



**AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) KROM
STRESİNDE BAKIR VE ASKORBİK ASİT
UYGULAMASININ METALLOTİYONİN VE NAC
TRANSKRİPSİYON FAKTÖR GENLERİNİN
EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Merve YÜCE

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Güleray AĞAR

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) KROM STRESİNDE BAKIR
VE ASKORBİK ASİT UYGULAMASININ METALLOTİYONİN VE
NAC TRANSKRİPSİYON FAKTÖR GENLERİNİN
EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Merve YÜCE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her Hakkı Saklıdır



**T. C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) KROM STRESİNDE BAKIR VE ASKORBİK
ASİT UYGULAMASININ METALLOTİYONİN VE NAC TRANSKRİPSİYON
FAKTÖR GENLERİNİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Merve YÜCE tarafından hazırlanan bu çalışma, 28/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği /oy çokluğu (/) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25/01/2018 tarih ve 4/19 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü**

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) KROM STRESİNDE BAKIR VE ASKORBİK ASİT UYGULAMASININ METALLOTİYONİN VE NAC TRANSKRİPSİYON FAKTÖR GENLERİNİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Merve YÜCE

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Abiyotik ve biyotik stresler tüm canlı gruplarını etkilemektedir. Hem doğal süreçler hem de antropojenik kaynaklar tarafından çevreye yayılan ağır metaller, bitki metabolizması üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bitkiler, stres tepkisinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin ifadesini uyararak ağır metaller gibi çevresel kirleticilere tepki verirler. Çalışmada, krom (Cr) ($1 \mu\text{M Kr}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) stresi altındaki *Helianthus annuus* L.'ta mikro besin elementi olan bakır (Cu) ($0,25 \mu\text{M CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve enzimatik olmayan antioksidan olan askorbik asitin (AsA) (200 mg/L) Metallothiyonin (MT) ve NAC transkripsiyon faktör genlerinin ifadesine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu etkileri belirleyebilmek için MT genleri (*HanMT2-1* ve *HanMT4*) ile NAC transkripsiyon faktör genlerinin (TF ID: *Han682*, *Han2027* ve *Han2724*) ifade seviyeleri qRT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Cr stresi altında MT ve NAC transkripsiyon faktör genlerinin ifade seviyelerinin organa göre değiştiği ve köklerde up-regüle olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca; Cr stresine karşı Cu ve AsA'nın koruyucu rolleri gözlenmiş ve MT ve NAC transkripsiyon faktör genlerinin sinyal yollarını aktive ederek strese karşı toleransta görev alabileceği belirlenmiştir.

2017, 54 sayfa

Anahtar Kelimer: Krom toleransı, Metallothiyonin, NAC transkripsiyon faktörü, Gen ifadesi, *Helianthus annuus* L.

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF COPPER AND ASCORBIC ACID TREATMENTS ON SUNFLOWER'S (*Helianthus annuus* L.) METALLOTHIONEIN AND NAC TRANSCRIPTION FACTOR GENE EXPRESSIONS UNDER STRESS OF CHROMIUM

Merve YÜCE

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AGAR

Abiotic and biotic stresses affect all living organisms. Heavy metals, have been contaminated to environment both natural and anthropogenic origins, have negative effects on plant metabolism. Plants respond to environmental pollutants like heavy metals by stimulating the stress response proteins' gene expressions. This study aimed to determine the effects of a micro nutrient element, copper (Cu) (0,25 μ M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and a non-enzymatic antioxidant, ascorbic acid (AsA) (200 mg/L) on the Metallothionein (MT) and NAC transcription factor genes expressions of chromium stressed in *Helianthus annuus* L.. For this purpose, the expression levels of MT (*HanMT2-1* and *HanMT4*) and NAC transcription factor genes (TF ID: *Han682*, *Han2027* and *Han2724*) were analyzed by qRT-PCR technique. The results show that expression levels of MT and NAC transcription factor genes under Cr stress changed based on organ and up-regulated in the roots. Additionally, there are protective roles of Cu and AsA against Cr stress and also, MT and NAC transcription factor genes may take charge in stress tolerance by activating signal pathway.

2017, 54 pages

Keywords: Chromium tolerance, Metallothionein, NAC transcription factor, Gene expression, *Helianthus annuus* L.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji ile Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Çalışmalarım boyunca bana göstermiş olduğu anlayış, yardım ve yönlendirmelerinden dolayı saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a, biyoinformatik araştırmalarımda yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN'a, ihtiyaç duyduğum her an destek ve yardımlarıyla yanımda olan Sayın Arş. Gör. Esra ARSLAN'a, laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzm. Biyolog Burcu SİĞMAZ'a, Sayın Arş. Gör. Dr. Gökçe KARADAYI'ya, Sayın Uzm. Biyolog Semra YAĞCI'ya, her an her durumda yanımda olan çalışma arkadaşım Sayın Biyoloji Öğretmeni Selin Sipahi Kuloğlu'na, tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji ile Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarlarında çalışan hocalarım ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman arkamda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve YÜCE

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Bitkisel materyal.....	20
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	20
3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar.....	21
3.1.3.a. Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler.....	21
3.1.3.b. Ağır metal çözeltilerinin hazırlanışı.....	21
3.1.3.c. Askorbik asidin hazırlanışı.....	21
3.1.3.d. Besin çözeltisinin hazırlanışı.....	21
3.1.3.e. Primerlerin hazırlanması.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Tohum sterilizasyonu.....	23
3.2.2. Uygulanacak Cu ve Cr konsantrasyonunun belirlenmesi.....	24
3.2.3. Bitkilerin yetiştirilmesi.....	24
3.2.4. Toplam RNA izolasyonu.....	25
3.2.5. cDNA sentezi.....	26
3.2.6. qRT-PCR ile gen ifade analizi.....	27
3.2.7. Verilerin analizi.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1. Gen İfadelerinin Analizleri.....	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	41

KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	55



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik asit
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
ALO	D-arabinono-1,4-lakton oksidaz
AO	Askorbat oksidaz
APX	Askorbat peroksidaz
As	Arsenik
AsA	Askorbik asit
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
Co	Kobalt
Cr	Krom
Cu	Bakır
Cys	Sistein
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
e ⁻	Elektron
Fe	Demir
g	Gram
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Glutasyon-S- transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hg	Civa

HO ₂ [·]	Perhidroksil radikali
JA	Jasmonik asit
L	Litre
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
Mo	Molibden
MT	Metallotiyonin
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NAM	No apical meristem=Apikal olmayan meristem
ng	Nanogram
Ni	Nikel
O	Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
Pb	Kurşun
Pb(NO ₃) ₂	Kurşun nitrat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNAp	RNA polimeraz
ROT	Reaktif oksijen türleri
rRNA	Ribozomal RNA
S	Kükürt
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
TF	Transkripsiyon faktörleri
TR	Transkripsiyonel düzenleyiciler
V	Vanadyum
Zn	Çinko

$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	Çinko nitrat
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkilerde stres yanıtı.....	1
Şekil 1.2. Ağır metal ile oluşturulan hasar gelişiminin ana mekanizmaları.	4
Şekil 1.3. MT'nin ağır metal detoksifikasyon mekanizması	8
Şekil 4.1. Ayçiçeği köklerinde seçilen genlerin çalışma eğrileri.....	29
Şekil 4.2. Ayçiçeği gövdelerinde seçilen genlerin çalışma eğrileri	30
Şekil 4.3. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki <i>MT2-1</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	31
Şekil 4.4. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki <i>MT2-1</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	32
Şekil 4.5. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki <i>MT4</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	33
Şekil 4.6. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki <i>MT4</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	34
Şekil 4.7. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki <i>Han2724</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	35
Şekil 4.8. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki <i>Han2724</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	36
Şekil 4.9. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki <i>Han682</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	37
Şekil 4.10. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki <i>Han682</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	38
Şekil 4.11. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki <i>Han2027</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	39
Şekil 4.12. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki <i>Han2027</i> geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

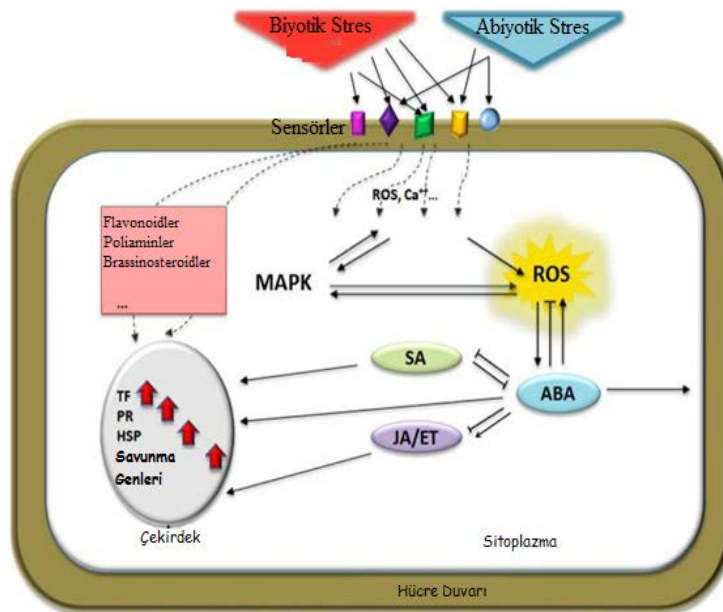
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve modelleri.....	20
Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin baz dizilimi	23
Çizelge 3.3. Uygulamaların listesi	25
Çizelge 3.4. qRT-PCR için kullanılan malzemeler.....	27



1. GİRİŞ

Bir bitkinin metabolizmasını, büyümesini ve gelişimini etkileyen veya engelleyen herhangi bir olumsuz durum veya madde stres olarak kabul edilmektedir. Bitki büyümesini ve gelişimini çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörleri etkilemektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Bitkiler; kuraklık, sıcaklık, ışık şiddeti, ağır metal ve besin eksikliği gibi doğal nedenlerden veya insan aktivitelerinden kaynaklanabilen farklı stres faktörlerine maruz kalırlar (Arora *et al.* 2002).

Bitkiler biyotik ve abiyotik stresler karşısında hayatta kalabilmek için hücresel, fizyolojik ve moleküler seviyede tepki verirler. Bu tepkide stres sinyallerinin algılanmasını ve iletilmesini destekleyen karmaşık bir ağ içerir (Fancy *et al.* 2017). Stres koşulları altında ilk önce bitkilerde aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi meydana gelir (Akram *et al.* 2017). ROT oluştuktan sonra stres algılanır ve sonra hücresel bir sinyal iletim yolu uyarılmaktadır. Stres sinyali, başlangıç stres tepkisini üretmek için strese duyarlı genleri devreye sokarak transkripsiyonel düzenlemeyi başlatır (Trinh *et al.* 2014) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Bitkilerde stres yanıtı (Rejeb *et al.* 2014)

Toprak kontaminasyonunda en önemli kirletici maddeler olarak kabul edilen ağır metaller, bazı fizyolojik ve moleküler değişikliklere neden olan, bitki verimliliğini olumsuz şekilde etkileyen abiyotik stres faktörlerinden biridir (Kisa *et al.* 2017).

Metaller yerkabuğunun çeşitli seviyelerinde doğal olarak bulunur ve bakır (Cu), mangan (Mn), demir (Fe), çinko (Zn) gibi bazı metaller ise bitki bünyesinde mikro seviyede yer almaktadırlar (Yang *et al.* 2005).

Canlı organizmalar, hem metaloprotein veya kofaktörlerde kullanmak üzere onların uygun konsantrasyonları sağlamak hemde metal fazlalıklarının toksik etkilerine karşı kendilerini korumak için geçiş metallerini depolar ve taşırlar. Biyolojik depolama ve taşınımın önemli olduğu geçiş metalleri; Cu, Fe, Zn, molibden (Mo), kobalt (Co), krom (Cr), vanadyum (V) ve nikel (Ni)dir (Lippard and Berg 1994).

Cu, normal bitki metabolizması için gerekli olan mikro besin maddesidir. Fotosentetik ve solunum elektron taşıma zincirleri gibi bir takım fizyolojik süreçlerde bir kofaktör olarak veya ATP sentezi de dahil olmak üzere farklı metabolik yollarda yer alan birçok önemli enzimin önemli bir parçası olarak yer almaktadır (Zengin and Kirbag 2007). Bunun yanı sıra; kükürt (S), oksijen (O) ve azot (N) içeren çeşitli kimyasal ligand spektrumunun yardımıyla proteinlere koordinasyon yaparak protein yapısı, katalitik aktivite ve protein - protein etkileşimlerinde değişiklik yaparak çeşitli biyokimyasal ve düzenleyici olayları kontrol etmektedir (Kim *et al.* 2008).

Yoğunluğu 5.0 g/cm^3 'den fazla olan bir grup metallerin oluşturduğu krom (Cr), alüminyum (Al), civa (Hg), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), gümüş (Ag) gibi ağır metaller; özellikle nüfus yoğunluğunun fazla olduğu bölgelerde önemli çevresel kirleticilerdendirler. Esansiyel miktarlarda bile atmosferde, toprakta ve suda bulunmaları bütün organizmalar için ciddi problemlere neden olmakta, besin zincirindeki biyoakümülayonu etkilemektedirler (Sanita di Toppi and Gabbrielli 1999).

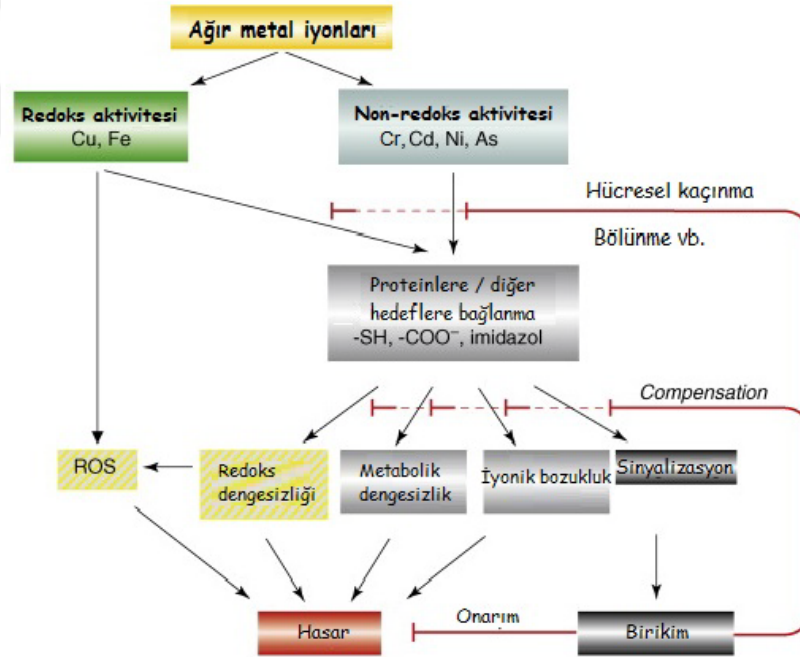
Cr, biyolojik olarak gerekli olmayan, çok düşük konsantrasyonlarda bile insanlar başta olmak üzere tüm canlı grupları için toksik etki gösterebilen ve özellikle endüstrilerde kullanılan en önemli çevre kirleticilerinden biridir (Das *et al.* 2014; Trinh *et al.* 2014; Gill *et al.* 2015).

Cr, tohum çimlenmesini, büyümeyi, pigment içeriğini, mitokondriyal elektron taşıma aktivitesini azaltabilir, enzimatik fonksiyonu değiştirebilir, kök hücrelerine zarar verebilir, proteinlerin yapılarını bozabilir, nitrat redüktaz aktivitesinin inhibisyonuna, kromozomal anormalliklere ve hücre bölünmesinin inhibisyonuna neden olabilir (Zeng *et al.* 2012). Bununla birlikte, birçok bitkide, Cr stresinde DNA içeriğinde bir artış gözlemlenmiş ve DNA miktarı, Cr konsantrasyonundaki artışına paralel olarak arttığı tespit edilmiştir (Panda and Choudhury 2005).

Cr'nin, bitkilerde bazı fizyolojik parametrelerde değişimlere neden olduğu bilinmektedir (Vajpayee *et al.* 2000). Çeltikte Cr stresinde bitki büyümesinin ve klorofil içeriğinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Zeng *et al.* 2012). 400 µM Cr konsantrasyonu altında yetiştirilen *Brassica napus* L.'da bozulmuş, olgunlaşmamış çekirdek yapısı, hücre duvarı ve tilakoit membran bozulması, yaprak yapısında değişiklikler gözlenmiştir (Gill *et al.* 2015). *Polytrichum commune*'de Cr, Cu ve Zn etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde toplam klorofil içeriğinde bir azalış belirlenmiştir (Panda and Choudhury 2004). Cr ve Pb ağır metal stresine maruz kalan *Taxithelium Nepalense* (karayosunları)'de tilakoit ve kloroplast membranında bozulma ile kloroplast yapısında değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca, ROT oluşumu ve başlıca antioksidan metabolizmayı inhibe eden lipid peroksidasyonunun başladığı bildirilmiştir (Choudhury and Panda 2005).

Cr ve diğer metallerin fazlalığı, bitki gelişiminde değişikliğe yol açan çeşitli metabolik yanıtlar başlatabilir. Cr gibi redoks metalleri, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları yoluyla doğrudan oksidatif hasar oluşturabilir ve bu da bitkilerde ROT üretimine neden olur. Süperoksit radikalleri ($O_2^- \cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($OH \cdot$) ve singlet oksijen (1O_2) gibi ROT'lar normal olarak aerobik organizmalarda az

miktarlarda üretilir. Bununla birlikte, stres koşulları altında üretimleri önemli ölçüde artar. Bitkilerde ROT'un aşırı üretilmesi, hücre zarının ve homeostazının bozulmasına, DNA iplikçik kırılmasına, proteinlerin bir araya getirilmesine veya hücre ölümünü tetikleyebilecek fotosentetik pigmentlerin hasar görmesine neden olabilir (Gomes *et al.* 2017) (Şekil 1.2). Bu durumda hücrenin antioksidan metabolizması tetiklenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin, Cr'ye duyarlı oldukları ve Cr'nin bu enzimlerin katalitik faaliyetlerinde bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur. Antioksidan etkinliğindeki bu düşüş, bitkilerde Cr toksisitesi altında oksidatif stres oluşturmada önemli bir faktördür. Cr stresi altında ROT üretimi birçok bitkide belirlenmiştir (Panda and Choudhury 2005).



Şekil 1.2. Ağır metal ile oluşturulan hasar gelişiminin ana mekanizmaları (Sharma and Dietz 2009).

Cr uygulanmış çeltik köklerinde oksidatif stresin başlamasının Cr toksisitesinin altında yatan ana biyolojik süreç olduğu bildirilmiştir (Panda 2007; Trinh *et al.* 2014).

ROT'lar, bitki gen ifadesinin ve genetik ürün düzenlemesinin düzenlenişinde çok yönlü rollere sahiptir (Foyer and Noctor 2009). Yüksek konsantrasyonları, metabolizmanın bozulmasına ve hücrel yapıların yok olmasına neden olabilen DNA, proteinler ve membran lipidleri de dahil olmak üzere çeşitli hücrel yapıların kontrolsüz oksidasyonuna neden olabilir (Smirnoff 2005). Oksidanların çoğu eşleşmemiş elektronu bulunan OH• gibi ROT'lardır ve bu yüzden oldukça reaktif olup; moleküler seviyede bitki hücrelerine zarar vermektedir. Çünkü bu moleküller nükleik asitlerle, proteinlerle ve lipidlerle reaksiyona girerler (Rady *et al.* 2016).

Bitkiler, olumsuz koşulları ve bunların olumsuz etkilerini tolere edebilecek stratejiler geliştirmişlerdir. Bir bitkide oksidatif strese karşı ilk savunma hattı, ROT üretiminin önlenmesidir. ROT oluştuktan sonra hasarı en aza indirmek için mümkün olduğunca etkin bir şekilde detoksifikasyona tabi tutulmalıdır, böylece detoksifikasyon mekanizmaları ROT'un zararlı etkilerine karşı ikinci savunma hattını oluşturur. Antioksidan enzimler, bu mekanizmaları katalize eden veya ROT'un doğrudan uzaklaştırılmasında rol oynayan enzimlerdir. Bu nedenle, antioksidanlar ve antioksidan enzimler, kontrolsüz oksidasyonun basamaklarını engellemek için işlev görür (Gratão *et al.* 2005).

Bitkilerde antioksidan savunma sistemleri; enzimatik (SOD, CAT, GR, askorbat peroksidaz (APX), monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidro askorbat redüktaz (DHAR), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon-S- transferaz (GST)) ve enzimatik olmayan (askorbik asit (AsA), glutatyon (GSH), fenolik bileşikler, alkaloidler, protein olmayan amino asitler ve α - tokoferoller) savunma sistemleri şeklinde 2 gruba ayrılmaktadır. Her iki grupta, ROT'ları süpürerek kontrolsüz oksidasyonlara neden olan sinyal yollarını kontrol edip, bitki hücrelerini oksidatif hasarlardan korurlar (Gill and Tuteja 2010).

Ayçiçeği ile yapılan bir çalışmada Co, Ni, Cd ve Pb toksisitesi, antioksidan savunma mekanizmasının aktivitesinde önemli değişikliğe neden olmuştur. Ayçiçeği yapraklarında oksidatif stresin hafifletilmesinden sorumlu SOD aktivitesi, her kirletici

metalin toksisitesinde belirgin bir şekilde artmıştır. Bu metallerin fazlalığından kaynaklanan oksidatif stresin bir sonucu olarak SOD aktivitesinde artış belirlenmiştir. Ayçiçeğinde Co, Cd, Ni, Cr ve Pb uygulaması, POX aktivitesinde artışa neden olmuştur (Gopal and Khurana 2011).

AsA, çevresel streslere karşı bitki yanıtlarını düzenlemede redoks tamponu olarak görev yapan ve enzimatik olmayan antioksidanların içerisinde en bol bulunan bir antioksidan çeşididir (Chen *et al.* 2014). Bitkilerin çoğunlukla vejetatif kısımlarında, apoplast, sitosol ve özellikle mitokondri ve kloroplastta yaygın olarak bulunurlar (Akram *et al.* 2017; Aziz *et al.* 2017). AsA, tilakoitlerde oluşan H_2O_2 temizlenmesinde rol alan APX için substrat görevi görmesinin yanı sıra etilen ve giberellik asit gibi önemli bitki hormonlarının biyosentezinde yardımcı substrat olarak görev almaktadır (Davey *et al.* 2000). Aynı zamanda fotosentez, hücre duvarı ve hücre büyümesi, mitoz bölünme, antosiyaninler ve hidroksiprolinin sentezi gibi çeşitli süreçlerde sinyal düzenleyicisi olarak görev alırlar (Smirnoff and Wheeler 2000). Ancak bitkilerde bunun gibi pek çok görevinin bilinmesine rağmen, metabolizması ve biyosentezi hakkında kesin bir bilgi elde edilememiştir (Seminario *et al.* 2017).

Hücresel seviyede, AsA artışının bitkilerde stres toleransının artırılmasında rolünün olduğu bilinmektedir. Bitkilerde, AsA fizyolojik olarak üretilen ROT ile etkileşime girerek, lignifikasyon, hücre bölünmesi ve aşırı hassas tepki gibi süreçlerin modülasyonunda görev almaktadır. AsA'nın antioksidan davranışının biyolojik önemi, diğer düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan (α - tokoferol, ürik asit, karotenoidler, flavonoidler, vs.) farklı olarak, radikal zincir reaksiyonlarının yapılarını bozarak zararsız hale getirebilmesidir (Davey *et al.* 2000). Dışsal AsA'nın, Allium, Pisum ve Lupinus'un kök uçlarında hücre siklusunun G1 / S geçişini hızlandırarak hücre çoğalmasının başlamasını uyardığı bulunmuştur. Dışsal AsA'nın eklenmesi durgun safhadaki (G0) hücrelerinin, hem mısır hem de Allium'da hücre döngüsüne tekrar girmesini teşvik etmiştir. AsA içeriğinin hücre bölünmesi sırasında arttığı ve G1 fazı boyunca dehidroaskorbat (DHA) konsantrasyonunun hücrenin çoğalmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, DHA konsantrasyonlarındaki artış ile AO

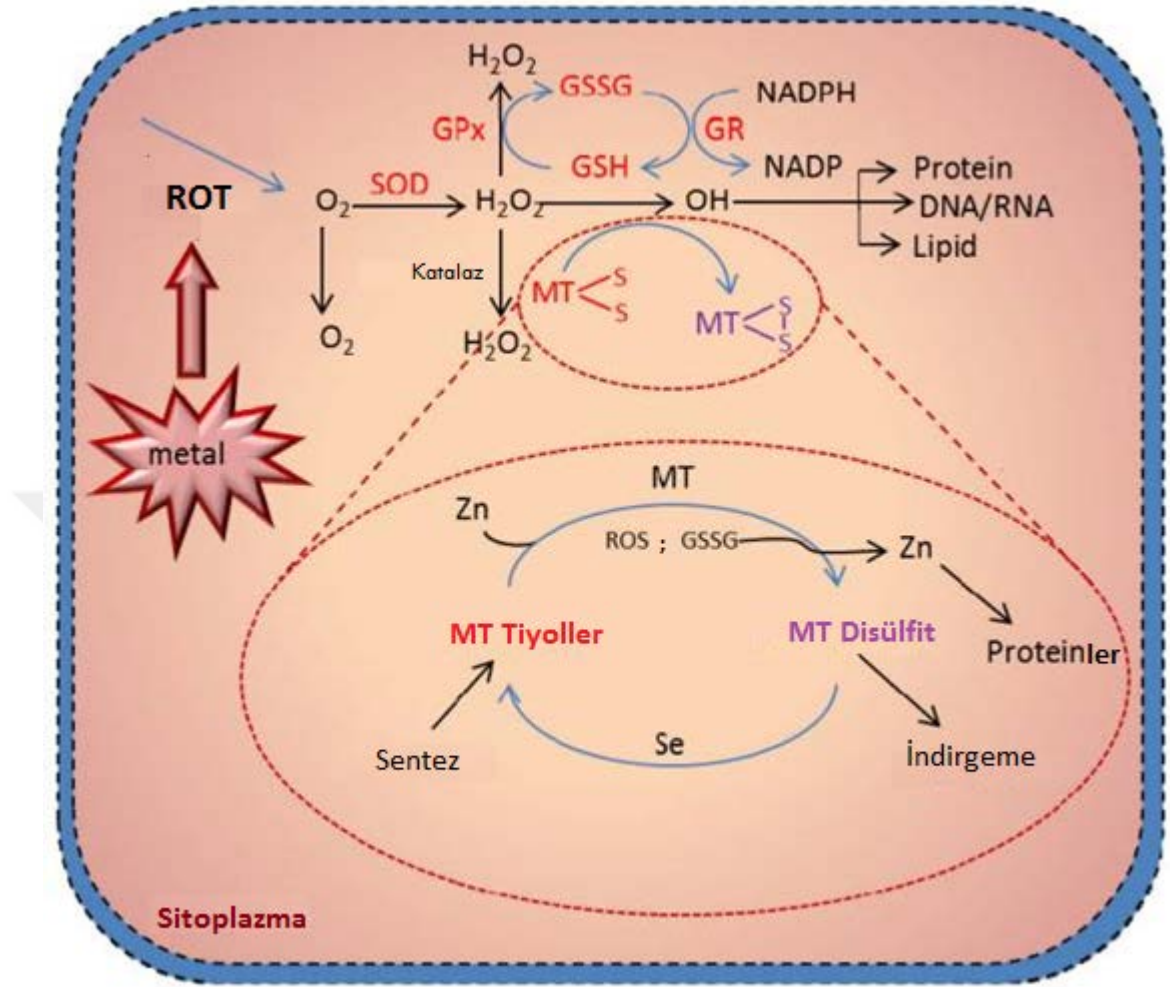
seviyeleri arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Bu, hücre bölünmesi döngüsünden çıkışın belirlenmesinde AO ve AsA / DHA oranının rolü olduğunu düşündürmektedir. Hem dışsal GSH hem de AsA, GSH biyosentezinin inhibisyonu nedeniyle hücre bölünmesinin durması tersine döndüğünden, AsA / DHA ve GSH / GSSG (glutasyon disülfid) çiftlerinin redoks durumu, önemli düzenleyici proteinlerinin bulunduğu tiollerinin modüle edilmesinden sorumlu olabilir ve oksidatif stres koşullarında hasar gören DNA'nın replikasyonu önleyebilir (Davey *et al.* 2000).

Oksalat; bazı bitki türlerinde ağır metal toleransına sahipken, AsA da bitkilerde oksalat öncüsüdür. Oksalat biyosentezinin, AsA biyosentezi nedeniyle artabileceği ve Al toksisite toleransına katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (Chen *et al.* 2014).

AsA dışında güçlü antioksidan özelliklere sahip olan metallotiyoninlerde (MT), ağır metallerin detoksifikasyonu ve metal homeostazı gibi önemli görevleri olup, hücre içi serbest radikallerin yok edilmesinde rol oynarlar (Kisa *et al.* 2017) (Şekil 1.3).

OsMT2b proteininin, O_2^- ve $OH^\bullet$ radikal temizleme faaliyetlerine sahip olduğu görülmüştür (Wong *et al.* 2004). *OsMT2c* geninin, Cu ve H_2O_2 uygulamaları ile up-regüle olduğu belirlenmiştir. Aşırı Cu, çeltikte H_2O_2 'nin hızlı ve devamlı bir şekilde üretilmesini ve serbest bırakılmasını sağlamıştır ve dışsal AsA, H_2O_2 üretimi ve *OsMT2c*'nin ifadesini azaltmıştır (Liu *et al.* 2015).

Cr uygulamasının sonucu olarak ROT ve H_2O_2 üretiminin MT mRNA transkripsiyonunu tetikleyen sinyalleri uyarabilirler. Böylece MT'ler muhtemelen Cr iyonlarını bağlayıp, toksik olmayan hale getirerek bitkilerde Cr detoksifikasyonunda çok önemli bir role sahip olabilecekleri öne sürülmüştür (Panda and Choudhury 2005).



Şekil 1.3. MT'nin ağır metal detoksifikasyon mekanizması (Ruttkay-Nedecky *et al.* 2013)

Mitokondri ya da kloroplastlar gibi hücrel organellerde ROT üretimi, bilginin bu organellerden çekirdeğe iletilmesi gerektiğini belirten nükleer transkriptomun değişmesine neden olur. Üç temel etki modu, ROT'un gen ifadesini nasıl etkilediğini gösterir. ROT sensörleri, sonuç olarak gen ifadesine etki eden sinyalleme yollarını uyarmak üzere harekete geçirilebilir. Alternatif olarak, sinyal yollarının bileşenleri doğrudan ROT ile oksitlenebilir. Son olarak ROT, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini değiştirerek gen ifadesini değiştirebilir (Apel and Hirt 2004).

Transkripsiyon faktörleri (TF), çevresel uyarılara bir sinyalleme yoluyla tepki verirler ve direkt fiziksel etkileşim ya da diğer proteinlerle kombinasyon halinde bir düzenleyici

ağı oluşturan genlerin üstündeki spesifik düzenleyici alanlara bağlanırlar. Bu düzenleyici süreçlerde, strese bağlı genlerin ifadeleri büyük ölçüde spesifik TF'ler tarafından yönetilmektedir. Bu TF'ler arasında, NAC, WRKY, C₂H₂ tipi çinko parmak, AP2 / EREBP ve MYB ailelerinin üyeleri, bitki stresindeki veya savunma yanıtlarındaki düzenleyici rolleri açısından iyi karakterize edilmiştir (Xia *et al.* 2010a).

NAC proteinleri, bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerinin en büyük ailelerinden birini oluşturur ve çok sayıda karasal bitkide bulunur (Olsen *et al.* 2005; Ricachenevsky *et al.* 2013). NAC domaini, NAM (No Apical Meristem=Apikal meristemi olmayan), ATAF1,2 (Arabidopsis transcription activation factor=Arabidopsis transkripsiyon aktivasyon faktörü) ve CUC2 (cup-shaped cotyledon=Küp-şekilli kotiledon) olarak adlandırılan üç genin isimlerinden türetilmiş bir kısaltmadır (Ernst *et al.* 2004). NAC transkripsiyon faktörü, oldukça korunmuş bir N-terminal NAC alanını ve değişken bir C-terminal transkripsiyon düzenleyici (TR) bölgesini barındırmaktadır. Korunmuş N-terminal NAC bölgesi, DNA bağlanması ve homodimerler veya heterodimerlerin oluşumundan sorumludur. Buna karşılık, C-terminal bölgesi çeşitli olup, bir transkripsiyonel aktivatör veya baskılayıcı olarak işlev görebilir (Zhang *et al.* 2015).

Son zamanlarda çok sayıda NAC domain proteinlerinin strese duyarlı olduğu, farklı stres sinyal yollarında önemli fonksiyonlara sahip oldukları belirlenmiştir (Cao *et al.* 2017). Ayrıca NAC'lar etilen ve oksin sinyali, büyüme, yaşlanma ya da çevresel streslere yanıt gibi çeşitli süreçlerde de görev almaktadırlar (Xia *et al.* 2010b). *Cucurbita moschata* (balkabağı)'da *CmNAC1*'in ifadesinin, kuraklık, tuz, absisik asit (ABA) ve H₂O₂ tarafından uyarıldığı ve *CmNAC1*'in promoterlerinde strese bağlı cis-elementlerinin bulunduğu ve bununda strese cevap veren bir NAC domain proteini olduğu gösterilmiştir (Cao *et al.* 2017). *Arabidopsis*'te *AtNAC2* geninin tuz stresine yanıtta etilen ve oksin sinyal yollarında gerekli olduğu bulunmuştur (He *et al.* 2005).

TaNAC4 geninin ifadesi, buğday köklerinde, yapraklardan ve saplardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Buğday yapraklarındaki *TaNAC4* transkripti patojen enfeksiyonu ile ayrıca dışsal uygulanan metil jasmonat, ABA ve etilen ile uyarılmıştır. Elde edilen

sonuçlar, *TaNAC4* geninin, buğdayda biyotik ve abiyotik streslere karşı cevapta rol oynayan bir transkripsiyonel aktivatör olarak işlevsel rolünün olduğunu göstermektedir (Xia *et al.* 2010a). Diğer taraftan *Brassica napus*'ta *BnNAC14* geninin; yaralanma, ağır metal, soğuk şok ve dehidrasyon da dahil olmak üzere çeşitli biyotik ve abiyotik streslere yanıt olarak farklı şekilde ifadesinin değiştiği bulunmuştur (Hegedus *et al.* 2003).

NAC proteinleri ile ilgili çalışmalar esas olarak *Arabidopsis* ve çeltik gibi model bitkilerde yapılmıştır. Buğdayın sadece birkaç NAC protein kodlayan geni bulunduğu ve bu genin bitki gelişimine ve abiyotik strese katıldığı belirlenmiştir. Buğdayda *Puccinia striiformis* patojenine karşı *TaNAC8* geni savunma yanıtında pozitif bir regülatör olarak görev aldığı tespit edilmiştir (Xia *et al.* 2010b).

Arabidopsis'de, strese yanıt veren üç NAC geninin (*ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072*) kuraklık, yüksek tuzluluk ve ABA ile indüklendiği ve bu genlerin aşırı sentezlenmesinin, transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin kuraklığa dayanıklılığını artırdığı gözlenmiştir. Diğer taraftan çeltikte, *OsNAC6*'nın ifadesinin sadece abiyotik stresle değil aynı zamanda biyotik stresle de uyarıldığı ve *OsNAC6*'yı aşırı ifade eden transgenik çeltik bitkilerinin dehidrasyona ve yüksek tuzluluğa tolerans gösterdiği belirlenmiştir (Wang *et al.* 2014).

Bazı bitkiler, ağır metallerin varlığını yansıtabilir, engelleyebilir ve biriktirebilirler. Bu nedenle de topraktan toksik metalleri kaldırmak için kullanılabilirler. Bu yüzden ağır metalle kontamine olmuş topraklarda yetişen bitkiler geliştirdikleri stratejilere göre 3 gruba ayrılmıştır:

1) Metale toleranslı bitkiler:

Toprakta bulunan metal konsantrasyonu yüksek olmasına rağmen, metallerin hücre içine alınması ve köklerden sürgünlere taşınımı sınırlıdır. Bunu da bitki; zar

geçirgenliğini ve hücre duvarlarının metal bağlama kapasitesini değiştirerek ya da daha fazla şelatlayıcı madde üreterek yapabilir.

2) Metal indikatör bitkiler:

Dokularında aktif olarak metali biriktiren ve genellikle topraktaki metal seviyesini yansıtan bitki türleridir. Hücre içi metal bağlayıcı bileşikler üreterek metallerin mevcut konsantrasyon seviyesine tolerans gösterirler veya metallere hassas olmayan kısımlarında depolayarak metallerin hücre içindeki ayrılma düzenini değiştirirler.

3) Metal akümülatör bitkiler:

Topraktan çok daha yüksek seviyelere kadar metalleri kendi kısımlarında toplayabilirler. Hiperakümülatörler olarak isimlendirilen bu bitkiler, bitki sağlığını olumsuz yönde etkileyen kirletici maddeleri çok yüksek miktarda kök, gövde veya yapraklarında absorbe edebilirler (Ghosh and Singh 2005).

Hiperakümülatör bitkiler, fitoremediasyon yöntemiyle bitkilerin kök alımı yoluyla topraktan metallerin uzaklaştırılması kapasitesini kullanarak topraktaki ağır metal kontaminasyonunu azaltmayı sağlamaktadır. Hasat edilebilir bitki dokularındaki eser kirleticilerin artan birikimi, bu yöntemin pratik olması için bir ön şarttır. Bu nedenle, kirli topraklarda rehabilitasyon için ideal bir bitki seçimi, bitki parçalarında ağır metali tolere edebilen ve biriktirebilen daha hızlı ve daha yüksek biyokütle üreten bitkiler üzerine düşünülmelidir (Bennett *et al.* 2013).

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) de kimyasal, enerji ve endüstriyel amaçlar için yararlı bir şekilde kullanılan bitkisel yağ ve biyokütle için önemli olan inorganik ve organik kirleticilerin temizlenmesi için fitoteknolojilere yönelik çevresel ürün olarak önemli bir bitki türü olarak kabul edilmektedir (Rivelli *et al.* 2012). Bu bitkinin fito-ekstraksiyon katsayısı diğer pek çok bitki türüne kıyasla en yüksek seviyededir (Bahadur *et al.* 2017). Ayçiçeğinin, çok geniş bir yelpazede ağır metalle kirli alanlarda (Cr, Ni, Pb ve Cd) son

derece toleranslı olduğu kanıtlanmıştır. Fitotoksik etkiler üzerine yapılan alışmalar, Cr kirliliğinin ciddiyyetini ve ayıeği gibi hiperakümülatör türleri kullanarak kirli ortamdan toksik Cr'nin güvenli bir şekilde uzaklaştırılmasına ihtiyaç vardır (Mohanty and Patra 2016). Ayıeği, Pb ve Cu'nun fito-ekstraksiyonunu gerekleştirebilen en iyi bitki türlerinden biridir (Bennett *et al.* 2013). Yine *Tithonia diversifolia* (meksika ayıeği) ile *Helianthus annuus* L. bitkilerinin Pb ve Zn ağır metallerine karşı güçlü birikim potansiyellerine sahip oldukları yapılan alışmalarla belirlenmiştir (Adesodun *et al.* 2010). Dolayısıyla bu araştırmada; ayıeğinde Cr stresinde MT ve NAC transkripsiyon faktör genlerinin ifade seviyeleri belirlenmiş; ayrıca bir mikro besin elementi olan Cu ile AsA'nın bu genlerin ifade seviyelerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ağır metal kirliliği önemli bir çevresel sorundur. İnsan sağlığı ve tarım üzerine olumsuz bir etkisi vardır. Bundan dolayı özellikle bitkiler, ağır metallerin gıda zincirine girmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Benakova *et al.* 2017). Dolayısıyla bu çevresel stresin meydana getirdiği kontaminasyonu yok etmek için bilim insanları çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bu stratejiler arasında bitki iyileştirme, bitkilerin doğal yeteneğini kullanarak kirleticileri alıp toplama veya dönüştürme, alternatif bir çevre koruma teknolojisi olabilir. Bununla beraber kontamine olmuş alanlardaki bitkilerin düzgün gelişimi için, kirleticilerin toksik etkilerine karşı uygun koruyucu yöntemlerin gerekliliği bilinmektedir (Jutsz and Gnida 2015). Tüm bu unsurlar göz önüne alındığında ağır metali bünyesinde bulundurabilen bitki türlerinin seçilmesi en uygun ve etkili bir yöntem gibi görünmektedir. Bu yöntemleri destekleyen birçok çalışma yapılmıştır.

Stoikou *et al.* (2017) ayçiçeğinde Cr ve Ni alınımı ile ilgili yaptığı araştırmada Cr ve Ni seviyelerinde önemli artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle ayçiçeği yetiştiriciliği ağır metalli bölgelerin biyoremediasyonunda bir çözüm olabileceği savunulmuştur. Diğer bir çalışmada ise; 400 mg/kg kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) ve çinko nitrat ($Zn(NO_3)_2$) bulunan toprakta yetiştirilen *Tithonia diversifolia* (meksika ayçiçeği) ve *Helianthus annuus* L. bitkilerinin ağır metal birikim potansiyellerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Adesodun *et al.* 2010).

Bitki hücrelerinde ağır metal iyon toksisitesi ile oksidatif stres arasındaki ilişki değişik araştırmalarda belirlenmiştir. 0.5 mM Fe^{+2} , Cu^{+2} veya Cd^{+2} iyonlarını içeren çözeltilerde; ayçiçeği fidelerinde, klorofil ve GSH içeriğinde bir azalmanın; buna karşın lipid peroksidasyonunda bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada Fe^{+2} ve Cd^{+2} iyonlarının SOD aktivitesinde bir azalışa; Cu^{+2} iyonları seviyesinde de artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Gallego *et al.* 1996).

Panda ve Choudhury (2004) *Polytrichum commune*'de (yosun) nitrat redüktaz aktivitesinde Cr, Cu ve Zn'nin rolü ve oksidatif stres tepkileri üzerindeki etkisi araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda doz ve zamana bağlı olarak metal birikiminin arttığı, klorofil içeriğinin düştüğü ve MDA miktarının arttığı ve buna bağlı olarak da oksidatif hasarın oluştuğu tespit edilmiştir.

Cr, canlılar için gerekli olmayan, kanserojen ve toksik bir ağır metaldir ve bitkiler dahil tüm canlı gruplarında olumsuz etkiler göstermektedir. Ayçiçeği genotiplerinin Cr stresine karşı fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini değerlendirmek için yapılan bir araştırmada artan Cr (0, 5, 10, 200 mM) konsantrasyonlarına bağlı olarak kök ve sürgündeki Cr birikimi ROT üreterek, genel bitki büyümesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Farid *et al.* 2017).

Farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.1, 0.3 ve 0.5 mM) Cr uygulanan *Brassica juncea*'da büyüme parametreleri, metal alınımı ve oksidatif stres analizlerini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, 0.5 mM Cr konsantrasyonunda SOD, POD, APX, GR, DHAR ve lipid peroksidasyonunun maksimum aktivasyonu gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre bitkinin büyümesini inhibe eden Cr (VI) stresinin, birikimi ile doğrudan ilişkili olduğunu ve çeşitli stres belirteçlerinin aktivitelerinde modülasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Kanwar *et al.* 2015).

Benakova *et al.* (2017) *Brassica napus*'da Cd ve Zn kombinasyonun fizyolojik ve anatomik özelliklere olan etkilerini belirlemek için yapmış olduğu çalışmalarında, Cd'nin kök ve sürgün uzunluğu gibi olumsuz etkilerine karşı Zn'nin koruyucu etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Bitki MT'leri, ağır metal homeostazında işlevsel role sahip olduğu düşünülmekte ve çevre kirliliğini değerlendirmek için biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadırlar. Cu ve Pb'ye maruz kalan domateste kök ve yapraklarda *MT1* ve *MT2* gen ifadelerinin arttığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada Pb uygulamasında köklerde *MT3* geninin ifade olmadığı, fakat Pb ve Cu uygulamasının yaprak ve meyvelerde *MT3* geninin

ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Diğer bir *MT* geni olan *MT4* geninin ise meyvelerde ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak *MT* transkriptlerinin Cu ve Pb tarafından regüle edildiği ve ifade şekillerinin *MT* izoformlarına ve doku tiplerine göre değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir (Kisa *et al.* 2017).

Pb stresi uygulanan ayçiçeğinde *HaMT1* geninin ifadesi incelenmiş ve araştırma sonucunda bu genin Pb detoksifikasyonunda yer aldığı rapor edilmiştir (Wińska-Krysiak *et al.* 2015).

Medicago sativa'da *MsMT2a* ve *MsMT2b* geninin Cd ağır metale karşı etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, *MsMT2a*'nın yoncanın tüm gelişim evrelerinde ifade edilirken, *MsMT2b*'nin Cd ile uyarılabileceği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2011).

Kandelia candel'de (mangrov) Zn, Cu, Pb, Hg ve Cd ağır metal streslerinin, *MT* geninin ifade seviyesinde değişiklik meydana getirdiği tespit edilmiştir (Zhang *et al.* 2012).

Ziziphus jujuba'da *ZjMT* geni izole edilerek *Escherichia coli*'ye aktarılmıştır. *ZjMT* geni ihtiva eden transgenik *Escherichia coli* hücreleri, kontrol hücrelerine kıyasla daha fazla metal toleransı ve daha yüksek metal iyonu birikimi sergilediği görülmüştür. Bu çalışma sonucunda *ZjMT*'nin metal iyonlarının detoksifikasyonuna katkıda bulunduğunu ve metal streslerine karşı tolerans sağladığı belirtilmiştir (Li *et al.* 2016).

Aegiceras corniculatum'da *MT2* geninin Cd ve Pb ağır metal streslerine karşı ifade seviyelerinin arttığı belirlenmiş ve bu genin Pb ve Cd savunma mekanizmalarından biri olarak işlev görebileceği rapor edilmiştir (Li *et al.* 2013).

Teixeira *et al.* (2013) *Solanum nigrum* L. bitkisinde Cr (III) ve Cr (VI) ağır metal stresinin, büyüme parametreleri, fotosentetik pigmentler, serbest prolin ve lipid peroksidasyonu ile hücre zarı hasarı derecesini değerlendirmek ve bu bitkinin ağır metal

birikimcisi olup olmadığını ve iyileştirme amaçları için kullanılabileceğini araştırmak için yürüttükleri çalışmada, Cr (III)'e ve Cr (VI)'ya maruz kalan bitkilerin prolin içeriğinde artış gözlenmiştir ve MDA verilerine göre sürgünlerde köklere göre daha yüksek lipid peroksidasyonun olduğu belirlenmiştir. Her iki uygulamada da ağır metal birikiminin köklerde sürgünlere oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada *MT2*'nin gen ifadesinin her iki Cr uygulamasında da arttığı tespit edilmiştir.

Goupil *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, domates bitkilerinin arsenik (As) ya da Cr (VI)'ya karşı moleküler tepkileri, stresle ilişkili Hsp (ısı şoku proteinleri), *MT* ve *GR* genlerinin ifade seviyeleri kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Cr (VI) uygulamasında *MT-2* ve *GR-1* genlerinin ifade seviyeleri, As (V) uygulamasına kıyasla daha düşük olmuştur. Bu sonuçlara göre, As (V)'in domateste *MT-2*'ye bağlı tolerans mekanizmalarını etkin bir şekilde uyardığı; ancak Cr (VI) stresinde bu durumun geçerli olmadığı tespit edilmiştir.

Arabidopsis thaliana'de *MT1* ve *MT2a* ve *MT2b* genlerinin ağır metallere etkisinin bitkinin organına bağlı olarak değiştiği ifade edilmiştir (Zhou and Goldsbrough 1995).

Ipomoea batatas (tatlı patatest) *ibMT1*, *ibMT2*, *ibMT3* genlerinin Ca, Zn, Cu, Fe, Cd, Mn, Mg ve Pb ağır metal streslerinde ifade seviyelerinin organa bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (Kim *et al.* 2014).

Silene vulgaris'te Cu stresinde *MT3* gen ifadesinin dokuya spesifik olarak değiştiği ve Cu toleransında görev aldığı tespit edilmiştir (Nevrtalova *et al.* 2014) .

Mekawy *et al.* (2017) çeltikte *OsMT-3a* geninin ağır metal ve tuzluluk stresine karşı etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, *OsMT-3a* geninin tuzluluk stresinden dolayı oluşan oksidatif strese karşı toleransı artırarak, ROT'ların uzaklaştırılmasını sağladığını ve bu genin tuzluluk toleransından sorumlu anahtar genlerden biri olabileceğini rapor etmişlerdir.

Baklagil ve tahıl bitkilerinde sulama suyu ile uygulanan Cd'nin emilimi ve birikimi üzerine Cu ve Zn'nin etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, yüksek seviyelerde Cd'nin bitki biyokütlesini azalttığı, tek veya kombine olarak Cu ve Zn uygulamasının ise bitki biyokütlesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmanın sonucunda Cd'ye karşı Cu ve Zn'nin antagonistik etki göstererek Cd'nin toksik etkisini baskıladıkları belirtilmiştir (Murtaza *et al.* 2017).

Kovacik *et al.* (2017) *Coccomyxa subellipsoidea*'da metal toksisitesi üzerine dış kaynaklı AsA'nın (100 μ M) etkisini araştırmışlardır. Hg'nin potasyum, çözünür protein, içsel AsA, protein olmayan tioller ve nitrik oksit sinyalini azalttığı; buna karşın, ROT sinyalini, CAT ve SOD aktivitelerini arttırdığını tespit etmişlerdir. Yine aynı araştırmada Pb uygulamasının ROT sinyal birikimini arttırdığı, protein olmayan tiollerin miktarını ise azaltıldığı belirlenmiştir. Dışsal AsA uygulamasının, özellikle Hg kaynaklı hasarı azalttığı ve nitrik oksit sinyalinde bir artışa neden olduğu görülmüştür. Araştırma sonucunda AsA'nın Hg ve Pb kaynaklı hasarı azalttığı bildirilmiştir.

Chen *et al.* (2014) AsA'nın Al toksisitesine ve yüksek ışığa bağlı oksidatif stres toleransındaki rolünü araştırmak için yaptıkları araştırmalarında, Al uygulamasına bağlı olarak bitki taze ağırlıklarının önemli ölçüde azaldığını ve yine kontrol uygulaması ile kıyaslandığında H_2O_2 ve MDA seviyelerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte Maya *D-arabinono-1,4-lakton oksidaz (ALO)* geninin transgenik tütün bitkilerinde aşırı ifadesinin, yapraklarda AsA ve oksalat sentezini hızlandığı rapor edilmiştir. Bu araştırma sonucunda hem ALO geninin bitkilerde AsA sentezini arttırabilmeleri için etkili bir gen olduğu gözlenmiştir, hemde AsA'nın, bir antioksidan olarak Al metalinin başlattığı oksidatif hasarları yok ederek Al toleransını arttırdığı ifade edilmiştir (Chen *et al.* 2014).

Arpa'da Cd'ye (0.1, 1, 5, 50 μ mol/L) karşı, Zn (300 μ mol/L) ve dışsal AsA (250 mg/L) uygulamalarının biyokütle ve fizyolojik özellikler üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Araştırmada, Cd stresinin olduğu ortama Zn veya AsA ilavesinin belirgin bir şekilde MDA miktarında bir azalışa ve biyokütle miktarında ise bir artışa neden olduğu

belirlenmiştir. Bununla birlikte, dışsal AsA uygulamasının, Cd'nin kökten sürgüne translokasyonunu artırdığı ve besin olarak tüketilmeyen ürünler için uygun olduğu bildirilmiştir (Wu and Zhang 2002).

NAC'lar, biyotik ve abiyotik stres cevaplarının yanı sıra, bitki büyüme ve gelişme regülasyonunda önemli rol oynayan özel bitki transkripsiyon faktörlerinden biridir. Tang *et al.* (2017) yaptığı bir çalışmada strese duyarlı *AhNAC4* geninin kuraklık, tuzluluk ve ABA uygulamasıyla up-regüle olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda *AhNAC4*'ün aşırı ifadesi, transgenik tütün bitkilerinin kuraklığa karşı toleransını artırdığı gözlenmiştir. Geliştirilmiş kuraklık toleransı, stomaların kapanmasıyla ve daha yüksek su kullanım verimliliği ile ilişkilidir. Araştırma sonucunda, *AhNAC4*'ün kuraklık stresinde önemli bir düzenleyici olarak görev aldığı bildirilmiştir.

Soğuk stresine hassas olmasının yanı sıra, kuraklık ve tuz streslerine karşı daha yüksek toleransa sahip olan karpuzda, *CINAC* transkripsiyon faktör ailesinin bu abiyotik streslere tepkisi araştırılmıştır. NAC'lar su ve metabolitlerin meyve kısmına taşınımında rol oynayabileceği gibi kuraklık veya tuz koşulları altında su durumunun korunmasında da görev aldığı bildirilmiştir ve abiyotik streslere karşı toleransta hormon (ABA ve JA) yollarlarında görev aldığı tespit edilmiştir (Lv *et al.* 2016).

Balkabağı abiyotik strese karşı oldukça dirençli bir türdür, ancak bu bitkideki stresle ilişkili NAC genlerinin biyolojik işlevleri büyük oranda bilinmemektedir. Bu nedenle yapılan araştırmalar sonucunda; *CmNAC1* genlerinin tuzluluk, soğuk, dehidrasyon, H₂O₂ streslerine karşı yüksek tolerans gösterdiği ve toleranslarda ABA stres yolunun önemli bir işlevi olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *CmNAC1*'in kabaktaki yeni stres tepki transkripsiyon faktörü olarak fonksiyonu *Arabidopsis*'te de değerlendirilmiştir. *CmNAC1*, kök gelişimini destekleme, tuz, soğuk ve kuraklık stresine uyum sağlamada olumlu bir rol oynadığı bildirilmiştir (Cao *et al.* 2017).

Buğdayda *TaNAC47* geninin fonksiyonunu anlayabilmek için yapılan bir çalışmada, genin farklı dokularda farklı şekilde ifade edildiği ve ifadesinin tuz, kuraklık, don ve dışsal ABA ile uyarıldığı ve bunun sonucunda bu streslere karşı *TaNAC47*'nin aşırı ifadesi ile tolerans kazandığı rapor edilmiştir. *TaNAC47*'nin aşırı ifadesinin down-regüle olarak düzenlenen genlerin ifadesini aktive ederek transgenik bitkilerin uygun olmayan ortamlarda toleransını artıracak çeşitli fizyolojik olayları değiştirdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, *TaNAC47*'nin çeşitli abiyotik streslere karşı bitki adaptasyonunu düzenlediğini tespit edilmiştir (Zhang *et al.* 2015).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen ve hiperakümülatör bir bitki olduğu bilinen *Helianthus annuus* L.'un Şems çeşidi kullanılmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve modelleri

Kullanılan cihazlar	Modelleri
Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Derin Dondurucu	Nuarie, U.S.A. , -86 Ultralow Freezer
Saf Su Cihazı	GFL 2004, GERMANY
Otoklav	Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
pH Metre	InoLab pH730 wtw Series, GERMANY
Magnetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A, KOREA
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
Hassas Terazî	Mettler Toledo AL204, CHINA
Steril Kabin	Esco AC2-4E1, SINGAPORE
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00
Santrifüj	Hettich, GERMANY, EBA-20
qRT-PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q, GERMANY
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, GERMANY

3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Çalışma boyunca kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

3.1.3.a. Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler

%10'luk NaOCl: Ticari ABC[®] marka çamaşır suyundan 10 ml alınarak hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%70'lik Etil Alkol: %100'lük etil alkolden 70 ml alınmış ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.b. Ağır metal çözeltilerinin hazırlanışı

1 mM $Kr_2Cr_2O_7$ (Potasyum di kromat (VI)): 0,294 gr $Kr_2Cr_2O_7$ tartılıp, 1Lt suda çözünmüştür.

0,25 mM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Bakır (II) sülfat pentahidrat): 0,062 gr $CuSO_4$ tartılıp, 1Lt suda çözünmüştür.

3.1.3.c. Askorbik asidin hazırlanışı

200 mg/L AsA hazırlamak için 200 mg AsA tartılmış, 800 ml distile su içerisinde iyice çözdürülmüş ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.d. Besin çözeltisinin hazırlanışı

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

3.1.3.e. Primerlerin hazırlanması

Helianthus annuus L. genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ile ilgili veri tabanlarından yararlanılarak NAC transkripsiyon faktör genleri için primer tasarımı yapılmıştır. NAC transkripsiyon faktör ailesinin protein CDS dizileri İTAK - Bitki Transkripsiyon Faktör ve Protein Kinaz Belirleme ve Sınıflandırma (<http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/>) veri tabanından elde edilmiştir. Elde edilen protein dizilerinin NAC domaini içerip içermediğini kontrol etmek için HMMER ve Pfam veri tabanları kullanılmıştır. Non-redundant diziler decrease redundancy tool (https://web.expasy.org/decrease_redundancy/) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırma işleminden sonra Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) kullanılarak domainler doğrulanmıştır. Elde edilen ve doğrulanan RNA dizilerinden Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programı ile primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primer dizileri NCBI-Blast algoritması kullanılarak gene özel olup olmadığı kontrol edilmiştir. *MT* genleri için Tomas *et al.* (2015)'in kullanmış olduğu primerler kullanılmıştır.

Liyofilize olarak gelen primerler, firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu hazırlanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda 1 μ M çalışma konsantrasyonları olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan genlerin ifade düzeylerini incelemek için hazırlanan primerlerin baz dizilimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Ayrıca çalışmada referans gen olarak *β -Aktin* seçilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin baz dizilimi

Primerin Adı	İleri Primer (Forward) 5'→3'	Geri Primer (Reverse) 5'→3'
<i>HaMT2-1</i>	TGCAGCTGCTAAGGA TCAAG	AAACATAATTCAAACACTGCTG CT
<i>HaMT4</i>	ACATCATTAGAAGCG ATGAGGTC	TTCCCCTATTGAGGAACTGAAA
<i>Han000682</i>	AGTGGAGACTTAGAG TGGTACT	GATTGTTGCAACTGTTCTTCCC
<i>Han002027</i>	TGTGTCGGGCTATTG GAAGG	TCATGCATGATCCAATCGGTC
<i>Han002724</i>	ATTGGGTTTTGTGTC GAACCT	GGTTTTGCATCATTGGGTGG
<i>β-AKTİN</i>	AGGGCGGTCTTTCCA AGTAT	ACATACATGGCGGGAACATT

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohum sterilizasyonu

Tohumlar ekim yapılmadan önce aşağıdaki işlemlerden geçirilmiştir.

*Çalışmada kullanılan *Helianthus annuus* L. Şems çeşidine ait tohumlar ilk olarak musluk suyunda yıkanmıştır.

*Daha sonra %70'lik etanolde 1 dakika karıştırılmış ve devamında steril suyla iyice çalkalanmıştır.

*Sonrasında %10'luk NaOCl çözeltisiyle 10 dakika muamele edilmiştir.

*Son olarak tohumlar 4 kez steril suyla iyice çalkalanmış ve steril filtre kağıdında kurutulmuştur.

3.2.2. Uygulanacak Cu ve Cr konsantrasyonunun belirlenmesi

Araştırmada, Cr için toksik olan doz; Cu için toksik olmayan dozu belirlemek için literatür araştırmalarına göre Cr için 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM $Kr_2Cr_2O_7$ çözeltisi; Cu için ise 0,25 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM $CuSO_4$ çözeltisi çimlenme ortamında kullanılmıştır. Steril edilmiş 25 adet ayçiçeği tohumu, içinde iki filtre kağıdı bulunan steril petri kaplarına yerleştirilmiştir. Kontrol gruplarına 10 ml distile su, deney gruplarına ise; ayrı ayrı 10 ml $CuSO_4$ ve 10 ml $Kr_2Cr_2O_7$ çözeltileri eklenmiştir. Yapılan çimlenme testi sonucunda çalışmada kullanılacak Cr stresi için 1mM $Kr_2Cr_2O_7$; Cu uygulaması için ise 0,25 mM $CuSO_4$ uygulanmasına karar verilmiştir.

3.2.3. Bitkilerin yetiştirilmesi

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

Aşağıda belirtilen her uygulama için 1 plastik kap kullanılmış ve her saksı 1 tekerrür olarak kabul edilmiştir. Steril edilen tohumlar nemlendirilmiş çimlendirme kağıdı içeren petri kutularına bırakılarak homojen bir çimlenme sağlamak için $+4^{\circ}C$ 'de 48 saat süreyle bekletilmiştir. Bu tohumlardan $\frac{1}{2}$ dozda Hoogland and Arnon (1938) solüsyonu içeren (pH=5,5-5,7) plastik kaplar üzerindeki her saksıya 10 tane olacak şekilde bırakılmış ve $20\pm 1^{\circ}C$ 'de 16 saat ışık (Floresans lambası- $300 \text{ lmol/ m}^2\text{s}^{-1}$) 8 saat karanlık şartlarda 14 gün süreyle büyütülmüştür. Çimlenen tohumlardan gelişen fidelerden her saksıda 5 tane kalacak şekilde homojen büyüme gösteren fideler bırakılarak bu fidelere Cr (1mM $Kr_2Cr_2O_7$), Cu (0,25mM $CuSO_4.5H_2O$) ve AsA (200 mg/L) uygulaması yapılmıştır. AsA uygulaması yapraktan spreysel şekilde yapılmış, Cr ve Cu uygulaması için $Kr_2Cr_2O_7$ ve $CuSO_4.5H_2O$ çözeltileri bitki yetiştirme ortamı olan Hoagland and

Arnon (1938) solüsyonuna eklenmiştir. Bitkiler aynı kültür şartlarında 10 gün süreyle strese maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda bitki örnekleri alınarak -80°C’de çalışma yapılacağı güne kadar bekletilmiştir.

Çizelge 3.3. Uygulamaların listesi

Uygulama	Açıklama
1	1mM $Kr_2Cr_2O_7$ (Cr)
2	0,25mM $CuSO_4.5H_2O$ (Cu)
3	Askorbik asit (200 mg/L)(AsA)
4	Cr+Cu
5	Cr+ AsA
6	Cu+ ASA
7	Cr+Cu+ ASA
8	Kontrol

3.2.4. Toplam RNA izolasyonu

RNeasy Plant Mini Kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Aşamalar aşağıda verilmiştir.

*-80°C dolabından çıkarılan örnekler yeterince soğutulan steril havanlarda sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir ve 100 mg olacak şekilde ependorf tüplere aktarılmıştır.

*Her tüpe 450 µL RLC tamponu eklenmiştir. Dokular iyice parçalanana kadar vortex edilmiştir.

*Örnekler lila renkli kolona aktarılıp, 2 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

*Lila renkli kolonlar atılmıştır, alt kısımda pelet haricinde biriken kısım steril bir ependorf tüpe aktarılmıştır.

*225 µL etanol ilave edilerek DNA-RNA pelet oluşumu gözlenmiştir.

- *Pipetle in-out tekniği ile ependorf tüpündeki pembe kolona aktararak 15 saniye 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- *Alttaki t p içerisindeki sıvı kısıım uzaklaştırılarak t p tekrar kolona takılmıştır.
- *350  L RW1 tamponu eklenmiştir ve 15 saniye 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı kısıım uzaklaştırılmıştır ve pembe kolon, kit içerisindeki kapaksız tüplere koyulmuştur.
- *500  L RPE tamponu ilave edilerek 15 saniye 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir ve sıvı kısıım uzaklaştırılmıştır.
- *500  L RPE tamponu ilave edilerek 2 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- *Pembe kolonlar steril yeni tüplere alınmıştır.
- *1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- *Pembe kolonlar steril yeni tüplere aktarılmıştır.
- *40  L RNase free water kolonun tam ortasına ilave edilmiştir.
- *1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- *Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
- *Toplam hacim 80  L olmuştur.

3.2.5. cDNA sentezi

Elde edilen RNA’ların kantitasyonu Nanodrop spektrofotometresi ile A_{260}/A_{280} değeri ölçülmüştür. Toplam RNA’lar 100 ng/ l’ye ayarlanmıştır. Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

- *Steril tüplere hacimleri 0,1ng-5 g olacak şekilde toplam RNA konulmuştur.
- *Ardından 1  l oligo (dT)₁₈ primer eklenerek toplam hacim 12  l’ye tamamlanmıştır. Karışım çok kısa santrifüj edildikten sonra 65 C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- *S re dolunca örnekler buz üzerine yerleştirilmiştir. Her tüpe, 4  l 5X Reaksiyon Buffer, 1  l RiboLock RNase Inhibitor, 2  l 10 mM dNTP Mix ve 1  l RevertAid M-MuLV RT eklenmiş ve son hacim 20  l olmuştur.

* Örnekler çok kısa santrifüj edildikten sonra PCR termal cyler cihazı kullanılarak inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon koşulları aşağıda verilmiştir.

- 25°C → 5 dk
 - 42°C → 60 dk
 - 70°C → 5 dk
- } PCR basamakları

*Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR'da kullanılmak üzere 40 µl nükleaz free water eklenerek son hacim 60 µl'ye tamamlanarak 1:2 oranında seyreltilmiştir.

3.2.6. qRT-PCR ile gen ifade analizi

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

- Kullanılacak tüm solüsyonlar hafif bir şekilde vortekslenmiştir.
- Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. qRT-PCR için kullanılan malzemeler

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

- Karışım PCR tüplerine aktarılmış ve hafifçe santrifüjlenilerek Qiagen Rotor-Gene cihazına yerleştirilmiştir.



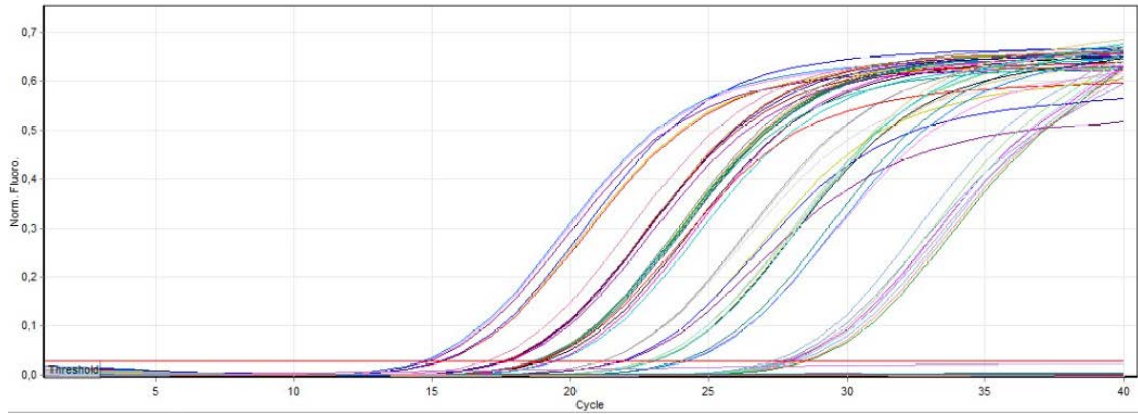
3.2.7. Verilerin analizi

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

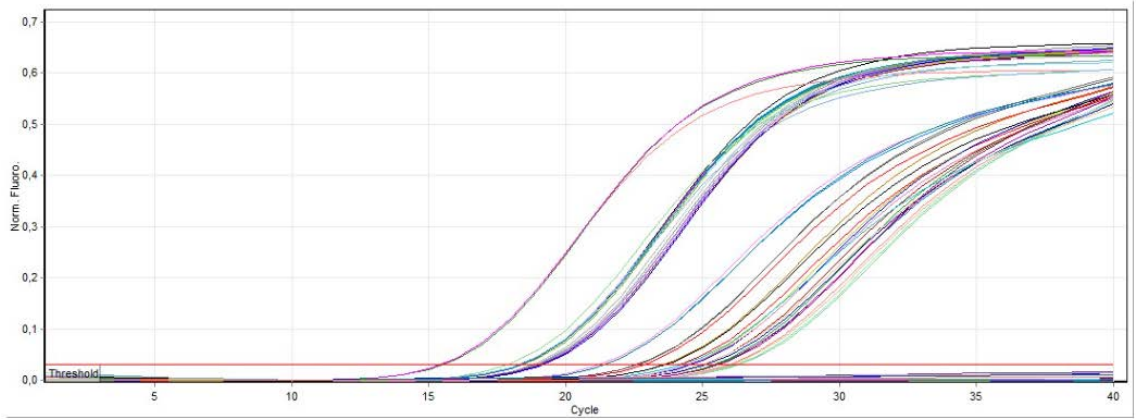
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Gen İfadelerinin Analizleri

Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) 1 mM Cr ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ağır metal stresine karşı; 0,25 mM Cu ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ve AsA (200 mg/L) uygulanmış bitkiler hasat edildikten sonra kök ve gövde kısımlarından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Nanodrop ölçümleri alındıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. *Han000682*, *Han002027*, *Han002724* NAC transkripsiyon faktör genlerine özgü primer dizaynı yapılarak, ağır metal detoksifikasyonunda rolü olduğu bilinen *HaMT2-1* ve *HaMT4* genlerine ait primerler (Tomas *et al.* 2015) kullanılarak qRT-PCR yapılmıştır. Elde edilen gen ifadelerinin kontrol edilebilmesi için housekeeping gen olarak β -Aktin geni kullanılmıştır. qRT-PCR amplifikasyonu sonucunda elde edilen SYBR-Green sinyal grafiği Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.



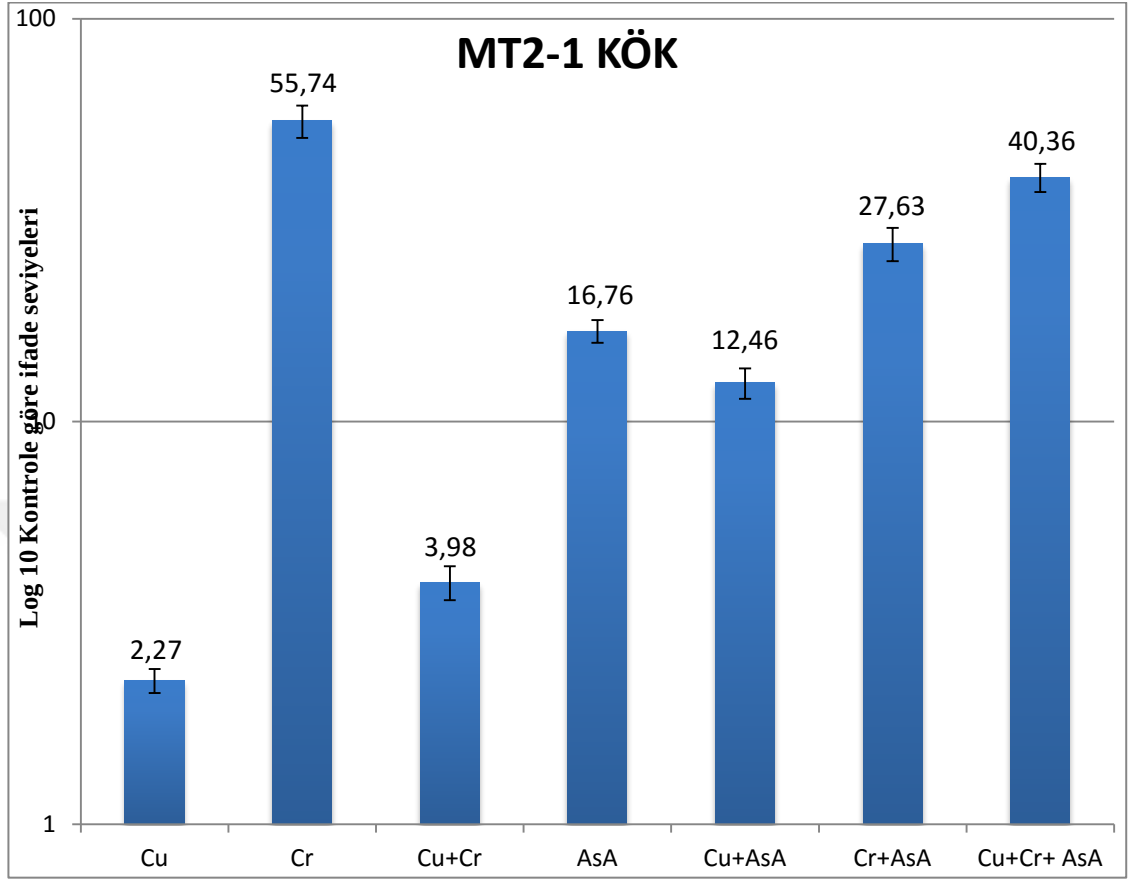
Şekil 4.1. Ayçiçeği köklerinde seçilen genlerin çalışma eğrileri



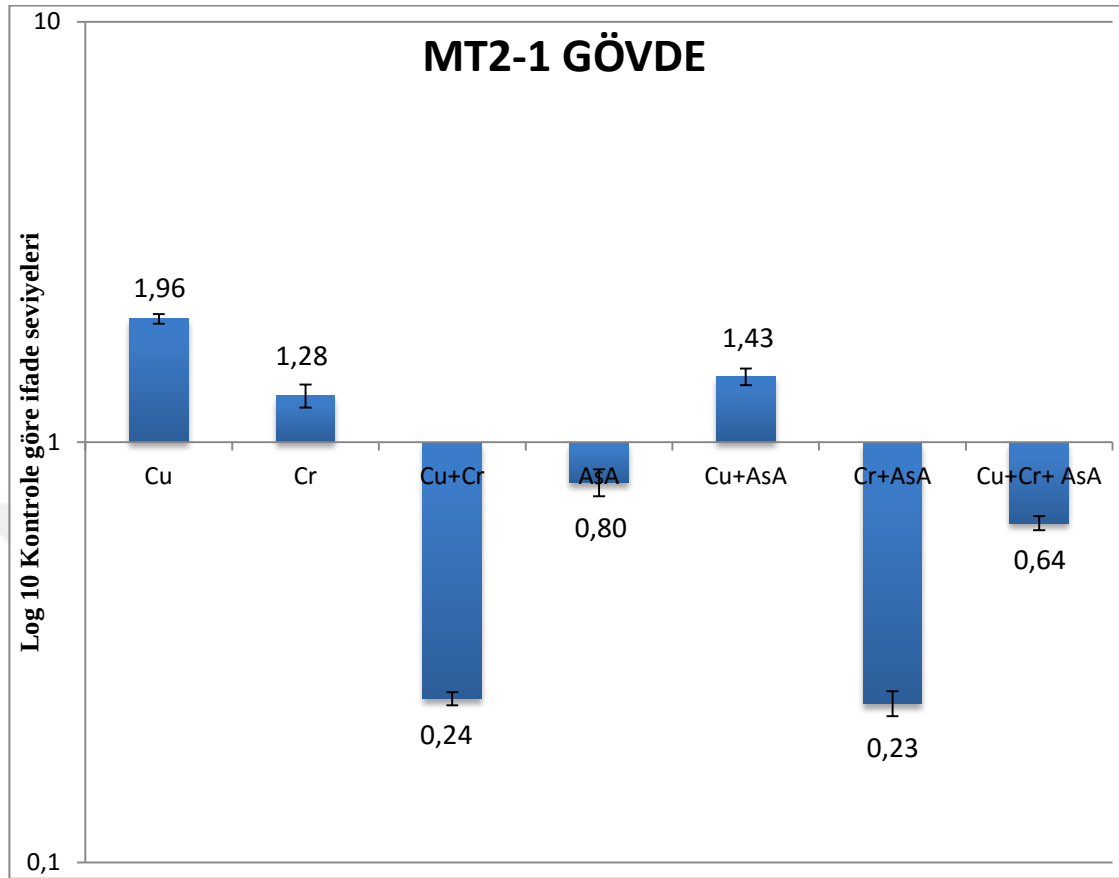
Şekil 4.2. Ayçiçeği gövdelerinde seçilen genlerin çalışma eğrileri

Cr ağır metal stresine karşı Cu ve AsA uygulamalarının etkisini belirleyebilmek için; MT gen ailesinin *MT2-1* ve *MT4* genleri çalışılmıştır. *MT2-1* gen ifadesinde yaptığı değişiklikler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Bitkinin kök kısmında elde edilen *MT2-1* gen ifade analizi sonuçlarına göre, bu genin tüm uygulamalarda up-regüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). En yüksek ifade Cr'de görülürken; en düşük ifade Cu'da gözlenmiştir.

Bitkinin gövde kısmında elde edilen gen ifade analizi sonuçlarına göre; *MT2-1* geninin Cu, Cr, Cu+AsA uygulamalarında up-regüle olduğu; Cu+Cr, AsA, Cr+AsA ve Cu+Cr+AsA uygulamalarında ise down-regüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4). En yüksek ifade seviyesi Cu'da görülürken; en düşük Cr+AsA uygulamasında belirlenmiştir.

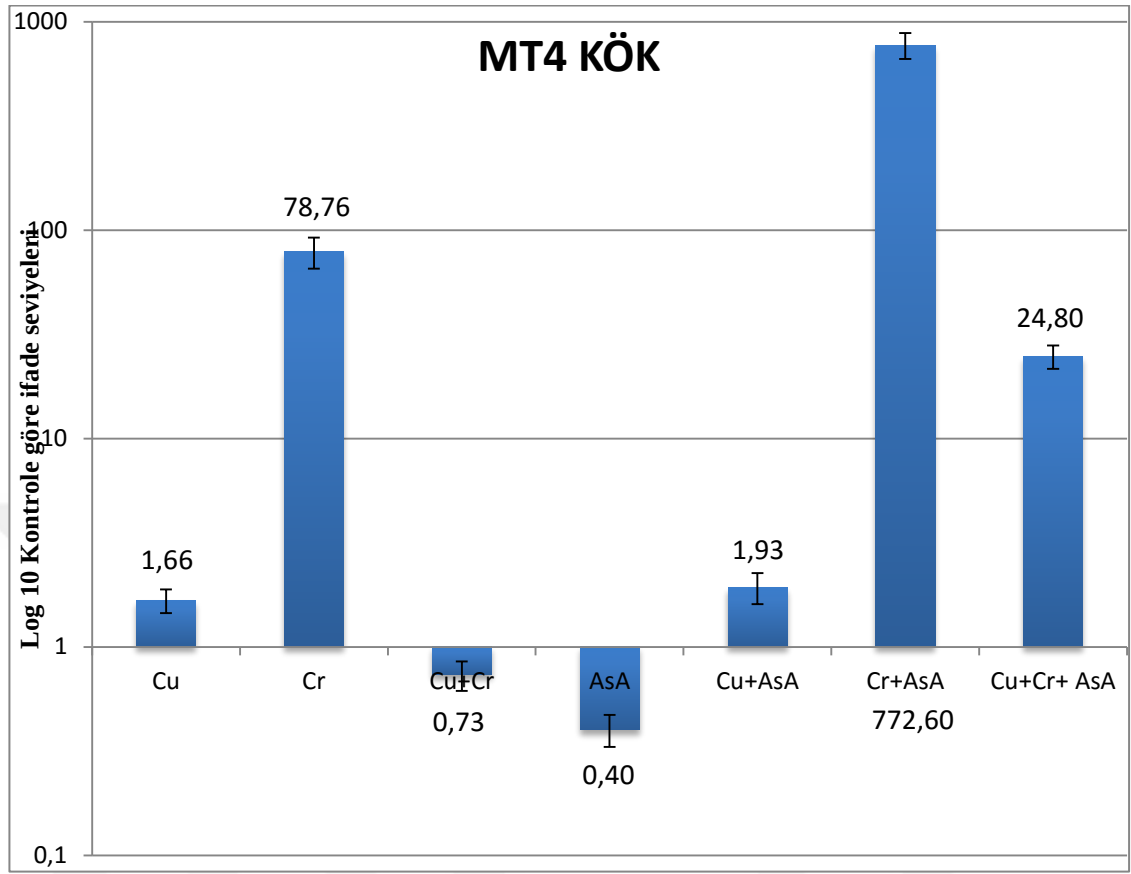


Şekil 4.3. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki *MT2-1* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

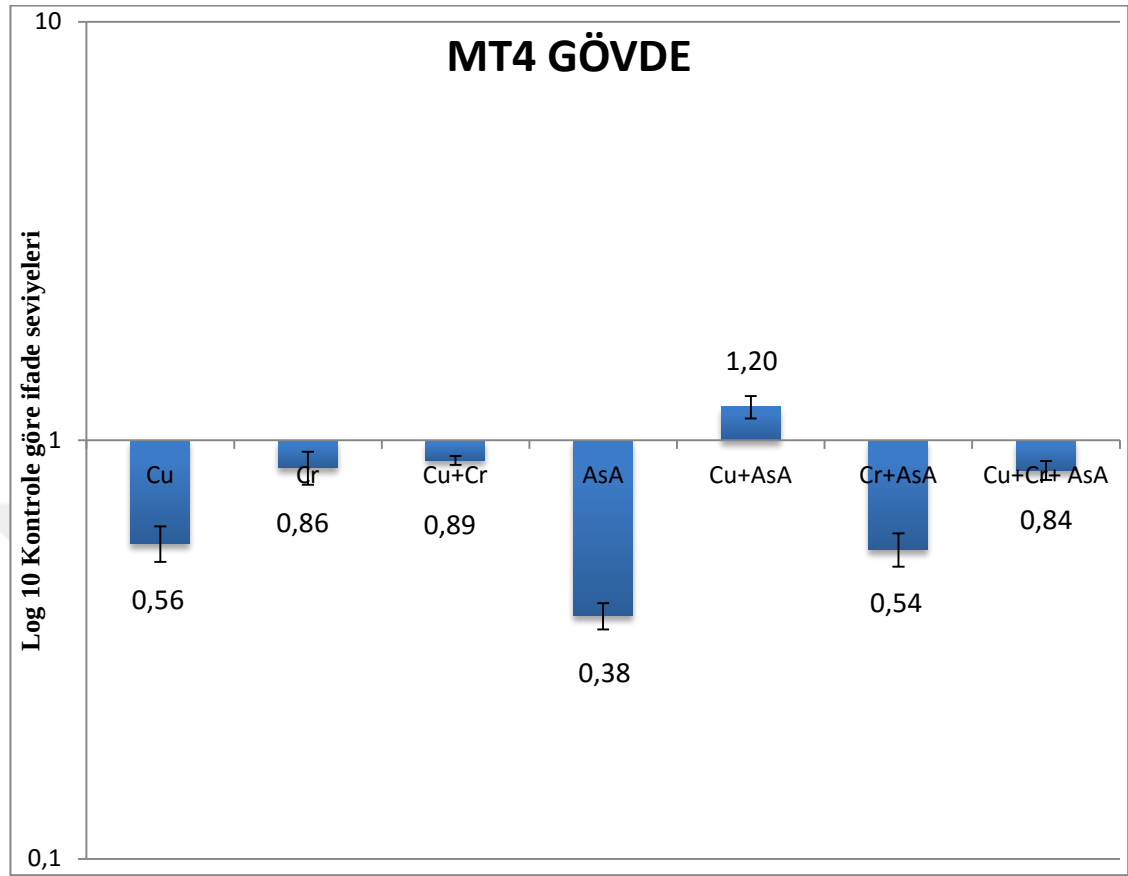


Şekil 4.4. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki *MT2-1* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Bitkinin kök ve gövde kısmında elde edilen *MT4* gen ifade analizi sonuçları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir. *MT4* geninin kökte Cu, Cr, Cu+AsA, Cr+AsA ve Cu+Cr+AsA uygulamalarında up-regüle olduğu; Cu+Cr ve AsA uygulamalarında ise down-regüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). En düşük gen ifade seviyesi AsA uygulamasında; en yüksek ise Cr+AsA uygulamasında gözlenmiştir. *MT4* geninin gövdede Cu+AsA hariç, diğer uygulamalarda down-regüle olduğu belirlenmiştir. En düşük gen ifade AsA uygulamasında görülürken, en yüksek ifade Cu+AsA uygulamasında tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

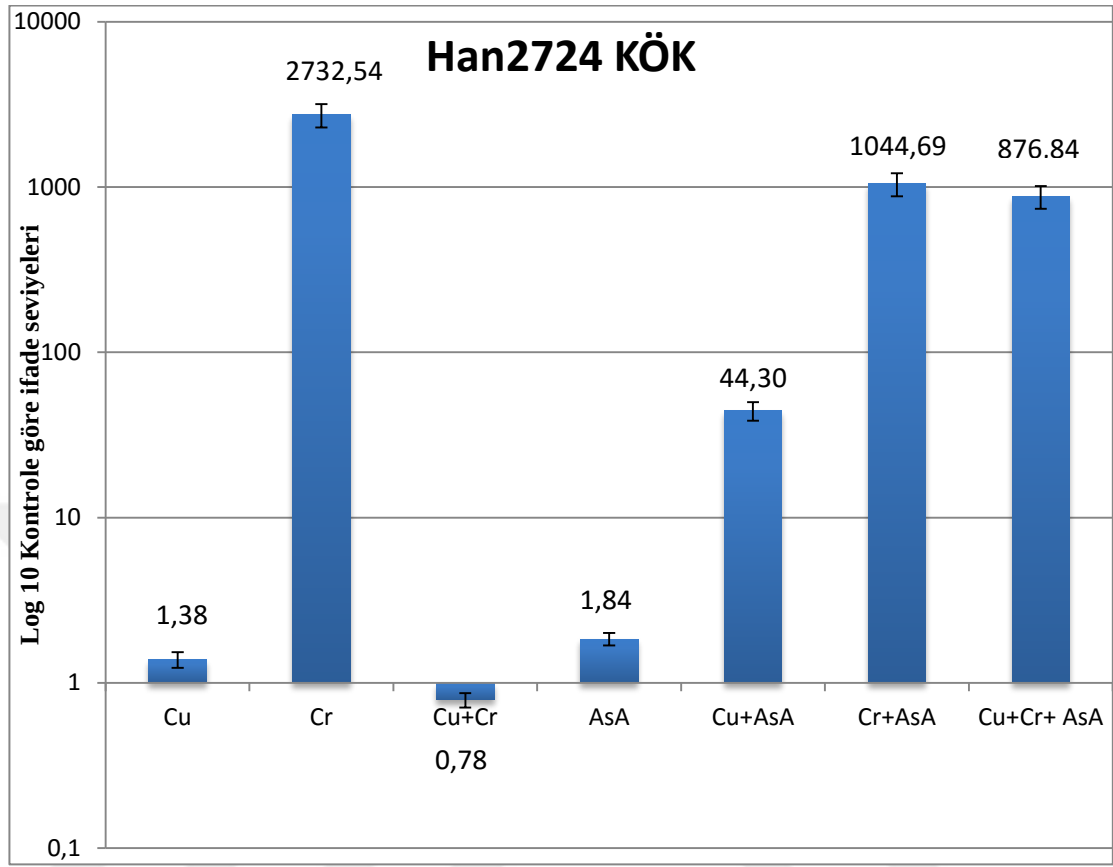


Şekil 4.5. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki *MT4* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

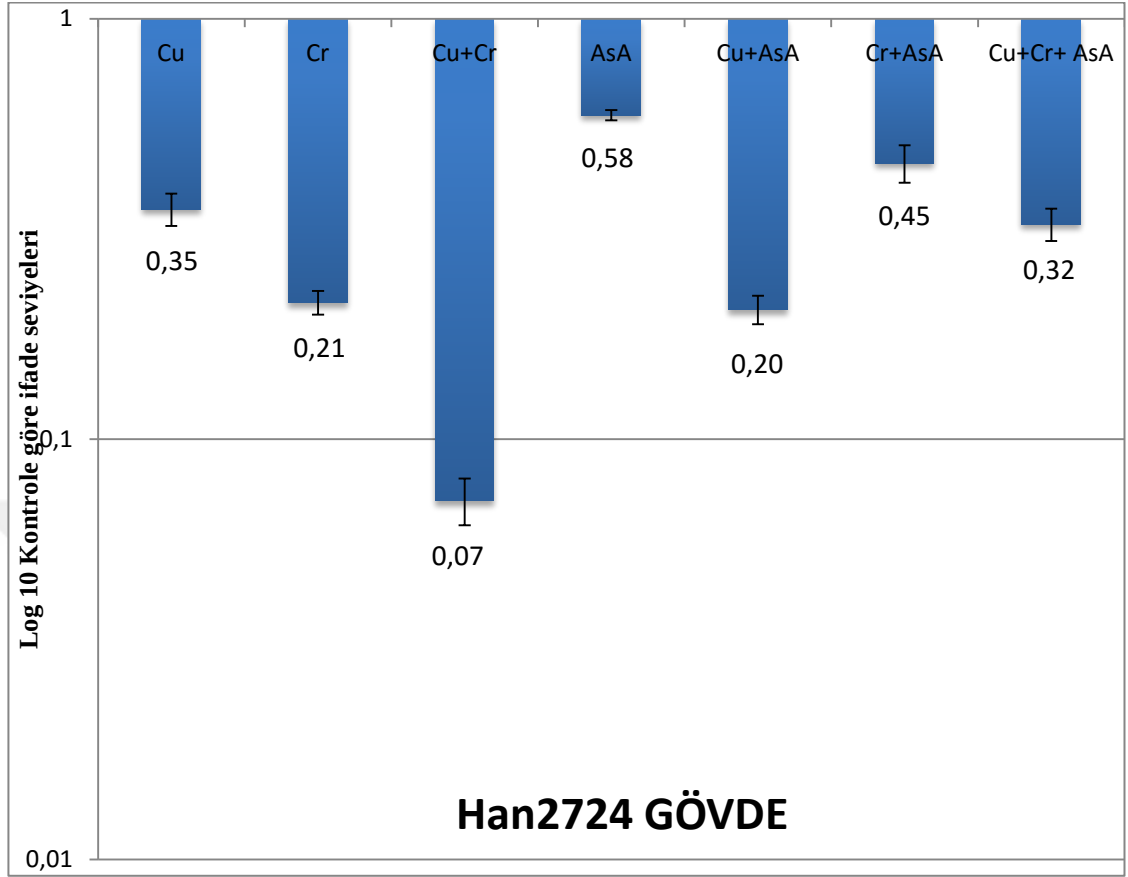


Şekil 4.6. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki *MT4* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Yine bu araştırmada, NAC transkripsiyon faktör ailelerinden *Han2724*, *Han682* ve *Han2027* genleri çalışılmıştır. *Han2724* geninin ifade analizi sonuçları ise Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’da verilmiştir. Kökte *Han2724* geninin Cu+Cr uygulaması hariç diğer uygulamalarda up-regüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.7.). En yüksek ifade seviyesi Cr uygulamasında görülürken, en düşük Cu+Cr uygulamasında belirlenmiştir. Gövdede ise *Han2724* geninin tüm uygulamalarda down-regüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). En düşük gen ifade seviyesi Cu+Cr uygulamasında görülürken, en yüksek ifade seviyesi AsA uygulamasında görülmüştür.

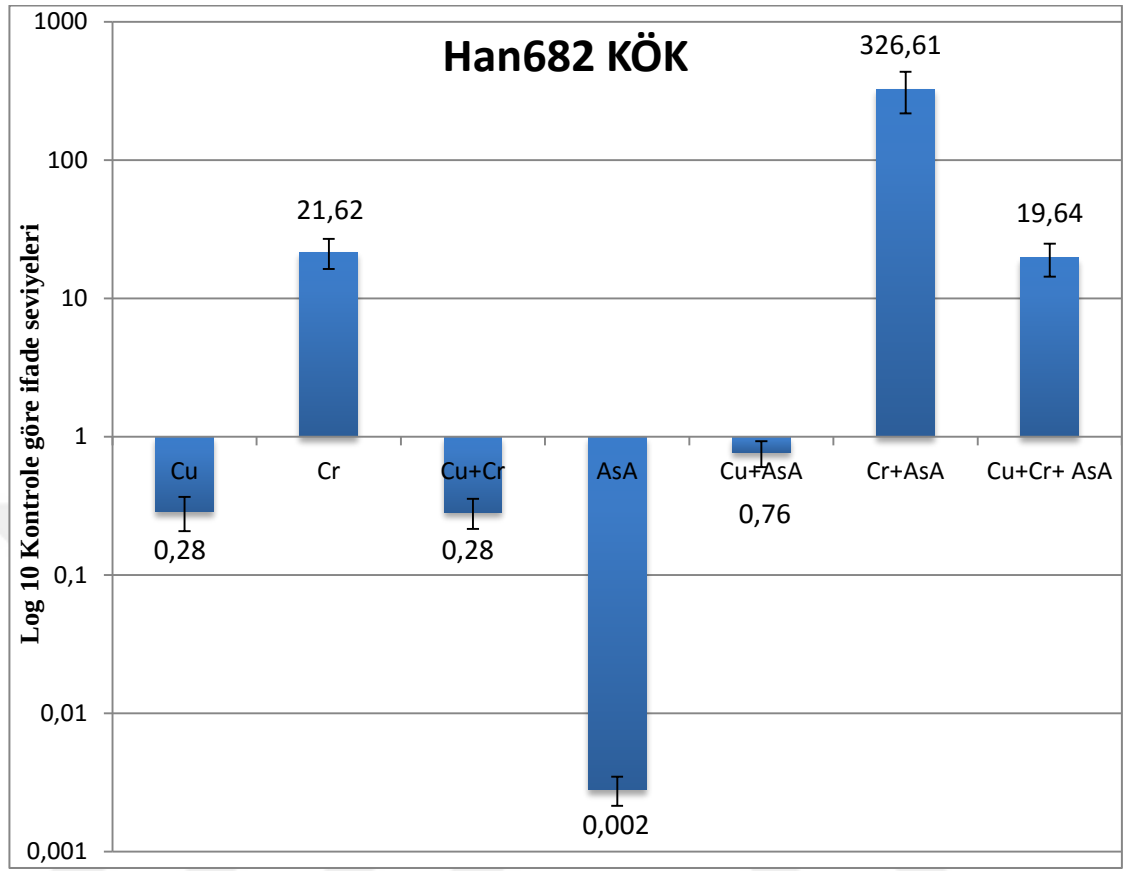


Şekil 4.7. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki *Han2724* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

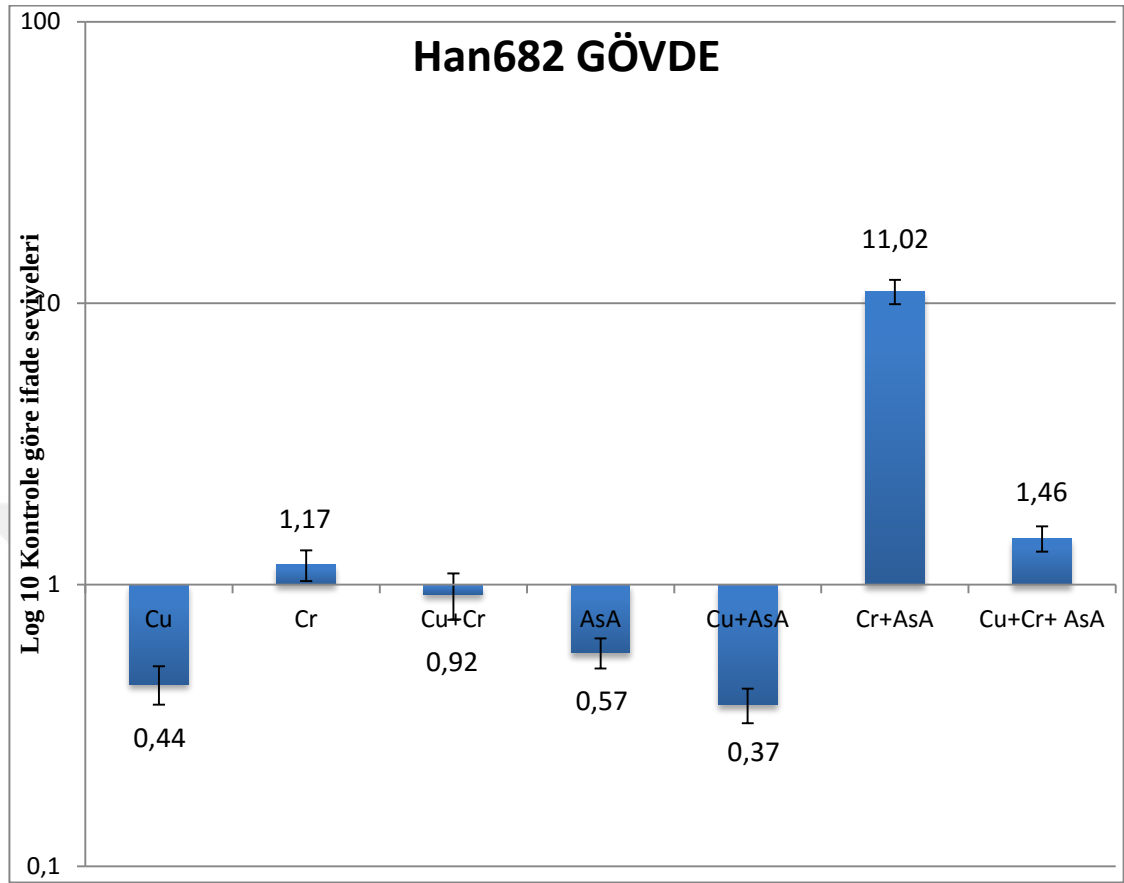


Şekil 4.8. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki *Han2724* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Han682 gen ifade analizi sonuçları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Elde edilen grafiğe göre kök kısmında, *Han682* genini Cr, Cr+AsA ve Cu+Cr+AsA uygulamalarının up-regüle ettiği; Cu, Cu+Cr, AsA ve Cu+AsA uygulamalarının ise down-regüle ettiği görülmüştür (Şekil 4.9). En düşük gen ifade seviyesi AsA uygulamasında görülürken, en yüksek ifade ise Cr+AsA uygulamasında belirlenmiştir. Gövdede ise *Han682* genini; Cr, Cr+AsA ve Cu+Cr+AsA uygulamalarının up-regüle ettiği; Cu, Cu+Cr, AsA ve Cu+AsA uygulamalarının ise down-regüle ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10.). Gövdede en düşük gen ifade seviyesi Cu+AsA uygulamasında görülürken; en yüksek Cr+AsA uygulamasında belirlenmiştir.

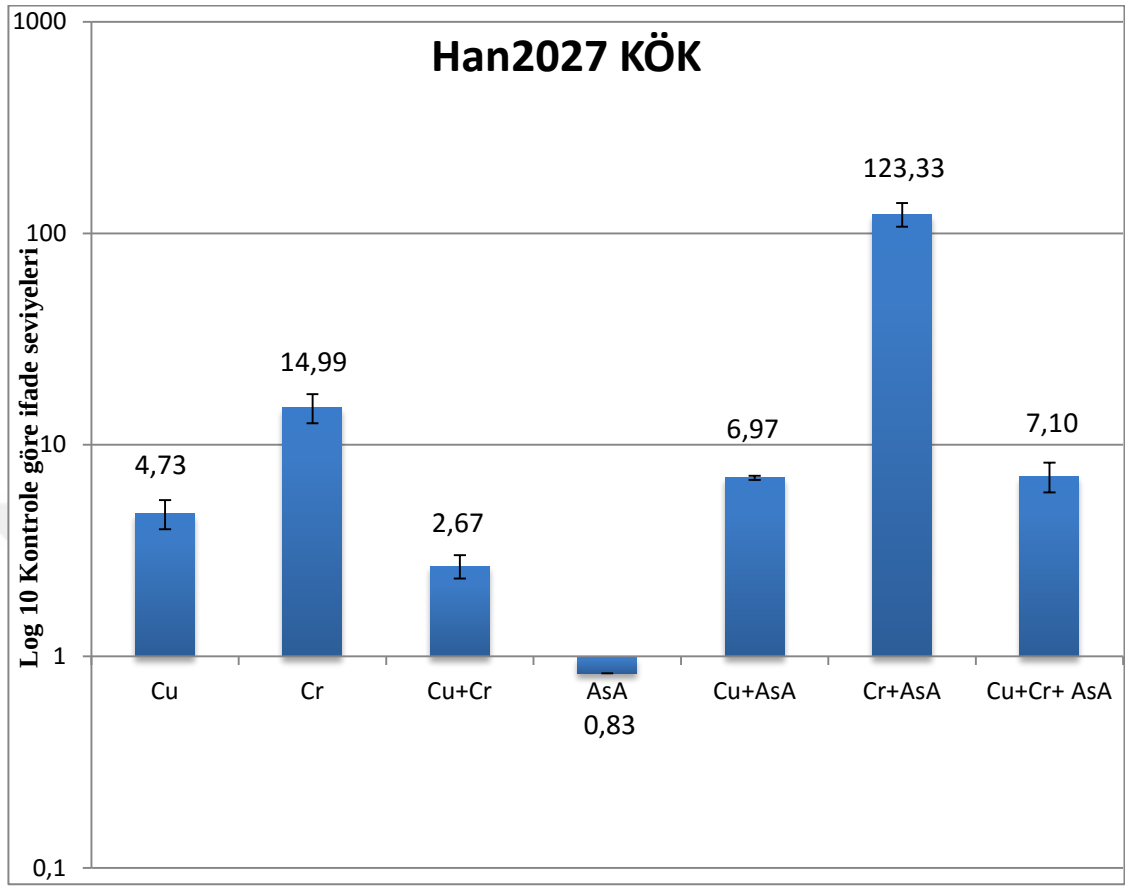


Şekil 4.9. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki *Han682* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

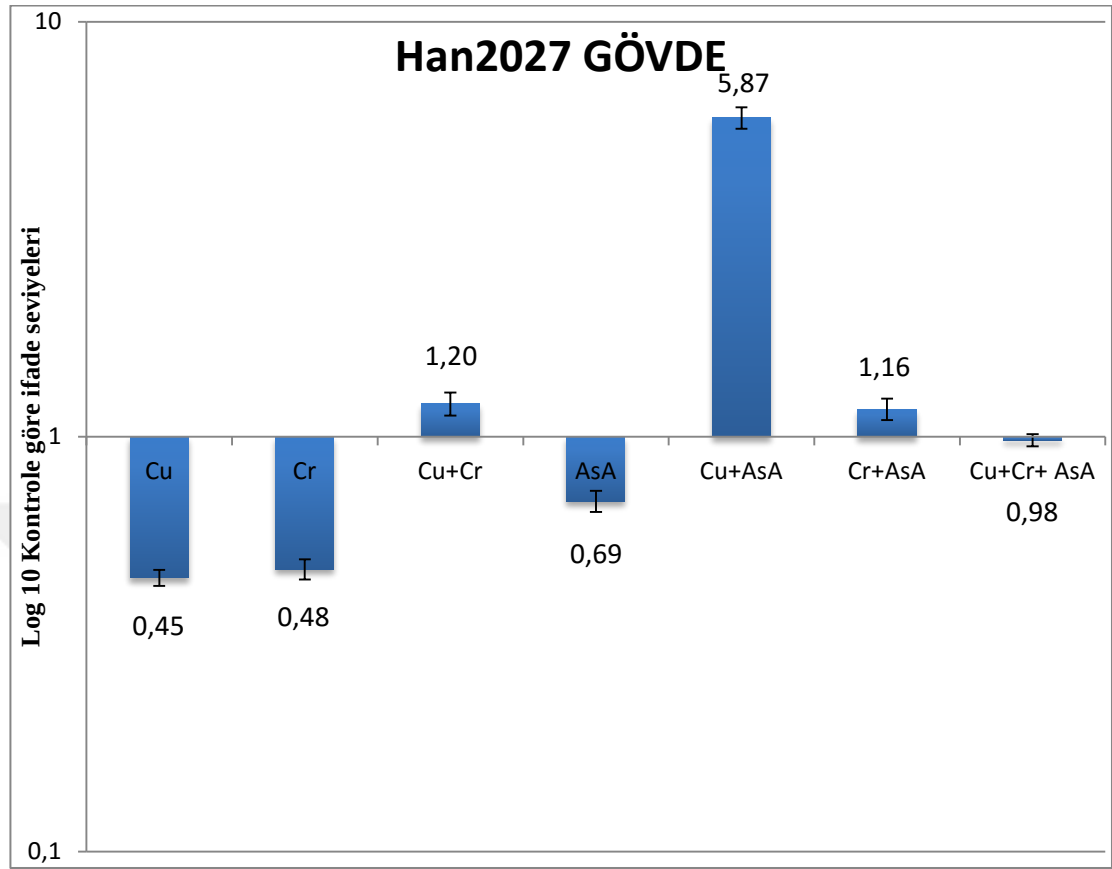


Şekil 4.10. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki *Han682* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Diğer bir NAC transkripsiyon faktör geni olan *Han2027* gen ifade analizi sonuçları Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir. Kökte *Han2027* geninin AsA uygulaması hariç diğer uygulamaların tamamında up-regüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.11.). En düşük gen ifade seviyesi AsA uygulamasında görülürken; en yüksek Cr+AsA uygulamasında belirlenmiştir. Gövdede ise *Han2027* geninin Cu+Cr, Cu+AsA ve Cr+AsA uygulamalarında up-regüle olduğu, diğer uygulamalarda ise down-regüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). En yüksek ifade seviyesi Cu+AsA uygulamasında belirlenirken; en düşük Cu uygulamasında elde edilmiştir.



Şekil 4.11. Ağır metal stresine maruz kalan bitki köklerindeki *Han2027* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)



Şekil 4.12. Ağır metal stresine maruz kalan bitki gövdelerindeki *Han2027* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler, büyüme ve gelişmelerini olumsuz etkileyen çeşitli çevre koşullarına maruz kalırlar (Knight and Knight 2001). Günümüzde toprak kontaminasyonunda toksik etkisi oldukça fazla olan en önemli çevresel faktörlerden biri de ağır metallerdir (Burzynski and Zurek 2007; Kisa *et al.* 2017). Bazı ağır metaller eser miktarda bulunduklarında, bitkilerin normal büyüme ve gelişimine katkı sağlamaktadırlar. Mikro element olarak adlandırılan bu ağır metallerden bakır, düzenleyici proteinlerde yapısal bir element olarak görev alır ve fotosentetik elektron taşınımına, mitokondriyal solunum, hücre duvar metabolizması ve hormon sinyalizasyonuna katılır (Fariduddin *et al.* 2009).

Ağır metaller bitkide optimum miktarları aştıkları zaman toksik etkiye neden olurlar. Bitki büyüme ve gelişimini olumsuz şekilde etkileyerek bazı fizyolojik ve moleküler değişikliklere neden olurlar (Kisa *et al.* 2017). Günümüzde gerek endüstriyel gerekse de doğal çevresel olaylardan dolayı toprağa salınan Cr, tüm canlı grupları için tehdit oluşturan ağır metallerden biridir. Cr toksisitesi yüksek ROT üretimi, gen ifade seviyesinde bir sinyalleme zincirini harekete geçirerek stres karşısında savunma yanıtı oluşturabilir (Shanker *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2017). Bu yanıt mekanizmalarının temel öğelerinden biride *MT* genleridir (Zhang *et al.* 2017). Bitki *MT*'leri stresle uyarılabilir bir proteindir ve mRNA ifadeleri çevresel faktörler ile bitki dokuları tarafından düzenlenir ve türe göre değişir (Pramanick *et al.* 2017; Kisa *et al.* 2017). Hem *MT1* hem de *MT2* proteinlerinin, metal bağlama ve ROT temizleme faaliyetlerinden sorumlu olan iki sisteyi zengin korunmuş domainleri vardır (Yamauchi *et al.* 2017).

Araştırmada köklerde tüm uygulamalarda *MT2-1* geninin çok yüksek seviyelerde transkribe edildiği saptanmış ve bu sonuç Tomas *et al.* (2015)'in sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. *Arabidopsis*'te çalışan Guo *et al.* (2013b) *MT2b*'nin yüksek ifade gösterdiği için bu genin referans gen olduğunu bildirmiştir.

Çeltikte, *OsMT* gen ailesi içerisindeki sadece *MT2* genleri saplarda yüksek seviyelerde ifade edilirken (Zhou *et al.* 2006); bu çalışmada *MT2-1*'in köklerde daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Bu da *MT* genlerinin ifade seviyesinin bitki türüne ve organına göre değiştiğini göstermektedir (Du *et al.* 2012). Genel olarak, şeker kamışında *MT2-1*'in ifadesi köklerde daha düşük, yapraklarda daha yüksek olma eğiliminde iken; Guo *et al.* (2013a)'in yaptıkları araştırmada köklerde ve tomurcuklarda *ScMT2-1-3*'ün ifade seviyesinin, gövde ve yapraklardakine kıyasla belirgin olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *Arabidopsis*, buğday ve çeltikte *MT* mRNA ifadelerinin, bazı ağır metallerle uyarıldığında arttığı gözlenmiştir (Pramanick *et al.* 2017). *ScMT2-1-3*'ün Cu stresindeki up-regülasyonu, bu genin şeker kamışı hücrelerinde bakır detoksifikasyonunda ve depolanmasında belirgin bir rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmada, kökte *MT2-1* geni Cr uygulamasında en fazla ifade verdiği gözlenmiştir. Guo *et al.* (2013a)'in de bildirdiği gibi *MT* geni stres toleransında rol aldığı için up-regüle olabileceği düşünülmüştür. Nitekim; *MT2-1* geninin Cr uygulamasında köklerde daha fazla ifade olması, Cr'nin köklerde daha fazla birikmesinden kaynaklanmış olabilir. Cr kökler tarafından alınıp, absorbe edildiğinde oldukça yavaş translokasyona uğrar ve büyük ölçüde köklerde tutulur (Singh *et al.* 2013). Cr'un köklerde daha fazla birikmesinin nedeni ise kök hücrelerinin Cr'yi vakuollerinde biriktirmesi ve böylece bitkide daha az toksik hale getirilmesi olabilir (Shanker *et al.* 2004).

Çalışmada; Cr uygulamasına Cu'nun eklenmesi ile köklerde gen ifadesinde bir azalma gözlemlenirken, bunun nedeninin Cu ve Cr'nin antagonistik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Murtaza *et al.* 2017). Nitekim, Dube *et al.* (2003) Cu ve Cr arasında antagonistik etki olduğunu bildirmiştir.

Araştırmada Cr'ye karşı AsA uygulaması *MT2-1* geninin ifadesini düşürdüğü gözlenmiştir. Bunun da muhtemel nedeni; Cr toksisitesi ile oluşan ROT'ların uzaklaştırılmasında AsA'nın görev almasıdır. Araştırmadaki bulgulara benzer olarak *Sebastes schlegelii* (kaya balığı)'nda Pb stresinde AsA uygulamasının *MT* geninin ifadesini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Kim and Kang 2017).

Çalışmada *MT2-1* geninin gövde kısımlarındaki gen ifade modellerine dayanarak; diğer uygulamalara kıyasla Cu uygulamasına en fazla ifade verdiği gözlenmektedir. Bu genin Cu'da fazla ifade olması bu genin Cu taşınımında rol almasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim, *Arabidopsis*'te *MT2b*'nin, floem aracılığıyla Cu homeostazında büyük bir rol oynadığı, dokular arasında fazla Cu'nun uzun mesafelere taşınmasında görev aldığı bildirilmiştir (Guo *et al.* 2013b). Diğer taraftan *MT2b*'nin, hücre duvarlarının lignifikasyonu için Cu sağlamak üzere vasküler dokuda bir Cu depolama mekanizması olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Guo *et al.* 2013b). Bu nedenlerden dolayı Cu'nun *MT2-1* genini çalıştırdığı düşünülmektedir. Yine araştırmada bu genin ifadesinin Cr uygulamasında az olmasının nedeni muhtemelen ayçiçeğinin ağır metali köklerde depolayarak, diğer organlara iletilmesini önlemesinden kaynaklanmış olabilir.

Cr uygulamasına tek başına Cu ve AsA eklenmesi sonucunda gen ifadelerinin benzer olduğu görülmüştür. Bu da Cu ve AsA'nın Cr toksisitesini aynı derecede tolere edebileceğini ve Cu'nun gerçekten mikro besin elementi olarak etki gösterdiğini açıklamaktadır. Hem Cu hem de AsA Cr ile oluşan ROT'ları uzaklaştırarak genin ifadesinin azalmasına neden olduğu söylenebilir.

MT4 genlerinin ifadeleri yalnızca tohumda değil aynı zamanda üreme organlarında ve vejetatif dokularda da ifade edildiği bildirilmiştir (Yang *et al.* 2015). *Arabidopsis*'te tohumda ifade olan *MT4* geninin, vejetatif dokularda ifade olduğu; bakır ve çinkoya karşı toleransını artırdığı gözlenmiştir (Leszczyszyn *et al.* 2013). Bu çalışmaya benzer olarak yapılan araştırmada *MT4* geninin köklerde ifade verdiği gözlenmiştir.

Araştırmada *MT4* geninin köklerde tek başına Cr uygulamasıyla karşılaştırıldığında Cr+AsA uygulamasında daha fazla ifade olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre, Cr uygulamasına AsA ilavesi *MT4* geninin ifadesini daha da artırdığı söylenebilir. Nitekim fare karaciğerinde yapılan çalışmalarda AsA uygulaması ile MT sentezinin uyarıldığı belirlenmiştir (Onosaka *et al.* 1987). Diğer taraftan Cr uygulamasının oluşturduğu toksisite nedeniyle genin ifadesini artırması beklenen bir sonuçtur. Bu genin tek başına uygulanan AsA'da down-regüle olması ortamda stres faktörünün olmamasından

kaynaklanmış olabilir. Yine araştırmada MT4 geninin gövde kısmındaki ifadesine bakıldığında, bu genin ifadesinde her iki ağır metal uygulamasında önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Buda *MT* geninin ifadesinin dokuya ve organa özgü olması ile açıklanabilir (Kisa *et al.* 2017).

Son zamanlarda, farklı bitkilerde belirlenen NAC domain proteinleri, abiyotik stres toleransının düzenlenmesinde sinyal yolları ile etkileşim kurarak işlevlerini yerine getiren temel bileşenlerdir (Shao *et al.* 2015; Cao *et al.* 2017). Genin stresle uyarılması ile bitkilerde ifade edilen stres toleransı arasında fizyolojik ve moleküler değişikliklere dayalı kuvvetli bir korelasyon vardır (Zhang *et al.* 2015). Birçok NAC geninin mRNA'ları, çeşitli abiyotik streslere tepki olarak önemli değişiklikler gösterdiği ve abiyotik stres toleransında gözle görülür bir değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Jin *et al.* 2017). Bu araştırmada; *Han2724* geninin kökte en fazla ifadesinin Cr uygulamasında gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuç, Cr toksisitesine bağlı olarak artan prolin içeriğinin strese cevap olarak NAC TF gen ifadesine olan etkisiyle açıklanabilir. Nitekim, kuraklık ve soğuk gibi abiyotik stres koşullarında *TaNAC47* geninin aşırı ifade olduğu bitkilerde prolin içeriğinde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu da bitkilerin stres altındayken; prolinin stresle ilişkili genlerin sentezlenmesine neden olarak stres toleransını sağladığını göstermektedir (Zhang *et al.* 2015).

Cu+Cr uygulamasında metallerinin antagonistik etkisinden dolayı ifadelerinde bir azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, Cr+AsA'nın birlikte verildiği uygulamada gen ifadesinin azaldığı görülmektedir. Bu durum, AsA'nın Cr toksisitesi nedeni ile oluşan ROT'ların savunmasında rol oynayarak genin ifadesinde azalmaya neden olması ile açıklanabilir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalarla desteklenmiştir. Transkripsiyon faktör genlerinden olan *TaNAC47* geni aşırı ifade olan transgenik bitkilerde, *AtRD29A*, *AtRD29B*, *AtCOR47*, *AtRD20*, *AtGSTF6*, *AtP5CS1* vb çeşitli stresle ilgili genlerin up-regüle olduğu belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2015).

Tütünde, kuraklık ve soğuk stresinde *PbeNAC1*'in aşırı ifadesinin, bazı strese tepki genlerinin pozitif düzenleyicisi olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Jin *et al.* 2017).

Buğdayda *TaNAC69* geni çeşitli abiyotik stresler tarafından up-regüle olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, *TaNAC2* ve *TaNAC67*'nin aşırı ifadesi, transgenik bitkilerin abiyotik streslere karşı toleransını geliştirmiştir. Aynı şekilde *TaNAC47* geninin aşırı miktarda ifade edildiği fidelerde, ABA'ya olan duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2015). Arpada *HvSNAC1* geninin promotör bölgesinde çeşitli strese duyarlı düzenleyici elementler tanımlanmıştır. Bu sayede *HvSNAC1* geninin aşırı ifadesi kuraklık başta olmak üzere birçok abiyotik stresi tolere edebileceği bildirilmiştir (Abdallat *et al.* 2014).

Araştırmada, *Han2724* geninin ifade seviyesinin gövdede tüm uygulamalarda down-regüle olduğu görülmüştür. Araştırmada elde edilen bulgulara benzer olarak nohutta NAC transkripsiyon faktör geni olan *CaNAC02*'nin negatif düzenleyici bir gen olduğu, araştırmada kullanılan her iki nohut çeşidinde de (ILC482 ve Hashem) gerek köklerde gerekse yapraklarda dehidrasyonla önemli derecede down-regüle olduğu belirlenmiştir. Ancak, kuraklığa dayanıklı kuraklığa duyarlı Hashem'de daha düşük ifade seviyeleri gözlenmiştir (Nguyen *et al.* 2015). Yine, *Citrullus lanatus*'ta (kuraklık ve tuz stresine karşı oldukça toleranslı, soğuk stresine duyarlı) *CINAC* genlerinin yaklaşık yarısının hızlı ve belirgin bir şekilde down-regüle olduğu belirlenmiştir. Bunların arasında *CINAC96* ve *CINAC09* genlerinin en fazla azalışı gösterdiği belirlenmiştir (Lv *et al.* 2016).

Han682 geninin kök kısmında AsA uygulamasına karşı en az ifade verdiği belirlenmiştir. Bitki stres altında olmadığı için genin down-regüle olması beklenen bir sonuçtur. Ancak, Cr'nin toksisitesine bağlı olarak ifadesinin arttığı gözlenmiştir. En yüksek ifade seviyesi Cr ve AsA'nın birlikte verildiği uygulamadır. Bu da bitkiye verilen AsA'nın Cr toksisitesini azaltmak için bu geni çalıştırdığını düşündürmektedir. Cr uygulamasına ilave Cu'nun genin ifadesini down-regüle ettiği gözlenmiştir. Bunun da muhtemel nedeni Cu ve Cr'nin antagonistik etkisidir.

Han682 geninin gövde kısmında en az ifadesi Cu ve AsA'nın birlikte verildiği uygulamada görülürken, en fazla ifade Cr ve AsA uygulamasında gözlenmiştir. Cu ile

AsA uygulamasında, ortamda stres koşulları olmadığından bu genin down-regüle olduğu görülmüştür. Diğer taraftan Cr ve AsA'nın birlikte uygulamasında; AsA'nın geni çalıştırarak ifadesini artırdığı belirlenmiştir.

Han2027 geninin kökte AsA uygulamasında en az ifade olduğu, en fazla ise Cr ve AsA uygulamasında olduğu gözlenmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi, bu genin Cr'nin neden olduğu toksisiteden dolayı ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Cu ve Cr'nin birlikte verildiği uygulamada ise ifadesinin azalmasının muhtemel nedeni metallerin antagonistik etkisidir. Bu sonuçlar *Han682* geninin ifadesiyle benzerdir. Çeltikte yapılan bir çalışmada; *ONAC* gen (*Os11g03370* ve *Os07g37920*) ifadelerinin dokuya özgü olduğu rapor edilmiştir. *Os11g03370* geninin, kallus ve kökte spesifik olarak ifade edildiği ve tuz ve soğuk stresleri tarafından uyarıldığı; *Os07g37920* geninin ise stamene özgü olduğu ve kuraklık ve tuz tarafından uyarıldığı bildirilmiştir (Fang *et al.* 2008). Yine soya fasülyesinde, 29 *GmNAC* genlerinden, 4 tanesinin köklerde, 13 tanesinin sürgünlerde ve 12 tanesinin ise her iki dokuda da indüklendiği ve *GmNAC* genlerinin altısı ise sürgünlerde dehidrasyonla down-regüle olduğu belirlenmiştir (Le *et al.* 2011).

Araştırmada, *Han2027* geninin gövde kısmında Cu uygulamasında en az ifade olduğu gözlemlenirken, en fazla ifade Cu ve AsA uygulamasında gözlemlenmiştir. Ayrıca; Cu, Cr ve AsA uygulamalarının bu genin ifadesini down-regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre NAC genlerinin ifadelerinin dokuya özgü olduğunu düşündürmektedir. Çeşitli bitki NAC transkripsiyon faktör genlerinin ifadesinin dokuya spesifik olduğu ve dokuya spesifik olarak ifade edilen transkripsiyon faktörlerinin bitki büyümesinde ve gelişiminde kritik rol oynadığı bildirilmiştir (Xia *et al.* 2010a). Xia *et al.* (2010a) tarafından çeltikte yapılan çalışmada *TaNAC4* geni, ağırlıklı olarak köklerde ifade edildiği, ancak ifade seviyelerinin yapraklarda ve saplarda köklere göre daha düşük olduğu ve *TaNAC4*'ün çeltikte *OsNAC19* ve soya fasulyesinde *GmNAC1* ile benzer bir ifade profiline sahip olduğu rapor edilmiştir.

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinden yeryüzündeki tüm canlılar etkilenmektedir. Bu nedenle, bitkilerdeki streslerin araştırılmasının en önemli amacı, gıda maddesi olarak

tüketilmesi nedeniyle daha toleranslı hale getirilmesidir. Bu da bitkilerde, önemli stres düzenleyici ağların ve olumsuz koşulların farklı kombinasyonlarının potansiyel etkilerinin anlaşılmasına bağlıdır. Abiyotik stres cevapları içerisinde yer alan *MT* ve *NAC* transkripsiyon faktör genleri gibi ana düzenleyici genler, stres toleransını geliştirebilmek için mükemmel adaylardır. *MT* genlerinin ağır metal stresine karşı güçlü bir mekanizmaya sahip olmasının yanı sıra, *ROT*'ları uzaklaştırabileceği dikkate alındığında diğer stres şartlarına karşı da bitkilerde toleransı artırabileceğini düşündürmektedir. Aynı şekilde *NAC* transkripsiyon faktör genleride çeşitli sinyal yollarını aktive ederek, stres şartlarına karşı tolerans sağlamaktadır. *AsA* ise stres şartları altında bitkilerde *ROT*'ları uzaklaştırarak oksidatif savunma potansiyelini ve stres toleransını artırmaktadır. Fakat; *AsA*'nın, bitki büyüme ve gelişmesinin farklı evrelerinde faaliyet gösteren metabolik süreçleri nasıl ve ne ölçüde uyarabileceği hakkında literatürde az bilgi mevcuttur. Bu bilginin açığa çıkarılması, *AsA*'nın stres şartları altında büyümeyi teşvik etmedeki etkin rolünü tam olarak aydınlatmaya yardımcı olabilir. Sonuç olarak; özellikle *NAC* transkripsiyon faktör genlerinin moleküler mekanizmalarının tam olarak araştırılması ve belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca, model bitki türlerinde çoklu abiyotik stres toleransında görev alan *NAC* transkripsiyon faktör genleri ürün bitkilerinde test edilmeli ve özellikle üreme başarısına odaklanarak *NAC* transkripsiyon faktör genlerini barındıran transgenik bitkilerin yetiştirilmesine ağırlık verilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abdallat, A.M.A., Ayad, J.Y., Elenein, J.M.A., Ajlouni, Z.A. and Harwood, W.A., 2014. Overexpression of the transcription factor HvSNAC1 improves drought tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding*, 33 (2), 401-414.
- Adesodun, J.K., Atayese, M.O., Agbaje, T.A., Osadiaye, B.A., Mafe, O.F. and Soretire, A.A., 2010. Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. *Water, Air, and Soil Pollution*, 207(1/4), 195-201.
- Akram, N.A., Shafiq, F. and Ashraf, M., 2017. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 613.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-99.
- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plant, Review Article, *Curr. Sci.*, India, vol. 82, 2002.
- Aziz, A., Akram, N.A. and Ashraf, M., 2017. Influence of natural and synthetic vitamin C (ascorbic acid) on primary and secondary metabolites and associated metabolism in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants under water deficit regimes. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Bahadur, A., Ahmad, R., Afzal, A., Feng, H., Suthar, V., Batool, A., Khan, A. and Mahmood-Ul-Hassan, M., 2017. The influences of Cr-tolerant rhizobacteria in phytoremediation and attenuation of Cr (VI) stress in agronomic sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Chemosphere*, 179, 112-119.
- Benakova, M., Ahmadi, H., Ducaiova, Z., Tylova, E., Clemens, S. and Tuma, J., 2017. Effects of Cd and Zn on physiological and anatomical properties of hydroponically grown *Brassica napus* plants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(25), 20705-20716.
- Bennett, M., Rahman, M.M., Azirun, S.M. and Boyce, A.N., 2013. Enhanced Accumulation of Copper and Lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*), Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Sunflower (*Helianthus annuus*). *PLoS One*, 8(5), e62941.
- Burzynski, M. and Zurek, A., 2007. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica*, 45(2), 239-244.
- Cao, H., Wang, L., Nawaz, M.A., Niu, M., Sun, J., Xie, J., Kong, Q., Huang, Y., Cheng, F. and Bie, Z., 2017. Ectopic Expression of Pumpkin NAC Transcription Factor CmNAC1 Improves Multiple Abiotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2052.
- Chen, Z., Qin, C., Lin, L., Zeng, X., Zhao, Y., He, S., Lu, S. and Guo, Z., 2014. Overexpression of Yeast Arabinono-1,4-Lactone Oxidase Gene (ALO) Increases Tolerance to Oxidative Stress and Al Toxicity in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(4), 806-818.
- Choudhury, S. and Panda, S.K., 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium Nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, and Soil Pollution*, 167(1-4), 73-90.

- Das, B.C., Panda, A., Sahoo, P.K., Jena, S. and Padhi, P., 2014. Effect of chromium (VI) on wheat seedlings and the role of chelating agents. *Current Science*, 106(10), 1387-1393.
- Davey, M.W., Montagu, M.V., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J., Favell, D. and Fletcher, J., 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- Du, J., Yang, J.L. and Li, C.H., 2012. Advances in metallotionein studies in forest trees. *Plant Omics*, 5(1), 46-51.
- Dube, B.K., Tewari, K., Chatterjee, J. and Chatterjee, C., 2003. Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus. *Chemosphere*, 53 (9), 1147-1153.
- Ernst, H.A., Olsen, A.N., Larsen, S. and Lo Leggio, L., 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep*, 5(3), 297-303.
- Fancy, N.N., Bahlmann, A.K. and Loake, G.J., 2017. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 40(4), 462-472.
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W. and Xiong, L., 2008. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 280 (6), 547-563.
- Farid, M., Ali, S., Akram, N., A., Rizwan, M., Abbas, F., Bukhari, S., A, H. and Saeed, R., 2017. Phyto-management of Cr-contaminated soils by sunflower hybrids: physiological and biochemical response and metal extractability under Cr stress. *Environ Sci Pollut Res*, 24, 16845–16859
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Hayat, S. and Ahmad, A., 2009. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in Brassica juncea plants exposed to different levels of copper. *Environmental and Experimental Botany*, 66 (3), 418-424.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 862-889.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress *Plant Science*, 121 151-159
- Ghosh, M. and Singh, S.P., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts *APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH*, 3(1), 1-18.
- Gill, R.A., Zang, L., Ali, B., Farooq, M.A., Cui, P., Yang, S., Ali, S. and Zhou, W., 2015. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of Brassica napus L. *Chemosphere*, 120, 154-64.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48(12), 909-30.
- Gomes, M.A., Hauser-Davis, R.A., Suzuki, M.S. and Vitoria, A.P., 2017. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicol Environ Saf*, 140, 55-64.

- Gopal, R. and Khurana, N., 2011. Effect of heavy metal pollutants on sunflower African Journal of Plant Science, 5 (9), 531-536.
- Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O., Hitmi, A. and Ledoigt, G., 2009. Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. Journal of Plant Physiology, 166(13), 1446-52.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology, 32(6), 481.
- Guo, J., Xu, L., Su, Y., Wang, H., Gao, S., Xu, J. and Que, Y., 2013a. ScMT2-1-3, a metallothionein gene of sugarcane, plays an important role in the regulation of heavy metal tolerance/accumulation. Biomed Research International, 2013, 904769.
- Guo, W.-J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P.B., 2003b. Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. New Phytologist, 159 (2), 369-381.
- He, X.J., Mu, R.L., Cao, W.H., Zhang, Z.G., Zhang, J.S. and Chen, S.Y., 2005. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. Plant Journal, 44(6), 903-16.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S. and Lydiate, D., 2003. Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. Plant Molecular Biology, 53, 383-397.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, 347, 347-353.
- Jin, C., Li, K.Q., Xu, X.Y., Zhang, H.P., Chen, H.X., Chen, Y.H., Hao, J., Wang, Y., Huang, X.S. and Zhang, S.L., 2017. A Novel NAC Transcription Factor, PbeNAC1, of Pyrus betulifolia Confers Cold and Drought Tolerance via Interacting with PbeDREBs and Activating the Expression of Stress-Responsive Genes. Frontiers in Plant Science, 8, 1049.
- Jutsz, A.M. and Gnida, A., 2015. Mechanisms of stress avoidance and tolerance by plants used in phytoremediation of heavy metals. Archives of Environmental Protection, 41(4).
- Kanwar, M.K., Poonam, Pal, S. and Bhardwaj, R., 2015. Involvement of Asada-Halliwell Pathway During Phytoremediation of Chromium (VI) in Brassica juncea L. Plants. Int J Phytoremediation, 17(12), 1237-43.
- Kim, B.E., Nevitt, T. and Thiele, D.J., 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. Nat Chem Biol, 4(3), 176-85.
- Kim, J.H. and Kang, J.C., 2017. Effects of sub-chronic exposure to lead (Pb) and ascorbic acid in juvenile rockfish: Antioxidant responses, MT gene expression, and neurotransmitters. Chemosphere, 171, 520-527.
- Kim, S.H., Jeong, J.C., Ahn, Y.O., Lee, H.S. and Kwak, S.S., 2014. Differential responses of three sweetpotato metallothionein genes to abiotic stress and heavy metals. Molecular Biology Reports, 41(10), 6957-6966.
- Kisa, D., Ozturk, L., Doker, S. and Gokce, I., 2017. Expression analysis of metallothioneins and mineral contents in tomato (Lycopersicon esculentum) under heavy metal stress. J Sci Food Agric, 97(6), 1916-1923.

- Knight, H. and Knight, M.R., 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 6(6), 1360-1385.
- Kovacik, J., Rotkova, G., Bujdos, M., Babula, P., Peterkova, V. and Matus, P., 2017. Ascorbic acid protects *Coccomyxa subellipsoidea* against metal toxicity through modulation of ROS/NO balance and metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 200-207.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L.S., 2011. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res*, 18 (4), 263-76.
- Leszczyszyn, O.I., Imam, H.T. and Blindauer, C.A., 2013. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics*, 5 (9), 1146-69.
- Li, L.S., Meng, Y.P., Cao, Q.F., Yang, Y.Z., Wang, F., Jia, H.S., Wu, S.B. and Liu, X.G., 2016. Type 1 metallothionein (ZjMT) is responsible for heavy metal tolerance in *Ziziphus jujuba*. *Biochemistry-Moscow*, 81(6), 565-573.
- Li, Y.H., Atagana, H., Liu, J.C., Wu, W.L. and Wu, S.J., 2013. cDNA sequence encoding metallothionein protein from *Aegiceras corniculatum* and its gene expression induced by Pb²⁺ and Cd²⁺ stresses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(12), 10201-10208.
- Lippard, S.J. and Berg, J.M., 1994. Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books. New York, NY, USA.
- Liu, J., Shi, X., Qian, M., Zheng, L., Lian, C., Xia, Y. and Shen, Z., 2015. Copper-induced hydrogen peroxide upregulation of a metallothionein gene, OsMT2c, from *Oryza sativa* L. confers copper tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Hazardous Materials*, 294, 99-108.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lv, X., Lan, S., Guy, K.M., Yang, J., Zhang, M. and Hu, Z., 2016. Global Expressions Landscape of NAC Transcription Factor Family and Their Responses to Abiotic Stresses in *Citrullus lanatus*. *Sci Rep*, 6, 30574.
- Mahajan, S., Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Science Direct*, 444: 139-158, 2005.
- Mekawy, A.M.M., Assaha, D.V.M., Munehiro, R., Kohnishi, E., Nagaoka, T., Ueda, A. and Saneoka, H., 2017. Characterization of type 3 metallothionein-like gene (OsMT-3a) from rice, revealed its ability to confer tolerance to salinity and heavy metal stresses. *Environmental and Experimental Botany*.
- Mohanty, M. and Patra, H.K., 2016. Tolerance potential and physiological responses of *Helianthus annuus* L. exposed to varying doses of hexavalent chromium J. *Mater. Environ. Sci.*, 7(6), 2221-2228
- Murtaza, G., Javed, W., Hussain, A., Qadir, M. and Aslam, M., 2017. Soil-applied zinc and copper suppress cadmium uptake and improve the performance of cereals and legumes. *Int J Phytoremediation*, 19(2), 199-206.
- Nevrtalova, E., Baloun, J., Hudzieczek, V., Cegan, R., Vyskot, B., Dolezel, J., Safar, J., Milde, D. and Hobza, R., 2014. Expression response of duplicated

- metallothionein 3 gene to copper stress in *Silene vulgaris* ecotypes. *Protoplasma*, 251(6), 1427-1439.
- Nguyen, K.H., Ha, C.V., Watanabe, Y., Tran, U.T., Nasr Esfahani, M., Nguyen, D.V. and Tran, L.S., 2015. Correlation between differential drought tolerability of two contrasting drought-responsive chickpea cultivars and differential expression of a subset of CaNAC genes under normal and dehydration conditions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 449.
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L. and Skriver, K., 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10(2), 79-87.
- Onosaka, S., Kawakami, D., Min, K., Oo-Ishi, K. and Tanaka, K., 1987. Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. *Toxicology*, 43 (3), 251-259.
- Panda, S.K. and Choudhury, S., 2004. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(2), 191-197.
- Panda, S.K. and Choudhury, S., 2005. Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 95-102.
- Panda, S.K., 2007. Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 164(11), 1419-28.
- Pramanick, P., Chakraborty, A. and Raychaudhuri, S.S., 2017. Phenotypic and biochemical alterations in relation to MT2 gene expression in *Plantago ovata* Forsk under zinc stress. *Biometals*, 30(2), 171-184.
- Rady, M.M., Howladar, M.M. and Howladar, S.M., 2016. Ascorbic acid application mitigate the salt stress effects on *Helianthus annuus* L. plants grown on a reclaimed saline soil. *Miami USA Mar 24-25*, 18(3), 1732-1736.
- Rejeb, I.B., Pastor, V. and Mauch-Mani, B., 2014. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants (Basel)*, 3(4), 458-75.
- Ricachenevsky, F.K., Menguer, P.K. and Sperotto, R.A., 2013. kNACking on heaven's door: how important are NAC transcription factors for leaf senescence and Fe/Zn remobilization to seeds? *Frontiers in Plant Science*, 4, 226.
- Rivelli, A.R., De Maria, S., Puschenreiter, M. and Gherbin, P., 2012. Accumulation of cadmium, zinc, and copper by *Helianthus annuus* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Int J Phytoremediation*, 14(4), 320-34.
- Ruttkay-Nedecky, B., Nejdl, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V. and Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 14(3), 6044-66.
- Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105e130.
- Seminario, A., Song, L., Zulet, A., Nguyen, H.T., Gonzalez, E.M. and Larrainzar, E., 2017. Drought Stress Causes a Reduction in the Biosynthesis of Ascorbic Acid in Soybean Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1042.
- Shanker, A., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C. and Pathmanabhan, G., 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway

- enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram ((L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science*, 166(4), 1035-1043.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. and Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31(5), 739-753.
- Shao, H., Wang, H. and Tang, X., 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 6, 902.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.J., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 43-50.
- Singh, H.P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D.R. and Kohli, R.K., 2013. Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 229-254.
- Smirnoff N., 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. University of Exeter, 293 p, UK.
- Smirnoff, N. and Wheeler, G.L., 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35(4), 291-314.
- Stoikou, V., Andrianos, V., Stasinou, S., Kostakis, M.G., Attiti, S., Thomaidis, N.S. and Zabetakis, I., 2017. Metal uptake by sunflower (*Helianthus annuus*) irrigated with water polluted with chromium and nickel. *Foods*, 6(7).
- Tang, G.Y., Shao, F.X., Xu, P.L., Shan, L. and Liu, Z.J., 2017. Overexpression of a peanut NAC gene, AhNAC4, confers enhanced drought tolerance in tobacco. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(4), 525-535.
- Teixeira, J., Ferraz, P., Almeida, A., Verde, N. and Fidalgo, F., 2013. Metallothionein multigene family expression is differentially affected by Chromium (III) and (VI) in *Solanum nigrum* L. plants. *Food and Energy Security*, 2(2), 130-140.
- Trinh, N.N., Huang, T.L., Chi, W.C., Fu, S.F., Chen, C.C. and Huang, H.J., 2014. Chromium stress response effect on signal transduction and expression of signaling genes in rice. *Physiol Plant*, 150(2), 205-24.
- Tomas, M., Pagani, M.A., Andreo, C.S., Capdevila, M., Atrian, S. and Bofill, R., 2015. Sunflower metallothionein family characterisation. Study of the Zn(II)- and Cd(II)-binding abilities of the HaMT1 and HaMT2 isoforms. *J Inorg Biochem*, 148, 35-48.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 41, 1075-1082.
- Wang, L., Wang, C., Wang, D. and Wang, Y., 2014. Molecular characterization and transcript profiling of NAC genes in response to abiotic stress in *Tamarix hispida*. *Tree Genetics & Genomes*, 10(1), 157-171.
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R. and Jin, L., 2011. Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environ Pollut*, 159(12), 3627-33.
- Wińska-Krysiak M., Koropacka K. and S., G., 2015. Determination of the tolerance of sunflower to lead-induced stress. *Journal of Elementology*, 20(2), 491-502.
- Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K. and Shimamoto, K., 2004. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology*, 135(3), 1447-56.

- Wu, F. and Zhang, G., 2002. Alleviation of Cadmium-Toxicity by Application of Zinc and Ascorbic Acid in Barley. *Journal of Plant Nutrition*, 25(12), 2745-2761.
- Xia, N., Zhang, G., Liu, X., Deng, L., Cai, G., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, J., Huang, L. and Kang, Z., 2010a. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Mol Biol Rep*, 37, 3703–3712.
- Xia, N., Zhang, G., Sun, Y.-F., Zhu, L., Xu, L.-S., Chen, X.-M., Liu, B., Yu, Y.-T., Wang, X.-J., Huang, L.-L. and Kang, Z.-S., 2010b. TaNAC8, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5-6), 394-402.
- Yamauchi, T., Colmer, T.D., Pedersen, O. and Nakazono, M., 2017. Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. *Plant Physiology*.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., and Stoffell, P. J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339–353. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.007
- Yang, M., Zhang, F., Wang, F., Dong, Z., Cao, Q. and Chen, M., 2015. Characterization of a Type 1 Metallothionein Gene from the Stresses-Tolerant Plant *Ziziphus jujuba*. *Int J Mol Sci*, 16 (8), 16750-62.
- Zeng, F., Qiu, B., Wu, X., Niu, S., Wu, F. and Zhang, G., 2012. Glutathione-mediated alleviation of chromium toxicity in rice plants. *Biol Trace Elem Res*, 148(2), 255-63.
- Zengin, F.K. and Kirbag, S., 2007. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Journal of Environmental Biology*, 28(3), 561-566.
- Zhang, F.Q., Wang, Y.S., Sun, C.C., Lou, Z.P. and Dong, J.D., 2012. A novel metallothionein gene from a mangrove plant *Kandelia candel*. *Ecotoxicology*, 21(6), 1633-41.
- Zhang, H., Lv, S., Xu, H., Hou, D., Li, Y. and Wang, F., 2017. H₂O₂ Is Involved in the Metallothionein-Mediated Rice Tolerance to Copper and Cadmium Toxicity. *Int J Mol Sci*, 18(10).
- Zhang, L., Zhang, L., Xia, C., Zhao, G., Jia, J. and Kong, X., 2015. The Novel Wheat Transcription Factor TaNAC47 Enhances Multiple Abiotic Stress Tolerances in Transgenic Plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1174.
- Zhou, G., Xu, Y., Li, J., Yang, L. and Liu, J.Y., 2006. Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39 (5), 595-606
- Zhou, J. and Goldsbrough, P.B., 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics* MGG, 248(3), 318-328.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Kağızman'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Kağızman'da tamamladı. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2015 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

