

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ABSİSİK ASİTİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ *ARABIDOPSIS THALIANA* *sos5*
MUTANTI ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tuba ACET

NİSAN 2014
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ABSİSİK ASİTİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ *ARABIDOPSIS THALIANA sos5*
MUTANTI ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba ACET

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10. 03. 2014

Tezin Savunma Tarihi : 24. 04. 2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Tuba ACET Tarafından Hazırlanan

**ABSİSİK ASİTİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ *ARABIDOPSIS THALIANA sos5*
MUTANTI ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 18/ 03/ 2014 gün ve 1545 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/ 04/ 2014 tarihinde yapılan sınavda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Üye : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ

Üye : Doç.Dr. Rabiye TERZİ

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Absisik Asitin Tuz Stresi Altındaki *Arabidopsis thaliana sos5* Mutantı Üzerindeki Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle doktora tez çalışmalarım süresince danışmanlığımı üstlenerek, her aşamada bana yol gösteren, her zaman ilgi ve desteği ile beni cesaretlendiren, değerli hocam sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, yurt dışı danışmanım Dr. Georg SEIFERT’e araştırmalarım süresince laboratuvar imkânlarını sonuna kadar açarak, büyük bir sabır ve alaka ile beni desteklediği için teşekkür ederim. Tez jürimde yer alan sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ ve sayın Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e, tez yazım aşamasında bana destek olan sayın hocalarım Doç. Dr. Rabiye TERZİ ve Yrd. Doç. Dr. Aykut SAĞLAM’a, Doç. Dr. Neslihan Saruhan’a, değerli hocam sayın Prof. Dr. Hasan ÖZYURT’a, deneylerimde kullandığım bazı tohumları temin etmemde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Christian LUSCHNING ve J.K. ZHU’ya, her konuda desteklerinden dolayı yurtdışı laboratuvar arkadaşlarım Dr. M. A. ALİ, Hui XUE ve Valerie STEINSCHAUER’e, deneylerim için gerekli cihaz ve malzemeleri kullanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR ve sayın Doç. Dr. Ersan KALAY’a ve desteklerini her an hissettiğim sevgili Yrd. Doç. Dr. A. Burhan ÇAKICI ve kıymetli dostum Yrd. Doç. Dr. Kadriye ÖZCAN’a teşekkür ederim. Ayrıca, desteklerinden dolayı KTÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı araştırmacılarına ve çalışmalarına destek veren başta Arş. Gör. Necla PEHLİVAN olmak üzere, Arş. Gör. Betül ÇİÇEK, Arş. Gör. Şule GÜZEL, Arş. Gör. Mehmet DEMİRALAY, Arş. Gör. Fuat YETİŞSİN, Ersan BEKTAŞ ve tüm KTÜ Biyoloji Bölümü çalışanlarına şükranlarımı sunarım. Hayatım boyunca bana her konuda sonsuz destek olan, doğruluğu ve cesareti öğrendiğim sevgili babam Bekir Sıtkı ACET’e, ilk öğretmenim sevgili annem Hamiyet ACET’e, çok kıymetli ablam Ülkü ACET ve sevgili abim Alper ACET’e yürekten teşekkür ederim. Bu çalışma YÖK’ün yurt dışı doktora araştırma bursu ile desteklenmiştir.

Tuba ACET
Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Absisik Asitin Tuz Stresi Altındaki Arabidopsis thaliana sos5 Mutantı Üzerindeki Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 06/05/2014

Tuba ACET

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XV
KISALTMALAR DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri	4
1.3. Tuz Stresi ve Etkileri	5
1.3.1. Tuzluluğun İyon İçeriği Üzerine Etkisi	7
1.3.2. Tuzluluğun Fotosentez Üzerine Etkisi	7
1.3.3. Tuzluluğun Hücre Zarı ve Hücre Çeperi Üzerine Etkisi	8
1.3.4. Tuzluluğun Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisi	9
1.3.4.1. Serbest Radikaller	10
1.3.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)	10
1.3.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	11
1.3.4.1.3. Hidroksil Radikali ($^{\bullet}OH$).....	12
1.3.4.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)	12
1.4. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Mekanizmaları	12
1.4.1. Hücre İçi İyon Dengesinin Sağlanması ve SOS Sinyal İletim Yolu	14
1.4.2. Osmolitlerin Biyosentezi	18
1.4.3. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Geliştirilen Savuna Mekanizmaları	19
1.4.3.1. Antioksidan Enzimler	20
1.4.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	20
1.4.3.1.2. Katalaz (CAT)	21
1.4.3.1.3. Askorbat Peroksidaz (APX)	22

1.4.3.1.4.	Peroksidaz (POD=GPX).....	23
1.5.	Tuz Stresinin ABA ile İlişkisi	24
1.5.1.	Absisik Asit'in Yapısı	24
1.5.1.1.	ABA Biyosentezi ve Katabolizması	25
1.5.1.2.	ABA ve Sinyal İletimi	27
1.6.	Hücre Çeperi ve <i>SOS5</i> Geni	29
1.7.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisi ve Önemi	34
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	37
2.1.	Bitkilerin Büyütülmesi ve Yapılan Muameleler.....	37
2.1.1.	Genetik Çaprazlamalar	39
2.1.2.	Çimlenme Deneyleri.....	40
2.2.	Lipid Peroksidasyonu Tayini	40
2.3.	Prolin Tayini	41
2.4.	Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini	41
2.4.1.	Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması.....	41
2.4.2.	Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesinin Tayini	41
2.4.3.	Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	41
2.4.4.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	42
2.4.5.	Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini	42
2.5.	Protein Tayini	42
2.6.	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) İçeriğinin Belirlenmesi.....	43
2.7.	Stoma Açıklığının Belirlenmesi	43
2.8.	Kök Uzunluklarının Ölçülmesi.....	43
2.9.	Konfokal Taramalı Laser Mikroskop ve Işık Mikroskop Çalışmaları.....	43
2.10.	Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi	44
2.10.1.	Genomik DNA izolasyonu	46
2.10.2.	<i>cpl1-1</i> Genotiplemesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi.....	46
2.10.3.	<i>cpl3-1</i> Genotiplemesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi.....	47
2.10.4.	<i>sad1-1</i> Genotiplemesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi	48
2.10.5.	<i>abi4-1</i> Genotiplemesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi.....	49
2.10.6.	<i>abi5-1</i> Genotiplemesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi.....	51
2.11.	Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	52
2.12.	Semikantitatif Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR)	52

2.12.1.	Agaroz Jel Elektroforezi	53
2.13.	Real Time PCR (qRT-PCR)	53
2.14.	İçsel ABA Tayini	54
2.15.	İstatistik Analizler	54
3.	BULGULAR	55
3.1.	Tuz Stresi Altında ABA muamelesinin <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Kök Fenotipleri Üzerine Etkisi	55
3.2.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Kök Fenotipi Üzerine Etkisi	56
3.3.	Tuz Stresi Altında Pyrabaktin'in <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Kök Fenotipine Etkisi	57
3.4.	Tuz Stresi Altında Fluridon'un <i>sos5 (fla4)</i> Kök Fenotipine Etkisi	58
3.5.	Tuz Stresi Altında Abscinazol E2B'nin <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Kök Fenotipine Etkisi	59
3.6.	ABA'nın Mutant Bitkilerde Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi	60
3.7.	Tuz Stresi Altındaki <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitkilerinde ABA'nın MDA İçeriği Üzerine Etkisi	62
3.7.1.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Yapraklarındaki MDA İçeriği Üzerine	62
3.7.2.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Köklerindeki MDA İçeriği Üzerine Etkisi	63
3.8.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitkilerindeki Prolin İçeriği Üzerine Etkisi	64
3.8.1.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Yapraklarındaki Prolin İçeriği Üzerine Etkisi	64
3.8.2.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Köklerindeki Prolin İçeriği Üzerine Etkisi	65
3.9.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitkilerinde Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	66
3.9.1.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Yapraklarındaki GPX Aktivitesi Üzerine Etkisi	66
3.9.2.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Köklerindeki GPX Aktivitesi Üzerine Etkisi	67
3.9.3.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Yapraklarındaki CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi	68
3.9.4.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Köklerindeki CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi	70

3.9.5.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Yapraklarındaki SOD Aktivitesi Üzerine Etkisi	71
3.9.6.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Köklerindeki SOD Aktivitesi Üzerine Etkisi	72
3.9.7.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Yapraklarındaki APX Aktivitesi Üzerine Etkisi	73
3.9.8.	Tuz Stresi Altında ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitki Köklerindeki APX Aktivitesi Üzerine Etkisi	75
3.10.	Tuz Stresi Altındaki Mutant Bitki Kök ve Yapraklarında ABA'nın Hidrojen Peroksit İçeriği Üzerine Etkisi.....	76
3.11.	Tuz Stresi Altındaki Yabani Tıp ve <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitkilerinde ABA'nın Stoma Açıklıkları Üzerine Etkisi.....	78
3.12.	Tuz Stresi Altındaki <i>sos5 (fla4)</i> Mutant Bitkilerinde ABA'nın Canlı Dokulardaki Kök Fenotipine Etkisi	80
3.13.	Tuz Stresi Altındaki <i>sos5 (fla4)</i> Mutant ve Çift Mutant Bitkilerinde ABA'nın Kök Fenotipine Etkisi	82
3.13.1.	Tuz Stresi Altındaki <i>abi4-1 sos5 (abi4 fla4)</i> Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri.....	83
3.13.2.	Tuz Stresi Altındaki <i>abi5-1 sos5 (abi5 fla4)</i> Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri.....	85
3.13.3.	Tuz Stresi Altındaki <i>cpl1-1 sos5 (cpl1 fla4)</i> Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri.....	87
3.13.4.	Tuz Stresi Altındaki <i>cpl3-1 sos5 (cpl3 fla4)</i> Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri.....	89
3.13.5.	Tuz Stresi Altındaki <i>sad1-1 sos5 (sad1 fla4)</i> Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri.....	91
3.14.	Tuz Stresi Altındaki Mutant Bitki Köklerinde Gen İfade Oranlarının Karşılaştırılması.....	93
3.14.1.	RT-PCR (Semi-kantitatif Revers Transkriptaz PCR) Metodu ile Gen İfade Farklılıklarının Gösterilmesi.....	93
3.14.2.	qPCR (Real Time PCR) Metodu ile Gen İfade Farklılıklarının Gösterilmesi..	94
3.15.	Tuz Stresi Altındaki Mutant Bitki Köklerinde İçsel ABA Miktarlarının Tayin Edilmesi.....	98
4.	TARTIŞMA.....	99
5.	SONUÇLAR.....	111
6.	ÖNERİLER.....	115
7.	KAYNAKLAR	117
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

ABA UYGULAMASININ TUZ STRESİ ALTINDAKİ *ARABIDOPSIS THALIANA*
YABANI TİP VE *sos5* MUTANTI ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuba ACET

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
2014, 137 Sayfa

Çalışmamızda, *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde *SOS5*, ROS ve ABA metabolizması arasındaki olası ilişkiyi aydınlatmak için tuz stresi altında dıştan ABA muamelesi ile lipid peroksidasyonu, prolin ve hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları belirlendi. Ayrıca, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve guaikol peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzimlerinin aktiviteleri belirlendi. Tuz stresi altında *SOS5*'in ABA'ya cevapta rol alan genetik regülatörlerle ilişkisini tespit etmek için çift mutantlar elde edildi. *SOS5*'in abiyotik streslere cevapta uyarılan genler ile ilişkisini aydınlatmak için bazı genlerin ifade düzeylerine bakıldı. Tuz stresi koşullarında ABA'nın, *sos5*'in tuza hassas kök fenotipini tamamen baskıladığı ve tohum çimlenme oranlarının mutant bitkide yabancı tipe oranla daha yüksek olduğu bulundu. Diğer taraftan, tuz stresi koşullarında mutant bitkilerde içsel H₂O₂ miktarının arttığı belirlendi. Stres altında ABA uygulaması ile prolin içeriğinde, APX, CAT ve GPX aktivitelerinde artış, SOD aktivitesinde köklerde azalma kaydedildi. Tuz stresi koşullarında *sos5* kök fenotipinin *abi4-1* mutasyonu ile arttığı ancak *cpl1-1* ve *sad1-1* ile baskılandığı tespit edildi. Tuz stresine maruz bırakılan *sos5* mutantının gen ifadelerinde azalma olduğu bulundu. Elde edilen bulgulara göre, tuz stresi altında *SOS5* geninin köklerde *ABI4* geni ile aynı yönlü ve *CPL1*, *SAD1* genleri ile antagonist olarak, çeşitli tolerans mekanizmalarını uyararak ABA'nın pozitif bir regülatörü gibi hareket ettiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*; *sos5* mutanti, ABA sinyalizasyonu, antioksidan sistem, tuz stresi, gen ifadesi

PhD Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION ON THE PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR
EFFECTS OF ABA APPLICATION ON *ARABIDOPSIS THALIANA* WILD TYPE
AND *sos5* MUTANT UNDER SALT STRESS

Tuba ACET

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Asim KADIOĞLU
2014, 137 Pages

In our study, to shed light on the potential relationship with *SOS5*, ROS and ABA metabolism in *Arabidopsis thaliana*, lipid peroxidation, prolin and hydrogen peroxide (H_2O_2) contents were determined. Furthermore, antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) were determined with ABA treatment under salt stress. Under salt stress to establish the relationship of *SOS5* with genetic regulators which have a role in ABA response, double mutants were obtained. To enlighten the *SOS5* relationships with some genes that induced in response to abiotic stresses, expression level of genes were checked. It was found that ABA fully suppressed salt overly sensitive root phenotype of *sos5* under salt stress conditions and *sos5* seed germination rates were higher compared to the wild type. On the other hand, it was found that under salt stress conditions endogenous H_2O_2 content increased in mutant plants. With the application of ABA under salt stress while raises in prolin content, APX, CAT and GPX activities were observed, SOD activity and in particular MDA content reduction at mutant roots were recorded. Under salt stress conditions it was found that *sos5* root phenotype was enhanced by *abi4-1* mutations but suppressed by *cpl1-1* and *sad1-1*. In *sos5* mutant that exposed to salt stress, decrease in expression were found in genes. According to the findings, under salt stress *SOS5* gene acts synergistic with *ABI4* gene and antagonistic with *CPL1*, *SAD1* genes in roots. In conclusion, this suggests that *SOS5* gene acts as a positive regulator of ABA and stimulate some tolerance mechanisms.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*; *sos5* mutant, ABA signalization, antioxidant system, salt stress, gene expression

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Başlıca çevresel stres tipleri	5
Şekil 2. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile ROS oluşum basamaklar	10
Şekil 3. Bitkilerin abiyotik stres cevapları.....	14
Şekil 4. Tuz stresine adaptasyonda SOS sinyalizasyon yolu ile iyon dengesinin düzenlenmesi	17
Şekil 5. Bitkilerde prolinin çok yönlü fonksiyonları	19
Şekil 6. ABA'nın yapısı.....	25
Şekil 7. ABA Biyosentez Yolu.....	26
Şekil 8. Stres koşulları altında ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız yollarda gen ifadesinin düzenlenmesi	29
Şekil 9. <i>SOS5</i> Geninin Pozisyonel Klonlanması	31
Şekil 10. <i>SOS5</i> geninin yapısı.....	31
Şekil 11. Arabidopsis kökünde dokuların dizilimi kökün dıştan görünümü	32
Şekil 12. Tuz koşulları altındaki <i>sos5</i> mutant kök fenotipindeki değişimler	33
Şekil 13. <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin genel görünümü ve kısımları	35
Şekil 14. Enzim ölçümleri için yetiştirilmiş bitkilerin görünümü	39
Şekil 15. Büyütme kabinde dikey biçimde yetiştirilen bitkilerin görünümü.....	39
Şekil 16. Leica SPII konfokal taramalı laser mikroskop	44
Şekil 17. Çift mutant elde etmek üzere bitkilerin toprakta yetiştirilmesi	45
Şekil 18. <i>cpl1 sos5</i> çift (double) mutantının PCR yöntemi ile belirlenmesi	47
Şekil 19. <i>cpl3 sos5</i> çift (double) mutantının PCR yöntemi ile belirlenmesi	48
Şekil 20. <i>sad1 sos5</i> çift (double) mutantının PCR ve sekanslama yöntemi ile belirlenmesi	49
Şekil 21. <i>abi4-1</i> genotiplemesi için yapılan PCR (kesim öncesi)	50
Şekil 22. <i>abi4-1 sos5</i> çift (double) mutantının PCR (kesim sonrası) ve sekanslama yöntemleri ile belirlenmesi	50
Şekil 23. <i>abi5-1</i> genotiplemesi için yapılan PCR (kesim öncesi)	51
Şekil 24. <i>abi5-1 sos5</i> çift (double) mutantının PCR (kesim sonrası) yöntemi ile belirlenmesi	51
Şekil 25. Tuz stresi koşullarında <i>sos5 (fla4)</i> mutant bitki köklerinin genel görünümü ve ABA'nın etkisi.....	55

Şekil 26. Tuz stresi koşullarında farklı konsantrasyonlardaki ABA'nın <i>sos5</i> mutant kök fenotipi üzerine etkisi	56
Şekil 27. Tuz stresi koşullarında farklı konsantrasyonlardaki Pyr'nin <i>sos5</i> mutant kök fenotipi üzerine etkisi	57
Şekil 28. Tuz stresi koşullarında 10 µM Flu'nun <i>sos5 (fla4)</i> mutant kök fenotipi üzerine etkisi.....	58
Şekil 29. Tuz stresi koşullarında ABA ve Flu'nun <i>sos5</i> mutant kök uzunluklarına etkisi	59
Şekil 30. Tuz stresi koşullarında 5µM AbsE2B'nin <i>sos5 (fla4)</i> mutant kök fenotipleri üzerine etkisi	60
Şekil 31. Farklı konsantrasyonlarda ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> mutant tohum çimlenmesi üzerine	61
Şekil 32. Farklı konsantrasyonlarda ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> mutant tohum çimlenmesi üzerine etkisi	61
Şekil 33. 5 µM ABA'nın <i>sos5 (fla4)</i> mutant tohumların çimlenmesi üzerine etkisi.....	62
Şekil 34. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının MDA içeriği üzerine etkisi.....	63
Şekil 35. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin MDA içeriği üzerine etkisi	64
Şekil 36. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının prolin içeriği üzerine etkisi	65
Şekil 37. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin prolin içeriği üzerine etkisi	66
Şekil 38. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının GPX aktivitesi üzerine etkisi	67
Şekil 39. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin GPX aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 40. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının CAT aktivitesi üzerine etkisi	69
Şekil 41. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin CAT aktivitesi üzerine etkisi	71
Şekil 42. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının SOD aktivitesi üzerine etkisi	72
Şekil 43. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	73
Şekil 44. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının APX aktivitesi üzerine etkisi	74
Şekil 45. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin APX aktivitesi üzerine etkisi	76

Şekil 46. Tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde muamele süresine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler	77
Şekil 47. Tuz stresi koşullarında mutant bitki yapraklarında 24 saatlik tuz muamelesine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler	77
Şekil 48. Tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde ABA muamelesine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler	78
Şekil 49. Tuz stresi koşullarında yabancı tip bitkilerde ABA muamelesine bağlı olarak stoma açıklığında meydana gelen değişimler	79
Şekil 50. Tuz stresi koşullarında mutant bitkilerde ABA muamelesine bağlı olarak stoma açıklığında meydana gelen	79
Şekil 51. Tuz stresi koşullarında yabancı tip ve mutant bitkilerde ABA muamelelerine bağlı olarak stoma açıklıklarındaki değişimlerin karşılaştırılması	80
Şekil 52. Tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler	81
Şekil 53. Tuz stresi koşullarında mutant bitkilerde ABA muamelesine bağlı olarak kök fenotiplerinde meydana gelen değişimlerin karşılaştırılması	82
Şekil 54. Tuz stresi koşullarında <i>sos5</i> mutant ve <i>abi4 sos5</i> çift mutant bitki köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler	84
Şekil 55. Tuz stresi koşullarında <i>sos5</i> mutant bitki ve <i>abi5 sos5</i> çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler	86
Şekil 56. Tuz stresi koşullarında <i>sos5</i> mutant bitki ve <i>cpl1 sos5</i> çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler	88
Şekil 57. Tuz stresi koşullarında <i>sos5</i> mutant bitki ve <i>cpl3 sos5</i> çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler	90
Şekil 58. Tuz stresi koşullarında <i>sos5</i> mutant bitki ve <i>sad1 sos5</i> çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler	92
Şekil 59. Tuz stresi koşullarında süreye bağlı olarak mutant bitki köklerindeki genlerin ifade değişimleri	94
Şekil 60. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki <i>ABA1</i> geninin ifade değişimi	95
Şekil 61. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki <i>CYP707A-3</i> geninin ifade değişimi	95
Şekil 62. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki <i>RD29-A</i> geninin ifade değişimi	96
Şekil 63. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki <i>RD29-B</i> geninin ifade değişimi	96
Şekil 64. Tuz stresi koşullarında (2 h) yabancı tip ve mutant bitki köklerindeki <i>RD22</i> geninin ifade değişimi	97
Şekil 65. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki <i>ERD1</i> geninin ifade değişimi	97

Şekil 66. Tuz stresi koşullarında (3. günün sonunda) mutant bitki köklerindeki içsel ABA miktarları	98
---	----

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Tuzluluğa bitki cevapları.....	6
Tablo 2. ROS ile ilgili en önemli enzimler ve antioksidanlar	20
Tablo 3. Mutant kısaltmaları	37
Tablo 4. Çaprazlanan tohumların ekim durumları ve fenotipik ayırımı	46
Tablo 5. <i>cpl1-1</i> için tasarlanan PCR yöntemi.....	47
Tablo 6. <i>cpl3-1</i> için tasarlanan PCR yöntemi	48
Tablo 7. Kesim Protokolü.....	50
Tablo 8. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	52
Tablo 9. RT-PCR Bileşenleri.....	53

KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
ABA1	: ABA biyosentez geni
ABI	: ABA duyarsız
ABSE2B	: Abscinazole E2B
AGP	: Arabinogalaktan Protein
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
CPL	: C-Terminal Domain Fosfataz Lokusu
CYP707A	: ABA katabolizma geni
DAB	: 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
DM	: Çift (Double) Mutant
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FLA4	: Fasiklin benzeri arabinogalaktan protein
GPX	: Guaiakol peroksidaz
KA	: Kuru ağırlık
MDA	: Malondialdehit
MS	: Besi ortamı (Murashige ve Skoog Medya)
NaCl	: Sodyum klorid
NCED	: 9-cis-epoksikarotenoidler dioksigenaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POD	: Peroksidaz
PP2C	: Protein fosfataz 2C
PYR	: Pyrabaktin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAD	: ABA'ya ve kuraklığa aşırı hassas gen lokusu (Super sensitive to ABA and drought)
SnRK2s	: SNF1 ilişkili protein kinaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOS	: Tuza oldukça hassas gen (Salt overly sensitive)

TA : Taze ağırlık
T-DNA : Transfer DNA
TAE : Tris asetat EDTA
ZEP : Zeaksantin epoksidaz

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Çevresel koşullar bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve üretkenliğini etkiler. Bitkiler yaşamları boyunca, patojen, pestisit ve böcekler gibi biyotik streslere ve tuzluluk, ozmotik dengesizlik, yüksek veya düşük sıcaklıklar gibi abiyotik streslere maruz kalırlar. Özellikle tuzluluk, düşük sıcaklık ve kuraklık gibi abiyotik stresler, tarımsal sistemlerde hasat edilen ürün miktarındaki azalmanın başlıca sorumlusudur (Boyer, 1982).

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuz stresi dünya genelinde artış göstermekte ve tarım alanlarında olumsuzluklara neden olmaktadır. Örneğin, Türkiye’de toprakların 1.5 milyon hektara yakın kısmı tuzluluk sorunu ile karşı karşıyadır (Ekmekçi vd., 2005). Dünya genelinde ise 800 milyon hektardan fazla karasal alan tuzluluktan etkilenmektedir ve bu alan dünyanın tüm karasal alanlarının % 6’sından fazladır (Munns vd., 2008). Tuzluluk dünya genelinde gittikçe artış göstermekte ve 2050 yılına kadar dünyada ekilebilir alanların % 50’den fazlasının bu stresten ciddi biçimde etkilenebileceği tahmin edilmektedir (Wang vd., 2003).

Tuzluluk, bitki büyümesini ve gelişimini inhibe eden ve ürün veriminde önemli derecede azalmaya neden olan bir stres durumudur (Shan vd., 2012). Bitkilerde tuz stresi büyümenin azalmasına, fotosentez hızının yavaşlamasına, reaktif oksijen türlerinin artmasına, su potansiyelinin azalmasına, iyon dengesizliğine ve stomaların kapanmasına yol açar (Cramer vd., 1994; Taiz ve Zeiger 2002; Bartels ve Sunkar 2005; Mahajan vd., 2008). Tuz stresi, bu olayların etkisiyle bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz bir şekilde etkiler ve önemli ölçüde ürün kaybına neden olur. Bu ürün kayıplarını en aza indirebilmek için tuza dirençli türler geliştirmek, bitkilerin tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarını aydınlatmak ve ilgili gen kaynaklarının korunmasını sağlamak oldukça önem taşımaktadır (Koca vd., 2007; Yılmaz vd., 2011; Lovelli vd., 2012).

Bitkiler yukarıda bahsedilen olumsuz etkilerle başa çıkabilmek için bazı karmaşık fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal cevaplarla uyarılabilen tolerans mekanizmaları geliştirirler. Çevresel stresler bitkide bir dizi sinyal molekül vasıtası ile algılanır ve taşınırlar (Mukhopadhyay vd., 2004). Tuz stresine cevap olarak; bitkilerde metabolizma yan ürünü olarak oluşan reaktif oksijen türlerini temizleyen çeşitli enzimatik olmayan

antioksidanlar ile antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttırılması, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve ozmolit sentezinin teşvik edilmesi, fotosentetik yolun değiştirilmesi, gen ifadesi ve SOS yoluyla iyon alımının düzenlenmesi, stresle ilgili genlerin aktive edilerek transkripsiyon faktörlerinin sentezlenmesi ile stres proteinlerinin üretiminin teşvik edilmesi gibi tolerans mekanizmaları sayılabilir (Yılmaz vd., 2011). Tuza aşırı duyarlı genlerin kontrolündeki SOS sinyal yolu, Na^+ ve K^+ iyon dengesini düzenlemektedir (Yokoi vd., 2002).

Bitkilerin tuz stresi altında hayatlarını sürdürebilmek için geliştirdikleri tolerans stratejilerinden biri de stres altında absisik asit (ABA) biriktirmeleridir (Borsani vd., 2003). ABA kuraklık ve tuz stresi gibi abiyotik streslere cevapta rol aldığı bilinen başlıca hormondur ve bitkilerde birçok gelişim sürecine katılır (Nitsch vd., 2012). ABA bitkilerde birçok stres ilişkili genin ekspresyonunu ve metabolik değişimleri uyarır (Chen vd., 2005). Bitkilerde su eksikliği ilk olarak strese maruz kalan kökler tarafından hissedilir ve burada üretilen ABA bitkilerin su kaybını önlemek için yapraklara taşınarak stomaların kapanmasını regüle eder (Sauter vd., 2001; Xiong vd., 2002). Bunların dışında ABA, antioksidan sistemi uyararak ve çeşitli ozmoprotektan moleküllerin birikimine neden olarak reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Lu vd., 2009; Ozfidan vd., 2013). Ayrıca dıştan ABA uygulamasının çeşitli bitki çeşitlerinde osmotik strese ve tuz stresine karşı bitkileri korudukları rapor edilmiştir (Ozfidan, 2013). Bununla birlikte, ABA'nın tuz stresi altındaki rolünün aydınlatılabilmesi için ABA-eksik mutantların kullanımının önemli olduğu vurgulanmıştır (Schwartz vd., 2003). Mevcut çalışmada, *sos5* mutantının ABA eksikliğinden dolayı tuz stresine tolerans sağlayamadığı ve bu nedenle aşırı hassas fenotip sergilemiş olabileceği düşünülerek hipotez kurulmuş ve yöntemler bu doğrultuda seçilmiştir.

Arabidopsis thaliana (Lahanagiller, Brassicaceae) ekonomik yönden önemli bir bitki olmamasına rağmen, 50 yıldan beri fizyolojik, biyokimyasal, genetik ve moleküler çalışmalarda model bir bitki olarak kullanılmaktadır (Çalış ve Yazar, 2011). Bu bitki, genetik çaprazlamaların yapılması ve mutasyonların oluşturulması yoluyla tuz stresi gibi çevresel stres cevaplarının anlaşılması açısından kullanışlıdır (Xiong vd., 2002, Chen vd., 2005). Örneğin, *Arabidopsis*'de SOS genlerinin keşfedilmesinden sonra iyon dengesi ve tuz toleransı arasındaki ilişki aydınlatılmaya başlanmıştır (Zhu vd., 1998; Mahajan vd., 2008).

Bitkilerde SOS yolu ile ilgili olarak; *SOS1* (Wu vd., 1996) , *SOS2* (Zhu vd., 1998) , *SOS3* (Liu vd., 1997) , *SOS4* (Zhu vd., 2000), *SOS5* (Shi vd., 2003) ve *SOS6* (Zhu vd., 2010) olmak üzere 6 lokus tanımlanmıştır. *SOS5* geni fasiklin benzeri bölge ve arabinogalaktan protein benzeri bölgelerden oluşmaktadır ve *FLA4* olarak da ifade edilmektedir (Mahajan vd., 2008; Seifert vd., 2014). SOS genlerinden çoğunun tuz stresi koşullarındaki ifadesi ve rolü çalışılmakla birlikte *SOS5* geni ile ilgili bu konuda fazlaca bilgi mevcut değildir.

SOS5 gen lokusunda meydana gelen mutasyon sonucu elde edilen *sos5* (*fla4*) mutant bitkilerinde, tuz stresi koşullarında anormal epidermal, kortikal ve endodermal hücre genişlemeleri oluşur. Bunun sonucu olarak aşırı kısa ve genişlemiş kök ucu fenotipi ortaya çıkar (Shi vd., 2003). *SOS5* mutasyonu olmayan yabani tip bitkilerin kökleri ise tuz stresi altında oldukça organize olmuş ve düzenli bir hücre yapısı sergilemektedir. Bu durum, tuz stresi altında, bitkilerin normal büyüme ve gelişmelerini sürdürmesi için *SOS5* geninin hücre çeperi bütünlüğü ve yapısını devam ettirmede gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Shi vd., 2003). Bununla birlikte, bu proteinin SOS sinyalizasyonundaki işlevi, tuz stresine cevapta rol alan genlerin ifadesine nasıl etki ettiği ve stresle uyarılan hormonlarla olan ilişkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bu nedenle mevcut çalışmada, *SOS5* geninin tuz stresi altındaki fonksiyonu aydınlatılmaya çalışılacaktır.

Yukarıda izah edildiği gibi *SOS5* geni tuz stresi altında hücre çeperi bütünlüğünü sağlamak için gereklidir. Bitkilerde hücre çeperi yapısı ile hücre iskeleti-çeper-membran etkileşimleri ve aynı zamanda komşu hücreler arasındaki ilişkiler hücre genişlemesinde önemli rol oynamaktadır (Darley vd., 2001). Bitki hücreleri hayvan hücrelerinden farklı olarak, nispeten ince ama mekanik olarak güçlü bir hücre çeperi tarafından kuşatılmıştır. Bu çeper, hücre tarafından salgılanan polisakkaritlerden ve diğer birçok polimerlerin yer aldığı karmaşık bir karışımdan oluşur (Taiz ve Zeiger, 2008). Hücre çeperinin hücre büyümesini kontrol etme fonksiyonu sadece mekanik rolü ile sınırlı değildir (Blaukopf vd., 2011). Bitkilerin, hücre çeperi fonksiyonunu ve bütünlüğünü kontrol etmeleri, onların hayatta kalmaları, bölünmeleri, genişlemeleri, farklılaşmaları ve aynı zamanda biyotik ve abiyotik çevre şartlarına karşı koymaları açısından çok önemlidir (Somerville vd., 2004). Bu bağlamda hücre yüzeyinde yer alan çeper bütünlüğünden sorumlu sensörler tanımlanmış ve bunlar; reseptör benzeri kinazlar, mekanik duyarlı iyon kanalları ve arabinogalaktan proteinler (AGP) olarak 3 grupta toplanmıştır (Wolf vd., 2012). AGPlerin hücre çeperi ile sitoplazmada arasında bilgi iletiminden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Driouich ve Baskin,

2008). Ancak, AGP'lerin hücre çeperi bütünlüğünü sağlamada hangi yolları kullandığı hakkında kesin bir bilgi mevcut değildir. Bu nedenle, tuz stresi altında dıştan ABA uygulaması ile hücre çeperi bütünlüğünün sağlanması tolerans mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

Literatürde tuz stresi ile ROS, antioksidan sinyal iletimi ve stres ilişkili gen ekspresyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcut olmasına rağmen (Lee vd., 2001; Shi vd., 2002; Shi vd., 2003; Abe vd., 2003; Lu vd., 2009; Zhu vd., 2010), *Arabidopsis thaliana* *sos5* mutantının tuz stresi altında, ABA uyarımlı ROS üretimi, antioksidan enzim sisteminin uyarılması, hücre çeperi performansı ve bütünlüğünün kontrol edilmesi gibi konularda bir çalışma yapılmamıştır.

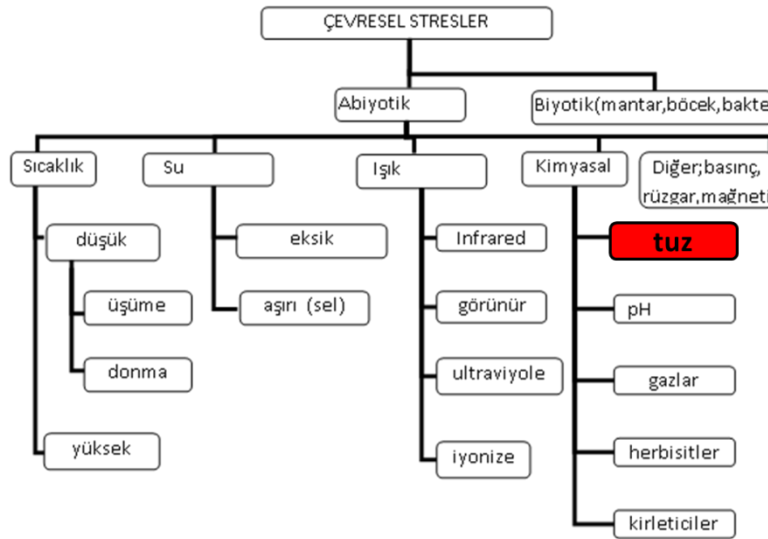
Literatürdeki bu eksikliği gidermek amacı ile, köklerdeki tuza cevabın ABA ile ilişkili olarak sinyalizasyon ve metabolik mekanizmalarını nasıl uyardığını aydınlatmak için ROS oluşumu (H_2O_2), lipid peroksidasyonu, SOD, CAT, APX ve GPX gibi detoksifikasyon enzimlerinin aktivasyonu, prolin ve içsel ABA miktarları ölçülmüştür. Ayrıca *SOS5* (*FLA4*) geninin tuz toleransı ve ABA cevabının genetik regülatörler vasıtasıyla kök gelişiminde rolü olup olmadığını test etmek için *fla4* ile ABA'ya duyarsız (*abi4*, *abi5*) ve ABA'ya aşırı duyarlı (*cpl1.1*, *cpl3.1* ve *sad1.1*) mutantları arasında çaprazlama sonucu double (çift) mutantlar elde edilmiştir. Son olarak, *SOS5* geninin ABA metabolizması ile ilişkisini moleküler düzeyde aydınlatmak için sırasıyla ABA biyosentezi ve katabolizmasında görev alan *ABA1*, *CYP707A-3* genlerinin, tuz stresine cevapta ABA'ya bağımlı olarak indüklenen *RD29A*, *RD29B*, *RD22* genlerinin ve ABA'dan bağımsız olarak indüklenen *ERD1* geninin ifade olma düzeylerine, RT-PCR ve qPCR teknikleri kullanılarak bakılmıştır.

1.2. Stres ve Çeşitleri

Canlılarda normal sistemin fonksiyonlarını inhibe etme eğiliminde olan olumsuz etkiler ya da kuvvetler stres olarak tanımlanmaktadır (Kadioğlu, 2011). Stres terimi aynı zamanda bitkilerde hasar oluşturma potansiyelini de kapsar. Bir metabolizma bozukluğunun sonucunda oluşan bu hasarlar bitkinin büyümesinde ve veriminde azalma meydana getirirler (Hale ve Orcutt, 1987).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca abiyotik stres faktörleri: soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve besin

yetersizliğinden; biyotik stres faktörleri ise: virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlardan oluşur (Yılmaz vd., 2011, (Şekil 1)). Bütün bu faktörler bitkinin gelişimini, hayatta kalmasını, biyokütle üretimini ve ürün verimini olumsuz yönde etkilerler (Agarwal vd., 2006).



Şekil 1. Başlıca çevresel stres tipleri

1.3. Tuz Stresi ve Etkileri

Tuzluluk, hem primer (doğal) sebepler (kayaçların aşınması, tuzlu sular, rüzgar ve yağmurla taşınan okyanus tortuları ve iklimsel etmenler) (Ashaf ve Flooad, 2007; Munns ve Tester, 2008; Ampudia-Galvan ve Testerink, 2011) hem de sekonder (yapay) sebepler (tarımsal alanlarda yapılan yanlış sulamalar ile çeşitli tuzlar bakımından zengin yer altı sularının toprak yüzeyine yükselmesi, aşırı otlatma, bilinçsizce tarım arazilerinin açılması ve tuzluluğa neden olan kimyasalların kullanımı) sonucu oluşan ve tarımsal üretimi önemli derecede kısıtlayan çevresel bir faktördür (Çulha ve Çakırlar, 2012).

Toprakta tuzluluk problemine neden olan bileşikler klorürler (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2), sülfatlar (Na_2SO_4 , MgSO_4), nitratlar (Na_2NO_3 , KNO_3), karbonatlar ve bikarbonatlar (CaCO_3 , Na_2CO_3 , NaHCO_3) ve boratlar olarak sıralandırılabilir. Ancak genelde toprak tuzluluğu ve tuz stresi denildiğinde NaCl 'ün varlığından söz edilmektedir (Eroğlu, 2007). Toprak tuzluluğu bitki büyüme ve gelişimini iki şekilde olumsuz yönde etkilemektedir: 1) kök dışındaki iyonlar, üşüme veya kuraklığın yarattığı strese benzer şekilde ozmotik bir

stres oluşturarak bitkinin topraktan su almasını güçleştirmesi, 2) Na^+ ve Cl^- iyonlarının artışına bağlı olarak toksik etki oluşturmasıdır (Ampudia-Galvan ve Testerink, 2011; Munns, 2005). Sodik bir topraktaki yüksek Na^+ konsantrasyonu hem bitkiyi doğrudan etkiler, hem de porluluğu ve geçirgenliği azaltmak sureti ile toprak yapısında bozulmaya neden olur. Tarlada, toprak ya da sulama suyunun tuzluluğu elektriksel iletkenlik veya ozmotik potansiyel olarak ölçülebilir. Suda tuz konsantrasyonunun artması, elektriksel iletkenliği arttırarak ozmotik potansiyeli düşürürken (osmotik basıncı artırır) su absorpsiyonunu riske atar ve bitkide fizyolojik bir kuraklığa neden olur (Taiz ve Zeiger, 2008; Hassine vd., 2010). İletkenlik birimi olarak desi Siemens/m (dS/m) veya mili Siemens/cm (mS/cm) kullanılır. Bu birime göre aşağıdaki tabloda tuzluluğa bitkilerin cevapları özetlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Tuzluluğa bitki cevapları (Kadıoğlu, 2011).

Tuzluluk (EC) dS/m 25 °C	Zirai Bitkilerin Cevabı
0-2	Önemli bir cevap yok, tolere edilebilir
2-4	Çok duyarlı türlerde verim azalabilir
4-8	Birçok bitkide verim azalır
8-16	Sadece toleranslı türlerden verim alınabilir
16 üzeri	Sadece çok toleranslı türlerden verim alınabilir

Yüksek tuz konsantrasyonlarına cevap verme yönünden bitkiler iki gruba ayrılmaktadır. Bunlardan tuzlu topraklarda yaşayabilen türler halofiler, tuzlu ortamlara direnç sağlayamayan türler ise glikofitler olarak adlandırılır (Taiz ve Zeiger, 2008; Hasegawa 2013). Yüksek bitkilerin çoğu glikofitler kapsamında yer almakta ve yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayamamaktadır. Tuza tolerans bakımından bitkiler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Familya, cins ve türler arasındaki farklılıkların yanı sıra, aynı türe ait çeşitler arasında da tuza tolerans yönünden farklılıkların bulunduğu bilinmektedir. Tüm bitkiler belirli derecelere kadar stres hasarlarına karşı koyma ve canlı kalabilme özelliği taşırlar. Son yıllarda tuz stres toleransı ile ilgili çalışmalar, tipik bir glikofit bitki olan *Arabidopsis thaliana* üzerine yoğunlaşmıştır (Vinocur ve Altman, 2005).

1.3.1. Tuzluluğun İyon İçeriği Üzerine Etkisi

NaCl fazlalığı su potansiyelini azaltmasının yanında, hücredeki iyon dengesini de bozarak bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Yüksek tuz (NaCl) alınımı diğer besleyici iyonların geçişi ile rekabet eder. Buna bağlı olarak bitkilerde Na^+ ve Cl^- düzeyleri artarken; Ca^{+2} , K^+ ve Mg^{+2} düzeylerinde azalma meydana gelir (Parida ve Das, 2005). Sodyum klorürün 100 mM'ın üzerindeki konsantrasyonları hücreler için sitotoksik olarak kabul edilmektedir. Çünkü bu durumda birçok temel enzim aktivitesinin azaldığı, hücre bölünmesi ve gelişmesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Mahajan vd., 2008). Özellikle büyüme ve gelişme için gerekli temel etmenlerden biri olan Ca^{+2} iyon alınımı etkilendiğinde, Na^+ hücre zarındaki Ca^{+2} ile yer değiştirerek zarın apoplast kısmında $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ iyon oranının artmasına neden olur. Bu durumda, zarın fizyolojik ve fonksiyonel yapısında bozulmalar meydana gelir ve hücrenin Ca^{+2} dengesi olumsuz şekilde etkilenir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

1.3.2. Tuzluluğun Fotosentez Üzerine Etkisi

Bitki gelişimi bütünleşmiş ve düzenlenmiş fizyolojik süreçlerin sonucunda vuku bulmaktadır. Bu süreçler birçok çevresel faktör tarafından olumsuz etkilenmektedir. En baskın fizyolojik süreç ise fotosentezdir. Tuz stresi altında bitki dokularında artan Na^+ konsantrasyonu oksidatif strese neden olmaktadır ve bu durum bitişik grana membranlarında yığılmaya, tilakoidlerin büzülmesine ve klorofillerin parçalanmasına sebep olmaktadır. Elektron mikroskop çalışmaları ile bitkilerde tuz muamelesi sonucu, kloroplastların tilakoid yapılarında düzensizlikler ve nişasta içeriklerinde azalmalar görülmüştür. Tilakoidlerin pigment-protein analizleri sonucu, yüksek tuzun Fotosistem I (PSI) ve Fotosistem II (PSII) reaksiyon merkezlerini önemli derecede etkilediği gösterilmiştir (Asraf, 2004; Parida ve Das, 2005).

Tuzluluk yaratmış olduğu ozmotik etki ile sinyal bir molekül olan ve bitki büyüme ve gelişiminin kontrolünde önemli rolü olan absisik asit (ABA) birikimini uyararak stomaların kapanmasını tetiklemektedir (Zhu, 2002). Buna bağlı olarak stoma iletkenliği de azalır. Bitkinin su kaybını engellemek için geliştirilen bu mekanizma aynı zamanda hücre içi CO_2 konsantrasyonunun da azalmasına neden olmaktadır. Tuz stresinde, stoma kaynaklı CO_2 fiksasyonunun sınırlandırılması sonucu, O_2 ortamda azalan CO_2 ile rekabete girerek

Rubisko'ya (CO₂'in Calvin döngüsüne katılmasını sağlayan enzim olan ribuloz difosfat karboksilaz) substrat olarak bağlanır ve enzimin karboksilaz aktivitesi azalırken oksijenaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Sivakumar vd., 2000). Ayrıca tuz stresi kloroplast tilakoidlerinde yer alan proteinlerin yapısını da bozarak elektron taşıma aktivitesini olumsuz etkilemektedir (Ashraf, 2004).

1.3.3. Tuzluluğun Hücre Zarı ve Hücre Çeperi Üzerine Etkisi

Hücre duvarı, genel olarak bitkiye mekanik bir sağlamlık kazandıran, hücreleri birbirine bağlayan ve onlara şekil veren bir yapıdır. Tuz stresi altında, apoplastta biriken Na⁺ iyonlarının, hücre duvarı yapısında bulunan bazı yapısal elemanların iyonik bağlarını bozarak veya enzimlerin yapısını olumsuz etkileyerek hücre duvarının işlevini bozabileceği belirtilmiştir (Rengel, 1992). Streslere cevapta, hücre duvarındaki selüloz, hemiselüloz, pektin, yapısal proteinler ve lignin polimerlerinden oluşan makromoleküller çeşitli enzimler vasıtası ile dinamik bir değişime uğramaktadır. Son yapılan proteomik çalışmalar, kökteki tuzdan sorumlu enzimlerin hücre duvarı polisakkarit sentezi/hidrolizi ve lignin biyosentezi gibi olaylara katıldığını bildirmektedir. Örneğin, Arabidopsis, salatalık, domates ve bezelye gibi bitkilerde polisakkarit sentezinde anahtar rol oynayan tersinir glikozillenmiş polipeptid ve UDP-glukoz: protein transglukosilaz enzimleri tuz stresi ile birlikte uyarılmıştır (Zhao vd., 2013).

Tuz stresinin diğer bir zararlı etkisi ise hücre zarı üzerine olmaktadır. Bilindiği gibi hücre zarı, çift fosfolipid tabaka içine gömülü proteinlerden oluşan, seçici ve geçirgen bir zarıdır. Hücre zarları bitkilerin stresle karşılaştıkları öncelikli kısımlardır ve protoplazmayı çevreden ayıran bir bariyer gibi düşünülmektedir (Gupta, 2007; Salama vd., 2007). Tuz stesi sonucu artan Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının hücreye girişi, hücre membran yapı ve fonksiyonunu olumsuz şekilde etkilemektedir (Chen vd., 2012). Tuz stresi altında hücre lipid kompozisyonundaki her hangi bir değişiklik, tilakoid ve mitekondriyal membranlarda olduğu gibi protein veya multiprotein komplekslerin değişiminde inaktivasyona sebep olur (Qureshi vd., 2013). Ayrıca tuz stresi, lipidlerin parçalanma ve modifikasyonunda görev alan lipoksigenaz enzim aktivitesinin artmasına neden olarak hücre zarındaki fosfolipidlerin azalmasını tetiklemektedir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Hücre zarındaki lipidler membranların temel yapısını oluşturmak dışında, ayrıca metabolizma için yakıt sağlamaktadırlar. Membran lipidlerinin peroksidasyonu, membran

hasarı için bir belirteçtir. MDA konsantrasyonunun ölçülmesi ile oksidatif hasar belirlenebilir. Örneğin, stres altındaki bitkilerde MDA içeriğinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Pagariya vd., 2012). Son yıllarda artan çalışmalarla birlikte, fosfatidik asit, serbest yağ asitleri ve lizofosfolipidler gibi membran lipidlerinin sinyal iletimden, hücresel iskeletinin yeniden kurulmasına ve membran trafiğine kadar birçok süreçte aracı rol üstlendiği ortaya konulmuştur. Bu süreçler, hem bitkinin hayatta kalmasını, büyümesini ve farklılaşmasını hem de bitkinin çevresel streslere karşı cevap mekanizmasını kritik olarak etkilemektedir (Wang, 2004; Salama vd., 2007).

1.3.4. Tuzluluğun Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisi

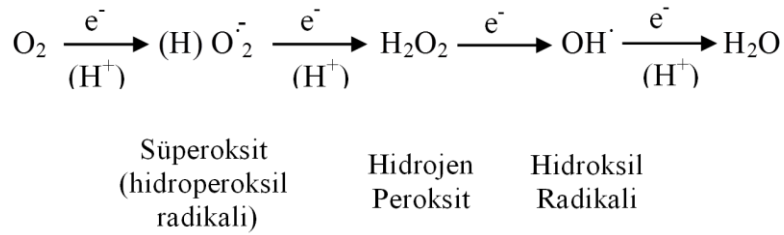
Bitkiler çeşitli abiyotik streslere maruz kaldığı zaman, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($\bullet OH$), singlet oksijen (1O_2) gibi bazı reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu başlatılır (Şekil 2). ROS üretimi oksidatif stresin en önemli zararlı etkisi olan lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır (Kadıoğlu vd., 2011; Yazıcı vd., 2007). Özellikle tuz stresi bitkide su eksikliğine neden olarak osmotik bir stres oluşturur ve ROS üretimini tetikleyerek geniş çapta metabolik aktiviteleri etkiler (Parida ve Das, 2005). Örneğin, tuz stresi altında aşırı üretilen ROS membranların, endomembran sistemlerinin ve klorofil, proteinler, DNA ve lipidler gibi gerekli makromoleküllerin zarar görmesine neden olmaktadır (Li, 2013).

Bitkilerde ROS oluşumuna neden olan birçok kaynak bulunmaktadır. ROS'ların başlıca üretildiği bölge kloroplast tilakoidlerindeki PSI ve PSII reaksiyon merkezleridir. Bunun dışında mitokondriyal solunum sırasında ROS oluşumu meydana gelir. Ayrıca peroksizomlar ve glikozomlar da fotorespirasyon ve yağ asiti oksidasyonu sırasında ROS oluşumuna katılırlar (Gechev, 2006). Diğer taraftan, son yıllarda NADPH oksidazlar, amin oksidazlar ve hücre duvarı bağlantılı peroksidazların da ROS oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Mittler, 2002).

Suyun kısıtlı olduğu durumlarda, bitki su kaybını engellemek için stomalarını kapatır. Bu durumda kloroplastlarda Calvin döngüsü ile CO_2 fiksasyonu ve $NADP^+$ yenilenmesi sınırlanır, CO_2/O_2 oranı düşer (Özfidan, 2010). Bu durum kuantum veriminde azalmaya sebep olur. Böylece fotosentezdeki elektron akseptörü $NADP^+$ kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin $NADP$ yerine oksijeni redükler ve PS I'in elektronları O_2 'ye transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi vd.,

2000). Süperoksit tek başına çok fazla reaktif olmayıp, H₂O₂ ve Hidroksil (•OH) radikallerini oluşturmak suretiyle etkili olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksidin hidroksil radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da artırabilir (Fenton reaksiyonu) (Smirnoff, 1993).

Serbest radikallerin hem indirgen hem de yükseltgen olarak bazen de her iki etkiyi birlikte göstererek hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bitki gelişiminde önemli rol oynayan hormonal sinyal iletiminde, hücre duvarı polimer yapısının değişiminde, bitkiyi abiyotik ve biyotik streslerden korumada, gen ekspresyonlarında, metabolik ve fizyolojik düzenlemelerde kritik rol üstlendiği ve oksidatif bir sinyal molekülü gibi hareket ettiği belirtilmiştir (Swanson ve Gilroy, 2010).



Şekil 2. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile ROS oluşum basamakları (Gechev vd., 2006)

1.3.4.1. Serbest Radikaller

1.3.4.1.1. Süperoksit Radikali (O₂•)

Süperoksit radikali (O₂•), oksijene bir elektronun aktarılmasıyla oluşur. Bu reaksiyon enzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Oksidatif fosforilasyon esnasında NADPH-oksidadaz veya ksantin-oksidadaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde moleküler oksijenden süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit radikalının yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz enziminin varlığına bağlıdır (Stahl ve Sies, 2002). Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit oluşumuna

neden olurlar. Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında ürün olarak süperoksit radikali oluşabilir. Plazma membranlarında da süperoksit üreten NAD(P)H oksidaz enziminin varlığı belirlenmiştir (Vionella ve Macri, 1991). Ayrıca süperoksit enzimatik olmayan reaksiyonlarla, örneğin kloroplast, mitokondri ve plazma membranındaki elektron transport sisteminin yeterince düşük redoks potansiyeline sahip bileşenleri ve ferrodoksin tarafından da üretilebilir. Ayrıca kloroplastlarda PS I ve PS II tarafından süperoksitin üretildiği kaydedilmiştir (Elstner ve Osswald, 1994). Süperoksit radikali oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarıyla ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Fridovich, 1995). Ayrıca, süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell, 1984).

1.3.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin oluştuğu yerlerde önemli miktarda H₂O₂ de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri H₂O₂'nin üretiminden sorumludur. H₂O₂'nin üretildiği başka bir kaynak fotorespirasyonla glikolatın oksidasyonunun meydana geldiği peroksizomlardır. Ayrıca biyokimyasal olarak oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur. Diğer taraftan plazma membranı ve ekstrasellular matriks H₂O₂'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardır (Slesak vd., 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H₂O₂'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H₂O₂ özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde

oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Halliwell, 1984).

1.3.4.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda olduğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl ve Sies, 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell, 1984).

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot OH$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama vd., 1998).

1.3.4.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşur. Bitkilerde 1O_2 'nin başlıca kaynağı fotosentetik elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer vd., 1997). Ayrıca singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak da üretilebilir. Oksijenin bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijenin yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasında olup karbon-karbon bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir (Stahl ve Sies, 2002).

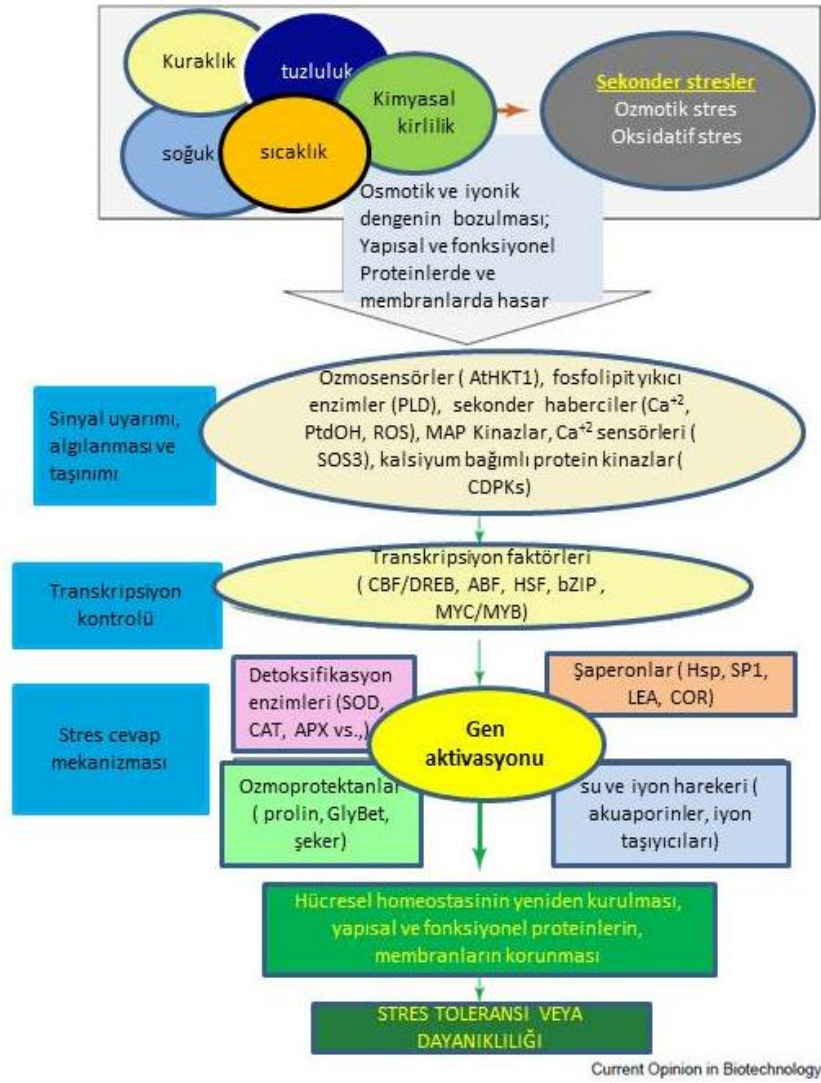
1.4. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Mekanizmaları

Çeşitli çözülebilir tuzların çok yüksek konsantrasyonlarını içeren ortamlarda bitkilerin büyüme ve hayat döngülerini tamamlayabilme yeteneklerine tuz toleransı denir (Parida ve Das 2005). Bitkiler, tuz stresinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelebilmek için

birçok fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal, hücrenel veya moleküler mekanizmalar kullanırlar (Aoki vd., 2005; Kadioğlu ve Terzi, 2007; Sreenivasulu vd., 2007; Pagaria vd., 2012). Tuz toleransı, tuz stresine dayanıklılığın bir göstergesidir ve bitki türüne, çevre şartlarına göre çeşitlilik göstermektedir (Yılmaz vd., 2011). Bitkilerin streslere karşı geliştirdikleri tolerans mekanizmalarını (sinyalizasyon ve metabolik) bilmek strese dayanıklı bitki üretebilmek açısından oldukça önemlidir. Tuzluluk ilk olarak bitkinin kökü tarafından algılanır ve kökteki stres cevabı tüm bitkinin strese adaptasyonu için gereklidir (Zhao vd., 2013).

Son yapılan proteomik çalışmalarda tuza cevapla ilgili önceki fizyolojik ve moleküler bulgulara ek çeşitli proteinler analiz edilmiştir. Bu bağlamda bitkilerin tuz stresinin negatif etkilerine karşı verdikleri cevaplar:

1. Tuz sinyalinin algılanması, taşınması ve sinyal taşınım yollarının dengede tutulması ile tuz adaptasyonu için hücre içi iyon dengesinin sağlanması (MYC, MAP kinaz, SOS kinaz (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 1997; Munnik vd., 1999; Zhu, 2001a), fosfolipazlar (Chapman 1998; Frank vd., 2000) ve HSF, CBF/DREB, ABF/ABAE (Stockinger vd., 1997; Choi vd., 2000; Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2000) gibi sinyal kaskadlarında ve transkripsiyonel kontrolde rol alan genler),
2. Reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi (antioksidan enzimlerin aktive olması gibi),
3. Protein translasyonu veya ilgili genlerin ekspresyonunun ayarlanması (ısı şok proteinleri ve şaperonlar, LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteinleri (Vierling, 1991; Ingram ve Bartels, 1996; Bray vd., 2000; Thomashow, 1998; Thomashow, 1999), akuaporin ve iyon taşıyıcıları gibi su ve iyon alımı ve taşınmasında rol alan proteinler (Maurel 1997; Serrano vd., 1999; Tyerman vd., 1999; Zimmermann ve Sentenac 1999; Blumwald, 2000),
4. Hücre iskeleti/hücre duvarı dinamiklerinin hareketi,
5. Ozmotik ayarlamının sağlanması, aynı zamanda membran ve proteinlerin kararlılığını sağlayan ozmolitlerin sentezi ve birikimi (Bohnert ve Sheveleva 1998) olarak sıralanabilir (Şekil 3). Bahsedilen tüm bu süreçler önce kökte ve sonra tüm bitkide hücrenel homeostasiyi sağlayarak, tuz stresi altında bitkinin büyüme ve gelişmesine imkan sağlar (Popova vd., 2008; Zhao vd., 2013).



Şekil 3. Bitkilerin abiyotik stres cevapları (Wang, 2003)

1.4.1. Hücre İçi İyon Dengesinin Sağlanması ve SOS (Salt Overly Sensitive) Sinyal İletim Yolu

Tuz stresi altında bitkilerde iyon dengesinin kurulması hayatta kalmaları için gereklidir (Borsani vd., 2003). Bitkiler tuz stresine maruz kaldıklarında , yalnızca Na^+ ve Cl^- iyonlarının değil, aynı zamanda K^+ ve Ca^{2+} 'un da iyonik dengesi olumsuz etkilenmektedir (Niu vd., 1995). Çünkü Na^+ iyonları, K^+ ile rekabet ederek, hücre içerisinde K^+ eksikliğine yol açmaktadır (Hasegawa 2013). Bu durumun yol açtığı stresle başa çıkabilmek için, kökler iyon dengesini ayarlayıcı bazı mekanizmalar geliştirirler. Bu sayede Na^+ 'un dışarı atımı artırılır ve bölümlere ayırma (kompartımanlaşma) ile Na^+ girişi düşürülür (Zhao vd., 2013). Tuz stresi bitkiler için hem iyonik hem de osmotik stres yaratması ve bu streslerle başa çıkabilmek için özelleşmiş yollar barındırması bakımından,

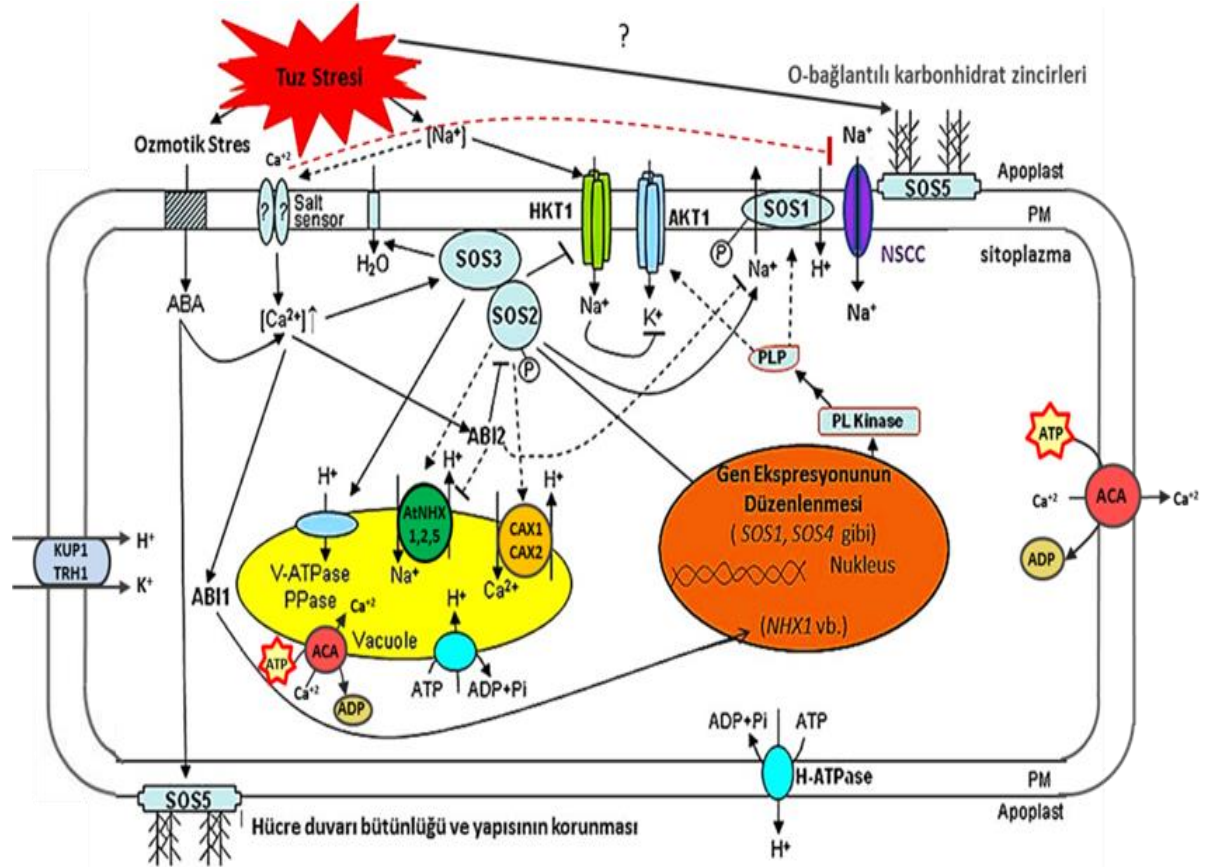
kuraklık ve soğuk gibi streslerden açıkça ayrılmaktadır (Zhu, 2001). Tuz toleransında önemli rol oynayan iyon taşıyıcılar (transporterlar) aşırı Na^+ 'un hücrede birikmesini 3 farklı mekanizma ile önlerler. Bunlar: 1) Na^+ taşıyıcıları ile Na^+ 'un bitkiye girişinin ve hücre içerisine geçişinin sınırlandırılması, 2) Na^+ 'un vakuolde bölümlere ayrılması (kompartımanlaştırılması), 3) sitozolik Na^+ 'un membran Na^+/H^+ taşıyıcılarının aktivitesi ile hücre dışına veya apoplasta taşınması (Apse vd., 1999; Bartels ve Sunekar, 2005).

Yüksek Na^+ konsantrasyonlarında K^+ alınımı, bir K^+-Na^+ taşıyıcısı olan *HKT1* ile engellenir. Bu taşıyıcının görevi Na^+ 'u almaktır ve kalsiyum, K^+/Na^+ seçiciliğini artırarak, tuza toleransı artırır (Liu ve Zhu, 1997). Yüksek iyon konsantrasyonları sitozoldeki pek çok enzim için toksik olabilir; bu etkiyi en aza indirebilmek için Na^+ iyonlarının vakuolde biriktirilmesi gerekmektedir (Zhu, 2001). Plazma zarı ve tonoplastta vakuolar tip H^+ -ATPaz (V-ATPaz) ve vakuolar pirofosfataz (V-PPaz) olmak üzere 2 tane elektrojenik H^+ pompasından söz edilmektedir (Parida ve Das, 2005). Ağır stres şartlarında bitki hücrelerinin hayatta kalabilmeleri için bu yapıların fonksiyonu büyük bir öneme sahiptir.

Ayrıca *Arabidopsis*'te *AtNHX1* geni tuz toleransı için çok önemli olan vakuolar Na^+/H^+ antiportlarını kodlar. Shi vd., (2002), yapmış oldukları çalışmada bu genin NaCl , KCl , veya ABA ile uyarıldığını ifade ederek, pH regülasyonu ve K^+ dengelenmesinde rol aldığını ileri sürmüşlerdir. Yine önceki çalışmalarda, *AtNHX1*'in aşırı ekpiresyonun ifade eden transgenik *Arabidopsis* ve domates bitkilerinde, tuza karşı toleransın arttığı belirtilmiştir (Apse vd., 1999; Quintero vd., 2000).

Ekstraselüler stres ilk olarak membran reseptörleri tarafından algılanır ve sekonder bir mesajcı gibi hareket eden Ca^{2+} 'un hücre içi seviyesi artar (Mahajan vd., 2008). Tuz adaptasyonunda Ca^{2+} 'un rol aldığı yönünde çalışmalar mevcuttur (Liu ve Zhu, 1997). Dıştan uygulanan Ca^{2+} 'un yüksek K^+/Na^+ seçiciliğini kolaylaştırarak, tuzun toksik etkisini düşürdüğü belirtilmiştir. Artan Ca^{2+} seviyesi ile tuz stresinde iyon dengesinin nasıl düzenlendiği, 1996'da Zhu ve arkadaşlarının *Arabidopsis*'te tuza aşırı hassas SOS (Salt Overly Sensitive) genlerini keşfetmeleri ile açıklanmıştır (Wu vd., 1996). Tuz stresi ile artan sitozolik Ca^{2+} miktarı, CBL4 (kalsinörin B-benzeri protein: Kalsiyum algılayıcı protein) olarak da bilinen, ilgili SOS3 sensörü tarafından algılanır ve SOS sinyal yolu başlatılır (Yokoi vd., 2002; Türkan ve Demiral, 2009 (Şekil 4)). SOS3 kalsiyumun varlığında, bir serin/treonin protein kinaz olan SOS2 ile etkileşerek SOS2'yi aktif hale getirir. Bu SOS2-SOS3 protein kinaz kompleksi, plazma membranı Na^+/H^+ antiportu olan *SOS1*'i fosforilleyerek fazla Na^+ 'u hücre dışına çıkartır. Daha sonra bu SOS2-SOS3

kompleksi iyonik dengenin sağlanmasında önemli olan diğer yollarla etkileşim kurar. Örneğin, HKT1 geninin ifadesini azaltarak veya HKT1 proteinini inaktif hale getirerek Na^+ 'un hücreye girişini engeller (Zhu 2002; Mahajan vd., 2008). *SOS2*, *NHX* (vakuol Na^+/H^+ antiportu) ile etkileşerek, *NHX*'i aktif hale getirir ve aşırı Na^+ 'un vakuolde birikimini sağlayarak iyon homeostasisına ilave katkı sağlar (Mahajan vd., 2008). *SOS2* aynı zamanda bir $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$ antiportu olan *CAX1* ile de etkileşerek *CAX1*'in aktivitesini düzenler ve Ca^{+2} homeostasisının korunmasını sağlar (Cheng vd., 2004). Ayrıca, *SOS2* *ABI1* ve *ABI2* ile etkileşime girerek stres sonrası içsel dengenin eski haline dönmesini sağlar (Türkan ve Demiral, 2009). SOS yolunun diğer üyelerinden olan *SOS4*'ün ise tuz stresi altında Na^+ ve K^+ dengesinin sağlanması ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Mahajan vd., 2008). Plazma membranının dış yüzeyinde yer alan *SOS5* geni, hücre yüzeyi adhezyon proteinini kodlar ve normal hücre genişlemesini kontrol eder. Nitekim bu genin mutasyonu ile elde edilen *sos5* mutantının, tuza aşırı hassas olduğu ve tuz şartları altında hücre duvarı bütünlüğünü yitirdiği, anormal hücre genişlemesi gösterdiği kaydedilmiştir (Shi vd., 2003). Bununla birlikte, bu proteinin SOS sinyalizasyonundaki işlevi, stres toleransında gen ekspresyonuna nasıl etki ettiği ve stresle uyarılan hormonlarla olan ilişkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bunlara ek olarak, Zhu vd., (2010) yapmış oldukları çalışmada *Arabidopsis*'te bir selüloz sentez benzeri proteinini kodlayan ve bitkilerin normal büyümesi ve gelişimi için gerekli olan *SOS6* geninin varlığından söz etmişler ve bu genin mutasyonu sonucu elde edilen *sos6-1* mutantının osmotik stres şartları altında aşırı ROS birikimine bağlı olarak hassasiyet gösterdiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4. Tuz stresine adaptasyonda SOS sinyalizasyon yolu ile iyon dengesinin düzenlenmesi (Türkan ve Demiral, 2009'dan uyarlanarak)

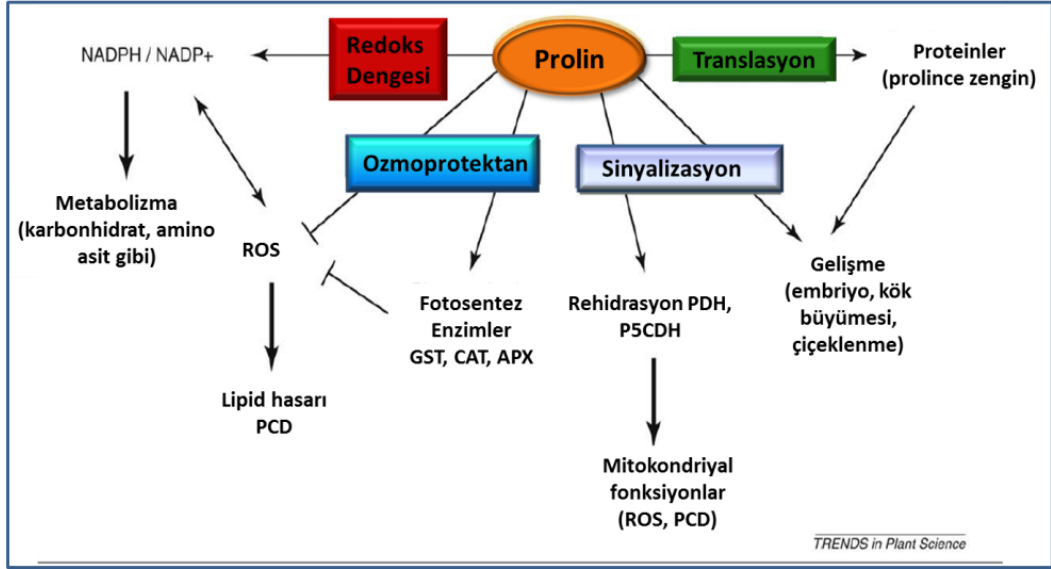
Tuz stresi sırasında sodyum, potasyum ve kalsiyum taşınımını yönlendiren, zardaki taşıma proteinleri. SOS1: Plazma zarındaki Na^+/H^+ , karşılıklı olarak taşıyıcı (antiporter); SOS3-SOS2: protein kompleksi tuz stresinin Ca^{2+} 'yi uyarılmasıyla aktive olur ve SOS1'in fosforillenmesini, aynı zamanda bazı genlerin ekspresyonunu düzenler, ACA: plazma/tonoplast zarı Ca^{2+} -ATPazı; KUP1/TRH1: ilgisi yüksek olan K^+/H^+ birlikte taşıyıcısı (kotransporter), AtHKT1: hücreye sodyum girişini sağlayan taşıyıcı, AKT1: K^+ giriş kanalı, NSCC: seçici olmayan katyon kanalı, CAX1-2: $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiportu, AtNHX1,2,5: hücre içi zar Na^+/H^+ antiporturudur, SOS4: bir pridoksal kinazı kodlar, PLP (Pridoksal-5-fosfat): iyon kanallarını ve taşıyıcılarının regülasyonuyla, Na^+ ve K^+ dengesine katkıda bulunur, SOS5: hücre duvarı sağlamlılığı ve hücre genişlemesinin devamlılığını kontrol eder. (siyah kesik çizgili oklar, SOS3 den bağımsız, SOS2 bağımlı yolları göstermektedir, PM: Plazma Membranı).

1.4.2. Ozmolitlerin (Uyumlu Çözünenler) Biyosentezi

Stres şartları altında bitkiler, osmotik dengenin sağlanması ve hücrel yapıların korunması için, yaygın olarak prolin, glisin betain ve şeker alkoller gibi ozmolitler biriktirirler (Borsani vd., 2003; Ashraf M, 2007; Yazıcı vd., 2007). Halofit bitkilerde tuz stresine karşı tolerans sağlayan şekerler (fruktoz, sukroz ve glukoz), şeker alkoller (mannitol, gliserol, metillenmiş inositol), kompleks şekerler (trihaloz, rafinoz ve fruktan), kuaterner amino asit yan ürünleri (prolin, glisin-betain, β -alaninbetain,), DMSP (dimetilsulfoniopropinat) ve sulfonyum bileşikleri gibi çeşitli ozmoprotektanlar tanımlanmıştır (Flowers ve Colmer, 2008).

Prolinin esas olarak sitoplazmada ve son yıllarda az da olsa kloroplastlarda sentezlendiği gösterilmiştir (Szekely et al., 2008). Bir ozmolit olan prolin yüksek yapılı bitkilerde glutamat veya ornitinden sentezlenir. *Arabidopsis thaliana*'da glutamat yoluyla prolin biyosentezi, çift işlevli Δ 1-pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) enzimi tarafından denetlenir. P5CS enzimi glutamik asiti fosforile ederek glutamil-5-semialdehit (G5SA)'e dönüştürür. Bu enzimin P5CS1 ve P5CS2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Prolin, G5SA'den pirolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla Δ 1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) enzimi katalizörlüğünde sentezlenir (Delauney ve Verma, 1993). Bu reaksiyonun hızını belirleyen basamak, P5CS enziminin γ -glutamil kinaz aktivitesidir. Prolin katabolizması ise prolin dehidrogenaz (PDH) ile parçalanır (Özfidan, 2010).

Prolin birikiminin, tuz stresinin olumsuz etkilerine karşı bitkilerde osmotik ayarlamaya katkıda bulunduğu, membranların, proteinlerin ve enzimlerin kararlılığını sağladığı ve serbest radikalleri temizlediği kaydedilmiştir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Hoque vd., 2008; Türkan ve Demiral, 2009). Prolin birikimi stres toleransını birçok yolda etkileyebilir (Szabados ve Savoure', 2010, (Şekil 5). Yapılan çalışmalarda birçok bitki çeşidinde strese toleranslı bitkilerde hassas olanlara göre prolin miktarı fazla bulunmuştur (Ashraf, 2007). Ayrıca prolin kuraklıkta lipid peroksidasyonun önlenmesinde de rol oynamaktadır (Molinari vd., 2007).



Şekil 5. Bitkilerde prolinin çok yönlü fonksiyonları (Szabados ve Savoure', 2010).

Xiong vd. (2001), bitkilerdeki prolin birikiminin ABA'ya bağımlı veya ABA'dan bağımsız olabileceğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra, bitkilerde ozmotik strese cevapta ABA birikiminin P5CS gen ekspresyonunu regule ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, ABA'nın tek başına bu geni uyardırmada yeterli olmadığı, kuraklık ve tuz stresi süresince ABA vasıtası ile P5CS gen uyarımında Ca^{+} iyonunun da rol oynadığı belirtilmiştir.

1.4.3. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Geliştirilen Savunma Mekanizmaları

Stresli ortamlar bitkilerde süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikler. Bununla birlikte süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), peroksidaz (POD), gibi enzimatik antioksidan sistem ve askorbat (Asc), glutatyon (GSH), α -tokoferol, fenolik birleşikler ve karotenoidler gibi metabolitler reaktif oksijen türlerinin etkilerine karşı koruma sağlarlar (Mittler, 2004; Chinnusamy vd., 2005; Kadioğlu vd., 2012). Antioksidan enzimler değişen çevresel şartlar altında aktifleşirler ve birçok bitkide stres toleransı ile ilişkilidirler (Kadioğlu ve Terzi, 2007). Antioksidan enzimlerin, fonksiyonları ve lokalize oldukları kısımlar Tablo 2'de özetlenmiştir (Gevhev, 2006).

Bu güne kadar tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır ve tuza toleranslı türlerde,

hassas olanlara oranla enzim aktivitelerinde artış olduğu kaydedilmiştir (Yılmaz vd., 2011).

Tablo 2. ROS ile ilgili en önemli enzimler ve antioksidanlar (Gechev, 2006).

Enzimler/ Antioksidanlar	Fonksiyon	Lokalizasyon
SOD	$O_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonu ile H_2O_2 oluşumunu sağlar.	sit, klo, mit, per
CAT	İndirgeyiciye gereksinim duymadan H_2O_2 'i detoksifiye eder.	mit, per, gli
APX	İndirgeyici olarak askorbat ile H_2O_2 detoksifikasyonu sağlar.	sit, klo, mit, per
MDHAR	İndirgeyici olarak NAD(P)H ile monodehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
DHAR	İndirgeyici olarak GSH ile dehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
GR	İndirgeyici olarak NADPH ile yükseltgenmiş glutatyonu indirger.	sit, klo, mit, per
POX	İndirgeyici olarak çeşitli substratları kullanarak H_2O_2 'i detoksifiye eder; hücre duvarı polimerleri ile etkileşim içindedirler.	hd, sit, mit, vak
GPX	İndirgeyici olarak GSH kullanarak lipitleri hidroperokside eder ve H_2O_2 'i detoksifiye eder.	sit, klo, mit, er
GST	Lipit hidroksiperoksitleri detoksifiye eder ve DHAR aktivitesi sergiler.	apo, cit, klo, mit, nuk
Askorbat	APX'in substratıdır, H_2O_2 'i detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
Glutatyon	Glutatyon transferazlar ve glutatyon redüktazların substratıdır. H_2O_2 ve diğer hidroksiperoksitleri detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
α -tokoferol	Membran lipitlerini peroksidasyondan korur, lipit peroksitlerini detoksifiye eder ve 1O_2 giderir.	membranlar
Karotenoidler	1O_2 giderir, ABA'nın haberci molekülüdür, fotosentezde etkindir.	klo, kro, ami
Flavonoidler	Direk olarak H_2O_2 'i temizler.	vak

hd: hücre duvarı, apo: apoplast, sit: sitosol, klo: kloroplast, kro: kromoplast, ami: amiloplast, mit: mitokondri, er: endoplazmik retikulum, vak: vakuol, per: peroksizom, gli: glioksizom, nuk: nukleus

1.4.3.1. Antioksidan Enzimler

1.4.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich, 1986; Elstner, 1987). SOD, ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından izole edilmiş ve başlangıçta bir bakır depo proteini olduğu düşünülmüştür. Bu enzimin katalitik fonksiyonu keşfedilene kadar eritrokuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz gibi isimlerle

adlandırılmıştır. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikalının oluşum riskini azaltır. SOD, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini ($O_2^{\bullet-}$) diğerine (H_2O_2) dönüştürür (Mehlhorn vd., 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir.



SOD bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler vd., 1992). SOD aktivitesinin su stresine cevabı türlere ve kuraklık süresine bağlı olarak değiştiği (Fu ve Huang, 2001) ve bu değişimlerin oksidatif strese dirençlilikle bağlantısı olduğu rapor edilmiştir (Foyer vd., 1994). Yapılan çalışmalarda kuraklık stresi esnasında bazı bitki türlerinde SOD aktivitesinin arttığı, ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve yonca (*Trifolium sp.*) bitkilerinde ise belirgin bir değişimin olmadığı rapor edilmiştir (Irigoyen vd., 1992; Smirnoff, 1993). Bazı çalışmalarda ise SOD aktivitesinde tek başına meydana gelen artışların reaktif oksijen türlerine karşı yeterli koruma sağlayamayacağı ve oksidatif stresi tek başına engelleyemeyeceği ileri sürülmüştür (Pitcher vd., 1991). Diğer taraftan, SOD'un hücre membran proteinleriyle ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Ogawa vd., 1997). Ozona maruz bırakılan buğday bitkisinde yapılan bir çalışmada SOD aktivitesindeki artışın hücre çeperinin yapısında değişime neden olabileceği rapor edilmiştir (Padu vd., 1999).

1.4.3.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), tabiatta çok yaygın dağılım göstermektedir. Bu enzim, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer ve Grabl, 1983). Katalaz yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen tetramerik demir porfirin içeren yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. Aynı zamanda katalaz, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren

indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Katalazın görev aldığı genel bir reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Feierabend vd., 1992; Streb vd., 1993). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Fridovich, 1986). Ayrıca H_2O_2 'ye olan zayıf affinitesi bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer vd., 1994). Katalazın büyük bir kısmı peroksizomlarda çok az miktarda da mitokondri matriksinde bulunur. Katalazın bitki dokusunda H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Patykowski ve Urbanek, 2003). Katalazın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde H_2O_2 'in ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999).

1.4.3.1.3. Askorbat Peroksidaz (APX)

Hidrojen peroksiti parçalarken substrat olarak askorbatı kullanan enzimler askorbat peroksidazlar (APX, EC 1.11.1.11) olarak adlandırılırlar. APX'lerin bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarındaki H_2O_2 'nin temizlenmesinde etkili oldukları düşünülmektedir (Dalton vd., 1987; Asada, 1992). Bu enzimin kloroplastlarda tilakoid membrana bağlı ve stromada bulunan formları vardır (Chen ve Asada, 1989; Miyake ve Asada, 1992). Bu formlar elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake ve Asada, 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir. Su stresine maruz kalan duyarlı buğday çeşitlerinde askorbat peroksidaz aktivitesinin uyarıldığı, toleranslı buğdayda ise sadece yüksek stres yoğunluğunda arttığı kaydedilmiştir (Sgherri vd., 2000). Benzer şekilde orta şiddetli su stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinde artan askorbat peroksidaz aktivitesinin H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda anahtar bir rol oynadığı

kaydedilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H⁺ vericisi olarak askorbata olan yüksek spesifikliklerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano ve Asada, 1987).

1.4.3.1.4. Peroksidaz (POD)

Peroksidazlar (POD, EC 1.11.1.17) bitkilerde yaygın olarak bulunan ve hem gruba ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. POD'lar çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahiptirler. Bitki hücrelerinde POD esas olarak, hücre çeperinde, vakuollerde, membrana bağlı ribozomlarda ve bitki dokularının ekstrasellular alanlarında bulunurlar. Hücre çeperine bağlı olan peroksidazlar çözünebilir, iyonik bağlı ve kovalent bağlı formlarda mevcuttur. Peroksidazların birçok fizyolojik olayla ilişkili olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bitki hücrelerindeki çeperin uzama kabiliyeti, lignin biyosentezi ve oksin katabolizmasıyla ilişkisinin olmasının yanı sıra en önemli fonksiyonu H₂O₂'nin parçalanmasını katalizleyerek antioksidan savunma sistemine katkı sağlamalarıdır.



Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Gaspar vd., 1991). Örneğin *Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada, kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Peroksidaz aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. Peroksidazlar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı kullanarak H₂O₂'yi temizlerler ve H vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. Guaiakol peroksidazlar guaiakole olan yüksek spesifikliklerine rağmen başka birçok substratı elektron vericisi olarak kullanabilirler. Kuraklık stresi koşullarında mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada guaiakol peroksidaz aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Zhang vd., 1995). Ayrıca, pamuk bitkisinde guaiakol peroksidaz enziminin tuz stresi altında arttığı bildirilmiştir (Parida ve Das, 2005). Benzer şekilde orta şiddette kuraklık stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinde guaiakol peroksidaz aktivitesinin kontrole göre

arttığı, fakat ağır kuraklık koşullarında aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Sharma ve Dubey, 2005).

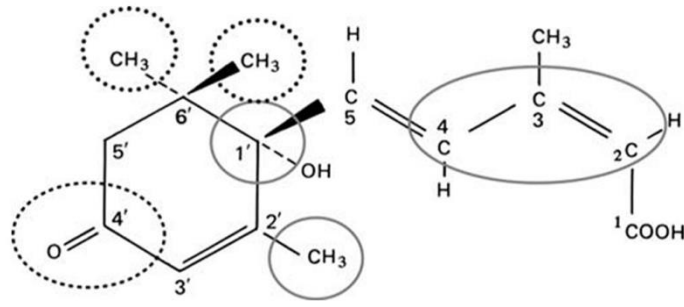
1.5. Tuz Stresinin Absisik Asit ile İlişkisi

Bitki gelişimi ve üretkenliği pek çok abiyotik stres etmenleri tarafından olumsuz etkilenmektedir ve bitkiler bu olumsuz etkilerle başa çıkabilmek için çok geniş çapta adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bir fitohormon olan absisik asit (ABA) de kuraklık ve tuz stresine cevapta hızlı bir şekilde üretilip; stres cevaplarının regüle edilmesinde ve bir seri sinyalizasyon şalesinin uyarılmasında kritik rol üstlenmektedir (Osakabe, 2013). Absisik asit, bitkilerde tohum dormansisi, çimlenmesi, olgunlaşması, çiçeklenme, senesens ve vejetatif gelişme gibi çeşitli biyolojik süreçlerde, ayrıca stomaların kapanması ve çeşitli genlerin ekspresyonu gibi abiyotik stres cevaplarında rol oynayan başlıca bitkisel hormondur (Kuhn ve Schroeder, 2003; Umezawa vd., 2011; Finkelstein, 2013). Ayrıca ABA, brassinosteroidler, etilen, giberellin, sitokinin ve oksin gibi diğer bitkisel hormonlarla etkileşerek bitki gelişiminin diğer pek çok özelliğini etkilemektedir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Bugüne kadar ABA ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve ABA'nın kuraklık (Iuchi et al., 2001) soğuk (Kumar vd., 2008), donma (Zhou vd., 2006), ağır metal (Hsu vd., 2006) ve tuz stresi (Etehadnia vd., 2008; Özfıdan vd., 2013) gibi farklı abiyotik streslere karşı koruyuculuk özelliği olduğu rapor edilmiştir. Bu bağlamda, ABA ile stresin algılanması ve hücrel cevap oluşumu arasındaki ilişki, ABA'ya duyarsız ve biyosentetik mutantların kullanımı ile doğrulanmıştır (Bartels ve Sunkar, 2005).

1.5.1. Absisik Asitin Yapısı

ABA'nın *cis* ve *trans* olmak üzere iki tane geometrik izomeri vardır. ABA'nın 2 nolu karbonundaki karboksil grubunun yerleşimi ABA'nın *cis* ya da *trans* izomerlerini belirler. Doğal olarak oluşan ABA, *cis* formundadır. C15 atomu içeren ABA, izoprenoidler (terpenoidler) olarak bilinen metabolitlerin bir sınıfına sahiptir (Özfıdan, 2010). ABA'nın yapısı Şekil 6'da gösterilmiştir.



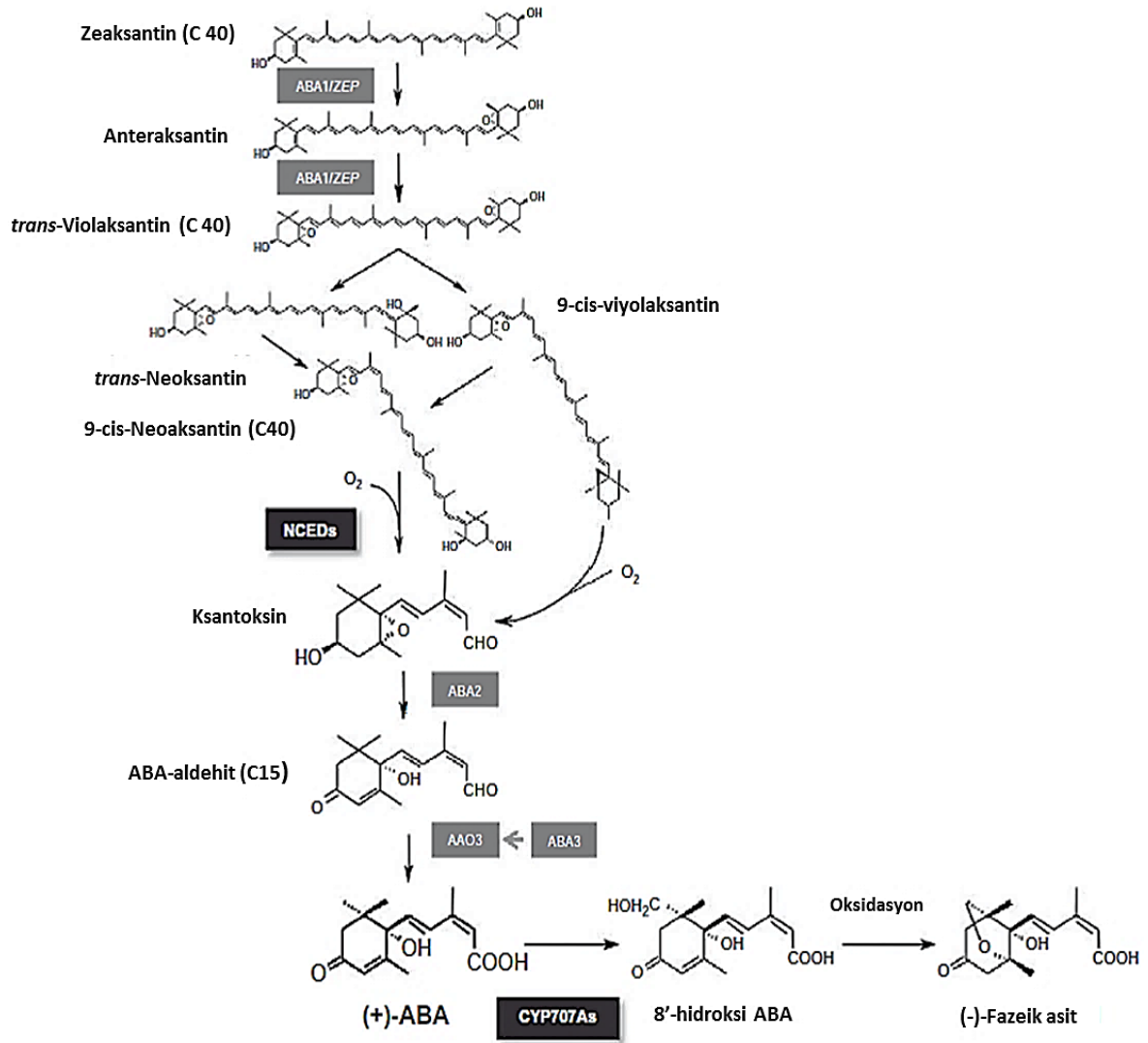
Şekil 6. ABA'nın yapısı (Finkelstein, 2013)

1.5.1.1. ABA Biyosentezi ve Katabolizması

ABA'nın yaprak, kök, gövde, tohum ve meyve dokularında mevalonik asitten sentezlendiği belirtilmiştir. Bu dokularda ABA'nın büyük bir çoğunluğu plastidlerde sentezlenmektedir (Kadioğlu, 2011). Yüksek bitkilerde, ABA biyosentezi C40 formundaki karotenoid yapısının bir seri enzimatik basamak sayesinde ayrılması ile başlatılır (Soto vd., 2013). Violaksantin sentezi, zeaksantin epoksidaz (ZEP) enzimi ile katalizlenir (Chernys ve Zeevaart, 2000). Bu enzimin *Arabidopsis*'te ABA1 lokusu tarafından kodlandığı bulunmuştur. Violaksantin bir C40 bileşiği olan 9'-cis-neoksantine dönüştürülerek, daha sonra C15 bileşiği olan ksantoksalı oluşturmak için ortasından ikiye ayrılır. Ayrılma 9-cis epoksikarotenoid dioksigenaz (NCED) tarafından katalizlenir (Taiz ve Zeiger, 2008). Ksantoksinin absisik asit aldehite dönüşümü ise, kısa zincirli bir dehidrogenaz/redüktaz benzeri enzim olan (SDR) tarafından katalizlenir ve *Arabidopsis*'te ABA2 lokusu tarafından kontrol edilmektedir. Absisik aldehit ABA'yı oluşturur ve bu son basamak kofaktör olarak molibdene ihtiyaç duyan aldehit oksidaz (AAO) tarafından katalizlenmektedir. *aba3* mutantları da AAO yokluğunda ABA sentezleyemez (Daszkowska-Golec ve Szarejko, 2013; Finkelstein, 2013).

ABA sentezine ek olarak, katabolizması da ABA düzeyinin regülasyonu için önemli bir mekanizmadır. *Arabidopsis* başlıca iki katabolizma yolu kullanmaktadır: 1) ABA'nın P-450 tip monoksigenaz ile hidroksilasyonu ile faseik asitin izomerizasyonu (8'-OH-ABA'nın kararsız formu), 2) ABA'nın bir monosakkaritle kovalent bağ kurarak, serbest yapıdan ABA-β-D-glukozil esterine (ABA-GE) dönüşerek inaktivasyonudur. Serbest ABA stoplazmada yerleşmişken, ABA+GE ise vokuollerde birikmektedir (Schroeder ve Nambara, 2006).

Arabidopsis'te ABA katabolizmasında görev alan ABA-8'-hidroksilazı kodlayan genler At *CYP707A 1, 2, 3 ve 4* (Cytochrome P450, Family 707, Subfamily A, Polypeptide 1, 2, 3, 4) olarak tanımlanmıştır (Daszkowska-Golec ve Szarejko, 2013). Bu genler, Arabidopsis bitkisi dışında çeltik (Saika vd., 2007), arpa (Millar vd., 2006), buğday (Ji vd., 2011) ve soya fasulyesinde de (Zheng vd., 2012) belirlenmiştir. ABA'nın biyosentez ve katabolizma yolları Şekil 7'de özetlenmiştir.



Şekil 7. ABA Biyosentez Yolu (Umezawa vd., 2011).

1.5.1.2. ABA ve Sinyal İletimi

Absisik asit, bitkilerde emriyogenez, tohum dormansisi, kök ve gövde büyümesi ve transpirasyon gibi birçok gelişimsel süreçlere katılan ve hem biyotik hem de soğuk, yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuz stresleri gibi abiyotik streslere adaptasyonda rol oynayan önemli bir bitkisel hormondur (Huand ve Wu, 2006; Zhang vd., 2010; Boneha vd., 2012). Farklı stres şartları bitkilerde ABA düzeyinin artmasına neden olur veya dışarılan ABA uygulamasının bitkilerde stres ilişkili birçok genin ekspresyonunu uyararak strese karşı toleransı artırdığı belirtilmiştir (Xiong vd., 2002a; Fediuc, 2005; Zhu, 2010).

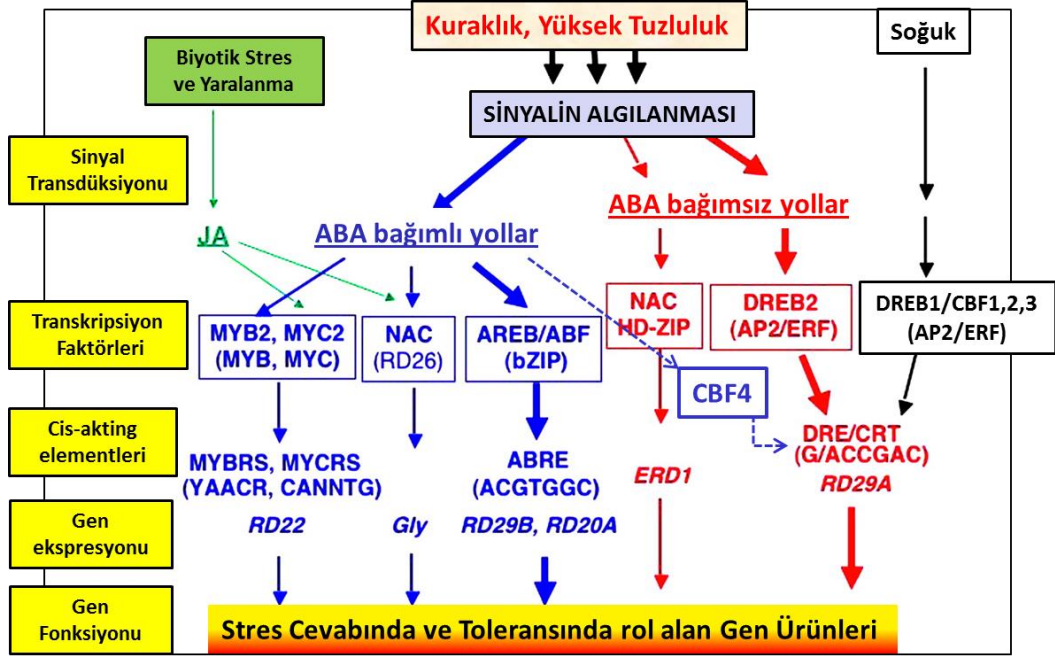
ABA sentezi yapamayan mutantların belirlenmesi ve karakterizasyonu ile ABA'nın fonksiyonu daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır. Bu mutantlar erken çimlenme, solmaya hassasiyet, stomal geçirgenlikte artış, yüksek sukroz veya tuz konsantrasyonu içeren ortamda çimlenme ve büyüme kabiliyeti gibi fenotiplerle belirlenmiştir (Keskin, 2012). *Arabidopsis*'ten ABA-sinyal iletim yolları ile ilgili birçok gen izole edilmiştir. Bunlar ser/thr protein fosfatazlar *ABI1* (ABA-insensitive 1: AT4G26080) , *ABI2* (AT5G57050) ve sırasıyla B3-, *Apetala2*-(AP2) ve esas lösün fermuarı- (bZIP) alanı ailesini kodlayan *ABI3* (AT3G24650) - *ABI4* (AT2G40220) - *ABI5* (AT2G36270) transkripsiyon faktörleridir (Korneef vd., 1984; Finkelstein, 2013). ABA reseptörü olarak 3 önemli proteinin olduğu belirlenmiştir. Bunlar PYR/PYL/RCAR (sitozolde), CHLH (plastid zarında) ve GPCR tip G proteinleri (hücre zarında) dir (Kadıoğlu, 2011). ABA sinyal yolunun merkezi olarak adlandırılan, PYR1/PYL (Pyrabactin Resistant 1/PYR1 Like) proteinleri *ABI1* gibi tip 2C protein fosfatazlara (PP2C) bağlanmak için ABA tarafından indüklenirler. Böylece, inhibe edilen SNF1 ilişkili protein kinazlar (SnRK2s) serbest bırakılır. Baskılayıcı durumun ortadan kalkması ile SnRK2, sırasıyla *ABI4* ve *ABI5* gibi transkripsiyon faktörlerini ve membran kanallarının dahil olduğu birçok substratı fosforilleyerek aktive eder (Hubbard 2010).

En iyi çalışılmış ABA sinyal iletim yollarından biri, ABA'ya cevap olarak stomaların kapanmasıdır (Allen vd., 2001). ABA uygulamasının, arkadaş (guard) hücrelerdeki sitozolik Ca^{+2} iyon seviyelerinde artmaya neden olduğu bilinmektedir. Sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonundaki dalgalanmalar, stomaların kapanması için gereklidir (Allen vd., 2001). Birçok fitohormon sinyal iletim işlemlerinde hücre içi mesajcı olarak Ca^{+2} işlev görmektedir. Ca^{+2} sinyali ABA'yı içeren yanıtlarda siklik-ADP-riboz (cADPR), inozitol 1,

4, 5 trifosfat (IP₃), inozitol hekzafosfat (InsP₆) veya H₂O₂ gibi ikinci mesajcılar tarafından uyarılır (Schroedaer vd., 2001).

Stres süresince ABA biyosentezi ilk olarak köklerde artar ve sonra ksilem vasıtasıyla kimyasal bir sinyal oluşturarak stomaların kapanmasını sağlamak üzere gövdeye taşınır (Gallé vd., 2013). ABA'nın strese karşı stoma kapanması, ozmolit birikimi, büyümenin inhibisyonu ve metabolizmanın değiştirilmesi gibi fizyolojik adaptasyonlarının yanı sıra, moleküler düzeyde gen ekspresyonunda birçok değişiklikler yaptığı ve LEA, HSP gibi proteinlerin ve reaktif oksijen temizleyicilerin sentezini artırdığı bildirilmiştir (Huang ve Wu, 2006; Sripinyowanich vd., 2013). Bununla birlikte, ABA yoksun mutantlarla yürütülen deneyler sonucu, stresle uyarılabilen genlerin bazılarının ABA'ya bağımlı olmasına rağmen bazılarının ise ABA'dan bağımsız olarak kontrol edildiği ortaya çıkmıştır (Zhu, 2002).

Kurak ve tuzluluk stresi ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollardaki, ABF (ABRE binding factor)/AREB (ABA responsive element binding protein), MYC (myelocytomatosis)/MYB (myeloblastosis), DREB2 (drought responsive element binding) ve NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transkripsiyon faktörlerine ait gen ifadelerini aktive eder. Bu önemli transkripsiyon faktörleri farklı streslere cevap olarak farklı transkript düzenlenmesi gösterir ve aşırı ifadeleri bitkilerde stresle ilişkili çok sayıda genin doğrudan veya dolaylı olarak devreye girmesi ile sonuçlanır (Agarwal ve Jha, 2010). AREB/ABF ve MYC/MYB transkripsiyon faktörleri ve bZIP (basic leucine zipper factor), ABRE, MYCR, MYBR transkripsiyon faktörleri iki farklı mekanizma ile ABA'ya bağlı olarak strese cevap verirken, DREB proteinleri ise ABA'ya bağlı olmayan durumlarda DRE aracılığı ile strese cevap yolağını aktive ederler (Şekil 8).



Şekil 8. Stres koşulları altında ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız yollarda gen ifadesinin düzenlenmesi (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

1.6. Hücre Çeperi ve *SOS5* Geni

Bitki hücre çeperleri çoğunlukla yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritler, oldukça glikozillenmiş proteinler ve ligninden oluşan dinamik yapılardır. Bu kompleks glikozillenmiş proteinler plazma membranlarının ve hücre çeperinin kararlılığı için çok önemlidir (Somerville vd., 2004). Bitki hücre çeperi; bitkilerdeki büyüme, gelişme, yaşamın sürdürülmesi ve üreme olaylarının birçok aşamasında önemli görevlere sahiptir. Hücre çeperinin görevlerini özetlersek: hücreye mekanik dayanıklılık kazandırır, hücreleri birbirine yapıştırır, hücrenin şeklini belirleyen ve yüksek turgor basınçlarının oluşmasını sağlayan bir hücresel dış iskelet görevi görür. Bunların dışında en önemli olarak, hücre çeperi dışardan gelen etkilere (biotik ve abiyotik) karşı yapısal bir engel görevi görür (Taiz ve Zeiger, 2008). Bu bağlamda hücre çeperinin, hücre büyümesi ve gelişmesindeki işlevinin bilinmesi; bitkinin hayatta kalması, hücre bölünmesi, farklılaşması ve çevredeki biyotik ve abiyotik değişimlere verdiği cevapların anlaşılmasında çok önemlidir. Hücre duvarı performansı ve sağlamlığının kontrolünde yer alan moleküler bileşenlerin tanımlanması, genetik ve fizyolojik yaklaşımların birlikte kullanılması ile anlaşılabilir (Blaukopf vd., 2011). Ayrıca, yüksek bitkilerde hücre çeperi bütünlüğünün korunması, düzenleyici genlerin bilinmesi ve stres ilişkili hormon metabolizmasının iyi anlaşılması,

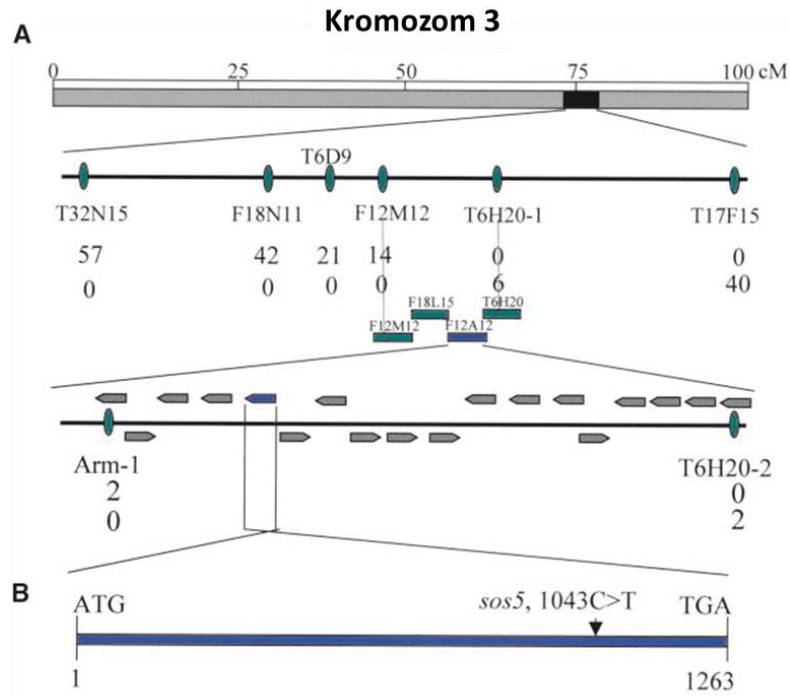
tarımsal biyoteknoloji alanında zor şartlara adapte olabilen bitki üretimi konusunda yeni bir yaklaşım getirebilir. Diğer yandan, elde edilen bilgilerin endüstride hücre çeperi ile ilişkili biyoyakıt üretiminde, yiyecek, kağıt ve pamuk liflerinin kalitesinin artırılması açısından da önemlidir (Doblin vd., 2014; Cabello vd., 2014).

Bitki hücre duvarları yüksek miktarda hidroksiprolince zengin glikoproteinleri (HRGPs) içerirler. Bu glikoproteinler, ekstensinler (EXTs) (Velasquez vd., 2011), prolince zengin proteinler (PRPs) (Kieliszewski vd., 1994) ve arabinogalaktan proteinleri (AGPs) (Showalter vd., 2010) kapsamaktadır.

Plazma zarında hücre duvarı adhezyonu için birçok gen ailesi bulunmaktadır. Bunlara: arabinogalaktan proteinler, fasiklin benzeri arabinogalaktan proteinler (FLAs), hücre duvarı ilişkili kinazlar (WAKs), lektin reseptör kinazlar (LTPs) ve birçok zara bağlanmış pek çok enzim (selüloz sentaz gibi) dâhil edilebilir (McFarlane, 2008).

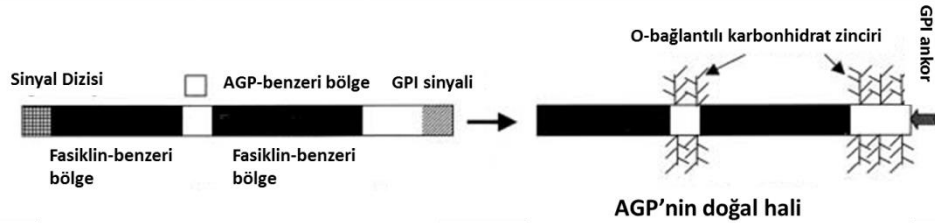
AGP'ler bitkilerin plazma membranında, hücre duvarında ve birçok ekstraselüler salgılarda belirlenmiş yüksek derecede glikozillenmiş karmaşık glikoproteinlerdir. Biyolojik pek çok işlevlerinin yanında, somatik embriyogenezin artışına ve engellenmesine dahil olurlar; ayrıca ksilogenezis, yaralanmaya cevap, hormon cevapları ile kök tüyü ve polen tüpünün gelişimi gibi pek çok olayda rol almaktadırlar (Kreuger ve van Hoist, 1996; Majewska-Sawka ve Nothnagel, 2000; Seifert ve Roberts, 2007; Johnson vd., 2011). AGP lerin alt grubunda, hücre yüzeyinde ve hücre duvarında yerleşmiş FLAs bulunur (Johnson vd., 2003). Hücre duvarı proteinleri ile ilgili günümüze kadar pekçok çalışma yapılmasına rağmen, AGP lerin hücre duvarı bütünlüğünü sağlama veya hücre sel algılama ve sinyal taşınım mekanizmasında nasıl rol aldıkları hala tartışmalıdır.

Shi vd., (2003), pozisyonel klanlama ile *SOS5*'in Arabidopsis'te 3. kromozomun alt kolunda yer alan intronsuz bir gen olduğunu göstermişlerdir (Şekil 9). Ayrıca *SOS5* proteinin 4 tane önemli yapı içerdiği belirtilmiştir, bunlar: 1. tek N terminal sinyal dizileri (plazma zarı yerleşimi için), 2. çift Arabinogalaktan protein benzeri bölge, 3. çift fasiklin benzeri bölge ve 4. tek C terminal GPI lipid anchor sinyal dizisidir (Şekil 10).



Şekil 9. *SOS5* Geninin Pozisyonel Klonlanması (Shi vd., 2003).

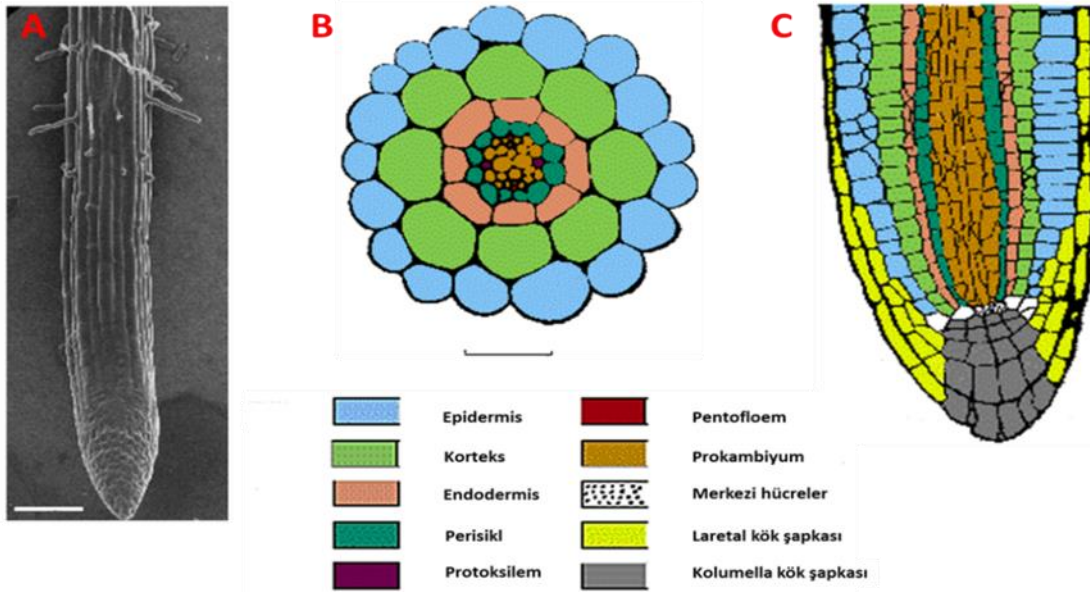
(A) *SOS5* kromozom 3'ün alt kolunda yer almaktadır , (B) *SOS5* intronsuz bir genidir.



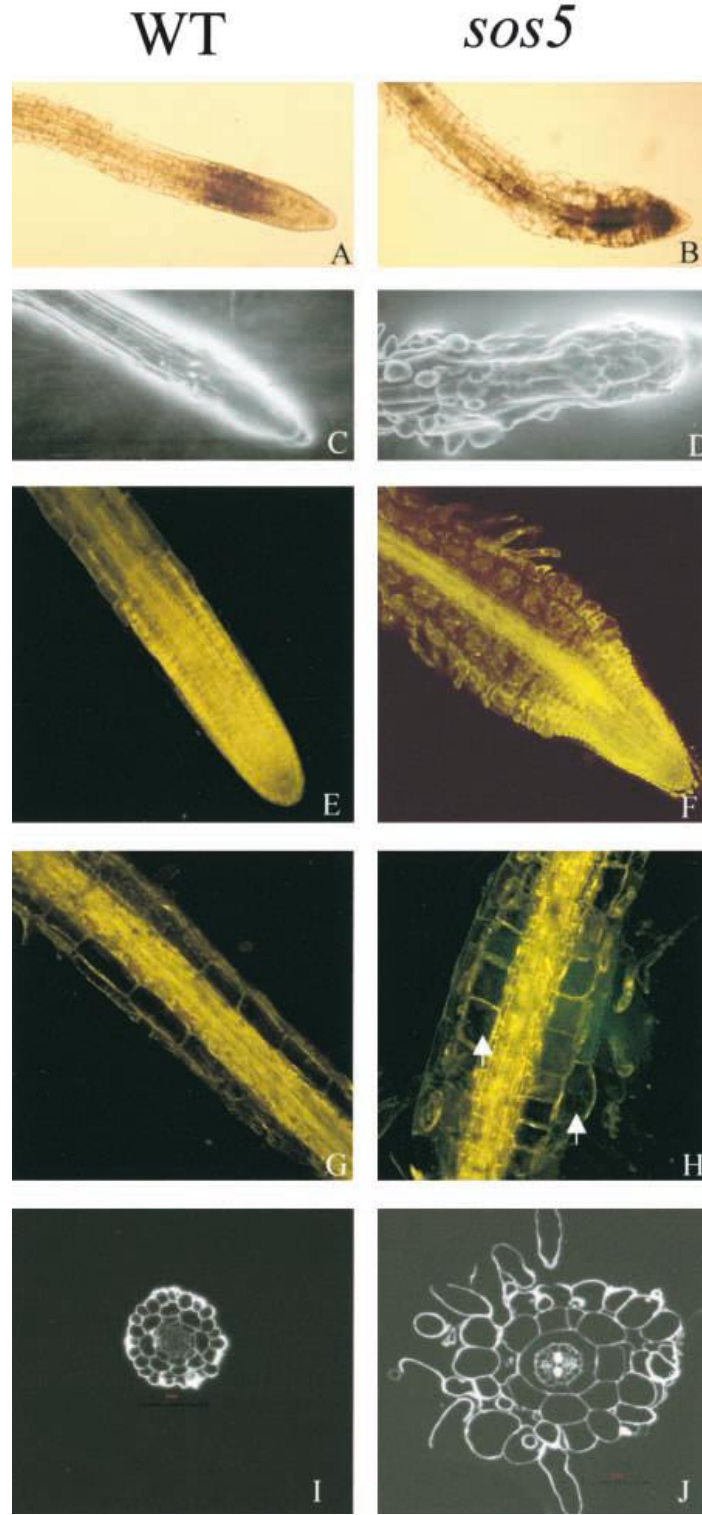
Şekil 10. *SOS5* geninin yapısı (Shi vd., 2003).

Bitkiler, yüksek tuzlulukla başa çıkmak için tuz stresi ilişkili yolların aktifleştirilmesi veya tuzun hücre içinde bölmelendirilmesi gibi farklı stratejiler kullanmaktadır. Bu bağlamda, kökün fenotipik esnekliğine (elastisitesi) bağlı olarak, bitkiler kök sistemlerinin yapılarını (RSA: Root System Architecture) ayarlayabilir ve kök büyüme yönlerini yüksek tuz konsantrasyonlarından sakınacak şekilde oluşturabilirler. Osmotik veya iyonik stresin algılanmasıyla, köklerde ABA düzeyi artar ve bu durum hem lateral kök oluşumunu hem de agravitopik büyümeyi uyarır. Bu da kök yapısında (RSA) değişime yol açar (Ampudia-Galvan ve Testerink, 2011). Normal şartlarda *Arabidopsis* bitki kökündeki dokuların

dizilimi Şekil 11’de gösterilmiştir. Bitkinin strese tolerans durumuna göre kök hücrelerinin görünümü değişebilmektedir. Dokulardaki bozulmalar yeterince onarılmazsa, bitki ölebilir. Örneğin Shi vd. (2003) Şekil 12’de tuza aşırı hassas *sos5* mutant bitki kökündeki değişimleri, yabani tip bitki ile karşılaştırmalı olarak göstermişlerdir. A, C, E, G ve I yabani tip (*Col-gl*)’in kök fenotipini gösterirken; B, D, F, H ve J *sos5* mutant bitki kökünün fenotipini göstermektedir. A ve B bitkilerin MS-0 besi ortamından 100 mM NaCl besi ortamına aktarılmasından 3 gün sonra ışık mikroskobu ile çekilmiş görüntülerdir. C ve D taramalı electron mikroskobu ile tuz ortamına 5 gün boyunca maruz kalmış bitkiler, E, F, G ve H ise 3 hafta boyunca MS-0 ortamında bekletilen bitkilerin kök ucunun konfokal mikroskop ile görüntülenmesinden elde edilmiştir. Son olarak I ve J görüntüleri 3 hafta MS-0 ‘da bekletilen köklerden alınan enine kesitlerden elde edilmiştir (Shi vd., 2003). Görüldüğü gibi, tuz stresine cevapta, *sos5 (fla4)* mutant bitkilerinin kök uçları şişkinleşmiş ve kök uzunlukları kısalmıştır. Bunun sebebi *sos5 (fla4)* mutantlarında anormal hücre genişlemesi, hücre çeperinde incelme ve orta lamelin azalması olarak gösterilmiştir. Ayrıca, izole dilen *SOS5* geninin AGP benzeri ve fasiklin benzeri bölgelerini (*FLA4*) kullanarak, normal hücre gelişimi için gerekli olan hücre yüzeyi adhezyon proteinini kodladığını ve bu nedenle tuz stresi altında normal hücre büyümesi ve gelişmesi için çok önemli olduğu rapor edilmiştir (Shi vd., 2003).



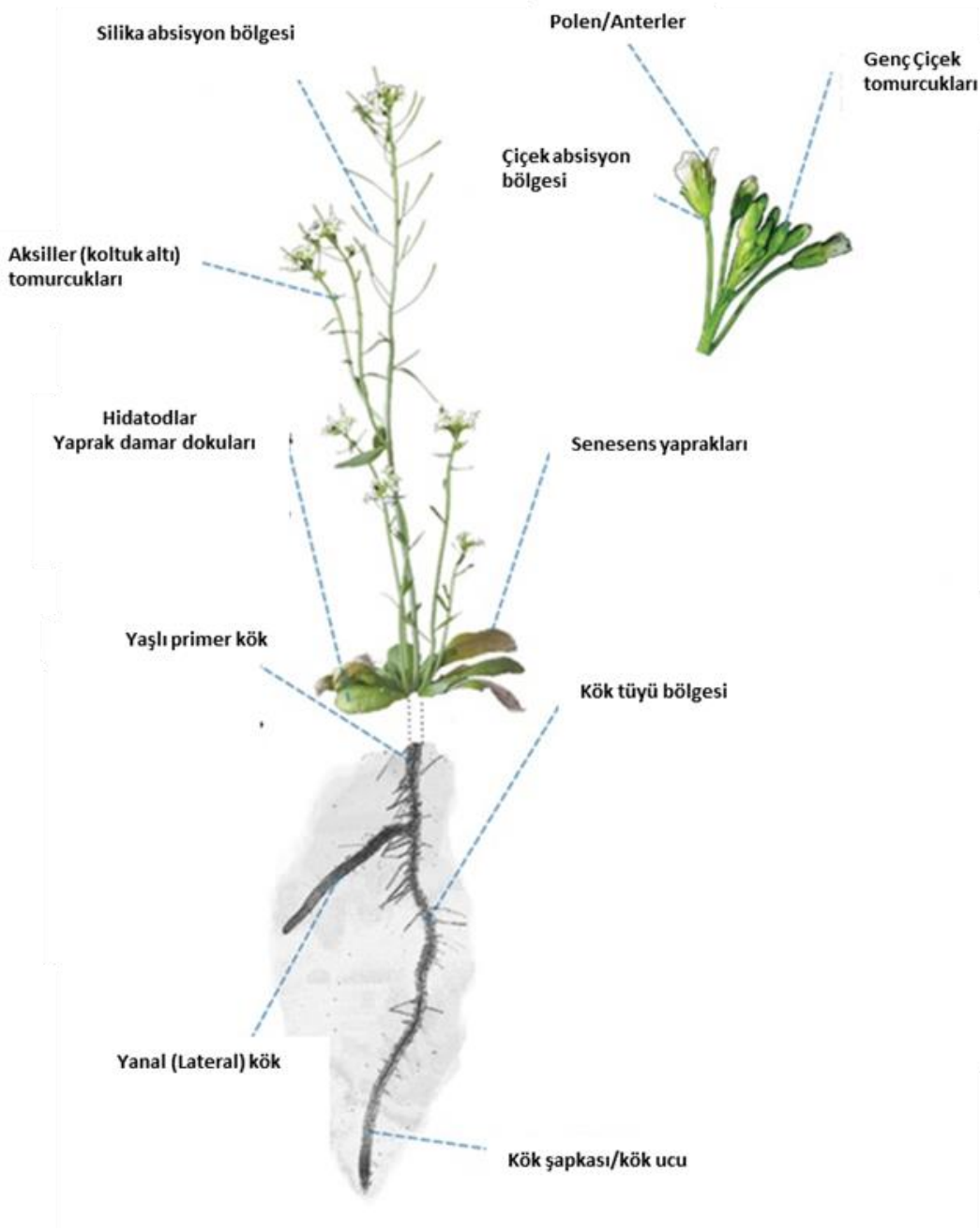
Şekil 11. Arabidopsis kökünde dokuların dizilimi (Dolan vd., 1993). Kökün dıştan görünümü, (Bar: 100 mm). B) kökün enine kesiti, (Kök ucunun 1 mm ardından alınmış). C) Kök ucunun uzunlamasına görünümü



Şekil 12. Tuz koşulları altındaki *sos5* mutant kök fenotipindeki değişimler (Shi vd., 2003)

1.7. *Arabidopsis thaliana* Bitkisi ve Önemi

Arabidopsis, brokoli, karnabahar, lahana, turp ve kolza ile yakın akraba olan Cruciferae (Brassicaceae) familyasına ait dikotiledon bir bitkidir. Fakat bu bitkilerin aksine, tarımsal önemi olan bir bitki değildir (Pehlivan, 2011). Araştırmamızda kullanılan model organizma olan *Arabidopsis thaliana* ilk kez on altıncı yüzyılda Johannes Thal tarafından tarif edilmiştir. Bu bitkiyi Almanya'da Harz Sıradağları bölgesinde bularak *Pilosella siliquosa* adını vermiştir. O zamandan bu yana bitkinin adı çok kez değişmiştir. Son olarak Carl von Linne'nin verdiği şu anki adı ile kullanılmaktadır (http://tr.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana). *Arabidopsis thaliana* bitkisi son yıllarda genomik araştırmalarda model bir bitki olarak kullanılmaktadır (Carson, 2008). *Arabidopsis thaliana*'yı genetik çalışmalar için özellikle ideal kılan, küçük bir genoma sahip olması, genomik dizilimleri ve kaynaklarının mevcudiyeti, doğal popülasyonları arasında nükleotid varyantları olması (farklı ekotipler), sahip olduğu 5 kromozomun büyük ölçüde genetik ve fiziksel olarak haritalandırılmış olması ve genetik transformasyonunun kolay olması gibi birçok özelliğe sahip olmasıdır (<http://www.nih.gov/science/models/arabidopsis>., DeRose-Wilson, 2010). Bununla beraber, bitki yaklaşık olarak 125 MB'lik bir genoma sahiptir. İyi katılım, kısa hayat döngüsü ve küçük morfolojik yapısı ile çalışmalarda tercih edilmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. *Arabidopsis thaliana* bitkisinin genel görünümü ve kısımları (Nussaume vd., 2011)

Genom haritası tamamlanmış ilk bitki olan *Arabidopsis*, (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) en az 1533 transkripsiyon faktörü içerir. Bu, tüm gen sayısının %5,9' unu ifade eder ve ayrıca bu sayı, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* ve mayadan 2 veya 3 kat daha fazladır (Riechmann ve ark., 2000). Bu faktörlerin bazıları sadece bitki spesifik DNA bağlanma bölgeleri ihtiva ederken, diğer organizmalarda bulunan bazıları da, bitki spesifik bağlanma bölge kombinasyonları içerir (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Gelişen tekniklerle beraber *Arabidopsis*, spesifik genlerin fonksiyonlarını araştırmada kullanılan mutant ya da transgenik bitki oluşturulmasında ve bu bitkilerin fenotipik olarak incelenip, manüplasyonu yapılan genin fonksiyonunu tanımlamada, sağlam bir genetik temel oluşturur (Somerville ve Koornneef, 2002). *Arabidopsis* bitkisi ile yapılan çalışmalar sadece akademik ortamla sınırlı kalmayıp, hem bitki biyoteknolojisinde uygulamalı olarak kullanılmakta hem de endüstride yer bulmaktadır.

Arabidopsis'in moleküler işlevlerinin yaklaşık olarak % 60'ı ifade edilmiştir (Swarbreck et al., 2008). Genetik bilimciler bu eksikliği giderebilmek amacı ile sonunda geniş bir bilgi grubu oluşturdular. AtGenExpress Konsorsiyumu ile *Arabidopsis* için üretilen geniş gen ekspresyon verileri düzenlenmekte (Schmid et al., 2005; Kilian et al., 2007; Oona et al., 2006; Hannah et al., 2005; Taji et al., 2004) ve Bio-Array Resource (Toufighi et al., 2005) ve NASC Arrays (Craigon et al., 2004) gibi veritabanlarında depolanmaktadır.

Özet olarak, *Arabidopsis* bitkisi fonksiyon kaybı veya kazanımı gibi yaklaşımlarla araştırmalarda öncelikli kullanılan moleküler model bir bitki olmayı sürdürecektir. Ayrıca bu çalışmalar, tuz stresine adaptasyonda rol alan bileşenlerin belirlenmesine ve sinyal taşınım yollarının aydınlatılmasına imkan sağlayacaktır (Botella vd., 2005).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Yapılan muameleler

Arabidopsis thaliana ekotipi Col-gl yabancı tip ve *fla4* (*sos5-1*) mutant bitki tohumları Jian-Kang Zhu'den (University of California, Riverside, USA) temin edildi. *cpl1-1*, *cpl3-1* ve *sad1-1* ayrıca *abi4-1* ve *abi5-1* bitki tohumları ise Georg Seifert'in (Universität für Bodenkultur, Wien, Austria) Genetik ve Hücre Biyolojisi Bölümünden sağlandı ve bütün mutant kombinasyonları sekanslanarak doğrulandı (Tablo 3).

Tablo 3. Mutant adlarının kısaltmaları

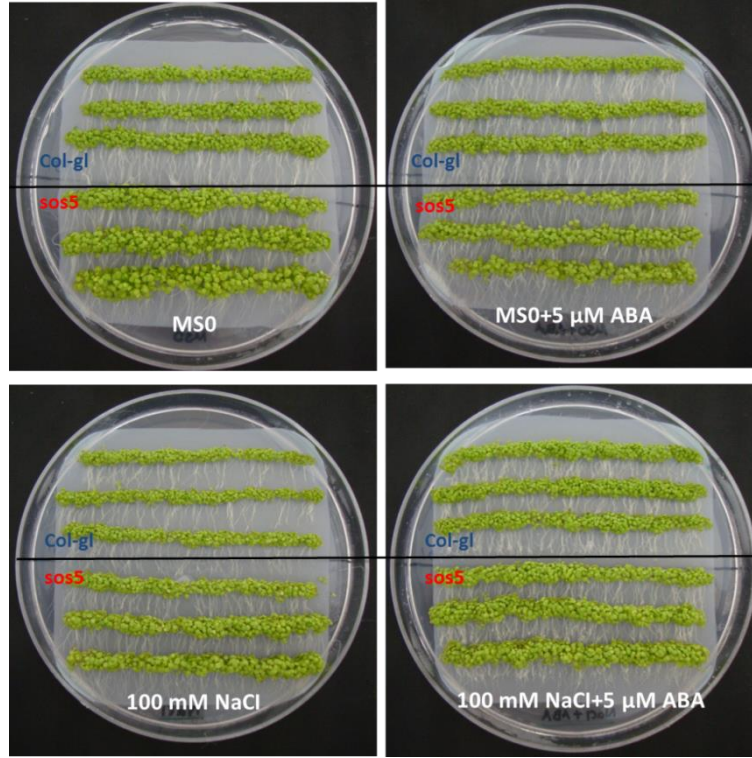
Kısaltılmış biçimi	Adı	Özelliği	Kullanım amacı
Col-gl	<i>Columbia glabrous</i>	<i>sos5</i> mutantının alt yapısı (background) ve yabancı bir ekotip	kontrol
C 24 (N 906)	Columbia	<i>cpl1-1</i> , <i>cpl3-1</i> ve <i>sad1-1</i> mutantlarının alt yapısı	kontrol
<i>sos5</i> (<i>fla4</i>)	Salt overly sensitive 5 mutantı	Tuza aşırı hassas kök fenotipi sergiliyor	<i>SOS5</i> geni ve ABA hormonu arasındaki ilişkiyi aydınlatmak
<i>cpl1-1</i>	C-terminal domain phosphatase loci 1 mutantı	ABA'ya aşırı duyarlı	<i>sos5</i> (<i>fla4</i>) mutantı ile genetik olarak çaprazlama (g.o.ç.) yapmak
<i>cpl3-1</i>	C-terminal domain phosphatase loci 3 mutantı	ABA'ya aşırı duyarlı	<i>sos5</i> (<i>fla4</i>) mutantı ile g. o. ç. yapmak
<i>sad1-1</i>	Supersensitive to ABA and Drought mutantı	ABA'ya ve kuraklığa karşı aşırı duyarlı	<i>sos5</i> (<i>fla4</i>) mutantı ile g. o. ç. yapmak
<i>abi4-1</i>	ABA insensitive-4 mutantı	ABA'ya duyarsız	<i>sos5</i> (<i>fla4</i>) mutantı ile g. o. ç. yapmak
<i>abi5-1</i>	ABA insensitive-5 mutantı	ABA'ya duyarsız	<i>sos5</i> (<i>fla4</i>) mutantı ile g. o. ç. yapmak

Tohumların sterilizasyon işlemi için ependorflara konulan tohumlara 1:9 oranında hipoklorid içeren çamaşır suyu ilave edilerek, 5 dk beklendi ve maksimum ayarda vortekslendi. Ardından, süpernatant kısmı mikropipet yardımı ile atıldı ve tohumlar 3 kez steril saf su ile yıkanarak, ekime hazır hale getirildi.

Tohumların plastik petrilere ekilmesi için vitamin içerikli MS Media (Murashige & Skoog, 1962) (Duchefa Biochemie, NL-Haarlem) besi ortamı hazırlandı. Bunun için %1'lik Sukroz ve MS media saf suda çözülerek, pH: 5,8'e ayarlandı, ardından besi ortamının katılaşmasını sağlamak için % 0,8'lik Fitajel (Sigma-Aldrich, P8169) eklenerek, otoklavlandı. Besi ortamını steril Laminar kabin içersinde petrilere dökmeden önce de 55 °C'ye gelinceye dek soğutuldu. Farklı özellikteki besi ortamları hazırlanırken, kimyasallar MS media besi ortamına katılmadan önce ilave edildi. Diğer taraftan 100 mM'lık NaCl besi ortamı, 1X media ile aynı şekilde hazırlanıp, tuz ilave edilerek otoklavlandı.

Köklerdeki değişimlerin gözlenmesi ve RNA ekstraksiyonu için yapılan deneylerde tohumlar Barky Ultipette (0,5-10µl product code CP-10) ile tek tek ekildi ancak enzim ölçüm deneylerinde ekimler naylon mesh adı verilen bir membran üzerine mikropipetle ekildi (Şekil 14). Ekimin ardından hava girişine imkan sağlayan ancak kontaminasyonu önleyen porlu bantla petrilere etrafı kapatıldı. Ardından petrilere karanlıkta, +4 °C'de 2 gün bekletildi. Bu süreçte tohumların dormansisi ortadan kaldırılarak, çimlenme teşvik edildi. Ardından petrilere dikey şekilde, 24,5 °C'de, % 70 nem oranına sahip Memmert marka büyütme kabini içinde 16h/8h ışık periyodu altında yetiştirildi (Şekil 15). Fenotipik gözlem deneyleri için, 3-4 günlük fideler, steril bir cımbız vasıtası ile dikkatlice test edilecek farklı media ortamlarına en az 3 biyolojik tekerrür olmak kaydı ile 10'ar tane aktarıldı. Gözlemler hem kök uzunluklarının 3 gün boyunca ölçülmesi, hem de mikroskop (Leica EZ4 HD) altında görüntülenerek yapıldı.

Aksi bir durum olmadıkça bütün fotoğraflar, kontrol ve test medialarına aktarıldıktan 48 saat sonraki durumu göstermektedir. Absisisik asit, pyrabactin (4-Bromo-N-[pyridin-2-ylmethyl] naphthalene-1-sulfonamide), fluridone (1-methyl-3-phenyl-5-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)-4-pyridone) ve standard kimyasallar Sigma-Aldrich (Vienna, Austria) tarafından elde edildi. Abscinazole E2B Dr. Yasushi Todoroki tarafından temin edildi. Stok solüsyonlar DMSO içerisinde hazırlandı ancak ABA 0.01 M NaOH içerisinde çözüldü.



Şekil 14. Enzim ölçümleri için yetiştirilmiş bitkilerin görünümü (72 saat)



Şekil 15. Büyütme kabininde dikey biçimde yetiştirilen bitkilerin görünümü

2.1.1. Genetik Çaprazlamalar

Çaprazlamalar parental (anne ve babaya ait) bitkiler arasında gerçekleşebilmektedir. İlk aşamada çaprazlama yapılacak Arabidopsis çiçeklerindeki çakışan kısımlar yani kendine döllenmeyi engellemek için özellikle polenlenmiş silikalar, açılmış çiçekler veya

genç tomurcuklar bir cımbız ve ışıklı çift göz merceği (10X-20X büyütme) vasıtası ile uzaklaştırıldı. Sadece 3 veya 4 tomurcuk (crossing) çaprazlama için kullanıldı. Ardından keskin ve steril bir cımbız vasıtası ile tamamen kapalı olan seçilmiş tomurcuklar açıldı ve anterlerin (erkek organ) hala kapalı olduğundan emin olduktan sonra, tamamı çiçekten uzaklaştırıldı. Bir bant ile bu tomurcuklar işaretlendi ve 2-3 gün büyümeye bırakıldı. Stigmanın büyümesi ile yüzeyi kaygan bir hal alan dişi organ çaprazlama için hazır hale getirildi. Ardından çaprazlamayı düşündüğümüz diğer bitkinin olgun çiçeği cımbızla açıldı ve görünen stamenler (erkek organ) mümkün olduğunca hızlı bir biçimde stigmaya hafifçe dokunduruldu. Bu işlem diğer bütün hazırlanmış stigmalar için tekrar edildi. Ardından işaretli çaprazlanmış çiçekler tohum oluşumu için büyütme odasında büyümeye bırakıldı.

2.1.2. Çimlenme Deneyleri

Çimlenme biyoassayı Clement vd., (2011)'e göre tasarlandı. Taze elde edilmiş tohumlar MS-0 ve 1 μM , 5 μM , 10 μM ve 20 μM ABA içeren besi ortamlarına ekildi. +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün stratifikasyon için bekletildi ve yatay şekilde Memmert marka büyütme kabinine yerleştirildi. Petriler mikroskop altında 5, 7 ve 14. günlerde takip edildi, radikula oluşumları ve özellikle yeşil yaprak oluşumlarına göre çimlenme durumuna karar verildi. Yaklaşık olarak her bir muamele için 50 tohum, 3 biyolojik tekerrür şeklinde ekildi. Deneyler farklı zamanlarda tekrar edilerek, benzer sonuçlara ulaşıldı.

2.2. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyonu Heath ve Packer (1968) tarafından belirlenen metoda göre hesaplandı. Bu metoda göre lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak MDA'yı kabul eden tiyobarbütirik asit testi kullanıldı. 0,25 g yaprak ve 0,1 g kökten alınan bitki örnekleri, % 20 trikloroasetik asit ve % 0,5 tiyobarbütirik asit içeren 10 ml çözeltide homojenize edildi. Homojenat 95 $^{\circ}\text{C}$ de 30 dakika inkübe edildi ve 10 000 g de 10 dakika santrifüjlendi. 532 ve 600 nm de süpernatantın absorbans okundu, 600 nm'deki spesifik olmayan absorbans çıkarıldı. Kırmızı renkli MDA-TBA kompleksinin miktarından lipid peroksidasyon değişimleri hesaplandı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.3. Prolin Tayini

Prolin tayini Bates vd. (1973)'e göre gerçekleştirildi. Taze ağırlıkları alınan (0,1 g) yaprak örnekleri %3'lük sülfosalisilik asit içinde homojenize edildi. Whatman filtre kâğıdından süzülen ekstratın 2 ml si, 2 ml asit ninhidrin ve 2 ml glasiyal asetik asit içeren kapaklı test tüplerinde 1 saat 100 °C'lik su banyosunda tutuldu. Reaksiyon buz banyosunda sonlandırıldı. Reaksiyon ortamına 4 ml toluen ilave edilerek karıştırıldı. Toluene kör olarak kullanıldı ve üst faz 520 nm de ölçüldü. Standart olarak L-prolin kullanıldı. Sonuçlar mg g⁻¹ kuru ağırlık olarak hesaplandı.

2.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini

2.4.1. Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması

Yapraklardan 0,25 g ve köklerden 0,1 gram olarak alınan numuneler sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml ekstraksiyon tamponu (50mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA pH 7,0, % 1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt +4 °C'de 20000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

2.4.2. Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesinin Tayini

Guaiakol peroksidaz aktivitesi, Urbanek vd., (1991)'in yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H₂O₂ ve 50 µl enzim ekstraktı içeren 2 ml'lik reaksiyon karşımının 470 nm'de 1 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi 26,6 mM⁻¹cm⁻¹ ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.4.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi, Aebi (1983)'nin yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H₂O₂ ve 20 µl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karşımının 240 nm'de 5 dakika süreyle ölçülmesiyle

belirlendi. Katalaz aktivitesi, H_2O_2 için $39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre belirlendi. 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metiyonin, 75 μM nitro blue tetrazolyum, ve 50 μl ekstrakt ihtiva eden 1 ml reaksiyon ortamına 2 μM riboflavin ilave edilerek reaksiyon başlatıldı, bu karışım 10 dakika boyunca $375 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ şiddetinde beyaz ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm'de absorbans değerleri belirlendi.

2.4.5. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini

Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlendi (Nakano ve Asada, 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 μM ASC, 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de ASC için $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.5. Protein Tayini

Protein tayini Bradford (1976)'a göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Bovin serum albumin (BSA) standartları hazırlanarak, Coomassie Brilliant Blue G250 boyar maddesi ile proteinlerin oluşturduğu kompleks 595 nm ölçüldü. Protein konsantrasyonu mg cinsinden hesaplanarak, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldı.

2.6. DAB (3,3'-diaminobenzidine) Boyama Metodu ile Hidrojen peroksit (H₂O₂) İçeriğinin Belirlenmesi

İçsel hidrojen peroksit miktarlarını tespit edebilmek için, 3-4 günlük Arabidopsis fidelerinde (kökü ile birlikte), DAB boyama metodu kullanıldı (Christensen vd., 1997; Bindschedler vd., 2006; Daudi vd., 2012). Ardından yapraklar ve kökler Leica EZ4 HD marka ışık mikroskobu ile fotoğraflandı.

2.7. Stoma Açıklığının Belirlenmesi

Stomatal biyoassay He vd., 2005'e göre gerçekleştirildi. 5 haftalık farklı saksılarda yetiştirilmiş sos5 ve Col-gl (WT) yapraklarından 9'ar adet kesildi (3 biyolojik tekerrür) ve büyütme kabiniinde, ışık şartlarında 2 saat boyunca açılma solüsyonunda (CO₂ free MES-KCl tamponu: 10 mM MES-KOH, 50 mM KCl, pH: 6,15) bekletildi. Ardından, yapraklar, açılma solüsyonu (kontrol), 5 µM ABA, 100 mM NaCl ve 100 mM NaCl+5 µM ABA, solüsyonlarına aktararak, 4 saat bekletildi. Ardından yaprakların bir peçete üzerinde suyu alındı ve yaprağın alt yüzeyine dikkatlice saydam tırnak cilası sürüldü, tam kurumadan bunun üzerine şeffaf bant yapıştırılıp, hızlıca çekildi. Sonra bu saydam bant cam lam üzerine yapıştırıldı stomalar, Leica DFC300 FX marka floresan mikroskobu ile çok sayıda fotoğraflandı. Stoma açıklıkları her uygulamadan en az 30 stoma olmak üzere, imageJ programı yardımıyla µm olarak ölçüldü.

2.8. Kök uzunluklarının Ölçülmesi

Bitkilerin bulunduğu petriyerler, 3 gün boyunca HP marka tarayıcı ile tarandı, ardından İmageJ Programı kullanılarak kök uzunlukları mm olarak ölçüldü.

2.9. Konfokal Taramalı Lazer Mikroskop ve Işık Mikroskobu Çalışmaları

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CSLM) araştırmacılara floresan veya yansıtıcı problemler ile işaretlenmiş dokuların oldukça kalın kesitleri, gelişmekte olan embriyolar gibi küçük organizmalar ve bütün haldeki hücre örnekleri ile çalışma imkanı sunar. Bu teknoloji araştırmacılara ulaşılacak en yüksek ışık mikroskobu çözünürlüğü ile hücre

altı yapılar, fonksiyonları ve hücre/organizma yapısının temiz bir şekilde görüntülenmesini sağlar (<http://merlab.metu.edu.tr/lazer-taramali-konfokal-mikroskop>).

Çalışmamızda *Arabidopsis* kök fenotipindeki değişimleri daha ayrıntılı biçimde gözlemleyebilmek için, Leica SPII konfokal mikroskobunu kullandık (Şekil 16). Özellikle hücre duvarındaki değişimleri görebilmek için, Kalkoflor beyazı (Calcofluor White: 4,4'-bis-[4-anilino-bis-dietilamino-5-triazin-2-ilamino]-2,2'-stilben-disülfonik asidin bir disodyum tuzudur) boyası kullanıldı. Kalkoflor tekstil ve kâğıt sanayisinde beyazlatıcı ajan olarak kullanılan, β 1-3, β 1-4 polisakkaritlerine (yani selüloz ve kitin) bağlanma yeteneği olan renksiz bir boyadır. Bu boya belli dalga boylarında floresan ışık vermektedir. Bitkilerin hücre duvarını boyamak için biyolojik bir işaretleyici olarak kullanılmaktadır (Hageage ve Harrington, 1984).

Mevcut çalışmada, MS Media ortamında 3-4 gün büyütülmüş ve ardından farklı test ortamlarına aktarılıp 24 saat bekletilen *Arabidopsis* fideleri kullanıldı. Fideler 5 dakika Kalkoflor boyasında bekletildikten sonra lamellere alındı ve 405 nm laser altında hücre duvarındaki değişimler görüntülendi.



Şekil 16. Leica SPII konfokal taramalı laser mikroskop

2.10. Çift (Double) Mutantların Elde Edilmesi

Çaprazlama sonrası (2.1.1.de açıklandığı üzere) işaretli çiçeklerden elde edilen tohumlar, MS-0 besi ortamına Tablo 4'te belirtilen miktarlarda Barky Ultipette (0,5-10 μ l product code CP-10) yardımı ile tek sıra halinde ekildi. Büyütme kabininde dikey şekilde

3-4 gün büyütüldükten sonra, cımbız yardımıyla dikkatlice 100 mM NaCl içerikli besi ortamına transfer edildi. Kök uçlarındaki değişim, günlük olarak ışık mikroskobu altında takip edildi ve 3. günün sonunda sos5 fenotipi gösteren, kısa ve kalınlaşmış kök özelliğinde olan bitkiler ayrılarak, tekrar MS-0 besi ortamına alındı. Burada birkaç gün tuz stresinin olumsuz etkisinden kurtulup iyileşmeye başladıktan sonra, rast gele seçilen 8'er adet *Arabidopsis* fidesi, tek (single) mutantlar ve Col-gl, C 24 yabancı tip kontrollerle birlikte daha önce -80 °C'de dondurulup açılmış hazır toprak ve perlit karışımı içeren küçük saksılara dikildi (Şekil 17). Ekilen tüm bitkiler numaralandırılıp bitki büyüme odasına kaldırıldı ve 2 hafta sonra 2.10.1'de izah edildiği gibi genomik DNA ekstraksiyonu yapıldı.



Şekil 17. Çift mutant elde etmek üzere bitkilerin toprakta yetiştirilmesi

Tablo 4. Çaprazlanan tohumların ekim durumları ve fenotipik ayırımı

POPULASYONLAR F2	Ekilen tohum sayısı	Çimlenen tohum sayısı	100 mM NaCl'ya aktarılan tohum sayısı	Yabani tip (WT) benzeri kök fenotipi	<i>sos5</i> mutant benzeri kök fenotipi	Yabani ve <i>sos5</i> kök fenotipi arasında kalanlar
<i>sos5</i> x <i>cpl1-1</i>	150	100	75	63	12 (16%)	5
<i>sos5</i> x <i>cpl3-1</i>	150	90	75	54	21 (28%)	16
<i>sos5</i> x <i>sad1-1</i>	150	80	75	61	14 (18%)	7
<i>sos5</i> x <i>abi4-1</i>	150	100	75	57	18 (24%)	8
<i>sos5</i> x <i>abi5-1</i>	150	100	75	60	15 (20%)	4

2.10.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA ekstraksiyonları Edwards vd., 1991'e göre yapıldı. Bitkilerden kesilen yapraklar, içerisinde 500 µl Edwards Tamponu (200 mM Tris (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA) bulunan ependorflara alındı ve hemen buza konuldu. Ardından plastik çubuklar ile ezildi ve ependorflar 13000 rpm'de 5 dakika santrifüf edildi. Yeni hazırlanmış ependorflara 300'er µl süpernatant kısmı aktarılıp, üzerine DNA'yı çökeltmek için 300 µl izopranoöl eklendi. 13000 rpm'de 5 dakika santrifüf edildikten sonra hızlıca ependorf tüpleri ters çevrilip solüsyon kısmı atıldı. DNA pelletleri bir peçete üzerinde yaklaşık 1 saat kurumaya bırakıldı. İzopranoölün tamamen buharlaşmasından sonra da 50 µl steril H₂O ile ependorflardaki DNA pelletleri çözünür hale getirildi. Ependorflar sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

2.10.2. *cpl1-1* Genotiplenmesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi

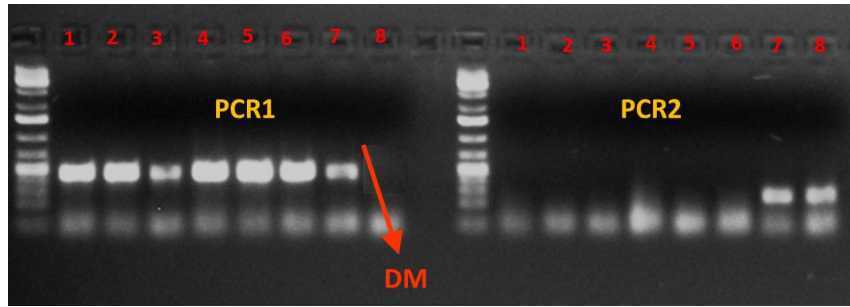
cpl1-1 genotiplenmesi ve *cpl1 sos5* çift mutantının belirlenmesi için 2 tane PCR yapıldı. PCR'larda 2.10.1'de izole edilen 8 ayrı bitkinin genomik DNA'sı kullanıldı. *cpl1-1* LB (left border) 3' ucunda T-DNA insersiyon mutasyonu ile meydana gelmiştir ve GT baz çifti eklenmiştir. Bunun için tasarlanan PCR'lar ve TAIR Web sitesinden yararlanılarak dizayn edilen primerler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. *cpl1-1* için tasarlanan PCR yöntemi

PCR Çeşitleri	Primerler	PCR Şartları
PCR1	CPL1-Seq2F: AAAGATGGCATTGGTAATTGATGATCG	Touch down PCR 68°C ↘ 55°C
	CPL1-Seq2R: AATCCACCTCTGACACCACAGGCAACG	
PCR2	CPL1-Seq2R: ATCCACCTCTGACACCACAGGCAACG	Touch down PCR 68°C ↘ 55°C
	LB3: TTGACCATCATACTCATTGCTG	

PCR ürünleri, % 1,5'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar yorumlandı. Yorumlar:

1. PCR1'de ürün var ve PCR2'de ürün yoksa: homozigot yabancı tip,
2. PCR1'de ürün var ve PCR2'de de ürün varsa: heterozigot
3. PCR1'de ürün yok ama PCR2'de ürün varsa: homozigot mutanttır, şeklinde yapıldı. PCR1'de ürün vermeyen ancak PCR2'de ürün veren 8 numaralı bitkinin istediğimiz *sos5*, *cpl1-1* çift (double) mutantı olduğu anlaşıldı (şekil 18). İşaretlediğimiz bu bitkinin tohumları alınarak farklı besi ortamlarında kontrollerle birlikte test edildi.

Şekil 18. *cpl1 sos5* çift (double) mutantının PCR yöntemi ile belirlenmesi

2.10.3. *cpl3-1* Genotiplenmesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi

cpl3-1 genotiplenmesi ve *cpl3-1 sos5* çift mutantının belirlenmesi için 2.10.1'de izole edilmiş olan ilgili DNA'lar tasarlanan PCR'larda kullanıldı (Tablo 6) ve sonuçlar jel fotoğraflarına göre yorumlandı.

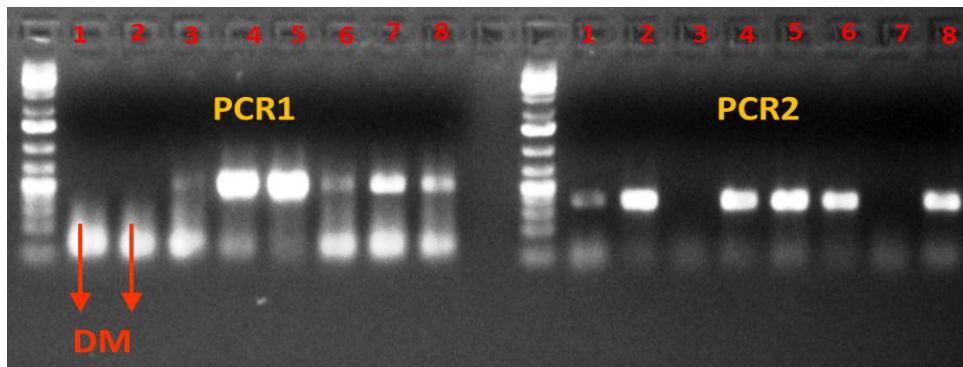
Yorumlar:

1. PCR1'de ürün var ve PCR2'de ürün yoksa: homozigot yabancı tip (WT),

2. PCR1’de ürün var ve PCR2’de de ürün varsa: heterozigot ve
3. PCR1’de ürün yok ama PCR2’de ürün varsa: homozigot mutanttır, şeklinde yapıldı. PCR1’de ürün vermeyen ancak PCR2’de ürün veren 1 ve 2 numaralı bitkilerin istediğimiz *cpl3-1 sos5* çift (double) mutanlığı olduğu anlaşıldı (Şekil 19). İşaretlediğimiz bu bitkilerin tohumları daha sonra alınarak farklı besi ortamlarında kontrollerle birlikte test edildi.

Tablo 6. *cpl3-1* için tasarlanan PCR yöntemi

PCR Çeşitleri	Primerler	PCR Şartları
PCR1	CPL3-Seq1F: AGACCACACCCTTCTCAATTCAGCTAAG	Touch down PCR 72°C ↘ 59°C
	CPL3-Seq1R: TACCATAACTCCTTCTAAATCTTTGC	
PCR2	CPL1-Seq2R: ATCCACCTCTGACACCACAGGCAACG	Touch down PCR 72°C ↘ 59°C
	LB3: TTGACCATCATACTCATTGCTG	

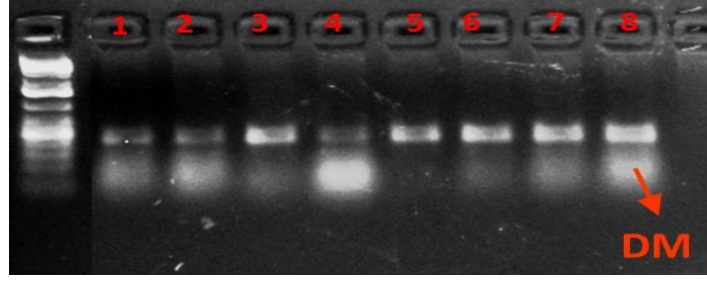


Şekil 19. *cpl3 sos5* çift (double) mutanlığının PCR yöntemi ile belirlenmesi

2.10.4. *sad1-1* Genotiplenmesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi

sad1 genotiplenmesi ve çift mutant eldesi için, 2.10.1’de izole ettiğimiz ilgili DNA’lar SAD1-Seq1F: TAAAGTGTAATAGATCAAGCAAC ve SAD1-Seq1R: TCGGAGCAAGAAAATCAGAG primerleri kullanılarak, touch down 68 °C- 55 °C PCR (TCD 55) şartları altında çoğaltıldı ve elde edilen PCR ürünleri önce jelde yürütülerek doğrulandı (Şekil 20). Ardından GenJet™ Gel Extraction Kit (#K0691-K0692)

ile jeldeki 1'den 8'e kadar olan kuyucuklar dikkatlice temizlenip eperdorflara konuldu. *sad1-1* mutasyonun tespitini yapmak üzere SAD1- Seq 1R primeri ile birlikte sekanslama şirketine gönderildi. Sekans sonuçlarında 8 numaralı bitkinin (homozigot mutant) *sad1 sos5* çift mutanti olduğu anlaşıldı. İşaretlediğimiz 8 numaralı bitki tohumları sonradan alınarak farklı besi ortamlarında test edilmiştir.



Şekil 20. *sad1 sos5* çift (double) mutantının PCR ve sekanslama yöntemi ile belirlenmesi

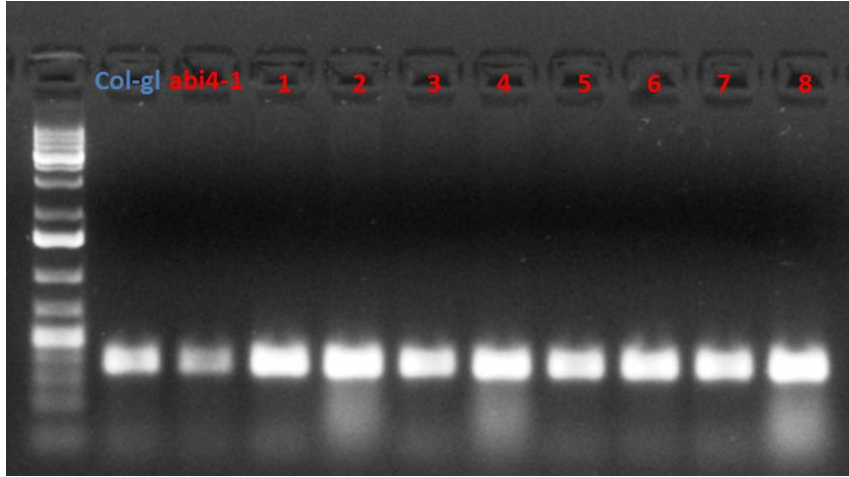
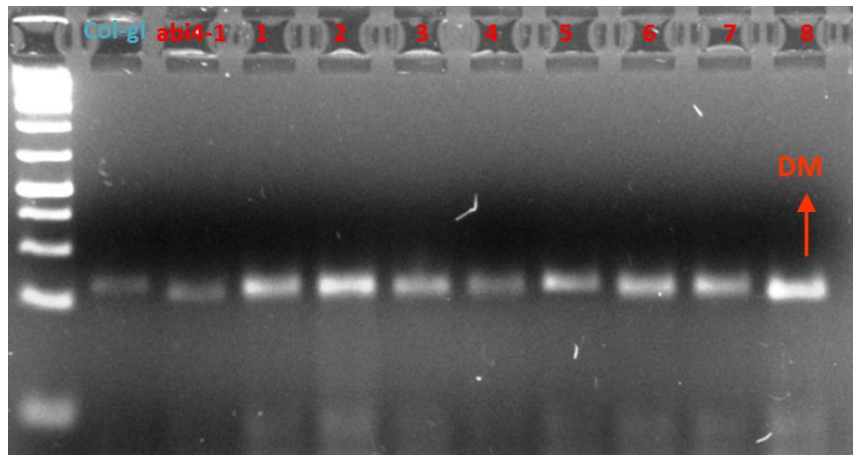
2.10.5. *abi4-1* Genotipleme ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi

abi4-1 genotipleme ve çift mutant eldesi için, 2.10.1'de izole ettiğimiz ilgili DNA'lar *abi4-1-F*: CGAAGACGCCGCACGTGCCTAC ve *abi4-1-R*: TGATACTGTTGGTGTGGAATTG primerleri kullanılarak, TCD 55 PCR şartları altında çoğaltıldı ve agaroz jelde yürütüldü (Şekil 21). *abi4* mutasyonu GGAGGAGCCAACTTT baz dizisindeki yeşille gösterilen G bazının silinmesi ile oluştuğu için, Thermo Scientific (#ER0311 800 U) marka *AvaII/Eco471* enzimi (5'...G ↓ G W C C...3' ve 3'...C C W G ↑ G...5') ile kesim protokolü kullanılarak GG-CC kısımları çoğaltıldı (Tablo 7). Ardından ürünler jelde yürütülerek kontrol edildikten sonra (Şekil 22), sonucun kesinliği için jelde mutant olduğundan şüphelendiğimiz 2, 5, 6 ve 8. bitkilere ait PCR ürünleri 2.10.4'te bahsedilen jel ekstraksiyon kiti kullanılarak temizlendi ve *abi4-1* primerlerinden biri eklenerek sekans şirketine gönderildi. Sonuçta, 8. bitkinin istediğimiz homozigot mutant (*abi4-1 sos5* çift mutanti) olduğu anlaşıldı. İşaretlenen bitkinin tohumları daha sonraki testlerde kullanılmak üzere biriktirildi.

Tablo 7. Kesim Protokolü

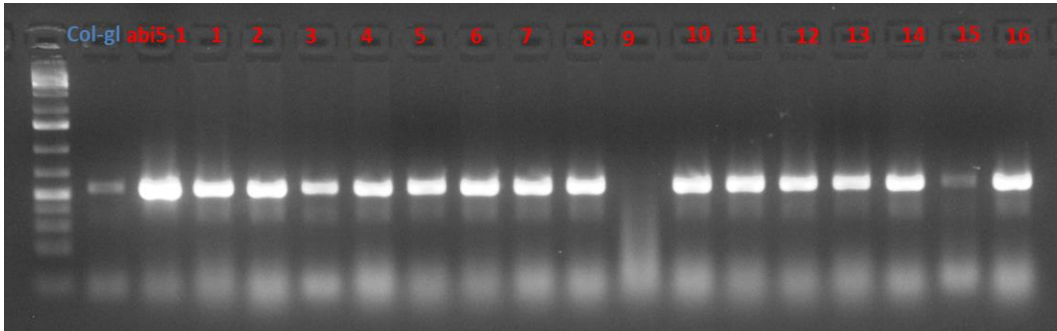
Kullanılan materyaller	Her Reaksiyon için (μ l)
dH ₂ O	13,7 μ l
PCR ürünü	4 μ l
10 X tamponu	2 μ l
Eco47I(AvaII) Enzimi	0,3 μ l
Toplam	20 μ l

Karışım dikkatlice hazırlanıp, 1-2 sn santrifüj (spin down) edildi ve ardından 37 °C’de 1-16 saat inkübe edildi. Eco47I enzimini inaktif hale getirmek için 65 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak ürünler jelde yürütülerek kontrol edildi.

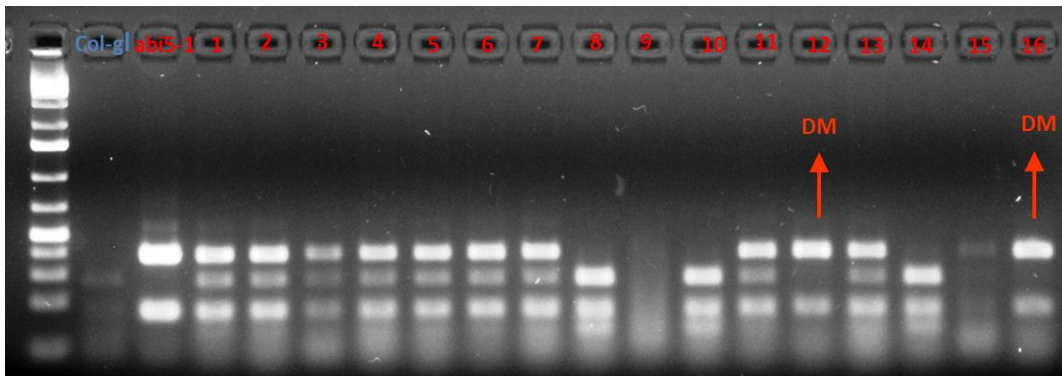
Şekil 21. *abi4-1* genotipleme için yapılan PCR (kesim öncesi)Şekil 22. *abi4-1 sos5* çift (double) mutantının PCR (kesim sonrası) ve sekanslama yöntemleri ile belirlenmesi

2.10.6. *abi5-1* Genotiplenmesi ve Çift (Double) Mutantların Belirlenmesi

abi5 genotiplenmesi ve çift mutant eldesi için, diğerlerinden farklı olarak 16 adet bitkinin DNA izolasyonu yapıldı. Önce *abi5-1* bölgesi *abi5-1-F*: CACTAATCCTAAACCTAATCCAAAC ve *abi5-1-R*: GTTGTTGTTGTTTTGGGAAG primerleri kullanılarak TCD55 PCR şartları altında çoğaltıldı ve agaroz jelde yürütüldü (9 numaralı bitki DNA'sı bilinmeyen bir nedenden ötürü çoğalamadığından, jeldeki kısmı boş gözükmemektedir) (Şekil 23). Ardından 2.10.7.'ye benzer olarak *Eco471/AvaII* enzimi ile kesildi. Bu enzim yabancı tip bitki DNA'larını jelde 3 bant verecek şekilde keserken (269 /172 /114 uzunluklarında), mutantları 2 bant (383 /172 uzunluklarında) verecek şekilde kesmiştir (Şekil 24). Sonuç olarak, 12 ve 13. bitkilerin elde etmek istediğimiz *sos5*, *abi5-1* çift mutantı olduğu anlaşıldı. İşaretlediğimiz 12 ve 13 numaralı bitki tohumları biriktirilerek sonradan farklı besi ortamlarında test edildi.



Şekil 23. *abi5-1* genotiplenmesi için yapılan PCR (kesim öncesi)



Şekil 24. *abi5-1 sos5* çift (double) mutantının PCR (kesim sonrası) yöntemi ile belirlenmesi

2.11. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Örnekler 3 tekerrürlü (triplicates) olarak kullanıldı. Her biyolojik tekerrür için 150 Arabidopsis fidesi, bir naylon mesh (20µm mesh size; Prosep, Belgium) üzerinde 5 gün boyunca yetiştirildi ve standart MS-0 besi ortamı ve 100 mM NaCl besi ortamlarına transfer edilerek, 2 saat inkübe edildi. Ardından dikkatlice fidelerin kök kısımları neşterle kesilerek yapraklı kısımlar uzaklaştırıldı. İçlerinde birer metal bilye olan ependorflara konulan kökler hemen sıvı azota atıldı ve öğütücü cihaza (Retsch, Germany) konularak 2 dakika boyunca parçalanması sağlandı. RNA peqGOLD Trifast (Peqlab, Germany) kiti ile üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

RNA konsantrasyonu bir Nano Drop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) cihazı kullanılarak ölçüldü ve gerekli hesaplamalar yapılarak, bütün RNA konsantrasyonlarının eşitlenmesi sağlandı. cDNA sentezi için herbir örnek için, 1µg total RNA kullanıldı. RNA bir tek zincir cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, USA) ile dT-primerleri kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına göre revers transkribe edildi.

2.12. Semikantitatif Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR)

Sentezlenen cDNA'lar, Tablo 8'de belirtilen PCR prosedürüne göre tasarlanan ilgili gen primerleri (Tablo 9) ile Biorad Termocycler cihazı kullanılarak test edildi. Elde edilen PCR ürünleri % 1,5-2 agaroz jele yüklenerek, bantlardaki yoğunluğa göre gen ekspresyon durumları hakkında yorum yapıldı.

Tablo 8. RT-PCR bileşenleri

Bileşen	Miktarı (µl)
10X Buffer	1 µl
2 mM dNTP mix	1 µl
Taq Polimeraz enzimi 0,	1 µl
(5 µM) reverse primer 0,	5 µl
(5 µM) forward primer 0,	5 µl
Nuclease-free H ₂ O 6,	4 µl
Toplam hacim	10 µl

Tablo 9. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

Primerler	Primer Dizilimleri	İşlevi
1-) ABA1: <u>At5g67030</u> ABA1/ZEAXANTHIN EPOXIDASE	ABA1-F: GTGGTTTGAAGATGACGATGC ABA1-R: GATTACTTTCACCCTAAACGCC	ABA biyosentezinde görevli gen
2-) CYP707A3: <u>At2g29090</u>	CYP707A3-F : TCCAAGAGACATTAAGAGCTGC CYP707A3-R : ATTCTGAGGAAGAGCGAACG	ABA katabolizmasında görevli gen
3-) RD29A: <u>At5g52310.1</u>	RD29A-F: AAGTTACTGATCCCACCAAAGAAGAAAC RD29A-R: TTTCTCCCAACGGAGCTCCTAAAC	Ozmotik stres, tuz stresi, soğuk ve kuraklık stresleri ve ABA’ya cevapta rol alır
4-) RD29B: <u>At5g52300.1</u>	RD29B-F: TCCGGTTTACGAAAAAGTCAAAGAAAC RD29B-R: AATCCGAAAACCCCATAGTCCCAAC	Yüksek tuzluluk, soğuk ve kuraklık gibi streslere cevapta ABA ile cevapta rol alır
5-) RD22: <u>At5g25610</u>	RD22-F: ACGTCAGGGCTGTTTCCACTGAGGTG RD22-R: TAGTAGCTGAACCACACAACATGAG	ABA, kuraklık ve yüksek tuzlulukla uyarılabilen gen
6-) ERD1: <u>At5g51070</u>	ERD1-F: ACTTGGAAGGGGTGAACTTCAGTG ERD1-R: AGGTCCCACAGTATAGGCTCATCG	Kuraklığa erken cevapta rol alır

2.12.1. Agaroz Jel Elektrofrez

PCR ürünleri % 1,5 ile % 2 Agaroz jel (Sigma) ile ayrılmış ve ethidium bromür ile Biorad UV Transilluminator cihazı ile görüntülendi. Agaroz jel 0,4 µl/100ml Ethidium Bromür içermektedir. Agaroz 1X TAE tamponu içerisinde mikrodalga fırında 120 °C’de çözüldü. Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra, katılaşmadan içerisinde tarak bulunan jel tepsisine döküldü. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. 10 µl her PCR ürünü 3 µl yükleme boyası eklenerek, ilk kuyucuğa DNA işaretleyici (ladder) yüklendi, 75 volt voltaj altında Biorad güç kaynağı ile 1X TAE tamponu ile dolu elektroforez cihazında 45 dakika yürütüldü.

2.13. Real Time PCR (qRT-PCR)

2.11.’de izah edildiği üzere elde edilen cDNA’lar Solis BioDyne 5x HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Medibena, Austria) kullanılarak gerçekleştirildi ve

ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) qRT-PCR cihazı kullanıldı. Real time PCR için 95.0 °C'de 15 dakika, 95.0°C'de 0:10 için 40 döngü, 55.0°C'de 0:30, 72.0°C'de 0:30 programı takip edildi. Her biyolojik tekerrür 2 teknik tekerrür şeklinde analiz edildi. Ortalama teknik hata 0,5(±1) Ct values şeklinde bulundu. Pipetleme hatasından kaynaklanabileceği düşünülen, yüksek çıkan değerler silindi.

Ayrıca, bu metotta kontrol geni olarak UBQ5 (UBQ5-F: AGGCGAAGATCCAAGACAAG ve UBQ5-R: TGAACCTTTCCAGATCCATCG) housekeeping geni kullanıldı. Çıkan sonuçlar kullanılan CFX96™ Real-Time PCR cihazının bilgisayar programı ile Col-gl (yabani tip) ile *sos5* (mutant) bitkileri gen ekspresyonu seviyesinde kıyaslanarak, bir grafik oluşturuldu.

qPCR metodunda da **2.12.**'de kullanılan ABA1, CYP707A3, RD29A, RD29B, RD22 ve ERD1 genleri test edilerek, jelde görsel olarak gördüğümüz ekspresyon farklılıklarını gerçek zamanlı olarak, daha güvenilir bir şekilde tespit etmek amaçlandı.

2.14. İçsel ABA Tayini

100 mg taze yaprak örnekleri 3 saat süre ile liyofilize edildi. Liyofilize örnekler, MilliQ (Su/doku oranı ratio 50:1, v/w) içerisinde 16 saat boyunca 4 °C'de ekstre edildi. Kantitatif ABA analizleri Phytodetek ABA ELISA kiti ile gerçekleştirildi ve (±) cis-trans ABA (Sigma, St. Louis), standart olarak kullanılarak, MS0 kontrol ortamında ve 100 mM NaCl ortamında 3 gün bekletilen bitkilerin içsel ABA miktarları ölçüldü.

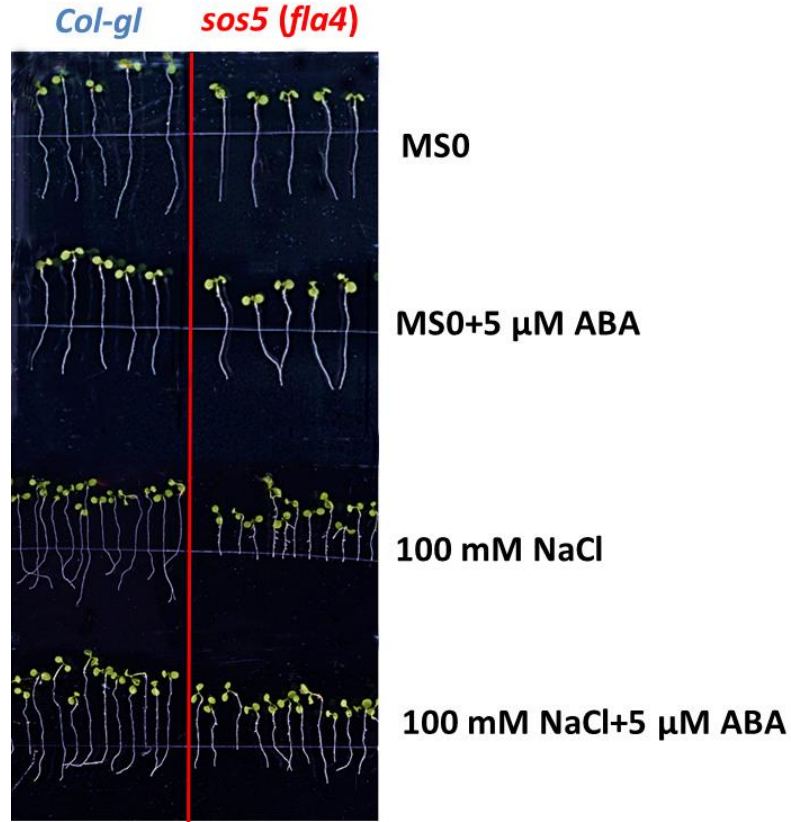
2.15. İstatistik Analizler

En az üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 16.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlendi. Kök uzunlukları ve stoma açıklıkları deneylerinde *student-T* testi ile karşılaştırmalar yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Tuz Stresi Altında ABA Muamelesinin *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Kök Fenotipleri Üzerine Etkisi

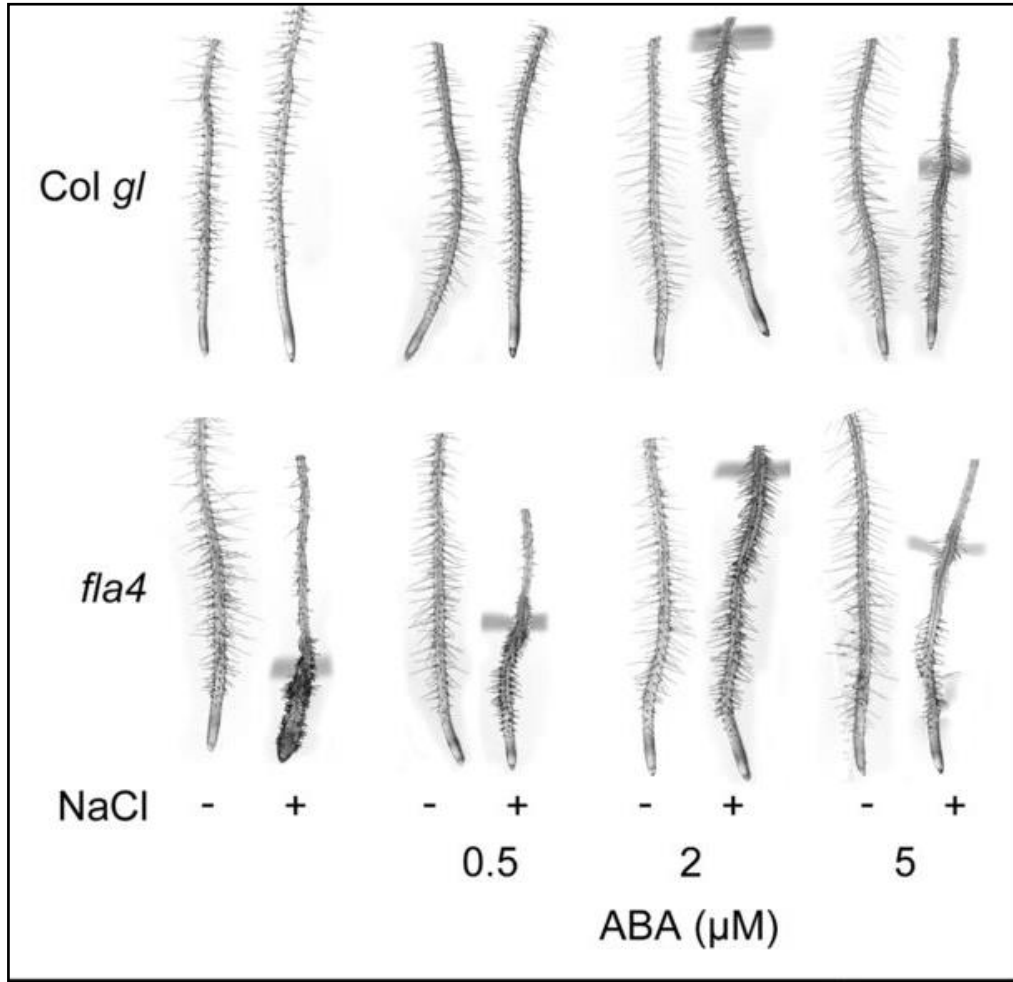
Arabidopsis thaliana bitkisinin yabani tip ve tuza aşırı hassas mutant bitkileri 3-4 gün MS-0 besi ortamında büyütüldükten sonra, MS-0 Kontrol, MS-0+ABA, 100 mM NaCl ve 100 mM NaCl+ABA içeren besi ortamlarına transfer edildi ve 3 gün boyunca köklerde meydana gelen fenotipik değişimler izlendi. Mutant bitkide tuz stresi muamele süresine bağlı olarak aşırı kısa ve şişkin olan kök fenotipi gözlenirken, ortama ABA ilave edilmesiyle mutant bitki ile yabani tipin neredeyse ayırt edilemez hale geldiği belirlendi. Stressiz kontrol ortamında, stresli ortamda ve stres+ABA içeren ortamdaki bitkilerin 48 saat sonundaki genel görünüşleri Şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 25. Tuz stresi koşullarında *sos5 (fla4)* mutant bitki köklerinin genel görünümü ve ABA'nın etkisi

3.2. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Kök Fenotipi Üzerine Etkisi

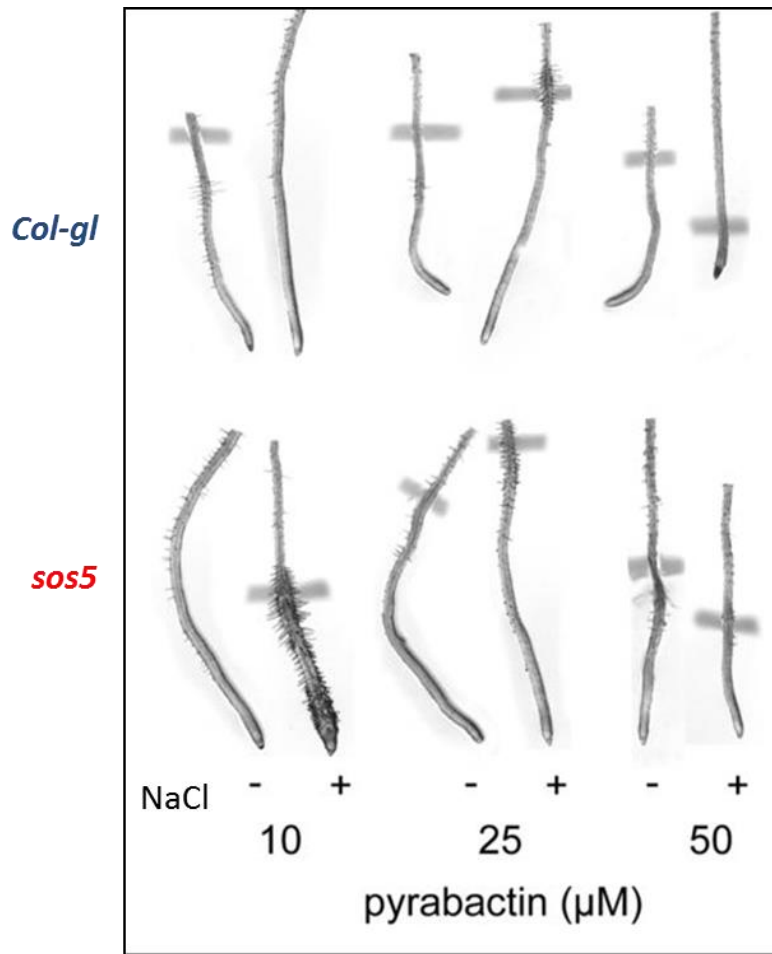
Tuz stresi altında mutant kök fenotipi üzerine en düşük dozda en etkili ABA konsantrasyonunu tespit etmek için, 0,5 μM , 2 μM ve 5 μM aralığı kullanıldı. 0,5 μM ile 2 μM arasında ABA'nın kısmen ancak 5 μM ABA'nın tuz stresi ile uyarılan mutant kök fenotipini tamamen baskıladığı gözlemlendi. 48 saat sonunda farklı konsantrasyolardaki ABA'nın kök fenotipleri üzerine etkisi Şekil 26'te gösterilmiştir. (Bundan sonraki tüm aşamalarda da bu ABA konsantrasyonu kullanılmıştır).



Şekil 26. Tuz stresi koşullarında farklı konsantrasyonlardaki ABA'nın *sos5* mutant kök fenotipi üzerine etkisi

3.3. Tuz Stresi Altında Pyrabaktin'in *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Kök Fenotipine Etkisi

Pyrabactin (Pyr), ABA agonisti olarak etki eden bir sentetik tohum çimlenme inhibitörüdür. 10 μM , 25 μM ve 50 μM Pyr konsantrasyon aralığında, 10 μM 'ın mutant kök fenotipi üzerine belirgin bir etkisi gözlenmezken, 50 μM Pyr'nin ise bitkilerde toksik etki yaptığı fark edildi. 25 μM Pyr'nin, tuz stresi altında aşırı hassas olan mutant kök fenotipini baskıladığı gözlemlendi. Tuz stresi altında basedilen konsantrasyonlardaki Pyr'nin bitki kök fenotipleri üzerine etkisi Şekil 27'da verilmiştir.

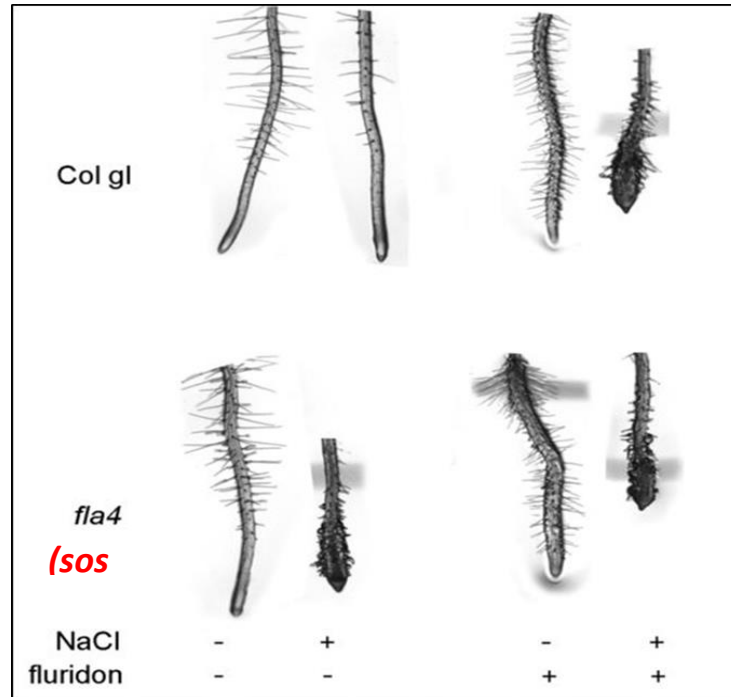


Şekil 27. Tuz stresi koşullarında farklı konsantrasyonlardaki Pyr'nin *sos5* mutant kök fenotipi üzerine etkisi

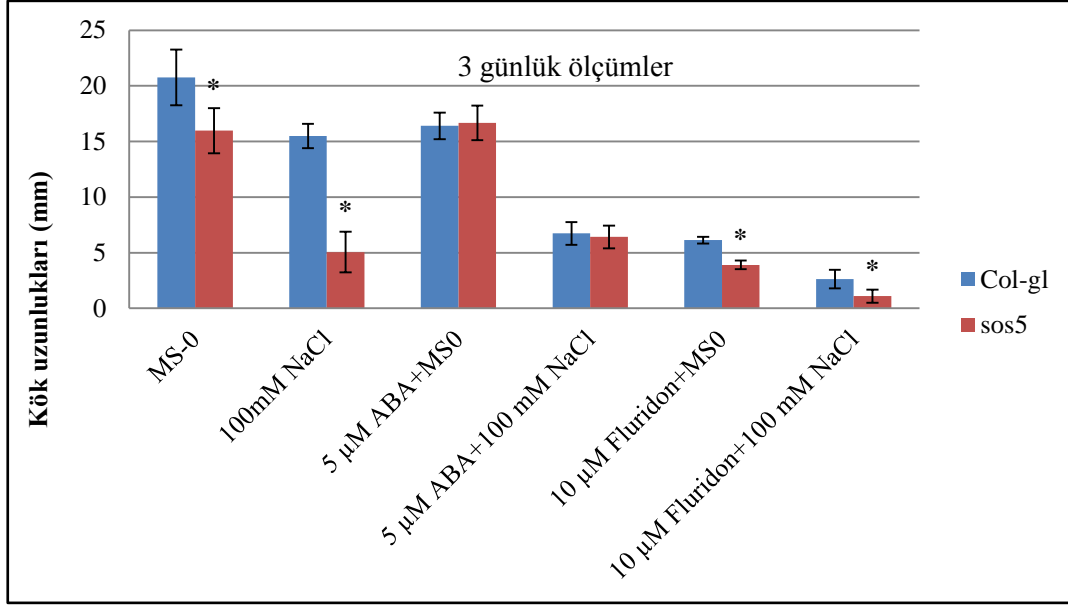
3.4. Tuz Stresi Altında Fluridon'un *sos5 (fla4)* Kök Fenotipine Etkisi

Fluridon (Flu), bir ABA biyosentez inhibitörüdür. Daha önce birçok konsantrasyonda etkinliği incelendi ve 10 μM 'da diğerlerine göre daha az ters etksi olduğu fark edilerek, kullanımı tercih edildi (veriler burada gösterilmemiştir). 10 μM Flu'nun tuz stresi içermeyen ortamda kısmen kök fenotiplerini değiştirdi ancak tuz stresi altında uygulandığında yabancı tip bitki köklerinde mutant kök fenotipine çarpıcı bir biçimde benzeyen, dramatik kök şişkinleşmesi gözlemlendi. Bununla beraber tuz stresi altında Flu muamelesinin mutant kök fenotipini yabancı tipe göre daha çok etkilediği ortaya çıktı. Yabancı tip ve mutant bitkilerde tuz stresi altında Flu muamelesinin köklerde yarattığı etki Şekil 28'de gösterilmiştir.

Normal şartlarda ve tuz stresi altında Flu muamelesinin yabancı tip ve mutant bitkilerde morfolojik değişimlere neden olduğu gözlenmekle birlikte, kök uzunluklarında da inhibisyona neden olduğu belirlendi. Tuz stresi altında mutant fenotipinin en bariz gözlemlendiği 3. günün sonunda, bitkilerin bulunduğu plastik petripler tarayıcı ile tarandıktan sonra, kök uzunlukları ImageJ programı yardımıyla mm olarak ölçüldü. Önceki uygulamalarla kıyaslamalı olarak ölçüm sonuçları Şekil 29'de verilmiştir.



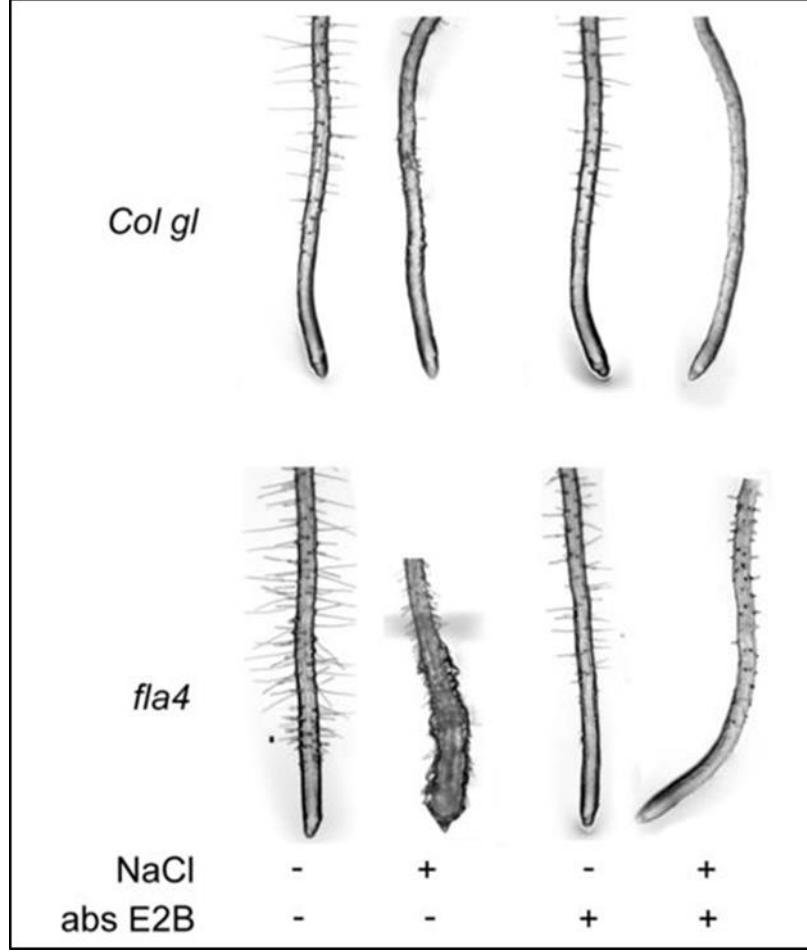
Şekil 28. Tuz stresi koşullarında 10 μM Flu'nun *sos5(flA4)* mutant kök fenotipi üzerine etkisi



Şekil 29. Tuz stresi koşullarında ABA ve Flu'nun *sos5* mutant kök uzunluklarına etkisi (* *Col-gl*'ya göre istatistik olarak önemli ($P < 0,001$) farkı göstermektedir (*Student-t* Testi). Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmadır)

3.5. Tuz Stresi Altında Abscinazol E2B'nin *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Kök Fenotipine Etkisi

Abscinazol E2B (AbsE2B), bir ABA katabolizma inhibitörüdür. Bu inhibitörün daha önce farklı konsantrasyonları denendi ve en etkili konsantrasyon olarak 5 µM belirlendi (söz konusu veriler burada verilmedi). Tuz stresi içermeyen ortamda AbsE2B muamelesinin hemen göze çarpmayan fakat yabancı tipe göre farklılık gösteren mutant fenotipini önlediği gözlemlendi. Bununla birlikte tuz stresi altında AbsE2B muamelesinin aşırı hassas mutant kök fenotipini bariz biçimde baskıladığı ve yabancı tipe ayırt edilemez hale getirdiği gözlemlendi. Yabancı tip ve mutant bitkilerde tuz stresi altında AbsE2B muamelesinin kök fenotiplerine etkisi Şekil 30'da gösterilmiştir.

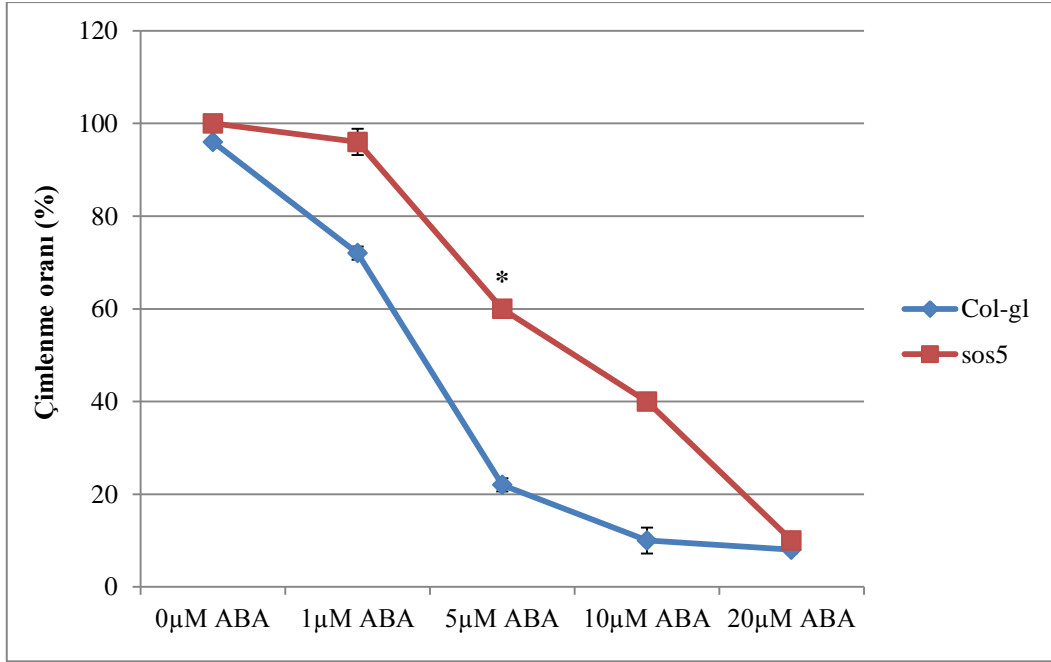


Şekil 30. Tuz stresi koşullarında 5 μ M AbsE2B'nin *sos5(fla4)* mutant kök fenotipleri üzerine etkisi

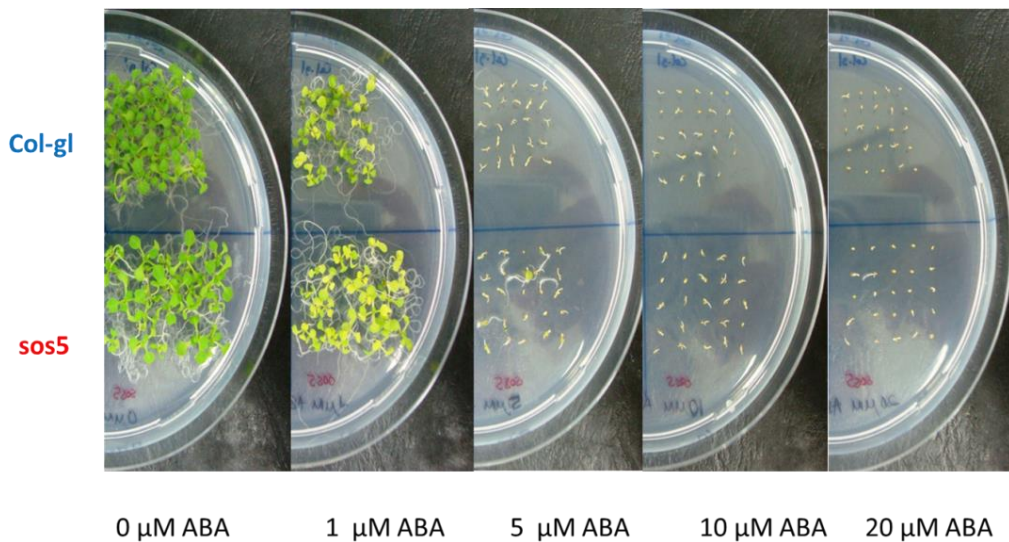
3.6. ABA'nın Mutant Bitkilerde Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Taze elde edilmiş tohumlar MS-0 ve 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M ABA içeren besi ortamlarına ekildi. 5, 7 ve 14. Günlerde çimlenme oranları mikroskop altında takip edildi, ilk radikula oluşumları ve yeşil yaprak çıkıntılarına bakılarak, çimlenme durumları değerlendirildi. ABA ihtiva etmeyen kontrol ortamında yabancı tip (% 96) ve mutant bitki (% 100) benzer oranlarda çimlendiler. 1 μ M ABA içeren besi ortamında, yabancı tip bitki tohumları % 72 oranında çimlenme gösterirken, mutant bitki tohumları % 96 oranında çimlenme gösterdi. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz 5 μ M ABA konsantrasyonunda ise yabancı tip tohum çimlenme oranı (% 22), mutant bitkiye göre (%60) önemli ölçüde düşüş gösterdi. 10 μ M ABA ortamında yine mutant bitki tohumları (%40), yabancı tipe göre (% 10) daha yüksek oranda çimlenme gösterdi ancak ABA'nın 20 μ M'lık yüksek

konsantrasyonunda her iki genotip tohumlarında benzer şekilde düşüş belirlendi. Artan ABA konsantrasyonuna bağlı olarak 14 günlük yabancı tip ve mutant bitki tohum çimlenme oranları, fotoğraf ve mikroskop görüntüleri Şekil 31, 32 ve 33’de verilmiştir.



Şekil 31. Farklı konsantrasyonlarda ABA'nın *sos5(fla4)* mutant tohum çimlenmesi üzerine etkisi (* Col-gl'ya göre istatistik olarak önemli ($P < 0,05$) farkı göstermektedir (*Student-t* Testi). Çizgiler üzerindeki barlar tekerrürlere ait standart sapmadır).



Şekil 32. Farklı konsantrasyonlarda ABA'nın *sos5(fla4)* mutant tohum çimlenmesi üzerine etkisi



Şekil 33. 5 µM ABA'nın *sos5(fla4)* mutant tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi (35 X)

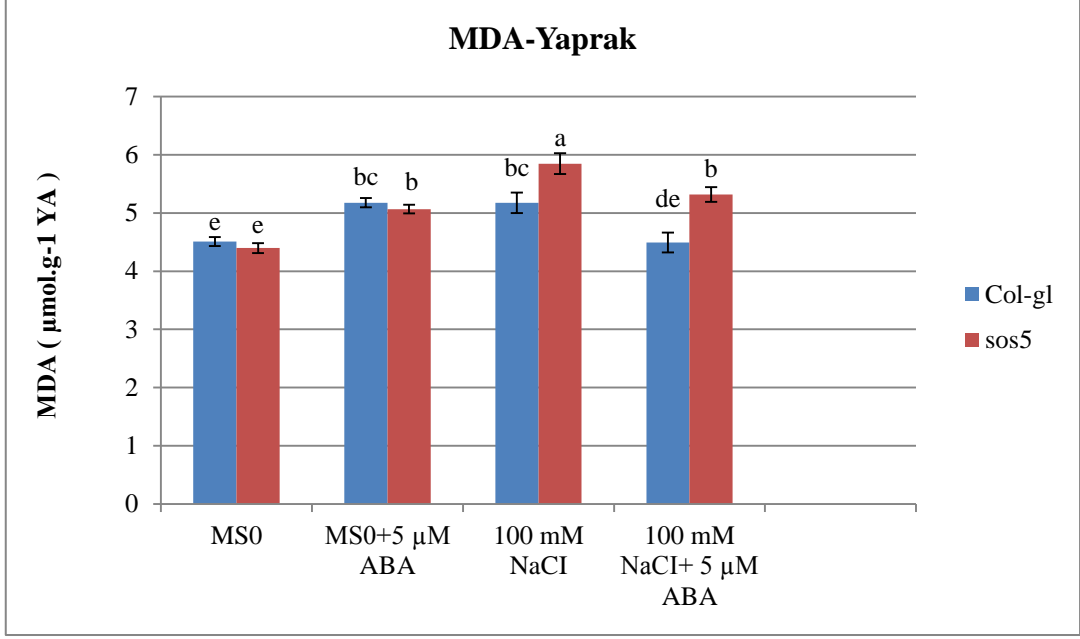
3.7. Tuz Stresi Altındaki *sos5 (fla4)* Mutant Bitkilerinde ABA'nın MDA İçeriği Üzerine Etkisi

MDA (Malondialdehit) içeriği, lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkar ve membranlarda meydana gelen hasarın bir göstergesidir. MS0 besi ortamında naylon mesh üzerine ekilen tohumlar, 3 gün büyütüldükten sonra MS0, MS0+ABA, 100 mM NaCl ve 100 mM NaCl+ABA ihtiva eden farklı besi ortamlarına aktarıldı. 3. günün sonunda hasat edilen bitkilerin kök ve yaprakları ayrılarak, MDA içeriklerine bakıldı.

3.7.1. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Yapraklarındaki MDA İçeriği Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında MDA içerikleri her iki genotipte de benzer çıktı. Yabani tip bitki yaprakları kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, MDA içeriğini % 13 oranında artırdı. Tuz stresi altında yabani tipte MDA içeriği aynı şekilde % 13 oranında arttı. Tuz stresi altında ABA muamelesinin ise MS0 ile önemli derecede bir farklılığı gözlenmedi ancak, tuz stresi ortamıyla kıyaslandığında MDA içeriğinde % 13 oranında düşüş kaydedildi.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kotrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, MDA içeriğini yabani tipe benzer şekilde % 13 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitkide MDA içeriği % 25 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile MS0 kontrole göre % 17 artış olmasına rağmen, sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında, MDA içeriğinde % 9 oranında düşüş gerçekleşti. (Şekil 34).

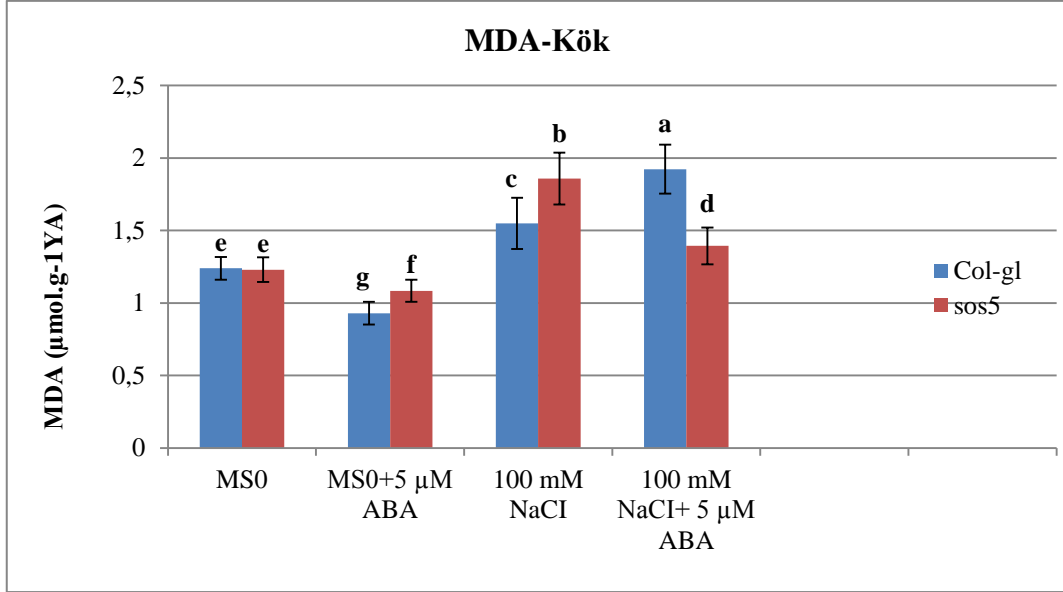


Şekil 34. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının MDA içeriği üzerine etkisi. (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.7.2. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Köklerindeki MDA İçeriği Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında köklerdeki MDA içerikleri her iki genotipte de benzer çıktı. Yabani tip bitki kökleri kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA'nın, MDA içeriğini % 25 oranında azalttığı kaydedildi. Tuz stresi altında yabani tipte MDA içeriği % 20 oranında arttı. Tuz stresi altında ABA muamelesinin de MDA içeriğini % 35 artırdığı kaydedildi. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında, tuz stresi altında ABA ilave edilmesi ile MDA miktarı % 19 civarında artış gösterdi.

Diğer taraftan mutant bitki kökleri kotrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, MDA içeriğini % 12 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitkide MDA içeriği % 34 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile MS0 kontrole göre % 12 artış olmasına rağmen, sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında, MDA içeriğinde % 25 oranında düşüş gerçekleşti (Şekil 35).



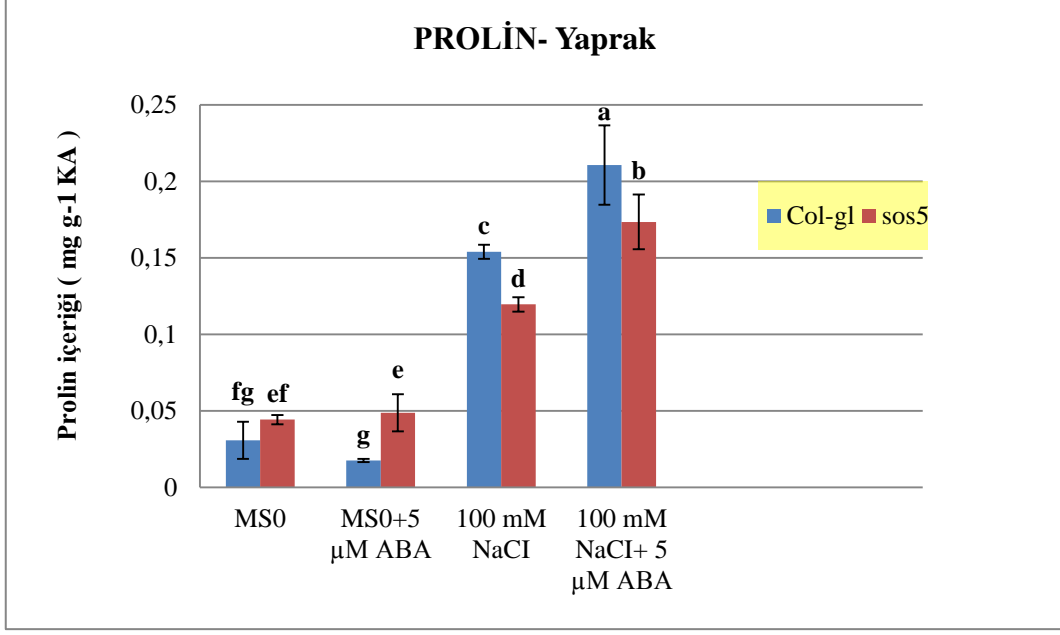
Şekil 35. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin MDA içeriği üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.8. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitkilerindeki Prolin İçeriği Üzerine Etkisi

3.8.1. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Yapraklarındaki Prolin İçeriği Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında her iki genotipin yapraklarında prolin içerikleri bakımından önemli derecede bir farklılık görülmedi. Yabani tip bitki yaprakları kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA'nın, prolin içeriğini % 42 oranında azalttığı kaydedildi. Tuz stresi altında yabani tipte prolin içeriği % 80 oranında önemli derecede artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesinde ise bu artış % 85 oranında oldu. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise tuz stresi altında ABA ilavesinin prolin miktarında % 29 oranında artışa sebep olduğu belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, prolin içeriğini % 10 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitkideki prolin içeriği % 63 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile de artış % 74 oranına kadar çıktı. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise, prolin içeriğinde yabani tipe benzer şekilde % 29 oranında artış gerçekleşti. (Şekil 36).

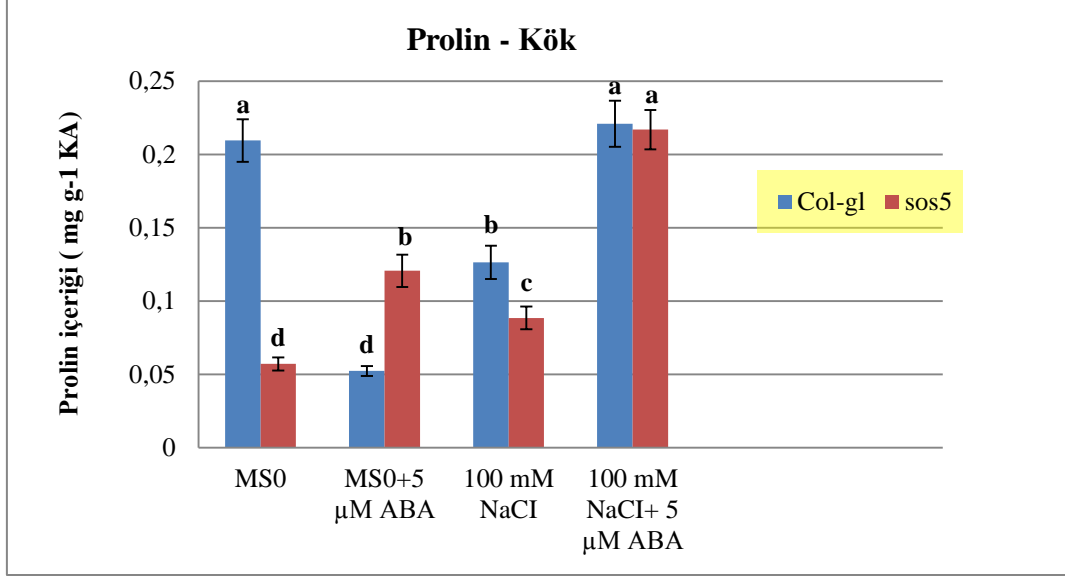


Şekil 36. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının prolin içeriği üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.8.2. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Köklerindeki Prolin İçeriği Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki kökündeki prolin miktarı mutanta göre önemli derecede yüksek çıktı. Yabancı tip bitki köklerindeki prolin içerikleri kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA varlığında, prolin içeriği % 76 oranında azalış gösterdi. Tuz stresi altında yabancı tip köklerinde prolin içeriği % 38 oranında azaldı. Tuz stresi altında ABA muamelesinde ise kontrole göre önemsiz derecede (% 4,5) artış meydana geldi. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise tuz stresi altında ABA ilavesinin yabancı bitki köklerinde % 40 oranında artışa neden olduğu görüldü.

Diğer taraftan mutant bitki kökleri MS0 kontrolü ile kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, prolin içeriğini % 53 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitki kökündeki prolin içeriği % 35 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile de artış % 74 oranına kadar çıktı. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise, prolin içeriğinde % 59 oranında artış gerçekleşti (Şekil 37).



Şekil 37. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin prolin içeriği üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.9. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitkilerinde Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

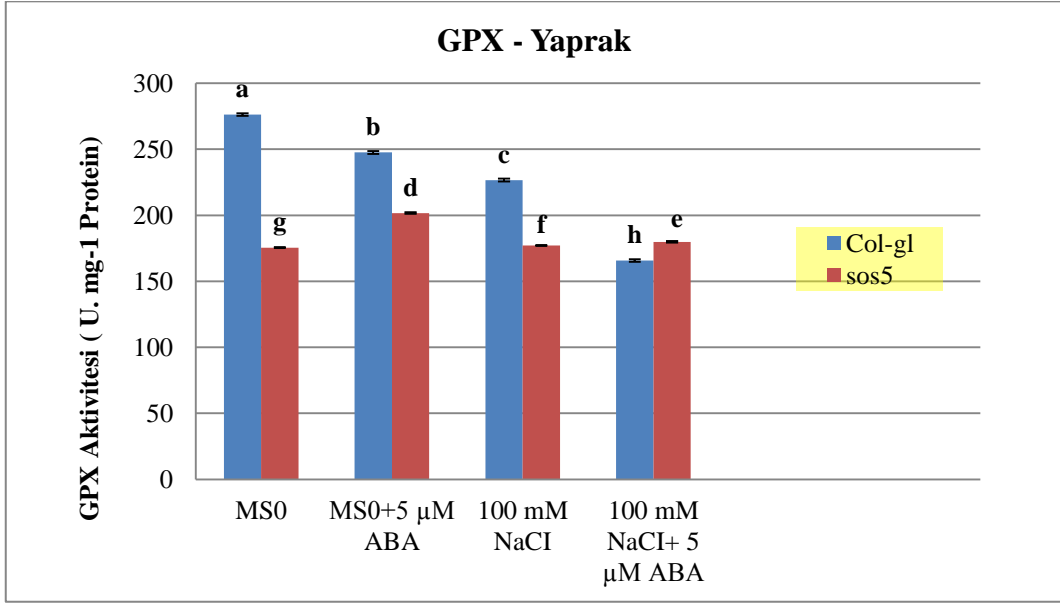
3.9.1. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Yapraklarındaki GPX Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki yapraklarındaki guaikol peroksidaz (GPX) miktarı mutanta göre önemli derecede yüksek bulundu. Yabancı tip bitki yapraklarındaki GPX içerikleri kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA varlığında, GPX aktivitesi % 10 oranında azaldı. Tuz stresi altında ise aktivite % 18 oranında azaldı. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile de GPX aktivitesinde % 40 oranında ciddi bir düşüş kaydedildi. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise tuzla birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki yapraklarında GPX enzim aktivitesini % 27 oranında düşürdüğü görüldü.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kotrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, GPX içeriğini % 15 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitki yapraklarındaki enzim aktivitesi kontrole göre sadece % 1 oranında artış gösterdi. Tuz

stresi altında ABA muamelesi ile de artış % 2 oranında oldu. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesinde % 2 oranında artış gerçekleşti.

Yabani tip ile mutant bitki yapraklarının enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, genel olarak yabani tip enzim aktiviteleri önemli derecede mutant bitkiye göre yüksek bulundu. Bununla beraber, tuz stresi altında ABA uygulaması ile 2 genotipin enzim aktivitelerinin birbirine yaklaştığı görüldü (Şekil 38).



Şekil 38. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının GPX aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

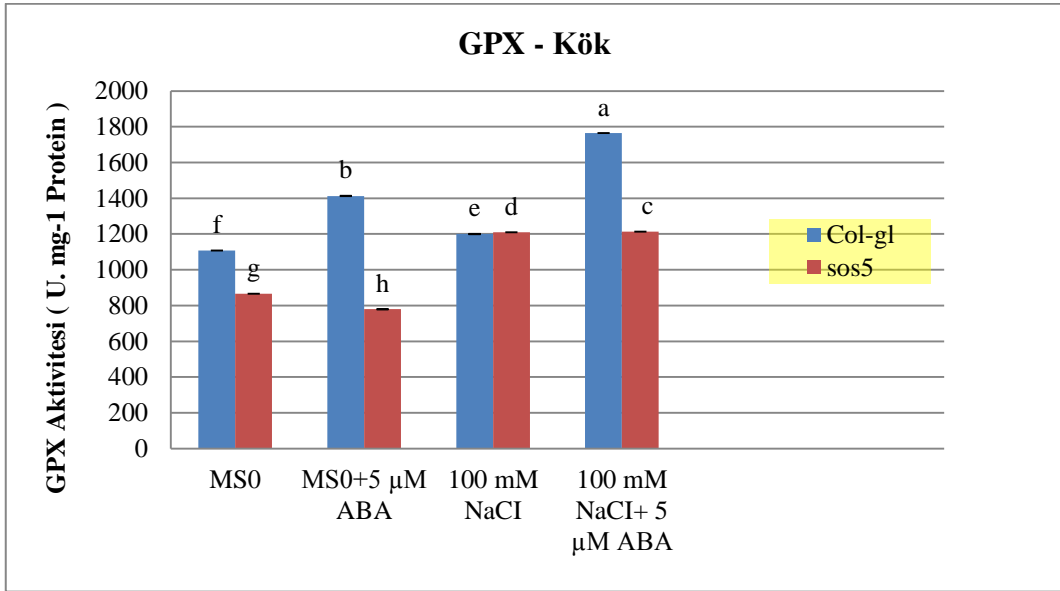
3.9.2. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Köklerindeki GPX Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabani tip bitki köklerindeki guaikol peroksidaz (GPX) miktarı mutanta göre önemli derecede yüksek çıktı. Yabani tip bitki köklerindeki GPX içerikleri kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA varlığında, GPX aktivitesi % 28 oranında arttı. Tuz stresi altında ise aktivite artışı % 8 oranında oldu. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile ise GPX aktivitesi % 59 oranında ciddi bir biçimde artış gösterdi. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise tuzla birlikte ABA

ilavesinin yabancı tip bitki köklerinde GPX enzim aktivitesini % 47 oranında artırdığı belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki kökleri kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, GPX içeriğini % 10 oranında azalttı. Tuz stresi altında ise mutant bitki köklerindeki enzim aktivitesi kontrole göre % 40 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile artış bezer şekilde % 40 oranında oldu. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesinde sadece % 0,3 oranında artış gerçekleşti.

Yabancı tip ile mutant bitki köklerinin enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, genel olarak yabancı tip enzim aktiviteleri önemli derecede mutant bitkiye göre yüksek bulundu. Ancak, tuz stresi altında her iki genotipteki enzim aktiviteleri birbirine yakın olarak bulundu (Şekil 39).



Şekil 39. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin GPX aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

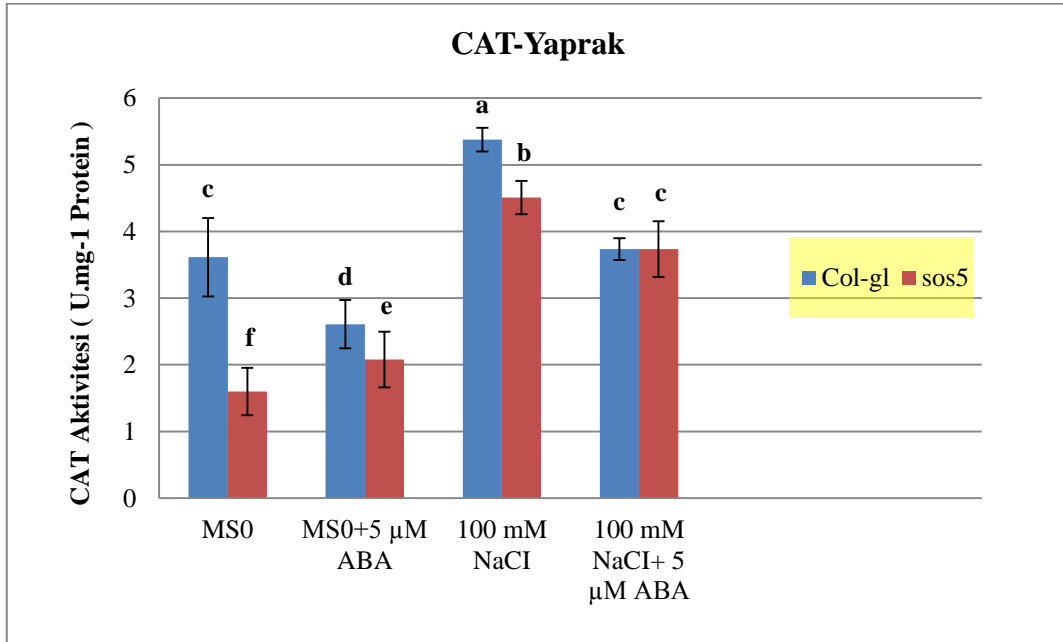
3.9.3. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Yapraklarındaki CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki yapraklarındaki katalaz (CAT) enzim aktivitesinin mutanta göre önemli derecede yüksek olduğu ortaya çıktı. Yabancı tip

bitki yapraklarındaki CAT enzim aktivitesi kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA uygulaması ile % 28 oranında azalış oldu. Tuz stresi altında ise aktivite kontrole göre % 49 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile ise CAT aktivitesinde önemli derecede bir artış olmadı. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında, tuzla birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki yapraklarındaki CAT aktivitesini % 31 oranında düşürdüğü belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, CAT içeriğini % 35 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitki yapraklarındaki enzim aktivitesi kontrole göre 2,94 kat oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile artış 2,44 kat oranında oldu. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesinde % 17 oranında azalış gerçekleşti.

Yabancı tip ile mutant bitki yapraklarının enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, genel olarak yabancı tip enzim aktiviteleri mutant bitkiye göre önemli derecede yüksek olmasına rağmen, tuz stresi altında ABA muamelesi ile her iki genotipteki enzim aktiviteleri birbirine eş değer olarak bulundu (Şekil 40).



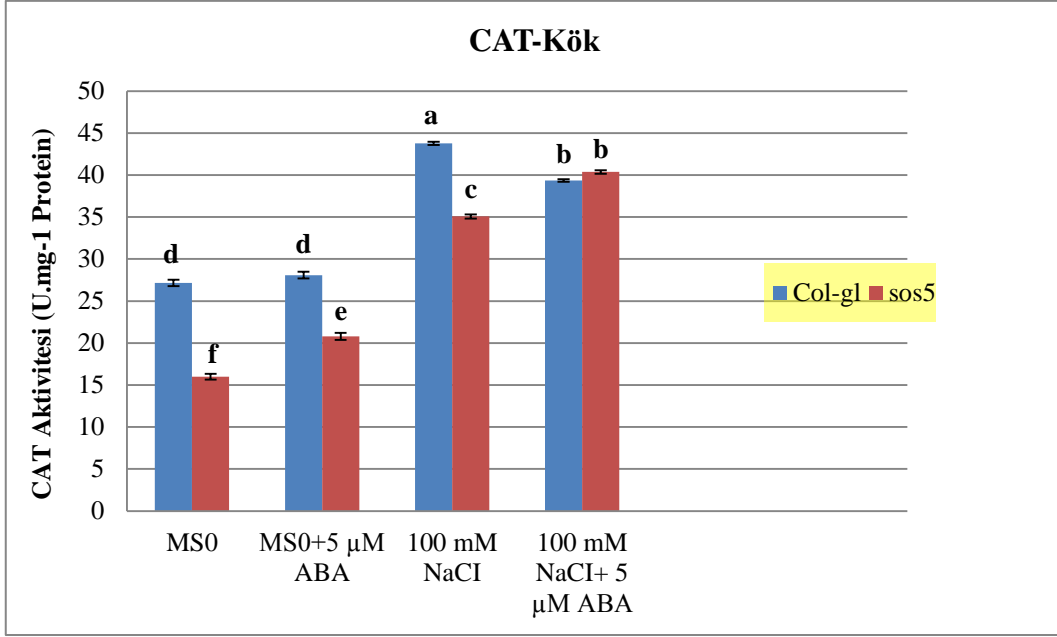
Şekil 40. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının CAT aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.9.4. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Köklerindeki CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki köklerindeki katalaz (CAT) enzim aktivitesinin mutanta göre önemli derecede yüksek olduğu ortaya çıktı. Yabancı tip bitki köklerindeki CAT enzim aktivitesi kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA uygulaması ile önemli derecede bir değişim olmadığı görüldü. Tuz stresi altında ise aktivite kontrole göre % 61 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile ise CAT aktivitesi % 45 oranında artış gösterdi. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, tuzla birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki köklerindeki CAT aktivitesini % 10 oranında düşürdüğü belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki kökleri kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, CAT içeriğini % 30 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitki köklerindeki enzim aktivitesi kontrole göre 2.19 katlık artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile ise enzim aktivitesi 2.52 katlık artış gösterdi. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesinde % 15 oranında artış gerçekleşti.

Yabancı tip ile mutant bitki köklerinin enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, genel olarak yabancı tip enzim aktiviteleri mutant bitkiye göre önemli derecede yüksek olmasına rağmen, tuz stresi altında ABA muamelesi ile her iki genotipteki enzim aktiviteleri yaprakta olduğu gibi birbirine eş değer olarak bulundu (Şekil 41).



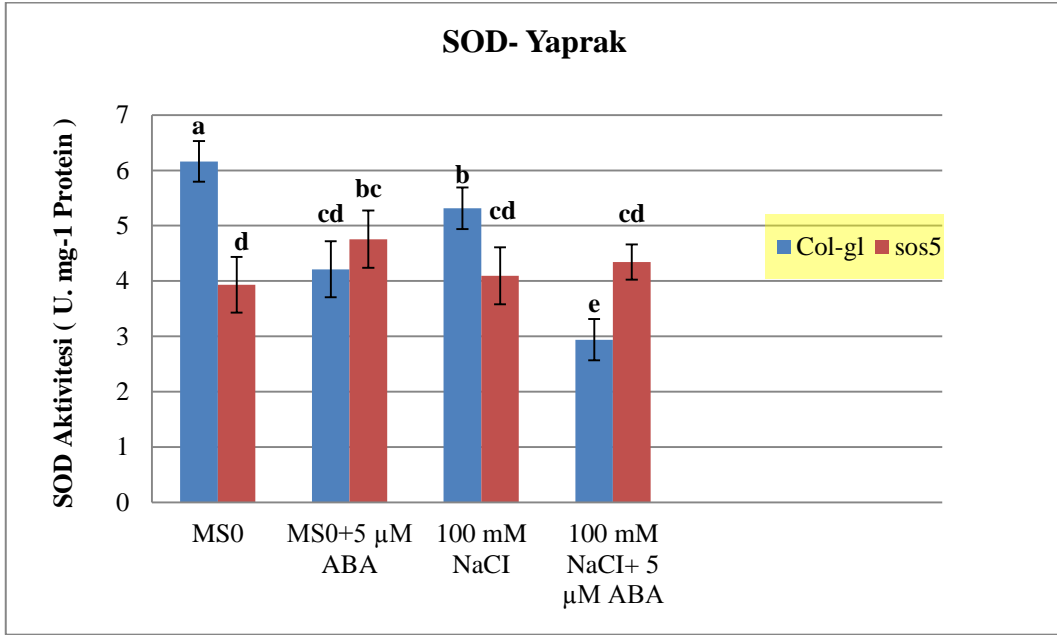
Şekil 41. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin CAT aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.9.5. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Yapraklarındaki SOD Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki yapraklarındaki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin mutanta göre önemli derecede yüksek olduğu ortaya çıktı. Yabancı tip bitki yapraklarındaki SOD enzim aktivitesi kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA uygulaması ile % 32 oranında azalış olduğu kaydedildi. Tuz stresi altında ise aktivite kontrole göre % 14 oranında azalış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile SOD aktivitesi % 52 oranında azaldı. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, tuzla birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki yapraklarındaki CAT aktivitesini % 45 oranında düşürdüğü belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, SOD içeriğini % 21 oranında artırdı. Tuz stresi altında ise mutant bitki yapraklarındaki enzim aktivitesi kontrole göre istatistiki açıdan önemli bir değişiklik göstermedi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile enzim aktivitesindeki artış önemsiz olarak bulundu. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesindeki artış yine önemsiz bulundu.

Yabani tip ile mutant bitki yapraklarının enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, özellikle tuz stresi altında yabani tip bitki yapraklarındaki enzim aktivitesi mutanta göre önemli derecede yüksekken, tuz+ABA içeren ortamda bu oran tam tersine döndü ve mutant bitkinin enzim aktivitesi yabani tipe göre önemli derecede yüksek bulundu (Şekil 42).



Şekil 42. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının SOD aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

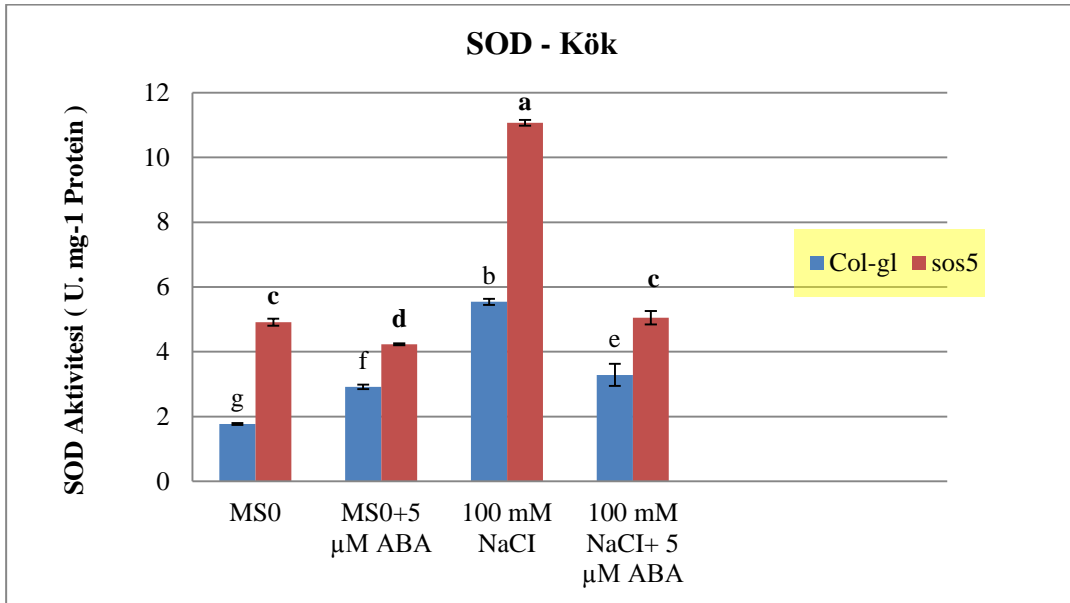
3.9.6. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Köklerindeki SOD Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabani tip bitki köklerindeki SOD enzim aktivitesinin mutanta göre önemli derecede düşük olduğu ortaya çıktı. Yabani tip bitki köklerindeki SOD enzim aktivitesi kontrole göre kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA uygulaması ile % 65 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ise aktivite kontrole göre 3,12 kat oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile SOD aktivitesi % 85 oranında artış gösterdi. Sadece tuz ihtiva eden ortamla kıyaslandığında ise, tuzla

birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki köklerindeki SOD aktivitesini % 41 oranında düşürdüğü belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki kökleri kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, SOD içeriğini % 14 oranında düşürdü. Tuz stresi altında ise mutant bitki köklerindeki enzim aktivitesi kontrole göre 2,23 katlık artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile artış önemsiz derecede gerçekleşti. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesinde % 54 oranında düşüş gerçekleşti.

Yabancı tip ile mutant bitki köklerinin enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, genel olarak mutant bitki köklerindeki enzim aktiviteleri yabancı tip bitkiye göre önemli derecede yüksek bulundu (Şekil 43).



Şekil 43. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin SOD aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

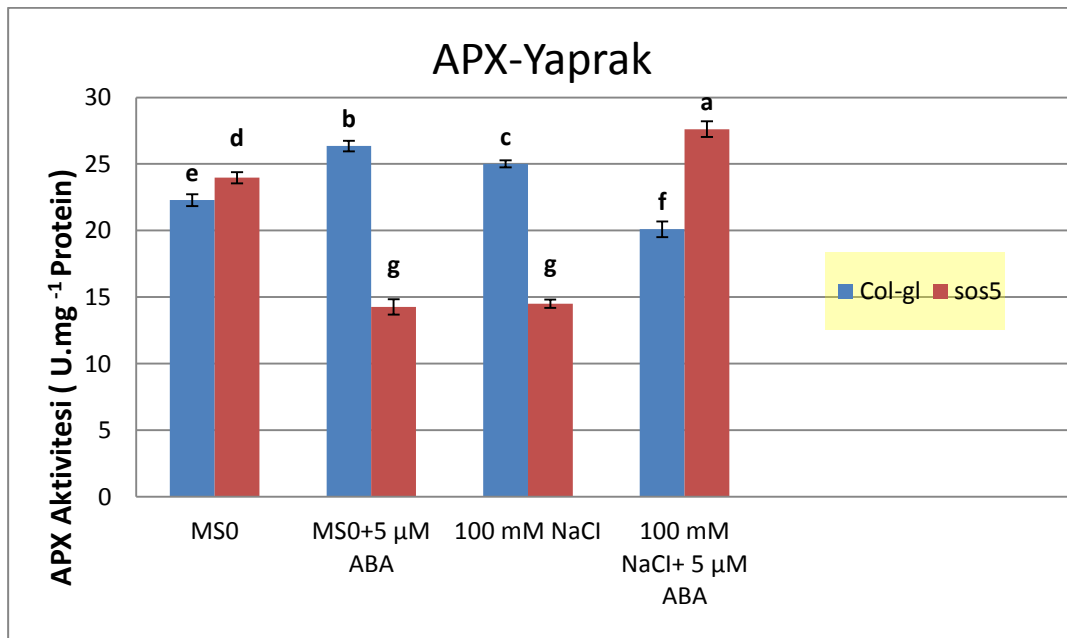
3.9.7. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5* (*fla4*) Mutant Bitki Yapraklarındaki APX Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin mutanta göre önemli derecede düşük olduğu belirlendi. Yabancı tip bitki yapraklarındaki APX enzim aktivitesi kontrole göre kıyaslandığında, stres

içermeyen şartlarda ABA uygulaması ile % 18 oranında artış olduğu belirlendi. Tuz stresi altında ise aktivite kontrole göre % 12 oranında artış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile APX aktivitesi % 10 oranında azaldı. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, tuzla birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki yapraklarındaki APX aktivitesini % 20 oranında düşürdüğü belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, APX içeriğini % 41 oranında azalttı. Tuz stresi altında ise mutant bitki yapraklarındaki enzim aktivitesi kontrole göre % 40 oranında azalış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile enzim aktivitesi % 15 oranında arttı. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesindeki artış ABA'nın etkisi ile 1,90 kat oranında bulundu.

Yabancı tip ile mutant bitki yapraklarının enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, özellikle tuz stresi altında yabancı tip bitki yapraklarındaki enzim aktivitesi mutanta göre önemli derecede yüksekken, tuz+ABA içeren ortamda bu oran tam tersine döndü ve mutant bitkinin enzim aktivitesi yabancı tipe göre önemli derecede yüksek bulundu (Şekil 44).



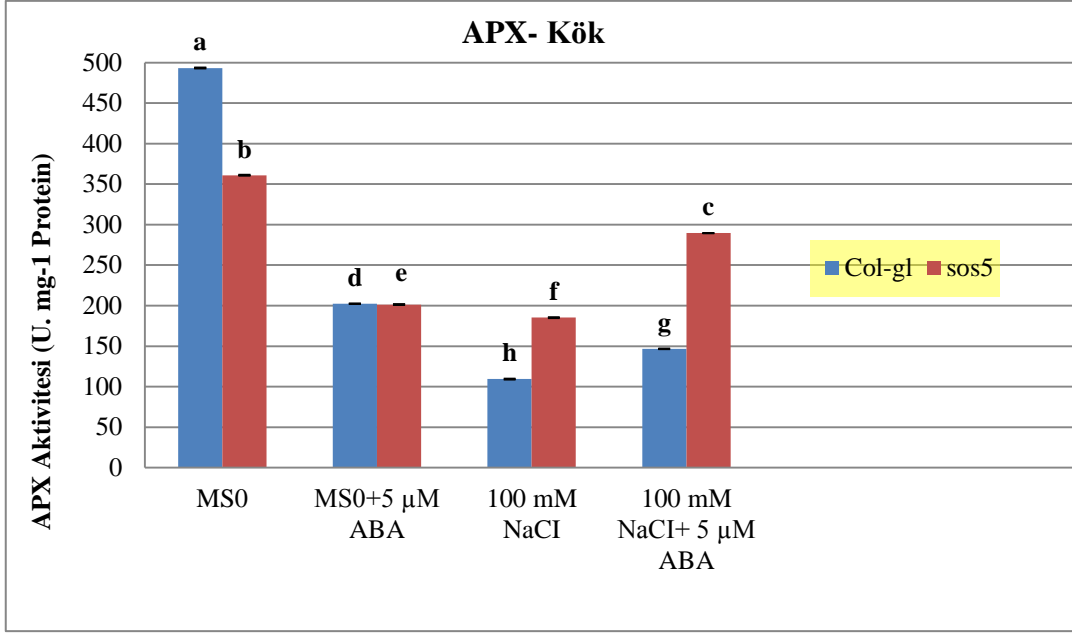
Şekil 44. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki yapraklarının APX aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

3.9.8. Tuz Stresi Altında ABA'nın *sos5 (fla4)* Mutant Bitki Köklerindeki APX Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip bitki köklerindeki APX enzim aktivitesi mutanta göre önemli derecede yüksek bulundu. Stres içermeyen şartlarda ABA uygulaması ile yabancı tip bitki köklerindeki enzim aktivitesi kontrole göre % 59 oranında azaldı. Tuz stresi altında ise aktivite kontrole göre % 78 oranında düşüş gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile APX aktivitesi % 70 oranında azaldı. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, tuzla birlikte ABA ilavesinin yabancı tip bitki köklerindeki APX aktivitesini % 34 oranında artırdığı belirlendi.

Diğer taraftan mutant bitki yaprakları kontrolle kıyaslandığında, stres içermeyen şartlarda ABA, APX içeriğini % 44 oranında azalttı. Tuz stresi altında ise mutant bitki köklerindeki enzim aktivitesi kontrole göre % 84 oranında azalış gösterdi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile enzim aktivitesi % 20 oranında azaldı. Sadece tuz ihtiva eden ortamlarla kıyaslandığında ise, enzim aktivitesindeki artışın ABA'nın etkisi ile 4,95 kat oranında olduğu bulundu.

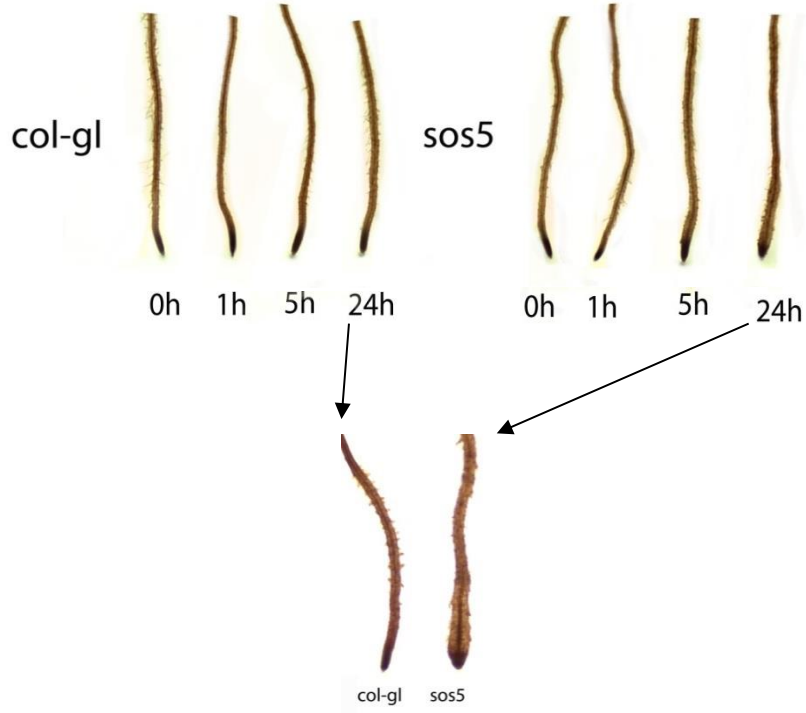
Yabancı tip ile mutant bitki köklerindeki enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, özellikle tuz stresi altında yabancı tip bitki köklerindeki enzim aktivitesi mutanta göre önemli derecede yüksek olarak bulundu. Bununla birlikte, tuz stresi altında ABA uygulaması ile her iki genotipte de aktivite artışı olurken mutant bitkideki artış yabancı tipe göre önemli derecede fazla olarak bulundu (Şekil 45).



Şekil 45. Tuz stresi koşullarında ABA'nın mutant bitki köklerinin APX aktivitesi üzerine etkisi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasıdır. Küçük harfler aynı sütun içerisindeki farkı gösterir. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi)

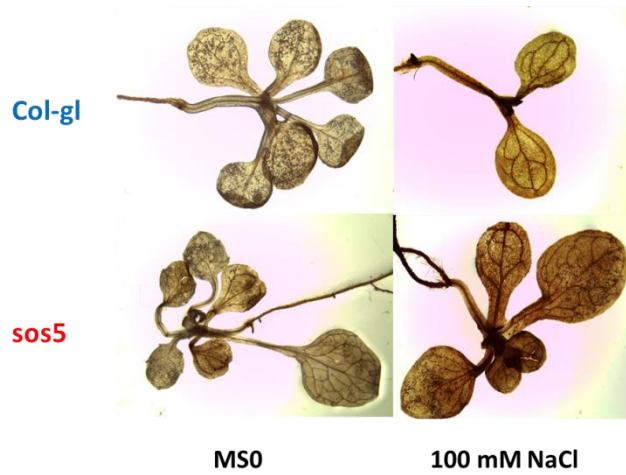
3.10. Tuz Stresi Altındaki Mutant Bitki Kök ve Yapraklarında ABA'nın Hidrojen Peroksit İçeriği Üzerine Etkisi

Tuz stresinin uygulanma süresine (saat) bağlı olarak Arabidopsis yabani tip ve mutant bitki köklerinde H_2O_2 miktarlarındaki değişim mikroskop altında çekilen fotoğraflarla Şekil 46'da gösterildi. Strese bağlı olarak oluşan H_2O_2 'yi yerleşim yerleriyle belirleyebilmek için DAB boyama yöntemi kullanıldı. Stres içermeyen koşullar altında her iki genotipin H_2O_2 miktarlarında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Ancak stresin artışına paralel olarak, mutant köklerinde özellikle kök ucu bölgesinde olmak kaydı ile H_2O_2 miktarında artış gözlemlendi. 24 saat sonunda yabani tip ile mutant köklerindeki renk değişimi kıyaslandığında, *sos5* mutant kökünde fenotipik değişime ek olarak rengin daha koyu olduğu yani daha fazla H_2O_2 biriktirdiği gözlemlendi.



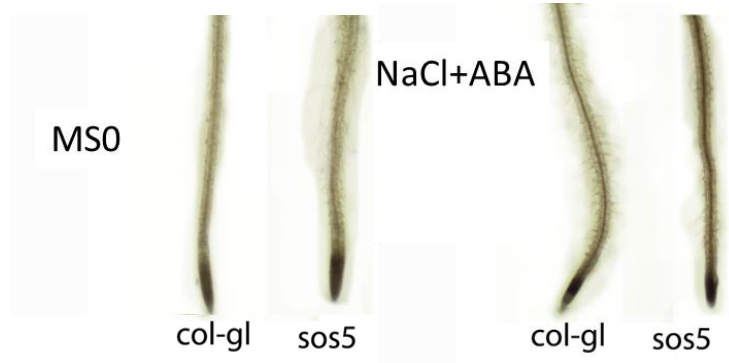
Şekil 46. Tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde muamele süresine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler

Kökteki sonuçlara benzer olarak, stres içermeyen ortamda yaprakların görünümü her iki genotipte de benzerken, 24 saat sonunda tuz stresine bağlı olarak mutant bitki yapraklarında yabani tipe oranla daha yüksek miktarda H_2O_2 birikimi olduğu gözlemlendi. Mikroskop altında çekilen fotoğraflar Şekil 47’de gösterildi.



Şekil 47. Tuz stresi koşullarında mutant bitki yapraklarında 24 saatlik tuz muamelesine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler

Tuz stresi altında ABA uygulamasının daha önceki çalışmalarımızda mutant bitkilerdeki tuza aşırı hassas kök fenotipini değiştirdiği ve yabani tipe benzer hale getirdiğini gözlemlemiştik. Bu etkinin içsel H_2O_2 içeriği ile bağlantısını görmek için, yabani tip ve mutant bitkiler stres içermeyen kontrol ve tuz+ABA ortamında 24 saat bekletildi. Mikroskop altında çekilen görüntüler Şekil 48’de gösterildi. Buna göre, stres altında ABA muamelesinin yabani tip ve mutant bitki köklerindeki içsel H_2O_2 miktarlarını dengelediği ancak mutant bitki kökünde yabani tipe göre kısmen bu miktarın fazla olduğu görüldü. Yine de yukarıdaki tuz stresi altındaki mutant kökü ile kıyaslandığında, rengin daha açık olduğu yani H_2O_2 miktarının düştüğü belirlendi.

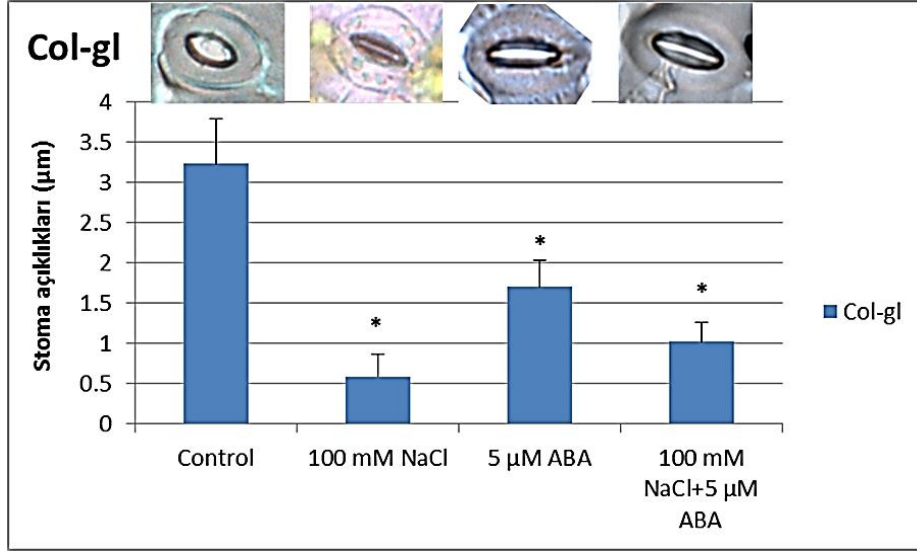


Şekil 48. Tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde ABA muamelesine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler

3.11. Tuz Stresi Altındaki *sos5* (*fla4*) Mutant Bitkilerinde ABA'nın Stoma Açıklıkları Üzerine Etkisi

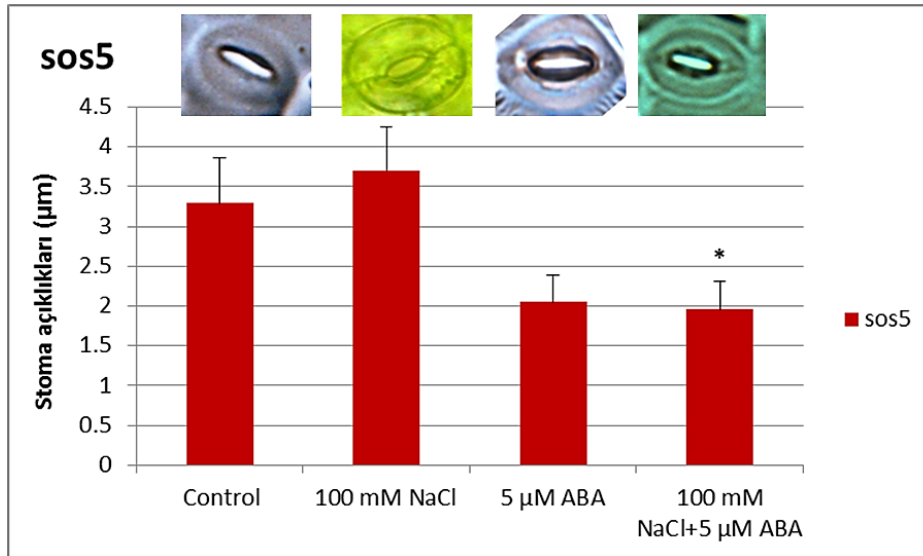
Tuz stresine karşı adaptasyon davranışlarından biri de bitkilerin su kaybını önlemek için stomalarını kapatmalarıdır ve ABA stomaların kapanmasını uyarır. Yabani tip ve mutant bitki stomaları 4 saat boyunca stres içermeyen MSO, 100 mM NaCl, ABA ve NaCl+ABA ihtiva eden solüsyonlarda bekletildi ve stoma açıklıkları ölçüldü.

Yabani tip bitki stomaları kontrolle kıyaslandığında, tuz stresi altında stomaların % 82 oranında kapandığı görüldü. Sadece ABA içeren ortamda kapanma % 47 oranında iken, tuz+ABA muamelesi ile stomalardaki kapanma % 68 oranında oldu (Şekil 49).



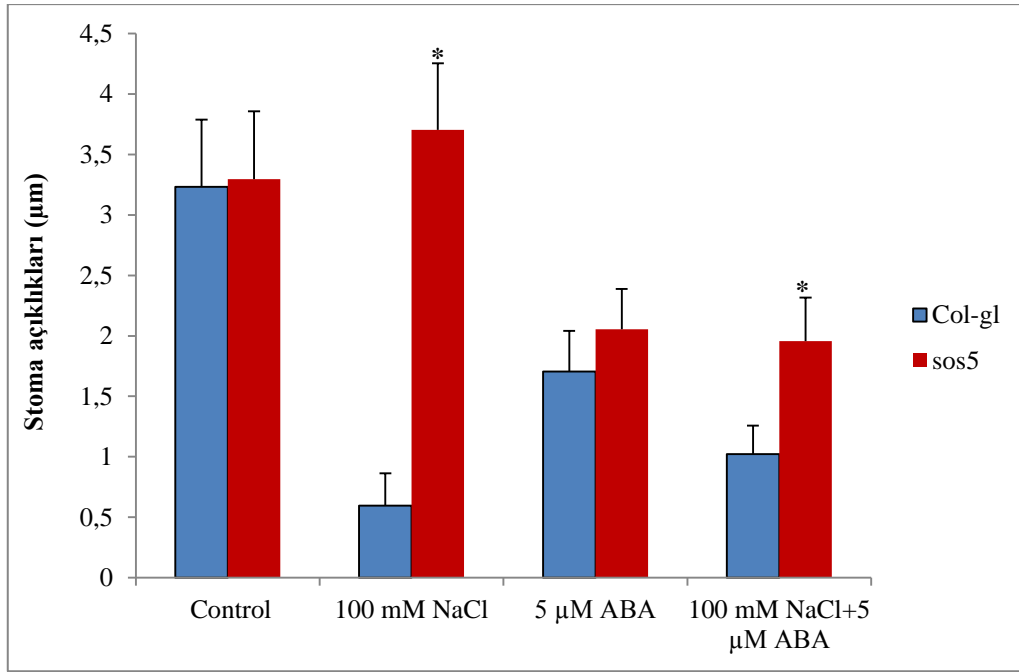
Şekil 49. Tuz stresi koşullarında yabani tip bitkilerde ABA muamelesine bağlı olarak stoma açıklığında meydana gelen değişimler (*: kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli ($P<0.001$) farkı göstermektedir (*Student-t* Testi). Kolonlar üzerindeki barlar tekerrürlere ait standart sapmadır)

Mutant bitki stomaları kontrol ile kıyaslandığında ise, tuz stresine ve sadece ABA muamelesine bağlı olarak önemli derecede bir değişim olmazken, tuz+ABA muamelesine bağlı olarak stomaların % 40 oranında kapandığı gözlemlendi (Şekil 50).



Şekil 50. Tuz stresi koşullarında mutant bitkilerde ABA muamelesine bağlı olarak stoma açıklığında meydana gelen değişimler (*: kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli ($P<0.001$) farkı göstermektedir (*Student-t* Testi). Kolonlar üzerindeki barlar tekerrürlere ait standart sapmadır)

Yabani tip ve mutant bitki stoma açıklıkları birlikte kıyaslandığında ise, stres içermeyen kontrol ortamında her iki genotipin açıklıkları özdeş bulundu. Tuz stresine bağlı olarak yabani tip stomaları kapanırken, mutant bitki stomalarının yabani tipe oranla % 84 gibi yüksek bir oranda açık olduğu tespit edildi. Sadece ABA uygulaması ile iki genotip arasında önemli derecede bir farklılık olmazken, tuz stresi altında ABA muamelesi ile mutant stomaları yabani tipe göre % 48 oranında önemli derecede açık bulundu (Şekil 51).

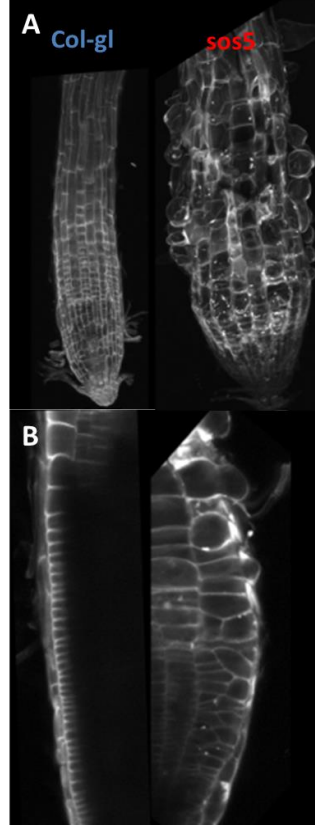


Şekil 51. Tuz stresi koşullarında yabani tip ve mutant bitkilerde ABA muamelelerine bağlı olarak stoma açıklıklarındaki değişimlerin karşılaştırılması (*: *Col-gl*'ya göre istatistik olarak önemli ($P<0.001$) farkı göstermektedir (*Student-t* Testi). Kolonlar üzerindeki barlar tekerrürlere ait standart sapmadır)

3.12. Tuz Stresi Altındaki *sos5* (*fla4*) Mutant Bitkilerinde ABA'nın Canlı Dokulardaki Kök Fenotipine Etkisi

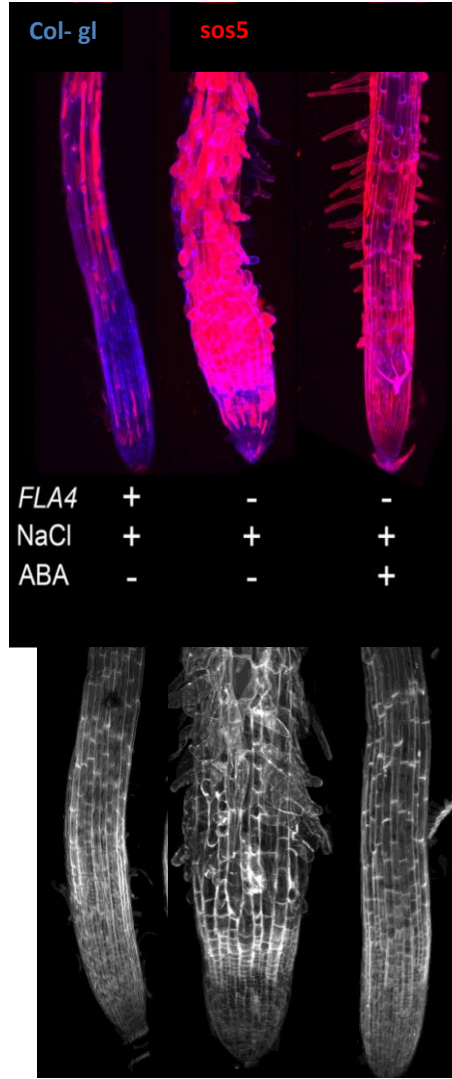
Tuz stresi altındaki *Arabidopsis thaliana* yabani tip ve mutant bitki köklerinde ABA'nın kök fenotipine etkisini daha yakından görebilmek amacı ile canlı dokularda konfokal mikroskop ile incelemeler yapıldı. Köklerdeki hücre dizilimlerini daha iyi görebilmek için hücre duvarına bağlanabilen Kalkoflur boyası kullanıldı. 24 saatlik NaCl muamelesinin ardından, mutant bitki kök anatomisi hücrelerin dizilimi ve selülozik yapıların bozulması ile yabani tipe göre ciddi biçimde farklılık gösterdi. Ayrıca, mutant

kök yapısının yabani tipe göre oldukça kısa ve kalın, hücrel genişlemelerin anormal bir biçimde olduğu gözlemlendi (Şekil 52).



Şekil 52. Tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler. Kökün tamamındaki fenotipik değişim (A) ve yakından trikoma görünüşleri (B).

Diğer taraftan, tuz stresi altında ABA ilavesi ile mutant bitki kökünün ciddi biçimde normale döndüğü ve hücrel yapıların daha organize şekil alarak yabani tipe ayırt edilemez hale geldiği gözlemlendi. Tuz stresi altında yabani tip ve mutant bitki kökündeki ABA'ya bağlı değişimler kıyaslamalı olarak Şekil 53'te gösterildi.



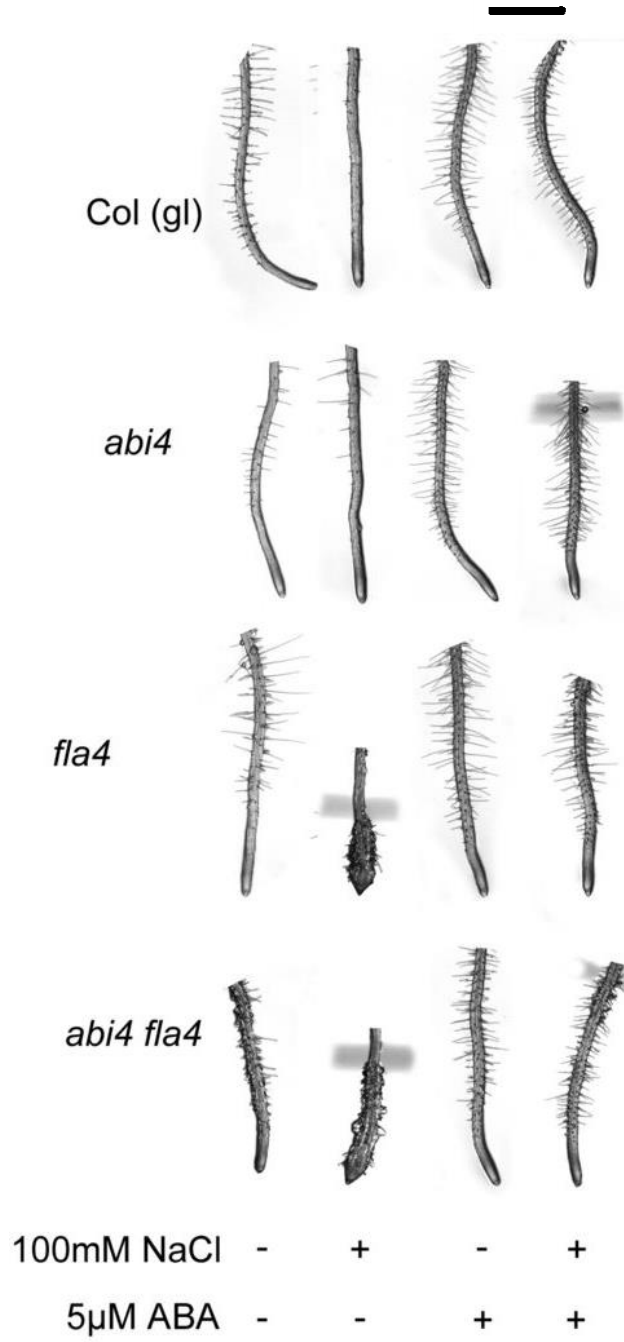
Şekil 53. Tuz stresi koşullarında mutant bitkilerde ABA muamelesine bağlı olarak kök fenotiplerinde meydana gelen değişimlerin karşılaştırılması (24 h. 100 mM NaCl'da bekletilen bitkilerin % 0,1 kalkoflor ile boyanması)

3.13. Tuz Stresi Altındaki *sos5 (fla4)* Mutant ve Çift Mutant Bitkilerinde ABA'nın Kök Fenotipine Etkisi

SOS5 geninin tuz stresine tolerans sağlamadaki olası rolünü test etmek amacı ile ABA'ya cevapta rol alan regülatörlerle ilişki kurarak, *abi4* ve *abi5* gibi ABA'ya duyarsız mutantlar ve *cpl1*, *cpl3* ve *sad1* gibi ABA'ya duyarlı mutantlar ile *sos5* mutant bitki arasında çaprazlamalar yaparak elde ettiğimiz çift mutantların tuz stresi altındaki kök fenotiplerini karşılaştırdık.

3.13.1. Tuz Stresi Altındaki *abi4-1 sos5 (abi4 fla4)* Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri

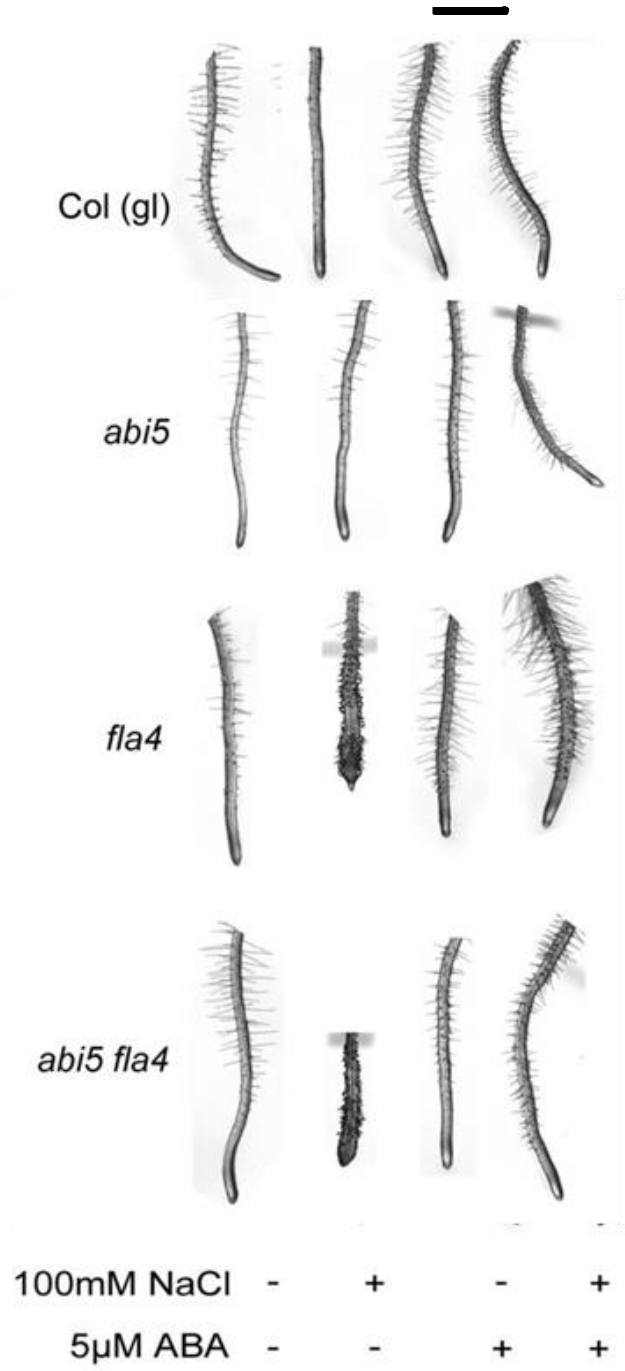
ABI4 lokusu ABA'ya cevapta pozitif bir regülatör gibi görev yapar ve bu gen lokusunda meydana gelen mutasyonla elde edilen mutant bitki ABA'ya duyarsız hala gelir. Yapılan çalışmada, *abi4* tek mutanti ne kontrol ne de stres ortamında belirgin bir değişim göstermezken, stres içermeyen MS0 ortamında yabani tip, *abi4* ve *sos5 (fla4)* tek mutant kontrollerine göre, *abi4 sos5* çift mutant kök fenotipinde bozulmalar görüldü. Tuz stresi altında ise, *sos5*'in bilinen hassasiyetine benzer olarak *abi4sos5* çift mutanti da şişkin ve kısa bir kök fenotipi seyledi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile hem *sos5* tek mutant bitki kökü hem de *abi4 sos5* çift mutant bitki kökü yabani tipe benzer şekilde normal hale döndüler. *SOS5* geni ve *ABI4* geni arasındaki ileri sürülen genetik sinerji Şekil 54'de karşılaştırmalı olarak gösterildi.



Şekil 54. Tuz stresi koşullarında *sos5* mutant ve *abi4 sos5* çift mutant bitki köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler (Ölçek çubuğu= 1mm)

3.13.2. Tuz Stresi Altındaki *abi5-1 sos5 (abi5 fla4)* Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri

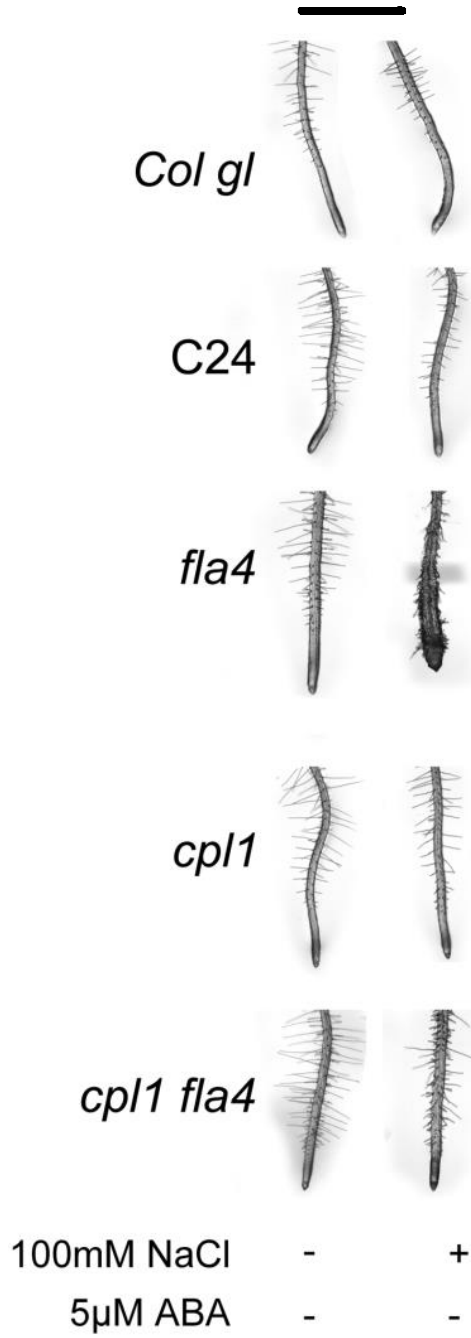
ABI5 lokusu ABA'ya cevapta pozitif bir regülatör gibi rol alan diğer bölgedir ve *ABI4*'e benzer şekilde, mutant bitki ABA'ya duyarsızlık gösterir. Yapılan çalışmada, *abi5* tek mutanı ne kontrol ne de stres ortamında belirgin bir değişim göstermedi. Stres içermeyen MS0 ortamında yabani tip, *abi5* ve *sos5 (fla4)* tek mutant kontrollerine göre, *abi5 sos5* çift mutant kök fenotipinde her hangi bir değişim görülmedi. Tuz stresi altında ise, *sos5*'in bilinen hassasiyetinden farklı olarak *abi5 sos5* çift mutanı yabani tipe oranla bozulmuş bir kök fenotipi sergiledi. Tuz stresi altında ABA muamelesi ile hem *sos5* tek mutant bitki kökü hem de *abi5 sos5* çift mutant bitki kökü yabani tipe benzer şekilde normal hale döndüler. *SOS5* geni ve *ABI5* geni arasında *ABI4*'te rastlanan bariz etki görülmedi. *SOS5* geni ve *ABI5* geni arasındaki bariz olmayan genetik etkileşimler Şekil 55'de karşılaştırmalı olarak gösterildi.



Şekil 55. Tuz stresi koşullarında *sos5* mutant bitki ve *abi5 sos5* çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler (Ölçek çubuğu= 1 mm)

3.13.3. Tuz Stresi Altındaki *cpl1-1 sos5 (cpl1 fla4)* Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri

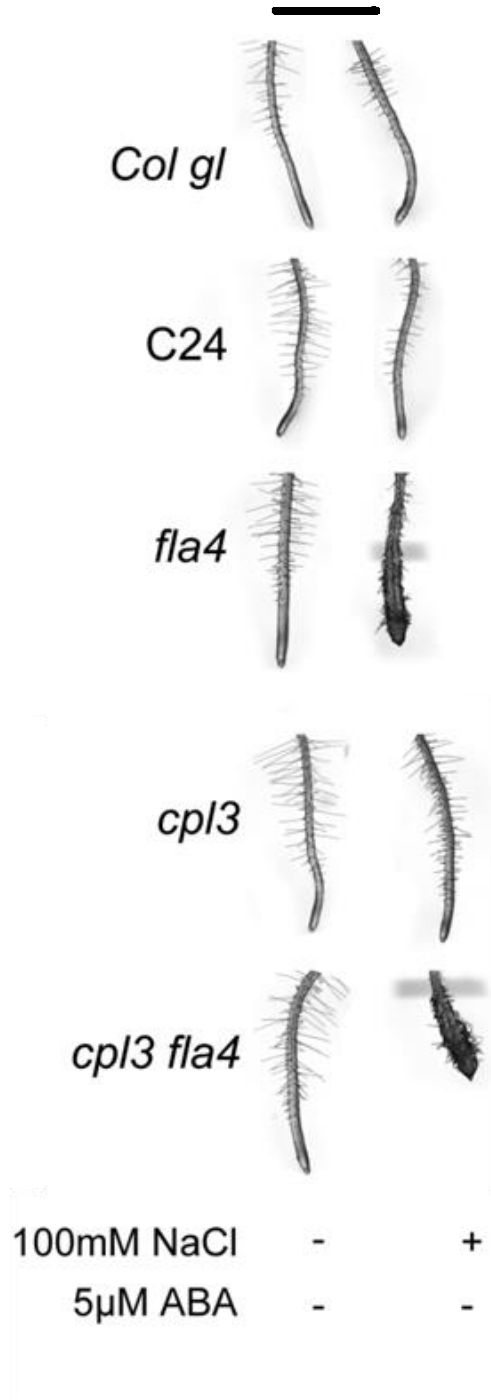
CPL1 lokusu ABA'nın negatif bir regülatörüdür ve mutanti ABA'ya aşırı hassasiyet gösterir. Yapılan çalışmada, stres içermeyen MS0 ortamında yabancı tip, *cpl1* mutantının arka planı olan (background) C24 kontrolü, *sos5* ve *cpl1* tek mutantları ile *cpl1 sos5* çift mutanti arasında bariz bir farklılık görülmedi. Tuz stresi altında aynı bitkiler kıyaslandığında, *sos5* mutanti beklenen şekilde tuza aşırı hassasiyet göstererek, kısa ve kalın bir kök fenotipi sergiledi. Ancak, *cpl1 sos5* çift mutantının tuz stresi altında yabancı tipe benzer şekilde normal kök yapısına döndüğü gözlemlendi. Bu durum içsel ABA miktarının artması ile tuz stresi altında aşırı hassas *sos5* kök fenotipinin baskılandığını gösterdi. *SOS5 (FLA4)* geni ile *CPL1* genleri arasındaki olası antogonistik ilişki Şekil 56'da gösterildi.



Şekil 56. Tuz stresi koşullarında *sos5* mutant bitki ve *cpl1 sos5* çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler (Ölçek çubuğu= 2 mm)

3.13.4. Tuz Stresi Altındaki *cpl3-1 sos5 (cpl3 fla4)* Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri

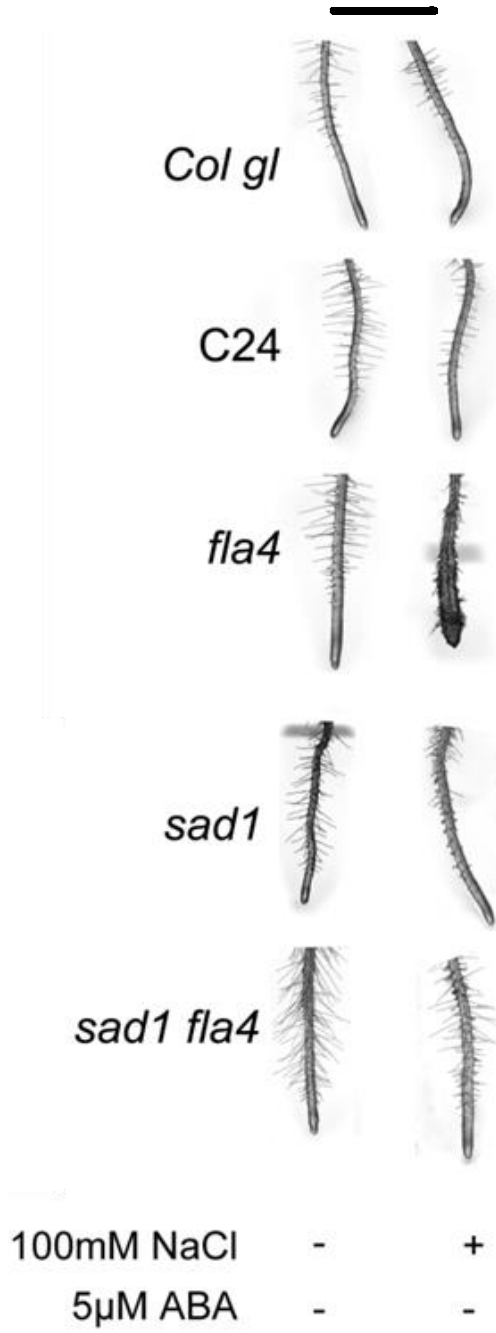
CPL3 lokusu ABA'ya cevapta rol alan negatif regülatörlerden biridir ve mutanti ABA'ya aşırı hassasiyet göstermesi ile karakterize edilir. Yapılan çalışmada, stres içermeyen MS0 ortamında mutantlar arasında bariz bir değişim gözlenmezken, tuz stresi altında *sos5* tek mutanti ve *cpl3 sos5* çift mutantının benzer şekilde aşırı hassas kök fenotipi geliştirdikleri görüldü. Hatta *cpl3 sos5* çift mutantındaki hassasiyetin daha fazla olduğu görüldü. Tuz stresi altında mutant bitki kök fenotipleri Şelil 57'de karşılaştırmalı olarak gösterildi.



Şekil 57. Tuz stresi koşullarında *sos5* mutant bitki ve *cpl3 sos5* çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler (Ölçek çubuğu= 2 mm)

3.13.5. Tuz Stresi Altındaki *sad1-1 sos5 (sad1 fla4)* Çift Mutant Bitkilerinde Kök Fenotipleri

SAD1 lokusu ABA'nın negatif regülatörlerinden biridir ve mutant bitkilerinde ABA'ya aşırı hassasiyet gözlenir. Yapılan çalışmada, stres içermeyen MS0 ortamında yabani tip kontrollerle mutant bitki kökleri arasında bariz bir farklılık olmadığı görüldü. Bununla birlikte, tuz stresi altında *sos5* tek mutantı tuza aşırı hassas kök fenotipi geliştirirken, *sad1 sos5* çift mutant bitki köklerinin tuz stresi altında normal kök fenotipi sergiledikleri ortaya çıktı. *SOS5 (FLA4)* geni ile *SAD1* genleri arasındaki olası antagonistik ilişki Şekil 58'de gösterildi.



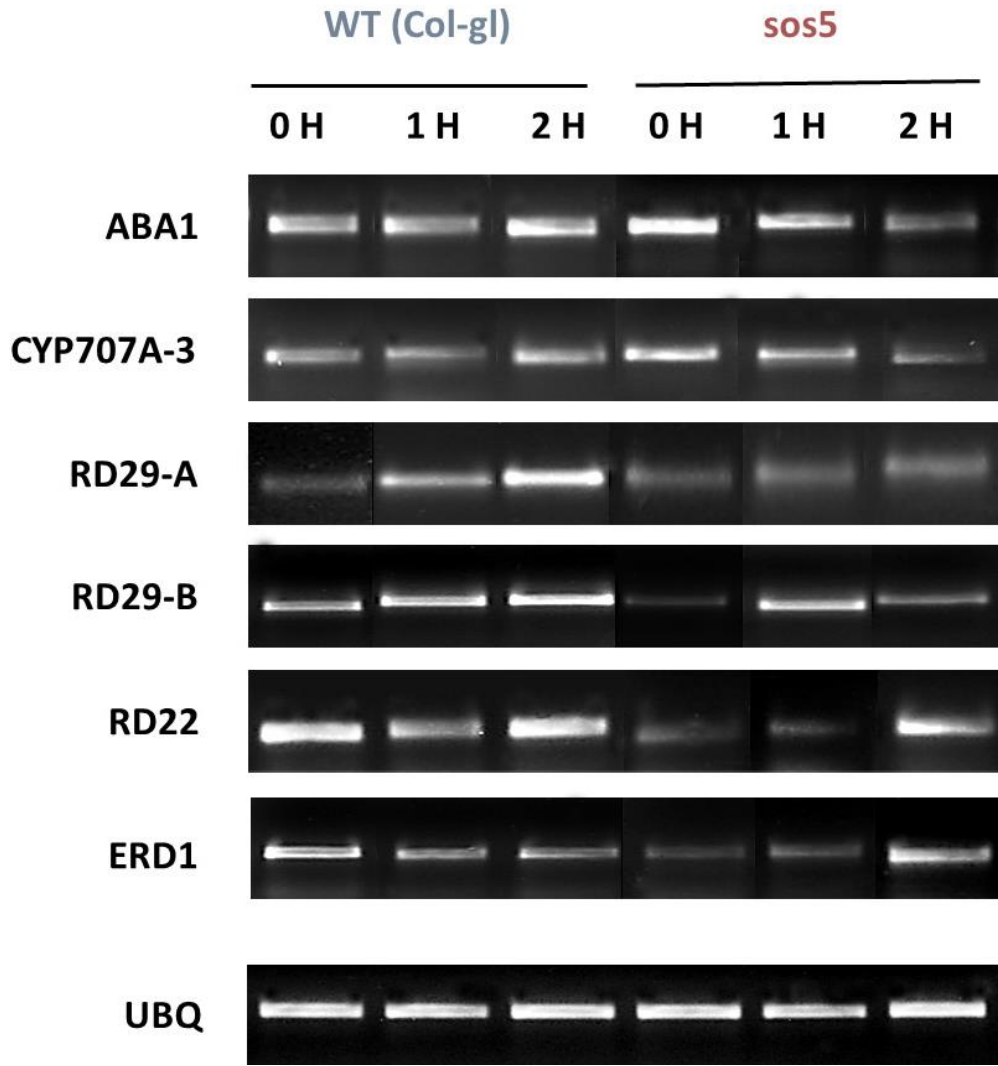
Şekil 58. Tuz stresi koşullarında *sos5* mutant bitki ve *sad1 sos5* çift mutant köklerinde meydana gelen fenotipik değişimler (Ölçek çubuğu= 2 mm)

3.14. Tuz Stresi Altındaki Mutant Bitki Köklerinde Gen İfade Oranlarının Karşılaştırılması

3.14.1. RT-PCR (Semi-quantitatif Revers Transkriptaz PCR) Metodu ile Gen İfade Farklılıklarının Gösterilmesi

UBQ geni referans olarak kullanılarak tuz stresine maruz kalma süresine bağlı olarak *ABA1*, *CYP707A-3*, *RD29 A*, *RD29B*, *RD22* ve *ERD1* genlerinin agaroz jel üzerine transkript seviyelerine bakıldı. Tuz stresi içermeyen MS0 ortamında, mutant bitkide *ABA1* geninin yabancı tipe oranla daha fazla ifade olduğu görüldü. 1 saatlik tuz stresi altında yabancı tipte bu gen kısmen daha fazla ifade olurken, 2 saatlik stres muamelesinin ardından mutant bitkideki gen ifadesi yabancı tipe göre azalma gösterdi. Benzer şekilde *CYP707A-3* geni stres içermeyen ortamda mutant bitki köklerinde yabancı tipe göre daha fazla ifade olurken, özellikle 2 saatlik stres muamelesi sonrası, mutanttaki gen ifadesi yabancı tipe göre düşüş gösterdi.

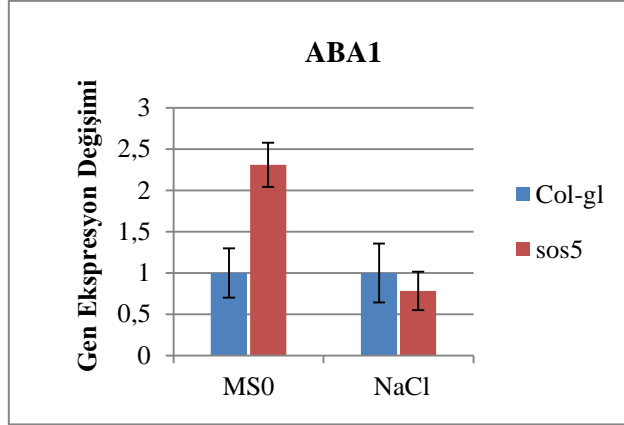
RD29 A geni stres içermeyen kontrol ortamında mutant bitki köklerinde yabancı tipe oranla daha fazla ifade olurken, stres uygulamasına bağlı olarak düşüş gösterdi. Diğer taraftan, *RD29 B* geni stres içermeyen ortamdaki mutant bitki köklerinde yabancı tipe oranla daha az ifade oldu ve stres muamele süresine bağlı olarak yabancı tipe oranla düştü. *RD22* geni, benzer şekilde MS0 ortamında ve stres şartları altında mutant bitki köklerinde yabancı tipe oranla daha az ifade oldu. *ERD 1* geni ise, stres içermeyen ortamda mutant bitki köklerinde yabancı tipe göre az ifade olurken, stres muamelesine bağlı olarak mutant bitkide yabancı tipe oranla daha fazla ifade edildiği görüldü. Yabancı tip ve mutant bitki köklerinde bahsedilen genlerin ifade düzeyleri, karşılaştırmalı olarak Şekil 59'da gösterildi.



Şekil 59. Tuz stresi koşullarında süreye bağlı olarak mutant bitki köklerindeki genlerin ifade değişimleri

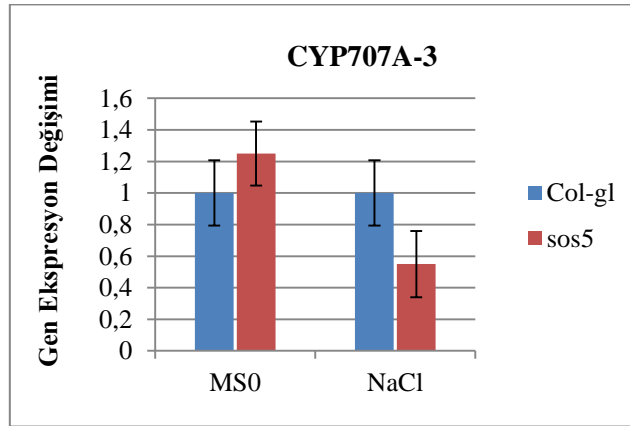
3.14.2. qPCR (Real Time PCR) Metodu ile Gen İfade Farklılıklarının Gösterilmesi

Jel üzerinde gösterilen ifade farklılıklarını gerçek zamanlı olarak grafik üzerinde göstermek için qPCR metodu ile yabani tip bitkiye oranla mutant bitki kökündeki gen ifade düzeylerini gösterdik. Şekil 60'da görüldüğü gibi, stres içermeyen ortamda *ABA1* geninin mutant bitki köklerinde yabani tipe göre 2,3 kat fazla ifade olduğu ancak tuz stresi altında ifade oranının kısmen düştüğü belirlendi.



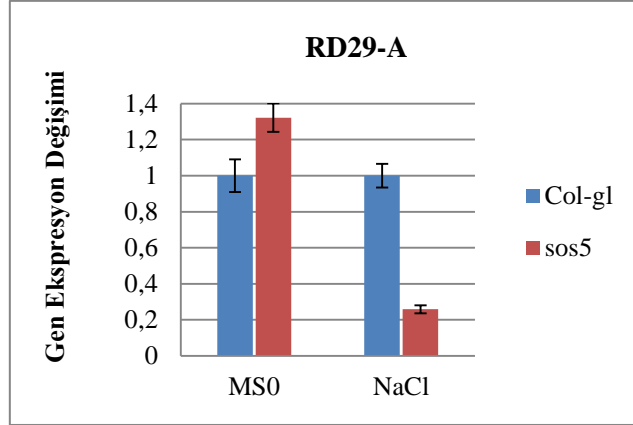
Şekil 60. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki *ABA1* geninin ifade değişimi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

Şekil 61’de gösterildiği üzere, stres içermeyen ortamdaki *CYP707A-3* geni, mutant bitki köklerinde yabani tipe oranla 1.25 kat fazla ifade olurken, stres uygulamasına bağlı olarak mutant bitkideki ifade oranı yabani tipe göre yarı yarıya düşüş gösterdi.



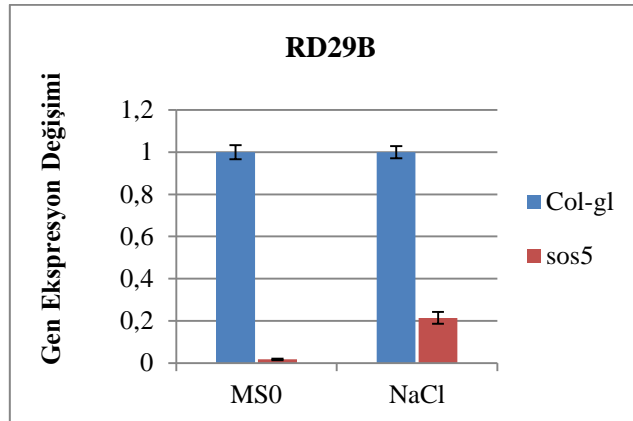
Şekil 61. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki *CYP707A-3* geninin ifade değişimi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

Şekil 62’de görüldüğü gibi, *RD29A* geninin ifade düzeyi stres içermeyen ortamda mutant bitki kökünde 1,32 kat fazla olurken, stres uygulamasının ardından mutant bitkide $\frac{1}{4}$ oranında düşüş gösterdi.



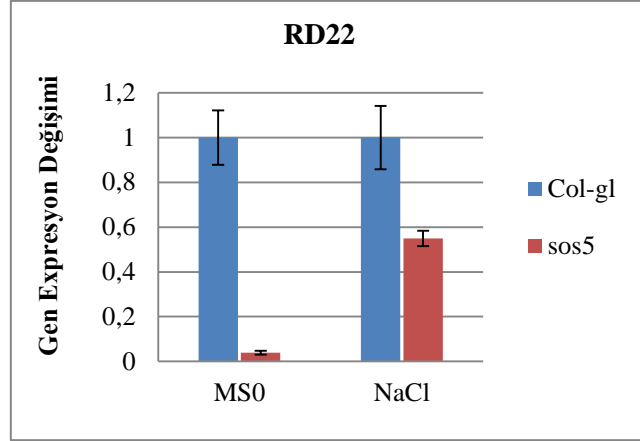
Şekil 62. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki *RD29-A* geninin ifade değişimi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

RD29B geni ise, stres içermeyen ortamdaki mutant bitki kökünde yabancı tipe oranla ciddi biçimde az ifade olurken, stres uygulamasının ardından yükseliş göstermesine rağmen, mutant bitkide yabancı tipe oranla 4,6 kat daha az ifade olduğu görüldü (Şekil 63).



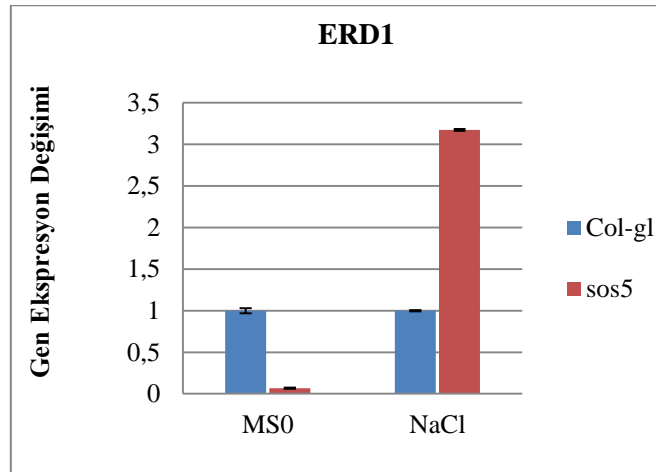
Şekil 63. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki *RD29-B* geninin ifade değişimi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

Stres içermeyen şartlarda *RD22* geni, mutant bitki kökünde yabancı tipe oranla 25 kat daha az ifade olduğu görüldü. Tuz stresi uygulamasının ardından ise, mutant bitki kökündeki gen ifadesi artış gösterdi ancak yabancı tipe göre 1,8 kat daha az ifade olduğu belirlendi (Şekil 64).



Şekil 64. Tuz stresi koşullarında (2 h) yabancı tip ve mutant bitki köklerindeki RD22 geninin ifade değişimi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

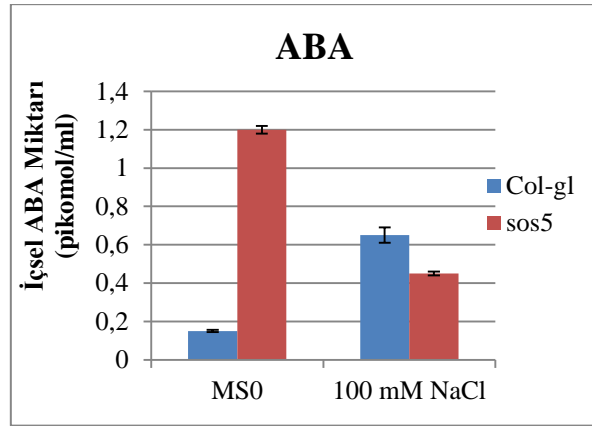
Son olarak Şekil 65’de görüldüğü üzere *ERD1* geninin ifade düzeylerine bakıldı. Stres içermeyen ortamda mutant bitki köklerinde bu genin yabancı tipe oranla 14,3 kat az ifade olduğu görüldü. Tuz stresi uygulamasının ardından ise mutant bitki kökündeki ifade düzeyi yabancı tipe oranla ciddi biçimde artış gösterdi ve yabancı tipe göre 3,17 kat fazla ifade olduğu bulundu.



Şekil 65. Tuz stresi koşullarında (2 h) mutant bitki köklerindeki ERD1 geninin ifade değişimi (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

3.15. Tuz Stresi Altındaki Mutant Bitki Köklerinde İçsel ABA Miktarlarının Tayin Edilmesi

3-4 gün MS0 besi ortamında büyütülüp, MS0 kontrol ve 100 mM NaCl ihtiva eden besi ortamlarına transfer edilen bitki fideleri, 3 gün bekletildikten sonra hasat edildi ve içsel ABA miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 66'da tablo halinde sunuldu. Stres içermeyen MS0 ortamında mutant bitki köklerindeki içsel ABA miktarının yabani tipe göre 8 kat fazla olduğu bulundu. Tuz şartları altında ise, yabani tip bitki köklerinde stres içermeyen ortama göre 4,3 kat artış olurken, mutant bitki köklerindeki içsel ABA miktarının stres içermeyen ortama göre 2,6 kat azaldığı belirlendi. Tuz stresi altında yabani tip ve mutant bitki köklerindeki içsel ABA miktarları kıyaslandığında ise, yabani tipin mutanta göre 1,4 kat kadar fazla içsel ABA biriktirdiği görüldü.



Şekil 66. Tuz stresi koşullarında (3. günün sonunda) mutant bitki köklerindeki içsel ABA miktarları (Kolonlar üzerindeki barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada tuz stresi koşullarında *Arabidopsis thaliana* *SOS5* (*FLA4*) geninin fonksiyonunu aydınlatmak ve ABA'nın bu gen bölgesi ile ilişkisini belirlemek amacıyla köklere bazı bitki büyüme düzenleyiciler ile biyoaktif bileşikler uygulanarak bu genin kökün fenotipine etkileri incelenmiştir. Buna paralel olarak, *sos5* mutanlığı ile ABA ilişkili mutanlar arasında çaprazlamalar yapılarak bu genin ABA'ya cevapta rol alan yollarla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca yabancı tip ve *sos5* mutanlığı bitki kök ve yapraklarında ABA'nın stres toleransını sağlamada antioksidan sistemi uyardığı rolü araştırılmıştır. Öte yandan, tuz stresi ile ilişkili olarak reaktif oksijen türlerinden olan H_2O_2 'nin mutanlığı ve yabancı tip bitkilerdeki değişimine bakılmıştır. İlave olarak, tuz stresi altında *SOS5* geninin ABA ile ilişkisini anlayabilmek için ABA biyosentezi ve katabolizmasında görev alan genler ile abiyotik streslere cevapta ABA'ya bağımlı ve ABA'dan bağımsız olarak uyarılan çeşitli genlerin ifade düzeylerine bakılmıştır.

Mevcut çalışmada, öncelikle tuz stresi koşullarında kök fenotipindeki değişimler gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, *Arabidopsis thaliana* bitkisinin *SOS5* lokusunun yüksek tuz stresi koşullarında normal hücre gelişimi için gerekli olduğu ve *sos5* mutanlarının tuz stresi koşullarında büyütüldüğünde, kısa kök fenotipi ve kök uzama bölgesinde ışınal şişkinliklerin olduğu belirlenmiştir (Shi vd., 2003; Xu vd., 2008). Bu anormal kök fenotipinin stres toleransında önemli rolü olan absisik asit fitohormonunun eksikliğinden kaynaklanması muhtemeldir. Absisik asitin, bitkilerde tuz stresi başta olmak üzere birçok abiyotik stres durumlarına cevapta önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Ahmad vd., 2010). Yine, dıştan ABA muamelesinin ABA yoksun mutanlarda normal hücre genişlemesi ve büyümesini yeniden sağladığı belirtilmiştir (Finkelstein, 2013). ABA'nın stres toleransını birçok yolla ilişkili olarak sağlaması, mevcut çalışmada bu fitohormonun kullanılmasında etkili olmuştur. Öncelikle en etkili ABA konsantrasyonunu belirlemek için 0,5 μ M ile 100 μ M gibi geniş bir aralıkta kökler test edilmiş ve 5 μ M ABA'nın tuz stresi ortamında *sos5* fenotipini baskıladığı ve yabancı tiple çok benzer bir görünüme sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç *SOS5*'in ABA sinyalizasyonu ile karşılıklı etkileştiğini göstermektedir. Araştırmalarımızda dıştan uygulanan ABA, *sos5* mutanlığının tuz stresi koşullarında hem aşırı hassas kök fenotipini hem de kısa olan kök uzunluğunu baskılamıştır. Bu durum tuz stresi altında *sos5* mutanlığının stresle başa çıkmak için yeterli

ABA üretmediği düşüncesini desteklemekte ve dıştan uygulama ile toleransın yeniden sağlanabildiği görülmektedir. Nitekim çalışmamızda tuz stresi altında yabancı tipte kontrole göre içsel ABA miktarı artarken, *sos5* mutantında azalma kaydedilmiştir. Sonuçlarımıza paralel olarak, dıştan ABA uygulamasının domates, mısır, bezelye ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde ozmotik strese ve patates bitkisinde ise tuz stresine karşı koruyucu etkileri olduğu rapor edilmiştir (Jin vd., 2000; Jiang ve Zhang., 2001; Xiong vd., 2006; Etehadnia vd., 2008; Özfıdan vd., 2013).

Çalışmamızda ABA reseptörleri ile *SOS5* geni arasındaki ilişkiyi araştırmak için, ABA reseptörlerinden olan pyrabaktin kimyasalı kullanılmıştır. Pyrabaktin, sentetik bir tohum çimlenme ve hipokotil büyüme inhibitörüdür ve ABA ile benzer şekilde ilgili transkripsiyon faktörlerini etkileyerek gen ekspresyonunu uyarır (Zhao vd., 2007; Park vd., 2009; Puli ve Raghavendra, 2012). Ayrıca, pyrabaktinin, PYR/PYL tip ABA reseptörü ile aynı yönde etki eden seçici bir yapı olduğu ve diğer olası ABA reseptörleri ile etkileşmediği bildirilmiştir (Park vd., 2009; Klingler vd., 2010). Elde ettiğimiz bulgularda, ABA ile paralellik göstermiş ve tuz stresi altında pyrabaktinin *sos5* mutantının kök fenotipini baskıladığı görülmüştür. Bu denemelerimiz sonucunda, sinyalizasyon yolunun merkezi olan ABA'nın devreye girmesinin *sos5*'in tuza aşırı hassas kök fenotipini baskılamak için yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

İçsel ABA seviyesini düşürmek amacıyla bir ABA inhibitörü olan fluridon (Nambara ve Marion-Poll, 2005; Hsu vd., 2014) uygulanması yapılarak, *SOS5* ile ABA arasındaki olası ilişki daha net aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu uygulamayla tuz stresi altında ABA'nın inhibe edilmesi sonucunda her iki genotipte (*Col-gl* ve *sos5*), *sos5* mutantının tuz stresi altında ortaya çıkan kök fenotipine benzer şekilde kök deformasyonlarının olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, *SOS5*'in ABA ile aynı yönde pozitif etki gösterdiği konusundaki düşüncelerimizi doğrulamaktadır. Bununla beraber, mevcut çalışmada tuz stresi altında normal kök gelişimi için *SOS5* mevcudiyetinin ve ABA biyosentezinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, fluridon inhibitörünün bitkilerde çeşitli yan etkiler gösterme olasılığından dolayı bu varsayımların genetik olarak da doğrulanmasına ihtiyaç duyulmuştur.

İçsel ABA seviyesini artırmak için yapmış olduğumuz diğer bir denemede ABA-8'-hidroksilazı engelleyen ve CYP707A'nın spesifik inhibitörü olan abscinazole E2B kullanılmıştır. Denemelerimiz sonucunda yüksek tuz stresi altında ABA katabolizmasının engellenmesi ile *sos5*'deki tuza aşırı hassas kök yapısının baskılandığı bulunmuştur. Bu

sonuç daha önceki bulgularımızı destekler nitelikte olup, ABA ile *SOS5*'in sinerjistik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar birlikte ele alındığında, *sos5* mutant bitkisinin tuza aşırı hassas kök fenotipi göstermesi, hücre içi ABA düzeyinin veya hassasiyetinin tuz stresine karşı denge oluşturmak için yeterli düzeyin altında olabileceği şeklinde açıklanabilir. Okazaki vd. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada, belirli konsantrasyonlarda AbsE2B'nin ABA katabolizmasını engelleyerek, *Arabidopsis* tohum çimlenmesini baskıladığını göstermişlerdir. Ayrıca, Zhu vd. (2010) tarafından *Arabidopsis* bitkileri ile yapılan çalışmada, tuza hassas olan bitki genotipinin yüksek tuz stresi altında yabancı tipe göre daha az ABA biriktirdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak mevcut araştırma verilerine dayanılarak içsel ABA düzeyindeki azalmanın, düşük ABA biyosentezi veya yüksek düzeyde ABA katabolizması sonucu ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Yapmış olduğumuz diğer denemede, *SOS5* fonksiyonunu yitiren *sos5* mutant bitki tohumlarının belirli konsantrasyonlarda ABA'ya daha az hassas olduğu, yabancı tipte hassasiyetin artarak çimlenme oranının düştüğü gözlemlenmiştir. Literatür bilgisine göre tohum dormansisi bitkilerin zamansız çimlenmelerine engel olarak, tohumun uygun çevresel şartlara kendini ayarlamasını sağlayan bir adaptasyon davranışı olarak izah edilmektedir. Bitki hormonu ABA'nın ise bu süreçte tohum dormansisini devam ettirerek, çimlenmeyi inhibe ettiği belirtilmiştir (Zhang vd., 2013). Elde ettiğimiz bulgulara göre, *SOS5*'in ABA sinyal iletiminde pozitif regülatör olarak rol aldığı ve böylece tuz stresine tolerans sağlayabileceği söylenebilir.

ABA'nın tuz stresi altında lipid peroksidasyonuna etkisini araştırmak için, yapılan denemelerde hem yaprak hem de köklerden alınan numunelerde, tuz stresinin her iki genotipte de MDA artışına neden olduğu, ancak tuza hassas olan *sos5* mutantındaki artışın daha fazla olduğu bulunmuştur. Tuz stresi ortamına ABA ilavesinin ise özellikle mutant bitki kök ve yapraklarında MDA miktarında düşüşe neden olarak, koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak Xiong ve ark., (2006)'nın yapmış oldukları çalışmada, kuraklık stresi altında ABA ilavesinin iyileştirici etkisi olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda tuza hassasiyeti yüksek *Arabidopsis* genotiplerinin tuz stresi koşullarında aşırı Na^+ biriktirdiği ve MDA miktarlarının kontrole göre önemli derecede arttığı rapor edilmiştir (Shi vd., 2014).

Tuz stresi koşullarında ABA'nın içsel prolin üzerine etkisini araştırmak için yapılan denemelerde, mutant bitki köklerindeki prolin miktarı yabancı tip bitkilere göre düşük bulunmuştur. Diğer taraftan, stres+ABA muamelesi sonucunda prolinin her iki genotipte

benzer bir artış gösterdiği görülmüştür. Benzer şekilde tuz stresi koşullarında mutant bitkilerin yabancı tipe oranla yapraklarında prolin miktarı düşüş göstermiş, ancak ortama ABA ilavesi ile prolin miktarının arttığı tespit edilmiştir. Bu durum *sos5* mutant bitki köklerinin yeteri kadar prolin sentezleyemediği için tuza aşırı hassas olduğunu düşüncesini ortaya koymuştur. Tuz ortamına ABA ilavesi ile her iki genotipte prolin miktarları artmıştır. Koca vd. (2007) yapmış oldukları çalışmada, tuz stresine toleranslı susam çeşitlerinde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak, tuz stresi altında, hassas olanlara göre prolin birikiminin arttığını kaydetmişlerdir. Bununla birlikte, çeltik bitkisinde yapılan çalışmalarda, tuz stresi altında ABA'nın OsP5CS1 gen ekspresyonunu uyararak prolin birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (Sripinyowanich vd., 2013). Ayrıca çalışmamızdaki bulguları destekler nitelikte Ozfifan vd. (2013) *Arabidopsis* ABA eksik *aba2* mutanı ile yabancı tip bitkileri PEG stresine maruz bırakmış ve dıştan 50 μ M ABA ilavesi ile her iki genotipte de prolin miktarının arttığını rapor etmişlerdir. Ancak, Zhu vd. (2010) tuza ve kuraklığa çok hassas olan *Arabidopsis sos6* mutanı ile yapmış oldukları çalışmada, 100 mM NaCl stres ortamında hassas olan mutanttaki prolin miktarının hem MS0 ortamındaki kontrole göre hem de yabancı tipe göre oldukça fazla olduğunu belirtmişlerdir. Bu durumu Ashraf ve Foolad. (2007) bitkilerdeki prolin birikiminin hem ABA'ya bağımlı hem de ABA'dan bağımsız sinyalizasyon yolları ile gerçekleşebileceğini belirterek açıklamıştır. Özet olarak, elde ettiğimiz verilere göre tuz stresi altında ABA ilavesi ile prolin üretimi artırılarak, bitkilerin tuza toleransının artmış olduğu söylenebilir.

SOS5 geninin ABA, ROS ve antioksidan enzim sistemleri ile olan ilişkilerini aydınlatmak amacı ile yapmış olduğumuz çalışmada ise bitki yaprak ve köklerinde GPX, CAT, SOD ve APX enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Tuz stresi koşullarında yabancı tip bitki yapraklarındaki GPX miktarının mutant bitkiye oranla yüksek olduğu bulunmuştur. Tuz stresi ile birlikte ABA verildiğinde ise GPX aktivitesinin mutantta daha fazla arttığı ve yabancı tipe göre de yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçları yabancı tip bitki için yorumlamak biraz güç olsa da, stres altında ABA ilavesi ile *sos5* mutantındaki enzim artışı, daha önce ifade edilen ABA ile kök fenotipindeki iyileşmenin bir sebebi olarak gösterilebilir. Benzer şekilde, tuz muamelesine bağlı olarak pek çok bitki kökünde peroksidaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Zhao vd., 2013). Bu sonuçlar, tuz stresinin köklerde GPX enzim aktivitesini artırdığını ve ABA ilavesinin de bu aktiviteyi desteklediğini göstermektedir. Ayrıca, kökler stresin ilk algılandığı kısımlar olduğundan bu enzim aktivasyonunun bundan dolayı daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Başka bir antioksidan enzim olan katalaz (CAT) ile ilgili kök ve yapraklarda yaptığımız analizlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. MS0 kontrol grubunda CAT aktivitesinin mutantta yabani tipe göre düşük olduğu görülmüştür. Tuz stresine maruz kaldıklarında ise her iki genotipte de enzim artışı kaydedilmiştir. Ancak yine de mutant bitkideki enzim aktivitesinin yabani tipe göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Seçkin vd. (2010) arpa türlerinde yapmış oldukları çalışmada, tuz stresine bağlı olarak CAT enzim aktivitesinin arttığını ancak dayanıklı türlerdeki artışın daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar mevcut araştırma bulgularımızla örtüşmektedir. Ayrıca tuz stresi + ABA muamelesi sonucu CAT enzim aktivitelerinin aktiviteleri yabani tip ve mutant bitkide eşit hale geldiği belirlenmiştir. Bu durum tuz stresi altında dıştan ABA uygulaması ile yabani tip ve mutant bitki köklerindeki fenotipik değişimlerin ve kök uzunluklarının benzer olmasını açıklayabilir.

Diğer bir antioksidan enzim olan superoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin tuz stresi koşullarında yabani tipte, mutanta göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Tuz stresi ile ABA birlikte uygulandığında ise, yabani tipte aktivitenin düştüğü ancak mutantta önemli bir değişim olmadığı görülmüştür. Köklerde enzim aktivitesine bakıldığında ise, tuz stresi ile birlikte her iki genotipte de MS0 kontrole göre aktivitenin arttığı görülmüş ve tuz stresi+ABA muamelesi ile de her iki genotipte düşüş olduğu ancak mutant bitkideki aktivitenin yabani tipe göre daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda; SOD'ların ifadesindeki artışların biyotik ve abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlamada önemli rolleri olduğu ileri sürülmüştür (Büyük vd., 2012). Ayrıca tuza toleranslı olan *Arabidopsis pst1* mutantının SOD aktivitesinin yabani tipe göre önemli derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir (Botella vd., 2005). Diğer taraftan Lu ve vd. (2009) bermuda çimi bitkilerinde, kuraklıkla birlikte ABA uygulamasının SOD aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Buna göre, tuz stresi ile mücadelenin SOD enziminin her iki genotipte de yüksek olması göz önüne alınarak, köklerde daha aktif olduğu ve bu yüzden yapraklardaki olası hasarı engellediği için stresle SOD enzim aktivitesine fazla gerek kalmadığı gibi bir sonuç çıkartılabilir. Ancak, dışarıdan ABA uygulamasının tuz stresi altında enzim aktivitesinde bir artış göstermemesi, genel literatüre ters olmakla birlikte, ortamdaki reaktif oksijen türlerinin APX ve CAT gibi diğer yolların uyarılması ile temizlendiği için SOD aktivitesine ihtiyacın azaldığını düşündürmektedir.

Diğer bir antioksidan enzim olan askorbat peroksidaz (APX) ile ilgili yaptığımız denemelerde tuz stresi altındaki yapraklarda yabancı tipteki APX enzim aktivitesinin mutant bitkiye göre önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresi+ABA uygulaması ile de yabancı tipte düşüş olurken, mutant bitki enzim aktivitesinde hem tuz şartlarındaki kendi kontrolüne hem de yabancı tipe göre artış kaydedilmiştir. Köklerdeki APX enzim aktivitelerine bakıldığında ise tuz stresi altında her iki genotipte stres içermeyen ortama göre düşüş olmuştur. Ancak mutant bitkideki enzim aktivitesinin yabancı tipe oranla daha düşük olduğu kaydedilmiştir. Tuz stresi+ABA uygulamasında her iki genotipteki enzim aktivitesinin arttığı ve mutant bitkideki artışın yabancı tipe göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Seçkin ve ark., (2010)'nın yaptıkları çalışmada tuza hassas ve toleranslı arpa çeşitlerinde APX enzim aktivitesinin 150 mM NaCl koşullarında, kontrole göre arttığı rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada, dıştan ABA uygulaması ile *Arabidopsis* bitkisinde APX2 gen ekspresyonunun kontrole göre 4,5 kata kadar arttığı tespit edilmiştir (Ghassemian vd., 2008). Tüm bu sonuçlar ele alındığında, tuz stresi köklerde APX enzim aktivitesinin düşmesine neden olmuş ve dıştan ABA uygulanması ile özellikle mutant enzim aktivitesinde ciddi bir artış görülmüştür. Bu durum ABA tarafından mutant bitki köklerinde gerçekleşen iyileştirici etkinin bir nedeni olarak görülebilir. Özellikle tuz stresi altında yabancı tipe göre daha az olan APX aktivitesinin, ABA muamelesi ile yabancı tipe oranla artması, ortamdaki hidrojen peroksiti uzaklaştırarak tuza tolerans sağlamak için ABA'ya gereksinim duyduğunun bir ispatı olarak gösterilebilir.

Tuz stresi altında reaktif oksijen türlerinden olan H_2O_2 miktarının yabancı tip ve mutant bitkide nasıl değiştiğini tespit etmek amacıyla yapmış olduğumuz çalışmada DAB boyama metodu kullanılmıştır. Yaprak ve köklerde MS0 kontrol ortamında birbirine çok yakın olan H_2O_2 miktarlarının tuz stresi ile uyarıldığını ve özellikle *sos5* mutantının kök ve yapraklarında miktarın çok daha fazla olduğunu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, *sos5* mutantının tuz stresine aşırı hassas oluşunun, daha fazla ROS birikimi nedeniyle, dokulardaki tahribattan kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Tuz stresi ile ABA birlikte uygulandığında ise mutant köklerindeki H_2O_2 miktarı yabancı tipe yaklaşmış ve kök fenotipik olarak da normal hale dönmüştür. Zhu ve ark., (2010) yapmış oldukları çalışmada, tuz ve ozmotik strese aşırı hassas olan *Arabidopsis sos6-1* mutantının MS0 kontrol ortamına göre, 100 mM NaCl stresine maruz bırakıldığında, yabancı tipe göre H_2O_2 miktarının önemli ölçüde arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca ABA'nın H_2O_2 'yi uyardığı gösterilmiştir (Kwak vd., 2003). Bu bilgiler ışığında tuz stresi altında dıştan ABA

uygulamasının içsel H₂O₂ miktarını hücresele dokulara zarar vermeyecek düzeye getirdiğini ve böylece mutant bitkinin tuz stresine verdiği cevabın yabancı tipe benzer olduğunu söyleyebiliriz.

Stoma açılma/kapanma durumunun gözlenmesi amacıyla yaptığımız denemede yabancı tip ve ABA'ya duyarsız olduğunu düşündüğümüz *sos5* mutant bitki yaprakları tuz stresine maruz bırakılarak, stoma açıklıkları ölçülmüştür. Stres içermeyen kontrol ortamında her iki genotipin stoma açıklıklarının birbirine eşit olduğu belirlenmiştir. 4 saat boyunca yüksek tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan her iki genotipin yapraklardaki stoma açıklığının mutant bitkide yabancı tipe göre çok fazla olduğu görülmüştür. Stres içermeyen ortama ABA ilavesi her iki genotipte de stoma kapanmasına neden olsa da, mutant bitki stomalarındaki açıklık kısmen daha fazla olmuştur. Tuz stresi+ABA muamelesi ile her iki genotipte de kontrole göre azalma kaydedilmiş ancak tuz stresi ortamı ile kıyaslandığında, yabancı tipin stoma açıklıklarında nispeten artış olurken, mutant stomalarının büyük oranda kapandığı bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar, mutant bitkinin ABA'ya karşı yabancı tipe göre daha duyarsız olduğunu veya yeteri kadar ABA sentezleyemediğini, bu yüzden yüksek tuz stresi altında stomalarını kapatamadığı için aşırı hassasiyet gösterdiğine işaret etmektedir. Stres altında dıştan ABA uygulaması ile mutant stomalarının kapanması da, daha önceki bulgularımızı doğrular biçimde, tuza toleransı artırmış ve kök fenotipinin normale dönmesine neden olmuştur. Ozfidan vd. (2013) yapmış oldukları çalışmada, ozmotik stres altında *Arabidopsis* ABA-eksik (*aba-2*) mutantında stomatal iletkenliğin, yabancı tipe göre bariz bir şekilde yüksek olduğunu ve stres ortamına ABA ilave edilmesiyle bağıl su içeriğinde (RWC) artışa bağlı olarak mutantın stoma iletkenliğinde, tek başına stres muamelesine oranla düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Kuraklık ve tuz stresi altında bitkilerde ABA üretimi tetiklenmekte ve stomalar kapatılarak, transpirasyonla su kaybı azaltılmaktadır (Yazıcı vd., 2007; Boneha vd., 2012). ABA'nın stoma kapanması ile ilişkisini aydınlatmak amacı ile yapılan çalışmalarda, ABA biyosentezi hasarlı olan *hp3-1* domates mutantında, ABA eksikliğine bağlı olarak stomalarındaki kapanmanın azaldığı bildirilmiştir (Galpaz vd., 2008). Bir başka çalışmada ise ABA reseptörleri olan PYR/PYL genlerinde fonksiyon kaybına neden olan *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4 pyl5 pyl8* altılı (sextuple) mutant bitkilerin ABA'ya aşırı duyarsız oldukları ve yabancı tipe göre stoma açıklıklarının oldukça fazla olduğu rapor edilmiştir (Gonzalez-Guzman vd., 2012). Bütün bu değerlendirmeler doğrultusunda, kendi başına ABA

sentezleyemeyen bitkilerin dıştan uygulanan ABA'ya cevap verdiği ve stomalara etki ederek stres toleransına katkı sağladığı görüşü desteklenmektedir.

Yapmış olduğumuz başka bir denemede hücre çeperi biyosentezi ve normal hücre genişlemesi için gerekli olan bir hücre yüzeyi adhezyon proteinini kodlayan *SOS5* geninin tuz stresindeki biyolojik fonksiyonu ve ABA sinyalizasyonu ile ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda *sos5* mutantı ve yabancı tip bitkilerini tuza ve tuz stresi+ABA muamelelerine maruz bırakarak hücre çeperindeki değişimler konfokal mikroskop altında daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Yüksek tuzluluk su kıtlığına, iyon toksisitesine ve besin eksikliğine neden olarak, hücrelerde moleküler hasara, büyümenin durmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açmaktadır (Ghaffari vd., 2014). Tuz stresi ve ozmotik stres altında *Arabidopsis*'in selüloz sentezinden sorumlu genlerinin mutasyonu ile elde edilen mutant bitki köklerinde aşırı hassas ve yabancı tipe göre oldukça kısa ve kalın kök fenotipi gözlenmiştir (Shi vd., 2003; Harpaz-Saad vd., 2012). Normal ve stres koşulları altında büyütülen *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, yaşayan kök hücrelerinin görüntülenmesi; canlı hücre yapılarının, dinamiklerinin ve fonksiyonlarının çalışılması için konfokal laser taramalı mikroskop kullanımı uygun bir metod olarak önerilmiştir (Wangenheim vd., 2014). Soto vd. (2013), yaptıkları çalışmada ABA'nın şeftali meyvelerinde hücre duvarı ilişkili genlerin ekspresyonunu farklı şekillerde etkilediğini bildirmişlerdir.

ABA'nın yüksek tuz konsantrasyonu altında hücre çeperi yapılarını nasıl etkilediğini tespit etmek amacı ile benzer şekilde yukarıda bahsedilen muamelelerin ardından bitki kökleri kalkoflur boyası ile boyandıktan sonra konfokal mikroskop altında incelenmiştir. 24 saatlik tuz stresi muamelesi ardından, *sos5* mutant kök yapısının, yabancı tipe göre oldukça kısa, kalın ve hücresel genişlemelerin anormal bir hal aldığı görülmüştür. Bu durumda mutant köklerindeki tuza aşırı hassasiyetin hücrelerdeki selüloz organizasyonunun bozulmasından kaynaklandığı ileri sürülebilir. Bununla birlikte, tuz stresi altında ortama ABA ilave edildiğinde, mutant bitki kökünün büyük oranda normal hale döndüğü ve hücresel yapıların organize olarak yabancı tiple ayırt edilemez hale geldiği fark edilmiştir. Bu durum hem ABA'nın bilinen iyileştirici etkisinin hem de *SOS5* geninin ABA ile pozitif yönde ilişkili oluşunun bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır diyebiliriz. Bilindiği gibi proteinlerin aksine, karbohidratlar genetik kodlanmış floresan etiketlerle tanımlanamazlar ve bunların (*insitu*) buldukların yerde, hücre çeperi yapısını ve dinamiklerini bozmadan belirlenmeleri için spesifik hücre polimerlerini tanıyan küçük floresan moleküllerin kullanıldığı mikroskobik çalışmalar için uygun farklı metodlara

gerek duyulur (Anderson ve Carroll., 2014). Örneğin, Mendu vd. (2011), *Arabidopsis* bitkisinin selüloz sentezleyemeyen *cesa* mutant tohumlarını, yabancı tiple karşılaştırmak için kalkoflor beyaz (Calcoflur White) boyası kullanarak, selülozik yapıları konfokal mikroskop altında incelemiştir. Dolan vd. (2003) daha önce de belirtilen *Arabidopsis* kök anatomisi, hücrelerin dizilimi ve selüloz yoğunlukları ciddi biçimde bozulmaya uğramıştır.

Tuz toleransı ve kök büyümesi için *SOS5* geninin ABA'nın genetik cevap regülatörleri ile ilişkisi olup olmadığını test etmek ve rolünü aydınlatmak için *sos5* ile ABA'ya duyarsız (insensitiv) ve ABA'ya aşırı duyarlı (oversensitiv) mutantlar arasında çaprazlamalar yapılarak, çift mutantlar elde edilmiştir. Ardından, kontrolleri ile birlikte bu mutantlar, MS0, MS0+ABA, tuz stresi ve tuz stresi+ABA besi ortamlarına ekilerek kök fenotipleri incelenmiştir. Çalışmamızda, ABA-duyarsız *abi4* ve *abi5* mutantları ile *cpl1*, *cpl3* ve *sad1* ABA-aşırı duyarlı mutantları kullanılmıştır. *ABI4* ve *ABI5* lokusları, tohum çimlenmesi ve ABA'ya bağımlı diğer bazı süreçlerde rol alan ABA'nın pozitif regülatörlerini kodlamaktadır (Finkelstein, 1994; Dai et al., 2013; Wind et al., 2013). Yaptığımız çalışmada, *abi4 sos5* ve *abi5 sos5* çift mutant bitki kökleri, ABA'ya *sos5* fenotipini tamamen baskılayarak cevap vermişlerdir. *abi4* ve *abi5* tek mutant kök fenotipleri tuz stresi koşullarında değişmezken, *abi4-sos5* çift mutant kökleri tuz stresine cevap olarak kısa ve epidermal şişkinliklerle ortaya çıkan anormal kök fenotipi sergilemişlerdir. Ancak, *abi5-sos5* çift mutant kökünde tuz koşullarında değişiklik olmasına rağmen aynı bariz etki fark edilememiştir. Bu sonuçlar, kök büyümesinde *At-SOS5 (FLA4)* ve *At-ABI4* genleri arasında genetik olarak sinergistik bir etki olduğunu ortaya koymaktadır.

Yukarıda izah edildiği gibi ABA'ya aşırı hassasiyet gösteren mutantlarla çaprazlama sonucu elde edilen çift mutantlar, farklı besi ortamlarında test edilmiştir. Tuz stresi varlığında veya yokluğunda *cpl1 sos5*, *sad1 sos5* çift mutantlarında kök morfolojileri yabancı tiple kıyaslanabilir bulunmuştur. Yani, *cpl1 sos5* ve *sad1 sos5* çift mutant köklerinin ortama ABA ilave edilmeksizin, tuz stresi altında yabancı tipe benzer, normal kök fenotipi sergiledikleri görülmüştür. Bunun aksine, *cpl3-sos5* çift mutantı *sos5* tek mutantı ile kıyaslandığında daha fazla tuz hassasiyeti sergilemiştir. C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE LOCI 1 and -3 [At-CPL1], [At-CPL3 ve SUPERSENSITIVE TO ABA AND DROUGHT [At-SAD1] lokusları ABA uyarımlı mRNA türlerinin negatif regülatörlerini kodlamaktadır ve strese cevapta negatif regülatörler olarak

tanımlanmışlardır. Fonksiyonlarının kaybıyla elde edilen mutant allelleri *RD29A* genini aşırı biriktirmeleri ile karakterize edilirler (Xiong vd., 2001; Xiong vd., 2002a; Koiwa vd., 2002). Birçok CPL, C-uçlarını defosforile ederek RNA polimeraz II'yi negatif yönde regüle edebilirken, *CPL1* normal miRNA biyosentezi için ve ABA aşırı hassasiyetine neden olan bu süreçte, genetik kusurlar için gereklidir (Manavella vd., 2012). Diğer aşırı hassas lokus olan *SAD1*, SM benzeri 5 proteinini (SM-like 5 protein: LSM5) kodlamaktadır (Xiong vd., 2001). *SAD1/LSM 5* proteini hem LSM1-7 hem de LSM1-8 komplekslerinin bir bileşenidir ve bunlar sırasıyla mRNA degradasyonu ve pre-mRNA yapışmasında rol alırlar (Perea-Resa vd., 2012).

Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında, *SOS5* ile *SAD1* ve *CPL1* genlerinin antagonistik bir ilişki içinde olduğu söylenebilir. Mutant *sos5*'in tuz stresi altındaki aşırı hassas kök fenotipinin, *cpl1* ve *sad1* ile baskılanması, yeterli ABA birikimine neden olması ile açıklanabilir. Tuz stresi altında *cpl3* ile *sos5* fenotipinin baskılanmayışı ise bu lokusun kökte genetik olarak gereksiz olduğu kanısını uyandırmaktadır. Sonuç olarak, *Arabidopsis* *SOS5* geni kök gelişimindeki rolü ABA'nın pozitif regülatörü olan *ABI4* tarafından artırıldığı ve ABA'nın negatif regülatörleri olan *CPL1* ve *SAD1* tarafından ise baskılandığı söylenebilir.

Yapılan bu çalışma ile genetik araştırmalarda sıkça kullanılan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin *Col-gl* yabani tip ve tuza oldukça hassas *sos5* mutantının tuz stresi altında ABA biyosentezinden ve katabolizmasından sorumlu genlerle, stres toleransında görev alan ABA'ya bağımlı ve bağımsız gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırması amaçlanmıştır.

Mevcut çalışmada, *SOS5* geninin ABA metabolizmasına olası bir regülatör gibi katılımının olup olmadığını araştırmak için, bu süreçlerde yer alan genlerin transkript seviyeleri, hem RT-PCR hem de qPCR metodları kullanarak ölçülmüştür. Tuz stresi altında 1 ve 2 saat bekletilen yabani tip ve mutant bitki köklerinde, ABA biyosentezinden sorumlu *ABA1* geni stres içermeyen MS0 ortamında, mutant kökünde, yabani tipe göre artış gösterirken, stres uygulaması ile birlikte zamana bağlı olarak, *ABA1* geni mutantta, yabani tipe göre büyük oranda düşmüştür. ABA katabolizmasında görev alan *CYP707A-3* geni ise kontrol ortamında mutantta yabani tipe oranla kısmen yüksek çıkarken, stres muamelesi ardından özellikle 2. saatte ifade oranı düşmüştür. Tuz stresi altında mutant bitki köklerinde özellikle ABA biyosentez geninin ifadesinin azalması, mutantın strese karşı yeterli ABA sentezleyemediğinin bir işareti olabilir ve tuza aşırı hassas kök fenotipinin nedeni olarak düşünülebilir. Katabolizma geninin ifadesindeki düşüş de, zaten

ortamda az ABA oluşundan kaynaklı bir feedback davranışına işaret etmekte ve mutant ABA mekanizmasında bir bozukluğun olduğunu göstermektedir. Yine stresle ABA bağımlı yol vasıtasıyla indüklenen *RD29A*, *RD29B* ve *RD22* genlerinin ekspresyon düzeyleri, tuz stresi altında yabancı tiple kıyaslandığında mutant bitki köklerinde büyük ölçüde düşmüştür. ABA'dan bağımsız ve sadece kuraklıkla ilişkili olan *ERD1* gen ekspresyonunda ise tuz stresi altında yabancı tipe oranla mutantta artış olmuştur. Bu sonuçlar, *SOS5* geninin tuz stresi toleransında doğrudan ABA ile ilişkili olduğunun bir kanıtı olabilir. Bu verilerimizi destekler nitelikte, yapılan bir çalışmada ABA bağımlı yolda gen ekspresyonunu sağlayan *MYB2* geninin *Arabidopsis*'de aşırı ifade edilmesiyle elde edilen transgenik bitkilerde, ABA'ya aşırı hassasiyet ve stoma açıklıklarında azalma ile birlikte, stres cevabında yer alan *RD22*, *RD29A* ve *ABA1* gibi genlerin ekspresyon oranlarının büyük ölçüde yükseldiği rapor edilmiştir (Shan vd., 2012). Yine bir başka çalışmada, ABA'nın uyardığı stoma hassasiyetini düşüren ve kuraklığa aşırı hassas olan *Arabidopsis max2* mutantında, *RD29A* ve *RD29B* gibi stresle ilişkili, ayrıca *NCED3* ve *CYP707A3* gibi ABA ilişkili gen ifade oranlarının stres altında yabancı tipe göre oldukça düşük olduğu bulunmuştur (Bu vd., 2014). Ayrıca Seifert vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada, tuz stresi içermeyen kontrol şartlarında *sos5* mutanı ve yabancı bitkideki ABA biyosentetik lokuslarının (*ABA1*, *ABA2*, *ABA3*, *NCED5* ve *AAO3*) ya da ABA katabolik lokuslarının (*CYP707A1*, *CYP707A2*, *CYP707A4*) önemli derecede farklılık göstermediği, ancak mutantta biraz daha düşük olduğu bulunmuştur. 40 dakikalık bir tuz muamelesinden sonra ise *ABA1*, *ABA3* ve *AAO3* genlerinde yabancı tipe göre azalma kaydedilmiştir. ABA katabolik genlerden ise sadece *CYP707A2* gen ekspresyonunda upregülasyon gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre kendi bulgularımızı değerlendirecek olursak: *SOS5*'in ABA biyosentez ve katabolizma olaylarına nasıl dahil olduğunu anlamak için tek bir genin ölçülmesinin net bir sonuç vermeyeceği ortaya çıkmıştır. Bu yüzden elde ettiğimiz sonuçlar ABA metabolizması ile ilgili bize kısmen bilgi verirken, bu yola katılan diğer genlerin 2 saat tuz uygulaması ardından bakılarak, durumun netleştirilmesi gerekmektedir. Bu bakımdan mevcut çalışmada bir eksiklik fark edilmektedir. Bununla beraber, ABA ile ilişkili olarak stres cevabında yer alan *RD29A*, *RD29B*, *RD22* ve ABA'dan bağımsız indüklenen *ERD1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin yabancı tip ve mutant arasında hem jel üzerinde bant yoğunlukları hem de gerçek zamanlı olarak grafik üzerinde gösterilmesi ile kıyaslanması, bize *SOS5* geninin tuz stresi toleransında ABA'ya bağımlı yolları kullandığını işaret etmektedir. Yine *SOS5*'in ABA biyosentezini teşvik ettiğini ve ABA katabolizmasını baskıladığı (down

regule ettiği) ile ilgili ihtimal uygun gör÷lmektedir. Nitekim daha önceki sonuçlarla ilişki kurarsak, fonksiyonunu kaybeden *sos5* mutantının ABA inhibisyonu ile sinergistik olduğunu ve ABA katabolizmasının kimyasal inhibisyonu ile *sos5* fenotipinin baskılanması veya tuz stresi altında dıştan ABA uygulanması ile aynı iyileştirici etkinin görülmesi bu teorileri güçlendirmektedir.

Bütün veriler birlikte ele alındığında, tuza aşırı hassas *sos5* mutant bitkilerinin, tuz stresi koşullarında yeteri kadar ABA sentezleyemediği, ABA ile ilişkili genleri yabani tipe göre fazla ifade edemediği ve antioksidan sistemleri yeteri kadar aktifleştiremediği için tuza tolerans sağlayamadığı ortaya çıkmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar, hem literatürdeki eksikliği giderecek, hem bitkilerdeki tuz stres tolerans mekanizması için yeni bir yaklaşım getirecek, hem de bitki abiyotik stresi ile hücre çeperi arasındaki ilişkiye ışık tutacaktır.

5. SONUÇLAR

1. Tuz stresi koşullarında tuza aşırı hassas olan *sos5 (fla4)* mutant bitki köklerinin dıştan 5 μ M ABA muamelesi sonucu hem fenotipik olarak, hem de kök uzunlukları bakımından yabani tipe benzer hale geldiği gözlemlendi.
2. Tuz stresi koşullarında ABA ile aynı yönde etki eden 25 μ M pyrabaktin'in bilinen *sos5* kök fenotipini baskıladığı gözlemlendi.
3. Tuz stresi koşullarında ABA biyosentez inhibitörü olan fluridon (10 μ M) muamelesi ile yabani tip bitki köklerinin *sos5*'e benzer biçimde (kısa ve şişkin) aşırı hassas bir hal aldığı görüldü.
4. Tuz stresi koşullarında ABA katabolizmasında yer alan *CYP707A* genini baskılayan, AbsE2B inhibitörü uygulamasının, tuza aşırı hassas *sos5* fenotipini baskıladığı belirlendi.
5. Farklı konsantrasyonlarda ABA içeren ortamlarda 20 μ M'a kadar mutant bitki tohumlarının önemli derecede fazla çimlendiği gözlemlendi. Buna göre mutant bitkinin ABA'ya duyarlılığının yabani tipe göre daha az olduğunu sonucuna varıldı.
6. ABA'ya cevapta pozitif regülatör olarak görev alan *ABI4* ve *ABI5* lokuslarında mutasyon sonucu elde edilen *abi4* ve *abi5* mutantları ile *sos5* bitkilerinin çaprazlanması sonucu, çift mutantlar elde edildi. Bu mutantların tuz stresine verdiği cevaplara bakıldığında özellikle *abi4 sos5* çift mutantının *sos5* tek mutanı gibi tuza aşırı hassas olduğu ve dıştan ABA uygulaması ile köklerin normale döndüğü görüldü. Aynı bariz etki *abi5 sos5* çift mutantında ise görülmedi. Bu verilere göre tuz stresi altında normal kök gelişimi için *SOS5 (FLA4)* ve *ABI4*'ün aynı yönlü çalıştığı sonucuna varıldı.
7. ABA'ya cevapta negatif regülatör olarak görev alan *CPL1*, *CPL3* ve *SAD1* lokuslarında mutasyon sonucu elde edilmiş *cpl1-1*, *cpl3-1* ve *sad1-1* mutantları ile *sos5* bitkilerinin çaprazlanması sonucu çift mutantlar elde edildi. Bu mutantların tuz stresine verdiği cevaplara bakıldı. Özellikle *cpl1 sos5* ve *sad1 sos5* çift mutantlarının ABA'ya gerek kalmaksızın tuz stresi altında normal kök fenotipi gösterdikleri görüldü. Ancak aynı etki *cpl3 sos5* çift mutantında görülmedi. Bütün bu sonuçlar, tuz şartları altında normal kök gelişimi için *CPL1*

ve *SADI* genlerinin *SOS5(FLA4)* ile antagonist olarak çalıştığını ve *CPL3*'ün ise bu süreçte rol almadığını ortaya koydu.

8. Tuz stresi koşullarında muamele süresine bağlı olarak, yabancı tip ve mutant bitki kök ve yapraklarında hidrojen peroksit içeriğinin arttığı bulundu. Bu artışın mutant bitkilerde yabancı tipe oranla daha fazla olduğu kaydedildi.
9. Tuz stresi koşullarında uygulanan ABA'nın hem yabancı tip hem de mutant bitkilerin kök ve yapraklarında prolin içeriklerini önemli ölçüde artırdığı belirlendi.
10. Tuz stresi koşullarında uygulanan ABA'nın özellikle mutant bitki köklerinde, sadece tuz içeren ortama kıyasla MDA içeriğini önemli ölçüde azalttığı bulundu.
11. Tuz stresi koşullarında mutant bitki yapraklarında APX enzim aktivitesinin yabancı tipe oranda oldukça düşük olduğu bulundu, diğer taraftan tuz stresi+ABA uygulaması ile bu aktivitenin önemli ölçüde arttığı belirlendi. Yine tuz koşullarında mutant bitki köklerinde APX aktivitesi yabancı tipe oranla düşükken, ortama ABA ilave edilmesi ile mutant kökündeki APX aktivitesi ciddi biçimde artış gösterdi.
12. Tuz stresi koşullarında köklerde ve yapraklarda CAT enzim aktivitesinin, mutant bitkide yabancı tipe oranla düşük olduğu ancak ortama ABA ilave edilmesi ile yabancı tip ve mutant bitkilerdeki CAT aktivite oranlarının özdeş olduğu bulundu.
13. Tuz stresi koşullarında mutant bitki yapraklarındaki GPX aktivitesinin yabancı tipe göre düşük olduğu ve dışardan ABA ilavesi ile mutant yapraklarındaki enzim aktivitesinin artış gösterdiği tespit edildi. Köklerde ise tuz stresi altında mutantla yabancı tip arasında kısmen bir farklılık görülmekle birlikte, dıştan ABA uygulamasının her iki genotipte de enzim aktivitesini artırdığı belirlendi.
14. Tuz stresi koşullarında yapraklardaki SOD enzim aktivitesinin mutant bitkide yabancı tipe oranla düşük olduğu tespit edildi. Ancak dıştan ABA uygulaması ile yabancı tipte düşüş tespit edilirken, mutant bitkide önemli derecede bir değişim olmadığı görüldü. Köklerde ise tuz stresi koşullarında SOD aktivitesinin mutant bitkide yabancı tipe oranla fazla olduğu tespit edildi. Tuz stresi ile ABA uygulamasının her iki genotipteki SOD aktivitesini düşürdüğü ancak mutanttaki aktivitenin yabancı tipe oranla önemli derecede fazla olduğu belirlendi.

15. Stres içermeyen koşullarda mutant bitki köklerindeki içsel ABA miktarının, yabancı tipe göre önemli derecede yüksek olduğu belirlendi. Diğer taraftan, tuz stresi koşullarında yabancı tip bitki köklerinde içsel ABA miktarının kontrole göre önemli ölçüde arttığı, mutant bitki köklerinde ise içsel ABA'nın düştüğü belirlendi.
16. Tuz stresi içermeyen koşullarda stoma açıklıklarının yabancı tip ve mutant bitkilerinde benzer olduğu saptandı. Tuz stres koşullarında ise, yabancı tip bitkilerin önemli ölçüde stomalarını kapattığı ancak mutant bitki stomalarının yabancı tipe oranla önemli derecede açık olduğu belirlendi. Sadece ABA muamelesinin her iki genotipte de benzer etkiyi yarattığı kaydedildi. Tuzlu ortama ABA ilave edilmesiyle mutant bitki stomalarının sadece tuz ihtiva eden ortama kıyasla kapandığı ancak yine de yabancı tipe oranla önemli derecede stomalarını açık tuttuğu tespit edildi.
17. Konfokal taramalı lazer mikroskop ile tuz stresi koşullarında mutant bitki köklerinde yabancı tipe göre ciddi deformasyonlar olduğu ancak tuz stresi altında ABA muamelesi ile mutant bitki kökünde yeniden hücre bütünlüğüne katkı sağlandığı ve yabancı tipten ayırt edilemez hale geldiği gözlemlendi.
18. Tuz stresi içermeyen ortamdaki mutant köklerinde *ABA1* gen ekspresyonunun yabancı tipe oranla fazla olduğu belirlendi. Ancak tuz stresi şartları altında mutant bitki kökündeki ekspresyon oranının yabancı tipe oranla azaldığı bulundu.
19. Tuz stresi içermeyen ortamdaki mutant bitki köklerinde *CYP707A3* gen ifadesinin kısmen yabancı tipe oranla fazla olduğu belirlendi. Ancak tuz stresi altında mutant bitki kökündeki gen ifadesinin yabancı tipe oranla düşüş gösterdiği kaydedildi.
20. Abiyotik stresler ve ABA ile uyarılan *RD29A* geninin stres içermeyen koşullarda mutant bitki köklerinde daha fazla ifade edildiği ancak tuz stresi altında mutant bitkide oldukça düştüğü kaydedildi.
21. Abiyotik stresler ve ABA ile uyarılan genlerden olan *RD29B* geninin, normal şartlarda mutant bitkide yok denecek kadar az ifade edildiği kaydedildi. Diğer taraftan, tuz stresi ile artmasına rağmen, yabancı tipe oranla önemli derecede az ifade olduğu kaydedildi.

22. Yine abiyotik stresler ve ABA ile uyarılan genlerden biri olan *RD22* geninin, normal şartlarda mutant köklerinde yabani tipe oranla az ifade edildiği ve tuz şartları altında ifadesini artırsa bile yabani tipe göre az olduğu kaydedildi.
23. Sadece kuraklığın erken evrelerinde, ABA'dan bağımsız olarak işlev gören *ERD1* geninin, tuz stresi içermeyen normal şartlarda mutant bitki köklerinde yabani tipe oranla çok az ifade edildiği, bununla beraber tuz stresi altında mutant bitkide yabani tipe oranla 3 kata kadar fazla ifade olduğu kaydedildi.

6. ÖNERİLER

Dünyada, nüfusun hızlı bir şekilde artmasıyla birlikte besin sıkıntısı oluşmuş ve ekilebilir alanlar yanlış kullanılmaya başlanmıştır. Bunun sonucu olarak toprakların doğal yapısı bozulmakta ve Na⁺ iyonlarının dengesizliğinden kaynaklı tuz stresi oluşmaktadır. Tuz stresi, ozmotik ve iyonik toksisiteye neden olarak bitkilerin yaşamını olumsuz yönde etkilemektedir. Bitkiler geliştirdikleri tolerans mekanizmaları ile bir dereceye kadar bu olumsuz koşullarda yaşamlarını sürdürebilirler. İnsanlar için önemli bir besin kaynağı olan bitkilerin tuza tolerans mekanizmalarının anlaşılması ve geliştirilmesi önem kazanmıştır. Çalışmamızda son yıllarda abiyotik stresle ilgili pek çok çalışmada kullanılan ve moleküler model bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'nın tuza oldukça hassas *sos5* mutanını kullanılmıştır. Tuz stresi koşullarında dıştan ABA uygulanması ile mutant bitkilerdeki hassasiyet ortadan kalkmış ve tuza tolerans artmıştır. ABA'nın bu iyileştirici etkisinin tarımda uygulanabileceği düşünülmektedir. Günümüz biyoteknolojik yaklaşımları stres toleransında yer alan genlerin özellikle tarımsal değeri olan başka bitkilere aktarımına imkân sağlamaktadır. Bu bakımdan çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguların strese dayanıklı bitkiler yetiştirmede kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, *SOS5* geninin fonksiyonlarının tamamen aydınlatılması, hücre çeperi ilişkili pek çok endüstriyel bitkinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Tarafımızdan *SOS5* geninin tuz stresi ve ABA fitohormonu arasındaki ilişki aydınlatılmasına rağmen, etilen başta olmak üzere diğer hormonlarla ilişkisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu açıdan gelecekte bu ilişkilerin açığa kavuşması *SOS5* yolunun tam olarak anlaşılmasını sağlayacaktır. Ayrıca mevcut çalışmamızda ABA biyosentez ve katabolizması ile ilişkili birer genin 2 saatlik stres uygulama sonrasında ifade olma düzeylerine bakılmıştır. Bu mekanizmanın daha net açıklanabilmesi için, biyosentez ve katabolizmada yer alan diğer genlerin de farklı zaman aralıklarında ifade düzeylerine bakılmasına gereksinim duyulmaktadır. Bununla birlikte, SOS yollarının bitkilerdeki iyon dengesini sağlayan mekanizma olduğu düşünüldüğünde, *SOS5* geninin bu açıdan rolünü aydınlatılabilmek için mutant bitkilerdeki iyon birikimlerine bakılarak, yabani tiplerle karşılaştırılmasının gerekli olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızın sonucu olarak, köklerde *SOS5*'in ABA vasıtası ile hücre çeperi biyosentezi ve kök gelişiminde önemli bir rol aldığını söyleyebiliriz. Bu genin

fonksiyonunun bitkinin diğer kısımlarında da ortaya konması, bitkilerdeki öneminin anlaşılması açısından gereklidir.

7. KAYNAKLAR

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling, Plant Cell, 15, 63–78.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H.U., Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 273-286.
- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Sudhir, M.K.R. ve Sopory, K., 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants, Plant Cell Reports, 25, 1263–1274.
- Agarwal, P. ve Jha, B., 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling, Biologia Plantarum, 54, 201–212.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G. ve Sharma, S., 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress, Critical Reviews in Biotechnology, 30, 161-175.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tank, Y.Y., Grill, E. ve Schroeder, J.I., 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements, Nature, 411, 1053-1057.
- Ampudia-Galvan, C.S. ve Testerink C., 2011. Salt stress signals shape the plant root, Current Opinion in Plant Biology, 14, 296–302.
- Anderson, C.T. ve Carroll, A., 2014. Identification and Use of Fluorescent Dyes for Plant Cell Wall Imaging Using High-throughput Screening, Plant Chemical Genomics Book, 103-109. DOI10.1007/978-1-62703-592-7_10Print, ISBN978-1-62703-591-0, Online ISBN978-1-62703-592-7, Methods in Molecular Biology Series, 1056, ISSN1064-3745, Publisher: Humana Press., Holder Springer Science+Business Media, New York.
- Aoki, A., Kanegami, A., Mihara, M., Kojima, T., Shiraiwa, M. ve Takahara, H., 2005. Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress, Gene, 356, 135 – 145, 2005.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. ve Blumwald, E., 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis, Science, 285, 1256–1258.
- Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase-Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, Physiologia Plantarum, 85, 235-241.

- Ashraf, M., 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants, Flora, 199, 361-376.
- Ashraf, M. ve Foolad M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, Environmental and Experimental Botany, 59, 206–216.
- Bartels, D. ve Sunkar, R., 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants, Critical Reviews in Plant Sciences, 24, 23–58.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies, Plant Soil., 39, 205-207.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276-287.
- Bergmeyer, J. ve Grabl, M., 1983. Methods of Enzymatic Analysis, Third Edition, Germany, 190-302.
- Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A., Stone J.M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D.R., Ausubel F.M. ve Bolwell G.P., 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance, The Plant Journal, 47, 51-63.
- Blaukopf, C., Krol, M.Z. ve Seifert, G.J., 2011. New Insights into the Control of Cell Growth, The Plant Cell Wall, Methods in Molecular Biology, 715, 221-244.
- Blumwald, E., 2000. Sodium transport ve salt tolerance in plants, Current Opinion in Cell Biology, 12, 4, 431–434.
- Bohnert, H. J. ve Sheveleva, E., 1998. Plant stress adaptations--making metabolism move, Current Opinion in Plant Biology, 1, 3, 267–274.
- Boneha, U., Bitona, I., Schwartz, A. ve Ben-Aria, G., 2012. Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*, Plant Science 187, 89– 96.
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., Plant adaptive responses to salinity stress, Plant Abiotic Stress, ISBN-10: 1-4051-2238-2, ISBN-13: 978-14051-2238-2, Edited by: Jenks, M.A., ve Hasegawa, P.M., Blackwell Publing Ltd., Pages: 37-58, 2005.
- Borsani, O., Valpuesta V. ve Botella, M.A., 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73, 101–115.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43, 83-116.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity ve environment, Science, 218, 443-448.

- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 248–254.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., ve Weretilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses, Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158–1249.
- Bu, Q., Lv, T., Shen, H., Luong, P., Wang, J., Wang, Z., Huang, Z., Xiao, L., Engineer, C., Kim, T.H., Schroeder, J.J. ve Huq, E., 2014. Regulation of Drought Tolerance by the F-Box Protein MAX2 in Arabidopsis, Plant Physiology January, 164, 424-439.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. ve Aras, S., 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69, 97-110.
- Cabello, J.V., Lodeyro, A.F. ve Zurbriggen, M.D., 2014. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants, Current Opinion in Biotechnology, 26, 62-70.
- Carson, R.D., 2008 Characterization Of Novel Abiotic Stress Associated Genes In Arabidopsis Thaliana Using A Systems Biology Approach, Master of Science, Graduate Department of Cell and Systems, Biology University of Toronto, Canada.
- Chapman, K. D., 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress, Trends in Plant Science, 3, 11, 419–426.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanisms, Food Chemistry and Toxicology, 37, 949-962.
- Chen, G.X. ve Asada, K., 1989. Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic Properties, Plant Cell Physiology, 30, 987-998.
- Chen, Z., Hong, X., Zhang, H., Wang, Y., Li, X., Zhu, J. ve Gong, Z., 2005. Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis, The Plant Journal, 43, 273–283.
- Chen, J., Cheng, T., Wang, P., Liu, W., Xiao, J., Yang, Y., Hu, X., Jiang, Z., Zhang, S. ve Shia, J., 2012. Salinity-induced changes in protein expression in the halophytic plant *Nitraria sphaerocarpa*, Journal of Proteomics, 75, 526 – 5243.
- Cheng, N.H., Pittman, J. K., Zhu, J.K. ve Hirschi, K. D. 2004. The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H^{+}/Ca^{2+} antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance, The Journal of Biological Chemistry, 279, 2922–2926.
- Chernys, J.T. ve Zeevaart, J.A.D., 2000. Characterization of the 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene Family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado, Plant Physiology, 124, 343-354.

- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. ve Zhu, J.K., 2005. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants, Crop Sciences, 45, 437-448.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. ve Kim, S. Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors, The Journal of Biological Chemistry, 275(3), 1723-1730.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J. ve May, S., 2004. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service, Nucleic Acids Research, 32 , 575-7.
- Cramer, G.R., Alberico, G.J. ve Schmidt, C., 1994, Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids, Australian Journal of Plant Physiology, 21, 675-692.
- Çalış, Ö. ve Yazar, Ç., 2011. Fare Kulağı Teresi, Arabidopsis thaliana'da Konukçu Dışı Dayanıklılığın Erken Yanıklık Hastalık Etmeni Alternaria solani'nin Kontrolü İçin Araştırılması, GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28, 179-186.
- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H., 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları, Afyon Kocatepe University Journal of Science, 11, 11-34.
- Dai, M., Xue, Q., McCray, T., Margavage, K., Chen, F., Lee, J.H., Nezames, C.D., Guo, L., Terzaghi, W., Wan, J., Deng, X.W., ve Wang, H., 2013. The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in Arabidopsis, The Plant cell, 25, 517-34.
- Dalton, D.A., Harus, F.J., Russell, S.A. ve Evans, H.J., 1987. Purification, Protection ve Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legumen Root Nodules, Plant Physiology, 83, 789-794.
- Darley, C.P., Forrester, A.M. ve McQueen-Mason, S.J., 2001. The molecular basis of plant cell wall extension, Plant Molecular Biology, 47, 179-195.
- Daszkowska-Golec, A. ve Iwona Szarejko, I., 2013. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought, Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture, Dr. Kourosh Vahdati (Ed.), ISBN: 978-953-51-1024-8, InTech, DOI: 10.5772/53128.
- Daudi A., Cheng Z., O'Brien J.A., Mammarella N., Khan S., Ausubel F.M. ve Bolwell G.P., 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity, Plant Cell, 24, 75-87.
- Delauney, A.J. ve Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, The Plant Journal, 4, 215-223.
- DeRose-Wilson, L., 2010. Genome Evolution ve the Genetics of Abiotic Stress Tolerance in Arabidopsis thaliana and Arabidopsis lyrata, Doctor of Philosophy in Biological Sciences University of California, Irvine.

- Doblin, M.S., Johnson, K.L., Humphries, J., Newbigin, E.J. ve Bacic, A., 2014. Are designer plant cell walls a realistic aspiration or will the plasticity of plant's metabolism win out?, Current opinion in Biotechnology, 26, 108-114.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. ve Scheres, B., 1993. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root, Development, 119, 71-84.
- Driouich, A. ve Baskin, T.I., 2008. Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalaktan proteins and cortical, American Journal of Botany, 95, 1491-1497.
- Edwards, K., Johnstone, C. ve Thomson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, Nucleic Acid Research, 19, 1349.
- Ekmekçi, E., Apan, M. ve Kara, T., 2005. Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 20, 3, 118-125.
- Elstner, E.F., 1987. Metabolism of Activated Oxygen Species, In: The Biochemistry of Plants, D.D. Davies, Ed., Academic Press, USA, 253-315.
- Elstner, E.F. ve Osswald, W., 1994. Mechanisms of Oxygen Activation During Plant Stress, Proceeding of the Royal Society of Edinburg, 103, 131-154.
- Eroğlu, İ., 2007. Tuz stresinin Bazı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Kültür Çeşitlerinde Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Etehadnia, M., Waterer, D.R. ve Tanino, K.K., 2008. The Method of ABA Application Affects Salt Stress Responses in Resistant and Sensitive Potato Lines, Journal of Plant Growth Regulation, 27, 331-341.
- Fediuc, E., Lips, S.H. ve Erdei, L., 2005. O-acetylserine (thiol) lyase activity in Phragmites and Typha plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response, Journal of Plant Physiology, 162, 865-872.
- Feierabend, J., Schaan, C. ve Hertwig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs Under Both High and Low Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II, Plant Physiology, 100, 1554-1561.
- Finkelstein, R.R., 1994. Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations, Plant J., 5, 765-771.
- Finkelstein, R., 2013. Abscisic Acid Synthesis and Response, The Arabidopsis Book, e0166. doi: 10.1199/tab.0166.
- Flowers, T.J. ve Colmer, T.D., 2008. Salinity tolerance in halophytes, New Phytologist, 179, 945-963.

- Foyer, C.H., Descouvieres, P. ve Kunert, K.J., 1994. Protection Against Oxygen Radicals: An Important Mechanism Studied in Transgenic Plants, Plant Cell Environment, 17, 507-523.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. ve Scott, I.M., 1997. Hydrogen Peroxide ve Glutathione Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling, Physiologica Plantarum, 100, 241-254.
- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F. ve Bartels, D., 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, The Plant Cell, 12, 1, 111–124.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, Archives of Biochemistry and Biophysics, 247, 1-11.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, Annual Review of Biochemistry, 64, 97-112.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, Environmental and Experimental Botany, 45, 105-114.
- Gallé, A., Csiszár, J., Benyó, D., Laskay, G., Leviczky, T., Erdei, L. ve Tari, I., 2013. Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: Biosynthesis and function of ABA in stress responses, Journal of Plant Physiology, 170, 1389– 1399.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D. ve Hirschberg, J., 2008. Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content, Plant Journal, 53, 717-730.
- Gaspar, T., Penel, C., Hagege, D. ve Greppin, H., 1991. Peroxidases in Plant Growth Differentiation and Development Processes, Univ. M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and Univ., Geneva, Switzerland.
- Gechev, S.T., Breusegem, F.B., Stone, J.M., Denev, I. ve Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, BioEssays, 28, 1091–1101.
- Ghaffari, A., Gharechahi, J., Nakhoda, B., Salekdeh, G.H. ve Salekdeh, G.H., 2014. Physiology and proteome responses of two contrasting rice mutants and their wild type parent under salt stress conditions at the vegetative stage, Journal of Plant Physiology, 171, 31–44.
- Ghassemian, M., Lutes, J., Chang, H., Iris Lange, Chen, W., Zhu, T., Wang, X. ve Lange, B.M., 2008. Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*, Phytochemistry, 69, 2899–2911.

- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G.W., Fernández, M.A., Holdsworth, M.J., Perez-Amador, M.A., Kollist, H. ve Rodriguez, P.L., 2012. Arabidopsis PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid, The Plant Cell, 24, 2483-2496.
- Gupta, S.D., 2007. Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchard grass during NaCl stress, Biologia Plantarum, 51, 4, 759-763.
- Hale, M.G. ve Orcutt, D.M., 1987. *The Physiology of Under Stress*, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: *Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, Halliwell, B., Ed., Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Clarendon Press.
- Hageage, G.J. ve B.J. Harrington., 1984. Use of calcofluor white in clinical mycology, Lab Medicine, 15, 109-112.
- Hannah, M., Heyer, A. ve Hinch, D.K., 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in Arabidopsis thaliana, PLoS Genetics, 1, 0179-0196.
- Harpaz-Saad, S., Western, T.L. ve Kieber, J.K., 2012. The FEI2-SOS5 pathway and Cellulose Synthase 5 are required for cellulose biosynthesis in the Arabidopsis seed coat and affect pectin mucilage structure, Plant Signaling & Behavior, 7, 285-288
- Hasegawa, P.M., 2013. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants, Environmental and Experimental Botany, 92, 19-31.
- Hassine, B. A. ve Lutts, S., 2010. Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene, Journal of Plant Physiology, 167, 1448-1456.
- He, J., Xu, H., She, X., Song, X. ve Zhao, W., 2005. The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean, Functional Plant Biology, 32, 237-247.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 125, 189-198.
- Hsu, Y. T., Kuo, M.C. ve Kao, C. H., 2006. Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid, Plant and Soil, 287, 267-277.

- Hsu, Y., Chen, Y., Hsiao, Y., Wang, B., Lin, S., Cheng, W., Jauh, G., Harada, J. ve Wang, C., 2014. AtRH57, a DEAD-box RNA helicase, is involved in feedback inhibition of glucose-mediated abscisic acid accumulation during seedling development and additively affects pre-ribosomal RNA processing with high glucose, The Plant Journal, 77, 119–135.
- Hoque, Md. A., Mst. Nasrin, Banu, A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. ve Murata, Y., 2008. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells, Journal of Plant Physiology, 165, 813–824.
- Huang, M. ve Wu, W., 2006. Genome-wide in silico identification and experimental confirmation of abscisic acid-regulated genes in Arabidopsis, Plant Science, 170, 986–993.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. ve Schroeder, J.I., 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components ve newly emerging questions, Genes & development, 24, 1695-708.
- Ji, X., Dong, B., Shiran, B., Talbot, M.J., Edlington, J.E., Hughes, T., White, R.G., Gubler, F. ve Dolferus, R., 2011. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals, Plant Physiology, 156, 647-662.
- Jiang, M. ve Zhang, J., 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings, Plant cell Physiology, 42, 1265–1273.
- Jin, S. and Chen, C.C.S., Plant, L., 2000. Regulation by ABA of osmotic-stress-induced changes in protein synthesis in tomato roots, Plant, Cell and Environment, 23, 51–60.
- Johnson, K.L., Jones, B.J., Bacic, A. ve Schultz, C.J., 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules, Plant Physiology, 133, 1911–1925.
- Johnson, K.L., Kibble, N.A.J., Bacic, A., ve Schultz, C.J., 2011. A Fasciclin-Like Arabinogalactan-Protein (FLA) Mutant of Arabidopsis thaliana, fla1, Shows Defects in Shoot Regeneration, PLoS ONE, 6, 251-254.
- Ingram, J. ve Bartels, D., 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47, 377–403.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. ve Sacherz-Diaz, M., 1992. Alfalfa Leaf Senescence Induced by Drought Stress: Photosynthesis, Hydrogen Peroxide Metabolism, Lipid Peroxidation and Etylene Evolution, Physiologia Plantarum, 84, 67-72.

- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*, The Plant Journal, 27, 325–333.
- Kadioğlu, A. ve Terzi, R., 2007. A dehydration avoidance mechanism: leaf rolling, The Newyork Botanical Garden, Botanical Review 73, 290-302.
- Kadioğlu, A., 2011. Bitki Fizyolojisi, ISBN: 978-605-4361-06-9, Beşinci baskı, Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sağlam, A., Terzi, R. ve Acet, T., 2011. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system, Plant Growth Regulation, 64, 27–37.
- Kadioğlu, A., Terzi, R., Saruhan, N. ve Sağlam, A., 2012. Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors, Plant Science, 182, 42– 48.
- Keskin, B.C., 2012. Bitkilerde Sinyal İletimi, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5, 53-73.
- Kieliszewski, M.J. ve Derek T.A., 1994. Lamport, Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny, The Plant Journal, 5, 157–172.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J. ve Harter, K., 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: Protocols, evaluation and exemplary data analysis of UV-B light, drought and cold stress response, The Plant Journal, 50, 347-363.
- Klingler, J.P., Batelli, G. ve Zhu, J.K., 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signaling, Journal of Experimental Botany, 61, 3199-210.
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. Ve Türkan, İ., 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, Environmental and Experimental Botany, 60, 344-351.
- Koiwa, H., Barb, A.W., Xiong, L., Li, F., McCully, M.G., Lee, B.H., Sokolchik, I., Zhu, J., Gong, Z., Reddy, M., Sharkhuu, A., Manabe, Y., Yokoi, S., Zhu, J.K., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 2002. C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signaling, growth, and development, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 10893-8.
- Korneef, M., Reuling, G. ve Karssen, C.M. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*, Physiologia Plantarum, 61, 377 383.
- Kreuger, M. ve van Holst, G.J., 1996. Arabinogalactan proteins and plant differentiation, Plant Molecular Biology, 30, 1077-1086.

- Kuhn, J.M. ve Schroeder, J.I., 2003. Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling, Current Opinion in Plant Biology, 6, 463–469.
- Kumar, S., Kaur, G. ve Nayyar, H., 2008. Exogenous Application of Abscisic Acid Improves Cold Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum L.*), Journal of Agronomy and Crop Science, 194, 449–456.
- Kwak, J. M., Mori, I., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R., Bodde, S., Jones, J. D. G. ve Schroeder, J. I., 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis, EMBO J., 22, 2623-2633.
- Lee, D.H., Kim, Y.S. ve Lee, C.B., 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa L.*), Journal of Plant Physiology, 158, 737-745.
- Li, D., Ma, N., Wang, J., Yang, D., Zhao, S. ve Meng, Q., 2013. Overexpression of tomato enhancer of SOS3-1 (LeENH1) in tobacco enhanced salinity tolerance by excluding Na⁺ from the cytosol, Plant Physiology and Biochemistry, 70, 150-158.
- Liu, J.P. ve Zhu, J.K., 1997. An Arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 14960-14964.
- Liu, J. ve Zhu, J.K., 1997. Proline Accumulation ve Salt-Stress-Induced Gene Expression in a Salt-Hypersensitive Mutant of Arabidopsis, Plant Physiol., 114, 591–596.
- Lovelli, S., Scopa, A., Perniola, M., Tommasa, T.D. ve Sofo, A., 2012. Abscisic acid root and leaf concentration to biomass partitioning in salinized tomato plants, Journal of Plant Physiology, 169, 226-233.
- Lu, S., Su W., Li H. ve Guo Z., 2009. Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities, Plant Physiology and Biochemistry, 47, 132–138.
- Mahajan, S., Pveey, G. K. ve Tuteja, N., 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway, Archives of Biochemistry and Biophysics, 471, 2, 146–158.
- Majewska-Sawka, A. ve Nothnagel, E.A., 2000. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development, Plant Physiology, 122, 3-9.
- Manavella, P.A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B. ve Weigel, D., 2012. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1, Cell, 151, 859-70.
- Mann, C. ve Kleilil, D., 1938. Homocuprein and Heptacuprein, Copper Protein Compounds of Blood and Liver in Mammals, Proceedings of the Royal Society of London, 126, 303-315.

- Maurel, C., 1997. Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48, 399–429.
- McFarlane, H.E., 2008. Isolation and characterization of SOS5 in a novel screen for plasma membrane to cell Wall adhesion genes in *Arabidopsis thaliana*, Master thesis, McGill University, department of biology, Montréal, Québec, Canada.
- Mehlhorn, H, Lelandais, M, Korth, H.G. ve Foyer, C.H., 1996. Comparison of Ascorbate-Dependent Peroxidase Activity in Horseradish Peroxidase Types I and II and in Leaf Extracts, FEBS Letters, 378, 203-206.
- Mendu, V., Stork, J., Harris, D. ve DeBolt, S., 2011. Cellulose synthesis in two secondary cell Wall processes in a single cell type, Plant Signaling & Behavior, 6, 1638-1643.
- Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B. ve Gubler, F., 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase, Plant Journal, 45, 942-54.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends In Plant Science, 7, 405-410.
- Mittler, R., Vveerauwera, S., Gollery, M. ve Breusegem, F.V., 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plants, Trends in Plant Science, 9, 490-498.
- Miyake, C. ve Asada, K., 1992. Tylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in the Tylakoids, Plant Cell Physiology, 33, 541-553.
- Miyake, C. ve Asada, K., 1996. Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate, Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase, Plant Cell Physiology, 37, 423-430.
- Molinari, H. B. C., Marur, C.J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Filho, J. C. B., Pereira, L. F. P. ve Vieira, L. G. E., 2007. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress, Physiologia Plantarum, 130, 218-229.
- Mukhopadhyay, A., Vij, S. ve Tyagi, A.K., 2004. Overexpression of zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 10, 6309-6314.
- Munnik, T., Ligterink W., Meskiene, I., Calderini O., Beyerly, J., Musgrave, A., ve Hirt, H., 1999. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress, The Plant Journal, 20, 4, 381–388.

- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together, New Phytologist, 167, 645–663.
- Munns, R., ve Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance, Annual Reviews of Plant Biology, 59, 651–81.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, 15, 473–497.
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Cell Physiology, 22, 867-880.
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1987. Purification of Ascorbate Peroxidase from Spinach Chloroplasts: Its Inactivation in Ascorbat Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical, Plant Cell Physiology, 28, 131-135.
- Nambara, E. ve Marion-Poll, A., 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism, Annual review of plant biology, 56, 165-85.
- Nishiyama, Y. Ikeda, H. ve Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure, American Heart Journal, 135, 115.
- Nitsch, L., Kohlen, W., Oplaat, C., Charnikhova, T., Cristescu, S., Michieli, P., Wolters-Arts, M., Bouwmeester, H., Mariani, C., Vriezen, W.H. ve Rieu, I., 2012. ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato, Journal of Plant Physiology, 169, 878-883.
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. ve Pardo, J. M., 1995. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. Plant Physiology, 109, 735–742.
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., Nakanishi, T.M. ve Thibaud, M.C., 2011. Phosphateimportinplants: focus on the PHT1 transporters, Frontiers in Plant Science, 2, 1-12.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. ve Asada, K., 1997. Generation of Superoxide Anion and Localization of Cu-Zn Superoxide Dismutase in the Vascular Tissue of Spinach Hypocotyls: Their Association With Lignification, Plant Cell Physiology, 38, 1118-1126.
- Okazaki, M., Kittikorn, M., Ueno, K., Mizutani, M., Hirai, N., Kondo, S., Ohnishi, T. ve Todoroki, Y., 2012. Abscinazole-E2B, a practical and selective inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20, 3162-72.
- Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2006. Monitoring expression profiles of Arabidopsis genes during cold acclimation and de-acclimation using DNA microarrays, Functional & Integrative Genomics, 6, 212-234.

- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. ve Tran, L.-S. P., 2013. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity, New Phytologist, doi: 10.1111/nph.12613
- Ozfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A.H. ve Seckin, B., 2013. Time course analysis of ABA and non-ionic osmotic stress-induced changes in water status, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in *Arabidopsis thaliana* wild-type (Columbia) and ABA-deficient mutant (*aba2*), Environmental and Experimental Botany, 86, 44–51.
- Özfidan, C., 2010. Ekzojen ABA uygulamasının Kuraklık Stresi Altındaki Yabani ve ABA- Eksik *Arabidopsis* Mutantları Üzerindeki Biyokimyasal ve Fizyolojik etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Padu, E., Moldau, H. ve Kollist, H., 1999. The Effect of Ozone on Antioxidantive Reactions in Apoplast and Symplast of Barley Leaves, Plant Peroxidase Newsletter, 133-138.
- Pagariya, M.C., Devarumatha, R.M., ve Kwar, P.G., 2012. Biochemical characterization and identification of differentially expressed candidate genes in salt stressed sugarcane, Plant Science, 184, 1– 13.
- Parida, A.K. ve Das, A.B., 2005. Salt Tolerance ve Salinity Effects on Plants: Review, Ecotoxicology and Environmental Safety, 60, 324-349.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provar, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F. ve Cutler, S.R., 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins, Science, 324, 1068-71.
- Patykowski, J. ve Urbanek, H., 2003. Activity of Enzymes Related to H₂O₂ Generation and Metabolism in Leaf Apoplastic Fraction of Tomato Leaves Infected With *Botrytis cinerea*, Journal of Phytopathology, 151, 153-161.
- Pehlivan, N., 2011. Transgenik Domates Bitkisinde (*Solanum Lycopersicum* Cv. Uc82ma 35s::Athb7) Kuraklığa Dayanıklılık Sağlayan Athb7 Geninin Ekspresyon Profilinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, RTE Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Perea-Resa, C., Hernandez-Verdeja, T., Lopez-Cobollo, R., del Mar Castellano, M. ve Salinas, J., 2012. LSM proteins provide accurate splicing ve decay of selected transcripts to ensure normal *Arabidopsis* development, The Plant cell, 24, 4930-47.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M. ve Zilinskas, B.A., 1991. Overproduction of *Petunia* Copper/Zinc Superoxide Dismutase Does Not Confer Ozone Tolerance in Transgenic Tobacco, Plant Physiol., 97, 452-455.

- Popova, O.V., Yang, O., Dietz, K. ve Golldack, D., 2008. Differential transcript regulation in *Arabidopsis thaliana* and the halotolerant *Lobularia maritima* indicates genes with potential function in plant salt adaptation, Gene, 423, 142–148.
- Puli, M.R. ve Raghavendra, A.S., 2012. Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*, Journal of Experimental Botany, 63, 1349-1356.
- Rengel, Z., 1992. The Role Calcium in Salt Toxicity, Plant Cell and Environment, 15, 625-632.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K. ve Yu, G. L., 2000. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes, Science, 290, 2105-2110, DOI: 10.1126/science.290.5499.2105
- Quintero, F.J., Blatt, M.R. ve Pardo, J.M., 2000. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters, FEBS Letters, 471, 224-228.
- Qureshi, M.I., Abdin, M.Z., Ahmad, J. ve Iqbal, M., 2013. Effect of long-term salinity on cellular antioxidants, compatible solute and fatty acid profile of Sweet Annie (*Artemisia annua* L.), Phytochemistry, 95, 215–223.
- Saika, H., Okamoto, M., Miyoshi, K., Kushiro, T., Shinoda, S., Jikumaru, Y., Fujimoto, M., Arikawa, T., Takahashi, H., Ando, M., Arimura, S., Miyao, A., Hirochika, H., Kamiya, Y., Tsutsumi, N., Nambara, E. ve Nakazono, M., 2007. Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8' -hydroxylase in rice, Plant Cell Physiol., 48, 287- 298.
- Sauter, A., Davies, W.J. ve Hartung, W., 2001. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot, Journal of Experimental Botany, 52, 1991–1997.
- Salama, K.H.A., Mansour, M.M.F., Ali, F.Z.M. ve Abou-hadid, A.F., 2007. NaCl-induced, changes in plasma membrane lipids and proteins of *Zea mays* L. cultivars differing in their response to salinity, Acta Physiologiae Plantarum, 29, 351-359.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Sholkopf, B., Weigel, D. ve Lohmann, J.U., 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development, Nature Genetics, 37, 501-506.
- Schroedaer, J., Allen, G., Hugouvieux, V., Kwak, J. ve Waner, D., 2001. Guard cell signal transduction, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52,627-658.
- Schroedaer, J. ve Nambara, E., 2006. A quick release mechanism for abscisic acid, Cell, 126, 1023-1025.

- Schwartz, S.H., Qin, X. ve Zeevaart, J.A.D., 2003. Elucidating the indirect pathway of Abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes, Plant Physiol, 131, 1591–1601.
- Seckin, B., Turkan, I., Sekmen, A.H. ve Ozfidan, C., 2010. The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley), Environmental and Experimental Botany, 69, 76–85.
- Seifert, G.J. ve Roberts, K., 2007. The biology of arabinogalactan proteins, Annual Review of Plant Biology, 58, 137-161.
- Seifert, G.J., Xue, H. ve Acet, T., 2014. The *Arabidopsis thaliana Fasciclin Like Arabinogalactan Protein 4* gene acts synergistically with abscisic acid signalling to control root growth, Annals of Botany, doi:10.1093/aob/mcu010, 1-9.
- Serrano, R., Mulet, J. M., Rios, G., Marquez, J. A., Larrinoa, I. i. F. d., Leube, M. P. ve Mendizabal, I., et.al., 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress, Journal of Experimental Botany, 50, 1023–1036.
- Sgherri, C.L.M., Maffei, M. ve Navari-Izzo, F., 2000. Antioxidative Enzymes in Wheat Subjected to Increasing Water Deficit and Rewatering, Journal of Plant Physiology, 157, 273-279.
- Shan H., Chen S., Jiang J., Chen F., Chen Y., Gu C., Li P., Song A., Zhu X., Gao H., Zhou G., Li T. ve Yang X., 2012. Heterologous Expression of the Chrysanthemum R2R3-MYB Transcription Factor CmMYB2 Enhances Drought and Salinity Tolerance, Increases Hypersensitivity to ABA and Delays Flowering in *Arabidopsis thaliana*, Molecular Biotechnology, 51, 160-173.
- Sharma, P. ve Dubey, R.S., 2005. Drought Induced Oxidative Stress and Enhances The Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings, Plant Growth Regulation, 46, 209-221.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. ve Zhu, J.K., 2002. Role of *SOS1* as a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter that controls long distance Na^+ transport in plant, Plant Cell, 14, 465–477.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. ve Zhu, J.K., 2003. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Nature Biotechnology, 21, 81–85.
- Shi, H., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B. ve Zhu, J. K., 2003. The arabidopsis *SOS5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion, Plant Cell, 15, 19-32.
- Shi, C., Feng, C., Yang, M., Li, J., Li, X., Zhao, B., Huang, Z. ve Ge, R., 2014. Overexpression of the receptor-like protein kinase genes *AtRPK1* and *OsRPK1* reduces the salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*, Plant Science, 217– 218, 63– 70.

- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response, Plant Physiology, 115, 2, 327.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways, Current Opinion in Plant Biology, 3, 3, 217–223.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Gene networks involved in drought stress response and tolerance, J. Exp. Bot., 58, 221-227.
- Showalter, A.M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D. ve Welch, L.R., 2010. A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins [W][OA], Plant Physiology, 153, 485–513.
- Sivakumar, P., Sharmila, P. ve Saradhi, P.P., 2000. Proline Alleviates Salt-stress-induced Enhancement in Ribulose-1,5-bisphosphate Oxygenase Activity, Biochemical ve Biophysical Research Communications, 279, 512-515.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. ve Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses, Acta Biochimia Polonica, 54, 39-50.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, New Phytologist, 125, 27-58.
- Somerville, C., ve Koornneef, M., 2002. A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant, Nature Reviews Genetics, 3, 883-889.
- Somerville, C. Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. ve Youngs, H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls, Science, 306, 2206-2211.
- Soto, A., Ruiz, K.B., Ravaglia, D., Costa, G. ve Torrigiani, P., 2013. ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage, Plant Physiology and Biochemistry, 64, 11-24.
- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K. ve Kavi Kishor, P.B., 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches, Gene, 388, 1–13.
- Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H., Buaboocha, T. ve Chadchawan, S., 2013. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress, Environmental and Experimental Botany, 86, 94– 105.
- Stahl, W. ve Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, Research Monographs, 1-2.

- Streb, P., Michael-Knauf, A. ve Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions, Physiologia Plantarum, 88, 590-598.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. ve Thomashow, M. F., 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 3, 1035–1040.
- Swanson, S. ve Gilroy, S., 2010. ROS in plant development, Physiologia Plantarum, 138, 384–392.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P. ve Huala, E., 2007. The Arabidopsis Information resource (TAIR): gene structure and function annotation, Nucleic Acids Research, 36, Database issue D1009–D1014.
- Szabados, L. ve Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid, Trends in Plant Science, 15, 89-97.
- Szekely, G., Abraham, E. ve Cseplo, A., 2008. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis, The Plant Journal, 53, 11-28.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. Plant Physiology, Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2008. Bitki Fizyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Naruasak, Y., Narusaka, M., Zhu, J.K. ve Shinozaki, K., 2004. Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt cress using Arabidopsis microarray, Plant Physiol., 135, 1697-1709.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guiamet, J.J. ve Araus, J.L., 2000. Oxidative Damage to Tylakoid Proteins in Water-Stressed Leaves of Wheat (*Triticum aestivum*), Physiologia Plantarum, 108, 398-404.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the Flowering plant Arabidopsis thaliana, Nature, 408, 796–815.
- Thomashow, M. F., 1998. Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance, Plant Physiology, 118, 1, 1–8.
- Thomashow, M.F., 1999. Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 571–599.

- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y. ve Collinge D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction, The Plant Journal, 11, 87-94.
- Toufighi, K., Brady, M., Austin, R., Ly, E. ve Provart, N.J., 2005. The Botany Array Resource: e- Northern, Expression Angling, and Promoter Analyses, Plant Journal, 43, 153-163.
- Türkan İ. ve Demiral T., 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance, Environmental and Experimental Botany, 67, 2–9.
- Tyerman, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E. ve Smith, J. A. C., 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations, Journal of Experimental Botany, 50, 1055–1071.
- Umezawa, T., Hirayama, T., Kuromori, T. ve Shinozaki, T., 2011. Advances in Botanical Research, The Regulatory Networks of Plant Responses to Abscisic Acid, Editor İsmail Türkan, 57, First Edition, 202-233, Elsevier, Japan.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By Botrytis cinerea Polygalacturanase, Acta Physiologiae Plantarum, 13, 43-50.
- Wang, W., Vinocur, B. ve Altman A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, Planta, 218, 1–14.
- Wang, X., 2004. Lipid signaling, Current Opinion in Plant Biology, 7, 329–336.
- Wangenheim, D., Daum, G., Lohmann, J., Stelzer, E. ve Maizel, A., 2014. Live Imaging of Arabidopsis Development, Arabidopsis Protocols Book, Part V, Pages pp 539-550. DOI10.1007/978-1-62703-580-4_28, ISBN978-1-62703-579-8, Online ISBN978-1-62703-580-4, Methods in Molecular Biology Series, Volume 1062, ISSN1064-3745, Publisher: Humana Press.
- Wind, J.J., Peviani, A., Snel, B., Hanson, J. ve Smeekens, S.C., 2013. ABI4: versatile activator and repressor, Trends In Plant Science, 18, 125-32.
- Wolf, S., Hematy, K. ve Hofte, H., 2012. Growth control and cell Wall signaling in plants, Annual Review of Plant Biology, 63, 381-407.
- Wu, S.-J., Ding, L. ve Zhu, J.-K., 1996. SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition, The Plant Cell, 8, 617-627.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H. ve Zhu, J.K., 2001. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress and osmotic stress responsive gene expression, Plant Cell, 13, 2063–2083.

- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D. ve Zhu, J.K., 2001. Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis, Developmental Cell, 1, 771-81.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. ve Zhu, J.K., 2002. Cell signaling during Cold, Drought, and Salt Stress, The Plant Cell, 14, 165-183.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Tanaka, Y., Stevenson, B., Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. ve Zhu, J.K., 2002a. Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 10899-904.
- Xiong, Y.C., Xing, G.M., Gong, C.M., Li, F.M., Wang, S.M., Li, X.A. ve Wang, Y.F., 2006. Dual role of abscisic acid on antioxidative defense in grass Pea seedling (*Lathyrus sativus* L.), Pakistan Journal of Botany, 39, 999–1014.
- Xu, S.L., Rahman, A., Baskin, T.I. ve Kieber, J.J., 2008. Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in Arabidopsis, Plant Cell, 20,3065-79.
- Velasquez, S.M., Ricardi, M.M., Dorosz, J.G., Fernandez, P.V., Nadra, A.D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancia, M., Verli, H., Pauly, M., Bacic, A., Olsen, C.E., Ulvskov, P., Petersen, B.L., Somerville, B., Iusem, N.D. ve Estevez, J.M., 2011. O-Glycosylated Cell Wall Proteins Are Essential in Root Hair Growth, , Science,17, 1401-1403.
- Vierling, E., 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42, 1, 579–620.
- Vinocur, B. ve Altman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, Current Opinion in Biotechnology, 16, 123–132.
- Vionella, A. ve Macri, F., 1991. Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide at Surface of Plant, Cell. J. Bioenerg. Biomemb., 23, 409-423.
- Yazici, I., Türkan, İ., Sekmen, A.H. ve Demiral T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation, Environmental and Experimental Botany, 61, 49-57.
- Yılmaz, E., Tuna, L.A. ve Bürün, B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri, C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi ISSN 1305-1385, Celal Bayar University Journal of Science, 7.1, 47–66.
- Yokoi, S., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 2002. Salt stress tolerance of plants, JIRCAS, Working Report, 25-33.

- Zhang, J., Cui, S., Li., J. ve Kirkham, M.B., 1995. Protoplasmic Factors, Antioxidant Responses, and Chilling Resistance in Maize, Plant Physiology and Biochemistry, 33, 567-575.
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jürgens, G., Paul Knox, J. ve Wang, M.H., 2010. ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem, The Plant Journal, 64, 764–774.
- Zhang, X., Yang, G., Shi, R., Han, X., Qi, L., Wang, R., Xiong, L. ve Li, G., 2013. Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase 45 functions in the responses to abscisic acid and abiotic stresses, Plant Physiology and Biochemistry, 67, 189-198.
- Zhao, Y., Chow, T.F., Puckrin, R.S., Alfred, S.E., Korir, A.K., Larive, C.K. ve Cutler, S.R. 2007. Chemical genetic interrogation of natural variation uncovers a molecule that is glycoactivated, Nature chemical biology, 3, 716-21.
- Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S., ve Dai, S., 2013. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots, Journal of Proteomics, 82, 230 – 253.
- Zheng, Y., Huang, Y., Xian, W., Wang, J. ve Liao, H., 2012. Identification and expression analysis of the Glycine max CYP707A gene family in response to drought and salt stresses, Annals of Botany, 110, 743-756.
- Zhou, B., Guo, Z. ve Lin, L., 2006. Effects of abscisic acid application on photosynthesis and photochemistry of *Stylosanthes guianensis* under chilling stress, Plant Growth Regulation, 48, 195–199.
- Zhu, J.K., Liu, J. ve Xiong, L., 1998. Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis: evidence for a critical role of potassium nutrition, The Plant Cell Online, 10, 1181–1192.
- Zhu, J.K., 2000. Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using Arabidopsis, Plant Physiol, 124, 941–948.
- Zhu, J.K., 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses, Current Opinion in Plant Biology, 4, 401–406.
- Zhu, J.K., 2001a. Plant salt tolerance, Trends in Plant Science, 6, 66–71.
- Zhu, J. K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants, Annual Review of Plant Biology, 53, 247-273.
- Zhu, J., Lee B., Dellinger M., Cui X., Zhang C., Wu S., Nothnagel E.A. ve Zhu J.K., 2010. A cellulose synthase-like protein is required for osmotic stress tolerance in Arabidopsis, The Plant Journal, 63, 128–140.

- Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W. ve Zhang, H., 2010. The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt ve osmotic stress responses, Gene, 457, 1–12.
- Zimmermann, S. ve Sentenac, H., 1999. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions, Current Opinion in Plant Biology, 2, 6, 477–482.

ÖZGEÇMİŞ

24.03.1982 yılında Gümüşhane’de doğdu. İlk öğrenimini Gümüşhane Gazipaşa İlkokulu’nda ve orta öğretimini Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2001 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, OFMA-Biyoloji Öğretmenliği Bölümü’nde başladığı lisans öğreniminden 2006 yılında bölüm üçüncüsü olarak mezun oldu. Ayrıca, 2004-2006 yılları arasında KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nde Yan Dal öğrenimini tamamladı. 2009 yılında KTÜ-Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Doktora eğitimine başladı. Yine aynı yıl, Gümüşhane Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2010 yılında Erasmus öğrenci değişim programı ile gittiği Boden Kultur Üniversitesi (Avusturya-Viyana), Biyoteknoloji Enstitüsü, Hücre Biyolojisi ve Genetik Bölümü’nde 1 yıl süreyle öğrenim gördü ve uluslararası bir projede yer aldı. Yine 2011 yılında aynı üniversiteye YÖK’ün yurt dışı araştırma bursu ile giderek, 1 yıl süresince tez çalışmalarını yürüttü. Şuanda Gümüşhane Üniversitesi’nde öğretim elemanı olarak görevine devam etmektedir.