stresleri birlikte uygulandığında aspir çeşitlerinden alınan doku örneklerinde *FAD2* gen ailesinin ifade seviyelerinin ciddi oranda düştüğü ve buna bağlı olarak yağ asidi dönüşümünün neredeyse engellendiği görülmüştür. Buna göre Cu ve asit yağmuru simülasyonunun birlikte uygulanması aspir çeşitlerinin *FAD2* gen ailesinin düzeylerinin düşmesine sebep olarak bitkinin yağ asidi dönüşümünü yerine getirmesini baskılamıştır. Asit yağmuru stresine maruz kalan aspir çeşitlerine ait *FAD2* gen ailesinin ifadelerinin kuvvetli asit konsantrasyonlarında ciddi anlamda azaldığı ve buna bağlı olarak bitkinin yağ asidi dönüşümünün istenilen düzeyde çalışmadığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, *FAD2* gen ailesinin yağ asidi dönüşümlerini düzenleyerek stres durumlarına karşı bitki savunmasını destekleyebildiği düşünülmektedir. Bu durum, aspir çeşitlerinin Cu ve asit yağmuru stresine karşı gelişim ve savunmada önemli rol oynayabileceğini göstermiştir.

Ağır metal ve asit yağmuru streslerinin hem ekofizyolojik hem de moleküler düzeyde aspir üzerindeki etkilerinin birlikte araştırıldığı bu çalışma, elde edilen bulgular göz önüne alındığında öncü bir çalışma niteliği taşımaktadır.

Çevre kirliliğine bağlı olarak bitkilerde su stresi oluşabileceğinin tespit edildiği bu çalışmaya göre; şayet önlem alınmazsa ilerleyen zamanlarda küresel iklim değişikliği, sulak alanların azalması, kuraklığın baş göstermesi ve çevre kirliliğinin artması sonucunda, su stresi yaşanmasına bağlı olarak bitki yetiştirilmesinde olumsuzluklar yaşanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, böyle koşullarda kuraklığa dayanıklı, strese toleranslı olan bitki türlerinin tercih edilmesinin doğru olacağı söylenebilir.

Bu çalışmada, ekofizyolojik özelliklerin belirlenmesi amacıyla kurulan deney setinde aspir perlitte ancak 19 gün süreyle yetiştirilebilmiştir. Aspir, doğal tarımsal ortamlarda ya da saksılarda toprakta yetiştirildiğinde daha uzun süre strese maruz bırakılarak; daha detaylı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahsan, N., Lee, D., Kim, K. H., Alam, I., Lee, S. H., Lee, K. W., Lee, H. And Lee, B. H. (2010). Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*. 78, 224-231.
- Akçin, A., Yalçın, E. Ve Akçin, T. (2017). *Spergularia Marina* (L.) Griseb. (Caryophyllaceae)' Da Tuzluluğun Prolin ve Klorofil Pigmentleri Üzerine Etkisi. *Sinop Universty Journal Of Natural Sciences*, 2(1), 80-92.
- Aksu, E. and Yıldız, N. (2004). Heavy metal stress and tolerance of plants. In *International Soil Congress on Natural Resource Management for Sustainable Development*. Erzurum.
- Allan, R. (1997). Introduction: Mining And Metals İn The Environment. *Journal Of Geochem. Exploraion*. 58, 95-100.
- Angelova, V. R., Perifanova-Nemska, M. N., Uzunova, G. P. and Kolentsova, E. N. (2016). Accumulation of Heavy Metals in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 10(7), 410-415.
- Azevedo, R. A., L., Prasad, M. N. V., Cardoso, P. F., Lea, P. J., and Gratao, P. (2005). Phytoremediation: Green Technology For The Clean Up Of Toxic Metals İn The Environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 53-64.
- Babaoğlu, M. (2007). Aspir ve Tarımı. *Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü*, Edirne.
- Bakacak, S. (2010). *Brachychiton Populneus* (Schoot & Endl.) R. Br.'Da (Japon Kavağı) Kadmiyum ve Bakır Stresinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 80, 10226992.
- Baker, A. J. and Brooks, R. (1989). Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review Of Their Distribution, Ecology And Phytochemistry. *Biorecovery*. 1(2), 81-126.
- Bakkenes M., Eickhout, B. and Alkemade, R. (2006). Impacts of Different Climate Stabilisation Scenarios on Plant Species in Europe, *Global Environmental Change*, 16 (1), 19-28.
- Baran, U. (2018). *Aspir Bitkisinin Yerel (Carthamus Tinctorius L.) ve Atasal (Carthamus Oxyacantha M. Bieb) Genotiplerinin Nikel Toleranslarının Belirlenmesi ve Fitoremediasyonunda Kullanılma Potansiyellerinin Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı.
- Baştuğ, R. Ve Kanber, R. (1989). Sulama Programlarının Geliştirilmesinde Bitkilerin İçsel Su Durumlarını Belirleyen Yöntemlerden Yararlanma Olanakları, *Akdeniz Universty Journal of the Faculty of Agriculture*, 2(1), 17-30.

- Bayraç, N. Ve Doğan, E. (2016). Türkiye’de İklim Değişikliğinin Tarım Sektörü Üzerine Etkileri, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi İibf Dergisi*, 11(1), 23- 48.
- Bayramin, S. (2006). Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) – Kolza (*Brassica napus* spp. *oleifera* L.) Tarımı ve Islahı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 15(1-2), 74-85.
- Belitz, H.D. and Grosch, W. (1987). *Food Chemistry*. Berlin Hiedelberg: Springer.
- Bo, L. I., Tian, X. L., Wang, G. W., Pan, F., & Li, Z. H. (2008). Heterosis Of Root Growth İn Maize (*Zea Mays* L.) Seedling Under Water Stress. *Acta Agronomica Sinica*, 34(4), 662–668
- Boşgelmez, A., Boşgelmez İ., Savaşçı S., Paslı N. ve Kaynaş S. (2001) *Ekoloji II*, Ankara: ISVAK Yayınları.
- Bölükbaşı, E. (2018). *Bakır (Cu²), Kurşun (Pb²) ve Kadmiyum (Cd²) Ağır Metal Streslerine Maruz Kalmış Aspir (Carthamus tinctorious L.) Çeşitlerinde oleik asidin (Omega-9) linoleik aside (Omega-6) çevriminden sorumlu olan FAD2 Geni mRNA İfade Seviyelerinin Real-Time PCR aracılığıyla analizi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 193, 519736.
- Cao, S., Zhou, X.R., Wood, C.C., Green, A.G., Singh, S.P., Liu, L. And Liu, Q. (2013). A Large and Functionally Diverse Family Of FAD2 Genes İn Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.). *BMC Plant Biology*, 13(5); 1-18.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995). Modification of The TRIZOL Reagent Procedure For Isolation of RNA From Polysaccharide And Proteoglycan-Rich Sources. *Biotechniques Short Technical Report*, 19(6); 942-945.
- Clarke, H., (2007). Conserving Biodiversity in the Face of Climate Change, *Agenda*, 14(2), 157-170.
- Clemens, S., (2001). Molecular Mechanisms of Plant Metal Tolerance and Homeostasis, *Planta*, 212 (2001) 475–486.
- Çepel, N. (2003). Ekolojik Sorunlar ve Çözümleri, *Tübitak Popolar Bilim Kitapları*, Ankara: TÜBİTAK Yayınları.
- Demirevska-Kepova, K. , Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R. and Feller, U., (2004). Biochemical Changes in Barely Plants After Excessive Supply of Copper and Manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52-253–266.
- Duke. J. A. (1983). Handbook of Energy Crops. West Lafayette: Purdue University, Center for New Crops & Plants Products.
- Eflatun, A. (1994). *Tarihi Eserler Üzerine Asit Yağmurlarının Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 59, 33550.

- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., and Xie, Y. (2015). Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response, *The Scientific World Journal*, <https://doi.org/10.1155/2015/756120>.
- Fan, H. B., and Wang, Y. H. (2000). Effects of Simulated Acid Rain on Germination, Foliar Damage, Chlorophyll Contents and Seedling Growth of Five Hardwood Species Growing in China, *Forest Ecology and Management*, 126 (3): 321-329.
- Fu, X.P., D.L. Tian and Z.Y. Huang. (2006). Effects of simulated acid rain on phytomorphology. *Journal of Zhejiang A&F University*, 23(5): 521-526.
- Gadallah, M.A.A. (2000). Effects of acid mist and ascorbic acid treatment on the growth, stability of leaf membranes, chlorophyll content and some mineral elements of *Carthamus tinctorius*, the safflower. *Water, air, and soil pollution*, 118(3): 311-327.
- Gautam, S., Anjani, K., and Srivastava, N. (2016). In Vitro Evaluation Of Excess Copper Affecting Seedlings And Their Biochemical Characteristics In *Carthamus Tinctorius* L.(Variety PBNS-12). *Physiology And Molecular Biology Of Plants*, 22(1), 121-129.
- Gilbert, J., Knights, S. E., and Potter, T. D. (2008). International Safflower Production-An Overview. *In International Safflower Conference Australian Oilseeds Federation. Wagga Wagga, Australia.*
- Glenn, E.P., Brown, J.J., Khan, M.J., (1997). Mechanisms of Salt Tolerance in Higher Plants. Edited by Basra, A.S., ve Basra, R.K., “Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants”, *Harwood Academic Publishers*, 83- 110.
- Gong, Q., Wang, L., Dai, T., Zhou, J., Kang, Q., Chen, H., Li, K and Li, Z. (2019). Effects of Copper on the Growth, Antioxidant Enzymes and Photosynthesis of Spinach Seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171: 771–780.
- Guan, L., Wu, W., Hu, B. And Li, D. (2014). Developmental and growth temperature regulation of omega-3 fatty acid desaturase genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.), *Genetics and Molecular Research*, 13 (3): 6623-6637.
- Gülmezoğlu, N., ve Aytaç, Z. (2016). Farklı Çinko Uygulamalarının Aspir Bitkisinin Verimi ve Çinko Alımı Üzerine Etkisi. *Toprak Su Dergisi*, 5(2), 11-17.
- Hall, J.L., (2002). Cellular Mechanisms For Heavy Metal Detoxification and Tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53, 366, 1–11.
- Heppard, E. P., Kinney, A. J., Stecca, K. L. and Miao, G. H. (1996). Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal [Omega]-6 Desaturase Genes in Soybeans. *Plant Physiology*, 110(1), 311-319.
- Hossain, Z., Makino, T. and Komatsu, S., (2012). Proteomic Study of B-Aminobutyric Acid-Mediated Cadmium Stress Alleviation In Soybean. *Journal of Proteomics*, 75, 4151-4164.

- Houshmandfar, A., and Moraghebi, F. (2011). Evaluation of Heavy Metal Tolerance At Different Clover Plant Growth Stages. *Iranian Journal Of Plant Physiology* . 1(2),95-99.
- Howlett, N.G. And Avery, S.V. (1997). Induction of Lipid Peroxidation During Heavy Metal Stress in *Saccharomyces Cerevisiae* and İnfluence of Plasma Membrane Fatty Acid Unsaturation, , *American Society For Microbiology*, 63, 2971-2976.
- İlkdoğan, U. (2012). *Türkiye’de Aspir Üretimi İçin Gerekli Koşullar ve Oluşturulacak Politikalar*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- İnternet 1: Güneş, A. Stres Fizyolojisi Ders Notu. URL: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/20578/mod_resource/content/0/BF%2014.%20HAFTA.pdf, Son Erişim Tarihi : 26.01.2022.
- İnternet 2: İşler, N. Aspir Tarımı. M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. URL : <http://www.mku.edu.tr/files/898-7f299b9f-6e6e-4418-aa25-7dd9fbd65874.pdf>. Son Erişim Tarihi : 20.07.2021.
- İnternet 3: TC. Tarım ve Orman Bakanlığı Ankara İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, (2015). Aspir Yetiştiriciliği. URL : <https://ankara.tarimorman.gov.tr/Belgeler/liftet/aspiryetistiriciligi.pdf>. Son Erişim Tarihi : 12.07.2021.
- İnternet 5: TC. Doğu Kalkınma Ajansı, (2019). Hatay İli Fidancılık Sektör Raporu. URL : https://www.dogaka.gov.tr/assets/upload/dosyalar/www.dogaka.gov.tr_967_YS3E23YN_Hatay-ili-Fidancilik-Sektor-Raporu.pdf. Son Erişim Tarihi : 25.01.2022.
- İnternet 6: T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Aspir Çeşitleri. URL : <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/gktaem/Menu/72/Aspir-Cesitleri>. Son Erişim Tarihi : 18.01.2022
- İnternet 7: Güleç, S. Bitkilerde Görülen Stres Çeşitleri. Ondokuzmayıs Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü. URL : https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fpersonel.omu.edu.tr%2Fdocs%2Fders_dokumanlari%2F8531_96007_2394.pptx&wdOrigin=BROWSELINK. Son Erişim Tarihi : 21.01.2022.
- Kafkasyalı, D. (2021). Bakır Toksisitesinin Bitkilerde Fizyolojik, Morfolojik, Biyokimyasal ve Transkripsiyonel Düzeydeki Etkileri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 47(1), 16-34.1
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S. (2004). Metallerin Çevresel Etkileri (III-III). *Metalurji Dergisi*, 137, 46-51.
- Kant, C., ve Aydın, A. (2002). Su Kültürü Ortamında Farklı Dozlarda Uygulanan Cu, Zn, Mn ve Fe’in Domatesin Gelişimi ve Mineral İçeriğine Etkisi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(2), 163-171.

- Kantarcı, D. (1995). *Hava Kirliliğinin Bitkiler Üzerine Doğrudan ve Dolaylı Etkileri*. İTÜ, II. Hava Kirlenmesi, Modellenmesi ve Kontrolü Sempozyumu, İstanbul.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., Singh, J. (2019). Antioxidant Enzymes Regulation in Plants in Reference to Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS). *Plant Gene*, 19, 100182.
- Kayaçetin, F. Katar, D. ve Aslan, Y. (2012). Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)’in Döllenme Biyolojisi ve Çiçek Yapısı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 21 (2): 75-80.
- Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F. and Renaut, J., (2008). Quantitative Changes in Protein Expression of Cadmium-Exposed Poplar Plants. *Plant Proteomics*, 8, 2514-2530.
- Kocaman, E. (2019). *Ağır Metal Stresine Maruz Kalmış Fasulye Çeşitlerinde Camta Ve Yabby Genlerinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi*, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Korkmaz H. ve Durmaz A. (2017). Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Karşı Geliştirilen Cevaplar. *Gümüşhane Universty Journal of Science and Technology*. 7 (2): 192-207.
- Koutroubas, S. D., Papakosta, D. K. and Doitsinis, A. (2009). Phenotypic Variation İn Physiological Determinants of Yield in Spring Sown Safflower Under Mediterranean Conditions, *Field Crops Research*, 112 (2), 199-204.
- Küpe, M. ve Köse, C. (2013). Hava Kirliliğinin Asmalar Üzerindeki Etkileri, *Fruit Science*, 1(1), 27-33.
- Kwon, O. K., Mekapogu, M., Kim, K. S. (2019). Effect of salinity stress on photosynthesis and related physiological responses in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 60: 831-839.
- Levitt, J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses II. water, Radiation, Salt and Other Stres*, Academic Press. 3-7, 25-74.
- Li, D., Mündel, H.H. (1996) Safflower: *Carthamus tinctorius* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 7. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany/International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.
- Li, S., Zhang, G., Gao, W., Zhao, X., Deng, C., and Lu, L. (2015). Plant Growth, Development and Change in GSH Level in Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) Exposed to Copper and Lead. *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 385-396.
- Lichtenthaler, H. K., And Wellburn, A. R. (1983). Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents. *Biochemical Society Transactions*. 11 (5): 591–592.

- Lillo, F., Ginocchio, R., Ulriksen, C., Dovletyarova, E. A., and Neaman, A. (2019). Evaluation of Connected Clonal Growth of *Solidago Chilensis* As an Avoidance Mechanism in Copper-Polluted Soils. *Chemosphere*, 230, 303-307.
- Livak, J.K. and Schmittgen, D.T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and The $2^{-\Delta\delta ct}$ Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Maksymiec, W., and Krupa, Z. (2007). Effects Of Methyl Jasmonate and Excess Copper On Root and Leaf Growth. *Biologia Plantarum*, 51(2), 322-326.
- Marcum, K.B., (1998). Cell Membrane Thermostability and Whole-Plant Heat Tolerance of Kentucky Bluegrass, *Crop Science*, 38, 1214-1218.
- Mccauley, A., Jones, C., and Jacobsen, J. (2009). Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms. *Nutrient Management Module*, 9, 1-16.
- Mithöfer, A., Schulze, B., and Boland, W. (2004). Biotic and Heavy Metal Stress Response in Plants: Evidence For Common Signals, *FEBS Letters*, 566(1-3), 1-5.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., And Hansson, A. (2007). Oxidative Modifications To Cellular Components in Plants. *Annual Reviews Of Plant Biology*, 58, 459-481.
- Moosavi, S. A., Gharineh, M. H., Afshari, R. T., and Ebrahimi, A. (2012). Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination Characteristics of Canola (*Barassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus tinctorious*) to Evaluate Phytoremediation Potential of These Crops. *Journal of Agricultural Science*, 4(9), 11.
- Müezzinoğlu, A., (1987). Hava Kirliliğinin ve Kontrolünün Esasları. İzmir: *Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları*.
- Namjooyan, S., Khavarnejad, R., Bernard, F., Namdjoyan, S., and Piri, H. (2012). The Effect of Cadmium on Growth and Antioxidant Responses in The Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) Callus. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36(2), 145-152.
- Nazir, F., Hussain, A. ve Fariduddin, Q. (2019). Hydrogen Peroxide Modulate Photosynthesis and Antioxidant Systems in Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) Plants Under Copper Stress. *Chemosphere* , 230: 544–558.
- Nuhoğlu, Y., (1996). *Hava Kirliliğinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri*. Lisansüstü Ders Notları (Basılmamış), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Okçu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. ve Pehlivan, M. (2009). Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkisi. *Alinteri Journal Of Agriculture Science*. 17(2), 14-26.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E., and Browse, J. (1994). Arabidopsis *FAD2* Gene Encodes The Enzyme That is Essential For Polyunsaturated Lipid Synthesis. *The Plant Cell*, 6(1), 147-158.

- Pandey, J., Agrawal, M., (1994). Evaluation of Air Pollution Phytotoxicity in A Seasonally Dry Tropical Urban Environment Using Three Woody Perennials. *New Phytologist Foundation*, 126 (1): 53-61.
- Patel, J.S. and Narayana, G.V. (1935). Chromosome Numbers in Safflower. *Current Science*. 4, 413.
- Ralph, P.J., and Burchett, M.D., (1998). Photosynthetic Response of *Halophila ovalis* to Heavy Metal Stres, *Environmental Pollution*, 103-91-101.
- Raven, J.A., Evans, M.C.W. and Korb, R.E. (1999). The Role of Trace Metals in Photosynthetic Electron Transport in O₂ Evolving Organisms. *Photosynthesis Research*, 60, 111-149.
- Roscoe, J.T. (1975). Fundemental research statistics for the behavioral sciences, Food and Agriculture Organization of the United Nation, *Includes bibliographies* , 63.
- Sant'Anna-Santos, B. F., Silva, L. C. D., Azevedo, A. A., And Aguiar, R. (2006). Effects Of Simulated Acid Rain on Leaf Anatomy and Micromorphology of *Genipa Americana* L. (*Rubiaceae*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2): 313-321.
- Sayyad, G., Afyuni, M., Mousavi, S. F., Abbaspour, K. C., Hajabbasi, M. A., Richards, B. K., and Schulin, R. (2009). Effects of Cadmium, Copper, Lead, and Zinc Contamination on Metal Accumulation By Safflower and Wheat. *Soil and Sediment Contamination*, 18(2), 216-228.
- Siedlecka, A., Tukendorf, A., Skorzynska-Polit, E., Maksymiec, W., Wojcik, M., Baszynski, T. and Krupa, Z. (2001). Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae), Prasad, M.N.V. (Ed.), *Metals in the Environment*. Analysis by Biodiversity, New York, Basel: Marcel Dekker, 171-217.
- Singh, A. And M. Agrawal (1996). Response of Two Cultivars of *Triticum aestivum* L. to Simulated Acid Rain. *Environmental Pollution*. 91, 161-167.
- Singh, A., and Agrawal, M. (2007). Acid Rain and Its Ecological Consequences. *Journal Of Environmental Biology*, 29(1), 15.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A, Semane, B., Hoet, P., Laere, A.V., and Vangronsveld, J. (2005). Induction of Oxidative Stress and Antoxidative Mechanisms in *Phaseolus Vulgaris* After Cd Application, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43-: 437-444.
- Sosse, A. B., Genet, P., Dunand, F. V., Toussaint, L. M., Epron, D. And Badot, M. P. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*. 166(5), 1213-1218.
- Soudek, P., Katrusakova ,A., Sedlacek, L., Petrova, S., Koci, V., Marsik, P. (2010). Effect of heavy metals on inhibition of root elongation in 23 cultivars of flax (*Linum*

- usitatissimum L.), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59:194–203.
- Souza-Santos, P., Ramos, R.S., Ferreira, S.T. and Carvalhoalves, P.C. (2001). Iron-Induced Oxidative Damage of Corn Root Plasma Membrane H⁺Atpase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)*, 1512:357-366.
- Sönmez, S., Kaplan, M., Sönmez, N.K., Kaya, H and Uz, İ., 2006. High Level of Copper Application To Soil And Leaves Reduce The Growth And Yield of Tomato Plants. *Scientia Agrícola (Piracicaba, Braz.)*, 63(3);213-218.
- Stobrawa, K., And Lorenc-Plucińska, G. (2008). Thresholds of Heavy-Metal Toxicity In Cuttings of European Black Poplar (*Populus Nigra* L.) Determined According To Antioxidant Status of Fine Roots and Morphometrical Disorders. *Science Of The Total Environment*, 390(1), 86-96.
- Taşlıgil, N., ve Şahin, G. (2016). Stratejik Önemi Artan Bir Endüstri Bitkisi: Aspir (*Carthamus Tinctorius* L.). *Türk Coğrafya Dergisi*, (66), 51-62.
- Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö., Gür, N., Ve Çobanoğlu, D. (2004). Ağır Metal İyonlarının (Cu^{++} , Pb^{++} , Hg^{++} , Cd^{++}) *Clivia* sp. Bitkisi Polenlerinin Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi Üzerine Etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(2), 177-182.
- Tunc, T. Ve Sahin, U. (2015). The Changes in the Physical and Hydraulic Properties of a Loamy Soil Under İrrigation with Simpler-Reclaimed Wastewaters. *Agricultural Water Management*. 158:213-224.
- Turan, G., ve Gökalp, M. F. (1993). Ege Bölgesinin Hava Kirliliğinin Önlenmesinde Güneş Enerjisi Bina Isıtma Sistemlerinden Yararlanma. *Ekoloji*, 3(9), 28-32.
- Vatansever, R., Ozyigit, I. I., ve Filiz, E. (2017). Genome-Wide İdentification and Comparative Analysis of Copper Transporter Genes in Plants. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 9(2), 278-291.
- Veziroğlu, N. (1998). *Asit Yağmurlarının Çılgınlığı*. Mimari Üniversitesi. Temiz Enerji Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Çeviri: Ö. F. Noyan), Ekoloji Çevre, 27, S:33-37.
- Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sossé, B., and Badot, P. M. (2002). Effects of Copper on Growth and on Photosynthesis of Mature and Expanding Leaves in Cucumber Plants. *Plant Science*, 163(1), 53-58.
- Wenzel, Ww, Bunkowski, M, Puschenrerter, M. ve Horak, O. (2003). Rhizosphere Characteristics Of İndigenously Growing Nickel Hyperaccumulator And Excluder Plants On Serpentine Soil. *Environmental Pollution*, 123-131– 8.
- Wojcik, M, Gonnellix, C., Selvix, F., Dresler, S., Rostanski, A. and Vangronsveld, J. (2017). Metallophytes Of Serpentine And Calamine Soilse Their Unique Ecophysiology And Potential For Phytoremediation, *Advances İn Botanical Research*, 83 1-34.

- Wood, T. and Bormann, F. H. (1977). Short-Term Effects Of A Simulated Acid Rain Upon The Growth And Nutrient Relations of *Pinus strobus*, L. *Water, Air, And Soil Pollution*, 7 (4): 479-488.
- Yalçın, N. (1999). Acidic Precipitation *Triticum vulgare* (Buğday) ve *Zea Mays* Saccharin T (Mısır) on the impact of plant. *Sakarya University Journal Of Science*, 3(2), 51-54.
- Yazdi-Samadi, B., A. Sarafi ve A.A. Zali, (1975). Heterosis and Inbreeding Estimates in Safflower, *Crop Science*. 15(1), 81-3.
- Yerli, C., Çakmakcı, T., Sahin, U., ve Tüfenkçi, Ş. (2020). Ağır Metallerin Toprak, Bitki, Su ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(Özel Sayı), 103-114.
- Yıldız, M., Terzi, H. ve Urşak, B. (2011). Bitkilerde Krom Toksisitesi Ve Hücrel Cevaplar. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*. 27(2):163-176.
- Yüksel, B. ve Aksoy, Ö. (2017). Su Stresi Koşullarında Bitkide Gözlenen Değişimler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 10 (2): 01-05.
- Zeid, I., M., Ghazi, S. M. And Nabawy, D.M. (2013). Alleviation of heavy metals toxicity in waste water used for plant irrigation. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(5):976-983.
- Zhang, B., Bu, J., & Liang, C. (2016). Root Morphology and Growth Regulated by Mineral Nutrient Absorption in Rice Roots Exposed to Simulated Acid Rain. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(12), 1-12.
- Zhang, D., Liu, X., Ma, J., Yang, H., Zhang, W.c and Li, C. (2019). Genotypic Differences And Glutathione Metabolism Response in Wheat Exposed to Copper. *Environmental and Experimental Botany*, 157, 250-259.
- Zhang, J., Liu, H., Güneş, J. and Li (2012). Arabidopsis Fatty Acid Desaturase FAD2 Is Required for Salt Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth, *Plos One*, 7(1): e30355. doi:10.1371.
- Quilantan , V.L. Villareal, L.; Muñoz Burgos, S.; Obeso Santos, E. (1977). The Effect of Borders and Inter-Varietal Competition in Safflower. *Agriculture Technology Mex.* 4 (1) , 49-61.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Nilay YILDIRIM

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1-) Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FMB-BAP 19-0423.

(Proje Adı :Ağır Metal ve Asit Yağmuru Streslerinin Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşitlerinde, Oleik Asidin Linoleik Aside Çevriminden Sorumlu Olan *FAD2* Geninin mRNA İfade Seviyeleri ve Bazı Ekofizyolojik Özellikler Üzerine Muhtemel Etkilerin Araştırılması)

2-) 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science.

Bildiri Adı: Asit Yağmuru ve Ağır Metal Streslerinin Üç Farklı Aspir Çeşidinde (*Carthamus tinctorius* L) Çeşidinde Çimlenme Başarısı Üzerine Etkisi. (Özet Bildiri)