

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TUZ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GELİŞTİRİLMİŞ FARKLI ASPİR
(CARTHAMUS TINCTORIOUS) FAD2 GENİ mRNA İFADE SEVİYELERİNİN
qRT-PCR YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Monireh HASANBAGLOU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

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

24.08.2015

Monireh HASANBAGLOU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GELİŞTİRİLMİŞ FARKLI ASPİR (CARTHAMUS TINCTORIOUS) FAD2 GENİ mRNA İFADE SEVİYELERİNİN qRT-PCR YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Monireh HASANBAGLOU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Aspir (*Carthamus tinctorius*) bir yağlı tohum olarak gıda değeri yüksek olan bir bitkidir. Bünyesinde oleik ve linoleik yağ asitleri olmak üzere 2 önemli yağ asidi barındırmaktadır. Bu sebeple gıda sanayi ve boya endüstrisi gibi alanlarda yaygın kullanıma sahiptir. Ülkemizde ve dünyada her geçen gün daha büyük bir problem olarak karşımıza çıkan ve bitkilerde verimliliği olumsuz yönde etkileyen tuz ve kuraklık streslerine karşı bitkilerin sahip oldukları mekanizmaların aydınlatılması, günümüz bitki moleküler biyolojisinin en önemli konuları arasındadır. Bu amaçla gerçekleştirilecek olan tez çalışmasında, oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olduğu düşünülen FAD2 genlerinin stres cevabındaki olası rolleri araştırılacak ve bu genlerin stresle olan ilişkileri aydınlatılmaya çalışılacaktır. Elde edilecek verilerin hem ulusal hemde uluslararası literatüre katkısı olabileceği kanaatindeyiz.

Bu kapsamda gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında 2 farklı Aspir bitkisi (*Carthamus tinctorius* L.) türüne ait toplam 2 çeşit kullanılmıştır. Kullanılan çeşitlere TRE-ASO12/08 (Türkiye) ve BDYAS-4 (ABD) NaCl ve tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresinin FAD2 geni ifade seviyesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tarım perlitine ekimi gerçekleştirilen Aspir çeşitleri 15 günlük fideler haline gelinceye dek iklim ve geliştirme dolabında Hoagland besi ortamı içerisinde yetiştirilmiş ve 3 ile 27 saat 100 mM tuz (NaCl) ve eş kuraklık stresine (PEG) maruz bırakılmıştır. çeşitlerin yaprak dokularından uygun zamanlarda örneklemeler alınarak RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Light Cycler Nano aracılığıyla Real-Time PCR analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda FAD2 geninin aspir bitkisinde hem tuz hem kuraklık stresine karşı olan savunma mekanizmasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda elde edilen tüm moleküler

verilerin ortak değerlendirilmesiyle fad2 geni ifadesinin çeşitlerin strese karşı direnç kabiliyetlerinin değerlendirilmesinde bir moleküler belirteç olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Gen ifadesi analizi sonuçları BDYAS-4 (ABD) çeşiti diğer çeşite göre kuraklık strese karşı daha dirençli olduğunu göstermiştir.

Ağustos 2015, 43 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aspir, FAD2, qRT-PCR, kuraklık ve tuz stres

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF FAD2 GENE mRNA LEVELS WITH qRT-PCR TECHNIQUE IN SAFFLOWER PLANTS (*CARTHAMUS TINCTORIUS*) SUBJECTED TO SALT AND DROUGHT STRESSES

Monireh HASANBAGLOU

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E.Sümer ARAS

Safflower (*Carthamus tinctorius*) is a plant of high food value as an oilseed. the mentioned oilseed contains 2 essential fatty acids, including oleic and linoleic fatty acids. This is why in such fields as food industry and the paint industry has widely used. In our country and around the world every day a bigger problem as we face the plants and in the efficiency of plants to salt and drought stress adversely affecting the elucidation of the mechanisms that they have, are among the most important issues of modern plant molecular biology. For this purpose, which will be held in the working thesis, which is responsible for the conversion of linoleic acid, oleic acid will be investigated for their possible role in stress response genes thought FAD2 and will be illuminated in relation to the stress of these genes. We believe that the data obtained may contribute to both national and international literature.

In this regard, we aimed to evaluate mRNA levels of FAD2 gene in 2 different ASPIR species TRE-ASO12/08 (Turkey) and BDYAS-4 (ABD) ,subjected to NaCl and PEG stress conditions. Aspir species which were grown in agricultural perlite for 15 days in a controlled environmental growth chamber were exposed to 3 and 27 hours of salt (NaCl) and drought (PEG) stress. RNA isolation, cDNA synthesis and Real Time PCR analysis using Light Cycler Nano instrument were performed with leaf tissues which were sampled at 3 and 27 hours of stress conditions. All results showed that FAD2 gene plays a key role in defence mechanism against both salt and drought stress. At the same time, usefulness of FAD2 gene for detection of tolerance capability of Aspir species against to salt and drought stress conditions was discovered based on the results obtained by analysis. Results of gene expression showed that BDYAS-4 (ABD) species were more resistant to drought stress conditions than the other species.

August 2015, 43 pages

Key Words: Safflower, FAD2, qRT-PCR, drought and salinity stresses

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan değerli danışmanım sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), her zaman maddi ve manevi destekte olan değerli aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

MONİREH HASANBAGLOU

Ankara, Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Aspir Bitkisinin Sistematik Yeri.....	3
2.2 Aspir Bitkisinin Biyolojisi.....	4
2.3 Aspir Aspir Bitkisinin Kullanım Alanları.....	5
2.4 Bitkilerde Stres.....	6
2.4.1 Bitkilerde kurak ve tuz stresinin fizyolojisi.....	7
2.4.2 Kuraklık stresi.....	8
2.4.3 Tuz stresi.....	9
2.4.4 Kuraklık ve tuz stresinin moleküler mekanizması.....	10
2.4.5 Fosfolpit sinyal yolağı.....	10
2.4.6 MAPK (mitogen activated protein kinase) dizileri.....	11
2.4.7 Fosfatazlar.....	12
2.4.8 Bitki hormonu olan ABA(ABSİSİK ASİT)	12
2.4.9 Kurak ve tuzluluk stresi ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollar.....	12
2.4.10 İyon homeostası ve SOS (Salt Overly Sensitive) sinyal iletimi.....	13
2.5 Yağ Asitleri.....	15
2.6 FAD Geni.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi.....	19
3.2 Aspir Çeşitlerinin Yetiştirilmesi.....	19

3.3 Besi Ortamının Hazırlanması.....	20
3.4 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması.....	20
3.4.1 100 mM tuz (NaCl) stresi.....	20
3.4.2 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi.....	21
3.5 Total RNA İzolasyonu.....	22
3.6 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi.....	23
3.7 Real-time PCR uygulaması.....	24
3.8 İstatistiksel Hesaplamalar.....	26
4. BULGULAR.....	27
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad
ACT	Aktin
B	bor
cDNA	Tamamlayıcı DNA
dH ₂ O	Distile su
FAD	fattyacid desaturase
CT	THRESHOLD CYCLE eşik değer döngü
CQ	cycle quantification
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
TBE	tris-brikasit –EDTA
DEPC	Diethyl pyrocarbonate treated H ₂ O
ABA	absisik asit
Ca (NO ₃) ₂ .	4H ₂ O Kalsiyum Nitrit
Ca ⁺²	Kalsiyum
Cl ⁻	Klor
CO ₂	Karbondioksit
CO ₃ ²⁻	Karbonat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat
DEPC	Dietil pyrokarnonat
EtOH	Etil Alkol
FeEDTA	Demir Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Ha	Ekim Alanı
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₃ BO ₃	Borik Asit
K ₂ SO ₄	Potasyum Sülfat
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Hidrojen Fosfat
L	Litre
M	Molar
Mg ⁺²	Magnezyum
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat
mM	Milimolar
MnSO ₄	Mangan Sülfat
mRNA	Haberci RNA
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NH ₄ Mo	Amonyum Molibdat
NO ⁻	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
OH	Hidroksil
p	fosfat
PEG	Polietilen Glikol
qPCR	Kantitatif PCR

RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOS	salt overly sensitive
SO ₄	Sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Çinko Sülfat
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Carthamus tinctorius</i> L.'un ülkemizdeki yayılış alanları	5
Şekil 2.2 Kurak ve tuz stresine karşı ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda gen ifadesinin belirlenmesi (Boudsocq ve Laurière 2005).....	13
Şekil 2.3 Tuz stresi altında SOS yolağı ile iyon homeostasisının düzenlenmesi (Mahajan vd. 2008).....	15
Şekil 3.1 Bitki büyütme kabininde uygun ortam koşullarında yetiştirilmek üzere steril tarım perlitine ekimi yapılmış aspir çeşitleri	20
Şekil 3.2 Bitki büyütme kabininde tuz ve kuraklık stresi uygulaması.....	22
Şekil 3.3 RNA izolasyonu örnek görüntüsü.....	23
Şekil 3.4 Light Cycler Nano (Roche) qRT-PCR cihazı	25
Şekil 4.1 qRT-PCR reaksiyonlarına örnek bir amplifikasyon eğrisi analizi görüntüsü.....	28
Şekil 4.2 qRT-PCR reaksiyonlarına örnek bir erime eğrisi analizi görüntüsü.....	29
Şekil 4.3 TRE-ASO12/08 ve BDYAS-4 aspir çeşitlerinde tuz ve kuraklık stresinin 3.saatinde gözlenen FAD2-8 geni mRNA seviyeleri.....	30
Şekil 4.4 TRE-ASO12/08 ve BDYAS-4 aspir çeşitlerinde tuz ve kuraklık stresinin 27. saatinde gözlenen FAD2-8 geni mRNA seviyeleri.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Dünyada aspir üretimi yapan ülkelerin, ekim, üretim ve verim durumu (2002) ülkeler.....	6
Çizelge 3.1 Aspir türüne ait 2 farklı hatların özellikleri.....	19
Çizelge 3.2 RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar Tayinleri.....	24
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan hedef ve referans gen primer dizileri.....	26

1. GİRİŞ

Türkiye gerek farklı iklimlere sahip olması gerekse üç floristik bölgenin kesişme noktasında bulunmasından dolayı bitki tür çeşitliliği bakımından dünyanın zengin ülkeleri arasında yer almaktadır (Atalay 1994; Arslan vd. 2002). Türkiye 11.000 civarında tohumlu bitki türüne sahip bir bölgedir. Tüm Avrupa ülkelerindeki endemik türlerin toplamı 2750 kadar iken, ülkemizde bu sayı 3000 civarındadır. Bitki türleri açısından ülkemiz %30 endemizm oranına sahiptir (Seçmen 2000).

Sıvı yağ tüketimi nüfuzada bağlı olarak giderek artmaktadır. Ülkemizde yıllık sıvı yağ açığının 700 bin ton olduğu düşünülmektedir. Sıvı yağ üretimindeki yıllık eksiklik ithalat yoluyla kapatılmaktadır. Bu açığın kapatılabilmesi , yağlı tohum üretiminin artırılması ve çeşitlendirilmesine bağlıdır. Ülkemizde giderek artış gösteren yıllık sıvı yağ açığı, alternatif yağ araştırmalarına yönelmeyi ön plana çıkarmaktadır. Sulanabilir arazilere ihtiyaç duyması nedeniyle ekimi yapılan mısır, ayçiçeği, zeytin, soya, pamuk, susam v.b. yağ bitkilerinin üretim alanları sınırlı kalmaktadır. Bu nedenden dolayı daha az yağış oranına gereksinim duyan ve toprak derinliği az, verimliliği düşük topraklarda bile yetişebilen aspir bitkisinin önemi artmaktadır. Aspir bitkisi, % 38'e kadar yağ içermesinden dolayı önemli bir yağ bitkisi olarak ön plana çıkmaktadır. (Coşge vd. 2007)

Aspir tohumlarından elde edilen yağ yüksek oranda doymamış yağ asitleri (% 78 linoleik asit) ve E vitamini içermektedir. Bu nedenle aspir bitkisinden elde edilen yağın insan beslenmesindeki önemi her geçen gün artmaktadır (Arslan vd. 1999; Öztürk vd. 2007)

Aspir bitkisinin, kurağa, soğuğa ve tuzluluğa karşı göstermiş olduğu tolerans, diğer yağ bitkilerine oranla daha yüksek olması, aspir bitkisinin ülkemizdeki yağ bitkilerinin tarımı bakımından önemini de arttırmaktadır. Aspir bitkisi, kurak bölgelere karşı göstermiş olduğu yüksek adaptasyondan dolayı dünyada önemi gittikçe artan değerli bir yağ bitkisidir. Olumsuz koşullara karşı göstermiş olduğu yüksek toleransa rağmen,

Türkiye’de aspir bitkisi yeterince tanınmadığı ve öneminin farkına varılamadığı için ma bugüne kadar tarımında önemli bir gelişme olamamıştır (Uysal vd. 2006).

BU tez çalışmasında, 100 mM tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresine maruz bırakılmış 2 farklı aspir çeşidinde (TRE-ASO12/ 08 VE BDYAS-4) stresin 2 ve 27. saatlerinde FAD2-8 geninin mRNA düzeyleri qRT-PCR tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmada stresle ilişkili olabileceği düşünülen FAD2-8 geni aspir bitkisinde oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olduğu düşünülen FAD2 gen ailesine dahil bir gendir.

2. GENEL BİLGİLER

Sistematiik olarak Aspir bitkisi (*Carthamus tinctorius L.*), Magnoliopsida (iki enekliler) sınıfı, Asterales takımı, iekli bitkilerin en büyük ailesi olan Asteraceae (papatyagiller) familyası, Carduoideae alt familyası *Carthamus* cinsi içerisinde yer alan bir bitki türüdür.

2.1 Aspir Bitkisinin Sistematiik Yeri

Sınıf	: Magnoliopsida (İki enekliler)
Takım	:Asterales
Familiya	:Asteraceae (Papatyagiller)
Alt Familiya	:Carduoideae
Cins	: <i>Carthamus</i>
Tr	: <i>Carthamus tinctorius</i>

Ülkemiz florasında Asteraceae (Compositae) familyasına bağlı 130 cins ve 1130 tür bulunmaktadır. Bu familyaya mensup olan *Carthamus L.* cinsi dünyada 25 kadar tür ile temsil edilmektedir. Ayrıca *Carthamus L.* cinsinin Anadolu florasında *C. lanatus L.*, *C. dentatus Vahl.*, *C. persicus Willd.*, *C. glaucus Bieb.*, *C. tenuis* (Bois ve Balansa) türlerinin de içinde bulunduğu 8 türün Anadolu florasında bulunduğu belirtilmektedir (Şekil 2.1.) (Davis 1975).

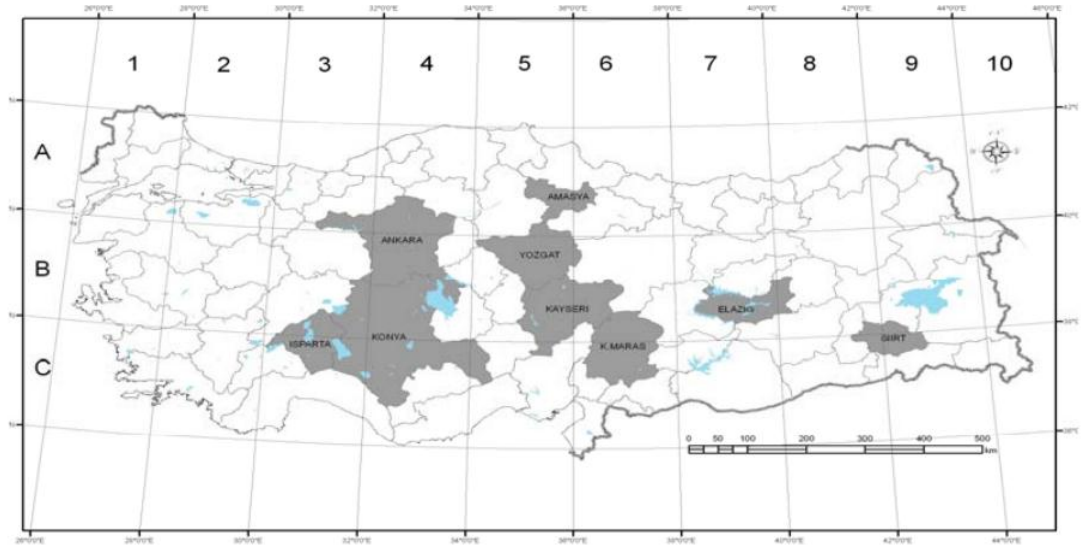
Aspir, yetiştirildiği coğrafyalarda, bölge halkı tarafından farklı şekillerde isimlendirilmektedir (Dajue ve Mündel, 1996). Aspir bitkisi ülkemizde yalancı safran olarak bilinmesinin yanı sıra dikenli ayçiçeği, zerdeçal, haspir, kır safranı, papağan yemi, Amerikan safranı ve boyacı aspiri gibi isimlerle de anılmaktadır. Kayıtlarda geçen diğer yalancı safran adları: „aspir“, „agnisikha“, „asfiore“, „assfore“, „kahil“, „asfrole“, „brarta“, „hebu“, carthami flos“, flase“, ghurtom“, golzardu“, kajena-goli“, kamal lotarra“, kar“, karar“, kazhirak“, khariah“, kharkool“, khartum“, khasdonah“,

„kouchan-gule“, ma“, maswarh“, ostur“, saffiore“ , snecus“, su“, suban“, zaffrole“, zaffrone“.

Aspir bitkisinin köken aldığı bölgenin Güney Asya olduğu tahmin edilmektedir(Babaoğlu,2006). Türklerin Orta Asya'dan Anadolu'ya göçü ile de, Anadolu coğrafyasının aspir bitkisi ile tanışmış olduğu düşünülmektedir. Aspir bitkisinin tarımına Avrupa kıtasında orta çağ döneminde başlanırken, Amerika coğrafyasında ise ancak Amerika kıtasının keşfinden sonra başlanabilmektedir (Babaoğlu, 2006).

2.2 Aspir Bitkisinin Biyolojisi

Aspir bitkisinin de dahil olduğu Compositae familyasının çiçek yapısı genel olarak birleşik toplu bir yapı sergiler. Aspir bitkisi 25-45 cm boylarında, gövdesi ise tüysüz parlak yapıdadır. Dikenli ve dikensiz formları olan aspir bitkisinin, dikenli formların dikensizlere göre daha fazla yağ oranı içermektedir. Diken yapıları genellikle bitkinin ilk yapraklarında bulunmaz, ancak bitkinin daha üst kısımların da özellikle tomurcuk oluşumu safhasında gövde dikenleri gelişir ve gelişen bu dikenler bitkinin çiçeklenme aşamasında oldukça güçlü ve sert bir yapı haline gelirler (Dajue ve Mündel, 1996). Gövde yaprakları tüysüz, yeşil, yumurtamsı, sapsız, kenarları düzgün ya da sivri yapıdadır. Dallanma gösteren çalimsı tipteki yapıya sahip olan aspir tek yıllık dikotil bir bitkidir. Yaprak yapısı ise, gövde üzerinde sarmal diziliş gösterir ve her noddan bir yaprak çıkar. Kazık kök yapısına sahip olan aspir bitkisinin kökleri yaklaşık olarak 2.5-3.0 m derinliklere kadar gidebilmektedir. Fillariler sivri, yumurtamsı, ağsı tüylüdür. Çiçekler sarı-turuncu renklidir. Ortalama bir ceviz büyüklüğünde olan normal çiçek tablası (1.5-3.5 cm) üzerinde bulunan çiçeklerin sayısı 20-180 arasında değişmektedir (Knowles 1982). Kurumuş çiçeklerde en sık rastlanan renkler sarı, turuncu, kırmızı, beyaz ve krem renklerinin farklı tonlarıdır (Esendal 1988, Knowles 1982). Aspir yüksek oranda kendine döllen bir kültür bitkisidir. Fakat, çeşitlerin genotipine ve üretiminin yapıldığı çevre koşullarına bağlı olarak, yüksek oranda yabancı döllenme de olabilir. Hatta bu yabancı döllenme oranı zaman zaman % 60-70'lere varabilir (Li ve Mündel 1996).



Şekil 2.1 *Carthamus tinctorius* L.'un ülkemizdeki yayılış alanları

2.3 Aspir Bitkisinin Kullanım Alanları

Aspir bitkisinin çiçekleri çay olarak Çin'de sıklıkla tüketilmektedir. Aspir bitkisinin çiçeğinde bulunan bazı amino asitler, mineral maddeler ve vitaminler (B1, B2, B12, C ve E) nedeniyle faydalı bir içecektir (Wang 1999, Rahammatalla 1998). Aspir bitkisi tıbbi olarak, kadınların regl dönemlerinin yanı sıra, kalp-damar rahatsızlıklarında ve travma sonucu meydana gelen şişliklerin tedavisinde ağrı kesici olarak kullanılmıştır (Hotta 2002, Bocheva 2003). Bu kullanımların doğruluğu, yapılan klinik ve laboratuvar çalışmaları ile de desteklenmiştir.

Ortadoğu ve Afrika ülkelerinde, Hindistan da aspir bitkisi, zehirlenmelerde panzehir olarak kullanılmıştır (Kneusel 1994) . İran'da, aspir tohumlarından elde edilen salça kıvamındaki madde, peynirin mayalanmasını hızlandırmak için kullanılmıştır. Bu maddenin, beyaz peynire hoş bir koku ve yumuşaklık verdiği bildirilmektedir (Okamoto 2005). Bangladeş'te, aspir tohumları öğütülüp hardal yağı ile karıştırılarak romatizmaya karşı ilaç olarak kullanılmaktadır (metinbabaloglu@ttae.gov.tr). Aspir bitkisinin çiçekleri bazı Ortadoğu ve Asya ülkelerinde pilav, çorba, sos, ekmek ve turşulara katılarak yemeklerin sarı ve parlak turuncu renk almaları sağlanmıştır.

Yağı alındıktan sonra geriye kalan kısım ortalama %25 oranında protein içermesinden dolayı hayvancılık alanında yem olarak kullanılabilir. Aspir bitkisinin tohum kabukları daha yoğun ve sert yüzeyli kağıt yapımında; hafif ve gözenekli fırınlanmış tuğla ve seramik yapımında; yalıtım işlerinde dolgu maddesi olarak da kullanılabilir (metinbabaloglu@ttae.gov.tr).

Çizelge 2.1 Dünyada aspir üretimi yapan ülkelerin, ekim, üretim ve verim durumu (2002) ülkeler

Dünyada Aspir Üretimi yapan Ülkelerin (2002)	Ekim Alanı (Ha)	Üretim (Ton)	Verim (Kg/da)
Hindistan	404.100	226.000	55.9
Meksika	52.758	52.855	100.2
ABD	79.320	135.160	170.4
Etiyopya	72.000	38.000	52.8
Avustralya	35.000	26.000	74.3
Türkiye	30	15	50
Dünya	756.055	577.555	76.4

2.4 Bitkilerde Stres

Bitkiler, kurak ve tuz stres koşullarını tolere etmek ve olumsuz koşullarda hayatta kalabilmek için çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Bartels ve Sunkar 2005). Bu adaptasyon mekanizmaları:

- 1) Homeostasi; iyon homeostasi (temel olarak tuz stresi ile ilgilidir), ozmotik homeostasi veya ozmotik uyum,
- 2) Stres hasar kontrolü ve tamiri veya detoksifikasyon,
- 3) Büyümenin kontrol altına alınması olmak üzere üç grupta incelenmektedir (Zhu 2001b).

Buna göre kurak ve tuz stres sinyali ise; hücrel homeostasının yeniden düzenlenmesi için iyonik ve ozmotik stres sinyali, stres hasarının kontrolü ve tamiri için detoksifikasyon sinyali, hücre bölünme ve uzaması için koordinasyon sinyali olmak üzere üç fonksiyonel gruba ayrılabilir (Zhu 2002).

Bitkinin tuz ve kuraklık stresi karşısında oluşturduğu hücrel cevap oldukça kompleks bir yapıda olmakla birlikte pek çok moleküler mekanizmayı da içermektedir (Wang vd. 2003). Kuraklık ve tuz stresi toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının ortaya çıkartılması da stres ile ilgili genlerin ifadelerinin aydınlatılmasına dayanmaktadır. Stres yollarında olan bu genler temel olarak;

1- MYC, MAP kinaz, SOS kinaz, fosfolipazlar ve HSF, CBF/DREB, ABF/ABAE (Stockinger ve ark. 1997; Choi ve ark. 2000; Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2000)

2- Isı şok proteinleri ve şaperonlar, LAE proteinleri, osmoprotektanlar ve serbest radikal uzaklaştırıcıları gibi membranların ve proteinlerin korunmasında doğrudan fonksiyonu olan genler (Vierling 1991, Ingram ve Bartels 1996, Bray vd. 2000, Thomashow 1998, Thomashow 1999),

3-Akuaporin ve iyon taşıyıcıları gibi su ve iyon alımı ve taşınmasında rol alan proteinler (Maurel 1997, Serrano vd. 1999, Tyerman vd. 1999, Zimmermann ve Sentenac 1999, Blumwald 2000)

olmak üzere üç grupta incelenebilir.

2.4.1 Bitkilerde kurak ve tuz stresinin fizyolojisi

Kuraklık ve tuzluluk koşulları tarımsal alanlarda ürün verimini ve ürünün kalitesini önemli ölçüde etkileyen çevresel faktörlerdendir. Bitkiler kuraklık ve tuzluluk stresine karşı morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere çeşitli uyumsal mekanizmalar geliştirerek, strese karşı dayanıklılık göstermektedirler. Strese karşı gösterilen mekanizmalar birbirleriyle ilişkili olup, stres proteinlerinin üretilmesi, antioksidanların ifadesinde meydana gelen artış, osmolitlerin birikmesi gibi hücrel

cevaplar meydana getirerek, strese karşı cevap vermeye çalışırlar (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2000, Knight ve Knight 2001, Zhu 2001a, Zhu 2002).

2.4.2 Kuraklık stresi

Bitkilerde kuraklık stresine karşı geliştirilmiş en önemli mekanizma olarak transpirasyon yoluyla su kaybının azaltılması gelmektedir. Bitki hormonu absisik asit (ABA) aracılığıyla bitkilerdeki stomaların kapatılması gerçekleştirilir (Mahajan ve Tuteja 2005). Absisik asit ile stomaların kapatılmasının yanı sıra kalsiyum konsantrasyonundaki değişim ilede stomaların kapatılması gerçekleştirilmektedir (Wilkinson vd. 2001). Stomaların kapanması Rubisco aktivitesinde düşüş meydana gelirken, bu azalmaya bağlı olarak da CO₂ alınımında düşüş yaşanmakta ve gerçekleşen fotosentez oranında azalma meydana gelmektedir (Bota vd. 2004).

Hücre içi CO₂ seviyesindeki düşüş, sonucunda elektron taşıma sistemindeki bileşiklerin fazla oranda azalmasına neden olur ve elektronlar oksijeni fotosistem 1'e transfer eder (Medrano vd. 2002). Bu durum sonucunda hücrede süperoksit, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidrosil radikallerini içeren ROS'lar meydana gelir (Mahajan ve Tuteja 2005). Kloroplast zarları, ROS'un aşırı miktarda üretimi nedeniyle oksidasyon stresinin neden olduğu hasara karşı oldukça hassastır. ROS, membranlarda yer alan lipidlerde de önemli ölçüde peroksidasyon ve de-esterifikasyona neden olabilir ve protein denatürasyonuna ve nükleik asitlerin mutasyonuna yol açabilir (Bowler vd. 1992). Bitkilerde kuraklık stresinin yol açtığı diğer olumsuz bir etmen ise sürgün gelişiminin yavaşlamasıdır. Kuraklık koşullarında bitki yaprak yüzeyini küçülterek transpirasyonu azaltır, böylece kuraklık stresine karşı tolerans oranını yükseltmiş olur. Birçok bitki kurak şartlarda yaşlanma sürecini ve yaşlı yaprakların absisyonunu (ayrılma) hızlandırırken, kökler ise toprağın derin katmanlarındaki suya ulaşabilmek için kök sisteminin geliştirilmesi şeklinde adaptasyon sağlar (Mahajan ve Tuteja 2005).

Bitkilerin kuraklık stresine karşı göstermiş olduğu morfolojik değişimlerin yanı sıra strese karşı moleküler düzeyde de geliştirilen mekanizmalar bulunmaktadır.

Fosfolipitlerin hidrolizi, denatüre proteinleri uzaklaştıran LEA (late embryogenesis abundant)/dehidrin genleri ile moleküler şaperonların ve proteinazların ifade düzeylerindeki değişiklikler, ROS'ların üretilmesi gibi genlerin ifadesi ve protein düzeyinde meydana gelen değişimler, strese karşı geliştirilen moleküler mekanizmalar arasındadır (Zhu 2002). Ayrıca kuraklık stresine karşı bitkide ozmotik dengenin sağlanmasında, membranların ve makromoleküllerin korunmasında anahtar rol oynayan prolin, glutamat, glisin-betain, karnitin, mannitol, sorbitol, fruktan, poliol, trehaloz, sükroz, oligosakkarit gibi çok sayıda bileşik sentezleyerek su kaybına karşı hücrenin direnç kazanmasını sağlamaktadır (Hoekstra vd. 2001, Ramanjulu ve Bartels 2002).

2.4.3 Tuz stresi

Bitkinin büyümesi ve gelişmesi üzerinde önemli bir etki meydana getiren diğer faktör ise tuz stresidir. Tuz stresi bitkinin gelişmesini iki farklı şekilde etkilemektedir. İlk olarak; bitkinin topraktan su alma yeteneğini azaltarak büyümeyi yavaşlatır. İkinci olarak; tuz stresinin iyon dengesine olan etkisidir (Munns 2005). Tuz stresi iyon dengesini (Na^+ , Cl^-) bozarak hücrenin ölmesine neden olmaktadır. Bitkide iyon dengesinin bozulması sonucunda Na^+ oranında meydana gelen aşırı düzeydeki artış, fotosentezin azalmasına, membran poransiyelinin bozulması, ROS üretimi gibi olumsuz etkilerin meydana gelmesine sebep olmaktadır (Mahajan ve Tuteja 2005). Tuz stresinde aynı zamanda ozmotik homeostasiyi etkilemektedir. Bozulan homeostasi, turgor basıncının düşmesine ve hücre hacminin değişmesine sebep olmaktadır (Chinnusamy ve Zhu 2004).

Stomaların kapanmasında rolü olan Ca^{+2} iyonu ve ABA tuz stresinde de önemli rol oynamaktadır. Kalsiyum başlangıç sinyalinde rol almakta (Albrecht vd. 2003) ve tuzstresi durumunda 5-10 saniye içinde sitozolik Ca^{+2} miktarında artış meydana gelmektedir (Chinnusamy ve Zhu 2004). ABA ise, tuz stresi durumunda daha uzun sürede artarak çeşitli ozmotik stres cevap genlerini ve iyon taşıyıcıların regüle etmektedir (Munns, 2002, Uno vd. 2000, Shen vd. 2001, Hoth vd. 2002, Chinnusamy ve Zhu 2004). Bitkiler ozmolit üretimi gerçekleştirerek, iyon homeostası değiştirilerek

dengelenmesi, ROS'ların ortamdan uzaklaştırılması gibi değişimler oluşturularak tuz stresine karşı koymaya çalışırlar (Maggio vd. 2003).Tuz stresi ile ifadesi değişen genler ise, iyon transportırları ve iyon kanalları, uyumlu çözünenler ve ozmoprotektanların üretiminde rol alan enzimlerin yanı sıra, transkripsiyon faktörleri, detoksifikasyon enzimleri ve sinyal yolaklarından oluşmaktadır (Zhu 2001b, Kreps vd. 2002, Seki vd. 2003; Gu vd. 2004, Takahashi vd. 2004, Munns 2005, Rensink vd. 2005, Sahi vd. 2006).

2.4.4 Kuraklık ve tuz stresinin moleküler mekanizması

Stres toleransının oluşması sırasında meydana gelen moleküler değişimlerin ortaya konulması, stresle ilgili moleküllerin genom düzeyinde ifadesine dayanmaktadır (Wang vd. 2003). Stresle ilgili genler erken devreye giren genler ve geç devreye giren genler olmak üzere iki grupta toplanabilirler. Erken devreye giren genler, stres sinyali hücre tarafından algılandığında baskılanırlar. Genel olarak transkripsiyon faktörü bu grubun içerisinde yer almaktadır. Ayrıca erken devreye giren gen gruplarının ifadeleri genellikle kısa sürelidir. Geç devreye giren gen gruplarında ise gen ifadeleri sürekli (Mahajan ve Tuteja 2005). LEA benzeri proteinler,hücresel bütünlüğün sürdürülmesinde sorumlu olan genler ve moleküler şaperonlar ise gen devreye giren gen grupları arasında gösterilebilir (Zhu 2002, Mahajan ve Tuteja 2005, Cramer vd. 2007). Bitkilerin ozmotik stresi algılama mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte moleküllerin birbiri ile etkileşimi sonucunda sinyal iletiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Fosfolipit sinyali, protein kinazlar, fosfatazların pek çok sınıfı gibi ozmotik stres sinyal ileticileri, sinyal iletiminde rol oynayan bileşenlerdir (Bartels ve Sunkar 2005).

2.4.5 Fosfolipit sinyal yolağı

Membran fosfolipitleri inositol 1,4,5 trifosfat (IP3), diaçilgliserol (DAG), fosfotidikasit (PA) gibi çoklu sinyal moleküllerinden oluşan bir sistemdir (Zhu 2002). Fosfolipaz C enzimi aktifleşerek , fosfotidilinositol 4,5 bifosfatı (PIP2) hidroliz eyoluyla IP3 ve

DAG'a ki protoplastlarda ikincil mesajcı olarak görev sahipler kataliz eder. IP₃ yüksek miktarda protoplasta birikir ve, Ca⁺²'u serbest bırakır. Sitozolik Ca⁺² miktarı değişmesinden dolayı, Ca⁺² sensörleri (kalsiyum bağlayıcı proteinler) tarafından algılanır ve sensör proteinleri yani, kinazlar ve fosfatazlar gibi fosforilasyon kaskadlar aktif hale gelir ve böylece temel stres cevap genleri veya bu genlerin transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek strese cevap oluşması sağlanır (Mahajan ve Tuteja 2005).

2.4.6 MAPK (mitogen activated protein kinase) dizileri

MAPK (mitogen activated protein kinase) dizileri (Bartels ve Sunkar 2005), hiperozmotik stres ile aktifleşerek, hücredeki ozmolit miktarında yükselmeye sebep olurlar (Gustin vd. 1998). Ozmolitlerin birikimi ile LEA tip stres genleri baskılanarak tamir mekanizmasının düzenlenmesinde görev alırlar. Düzenlenme görevinin yanı sıra ozmotik dengenin yeniden düzenlenmesini sağlayarak stres baskısı altındaki hücreyi stresin yol açtığı hasardan korurlar (Mahajan ve Tuteja 2005). Bitkilerde hiperozmotik stres sonucunda aktivasyonu gerçekleşen çok sayıda MAPK kaskadları bulunmaktadır. Yonca bitkisi üzerinde yapılan çalışmada tuz stresi ile indüklenen (salt-stres-inducible) SIMK (MAPK (46 kD)'nın (Munnik ve ark. 1999), tütün bitkisi (*Nicotiana sp.*) üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, MAPK benzeri SIPK (salicylic-induced protein kinase)'nın hiperozmotik stres sonucunda aktivasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir (Mikołajczyk vd. 2000). Mayalarda bulunan diğer bir protein kinaz ailesi SNF1/AMP-aktive protein kinazlar (SNF = sucrose-nonfermenting) analizi sonucunda ATP/AMP oranına bakılarak karbohidrat metabolizması ile ilgili enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonu ile anabolizma ve katabolizmanın arasındaki değişimin kontrolü gerçekleştirilir. Bazı kinazlar bitkilerde dehidrasyona ve ABA'ya cevap olarak indüklenebilmektedirler (Bartels ve Sunkar 2005). CDPKlar (calcium dependent protein kinases=kalsiyum bağımlı protein kinaz), ozmotik stresin yanı sıra kalsiyum sinyalinin de iletilmesini sağlayan kinazlardır (Zhu 2002).

2.4.7 Fosfatazlar

Protein kinaz enzimlerinin aktivasyonu fosfatazların modülasyonu ve fosforegülatör mekanizmanın dönüşümü sonucunda oluşmaktadır. Fosfatazlar etki ettikleri maddelere göre, fosfoproteinler ve fosfotirozinler olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirler (Cohen 1989).

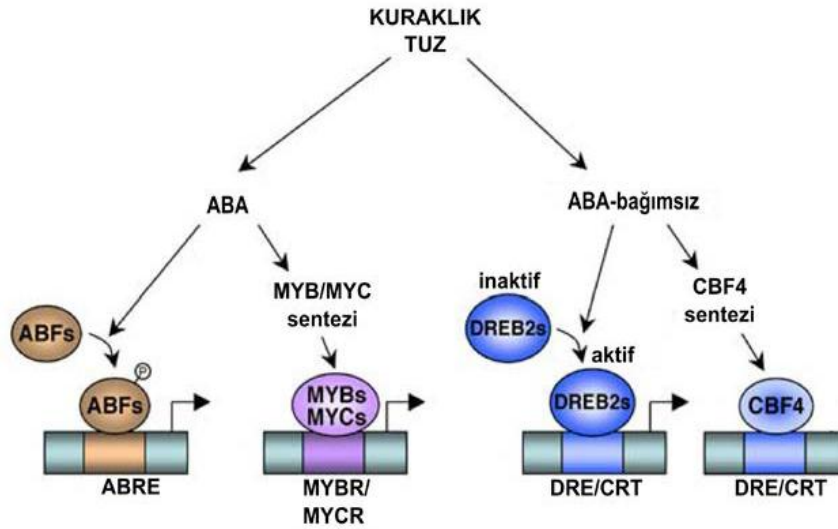
2.4.8 Bitki hormonu olan ABA(abisik asit)

Çimlenmenin engellenmesi, tohum dinlenme döneminin teşviki, büyümenin düzenlenmesi, meyvenin olgunlaşması gibi bitki gelişiminin birçok sürecinde önemli bir bitki hormonu olan ABA düzenleyici rol oynamaktadır. (Finkelstein vd. 2002, Parent vd. 200, Raghavendra vd. 2010). Ayrıca ABA düzenleyici hormonu, bitkilerde abiyotik strese cevapta içsel (endojen) mesajcı olarak görev üstlenmesinden dolayı aynı zamanda stres hormonu olarak da isimlendirile bilmektedir. Fizyolojik çalışmalar, bitki metabolizmasında kurak ve tuz stresi koşullarında gen ifadesi değişimlerine paralel olarak yüksek miktarda ABA birikiminin olduğunu göstermektedir (Fujii vd. 2009; Ma vd. 2009; Park vd. 2009; Kang vd. 2010; Kuromori vd. 2010). ABA-noksan (ABA-deficient) ve ABA-duyarlı (ABA-insensitive) mutant bitkilerle yapılan çalışmalarda, kurak ve tuz stresi koşullarına maruz bırakılmış bitkilerdeki sinyal iletiminin hem ABA'ya bağlı, hem de ABA bağımsız metabolik yollarla enzim spesifik fosfatazlar mayalarda MAPK metabolik yolağında önemli rol oynarlar (Shiozaki ve Russell 1995).

2.4.9 Kurak ve tuzluluk stresi ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollar

Kurak ve tuzluluk stresi ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarındaki, ABF (ABRE binding factor)/AREB (ABA responsive element binding protein), MYC (myelocytomatosis)/MYB (myeloblastosis), DREB2 (drought responsive element binding) ve NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transkripsiyon faktörlerine ait gen anlatımlarını aktive olmasına sebep olur. Bu transkripsiyon faktörleri tuz ve kuraklık streslerine karşı değişik düzeylerde transkript düzenlenmesi gösterir (Agarwal ve Jha 2010). AREB/ABF ve MYC/MYB gibi transkripsiyon faktörleri ve bZIP (basic leucine

zipper factor), ABRE, MYCR, MYBR transkripsiyon faktörleri iki farklı mekanizma ile ABA'ya bağlı olarak strese cevap verirler. Ayrıca, bağlı olmayan durumlarda ise DREB proteinleri, ABA'ya DRE aracılığı ile strese cevap yolağını aktivasyonunu gerçekleştirirler (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Kurak ve tuz stresine karşı ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda gen ifadesinin belirlenmesi (Boudsocq ve Laurière 2005)

ABA'nın stresle indüklenen metabolitlerin düzenlenmesinde görev aldığı ABA ve abiyotik stres ile ilgili yapılan son çalışmalar ile ortaya konulmuştur. ABA veya yüksek tuzluluğa maruz bırakılmış Arabidopsis bitkisinde metabolit profilleri karşılaştırıldığında ABA bağımlı ve ABA bağımsız basamaklarda tuz stresi ile indüklenen metabolitlerin yeniden düzenlendiği bulunmuştur. (Kempa vd. 2007, Urano vd. 2009).

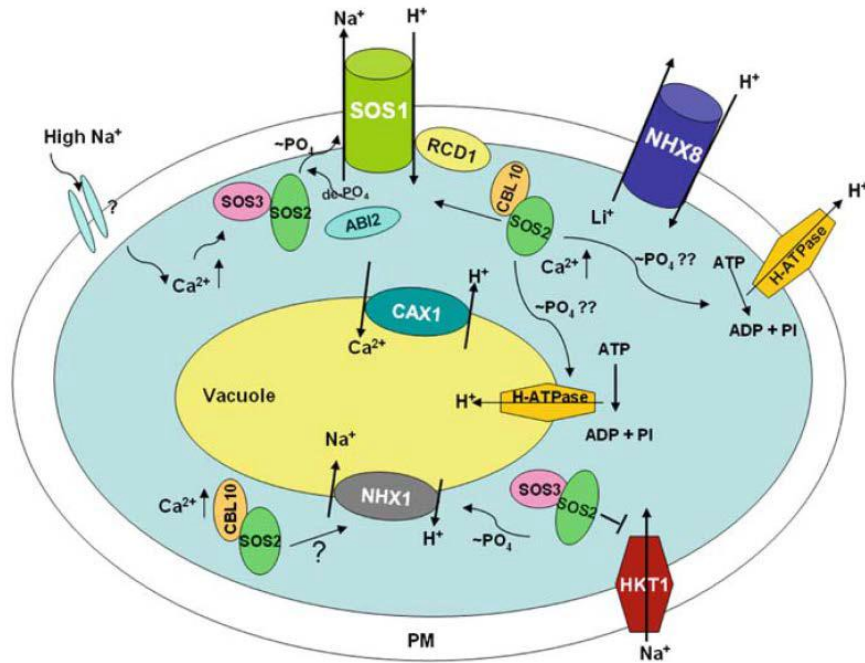
2.4.10 İyon homeostası ve SOS (Salt Overly Sensitive) sinyal iletimi

Tuzluluk stresi boyunca hücredeki iyon homeostasının (dengesi) düzenlenmesi bitkinin tuza karşı göstermiş olduğu tolerans açısından büyük önem taşır. Tuz stresi hücrede bulunan Na^+ ve Cl^- iyonlarının derişimlerinin bozulmasına sebep olur. Ayrıca hücredeki K^+ ve Ca^{+2} iyonlarının da kararlılığının de bozulmasına neden olmaktadır. (Niu vd. 1995). Hücre dışında bulunan Na^+ iyonları, hücre dışında bulunan K^+ iyonunun hücre

içine akışını olumsuz etkilediği gibi hücrenin temel besin maddelerinin de alımını azaltır (Knight vd. 1997).Tuz stresine maruz kalmış bitkide hücrede bulunan iyon taşıyıcılar Na^+ yonunun aşırı derecede hücre içerisinde birikmesini 3 farklı mekanizma ile düzenler. Bu mekanizmaları şu şekilde özetleyebiliriz.

- 1) Na^+ taşıyıcıları Na^+ 'un bitkiye girişi ve hücre içine birikimini sınırlayarak hücre zarı geçirgenliğini azaltırlar.
- 2) Na^+ 'un vakuolde biriktirilmesi ile iyon düzenlenmesi gerçekleştirilir.
- 3) Sitozolik Na^+ iyonunun membran Na^+/H^+ taşıyıcıları ile hücre dışına taşınması ile gerçekleştirilir (Bartels ve Sunkar 2005).

Tuz stresine karşı hücrenin göstermiş olduğu yanıtlardan biri sitozolik Ca^{+2} miktarındaki artış ve Ca^{+2} sensör proteinlerinin aktifleşmesidir (Knight vd. 1997). Kalsiyum sensörü olan SOS3 tarafından sitozolik Ca^{+2} miktarı algılanır. SOS2 ile (bir serin/treonin protein kinaz) etkileşir ve böylece SOS2 yolağını aktif eder (Halfter vd. 2000; Liu vd. 2000). SOS2-SOS3 protein kinaz bileşimi, SOS1(membran Na^+/H^+ antiportu) aktive ederek hücredeki fazla Na^+ 'u hücre dışına aktarır(Shi vd. 2002). SOS2-SOS3 kompleksinin meydana getirdiği bir diğer etki ise HKT1 geninin ifadesinde azalma meydana getirerek HKT1 proteini inaktif konuma getirmektir. Böylece Na^+ un hücreye girişini engellemiş olur (Zhu 2002). SOS2, NHX (vakuol Na^+/H^+ antiportu) ile etkileşime girerek, NHX'i aktif hale getirir ve aşırı Na^+ 'un vakuolde birikimini sağlayarak hücre sel iyon homeostazisine katkı sağlamış olur (Mahajan vd. 2008). Na^+ homeostazisinin yanı sıra,SOS2geni CAX1 (bir $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$ antiportu olan) ile de etkileşime girerek CAX1'in aktivitesini düzenler. Böylece SOS2, hücre sel Ca^{+2} homeostazisinin de korunmasını sağlar (Şekil 2.3) (Cheng vd. 2004).



Şekil 2.3 Tuz stresi altında SOS yoluğı ile iyon homeostasisının düzenlenmesi (Mahajan vd. 2008)

2.5 Yağ Asitleri

Aspir bitkisinin tohumu yüksek oranda yağ içermektedir. Aspir bitkisinin soğuk, kuraklık ve tuzluluk gibi faktörlere karşı göstermiş olduğı yüksek tolerans nedeniyle özellikle dünyanın kurak ve yarı kurak coğrafyalarında yetiştirilmektedir.

Aspir bitkisi bünyesinde içerik olarak oleik (C18:1) linoleik (18:2) ve linolenik asit (C18:3) barındırmaktadır (Camas ve Esendal, 2006). Linoleik asit kandaki kolesterol düzeyini azaltıcı etki meydana getirmektedir. Aspir bitkisinin yağı içerik olarak % 6-8 oranında palmitik asit, % 2-3 oranında steraik asit, % 16-20 oranında oleik asit ve % 71-75 oranında linoleik asit'den meydana gelmektedir. Yağlı tohuma sahip bir bitkinin içerdiği yağ asiti kompozisyonu, o bitkinin yağ kalitesinin göstergesidir (Velasco ve Fernandez-Martinez 2001).

Aspir bitkisinin barındırdığı yağ asitlerinin kompozisyonu ve sahip olduğı yağ asidi içeriğı, tarımsal uygulamalarda önemli sonuçlar meydana getirmektedir (Cosge vd. 2007, Irving vd. 1988). Aynı şekilde aspir bitkisinin yağ asidi içeriğı ve kompozisyonu,

bitkinin çevre koşullarına karşı toleransını da etkilemektedir (Knowles ve Ashri 1995). Genotip ve yağ asitlerinin bileşimi üzerindeki çevresel etkilerin iyi anlaşılması, kısıtlayıcı çevresel faktörlerin yağ kalitesini üzerindeki etkisinin belirlenmesinde son derece önemlidir.

Lipidler, hücre zarının hayati yapısal bileşenlerinde bulunabildikleri gibi hücrenin depolama ürünü olarak da göreve yaparlar. Plazma zarlarının lipid kompozisyonu çevre şartları değiştikçe farklılaşmaktadır. Bu değişiklikler dış düzensizliklere karşı direnç göstermek, zarın membran akışkanlığını korumak ve işlevselliğini sürdürmek için hayati öneme sahiptir. Tuzluluk oranı, yağ asidi bileşimini değiştiren önemli çevresel faktörlerden biridir (Smaoui ve Chérif 2000). Bazı araştırmalara göre membran doymamış yağ asitlerinin oranı, tuz stresine karşı fotosentez mekanizmasının işlevselliğini korumada önemli rol almaktadır (Allakhverdiev vd. 2001).

Çevresel değişkenlerden olan kuraklık stresi ürün elde edilmesinde negatif etki oluşturmaktadır. Kuraklık stresine karşı bitkide tepki olarak tolerans ve duyarlılık gibi davranış değişiklikleri oluşabilmektedir. Bitkiler kuraklık stresine karşı üç farklı adaptasyon geliştirmişlerdir.

1-Yaşam sürelerini kısa süre tutarlar.

2-Dehidrasyondan korunarak depoladıkları su seviyesini yüksek tutarlar.

3-dehidratasyon toleransı sağlamak için geniş bir ölçüde fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler oluşturulması bitkiye düşük su potansiyeline (mekanik direnci, membran parçalanma mekanizmaları gibi) karşı izin vermektedir.

Tuz stresi, oleik asit (C18:1) miktarında önemli bir artışa neden olmaktadır. Bunun yanı sıra linoleik asit (C18:2) ve linolenik asit (C18:3) asit oranlarında önemli azalmalar meydana getirmiştir. Yapılan çalışmalarda, tuzluluk stresine maruz bırakılmış bitkilerde oleik asit desatüráz inhibasyonu ve tuz düzeyine karşı tolerans ve duyarlılık gösteren genotiplerin vermiş olduğu cevaplar araştırılmıştır. Bitkiler, abiyotik ve biyotik strese uyum sağlamak için membran yapılarında değişiklik yaparlar ve membran da α -

linolenik (C18:3) asit içeren lipid artış meydana gelir. yağ asit desaturazların etkisi sonucunda Membranın akışkan yapısındaki değişimlere yol açıp yani doymamış yağ asit seviyesinde değişiklikler ortaya çıkar ve bu fonksiyon yağ asit desaturazları aktivitesinde düzenleme meydana getirir. Membran akışkanlığı ayarlaması stres sırasında kritik integral proteinlerin fonksiyonu için uygun bir ortam sağlar. α -linolenik asit içeren membran lipidinin yükseltilmesi düzenlenmiş lipaz aktivitesinin düzenmesiyle gerçekleşir (Upchurch 2008) .

2.6 FAD Geni

Yağ asiti biyosentezi yolağında yağ asidi desaturazlar (FAD) ve elongazlar önemli görevleri olan enzimlerdir (Warude vd. 2006). Yağ asitlerinin desaturasyonu, bitkilerin yağ biyosentezi esasında önemli bir süreç oluşturmaktadır. Meydana gelen bu süreç, doymuş ve doymamış yağ asit miktarlarının belirlendiği bir süreç olup, sinai uygulamalarda kullanılan yağın son kullanım tarihinin belirlenmesine yol açar (Knutzon vd.1992, Mikkilineni ve Rocheford 2003). Yağ asitlerinde bulunan hidrokarbon zincirindeki çift bağların oluşumunda yağ asit desaturazları görev alır. FAD2 ve FAD3 yağ asit desaturazları, enzim aktivitesinden sorumludurlar (Shanklin ve Cahoon 1998, Los ve Murata 1998).

Bitkisel yağların kullanımı ve besin değeri büyük ölçüde yağ asid kompozisyonuna bağlıdır. Özellikle oleik asit ve linoleik asitin nisbi oranı bitkisel besin değerini ve bitkisel yağların kullanımını etkilemektedir. Mikrozomal oleyol, fosfatidil kolin desaturaz, FAD2 genleri tarafından kodlanır ve fosfatidilkolinin oleik asitinin Δ 12 pozisyonunda bir çift bağ yaparak onu linoleic asite çevrilmesinde rol oynarlar.

Bilinen bitki fad2 enzimleri, 1-4 üyeden oluşan küçük bir gen ailesi tarafından kodlanırlar. Ayrıca, klasik oleat Δ 12 desaturazın aktivitesine ek olarak sınırlı sayıda FAD2'nin fonksiyonel varyasyonlarına alternatif yada acyl modifikasyonlar edilebilen görevleri bilinmektedir. Bitki hücrelerinde zarin yüksek düzeyde doymamış yağ asidi içermesi yaygın olarak görülen bir özelliktir. Doymamış yağ asitlerinden iki tip yağ asidi desaturaz enzimi sorumludur. Endoplazmik retikulumda FAD2 geni ve

plastidlerde FAD6 geni iki ω -6 desatürazların kodlanmasından sorumludurlar. Bunlar ω -6 pozisyonunda çift bağ yaparak oleik asit (18:1) linoleik aside (18:2) dönüştürmede görev alırlar. Ayrıca endoplasmik retikulumda bulunan FAD3 geni ve plastidlerde bulunan FAD7 ve FAD8 geni üç tane ω -3 desatüraz kodlanmasından sorumludurlar. desatürazlar, linoleik asidin (C18:2) ω -3 pozisyonunda çift bağ meydana getirerek, linolenik asite (18:3) dönüştürürler. FAD2 geni, tohum gelişiminde doymamış yağ asidi sentezinden sorumlu olduğu için temel bir enzimdir. (Cao vd. 2013). FAD2 geninde meydana gelen mutasyon sonucunda oluşan ve fonksiyonlarını kaybetmiş olan mutant formlarında tuz stresine karşı gösterilen aşırı duyarlılık, vaküolar / plazma Na^+/H^+ antiporter aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır. Ayrıca mutant formlarda sitosolik Na^+ birikimi de meydana gelmektedir. FAD2, tuz ve osmotik strese karşı aşırı hassas bir genidir. *Arabidopsis thaliana* da FAD2 geni vaküoler ve plazma membranının Na^+/H^+ değiştiriciler aktivitesinde yüksek düzeyde rol oynar ve sitosol de Na^+ konsantrasyonunu azaltır böylece tohum çimlenmesi ve erken fide büyümesi sırasında tuza dayanıklılık kazandırılması sağlanır (Zhang vd. 2012)

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitkisel Materyalin Temini

Araştırmada bitkisel materyal olarak Aspir (*C. tinctorius*) türüne ait toplam 2 çeşit kullanılmıştır. Kullanılan çeşitler TRE-ASO12/08 (Türkiye) ve BDYAS-4 (ABD) çeşitleridir. Çalışılacak çeşitlerin temini Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TRE-ASO12/08 çeşitleri) ve Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden BDYAS-4 (ABD) sağlanmıştır.

Çizelge 3.1 aspir türüne ait 2 farklı çeşitlerin özellikleri

Morfolojik ve teknolojik özellikler	BDYAS-4	TRE-ASO12/08
Bitki Boyu	80-100 cm	90-100 cm
Dallanma	Yüksek	İyi
Yapraklar	Orta	Orta
Dikenlilik	Dikenli	Dikenli
Çiçek Rengi	Önce sarı sonra turuncuya döner	Sarı
Tohum Rengi	Beyaz	Krem
Protein (%):	14-16	14
Yağ Oranı (%)	34-36	39-41

3.2 Aspir Çeşitlerinin Yetiştirilmesi

Araştırmamızda temin edilmiş olan aspir tohumları yüzey sterilizasyonunun ardından steril perlit içeren bitki yetiştirme kaplarına ekilmiştir (Şekil 3.2). 2 farklı aspir çeşidi fide haline gelinceye dek iklim ve geliştirme dolabında günlük 16 saat (25 °C) gündüz, 8saat (22 °C) gece döngüsünde yetiştirilmiştir.



Şekil 3.1 Bitki büyütme kabininde uygun ortam koşullarında yetiştirilmek üzere steril tarım perlitine ekimi yapılmış aspir çeşitleri

3.3 Besi Ortamının Hazırlanması

Aspir (*C. tinctorius*) tohumları 25 gün süre ile aşağıda içeriği bulunan 1/10 luk Hogland besi ortamı içerisinde geliştirildi. Buna göre çözeltideki son iyon konsantrasyonları 2mM Ca, 10^{-6} M Mn, 4mM NO_3 , $2 \cdot 10^{-7}$ M Cu, 1mM Mg, 10^{-8} M NH_4 , 2mM K, 10^{-6} M Zn, 0.2 mM P, 10^{-4} M Fe ve 10^{-6} M B olacak şekilde; makro besin içerikleri; K_2SO_4 (15.7 g), KH_2PO_4 (2.7 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (24 g), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (47.23 g) ve KCl (0.0746 g) ayrı ayrı 2'şer L dH_2O içerisinde çözüldü. Böylece 10 L 10X makro besin elementi hazırlandı. Mikro besin içerikleri; H_3BO_3 (0.124 g), MnSO_4 (0.066 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.100 g), NH_4Mo (0.048 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1553 g) 1 L dH_2O içerisinde çözdürdük. Her 10 L 10X makro besin elementi için 50 ml makro besin elementi karıştırdık ve hazırlanan bu çözelti 1/10 seyreltilerek ve her 1L 1X konsantrasyondaki solüsyona 1 ml 1000 X FeEDTA solüsyonundan eklenerek kontrol çalışma ortamı olarak kullandık (1000 X FeEDTA hazırlayabilmek için 365 g FeEDTA 1 L dH_2O içerisinde çözdürdük).

3.4 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması

3.4.1 100 mM tuz (NaCl) stresi

5 lt 1/10 Hoagland besi ortamına NaCl son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 29,22 g NaCl eklenmiştir. Elde edilen 100 mM NaCl solüsyonunun osmotik basıncı

yaklaşık olarak 190 mmol/kg olarak belirlenmiştir. 15 günlük bitkiler her kap içerisinde 10 fide olacak şekilde 100 mM NaCl içeren 3 kap içerisine alınmış, iklim ve geliştirme odasında tutularak 0., 3., ve 27. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Stresin erken ve geç etkilerini gözlemlemek amacıyla 3. ve 27. saatler seçilmiştir. 2 zaman dilimi arasında (3 ve 27) 24 saat bırakılmasının sebebi gen ifadesi düzeylerinde sirkadiyan saat kontrolüyle oluşabilecek istenmeyen değişiklikleri önlemektir. Örneklem alımları yaprak ve kök olmak üzere 2 farklı dokudan gerçekleştirilmiş olup hedef örnekler sıvı azot ile muamele edilerek RNA izolasyonu aşamasına kadar korunmak üzere -80^{oC} derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.4.2 100mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi

100mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi oluşturmak amacıyla; 1/10 kontrol Hoagland besi ortamına 100 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturacak şekilde, yapay kuraklık oluşturmak amacıyla gerekli PEG 6000 miktarları tespit edilmiştir. Bu sayede tuz ve kuraklık stresleri dengeli olarak uygulanmıştır. Besi ortamına PEG 6000 belirli aralıklarla ve düşük miktarlarda ilave edilerek osmotik basıncı ölçülmüş, 100 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturan madde miktarı tespit edilmiştir (% 15,955) (Şekil 3.5). 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi için hazırlanan PEG 6000 solüsyonları benzer şekilde iki gerçek yapraklı bitkilere 27 saat süre ile uygulanarak örneklem alımı tuz stresi ile aynı saatlerde (0., 3. ve 27. saatlerde) yapılmıştır. Örneklem alımları yaprak ve kök olmak üzere 2 farklı dokudan gerçekleştirilmiş olup hedef örnekler sıvı azot ile muamele edilerek RNA izolasyonu aşamasına kadar korunmak üzere -80^{oC}'e kaldırılmıştır.



Şekil 3.2 Bitki büyütme kabiniinde tuz ve kuraklık stresi uygulaması

3.5 Total RNA izolasyonu

Muhafaza edilen bu örneklerden RNA izolasyonu Trizol protokolüne (Chomczynski ve Mackey 1995) göre Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyolojisi araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Buna protokole göre:

Alınan örnekler sıvı azotta ezilir.

2 ml'lik tüpe 1ml trizol eklenir.

Üzerine 300-500 mg örnek eklenir.

Elle tüp kuvvetli bir şekilde sallanarak karışım sağlanır, vortekslenir ve örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.

Üzerine 250 µl kloroform eklenir ve karıştırılır.

Oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.

14.000 rpm de 4°C de 10 dk santrifüj edilir ve üst sıvı yeni bir tüpe aktarılır.

Üzerine 250 µl 1.2 M NaCl, 250 µl 0.8 M Na-sitrat ve 250 µl izopropanol eklenir.

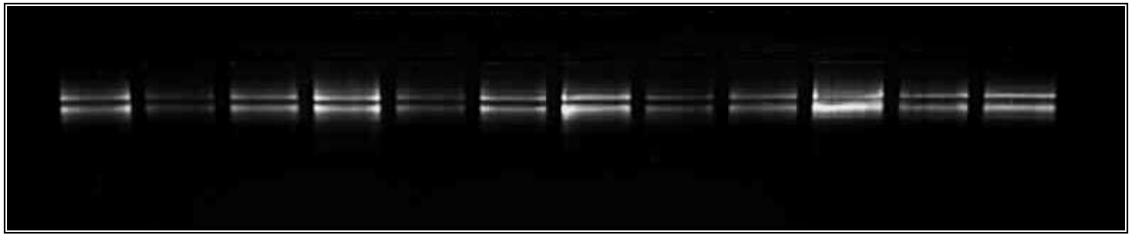
tercihen -20 °C de 10 saat veya gece boyu bekletilir.

14.000 rpm de 4 °C de 10 dk santrifüj edilir, üst sıvı atılır (pellet bu aşamada tüp dibinde görülmelidir.)

Pellet %70'lik EtOH ile yıkanır ve dikkatlice kurutulur.

20-50 µl DEPC muamele edilmiş suda çözündürülür.

Trizol protokolüne göre izole edilecek olan RNA'ların Nanodrop spektrometre aracılığı ile saflık ve miktar tayini yapılmıştır ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek saflıkları teyit edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.3 RNA izolasyonu örnek görüntüsü

3.6 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği yöntemle göre Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyolojisi Araştırma laboratuvarında bulunan PCR cihazı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Bu aşamada farklı cDNA sentez primerleri olan Random Hexamer Primer ve Anchored- oligo(dT)18 ayrı ayrı denenmiş ve Anchored- oligo (dT)18 primerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca saf RNA miktarı için 1 ng ile 4 µg arasında farklı miktarlar denenmiş ve elde edilen cDNA örneklerinde saflık ve miktar tayini yapılmıştır.

Çizelge 3.2 RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

NO	3saat Stres Uygulaması	A260/280	ng/ul
1.	BDYAS- Kontrol	1.84	1848.9
2.	100 mM Tuz BDYAS	1.85	1632.5
3.	100 mM PEG BDYAS	1.84	1629.9
4.	TRE-ASO Kontrol	1.85	1621.3
5.	100 mM Tuz TRE-ASO	1.73	1111.2
6.	100 mM PEG TRE-ASO	1.84	1836.8
NO	27saat Stres Uygulaması	A260/280	ng/ul
1.	BDYAS- Kontrol	1.85	1585.6
2.	100 mM Tuz BDYAS	1.85	1713.9
3.	100 mM PEG BDYAS	1.85	1631.8
4.	TRE-ASO Kontrol	1.83	1659.8
5.	100 mM Tuz TRE-ASO	1.85	1741.8
6.	100 mM PEG TRE-ASO	1.85	1692.6

3.7 Real-Time PCR Uygulaması

“Real-time PCR” teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürün miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son yıllarda kullanılmaya başlamış bir yöntemdir. Floresan ışımaya tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi ile birlikte bilinen “PCR” geliştirilerek oluşturulan teknik gen anlatım çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır (Klein,D. 2002). “PCR” çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla “ Gerçek Zamanlı –Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)”, “İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT)”, “Floresan RT-PZR” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (Kubista 2008).

Real-Time PCR uygulaması Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyolojisi Araştırma laboratuvarında yer alan Light Cycler Nano (Roche)

cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil3.7).



Şekil 3.4 Light Cycler Nano (Roche) qRT-PCR cihazı

Real Time PCR reaksiyonu komponentleri

Komponent	Son Konsantrasyon
cDNA	2 µg
Forward Primer	0.5 µM
Reverse Primer	0.5 µM
SYBR Green Master boyası	4
Saf su, PCR-grade	14
Toplam hacim	20 µl'dir.

Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

Primer	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	15 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 s	40
Bağlanma	65 °C	20 s	
Uzama	72 °C	20 s	

Çalışmada hedef gen olan FAD2-8 genine ait primer dizisi NCBI veri tabanından elde edilmiştir. Kullanılan primerlere ait diziler Tablo 3.7’ de verilmiştir. Ayrıca ekspresyon çalışmaları için gerekli şartlardan birisi olan normalizasyon işleminde housekeeping gen olarak ACT geni kullanılmıştır. Real-Time PCR yöntemi ile kantitasyon (miktar belirleme = gen ekspresyonu miktarı belirleme) çalışması SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kantitasyonu takiben PCR’ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla Melting Analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan hedef ve referans gen primer dizileri

Primer	İleri	Geri
FAD2-8	GAGCAACGGAGAGAAGTAACC	GAGGGATGATAGAAAGAGGTCC
ACT (Aktin)	CAATGTTCCCGCCATGTAT	CGACCACTGGCATAAAGAGAA

3.8 İstatistiksel Hesaplamalar

Verilerinin istatistiksel olarak değerlendirmesi Kenneth J. Livak ve Thomas D. Schmittgen 2001’e ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre ve One Way ANOVA (Dunnett)’a göre yapılmıştır. Bu yolla farklılaşan gen ekspresyon (konsantrasyon ve Ct değeri olarak belirlenecek) sonuçlarının housekeeping gen olarak seçilen ACT genine göre normalizasyonu yapılmıştır.

4. BULGULAR

Gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında biri ulusal (TRE-ASO12/08) ve diğeri Amerika kökenli (BDYAS-4) iki farklı aspir bitkisi çeşiti seçilerek farklı sürelerde 100 mM NaCl ve eşdeğerde kuraklık (PEG) stresi uygulanmıştır. 2 farklı aspir bitkisi hattına ait yaprak numunelerinde stres savunması ile ilişkili olabileceği düşünülen FAD2-8 geninin ifade seviyeleri belirlenmiş ve genin strese karşı geliştirilen tolerans mekanizmasındaki etkisi araştırılmıştır.

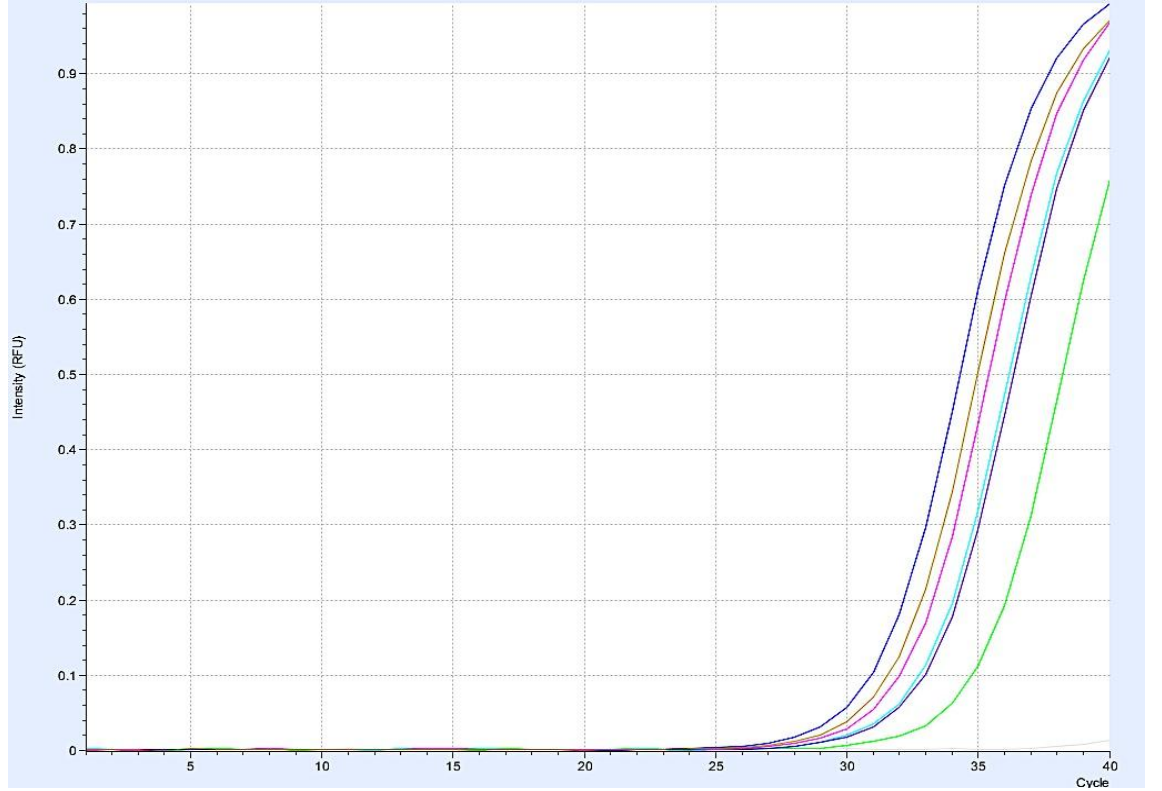
Gen ifadesi seviyelerinin tespiti kantitatif eş zamanlı PCR (Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu PCR çeşidi günümüzde yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel bir PCR yöntemidir. Kantitatif eş zamanlı PCR, reaksiyon sırasında her döngü sonunda oluşan ürün miktarının, boya ya da probların hedef bölgeye hibridize olması sonucu oluşan ışımının (floresans) kamera ile görüntülenmesiyle gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenmesine olanak tanıyan bir metottur.

Kantitatif eş zamanlı PCR, oluşan ürüne bağlanan ışınım veren raportöre gereksinim duyar. Raportör oluşan ürün miktarını yansıtan floresans sinyal oluşturur. PCR döngüleri sonucunda oluşan kısa sekanslara ampikon adı verilir. Başlangıç PCR döngülerinde kantitatif gerçek zamanlı PCR’da sinyal zayıftır. Sinyalin güçlenmesi ampikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik seviyeye ulaşması için gereken döngü sayısına CT (threshold cycle = eşik değer döngü) veya CQ (Cycle quantification) değeri adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri CT veya CQ değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak artar (Kubista vd. 2006). Eş zamanlı PCR’da floresans raportörler kullanılmaktadır. Hedef bölgenin çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği anda floresan raportörlerden alınan sinyal artan miktarda gözlenir. Kullanılan raportörler moleküler beacon, Taqman prob, hibridizasyon probu, LightUp prob, simple prob, scorpion primer ya da SYBR Green ve BOXT0 gibi boyalar olabilir (Kubista vd. 2006).

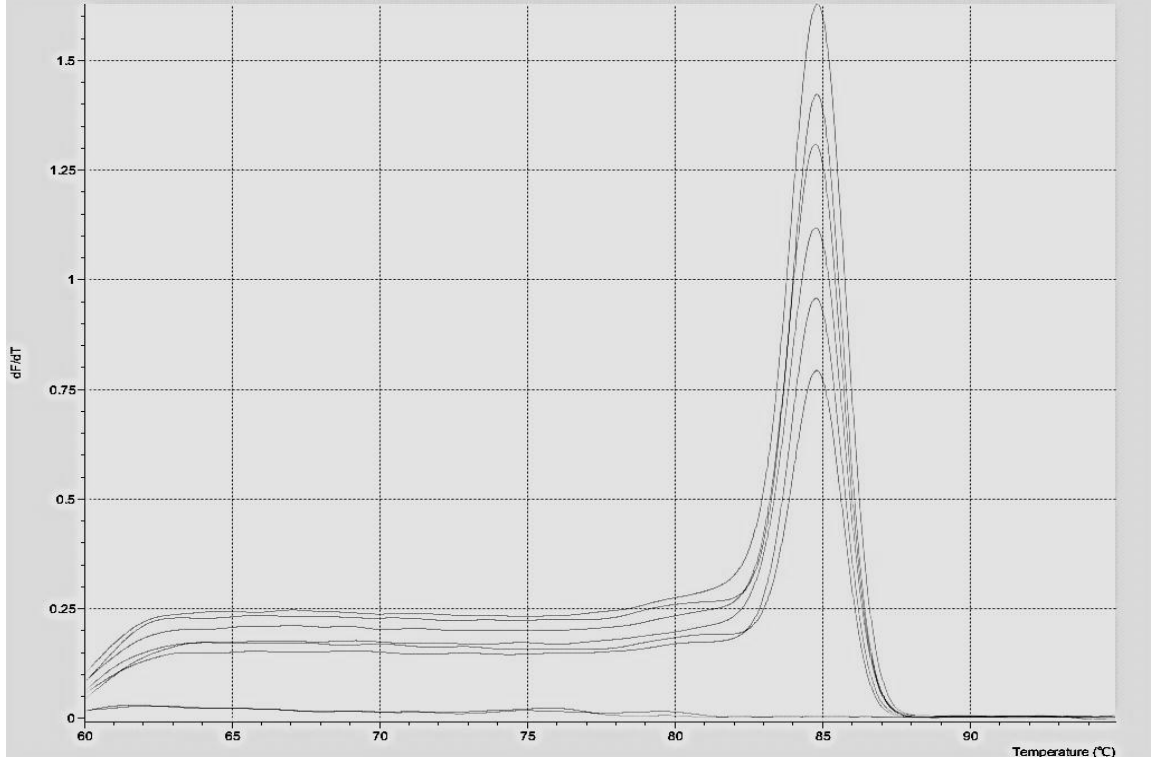
Hedeflenen genlerin stres koşulları altındaki davranışlarının Real-Time PCR yöntemiyle takip edilmesi genlerin fonksiyonlarının sınanmasına ve stresle ilişkili olan genlerin tanımlanmasına olanak tanımaktadır. Bu kapsamda gerek ulusal gerek uluslararası

düzeyde Real-Time PCR yöntemi kullanılarak yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Wu vd. 2004, Soydam vd. 2013).

qRT-PCR reaksiyonlarından elde edilen sonuçların normalize edilerek analiz edilmiş ve primerlerin özgünlüğü erime eğrisi analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1-4.2).

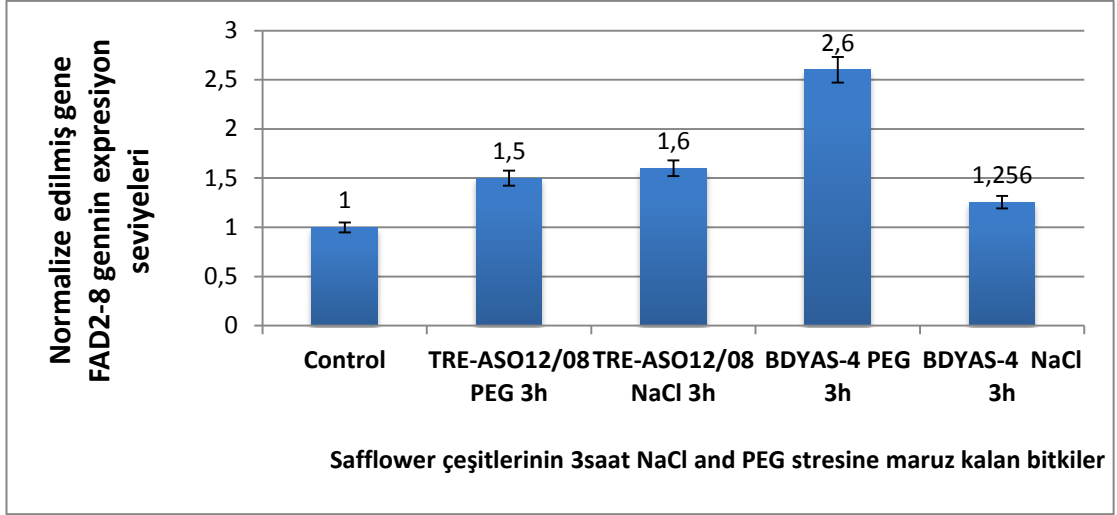


Şekil 4.1 qRT-PCR reaksiyonlarına örnek bir amplifikasyon eğrisi analizi görüntüsü



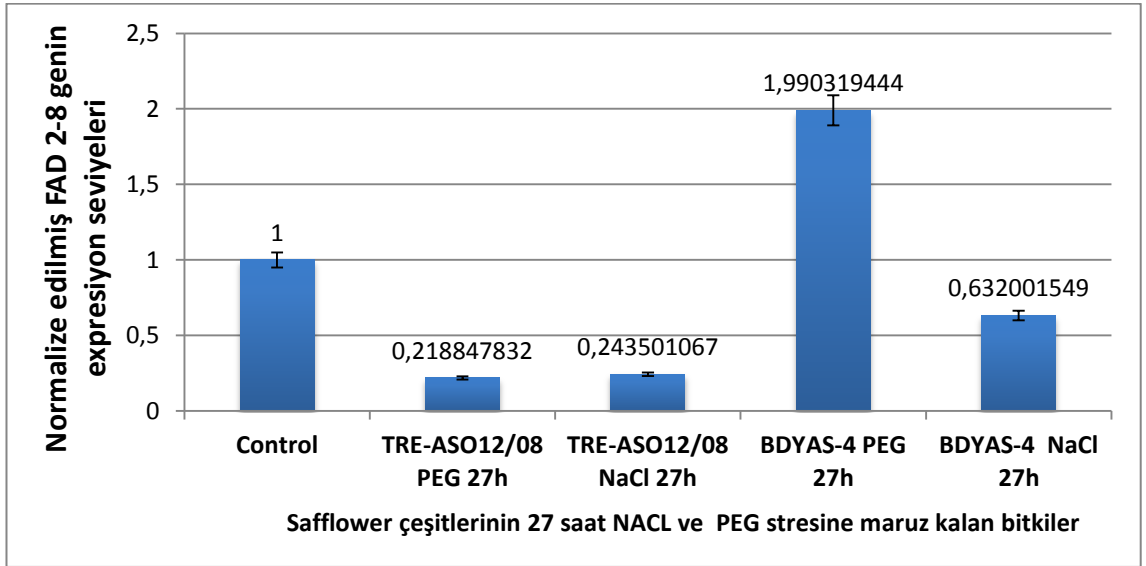
Şekil 4.2 qRT-PCR reaksiyonlarına örnek bir erime eğrisi analizi görüntüsü

qRT-PCR analizleri sonucunda hem tuz hemde kuraklık stresinin her 2 aspir çeşitinde stresin 3. saatinde FAD2-8 geninin ifadesinde kontrole göre istatistiki olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği görülmektedir. Ulusal aspir çeşiti olan TRE-ASO12/08' türkiye de hem tuz hem kuraklık stresi altında FAD 2-8 geni ifade düzeyinde kontrole göre yaklaşık 1.5 katlık bir artış olduğu görülmektedir. Amerika kökenli olan BDYAS-4 çeşitin de ise kuraklık stresinin 3. saatinde gen ifadesi artışının kontrole göre yaklaşık 2.8 kat kadar fazla olduğu görülmektedir. Tuz stresinin 3. saati dikkate alındığında FAD 2-8 geni ifade seviyesinin en yüksek olduğu çeşit TRE-ASO12/08 olarak göze çarparken, kuraklık stresinde bu durumun tersi olarak gen ifadesinin en yüksek olduğu çeşit BDYAS-4 (ABD) olarak belirlenmiştir. Bu durumun Amerikan çeşiti olan BDYAS-4'(ABD)ün 3 saatlik kuraklık stresine karşı daha dayanıklı olabileceğini gösteren bir bulgu olabileceği kanaatindeyiz.



Şekil 4.3 TRE-ASO12/08 ve BDYAS-4 aspir çeşitlerinde tuz ve kuraklık stresinin 3. saatinde gözlenen FAD2-8 geni mRNA seviyeleri

27 saat tuz stresine maruz bırakılan 2 aspir bitkisi çeşitlerin de FAD2-8 geni mRNA seviyelerinin kontrole göre düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Ancak BDYAS-4 çeşitler gen ifadesinde azalışın aksine kontrole göre ciddi bir artış olduğu belirlenmiştir. 27 saat tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılan TRE-ASO12/08 ve BDYAS-4 çeşitlerinin FAD2-8 mRNA seviyeleri bakımından mukayese edilmesi durumunda ise, TRE-ASO12/08'in gen ifadesinin en fazla düşüş yaptığı çeşit olduğu ve FAD2-8 geninin hem tuz hemde kuraklık stresleri altında neredeyse aynı oranda ifade olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.4 TRE-ASO12/08 ve BDYAS-4 aspir çeşitlerinde tuz ve kuraklık stresinin 27. saatinde gözlenen FAD2-8 geni mRNA seviyeleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aspir yalancı safran, Amerikan safranı ve boyacı safranı olarakta bilinen, tek yıllık geniş yapraklı, sarı, kırmızı, turuncu, beyaz renkli çiçekleri olan, dikenli ve dikensiz tipte yapraklı, kuraklığa karşı dirençli ve ortalama yağ oranı %30 ile 50 arasında olan bir yağ bitkisidir. Güney Asya orjinli olduğu, milattan önce ekildiği ve Mısır'dan yayıldığı kabul edilmektedir (Arıoğlu vd. 2010, Kolsarıcı ve Eda. 2002). Günümüzde dünyada yayılış gösteren 25 yabancı türünün olduğu bilinmekte ve bu yabancı türlerin bir kaçı (örneğin, *Carthamus lanatus* ve *C. dentatus*) Türkiye'nin değişik bölgelerinde doğal ortamlarda rahatlıkla görülebilmektedir (Babaoğlu 2007, Patel ve Narayana 1935, Richharia ve Kotval 1940, Ashri ve Knowles 1960, Singh ve Nimbkar 2006).

FAD veya fad genleri desaturaz enzimlerini kodlayan genlerdir. Desaturaz enzimlerinin yağlık bitkilerin çoğunda oleik asidin linoleik aside çevriminden sorumlu olduğu bilinmektedir. Yüksek oleik içeriğe sahip çeşitlerde özellikle çiçeklenmeden hemen sonra bu enzim bloke edilerek çok az linoleik asit üretilebilmektedir. İlk FAD2 geninin *Arabidopsis thaliana*'da klonlanışının ardından, soya fasulyesi, pamuk, kolza, yer fıstığı ve keten gibi farklı bitki türlerinde, ortoloğu olan DNA dizileri karakterize edilmiştir. *Arabidopsis* haricinde diğer bitki türlerinde FAD2'nin küçük gen aileleri tarafından kodlandığı bilinmektedir. Örneğin, soya fasulyesinde FAD2 kodlayan üç farklı gen ailesi üyesi bulunurken bu sayı pamuk bitkisinde dördüttür (Cao vd. 2013). Ancak gerçekleştirilen literatür taramasında aspir bitkisinde bu konuda gerçekleştirilmiş olan çalışmaların oldukça az sayıda olduğu gözlenmiştir. Özellikle FAD genlerinin aspir bitkisinde stres koşullarına karşı verilen cevaptaki rollerine dair çalışmaların noksan olduğu görülmektedir. Bu sebeple gerçekleştirilen bu tez çalışmasında FAD2 gen ailesinin üyeleri (FAD2-1...FAD2-11) taranarak aralarından FAD2-8 geni seçilmiştir. 2 farklı aspir bitkisi çeşidinde 3 ve 27 saat tuz ve kuraklık stresine maruz kalınması durumunda FAD2-8 geninde strese karşı oluşan cevabın mRNA düzeyinde incelenmesi hedeflenmiştir.

Elde edilen verileri mukayese etmek amacıyla gerçekleştirilen literatür araştırmasında FAD2 genleri ve stres cevabına dair çalışmaların noksan olduğu görülmektedir. (Baldini vd. 2002) araştırmasında aspir bitkisine yakınlığı ile bilinen ayçiçeği tohumlarında su noksanlığı stresi durumunda C18:1/C18:2 oranında artış olduğu görülmüştür yani linoleik asit birikimi artmıştır. (Baldini vd. 2002) çalışmasından elde edilen bu sonuçlar FAD2 gen ailesi üyelerinin ifade düzeylerinin artmasından ileri gelebilir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da stres koşullarına cevap olarak FAD2-8 geni ifadesinde 3. saatte gözlenen artış bu araştırmayı destekler niteliktedir.

(Zhang vd. 2012)'nın *Arabidopsis thaliana*'da gerçekleştirdikleri çalışmada yüksek konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış FAD2 mutant aspir çeşidi ile col-0 (Kolombiya yabani tip) çeşidi strese dayanıklılıkları bakımından mukayese edilmiştir. 5 günlük fideler MS besiyeri içeren petride 200 ve 250 mM NaCl stresine maruz bırakılmışlardır. 10 gün boyunca stres ortamında yetiştirilen bu bitkilerde yaşam süreleri göz önünde bulundurulduğunda strese maruz bırakılmamış FAD2 mutant ve yabani kontrol aspir çeşitlerinde benzerlik gözlenmiştir. Stres koşulları göz önünde bulundurulduğunda ise FAD2 mutant çeşidin 200 veya 250 mM NaCl içeren besiyerindeki gelişiminin yabani tipe göre daha az olduğu saptanmıştır. Diğer bir ifade ile yabani tip NaCl stresinden daha az oranda etkilenmiştir(Zhang J vd. 2012). bu çalışmasının sonuçları NaCl stresine karşı olan dayanıklılık ile FAD2 geni arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır ve bu tez çalışmasından stresin 3. saatinden elde edilen veriler ile paralellik göstermektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında tuz ve kuraklık stresinin FAD2-8 geni üzerindeki erken ve geç etkilerini araştırmak amacıyla 3. ve 27.saatler ele alınmıştır. qRT-PCR analizlerinden elde edilen veriler ışığında 3. Saatte her iki stres koşulunda da hem BDYAS hemde TRE-ASO aspir çeşitlerinde FAD2-8 mRNA düzeylerinin kontrole göre artış gösterdiği, ancak 27. saatte kontrolün altında ifade sergilediği saptanmıştır. Bu durumun FAD2-8 geninin stresin ilk saatlerinde strese karşı olan savunmada rol oynayabileceğinin bir işareti olabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca 3. Saatte tuz ve kuraklık streslerinin karşılaştırılması durumunda kuraklık stresi altındaki BDYAS çeşidinde FAD2-8 geni mRNA düzeyinin diğer koşullara oranla oldukça yüksek olduğu göze

çarpmaktadır. Bu artış kontrolün neredeyse 2.5 katı kadardır. Kuraklık stresi altında BDYAS çeşidinde FAD2-8 geni mRNA düzeyinde gözlenen bu ciddi artışın bu çeşidin kuraklık stresine karşı olan dayanıklılığının TRE-ASO çeşidinden daha fazla olabileceği görüşünü uyandırmaktadır.

Her iki stresin 27. saatinde ise yine kuraklık stresine maruz kalan BDYAS çeşidi haricinde diğer tüm koşullarda kontrole göre ciddi bir düşüş olduğu saptanmıştır. BDYAS çeşidinde kontrole kıyasla mRNA düzeyinin yaklaşık olarak 2 kat fazla olması 3. Saatte elde edilen verilerle uyumluluk göstermektedir. Bu sonuç BDYAS çeşidinin kuraklığa karşı daha dayanıklı olabileceği ihtimalini arttırmaktadır.

Şimdiye kadar farklı bitkilerde tanımlanmış ve analiz edilmiş FAD genlerinin büyük çoğunluğunun çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak kuraklık periyodunun başlangıcında en üst seviyelerde ifade olduğu ve ilerleyen saatlerde keskin düşüşler sergilediğine dair literatur bilgisi bulunmaktadır (Brands ve Ho 2002, Wang vd. 2002, Barrera-Figueroa vd. 2007, Kavar vd. 2008).

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen bulgular FAD2-8 geninin aspir çeşitlerinde strese karşı olan savunmada rol oynayabileceğini gözler önüne sermektedir. Ayrıca FAD2-8 geninin farklı aspir çeşitlerinin tuz ve kuraklık streslerine karşı olan dayanıklılıklarının değerlendirilmesinde bir moleküler belirteç olarak kullanılabileceği görüşünü ortaya koymaktadır. Bilindiği üzere gelecekte artacağı tahmin edilen dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için gerekli temel besin maddelerinin üretiminin arttırılmasına ihtiyaç vardır. Markörler yardımıyla erken seleksiyon önemli bir konu oluştururken, genetik manipulasyonlar kullanılarak strese karşı dayanıklı çeşitler geliştirmek de günümüz bitki biyoteknolojisinin özel konuları arasındadır. Genetik manipulasyonların yapılması için öncelikle şüpheli olan genlerin kontrollü şekilde sınanmaları gerekmektedir. Bu çalışma ile FAD2-8 geninin aspir bitkisinde bu ileri çalışmalar için iyi bir aday gen olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ashri, A. and P.F. Knowles.1960.Cytogenetics of safflower(*Carthamus L.*) species and their hybrid.*Agron.J.*52: 11-17
- Agarwal, P. and Jha, B. 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54(2); 201–212.
- Akınerdem, F. ve Öztürk, Ö. 2007.Biyoyakıtlar ve Enerji Tarımı. Enerji Güvenliği, Enerji Tarımı. Küresel Isınma Açısından Biyoyakıtlar Uluslararası Semp: 06 Nisan 2007 TOBB Üniversitesi, Ankara.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, U., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., and Kudla, J. 2003. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 36(4); 457–470.
- Allakhverdiev, S.I., Kinoshita, M., Inaba, M., Suzuki, I., and Murata, N. (2001). Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt-induced damage in *Synechococcus*. *Plant Physiology*, 125, 1842–1853.
- Arioğlu, H.H., Kolsarıcı, Ö., Göksu, A.T., Güllüoğlu, L., Arslan, M., Çalışkan, S., Söğüt, T., Kurt, C. ve Arslanoğlu, F. 2010. Yağ Bitkileri Üretiminin Artırılması Olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisleri Birliği VII. Teknik Kongresi Bildiri Kitabı I, Sayfa: 361- 377. Ankara
- Arslan, N., Gürbüz, B., Gümüşcü , A., Sarıhan , E.O., İpek, A., Özcan , S., Mirici, S., and Parmaksız, İ. 2002. *Sternbergia candida* Mathew et. Baytop türünün kültüre alınması üzerinde araştırmalar.14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Arimoto-Kobayashi,S. Machida,M. Okamoto,K. and Yamaguchi,A. 2005. Evalvation of Photo-Mutagenicity and Photo-Cytotoxicity of Food Coloring Agent, *Mutagenesis* , 20(3):229-233
- Atalay, İ. 1994. Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Babaoğlu, M., 2006, Dünya ve Türkiye’de aspir bitkisinin tarihi, kullanım alanları ve önemi.
- Baldini, M., Giovanardi, R., Tahmasebi-Enferadi, S. and Vannozzi, G. P. 2002. Effects of water regime on fatty acid accumulation and final fatty acid composition in the oil of standard and high oleic sunflower hybrids. *Italian Journal of Agronomy*,6, 119–126.

- Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1); 23–58.
- Brands, A. and Ho, T.H. 2002. Function of a plant stress-induced gene, HVA22. Synthetic enhancement screen with its yeast homolog reveals its role in vesicular traffic. *Plant Physiol*, 130(3):1121-31
- Barrera-Figueroa, B.E. Pena-Castro, J., Acosta-Gallegos, J.A., Ruiz-Medrano, R. and Xoconostle-Cazares B. 2007. Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. *Functional Plant Biology*, 34: 368–381
- Blumwald, E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 431–434.
- Bocheva, A. Mikhova, B. Taskova, R. Mitova, M. Duddeck, H. 2003. Antiinflammatory and analgesic effects of *Carthamus lanatus* aerial parts. *Fitoterapia*, 74(6):559-63
- Bota, J., Medrano, H, and Flexas, J. 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*, 162(3); 671–681.
- Boudsocq, M. and Laurière, C. 2005. Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology*, 138(3); 1185–1194.
- Bowler, C., Montagu, M. V. and Inze, D. 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1); 83–116.
- Brands, A. and Ho, T-HD. 2002. Function of a Plant Stress-Induced Gene, HVA22. Synthetic Enhancement Screen with Its Yeast Homolog Reveals Its Role in Vesicular Traffic, *Plant Physiology*, 130, 1121-1131.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p 1158–1249.
- Camas, N., & Esendal, E., 2006. Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield components of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Hereditas*, 143, 55–57.

- Cao, Sh., Zhou, X.R., Wood, C.C., GreenA.G., Singh,S.P., Liu, L ., Liu,Q. 2013. A large and functionally diverse family of Fad2 genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *BMC Plant Biology*, 13:5
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Zhu, J.K. and Hirschi, K.D. 2004. The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H(+)/Ca(2+) antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(4); 2922–2926.
- Chinnusamy, V. and Zhu, J.K. 2004. Plant salt tolerance. In: H. Hirt and K. Shinozaki (Ed), *Plant Responses to Abiotic Stress, Topics in Current Genetics*, ss 241–270. Springer Berlin / Heidelberg.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S.Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(3); 1723–1730.
- Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, 58; 453–508.
- Cosge, B., Gurbuz, B., and Kiralan, M. (2007). Oil content and fatty acid composition of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in spring and winter. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1, 11–15.
- Coşge, B., Gürbüz, B. and Kiralan, M. 2007. Oil Content and Fatty Acid Composition of Some Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Varieties Sown in Spring and Winter. *International Journal of Natural and Engineering Science*, 1(3): 11-16.
- Cramer, G., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R., Tattersall, E., Bohlman, M., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K.A., Schooley D.A. and Cushman J. C. 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional and Integrative Genomics*, 7(2); 111–134.
- Dajue, L. and Mündel, H.H. 1996. Safflower *Carthamus tinctorius* L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7, *International Plant Genetic Resources Institute*, 83p.
- Davis, P.H. 1975. *Flora of Turkey and The East Aegeans Islands*. Vol: 5 The University Press. Edinburg, England.
- Esendal, E. 1988. Aspir türleri üzerine bir monografi, coğrafi dağılışı, türler arası ilişkiler, genetik ve sitogenetik özellikler. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi*, 3(1):139-150.

- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L. and Rock, C.D. 2002. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14; 15–45.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S. R., Sheen J., Rodriguez P.L., and Zhu J.K. 2009. In vitro reconstitution of an absciscic acid signalling pathway. *Nature*, 462(7273); 660–664.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. 1998. MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4); 1264–1300.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. and Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(9); 431–438.
- Hotta, Y. Nagatsu, A. Liu, W. Muto, T. Narumiya, C. Lu, X. 2002. Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction. *Mol Cell Biochem* ,238:151-62.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafey, M.K., Tingey, S. V. and Chua, N. H. 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of absciscic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science*, 115(24); 4891–4900.
- Ingram, J., and Bartels, D. 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47; 377–403.
- Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S. M., Martinoia, E. and Lee, Y. 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone absciscic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5); 2355–2360.
- Kawar, PG., Prabu, G.R., Dixit, G.B. and Prasad, D.T. 2008. Isolation of Expressed DNA Fragments from the Uncultured Sugarcane Grassy Shoot Phytoplasma Associated with Sugarcane Grassy Shoot (SCGS) Disease by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR). IX Plant Pathology and VI Molecular Biology, June 23-27, 2008, Cali, Colombia, South America -.
- Kempa, S., Rozhon, W., Šamaj, J., Erban, A., Baluška, F., Becker, T., Haselmayer, J., Schleiff, E., Kopka, J., Hirt, H. and Jonak, C. 2007. A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism. *The Plant Journal*, 49(6); 1076–1090.
- Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol. Med.*, 8: 257–260.

- Kneusel, R.E. Schiltz, E. Matern, U. 1994. Molecular Characterization and Cloning of an Esterase Which Inactivates the Macrolide Toxin Brefeldi. *J.Biol.Chem*, 269(5): 3449-56.
- Knight, H. and Knight, M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in plant science*, 6(6); 262–267.
- Knight, H., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal*, 12(5); 1067–1078
- Knowles, P.F. 1982. Safflower Genetics and Breeding. Improvement of Oil-Seed and Industrial Crops by Induced Mutations. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Knowles, P. and Ashri, A. 1995. Safflower: *Carthamus tinctorius* (Compositae). In J. Smartt & N.W. Simmonds (Eds.), *Evolution of Crop Plants* (pp. 47–50). Harlow: Longman.
- Knutzon, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B., Knauf, V.C., Mikkilineni, V. and Rocheford, T.R. 2003. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (Fad2) and fatty acid desaturase-6 (Fad6) cDNAs in maize. *Theor Appl Genet* 106:1326–1332
- Knutzon, D.S., Scherer, D.E. and Schreckengost, W.E. 1991. Nucleotide sequence of a complementary DNA clone encoding stearylacyl carrier protein desaturase from castor bean, *Ricinus communis*. *Plant Physiol* 96:344–345
- Kolsarıcı, Ö. and Eda, G. 2002. Effects of Different Row Distances and Various Nitrogen Doses on the Yield Components of a Safflower Variety. *Sesame and Safflower Newsletter* No. 17, pp. 108-111.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X. and Harper, J.F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, 130(4); 2129–2141.
- Kridl, J.C. 1992. Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearylacyl carrier protein desaturase gene. *Proc Nat Acad Sci USA*. 89:2624–2628
- Kubista, M. 2008. Emerging real-time PCR applications. *Drug Discovery World summer*. 57-66.
- Kuromori, T. Miyaji, T. Yabuuchi, H. Shimizu, H. Sugimoto, E. Kamiya, A. Moriyama, Y. Shinozaki, k. 2010. involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(5); 2361–2366.

- Li, D. and Mündel, H.H., 1996. Safflower. *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7. Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Los, D.A. and Murata, N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica Biophysica Acta* 1394:3–15
- Maggio, A., Bressan, R. A., Ruggiero, C., Xiong, L. and Grillo, S. 2003. Abiotic Stresses in Plants. (B. Pawlik-Skowrońska and L. S. D. Toppi, Ed). Springer.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2); 139–158.
- Maurel, C. 1997. Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48; 399–429.
- Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulías, J. and Flexas, J. 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany*, 89(7); 895–905
- Mikkilineni, V. and Rocheford, T.R. 2003. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (Fad2) and fatty acid desaturase-6 (Fad6) cDNAs in maize. *Theor Appl Genet* 106:1326–1332
- Mikołajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszyńska, G., Klessig, D. F. and Dobrowolska, G. 2000. Osmotic Stress Induces Rapid Activation of a Salicylic Acid-Induced Protein Kinase and a Homolog of Protein Kinase ASK1 in Tobacco Cells. *The Plant Cell*, 12(1); 165–178.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2); 239–250.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J.M. 1995. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiology*, 109(3); 735–742.
- Parent, B. Hachez, C. Redondo, E. Simonneau, T. Chaumont, F. and Tardieu, F. 2009. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiology*, 149(4); 2000–2012.
- Patel, J.S. and Narayana, G.V. 1935. Chromosome numbers in safflower. *Curr.Sci.*4: 412
- Park, S.Y. Fung, P. Nishimura, N. Jensen, D.R. Fujii, H. Zhao, Y. Lumba, S. Santiago, J. Rodrigues, A. Chow, T.F. Alfred, S.E. Bonetta, D. Finkelstein, R. Provart, N.J. Desveaux, D. Rodriguez, P.L. McCourt, P. Zhu, J.K. Schroeder, J.I. Volkman,

- BF. Cutler, SR. 2009. Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930); 1068–1071.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. and Grill, E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends in plant science*, 15(7); 395–401.
- Rahamatalla, A.B. Babiker, E.E, Krishna, A.G. El Tinay, A.H. 1998, Changes in Chemical Composition, Minerals and Amino Acids During Seed Growth and Development of Four Safflower Cultivars, *Plant Foods for Human Nutrition*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Ramanjulu, S. and Bartels, D. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment*, 25(2); 141–151.
- Rensink, W.A., Iobst, S., Hart, A., Stegalkina, S., Liu, J. and Buell, C. R. 2005. Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. *Functional and Integrative Genomics*, 5(4); 201–207.
- Richharia, R.H and J.P. Kotval. 1940. Chromosome Number in safflower. *Curr.Sci.* 9: 73-74
- Robert G. Upchurch. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* , 30;967–977.
- Sahi, C., Singh, A., Blumwald, E. and Grover, A. 2006. Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiologia Plantarum*, 127(1); 19.
- Seçmen Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116. İzmir.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2); 194–199.
- Shanklin, J. and Cahoon, EB. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:611–641
- Shen, Q., Chen, C.-N., Brands, A., Pan, S.-M. and Tuan.Hua, D.H. 2001. The stress- and absciscic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant Molecular Biology*, 45(3); 327–340.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Zhu, J.K. 2002. The Putative Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na⁺ Transport in Plants. *The Plant Cell*, 14(2); 465–477.

- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115(2); 327.
- Singh, V. and Nimbkar, N. 2006. safflower (*Carthamus tinctorius* L.), Chap. 6. In: Singh RJ(ed) Genetic resource, chromosome engineering, and crop improvement, vol 4. CRC, New York, pp 167-194
- Smaoui, A. and Chérif, A. 2000. Changes in molecular species of triacylglycerols in developing cotton seeds under salt stress. *Biochemical Society Transactions*, 28, 902– 905.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. and Thomashow, M. F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3); 1035–1040.
- Takahashi, S. Seki, M. Ishida, J. Satou, M. Sakurai, T. Narusaka, M. Kamiya, A. Nakajima, M. Enju, A. Akiyama, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki K. 2004. Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in *Arabidopsis* cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Molecular Biology*, 56(1); 29–55.
- Tyerman, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E. and Smith, J. A. C. 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*, 50(Special); 1055–1071.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21); 11632–11637.
- Uysal, N. Baydar, H. ve Erbaş, S. 2006. Isparta popülasyonundan geliştirilen aspir (*Carthamus tinctorius* L.) hatlarının tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fak. D
- Velasco, L. and Fernandez-Martinez, J.M. 2001. Breeding for oil quality in safflower. In J. W. Bergman & H. H. Mundel (Eds.), *In Proceedings of Vth International Safflower Conference* (pp. 133–137). ND and Sidney, MO, USA: Williston.
- Vierling, E. 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1); 579–620.

- Vierling, E. and Kimpel, J.A. 1992. Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 3(2); 164–170.
- Wang, P. Ou, S. Peilin, C. 1999, Optimization of Condition for Safflower Cell Culture and Accumulation of Cellicolous Product Tocopherols, *Chin J.Biotechnol*, 15(4):231-237
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. 2004.Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5); 244–252. Chapman, K. D. 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Science*, 3(11); 419–426.
- Warude, D., Joshi, K. and Harsulkar, A. 2006 Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 26:83–93
- Wilkinson, S. and Davies, W. J. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*, 25(2); 195–210.
- Zhang, J. Liu, H. Sun, J. Li, B. Zhu, Q. Chen ,. Zhang, H . 2012 Arabidopsis Fatty Acid Desaturase FAD2 Is Required for Salt Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth. *PLoS ONE*7(1):e30355.
doi:10.1371/journal.pone.0030355
- Zhu, J. K. 2001a. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2); 66–71.
- Zhu, J. K. 2001b. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5); 401–406.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53; 247-273

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Monireh HASANBAGLOU

Doğum Yeri :İran

Doğum Tarihi : 20. 04.1983

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :İran Matin Koleji (2001)

Lisans :İran Lahijan Üniversitesi, Moleküler ve Hücrel Biyoloji-
Microbiyology (2006)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D.
(Eylül 2013 – Ağustos 2015)