

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KURAKLIK STRESİ KOŞULLARINDA POLİAMİN METABOLİZMASI İLE**  
**HİDROJEN PEROKSİT İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Yüksek Biyolog Mehmet DEMİRALAY**

**HAZİRAN 2015**  
**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
DOKTORA TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ  
Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Kuraklık Stresi Koşullarında Poliamin Metabolizması ile Hidrojen Peroksit İlişkisinin Araştırılması” isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamda danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve tecrübesini her zaman ilgiyle paylaşan değerli hocam sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na sonsuz teşekkürleri bir borç bilirim.

Tez süreci boyunca büyük bir sabırla bana yardımcı olan, tez izleme jüri üyesi sayın hocam Prof. Dr. Faik Ahmet AYZAZ’a ve sayın hocam Prof. Dr. İbrahim TURNA’ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Biyoloji Bölümü laboratuvarlarını ve imkanlarını kullanmama izin veren bölüm başkanım sayın Prof. Dr. Hüseyin İNCEER’e teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım Doç. Dr. Aykut SAĞLAM, Yrd. Doç. Dr. Ersan BEKTAŞ ve Arş. Gör. Fuat YETİŞSİN’e, beraber çalıştığımız ekibin değerli üyeleri olan Doç. Dr. Rabiye TERZİ, Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER, Yrd. Doç. Dr. Tuba ACET, Ahmet Gencer YEDİYILDIZ, Asiye SEZGİN, Cansu HACISALİHOĞLU, Sevgi KONAR, Lokman KÜÇÜK ve Abdullah Erkam ŞAHİN’e teşekkür ederim. Poliamin ölçümlerini gerçekleştirmem için bana laboratuvar imkanlarını sunan KTÜ Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Ahmet YAŞAR hocama teşekkür ederim. Görevli olduğum Fen Edebiyat Fakültesi dekanı sevgili hocam Prof. Dr. Yılmaz ALTUN’a teşekkür ederim. Ayrıca Artvin Çoruh Üniversitesi Biyoloji Bölümü hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmamda bana olan desteklerini hiç eksik etmeyen dostlarım Bakiye ÇAKIR ve Şule CEYLAN’a ve Ayşegül SARAL’a teşekkür ederim. Artvin’de bulunduğum sürece arkadaşlığını ve dostluğunu benimle paylaşan Seçkin YILMAZ’a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca beni seven, bana inanan, dualarını her zaman kalbimde hissettiğim ve bir ömür boyu çalışsam bile emeklerinin karşılığını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim en değerli ve mukaddes varlığım olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK 113Z863, ve KTÜ BAP 10544 nolu projelerle desteklenmiştir.

Mehmet DEMİRALAY

Trabzon 2015

## **TEZ ETİK BEYANNAMESİ**

Doktora Tezi olarak sunduğum “Kuraklık Stresi Koşullarında Poliamin Metabolizması ile Hidrojen Peroksit İlişkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı başından sonuna kadar danışmanım Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda 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. 05/05/2015

Mehmet DEMİRALAY

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
ÖZET .....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1.GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bitkiler ve Stres.....	5
1.2.1. Kuraklık Stresi.....	7
1.2.1.1. Kuraklık Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkisi .....	7
1.2.1.2. Hidrojen Peroksit ve Kuraklık Stresi.....	9
1.3. Poliaminler .....	9
1.3.1. Poliamin Metabolizması.....	11
1.3.2. Poliaminler, NADPH Oksidase, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ve Kuraklık Stresi.....	14
1.3.2.1. Kuraklık Stresi Toleransında Poliaminlerin ABA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve Prolinle İlişkisi.....	16
1.4. Mısır Bitkisi ( <i>Zea mays</i> L.).....	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	23
2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Yapılan Uygulamalar .....	23
2.2. Su Potansiyeli Ölçümü .....	24
2.4. Lipid Peroksidasyonu Tayini.....	24
2.5. İçsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tayini.....	25
2.6. Prolin Tayini.....	25
2.7. Poliamin Tayini .....	25
2.8. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İlişkili Enzim Aktivitelerinin (NADPH Oksidaz, Katalaz, Peroksidaz ve Süperoksit Dismutaz) ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....	26
2.8.1. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi .....	26
2.8.2. NADPH Oksidaz (NOX) Aktivitesinin Belirlenmesi .....	26
2.8.3. Katalaz Aktivitesi .....	27
2.8.4. Peroksidaz Aktivitesi.....	27
2.8.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	27
2.9. İçsel Absisik Asit (ABA) Tayini .....	27
2.10. Moleküler Çalışmalar .....	28
2.10.1. Real Time PCR Analizleri İçin Uygun Primerlerin Tasarlanması.....	28
2.10.2. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi .....	29
2.10.3. Gen İfadelerinin Real Time (RT) PCR Analizleri ile Belirlenmesi .....	30
2.11. İstatistik Analizler .....	31
3. BULGULAR .....	32
3.1. Poliamin İçeriğinin Azaltılması İçin Uygun İnhibitör (DFMA ve DFMO) Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	32
3.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Sentez İnhibitörü ve Poliamin İnhibitör Uygulamalarının Stresle İlişkili Bazı Parametreler Üzerine Etkileri .....	33

3.2.1.	Su Potansiyeli .....	33
3.2.2.	Lipid Peroksidasyonu .....	34
3.3.	Çeşitli Uygulamaların H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İçeriği ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İçeriğinin Düzenlenmesinden Sorumlu Olan Parametreler ve Gen İfadeleri Üzerine Etkileri .....	34
3.3.1.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İçeriği .....	34
3.3.2.	NADPH Oksidaz Enzim Aktivitesi .....	35
3.3.3.	NADPH Oksidaz ( <i>NOX</i> ) Geni İfade Seviyesi .....	36
3.3.4.	Katalaz Enzim Aktivitesi .....	37
3.3.5.	Peroksidaz Enzim Aktivitesi .....	38
3.3.6.	Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi .....	39
3.4.	Çeşitli Uygulamaların Prolin İçeriği ve Prolin Metabolizmasında Görevli Olan Gen İfadeleri Üzerine Etkileri .....	40
3.4.1.	Prolin İçeriği .....	40
3.4.2.	Prolin 5- Karboksilat Sentaz ( <i>P5CS</i> ) Geni İfade Seviyesi .....	41
3.4.3.	Prolin Dehidrogenaz/Oksidaz ( <i>PRODH</i> ) Geni İfade Seviyesi .....	42
3.5.	Çeşitli Uygulamaların Absisik Asit ( <i>ABA</i> ) İçeriği ve Absisik Aldehit Oksidaz ( <i>AAOX</i> ) Geni İfade Seviyesine Etkileri .....	43
3.5.1.	Absisik Asit ( <i>ABA</i> ) İçeriği .....	43
3.5.2.	Absisik Aldehit Oksidaz ( <i>AAOX</i> ) Geni İfade Seviyesi .....	44
3.6.	Çeşitli Uygulamaların Poliamin İçeriği ve Poliamin Metabolizmasında Görev Alan Genlere Ait İfade Seviyeleri Üzerine Etkileri .....	45
3.6.1.	Poliamin İçeriği .....	45
3.6.2.	Arjinin Dekarboksilaz ( <i>ADC</i> ) .....	47
3.6.3.	Agmatin Deaminaz/İminohidrolaz ( <i>AIH</i> ) .....	48
3.6.4.	S-Adenozilmetiyonin Dekarboksilaz ( <i>SAMDC</i> ) .....	49
3.6.5.	Spermidin Sentaz ( <i>SPDS</i> ) .....	49
3.6.6.	Diamin Oksidaz/Cu Amin Oksidaz ( <i>DAO/CuAO</i> ) .....	50
3.6.7.	Poliamin Oksidaz ( <i>PAO</i> ) .....	51
4.	TARTIŞMA .....	53
5.	SONUÇLAR .....	68
6.	ÖNERİLER .....	70
7.	KAYNAKLAR .....	72

## ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

KURAKLIK STRESİ KOŞULLARINDA POLİAMİN METABOLİZMASI İLE  
HİDROJEN PEROKSİT İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet DEMİRALAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

2015, 87 Sayfa

Mevcut çalışmada poliamin metabolizmasında görev alan arjinin dekarboksilaz, agmatin iminohidrolaz/deaminaz, spermidin sentaz, S-adenozil metiyonin dekarboksilaz, diamin oksidaz/bakır amino oksidaz ve poliamin oksidaz genlerine ait ekspresyon seviyeleri, kuraklık stresi koşullarında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), difenil iyodonyum klorit, diflorometil arjinin ve diflorometil ornitin gibi farklı uygulamalara göre RT PCR metoduyla incelendi. Ayrıca poliamin metabolizmasıyla yakın ilişkili olan absisik asit miktarı (ABA) ile sentezinde görev alan absisik aldehit oksidaz, prolin miktarı ve prolin metabolizmasından sorumlu olan prolin 5 karboksilat sentaz ve prolin dehidrogenaz genleri ifade seviyeleri belirlendi. Bu ilişkinin belirlenmesinde kritik parametremiz olan poliamin seviyeleri (putresin, spermidin ve spermin) HPLC yöntemiyle ölçüldü. Sonuçlara göre dışarıdan uygulanan hidrojen peroksitin kuraklık stresi koşullarında poliamin sentezini uyardığı ve bu uyarımı poliamin sentez genlerini teşvik ederek ve poliamin yıkım genlerini ise baskılayarak gerçekleştirdiği gözlemlendi. Ayrıca yine kuraklık koşullarında dışarıdan uygulanan hidrojen peroksitin ABA sentezini baskıladığı, prolin sentezini teşvik ettiği saptandı. Sonuç olarak düşük konsantrasyonda dışarıdan uygulanan hidrojen peroksitin, poliamin metabolizmasında olumlu bir sinyalizasyon şelalesini başlattığı ve bunun sonucunda sentez yönünden teşvik edici, yıkım genleri üzerine ise baskılayıcı etkilere sahip olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Kuraklık, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), poliamin, putresin, spermidin, spermin, absisik asit (ABA), *Zea mays* L.



PhD Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN POLYAMINE METABOLISM  
AND HYDROGEN PEROXIDE UNDER DROUGHT STRESS

Mehmet DEMİRALAY

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU  
2015, 87 Pages

The expression levels of the genes, which take part in polyamine metabolism, such as arginine dekarboxylase, agmatine iminohidrolase/deaminase, spermidine synthase, S-adenosyl methionine decarboxylase, diamine oxidase/copper amino oxidase and polyamine oxidase were determined by RT PCR under drought stress after exogenous hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), diphenyleneiodonium chloride, difluoromethyl arginine and difluoromethyl ornithine treatments. Content of abscisic acid (ABA) and expression level of abscisic aldehyde oxidase gene that has a role in abscisic acid synthesis were determined. In addition to ABA, proline content, and the expression levels of pyrroline 5 carboxylate synthase and proline dehydrogenase were determined. Polyamine levels (putrescine, spermidine and spermine), our critical parameter in determining the relationship were measured by HPLC. According to data, exogenous  $H_2O_2$  induced polyamine synthesis by up regulating polyamine synthesizing genes and down regulation polyamine degrading genes. Moreover,  $H_2O_2$  suppressed ABA synthesis and induced proline synthesis. In conclusion, exogenous  $H_2O_2$  that was applied at a low concentration affected polyamine metabolism toward synthesis. On the contrary the polyamine degrading genes were suppressed by  $H_2O_2$ . It was determined that  $H_2O_2$  started a signaling cascade in polyamine metabolism.

**Key Words:** Drought, Hydrogen peroxide, polyamine, putrescine, spermidine, spermine, abscisic acid, (ABA), *Zea mays* L.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri .....	6
Şekil 2. Bitkilerde yaygın olarak bulunan poliaminler .....	12
Şekil 3. Poliamin metabolizması .....	13
Şekil 4. Bazı abiyotik stres çeşitlerinin poliamin sentezine etkileri .....	14
Şekil 5. Dışarıdan uygulanan poliamin sentez inhibitörlerinin içsel poliamin seviyeleri üzerine etkisi ve etkin inhibitör konsantrasyonunun tespit edilmesi. ....	32
Şekil 6. Deney uygulamalarının kuraklık stresine maruz kalmış mısır bitkisinde yaprak su potansiyeli üzerine etkisi. ....	33
Şekil 7. Deney gruplarında MDA içeriğinin belirlenmesi.....	34
Şekil 8. Çeşitli uygulamalarının içsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> seviyesine etkisi .....	35
Şekil 9. Çeşitli uygulamalarının NAPH oksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	36
Şekil 10. Çeşitli uygulamaların NADPH Oksidaz ( <i>NOX</i> ) geni ifade seviyesine etkileri ...	37
Şekil 11. Çeşitli uygulamaların katalaz enzim aktivitesine etkileri.....	38
Şekil 12. Çeşitli uygulamaların peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri .....	39
Şekil 13. Çeşitli uygulamaların süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. ....	40
Şekil 14. Çeşitli uygulamaların prolin içeriğine etkileri.....	41
Şekil 15. Çeşitli uygulamalarının prolin karboksilat sentaz ( <i>P5CS</i> ) geni ifade seviyesi üzerine etkileri .....	42
Şekil 16. Çeşitli uygulamaların prolin dehidrogenaz/oksidaz geni ( <i>PRODH</i> ) ifade seviyesine etkileri .....	43
Şekil 17. Çeşitli uygulamaların ABA seviyesi üzerine etkileri .....	44
Şekil 18. Çeşitli uygulamaların Absisik aldehit oksidaz ( <i>AAOX</i> ) geni ifade seviyesi üzerine etkileri .....	45
Şekil 19. Çeşitli uygulamaların poliamin seviyeleri üzerine etkileri.....	46
Şekil 20. Arjinin dekarboksilaz ( <i>ADC</i> ) genine ait nisbi ifade seviyelerinin deney gruplarına göre belirlenmesi.....	47
Şekil 21. Çeşitli uygulamaların agmatin deaminaz/iminohidrolaz ( <i>AIH</i> ) genine ait ifade seviyeleri üzerine etkileri .....	48
Şekil 22. Çeşitli uygulamaların S-adenozil metiyonin dekarboksilaz geni ( <i>SAMDC</i> ) ifade seviyesi üzerine etkileri .....	49
Şekil 23. Çeşitli uygulamaların spermidin sentaz genine ( <i>SPDS</i> ) geni ifade seviyesi üzerine etkileri .....	50
Şekil 24. Çeşitli uygulamaların diamin oksidaz/Cu Amin oksidaz ( <i>DAO/CuAO</i> ) geni ifade seviyesi üzerine etkileri .....	51
Şekil 25. Çeşitli uygulamaların poliamin oksidaz ( <i>PAO</i> ) geni ifade seviyesi üzerine etkileri.....	52
Şekil 26. Kuraklık stresi koşullarında olası H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ilişkili poliamin metabolizması.....	67

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Mısır Bitkisinin Diğer Ekinlerle Üretim Yönünden Karşılaştırılması .....	21
Tablo 2. Mısır Bitkisinin Bitki Sistematiğindeki Yeri .....	22
Tablo 3. Deney Tasarımı ve Uygulamalar.....	24
Tablo 4. İfadeleri belirlenen genlere ait primerler.....	29
Tablo 5. RT PCR Protokolü .....	30
Tablo 6. RT PCR Reaksiyon Ortamı .....	31
Tablo 7. Çalışma bulgularının genel bir özeti .....	65

## KISALTMALAR DİZİNİ

<i>AAOX</i>	: Absisik Aldehit Oksidaz Geni
<i>ABA</i>	: Absisik Asit
<i>ADC</i>	: Arjinin Dekarboksilaz Geni
<i>AIH</i>	: Agmatin İminohidrolaz/Deaminaz Geni
<i>CAT</i>	: Katalaz
<i>CPA</i>	: N Karbomil Putresin Aminotransferaz
<i>CuAO</i>	: Bakır Amin Oksidaz/Primer Amin Oksidaz ( <i>DAO</i> ) Geni
<i>DAO</i>	: Diamin Oksidaz ( <i>CuAO</i> ) Geni
<i>DFMA</i>	: Diflorometil Arjinin
<i>DFMO</i>	: Diflorometil Ornitin
<i>DPI</i>	: Difenil İyodonyum Klorür
$H_2O_2$	: Hidrojen Peroksit
<i>NOX</i>	: NADPH Oksidaz Geni
<i>ODC</i>	: Ornitin Dekarboksilaz Geni
<i>P5CS</i>	: Pirolin 5-Karboksilat Sentaz Geni
<i>PAO</i>	: Poliamin Oksidaz Geni
<i>PEG</i>	: Polietilen Glikol 6000
<i>POD</i>	: Peroksidaz
<i>PRODH</i>	: Prolin Dehidrogenaz/Oksidaz Geni
<i>SAMDC</i>	: S-Adenozil Metiyonin Sentaz Geni
<i>SOD</i>	: Süperoksit Dismutaz
<i>SPDS</i>	: Spermidin Sentaz Geni
<i>SPMS</i>	: Spermin Sentaz Geni

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Kuraklık problemini de içine alan birçok abiyotik stres faktörü, küresel ölçekte bitki üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Birleşmiş Milletler Dünya Tarım ve Gıda Organizasyonu (FAO) verilerine göre dünya nüfusunun nerdeyse yarısı olan 3 milyar insan kırsal bölgelerde yaşamlarını sürdürmektedir (FAO Statistical Yearbook, 2013). Dünya nüfusunun 2050 yılında 9 milyar olacağı öngörülmektedir. Bu durum ise, büyüme eğrisi nispeten değişmeyen tarımsal sektörün (kırsal bölge), günümüze kıyasla gelecekte daha fazla insanı beslemek zorunda olacağı anlamına gelmektedir. Dünyadaki tarım arazilerinin genişletilmesi için çok az bir alan mevcuttur. Günümüzde 1,5 milyar hektarın üzerinde bir alan (dünya karasal alanın yaklaşık %12'si) tarımsal üretim için kullanılmaktadır. Son 50 yıllık süreçte tarımsal üretim yıl başına %2-%4 oranında büyürken; tarım arazilerindeki büyüme sadece %1 oranında olmuştur. Başka bir şekilde izah etmek gerekirse, bu 50 yıllık zaman diliminde kişi başına düşen küresel tarım arazisi dereceli bir şekilde 0,44 hektardan 0,25 hektara düşmüştür. Kişi başına düşen tarım arazilerindeki azalışa rağmen, sulama yöntemlerinin iyileştirilmesi, biyoteknolojik ve genetik çalışmaların tarımsal ölçekte kullanılması sayesinde ekin üretiminde önemli artışlar sağlanmıştır (Alexandratos ve Bruinsma, 2012). Diğer taraftan dünya nüfusunun artması da, besin ihtiyacındaki hızlı artışı tetiklemektedir. FAO'ya göre dünya, 2050 yılında günümüzdekine oranla %70 daha fazla besine ihtiyaç duyacaktır. Bu bilgilerden anlaşılacağı üzere, Dünya nüfusunu beslemek için tarım alanlarının genişletilmesi pek mümkün görülmemektedir. Bu nedenle mevcut tarım alanlarında verimi arttırabilecek çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışmaların en önemlilerinden birisi, çevresel stresten en az etkilenebilecek toleranslı bitki çeşitlerinin geliştirilmesidir.

Çevresel stres faktörlerinden dünya üzerindeki kullanılabilir alanları en fazla etkileyen stres türü, %26'lık payla kuraklık stresidir (Blum, 1986). Kuraklık stresi; bitkilerde osmotik stresi uyararak turgor kaybına ve dolayısıyla büyümede azalmaya neden olur. Ayrıca kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde hücre zarının yapısal bütünlüğü bozulabilir ve proteinlerde aktivite kaybı meydana gelebilir. Bunun sonucunda fotosentezin inhibisyonu, metabolik bozukluklar, büyüme bozuklukları, üremede azalma ve erken senesens meydana gelir (Krasensky ve Jonak, 2012). Dolayısıyla bitkisel verimde

önemli azalmalar gerçekleşir. Strese maruz kalan bitkiler, yaşamlarını devam ettirebilmek için bazı dayanıklılık mekanizmaları geliştirirler (Arora ve Mohan, 2002). Bunlar, tolerans ve sakınma mekanizması olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir.

Bitkilerde stres sonucu oluşan verim kayıplarını en aza indirmek ve dünyanın değişen iklim koşullarına karşı dayanıklı türler geliştirmek amacıyla bu dayanıklılık mekanizmalarının çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Son yıllarda bitkilerde stres dayanıklılığı ile ilgili sinyal bileşikler ve sinyal iletim yolları hakkında fazlaca çalışmalar yapılmaktadır (Rhee, 2006). Bu sinyal bileşiklerinden birisi de hidrojen peroksittir (Rhee, 2006). Hidrojen peroksitin farklı streslere karşı tolerans sağladığı bilinmektedir. Nitekim reaktif oksijen türlerinin önemli bir üyesi olan hidrojen peroksit, genellikle toksik etki göstermesine rağmen abiyotik stres toleransında önemli bir sinyal iletimi rolüne sahiptir (Foyer ve Noctor, 2009, Rhee,2006). Bazı araştırmacılar, düşük konantrasyonlarda  $H_2O_2$  uygulamalarının bitkilerde kuraklık, sıcaklık ve ağır metal gibi abiyotik stres türlerine karşı tolerans sağladığını ifade etmişlerdir (He vd., 2009; Hu vd., 2009; Gao vd., 2010). Özellikle Terzi vd., (2014) tarafından laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda yaprak kıvrılmasının büyük ölçüde hidrojen peroksit sinyal yolu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu kapsamda araştırma grubumuzca tamamlanan Tübitak projesi kapsamında (115T511) hidrojen peroksit uygulamasının poliamin seviyesini ilginç bir şekilde uyardığı saptanmıştır. Bu araştırmalar sonucunda stres toleransında önemli bir molekül olan poliaminlerle, hidrojen peroksit arasında bir ilişkinin olabileceği düşünülmüştür. Bitkilerde stres etkisiyle artış gösteren bileşiklerden birisi olan poliaminler, nükleus dahil bitki hücresinin tüm içsel yapılarında ve birçok yaşamsal süreçlerinde bulunurlar (Galston vd., 1997; Walden vd., 1997; Bouchereau vd., 1999; Kuznetsov ve Shevyakova 2007; Bachrach, 2010). Ayrıca farklı bitki türleriyle devam eden çalışmalar poliamin birikiminin kuraklık, tuzluluk, soğuk, sıcak, ozon, UV, ağır metal toksisitesi, mekanik yaralanma ve herbisit gibi çok sayıda çevresel strese karşı bir yanıt olduğunu göstermiştir (Bouchereau vd., 1999; Alcazar vd., 2006b; Groppa ve Benavides 2008). Buna karşın, bu yanıtların fizyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Alcazar vd., 2010a). Dışarıdan uygulanan hidrojen peroksitin poliamin seviyelerine etkileriyle ilgili literatürde yapılan çalışmalar ise çok sınırlıdır. Örneğin Abass ve Mohamed (2011) fasulye tohumlarında yaptıkları çalışmada  $H_2O_2$  uygulamasının kuraklık koşullarında sürgünlerdeki poliamin içeriğini uyardığını ileri sürmüşlerdir. Benzer bir şekilde laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada  $H_2O_2$ 'nin (10 mM) mısır bitkilerinde antioksidan sistemi aktive ettiği, içsel

poliamin miktarını arttırdığı ve bitki su durumunun korunmasına yardımcı olduğu belirlenmiştir (Terzi vd., 2014). Literatürde bu iki çalışma haricinde dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$ 'nin poliamin ile ilişkisi konusunda yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, bu çalışmalarda  $H_2O_2$  uygulamasının poliamin seviyeleri üzerindeki artış etkisi bir sonuç olarak verilmiş ve poliamin artışının nedeni irdelenmemiştir. Hidrojen peroksit sinyal yolunda, hidrojen peroksit ile poliaminler arasında tespit edilen bu ilişkinin ayrıntıları konusunda literatürde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle mevcut çalışmada hidrojen peroksitin poliamin sentez yolağındaki hangi genleri uyararak ya da baskılayarak bu işi yaptığı belirlenmiştir. Bu amaçla hidrojen peroksitin poliamin sentezini ya da yıkımını nasıl etkilediğini belirleyebilmek için, poliamin sentezinde görev alan arjinin dekarboksilaz (*ADC*), agmatin iminohidrolaz/deaminaz (*AIH*) s-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (*SAMDC*), spermidin sentaz (*SPDS*) ve poliamin yıkımında rol alan diammin oksidaz (*DAO/CuAO*) ve poliamin oksidaz (*PAO*) genlerine ait ifade seviyeleri incelenmiştir.

Diğer taraftan daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda 10 mM  $H_2O_2$ 'nin ABA ve prolin seviyelerini değişik şekillerde etkilediği de bulunmuştur (Terzi vd., 2014). Bu tez çalışması kapsamında söz konusu etkilenmenin poliaminler ile ilişkili olabileceği konusunda bir hipotez geliştirilmiştir. Literatürde ABA ve poliaminler arasındaki etkileşimlerden bahseden bazı raporlar mevcuttur. Örneğin kuraklık stresi altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde *SAMDC* geninin aşırı ifade edilmesi, sırasıyla spermin artışını ve *NCED3* (ABA sentezindeki anahtar bir enzim) genini ifade düzeyinde teşvik edildiği kaydedilmiştir (Alcazar vd., 2006a). Laboratuvarımızda daha önce, bir proje kapsamında (TUBİTAK 111T511) içsel absisik asit (ABA) içeriğinin ABA biyosentez inhibitörü olan floridonla azaltılması sonucunda, poliaminlerin seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (yayımlanmamış veriler). Aynı çalışmada dışarıdan uygulanan ABA'nın içsel poliamin düzeylerini artırdığı rapor edilmiştir. Benzer olarak Alcazar vd., (2006a) *Arabidopsis* bitkileri kuraklık stresi altındayken, ABA hormonunun *ADC2*, *SPDS1* ve *SPMS* ifadelerini transkripsiyon düzeyinde arttırarak poliamin metabolizmasını düzenlediğini rapor etmişlerdir. ABA eksik ve ABA duyarsız *Arabidopsis* mutantlarının kullanıldığı bir çalışmada ise (Alcazar vd., 2006b), kuraklık stresi koşullarında putresin birikiminin önemli derecede kesintiye uğradığı bildirilmiştir. ABA'nın bu şekilde poliamin birikimini teşvik ettiği kabul edilmesine rağmen, bu mekanizmayı nasıl uyardığı henüz anlaşılamamıştır. Söz konusu bu mekanizmayı incelemek için, ABA sentezinde görev alan absisik aldehit

oksidaz enzimini kodlayan gen bölgesi (*AAOX*) ifade seviyesinde incelenmiştir. Bu sebeple mevcut tez çalışmasında  $H_2O_2$  teşvikli poliamin artışının ABA ile ilişkisinin olup olmadığı test edilmiştir.

Prolin bitkilerde stres esnasında üretimi teşvik edilen ve hem antioksidan hem de osmolit olarak görev yapan önemli bir bileşiktir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009). Bitkilerde prolin oluşumu, özel genler tarafından kodlanan enzimlerin dahil olduğu kendilerine özgü bir sentez metabolizmasına sahip olduğu halde, poliaminlerin oksidasyonu sonucunda da meydana gelebilir (Cohen, 1998). Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalardan elde ettiğimiz verilere göre, dışarıdan gerçekleştirilen prolin uygulamasının, kuraklık koşullarında poliamin birikimini yüksek bir seviyede teşvik ettiği bilgisine ulaşılmıştır. Literatür bilgisi ise daha çok prolin ve poliamin ilişkisini poliamin katabolik yollarına bağlamaktadır (Hatmi vd., 2015). Ayrıca başka bir çalışmada dışarıdan poliamin uygulaması prolin seviyesini önemli derecede arttırmıştır (Shi vd., 2013b). Bu bilgiler, poliaminler ve prolin arasındaki muhtemel bir ilişki olabileceğini akla getirmektedir. Ek olarak, dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$ 'nin prolin ve poliamin içeriğini, kuraklık koşullarında önemli derecede arttırdığı da tarafımızdan tespit edilmiştir (Terzi vd., 2014). Bu sonuçlardan yola çıkarak mevcut çalışmada  $H_2O_2$ , prolin ve poliamin metabolizması arasında bir ilişki olabileceğine dair bir hipotez geliştirilmiştir. Bu ilişkiyi aydınlatmak amacıyla prolin sentezinde ve yıkımında görev alan bazı genlerin pirolin-5-karboksilat sentaz (*P5CS*) ve prolin dehidrogenaz (*PRODH*) ifade düzeyleri incelenmiştir.

Poliaminlerin abiyotik stresle olan ilişkilerini incelemek için, transgenik olarak elde edilen ve poliamin sentezi yönünden eksik ya da aşırı ifade eden mutantların kullanılması günümüzde sıkça uygulanan bir yaklaşımdır (Alcazar vd., 2006a, 2006b). Buna ek olarak, dışarıdan poliamin uygulaması veya poliamin biyosentezini bloke eden inhibitörlerin uygulanması gibi birçok yaklaşımlar da mevcuttur (Groppa ve Benavides, 2008; Moschou vd., 2012). Bu nedenle araştırmamızda poliamin biyosentez inhibitörlerinden diflorometil arjinin (DFMA) ve diflorometil ornitin (DFMO) kullanılarak hidrojen peroksitin poliamin sentezi üzerindeki olası etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Mevcut çalışmada  $H_2O_2$ 'in poliamin metabolizması üzerindeki sinyalizasyonunu incelemek ve nihayetinde poliamin metabolizmasının düzenlenmesi konusunda yeni bulgularla literatüre katkıda bulunmak hedeflenmiştir. Ayrıca, mevcut çalışma ile  $H_2O_2$ , ABA ve prolinin kuraklık stresi koşulları altında poliamin metabolizması üzerine etkileri

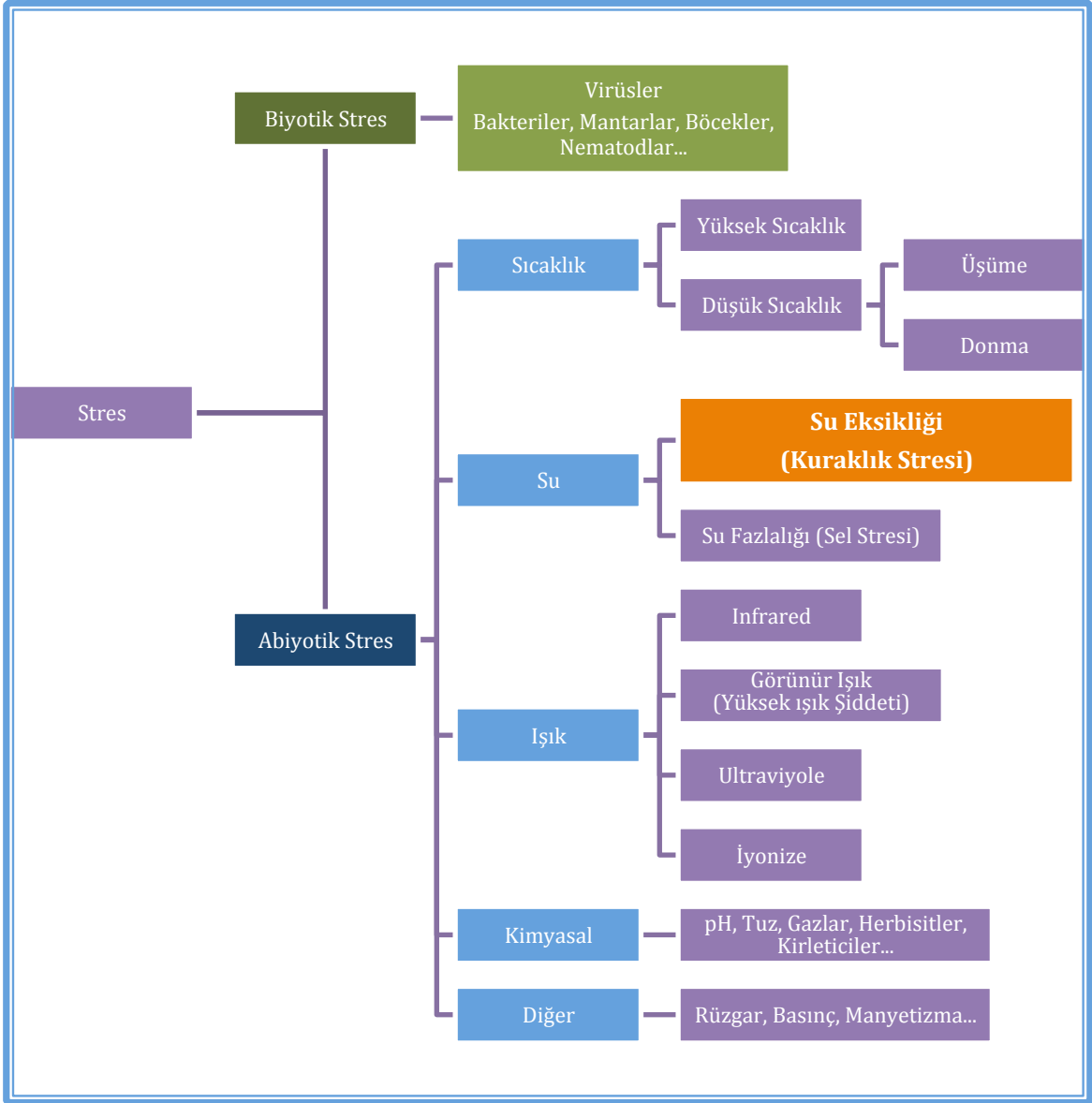


fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde incelenerek elde edilen verilerin poliamin metabolizmasının daha ayrıntılı bir şekilde yorumlanmasına yardımcı olacaktır.

## **1.2. Bitkiler ve Stres**

Canlılarda normal sistemin fonksiyonlarını inhibe etme eğiliminde olan olumsuz etkiler ya da kuvvetler, stres olarak tanımlanır (Kadıoğlu, 2011). Stres terimi aynı zamanda hasar meydana getirme potansiyelini de kapsar. Stres hücresel yapıları bozabilir ve bitki için hayati değeri olan önemli fizyolojik fonksiyonlara zarar verebilir (Krasensky ve Jonak, 2012). Kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık gibi çevresel etkiler; bitkilerde osmotik stresi tetikler ve bu durum turgor kaybına neden olur. Ayrıca strese maruz kalan bir bitkide; hücre zarının yapısal bütünlüğü bozulabilir, proteinlerde aktivite kaybı meydana gelir ve oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türleri aşırı derecede üretilir. Bunun sonucunda fotosentez inhibisyonu, metabolik bozukluklar, büyüme bozuklukları, üremede azalma ve erken senesens meydana gelir (Krasensky ve Jonak, 2012).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kısma ayrılabilir. 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 (Schulze vd., 2005; 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. Bitkilerde stres çeşitleri (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011).

Stres altındaki bitkiler üzerinde çalışma yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Birincisi bitkilerin strese karşı reaksiyon mekanizmasının öğrenilmesidir. İkincisi ise tarımsal alanlarda stres altında bulunan bitkilerin söz konusu streslere dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve dolayısıyla daha verimli ürünler elde edilmesi için gerekli literatür bilgilerinin meydana getirilmesidir. Bilindiği gibi dünya topraklarının yaklaşık % 12'si tarıma elverişlidir. Bu nedenle aşırı olumsuz şartlardan kaynaklanan streslere dayanabilen ya da bu stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirmeye ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve toleranslı bitkiler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekir (Bidwell, 1974). Bununla beraber günümüzdeki

moleküler biyoloji ve genetik çalışmaların strese tolerans konusunda aldığı mesafe göz önüne alınır; stres teşvikli genetik mekanizmaların anlaşılması hem bilimsel hem de insani (besin yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, savaşlar ve diğer problemler) açılardan önemlidir.

Genellikle bitkiler strese maruz kaldıklarında, stres sinyalizasyonu hemen başlar. Strese karşı yanıt ve savunma genlerine ait ifade seviyeleri ilk yarım saatten başlar ve 6 saat sonunda en yüksek seviyeye çıkar. Böylelikle bitkiler stresle başa çıkmak için oldukça hızlı bir yanıt sistemine sahip olurlar (Swindell, 2006).

### **1.2.1. Kuraklık Stresi**

Kuraklık genel anlamda meteorolojik bir olgu olup, toprağın su içeriği ile bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönem için kullanılan bir terimdir. Yağışsız dönemin oluşturduğu kuraklık stresi; toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından gerçekleştirilen transpirasyon hızına bağlı olarak değişir (Jones, 1992; Kozlowski ve Pallardy, 1997).

#### **1.2.1.1. Kuraklık Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkisi**

Kuraklık stresi nedeniyle meydana gelen ürün kayıpları; toplumlar üzerinde siyasi, ekonomik ve sosyolojik etkilere neden olmaktadır (Türkeş, 2012). Görüldüğü gibi kuraklık stresi, insanlığı birçok yönden etkileyen bir olgudur ve kuraklık stresine karşı bitkide oluşturulan yanıtların fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yönden araştırılması önemlidir. Kuraklık stresinin bitkiler üzerine etkilerini ise mekanik, metabolik ve oksidatif etki olarak açıklamak mümkündür.

Kuraklık, bitki hücrelerinden belirgin bir su kaybı gerçekleştiği zaman bitkide turgor azalmasıyla kendini gösterir ve bu durum “mekanik etki” olarak adlandırılır. (Lewitt, 1980). Bilindiği gibi plazma membranının yapısı hücredeki sulu ortamın bir sonucudur. Bu yapı membrandaki hidrofobik fosfolipid kuyrukların su tarafından itilmesiyle oluşur (sıvı-katı faz). Kuraklık etkisiyle hücreden su kaybıyla beraber, membran yapısı değişikliğe uğrar, fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşır ve membranlar kompakt bir görüntü alır (Jel fazı). Su kaybına bağlı olarak hücre hacmi de azalır ve plazma membranı hücre çeperinden ayrılır. Gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen

çökme, yırtılmalara yol açabilir (McKersie ve Lehsem, 1994) ve bu durum zarlar üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimlerin serbest kalması ve dolayısıyla sitoplazmanın otolizi ile sonuçlanabilir (Salisbury ve Ross, 1992). Sonuç olarak mekanik etki, normal hücrel metabolizmayı kalıcı olarak bozabilir.

“Metabolik etki” ise suyun, hücre içeriğinin büyük bir kısmını oluşturması, taşıyıcı olması, hücrel reaksiyonlar ve işlevler için çözücü rolü oynaması gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı, hücreden su kaybı durumunda, normal regülasyon devam edemez ve metabolizma bozulur. Su kaybına bağlı olarak gerçekleşen iyon birikimi, membran bütünlüğünü sağlayan proteinlerinin yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar verebilir. Su kaybı sonucunda, proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik aminoasitlerin su ile etkileşimleri bozulur (Campbell, 1991) ve bu durum protein denatürasyonlarına neden olur (Bray, 1997; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Proteinlerin parçalanmasıyla dokularda aminoasitler birikir ve enzim inhibisyonları oluşur. En önemlisi  $\text{NH}_3$  gibi toksik bir bileşik ortaya çıkar.  $\text{NH}_3$  bitkide metabolik dengenin bozulmasına neden olduğu gibi suyun yukarı doğru taşınmasına da engel olarak iki yönlü zarar verir. Kuraklık stresi sırasında hasar gören diğer yapılar DNA ve RNA gibi nükleik asitlerdir. Kuraklık stresine maruz kalmış olan bitkilerde RNAaz enzimin bağlı durumdan serbest duruma geçmesi sonucu aktivitesi artar. Kuraklık stresi altında bitkilerde hormonal dengelerde de bir takım değişiklikler meydana gelir. ABA miktarı artarken, sitokininlerin, GA'nın ve IAA'nın miktarları azalır (Çırak ve Esendal, 2006).

Bitkilerdeki “oksidatif etki” serbest radikallerin özellikle reaktif oksijen türlerinin oluşumunu içerir. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için bu moleküllerin kimyasal aktifliği oldukça yüksektir. Bu radikaller plazma membranında, mitokondrilerde ve ER membranlarında da oluşabilir (McKersie ve Lehsem, 1994). Bununla birlikte, suyun kısıtlı olduğu durumlarda, bitki daha fazla su kaybetmemek için, genellikle stomalarını kapatır. Bu durum da fotosentezle fiksasyon için gerekli  $\text{CO}_2$ 'nin alımının kısıtlanmasına neden olur ve bu nedenle kuantum verimi azalır. Birçok türde kuraklık stresi altında artan süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) üretim hızı lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doymunluğuna ve sonuç olarak membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur (Sgherri vd., 1996). Süperoksit tek başına çok fazla reaktif olmayıp,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve hidroksil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) radikallerini oluşturmak suretiyle etkili olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Serbest radikaller hem indirgen hem

de yükseltgen olarak, bazen de her iki etkiyi birlikte göstererek hücre hasarına neden olurlar. Serbest radikallerin DNA, hücresel proteinler ve lipidler üzerinde de zararlı etkileri vardır. Serbest oksijen türleri genellikle hidroksil, peroksi, singlet oksijen, peroksinitrit ve hidrojen peroksitten oluşur. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişebilmektedir.

### 1.2.1.2 Hidrojen Peroksit ve Kuraklık Stresi

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik olarak NADPH oksidaz aktivitesiyle (Torres vd., 2005) veya süperoksit dismutaz (SOD) tepkimeleri (Mehlhorn vd., 1996) sonucunda oluşur. Süperoksitin oluştuğu yerlerde önemli miktarda  $H_2O_2$ 'de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri  $H_2O_2$ 'nin üretiminden sorumlu önemli bir kaynaktır.  $H_2O_2$ '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  $H_2O_2$  oluşturulur. Diğer taraftan hücre zarı ve ekstrasellular matriks  $H_2O_2$ 'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardır (Slesak vd., 2007).  $H_2O_2$  özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olur ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ 'nin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Halliwell, 1984).

### 1.3. Poliaminler

Poliaminler, biyokimyada tanımlanmış en eski gruplardan birisi olarak kabul edilebilir (Galston 1991). Gerçekten de 1678 yılında Antonie van Leewenhoek insan genç spermelerinde gözlemleyemediği, sadece bir kaç günlük yaşlanmış insan spermelerinde rastladığı kristalize yapılardan (tetraamin yapılı Spermin=Spm) bahsetmiştir. Bu gözlemin üzerinden geçen iki yüz yıl sonra Schreiner 1878 yılında bu yapıları, organik temelli yeni bir bileşik olarak kabul ederken sadece on yıl sonra bu kristaller, Ladenburg ve Abel tarafından 1888 yılında spermin olarak isimlendirilmiştir. Yüzyıldan daha uzun bir süre

öncesinde ise bir diamin olan putresin ve kadaverin ise çürüten kadavralarda tanımlanmıştır. En çok bilinen putresin, spermin ve spermidinin yapısal ve kimyasal özellikleri 1920'li yıllarda aydınlatılmış ve dahası bunların azot içeren düşük moleküler ağırlıklı bileşikler olduğu ortaya çıkarılmıştır (Alcazar, 2010a). Poliaminlerle ilgili araştırmaların ilk zamanlarında, Richards ve Coleman ise 1952 yılında potasyum eksikliğine maruz kalmış arpa bitkilerinde ninhidrin pozitif, bilinmeyen yapıların varlığını gözlemlediler. Bu yapılar sonradan, izolasyon ve kristalizasyon yöntemleri ile putresin olarak tanımlandı (Alcazar vd., 2010a).

Günümüzde poliaminlerin yaşayan bazı arkeik metanojen ve halofit bakteriler hariç tüm hücrelerde bulunduğu kabul edilmektedir (Gupta vd., 2013). Birçok araştırma poliaminlerin yaşam için gerekli olduğunu göstermiştir. Poliaminlerin, normal hücresel pH değerlerinde protonlanmış olması nedeniyle önceleri, farklı anyonik (negatif yüklü) makromoleküllere (DNA, RNA, kromatin, proteinler ve fosfolipidler) bağlanma yetenekleriyle ilişkilendirilmiş ve böylece; poliaminlerin yapısal bir rolü olduğu düşünülmüştür. Çünkü protonize olmaları, poliaminlere pozitif bir yük kazandırır ve bu nedenle negatif yüklü olan hayati makromoleküllere bağlanabilirler. Makromoleküllere bağlanan poliaminler, bağlandıkları kritik molekülleri degradasyondan ve modifikasyondan koruyarak hayatsal fonksiyonların devam etmesine yardımcı olurlar (Ruiz-Herrera vd., 1995; D'Agostino vd., 2005). Buna karşın, makromoleküllerin stabilizasyonuna ek olarak poliaminlerin hormonlara benzer bir şekilde, çok sayıda temel hücresel süreçlerde düzenleyici moleküller olarak görev yaptığı da kabul edilmiştir (Igarashi ve Kashiwagi 2000; Seiler ve Raul 2005; Alcazar vd., 2006b; Kuznetsov ve Shevyakova 2007; Kusano vd., 2008). Bu temel süreçler; hücre bölünmesi, farklılaşması ve çoğalması, hücre ölümü, membran stabilizasyonu, enzimlerin aktivasyonu, iyon kanallarının düzenlenmesi, DNA replikasyonu, protein sentezi ve gen ifadesi gibi hayati fonksiyonlardır (Bouchereau vd., 1999; Igarashi ve Kashiwagi 2000; Kaur- Sawhney vd., 2003; Childs vd., 2003; Seiler ve Raul 2005; Andronis vd., 2014). Aynı zamanda; poliaminler; organ oluşumu, embriyo oluşumu, çiçek oluşumu ve gelişimi, yaprak senesensi, meyve gelişimi ve olgunlaşması, biyotik ve abiyotik stres yanıtları gibi diğer birçok fizyolojik süreçleri içerir (Galston ve Kaur-Sawhney 1990; Kumar vd., 1997; Walden vd., 1997; Malmberg vd., 1998; Bouchereau vd., 1999; Bagni ve Tassoni 2001; Alcazar vd., 2006b; Kusano vd., 2008). Kimyasal ya da genetik müdahalelerle poliamin

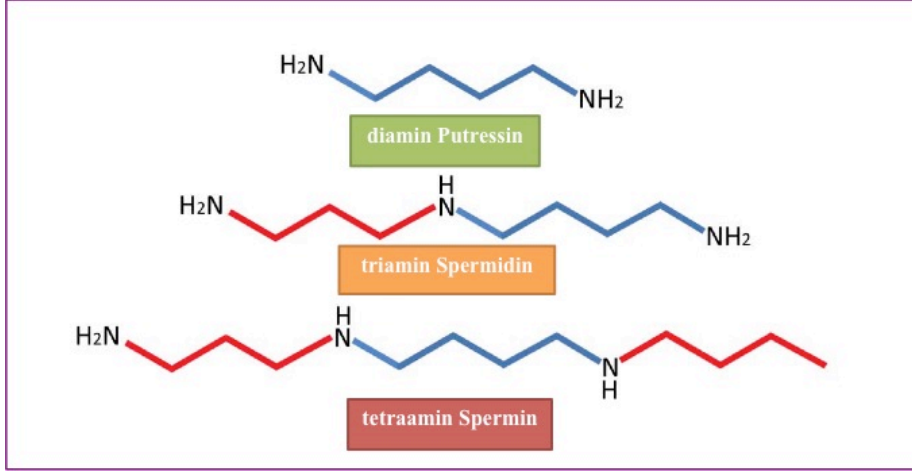
seviyelerinin azaltılması; mayalarda, protistalarda ve bitkilerde ölümcüldür (Hamasaki-Katagiri vd., 1998; Roberts vd., 2001; Imai vd., 2004; Urano vd., 2005).

Poliaminler işlevsel olarak bitkisel hormonlara benzese de; hücre içi seviyeleri yönünden daha yüksektir (poliaminler:  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M ve bitkisel hormonlar:  $10^{-13}$ - $10^{-7}$ ). Aslında; toplam poliamin konsantrasyonu ve oranı önemli ölçüde bitkinin türüne, organ ve doku tipine, bitkinin gelişimsel sürecine ve son olarak maruz kaldığı stresin çeşitine ve şiddetine bağlıdır (Kuznetsov ve Shevyakova 2007; Gupta vd., 2013; Jimenez-Bremont vd., 2014).

Genel olarak bitkilerde putresin seviyesi diğer poliaminlere göre daha yüksektir (Cohen, 1998). Aynı zamanda, bazı bitki türlerinde (baklagiller gibi) kadaverin de bulunmuştur (Tomar vd., 2013). Ek olarak, hücrede serbest veya bağlı halde bulunan poliaminler çözünebilir ya da çözünmeyen formlara sahiptirler. Çözünebilir poliamin formları ya serbest halde ya da organik asitlerle konjuge bir şekilde bağlı (çoğunlukla hidroksinamik asit gibi) olarak bulunur. Çözünmeyen poliaminler ise proteinler gibi makromoleküllerde, hücre duvarı polisakkaritlerinde ve hücre zarında bağlı bir şekilde yerleşmiştir (Martin-Tanguy, 2001).

### **1.3.1. Poliamin Metabolizması**

Poliaminlerin bitkilerdeki biyosentez ve metabolik yolları ayrıntılıyla incelenmiştir (Wimalasekera vd., 2011a; Tavladoraki vd., 2012). Poliamin sentezi bakterilerden, hayvanlara ve bitkilere kadar bazı varyasyonlara rağmen büyük oranda korunmuştur (Gupta vd., 2013). Ökaryotik hücrelerde en fazla bulunan putresin, spermidin ve spermin (Şekil 2); L-arjininden (veya bir dizi enzimatik yolla ornitinden) ve metiyoninden, birbirine bağlı altı basamaklı bir seri enzimatik reaksiyon ile sentezlenir (Kusano vd., 2008; Alcazar vd., 2010a; Btrian vd., 2012).



Şekil 2. Bitkilerde yaygın olarak bulunan poliaminler (Bitrian vd., 2012).

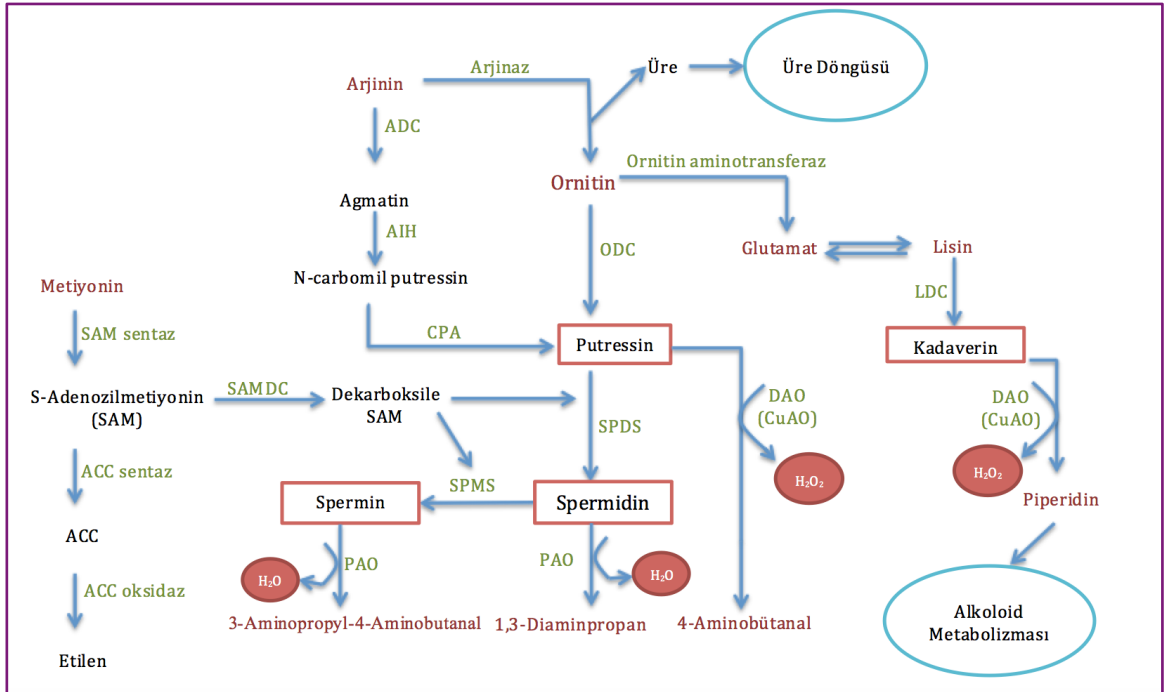
Arjinin amino asiti, arjinaz (EC 3.5.3.1) ve ornitin dekarboksilaz (ODC, EC 4.1.1.17) enzimlerinin aktiviteleriyle putresine dönüştürülür. Hemen hemen serbest yaşayan tüm ökaryotlar; ornitin dekarboksilaz enziminin etkisiyle, doğrudan bir şekilde ornitinden, putresin (1,4-diaminobütan) sentezleyebilir. *ODC* geni, bitki dünyasında ilk olarak Heimer ve Mizrahi (1982) tarafından tanımlanmıştır. Bitkilerde ve bakterilerde putresin, arjinin dekarboksilaz (ADC, EC 4.1.1.19) enziminin katalizlediği ve iyi tanımlanmış bir alternatif yolla da sentezlenir. Buna göre, ADC aktivitesi ile arjininden elde edilen agmatinin sıralı bir şekilde, agmatin iminohidrolaz/deaminaz (AIH, EC 3.5.3.12) ve N-karbomil putresin amidohidrolaz (CPA, EC 3.5.1.53) enzimleri tarafından katalize edilmeleriyle putresin sentezlenir (Shi ve Chan, 2013a). Alcazar vd., (2005), bitkilerdeki putresin seviyesini sınırlayan enzim ADC'dir. Bu iddiayı destekleyen bir duruma örnek vermek gerekirse; *Arabidopsis* bitkisinde ODC aktivitesi tespit edilememiştir. Bunun yerine *ADC1* ve *ADC2* olmak üzere iki gen bölgesi ve bu iki gen bölgesinin kodladığı iki farklı enzim aktivitesi vardır, ayrıca putresin sentezi tamamen ADC aktivitesi tarafından gerçekleştirilir (Tiburcio vd., 2014).

Putresin, S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC, EC 4.1.1.50) tarafından oluşturulan dekarboksile S-adenosilmetiyoninin (dcSAM) aminopropil kısmı ile spermidin üretilmesi için, spermidin sentaz enzimi etkinliğiyle (SPDS, EC 2.5.1.16) birleştirilir. Spermidin son olarak, spermin sentaz (SPMS, EC 2.5.1.22) enzimi tarafından katalizlenerek ikinci bir aminopropil grubu (yine dc SAM kökenli) eklenir ve spermin üretilmiş olur (Gupta vd., 2013). Bitkiler ve bakterilerde agmatin ile tanımlanan ADC yolu, hayvan hücrelerinde gösterilememiştir. Bu nedenle hayvanlardaki poliamin



sentezinin ornitinden başladığı ve böylece poliaminlerin ornitin aminotransferaz tarafından direk ornitinden köken aldığı kabul edilmektedir (Wu vd., 2005). Ayrıca gen ilişkili poliamin sentezinin, büyük oranda diğer metabolik yollarla etkileşim içinde olduğu ileri sürülmektedir (Wimalasekera vd., 2011a).

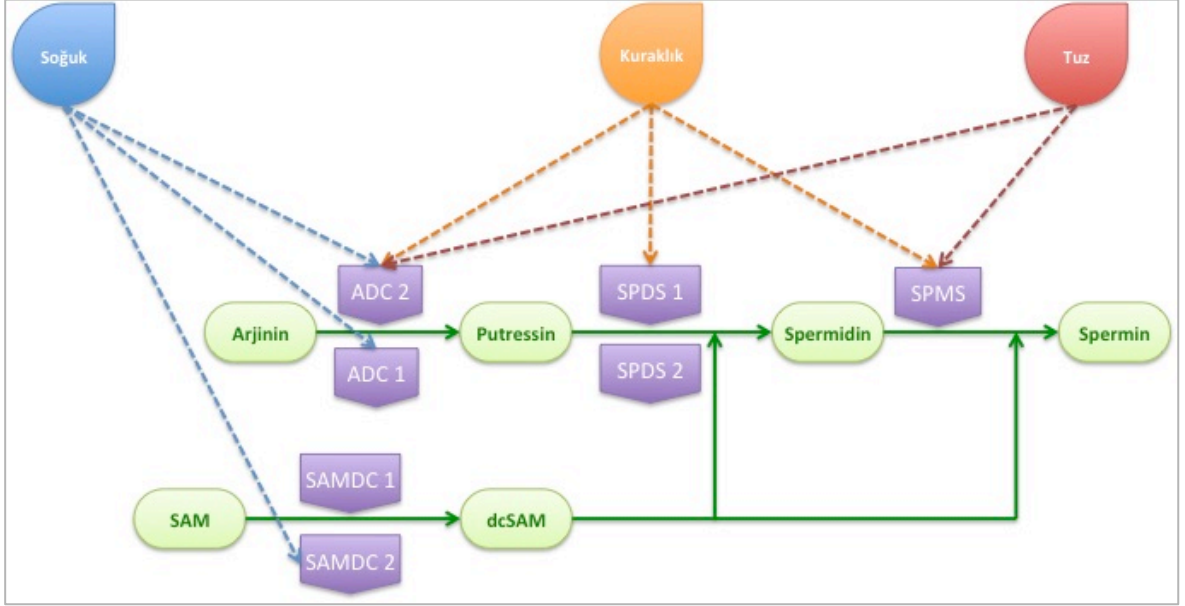
Poliaminlerin bitkilerde katabolize edilmelerini amin oksidazlar gerçekleştirir. Bunlar; diamin oksidaz (DAO/CuAO, EC 1.4.3.6) ve poliamin oksidazdır (PAO, EC 1.5.3.3). İlk sınıf olan diamin oksidazlar, bakır içeren enzimlerdir (bakır amin oksidazlar (CuAO) olarak da adlandırılmaktadırlar) ve diamin putresin ile diamin kadaverinde bulunan primer amino gruplarının oksidasyonunu katalizlerler. Putresinin katabolize edilmesiyle 4-aminobütanal (kendiliğinden  $\Delta^1$  piyroline dönüşür),  $H_2O_2$  ve amonyak ürünleri ortaya çıkar (Alcazar vd., 2010a; Bitrian vd., 2012). Amin oksidazların diğer sınıfı, flavin içeren poliamin oksidazlardır. Bunlar spermidin ve sperminin terminal katabolizasyonundan sorumludur. Terminal bölgelerin katalize edilmesi sonucunda 4-aminobütanal ya da N-(3-aminopropil)-4-aminobütanal, 1,3-diaminopropan ve  $H_2O_2$  oluşur (Cona vd., 2006b; Moschou vd., 2008a). Poliamin metabolizmasının genel şeması Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Poliamin metabolizması (Demiralay, 2015).

### 1.3.2. Poliaminler, NADPH Oksidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ve Kuraklık Stresi

Poliaminler, birçok stres toleransında önemli rollere sahiptir ve poliaminlerin diğer fizyolojik ve biyokimyasal yollarla nasıl bir etkileşim halinde olduğu anahtar sorudur. Poliaminlerin abiyotik stres yanıtıyla ilişkili olası mekanizması Şekil 4'deki gibi olabilir (Alcazar vd., 2010a; Shi ve Chan, 2013a).



Şekil 4. Bazı abiyotik stres çeşitlerinin poliamin sentezine etkileri (Alcazar vd., 2010; Shi ve Chan, 2013a).

Poliaminler; nükleus dahil bir bitki hücresinin tüm içsel yapılarında ve birçok yaşamsal süreçlerinde bulunur (Galston vd., 1997; Walden vd., 1997; Bouchereau vd., 1999; Kuznetsov ve Shevyakova 2007; Bachrach, 2010). Ayrıca farklı bitki türleriyle devam eden çalışmalar poliamin birikiminin kuraklık, tuzluluk, soğuk, sıcak, ozon UV, ağır metal toksisitesi, mekanik yaralanma ve herbisit uygulamaları gibi birçok çevresel duruma karşı yanıt olduğunu göstermiştir (Bouchereau vd., 1999; Alcazar vd., 2006b; Groppa ve Benavides 2008). Buna karşın, bu yanıtların fizyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Alcazar vd., 2010a).

Zhou ve Yu (2010), PEG teşvikli kuraklık stresine maruz kalmış kabe samanı (*Chrysopogon zizanioides*) bitkisinde serbest ve bağlı poliaminleri ayrıntılı bir şekilde çalışmışlar ve sonuç olarak bu bitkinin su eksikliğine ya da kuraklık stresine maruz bırakıldığında aşırı miktarda poliamin (özellikle spermidin ve spermidin) biriktirerek yaşamını devam ettirdiğini göstermişlerdir. Benzer bir şekilde, *Arabidopsis* ve

*Craterostigma plantagineum* (yeniden dirilen bir çeşit bitki, stres nedeniyle toprak üstü organları ölse de, stres etkileri hafiflediğinde yeniden yaşama dönme özelliği) bitkileriyle yapılan başka bir çalışmada (Alcazar vd., 2011); bitkilerin kuraklık stresine maruz kaldıklarında poliamin profillerinde önemli değişiklikler meydana geldiği rapor edilmiştir. Buna ek olarak, birçok bitki türünde poliamin birikiminin abiyotik stres etkilerini hafiflettiği rapor edilmiştir (Alcazar vd., 2011; Alet vd., 2012).

Dışarıdan uygulanan poliaminlerin çeşitli derecelerde fizyolojik süreçlere katıldığını gösteren çok fazla kanıt vardır. Bu süreçler; hücre membranı bütünlüğünün korunması, stres kaynaklı büyüme inhibisyonunun geri çevrilmesi, osmotik yanıt genleri ifadelerinin düzenlenmesi, süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerinin azaltılması, Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonlarının farklı organlarda birikiminin azaltılması ve antioksidan enzim etkinliğinin artırılması olarak özetlenebilir (Ali, 2000; Iqbal ve Ashraf, 2005; Afzal vd., 2009; Ndayiragiji ve Lutts, 2006; Tang ve Newton, 2005; Yiu vd., 2009; Zhang vd., 2009, Terzi vd., 2014).

Transgenik olarak, aşırı ya da az poliamin üretimi yapan mutant bitkilerle gerçekleştirilen son çalışmalar, poliaminlerin abiyotik strese karşı koruyucu rolleri olduğu fikrini desteklemektedir (Alcazar vd., 2006b; Kusano vd., 2008; Gill ve Tuteja, 2010). *Arabidopsis* bitkisinde *ADC1* geninin aşırı ifade edilmesi, putresin seviyesini yükseltmiş ve bu putresin birikimi soğuk stresine karşı toleransı arttırmıştır (Altabella vd., 2009). Benzer bir şekilde yine *Arabidopsis* bitkisinde *ADC2* geninin aşırı ifade edilmesi ile yükselen putresin seviyesi, muhtemelen stoma kapanmasını teşvik etmiş ve su kaybındaki bu azalış kuraklık toleransını arttırmıştır (Alcazar vd., 2010b). Kusano vd., (2007)'nin, yapmış olduğu bir çalışmada *acl5/spms* çift mutant *Arabidopsis* spermin üretemeyen bitkileri, kuraklık ve tuz stresine karşı aşırı duyarlı hale gelmiştir. Buna karşın aynı çalışmada dışarıdan uygulanan spermin, bitkide bahsedilen streslere karşı yatıştırıcı etki göstermiştir. Ek olarak, sperminin abiyotik strese karşı koruyucu rolünü incelemek amacıyla, Yamaguchi vd., (2006, 2007) *spms1/acl5-1 Arabidopsis* çifte eksik mutantları ile yaptıkları çalışmalarda kuraklık ve tuz stresine karşı hassasiyetin arttığını rapor etmişlerdir.

Son çalışmalar, farklı bitki ve hayvanlardan aktarılacak aşırı üretimi teşvik edilen poliamin biyosentez genlerinin (*ADC*, *ODC*, *SAMDC*, *SPDS* ve *SPMS*); *Arabidopsis*, çeltik, tütün, domates patlıcan ve armut gibi bitkilerde içsel poliamin seviyelerini yükselttiğini ve kuraklık, tuzluluk, sıcak stresi, yaralanma, ozon etkisi, sel stresi, ağır metal stresi (Cu, Cr, Fe ve Ni) ve oksidatif stres gibi abiyotik stres etmenlerine karşı tolerans artışını teşvik ettiğini göstermiştir (Hussain vd., 2011; Moschou vd., 2012; Tavladoraki

vd., 2012; Shi vd., 2013b). Diğer taraftan, *Atadc1/2* nakavt mutanıtı *Arabidopsis* bitkileri ile yapılan bazı çalışmalarda, *ADC1/2* genlerinin susturulmasıyla putresin seviyesinde azalmalar meydana gelmiş ve sonrasında hem tuzluluk hemde soğuk stresine karşı tolerans kaybı yaşanmıştır (Cuevas vd., 2008). Ayrıca *AtSPMS/AtACL5* nakavt *Arabidopsis* bitkilerinin spermin içerikleri dūřmūř ve akabinde kuraklık, tuzluluk ve sıcak streslerine karşı toleransı azalmıştır.

Önemli reaktif oksijen türlerinden (ROS) birisi olan  $H_2O_2$ 'nin üretilmesi, polimain katabolik süreçleri ile çok sıkı bir bağ içerisindedir, çünkü sadece NADPH oksidazların değil aynı zamanda amin oksidaz enzimlerinin (DAO ve PAO) aktivitesi sonucunda da önemli bir ROS eşidi olan  $H_2O_2$  üretimi meydana gelir (Cona vd., 2006a, 2006b). Tütün bitkisi apoplastik poliamin oksidazının ve *Arabidopsis* bitkisi *AtPAO3* geninin kodladığı poliamin oksidazının,  $H_2O_2$  üretimine katkıda bulunduğu bazı çalışmalarda belgelenmiştir (Moschou vd., 2008a; Wu vd., 2010). Yine *Arabidopsis* bitkisiyle yapılan bir çalışmada, poliamin oksidasyonunun poliamin oksidaz tarafından farklı şekillerde ve ifade seviyesinde düzenlendiği, böylece ROS seviyelerine oldukça karmaşık bir şekilde etki ettiği bildirilmiştir (Fincato vd., 2011). NADPH oksidaz homologlarının bitkilerde ROS birikimi için önemli olduğunu teyit eden birçok çalışma vardır (Kwak vd., 2003; Sagi vd., 2004; Torres vd., 2005). Bu çalışmaların hemen hepsinde kusurlu NADPH oksidaz geni mutantları kullanılmış ve bu bitkilerde ROS birikiminin özellikle de  $H_2O_2$ 'in azaldığı rapor edilmiştir.

### **1.3.2.1. Kuraklık Stresi Toleransında Poliaminlerin ABA, $H_2O_2$ ve Prolinle İlişkisi**

Bitkiler abiyotik strese maruz kaldığında içsel ABA seviyesi, çeşitli gen ifadelerinin azaltılması ve diğer fizyolojik yanıtları etkinleştirmek için teşvik edilir (Klingler vd., 2010). İlginçtir, Toumi vd., (2010) üzüm bitkileriyle gerçekleştirdikleri bir çalışmada ikincil bir koruma mekanizması olan stoma kapanmasıyla sonuçlanan ABA birikiminin, hem poliamin birikimini hem de oksidasyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Alcazar vd., (2010a, 2010b) ise yaptıkları bir çalışmada; putresin ve ABA'nın birbirlerinin sentezini karşılıklı olarak teşvik eden bir pozitif geri besleme dōngüsüne dahil olduklarını bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı, poliaminlerin stoma yanıtlarını, kısmen de olsa ABA ile etkileşime girerek düzenlediğini kabul etmektedir (Alcazar vd., 2010a, 2010b; Klingler

vd., 2010; Wimalasekera vd., 2011a). Bitkilerde poliamin katabolizması yüksek derecede  $H_2O_2$  üretimiyle bağlantılıdır. Çünkü  $H_2O_2$ , poliamin metabolizmasının birçok reaksiyon basamağında, özellikle de CuAO (DAO) ve PAO metabolik yollarında üretilir (Alcazar vd., 2011; Tisi vd., 2011; Wimalasekera vd., 2011a, 2011b; Moschou vd., 2012). Ek olarak, poliamin katabolizmasından türevlenen  $H_2O_2$ 'in programlanmış hücre ölümünü uyardığı ve ayrıca abiyotik strese karşı bir savunma fonksiyonunun olduğu gösterilmiştir (Tisi vd., 2011).

Son yıllarda, Moschou vd. (2012) poliamin kaynaklı  $H_2O_2$ 'nin bazı gelişimsel süreçler ve stres yanıtlarındaki rolünü ve birçok poliamin bağımlı fizyolojik süreçlerle ilişkisi olabileceğini tartışmışlardır. Klingler vd., (2010) ABA bağımlı amin oksidaz kaynaklı  $H_2O_2$ 'in üzümde stoma iletkenliğini etkilediğini savunmuşlardır. Bir taraftan da, “poliamin türevli  $H_2O_2$ , kuraklık altında ABA teşvikli stoma düzenlenmesinin bir parçasıdır” iddiası da vardır (Alcazar vd., 2011; Tisi vd., 2011; Moschou vd., 2012). Ek olarak literatürde poliaminlerin birçok antioksidan enzimi etkinleştirerek (SOD, CAT, POD), stresin tetiklediği ROS seviyelerini ve oksidatif hasarı (lipid peroksidasyonu gibi) iyileştirmesiyle ilgili bilgiler de mevcuttur (Wang vd., 2011; Moschou vd., 2012; Tavladoraki vd., 2012; Shi vd., 2013; Shi vd., 2013a, 2013b, 2013c). Bu bilgilerle tutarlı olan başka bir ifadeye göre (Hussain vd., 2011) poliamin konjugatları aynı zamanda ROS radikallerinin etkili bir şekilde temizlenmesine de hizmet eder. Bütün bu bilgilerin ışığında kısa bir şekilde izah etmek gerekirse, dışarıdan poliamin uygulamaları, antioksidan enzimleri etkinleştirir ve önemli ölçüde  $H_2O_2$  ve  $O_2\bullet^-$  birikimini inhibe eder (Shi vd., 2013a). Stresli koşullarda poliamin birikimine yol açan ana sentez enzimi ADC'dir (Galston ve Sawhney 1990; Liu vd., 2006). Bitkilerin stresle başa çıkabilme kabiliyeti; poliaminleri sentezleyebilme yeteneğiyle paralellik göstermektedir (Kasinathan ve Wingler 2004; Liu vd., 2007). Yukarıda bahsedilen açıklamaların aksine, poliamin birikiminin fizyolojik önemi kolay açıklanabilir bir durum değildir ve poliamin-stres yanıtlarının, stres teşvikli yaralanmadan mı, yoksa strese karşı koruyucu bir yanıt mı olduğu aydınlatılması gereken bir durumdur (Hussain vd., 2011; Gupta vd., 2013). Literatürde, kuraklık stresinin bitkilerde önemli ölçülerde poliamin birikimine yol açtığı ve bu sayede poliaminlerin strese karşı özel rollerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Galston vd., 1997; Groppa ve Benavides, 2008).

Poliaminlerin bitki abiyotik streslere yanıtlarıyla ilişkili olduğunu gösteren bilgilerden en çok dikkat çekici olanı ise kuraklık ve tuz stresi üzerine yapılan

çalışmalardır (Groppa ve Benavides 2008; Farooq vd., 2009; Zhou ve Yu 2010). Putresinin stres toleransındaki açık rolüne karşın, spermidin ve sperminin kuraklık stresine karşı koruyucu rolü ile ilgili birçok tartışmalı literatür bilgisi mevcuttur (Yamaguchi vd., 2007; Kubis 2008). Zhou ve Yu (2010), su eksikliği ve sonrasında yeniden sulanan güve otu (*Chrysopogon zizanioides*) yapraklarındaki serbest, konjuge ve bağlı poliamin seviyesi değişimlerine eş zamanlı olarak odaklanmışlardır. Analiz sonuçlarında serbest ve konjuge putresin seviyelerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Tersine spermidin ve spermin seviyelerinde (hem serbest hem de konjuge) artış olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın Alcazar vd. (2010a, 2011) transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde *ADC2* geninin aşırı ifade edilmesi sonucunda putresin seviyesinde artış olduğunu ve dehidrasyona, kuraklığa ve soğuk stresine karşı toleransın arttığını bildirmişlerdir. Farooq vd., (2009) kuraklığa karşı toleransı geliştirmek amacıyla dıştan çeşitli poliamin uygulamalarında bulunmuşlar ve poliamin çeşitleri arasında da en etkili olanın spermin olduğunu savunmuşlardır.

Oldukça iyi tanımlanmış bitkisel bir hormon olan ABA, birçok gelişimsel süreçte ve adaptif stres yanıtlarında hayati rollere sahiptir (Cutler vd., 2010; Raghavendra vd., 2010; Hubbard vd., 2010; Fujita vd., 2011). Bitki dokularındaki ABA derişiminin kuraklık ve tuz stresi koşullarında en az diğer abiyotik streslerde olduğu kadar yükseldiği iyi bilinen bir gerçektir. Ayrıca, ABA teşvikli strese yanıt genlerinin varlığı birçok çalışmayla da belgelenmiştir (Mukherjee vd., 2006; Roychoudhury vd., 2008; Cutler vd., 2010; Radhakrishnan ve Lee, 2013; Kasinathan ve Wingler, 2004; Urano vd., 2004; Hussain vd., 2011). Stres koşullarında dışarıdan ABA uygulamasının, poliamin metabolizması enzimlerini (ADC, SPDS ve SPMS) sentez ve transkripsiyon seviyesinde düzenlediği ifade edilmiştir (Alcazar vd., 2006b; Hussain vd., 2011). Ek olarak, transkriptomik ve metabolik analizlere göre kuraklık teşvikli ABA bağımlı transkripsiyonel düzenlemeler, amino asitlerin dallanmasında, prolin ve poliamin sentezlerinde kritik derecede rollere sahiptir (Urano vd., 2009; Fujita vd., 2011). Aslında bitki mutasyon ve transkriptomik analizlerine ilişkin birçok veriye göre, strese uyum sürecinde putresin ve ABA arasında pozitif bir geri besleme mekanizması vardır ve bu mekanizma hem putresin hem de ABA, karşılıklı olarak birbirlerinin biyosentezini etkilemektedir (Cuevas vd., 2009; Urano vd., 2009).

Daha önce de belirtildiği gibi, poliamin katabolizması çoğu zaman toksik bir molekül olarak düşünülen  $H_2O_2$  üretir. Son zamanlarda  $H_2O_2$ 'in bir sinyal molekülü olarak üretildiği konumdan komşu hücrelere ve dokulara geçerek farklı streslere karşı savunma

sistemini aktive etme yeteneğinde olduğunu vurgulayan birçok çalışma bildirilmiştir (Neill vd., 2002; Bright vd., 2006; Rhee, 2006; Dickinson ve Chang, 2011).

*Arabidopsis* bitkisinde yapılan transkriptomik çalışmalar, poliamin biyosentez genlerinin abiyotik stres etkisiyle farklı basamaklarda düzenlendiğini göstermiştir (Alcazar vd., 2006a, 2006b). Poliamin eksik fonksiyonlu *Arabidopsis* mutant bitkilerinin karakterizasyonu, poliamin sentezine ilişkin önemli deliller sağlamıştır (Urano vd., 2004; Yamaguchi vd., 2007; Cuevas vd., 2008). Farklı bitki türlerine ait poliamin aşırı üretimi yapan hatlar ile, bu analizler devam etmiştir (Alcazar vd., 2010b). Poliamin sentez genlerinin (*ADC*, *ODC*, *SAMDC* ve *SDPS*) çeltik, tütün ve domates gibi bitkilerde aşırı ifade edilmesi, birçok stres çeşidine karşı toleransın artmasına sebep olmuş ve bu poliamin seviyelerindeki artış (putresin ve/veya spermin ve spermin) tolerans artışıyla paralellik göstermiştir (Gill ve Tuteja 2010; Alcazar vd., 2010a; Tiburcio vd., 2014).

Stres boyunca poliamin ve ABA seviyelerindeki artışlar, çoğu zaman hücre dışı amin oksidazlar ve poliaminlerin düşük miktarda bulunduğu hücreler arası ortama taşınmasının aracılık ettiği poliamin oksidasyonu tarafından uyarılır (Moschou vd., 2008a; Toumi vd., 2010). Bir çalışmaya göre, *ZmPAO* (mısır) ve *AtCuAOI* (*Arabidopsis*) gibi apoplastik amin oksidazları kodlayan genlerin ifade düzeyleri ABA tarafından uyarılmış ve dahası *Arabidopsis* bitkisi *atcuao1* mutantlarında osmotik strese karşı daha düşük bir duyarlılık sergilemiştir (Wimalasekera vd., 2011b). Bu gözlemler hep birlikte amin oksidazların bitki abiyotik stres yanıtlarında pozitif bir etkileşim olduğunu iddia eder.

Prolin birikiminin, abiyotik streslerin olumsuz etkilerine karşı bitkilerde ozmotik ayarlamaya katkıda bulunduğu, membranların, proteinlerin ve enzimlerin kararlılığını sağladığı ve serbest radikalleri temizlediği kaydedilmiştir (Kadioglu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009). Prolin birikimi stres toleransını birçok yolda etkileyebilir (Szabados ve Savoure, 2010). Yapılan çalışmalarda birçok bitki çeşidinde strese toleranslı bitkilerdeki prolin miktarı, hassas olanlara göre fazla bulunmuştur (Ashraf, 2007). Ayrıca prolin kuraklıkta lipid peroksidasyonun önlenmesinde de rol oynamaktadır (Molinari vd., 2007). Dahası, gerçekleştirdiğimiz bir tubitak projesi (115T511) kapsamında dıştan prolin uygulamasının poliamin seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir.

#### **1.4. Mısır Bitkisi (*Zea mays* L.)**

Mısır bitkisinin (Amerikan yerlilerinin deyimiyle “corn”) kökeni büyük ihtimalle Orta Amerika’ya, özellikle de Meksika’ya dayanmaktadır. Bu bölgeden kuzeye doğru

Kanada'ya ve güneye doğru Arjantin'e yayılmıştır. En eski Mısır bitkisi yaklaşık 9000 yaşındadır ve arkeologlar tarafından Teotihuacan (Meksika'da Puebla şehri yakınlarında bir vadi) isimli eski bir yerleşim yerinde bulunmuştur (Matsuoka vd., 2002). Maya ve Aztek gibi Amerikan yerli uygarlıkları için oldukça değerli olan mısır, önemli bir öge olarak kabul edilmiş; ayrıca dini inanışlarında, beslenmelerinde ve festivallerinde önemli bir role sahip olmuştur. Amerika kıtasının Christopher Columbus tarafından keşfinden (1493) sonra mısır tohumları önce İspanya'ya sonra da Avrupa kıtasının geri kalanına ve Akdeniz bölgelerine yayılmıştır. Mangelsdorf ve Reeves, 1939 yılında mısır bitkisinin dünyanın tarıma uygun hemen hemen tüm yerlerinde ve yılın her ayında hasat edilebileceğini göstermiştir (FAO, 1992; Bonavia, 2013). Mısır bitkisinin Türkiye'ye Suriye ve Mısır yolu ile 16. yüzyılda geldiği kabul edilmektedir (Özcan, 2009; Cömertpay, 2008).

Mısır bitkisi, buğday ve çeltikten sonra en önemli besin kaynağı olarak kullanılması ve günümüzde en fazla üretimi yapılan tahıl çeşitlerinden birisi olması nedeniyle gelecek için oldukça önemli bir tahıl çeşididir. Araştırmalar 2050 yılında mısır üretiminin daha da fazla olacağını ve bu üretimin küresel besin azlığı problemine çözüm olabileceğini rapor etmektedir (Alexandratos ve Bruinsma, 2012). Mısır bitkisi 2009 yılında genetik sekansı tamamlanan,  $2n=20$  kromozomlu diploid bir bitkidir ve 10 tane haploid kromozomu üzerinde yerleşmiş 39469 geni ihtiva eden ve 2,4 milyar bazdan oluşan büyük bir genoma sahiptir (Schnable vd., 2009; Zhang vd., 2009; URL-1, 2013). İlginçtir ki; bu genlere ait 63391 transkript elde edilmiştir. Bunun sebebi ise, bir gene ait birden fazla mRNA sekansının ya da farklı ekzon kesimlerinin olmasıdır. Gen sekansının 2009 yılında tamamlanması ve bu projeye ayrılan fonlar; mısır bitkisinin geleceğin dünyası için ne kadar değerli olduğunun göstergesidir. Dünyada mısır bitkisinin diğer önemli ekin türlerine göre son elli yıllık ve gelecekteki üretim tahminleri Tablo 1'de verilmiştir.



Tablo 1. Mısır bitkisinin diğer ekinlerle üretim yönünden karşılaştırılması (World Agriculture Towards 2030/2050, FAO-ESA, 2012)

	Üretim Miktarı			Hasat Edilen Alan			Ürün		
	Milyon Ton			Milyon Hektar			Ton/Hektar		
	1961/ 1963	2005/ 2007	2050/ -----	1961/ 1963	2005/ 2007	2050/ -----	1961/ 1963	2005/ 2007	2050/ -----
Buğday	235	614	858	206	222	225	1,1	2,8	3,8
Çeltik	230	644	827	118	158	155	1,9	4,1	5,3
<b>Mısır</b>	<b>210</b>	<b>736</b>	<b>1178</b>	<b>106</b>	<b>155</b>	<b>194</b>	<b>2,0</b>	<b>4,7</b>	<b>6,1</b>
Soya Fasulyesi	27	217	390	24	94	124	1,1	2,3	3,2
Bakliyat	44	60	100	69	73	62	0,6	0,8	1,6
Arpa	84	137	186	59	56	64	1,4	2,4	2,9
Süperge Darısı	44	60	102	47	45	53	0,9	1,3	1,9
Darı	25	32	60	43	37	42	0,6	0,9	1,4
Pamuk Tohumu	30	71	100	32	36	39	0,9	2,0	2,6
Kolza	4	50	99	6	31	36	0,6	1,6	2,8
Yer Fıstığı	15	36	68	17	24	35	0,9	1,5	2,0
Ayçiçeği	7	29	49	7	23	28	1,0	1,3	1,7
Şeker Kamışı	428	1452	2822	9	21	27	49	68	104
Tüm Tahıllar	843	2069	3009	654	704	763	1,3	2,9	3,9
<b>Tüm Ekinler</b>				<b>978</b>	<b>1256</b>	<b>1380</b>	<b>439</b>	<b>924</b>	<b>1296</b>

Mısır, geniş adaptasyon kabiliyeti nedeniyle Dünya'nın farklı bölgelerinde kültüre alınabilmektedir. 50° kuzey enleminden 50° güney enlemlerine, deniz seviyesinden 3000-4000 m yüksekliğe kadar olan alanlarda ve ayrıca birçok toprak tipinde tarımı yapılabilir (Morris, 2002). Mısır, Poaceae (buğdaygiller) familyasına ait monokotiledon bir bitkidir (Tablo 2, URL-2).

Tablo 2. Mısır bitkisinin bitki sistematığındeki Yeri (URL-2).

Alem:	Plantae
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Liliopsida
Takım:	Poales
Familiya:	Poaceae
Cins:	<i>Zea</i>
Tür:	<i>Zea mays</i> L.
Alttür	<i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> L.

Mısır bitkisi dört aylık kısa bir süreçte 2,5-4,5 metre boya ulaşabilmekte ve tek bir bitkiden 600-1000 tohum elde edilebilmektedir. Buğday ise 7-8 aylık bir zaman diliminde 70-120 cm boya sahip olurken, bitki başına düşen verim 50-100 tohum civarındadır (Özcan, 2009). Mısır, geniş bir kullanım alanı olması nedeni ile diğer tahıllara göre oldukça farklı bir konuma sahiptir. İçerdiği zengin besin maddeleri ile mısır, hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılır. Mısır danesinin yapısında ticari değere sahip birçok kimyasal bileşik vardır. Olgun bir mısır danesi %70-75 nişasta, % 8-10 protein ve % 4-5 yağ içerir. Mısır, nişasta protein ve yağ kaynağı olarak kullanılmasının dışında diğer birçok kullanım alanları (glukoz; içeceklerde ve reçel yapımında, etanol, biodizel yakıt, plastik yapımında) ile de dikkat çekmektedir. Birçok kullanım alanı nedeniyle bugün; koçan uzunluğu ve şekli, tane büyüklüğü ve şekli, dane rengi, yapısı, aroması ve lezzeti, pişirim kalitesi, endospermi, yağ, protein ve nişasta içeriği gibi birçok farklı özelliklere sahip farklı mısır çeşitleri geliştirilmiştir (Cömertpay, 2008).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Yapılan Uygulamalar

Denemelerde bitkisel materyal olarak kullanılan Akpınar mısır çeşidi (*Zea mays* L.) tohumları, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Tohumlar, her saksıya 6 tohum olacak şekilde toprak içeren saksılara (25×18×12 cm) ekildikten sonra, dört hafta süreyle , % 55-60 nem, 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddeti, 25 °C  $\pm$  2 sıcaklık ve 16 saat aydınlık; 8 saat karanlık periyodunda bitki büyütme odasında yetiştirildi. Bitkilere dört hafta süreyle iki günde bir 200 ml su verildi. Dört haftalık süre sonunda, mısır fideleri topraktan 2 cm yükseklik olacak şekilde gövdelerinden kesilerek saf su içeren cam tüplere aktarıldı. Yaralanma stresinin etkilerini yatıştırmak amacı ile bir saat boyunca saf suda bekletilen fideler deneyin amacına göre 5 gruba ayrıldı ve düşük konsantrasyonlardaki uygulama solüsyonları içeren tüplerde ve aynı bitki büyütme koşullarında 6 saat boyunca bekletildi (Tablo 3).

Bitkilerin strese karşılaştıkları ilk andan itibaren strese yanıt sinyalizasyonun başladığı ve maksimum gen aktivitesinin genellikle ilk zamanlarda meydana gelmesi nedeniyle (Swindell, 2006) mevcut çalışmanın kuraklık stresi uygulama süresi, 6 saat olarak belirlendi.

Tüm gruplarda kuraklık etkisini oluşturmak için polietilen glikol (%3'lük PEG 6000 ve -0.3 MPa) kullanıldı. Kontrol grubu olarak sadece %3 PEG (Merck, 8074911000, Germany) kullanılırken diğer gruplar da PEG'e ek olarak aşağıdaki dıştan uygulamalar yapıldı. Kuraklık stresi koşullarında dıştan uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in, içsel poliamin seviyesi üzerine etkilerini incelemek için, önceki çalışmalarda iyileştirici etkisi belirlenmiş olan (Terzi vd., 2014) 10 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, 1086001000) derişimi dışarıdan uygulanırken; azaltılmış içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının poliamin seviyelerine etkilerini incelemek için NADPH oksidaz aktivitesini inhibe ederek içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesini azaltan difeniliodonyum klorür kullanıldı (DPI; Fluka, 43088, Canada ). İçsel poliamin miktarını azaltmak ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile arasındaki ilişkiyi belirlemek için poliamin sentezini inhibe eden diflorometil arjinin (DFMA; Santa Cruz, 211368, USA) ve diflorometil ornitin (DFMO; 204723A, Santa Cruz, USA) inhibitörleri 5  $\mu\text{M}$ 'lık derişimlerde birlikte uygulandı. Son grup olarak; poliamin sentez inhibitörleri varlığında dıştan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verildiğinde poliamin seviyelerindeki değişimi

incelemek amacıyla, poliamin sentez inhibitörleri (5  $\mu$ M DFMA + 5  $\mu$ M DFMO) ve 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birlikte uygulandı.

Tablo 3. Deney tasarımı ve uygulamalar

Uygulama Grubunun Adı	Dışarıdan Uygulanan Bileşik	Uygulama Amacı	Uygulama Derişimi
Kontrol (PEG %3)	Yok	Kuraklık stresi oluşturmak.	%3 PEG 6000
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in PA'ler üzerine etkisi	%3 PEG 6000 + 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PEG + DPI	DPI (Difenilyodonyum klorit)	Azaltılmış içsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarının PA'ler üzerine etkisi	%3 PEG 6000 + 100 $\mu$ M DPI
PEG + İnhibitör	DFMA (Diflorometil Arjinin)+ DFMO (Dflorometil ornitin)	PA sentezini bloke etmek ve içsel PA miktarını azaltmak	%3 PEG 6000 + 5 $\mu$ M DFMA+5 $\mu$ M DFMO
PEG + İnhibitör + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	DFMA (Diflorometil Arjinin)+ DFMO (Dflorometil ornitin) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	İçsel PA miktarı azaltılmış bitkilerde dışarıdan uygulanan H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in etkisini incelemek	%3 PEG 6000 + 5 $\mu$ M DFMA+5 $\mu$ M DFMO + 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Örnekleme için tabandan itibaren seçilen 3. yapraklar, sonraki çalışmalar için sıvı azottan geçirilerek -80 °C de saklandı. Su potansiyeli için taze yaprak numunesi kullanıldı.

## 2.2. Su Potansiyeli Ölçümü

Yaprak su potansiyeli C52 termocouple psikometre cihazı ile belirlendi (Wescor, Inc., Logan, UT USA). Bitkinin 3. yaprağının geniş yüzeyinden 6 mm çapında alınan diskler, cihazın C52 sensörüne yerleştirildi. Numunelerin yaprak su potansiyelleri belirlenmeden önce cihaz 45 dakika kalibre edildi.

## 2.4. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon miktarı, lipid peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehid içeriğine dayanarak Heath ve Packer (1968), metoduna göre tayin edildi. Ekstraksiyon % 0,1 trikloro asetik asit (TCA) içerisinde yapıldı. Homojenat 15000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, % 20 TCA içerisinde hazırlanmış % 0,5 tiobarbiturik asit ilave edildikten sonra, süpernatantın absorbansı 532 nm de kaydedildi. 600 nm de spesifik olmayan absorpsiyon için okunan değer hesaptan çıkarıldı. Elde edilen sonuç

formülde ( $A = \epsilon.c.l$ ) yerine konularak malondialdehit (MDA) konsantrasyonu hesaplandı. Lipid peroksidasyonu verileri, uygulamaların stres üzerine etkisinin araştırılması ve değişen içsel poliamin seviyelerinin iyileştirici etki yapıp yapmadığını belirlemek amacı ile ölçüldü ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.5. İçsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tayini

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği Velikova vd., (2000), metoduna göre belirlendi. Yaprak numunelerinden 0,25 g alınarak 0,1 g aktif kömür ile birlikte 5 ml % 0,1 TCA içerisinde homojenize edildi. Homojenat 15000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 1000 µl alınarak üzerine 1000 µl 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1500 µl 1 M KI ilave edildikten sonra oluşan sarı renk 390 nm'de spektrofotometredeki kayıtlı standart grafikten okundu. İçsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının tayini, bu çalışma için PA seviyelerinin değişimlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkisinin olup olmadığını belirlemede kullanıldı.

### 2.6. Prolin Tayini

Kurutulmuş numunelerden (0,2 g) alınarak 10 ml % 3'lük sülfosalisilik asit ile homojenizasyonun ardından filtre edildi. Süzüntü 22 °C'de 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımlarından 1 ml alınarak üzerine 1 ml asetik asit ve 1 ml ninhidrin konuldu. Ninhidrin, asetik asit ve orto-fosforik asit kullanılarak hazırlandı. Daha sonra tüplere konulan örnekler 1 saat 100 °C'de su banyosunda tutuldu ve reaksiyon buzda sonlandırıldı. Soğuyan örneklerin üzerine 3 ml toluen eklenerek, vorteksle karıştırıldı. Ağzı kapaklı tüplere alınan örnekler 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pipetle üst faz sarsılmadan küvete alındı ve 520 nm'de spektrofotometrede okundu (Bates vd., 1973). Sonuçlar gram kuru ağırlık (KA) başına µg olarak ifade edildi. Dışarıdan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile değişen poliamin seviyeleri ve prolin arasında bir ilişkinin olup olmadığını incelemek için prolin ölçümleri gerçekleştirildi.

### 2.7. Poliamin Tayini

Poliamin içeriği Flores ve Galston, (1982) metoduna göre ölçüldü. Taze yaprak dokusu (5 g) 10 ml 0,4 M perklorik asit ile homojenize edildi. Homojenat, 4 °C de 3000 g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant toplandı, üzerine 10 ml 0,4 M perklorik asit ilave edildi ve tekrar santrifüjlendi. Süpernatantlar birleştirildi ve son hacim perklorik asit ile 25 ml'e tamamlandı. Süpernatant Whatmann filtre kağıdı ile süzüldü. Süpernatantın 1 ml'si üzerine 200 µl 1 M NaOH ve 300 µl sodyum hidrojen karbonat ilave edildi ve karışım 30

saniye vorteksle karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 2 ml dansil klorit ilave edildi. Karışım 40 °C sıcaklığında 45 dk inkübe edildi. Reaksiyon 100 µl % 25 amonyum hidroksit ile durduruldu. Karışım 30 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra hacim asetronitril ile 5 ml'e tamamlandı. Bu karışım 2500 g' de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant 0,22 µm'lik filtrelerden geçirildi ve HPLC'ye yüklendi. Poliamin içeriği UV/VIS detektör ile HPLC cihazıyla (Shimadzu, LC 20 AT/Prominence, Japan) okundu. Çözücü miktarları amonyum asetat: asetronitril (65:35 v/v), akış hızı 0,70 ml dk-1 ve 50 °C biçiminde olacak şekilde kullanıldı. 20 µl ekstre, C18 (4.6 × 250 mm) kolonuna enjekte edildi ve 254 nm dalga boyunda belirleme yapıldı. Piklerin alanları kaydedildi ve bir bilgisayar yazılımı ile putresin, spermin ve spermidin konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar gram taze ağırlık başına µg olarak ifade edildi.

## **2.8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> İlişkili Enzim Aktivitelerinin (NADPH Oksidaz, Katalaz, Peroksidaz ve Süperoksit Dismutaz) ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in içsel seviyesinin düzenlenmesinde etkili olan NADPH oksidaz, katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitesi ve toplam protein miktarı belirlendi.

### **2.8.1. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein tayini Bradford, (1976)'a göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Enzim aktivitesi ölçümleri için hazırlanan ekstraktlardan numune başına 30 µl örnek, 170 µl distile su ve 1000 µl protein boyası kullanıldı. 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.

### **2.8.2. NADPH Oksidaz (NOX) Aktivitesinin Belirlenmesi**

Yapraklardan 0,1 g alınan numuneler sıvı azot içerisinde toz haline getirildikten sonra 1,8 ml ekstraksiyon tamponu (100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA pH 7,0, % 0,1 Triton) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt 4 °C'de 15000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

NADPH oksidaz (EC 1.6.3.1) aktivitesi NADPH'ın 340 nm'deki ( $\epsilon=6,2 \text{ mM cm}^{-1}$ ) oksidasyonuna göre (Cakmak ve Marschner, 1988) belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA ve 100  $\mu\text{M}$  NADPH'dan oluşan reaksiyon ortamında 3 dakika süreyle absorbandsaki azalışa bağlı olarak belirlendi.,

### **2.8.3. Katalaz Aktivitesi**

Katalaz (EC 1.11.1.6) aktivitesi, Aebi, (1983) yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 20  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının 240 nm'de 5 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Katalaz aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  için  $\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

### **2.8.4. Peroksidaz Aktivitesi**

Peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesi, Urbanek vd., (1991) yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 50  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı içeren 2 ml'lik reaksiyon karışımının 470 nm'de 1 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi  $\epsilon=26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

### **2.8.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi**

Süperoksit dismutaz (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  $\mu\text{M}$  nitro blue tetrazolyum ve 50  $\mu\text{l}$  ekstrakt ihtiva eden 1 ml reaksiyon ortamına 2  $\mu\text{M}$  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 absorbands değerleri belirlendi.

## **2.9. İçsel Absisik Asit (ABA) Tayini**

Absisik asit tayini ELISA yöntemi ile tayin edildi (Phytodetek ABA ELISA Kit AGDIA PDK 09347/0096, Amerika). Numunelerden alınan 0,1 g miktardaki örnekler

homojenize edildikten sonra 16 saat boyunca +4 °C de kuru sallayıcı da inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, örnekler +4 °C de 10000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 1/20 oranında sulandırıldı ve örneklerden, üreticinin talimatlarına göre ABA ölçümü ve hesaplanması gerçekleştirildi.

## **2.10. Moleküler Çalışmalar**

Çalışmanın bu aşamasında toplam RNA izolasyonu, cDNA eldesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ABA ve Poliamin senteziyle ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde analizleri gerçekleştirildi.

### **2.10.1. Real Time PCR Analizleri İçin Uygun Primerlerin Tasarlanması**

Ekspresyon seviyesi belirlenecek genler için gerekli primerler, NCBI veritabanındaki gen sekansları kalıp olarak kullanılarak, Primer 3 plus programı ile tasarlandı (Primer3 Plus, URL-3). Tasarlanan primerler, NCBI veritabanını kullanan “primer3 plus” programı kullanılarak blast yapıldı ve primerlerin, eşleşme oranlarına bakılarak, istenen gen bölgelerine doğru bir şekilde bağlanabildiği teyit edildi. Gen ifadelerinin referansı için AKTİN 1 genine ait primerler tasarlandı. Çalışmada ekspresyonu hedeflenen genler ve bu genlere ait primerler Tablo 4’de verildi.



Tablo 4. İfadeleri belirlenen genlere ait primerler

Gen Adı	NCBI Erişim No	Primer Adı ve Sekansı
<i>Aktin 1</i>	NM_001155179.1	<b>ACT1Zm_F:</b> "GAAGATCACCCCTGTGCTGCT" <b>ACT1Zm_R:</b> "ACCAGTTGTTCGCCACTAG"
<i>Arjinin Dekarboksilaz</i>	EU968980.1	<b>ADCZm_F:</b> "GACATCACCTGCGACAGTGA" <b>ADCZm_R:</b> "GAACAGGTTGTGCTTGCCAG"
<i>Spermidin Sentaz</i>	EU976300.1	<b>SPDSZm_F:</b> "TTCCCCTGTTTCGATTCACCG" <b>SPDSZm_R:</b> "GCAGAACCCTTCTTGCGTC"
<i>Agmatin Deaminaz</i> ( <i>Agmatin İminohidrolaz</i> )	NM_001156428.1	<b>AIHZm_F:</b> "GACGAGGATACAAACGGCCA" <b>AIHZm_R:</b> "ACGGACTGGGAGAGAACAGA"
<i>S-Adenozilmetiyonin</i> <i>Dekarboksilaz</i>	EU968400.1	<b>SAMDCZm_F:</b> "GGAGGCGTGAAGAAGTTCCA" <b>SAMDCZm_R:</b> "TTATCAGGAAGCAGCAGGCC"
<i>Diamin Oksidaz</i> ( <i>Cu Aminoksidaz</i> )	NM_001152492.1	<b>DAOZm_F:</b> "ACAGCAAGTCCGAGAAGTGG" <b>DAOZm_R:</b> "TGTACCACAGCACGATGTCC"
<i>Poliamin Oksidaz</i>	NM_001111636.1	<b>PAOZm_F:</b> "CGCTACGAATACGACCAGCT" <b>PAOZm_R:</b> "TGGGCGCAGTTGATGAGAAT"
<i>NADPH Oksidaz</i>	DQ890023.1	<b>NOXZm_F:</b> "GGGCCAGTACTTCGGTGAAA" <b>NOXZm_R:</b> "AAGCTTACCAGGCTACGAC"
<i>Absisik Aldehit Oksidaz</i>	NM_001111838.1	<b>AAOXZm_F:</b> "CCTGACAAGAAGCGTGTCTCT" <b>AAOXZm_R:</b> "GAATGTGACGGCGGATTTCG"
<i>Prolin 5 Karboksilat Sentaz</i>	DQ864376.1	<b>P5CSZm_F:</b> "AACATCTTGCCCTCTGGGTG" <b>P5CSZm_R:</b> "CCATTGCCACTTCGAAGTGC"
<i>Prolin Dehidrogenaz/Oksidaz</i>	NM_001154105.1	<b>PRODHZm_F:</b> "TCAGCAAGTACCTGCCGTAC" <b>PRODHZm_R:</b> "ACCCTCCTCACCAACTCCTT"

### 2.10.2. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Toplam RNA izolasyonu için taze ya da -80 °C’de saklanan numunelerden 0,1 g miktar kullanıldı. Sıvı azot ile dondurulan örnekler, doku homojenizatörü ile parçalandıktan sonra iki farklı firmaya ait Toplam RNA izolasyon kiti (RNeasy Plant Mini Kit 74904, Qiagen Hollanda; Pure Link RNA Mini Kit 121830018A, Ambion Applied Life Tech. Amerika) kullanılarak ve üreticinin talimatlarına uyularak Toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000, Amerika) ile ölçüldü. Miktarı ve saflığı belirlenen toplam RNA örnekleri cDNA eldesi için -80 °C’de saklandı.

İzole edilen Toplam RNA örneklerinden grup başına 2000 ng olacak şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Applied marka (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368814, Applied Biosystems Amerika) cDNA sentez kiti kullanıldı. Sentezlenen cDNA'lar Real Time PCR analizleri gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklandı.

### 2.10.3. Gen İfadelerinin Real Time (RT) PCR Analizleri ile Belirlenmesi

Bir önceki aşamada örneklerden elde edilen cDNA'lar, gen ifadelerinin belirlenmesi için Real Time PCR analizlerinde kullanıldı. Analizler için 5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Supermix (08-36-00008, Solis Biodyne, Estonya) süpermiks ve CFX Connect Real Time PCR System (BioRad, Amerika) cihazı kullanıldı. RT PCR protokolü ise Solis Biodyne talimatları modifiye edilerek; 95 °C'de 12 dakika, 95 °C'de 15 saniye 45 döngü, 60.0 °C'de 30 saniye, 72.0 °C'de 30 saniye, melt curve için 65.0 °C'den 95 °C'ye 0,5 °C'lik artışlarla olacak şekilde gerçekleştirildi (Tablo 5). Her biyolojik tekerrür 3 teknik tekerrür şeklinde analiz edildi. Ortalama teknik hata 0,5(±1) Cq values şeklinde bulundu. Protokol Tablo 3'te verildi. Ayrıca referans geni için *AKTİN 1* genine ait primerler kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 5. RT PCR protokolü

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Aktivasyonu	95,0 °C	12 dk	1
Denaturasyon	95,0 °C	15 sn	44
Bağlanma	60,0 °C	30 sn	
Uzama	72,0	30 sn	
Plate Okuma	-	-	
Melt Curve Analizi	65,0 °C -95,0 °C arası 0,5 °C'lik artışlar 5 sn aralıklarla plate okuma		-

RT PCR reaksiyon ortamı yine miks üreticisinin talimatlarına göre hazırlandı. Reaksiyon ortamında kullanılan bileşikler ve oranları Tablo 6’da verildi.

Tablo 6. RT PCR reaksiyon ortamı

Reaksiyon Bileşeni	Miktarı ( $\mu$ l)
Süper Miks	4
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	1
Nükleaz içermeyen su	13
Toplam	20

### 2.11. İstatistik Analizler

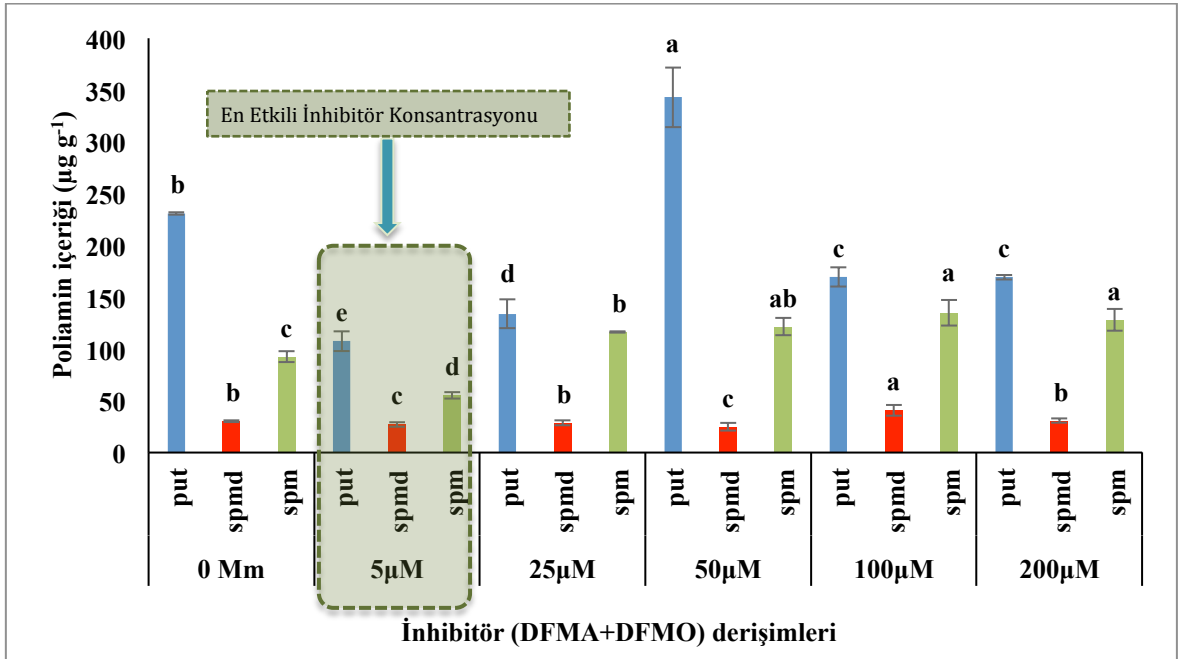
Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 16.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi’ne göre belirlendi.

RT PCR analizleri ise, kullanılan sistemin lisanslı yazılımı olan ve cihazla birlikte tümleşik olarak çalışan Bio-Rad CFX Manager 3.1 ile gerçekleştirildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Poliamin İçeriğinin Azaltılması İçin Uygun İnhibitör (DFMA ve DFMO) Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Etkin poliamin sentez inhibitörü konsantrasyonunu belirlemek için; 0, 5, 25, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda DFMA ve DFMO inhibitörleri 6 saat süresince birlikte uygulandı ve bu gruplardan poliamin (putresin, spermidin ve spermin) ölçümleri gerçekleştirildi. Uygulama ve ölçümler sonucunda, en etkili inhibitör konsantrasyonunun 5  $\mu\text{M}$  olduğu tespit edildi. Şekil 5’de verilen ölçüm sonuçlarına göre; putresin ve spermin seviyeleri açık bir şekilde en düşük olarak 5  $\mu\text{M}$ ’lık inhibitör uygulamasında bulundu. Buna karşın 5  $\mu\text{M}$  inhibitör uygulamasında spermidin seviyesi, 50  $\mu\text{M}$ ’lık uygulama hariç diğerlerine göre daha düşük seviyede çıkmıştır. Bununla birlikte spermidin oranının 5  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$ ’lık uygulamalarda istatistiksel olarak aynı çıksa da; putresin ve spermin seviyesinin diğer konsantrasyonlara göre belirgin bir şekilde düşük çıkması sebebiyle, en etkili poliamin biyosentez inhibitörü konsantrasyonunun (DFMA+DFMO) 5  $\mu\text{M}$  olduğuna karar verildi.

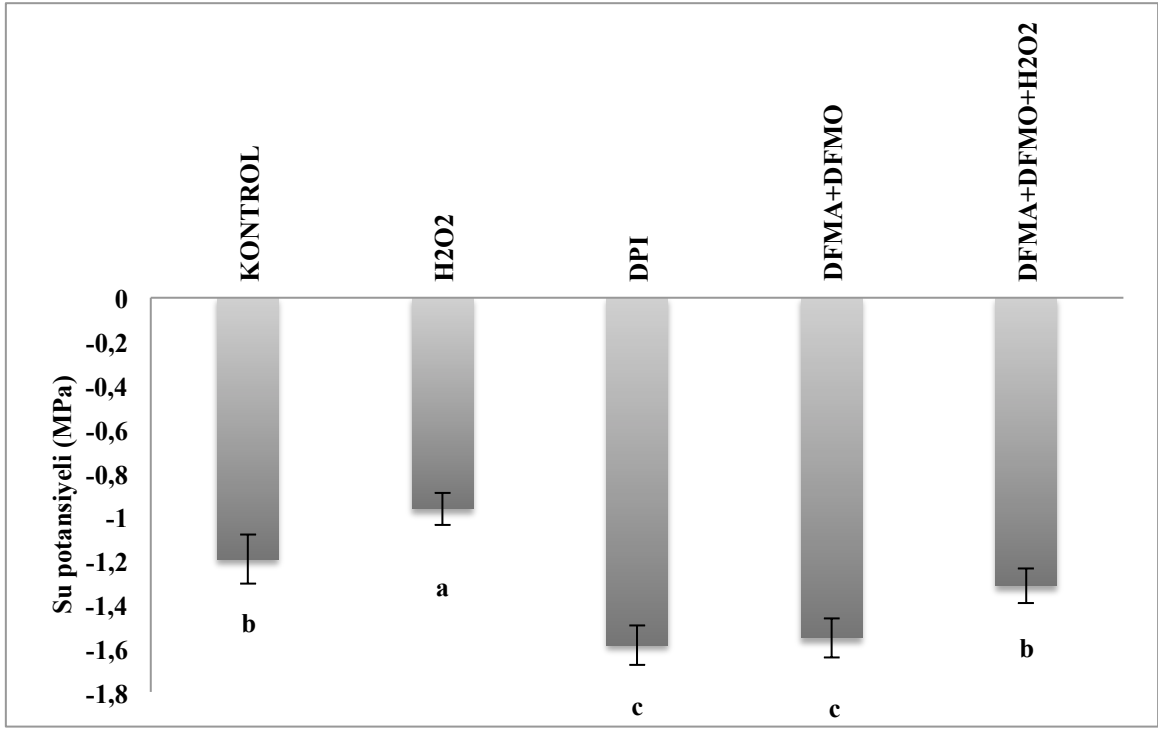


Şekil 5. Dışarıdan uygulanan poliamin sentez inhibitörlerinin içsel poliamin seviyeleri üzerine etkisi ve etkin inhibitör konsantrasyonunun tespit edilmesi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sentez İnhibitörü ve Poliamin İnhibitör Uygulamalarının Stresle İlişkili Bazı Parametreler Üzerine Etkileri

#### 3.2.1. Su Potansiyeli

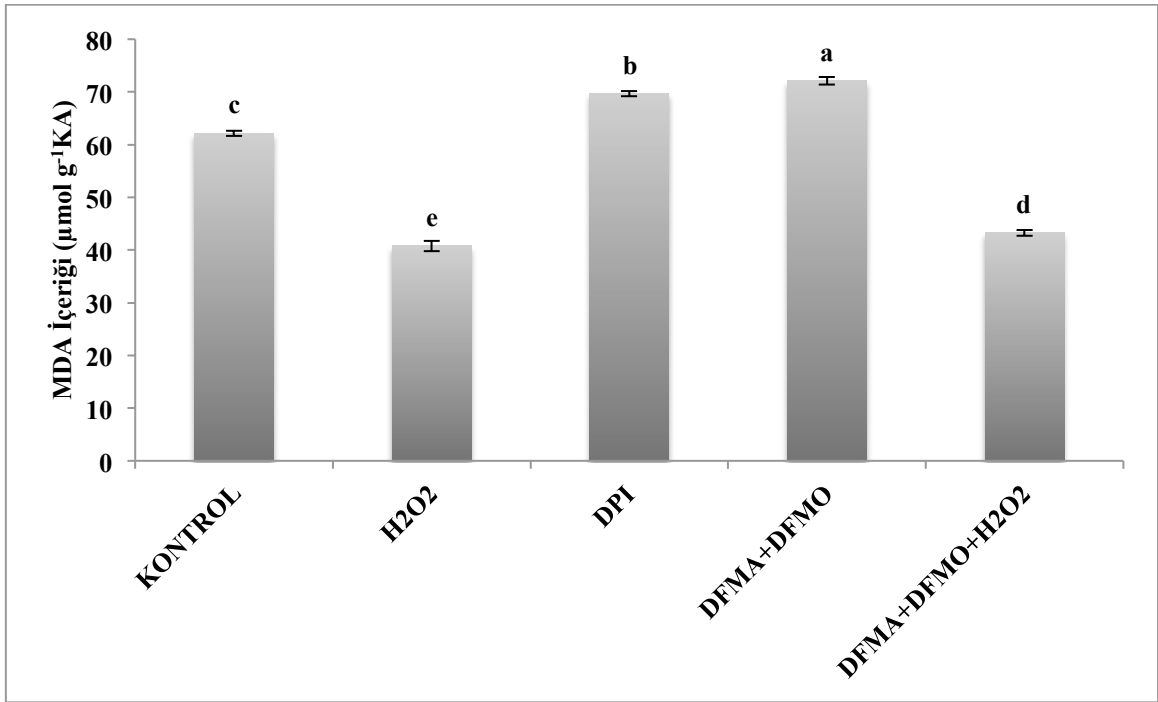
Uygulama süresi olan 6 saat sonrasında örneklerden yaprak su potansiyeli ölçüldü ve sonuçlar Şekil 6'de sunuldu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması yapılan grupta su potansiyeli açısından belirgin bir iyileşme gözlemlendi. DPI ve DFMA+DFMO uygulamalarının ise su potansiyelini kontrol grubuna göre (PEG uygulaması) daha fazla düşürerek bitkinin su durumunu olumsuz yönde etkilediği tespit edildi. DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda ölçülen su potansiyeli değerinin PEG grubuyla istatistiksel olarak aynı olmasına rağmen DPI ve DFMA+DFMO gruplarına göre daha yüksek bir değer sergilediği belirlendi.



Şekil 6. Deney uygulamalarının kuraklık stresine maruz kalmış mısır bitkisinde yaprak su potansiyeli üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.2. Lipid Peroksidasyonu

Deney gruplarından lipid peroksidasyonun bir ürünü olan MDA içeriği ölçüldü (Şekil 7). Analizlere göre  $H_2O_2$  ve DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  uygulama gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı azalmalar gözlemlendi. İçsel  $H_2O_2$  miktarının azalmasına neden olan DPI grubunda ölçülen MDA miktarı ile sadece poliamin inhibitörleri uygulanan DFMA+DFMO grubundaki MDA miktarının, tüm gruplar arasındaki en yüksek değerlere sahip olduğu belirlendi.



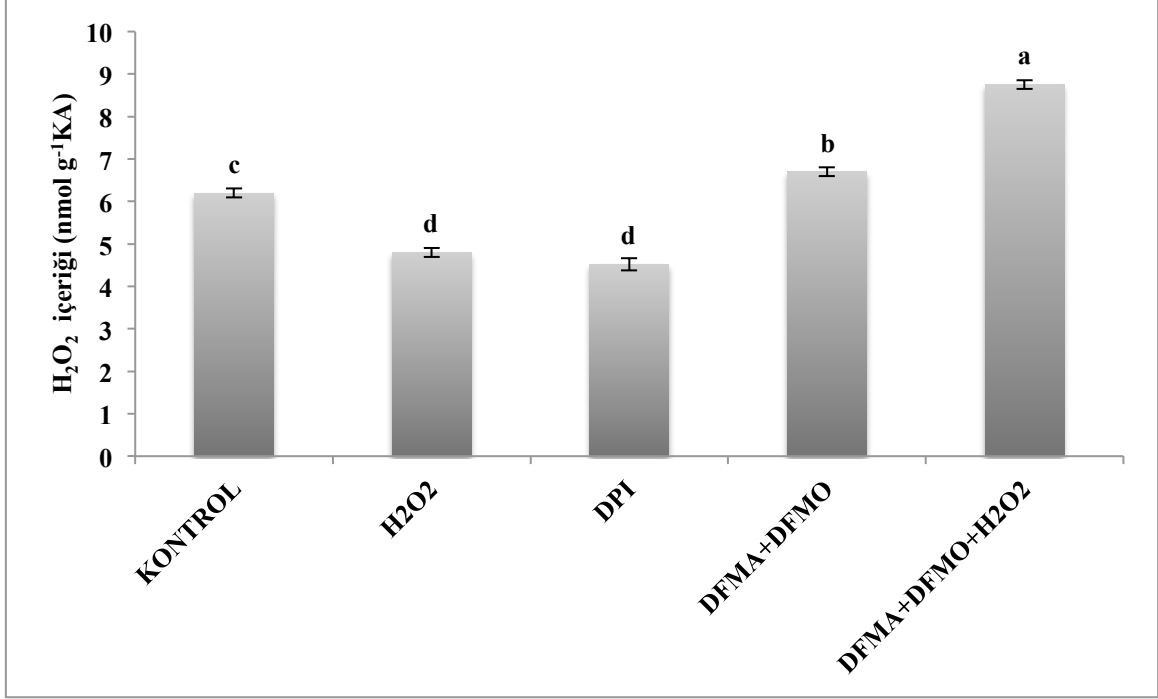
Şekil 7. Deney gruplarında MDA içeriğinin belirlenmesi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık

### 3.3. Çeşitli Uygulamaların $H_2O_2$ İçeriği ve $H_2O_2$ İçeriğinin Düzenlenmesinden Sorumlu Olan Parametreler ve Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

#### 3.3.1. $H_2O_2$ İçeriği

Çalışmanın bu aşamasında deney gruplarından  $H_2O_2$  içeriği ölçüldü (Şekil 8). İyileştirici etkisi önceki çalışmalarımızda belirlenmiş olan 10 mM  $H_2O_2$  uygulaması, içsel  $H_2O_2$  seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalttı. NADPH oksidaz

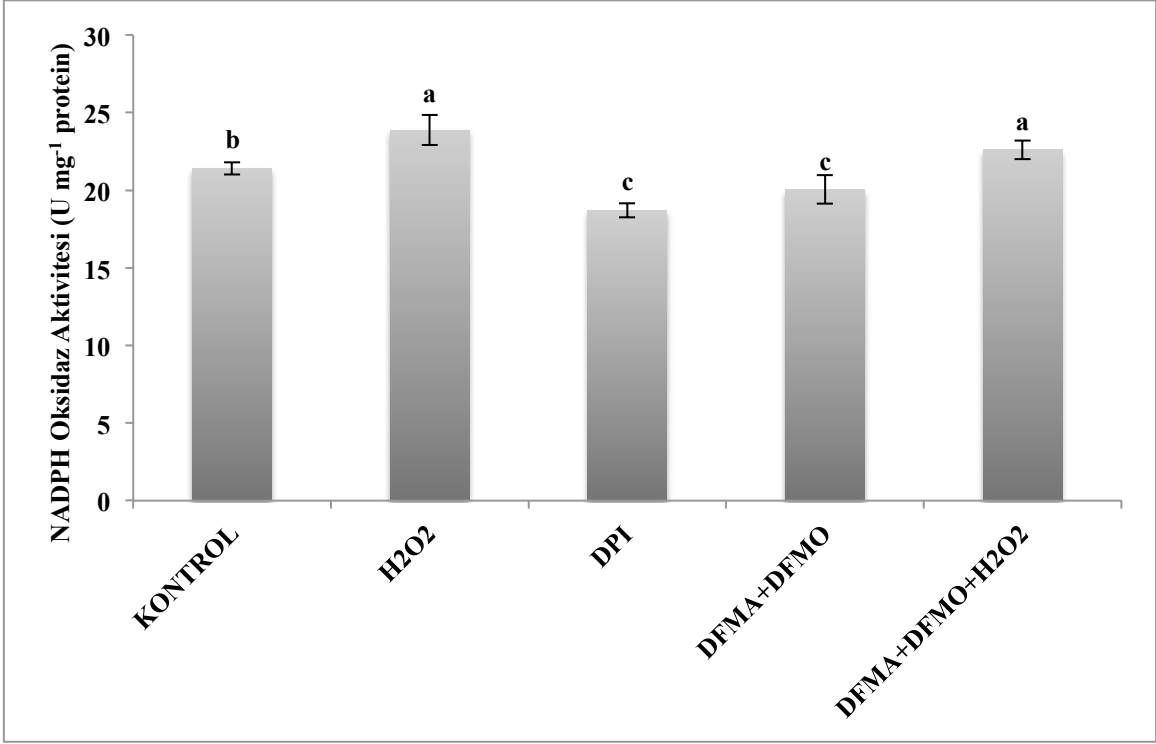
enzimini bloke etme özelliği bilinen DPI uygulaması sonucunda içsel  $H_2O_2$  seviyesinin,  $H_2O_2$  grubuyla istatistiksel açıdan farksız olduğu belirlendi. Analiz verilerine göre poliamin inhibitörlerinin ve  $H_2O_2$ 'in birlikte uygulandığı deney grubundaki  $H_2O_2$  içeriğinin diğer gruplara göre daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 8. Çeşitli uygulamalarının içsel  $H_2O_2$  seviyesine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık.

### 3.3.2. NADPH Oksidaz Enzim Aktivitesi

Hücrede  $H_2O_2$ 'in üretilmesinden sorumlu kaynaklardan birisi olan NADPH oksidaz ölçümleri Şekil 9'de verildi. Bu verilere göre dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$  bileşiğinin, kuraklık stresi altında NADPH oksidaz aktivitesini,  $H_2O_2$  ve DFMA+DFMA+ $H_2O_2$  gruplarında kontrole göre önemli ölçüde arttırdığı belirlendi. Diğer taraftan çalışmadaki en düşük NADPH oksidaz aktivitesi, söz konusu bu enzimi inhibe etme özelliğiyle bilinen DPI grubunda ve poliamin inhibitörlerinin tek başına uygulandığı DFMA+DFMO gruplarında olduğu gözlenmiştir. Yine analiz verilerine göre DPI ve DFMA+DFMO gruplarındaki NADPH oksidaz aktiviteleri istatistiksel açıdan farklı çıkmamıştır.

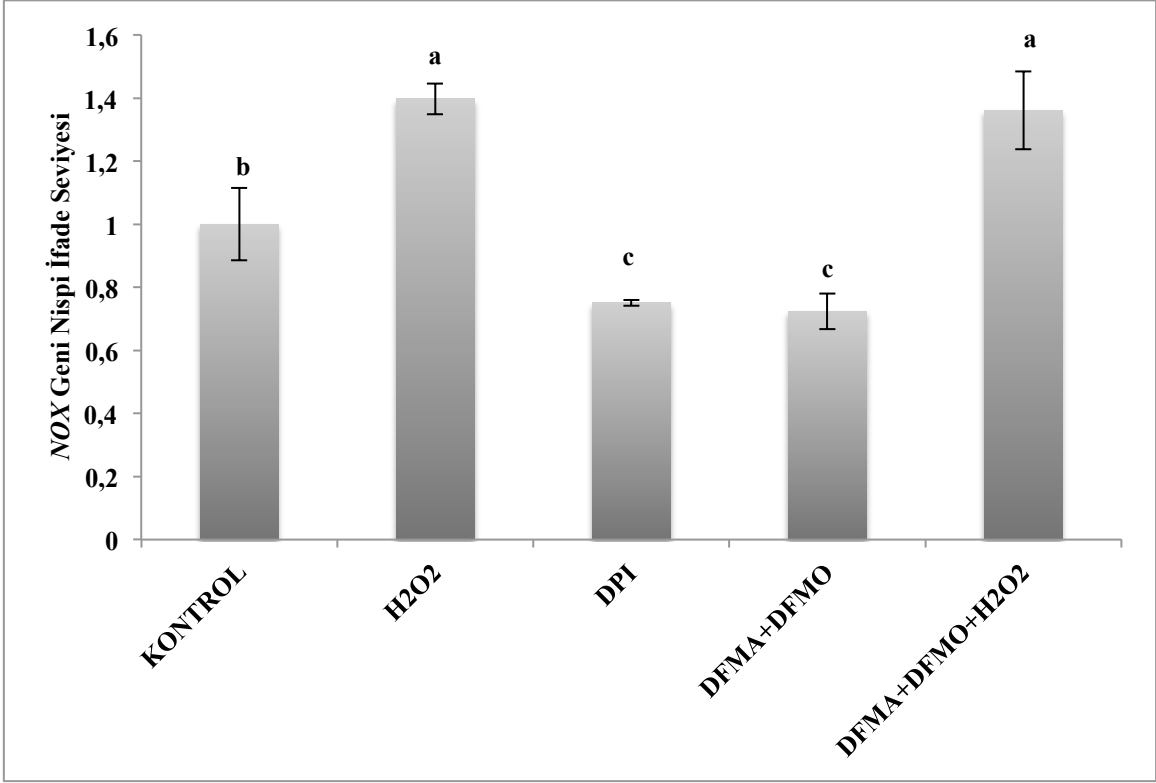


Şekil 9. Çeşitli uygulamalarının NAPH oksidaz aktivitesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.3. NADPH Oksidaz (*NOX*) Geni İfade Seviyesi

Çalışmanın bu kısmında içsel  $H_2O_2$  miktarının artırılmasına enzimatik olarak katkısı olan NADPH oksidaz (*NOX*) genine ait ifade düzeyleri belirlendi (Şekil 10). Çalışmada en yüksek ifade seviyesi,  $H_2O_2$  uygulamasının yapıldığı grupta gözlemlendi. Ayrıca söz konusu enzimi bloke eden DPI uygulamasının, sadece enzim aktivitesini değil enzimi kodlayan gen bölgesinin de ifade düzeylerini düşürdüğü tespit edildi. Aynı zamanda poliamin sentez inhibitörlerinin (DFMA+DFMO) uygulandığı grupta ifade düzeyi DPI grubuyla istatistiksel olarak aynı olduğu saptandı. Buna karşın poliamin sentez inhibitörlerinin,  $H_2O_2$  ile birlikte uygulandığı durumda (DFMA+DFMO+ $H_2O_2$ ) *NOX* geni ifade seviyesinin arttığı ve  $H_2O_2$  uygulamasıyla aynı düzeyde olduğu belirlendi.

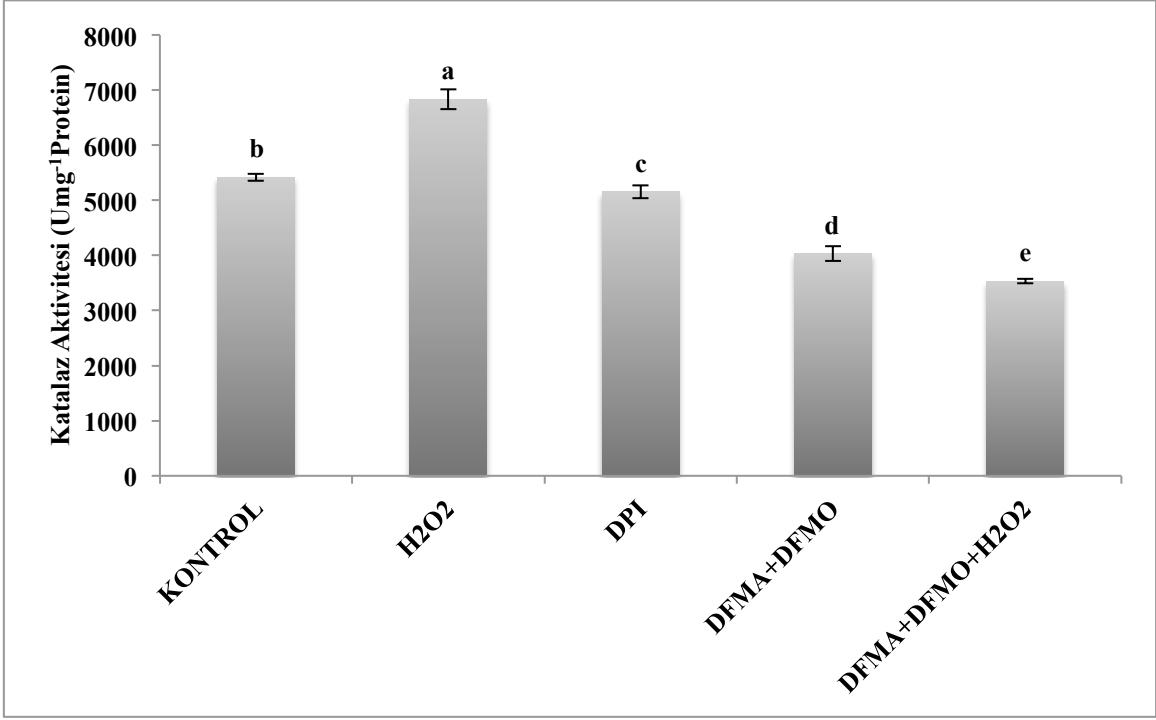




Şekil 10. Çeşitli uygulamaların NADPH Oksidaz (NOX) geni ifade seviyesine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

#### 3.3.4. Katalaz Enzim Aktivitesi

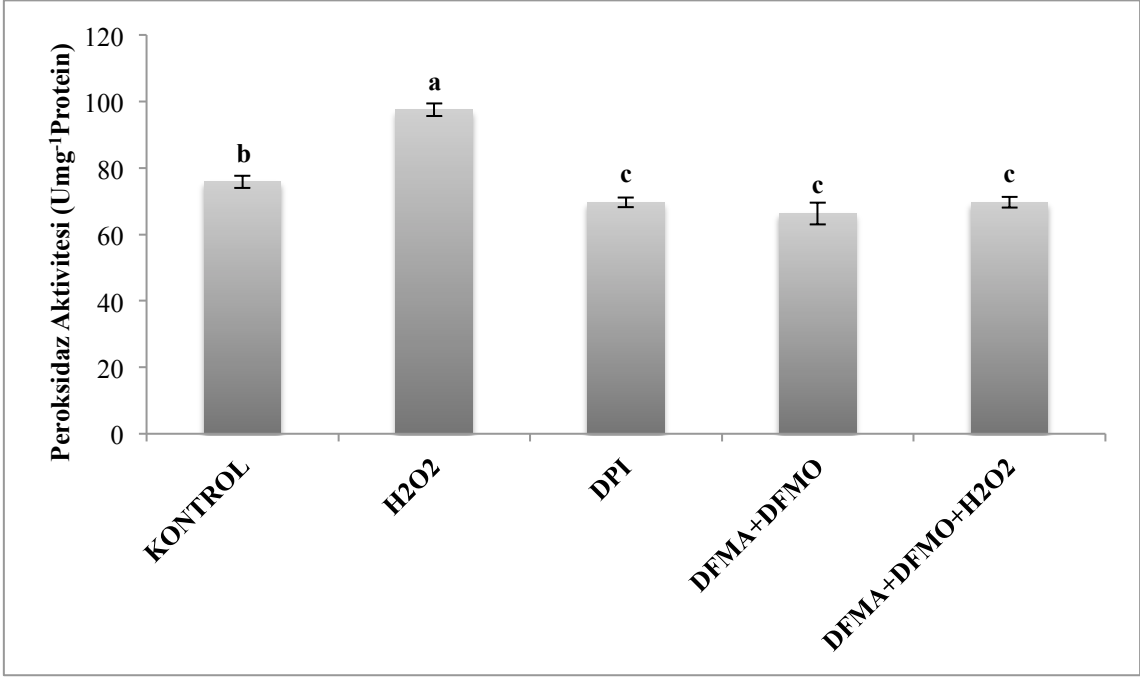
Deney gruplarında katalaz aktivitesi ölçüldüğünde, en yüksek enzim aktivitesinin  $H_2O_2$  uygulama grubunda olduğu gözlemlendi (Şekil 11).  $H_2O_2$ 'in enzimatik olarak üretilmesini inhibite eden DPI grubunda ise söz konusu enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. Katalaz aktivitesinin en düşük olarak gözlemlendiği grubun, poliamin inhibitörlerinin  $H_2O_2$  ile birlikte uygulandığı DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  uygulaması olduğu tespit edildi. Deney gruplarının tümüne bakıldığında ise,  $H_2O_2$  grubu hariç diğer uygulamaların tamamının katalaz aktivitesini kontrol grubuna göre düşürdüğü belirlendi.



Şekil 11. Çeşitli uygulamaların katalaz enzim aktivitesine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.5. Peroksidaz Enzim Aktivitesi

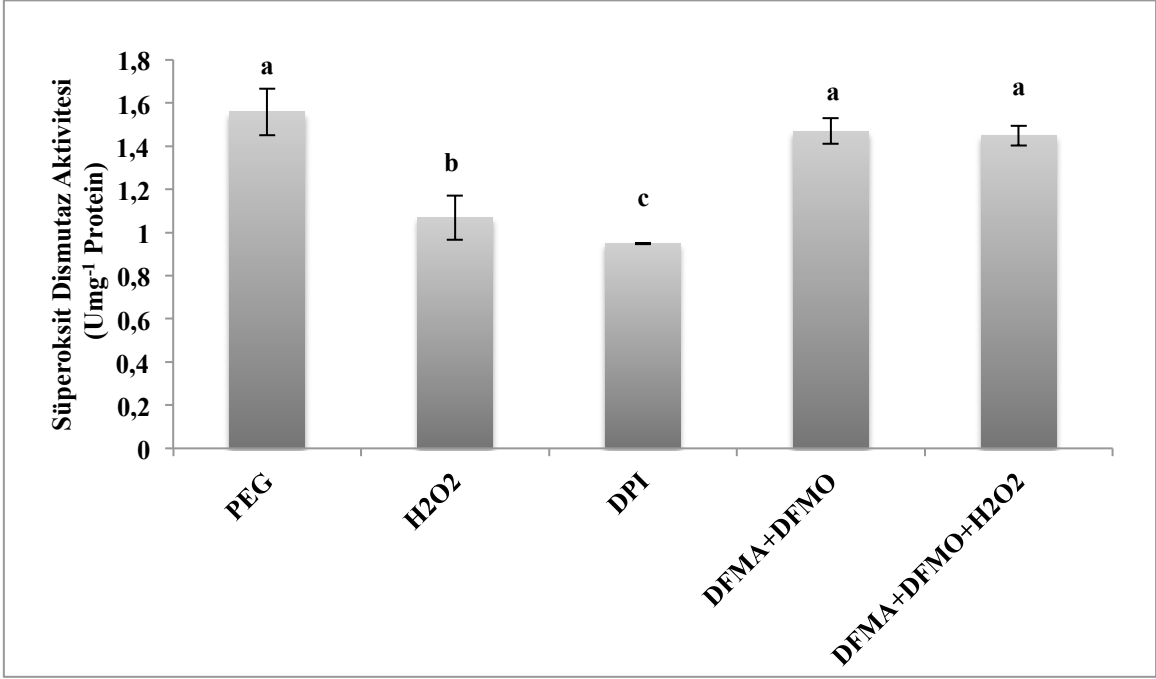
Çalışmanın bu aşamasında deney gruplarında peroksidaz aktivitesi ölçüldü (Şekil 12). Gruplar arasında en yüksek aktivitenin  $H_2O_2$  uygulamasında olduğu belirlendi. Ayrıca, kontrol grubunun  $H_2O_2$  uygulaması hariç diğer uygulama gruplarından daha fazla olduğu belirlendi. Kontrol ve  $H_2O_2$  uygulamalarından daha düşük enzim aktivitesi gösteren DPI, DFMA+DFMO ve DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  grupları arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark gözlenmedi.



Şekil 12. Çeşitli uygulamaların peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.6. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi

Deney gruplarında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçüldüğünde, en düşük aktivitenin DPI uygulamasında olduğu belirlendi.  $H_2O_2$  uygulama grubundaki söz konusu enzim aktivitesinin DPI grubundan yüksek olmakla birlikte kontrol grubundan daha düşük olduğu tespit edildi. Son olarak kontrol grubu, DFMA+DFMO ve DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  uygulamalarında söz konusu enzim aktivitesi yönünden istatistiksel bir fark gözlenmedi (Şekil 13).

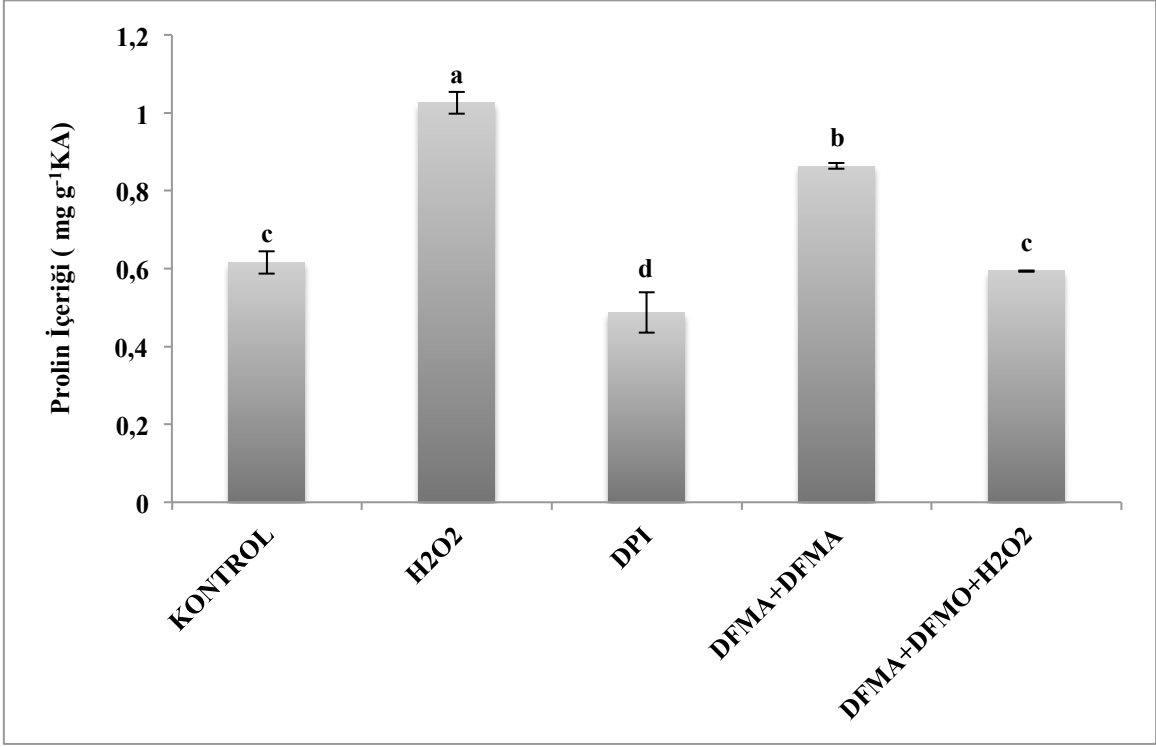


Şekil 13. Çeşitli uygulamaların süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.4. Çeşitli Uygulamaların Prolin İçeriği ve Prolin Metabolizmasında Görevli Olan Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

#### 3.4.1. Prolin İçeriği

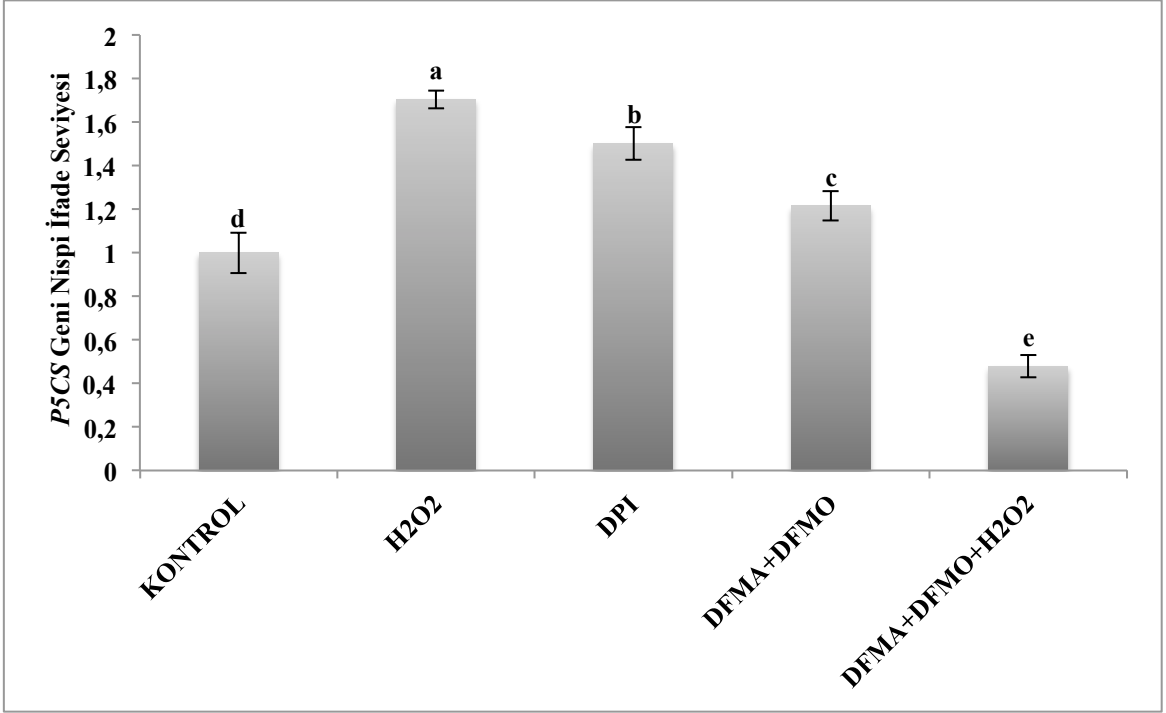
PEG teşvikli kuraklık stresinde deney uygulamalarının prolin seviyesine olan etkileri Şekil 14’de sunuldu. Buna göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının, diğer deney gruplarının tamamından daha yüksek bir prolin artışına neden olduğu tespit edildi. Çalışmanın en düşük prolin seviyesi DPI grubunda gözlemlendi. Poliamin sentez inhibitörlerinin tek başına uygulandıkları DFMA+DFMO grubunun, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulama grubundan sonraki en yüksek prolin içeriğine sahip olduğu kaydedildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının DFMA+DFMO uygulaması ile birlikte gerçekleştirildiği durumda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturamadığı tespit edildi.



Şekil 14. Çeşitli uygulamaların prolin içeriğine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık.

### 3.4.2. Pirolin 5- Karboksilat Sentaz (*P5CS*) Geni İfade Seviyesi

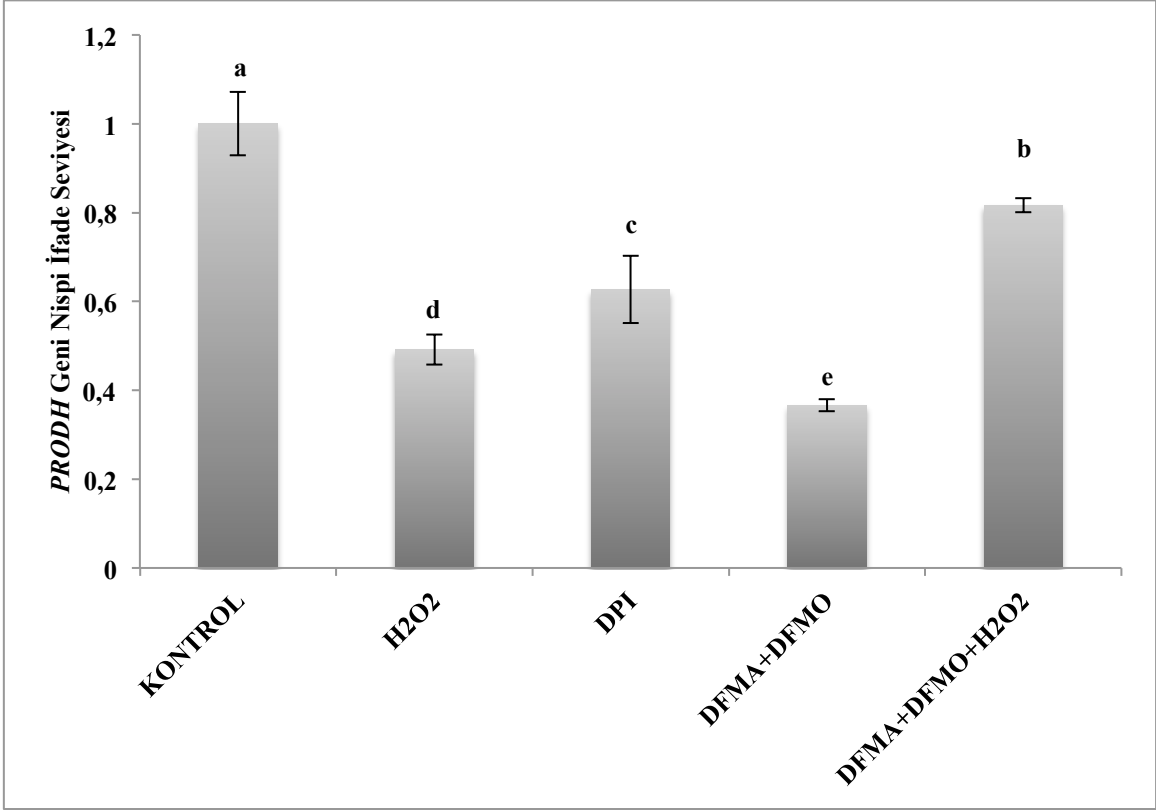
Hüresel poliamin seviyeleriyle ilişkili olduğu tahmin edilen prolinin sentezini pozitif yönde kontrol eden pirolin karboksilat sentaz enzimini kodlayan gen bölgesi, ifade düzeyinde analiz edildi (Şekil 15). Analiz verilerine göre  $H_2O_2$  uygulamasının gerçekleştirildiği grupta *P5CS* geni ifadesinin diğer gruplara göre yüksek çıktığı tespit edildi. Buna karşın içsel  $H_2O_2$  seviyesinin DPI uygulaması ile azaltılması durumunda söz konusu gen ifadesinin,  $H_2O_2$  uygulamasına göre düştüğü, kontrol grubuna göre ise yüksek kaldığı gözlemlendi. Buna ek olarak çalışmanın diğer bir uygulama grubu olan DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  grubunda en düşük *P5CS* ifade seviyesi saptandı.



Şekil 15. Çeşitli uygulamalarının prolin karboksilat sentaz (P5CS) geni ifade seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.4.3. Prolin Dehidrogenaz/Oksidaz (*PRODH*) Geni İfade Seviyesi

Hücrel prolin seviyesinin enzimatik olarak azaltılmasından sorumlu olan prolin dehidrogenaz/oksidaz gen bölgesine ait ifade seviyeleri Şekil 16’te verildi. Kontrol grubunda prolin dehidrogenaz ifadesinin en fazla olduğu tespit edildi. En düşük gen ifade seviyesinin ise poliamin sentez inhibitörlerinin uygulandığı DFMA+DFMO grubunda olduğu belirlendi. Kontrolden sonraki en yüksek gen ifadesi DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda saptandı. DPI inhibitörünün uygulandığı gruptaki gen ifade seviyesinin kontrol ve DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarına göre düşük; bununla birlikte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve DFMA+DFMO gruplarından yüksek olduğu kaydedildi.

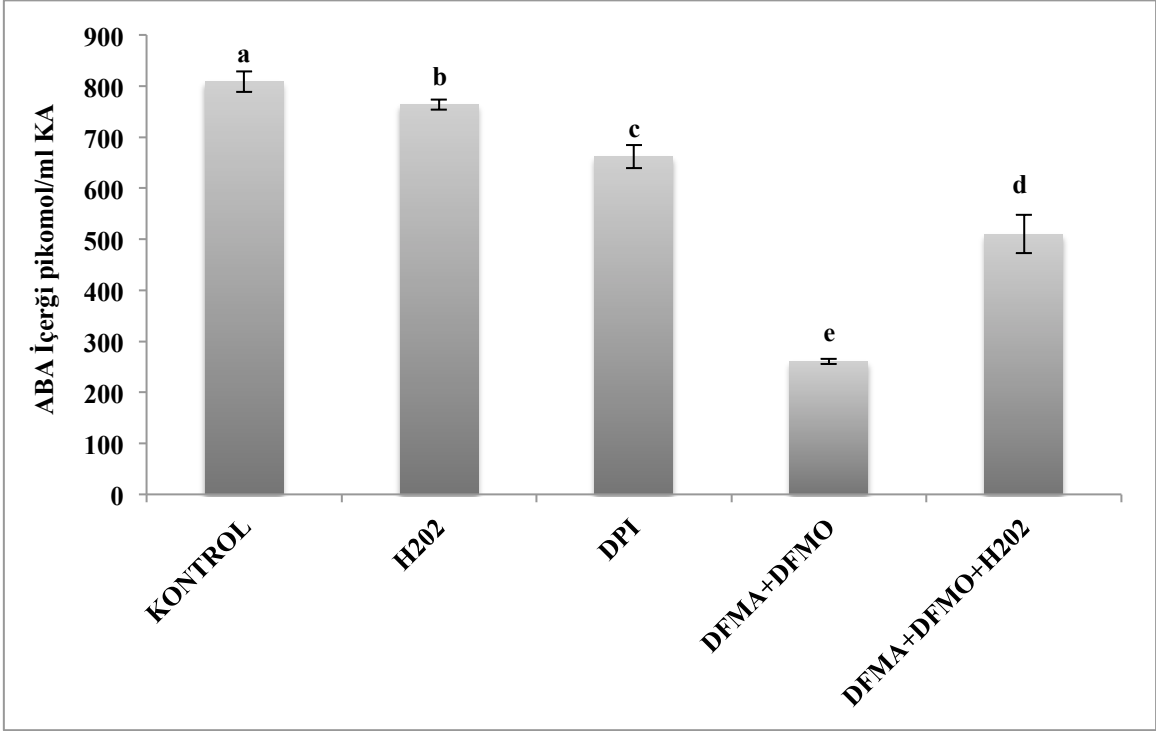


Şekil 16. Çeşitli uygulamaların prolin dehidrogenaz/oksidaz geni (PRODH) ifade seviyesine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.5. Çeşitli Uygulamaların Absisik Asit (ABA) İçeriği ve Absisik Aldehit Oksidaz (AAOX) Geni İfade Seviyesine Etkileri

#### 3.5.1. Absisik Asit (ABA) İçeriği

Strese maruz kalmış bitkilerde önemli derecelerde artış gösteren ABA seviyesi, çalışmamızda kuraklık stresi altında ölçüldü ve sonuçlar Şekil 17’te verildi. Buna göre,  $H_2O_2$  uygulamasının ABA içeriğini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü. Bununla birlikte çalışmamızda tasarlanan tüm gruplarda ABA seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük bir ABA birikimine neden olduğu belirlendi.

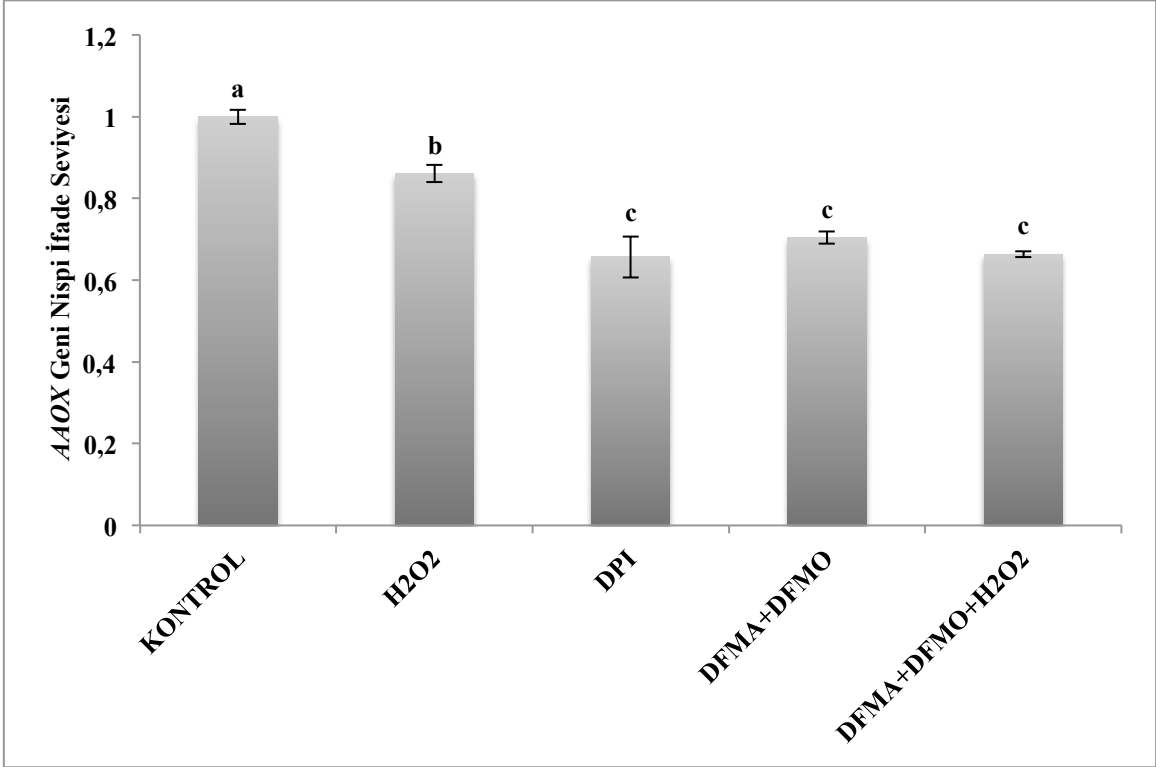


Şekil 17. Çeşitli uygulamaların ABA seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık

### 3.5.2. Absisik Aldehit Oksidaz (AAOX) Geni İfade Seviyesi

Bitkilerde absisik asit sentez basamaklarında kilit bir role sahip olan absisik aldehit oksidaz enzimini kodlayan gen bölgesinin ifade düzeyleri analiz edildi ve sonuçlar Şekil 18'de grafiğe dönüştürüldü. Analiz verilerine göre en yüksek gen ifade seviyesinin kontrol grubunda olduğu saptandı. Bu durumdan farklı olarak  $H_2O_2$  uygulaması yapılan grupta belirlenen ifade seviyesinin kontrol hariç, diğer gruplarından daha yüksek çıktığı bulundu. Ayrıca kontrol ve  $H_2O_2$  uygulamalarının yapıldığı gruplar hariç diğer gruplar arasında ifade seviyesi yönünden istatistiksel bir fark saptanmadı.





Şekil 18. Çeşitli uygulamaların Absisik aldehit oksidaz (AAOX) geni ifade seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.6. Çeşitli Uygulamaların Poliamin İçeriği ve Poliamin Metabolizmasında Görev Alan Genlere Ait İfade Seviyeleri Üzerine Etkileri

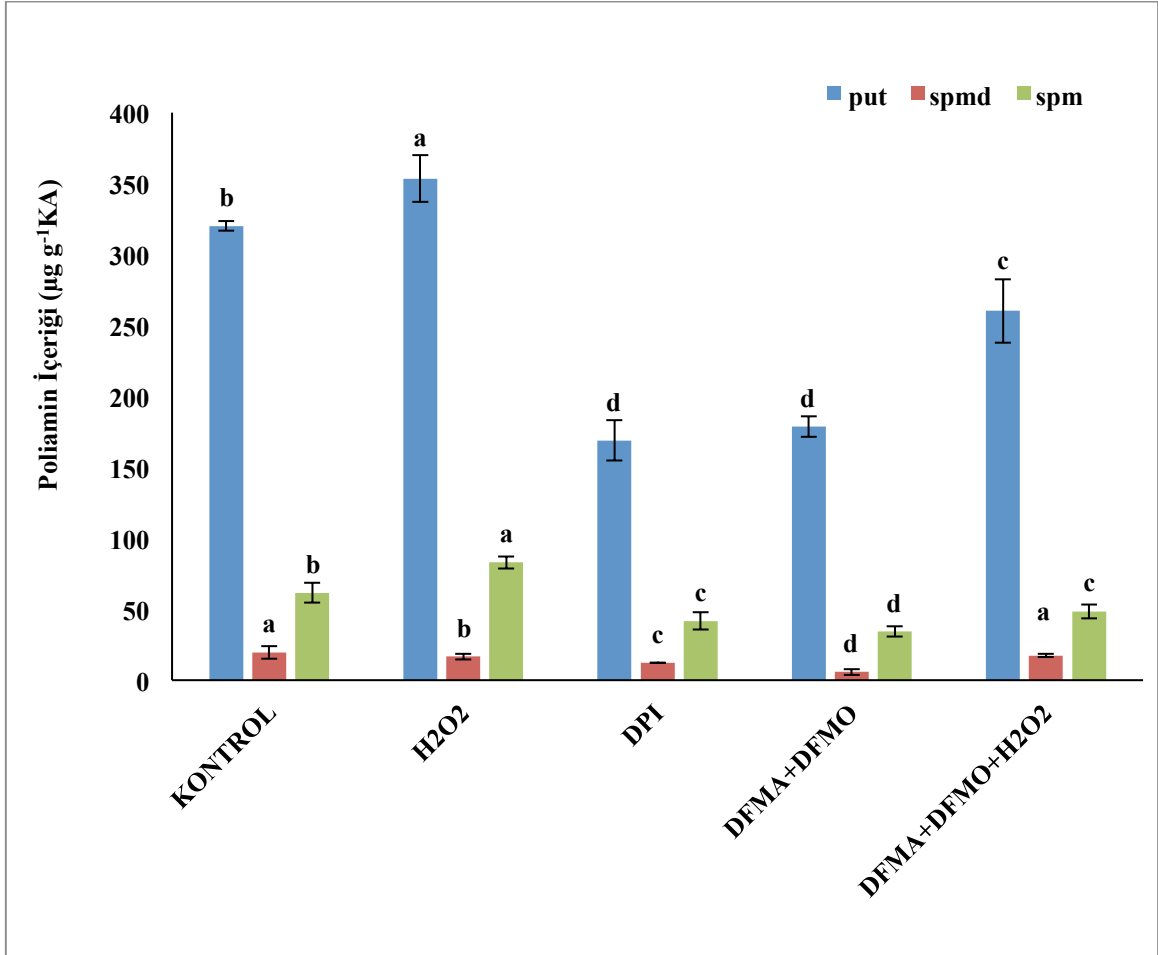
#### 3.6.1. Poliamin İçeriği

Mevcut çalışmada deney gruplarında, en yaygın poliaminler olan putresin, spermidin ve spermin analizleri gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 19’te verildi. Poliamin ölçümlerine göre en fazla putresin içeriği (tüm gruplar içersinde)  $H_2O_2$  uygulamasında belirlendi. Putresin seviyesi, en düşük olarak NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI ve poliamin sentez inhibitörleri olan DFMA+DFMO uygulama gruplarında tespit edildi. Bununla birlikte  $H_2O_2$ ’in poliamin sentez inhibitörleriyle birlikte uygulanması durumunda (DFMA+DFMO+ $H_2O_2$ ), putresin seviyesini DPI ve DFMA+DFMO uygulamalarına göre yükseltmesine rağmen kontrol grubuna göre düşük kaldığı gözlemlendi.

Spermidin içeriği yönünden incelenen sonuçlarda en fazla spermidin miktarı, kontrol ve DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  gruplarında gözlemlendi. Putresin seviyesinin artmasına sebep olan

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının ise spermidin içeriğini, DPI ve DFMA+DFMO gruplarına göre arttırdığı belirlendi.

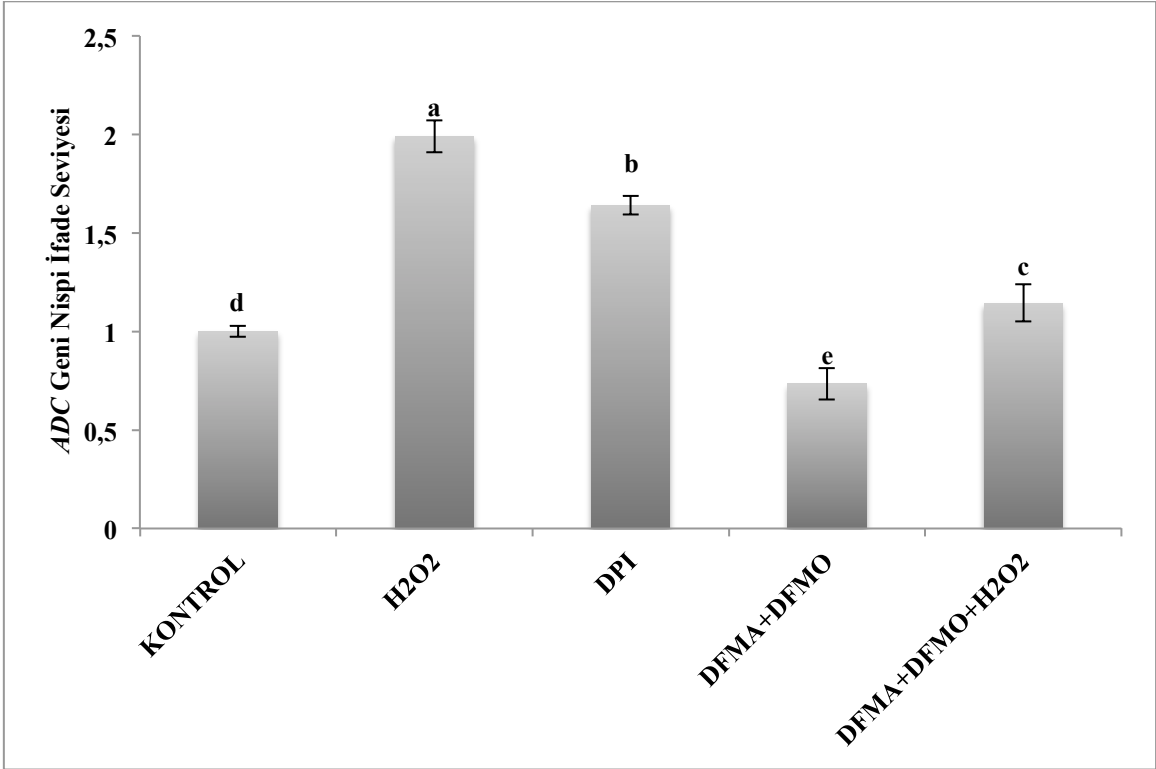
Analiz verileri spermin içeriği yönünden incelendiğinde en fazla spermin içeriğinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında olduğu tespit edildi. Aynı zamanda en düşük spermin içeriği ise DFMA+DFMO grubunda ölçüldü. DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda ölçülen spermin içeriğinin kontrol grubundan düşük olduğu; buna karşın DPI ve DFMA+DFMO gruplarından yüksek olacak şekilde ara bir değer gösterdiği anlaşıldı. Poliamin sonuçlarının geneline bakıldığında dışarıdan uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in toplam poliamin seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artışa sebep olduğu belirlendi.



Şekil 19. Çeşitli uygulamaların poliamin seviyeleri üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık.

### 3.6.2. Arjinin Dekarboksilaz (ADC)

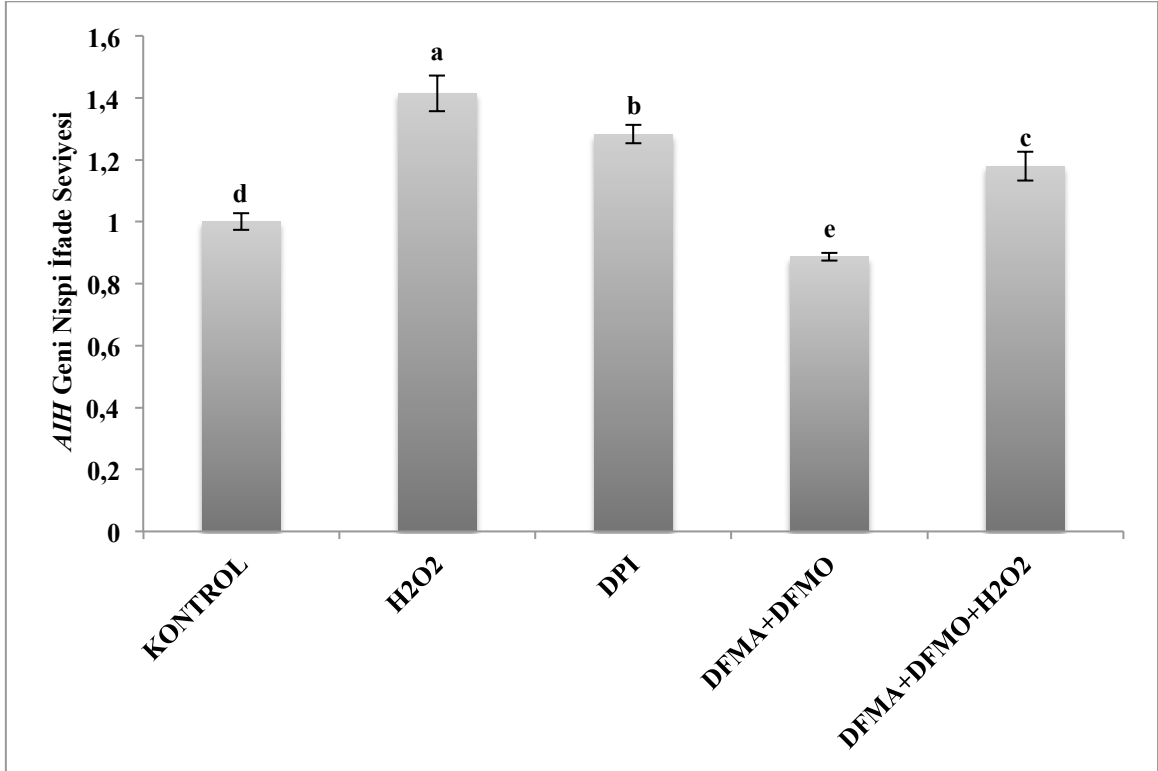
Bitkilerde poliamin sentezinden sorumlu anahtar genlerden birisi olan arjinin dekarboksilaz genine ait nispi ifade seviye bulguları Şekil 20’te verildi. Analiz sonuçlarına göre dışarıdan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması söz konusu enzimin ifade seviyesini diğer grupların tamamına göre arttırdı. İçsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin azalmasına neden olan DPI uygulaması ise; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması hariç en yüksek ifade seviyesini gösterdi. ADC genine ait en düşük ifade seviyesinin, poliamin sentez inhibitörlerinin uygulandığı DFMA+DFMO grubunda gerçekleştiği tespit edildi. Poliamin sentez inhibitörleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birlikte uygulandığında (DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ölçülen ifade seviyesinin sadece inhibitör uygulanan (DFMA+DFMO) ve aynı zamanda da kontrol gruplarından daha fazla olduğu belirlendi.



Şekil 20. Arjinin dekarboksilaz (ADC) genine ait nisbi ifade seviyelerinin deney gruplarına göre belirlenmesi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.6.3. Agmatin Deaminaz/İminohidrolaz (AIH)

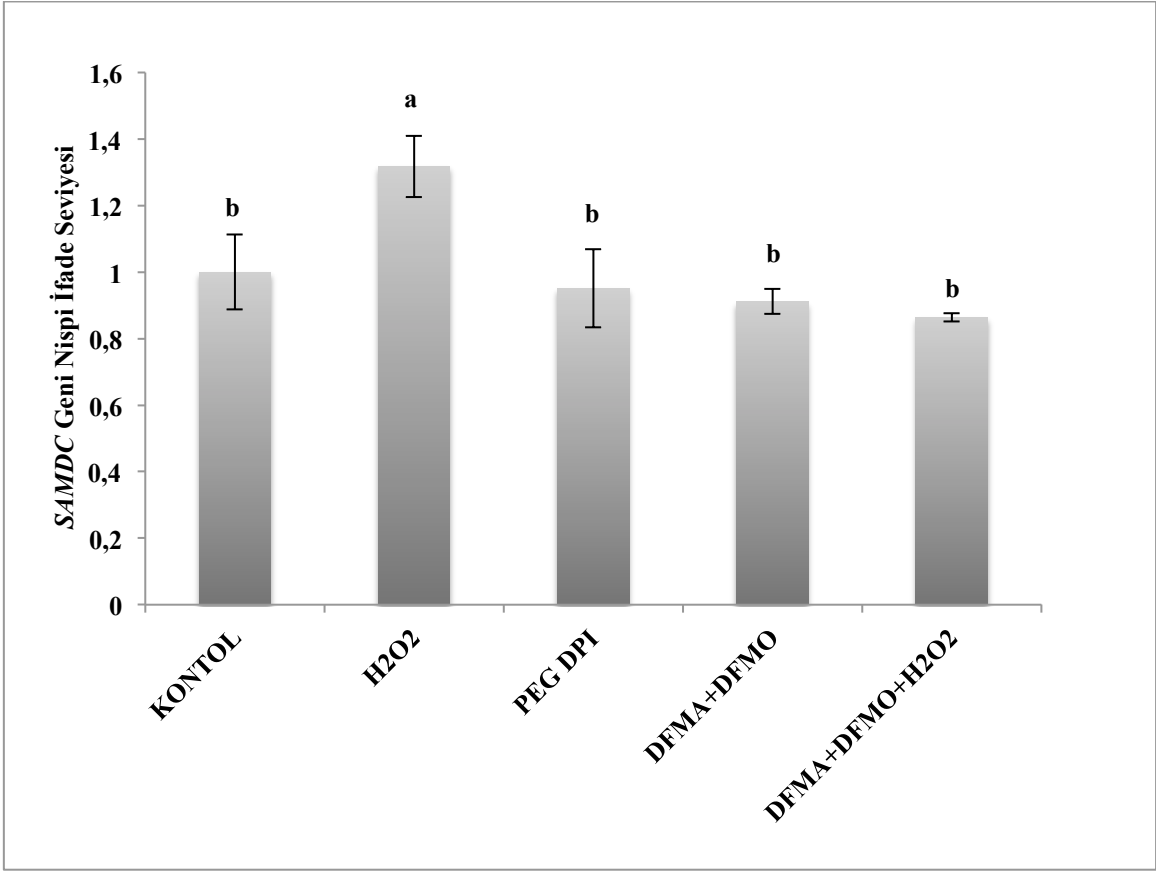
Poliamin sentezinde *ADC* yolunda görev alan ve putresin seviyesinin artmasından sorumlu enzimlerden birisi olan agmatin deaminaz/iminohidrolaz'ı (*AIH*) kodlayan gene ait nispi ifade seviyesi, uygulama gruplarına göre Şekil 21'te sunuldu. Analiz sonuçlarına göre en yüksek ifade seviyesinin  $H_2O_2$  uygulaması grubunda olduğu belirlendi. DPI uygulamasında ise, bahsi geçen genin ifade seviyesi ikinci en yüksek seviyeyi gösterdi. Çalışmanın bu safhasında *AIH* genine ait en düşük ifade seviyesi, poliamin sentez inhibitörlerinin uygulandığı grupta (DFMA+DFMO) olduğu gözlemlendi. İnhibitörlere  $H_2O_2$  eklenmesiyle elde edilen DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  grubunda ise yalnızca inhibitör uygulanan gruba ve kontrol grubuna göre daha yüksek bir ifade düzeyinin olduğu saptandı.



Şekil 21. Çeşitli uygulamaların agmatin deaminaz/iminohidrolaz (*AIH*) genine ait ifade seviyeleri üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.6.4. S-Adenozilmetiyonin Dekarboksilaz (*SAMDC*)

Mevcut çalışmanın bu aşamasında, poliamin biyosentezinde ikincil poliaminlerin (spermidin ve spermin) sentezlenebilmesi için gerekli olan amin gruplarının kaynağını oluşturan S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz geninin ifade seviyeleri incelendi. Analiz bulgularına göre söz konusu enzime ait ifade seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı tek grup H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması olduğu tespit edildi (Şekil 22). Diğer taraftan, kontrol dahil diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı tespit edildi.

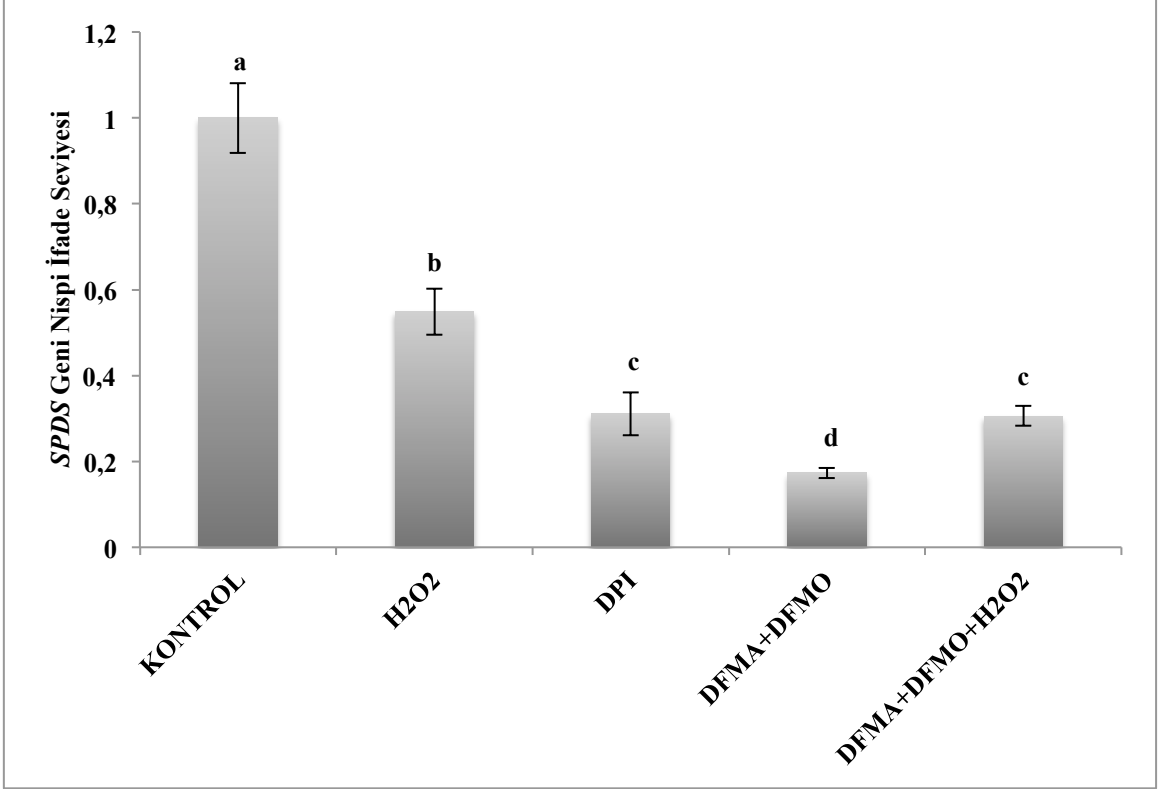


Şekil 22. Çeşitli uygulamaların S-adenozil metiyonin dekarboksilaz geni (*SAMDC*) ifade seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.6.5. Spermidin Sentaz (*SPDS*)

Bitki poliamin havuzunda, putresinden sentezlenen ilk poliamin olan spermidine ait ifade düzeyleri ölçüldü (Şekil 23). Ölçüm sonuçlarına göre dıştan uygulanan tüm bileşikler gen ifadesinin azalmasına neden oldu. Bununla birlikte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının bahse konu

olan gen ifadesini, kontrol gurubu hariç diğer gruplara göre daha fazla yükselttiği belirlendi. Aynı sonuçlara göre DPI ve DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamaları *SPDS* geni ifadesiyle istatistiksel olarak aynı etkiyi gösterdi. Son olarak en düşük gen ifade düzeyinin, sadece poliamin inhibitörleri uygulanan grupta (DFMA+DFMO) olduğu tespit edildi.

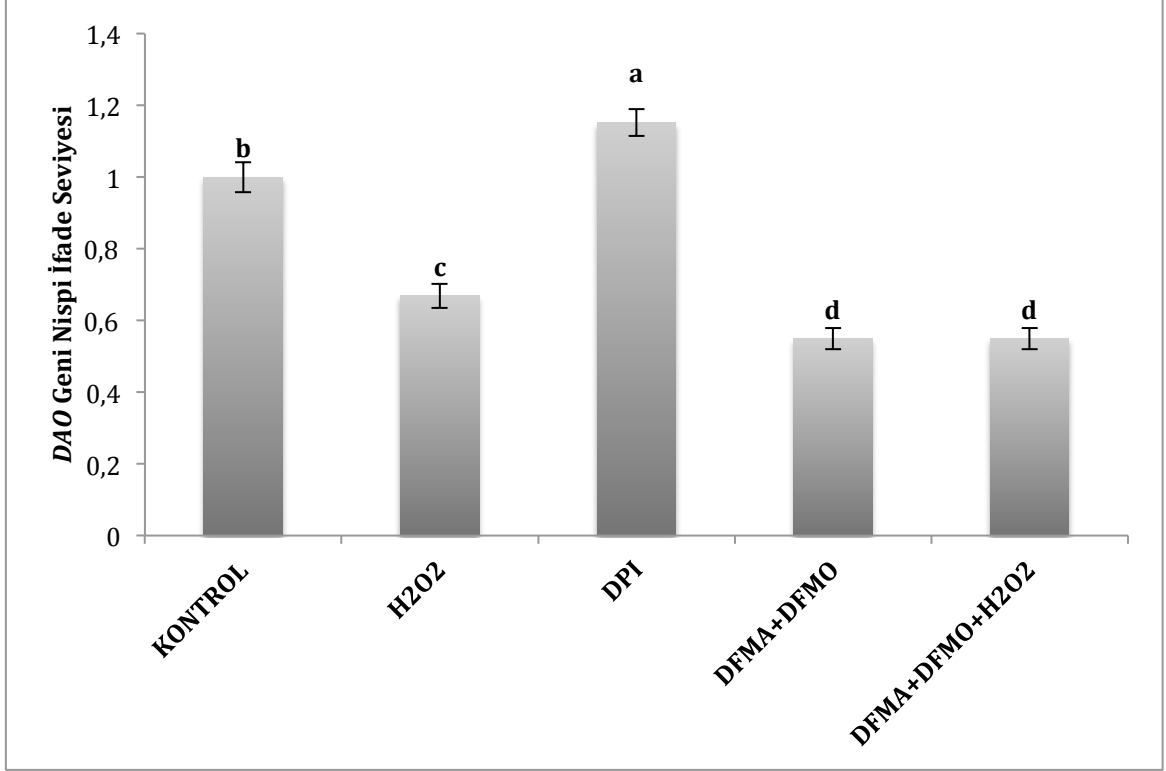


Şekil 23. Çeşitli uygulamaların spermidin sentaz genine (*SPDS*) geni ifade seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.6.6. Diamin Oksidaz/Cu Amin Oksidaz (*DAO/CuAO*)

Poliamin metabolizmasının yıkım basamaklarından birisi olan ve diamin poliaminlerin (putresin ve kadaverin gibi) degradasyonundan sorumlu olan diamin oksidaz/Cu amin oksidaz (*DAO* ya da *CuAO*) geninin ifade seviyesi mevcut çalışmada analiz edildi (Şekil 24). Analiz sonuçlarına göre en yüksek *DAO* aktivitesi içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerini azaltan DPI uygulamasında görüldü. Buna karşın dışarıdan gerçekleştirilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının *DAO* geni ifade seviyesini, kontrol ve DPI grubuna göre daha düşük bir düzeye indirdiği belirlendi. Yine bu sonuçlara göre en düşük gen ifade seviyesinin

poliamin sentez inhibitörleri gruplarında (hem DFMA+DFMO hem de DFMA+DFMO+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) olduğu gözlemlendi.

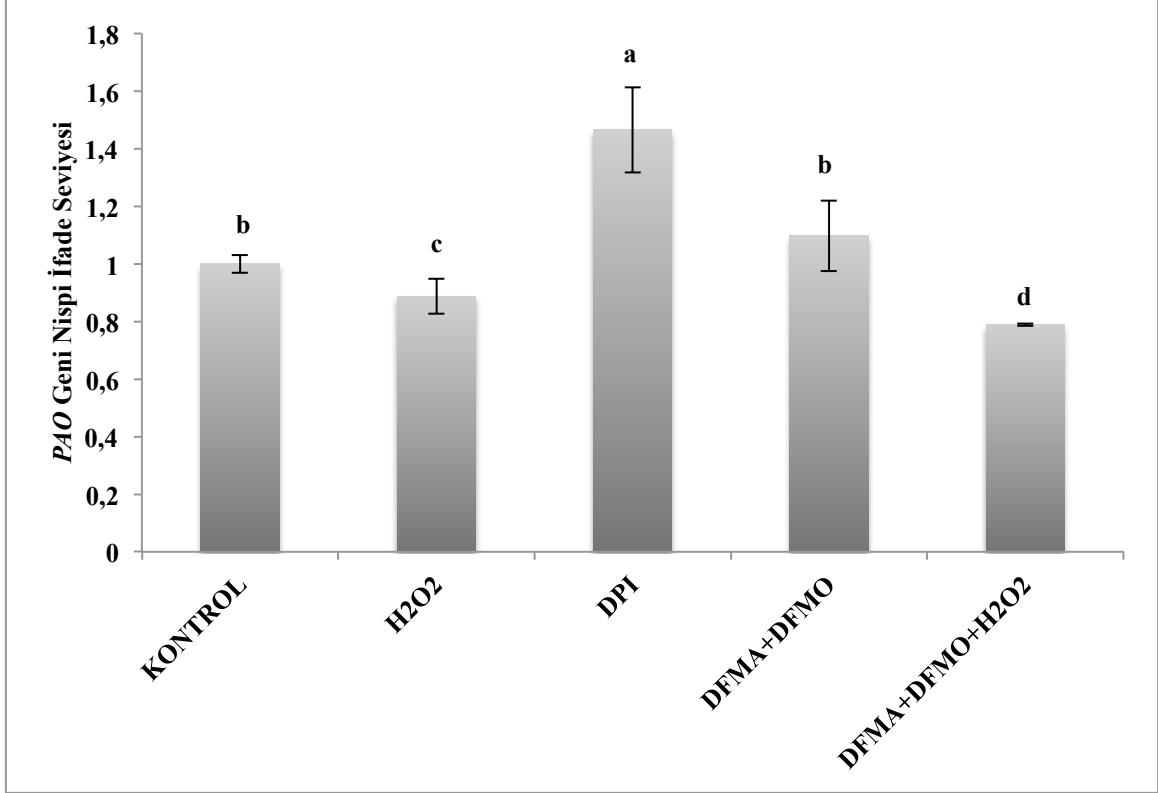


Şekil 24. Çeşitli uygulamaların diamin oksidaz/Cu Amin oksidaz (DAO/CuAO) geni ifade seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.6.7. Poliamin Oksidaz (PAO)

Poliamin oksidaz enzimi, poliamin metabolizmasında yıkım yolunun son basamağında yer alır ve hem triamin (spermidin) hem de tetraamin (spermin) poliaminlerin parçalanmasını kontrol eder. Çalışmanın bu safhasında bu yıkım enzimini kodlayan genin ifade seviyesi ölçüldü (Şekil 25). Buna göre en yüksek ifade seviyesi, DPI inhibitörü uygulanarak içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı azaltılan DPI grubunda tespit edildi. Kontrol ve poliamin sentez inhibitörlerinin uygulandığı DFMA+DFMO gruplarında ölçülen ifade seviyeleri arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı. Buna karşın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan grupta ölçülen ifade seviyesinin DPI, kontrol ve DFMA+DFMO gruplarına göre daha düşük olduğu belirlendi. Poliamin sentez inhibitörlerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'le birlikte uygulandığı grupta ölçülen

*PAO* ifade seviyesinin, çalışmanın bu safhasında ölçülen en düşük ifade seviyesi olduğu belirlendi.



Şekil 25. Çeşitli uygulamaların poliamin oksidaz (*PAO*) geni ifade seviyesi üzerine etkileri. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.



#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı,  $H_2O_2$  molekülünün kuraklık stresi esnasında poliamin metabolizması üzerindeki sinyalizasyon etkisini ve bu sinyalizasyon mekanizması gerçekleşirken, sürece başka metabolik yolların da (ABA ve prolin) dahil olup olmadığını araştırmaktır. Kuraklık stresi etkisini oluşturmak için polietilen glikol (PEG) kullanılmıştır. Ayrıca  $H_2O_2$  molekülünün kuraklık stresi süresince poliamin metabolizması üzerine etkilerini araştırmak için dışarıdan  $H_2O_2$  uygulaması yapılmıştır. İçsel  $H_2O_2$  eksikliğinde poliamin birikimini ve poliamin metabolizmasında görev alan hem sentez hem de yıkım enzimlerini kodlayan genlerin ifadelerini incelemek için dışarıdan DPI inhibitörü uygulanmıştır. DPI uygulamasının, içsel  $H_2O_2$  seviyesini NADPH oksidaz enzimini bloke ederek azalttığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Jiang ve Zhang, 2002a, 2002b). Çalışmamızda,  $H_2O_2$ 'nin poliamin yolağındaki hangi yolları etkilediğini belirlemek için arjinin dekarboksilaz (ADC) ve ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimlerini bloke eden poliamin biyosentez inhibitörleri [diflorometil arjinin (DFMA) ve diflorometil ornitin (DFMO)] kullanılmıştır. Ayrıca, hem  $H_2O_2$  varlığında hem de poliamin biyosentez inhibitörleri varlığında poliamin birikimini ve gen ifade düzeylerindeki değişimleri incelemek amacıyla, poliamin sentez inhibitörleri ve  $H_2O_2$  birlikte (DFMA+DFMO+ $H_2O_2$ ) uygulanmıştır. Deney gruplarında bazı stres parametrelerinin ölçülmesiyle (su potansiyeli, MDA miktarı ve içsel  $H_2O_2$  seviyesi), bitkilerin PEG ortamında kuraklık stresine maruz kaldığı tespit edilmiştir.

Osmotik stres koşullarındaki mısır bitkilerinde dıştan uygulanan  $H_2O_2$  ve diğer uygulamaların su içeriği üzerine etkilerini belirlemek için su potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Yaprak su potansiyelinin kuraklık stresi için iyi bir indikatör olduğu kabul edilmektedir (Shaw vd., 2002). Benzer şekilde Sharma ve Dubey, (2005) yaptıkları bir çalışmada, kuraklık stresi altındaki çeltik kültürlerinde yaprak su potansiyelinin -0.5 MPa'dan -2 MPa'a kadar düşebildiğini rapor etmişlerdir. Yine buğdayda yapılan bir çalışmada kuraklık stresinin yaprak su potansiyelini kontrol bitkilerine göre -0.63 MPa'dan -2 MPa'a düşürdüğü kaydedilmiştir (Siddique vd., 2000). Terzi vd., (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, mısır bitkilerinde  $H_2O_2$  ön uygulamasıyla beraber osmotik stres koşullarında yaprak su potansiyelinin yükseldiği ve bitki su durumunun iyileştiği belirlenmiştir. Mevcut çalışmamızda,  $H_2O_2$  uygulaması ile su durumunun iyileşmesi ve bu iyileşmeye paralel olarak, poliamin seviyelerinin de arttığı belirlenmiştir. İçsel  $H_2O_2$

seviyesini azaltmak amacıyla,  $H_2O_2$  üreten kaynaklarından birisi olan NADPH oksidaz'ın aktivitesini inhibe eden DPI'in ve poliamin sentez inhibitörlerinin kullanımı sonrası yaprak su potansiyelinde düşme meydana gelmesi ve yine bu duruma paralel olarak poliamin seviyelerinde görülen azalış,  $H_2O_2$  uygulamasının poliamin metabolizmasını düzenleyerek su potansiyeli üzerine etkili olabileceği kanısını oluşturmuştur.

Mevcut çalışmada,  $H_2O_2$  ve diğer uygulamaların kuraklık stresine olan etkilerini belirlemek için lipid peroksidasyonu ölçümü gerçekleştirilmiştir. Oksidatif stres indikatörü olarak bilinen ve lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA içeriği, kuraklık stresi ile ilişkili diğer bir stres parametresidir. Hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla hücre membranlarında hasara yol açtığı bilinmektedir (Munne-Bosch vd., 2001). Bununla beraber, çalışmamızda dıştan uygulanan düşük konsantrasyondaki (10 mM)  $H_2O_2$ 'in kuraklık stresi koşullarında lipid peroksidasyonunu iyileştirdiği belirlenmiştir. Ek olarak çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz  $H_2O_2$  uygulamasının katalaz ve peroksidaz aktivitesini arttırdığı da gözlenmiştir. Katalaz enziminin hücrede fazlaca bulunan  $H_2O_2$ 'i su ve oksijene indirgeyerek temizlediği bilinmektedir (Bergmeyer ve Grabl, 1983; Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Ayrıca söz konusu bu enzimin  $H_2O_2$ 'in membranlarda oluşturacağı olası hasarın (lipid peroksidasyonu gibi) engellenmesinde de rol aldığı rapor edilmiştir (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Benzer olarak peroksidazlar da stres altında  $H_2O_2$ 'in temizlenmesinden ve hücre zarı bütünlüğünün korunmasından sorumlu olduğu da bildirilmiştir (Gaspar vd., 1991; Zhang vd., 1995; Parida ve Das, 2005). Bu literatür bilgileri ve MDA verilerimiz birlikte düşünüldüğünde,  $H_2O_2$  uygulamasının katalaz ve peroksidaz aktivitelerini artırarak hücre zarı bütünlüğünü koruduğunu ve böylece MDA seviyesini düşürdüğünü söyleyebiliriz. Mevcut çalışma bulgularını destekler şekilde, kuraklık koşullarındaki buğday fidelerinde ve osmotik stres koşullarındaki salatalık ve mısır fidelerinde benzer bulgular elde edilmiştir (He vd., 2009; Liu vd., 2010; Terzi vd., 2014). Çalışmamızda NADPH oksidaz enzimi aktivitesini bloke ederek içsel  $H_2O_2$  seviyesini düşüren DPI uygulaması yapılmıştır. Bu uygulama sonucunda içsel  $H_2O_2$  seviyesi, NADPH oksidaz aktivitesi ve *NADPH oksidaz* geni ifade seviyesi (*NOX*) diğer gruplara göre ciddi bir şekilde azalmıştır. Araştırmamızda söz konusu  $H_2O_2$  seviyesinin düşmesi sonucu MDA seviyesinde düşüş beklememize rağmen, MDA miktarının yükseldiği bulunmuştur. Bu durum; DPI uygulaması ile azalan katalaz ve peroksidaz aktivitesiyle açıklanabilir. Aynı zamanda bu açıklama, poliamin sentez inhibitörlerinin uygulandığı (DFMA+DFMO) gruptaki MDA seviyesini açıklamaya

da yardımcı olabilir. Söz konusu bu grupta, MDA içeriği diğer gruplardan daha yüksek çıkmıştır. DFMA+DFMO grubunda katalaz ve peroksidaz enzim aktivitelerindeki azalış ve aynı zamanda önemli bir  $H_2O_2$  üretim kaynağı olarak bilinen SOD (Fridovich, 1986; Elstner, 1987) aktivitesindeki artış,  $H_2O_2$ 'in yüksek bir seviyede olmasına ve de sonuç olarak MDA seviyesinin artmasına etki yapmış olabilir. Dahası çalışmamızdaki,  $H_2O_2$  uygulamasının yapıldığı grupta poliamin seviyelerinde de belirgin artışlar gözlenmiştir.  $H_2O_2$  uygulamasıyla lipid peroksidasyonunda görülen azalma ve aynı uygulamanın uyardığı poliamin birikimindeki artışın bir sonucu olarak su durumunun iyileşmesi, poliaminler ve  $H_2O_2$  arasında önemli bir bağlantı olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Mevcut çalışmada, kuraklık stresi koşullarında DFMA+DFMO uygulaması sonucu poliamin seviyeleri baskılandığında, su potansiyelinin düştüğü ve buna paralel olarak lipid peroksidasyonunun arttığı görülmüştür. Çalışmamıza benzer olarak, Nayyar vd., (2005), kuraklık stresine maruz bırakılmış nohut ve soya fasulyesi bitkilerine DFMA ve DFMO inhibitörleri uygulandığında membran hasarının arttığını, kök su içeriklerinin azaldığını ve büyümenin inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Buna göre  $H_2O_2$ 'le ilişkili poliamin seviyesi artışlarının kuraklık stresine karşı verilen koruyucu yanıtlarda önemli bir rol oynadığı söylenebilir.

İçsel poliamin seviyesinin kuraklık stresi sonucunda önemli derecede artış göstermesi birçok çalışmada rapor edilmiştir (Erdei vd., 1996; Galston vd., 1997; Groppa ve Benavides, 2008). Mevcut çalışmada ise kuraklık stresi koşullarında dıştan  $H_2O_2$  uygulaması ile putresin ve spermin gibi yaygın poliamin içeriklerinin kontrol grubuna (sadece kuraklık) göre arttığı belirlenmiştir. Abass ve Mohamed, (2011) gerçekleştirdiği bir çalışmada fasülye tohumlarına yapılan  $H_2O_2$  uygulamasının kuraklık koşullarında poliamin içeriğini uyardığını ileri sürmüşlerdir. Benzer olarak Terzi vd., (2014) mısır fidelerine  $H_2O_2$  ön uygulaması yaptıktan sonra fideleri osmotik strese maruz bırakmış ve sonuç olarak putresin, spermin ve spermidin içeriklerinde anlamlı artışlar tespit etmişlerdir. Poliaminlerin antioksidan veya ROS temizleyicisi olarak rol oynadığı, protein ve hücrel yapıların kararlılığına katkıda buldukları ve böylece bitkilerin stress dayanıklılığını arttırdıkları bilinmektedir (Bartels ve Sunkar, 2005). Nitekim çalışmamızda,  $H_2O_2$  uygulamalarının sonucu olarak artan poliamin içeriğinin ve antioksidan enzim aktivitelerinin (katalaz ve peroksidaz) membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olduğu ifade edilebilir. Ayrıca çalışmamızda  $H_2O_2$  uygulamasının katalaz ve peroksidaz

aktivitesini arttırması bu fikrimizi güçlendirmektedir. Ayrıca, buradaki ilgi çekici durum, poliamin içeriğinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonrasında artmasıdır. DFMA+DFMO inhibitörleri uygulaması ile poliamin düzeylerinin azalması ve sonrasında meydana gelen MDA içeriklerindeki artış, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin poliamin metabolizması üzerindeki pozitif rolü olduğuna dair fikrimizi desteklemektedir. Ayrıca DPI ve poliamin sentez inhibiörleri (DFMA+DFMO) uygulamalarının poliamin seviyesi üzerindeki etkisinin benzer olması yani her iki uygulama grubunda da poliamin seviyesinin düşmesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin poliamin sentez yolundaki teşvik edici etkisi, fikrimizi destekler niteliktedir.

Yukarıda içsel poliamin düzeylerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teşvikli artışların hangi metabolik yollarla sağlandığını belirlemek amacıyla çalışmamızda, poliamin biyosentezinde görevli olan arjinin dekarboksilaz (*ADC*), agmatin iminohidrolaz (*AIH*), S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (*SAMDC*), spermidin sentaz (*SPDS*) ve poliamin yıkımından sorumlu diamin oksidaz (*DAO/CuAO*) ve poliamin oksidaz (*PAO*) enzimlerini kodlayan genlerin ifade seviyeleri, kuraklık stresi koşullarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sentez inhibitörü (DPI) ve poliamin sentez inhibitörleri (DFMA+DFMO) varlığında incelenmiştir. Putresin sentezinin ilk basamağında yer alan *ADC* geninin ifade seviyesinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasıyla diğer gruplara kıyasla arttığı belirlenmiştir. Bitkilerde triamin ve tetraaminlerin poliaminlerin kaynağı durumunda olan putresin havuzu, büyük oranda *ADC* geninin kontrolü altındadır ve kuraklık stresinde artış göstermektedir (Urano vd., 2004; Alcazar vd., 2010a). Bu nedenle dışarıdan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan deney grubunda putresin seviyesinin artması, *ADC* genine ait ifade seviyesinin artmasıyla ilgili olabilir. Nitekim Urano vd. (2004) yaptıkları bir çalışmada; kuraklık koşulları altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde artan putresin seviyesinin *ADC* transkriptlerinin uyarılmasına pozitif korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da tespit ettiğimiz *ADC* ve putresin arasındaki bu pozitif ilişki Urano vd., (2004)'un vardıkları sonuca benzerlik göstermektedir. Ayrıca Abass ve Mohamed, (2011) ve Terzi vd., (2014), gerçekleştirdikleri çalışmalarda, kuraklık stresi koşullarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının poliamin içeriğini arttırdığını HPLC analizleri ile tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmadaki HPLC analizleri, bahsi geçen araştırmacıların çalışma bulgularını desteklemektedir. Ayrıca gerçekleştirdiğimiz RT PCR analizleri de, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin poliamin birikimini teşvik ettiği düşüncemizi kuvvetlendirmektedir. Şöyle ki putresin sentezinde görev alan bir diğer enzim olan *AIH* (agmatin deaminaz/iminohidrolaz)'ın gen transkript seviyesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile kontrole göre artmıştır. Kuraklık stresi koşullarında *AIH* geninin ifade seviyesinin arttığı daha önceleri rapor edilmiştir. Örneğin

Alcazar vd., (2006b), kuraklık stresine maruz bırakılan *Arabidopsis* bitkilerinde *AIH* transkriptlerinin arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre,  $H_2O_2$  uygulamasıyla meydana gelen putresin seviyesindeki artışın bir diğer nedeni de *AIH* geninin pozitif yönde düzenlenmesidir. Aynı zamanda içsel  $H_2O_2$  miktarını düşüren DPI uygulamasıyla azalan *AIH* geni transkript düzeyi, bahse konu olan gene ait ifade seviyesinin  $H_2O_2$  tarafından teşvik edilerek, putresin seviyesinin arttırılabileceğini göstermektedir. Alcazar vd., (2011) ve Do vd., (2014), kuraklık stresi koşullarında sırasıyla *Arabidopsis* ve çeltik bitkilerinde *SPDS* transkript seviyelerinde artış belirlemişlerdir. Çalışmamızda  $H_2O_2$  uygulanan gruplarda spermidin miktarının, kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Bu azalış *PAO* aktivitesi ile spermidinin putresin havuzuna geri kazandırılmasıyla ya da spermidin sentaz (*SPDS*) genine ait transkriptlerin azalmasından kaynaklanabilir. Çünkü *SPDS* geninin, kontrol grubunda  $H_2O_2$  grubuna göre daha fazla ifade edildiği çalışmamızda tespit edilmiştir. Buna karşın *SPDS* geni ifadesi DFMA+DFMO+ $H_2O_2$  grubunda  $H_2O_2$  grubundan daha az olarak belirlenmiştir. Ayrıca *PAO* ifade seviyesinin  $H_2O_2$  grubunda düşük, PEG grubunda ise fazla çıkması spermidin seviyesindeki dalgalanmayı açıklamaya yardımcı olabilir. Nitekim çalışmamızda PEG koşullarında putresin seviyesinde önemli derecede artışlar belirlenmiştir. Sonuç olarak kontrol grubuna göre, çalışmamızdaki  $H_2O_2$  uygulamasıyla meydana gelen içsel spermidin seviyesindeki azalış, *SPDS* geni ifade seviyesindeki azalma ile uyum içindedir. Çalışmamızda spermidin ve spermin sentezinde rol oynayan *SAMDC* geninin ifade düzeyi belirlenmiştir. *SAMDC* geni, spermidin ve spermin sentezinde dekarboksile S-adenozil metiyonin (dcSAM) sağlayıcısı olarak kritik bir rol üstlenen aynı isimli enzimi kodlar. Bu enzimin bitkilerdeki ortalama yaşam süresi yaklaşık 5-60 dakika arasındadır ve hem spermidin hem de spermin sentezi için sınırlayıcı bir enzimdir (Kuznetsov ve Shevyakova 2007). Çünkü *SAMDC*'ın ürettiği dcSAM sağlanamazsa spermidin ve spermin sentez yolu devam edemez. Bu sebeple söz konusu enzimi kodlayan gen (*SAMDC*), poliamin sentezi devam ettiği sürece ifade edilmelidir. Böylece bu genin ifade seviyesinin ölçülmesi spermidin ve spermin seviyelerinin düzenlenmesinde oldukça önemli bilgiler sağlar. Kuraklık stresi altında *SAMDC* ifade seviyesinde meydana gelen artışlar sınırlı sayıda da olsa, rapor edilmiştir. Örneğin, kuraklık stresi koşullarında, Alcazar vd., (2011) *Arabidopsis* bitkilerinde, Li ve Chen (2000) ise çeltik bitkilerinde *SAMDC* transkriptlerinin arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, spermin seviyesinin kuraklık stresi altındaki çeltik bitkilerinde arttığı da bildirilmiştir (Capell vd., 2004). Çalışmamızda kuraklık koşullarında,  $H_2O_2$  uygulaması gerçekleştirildiğinde ( $H_2O_2$

grubu) meydana gelen *SAMDC* transkript seviyesindeki artış diğer deney gruplarından daha fazla olmuştur. Hidrojen peroksit uygulamasıyla artan spermin düzeyi de bunu göstermektedir. Terzi vd., (2014), hidrojen peroksit ön uygulaması yaptıkları mısır fidelerini osmotik strese maruz bıraktıklarında spermin biriktirdiğini rapor etmişlerdir. Kurepa vd., (1998), *Arabidopsis* bitkisinde parakuat toksisitesi ve poliamin seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Parakuat herbisid olarak kullanılan ve hücrede  $H_2O_2$  seviyesinin artmasına neden olan bir bileşiktir (Demiralay vd., 2013). Kurepa vd., (1998), çalışmalarında parakuat uygulamasının putresin seviyesini önemli derecede arttırdığını buna karşın spermidin ve spermin seviyesi üzerine etkili olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen verilerde bu durumu destekler niteliktedirler. Çünkü dışarıdan düşük bir konsantrasyonda uygulanan  $H_2O_2$ , poliamin artışını (putresin ve spermin) önemli derecelerde etkilemiştir. Spermin sentezinin, *SAMDC* enzimi etkinliği tarafından sınırlandırıldığı bilinmektedir (Kuznetsov ve Shevyakova, 2007). Sonuç olarak, çalışmamızda  $H_2O_2$ 'in poliamin metabolizması üzerindeki teşvik edici etkisi, fikrimizi desteklemektedir. Dahası *SAMDC* gibi kritik bir enzimi kodlayan genin  $H_2O_2$  varlığında ifade düzeyinde artış göstermesi, çalışma konumuzu oluşturan  $H_2O_2$ -poliamin sinyalizasyonu fikrini güçlendirmektedir.

Poliaminlerin yıkımında görevli olan genlerin, DAO (CuAO) ve PAO enzimlerini kodladığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Cohen, 1998; Angelini vd., 2010; Fincato vd., 2012). Çalışmamızda *DAO* geninin ifade seviyesinde incelenmesi sonucunda, kuraklık koşullarında  $H_2O_2$  uygulamasıyla gen ifadesinin diğer gruplara göre önemli seviyede azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum,  $H_2O_2$  uygulamasında putresin seviyesinin diğer gruplara göre yüksek olmasını açıklamaya yardımcı olabilir. Çünkü çalışmamızda putresin seviyesi en fazla olarak  $H_2O_2$  uygulamasında belirlenmiştir. İçsel  $H_2O_2$  seviyesini azaltan DPI uygulaması ise, *DAO* transkript seviyesinin en fazla tespit edildiği grup olmuştur. Bu durumu putresin seviyelerini inceleyerek teyit etmek mümkündür. *DAO* ifade seviyesinin  $H_2O_2$  varlığında azalması, buna karşın DPI varlığında artması; kuraklık stresi süresince  $H_2O_2$  ile poliamin seviyesi arasında pozitif bir sinyal ilişkisi olabileceği fikrini desteklemektedir. Bununla beraber, herhangi bir harici uygulama yapılmayan PEG (kontrol) grubundaki *DAO* ifade seviyesi, DPI grubu hariç diğer uygulama gruplarından daha yüksektir. DFMA+DFMO inhibitörlerinin uygulandığı gruptaki putresin seviyelerine bakıldığında ise, DPI uygulanması sonucunda oluşan *DAO* kaynaklı putresin içeriğindeki azalışın,  $H_2O_2$ 'in poliamin metabolizması (hem sentezi hem de yıkımı) üzerindeki etkisini

göstermeye yardımcı olabilir. *DAO* üzerindeki bulgularımızı destekler bir şekilde, Alcazar vd., (2011) tarafından *Arabidopsis* bitkisi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, *DAO* enzim aktivitesinin kuraklığın başladığı ilk saate ciddi artışlar gösterdiği, sonraki saatlerde ise çok fazla azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda poliaminlerin (özellikle spermidin ve spermin) yıkımda rol oynayan *PAO* geninin transkript seviyelerinin incelenmesi sonucunda hem kontrol hem de DPI gruplarında *PAO* transkriptlerinin seviyesi  $H_2O_2$  grubuna göre artış göstermiştir. Bulgularımızı destekler biçimde, bir başka çalışmada kuraklığa maruz kalmış *Arabidopsis* bitkilerinde *PAO* ifade seviyesinin artış gösterdiği rapor edilmiştir (Alcazar vd., 2011). Yine benzer sonuçların bildirildiği başka bir çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan üzüm bitkilerinde *PAO* transkriptlerinin önemli ölçüde arttığı ve hem putresin hem de spermidin seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Hatmi vd., 2015). Diğer yandan çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz  $H_2O_2$  uygulaması, *PAO* transkriptlerinin azalmasına ve poliamin seviyesinin artmasına sebep olmuştur. Bu durum,  $H_2O_2$  grubunda artış gösteren putresin seviyesiyle kendini göstermiştir.

Birçok çalışmaya göre reaktif oksijen türlerinin üretilmesi poliamin katabolik süreçleri ile çok sıkı bir bağ içerisindedir. Çünkü NADPH oksidaza ek olarak amin oksidaz (*DAO* ve *PAO*) aktivitesi sonucunda önemli bir ROS çeşidi olan ve hem bitki savunma hem de stres yanıtlarıyla ilişkili olduğu kabul edilen  $H_2O_2$  üretilir (Cona vd., 2006a, 2006b). Tütün bitkisi apoplastik poliamin oksidazının ve *Arabidopsis* bitkisi *AtPAO3* geninin kodladığı peroksizomal poliamin oksidazının,  $H_2O_2$  üretimine katkıda bulunduğu bazı çalışmalarda belgelenmiştir (Moschou vd., 2008b; Wu vd., 2010). Yine *Arabidopsis* bitkisiyle yapılan bir çalışmada, poliamin oksidasyonunun poliamin oksidaz tarafından farklı şekillerde ve ifade seviyesinde düzenlendiği, böylece ROS seviyelerine oldukça karmaşık bir şekilde etki ettiği bildirilmiştir (Fincato vd., 2011). NADPH oksidaz homologlarının bitkilerde ROS birikimi için önemli olduğunu teyit eden birçok çalışma vardır (Kwak vd., 2003; Sagi vd., 2004; Torres vd., 2005). Bu çalışmaların hemen hepsinde kusurlu NADPH oksidaz geni mutantları kullanılmış ve bu bitkilerde ROS birikiminin özellikle de  $H_2O_2$ 'in azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda bulduğumuz veriler de bu sonuçları desteklemektedir. Çalışmamızın kontrol grubu olan ve dışarıdan uygulama yapılmayan Kontrol (PEG) grubunda, hem *DAO* hem de *PAO* genlerine ait ifade seviyelerinin  $H_2O_2$  grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Söz konusu genlere ait ifade seviyelerinin yüksek olmasına paralel olarak, kontrol grubunda  $H_2O_2$  içeriğinin de diğer gruplara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın dışarıdan uygulama

yapılan diğer gruplarda *DAO* ve *PAO* genlerinin farklı seviyelerde ifade olması, dışarıdan yapılan uygulamaya göre değişiklik göstermektedir. Gerçekten de her iki genin (hem *DAO* hem de *PAO*) ifade seviyeleri kontrol grubunda, DPI uygulaması hariç diğer gruplara göre daha yüksektir. DPI uygulaması nedeniyle yüksek bulunan gen ifadelerine karşın içsel  $H_2O_2$  miktarının düşük olması, DPI'un önemli  $H_2O_2$  kaynaklarından birisi olan NADPH oksidaz enzimini bloke etmesiyle açıklanabilir. Nitekim çalışma bulgularına göre kanaatimiz;  $H_2O_2$  seviyesinin poliamin sentezini teşvik ederken yıkımını da azaltması yönündedir. DPI uygulaması ise düşüncemizi, azalttığı  $H_2O_2$  seviyesi varlığında poliamin sentezinin düşük seviyede kalmasına neden olması ve buna karşın poliamin yıkımını arttırmasıyla desteklemektedir. Poliaminler ve NADPH oksidaz arasındaki çapraz bağlantının bütün bitkisinde protoplast rejenerasyonunu düzenlediği Papadakis ve Roubelakis-Angelakis, (2005) tarafından önerilmiştir. En fazla çalışılmış ROS türevleri olan süperoksitler ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve  $H_2O_2$ , fizyolojik ve patolojik birçok süreçte kritik rollere sahiptir (Pitzschke vd., 2006; Dikalov vd., 2011; Suzuki vd., 2013). Andronis vd., (2014) yakın bir zamanda yayınladıkları bir çalışmada, dışarıdan uygulanan poliaminlerin *Arabidopsis* bitkisinde NADPH oksidaz bağımlı oksijen tüketimini uyardığını tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada aşırı ifade edilen *AtPAO3* genini taşıyan mutant bitkilerde oksijen miktarınının eksik fonksiyonlu *Atpao3* mutant bitkilerine göre azaldığı bulunmuştur. Eksik fonksiyonlu mutantlarda, süperoksit miktarı yüksek çıkarken  $H_2O_2$  miktarı düşük çıkmıştır. Aşırı ifade edilen mutant *Arabidopsis* bitkilerinde ise durum tam tersidir. Andronis vd., (2014) buldukları sonuca göre, poliaminler ve  $H_2O_2$  arasında oldukça güçlü bir ilişkinin var olduğu düşünülmektedir ve ayrıca bu ilişkinin de NADPH oksidaz ile bağlantısı vardır. Çünkü bu enzim süperoksitlerin  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmesinde oldukça etkin bir role sahiptir. Aynı araştırmacılar, bu iddialarını DPI yoluyla NADPH oksidaz enzimini bloke ederek göstermişlerdir. Çalışmamızda da kullanmış olduğumuz DPI, NADPH oksidaz enzimini bloke ederek  $H_2O_2$  birikimini azaltmış ve bu azalmayla birlikte poliamin seviyelerinde de önemli düşüşler görülmüştür. Dahası poliamin yıkımından sorumlu olan *DAO* ve *PAO* ifade seviyeleri yükselmiştir. Andronis vd., (2014), DPI kullandıklarında  $H_2O_2$  miktarında azalma gözlemledikleri halde, süperoksit radikalinde de önemli bir artış tespit etmişlerdir. Kubis vd., (2003) yaptığı bir çalışmada, kuraklığa maruz kalmış arpa bitkilerinde DAO aktivitesi yoluyla oluşan  $H_2O_2$ 'in poliamin metabolizmasını düzenlediğini ileri sürmüşlerdir. Poliamin oksidasyonunun  $H_2O_2$  aracılığı ile bir sinyal şelalesi başlattığı modeli uzun süredir kabul gören bir düşüncedir. Çünkü



$H_2O_2$ , poliamin oksidasyonunun direk bir ürünüdür (Moschou vd., 2008b). Özetle literatür bilgileri, poliamin metabolizmasının DAO ve PAO enzimleri etkinliğinden köken alan  $H_2O_2$  tarafından düzenlenebileceğini belirtir. Çalışma bulgularımız bu bahsi geçen çalışmalarla çelişkili gibi görünmektedir. Çünkü çalışmamızda dıştan uygulanan  $H_2O_2$  DAO ve PAO genleri ifade düzeylerinin azalmasına ve buna karşın poliamin sentez genlerine ait (*ADC*, *AIH*, *SAMDC*) ifade seviyelerinin artmasına neden olmuştur. Öyle ise çalışma bulgularımıza göre  $H_2O_2$  poliamin metabolizması üzerinde pozitif düzenleme yeteneğine sahiptir denilebilir. Buna karşın çalışmalarımızda elde ettiğimiz veriler sadece poliamin oksidasyonu kaynaklı  $H_2O_2$ 'in değil de, dışarıdan uygulanan ya da NADPH oksidaz kaynaklı  $H_2O_2$ 'in de poliamin sinyalizasyonuna etki ettiğine işaret etmektedir. Bununla beraber son zamanlarda yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgilere göre; bu sinyalizasyon şelalesine “diğer ROS üyeleri de en az poliamin oksidasyonu kökenli  $H_2O_2$  kadar katkı sağlar” şeklinde bazı öneriler mevcuttur (Zepeda-Jazo vd., 2011; Velarde-Buendia vd., 2012). Ayrıca, çalışmamızda poliamin sentezini uyaran bir sinyal molekülü olarak kabul ettiğimiz  $H_2O_2$  uygulaması, NADPH oksidaz aktivitesini ve gen ifade seviyelerini de arttırmıştır. Bu durum NADPH oksidaz etkinliği sonrasında üretilen  $H_2O_2$ 'nin de poliamin birikimine olumlu etki yaptığının bir göstergesi olabilir.

Çalışmamızda içsel ABA seviyesinin düzenlenmesinde görev alan *AAOX* geni ifadesi ve ABA içeriği incelenmiştir. Kuraklık stresi altında içsel ABA seviyesinin ve ABA sentezlenmesinden sorumlu *AAOX* geni ifade seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Lu vd., 2013). Ayrıca kuraklığa toleranslı bir üzüm bitkisi çeşidinde PAO aktivitesinin hassas olan çeşide göre daha fazla arttığı ve ABA sinyalizasyon yolunun; poliaminler, DAO, PAO aktiviteleriyle birlikte  $H_2O_2$  üretimini düzenlediğini belirtilmiştir (Toumi vd., 2010). Çalışmamızda  $H_2O_2$  içeriği, ABA içeriği ve *AAOX* geni ifade seviyesi, en fazla olarak kontrol grubunda görülmüştür. Buna karşın, çalışmamızda önemli içsel  $H_2O_2$  kaynaklarından birisi olarak kabul edilen NADPH oksidaz etkinliği ve geni ifadesinin en fazla olduğu durum, kontrol grubunda değil de  $H_2O_2$  grubunda tespit edilmiştir. Soya fasülyesi tohumları ve tohum zarflarında sperminin, osmotik stres toleransını antioksidanlar ve ABA değişiklikleri aracılığıyla gerçekleştirdiği yatıştırıcı etkileri, yakın zamanda rapor edilmiştir (Radhakrishnan ve Lee, 2013). Bu rapora göre, dışarıdan spermin uygulaması lipid peroksidasyonunu azaltarak, toplam polifenol içeriğini yükselterek ve antioksidan enzimleri (CAT ve SOD gibi) etkinleştirerek PEG teşvikli kuraklık stresi etkilerini yatıştırmıştır. Aynı zamanda içsel ABA seviyesi PEG uygulamasında tohum

zarflarında yüksek çıkmıştır. Yine aynı rapora göre; osmotik strese maruz kalmış tohum zarflarındaki ABA sentezi dışarıdan spermin uygulaması ile bloke edilmiştir. Bu raporu destekler şekilde çalışmamızda da  $H_2O_2$  uygulaması ile yükselen poliamin seviyesinin hem stres etkilerini yatıştırdığı hem de ABA seviyesini azalttığı ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda söz konusu  $H_2O_2$  uygulama grubuna ABA sentezinde kilit bir rol oynayan *AAOX* geni ifade seviyeleri de kontrol grubuna göre düşük çıkmıştır. Bu durum dıştan  $H_2O_2$  uygulamasının poliamin miktarını arttırması ve lipid peroksidasyonunu azaltmasıyla da açıklanabilir. Nitekim, Çalışkan (2014), doktora tezinde dışarıdan gerçekleştirilen poliamin uygulamalarının SOD, CAT, APX, GR gibi antioksidan sistem enzimelerini kontrol grubuna göre daha fazla aktive ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunda ve bitki su durumunda bir iyileşme de belirtilmiştir. Bu şekilde harekete geçen antioksidan sistemin, -çalışmamızda da olduğu gibi- stres etkisini yatıştırmayı sonrasında, stres sinyali olarak kabul edilen ABA seviyesinin ve *AAOX* geni ifade seviyelerinin azaldığı kabul edilebilir. Dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$  ve yine dışarıdan uygulanan poliaminlerin antioksidan sistem üzerine gerçekleştirdiği etkilerin benzer şekilde iyileştirici olması gerçekten de ilgi çekici bir durumdur. Yukarıda da belirtildiği gibi, çalışmamızdaki ABA seviyesindeki azalışı,  $H_2O_2$ 'nin hem poliamin seviyeleri hem de antioksidan sistem üzerindeki teşvik edici etkisine bağlamak mümkün olabilir. Nitekim Radhakrishnan ve Lee (2013), dışarıdan uygulanan poliaminlerin kuraklık stresi koşullarında ABA seviyesini azalttığını bildirmişlerdir. Bununla beraber çalışmamızda,  $H_2O_2$  uygulaması, stres indikatörü olarak tanımlanan ABA miktarını ve *AAOX* ifade seviyesini kontrol grubuna göre düşürmüştür. Buna karşın literatür bilgilerine göre ABA artışı, poliamin artışını teşvik eder (Alcazar vd., 2006a; Hussain vd., 2011). Çalışmamızdan elde edilen bulgular ile literatürdeki mevcut bilgiler arasında bir tezatlık vardır. Mevcut çalışmamızda,  $H_2O_2$  uygulaması sonucunda ABA miktarının ve *AAOX* geni ifade seviyesinin kontrol grubuna göre azalması,  $H_2O_2$  uygulamasının daha önce tespit ettiğimiz iyileştirici konsantrasyonda kullanılmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca  $H_2O_2$  grubundaki poliamin birikiminin kuraklık stresine karşı toleransı arttırdığı ve buna bağlı olarak da ABA seviyesinin azalmasına neden olduğu düşünülebilir.

Diamin oksidaz, putresini ve kadeverini ayrıca daha düşük oranda da spermidin ve spermini okside eder. Poliamin oksidaz ise diamin oksidazın aksine, sadece spermidin ve spermine ilgi duyarken putresine karşı tamamen ilgisizdir (Angelini vd., 2010). Diamin oksidazın putresin üzerindeki katabolik etkisi; prolin,  $H_2O_2$  ve amonyak oluşumuyla

sonuçlanır (Cohen, 1998). Aynı zamanda poliamin oksidaz, poliaminlerin terminal oksidasyonunu gerçekleştirir. Oksidasyon sonucunda spermidin ve sperminden; prolin, 1-(3-aminopropil) prolinum, 1,3-diaminopropan ve  $H_2O_2$  oluşur. Hücre içi poliamin oksidazlar ise poliaminleri birbirlerine dönüştürürken yine  $H_2O_2$  üretimi meydana gelir. İlginçtir ki, poliamin oksidazlar spermini spermidine ya da spermidini putresine dönüştürürken poliamin biyosentez yolunu tersten yürütürler (Tavloraki vd., 2006; Kamada-Nobusada vd., 2008; Moschou vd., 2008c; Toumi vd., 2010; Fincato vd., 2012). Bu literatür verilerinden yola çıkarak çalışmamızda içsel prolin miktarı ve prolin metabolizmasının düzenlenmesinde görev yapan *P5CS* (prolin 5 karboksilat sentaz) ve *PRODH* (prolin dehidrogenaz/oksidaz) genleri ekspresyon seviyesinde incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında kontrol (PEG),  $H_2O_2$  ve DPI gruplarında hem *P5CS* hem de *PRODH* gen ifadeleri, prolin içeriği ile uyum içerisindedir. Dışarıdan  $H_2O_2$  uygulanan deney grubunda, *P5CS* ifadesi artarken *PRODH* ifadesinin azalması, doğal olarak içsel prolin seviyesinde önemli bir artışla sonuçlanmıştır. Yukarıda belirtilen çalışmalara göre *DAO* ve *PAO* etkinlikleri sonucunda, poliaminlerden meydana gelen yıkım ürünlerinden birisi de proлиндur. Bu durum çalışma verilerimize göre tezatlık teşkil etmektedir. Çünkü *DAO* ve *PAO* aktiviteleri,  $H_2O_2$  grubunda oldukça düşük çıkmaktadır. Bu durumun prolin miktarına olumsuz olarak etki etmesi ve seviyesinin azalmasına neden olması beklenir. Bununla birlikte dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$  molekülünün içsel prolin seviyesini arttırdığı daha önce rapor edilmiştir (Terzi vd., 2014). Çalışmamızda, prolin seviyesini düzenleyen metabolizma genlerinin (*P5CS* ve *PRODH*) transkripsiyon seviyesinde incelenmesi bu durumu moleküler anlamda desteklemektedir. Yine sonuçlarımızı destekleyen diğer bulgumuz ise, DPI grubunda içsel prolin seviyesi ciddi oranda düşük çıkmasıdır. Yine aynı grupta *DAO* ve *PAO* genlerine ait ifade seviyeleri en yüksek seviyede bulunmuştur. Çalışmamızda, katabolik poliamin enzimleri aktivitesi (*DAO* ve *PAO*) sonucunda prolin seviyesinin düşük olması, açıklanması gereken bir durumdur. Çünkü literatür bilgisi, poliamin yıkımı sonucunda prolin açığa çıktığından bahseder (Gill ve Tuteja, 2010; Gupta vd., 2013). Buna karşın prolin birikimin esas kaynağının *P5CS* aktivitesi olduğu unutulmamalıdır. Dahası prolinin oksidasyonundan sorumlu olan *PRODH* aktivitesindeki azalış da prolin birikimine dolaylı olarak olumlu katkılar sağlar. Bununla birlikte DPI'in  $H_2O_2$  sentez inhibitörü olduğu unutulmamalıdır. Çünkü DPI uygulamasında her ne kadar *DAO* ve *PAO* ifade seviyeleri artsa da, esas prolin uyarıcısı olarak kabul ettiğimiz NADPH oksidaz kaynaklı  $H_2O_2$  seviyeleri düşüktür ve bu düşmenin sonucu olarak prolin sentezi

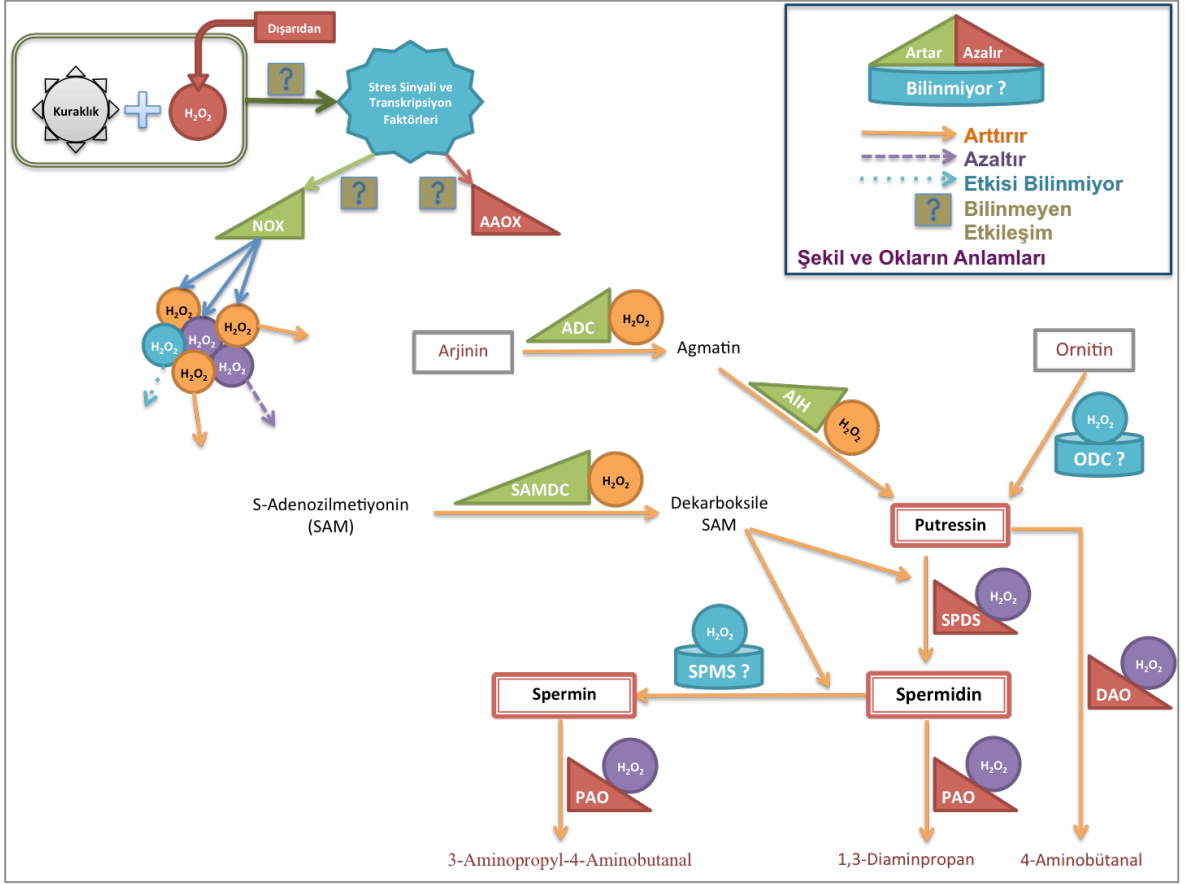
düşük seviyede devam etmiştir. Ayrıca DPI grubunda *PRODH* genine ait transkriplerin  $H_2O_2$  grubundan yüksek olması daha fazla *PRODH* enziminin bulunmasına ve daha fazla prolinin oksidasyon sonucunda yıkılmasına neden olacağı unutulmamalıdır. Ayrıca Shi vd., (2013b) yaptıkları bir çalışmada, dışarıdan poliamin uyguladıkları bermuda çimi bitkilerini kuraklık stresine maruz bıraktıklarında önemli derecede prolin artışı gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak “DAO ve PAO etkinlikleri sonucunda  $H_2O_2$  ve prolin meydana gelse de, başka bir kaynak tarafından (dıştan  $H_2O_2$  uygulaması ve NADPH oksidaz aktivitesi gibi) üretilen  $H_2O_2$ , prolin metabolizmasına sentez yönünden (*P5CS* transkriptlerinin artmasına, *PRODH* transkriptlerinin azalmasına neden olması) daha önemli katkı yapmaktadır” denilebilir. Buna ek olarak, poliamin ve prolin içeriklerinin dıştan  $H_2O_2$  uygulaması ile artması ve aynı zamanda poliamin ve prolin sentezinde görev alan genlerin de ifade düzeylerinde artışlar göstermesi, “dışarıdan  $H_2O_2$  uygulaması, poliamin ve prolin içeriğini gen seviyesinde düzenler” fikrini desteklemektedir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm verilerin ışığında;  $H_2O_2$  uygulaması (10 mM), poliamin sentez genlerinin ifade seviyelerinin artmasına sebep olmuştur. Bir ihtimal bu teşvik edici etkiyi ABA ile etkileşime geçerek ve NADPH oksidaz geni ve enzimi aktivitesini teşvik ederek gerçekleştirmiş olabilir.  $H_2O_2$ 'nin iyiletirici etkisi *AAOX* geni ifade seviyesini ve bu genin kodladığı enzimin ürünü olan ABA miktarını düşürmüştür. Literatür bilgisine göre ABA artışı, poliamin yıkımını teşvik etmekte ve bu yıkım sonucunda  $H_2O_2$  meydana gelmektedir (Toumi vd., 2010). Çalışmamızda uygulanan 10 mM konsantrasyona sahip  $H_2O_2$ , ABA seviyesinin ve poliamin yıkım enzimlerini kodlayan *DAO* ve *PAO* gen ifade seviyelerini düşürmüştür. Bunun sonucunda ise stres etkilerinin yatıştırıldığı ve bu yatışmaya bağlı olarak hem *AAOX* geni ifade düzeyi hem de ABA seviyesi azalmıştır. Bu durum  $H_2O_2$  ilişkili poliamin metabolizmasında prolin etkileşimlerine ek olarak bir ABA etkileşiminde olduğunu gösteriyor olabilir. Tartışmanın tümüne bakıldığında, araştırmacılar  $H_2O_2$ 'nin daha çok poliamin yıkımıyla ilişkili olduğunu ve poliaminlerin yıkımıyla meydana gelen  $H_2O_2$ 'in metabolizma üzerinde stres yatıştırıcı etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu ifade doğru olabilir. Fakat çalışma verilerimize göre strese yanıt metabolizmasında ilgi çekici roller sergileyen  $H_2O_2$  molekülü, poliamin sentezinde tek başına değil de oldukça karmaşık ve birçok bileşenin de içinde olduğu (ABA ve prolin gibi) bir sinyalizasyon sisteminin bir üyesidir. Çalışma bulgularının genel bir özeti Tablo 7’de sunulmuştur.

Tablo 7. Çalışma bulgularının genel bir özeti (↑: Kontrol grubuna göre artmış, ↓: Kontrol grubuna göre azalmış, ⊙: Kontrol grubuyla istatistiksel olarak bir fark yok).

		Deney Grupları					
		Kontrol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	DPI	DFMA+DFMO	DFMA+DFMO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Parametreler	Su Pot.	-1,19±0,11	-0,96±0,07 ↑	-1,59±0,09 ↓	-1,55±0,09 ↓	-1,32±0,08 ⊙	
	MDA	62,13±0,47	40,79±0,99 ↓	69,68±0,47 ↑	72,15±0,73 ↑	43,26±0,58 ↓	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,2±0,1	4,8±0,11 ↓	4,52±0,14 ↓	6,7±0,1 ↑	8,78±0,1 ↑	
	NOX Ak.	0,18±0,0015	0,2±0,01 ↑	0,13±0,0017 ↓	0,11±0,005 ↓	0,17±0,011 ⊙	
	CAT	5420±65	6836±180 ↑	5155±118 ↓	4034±138 ↓	3535±40 ↓	
	POD	75,83±1,85	97,51±1,88 ↑	69,66±1,53 ↓	66,31±3,3 ↓	69,66±1,58 ↓	
	SOD	1,56±0,11	1,1±0,1 ↓	0,95±0,002 ↓	1,47±0,06 ⊙	1,45±0,05 ⊙	
	Prolin	0,62±0,03	1,03±0,03 ↑	0,49±0,05 ↓	0,86±0,01 ↑	0,59±0,002 ⊙	
	ABA	808±20	763±9 ↓	661±22 ↓	260±5 ↓	509±37 ↓	
	<b>Poliaminler</b>						
	Putresin	320±16	353±14 ↑	168±7 ↓	178±22 ↓	260±25 ↓	
	Spermidin	19,5±2,07	16,7±0,1 ↓	12,16±2,1 ↓	5,83±1,14 ↓	17,27±1,31 ↓	
	Spermin	61,52±4,26	82,9±6,1 ↑	41,7±3,56 ↓	34,31±4,91 ↓	48,49±5,22 ↓	
	<b>Genler</b>						
<i>ADC</i>	1±0,03	1,99±0,08 ↑	1,64±0,05 ↑	0,73±0,08 ↓	1,14±0,08 ↑		
<i>AIH</i>	1±0,03	1,41±0,06 ↑	1,28±0,03 ↑	0,89±0,01 ↓	1,18±0,05 ↑		
<i>SAMDC</i>	1±0,11	1,32±0,09 ↑	0,95±0,12 ⊙	0,91±0,04 ⊙	0,86±0,01 ⊙		
<i>SPDS</i>	1±0,08	0,55±0,05 ↓	0,31±0,05 ↓	0,17±0,01 ↓	0,31±0,02 ↓		
<i>DAO</i>	1±0,04	0,67±0,03 ↓	1,15±0,04 ↑	0,55±0,03 ↓	0,55±0,03 ↓		
<i>PAO</i>	1±0,03	0,89±0,06 ↓	1,47±0,15 ↑	1,1±0,12 ⊙	0,79±0,003 ↓		
<i>NOX</i>	1±0,12	1,4±0,05 ↑	0,75±0,01 ↓	0,73±0,06 ↓	1,36±0,12 ↑		
<i>AAOX</i>	1±0,02	0,86±0,02 ↓	0,66±0,05 ↓	0,70±0,02 ↓	0,66±0,02 ↓		
<i>P5CS</i>	1±0,09	1,7±0,04 ↑	1,5±0,08 ↑	1,22±0,07 ↑	0,48±0,05 ↓		
<i>PRODH</i>	1±0,07	0,49±0,03 ↓	0,63±0,08 ↓	0,37±0,01 ↓	0,82±0,02 ↓		

Çalışmamızın amacı,  $H_2O_2$ -poliamin ilişkisini, literatür bilgilerinin aksine, sadece yıkım üzerinden değil de bir bütün olarak poliamin metabolizması üzerinden incelemektir. Çalışmamız bu yönüyle diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Bulgularımıza göre önerdiğimiz mekanizma modelini kısaca özetlemek gerekirse; kuraklık koşullarında dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$ , büyük ihtimalle hem *NOX* geninin ifadesini hem de enzim aktivitesini teşvik etmiştir. Bu etkinlik sonrasında meydana gelen  $H_2O_2$  doğrudan ya da dolaylı diğer olası metabolik yollarla poliamin sentez genlerinden olan *ADC*, *AIH* ve *SAMDC'in* ifadesini arttırmıştır. Bu ifade düzeyindeki artışın bir sonucu olarak içsel poliamin miktarında artış gerçekleşmiştir. Ek olarak,  $H_2O_2$ 'nin doğrudan ya da dolaylı bir şekilde poliamin yıkım genlerinin ifade edilmesini baskılayarak poliamin oksidasyonunu gerçekleştiren enzimlerin üretilmesini azalttığı düşünülmektedir.  $H_2O_2$ 'nin sentez poliamin genlerini teşvik edici ve aynı zamanda poliamin yıkım genlerini de baskılayıcı özelliği sayesinde;  $H_2O_2$  hücrede poliamin metabolizmasının pozitif yönde düzenlenmesinde önemli bir rol üstlendiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere dayanarak olası  $H_2O_2$ -poliamin ilişkisini gösteren bir model şema çizilmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. Kuraklık stresi koşullarında olası  $H_2O_2$  ilişkili poliamin metabolizması (Demiralay, 2015).

## 5. SONUÇLAR

Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar kısaca şu şekilde özetlenebilir.

1. Deney düzeneğinin tasarımına göre, poliamin sentez inhibitörleri olan DFMA+DFMO için etkin konsantrasyon düzeyinin 5  $\mu$ M olduğu belirlendi.
2. Dışarıdan uygulanan 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, yukarıda belirtilen stres parametreleri analiz edildiğinde, iyileştirici etki yaptığı teyit edildi.
3. Dışarıdan gerçekleştirilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması NADPH oksidaz aktivitesinin ve bu enzimi kodlayan gen ifadesinin artmasına sebep olduğu gözlemlendi.
4. Literatür bilgisine göre kuraklık stresinde artış gösteren ABA miktarı ve ABA artışına sebep olan *AAOX* geni ifade seviyesinin analizi sonucunda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının kuraklık stresi altında bahsi geçen bu parametlerin azalmasına ve kuraklık stresine karşı yatıştırıcı etki yaptığı tespit edildi.
5. İçsel poliamin seviyeleri incelendiğinde, kuraklık stresi altında dışarıdan uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'tin poliamin miktarında önemli artışlara sebep olduğu kaydedildi.
6. Poliamin sentezinde görev alan genlere ait ifade seviyelerinin, dışarıdan gerçekleştirilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile önemli artışlar gösterdiği saptandı.
7. Poliamin yıkımında görevli olan oksidaz genleri (*DAO* ve *PAO* genleri) incelendiğinde kuraklık stresinde artış gösterirken, harici H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile önemli azalmalar gösterdiği ve kuraklık stresine DPI uygulaması eklendiğinde söz konusu yıkım genlerinin en yüksek seviyede ifade edildiği belirlendi.
8. Poliamin sentez inhibitörleri olarak bilinen DFMA ve DFMO bileşiklerinin kuraklıkla kombine bir şekilde uygulandığında poliamin miktarının kontrol (sadece PEG) grubuna göre azalmalar gösterdiği anlaşıldı. Bu sonuçlar poliamin sentez genleri ifade seviyeleri de incelenerek desteklendi.
9. Poliamin seviyeleri ve metabolizma genlerine ait ifade seviyeleri dikkate alındığında; kuraklık stresi altında DFMA ve DFMO bileşiklerinin birlikte uygulamasının, poliamin sentezini önemli derecede bloke ettiği buna karşın bu inhibitörlerin yine kuraklık stresinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte uygulanması durumunda ise hem transkripsiyon seviyesinde hem de poliamin miktarında iyileştirici etki yaptığı tespit edildi.
10. Prolin metabolizmasında görev alan enzimleri (*P5CS* ve *PRODH*) kodlayan genlere ait ekspresyon seviyelerinin incelenmesiyle; kuraklık stresi koşullarında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



uygulaması ile prolin seviyesinin ve *P5CS* genine ait transkriptlerin önemli ölçüde artış gösterdiği; buna karşın *PRODH* geni ifade seviyelerinin ise dikkat çekici bir şekilde azaldığı kaydedildi.

11. Çalışma sonuçlarına bir bütün olarak bakıldığında  $H_2O_2$  ve poliamin arasındaki ilişki hakkındaki varılan düşünceler şu şekilde sıralanabilir.
  - a. Poliamin metabolizmasının öncelikle  $H_2O_2$  seviyesi ile doğrudan ilişkili olduğu ve dahası, bu ilişkinin poliamin sentezi üzerinde teşvik edici, yıkımı üzerinde ise engelleyici bir etkiye sahip olabileceği sonucuna varıldı.
  - b. Literatürde daha önce de kaydedilmiş ABA- $H_2O_2$  ilişkisinin kabul edilenden daha farklı bir etkileşim içerisinde olabileceği ve poliamin metabolizması üzerinde, poliamin yıkımından ziyade poliamin birikimi üzerinde etkili olabileceği kabul edildi.
  - c. Son olarak, kuraklık stresi koşullarında oldukça önemli bir molekül olarak kabul ettiğimiz  $H_2O_2$ , bir sinyal molekülü gibi davranarak poliamin sentezini ve içsel poliamin miktarını henüz tam olarak anlayamamış olası mekanizmalarla gerçekleştirdiği fikri kabul edildi.

## 6. ÖNERİLER

Günümüzün ve geleceğin dünyasında en önemli insani ihtiyacın beslenme olacağı öngörülmektedir. Dahası gıda gereksinimin getirdiği bireysel ve toplumsal baskılar, ülkeleri ve siyasi rejimleri tehdit eder niteliktedir. Şimdiden başlayan bu sıkıntılara enerji gereksinimleri de eklendiğinde durum daha da endişe verici bir hal almaktadır. Dahası bilim insanları bitkisel kaynakları, sadece besin ihtiyacının karşılanması amacıyla değil enerji gereksinimlerini gidermek için de kullanmak arzusundadırlar. Günümüzde bile insanlara beslenme açısından yetmeyen bitkisel kaynakların artan insan nüfusunun ve çeşitlenen (enerji, giyim, barınma) gereksinimler karşısında nasıl arttırılabileceği düşünülmektedir. Çünkü ekilebilir ve dikilebilir alanların genişleme hızı kentsel alanların genişleme hızından daha yavaştır. Bu nedenle birim metrekare başına düşen verim miktarının geçmişe göre arttırılması gerekmektedir. Bir ihtimal bu sayede besin eksikliği kaynaklı olası hastalıklar, savaşlar ve açlık gibi küresel ölçekli felaket endişelerinin önüne geçilmesi sağlanabilir.

Poliaminlerin büyüme, gelişme ve stres toleransı gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev aldığı tahmin edilen ya da bilinen durumlardır. Bununla beraber poliaminlerin bitki stres toleransı üzerindeki etkileşimleri yeni yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Putresin, spermidin ve sperminin sentezinin ve sentezinde görev alan ara moleküllerin, strese karşı koruyucu rolüne ait moleküler mekanizmaların aydınlatılması için çok fazla çaba gereklidir. Günümüze gelene kadar poliaminler hakkında yapılan çalışmalar ileriye yönelik poliamin-stres ilişkisi ve stres karşısında ürün veriminin arttırılması için bir dayanak noktası oluşturmuştur. Mikroarray, transkriptom, metabolomik ve tersine genetik yaklaşımları gibi moleküler çalışmalardan elde edilen veriler, poliamin biyosentezi ilişkili abiyotik stres toleransını anlamaya yardımcı olabilir. Dahası poliamin biyosentezine ait enzimlerin üç boyutlu yapısal çalışmalarından gelecek bilgiler de bitki veriminin arttırılmasına yardımcı olabilecektir.

Çalışmamızda poliamin metabolizması gen seviyesinde incelenmiştir. Aynı zamanda poliamin metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen bazı parametreler de incelenmiştir. Bunun yanında poliamin sentezi konusu oldukça karmaşık bir yapıdadır ve bu konuda katedilmesi gereken daha çok mesafe vardır. Özellikle poliamin metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen ABA, prolin ve NADPH oksidaz metabolizmaları daha ayrıntılı ve belki de transkriptomik ya da mikroarray seviyesinde incelenmelidir. Dahası bu incelenmelerle

yetinilmemeli, hem poliamin metabolizmasına ait hem de poliaminlerle ilişkili olduğu tarafımızdan desteklenen diğer metabolizma genlerine (*AAOX*, *NOX* vb.) genetik seviyede müdahale edilerek yani mutant bitkiler geliştirilerek daha fazla yol alınmalıdır. Son yıllardaki çalışmalarla önemi daha iyi kavranan, miRNA ve transkripsiyon faktörlerinin incelenmesi de söz konusu poliamin metabolizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı da bu önerilere eklenebilir. Son olarak, çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerden yola çıkılarak gerçekleştirilecek sonraki çalışmalarla poliamin metabolizması ve ilişkili olduğu sinyalizasyon şelalesi (özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkinliği) daha iyi aydınlatılmış olacaktır. Belki bu sayede bitki veriminin arttırılmasına yönelik yeniliklerin geliştirilmesine yardımcı olunabilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abass, M.S. ve Mohamed, H.I., 2011. Alleviation of Adverse Effects of Drought Stress on Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Exogenous Application of Hydrogen Peroxide, Bangladesh Journal of Botany, 40, 75-83.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H.U., Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 273-286.
- Afzal, I., Munir, F., Ayub, C.M., Basra, S.M.A., Hameed, A. ve Nawaz, A., 2009. Changes in Antioxidant Enzymes, Germination Capacity and Vigour of Tomato Seeds in Response of Priming with Polyamines, Seed Science and Technology, 37, 765-70.
- 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.
- Alcazar, R., Garcia-Martinez, J.L., Cuevas, J.C., Tiburcio, A.F. ve Altabella, T., 2005. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis Induces dwarfism and Late-Fowering Through GA Deficiency, The Plant Journal, 43, 425-436.
- Alcazar, R., Cuevas, J.C., Patron, M., Altabella, T. ve Tiburcio, A.F., 2006a. Abscisic Acid Modulates Polyamine Metabolism Under Water Stress in Arabidopsis thaliana, Physiologia Plantarum, 128, 448-455
- Alcazar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A.F., Altabella, T., 2006b. Involvement of Polyamines in Plant Response to Abiotic Stress, Biotechnology Letters, 28, 1867-1876.
- Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolitto, C., Reymond, M., Koncz, C., Carasso, P. ve Tiburcio, A.F., 2010a. Polyamines: Molecules With Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance, Planta, 231, 1237-1249.
- Alcazar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrian, M., Tiburcio, A.F. ve Altabella, T., 2010b. Putrescine Accumulation Confers Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis Plants Overexpressing the Homologous Arginine Decarboxylase 2 Gene, Plant Physiology and Biochemistry, 48, 547-552.
- Alcazar, R., Bitrian, M., Bartels, D., Koncz, C., Altabella, T. ve Tiburcio, A.F., 2011. Polyamine Metabolic Canalization in Response to Drought Stress in Arabidopsis and The Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*, Plant Signaling and Behavior, 6, 243-250.
- Alet, A.I., Sanchez, D.H., Cuevas, J.C., Marina, M., Carrasco, P., Altabella, T., Tiburcio, A.F. ve Ruiz, O.A., 2012. New Insights into The Role of Spermine in Arabidopsis thaliana Under Long Term Salt Stress, Plant Science, 182, 94-100.

- Alexandratos N., ve Bruinsma J., 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 revision , Yayın No: 12-13, ESA-FAO, Roma.
- Ali, R.M., 2000. Role of Putrescine in Salt Tolerance of *Atropa Belladonna* Plant, *Plant Science*, 152, 173-9.
- Altabella, T., Tiburcio, A.F. ve Ferrando, A., 2009. Plant with Resistance to Low Temperature and Method of Production Thereof. Spanish patent application, Yayın No: WO/2010/004070, Barcelona.
- Andronis, A.E., Moschou, P.N., Toumi, I. ve Roubelakis-Angelakis, K.A., 2014. Peroxisomal Polyamine Oxidase and NADPH-Oxidase Cross-Talk for ROS Homeostasis which Affects Respiration Rate in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers In Plant Science*, 5, 132, 39-48.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., ve Tisi, A., 2010. Plant Amine Oxidases “on The Move”: an Update. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 560-564.
- Arora, A. ve Mohan, J., 2002. Expression of Dwarfing Genes Under Nitrogen and Moisture Stress in Wheat (*Triticum* spp): Dry Matter Partitioning, Root Growth and Leaf Nitrogen, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186, 111-118.
- 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.
- Bachrach, U., 2010. The Early History of Polyamine Research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 7, 490-495.
- Bagni, N. ve Tassoni, A., 2001, Biosynthesis, Oxidation and Conjugation of Aliphatic Polyamines in Higher Plants, *Amino Acids*, 20, 301-317.
- 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 and 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.
- Bidwell, R.G.S., 1974. *Plant Physiology*, Giles, McMillan Co., New York.
- Bitrian, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A.F. ve Alcazar, R., 2012. Polyamines under Abiotic Stress: Metabolic Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants, *Metabolites*, 2, 3, 516-528.

- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, , 1- 223, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Bonavia, D., 2013. *Maize: Origin, Domestication, and its Role in the Development of Culture*, ISBN: 9781107023031, Cambridge University Press, New York.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. ve Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and Environmental Challenges: Recent Development. *Plant Science*, 140, 103-125.
- 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., 1997. Plants Responses to Water Deficit, *Trends in Plants Science*, 2, 48-54.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. ve Neill, S.J., 2006. ABA-Induced NO Generation and Stomatal Closure in Arabidopsis are Dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Synthesis, *The Plant Journal*, 45, 113-122.
- Cakmak, I. ve Marschner, H., 1988. Zinc-Dependent Changes in ESR Signals, NADPH Oxidase and Plasma Membrane Pemeability in Cotton Roots, *Physiologia Plantarum*, 73, 182-186.
- Campbell, M.K., 1991. *Biochemistry*, Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, Fort Worth, USA.
- Capell, T., Bassie L. ve Christou P., 2004. Modulation of The Polyamine Biosynthetic Pathway in Transgenic Rice Confers Tolerance to Drought Stress, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 101, 9909–9914.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- Childs, A. C., Mehta, D. J., and Gerner, E. W., 2003. Polyamine-dependent Gene Expression, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1394-1406.
- Cohen, S.S., 1998. *A Guide to The Polyamines*, Oxford University Press, ISBN-13: 978-0195110647, New York.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. ve Tavladoraki, P., 2006a. Functions of Amine Oxidases in Plant Development and Defence, *Trends in Plant Science*, 11, 80-88.
- Cona, A., Rea, G., Botta, M., Corelli, F., Federico, R., ve Angelini, R., 2006b. Flavin-Containing Polyamine Oxidase is A Hydrogen Peroxide Source in The Oxidative Response to The Protein Phosphatase Inhibitor Cantharidin in *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2277–2289.
- Conforti, P., 2011. *Looking Ahead in World Food and Agriculture: Perspectives to 2050*, ISBN 978-92-5-106903-5, FAO, Roma

- Cömertpay, G., 2008. Yerel Mısır Popülasyonlarının Morfolojik ve DNA Moleküler İşaretleyicilerinden SSR Tekniği İle Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Cuevas, J.C., Lopez-Cobollo, R., Alcazar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F. ve Ferrando, A., 2008. Putrescine is Involved in Arabidopsis Freezing Tolerance and Cold Acclimation by Regulating ABA Levels in Response to Low Temperature, *Plant Physiology* 148, 1094-1105.
- Cuevas, J.C., Lopez-Cobollo, R., Alcazar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F. ve Ferrando, A., 2009. Putrescine as a Signal to Modulate The Indispensable ABA Increase Under Cold Stress, *Plant Signaling and Behavior*, 4, 219-220.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. ve Abrams, S.R., 2010. Abscisic Acid: Emergence of A Core Signaling Network, *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651-679.
- Çırak, C. ve Esenal, E., 2006. Soyada Kuraklık Stresi, *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21, 231- 237.
- Çalışkan, N., 2014. Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde Poliamin Ön Muamelesinin Yaprak Kıvrılması, Antioksidan Sistem ve Fotosentez Üzerindeki Etkileri, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- D'Agostino, L., Di Pietro, M., ve Di Luccia, A. 2005. Nuclear Aggregates of Polyamines are Supramolecular Structures That Play a Crucial Role in Genomic DNA Protection and Conformation, *FEBS Journal*, 272, 3777-3787.
- Demiralay, M., Sağlam, A. ve Kadioğlu, A., 2013. Salicylic Scid Delays Leaf Rolling by İnducing Antioxidant Enzymes and Modulating Osmoprotectant Content in *Ctenanthe Setosa* Under Osmotic Stress, *Turkish Journal of Biology*, 37, 1-11.
- Do, P.T., Drechsel, O., Heyer, A.G., Hinch, D.K. ve Zuther, E., 2014. Changes in Free Polyamine Levels, Expression of Polyamine Biosynthesis Genes and Performance of Rice Cultivars Under Salt Stress: A Comparison with Responses to Drought, *Frontiers in Plant Science*, 5, 182.
- Dickinson, B.C. ve Chang, C.J., 2011. Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species in Signaling or Stress Responses, *Nature Chemical Biology*, 7, 8, 504-511.
- Dikalov, S., Nazarewicz, R., Panov, A., Harrison, D.G. ve Dikalova, A., 2011. Crosstalk Between Mitochondrial ROS and NADPH Oxidases in Cardiovascular and Degenerative Diseases: Application of Mitochondria-Targeted Antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 85-86.
- Elstner, E.F., 1987. Metabolism of Activated Oxygen Species, In: *The Biochemistry of Plants*, D.D. Davies, Ed., Academic Press, USA, 253-315.

- Erdei, L., Szegletes, Z., Barabas, K. ve Pestenacz, A., 1996. Responses in Polyamine Under Osmotic and Salt Stress in Sorghum and Maize Seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 147, 599-603.
- FAO, 1992. Maize in human nutrition, Rome. <http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E00.htm>
- FAO, 2013. FAO Statistical Yearbook, ISBN: 978-92-5-107396-4, Roma.
- Farooq, M., Wahid, A. ve Lee, D.J., 2009. Exogenously Applied Polyamines Increase Drought Tolerance of Rice by Improving Leaf Water Status, Photosynthesis and Membrane Properties, *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 5, 937-945.
- Fincato, P., Moschou, P.N., Spedaletti, V., Tavazza, R., Angelini, R., Federico, R., vd., 2011. Functional Diversity Inside the Arabidopsis Polyamine Oxidase Gene Family, *Journal of Experimental Botany*, 62, 1155-1168.
- Fincato, P., Moschou, P.N., Ahou, A., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Federico, R., vd., 2012. The Members of Arabidopsis thaliana PAO Gene Family Exhibit Distinct Tissue and Organ-Specific Expression Pattern During Seedling Growth and Flower Development, *Amino Acids*, 42, 831-841.
- Flores, H.E. ve Galston, A.W., 1982. Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography, *Plant Physiology*, 69,3, 701-6.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications, *Antioxidants and Redox Signaling*, 11, 861-905.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247, 1-11.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2011. ABA-Mediated Transcriptional Regulation in Response to Osmotic Stress in Plants, *Journal of Plant Research*, 124, 509-525.
- Galston, A.W. ve Kaur-Sawhney, R., 1990 Polyamines in Plant Physiology. *Plant Physiology* 94, 406-410.
- Galston A.W., 1991. On The Trail of A New Regulatory System in Plants, *The New Biologist*, 3, 450-453
- Galston A.W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T. ve Tiburcio, A.F., 1997. Plant Polyamines in Reproductive Activity and Aesponse to Abiotic Stress. *Botanica Acta*, 110, 197-207
- Gao, Y., Guo, Y.K., Lin, S.H., Fang, Y.Y. ve Bai, J.G., 2010. Hydrogen Peroxide Pretreatment Alters the Activity of Antioxidant Enzymes and Protects Chloroplast Ultrastructure in Heat Stressed Cucumber Leaves, *Scientia Horticulturae*, 126, 20-26.



- 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.
- Gill, S. ve Tuteja, N., 2010. Polyamines and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Plant Signaling and Behavior*, 5,1, 26-33.
- Groppa, M.D. ve Benavides, M.P., 2008. Polyamines and Abiotic Stress: Recent Advances, *Amino Acids*, 34, 35-45.
- Gupta, K., Dey, A. ve Gupta, B., 2013. Plant Polyamines in Abiotic Stress Responses, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35,7, 2015-2036.
- 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.
- Hamasaki-Katagiri, N., Katagiri, Y., Tabor, C.W. ve Tabor, H., 1998. Spermine is Not Essential for Growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the SPE4 Gene (Spermine Synthase) and Characterization of a spe4 Deletion Mutant, *Gene*, 210, 195-201.
- Hatmi, S., Gruau, C., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Baillieul, F., Eullaffroy, P., Clément, C., Ferchichi, A. ve Aziz, A., 2015. Drought Stress Tolerance in Grapevine Involves Activation of Polyamine Oxidation Contributing to Improved Immune Response and Low Susceptibility to *Botrytis cinerea*, *Journal of Experimental Botany*, 66, 775-787.
- He, L., Gao, Z. ve Li, R., 2009. Pretreatment of Seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Enhances Drought Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings, *African Journal of Biotechnology*, 8, 6151-6157.
- 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.
- Heimer, Y.M. ve Mizrahi, Y., 1982. Characterization of Ornithine Decarboxylase of Tobacco Cells and Tomato Ovaries, *Biochemical Journal*, 201, 373-376.
- Hu, Y., Ge, Y., Zhang, C., Ju, T. ve Cheng, W. 2009. Cadmium Toxicity and Translocation in Rice Seedlings are Reduced by Hydrogen Peroxide Pretreatment, *Plant Growth Regulation*, 59, 51-61.

- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. ve Schroeder, J.I., 2010. Early Abscisic Acid Signal Transduction Mechanisms: Newly Discovered Components and Newly Emerging Questions, *Genes and Development*, 24, 1695–1708.
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M. ve Siddique, K.H.M., 2011. Polyamines: Natural and Engineered Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants. *Biotechnology Advances*, 29, 300-311.
- Igarashi, K., ve Kashiwagi, K., 2000. Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271, 559-564.
- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y. ve Takahashi, T., 2004. Spermidine Synthase Genes are Essential for Survival of Arabidopsis, *Plant Physiology*, 135, 1565-1573.
- Iqbal, M. ve Ashraf, M., 2005. Changes in Growth, Photosynthetic Capacity, and Ionic Relations in Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) due to Pre-Sowing Seed Treatment with Polyamines, *Plant Growth Regulation*, 46, 19-30.
- Jiang, M. ve Zhang, J., 2002a. Involvement of Plasma-Membrane NADPH Oxidase in Abscisic Acid and Water Stress-Induced Antioxidant Defense in Leaves of Maize Seedlings, *Planta*, 215, 1022-1030.
- Jiang, M. ve Zhang, J., 2002b. Water Stress-Induced Abscisic Acid Accumulation Triggers The Increased Generation of Reactive Oxygen Species and Upregulates The Activities of Antioxidant Enzymes in Maize Leaves, *Journal of Experimental Botany*, 53, 2401-2410.
- Jimenez-Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-González, M. L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O.A. ve Garriz, A., 2014. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontier in Plant Science*, 5, 95, 65-78.
- Jones, H.G., 1992. *Plants and Microclimate*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kadioğlu, A., 2011. *Bitki Fizyolojisi*, ISBN: 978-605-4361-06-9, Beşinci baskı, Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Kadioglu, A., Terzi, R. 2007. A Dehydration Avoidance Mechanism: Leaf Rolling, *The Botanical Review*, 73, 290-302.
- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y., 2005. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18, 723-740.
- Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., ve Nishimura, M., 2008. A Putative Peroxisomal Polyamine Oxidase, AtPAO4, is Involved in Polyamine Catabolism in Arabidopsis thaliana, *Plant and Cell Physiology*, 49, 1272-1282.

- Kasinathan, V. ve Wingler, A., 2004. Effect of Reduced Arginine Decarboxylase Activity on Salt Tolerance and on Polyamine Formation During Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*, *Physiologia Plantarum*, 121, 101-107.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Altabella, T. ve Galston, A., 2003 Polyamines in Plants: An Overview, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2, 1-12.
- Klingler, J.P., Batelli, G. ve Zhu, J.K., 2010. ABA receptors: The START of a new paradigm in phytohormone signalling, *Journal of Experimental Botany* 61, 3199-3210.
- Kozłowski, T.T. ve Pallardy, S.G., 1997. *Physiology of Woody Plants*, Academic Press, San Diego.
- Krasensky, J. ve Jonak, C., 2012. Drought, Salt, and Temperature Stress-induced Metabolic Rearrangements and Regulatory Networks, *Journal of Experimental Botany*, 63,4, 1493-1608.
- Kubis, J., 2003. Polyamines and “Scavenging System”: Influence of Exogenous Spermidine on Catalase and Guaiacol Peroxidase Activities and Free Polyamine Level in Barley Leaves Under Water Deficit, *Acta Physiologiae Plantarum*, 25, 337-343.
- Kubis, J., 2008. Exogenous Spermidine Differentially Alters Activities of Some Scavenging System Enzymes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Superoxide Radical Levels in Water Stressed Cucumber Leaves, *Journal of Plant Physiology*, 165, 397-406.
- Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M.A. ve Tiburcio, A.F., 1997 Recent Advances in Polyamine Research, *Trends in Plant Science*, 2, 124-130.
- Kurepa, J., Smalle, J., Van Montagu, M. ve Inze, D., 1998. Polyamines and Paraquat Toxicity in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, 39, 987-992.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T. ve Takahashi, Y., 2007. The Polyamine Spermine Rescues *Arabidopsis* from Salinity and Drought Stresses. *Plant Signaling and Behavior*, 2, 251-252.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. ve Takahashi, Y., 2008. Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival, *Planta*, 228, 367-381.
- Kuznetsov, V.V. ve Shevyakova, N.I., 2007. Polyamines and Stress Tolerance of Plants, *Plant Stress*, 1, 50-71.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom R.E., 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 Journal*, 22, 2623-2633.
- Lewitt, J., 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Academic Press, New York.

- Li, Z.Y. ve Chen, S.Y. 2000. Differential Accumulation of the S-adenosylmethionine Decarboxylase Transcript in Rice Seedlings in Response to Salt and Drought Stresses, *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 782-788
- Liu, H.H., Dong, B.H., Zhang, Y.Y., Liu, Z.P. ve Liu Y.L., 2004. Relationship Between Osmotic Stress and The Levels of Free, Conjugated and Bound Polyamines in Leaves of Wheat Seedlings, *Plant Science*, 166, 1261-7.
- Liu, J.H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M. ve Moriguchi, T., 2006. Polyamine Biosynthesis of Apple Callus Under Salt Stress: Importance of The Arginine Decarboxylase Pathway in Stress Response, *Journal of Experimental Botany*, 57, 2589-2599.
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. ve Moriguchi, T., 2007. Polyamines and Their Ability to Provide Environmental Stress Tolerance to Plants, *Plant Biotechnology*, 24, 117-126.
- Liu, Z.J., Guo, Y.K. ve Bai, J.G., 2010. Exogenous Hydrogen Peroxide Changes Antioxidant Enzyme Activity and Protects Ultrastructure in Leaves of Two Cucumber Ecotypes Under Osmotic Stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 171-183.
- Lu, Y., Li, Y., Zhang, J., Xiao, Y., Yue, Y., Duan, L., Zhang, M. ve Li, Z., 2013. Overexpression of Arabidopsis Molybdenum Cofactor Sulfurase Gene Confers Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.), *Plos One*, 8,1, 1-12.
- Malmberg, R.L., Watson, M.B., Galloway, G.L. ve Yu, W., 1998. Molecular Genetic Analyses of Plant Polyamines, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17, 199-224.
- Martin-Tanguy, J., 2001. Metabolism and Function of Polyamines in Plants: Recent Development (New Approaches), *Plant Growth Regulation*, 34, 135–148.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez J., Buckler E.S., ve Doebley, J.F., 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping, *PNAS*, 99, 6080-6084.
- 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.
- McKersie, B.D. ve Lehsem, Y., 1994. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Minocha, R., Majumdar, R., ve Minocha, S.C., 2014. Polyamines and Abiotic Stress in Plants: a Complex Relationship. *Frontiers in Plant Science*, 5,175, 6-22.
- 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.

- Morris, M.L., 2002. Impacts of International Maize Breeding Research in Developing Countries, 1966-98. DF:CIMMYT, Mexico.
- Moschou, P.N., Delis, I.D., Paschalidis, K.A., ve Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008a. Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Polyamine Oxidase are not Able To Cope With Oxidative Burst Generated by Abiotic Factors, *Physiologia Plantarum*, 133, 140-156.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A. ve Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008b. Plant Polyamine Catabolism: The State of The Art, *Plant Signalling and Behavior*, 3, 1061-1066.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I., vd., 2008c. Spermidine Exodus and Oxidation in the Apoplast Induced by Abiotic Stress is Responsible for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signatures That Direct Tolerance Responses in Tobacco, *Plant Cell*, 20, 1708-1724.
- Moschou, P.N., Wu ,J., Tavladoraki, P., Angelini, R. ve Roubelakis-Angelakis, K.A., 2012. The Polyamines and Their Catabolic Products are Significant Players in The Turnover of Nitrogenous Molecules in Plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 5003-5015.
- Mukherjee, K., Roy Choudhury, A., Gupta, B., Gupta, S. ve Sengupta D.N., 2006. An ABRE-Binding Factor, OSBZ8, is Highly Expressed in Salt Tolerant Cultivars Than in Salt Sensitive Cultivars of Indica Rice, *BMC Plant Biology*, 6,18, 1-14.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. ve Thomson, J.A., 2002. Physiological and Molecular Insights into Drought Tolerance, *African Journal of Biotechnology*, 1, 23-38.
- Munne-Bosch, S., Jubany-Mari, T. ve Alegre, L. 2001, Drought-Induced Senescence is Characterized by A Loss of Antioxidant Defences in Chloroplasts, *Plant Cell and Environment*, 24, 1319-1327.
- Ndayiragiji, A. ve Lutts, S., 2006. Exogenous Putrescine Reduces Sodium and Chloride Accumulation in NaCl-Treated Calli of The Salt-Sensitive Rice Cultivar I Kong Pao, *Plant Growth Regulation*, 48, 51-63.
- Nayyar, H., Kaur, S., Singh, S., Kumar, S., Singh, K.J. ve Dhir K.K., 2005. Involvement of Polyamines in The Contrasting Sensitivity of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) to Water Deficit Stress. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 46, 333-338.
- Neill, S., Desikan, R. ve Hancock, J., 2002. Hydrogen Peroxide Signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 388-395.
- Özcan, S., 2009. Modern Dünyanın Vazgeçilmez Bitkisi Mısır: Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Mısırın Tarımsal Üretime Katkısı, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2,2, 01-34

- 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.
- Papadakis, A.K., ve Roubelakis-Angelakis, K.A., 2005. Polyamines Inhibit NADPH Oxidase-Mediated Superoxide Generation and Putrescine Prevents Programmed Cell Death Induced by Polyamine Oxidase-Generated Hydrogen Peroxide, *Planta* 220, 826-837.
- Parida, A.K. ve Das, A.B., 2005. Salt Tolerance ve Salinity Effects on Plants: Review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Parra-Lobato, M.C. ve Gomez-Jimenez, M.C., 2011. Polyamine-Induced Modulation of Genes Involved in Ethylene Biosynthesis and Signalling Pathways and Nitric Oxide Production During Olive Mature Fruit Abscission, *Journal of Experimental Botany*, 62, 4447-4465.
- Paschalidis, K.A., Toumi, I., Moschou, P.N. ve Roubelakis-Angelakis K.A., 2010. ABA-Dependent Amine Oxidases-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Affects Stomata Conductance, *Plant Signalling and Behavior*, 5, 9, 1153-1156.
- Pitzschke, A., Forzani, C. ve Hirt, H., 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants, *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1757-1764.
- Radhakrishnan, R. ve Lee I.J., 2013. Ameliorative Effects of Spermine Against Osmotic Stress Through Antioxidants and Abscisic Acid Changes in Soybean Pods and Seeds, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 263-269.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. ve Grill, E., 2010. ABA Perception and Signalling. *Trends in Plant Science*, 15, 395-401.
- Rhee, S.G., 2006. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a Necessary Evil for Cell Signaling, *Science*, 312, 5782, 1882-1883.
- Richards FJ, Coleman RG (1952) Occurrence of putrescine in potassium-deficient barley. *Nature* 170-460
- Roberts, S.C., Jiang Y.Q., Jardim, A., Carter, N.S., Heby, O. ve Ullman, B., 2001. Genetic Analysis of Spermidine Synthase from *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115, 217-226.
- Rosegrant, M.W. ve Cline, S.A., 2003. Global Food Security: Challenges and Policies, *Science*, 302, 1917-1919.
- Roychoudhury, A., Gupta B. ve Sengupta, D.N., 2008. Trans-Acting Factor Designated OSBZ8 Interacts with Both Typical Abscisic Acid Responsive Elements as well as Abscisic Acid Responsive Element Like Sequences in The Vegetative Tissues of Indica Rice Cultivars, *Plant Cell Reports*, 27, 779-794.

- Ruiz-Herrera, J., Ruiz-Medrano, R. ve Dominguez, A., 1995. Selective Inhibition of cytosine-DNA Methylases by Polyamines. *FEBS Letters* 357, 192-196.
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J.W. vd., 2004. Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs Impinge on Wound Responsiveness and Development in *Lycopersicon esculentum*, *The Plant Cell*, 16, 616-628.
- Salisbury, F.D. ve Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Co., California.
- Schnable, S.S., Ware, D., Fulton., R.S., Stein J.C. ve Wei, F., 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics, *Science*, 326,1112-1115
- Schulze, E.D., Beck, E. ve Müller-Hohenstein, K., 2005. *Plant Ecology*, ISBN: 978-3-540-20833-4, Birinci Baskı, Bölüm 1.1., Springer.
- Seiler, N. ve Raul, F., 2005. Polyamines and Apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 623-642.
- Sgherri, C.L.M., Pinzino, C. ve Navari-Izzo, F., 1996. Sunflower Seedlings Subjected to Increasing Water Stress by Water Deficit: Changes in O<sub>2</sub>- Production Related to the Composition of Thylakoid Membranes, *Physiologia Plantarum*, 96, 446-452.
- 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.
- Shaw, B., Thomas, T.H., Cooke, D.T. 2002, Responses of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) to Drought and Nutrient Deficiency Stress, *Plant Growth Regulation*, 37, 77-83.
- Shi, H. ve Chan, Z., 2013a. Improvement of Plant Abiotic Stress Tolerance Through Modulation of The Polyamine Pathway, *Journal of Integrative Plant Biology*, 56, 2, 114-121.
- Shi, H., Ye, T. ve Chan, Z., 2013b. Comparative Proteomic and Physiological Analyses Reveal The Protective Effect of Exogenous Polyamines in The Bermuda Grass (*Cynodon dactylon*) Response to Salt and Drought Stresses, *Journal of Proteome Research*, 12, 4807-4829.
- Shi, H., Ye, T., Chen, F., Cheng, Z., Wang, Y., Yang P., Zhang, Y. ve Chan, Z., 2013c. Manipulation of Arginase Expression Modulates Abiotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*: Effect on Arginine Metabolism and ROS Accumulation, *Journal of Experimental Botany*, 64, 1367-1379.
- Shi, J., Fu, X.Z., Peng, T., Huang, X.S., Fan, Q.J. ve Liu J.H., 2013. Spermine Pretreatment Confers Dehydration Tolerance of Citrus *In Vitro* Plants via Modulation of Antioxidative Capacity and Stomatal Response, *Tree Physiology*, 30, 914-922.

- Siddique, M.R.B., Hamid, A. ve Islam, M.S., 2000, Drought Stress Effects on Water Relations of Wheat, *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 41, 35-39.
- 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 biochimica Polonica*, 54, 39-50.
- Slocum, R.D., 1991. Polyamine Biosynthesis in Plants. Bölüm, Slocum R.D. ve Flores H.E., *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton, 23-40.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, *New Phytologist*, 125, 27-58.
- Street, H.E. ve Öpik, H., 1984. *The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development*, Üçüncü Baskı, Baltimore.
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H.A., Shulaev, E., Cortes, D.F. vd., 2013. Temporal-Spatial Interaction Between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants, *The Plant Cell*, 25, 3553-3569.
- Szabados, L. ve Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in Plant Science*, 15, 89-97.
- Swindel, W.R., 2006. The Association Among Gene Expression Responses to Nine Abiotic Stress Treatments in *Arabidopsis thaliana*, *Genetics*, 174, 4, 1811-24.
- Tang, W. ve Newton, R.J., 2005, Polyamines Reduce Salt-Induced Oxidative Damage by Increasing The Activities of Antioxidant Enzymes and Decreasing Lipid Peroxidation in Virginia Pine. *Plant Growth Regulation*, 46, 31-43.
- Tavladoraki, P., Rossi, M.N., Saccuti, G., Perez-Amador, M.A., Polticelli, F., Angelini, R. ve Federico, R., 2006. Heterologous Expression and Biochemical Characterization of A Polyamine Oxidase from *Arabidopsis* Involved in Polyamine Back Conversion. *Plant Physiology*, 141, 1519-1532.
- Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Toninello, A. ve Agostinelli, E., 2012. Polyamine Catabolism: Target for Antiproliferative Therapies in Animals and Stress Tolerance Strategies in Plants, *Amino Acids*, 42, 411-426.
- Terzi, R., Kadioglu, A., Kalaycioglu, E., ve Saglam, A., 2014. Hydrogen Peroxide Pretreatment Induces Osmotic Stress Tolerance by Influencing Osmolyte and Abscisic Acid Levels in Maize Leaves, *Journal of Plant Interactions*, 9,1, 559-565.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrian, M. ve Alcazar, R., 2014. The Roles of Polyamines During The Lifespan of Plants: From Development to Stress, *Planta*, 240, 1-18.
- Tisi, A., Federico, R., Moreno, S., Lucretti, S., Moschou, P.N., Roubelakis-Angelini, R. ve Cona, A., 2011. Perturbation of Polyamine Catabolism can Strongly Affect Root Development and Xylem Differentiation, *Plant Physiology*, 157, 200-215.



- Tomar, P. C., Lakra, N., ve Mishra, S., 2013. Cadaverine: A Lysine Catabolite Involved in Plant Growth and Development, *Plant Signalling and Behavior*, 8, 10, 1-15.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., ve Dangl, J.L., 2005. Pathogen-Induced, NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Intermediates Suppress Spread of Cell Death in *Arabidopsis thaliana*, *Nature Genetics*, 37, 1130-1134.
- Toumi, I., Moschou., P.N., Paschalidis, K.A., Bouamama, B., Ben Salem-Fnayou A., Ghorbel, A.W., Mliki, A. ve Roubelakis-Angeleakis, K.A., 2010. Abscisic Acid Signals Reorientation of Polyamine Metabolism to Orchestrate Stress Responses via The Polyamine Exodus Pathway in Grapevine, *Journal Plant Physiology*, 167, 519-525.
- Turkan, I. ve Demiral, T. 2009. Recent Developments in Understanding Salinity Tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 67, 2-9.
- Türkeş, M., 2012. Türkiye’de Gözlenen ve Öngörülen İklim Değişikliği, Kuraklık ve Çölleşme, *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 4,2, 1-32.
- Urano, K., Yoshihara, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2004. *Arabidopsis* Stress-Inducible Gene for Arginine Decarboxylase AtADC2 is Required for Accumulation of Putrescine in Salt Tolerance, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 369-375.
- Urano, K., Hobo, T. ve Shinozaki, K., 2005. *Arabidopsis* ADC Genes Involved in Polyamine Biosynthesis are Essential for Seed Development, *FEBS Letters*, 579, 1557-1564.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2009. Characterization of the ABA-Regulated Global Responses to Dehydration in *Arabidopsis* by Metabolomics. *The Plant Journal*, 57, 1065-1078.
- 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.
- URL-1, 2013, [http://plants.ensembl.org/Zea\\_mays/Info/Annotation](http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Annotation)
- URL-2, 2014. Integrated Taxonomic Information System <http://www.itis.gov>
- URL-3, 2014. <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
- Velarde-Buendia, A.M., Shabala, S., Cvikrova, M., Dobrovinskaya, O., ve Pottosin, I. 2012. Salt-Sensitive and Salt-Tolerant Barley Varieties Differ in The Extent of Potentiation of The ROS-Induced K<sup>+</sup> Efflux by Polyamines, *Plant Physiology and Biochemistry*, 61, 18-23.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000, Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-treated Bean Plants: Protective Roles of Exogenous Polyamines, *Plant Science*, 151, 59-66.

- Wang, B.Q., Zhang, Q.F., Liu, J.H., Li, G.H., 2011. Overexpression of PtADC Confers Enhanced Dehydration and Drought Tolerance in Transgenic Tobacco and Tomato: Effect on ROS Elimination, Biochemical and Biophysical Research Communications, 413, 10-16.
- Walden, R., Cordeiro, A. ve Tiburcio, A.F., 1997. Polyamines: Small Molecules Triggering Pathways in Plant Growth and Development. *Plant Physiology*, 113, 1009-1013.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F. ve Scherer, G.F.E., 2011a. Polyamines, Polyamine Oxidases and Nitric Oxide in Development, Abiotic and Biotic Stresses, *Plant Science*, 181, 593-603.
- Wimalasekera, R., Villar, C., Begum, T. ve Scherer, G.F.E., 2011b. Copper Amine Oxidase1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* Contributes to Abscisic Acid and Polyamine-Induced Nitric Oxide Biosynthesis and Abscisic Acid Signal Transduction, *Molecular Plant*, 4, 663-678.
- World Bank , 2005. Agriculture Investment Sourcebook, ISBN 10: 0-8213-6085-X, World Bank, Washington DC.
- Wu, G., Bazer, F.W., Hu, J., Hohnson, G.A. ve Spencer, T.E., 2005. Polyamine Synthesis from Proline in The Developing Porcine Placenta. *Biology of Reproduction*, 72, 842-850.
- Wu, J., Shang, Z., Jiang, X., Moschou, P.N., Sun, W., Roubelakis-Angelakis, K.A., vd., 2010. Spermidine Oxidase-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Regulates Pollen Plasma Membrane Hyperpolarization-Activated Ca<sup>2+</sup>-Permeable Channels and Pollen Tube Growth, *The Plant Journal*, 63, 1042-1053.
- 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.
- Xue, B., Zhang, A., ve Jiang, M., 2009. Involvement of Polyamine Oxidase in Abscisic Acid-Induced Cytosolic Antioxidant Defense in Leaves of Maize, *Journal of Integrative Plant Biology*, 51, 225-234.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A. ve Kusano, T., 2006. The Polyamine Spermine Protects Against High Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Letters*, 580, 6783-6788.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A.J. ve Kusano, T., 2007. A Protective Role for The Polyamine Spermine Against Drought Stress in *Arabidopsis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352, 486-490.
- Yılmaz, E., Tuna, L.A. ve Bürün, B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri, *Celal Bayar University Journal of Science*, 7,1, 47-66.

- Yiu, J.C., Juang, L.D., Fang, D.Y.T., Liu, C.W. ve Wu, S.J., 2009. Exogenous putrescine reduces flooding- induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. *Scientia Horticulturae*, 120, 306-14.
- Zepeda-Jazo, I., Velarde-Buendía, A.M., Enriquez-Figueroa, R., Jayakumar, B., Shabala, S., Muniz, J. vd., 2011. Polyamines Interact with Hydroxyl Radicals in Activating Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> Transport Across The Root Epidermal Plasma Membranes. *Plant Physiology*, 157, 2167-2180.
- 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, L., Chia, J.M., Kumari, S., Stein, J.C., Liu Z., Narechania, A., Maher, C.A., Guill, K, McMullen, M.D ve Ware, D., 2009. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLOS Genetics*, 5,11, 1-16.
- Zhang, W., Jiang, B., Li, W., Song, H., Yu, Y. ve Chen, J., 2009. Polyamines Enhance Chilling Tolerance of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Modulating Antioxidative System, *Scientia Horticulture*, 122, 200-8.
- Zhou, Q. ve Yu, B., 2010. Changes in Content of Free, Conjugated and Bound Polyamines and Osmotic Adjustment in Adaption of Vetiver Grass to water Deficit, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 417- 425.
- Zhu, D., Jiang, M.Y. ve Tan, M.P., 2006. The Mechanism of ABA-Induced Apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in Maize Leaves, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 32, 519-526.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and Srought Stress Signal Transduction in Plants, *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247-273.

## ÖZGEÇMİŞ

Tez çalışmasını hazırlayan ve sunan Mehmet DEMİRALAY 1980 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk ve orta öğretimini doğduğu şehirde tamamladıktan sonra 1999 yılında Konya Selçuk Üniversitesi Biyoloji programını kazandı. Biyoloji bölümünü 2003 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl yine Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Botanik Anabilimdalında yüksek lisansa başladı. 2006 yılında yüksek lisans programını bitirdikten sonra öğrenim hayatına ara verdi ve özel sektörde sağlık alanında çalıştı. 2009 yılında Artvin Çoruh Üniversitesi Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atandı. Yine aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilimdalında doktora programına başladı. Şu anda Artvin Çoruh Üniversitesindeki görevine devam etmektedir.