

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gossypium hirsutum FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN OKSİDATİF
STRESLE MÜCADELEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

AKIN SUNULU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ EMEL ORDU

İSTANBUL, 2019



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün FYL-2018-3358 numaralı projesi ve 216Z052 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim ve öğretim süreci boyunca bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, karakteri, bilgisi, hoşgörüsü ve çalışkanlığıyla bana bu yolda rehber olan değerli danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Emel ORDU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın tüm basamaklarında değerli birikimlerini ve tecrübelerini cömertçe paylaşan sayın hocam Arş.Gör.Dr. Günseli KURT GÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Engin birikimleri ve çalışkanlıkları ile her zaman bana yol gösteren ve hayatımda yeni ufuklar açan ve manevi desteklerini asla esirgemeyen çok değerli hocalarım sayın Arş. Gör. Hasan DEMİRCİ'ye ve Arş. Gör. Ahmet YAĞBASAN'a teşekkür ederim.

Manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren çok değerli arkadaşlarım Arş.Gör. Şayan POYRAZ, Sinem KURT, Gülşah AKBAŞ, Caner ERTÜRK, Tuğba ATABEY, Sefanur ERDÖL, İlgül AKMAYAN ,Kübra TRABZONLU, Emrah BERTAN, Hatice Nur AYDIN, Reyhan AKKUZU, Kübra AVCI, Merve GÖZEL, Kübra ATİK, Beyzanur KAŞALTI, Enes AK, Hilal CİVELEK, Maide ŞEKER ve daha ismini yazamadığım bir çok arkadaşşıma teşekkür ederim.

Lisans döneminden beri varlıkları ile maddi manevi bana destek olan, her zaman yardımına koşan ve beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşlarım Ahmet ŞAHİN'e ve Metin ÖZ'e, Halit OKUMUŞ'a, Erdem SOYLU'ya, Ahmet Selçuk SUYABAK'a ve Tuğba SARI'ya teşekkür ederim

Çalışmamda katkıları olan kıymetli tüm bölüm hocalarıma ve aileme teşekkür ederim.

Nisan, 2019

Akın SUNULU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Toprakta Ağır Metal Kirliliği	5
2.2 Bitkilerde Ağır Metal Stresi	7
2.2.1 Bitkilerde Cu Stresi	9
2.2.2 <i>Gossypium hirsutum</i> (Pamuk) Bitkisinde Cu Stresi.....	11
2.3 <i>Gossypium hirsutum</i> Bitkisinin Taksonomisi	13
2.4 <i>Gossypium hirsutum</i> Bitkisinin Önemi ve Kullanım alanları	13
2.5 NAD ⁺ - Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Önemi	15
2.6 Bitkilerde NAD ⁺ - Bağımlı Format Dehidrogenaz Enzimi.....	16
2.7 Kantitatif PCR	18
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1 Materyal.....	21
3.1.1 Cihazlar:	21

3.1.2	Kimyasallar ve Malzemeler:.....	21
3.1.3	Kitler	22
3.2	Yöntem.....	22
3.2.1	<i>Gossypium hirsutum</i> (Pamuk) Bitkisinin Büyüme Koşulları.....	22
3.2.2	Murashie ve Skoog Ortamı	23
3.2.3	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu.....	23
3.2.4	Toplam (Total) RNA İzolasyonu	23
3.2.5	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	24
3.2.6	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
3.2.7	Enzim İzolasyonu	29
3.2.8	Protein Konsantrasyonu Analizi	30
3.2.9	FDH Aktivitesi İçin Kolorimetrik Analiz	31
3.2.10	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD).....	31
3.2.11	Malondialdehid (MDA) İçeriğinin Analizi	32
3.2.12	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Analizi.....	33
3.2.13	Verilerin Değerlendirilmesi	33
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER		34
4.1	Sonuçlar	34
4.1.1	Farklı Cu konsantrasyonlarında yetiştirilen Pamuk Bitkileri.....	34
4.1.2	RNA İzolasyonu	35
4.1.3	cDNA Sentezi	36
4.1.4	NAD ⁺ - Bağımlı FDH Transkripsiyon Analizi.....	36
4.1.5	Cu Stresinin Varlığında FDH Enzim Aktivitesi	38
4.1.6	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) İçeriğinin Analizi	41
4.1.7	Malondialdehid (MDA) İçeriğinin Analizi.....	43
4.1.8	SOD Aktivitesi	46
4.2	Öneriler	49
KAYNAKLAR.....		51
ÖZGEÇMİŞ.....		60

SİMGE LİSTESİ

cm	Santimetre
cm ³	Santimetreküp
mm	Milimetre
mM	Milimolar
g	Gram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
pH	Hidrojen gücü
rpm	Dakikadaki devir sayısı
U	Enzim ünitesi
µg	Mikrogram
L	Litre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat
µmol	Mikromol

KISALTMA LİSTESİ

Alla	Allantoin
APX	Askorbat Peroksidaz
Bp	Baz çifti
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
Cu	Bakır
Cu(SO ₄) ₂	Bakır(II) Sülfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FDH	Format Dehidrogenaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Hg	Civa
Kb	Kilo baz
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat Redüktaz
MS	Murashie Skoog
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NO	Nitrik Osit
Pamuk	<i>Gossypium hirsutum L.</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pb	Kurşun
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SA	Saliklik Asit
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Türevler
UV	Ultraviole

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Mayaların metanol katabolizmasında son adımda yer alan FDH'nin rolü ...	16
Şekil 2.2	Real Time PCR'da kullanılan SYBR Green Teknolojisinin çalışma mekanizmasının şematik sunumu	20
Şekil 4.1	Farklı Cu konsantrasyonları içeren ortamda yetişen Erşan-92 (Pamuk) Bitkisi.....	34
Şekil 4.2	RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.3	Yaprak FDH transkripsiyon analizi	37
Şekil 4.3	Kökteki FDH transkripsiyon analizi	37
Şekil 4.4	Yapraktaki FDH aktivitesi.....	40
Şekil 4.4	Kökteki FDH aktivitesi.....	40
Şekil 4.5	Yapraktaki H ₂ O ₂ içeriği	42
Şekil 4.5	Kökteki H ₂ O ₂ içeriği	42
Şekil 4.6	Yapraktaki MDA içeriğinin analizi.....	45
Şekil 4.6	Kökteki MDA içeriğinin analizi	45
Şekil 4.7	Yapraktaki SOD aktivitesinin analizi	48
Şekil 4.7	Kökteki SOD aktivitesinin analizi	48

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Farklı ortamlardaki ağır metal konsantrasyonları için önerilen değerler	6
Çizelge 3.1 SCRIPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience) içeriği	25
Çizelge 3.3 cDNA reaksiyonu inkübasyon süreci	27
Çizelge 3.4 RT PCR' de kullanılan oligonükleotidler	28
Çizelge 3.5 RT- PCR reaksiyon karışımı	28
Çizelge 3.6 RT- PCR reaksiyon süreci	29
Çizelge 4.3 Yaprak FDH transkripsiyon analizi	36
Çizelge 4.3 Kökteki FDH transkripsiyon analizi	36
Çizelge 4.4 FDH aktivitesi yaprak	39
Çizelge 4.4 Kökteki FDH aktivitesi	39
Çizelge 4.5 Yapraktaki H ₂ O ₂ içeriği	41
Çizelge 4.5 Kökteki H ₂ O ₂ içeriği	41
Çizelge 4.6 Yapraktaki MDA içeriğinin analizi	44
Çizelge 4.6 Kökteki MDA içeriğinin analizi	44
Çizelge 4.7 Yapraktaki SOD aktivitesinin analizi	46
Çizelge 4.7 Kökteki SOD aktivitesinin analizi	47

***Gossypium hirsutum* FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN OKSİDATİF
STRESLE MÜCADELEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Akın SUNULU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Besin zincirine doğrudan dahil olmayan pamuk (*Gossypium hirsutum* L.), ağır metalleri besin zincirinden uzaklaştırmak için, kirlenmiş topraklara ekilebilecek ticari bir ürün olarak uygun bir adaydır. Bu nedenle, ağır metal stresini tolere edebilen doğru pamuk genotiplerinin seçebilmesi amacıyla pamuk bitkisinde ağır metal stresine karşı tepki mekanizmalarının çözümlenmesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda bakır stresi altında yetiştirilen *G. hirsutum* genotipi, Erşan-92'nin ağır metal tolerans yanıtında ilk kez NAD⁺ bağımlı format dehidrojenaz enziminin rolü araştırılmıştır. Bitkinin yaprak ve kök dokularının stres tepkisi, FDH ve SOD (Superoksit dismutaz) enzimlerinin aktivitesinin yanı sıra H₂O₂ (hidrojen peroksit) ve MDA (malondialdehit) seviyelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Erşan-92'nin köklerinde ağır metal stresi ile birlikte, ROS ve lipid peroksidasyon seviyelerinin artmasının yanısıra SOD ve FDH aktivitelerinde de artış tespit edilmiştir. Bu ölçümlerle örtüşen FDH transkript analizi, GhFDH ekspresyonunun Cu stresine arttığını göstermektedir. Yapraklarda 50 µM Cu varlığında FDH transkript seviyesi en yüksek seviyeye (17.88 kat artış) ulaştığı görülürken köklerde 100 µM Cu içeren ortamda 15.67 kat arttığı; 50 ve 75 µM Cu varlığındaki FDH transkripsiyon seviyesi kontrol bitkileri ile hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. Erşan-92'nin köklerindeki artmış FDH ekspresyon seviyesi, kök büyümesindeki gerileme ile paraleldir. Diğer konsantrasyonlarda FDH enzim aktivitesi anlamlı bir farklılık göstermezken kök dokusunda, 100 µM Cu varlığında 6.35 kat daha yüksek ölçülmüştür. Sonuçlar FDH enziminin Erşan-92 genotipinde ağır metal stresine toleransta rol

oynadığını ve bu genotipin 100 µM Cu seviyesine kadar mücadele etmeye devam ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Gossypium hirsutum*, Format dehidrogenaz, hidrojen peroksit içeriği, Superoksit dismutaz aktivitesi, malondialdehit içeriği, lipid peroksidasyon seviyesi.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF *Gossypium hirsutum* FORMAT DEHYDROGENASE ENZYME IN COMBATING OXIDATIVE STRESS

Akın SUNULU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr Emel ORDU

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), which is not directly involved in the food chain, appears to be a suitable candidate to remove heavy metals from the food chain and as a commercial crop it can be planted on contaminated soils to remove heavy metals from the food chain. Therefore, in order to select the right cotton genotypes that can tolerate heavy metal stress, it is important to analyze the reaction mechanisms against heavy metal stress in the cotton plant. In our study, the role of NAD + dependent formate dehydrogenase enzyme in the heavy metal tolerance response of Erşan-92 which is *G. hirsutum* genotype grown under copper stress was investigated. The stress response of the leaf and root tissues of the plant was determined by measuring the activity of FDH and SOD (Superoxide dismutase) enzymes as well as H₂O₂ (hydrogen peroxide) and MDA (malondialdehyde) levels. With the heavy metal stress in the roots of Erşan-92, increased levels of ROS and lipid peroxidation as well as an increase in SOD and FDH activities were determined. The FDH transcript analysis, which coincides with these measurements, indicates that GhFDH expression increases with Cu stress. In the presence of 50 µM Cu in the leaves, the FDH transcript level reached the highest level (17.88 fold increase), while the roots increased 15.67 fold in the medium containing 100 µM Cu; The level of FDH transcription in the presence of 50 and 75 µM Cu was determined to be almost the same as the control plants. The increased level of FDH expression in the roots of Erşan-92 is parallel to the decline in root growth. Although FDH enzyme activity was not significantly different at other concentrations, it

was 6.35 times higher in the presence of 100 μM Cu in the root tissue. The results show that FDH enzyme plays a role in the tolerance of heavy metal stress in the Erşan-92 genotype and this genotype continues to fight up to 100 μM Cu.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, Formate dehydrogenase, hydrogen peroxide content, Superoxide dismutase activity, malondialdehyde content, lipid peroxidation level.



1.1 Literatür Özeti

Pamuk bitkisi (*Gossypium hirsutum* L.) düzenli yağmur alan ılımlı iklimlerde yıllık olarak yetiştirilebilmektedir. Bilinen 50 türden sadece dördü yaygın olarak yetiştirilebilirken, geriye kalan 46 tür tropik bölgelerde ve alt tropik bölgelerde yetişmektedir. Lif kalitesi, verimi ve belirli iklim koşullarına adaptasyondaki farklılıklar bazı pamuk türlerinin diğerlerine göre daha fazla tercih edilmesine sebep olmuştur. Yaygın olarak yetiştirilen dört pamuk türünün tamamı, gıda üretimi ve tıbbi uygulama da dahil olmak üzere çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır[1]. Genelde "Amerikan ya da Meksika pamuğu" olarak anılan *Gossypium hirsutum*, yüksek verim ve farklı çevre koşullarına adapte olabilmesi nedeniyle tüm pamuk türleri içinde en yaygın olarak yetiştirilen pamuk türüdür [2], [3], [4]

Pamuk dünyadaki birçok ülkede lif ve gıda ürünü olarak yetiştirilmektedir. Hem biyotik hem de abiyotik stres, pamuktaki büyüme ve verimdeki azalmadan esas olarak sorumlu tutulmaktadır. Aşırı gübreleme ve ilaçlama sonucu pamuk ekinleri sürekli Cu toksisitesi tehdidi altında bulunmaktadır. Pamuk bitkisindeki Cu kaynaklı fizyolojik ve biyokimyasal hasarların azaltılması ve daha dayanıklı pamuk türü üretimi ile ilgili bir çok çalışma yapılmaktadır [5], [6] [7]

Kuraklık, sıcaklık değişimleri, kimyasal ajanlar, patojen saldırıları gibi farklı çevresel stres koşullarında NAD^+ (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) bağımlı format dehidrogenaz (FDH) anlatımı ile ilgili çalışmaların yaygın olarak yapıldığı görülürken [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17] ağır metal stresinde NAD^+ bağımlı format

dehidrogenaz anlatımı ile ilgili çalışmaların kısıtlı olduğu; pamuk bitkisinde Cu ve NAD⁺-bağımlı FDH ile yapılmış çalışma bulunmadığı görölmektedir [18].

Bu tez çalışması ile ilk kez Cu stresi altında pamuk bitkisinde NAD⁺-bağımlı FDH enziminin rolü araştırılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Ekonomik olarak değerli tarımsal topraklar, çeşitli antropojenik aktiviteler nedeniyle ağır metallerle kirlenmiş durumdadır. Tarımda böcek saldırıları ve böcekten kaynaklanan hastalıklar veya yabancı otlarla mücadelede sıklıkla kullanılan zirai kimyasallar, ağır metal (Cu, Zn, Pb, Fe, Ni, Cd, Hg) kirliliğinin başlıca nedeni olarak görölmektedir. Ağır metal kirliliğine sebep olan diğer faktörler ise; kompost kullanımı, atmosferik çökeltme, kanalizasyon çamurunun gübre olarak kullanılması, hayvan gübreleri, madencilik, kentsel faaliyetler, fosil yakıtlar ve endüstriyel atıklar olarak sıralanmaktadır [19], [20]. Ağır metal kirliliği olan topraklarda yapılacak tarımsal aktiviteler uzun vadede, enzim aktivitesini bozarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına ve su dengesinin değişmesine neden olarak bitkilerde ürün ve verim kalitesini düşürmektedir [20]. Ayrıca, ağır metallerce kirletilmiş bu alanların tarımsal faaliyetler için kullanılmaya devam edilmesi, bitkilerde biriken ağır metallerin beslenme zinciri yoluyla hayvanlara ve insanlara taşınmasına sebep olmaktadır. İnsan vücudunda ağır metal birikiminin DNA, beyin, sinir sistemi ya da otoimmün sisteme zarar vererek çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir [21], [22]. Bu zararlarından dolayı ağır metal kirliliği, ticari önemi olan ekilebilir tarımsal alanları kısıtlamaktadır. Topraktaki ağır metal miktarını azaltmak ve kirlenmiş alanları yeniden tarıma kazandırmak amacıyla bitkilerin kullanılması yaygın kabul gören ve düşük maliyetli bir teknolojidir. Bu teknolojinin kritik noktası ağır metal direnci veya hiperakümülyasyon özelliklerine sahip doğru bitkileri seçebilmektir [23]. Gıda zincirinde doğrudan yer almayan ve önemli bir ticari değeri olan pamuk (*Gossypium hirsutum* L.), hem gıda zincirinden ağır metallerin uzaklaştırılması hem de toprağın temizlenmesi için uygun görülen, kirlenmiş topraklarda ekilebilecek bitkiler arasındadır. Bu nedenle, ağır metallerce kirlenmiş tarım alanlarına ekim için uygun, ağır metal stresini tolere edebilen doğru pamuk genotiplerinin seçebilmesi amacıyla pamuk bitkisinde ağır metal stresine karşı tepki

mekanizmalarının çözümlenmesi önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında fizyolojik denemeler sonucunda çevresel streslere karşı dayanıklı olarak bilinen pamuk genotipi *Erşan-92*'nin farklı konsantrasyonlardaki Cu stresine karşı gösterdiği tepki, bitkilerde çevresel stres ile ilişkili olduğu bilinen NAD^+ -bağımlı FDH anlatımı incelenerek araştırılmıştır. Böylece çevresel stres koşullarına toleranslı olarak bilinen *Erşan-92* pamuk genotipinde bu özelliğin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır. Uzun vadede amacımız ağır metallerce kirlenmiş topraklarda yetiştirilen pamuk çeşitlerinin ürün verim ve kalitesini arttırarak ticari öneme sahip kontamine tarım alanlarının etkili ve sürdürülebilir bir şekilde kullanımını sağlamak ve, ağır metallerin gerek besin zinciri gerekse tekstil hammaddesi olan lifler yoluyla insan vücuduna girmesinin önüne geçilebilmesidir.

1.3 Hipotez

Cu, bitki metabolizması için gerekli bir element olmasına rağmen, fazlası farklı bitki organellerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini uyarmaktadır [24]. Bitki metabolizması sırasında ROS'un aşırı üretimi bitki hücrelerinde lipidler, proteinler ve DNA gibi hücresel bileşenlerin oksidasyonu ile geri dönüşümsüz hasarlara neden olarak verim ve kalitede dramatik kayıplarla sonuçlanmaktadır [25], [23]. ROS ile mücadele sırasında, format kritik bir yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Artırılmış format seviyesinin, H_2O_2 ile mücadele eden hücrelerde bir indirgeme gücü olarak rol oynadığı ve NAD^+ -bağımlı FDH aracılığıyla anti-oksidatif savunma stratejisine katkıda bulunduğu bilinmektedir [8]. NAD^+ -bağımlı FDH, NAD(P)^+ 'nin NAD(P)H 'ye indirgenmesi sırasında, formatın oksidasyonunu katalizlemektedir. FDH'lerin genel olarak enerji sağlama mekanizmalarına dahil olduğu bilinmekle birlikte, bu enzimler aynı zamanda bitkilerde oksidatif stresle mücadelede temel bir rol oynamaktadır. Bitkilerde çok farklı stres faktörlerine karşı sentezleniyor oluşu FDH'in çok amaçlı bir enzim olduğunu ve yüksek bitkilerin stres metabolizmasında anahtar bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu hipotez doğrultusunda çalışmamızda, ağır metal stresine karşı toleranslı olarak bilinen *Erşan-92 G.hirsutum*(Gh) genotipi [26], farklı Cu konsantrasyonları içeren ortamlarda yetiştirilerek pamuk bitkisinin Cu stresine karşı verdiği cevapta FDH'in rolü üzerine odaklanılmıştır. FDH abiyotik streslere karşı

dayanıklı genotiplerin geliştirilmesinde önemli bir protein markörü olabilme kapasitesine sahiptir.



GENEL BİLGİLER

2.1 Toprakta Ağır Metal Kirliliği

Toprak; besin geri dönüşümü, enerji değişimi, sera gazı akılarının ölçülmesi ve karbonun geri dönüşümü gibi biyojeokimyasal döngülerin meydana geldiği bir alt sistemdir [27]. Toprağın doğru kullanılması ve yönetilmesi dünyanın büyüyen nüfusu için yüksek kaliteli gıda ve elyaf üretimini sürdürmenin anahtarı olarak görülmektedir [28]. Bununla birlikte tarımsal girdiler, kentleşme ve ekonomik gelişme gibi etkilerden dolayı ağır metaller toprakta birikmektedir [29], [30].

Madencilik, modern tarım uygulamaları ve sanayileşme dahil olmak üzere birçok antropojenik faaliyet, çevre üzerinde uzun vadeli zararlı etkiye sebebiyet vermektedir. Bütün bu faktörler toprak, su ve havadaki ağır metal konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Ağır metallerle toprağın kirlenmesi birçok çevre sorununa neden olmaktadır ve hem hayvanlar hem de bitkiler üzerinde toksik etki yaratmaktadır [31].

Biyolojik zararlılarla mücadele için kullanılan tarım ilaçları, gübreleme, çevredeki maden yatakları, fosil yakıtlar, şehir trafiği, evsel atıklar ve özellikle nehirlerle bırakılan kontrolsüz endüstriyel atıklar nedeniyle tarım için kullanılan toprak ve sulama suları Cd, Zn, Pb, Fe, Ni, Cu, Cr, Hg, Co gibi ağır metallerle kirlenmektedir. Doğal salınım dışında, endüstriyel devrimin sonucu olarak ağır metallere olan talebin büyümesi ve kullanımının artması, biyosferde ağır metalin yüksek dağılımına neden olmuştur [5] [32], [33]. Bunun sonucunda günümüzde ekonomik olarak önemli tarımsal birçok alan ağır metallerce kirlenmiş durumdadır.

Metaller; elektrik iletkenliği, işlenebilirliği ve parlaklığı yüksek olan ve katyon oluşturmak için elektron veren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Metaller, yer kabuğunda doğal olarak bulunmaktadır ve bileşimleri bölgelere göre farklılık göstermektedir [34]. Ağır metaller genel olarak 5 g/ cm³'ten daha fazla özgül yoğunluğa sahip olan ve çevreyi ve canlı organizmaları olumsuz yönde etkileyen metaller olarak adlandırılmaktadır [35].

Bu metaller canlı organizmalarda çok düşük konsantrasyonlarda çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları sürdürmek için zaruri olmasına rağmen belirli eşik konsantrasyonlarını aştıklarında zararlı olmaktadırlar (Çizelge2. 1). Ağır metallerin sağlık üzerinde birçok olumsuz etkisine sahip olduğu bilinmekle birlikte ağır metal maruziyeti dünyanın birçok yerinde devam etmekte ve artmaktadır [36], [37]. Biyolojik sistemlerde, ağır metallerin hücre zarı, mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum ve nukleus gibi organelleri ve, metabolizmada detoksifikasyon ve hasar onarımında rol oynayan bazı enzimler gibi bileşenleri etkilediği bildirilmiştir [38]. Metal iyonlarının DNA ve nükleer proteinler gibi hücre bileşenleri ile etkileşime girerek DNA hasarına ve hücre döngüsü modülasyonuna, kanserojenez veya apoptozise yol açabilecek konformasyonel değişikliklere neden olduğu bilinmektedir [39].

Çizelge 2.1 Farklı ortamlardaki ağır metal konsantrasyonları için önerilen değerler [40]

	Pb	Cd	Hg	Cu	Co	Zn	Cr	Ni
Su(mg/L)	0.01	0.03	0.01	2		2	0.05	0.07
Toprak(mg/kg)	150	5		100	50	500	250	100
Sebzeler(mg/kg)	0.3	0.2		40		60	0.2	

Uzun vadede topraktaki ağır metal birikimi bitkilerde enzim aktivitesinin bozulması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ve su dengesinin değişmesine neden olarak ürün verim ve kalitesini düşürmektedir [41]. Bu alanlar tarımsal faaliyetler için kullanılmaya devam edildiğinde, bitkilerde biriken ağır metaller gıda zinciri yoluyla hayvanlara ve insanlara ulaşmaktadır [22].

Yüksek derecede toksisiteleri nedeniyle bu elementler düşük maruz kalma seviyelerinde bile çoklu organ hasarına neden olduğu bilinen sistemik toksik maddeler olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, ABD Çevre Koruma Ajansı ve Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı'na göre insan kanserojenleri (bilinen veya olası) olarak sınıflandırılmaktadırlar [42].

2.2 Bitkilerde Ağır Metal Stresi

Ağır metal terimi genellikle 20'den fazla atomik kütle ve 5'in üzerinde özgül ağırlığı olan bir dizi metal ve metaloidlere atıfta bulunmaktadır, bu da çok düşük konsantrasyonlarda bile bitki ve hayvanlar için toksik olabilmektedir [43] [44]. Organik kirleticilerden farklı olarak, ağır metaller doğal olarak veya mikrobiyal topluluklar tarafından parçalanamamaktadır. Bu nedenle, ağır metaller toprağa girişinden itibaren uzun bir süre sonra da toprakta kalabilmektedirler. Günümüzde toprakların ağır metallerce kirlenmesi kritik bir çevre sorunu haline gelmiştir. Çoğu ağır metaller (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni ve Zn), enzimler ve diğer proteinlerin bileşenleri olarak çok sayıda metabolik sürece dahil oldukları için bitkiler için gerekli mikro besin maddeleridir. Ancak, konsantrasyonları belirli bir kritik noktadan daha yüksekse hücresel ve moleküler düzeyde bir dizi etkileşime yol açabildikleri için toksik etki göstermektedir. Bitkilerde yaşamsal olarak zorunlu olmayan kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa (Hg) gibi metallerin çok küçük miktarları dahi bitkiler için toksik olabilmektedir. Toprak ve bitki özellikleri; örneğin, toprağın mineralojik ve organik madde özellikleri ve bitki metal duyarlılığı ve bitkiler tarafından ağır metal alımının tahmini, topraklarda ağır metallerin biyoyararlanımı üzerinde etkilidir [45], [46].

Bitkilerde ağır metal toksisitesi esas olarak oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres sonucu meydana gelen $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 , ve $\cdot\text{OH}$ gibi reaktif oksijen türleri (ROS), yüksek düzeyde ağır metallerle maruz kalan bitkilerin birincil cevabı olarak ortaya çıkmaktadır [47].

Bitkilerin toksik radikalleri temizlemek ve kendilerini oksidatif stresten korumak için bazı antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu savunma mekanizmaları iki ana sınıfa ayrılmaktadır: İlk olarak yağda çözünen membran ile ilişkili antioksidanlar (α - tokoferol, β karoten) ve suda çözünen indirgeyiciler (glutatyon, askorbat) içeren düşük

moleküler ağırlıklı antioksidanlar; ikinci olarak ise antioksidan enzimler: Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) olarak bilinmektedir [48], [49].

Bitkiler ağır metal stresi ile mücadelede farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Bu stratejiler ağır metal iyonlarının köklerden alımının durdurulması; iyonlarının sitosol içerisine girişinin önlenmesi; fitokletainler gibi ligantlar tarafından sitosolde bağlanması; vakuolde biriktirerek serbestçe dolaşmasının engellenmesi ve stres proteinleri sentezlemesi olarak özetlenebilmektedir. Aynı stresle mücadelede farklı genotipler farklı stratejileri kullanabilmektedir [26].

Bonanno ve ark.(2017)'nın yaptıkları bir çalışmada *Posidonia oceanica* ve *Cymodocea nodosa* gibi deniz bitkilerinde As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb ve Zn seviyeleri araştırılmıştır. Sonuçlar tortulardaki metallerin biyoendikasyonunun (biyolojik göstergesinin) genellikle türe özgü olduğunu göstermiştir. Özellikle mevcut bulgular ekolojik ve morfolojik benzerliklere rağmen farklı bitki türlerinin ağır metallere maruz kalmaya farklı tepki gösterme eğiliminde olduğunu göstermektedir [50].

Nitrik oksit (NO) bitkilerin ağır metallere stres toleransında önemli rol oynayan iyi bilinen bir sinyal molekülüdür. Wang v.d. (2018) yaptığı bir çalışmada domates fidelerinde sıvı besin kültürü içerisinde bakır (Cu) ve kadmiyumun(Cd) absorbe edilme ve taşınma özelliklerini, ayrıca Cu ve/ veya Cd stresi altında eksojen NO'ya verdiği yanıtı araştırılmıştır. Sonuçlar 50 mg/L konsantrasyondaki Cu ve Cd'nin bitki büyümesini büyük ölçüde inhibe ettiğini, Cd'nin Cu'dan daha yüksek inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir [51].

Salatalık bitkilerinin kadmiyum (Cd, 5–15 μ M) ve/ veya allantoin (Alla, 10-1000 μ M) derişimine bağlı olarak verdiği tepkileri; ve salatalık bitkisinde yüksek Cd konsantrasyonunda Alla'nın olası bir koruyucu rolünün varlığı araştırılmıştır. 14 gün maruz kaldıktan sonra Alla, Cd'nin salatalık bitkisindeki fotosentetik pigmentlerin içeriğinin azaltması ve bitki büyümesini inhibe etmesi gibi negatif etkilerini önemli ölçüde tersine döndürmüştür [52].

Antik bitkilerin ağır metal stresine moleküler tepkisini araştırmak ve ağır metallere maruz kaldıktan sonra tehlike altındaki bitkilerde DNA metilasyonunun özelliğini

araştırmak için nesli tükenmekte olan bir tür olan *Isoetes sinensis* bitkisinde farklı konsantrasyonlarda kurşun (500, 2000, 5000 mg·L⁻¹ Pb) ve cadmium (100, 250, 500 mg·L⁻¹ Cd) içeren ortamda strese maruz bırakılmıştır. Pb ve Cd stresleri ile DNA metilasyonunun (hipermetilasyon dahil) oranı neredeyse eşit (% 39.04 ve % 39.71) olduğu görülmüştür, ancak Cd ile DNA demetilasyonunun oranı Pb'den daha yüksek olduğu belirtilmiştir (% 46,86- % 33,92) [53].

2.2.1 Bitkilerde Cu Stresi

Cu; protein metabolizması, elektron taşınımı, azot fiksasyonu, iyon metabolizasyonu ve etilen algılaması gibi çeşitli süreçlerdeki kritik rolü nedeniyle bitki gelişimi için gerekli temel bir mikro besin maddesi olarak bilinmektedir. Sitokrom oksidaz, askorbik asit oksidaz, polifenol oksidaz ve poliamin oksidaz sentezinde önemli bir rol oynamaktadır [54].

Bununla birlikte, toprak veya sulardaki aşırı Cu konsantrasyonları hücrel toksisite yoluyla büyüme geriliği ve yaprak klorozu(sararma) da dahil olmak üzere bitki performansını ciddi şekilde bozabilmektedir [55]. Genel olarak bitki dokuları 10 µg g⁻¹ (kuru ağırlık) Cu [56] içermektedir ve bu limitleri aştığında bitki büyümesi için toksik hale gelebilmektedir. Bitki dokularında aşırı Cu konsantrasyonları protein morfolojisini bozabilmektedir, tiyollere bağlanarak enzimleri etkisiz hale getirebilmekte ve dolayısıyla bitki büyüme ve veriminin azalmasına yol açabilmektedir Bu problem elektrolitik olarak oluşturulan Cu'nun haşere ve hastalık kontrolü için sıklıkla uygulandığı alanlarda çok yaygın olarak görülmektedir [57].

Redoks aktif yapısı nedeniyle bitki dokularındaki yüksek Cu konsantrasyonu; tekli oksijen, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi ROS üretebilmektedir [58]. ROS toksik bir etkiye sahiptir ve proteinler, lipitler ve DNA gibi önemli makromolekülleri parçalayarak hücre ölümü veya apoptoza neden olmaktadır. Metal kaynaklı hasarla başa çıkabilmek için bitki türleri, ligandlarla kompartmantasyon yoluyla veya hücrel homeostaz yoluyla yüksek metal içeriğini kök hücrelerinde saklayabilmektedir. Cu'ın reaktif olmayan bir forma dönüştürülmesi de bitkilerdeki koruma stratejilerinden biridir [59]. Ayrıca bitkiler ROS'un söndürülmesiyle hücrel

toksisiteyi yenmelerine yardımcı olan bir antioksidan savunma sistemi de kullanabilmektedirler [6].

Hücredeki bakırın dinamik dengesinin esas olarak üç açıdan kontrol edildiği bilinmektedir: (1) emilim, (2) hücre içi depolama ve (3) bakırın ekzosmosisi. Cu'nun bitki üzerindeki fitotoksik etkisi, ağır metal kirleticilerin çoğundan daha yüksek olduğu bilinmektedir [60]. Cu ve diğer ağır metallerin buğday büyümesi üzerindeki toksik etkisinin aşağıdaki sırayla olduğu bildirilmiştir: Cd> Cu> Ni> Zn> Pb> Cr [61]. Topraktaki Cu fazlalığı bitki yapraklarında birikmiş olup, vakol ve kloroplastlarda depolama oranı sırasıyla % 48 ve % 7 olarak bilinmektedir [62]. Cu maruziyetine cevaben, bitkilerde süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiacol peroksidaz (GPX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi proteinlerin ve enzimlerin önemli ölçüde induklendiği görülmüştür [63].

Cu toksisitesine bağlı stres, toplam katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artışa ve ayrıca; SOD ve CAT gen ekspresyonunun eşzamanlı induksiyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir [64].

Brassica juncea(*B. Juncea*) bitkisi ile yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlardaki Cu (0, 0.25, 0.5 ve 0.75 mM) stresi altında Askorbat peroksidaz (APOX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPOX) ve gultrathione-transferazın enzimatik aktivitelerinin arttığı gözlenmiş; monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivitesinin ise düştüğü görülmüştür. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyon radikalinin (O_2^-) birikimi stres markörü (biyobelirteci) olarak seçilmiştir ve yüksek H_2O_2 (% 88.89) ve O_2^- (% 62.11) seviyeleri Cu stresine mazur kalan *B. juncea* fidelerinde oksidatif stres varlığını göstermektedir [65].

Cu toksisitesine maruz bırakılan mısır bitkisinin kök dokularında stres faktörü olarak bilinen hidrojen peroksit miktarının arttığı görülmüştür. Salisilik asit ile ön mumale edilen mısır bitkisinin kök dokularında ise Cu stresine bağlı hidrojen peroksit miktarının düştüğü gözlenmiştir [66].

Kökler aşırı Cu'ya maruz kaldığında; metal şelasyonu, metal taşınması ve sinyal mekanizmalarının, hormonların, proteinlerin ve antioksidan sistemin aktivasyonu gibi detoksifikasyon stratejileri indüklenmektedir [67].

Su mercimeği ile yapılan bir çalışmada 10 μM 'nin üstünde Cu içeren ortamda, büyüme hızının yüzde inhibisyonu, toplam klorofil içeriği, kuru ağırlık, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) gibi çeşitli parametrelerdeki değişim bir stres durumunu temsil etmektedir. Su mercimeği eşzamanlı olarak grafen oksit (GO) ve Cu'ya maruz bırakıldığında özellikle 5 mg/ L'lik bir GO konsantrasyonunda ve 10 μM 'nin üzerinde bir Cu seviyesine maruz kaldığında, Cu stresinin azaldığı büyüme oranının yüzde inhibisyon miktarının artmasını ve klorofil içeriğinin azalmasını inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç olarak grafen oksit varlığının Cu stresinin bitkide oluşturduğu toksik etkisinden koruduğu görülmüştür [60].

Salix integral Thunb. (S. integral) bitkisinin yüksek Cu konsantrasyonuna maruz bırakılması, kökteki kalsiyum(Ca), potasyum(K) ve kükürt (S) konsantrasyonlarında belirgin artışlara neden olmuş; kökteki fosfor (P), sodyum (Na) ve çinko (Zn) konsantrasyonlarında ise azalmaya sebep olmuştur. Farklı konsantrasyonlarda Cu (50, 150, 450 mg kg⁻¹)' ya maruz bırakılan *S. integral* bitkisinde; yüksek Cu konsantrasyonlarında hem süperoksit dismutaz (SOD) hem de peroksidaz (POD) aktivitelerinin arttığı, katalaz (CAT) seviyesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir [68].

50 ve 100 mg Cu'ya maruz bırakılan *Abutilon indicum L.* bitkisinde katalaz (CAT), guakol peroksidaz (GPX) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan aktivitelerde hızlı bir artış tespit edilmiş; ancak daha yüksek konsantrasyonda (200 mg/kg toprak) Cu içeren ortamda yetiştirilen bitkide ise SOD, CAT ve GPX aktiviteleri azaldığı görülmüştür [19].

2.2.2 *Gossypium hirsutum* (Pamuk) Bitkisinde Cu Stresi

Dünyanın çoğu yerinde lifli bir ürün olarak yetiştirilen pamuk, çeşitli abiyotik ve biyotik stresler nedeniyle ciddi verim ve kalite kayıpları yaşamaktadır. Aşırı gübrelenme ve ilaçlamaya maruz kalan pamuk mahsülü sürekli Cu toksisitesi tehdidi altındadır. Bu konudaki literatür araştırıldığında, pamuk bitkisi üzerinde Cu toksisitesinin etkisi ve bu toksisitenin nasıl indirgenebileceği konularında güncel ve dikkat çekici çalışmaların bulunduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada [6] büyüme ortamındaki aşırı Cu konsantrasyonu (100 μM) pamuk kökünün büyümesini inhibe ettiği görülmüş ancak düşük konsantrasyonlarda Cu translokasyonu yoluyla büyümeyi hızlandırdığı ortaya

çıkmiştir. Pamuk bitkileri kök dokularında maksimum Cu'ı sınırlama eğilimi göstermiştir. Bununla birlikte büyüme inhibasyonun yapraklardaki Cu miktarının artmasıyla daha fazla ilişkili olduğu görülmüştür. Pamuk yapraklarındaki Cu kaynaklı oksidatif artış lipid membranı hasarına ve dolayısıyla büyüme inhibasyonuna sebebiyet verdiği görülmüştür. Saliklik asit (SA), Cu translokasyonunu sürgüne doğru sınırlandırarak ve antioksidan enzim aktivitelerini modüle ederek pamuk büyümesini arttırdığı görülmüştür. Artan hücrel Cu konsantrasyonu kök ve sürgün gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği görülse de, yaprak büyümesi Cu toksisitesine karşı daha hassas olduğu görülmüştür. Pamuk yapraklarındaki Cu kaynaklı oksidatif stres önemli ölçüde artan hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği ve lipid membranı hasarı ile kanıtlanmıştır [6].

Si (1.0 mM) 'nin farklı Cu (0, 25 ve 50 μ M) konsantrasyonlarında büyütülen pamuk fidelerinin büyümesi ve fizyolojisi üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan bir başka çalışmada yüksek Cu seviyelerinde fidelerdeki büyüme, biyokütle, fotosentetik pigmentler ve gaz değişim özelliklerinin azaldığı ancak, pamuğun yaprağı ve kökünün içindeki elektrolit sızıntısının (EL), hidrojen peroksit (H_2O_2) tiyobarbiturik asit reaktif maddelerinin (TBARS) içeriğini arttığı görülmüştür [69].

Mei v.d. (2015) yaptığı çalışmada salisilik asit (SA) ve askorbik asidin (AsA) pamuk genotiplerinde (iki ana hat (J208, Z905) ve bunların hibrit hattında (ZD14)) Cu kaynaklı toksisite değişikliklerine karşı iyileştirici rolü araştırılmıştır. Cu (100 μ M) stresine karşı tolerans potansiyelini incelemek için 2 haftalık pamuk fideleri, 100 μ M ile SA veya AsA ile üç gün boyunca ön muamele edilmiştir. Besin ortamındaki artan Cu konsantrasyonunun çalışılan üç pamuk genotipinin köklerinde ve sürgünlerinde Cu birikmesini arttırdığı görülmüştür. Artan hücrel Cu konsantrasyonu kök büyümesi ve sürgün gelişimini önemli ölçüde inhibe etmiş olsa da, yaprak büyümesinin Cu toksisitesine karşı daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Pamuk yapraklarındaki Cu kaynaklı oksidatif stres önemli ölçüde artmış hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği ve lipid membran hasarı ile kanıtlanmıştır. Pamuk yapraklarına doğru Cu translokasyonunun artması, biyokütle üretimini inhibe eden malondialdehit (MDA) içeriğini kuvvetli bir şekilde etkilemiştir. SA ve AsA ile önceden muamele edilmiş pamuk fideleri Cu stresi altında daha iyi büyüme göstermiştir. Genel Cu alımındaki artışa rağmen, SA ile önceden muamele fidelerin antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki modifikasyonu ve Cu

translokasyonunun inhibe edilmesi yoluyla Cu toksisitesine karşı koyabildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan pamuk genotiplerinde AsA'nın iyileştirici rolünün Cu stresi açısından SA'dan anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymuştur[6].

2.3 *Gossypium hirsutum* Bitkisinin Taksonomisi

Pamuk, *Gossypiae* familyasının *Malvaceae* ailesine ait olan *Gossypium* cinsi bir bitkidir. 18. yüzyılın ortalarında Linnaeus tarafından adlandırılmıştır. Tüylülüğünden (hirsut) dolayı *Gossypium hirsutum* L. olarak adlandırılmıştır. *Gossypium hirsutum* ssp. latifolium, *Gossypium hirsutum* var. *punctatum*, *Gossypium jamaicense*, *Gossypium mexicanum*, *Gossypium morillii*, *Gossypium punctatum*, *Gossypium purpurascens*, *Gossypium religiosum*, *Gossypium schottii*, *Gossypium taitanense* and *Gossypium tridens* olarak da adlandırılmaktadırlar. Yaygın olarak yayla pamuk, Amerikan pamuk veya Meksika pamuk olarak da bilinmektedir [70].

Gossypium cinsi genel olarak kromozomal benzerliğe dayalı olarak A-G ve K olarak adlandırılan sekiz diploid genomik gruba ve bir tetraploid genomik gruba ayrılmaktadır [71].

Diploid türler ($2n=26$) tüm kıtalara yayılmıştır ancak bunların çok azının tarımsal önemi bulunmaktadır. En önemli tarımsal pamuk türleri *G. hirsutum* ve *G. barbadense* olarak bilinmektedir. Her iki tür de tahminen Eski Dünya A genomu ($2n=26$) ve Yeni Dünya D genomu ($2n=26$) arasında doğal şartlarda gerçekleşmiş bir melezleme sonucu ortaya çıkmış allotetraploidler olarak bilinmekte (AADD) ve 52 somatik kromozoma sahip olduğu bilinmektedir [72].

2.4 *Gossypium hirsutum* Bitkisinin Önemi ve Kullanım alanları

Pamuk düzenli yağmur alan ılımlı iklimlerde yıllık olarak yetiştirilebilmektedir. Dikotiledon bir bitki olan pamuğun yaprakları 3 lobludur, tohumları kozalar içinde bulunmaktadır. Bilinen 50 türden sadece dört tanesi yaygın olarak yetiştirilmekte, geriye kalan 46 tür tropik bölgelerde ve alt tropik bölgelerde yetişmektedir. Yaygın olarak yetiştirilen dört pamuk türü, *G. hirsutum*, *G. herbaceum*, *G. barbadense* ve *G. arboreum* olarak bilinmektedir. Bu türler lifin uzunluğu, olgunluğu, mukavemeti ve

mikroneri (hücre duvarı kalınlığı) ile tanımlanan lif kalitesi açısından farklılık göstermektedir. Lif kalitesi, verimi ve belirli iklim koşullarına adaptasyondaki farklılıklar bazı pamuk türlerinin diğerlerine göre tercih edilmesine sebep olmuştur. Yaygın olarak yetiştirilen dört pamuk türünün tamamı, gıda üretimi ve tıbbi uygulama da dahil olmak üzere çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır [1]

Genelde "Amerikan ya da Meksika pamuğu" olarak anılan *G. hirsutum*, yüksek verim ve farklı çevre koşullarına adapte olabilmesi nedeniyle tüm pamuk türlerinin içinde en yaygın olarak yetiştirilen pamuk türü olduğu bilinmektedir [2], [3], [4].

Pamuk tomurcuğu, bitkinin en çok kullanılan kısmıdır ve tekstil, yemeklik yağ, kağıt, hayvan yemi ve tıbbi ürünler gibi geniş bir ürün yelpazesi için başlangıç hammaddesidir. Pamuk lifi konfor, renk tutma, emicilik ve dayanıklılık gibi birçok önemli özelliğe sahiptir [73].

Tüm pamuk bitkisi terpenler, fenolikler, yağ asitleri, lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi değerli bileşiklerin kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Tohumlar, kozalar, kaliks, yapraklar, saplar ve bitkinin kökleri içinde dağılan bu bileşikler, insanlarda ve hayvanlarda fonksiyonel biyoaktif rol oynamaktadır. Potansiyel kontraseptif etkilere sahip bir poli-fenolik, anti-inflamatuar ve sitotoksik özelliklere sahip olan gossipol, insan ve hayvanlarda bazı potansiyel uygulamalar için ilaç hammaddesi olarak kullanılan bileşik örneklerinden biri olarak bilinmektedir [74].

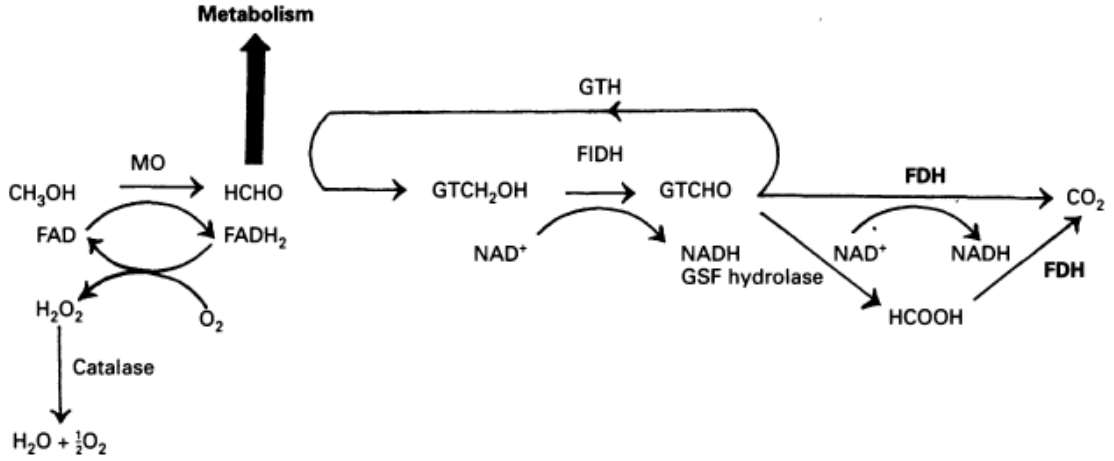
Büyüme koşulları ve yapısı nedeniyle belirli bölgelerde yetiştirilebilen pamuk üretiminin yaklaşık olarak beş bin yıldır yapıldığı tahmin edilmektedir. Sanayi devrimiyle birlikte pamuk zengin lif içeriğinden dolayı bitkisel tekstil hammaddesi olarak kullanılmaya başlamıştır, ayrıca lifi dışında çekirdeği de yağ sanayisinde kullanılmaktadır. Pamuk, dünya elyaf tüketiminin yaklaşık % 35'ini karşılamaktadır ve dünyadaki en önemli tekstil liflerinden biri olarak bilinmektedir. Pamuk yeryüzünde yaklaşık 80 ülkede yetiştirilmektedir ve dünya pamuk üretiminin üçte ikisi sadece Çin, Hindistan ve ABD tarafından sağlanmaktadır. ABD, dünya pamuk üretimi sıralamasında Çin ve Hindistan'ın ardından üçüncü sırada bulunmasına rağmen tek başına dünya pamuk ihracatının yaklaşık üçte birini karşılamaktadır ve pamuk ihracatında dünyada lider konumunda bulunmaktadır [75]. Ülkemizde ise 1924'de Adana'da daha sonra ise

Nazilli’de kurulan Bölge Pamuk Araştırma Enstitüleri’nde Amerika’dan getirilen kırktan fazla Upland-tipi (*G.hirsutum* türü) pamuk tohumluğu ile araştırmalara başlanmış ve bu tarihten itibaren Türkiye önemli pamuk üreticileri arasına katılmıştır [76].

Sağladığı istihdam imkânlarıyla birlikte tekstil ve hazır giyim değer zincirinde önemli ölçüde katma değer oluşturan pamuk gibi stratejik zirai ürünlerin üretimi devlet tarafından desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Türkiye açısından gerek tekstil ve hazır giyim endüstrisi ve gerekse kırsal kalkınma bağlamında tarım sektörü için hayati öneme sahip olan pamuğun desteklenmesi, pamuk üretiminin sürdürülebilirliğinin sağlanması stratejik önem arz etmektedir. Pamuk tekstil ve hazır giyim endüstrisinin iktisadi kalkınma sürecine sağladığı istihdam ve katma değer etkenlerinden dolayı ülkemizde çok önemli bir stratejik ürün olarak görülmektedir [77].

2.5 NAD⁺- Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Önemi

Format dehidrogenaz (FDH, EC 1.2.1.2) metilotrofik mikroorganizmalar ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan bir enzimdir. FDH enzimi NAD(P)⁺ varlığında formatın (HCOO⁻) CO₂’e oksidasyonunu katalizlerken NAD⁺’nin NADH’e indirgenmesini ve uygun şartlarda NADH varlığında ise ters yönde, CO₂’in indirgenmesini katalizleyebilmektedir. Bu özellikleri ile FDH, kiral bileşiklerin enzimatik sentezi sırasında kullanılması gereken ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)H’in yeniden elde edilmesi, ortamdaki formik asit miktarının belirlenmesi, atmosferik CO₂’in tutulması ve CO₂’den hidrojen yakıtının stabilize edilmiş bir formu olan formik asit üretilmesi gibi biyoteknolojik uygulamalar için çok önemli bir enzim olduğu bilinmektedir [78].



Şekil 2.1 Mayaların metanol katabolizmasında son adımda yer alan FDH'nin rolü [79].

Format dehidrogenazlar aerobik bakteri, arkea, maya, mantar, bitki ve omurgalıların yanı sıra anaerobik türlerde de bulunan bir enzim grubudur [80]. FDH'ler iki gruba ayrılmaktadır; metal bağımlı FDH'ler ve metalden bağımsız FDH'ler. İkinci gruba dahil olan FDH'ler, aynı iki alt birimden oluşan homodimerler olarak işlev görmektedir ve NAD(P)^+ 'ye karşı yüksek bir özgünlüğe sahip olduğu bilinmektedir [79], [81]. Oksidoredüktazlar optik olarak aktif bileşik üretiminde kimya ve farmasötik endüstrileri için olağanüstü bir biyokatalizör grubu olarak görülmektedir [81]. Birçoğu katalitik etkinlikleri için çok pahalı kofaktörler olan NADH veya NADPH gerektirmektedir. Oksidoredüktaz katalizli bir işlem geliştirmek için bu kofaktörlerin stokiometrik gereksinimi nedeniyle yerinde(in situ) kofaktör rejenerasyonu dikkate alınmaktadır [82]. FDH'ler, bu tür enzimatik indirgeme reaksiyonları sırasında NAD(P)^+ H'nin rejenerasyonu için önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir [79]. Bu enzimlerin endüstriyel olarak büyük bir öneme sahip olduğundan dolayı yüksek termal stabilite, çözücü stabilitesi ve katalitik stabilite gibi sanayi için gerekli bir çok özellik protein mühendisliği (rasyonel dizayn, yönlendirmeli veya satürasyon mutagenез) uygulamaları ile geliştirilmeye çalışılmaktadır [10], [15], [9], [83], [11].

2.6 Bitkilerde NAD^+ - Bağımlı Format Dehidrogenaz Enzimi

Yapılan araştırmalar NAD^+ - bağımlı FDH enziminin bitkilerde stres proteinlerine ait olduğunu göstermektedir. Kuraklık, sıcaklık değişimi, ağır metal kirliliği, kimyasal

ajanlara maruz kalma, hipoksiya, patajonik mikroorganizma saldırısı gibi durumlarla bitkilerde FDH sentezinin arttığı farklı yayınlarda bildirilmektedir [18]. Çok farklı stres faktörlerine karşı sentezleniyor olması ile bilinen FDH yüksek bitkilerin stres metabolizmasında kilit rol oynadığı evrensel bir enzim olarak görülmektedir.

Bu nedenle çevresel stres koşullarına dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda FDH önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı FDH tipleri tanımlanmıştır. Ancak, bitkilerde sadece NAD^+ - bağımlı tip (EC 1.2.1.2) olduğu bildirilmiştir. NAD^+ - bağımlı FDH'lerin solunum zincirine NADH sağladıkları gösterilmiştir [79]. Tarihsel olarak, ilk bitki FDH aktivitesi, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) tohumlarında tanımlanmıştır [84]. FDH transkript birikimi, hipoksi, dondurucu soğuk, kuraklık, patatesten karanlık ve yaralama gibi çeşitli abiyotik stresler altında ve *A. thaliana* yapraklarının yanı sıra arpa kökündeki demir eksikliği bildirilmiştir [85], [86].

Birçok bitkide FDH mitokondride lokalize olmakla birlikte *A. thaliana*'dan izole edilen FDH ile ilgili çalışmalar enzimin kloroplastta da taşındığını göstermektedir. Bu enzimin N-terminal bölgesi patates, arpa ve pirinçten elde edilen FDH enzimlerinin sinyal dizilerinden oldukça farklıdır. Belli koşullarda kloroplastta lokalize olan AthFDH'in FDH'in ters yöndeki reaksiyonunu yani CO_2 'in formata dönüşümünü katalizlediği düşünülmektedir [87]. Bu şekilde bazı bitkilerde FDH'in kloroplastta lokalize olması önemlidir. Çünkü bu komponentin metabolizması mitokondrininkinden oldukça farklıdır. FDH'in kloroplasttaki lokasyonu mitokondride normal olarak mümkün olandan daha yüksek enerjili elektron kaynağı sağlayabilmekte ve indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştirebilmektedir [78]. Araştırmalar hücre içinde meydana getirilen formatın diğer enzimatik reaksiyonlar tarafından tüketildiğinde FDH'in etkili bir şekilde CO_2 'i formata indirgediğini göstermektedir [87].

Biyotik ve abiyotik stres koşulları altında FDH'lerin bitki büyümesi üzerindeki etkileri hakkında çok sayıda veri olmasına rağmen, bitki kaynaklı rekombinant FDH'lerin kinetiği ve stabilitesi konusundaki bilgi sınırlıdır [18], [88], [89]. *Arabidopsis thaliana*'dan [90] *Glycine max*'dan [12], [13] ve *Lotus japonicus*'tan [14] izole edilen sadece birkaç gen, bitki kaynaklı rekombinant FDH'lerin stabilite özellikleri ve kinetik karakterizasyonları hakkında bilgi vermektedir. Mikrobiyal kaynaklı FDH enzimlerinin

biyoteknolojik kullanımı konusu oldukça yaygın bir şekilde çalışılmışken, bitki kaynaklı FDH'lerin rekombinant olarak elde edilmesi güçlükler nedeniyle biyoteknolojik potansiyelinin yeterince değerlendirilmediği da anlaşılmaktadır [15].

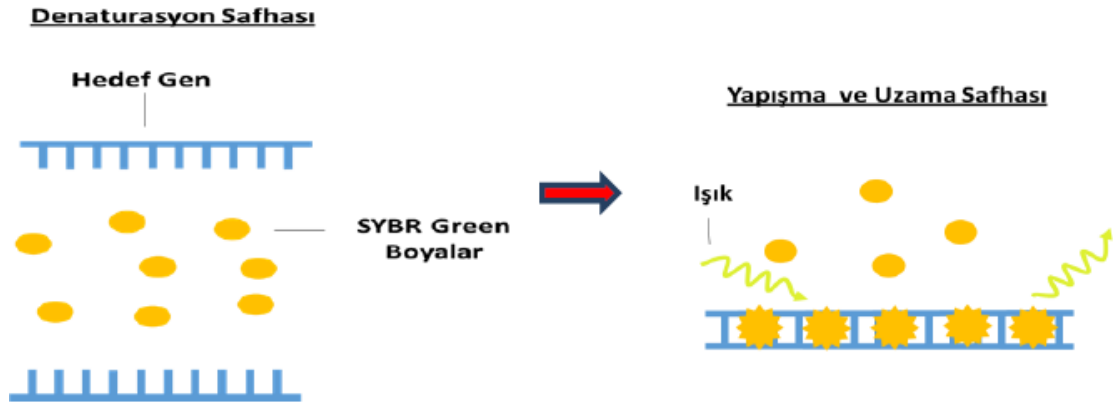
2.7 Kantitatif PCR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ve Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonunun (RT- PZR) ortaya çıkması, gen ekspresyonunun ölçüm alanını önemli ölçüde değiştirmiştir. Real time PCR'da, PCR süreci boyunca veriler toplanmaktadır. Böylece amplifikasyon ve tespiti tek bir adımda birleştiren teknik olarak bilinmektedir. Bu, PCR ürün konsantrasyonunu floresan yoğunluğuna bağlayan çeşitli farklı floresan kimyasalları kullanılarak elde edilmektedir [91]. Reaksiyonlar hedef amplifikasyonun ilk tespit edildiği zamandaki (veya PCR döngüsündeki) nokta ile karakterize edilmektedir. Bu değer genellikle floresan yoğunluğunun arka plan floresanından daha büyük olduğu döngü eşiği (Ct) olarak adlandırılmaktadır. Sonuç olarak başlangıç materyali içindeki hedef DNA miktarı ne kadar büyük olursa, floresan sinyalinde daha hızlı bir artış olur ve daha düşük bir Ct değeri vermektedir [92].

Gen ifadesini ölçmek için diğer yöntemlere göre real time PCR kullanmanın daha faydalı olduğu bilinmektedir. 7 ila 8 log büyüklüğünde doğru bir dinamik aralık ile nicel veri üretebilmektedir [93] ve amplifikasyon sonrası manipülasyon gerektirmemektedir. Real time PCR deneyleri, RNase koruma analizlerinden 10,000 ila 100,000 kat daha hassas olduğu bilinmektedir [94]. Nokta leke hibridizasyonundan 1000 kat daha hassas olduğu bilinmektedir [95]; hatta belirli bir transkriptin tek bir kopyasını bile algılayabilmektedir [96].

Ek olarak, real time PCR analizleri ile örnekler arasındaki %23 kadar küçük gen ekspresyonu farklılıklarını güvenilir bir şekilde tespit edebilmektedir ve bant densitometrisi ve prob hibridizasyonu gibi son nokta testlerinden daha düşük varyasyon katsayılarına sahip olduğu bilinmektedir. Real time PCR'da aynı özdeş sekanslara sahip haberci RNA'lar (mRNA'lar) arasında ayırım yapılabilmektedir ve diğer gen ekspresyonu analiz yöntemlerinden çok daha az RNA kalıbı gerektirmektedir [97], [98].

Real time PCR için başlıca dezavantaj olarak pahalı ekipman ve reaktifler gerektirmektedir. Ters transkripsiyon (RT) ve ardından polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), çeşitli kaynaklardan türetilen mRNA ekspresyonunu analiz etmek için tercih edilmektedir. Real time RT-PCR oldukça duyarlı bir teknik olarak bilinmektedir ve nadir transkriptlerin ve gen ekspresyonundaki küçük değişikliklerin miktarlarının belirlenmesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra gerçekleştirilmesi kolay olarak görülmekte ve gerekli doğruluğu sağlamaktadır. Güvenilir ve aynı zamanda hızlı ölçüm sonuçları üretmektedir. Real time PCR'de yeni sentezlenen PCR ürünleri için en basit tespit tekniği, özellikle çift-iplikçikli DNA'ya bağlanan SYBR Green veya Eva Green floresans boyası kullanılmaktadır. SYBR Green (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenylquinolinium) bir asimetrik siyanin boya olup çift zincirli DNA'nın küçük oluşuna bağlandığı bilinmektedir ve analiz sırasında her döngünün uzama safhasında eş zamanlı olarak ölçülebilmektedir. Bu boya bazlı algılama teknolojisi hedef diziye özgü olmadığından dolayı primer dimer oluşturabilmekte ve yanlış eşleşmiş PCR ürünlerine bağlanabilmektedir; böylece yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir. Bu yanlış pozitif sonuçları belirlemek için erime eğrisi (Melting curve) analizi kullanılmaktadır. Erime noktaları belirlenmesi işlemi PCR sonrası oluşan tüm çift zincirli DNA'lara sıcaklık uygulanarak yapılmaktadır. Guanin/sitozin oranı daha fazla olanlar ve daha uzun DNA zincirine sahip olanların erime noktaları daha yüksek olmasından dolayı primer dimer ve yanlış eşleşmiş DNA'lar belirlenebilmektedir [99], [100], [101]. SYBR Green teknolojisinin kullanım avantajları olarak daha az maliyetli olması ve daha güçlü floresan sinyal oluşturması sayılabilmektedir. Dezavantajları olarak da PCR reaksiyonlarında yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etkisi ve daha düşük tekrarlanabilirliği görülmektedir [102], [101].



Şekil 2.2 Real Time PCR’da kullanılan SYBR Green Teknolojisinin çalışma mekanizmasının şematik sunumu [99].

Üçüncü nesil boya olarak tanımlanan ve son zamanlarda SYBR Green boyalara alternatif olarak geliştirilen Eva Green; SYBR Green boyalardan daha stabil, daha hassas ve daha az inhibitör etkisi sunması gibi özelliklerinden dolayı diğer boyalara göre daha fazla tercih edilmektedir [103].

Seçimin ölçüm yöntemi yöntemi; hedef diziye, dokuda mevcut mRNA miktarının beklenen aralığına, gereken doğruluk derecesine ve nicelleştirmenin göreceli veya mutlak olması gerekip gerekmediğine göre belirlenmektedir [93], [104].

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Cihazlar:

Vortex (Heidolph, Stuart), hassas terazi (Shimadzu ATX224), manyetik karıştırıcı(Thermo fisher), Otoklav (Hirayama HVE-50), Santrifüj cihazı(Hettich Universal 32R), mikro-hacim spektrofotometre (PCRmax Lambda), güvenlik kabini (Hedlab X-Bio Class-II), -80 °C Dolabı(Thermo fisher), CFX Connect real-time PCR (Bio-Rad, ABD), Spektrofotometre cihazı (UV-1800), mikrolaka spektrofotometre (Biotek Instruments MQX200R2), jel elektroforez cihazı(Thermo fisher EC250-90), mikropipet(Eppendorf)

3.1.2 Kimyasallar ve Malzemeler:

G. hirsutum L. Tohumları(Erşan-92), Murashie ve Skoog besiyeri(HIMEDIA), Erlen(Isolab) Agar(Sigma Aldrich), manyetik balık(isolab), sodyum hidroksit(NaOH, Sigma Aldrich), hidroklorik asit(HCl, Sigma-Aldrich), bakır (II) sülfat($\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$, Sigma Aldrich), sülfirik asit(H_2SO_4 , Sigma Aldrich), distile su(H_2O), etanol(EtOH, Sigma Aldrich), çamaşır suyu(hypo), dietil pirokarbonat(depc, Sigma Aldrich), SYBR Green (Safe View Classic, ABM), Eva Green (Safe View Classic, ABM), etilendiamintetraasetik asit (EDTA Sigma Aldrich), Triton–X 100 (Sigma Aldrich), quartz küvet (Sigma Aldrich) fenilmetilsülfonil florid (PMSF,Thermoscientific) ve polivinilpirolidon (PVP, Sigma Aldrich), Tris(Sigma Aldrich), Agaroz (Sigma Aldrich), TBA(Sigma Aldrich), Trikloroasetik Asit(TCA, Sigma Aldrich), Titanyum(III) sülfat (Sigma Aldrich), falkon tüp(Isolab), fenazin metosülfat (PMS, Sigma Aldrich), nitroblue tetrazolium (NBT, Thermo Fisher), β -

nicotinamide adenine dinucleotide, NAD(NEB), sodyum format(MERCK), qPCR GreenMaster(Bio-Rad, ABD), 1 kb DNA Markör (NEB), RNA Markör (RiboRuler High Range Thermo Scientific).

3.1.3 Kitler

Zymo Research Quick-RNA™ Mini Prep Kit. 50 defa kullanım için Kit içeriği; RNA lizis tamponu(50 ml), RNA hazırlık tamponu, RNA yıkama tamponu, DNaz / Rnaz içermeyen Su, DNaz 1, DNA Sindirim Tamponu, Spin-Away™ Filtreler, Zymo-Spin™ IIICG kolonları, Toplama Tüpleri

SCRIPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience)

UNG Kiti (JenaBioscience)

Ransod Kiti (Randox Labs.). Kit içeriği; R1a. karışık Substrat(Xanthine 0.05 mmol/l ve I.N.T. 0.025 mmol/l) → 5 x 20 ml, R1b. Tamponu (CAPS 40 mmol/l, pH 10.2 ve EDTA 0.94 mmol/l) → 1 x 105 ml, R2. Xanthine Oxidase (80 U/l) → 3 x 10 ml, CAL Standart → 5 x 10 ml.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Gossypium hirsutum* (Pamuk) Bitkisinin Büyüme Koşulları

G. hirsutum L. (Erşan-92) tohumları Doğu Akdeniz Geçiş Bölgeleri Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Kahramanmaraş, Türkiye' den Yüksek Ziraat Mühendisi Güven Borzan tarafından sağlanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu yapılmış ve kabuksuz tohumlar farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 75 ve 100 µM) Cu(SO₄)₂ ile Murashige ve Skoog ortamı (½ MS) içeren magenta kaplarına aktarılmıştır. Kontrol numunesi ilave Cu içermeyen ½ MS ortamında büyütülmüştür.

Tohumlar, 21 gün boyunca, 96 µmol m⁻² s⁻¹ aydınlatma, hava nemi % 60-70 ve gece/gece sıcaklığı 25/23 °C ile 16 saat gün / 8 saat altında bir büyüme odasında büyütülmüştür. Sonraki analizler için ortalama büyüklüğe erişmiş bitkiler seçilmiştir. Bütün deneyler üç kez tekrarlanılmıştır.

3.2.2 Murashie ve Skoog Ortamı

Murashige ve Skoog ortamı bitki hücre kültüründe, bitkilerin laboratuvar ortamında yetiştirilmesi için kullanılan ve bitki büyümesi ve yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesi için gerekli malzemeleri içeren besiyeridir. MS ortamı 1/2 kuvvetinde hazırlanmıştır. Projede Cu stresinin incelenmesi için MS ortamına farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 75 100 μ M) $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$ eklenmiştir.

Toz olarak bulunan Murashie ve Skoog (HIMEDIA) besiyeri 2.07 gr hassas terazide tartılmış ve erlene eklenmiştir ($\frac{1}{2}$ oranında MS olması için). 800 ml distile su şişeye eklenmiştir. Manyetik balık şişenin içine atılmış ve malzemelerin çözünmesi için şişe manyetik karıştırıcıda ve sabit hızda karıştırılmıştır.

Şişedeki besiyerinin pH değeri 5.75 ± 0.5 değerine gelinceye kadar 1N NaOH veya HCl ile ayarlanmıştır. pH ayarlandıktan sonra erlen 1 lt olana kadar distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C , 15 lbs de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Daha sonra belli soğukluğa gelen besiyerine farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 75 100 μ M) $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$ eklenmiştir ve 125 ml olacak şekilde magenta kaplarına aktarılmış ve jelleşmesi beklenmiştir.

3.2.3 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

G. hirsutum L. (Pamuk) tohumları kabuklarının tüylü yüzey yapısından dolayı oldukça kirli (kontamine) olduğundan sterilizasyonu önemlidir. Tohumların yüzey sterilizasyonu, [105] 'den modifiye edilen protokole göre aşağıdaki gibi yapılmıştır:

G. hirsutum L. tohumları (*Erşan-92*) konsantre H_2SO_4 ile 15 dk boyunca muamele edilmesinin ardından 3 er defa distile su ile yıkanmıştır. Tohumlar 1 gece boyunca $\text{H}_2\text{O}'$ da havalandırılmış ve % 70 EtOH içeren Tween-20 (her 100 cm^3 de 2 damla) ile muamele edilmiştir. Daha sonra tohumlar 30 dk boyunca % 20 çamaşır suyu içeren Tween -20 içerisinde çalkalanmış ve birkaç defa sterildistile su ile yıkanmıştır.

3.2.4 Toplam (Total) RNA İzolasyonu

Toplam RNA, Zymo Research Quick-RNA™ Mini Prep Kit kullanılarak aşağıdaki gibi izole edilmiştir:

Beliri bir boyuta gelmiş olan bitkiden kök ve yaprak dokuları alınarak sıvı azot ile havanda dövülerek toz haline getirilmiştir.

100 mg öğütülmüş doku 600 µL RNA lizis tamponu ile hücrenin çözülmesi sağlanmıştır.

Karışım 30 s için 15,000 x g'de santrifüj edilmiş ve üst sıvı (süpernatant) alınmıştır.

Süpernatant Spin-Away™ Filtreler eklenmiştir ve 15,000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Bu adımda gDNA filtrede kalmış ve RNA pürifikasyonu için filtreden geçen sıvı toplanmıştır ve yeni bir tüpe alınmıştır.

Filtreden geçen sıvıya 1:1 hacim oranında etanol (% 95-100) eklendi ve iyice karıştırılmıştır. Karışım Zymo-Spin™ IIICG kolonuna transfer edilmiştir ve 30 s için 15,000 x g'de santrifüj edildi ve süpernatant atılmıştır.

Kolon 80 µL Dnase 1 ile 15 dk oda sıcaklığında muamele edilmiş daha sonra 400 µL RNA hazırlık tamponu eklenmiştir. Karışım 30 s için 15,000 x g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

700 µL RNA yıkama tamponu kolona eklenerek, karışım 30 s için 15,000 x g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kolon 400 µL RNA Yıkama Tamponu ile tekrardan muamele edilmiştir. Yıkama tamponunun tamamen çıkarılmasını sağlamak için kolon 2 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra kolon RNaz içermeyen bir tüpe aktarılmıştır.

Toplam RNA, 50 µl DEPC ile işlenmiş su ile kolondan alınmıştır.

RNA yoğunluğu ve saflığı, mikro-hacim spektrofotometre (PCRmax Lambda) kullanılarak belirlenmiştir.

RNA bütünlüğü % 1.2 agaroz jel elektroforezi ve SYBR Green (Safe View Classic, ABM) boyaması yolu ile değerlendirilmiştir.

Konsatrasyon ölçümü yapılan RNA'lar komplementer DNA sentezi(cDNA) işlemi gerçekleştirilceye kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.5 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Toplam RNA'nın 400 nanogramı, SCRIPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience) kullanılarak birinci-iplik cDNA'ya sentezlenmiştir. SCRIPT Ters Transkriptaz, RNase H aktivitesi ve artan termal stabilitesi ile M-MLV Ters Transkriptazının (M-MLV RT) genetik olarak yapılandırılmış bir versiyonudur. Tek iplikli RNA veya DNA'yı kalıp olarak kullanan bir

primerden başlayarak tamamlayıcı bir DNA zincirini sentezleyen bir RNA yönelimli DNA polimerazdır. Devre dışı bırakılmış RNaz H aktivitesi ile birlikte arttırılmış termal stabilitesi, standart M-MLV RT ile karşılaştırıldığında arttırılmış bir spesifisite, daha yüksek cDNA verimi ve tam uzunluktaki cDNA sentezi için geliştirilmiş bir verimlilik ile sonuçlanmaktadır. Enzim, 100 bp'den 10 kb uzunluğa kadar cDNA'nın sentezi için önerilmektedir.

Çizelge 3.1 SCRIPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience) içeriği

Malzemeler	PCR-511S
SCRIPT Ters Transcriptase; 200 birim / μ l	100 μ l
SCRIPT RT Tamponu; 5x conc	400 μ l
dNTP Karışımı; 10 mM each	100 μ l
DTT stok solüsyonu; 100 mM	100 μ l
Oligo-(dT)20 primer; 100 μ M	50 μ l
Random Hexamers 100 μ M	50 μ l
RNase Inhibitor 40 units/ μ l	50 μ l
Pozitif Kontrol RNA 10 ng/ μ l	10 μ l
Rnaz içermeyen su	1.2 ml

cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 200ng/ μ l olacak şekilde eşitlenmiştir. RNA örnekleri -20°C'den çıkartılarak çözünmeleri sağlanmış ve çözünen RNA örnekleri kısa bir süre nazikçe vortekslenmiştir. Daha sonra Çizelge 3.2' de belirtilen talimatlara göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Tüm deney buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 cDNA Sentez Reaksiyonunun Hazırlanması

Bileşenler	Final konsantrasyon	20 µl deney
Rnaz içermeyen su	-	10 µl
SCRIPT RT Tamponu	1x	4 µl
dNTP karışımı	500 µM	1 µl
DTT stok solüsyonu	5 mM	1 µl
Rnaz inhibitörü	20 birim	1 µl
SCRIPT Ters Transcriptase Enzimi	100 birim	0.5 µl
Oligo dT Primer	oligo-dT15-25 primer: 50 pmol (300 ng)	0.5 µl
RNA kalıbı	400ng/ul	2 µl

Hazırlanan bu reaksiyon karışımı buz üzerinde bulunan eppendorf tüpler içerisine ilave edilerek toplamda 20 µl'lik reaksiyon hacmine ulaşılmıştır. Enzim eklemeyen önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile nazikçe karıştırılmıştır.

Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal cycler cihazına konularak cDNA reaksiyonu çizelge 3.3' de belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 cDNA reaksiyonu inkübasyon süreci

Sıcaklık	Zaman
42 °C	10 dakika
50 °C	60 dakika
70 °C	10 dakika

Bu süre sonunda elde edilen ürünler -20 derecede saklanmıştır.

3.2.6 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kantitatif PZR (Real time PCR) sayesinde gen ürünlerinin miktarı ve nükleik asit amplifikasyonu, kolaylıkla ve düşük bir kontaminasyon olasılığı ile sağlanmaktadır. Bu yöntem sayesinde elde edilen RNA'lar kolaylıkla niceliksel ve niteliksel olarak saptanabilmektedir. Örneklerin kantifikasyonu (miktarı) reaksiyon sırasında oluşan floresan sinyali sayesinde eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarında elektroforez gibi yöntemlere ihtiyaç duyulmamasından dolayı normal PCR yöntemine göre daha hızlı ve daha düşük bir kontaminasyon riskine sahip olmaktadır.

Gen ekspresyon seviyeleri, qPCR GreenMaster kullanılarak bir Bio-Rad CFX Connect (Bio-Rad, ABD) üzerinde UNG Kiti (JenaBioscience) kullanılarak qRT PCR ile belirlenmiştir. “Housekeeping” gen olarak Aktin kullanılmıştır. Primer tasarımı, Pamuk FDH (Acc.No. XM_016894382.1)dizisine göre yapılmıştır.

Çizelge 3.4 RT PCR' de kullanılan oligonükleotidler

Primer	Sekans	Amplikon boyutu
Actin-fwd	CTGGAGACTGCCAAGAGCAGCT	97 bp
Actin-rev	CCGGGCAACGGAATCTCTCAGC	97 bp
FDH-RT-fwd	ATGTTTGGTACCCGCAACCT	215 bp
FDH-RT-rev	ATCGGTATTGAGGAGCGAGC	215 bp

Kantitatif PCR MolGen Biyoteknolojisi firmasında hizmet alımı olarak yaptırılmıştır.

Ekspresyon seviyeleri aktin genin ekspresyon seviyesine göre (*G. hirsutum*'da iç kontrol olarak) normalleştirilmiştir. Kullanılan primerler çizelge 3.4' de listelenmiştir

Toplam hacim 20 µl olacak şekilde çizelge 3.5' de belirtilen miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 RT- PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktarlar
PCR kalitesinde Su	6.8 µl
Real Time Master Mix	10 µl
Forward Primer	0.6 µl
Reverse Primer	0.6 µl
cDNA ürünü	2 µl

Daha sonra 96 kuyucuklu mikropalak içine konulan standart ve örnek karışımları Bio-Rad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon Çizelge 3.6'da belirtilen talimatlara göre gerçekleştirilmiştir

Çizelge 3.6 RT- PCR reaksiyon süreci

Sıcaklık	Zaman
50 °C	2 dakika
95 °C	2 dakika
95 °C	15 saniye
55 °C	1 dakika
72 °C	30 saniye

} 40 siklus

Reaksiyon sonrası cihazın önerdiği şekilde erime eğrisi (Melting Curve) analizi yapılmıştır. Gen ürünleri Cihaz üzerinde EVA Green boyası ile tespit edilmiştir. Üçüncü nesil boya olarak tanımlanan Eva Green boyalar gen ürününün tespitinde SYBR Green boyalara alternatif olarak daha hassas, daha stabil ve daha az inhibitör etkisi sunması gibi özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Ayrıca erime eğrisi analizinde SYBR Green boyalara göre daha iyi sonuç vermektedir [103]. Deteksiyon basamağı olarak 59 derece belirlenmiştir.

Gen ifadesindeki bağıl değişiklikler $2^{-\Delta\Delta CT}$ algoritması kullanılarak analiz edilmiştir [106]. qRT-PCR'ler, test edilen her koşuldan bağımsız olarak izole edilen iki farklı RNA numunesi üzerinde üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 Enzim İzolasyonu

Enzim izolasyonları Sekmen, Ozgur [107] protokolüne göre aşağıdaki gibi yapılmıştır:

Taze yaprak ve kök doku örnekleri 21 gün boyunca 0, 50, 75 ve 100 μM $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$ stresi altında yetiştirilen pamuk bitkilerinden alınmıştır.

Taze dokular, sıvı azotla ince bir toz halinde öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki numunelerin tam ağırlığı, protein ve enzim analizleri için belirlenmiştir.

Numuneler, 0.1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA),% 0.2 (w/ v) Triton–X 100, 1-mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF) ve polivinilpirolidon (% 2, w / v) içeren, 1.5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 içinde homojenize edilmiştir.

Homojenatlar süzölmüş ve 4 ° C'de 15,000 x g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe alınarak çökelen kısım (katı kısım) aynı tamponun 0.5 ml'sinde yeniden süspanse edilmiştir. Süspansiyon 15 dakika 15,000 x g'de santrifüjlenmiştir.

Süpernatantlar birleştirilerek **süperoksit dismutaz(SOD)** ve **format dehidrogenaz (FDH)** analizleri gerçekleştirilinceye kadar buz üzerinde muhafaza edilmiştir.

3.2.8 Protein Konsantrasyonu Analizi

Bitki ekstraktlarının toplam çözünür protein içerikleri Bradford protein testi kiti (Bio-Rad) kullanılarak, Bradford [108] protokolüne göre belirlenmiştir. Öncelikle sığır serum albumini(BSA) kullanılarak standart eğri çizilmiş, bu standartlara göre de bitki ekstraktlarının toplam çözünür protein içerikleri belirlenmiştir. Bu protokol süresince BSA standartları ve enzim ekstraksiyonları buz üzerinde çalışılmıştır. Bitkilerin protein konsantrasyonlarının belirlenmesi aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1X olarak kullanılan boya maddesi +4°C'den alındı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilerek deney için hazır hale getirilmiştir.

Bio-Rad kitinin bradford protein testi kitinde standart eğri oluşturmak için 125–1,000 µg/ml konsantrasyonları aralığında BSA (sığır serum albumii proteini) içermektedir. 5 µl BSA standartları mikropipet (Eppendorf) ile alınmış ve 96 kuyucuklu mikropalak içerisine ayrı ayrı eklenmiştir. Daha sonra her bir BSA standartının üzerine 250 µl 1x boya maddesi eklenmiş ve bir kuyucuğa blank olarak sadece boya maddesi eklenmiştir. 5 dk karanlıkta inkübasyondan sonra 595 nm de mikropalaka spektrofotometrede (Biotek Instruments MQX200R2) okunmuştur. Okunan değerlere göre BSA standart eğrisi çizilmiştir. Her numune için 3 kuyucuk kullanılmıştır.

Enzim ekstraksiyonu yapılmış pamuk bitkisinin kök ve yaprak numunelerinin her birinden 5 µl alınıp 96 kuyucuklu mikropalağa ayrı ayrı eklenmiştir ve daha sonra üzerlerine 250 µl boya maddesi eklenmiştir. Absorbans değeri 5 dk karanlıkta inkübasyondan sonra 595 nm'de mikropalaka spektrofotometre cihazında (Biotek Instruments MQX200R2) ölçölmüştür. Toplam çözünür protein içerikleri standart

eğrideki formüle göre hesaplanmıştır. Her numune için 3 er kuyucuk kullanılmıştır. Enzim konsantrasyonları standart eğrideki konsantrasyon aralığına girebilmesi için gerektiğinde dilüsyon yapılmıştır.

3.2.9 FDH Aktivitesi İçin Kolorimetrik Analiz

Kök ve yaprak dokularının FDH aktivitesi kolorimetrik analiz ile Özgün v.d. (2016) protokolüne göre belirlenmiştir. FDH aktivitesi ölçümü için daha önceden enzim ekstraksiyon protokolü ile üretilen üst sıvılar (ham ekstrakt) kullanılmıştır. Kolorimetrik analiz, format dehidrogenaz tarafından üretilen NADH ile reaksiyona giren fenazin metosülfat (PMS) varlığında, nitroblue tetrazolium'un (NBT) çözülebilir formazana indirgenmesine dayanmaktadır [16]. Analiz aşağıdaki gibi yapılmıştır:

10-mM NAD⁺ 'dan 20 µl , 20 µl enzim ekstrakt (GH Kök ve yaprak dokularından elde edilen FDH enzimleri), 20 µl 200-mM sodyum format ve 300 µM NBT(nitroblue tetrazolium) ve 30 µM PMS (fenazin metosülfat) içeren 140 µl 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0) UV quartz küvet (Sigma aldrich) içerisinde karıştırılmıştır. Doğru bir ölçüm için küvete reaksiyonu başlatan 20 µl' lik enzim ekstraktı en son eklenmiştir.

FDH aktivitesi, mikropilaka spektrofotometre (Biotek Instruments MQX200R2) ile 96-kuyucuklu bir plakada 580 nm'de ölçülmüştür. Her bir örnek için 3 farklı ölçüm alınmıştır.

3.2.10 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)

SOD aktivitesinin belirlenmesi Ransod Kiti (Randox Labs.) kullanılarak McCord ve Fridovich (1969) metoduna göre test edilmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD) oksidatif enerji süreçleri sırasında üretilen toksik süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen perokside ve moleküler oksijene değişimini hızlandırmaktır. Bu yöntemde kırmızı bir formazan boyası oluşturmak üzere 2- (4-iyodofenil) -3- (4-nitrofenol) -5-feniltetrazolyum klorür (I.N.T.) ile reaksiyona giren süperoksit radikalleri üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılmaktadır. Süperoksit dismutaz aktivitesi daha sonra bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmektedir. Bir birim SOD, test koşulları altında INT'nin azaltılma oranının % 50 inhibisyonuna neden olan bir birim olarak olarak kullanılmaktadır [109].

SOD aktivite ölçümleri aşağıdaki gibi yapılmıştır:

5 µl hücre lizati ve 170 µl R1 reaktifi 96 oyuklu mikrolaka eklenmiş ve daha sonra karıştırılmıştır. 25 µl reaksiyon başlatıcı ajan (R2, ksantin oksidaz çözeltisi) ilave edilmiştir, karıştırılmış ve başlangıç abzorbanı (A1) 30 saniye sonra 505 nm'de mikrolaka spektrofotometre cihazında belirlenmiştir. (Biotek Instruments MQX200R2).

Son abzorbanı ise (A2) 3 dakika sonra ölçülmüştür.

Enzim aktivitesi standart eğri üzerinden belirlenmiştir. Hesaplamalar aşağıda gösterilmiştir. Tüm standart oranlar ve örnek seyreltici oranları, örnek seyreltici oranının yüzdelere dönüştürülmüş ve bir yüzde inhibisyonu vermek için % 100'den çıkarılmıştır. Her bir numune için yüzde inhibisyonunun hesaplanmasının ardından, enzim aktivitesi, her bir standart için (S1 ila S6) log10'a karşı yüzde inhibisyonunun (SOD ünitelerinde / ml'de standart konsantrasyon) çizilmesiyle elde edilen standard eğriden belirlenmiştir.

3.2.11 Malondialdehid (MDA) İçeriğinin Analizi

Membranın çoklu doymamış yağ asitlerinin ayrışma ürünlerinden biri olan malondialdehid (MDA), oksidatif stresin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [110]. Ağır metal içeren bir ortamda yetiştirilen bitkilerin oksidatif stresini belirlemek için bir diğer önemli parametre, MDA (malondialdehid) içeriğini değerlendirmektir. MDA, membran lipid peroksidasyonunun ürünüdür ve nükleik asit ve amino asitlerle çapraz bağlanma potansiyeline sahiptir ve çözünmeyen çökeltiler oluşturmakta, bu da hücrelerde biyolojik süreçlerin kesintiye uğramasına neden olmaktadır [18]. MDA içeriği olarak eksprese edilen lipid peroksidasyon düzeyi 2-tiyobarbitürik asit (TBA) reaktif metabolit olarak belirlenmiştir ve Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler Ali, Rizwan [69] protokolüne göre aşağıdaki gibi analiz edilmiştir:

0.25 g taze doku, 5 ml % 0.1 (hacim / hacim) TCA ile karıştırılmıştır. Sonrasında karışım 15 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüjlenmiştir. % 0,5 TBA içeren % 20'lik TCA'nın dört mililitresi, 1 mL yüzer maddeye(süpernatant) eklenmiştir. Numune 30 dakika boyunca 95 ° C'de ısıtılmış ve daha sonra hızla buz üzerinde soğutulmuştur.

10 dakika boyunca 10,000 x g'de santrifüjlemeden sonra, süpernatantın absorbens değeri 532 ve 600 nm'de spektrofotometre cihazında (UV-1800) kinetik metoduyla ölçülmüştür. MDA içeriği $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bir sönüm katsayısı ile hesaplanmıştır.

3.2.12 Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Analizi

Hidrojen peroksit doğal olarak meydana gelen bir inaktive edici ve sinyalleme ajanıdır. Ayrıca hücre içindeki konsantrasyonu stres koşullarında artmaktadır [17]. H_2O_2 ölçümü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

H_2O_2 içeriğinin tayini, 50 mg kök veya yaprak dokusunun, 3 ml 50 mM fosfat tamponu, pH 6.5 içinde ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Homojenat, 30 dakika boyunca 6000 x g'de santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni bir Falkon tüpe alınmıştır. Süpernatant (3 ml) %20 (v/v) H_2SO_4 içinde 1 ml %0.1 titanyum sülfat ilave edilmiş ve karışım 20 dakika 6000 x g'de santrifüjlenmiştir.

Süpernatant'ın absorbens değeri 410 nm'de spektrofotometre (UV-1800) cihazı ile ölçülmüştür.

H_2O_2 içeriği $0.28 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ sönme katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır [69].

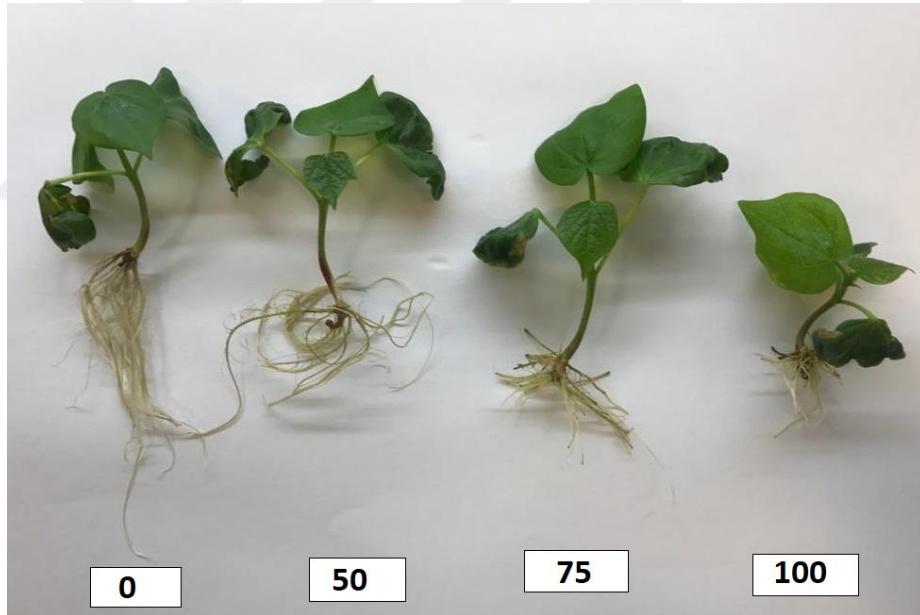
3.2.13 Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm analizler üç kez yapılarak ortalaması alınmış ve standart sapma (SD, n = 3) değerleri hesaplanmıştır. Varyans analizi (ANOVA), JMP İstatistiksel Discovery, SAS, sürüm JMP 6.0.0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra farklı örnek gruplarının önemini değerlendirmek için Tukey testi kullanılmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Farklı Cu konsantrasyonlarında yetiştirilen Pamuk Bitkileri

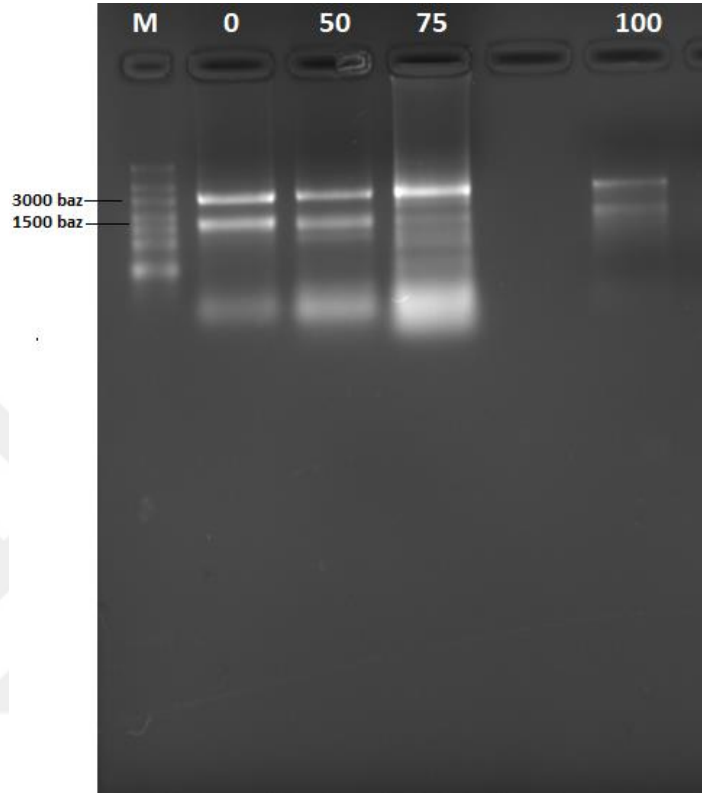


Şekil 4.1 Farklı Cu konsantrasyonları içeren ortamda yetişen *Erşan-92* (Pamuk) Bitkisi

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere artan Cu konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak pamuk bitkilerinin kök dokularında gelişim eksikliği görülmüştür, ancak kontrol grubuna kıyasla 50 μM Cu içeren ortamda yetişen pamuk bitkisinin kök dokusunda belirgin bir gelişim eksikliği gözlenmemiştir. 0, 50 ve 75 μM Cu içeren ortamda yetişen pamuk bitkilerinde yaprak dokularının gelişimi benzer olmasına rağmen 75 ve 100 μM Cu içeren ortamda

yetişen pamuk bitkisinin özellikle kök dokusu diğerlerine göre daha az gelişmiştir(Şekil 4.1).

4.1.2 RNA İzolasyonu



Şekil 4.2 RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü

21 gün boyunca farklı Cu konsantrasyonları içeren ortamda yetiştirilen pamuk bitkilerinin taze dokularından elde edilen total RNA izolasyonlarının jel görüntüsü Şekil 4.2 de gösterilmiştir.

Şekil 4.2 görüldüğü gibi boyutları 3000 baz ve 1500 baz olan 2 bant elde edilmiştir. RNA bütünlüğü % 1.2 agaroz jel elektroforezi ve SYBR Green (Safe View Classic, ABM) boyaması yolu ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.2). Markör olarak RNA Ladder (RiboRuler Thermo Scientific) kullanılmıştır.

4.1.3 NAD⁺ Bağımlı FDH Transkripsiyon Analizi

Bitkilerde, NAD⁺ bağımlı FDH bir stres proteini olarak bilinmektedir ve kuraklık, soğuk veya ısı şoku, hipoksi, karanlık, kimyasal maddelere maruz kalma veya patojenik mikroorganizmaların etkisi gibi çeşitli abiyotik koşullar altında indüklenmektedir [12], [88], [8]. Ancak, ağır metal stresi altında yetiştirilen bitkilerde FDH aktivitesinin araştırılması konusunda pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada *Vigna umbellata* (VuFDH) FDH'nin Al stresine yanıt olarak ekspresyon seviyesi artmış olduğu ve artmış FDH ekspresyonunun alüminyumun toksik etkisini azaltma doğrultusunda görev yaptığı bildirilmiştir. Ayrıca, rekombinant tütünde VuFDH'nin aşırı ekspresyonu, Al toksisitesine daha fazla toleransla sonuçlandığı görülmektedir [18].

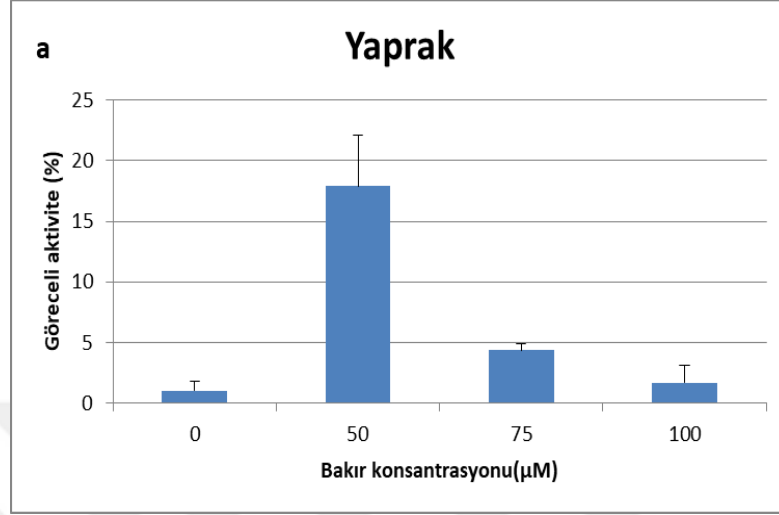
Çizelge 4.3.a Yaprak FDH transkripsiyon analizi

Cu Konsantrasyonu(μ M)	Göreceli aktivite(%)
0	1
50	17,87659421
75	4,34693945
100	1,693490625

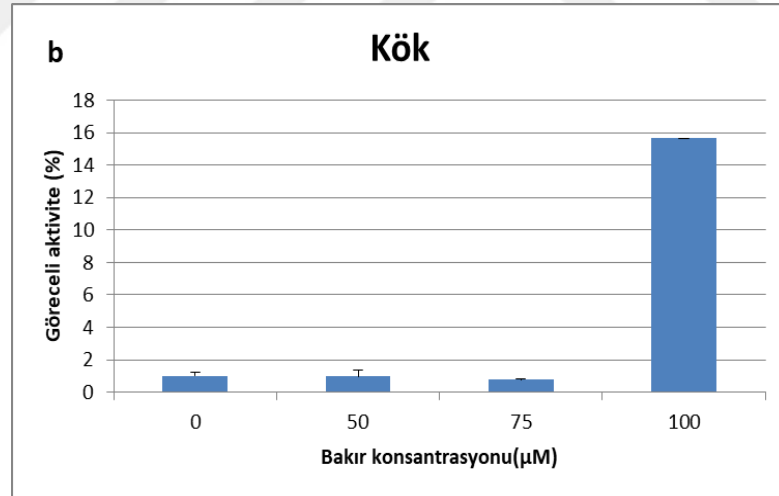
Çizelge 4.3.b Kökteki FDH transkripsiyon analizi

Cu Konsantrasyonu(μ M)	Göreceli aktivite(%)
0	1
50	0,972654947
75	0,773782497
100	15,67072476

Çalışmamızda Cu stresi altında yetiştirilen *Erşan-92* pamuk genotipinde NAD⁺-bağımlı FDH transkripsiyonunun ekspresyonu analizi ilk kez gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3.a Yaprak FDH transkripsiyon analizi. Bağlı ekspresyon seviyesi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı; hata çubukları SD'yi göstermektedir.



Şekil 4.3.b Kökteki FDH transkripsiyon analizi. Bağlı ekspresyon seviyesi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı; hata çubukları SD'yi göstermektedir.

Cu stresine yanıt olarak FDH kodlama geninin bağlı ekspresyon seviyesini analiz etmek için qPCR uygulanmıştır. Bağlı ekspresyon analizi, kontrol grubuna kıyasla yapılmıştır. 50 µM Cu varlığında FDH transkript seviyesi yaprak eksplantında en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür ve FDH transkript seviyesi kontrol örneğine göre 17.88 kat artış

gösterirken, artan Cu konsantrasyonlarında (75 ve 100 μ M), *Erşan-92*'nin FDH geninin ekspresyonu sırasıyla 4.35 kat ve 1.69 kat artmıştır (Çizelge 4.1.a ve Şekil 4.3.a).

FDH gen ekspresyonu ayrıca kök dokularında da incelenmiştir ve 50 ve 75 μ M Cu örneklerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. *Erşan-92*'deki FDH geninin transkripsiyon seviyesinin, bitkilerin 100 μ M Cu içeren ortamda yetiştirildiği zaman 15.67 kat arttığı; 50 ve 75 μ M Cu varlığındaki FDH transkripsiyon seviyesi kontrol bitkileri ile hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. *Erşan-92*'nin köklerindeki artmış FDH ekspresyon seviyesi, kök büyümesindeki gerileme ile paralel olduğu görülmektedir. Sonuçlar, Al stresine yanıt olarak; format birikimi ve kök büyümesinin engellenmesi sonucu *Vigna umbellata* köklerindeki VuFDH ekspresyonunun indüklenmesi [18] ile tutarlıdır (Çizelge 4.3.b ve şekil 4.3.b).

4.1.4 Cu Stresinin Varlığında FDH Enzim Aktivitesi

Bu çalışmada, *Erşan-92* genotipinin yaprak ve kök dokularının FDH aktiviteleri, fenazin metosülfat (PMS) varlığında, FDH tarafından üretilen NAD(P)H ile reaksiyona giren nitro mavi tetrazolyum (NBT) 'nin çözünür mavi-mor renkli formazan boyasına indirgenmesi ile kolorimetrik olarak izlenmiştir [16]. Metalle muamele edilmiş numunelerin bağlı FDH aktivitesi, kontrol numunesi ile karşılaştırılmıştır. Yaprak dokusunda, FDH transkript miktarı 50 μ M Cu içeren ortamda en yüksek tespit edilirken FDH enzim aktivitesi olarak 75 μ M Cu içeren ortamda kontrol örneğine göre 3.24 kat artmış FDH aktivitesi gözlenmiştir(Çizelge 4.4.a). Bununla birlikte tüm Cu konsantrasyonları için ölçülen FDH aktivitesi kontrol bitkisine kıyasla istatistiksel analize göre önemli ölçüde farklı olmasa da ölçülen FDH aktivite değerleri artan Cu konsantrasyonu ile birlikte artmaktadır (Şekil 4.4.a).

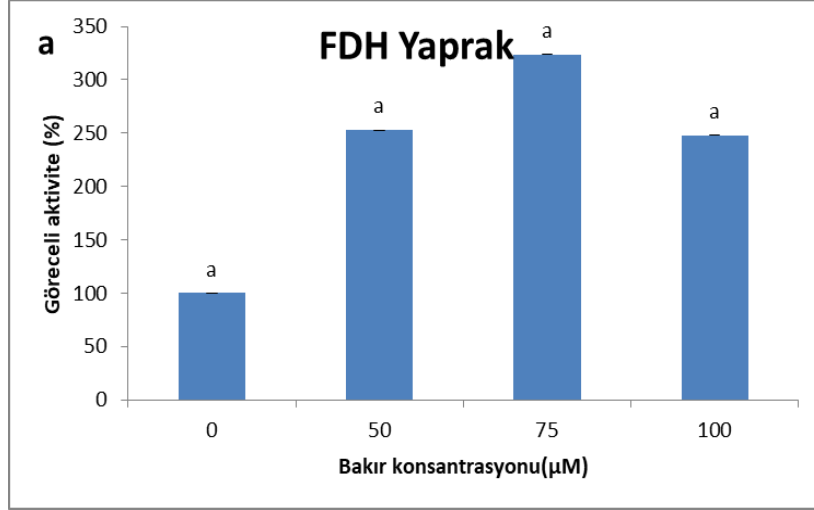
Çizelge 4.4.a FDH aktivitesi yaprak

Cu Konsantrasyonu(μ M)	Ortalama (U/mg/fw)	Göreceli aktivite(%)
0	0,033621333	100
50	0,085023694	252,8861
75	0,108808767	323,6301
100	0,083352889	247,9167

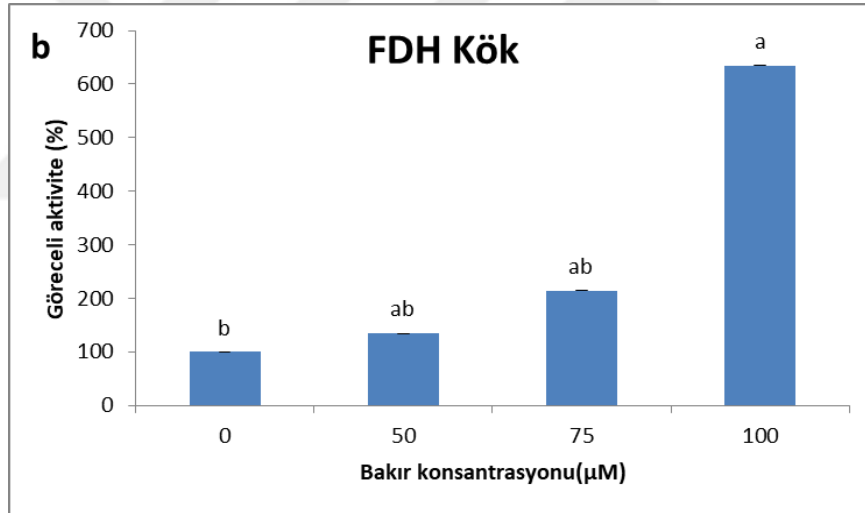
Çizelge 4.4.b Kökteki FDH aktivitesi

Cu Konsantrasyonu(μ M)	Ortalama (U/mg/fw)	Göreceli aktivite(%)
0	0,005152409	100
50	0,006922121	134,3473
75	0,01106407	214,7359
100	0,032722034	635,0823

Erşan-92 kök dokusunda, FDH aktivitesi artan metal konsantrasyonlarında önemli derecede artmış ve 100 μ M Cu varlığında 6.35 kat daha yüksek aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.4.b).



Şekil 4.4.a Yapraktaki FDH aktivitesi. Metalle muamele edilmiş numunelerin nispi FDH aktivitesi, kontrol numunesine kıyasla hesaplandı. Çubuklar üç kopyadan $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.



Şekil 4.4.b Kökteki FDH aktivitesi. Metalle muamele edilmiş numunelerin nispi FDH aktivitesi, kontrol numunesine kıyasla hesaplandı. Çubuklar üç kopyadan $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.

Erşan-92 genotipinin FDH aktivitesinin, özellikle stres koşullarındaki köklerde artışı bu genotipin köklerden başlayarak Cu stresi ile mücadele ettiğini göstermektedir.

Alekseeva v.d. [12] strese maruz kalan bitkilerin tepki oranının, etkileşimin türüne bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Patates, arpa ve yalı çamı gibi bitkilerin ışık ve demir eksikliği veya düşük oksijen koşullarına maruz bırakıldığında farklı saatlerde veya günlerde FDH ekspresyonunda artışa neden olmuştur.

4.1.5 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) İçeriğinin Analizi

Hidrojen peroksit doğal olarak meydana gelen inaktive edici ve sinyalleme ajanıdır; hücre içindeki konsantrasyonları stres koşullarında artmaktadır [17]. Örneğin, *Solanum cheesmaniae* ve *Solanum lycopersicum* türlerinin H₂O₂ seviyesi kontrol bitkisine kıyasla 250 µM Cu'da artmıştır [111]. Buna ek olarak, Cu ile muamele edilmiş *Triticum aestivum* L. yaprakları ve kökleri H₂O₂ seviyesini yükselterek metal stresine cevap vermektedir [60].

Çizelge 4.5.a Yapraktaki H₂O₂ içeriği

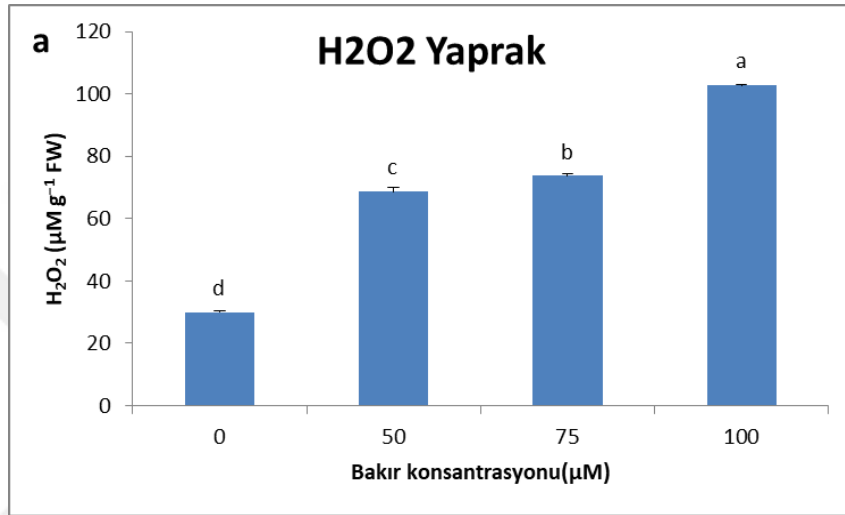
Cu Konsantrasyonu(µM)	H ₂ O ₂ (µM/gfw)
0	29,95
50	68,66825208
75	73,75
100	102,8125

Çizelge 4.5.b Kökteki H₂O₂ içeriği

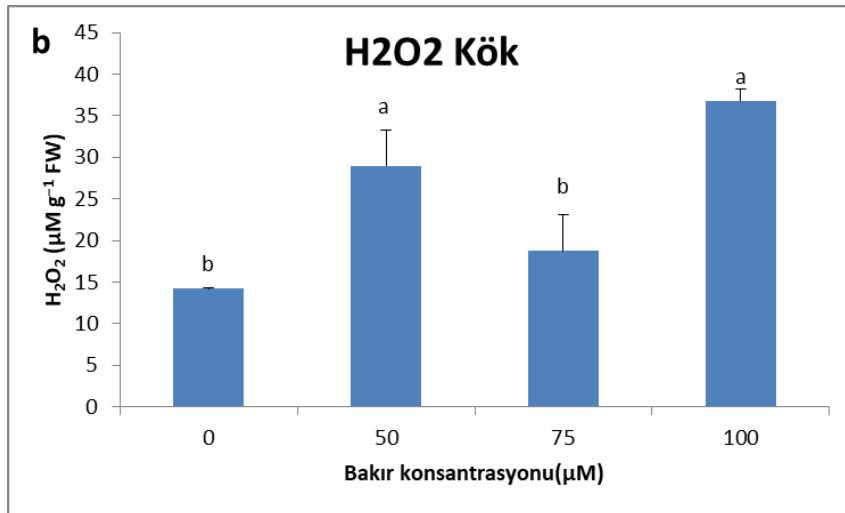
Cu Konsantrasyonu(µM)	H ₂ O ₂ (µM/gfw)
0	14,20588235
50	28,94444444
75	18,73958333
100	36,80645161

Bu çalışmada, *Erşan-92* pamuk genotipinin yaprak ve kök dokularının H₂O₂ seviyesi bitkilerde stresin değerlendirilmesine imkan sağlayan ROS'lardan biri olduğu için belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Cu içeren ortamlarda yetiştirilen *Erşan-92*

pamuk genotipi bitkilerinin yapraklarındaki H_2O_2 analizi en yüksek H_2O_2 miktarının ,100 μM Cu içeren ortamda büyütülen yapraklarda gözleendiğini ve kontrol bitkisi (1322.917 μM g-1 FW) ile karşılaştırıldığında 3.43 kat arttığını ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.5.a ve şekil 4.5.a). Kök eksplantındaki H_2O_2 , farklı Cu konsantrasyonlarında değerlendirildiğinde, 100 μM Cu'daki bitki köklerinde kontrole (36.386- μM g-1 FW) göre 2.59 kat daha fazla H_2O_2 olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5.b ve şekil 4.5.b).



Şekil 4.5.a Yapraktaki H_2O_2 içeriği. Çubuklar üç kopyadan $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.



Şekil 4.5.b Kökteki H_2O_2 içeriği. Çubuklar üç kopyadan $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Farklı Cu konstantrasyonunda yetiştirilmiş *Erşan-92* genotipinin kök dokularında H_2O_2 içeriğinin aynı olduğu; 50 ve 100 μM da istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir.

Bulgularımıza benzer şekilde, strese maruz bırakılmamış bitkilere kıyasla; kadmiyum ile muamele edilmiş [112], [69]; kurşuna maruz bırakılmış [24] ve Cu ile muamele edilmiş pamuk çeşitlerinde [6] yaprak ve kök dokularındaki H_2O_2 seviyeleri arttığı bildirilmektedir.

Cu stresine yanıt olarak H_2O_2 düzeyleri doku ve türe bağlı olabilmektedir [111]. Çalışmamızda *Erşan-92* pamuk genotipinin yapraklarında kök dokularından daha yüksek H_2O_2 düzeyine sahip olduğu görülmüştür. Bu veri, çevresel streslere karşı toleranslı olarak bilinen genotip *Erşan-92*'nin köklerinin yüksek metal detoksifikasyon potansiyeli ile açıklanabilmektedir [6]. Ayrıca FDH enzim aktivitesinin köklerde artan Cu konsantrasyonu ile paralel olarak artış göstermesi FDH'in köklerde Cu stresini indirdiğini ve böylece köklerdeki H_2O_2 miktarının yapraklara göre daha düşük olduğunu düşündürmektedir (Çizelge 4.5.a ve çizelge 4.5.b).

4.1.6 Malondialdehid (MDA) İçeriğinin Analizi

Ağır metal içeren bir ortamda yetiştirilen bitkilerin oksidatif stresini belirlemek için kullanılan bir diğer önemli parametre MDA (malondialdehid) içeriğini değerlendirmektir. MDA, Membran lipid peroksidasyonunun ürünüdür, nükleik asit ve amino asitlerle çapraz bağlanma potansiyeline sahiptir, çözünmeyen çökeltiler oluşturur bu da hücrelerde biyolojik süreçlerin kesintiye uğramasına neden olmaktadır [18]. Bitkiler fazla miktarda Cu konsantrasyonuna maruz kaldıklarında, membranın sülfhidril gruplarına eklenebilir veya membranın zarar görmesiyle lipid peroksidasyonuna neden olabilir ve bitkinin farklı kısımlarında serbest radikallerin üretilmesine neden olabilir [25]. Cu maruziyetine yanıt olarak *Eclipta alba* L. [113], *Triticum aestivum* L. [5] ve *Tanacetum parthenium* [114] gibi çeşitli bitkilerin MDA içeriğinin artışı, literatürde bildirilmiştir.

Çizelge 4.6.a Yapraktaki MDA içeriğinin analizi

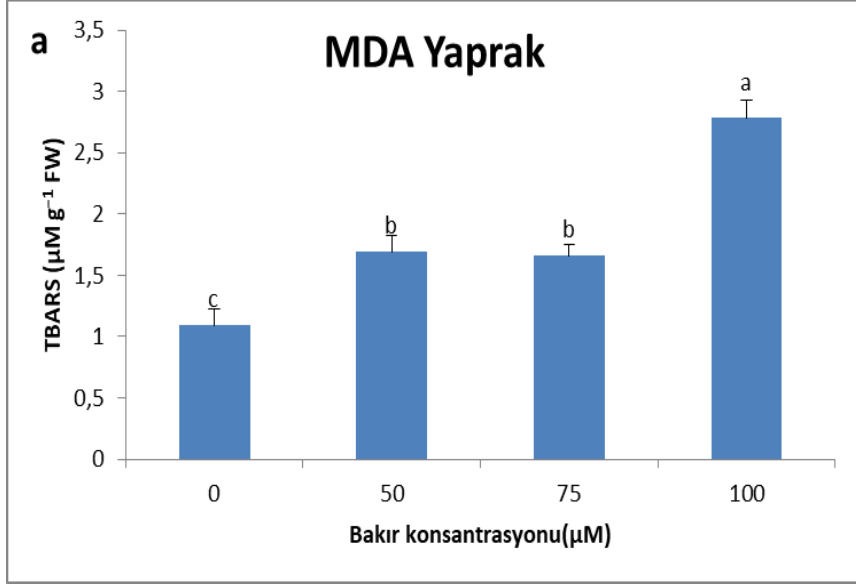
Cu Konsantrasyonu(μM)	MDA ($\mu\text{M/gfw}$)
0	1,090229
50	1,68864
75	1,656849
100	2,786349

Çizelge 4.6.b Kökteki MDA içeriğinin analizi

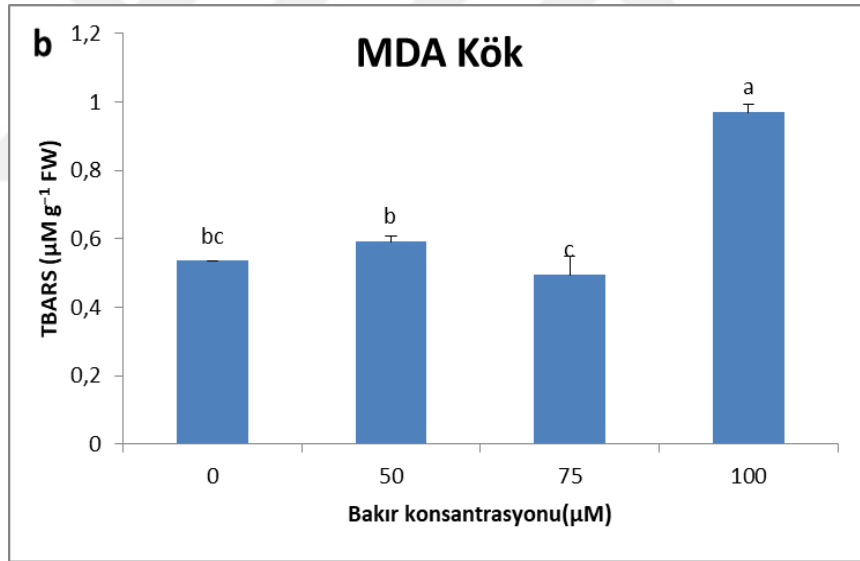
Cu Konsantrasyonu(μM)	MDA ($\mu\text{M/gfw}$)
0	0,5356056
50	0,591397849
75	0,49491825
100	0,970131422

Bu çalışmada da *Erşan-92* kök ve yaprak dokularındaki lipid peroksidasyonunun yüksek metal konsantrasyonlarında arttığı ve hidrojen peroksit içeriğine benzer şekilde daha yüksek Cu konsantrasyonlarında maksimum seviyeye ulaştığı bulunmuştur.

Yaprak dokuları incelendiğinde maksimum MDA içeriği 100 μM Cu'da, kontrol grubuna göre 2.56 kat (2.786- μMg – 1 FW) artmıştır (Şekil 4.6.a ve Çizelge 4.6.a).



Şekil 4.6.a Yapraktaki MDA içeriğinin analizi. Çubuklar üç kopyadan $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.



Şekil 4.6.b Kökteki MDA içeriğinin analizi. Çubuklar üç kopyadan $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.

Kök dokusundaki MDA içeriği incelendiğinde, *Erşan-92*'nin lipid peroksidasyon seviyeleri 50-75 μ M Cu'da kontrole yakın olduğu görülmüştür ve MDA içeriği yaprak

dokusunda olduğu gibi 100 µM metal (0.97-µM g-1 FW) varlığında 1.81 kat artmıştır (Şekil 4.6.b ve Çizelge 4.6.b).

Çeşitli çalışmalarda MDA artışının lipid peroksidasyonuna veya plazma membran hasarına ve son olarak da bitki büyümesinin engellenmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, ağır metal stresine maruz kalan farklı pamuk çeşitlerinde görüldüğü gibi, artan MDA içeriğine sahip pamuk genotipinin büyümesinin gecikmesi gözlenmiştir [69], [6].

4.1.7 SOD Aktivitesi

ROS metabolik süreçler sırasında bazı önemli reaksiyonlarla üretilmektedir, ancak birikimleri bitkilerin biyotik ve abiyotik strese maruz kalmasıyla oluşmaktadır. ROS temizleme sistemi, temel ve toksik seviyeler arasında ROS konsantrasyonu dengesini sağlamaktadır. SOD, CAT, askorbik peroksidaz ve glutatyon peroksidaz antioksidan savunma enzimlerini oluşturmaktadır ve SOD süperoksit radikallerini moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürerek ilk savunma hattını koruyan enzimdir [9], [5]. İki pamuk türünün, *Gossypium arboreum* ve *Gossypium raimondii*'nin SOD genlerinin genom geneli analizi, altı Cu / Zn-SOD, iki Fe-SOD ve iki Mn-SOD içeren SOD gen ailesinin 10 geninin tanımlandığını ortaya koymuştur [5].

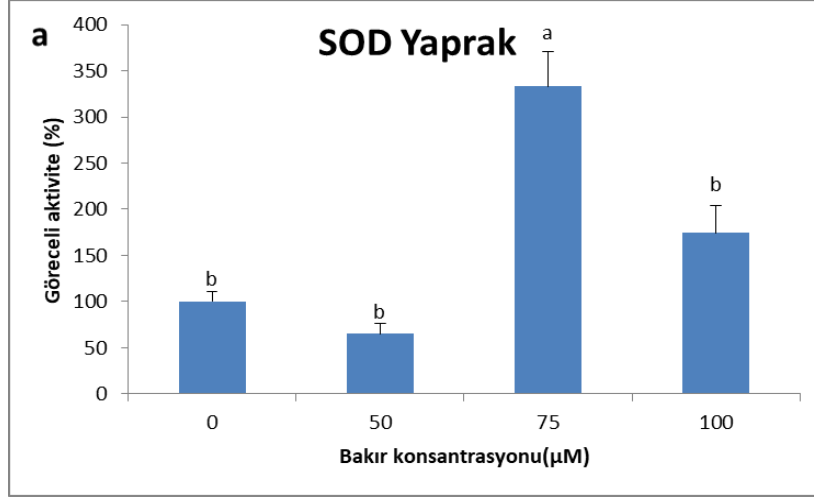
Çizelge 4.7.a Yapraktaki SOD aktivitesinin analizi

Cu Konsantrasyonu(µM)	Ortalama (U/mg/fw)	Göreceli aktivite(%)
0	52,02191332	100
50	33,79690507	64,96667061
75	173,3406539	333,2069947
100	90,6561235	174,2652619

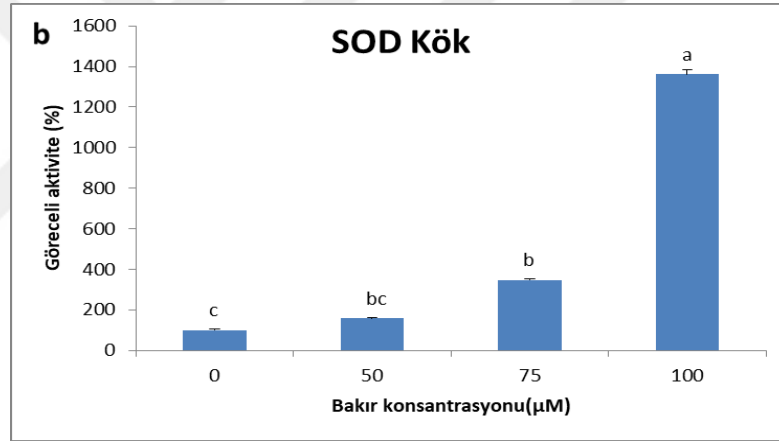
Çizelge 4.7.b Kökteki SOD aktivitesinin analizi

Cu Konsantrasyonu(μM)	Ortalama (U/mg/fw)	Göreceli aktivite(%)
0	13,98176351	100
50	22,05535064	157,7437
75	48,52400027	347,0521
100	190,3016605	1361,071

Bu çalışmada, *G. hirsutum* genotipinin kök ve yaprak dokularının Cu / Zn-SOD aktiviteleri Cu stres altında bitkinin antioksidan enzim cevabını incelemek üzere belirlenmiştir. 75 μM Cu'da büyütülen *Erşan-92* yapraklarındaki SOD aktivitesi değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre 3.33 kat ($173.341 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein g}^{-1} \text{ FW}$) daha yüksek aktivite saptanmıştır (Çizelge 4.7.a). *Erşan-92*'nin yaprak dokularında görüldüğü gibi, antioksidan özellikler sadece sınırlı bir şekilde gösterildiğinden, ağır metal stresi artan konsantrasyonlarına maruz kalan çeşitli pamuk genotiplerinin farklı dokularında SOD ekspresyonunda aşağı doğru bir parabolik eğilim gözlenmiştir (Şekil 4.7.a ve 4.7.b). Bitkiler fazla metal konsantrasyonuna maruz kaldıklarında, antioksidan savunma sistemi Cu toksisitesi nedeniyle regüle edilebilmektedir [69], [6], [18]. Abiyotik stresle muamele edilen pamuğun farklı genotiplerinin antioksidan yanıtı üzerine yapılan çalışmalar, bitkinin antioksidan tepkisinin doku veya genotip seviyesinde farklı olabileceğini göstermektedir [112], [69], [6].



Şekil 4.7.a Yapraktaki SOD aktivitesinin analizi. Metalle muamele görmüş numunelerin nispi SOD aktivitesi, kontrol numunesine kıyasla hesaplanmıştır. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.



Şekil 4.7.b Kökteki SOD aktivitesinin analizi. Metalle muamele görmüş numunelerin nispi SOD aktivitesi, kontrol numunesine kıyasla hesaplanmıştır. Farklı harfler Tukey testine göre örnekler ($P < 0.05$) arasında önemli farklılıklar göstermektedir.

Yapraklardaki SOD aktivite paterni aşağı doğru parabolik olmasına rağmen, kök dokulardaki aktivitenin artışı veya azalmasında doğrusallık gözlenmiştir. *Erşan-92* köklerinde SOD aktivitesinin yüksek metal konsantrasyonlarında arttığı ve 100 µM Cu'da 13.61 kat artarak 130.302-U mg-1 protein g – 1 FW'a ulaştığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7.b ve Şekil 4.7.b). Bulgularımıza benzer şekilde [107] kuraklığa duyarlı N-84S ve kuraklığa dayanıklı M-503 çeşitlerinin kuraklık ve ısı koşullarına göre ROS süpürme kapasitelerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre N-84S genotipinin SOD aktivitesinin,

stres altında yetiştirilen ve herhangi bir strese maruz bırakılmayan kontrol bitkisinden önemli ölçüde farklı olmadığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde [112] kadmiyum stres varlığında farklı pamuk çeşitlerinin antioksidan yanıtını karşılaştırmış ve transgenik pamuğun (Br001) diğer genotiplere göre daha duyarlı olduğunu ve SOD düzeyinin diğer genotiplere göre daha düşük olduğunu ortaya koymuştur.

4.2 Öneriler

Bir bitkinin çevresel streslere karşı toleransı, örneğin ağır metal kirliliğine karşı toleransı, tamamen bitkinin oksidatif strese karşı koruma mekanizmalarının anlaşılması ile bağıntılı olduğu düşünülmektedir. Bitkilerin oksidatif strese verdiği tepkiler hakkında çok fazla araştırma yapılmış olsa da pamuk bitkisinde NAD^{+} -bağımlı format dehidrogenaz enziminin Cu stresine karşı verdiği yanıt ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda 21 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 75 and 100 μM Cu) Cu içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında (*Erşan-92*) pamuk genotipi yetiştirilmiştir. FDH seviyelerinin analizleri qPCR ile değerlendirmiştir. Ayrıca, pamuk genotipinin yaprak ve kök dokularının stres tepkisi, FDH ve SOD enzimlerinin aktivitesinin yanı sıra H_2O_2 ve MDA seviyelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Abiyotik strese toleranslı olarak bilinen *Erşan-92*'nin köklerinde ağır metal stresine karşı savaşın varlığı, ROS ve lipid peroksidasyon seviyelerinin artmasıyla birlikte SOD ve FDH aktivitelerindeki artış ile belirlenmiştir. Ek olarak, FDH'nin transkript seviyelerinin örtüşen desenleri, GhFDH ekspresyonunun Cu stresine arttığını göstermektedir, bu da FDH enziminin metal detoksifikasyon işleminin bir parçası olarak düşünülmesi gerektiğini belirtmektedir. *Erşan-92* kök dokusundaki FDH aktivitesi Cu konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak yükselmiştir. Ayrıca FDH enzim aktivitesinin köklerde artan Cu konsantrasyonu ile paralel olarak artış göstermesi FDH'in köklerde Cu stresini indirdiğini ve böylece köklerdeki H_2O_2 miktarının yapraklara göre daha düşük olduğunu düşündürmektedir. Her ne kadar daha ileri deneylerle desteklenmesi gerekse de, Bu sonuç aynı zamanda FDH aktivitesinin çevresel strese toleranslı genotip *Erşan-92*'deki ağır metal stresine toleransta rol oynadığını da göstermektedir. Çalışmamız, *Erşan-92*'nin 100 μM Cu seviyesine kadar mücadele etmeye devam ettiğini göstermektedir.

Sonraki alışmalarda Cu'nun farklı konstantrasyolarının denenmesi ve 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, ... μM gibi daha sık aralıklarla ve 100 μM 'ın üzerine çıkan konstantrasyonlarla ağıır metal stersine karşı verdiği cevapta NAD bağıımlı FDH enzimi incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca *Erşan-92*'deki kök ve yaprak dokusuna ek olarak gövde dokusunun da incelenmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Gotmare, V. Singh, P. ve Tule, B., (2000). "Wild and cultivated species of Cotton", Technical Bulletin, 5: 70-95.
- [2] Nandeshwar, S.B. Moghe, S. Chakrabarty, P.K. Deshattiwar, M.K. Kranthi, K. Anandkumar, P. Mayee, C.D. ve Khadi, B.M., (2009). "Agrobacterium-Mediated Transformation of cry1Ac Gene into Shoot-Tip Meristem of Diploid Cotton *Gossypium arboreum* cv. RG8 and Regeneration of Transgenic Plants", Plant Molecular Biology Reporter, 27: 549-557.
- [3] Momtaz, O.A. Diab, A.A. ve Madkour, M., (2000). "Development of transgenic Egyptian cotton (*Gossypium barbadense*) varieties from meristematic tissue", In Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences, 2: 513-516.
- [4] Gomez, S.K. Oosterhuis, D.M. Hendrix, D.L. Johnson, D.R. ve Steinkraus, D.C., (2006). "Diurnal pattern of aphid feeding and its effect on cotton leaf physiology", Environ. Exp. Bot. 8: 77-86.
- [5] Liu, W. Liang, L. Zhang, X. ve Zhou, Q., (2015). "Cultivar variations in cadmium and lead accumulation and distribution among 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars", Environ Sci Pollut Res Int, 22: 8432-8441.
- [6] Mei, L. Daud, M.K. Ullah, N. Ali, S. Khan, M. Malik, Z. ve Zhu, S.J., (2015). "Pretreatment with salicylic acid and ascorbic acid significantly mitigate oxidative stress induced by copper in cotton genotypes", Environ Sci Pollut Res Int, 22: 9922-9931.
- [7] Angelova, V. Ivanova, R. Delibaltova, V. ve Ivanov, K., (2004). "Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp)", Industrial Crops and Products, 19: 197-205.
- [8] Thomas, S.C. Alhasawi, A. Auger, C. Omri, A. ve Appanna, V.D., (2016). "The role of formate in combatting oxidative stress", Antonie Van Leeuwenhoek, 109: 263-271.
- [9] Ordu, E.B. Sessions, R.B. Clarke, A.R. ve Karagüler, N.G., (2013). "Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylica*", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 95: 23-28.
- [10] Alpdagtas, S. Yucel, S. Kapkac, H.A. Liu, S. ve Binay, B., (2018). "Discovery of an acidic, thermostable and highly NADP(+) dependent formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929", Biotechnol Lett, 40: 1135-1147.

- [11] Fogal, S. Beneventi, E. Cendron, L. ve Bergantino, E., (2015). "Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8", *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 9541-9554.
- [12] Alekseeva, A.A. Serenko, A.A. Kargov, I.S. Savin, S.S. Kleymenov, S.Y. ve Tishkov, V.I., (2012). "Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations", *Protein Eng Des Sel*, 25: 781-788.
- [13] Kargov, I.S. Kleymenov, S.Y. Savin, S.S. Tishkov, V.I. ve Alekseeva, A.A., (2015). "Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design", *Protein Eng Des Sel*, 28: 171-178.
- [14] Andreadeli, A. Flemetakis, E. Axarli, I. Dimou, M. Udvardi, M.K. Katinakis, P. ve Labrou, N.E., (2009). "Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia", *Biochim Biophys Acta*, 1794: 976-984.
- [15] Kurt-Gur, G. ve Ordu, E., (2018). "Characterization of a novel thermotolerant NAD(+)-dependent formate dehydrogenase from hot climate plant cotton (*Gossypium hirsutum* L.)", *Biotech*, 8: 175.
- [16] Özgün G.P. E.B., O. H.E., T. E., Y. R.B., S. ve N., G.K., (2016). "Site Saturation Mutagenesis Applications on *Candida methylica* Formate Dehydrogenase", *Scientifica*, 2016: 7.
- [17] Savin, S.S. ve Tishkov, V.I., (2010). "Assessment of Formate Dehydrogenase Stress Stability In vivo using Inactivation by Hydrogen Peroxide", *Acta naturae*, 2: 97-102.
- [18] Lou, H.Q. Gong, Y.L. Fan, W. Xu, J.M. Liu, Y. Cao, M.J. Wang, M.-H. Yang, J.L. ve Zheng, S.J., (2016). "A Formate Dehydrogenase Confers Tolerance to Aluminum and Low pH", *Plant physiology*, 171: 294-305.
- [19] Rout, J.R. ve Sahoo, S.L., (2013). "Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L", *Plant Growth Regulation*, 71: 95-99.
- [20] Yüksel, O., (2015). "Influence of municipal solid waste compost application on heavy metal content in soil", *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 313.
- [21] Jan, A.T. Azam, M. Siddiqui, K. Ali, A. Choi, I. ve Haq, Q.M.R., (2015). "Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants", *International journal of molecular sciences*", 16: 29592-29630.
- [22] Nicholson, F.A. Smith, S.R. Alloway, B.J. Carlton-Smith, C. ve Chambers, B.J., (2003). "An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales", *Science of The Total Environment*, 311: 205-219.
- [23] Kang, W. Bao, J. Zheng, J. Hu, H. ve Du, J., (2015). "Distribution and chemical forms of copper in the root cells of castor seedlings and their tolerance to copper phytotoxicity in hydroponic culture", *Environ Sci Pollut Res Int*, 22: 7726-7734.
- [24] Adrees, M. Ali, S. Rizwan, M. Ibrahim, M. Abbas, F. Farid, M. Zia-Ur-Rehman, M. Irshad, M.K. ve Bharwana, S.A., (2015). "The effect of excess copper on

- growth and physiology of important food crops: a review", *Environ Sci Pollut Res Int*, 22: 8148-8162.
- [25] Emanverdin, A. Ding, Y. Mokhberdoran, F. ve Xie, Y., (2015). "Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response", *The Scientific World Journal*, 18.
 - [26] Ordu, E. ve Memon, A., (2005). "An efficient and rapid in vitro regeneration system for metal resistant cotton", *Biologia Plantarum*, 3: 415-417
 - [27] Blanco-Canqui, H. ve Lal, R., (2008). *Erosion Control and Soil Quality*, ed. Principles of Soil Conservation and Management. Dordrecht: Springer Netherlands, 477-492.
 - [28] Doran, J.W., (2002). "Soil health and global sustainability: translating science into practice", *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88: 119-127.
 - [29] He, B. Yun, Z. Shi, J. ve Jiang, G., (2013). "Research progress of heavy metal pollution in China: Sources, analytical methods, status, and toxicity", *Chinese Science Bulletin*, 58: 134-140.
 - [30] Chen, X. ve Lu, X., (2018). "Contamination characteristics and source apportionment of heavy metals in topsoil from an area in Xi'an city, China", *Ecotoxicol Environ Saf*, 151: 153-160.
 - [31] Tiwari, S. ve Lata, C., (2018). "Heavy Metal Stress, Signaling, and Tolerance Due to Plant-Associated Microbes: An Overview", *Front Plant Sci*, 9: 452.
 - [32] Zenk, M.H., (1996). "Heavy metal detoxification in higher plants: a review", *Gene*, 179: 21-30.
 - [33] Schützendübel, A. ve Polle, A., (2002). "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization", *J Exp Bot*, 53: 1351-1365.
 - [34] Khlifi, R. ve Hamza-Chaffai, A., (2010). "Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: a review", *Toxicol Appl Pharmacol*, 248: 71-88.
 - [35] Jarup, L., (2003). "Hazards of heavy metal contamination", *Br Med Bull*, 68: 167-182.
 - [36] Murthy, K., (2013). "Biosorption of Few Heavy Metal Ions Using Agricultural Wastes", *Journal of Environmet Pollution and Human Health*, 1: 1-6.
 - [37] Nagajyoti, P.C. Lee, K.D. ve Sreekanth, T.V.M., (2010). "Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review", *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216.
 - [38] Wang, S. ve Shi, X., (2001). "Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222: 3-9.
 - [39] Beyersmann, D. ve Hartwig, A., (2008). "Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms", *Arch Toxicol*, 82: 493-512.
 - [40] Yabe, J. Ishizuka, M. ve Umemura, T., (2010). "Current levels of heavy metal pollution in Africa", *J Vet Med Sci*, 72: 1257-1263.
 - [41] Bucker-Neto, L. Paiva, A.L.S. Machado, R.D. Arenhart, R.A. ve Margis-Pinheiro, M., (2017). "Interactions between plant hormones and heavy metals responses", *Genet Mol Biol*, 40: 373-386.

- [42] Tchounwou, P.B. Yedjou, C.G. Patlolla, A.K. ve Sutton, D.J., (2012). "Heavy metal toxicity and the environment", *Experientia supplementum*, 101: 133-164.
- [43] Liu, W. Cheng Ni, J. ve Zhou, Q., (2013). Uptake of Heavy Metals by Trees: Prospects for Phytoremediation. *Energy and Environment Materials*, 8: 743-744
- [44] Rascio, N. ve Navari-Izzo, F., (2011). "Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?", *Plant Science*, 180: 169-181.
- [45] Liu, W. Zhou, Q. An, J. Sun, Y. ve Liu, R., (2010). "Variations in cadmium accumulation among Chinese cabbage cultivars and screening for Cd-safe cultivars", *J Hazard Mater*, 173: 737-743.
- [46] Wei, S. Zhu, J. Zhou, Q.X. ve Zhan, J., (2011). "Fertilizer amendment for improving the phytoextraction of cadmium by a hyperaccumulator *Rorippa globosa* (Turcz.) Thell", *Journal of Soils and Sediments*, 11: 915.
- [47] Mithofer, A. Schulze, B. ve Boland, W., (2004). "Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals", *FEBS Lett*, 566: 1-5.
- [48] Sarma, H., (2011). "Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology", *Journal of Environmental Science and Technology*, 2: 118-138.
- [49] Zaimoglu, Z. Koksall, N. Basci, N. Kesici, M. Gulen, H. ve Budak, F., (2011). "Antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. And *Brassica oleracea* L. Plants under chromium stress", *J. Food Agric. Environment*, 9: 676-679
- [50] Bonanno, G. Borg, J.A. ve Di Martino, V., (2017). "Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: A comparative assessment", *Sci Total Environ*, 576: 796-806.
- [51] Wang, Y.J. Hu, M.M. Cui, X.M. Lou, Y.H. ve Zhuge, Y.P., (2018). "Exogenous NO mediated the detoxification pathway of tomato seedlings under different stress of Cu and Cd", *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 29: 4199-4207.
- [52] Dresler, S. Hawrylak-Nowak, B. Kováčik, J. Pochwatka, M. Hanaka, A. Strzemski, M. Sowa, I. ve Wójciak-Kosior, M., (2019). "Allantoin attenuates cadmium-induced toxicity in cucumber plants", *Ecotoxicol Environ Saf*, 170: 120-126.
- [53] Ding, G.H. Guo, D.D. Guan, Y. Chi, C.Y. ve Liu, B.D., (2018). "Changes of DNA methylation of *Isoetes sinensis* under Pb and Cd stress", *Environ Sci Pollut Res Int*. 4: 3428-3435
- [54] Thomas, J.C. Malick, F.K. Endreszl, C. Davies, E.C. ve Murray, K.S., (1998). "Distinct responses to copper stress in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*", *Physiologia Plantarum*, 102: 360-368.
- [55] Lewis, S. Donkin, M.E. ve Depledge, M.H., (2001). "Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors", *Aquat Toxicol*, 51: 277-291.
- [56] Ducic, T. ve Polle, A., (2005). "Transport and detoxification of manganese and copper in plants", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 103-112.
- [57] Bouazizi, H. Jouili, H. Geitmann, A. ve El Ferjani, E., (2010). "Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake", *Ecotoxicol Environ Saf*, 73: 1304-1308.

- [58] Drązkiewicz, M. Skórzyńska-Polit, E. ve Krupa, Z., (2004). "Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*", *Biometals*, 17: 379-387.
- [59] Najeeb, U. Jilani, G. Ali, S. Sarwar, M. Xu, L. ve Zhou, W., (2011). "Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid", *J Hazard Mater*, 186: 565-574.
- [60] Hu, C. Liu, L. Li, X. Xu, Y. Ge, Z. ve Zhao, Y., (2018). "Effect of graphene oxide on copper stress in *Lemna minor* L.: evaluating growth, biochemical responses, and nutrient uptake", *J Hazard Mater*, 341: 168-176.
- [61] Athar, R. ve Ahmad, M., (2002). "Heavy Metal Toxicity: Effect on Plant Growth and Metal Uptake by Wheat, and on Free Living *Azotobacter*", *Water, Air, and Soil Pollution*, 1: 165-180.
- [62] Boojar, M.M.A. ve Tavakkoli, Z., (2010). "Role of antioxidant enzyme responses and phytochelatins in tolerance strategies of *Alhagi camelorum* Fisch growing on copper mine", *Acta Botanica Croatica*, 1-107-121.
- [63] Srivastava, S. Mishra, S. Tripathi, R.D. Dwivedi, S. ve Gupta, D.K., (2006). "Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle", *Aquat Toxicol*, 80: 405-415.
- [64] Lombardi, L. ve Sebastiani, L., (2005). "Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants", *Plant Science*, 168: 797-802.
- [65] Yadav, P. Kaur, R. Kanwar, M.K. Sharma, A. Verma, V. Sirhindi, G. ve Bhardwaj, R., (2018). "Castasterone confers copper stress tolerance by regulating antioxidant enzyme responses, antioxidants, and amino acid balance in *B. juncea* seedlings", *Ecotoxicol Environ Saf*, 147: 725-734.
- [66] Moravcova, S. Tuma, J. Kovalikova Ducaiova, Z. Waligórski, P. Kula, M. Saja, D. Słomka, A. Bąba, W. ve Libik-Konieczny, M., (2017). "Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of *Zea mays* plants under copper stress", *Plant Physiol Biochem*, 122: 19-30.
- [67] Sağlam, A. Yetişsin, F. Demiralay, M. ve Terzi, R., (2016). Chapter 2 - Copper Stress and Responses in Plants, P. Ahmad, ed. *Plant Metal Interaction*. Elsevier, 21-40.
- [68] Cao, Y. Ma, C. Chen, G. Zhang, J. ve Xing, B., (2017). "Physiological and biochemical responses of *Salix integra* Thunb. under copper stress as affected by soil flooding", *Environ Pollut*, 225: 644-653.
- [69] Ali, S. Rizwan, M. Ullah, N. Bharwana, S.A. Waseem, M. Farooq, M.A. Abbasi, G.H. ve Farid, M., (2016). "Physiological and biochemical mechanisms of silicon-induced copper stress tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)", *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 262.
- [70] Milford, F.J., (1996). *Crop Production: Evolution, History and Technology*, by C. Wayne Smith. New York: John Wiley & Sons. 469.
- [71] Endrizzi, J.E. Turcotte, E.L. ve Kohel, R.J., (1985). "Genetics, Cytology, and Evolution of *Gossypium*", *Advances in Genetics*. 23: 271-375.

- [72] Khan, M. Khan, I.M. Khan, A. Cheema, N.M. ve Khan, A.S., (2019). "Genetic Studies for Morphological and Fiber Quality Traits in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)", *Science, Technology and Development*, 3: 131-138.
- [73] Hegde, S. ve Waines, J., (2004). "Hybridization and Introgression between Bread Wheat and Wild and Weedy Relatives in North America", *Crop Science*, 4: 1145-1155.
- [74] Shahida, P.S. Perveen, R., (2001). "Cotton Plant Volatiles and Insect's Behaviour", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5:554-558.
- [75] MEYER, L., (2018). *Cotton and Wool Outlook*, U.S.A. Agriculture and Service, 16.
- [76] Adalıoğlu, H.A. Akkuş, İ.C. Abay, C. ve Kart, M.Ç.Ö., (2017). "Factors affecting farmers-preferences in choice of cotton seed in Söke district of Aydın province", *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32: 189-196.
- [77] Aydoğdu, M. Karli, B. Parlakci Dogan, H. Sevinc, G. Emre Eren, M. ve Küçük, N., (2018). "Economic Analysis of Agricultural Water Usage Efficiency in the GAP-Harran Plain: Cotton Production Sampling", *International Journal of Advances in Agriculture Sciences*, 3: 12-19.
- [78] Tishkov, V.I. ve Popov, V.O., (2004). "Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase", *Biochemistry (Moscow)*, 69: 1252-1267.
- [79] Lamzin, V.S. Dauter, Z. Popov, V.O. Harutyunyan, E.H. ve Wilson, K.S., (1994). "High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase", *J Mol Biol*, 236: 759-785.
- [80] Yu, X. Niks, D. Mulchandani, A. ve Hille, R., (2017). "Efficient reduction of CO₂ by the molybdenum-containing formate dehydrogenase from *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*)", *J Biol Chem*, 292: 16872-16879.
- [81] Shabalin, I.G. Polyakov, K.M. Tishkov, V.I. ve Popov, V.O., (2009). "Atomic Resolution Crystal Structure of NAD(+)-Dependent Formate Dehydrogenase from Bacterium *Moraxella* sp. C-1", *Acta naturae*, 1: 89-93.
- [82] Gao, X. Ni, K. Zhao, C. Ren, Y. ve Wei, D., (2014). "Enhancement of the activity of enzyme immobilized on polydopamine-coated iron oxide nanoparticles by rational orientation of formate dehydrogenase", *J Biotechnol*, 188: 36-41.
- [83] Hatrongjit, R. ve Packdibamrung, K., (2010). "A novel NADP+-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization", *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 557-561.
- [84] Farinelli, M.P. Fry, D.W. ve Richardson, K.E., (1983). "Isolation, purification, and partial characterization of formate dehydrogenase from soybean seed", *Plant Physiol*, 73: 858-859.
- [85] Hourton-Cabassa, C. Ambard-Bretteville, F. Moreau, F. Davy de Virville, J. Remy, R. ve Francs-Small, C.C., (1998). "Stress Induction of Mitochondrial Formate Dehydrogenase in Potato Leaves", *Plant Physiol*, 116: 627-635.
- [86] Suzuki, K. Itai, R. Suzuki, K. Nakanishi, H. Nishizawa, N.-K. Yoshimura, E. ve Mori, S., (1998). "Formate Dehydrogenase, an Enzyme of Anaerobic Metabolism, Is Induced by Iron Deficiency in Barley Roots", *Plant physiology*, 116: 725.

- [87] Olson, B.J. Skavdahl, M. Ramberg, H. Osterman, J.C. ve Markwell, J., (2000). "Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast", *Plant Sci*, 159: 205-212.
- [88] David, P. des Francs-Small, C.C. Seignac, M. Thareau, V. Macadre, C. Langin, T. ve Geffroy, V., (2010). "Three highly similar formate dehydrogenase genes located in the vicinity of the B4 resistance gene cluster are differentially expressed under biotic and abiotic stresses in *Phaseolus vulgaris*", *Theor Appl Genet*, 121: 87-103.
- [89] Shiraishi, T. Fukusaki, E.-I. ve Kobayashi, A., (2000). "Formate dehydrogenase in rice plant: Growth stimulation effect of formate in rice plant", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89: 241-246.
- [90] Sadykhov, E.G. Serov, A.E. Voinova, N.S. Uglanova, S.V. Petrov, A.S. Alekseeva, A.A. Kleimenov, S. Popov, V.I. ve Tishkov, V.I., (2006). "A comparative study of the thermal stability of formate dehydrogenases from microorganisms and plants", *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 42: 269-273.
- [91] Higuchi, R. Fockler, C. Dollinger, G. ve Watson, R., (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions", *Biotechnology (N Y)*, 11: 1026-1030.
- [92] Heid, C.A. Stevens, J. Livak, K.J. ve Williams, P.M., (1996). "Real time quantitative PCR", *Genome Res*, 6: 986-994.
- [93] Morrison, T.B. Weis, J.J. ve Wittwer, C.T., (1998). "Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification", *Biotechniques*, 24: 954-958.
- [94] Wang, T. ve Brown, M.J., (1999). "mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection", *Anal Biochem*, 269: 198-201.
- [95] Malinen, E. Kassinen, A. Rinttila, T. ve Palva, A., (2003). "Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria", *Microbiology*, 149: 269-277.
- [96] Palmer, S. Wiegand, A.P. Maldarelli, F. Bazmi, H. Mican, J.M. Polis, M. Dewar, R.L. Planta, A. Liu, S. Metcalf, J.A. Mellors, J.W. ve Coffin, J.M., (2003). "New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma", *J Clin Microbiol*, 41: 4531-4536.
- [97] Gentle, A. Anastasopoulos, F. ve McBrien, N.A., (2001). "High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve", *Biotechniques*, 31: 502-508.
- [98] Schmittgen, T.D. Zakrajsek, B.A. Mills, A.G. Gorn, V. Singer, M.J. ve Reed, M.W., (2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods", *Anal Biochem*, 285: 194-204.
- [99] Tutar, E. Köksalan, E. ve Akyol, I., (2015). "Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda Real Time PCR Teknolojisi", *KSU J. Nat. Sci.*, 18: 26.

- [100] Gasparic, M. Tengs, T. La Paz, J.L. Holst-Jensen, A. Pla, M. Esteve, T. Zel, J. ve Gruden, K., (2010). "Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection", *Anal Bioanal Chem*, 396: 2023-2029.
- [101] Eischeid, A.C., (2011). "SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR", *BMC Res Notes*, 4: 263.
- [102] Giglio, S. Monis, P.T. ve Saint, C.P., (2003). "Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR", *Nucleic acids research*, 31: 136-136.
- [103] Xu, J. Yang, L. Wang, Z. Dong, G. Huang, J. ve Wang, Y., (2006). "Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil", *Chemosphere*, 62: 602-607.
- [104] Freeman, W.M. Walker, S.J. ve Vrana, K.E., (1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential", *Biotechniques*, 26: 112-124.
- [105] Bicakci, E. ve Memon, A.R., (2005). "An efficient and rapid in vitro regeneration system for metal resistant cotton", *Biologia Plantarum*, 49: 415-417.
- [106] Livak, K.J. ve 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: 402-408.
- [107] Sekmen, A.H. Ozgur, R. Uzilday, B. ve Turkan, I., (2014). "Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress", *Environmental and Experimental Botany*, 99: 141-149.
- [108] Bradford, M.M., (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- [109] McCord, J.M. ve Fridovich, I., (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)", *J Biol Chem*, 244: 6049-6055.
- [110] Demiral, T. ve Türkan, İ., (2005). "Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance", *Environmental and Experimental Botany*, 53: 247-257.
- [111] Branco-Neves, S. Soares, C. De Sousa, A. Martins, V. Azenha, M. Gerós, H. ve Fidalgo, F., (2017). "An efficient antioxidant system and heavy metal exclusion from leaves make *Solanum cheesmaniae* more tolerant to Cu than its cultivated counterpart", *Food and Energy Security*, 3: 123-133.
- [112] Daud, M.K. Sun, Y. Dawood, M. Hayat, Y. Variath, M.T. Wu, Y.X. Raziuddin Mishkat, U. Salahuddin Najeeb, U. ve Zhu, S., (2009). "Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars", *J Hazard Mater*, 161: 463-473.
- [113] Chandrasekher, C. ve Ray, J.G., (2017). "Copper accumulation, localization and antioxidant response in *Eclipta alba* L. in relation to quantitative variation of the metal in soil", *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 205.
- [114] Hojati, M. Modarres-Sanavy, S.A.M. Enferadi, S.T. Majdi, M. Ghanati, F. Farzadfar, S. ve Pazoki, A., (2017). "Cadmium and copper induced changes in

growth, oxidative metabolism and terpenoids of *Tanacetum parthenium*",
Environ Sci Pollut Res Int, 24: 12261-12272.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Akın SUNULU
Doğum Tarihi ve Yeri : 30.01.1993 , K.Maraş
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : aknsunulu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik	2016-2019
Lisans	Biyomühendislik(ing)	Marmara	2009-2014
Lise	Sayısal	Düziçi A.Ö.L	2007-2011

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2019	Aktin Biyoteknoloji	Laboratuvar Sorumlusu

YAYINLARI

Makale

1. Bozkurt, Y., Sahin, A., Sunulu, A., Aydogdu, M. O., Altun, E., Oktar, F. N., Gunduz, O. (2017). "Electrospun Nanocomposite Materials, A Novel Synergy of Polyurethane and Bovine Derived Hydroxyapatite", Journal of Physics: Conference Series, 1: 829.
2. Kurt-Gür, G., Demirci, H., Sunulu, A., & Ordu, E. (2018). "Stress response of NAD - dependent formate dehydrogenase in Gossypium hirsutum L. grown under copper toxicity", Environmental Science and Pollution Research, 31: 31679-31690.

Proje

1. 216Z052 numaralı tübitak projesi bursiyeri