

**KURAKLIK ŞARTLARINDA *HORDEUM VULGARE*
L.(ARPA) BİTKİSİNE UYGULANAN SİKLİTOLÜN PROTEİN
İFADELERİ VE ABA SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE İŞLEK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
HAZİRAN- 2019**

**KURAKLIK ŞARTLARINDA *HORDEUM VULGARE*
L.(ARPA) BİTKİSİNE UYGULANAN SİKLİTOLÜN PROTEİN
İFADELERİ VE ABA SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE İŞLEK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Doç. Dr. Serpil ÜNYAYAR**

**İkinci Danışman
Öğr. Gör. Dr. Sertan ÇEVİK**

**MERSİN
HAZİRAN- 2019**

ONAY

Prof.Dr. Serpil ÜNYAYAR danışmanlığında hazırlanan “Kuraklık şartlarında *Hordeum vulgare* L. (Arpa) bitkisine uygulanan siklitolün protein ifadeleri ve ABA seviyesi üzerine etkisinin incelenmesi” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 18/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/~~çokluğu~~ ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Serpil ÜNYAYAR	
Üye	Prof.Dr. Yüksel KELEŞ	
Üye	Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ^{23/08/2019}../.../... tarih ve ^{2019.33}../.../... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

18/07/2019



İmza / Signature

Öğrenci Adı ve Soyadı / Student Name and Surname

Ayşe İŞLEK

ÖZET

Kuraklık şartlarında *Hordeum vulgare L. (arpa)* Bitkisine Uygulanan Siklitolün Protein ifadeleri ve ABA Seviyesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan *Hordeum vulgare L.* (arpa) bitkisine bir siklitol türevi olan *dl*-siklopentan-1,2,3-triol uygulaması sonucunda ortalama biyokütle, ABA hormonu miktarı ve protein ifadelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Kuraklık stresi toplam biyokütleyi azaltırken, ABA hormonunun miktarını ise arttırmıştır. Dışsal *dl*-siklopentan-1,2,3-triol uygulanmasıyla birlikte ise gerek kontrol gerekse kuraklık uygulanan bitkilerde biyokütlerde artış, ABA hormon miktarında ise azalma meydana gelmiştir.

Ozmotik ayarlayıcı olan siklitollerin arpa üzerindeki etkisini göstermek için 2-DE ve MALDI-TOF-MS kullanılmış ve bu uygulamanın protein ifadelerinde önemli değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir. Toplamda 32 proteinin miktarında istatistiksel olarak değişiklik olmuştur. Siklitol uygulaması, Oksijen oluşumunu arttıran protein 1 (OEE1), Klorofil a-b bağlayıcı protein, Fosfoglisarat kinaz, Rubisco, Karbonik anhidraz, Ferredoksin-NADP redüktaz, Fosforibulokinaz, karbonik anhidraz (CA), Malat dehidrogenaz, sitosolik Fosfoglisarat kinaz, 20 kDa Şaperonin, Kalsiyum bağlayıcı protein (CML42) gibi proteinlerin miktarlarında artışlara neden olmuştur. Siklitol uygulaması Fosforibulokinaz ile Fosfoglisarat kinaz miktarlarında azalmaya neden olmuştur. S-adenosilmetionin sentazın miktarı siklitol uygulaması ile birlikte kontrol gruplarında azalırken kurak gruplarda ise artmıştır. Kuraklık koşullarındaki arpaya dışsal sentetik siklitol uygulaması, özellikle fotosentez, enerji, biyosentez ve antioksidan mekanizmalarıyla ilgili olan protein miktarını önemli ölçüde değiştirmiştir.

Çalışmalarımızın sonucunda elde ettiğimiz veriler ışığında siklitol uygulamasının bitkinin kuraklığa karşı toleransını arttırdığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Arpa, kuraklık, siklitol, ABA, proteomik

Danışman: Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Mersin.

İkinci Danışman: Öğr. Gör. Dr. Sertan ÇEVİK Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Mersin

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Cyclitol Applied to *Hordeum vulgare* L. (barley) on Protein Expression and ABA Level in Drought Conditions

In this study, changes in total biomass, ABA hormone content and protein expression were investigated in *Hordeum vulgare* L that exposed to drought stress and treated by dl-cyclopentane-1,2,3-triol. Drought stress decreased the total biomass and increased the amount of ABA hormone. While the application of exogenous dl cyclopentane-1,2,3-triol increased biomass, it decreased ABA hormone content in both control and drought treated-plants.

2-DE and MALDI-TOF-MS were used to show the protective effect of cyclitol, which are osmotic regulators, on barley and changes in protein expression was found. There was a statistically significant change in the amount of 32 proteins in total. Cyclitol application caused of quantities of proteins such as Oxygen-evolving enhancer protein 1 (OEE1), Chlorophyll a-b binding protein, Phosphoglycerate kinase, Rubisco, Carbonic anhydrase, Ferredoxin--NADP reductase, Phosphoribulokinase, Carbonic anhydrase(CA), Malate dehydrogenase, Cytosolic Phosphoglycerate kinase, 20 kDa chaperonin, Calcium-binding protein CML42. Cyclitol application caused decrease of quantities of Phosphoribulokinase and Phosphoglycerate kinase. The quantity of S- adenosylmethionine synthetase decreased in control groups but increased in drought groups with cyclitol application. The application of exogenous synthetic cyclitol to barley under drought conditions has significantly altered the amount of protein associated with photosynthesis, energy, biosynthesis and antioxidant mechanisms.

In the light of the data obtained from our studies, it can be said that cyclitol application increases the tolerance of the plant against drought.

Keywords: Barley, drought, cyclitol, ABA, proteomic

Advisor: Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR, Department of Biotechnology, University of Mersin, Mersin.

Second Advisor: Öğr. Gör. Dr. Sertan ÇEVİK, Department of Biotechnology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, görüş ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübeleri ile sürekli destek olan değerli danışmanlarım Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR ve Öğr. Gör. Dr. Sertan ÇEVİK ve emeği geçen tüm biyoloji bölümü hocalarıma çok teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım süresinde bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan Araş. Gör. Aytunç YILDIZLI'ya ve laboratuarda emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca gece gündüz demeden yardımcı olan sevgili arkadaşım Ayşegül KABADAYI ve Buket BULUT'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan değerli eşim Orhan İŞLEK'e çok teşekkür ederim

Hayat boyu yapmış olduğum, inandığım her konuda desteklerini ve bana olan inançlarını hiç esirgemeyen canım annem Gülay GÖK canım babam Mustafa GÖK 'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarımı sonuca bağlamamdaki en büyük enerjinin sahibi canım kızım Alya İŞLEK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1 Arpa	5
2.2. Kuraklık	5
2.3.Siklitol	6
2.4. Absisik Asit (ABA)	7
2.5. Proteomiks	8
3. LİTERATÜR TARAMASI	10
4. MATERYAL ve YÖNTEM	13
4.1. Ortalama Biyokütle Analizi	13
4.2. Absisik Asit (ABA) analizi:	13
4.3. Protein Analizleri	14
4.3.1. Protein İzolasyonu	14
4.3.2 Protein Konsantrasyon Tayini	14
4.3.3 İzole Edilen Proteinlerin Elektroforetik Ayırımı	14
4.3.3.1. Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi	14
4.3.3.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi	15
4.3.3.3. 2D Jellerinin Görüntülenmesi, Protein Leke Analizi ve Leke Kesimi	15
4.3.3.4. Jel İçi Tripsin Kesimi ve MALDI TOF/TOF MS Analizi	16
4.4. İstatistiksel Değerlendirme	16
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	17
5.1. Bulgular	17
5.1.1. Toplam Biyokütlede Meydana Gelen Değişimler	17
5.1.2. ABA Seviyesindeki Değişimler	18
5.1.3. Protein Analizleri	18
5.1.3.1 SDS-PAGE Analizleri	18
5.1.3.2. 2D Jel Elektroforezi Analizleri	19
5.2. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	32
EKLER	39
ÖZGEÇMİŞ	46

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. 2018 FAO istatistik verilerine göre dünya genelinde en çok arpa üretimi yapılan ülkelerin sıralaması	1
Tablo 5.1. Siklitol uygulamasıyla, 3.gün kontrol bitkilerinde ifadeleri değişen protein listesi	22
Tablo 5.2. Siklitol uygulaması ile 3. gün kurak bitkilerinde ifadeleri değişen protein listesi	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Türkiyede tahıl üretim oranları (TÜİK,2013)	1
Şekil 1.2. Çevresel stres etmenleri	2
Şekil 1.3. Poliol ve siklitollerin genel yapısal formülleri, Yancey, 2005	3
Şekil 2.1. FAO istatistik verilerine göre 2008-2017 arasında hasat alanı ve üretimdeki dalgalanmalar	5
Şekil 2.2. ABA-stoma ilişkisi	7
Şekil 5.1. Bitkilerin genel görünüşü	17
Şekil 5.3. Stresin birinci ve üçüncü günlerinde ABA içeriği	18
Şekil 5.4. Proteinlerin elektroforezde yürütüldüğü görüntü	19
Şekil 5.5. a) Kontrol şartlarındaki <i>Hordeum vulgare</i> bitkilerine ait protein lekelerinin 2D-sanal jel görüntüleri b) Siklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri c) İki grubun karşılaştırılması.	19
Şekil 5.6. Kontrol bitkilerinde 3. gün Siklitol uygulamasıyla birlikte ifadesi değişen proteinlerin işlevleri	20
Şekil 5.7. Kontrol şartlarındaki <i>Hordeum vulgare</i> bitkilerindesiklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri ve ifade değişim oranları	21
Şekil 5.9. Kuraklığa maruz bırakılan bitkilerde Siklitol uygulamasıyla birlikte ifadesi değişen proteinlerin işlevleri	24
Şekil 5.10. Kuraklık altındaki <i>Hordeum vulgare</i> bitkilerindesiklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri ve ifade değişim oranları	25

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
ABA	Absisik asit hormonu
AP	Askorbat peroksidaz
CA	Karbonik anhidraz
Ca ⁺²	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
CML42	Kalsiyum bağlayıcı protein
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GR	Glutasyon redüktaz
KAT	Katalaz
LC	Sıvı kromatografisi
OEE1	Oksijen oluşumunu arttıran protein 1
PGK	Fosfogliserat kinaz
PO	Peroksidaz
PPO	Polifenol oksidaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	Süperoksit dismutaz
TFA	Trifluoro asetik asit

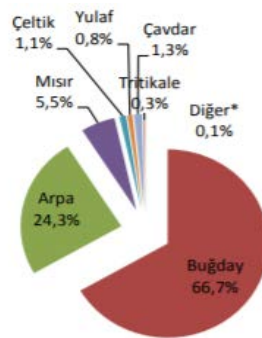
1. GİRİŞ

Ekonomik olarak önemli bir bitki olan arpa daha çok malt endüstrisi ve hayvan yemi olarak kullanılsa da günümüzde insan beslenmesinde gıda katkısı olarak ta kullanılmaya başlanmıştır. Arpa dünyada en çok üretilen tahıl bitkileri içerisinde dördüncü sıradadır. Yıllık üretim oranı ortalama olarak 150 milyon ton civarındadır ve Türkiye’de bu orana her yıl değişkenlik göstermekle birlikte yaklaşık olarak 6.7 milyon ton/yıl katkı sağlamaktadır (tablo 1.1.)

Tablo 1.1. 2018 FAO istatistik verilerine göre dünya genelince en çok arpa üretimi yapılan ülkelerin sıralaması

Sıra	Ülke	Üretim
1	Rusya	17,992,517
2	Almanya	10,730,500
3	Fransa	10,306,008
4	Ukrayna	9,435,710
5	Avustralya	8,992,274
6	Kanada	8,704,300
7	İspanya	7,979,590
8	Türkiye	6,700,000
9	Birleşik Krallık	6,655,000
10	Amerika Birleşik Devletleri	4,338,850

Önemli Arpa üreticisi ülkelerden biri olan Türkiye’de ise arpa buğdaydan sonra en çok üretimi yapılan tahıl ürünüdür (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Türkiye’de tahıl üretim oranları (TÜİK, 2013)

Ülkemizde üretilen arpanın büyük bir kısmı dünyada olduğu gibi hayvan yemi olarak, küçük bir miktarı ise malt endüstrisinde kullanılmaktadır. Türkiye önemli arpa üreticisi ülkelerden biri olmasına rağmen özellikle malt endüstrisinde kullanılan kaliteli arpa ithal edilmektedir [1].

Bitkiler yaşamları boyunca, gelişimlerini olumsuz etkileyecek çevresel stres faktörleri ile karşılaşmaktadırlar [2]. Bu çevresel stresler bitkilerde çeşitli mekanizmaları etkileyerek ciddi verim kayıplarına neden olurlar. Bu nedenle bilim insanları uzun zamandan beri bitkilerin bu streslerle başa çıkabilmek için geliştirdikleri stratejileri anlayabilmek adına çalışmalar yürütmektedirler. Çevresel stresler abiyotik ve biyotik stres faktörleri olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 1.2.) [3].



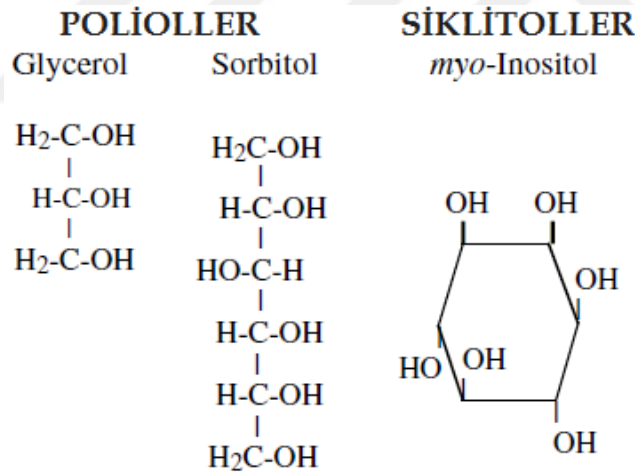
Şekil 1.2. Çevresel stres etmenleri

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan kuraklık, bitki gelişimini ve ürün verimini etkileyen önemli bir stres etmenidir, dünyadaki ekilebilir alanların büyük kısmı kısa ya da uzun süreler boyunca kuraklık stresinden etkilenmektedirler. Yayınlanan raporlar kuraklık stresinin %26'lık payı ile dünya üzerinde tarımsal alanları en çok etkileyen abiyotik stres olduğunu göstermektedir [4].

Doğaları gereği aktif hareket edemeyen bitkiler, çevresel koşullara uyum sağlayacak tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir [4,5]. Çevresel streslere biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler düzeyde tepkiler oluşturan bitkiler bu sayede dayanıklılık mekanizmalarını ortaya koyarlar. Kuraklık söz konusu olduğunda tüm bu dayanıklılık mekanizmaları üç ana strateji altında toplanmaktadır, bunlar; kuraklıktan kaçınma, kuraklığa tolerans ve kuraklığın ertelenmesi stratejileridir.

Kuraklıktan kaçınma; kuraklık dönemi başlamadan önce yaşam döngüsünün tamamlanması durumudur. Bu durumda bitkiler kuraklık başlamadan önce hızlı bir büyüme ve gelişme göstererek yaşam döngülerini tamamlarlar. Kuraklık toleransında ise kuraklığa maruz kalan bitkilerin metabolizmalarını devam ettirmeleri söz konusudur. Tolerans strese karşı bitkinin dayanıklılık kapasitesini ifade etmektedir ve bunun için metabolizmada kısa ve uzun süreli ciddi değişiklikler meydana gelmektedir. Kuraklığın ertelenmesi ise stres altında bitkilerin mevcut su durumlarını koruma yeteneği olarak ifade edilir. Bu mekanizma için ise yaprak alanının küçülmesi, yaprakların mumsu bir tabaka ile kaplanması, derinlere doğru kök gelişiminin teşvik edilmesi gibi stratejiler ile kuraklık stresinin ertelenmesi sağlanmaktadır [6].

Kuraklıkla karşılaşan bitkilerin sıklıkla başvurdukları diğer bir yöntem ise hücre turgor basınçlarını (su potansiyel miktarı) değiştirerek ozmotik ayarlama yapabilmeleridir. Böylece bitki hücrelerinin kuraklık stresinden en az şekilde etkilenmeleri sağlanır [7]. Bunu, hücrelerinde su tutucu moleküller biriktirerek yapabilmektedirler. Bu su tutucu moleküllerden birisi siklitoller olarak adlandırılan halkalı yapılardır (Şekil1.3.). Çoklu hidroksi grubu içeren siklitoller karbonhidrat türevleridir. Bunların kuraklık sırasında biriktirdiği ve bitki hücrelerinin ozmotik potansiyellerini değiştirdikleri bilinmektedir [8]. Siklitoller su kaybını önlemenin yanı sıra fotosolunumun da önlenmesine yardımcı olabilmektedirler [5,9].



Şekil 1.3. Poliöl ve siklitollerin genel yapısal formülleri, Yancey, 2005

Kuraklığa maruz kalan bitkilerde meydana gelen diğer bir önemli değişiklik ise hormonal düzeyde meydana gelen değişikliklerdir. Kuraklık stresi sırasında ABA hormonunun miktarı artar. Kuraklık stresi ile birlikte oluşan düşük su potansiyeli altında kökte sentezi gerçekleştirilen ABA, köklerden ksileme aktararak yapraklara taşınır ve buralarda ilgili ABA reseptörlerine bağlanarak stomaların kapanmasına aracılık ederler. ABA, bekçi hücrelerdeki Ca^{+2} iyonunda artışa sebep olur ve bu artış stomaların kapanmasında etkin rol oynamaktadır.

ABA'nın reseptörlere bağlanmasından sonra hücre içerisinde birçok gen uyarılır ve aktif bir kapanma mekanizması gelişir. Stomaların açılıp kapanması kilit hücrelerinin şişmesi veya büzülmesi ile ayarlanır. Kilit hücrelerindeki ozmotik basıncın artması stomaların açılmasına neden olur. Bu açılma fotosentez için gerekli CO₂'in alınması için gereklidir fakat bu açıklıklardan yaklaşık olarak mevcut suyun %90'ı kaybedilir [10].

Çevresel streslere maruz kalan bitkilerde gen ve protein düzeyinde ciddi değişiklikler olur. Meydana gelen bu değişikliklerin tespit edilmesi, strese yanıtta aktif rol oynayan proteinlerin belirlenmesi karmaşık stres mekanizmalarının anlaşılması adına hayati ipuçları sağlar. Bu anlayışla genomik, transkriptomik ve proteomik gibi -omik yöntemler son zamanlarda stres fizyolojisi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

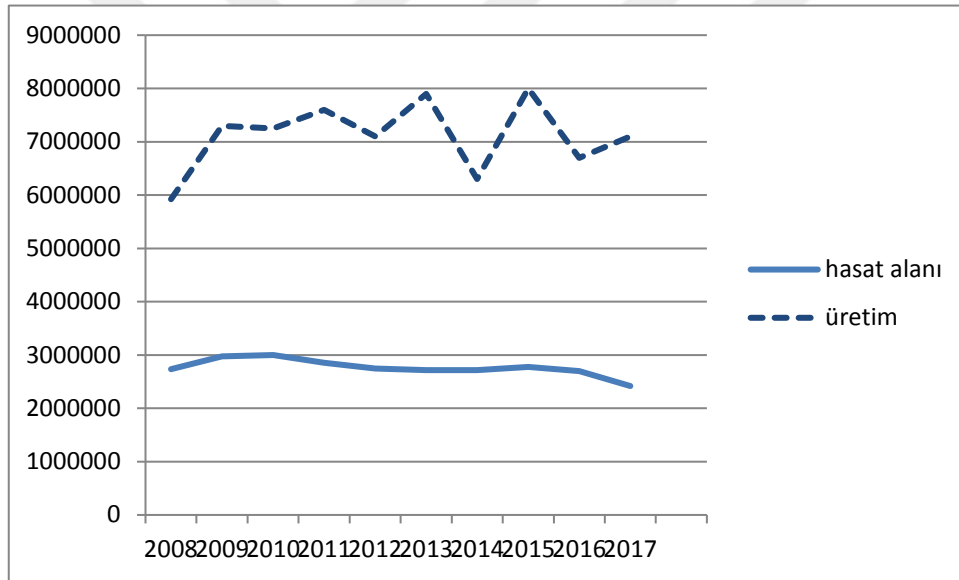
Bu çalışmanın temel amacı, kuraklık koşullarına maruz bırakılan arpa bitkilerinde siklitol uygulaması sonucunda biyokütle, ABA hormonu ve protein miktarlarında meydana gelen değişimleri inceleyerek, bu değişimlerin stres mekanizmasındaki rollerini belirlemektir. Elde edilen veriler kuraklık stresi altındaki bitkilerde siklitol uygulamasının tarımsal olarak uygulanabilir olup olmadığıyla ilgili ciddi ipuçları sağlamıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Arpa

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), dünyanın en eski ve en önemli tahıl bitkileri arasındadır. Yaklaşık olarak 10.500 yıl önce kültüre alındığı bilinmektedir. Yem, malt ve gıda sanayinde geniş bir kullanım sahasına sahip olduğundan dolayı ekonomik olarak oldukça önemli bir bitki türüdür[11]. Arpa tohumlarının protein içeriğinin yüksek olması onu çok iyi bir protein kaynağı haline getirmektedir [12]. Ülkemizde hayvan beslenmesinde, ham protein ihtiyaçlarının % 9.45'i, arpadan karşılanmaktadır [13].

FAO istatistik verilerine göre ülkemizde arpa ekim alanı ve üretim miktarına ait verilerin bulunduğu çizelgede özellikle üretim miktarlarında ciddi dalgalanmaların olduğu görülmektedir(Çizelge 2.1.). Bu dalgalanmaların en önemli nedenlerinden birisi çevresel streslerin meydana getirdiği kayıplardır [14].



Şekil 2.1. FAO istatistik verilerine göre 2008-2017 arasında hasat alanı ve üretimdeki dalgalanmalar

2.2. Kuraklık

Bitkilerin en iyi gelişimlerini gösterebilmeleri uygun ortam ve koşullara bağlıdır. Bu koşulların zaman içerisinde değişkenlik göstermesi bitkilerin gelişimlerini olumsuz yönde etkilemektedir[15]. Bitki gelişimini olumsuz yönde etkileyen bu faktörlere stres denmektedir. Stres faktörleri Levitt'e [2] göre biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [2]. Abiyotik stres faktörleri içerisinde bitkilerin büyüme ve gelişmelerini en çok etkileyen kuraklıktır [16]. Doğal iklimsel süreçlerin dışında hızla artan dünya nüfusu, bilinçsiz şehirleşme, insan kaynaklı

küresel ısınma ve orman tahribatları gibi durumlar kuraklığın şiddeti ve boyutlarını arttırmaktadır. Dünya da hızla artan nüfusa yönelik gelecekteki gıda talebinin kuraklığın etkilerini daha da arttırması muhtemeldir. Geçmiş yıllarda kuraklık büyük kıtlıklara neden olmuştur [16]. Bu nedenle yakın gelecekte kuraklık insanlık için çok daha büyük bir tehdit haline gelebilecektir. Meteorolojik bir olgu olan kuraklığın şiddeti öngörülebilir bir durum değildir [16,17]. Kuraklık stresine karşı bitkilerin geliştirdikleri direnç mekanizmalarını disiplinler arası çalışan bilim insanları, anlamaya çalışmaktadırlar, fakat ciddi bir başarı elde edebilmiş değildir [16,18].Günümüzde kuraklık kaynaklı ürün verimi kayıpları %70'lere kadar ulaşmış durumdadır.

Kuraklığa karşı bitki tarafından verilen en erken fenotipik cevaplardan birisi stomaların kapanmasıdır. Stomaların kapanması fotosentez için gerekli olan karbondioksitin alımını azaltır ve bunun sonucu olarak fotosentez sınırlanır. Stomaların kapanması sonucunda sadece içsel karbondioksit miktarı azalmaz bununla birlikte içsel oksijen miktarı artar. Bu durum oksijeni alternatif elektron alıcısı konumuna getirir ve Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) miktarının artmasına sebep olur [19]. Üzerinde eşleşmemiş elektron bulunan ROT oksitleyici ya da redükleyici bir ajan gibi davranarak kontrolsüz bağ oluşumlarına neden olur. Bu nedenle stres sırasında ROT üretiminin artması makromoleküller ve membranlarda hasarlara neden olabilmekte ve hücre ölümüne kadar uzanan bir sürecin başlangıcını oluşturabilmektedir. ROT miktarının artması bitkilerde mevcut olan antioksidan sistemi uyararak, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (AP), peroksidaz (PO) ve polifenol oksidaz (PPO) gibi enzimatik; flavonoid, karotenoid, tokoferol, glutatyon ve askorbat gibi enzimatik olmayan antioksidanların miktarının artmasına neden olur [20,21]. Böylelikle hasarı azaltmaya yönelik olarak ciddi bir cevap oluşturulmuş olur.

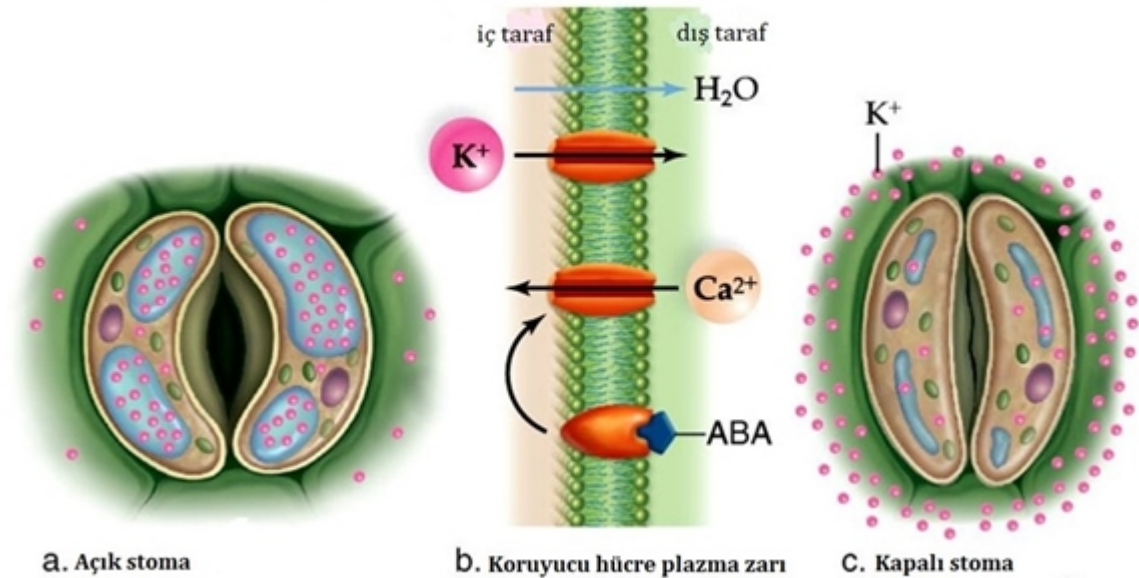
2.3.Siklitol

Kuraklık stresi ile birlikte hücre su potansiyeli ve buna bağlı olarak bitki turgoru düşer. Bu durum sitosol ve hücrelerarası matriksteki çözünmüş maddelerin artmasına yol açar [8]. Bitkiler kuraklık gibi stres faktörlerine maruz kaldıklarında osmolitler (uygun çözünenler) üreterek osmotik düzenleme sağlanır. En yaygın osmolitler prolin, şekerler, siklitoller ve glisinbetaindir [22]. Karbonhidrat türevi olan siklitoller polihidroksisikloalkanlar için kullanılan genel bir isimdir [23]. Konduritol, Quersitol ve inositol olarak 3 ana gruba ayrılırlar. Özellikle inositol türevlerinin fosforilenmiş formu olan inositol fosfat molekülleri hücre içi sinyal iletiminde görev alır ve stresin algılanmasını sağlayarak tolerans gelişiminde rol alır [24,25]. Bununla birlikte hücre içi osmotik potansiyeli arttırarak stres altında suyun korunmasına yardımcı olurlar. Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan siklitoller doğada bulunabilen doğal

ürünlerdir[24,25]. Siklitoller bütün bitkiler tarafından sentezlenir. Ancak sentez miktarı bitkinin tolerans derecesine göre değişkenlik gösterir[26].

2.4. Absisik Asit (ABA)

Bir bitki hormonu olan absisik asit (ABA) köklerde sentezlenerek ksilem yoluyla bitkinin diğer kısımlarına yollanmaktadır. Kuraklığa maruz kalan bitkilerde stomaların kapandığı bilinmektedir. Stoma kapanma mekanizmasında ise ABA bağımlı ve ABA bağımsız yolların olduğu tespit edilmiştir.(Şekil 2.1.) Büyük bir kısmı kökten sentezlenip taşınarak bekçi hücrelerdeki ABA resöptörlerine bağlanan ABA stomaların kapanması ile sonuçlanan bir dizi olayı başlatır. Absisik asit stomaların kapanmasını sağlayarak, suyun transpirasyonunu önlemektedir. Stomanın kapanması bitkinin üst organlarındaki gelişmeyi azaltarak suyun kökte kullanılmasına, kökün derinlere doğru inebilmesine ve daha fazla suya erişimine imkân sağlar [27].Bununla birlikte ABA'nın stres altında sinyal iletiminde de görev aldığı ve birçok mekanizmayı doğrudan etkilediği de bilinmektedir [28]. Kuraklık stresi ile karşılaşan bitkilerde absisik asit miktarı yapraklarda 40 kat artar, diğer organlarda bu artış daha azdır.



Şekil 2.2. ABA-stoma ilişkisi

2.5. Proteomiks

Bir organizmanın genomu tarafından kodlanan proteinlerin tamamı proteom, proteomun tüm bileşenlerini ya da belirli bir kısmını yapısal ve işlevsel olarak çalışan bilim dalı ise proteomik olarak tanımlanmıştır [29].

Bitkiler tarafından çevresel streslere karşı geliştirilen hücresel ve moleküler seviyelerdeki stratejilerin temelinde protein düzeyinde meydana gelen değişimler vardır [30]. Bu değişimleri anlayabilmek adına ciddi genomik ve transkriptomik çalışmalar yapılmıştır, ancak bir organizmada bulunan proteinlerin yapısı, işlevi, miktarı ve çeşidi sadece DNA dizisine bakılarak anlaşılmaz [29]. Bu nedenle zaman içinde elde edilen bu büyük verilerin proteomik çalışmalarla desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Proteomik çalışmaları sayesinde belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin miktarları, yapıları, yerleşimleri, modifikasyonları ve işlevleri ile ilgili geniş çapta bilgi alınabilir. Oldukça karmaşık olan proteomik analiz süreçleri tecrübe gerektirmektedir. Genellikle proteomik çalışmalarında proteinlerin izolasyonu ile başlayan süreç, elde edilen proteinlerin nitelik ve nicelik bakımından test edilmesi, kromotagrafik olarak ayrılmaları ve son olarak kimlik tanımlarının yapılması basamaklarını içermektedir.

Protein izolasyonu dikkat gerektiren zor bir basamaktır. Bunun için önce izolasyonu yapılacak olan protein grubunun bulunduğu dokunun parçalanması gerekmektedir. Doku parçalamak için çok fazla yöntem geliştirilmiş olsa da bitki proteomu çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntem; sıvı azot ile dondurulmuş olan dokuların bir havan ya da öğütücü yardımıyla parçalanmasıdır. Doku parçalandıktan sonra uygun tampon içerisine alınan proteinlerin kimlik tanımları yapılmaya kadar bozulmadan muhafaza edilmesi izolasyondaki diğer önemli bir husustur. Bu nedenle kullanılacak tüm tamponların soğuk olması büyük önem arz etmektedir. İzolasyon sırasında dokular parçalandıktan sonra genellikle uygun bir lizis tamponu içerisine alınırlar. Bu basamakta kullanılan lizis tamponunun proteinleri okside etmemesi, disülfid bağlarını kırmaması, proteazları etkisiz hale getirmesi beklenmektedir [32]. Bununla birlikte bitki hücrelerinde bolca bulunan kirleticilerin (fenolik bileşikler, pigmentler, organik asitler, terpenler, lipidler, nükleik asitler, iyonlar, polisakkaritler) ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir.

Protein izolasyonunun başarısı elde edilen protein miktarına bağlıdır. İzole edilen proteinlerin miktarının belirlendiği birçok yöntemlerden içerisinde en sık tercih edilen yöntemler; Lowry yöntemi [33], Bradford yöntemi [34], BCA yöntemi [35] ve Nano-drop ile ölçüm metodudur [36]. Her yöntemin protein miktarlarını belirleme mekanizmaları ve hassasiyetleri birbirinden farklıdır. Bunun için araştırmacıların izolasyon yöntemlerine en uygun olan miktar belirleme yöntemini ya da yöntemlerini seçmesi önerilmektedir. Bu işlem için genellikle en az iki yöntem ile protein miktarları belirlenmelidir.

Proteinlerin izolasyonundan sonra proteinlerin ayrılmaları sağlanmalıdır. Bu ayırmalarda genellikle proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayıran sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), moleküler ağırlık ve izoelektrik noktalarına göre ayıran iki boyutlu (2D) jel elektroforezi ve moleküler ağırlık ya da polaritelere göre ayıran sıvı kromatografisi (LC) tercih edilmektedir.

Elde edilen proteinler eğer jel üzerinde ayrılmışlar ise bu proteinlerin görünür hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için proteinlerin boyanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan birçok ticari boya vardır, bunlar içerisinde özellikle Commasie boyası yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kullanılan boyaların hassasiyetleri farklılık göstermekte birlikte temelde boyanın maliyeti bu çalışmalarda önemli seçim kriteri olmaktadır. Eğer çok hassas boyama gerektiren bir işlem varsa bunun için florasan işaretleyiciler kullanılmaktadır.



3. LİTERATÜR TARAMASI

Kuraklık stresi çok uzun zamandan beri çok yönlü olarak çalışılan bir konudur. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların literatür özeti incelendiğinde; kuraklık stresinin farklı bitki ve şiddetlerde meydana getirdiği değişimler açıklanmaya çalışılmıştır.

Kuraklık stresinin biyokütle üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaların literatür özeti incelendiğinde; Fazeli ve ark. [37] kuraklık stresi altında iki farklı susam çeşidinin yaprak ve köklerinde biyokütle miktarında meydana gelen değişiklikleri yaptıkları çalışmalarla belirlemişlerdir. Kuraklık stresi ile birlikte biyokütlenin azaldığını duyarlı türde bu azalmanın çok daha belirgin olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde; Gökhan Çamoğlu ve ark. [38] mısır bitkisinde benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Benlioğlu ve ark. [39] ise arpa bitkisinde tuz stresinin şiddetine paralel olarak biyokütlenin azaldığını rapor etmişlerdir.

Çalışma konularımızdan biri olan ABA hormonunun özellikle stres altında önemli görevleri olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur;

Fan ve Blake [40] kuraklık stresi ile birlikte ağaçsı bitkilerin yapraklarında ABA miktarının arttığını belirlemişlerdir. Özyurt ve Akça [41] mahlep bitkisinde benzer sonuçları bildirmişlerdir. Zhang ve ark. [42] ise yapraktan ABA uygulaması yaptıklarında bitkilerin stres altında daha iyi verim verdiklerini görmüş ve bunu ABA hormonunun stoma hareketlerini kontrol ederek, suyun daha verimli kullanılmasıyla mümkün olabileceğini belirtmişlerdir.

Pei ve ark. [43] ise ABA hormonu ile kalsiyum kanalları arasındaki etkileşimi ortaya koymuş ve bu durumun stoma kapanmasında önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda ABA seviyesinin artmasının sadece stoma kapanmasını etkilemediği bununla birlikte klorofil sentezinde azalmalar meydana getirdiği ve buna bağlı olarak kloroplastlarda yapısal ve işlevsel değişiklikler yarattığı rapor edilmiştir [44,45]. Bu durum ABA'nın kuraklık stresi sırasında fotosentez mekanizmasının düzenlenmesinde etkin rol oynadığı sonucuna işaret etmektedir. Losanka ve arkadaşları [46] kuraklığa maruz kalan arpa bitkisine ABA miktarının arttığını ve buna bağlı olarak fotosentetik hızın azaldığını belirlemişlerdir.

Öztürk [47] ABA miktarında meydana gelen artışların hücresel anlamda gen ifadelerini değiştirdiğini vurgulamış ve bu durumun metabolizmanın yeniden yapılandırılması için önemli olduğunu belirtmişlerdir [47]. ABA seviyesindeki artışların gen ifadeleri üzerinde yarattığı etkiler sonucunda hücre içinde çözücü proteinlerin birikimini arttırdığı, antioksidan aktivitesinin teşvik edildiği ve diğer enerji tüketim yollarını baskıladığı da yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [48,49]

Arpa bitkisi ile yapılan çalışmalarda ABA'nın stres altında prolin sentezini teşvik ettiği rapor edilmiştir [50, 51]. Bu durum kuraklık, tuzluluk gibi streslere maruz kalan bitkilerde suyun korunması adına oldukça önemlidir.

Liu ve ark. [52] yaptıkları çalışmada kuraklık stresi altında ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollar ile cevap oluşturulduğunu, ABA'nın özellikle diğer yolların işlevini de etkileyerek etkin kuraklık cevabının oluşması sırasında önemli roller oynadığını ortaya koymuşlardır.

Golec [53] kuraklık stresi altında özellikle transkripsiyonel düzenleme sırasında ABA'nın aktif rol oynadığını ve bu işi yaparken diğer hormonlarla etkileşim halinde olduğunu göstermiştir. Meydana gelen bu etkileşimin kuraklığın erken safhalarında verilen fenotipik cevaplarda önemli olduğunu vurgulamıştır.

Çalışmamızdaki diğer bir önemli başlık bitkilere siklitol uygulamasıdır, siklitol ya da türevlerinin bitkilerdeki rolleri ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar literatürde yer almaktadır.

Sambe ve ark. [54] yaptıkları çalışmada myo-inositolün hücre içerisinde artmasının bitkinin stres toleransını arttırdığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Vernon ve ark. [55] bütün bitkisinde stres toleransı ile hücresel siklitol içeriği arasında doğrusal bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir.

Çevik ve ark. [11] yaptıkları çalışmada nohut bitkilerine dışsal siklitol türevlerinin uygulanmasıyla kuraklık stres toleransının arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada özellikle antioksidan sistem kapasitesinin uygulamayla birlikte yükseldiği ve bu durumun stresle başa çıkabilmek adına bitkiye büyük yarar sağladığı vurgulanmıştır. Sairam ve Saxena, [56] buğday genotipleri ile yaptıkları çalışmada kuraklık toleransı yüksek olan genotiplerin antioksidan kapasitelerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer olarak Çevik ve Ünyayar [37] iki farklı nohut türünde yaptıkları çalışmada kuraklık toleransı ile antioksidan enzim aktiviteleri arasında pozitif bir korelasyon tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar siklitol uygulamasıyla birlikte artan antioksidan kapasitenin özellikle stres altında bitkiye büyük yararlar sağlayacağını göstermektedir.

Yıldızlı ve ark. [57] tarafından yapılan çalışmada bir siklitol türeviden olan myo-inositolün kuraklık stresi altındaki biber bitkilerine dışsal olarak uygulanmasının özellikle reaktif oksijen türlerinin miktarının azalmasını sağladığı bununla birlikte hücre su durumunu da koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle kuraklık stresinin negatif etkilerinin myo-inositol uygulamasıyla birlikte azaltıldığı sonucuna varmışlardır.

Bitkilerde gerçekleştirilen ve abiyotik streslerin karmaşık mekanizmalarını anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalar içerisinde proteomik önemli bir alanı oluşturmaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmaların büyük kısmında, stres altında ve stressiz koşullarda yetiştirilen bitkilerden izole edilen proteomlar karşılaştırmakta ve meydana gelen farklılıklardan yararlanılarak mekanizma anlaşılmasına çalışılmaktadır.

Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde çok sayıda proteinin ifadesinde değişiklikler meydana gelir ayrıca birçok protein de modifikasyona uğrar. Oldukça zahmetli ve zor bir çalışma olan proteomik analizlerde araştırmacılar yüzlerce protein lekesini analiz etmek

durumunda kalırlar. Bu çerçevede yapılan çalışmalar incelendiğinde; Hajheidari ve ark. [58] kuraklığa maruz kalan buğday bitkileri üzerinde yaptıkları proteomik çalışmalarda 650 protein lekesi belirlemişlerdir. Bunlar içerisinde ise 121 proteinin ifadesinin kuraklıktan etkilenecek değiştiğini tespit etmişlerdir. Salekdeh ve ark. [29] ise kuraklık stresinin pirinç bitkisinde meydana getirdiği protein ifade değişimlerini belirledikleri çalışmalarında 1000'den fazla protein lekesini analiz etmişlerdir. Bunlar içerisinde 42 tanesinin ifadesinde değişiklikler olduğunu belirlemişlerdir.

Deeba ve ark. [31] pamuk bitkisiyle yaptıkları çalışmada 550 protein lekesini analiz etmişler ve ifadesi değişen proteinlerin büyük bir kısmının fotosentez mekanizmasıyla ilişkili olduğunu belirlemişler ve kuraklık stresinin pamukta fotosentez mekanizmasını negatif olarak etkilediğini rapor etmişlerdir. Bu durumun bitki verimini ciddi derecede düşürdüğünü vurgulamışlardır.

Klaudia ve ark. [59] *Hordeum vulgare* L bitkisinde kuraklık stresinin kök ve yaprak proteomunda meydana getirdikleri değişimleri incelemişlerdir. Çok sayıda proteinin ekspresyon düzeyi kuraklık stresi ile birlikte değişmiş ve ifadesi değişen proteinlerin daha çok savunma, fotosentez ve karbon mekanizmasında yer alan proteinler olduğunu rapor etmişlerdir.

Mohammadi ve ark. [60] ise kuraklık stresi ile birlikte fasulyede enerji metabolizmasının ciddi derecede etkilendiğini bildirmişlerdir. Çevik ve ark. [61] ise kuraklığa toleransları farklı olan iki farklı nohut türünü kuraklık stresine maruz bırakarak proteom desenlerini karşılaştırmış fotosentez, enerji ve antioksidan sistem ile ilişkili proteinlerin miktarlarında ciddi değişiklikler meydana geldiğini göstermişlerdir.

Tüm bu sonuçlar kuraklık stresinin fotosentezden, antioksidan savunma sistemine, enerji metabolizmasından biyosenteze kadar birçok mekanizmayı doğrudan etkilediğini göstermektedir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmamızda Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğünden elde edilen *Hordeum vulgare L*'e ait tohumlar kullanıldı. Erzurum, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakùltesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr.Mehmet Serdar GÜLTEKİN tarafından sentezlenen *dl-cyclopentane-1,2,3-triol* (20 µM) çözelti hali uygulamalar için kullanıldı. Tohumlar torf/perlit/gübre (3:1:1) içeren saksılara ekildi. Bitkiler, 22/16°C (gün/gece) sıcaklık, % 60 ± 5 oransal nem ve 150 µmol foton m²/sn (gün/gece 12/12 s) koşullarında iklimlendirme odasında yetiştirildi. Bitkiler 10 gün büyütüldükten sonra kuraklık stresi başlatıldı. Kuraklık stresinin birinci gününden itibaren kuraklık süresi boyunca saksılardaki bitkilerin yarısının yapraklarına tamamen ıslanana kadar *dl-siklopentan-1,2,3-triol* sulu çözelti (tween 20 içerir) püskürtülmüştür. Uygulama yapılmayan bitkilerin yapraklarına da distile su püskürtüldü. Siklitol uygulamasının 1. ve 3. günlerinde bitkiler hasat edilerek; biyokütle ve ABA analizi, 3. günü için proteomiks çalışmaları yapıldı. Bunun için hasat edilen yapraklar sıvı azotta dondurulduktan sonra analiz yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

4.1. Ortalama Biyokütle Analizi

Ortalama biyokütle analizi için 1, 3 ve 5. günlerde eşit boylarda 10'ar tane bitki alınarak tartıldı ve taze ağırlıkları kaydedildi. Daha sonra bu bitkiler 65 °C'de 58 saat etüvde tutularak kurutuldu ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları kaydedildi.

4.2. Absisik Asit (ABA) analizi:

ABA ekstraksiyonu Cloud-Clone Kit protokolüne (Cloud-Clone Corp. ELISA KIT-CEB218Ge) göre yapıldı. Bunun için taze yaprak (1 g) soğuk metanolde (%80) öğütüldü. Homojenat, 24 saat boyunca 4 °C'de karıştırıldı ve süzülerek süpernatant kısmı toplandı. Ardından her tüp üzerine Metanol (% 80, 2 mL) ilave edildi ve 4 °C'de 1 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra 2000 g 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı. Süpernatantlar döner buharlaştırıcıda yaklaşık 2 mL kalana kadar buharlaştırıldı. Örneklerle petrol eteri (1 mL) ilave edilerek karıştırıldı ve metanol toplandı. Metanol döner buharlaştırıcıda buharlaştırılarak uzaklaştırıldı ve daha sonra elde edilen çözeltiler ABA saptamasında kullanıldı.

4.3. Protein Analizleri

4.3.1. Protein İzolasyonu

Kuraklık uygulamasının 3. gününde örnekler hasat edilerek hızlı bir biçimde sıvı azot içerisine alındı ve analiz gününe kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Protein izolasyonu Kim ve ark. [62] göre, 3 biyolojik tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Bu yöntemle göre;

- -80 °C'de dondurucuda saklanan yaprak örneklerinden her bir grup için 3 g alınarak sıvı azot içerisinde dondurulmuş haznelere aktarıldı ve yaprak örneklerinin üzerine 300 mg PVP tartılarak eklendi.
- Yaprak örnekleri öğütücüde (Retsch, MM400) iyice toz haline gelene kadar parçalandı ve üzerlerine lizis tamponu (MgNP40, 7,5 mL/1g) konuldu.
- Lizis tamponundaki örnekler buz üzerinde 15-20 dakika bekletildikten sonra santrifüj (3.000 rpm'de 15 dk +4 °C) edilerek süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı ve üzerine %50 PEG çözeltisi eklendi.
- Tekrar buz üzerine alınan tüpler ara ara vortekslenerek 30 dk bekletildi ve ardından 12.000 rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alınarak üzerine soğuk aseton eklendi ve örnekler bir gece -20 °C'de bekletildi.
- Ertesi gün örnekler santrifüj edilerek (10 dk +4 °C'de 14.000 rpm) pellet kısımları alındı ve üzerlerine soğuk aseton eklendi ve yine tüpler -20 °C'de 60 dk bekletildi bu işlem pellet tamamen beyazlaşana kadar tekrar edildi.
- Elde edilen protein çöktürmesinin üzerine çözündürme solüsyonu eklenerek proteinler çözüldü ve Lo-Bind tüplerine alınarak -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

4.3.2 Protein Konsantrasyon Tayini

İzole edilen protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlendi.

4.3.3 İzole Edilen Proteinlerin Elektroforetik Ayırımı

4.3.3.1. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

Protein örnekleri %12'lik SDS – PAGE için jelle yüklendi. (%4'lük yığılma ve %12'lik ayırma). Her grup için 1 µL örnek, 10 µL yükleme boyası, 4 µL ultra saf su küçük bit tüp içerisine konularak karıştırıldı. Daha sonra kaynar suda 5 dakika bekletilen tüpler kısa süre sonra buz üstüne alındı. Tüplerden alınan karışımlar toplam 15 µL hacimde kuyucuklara yüklendi ve yürütüldü. Jeller metanol/asetik asit/su (40:10:50) karışımında bir saat fikse edildikten sonra, Blue Silver Commasie Boya ile boyandı. Bu boyanan jellerin her biri steril bir kap içerisine konularak tüm jeli kapatacak kadar üzerine su konuldu. Çalkalayıcı üzerine bırakılan kapların

içindeki jellerin 24 saat süre ile renklerinin açılması beklendi. Rengi tamamen açılan jeller görüntüleme cihazı içinde fotoğraflandı.

4.3.3.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi

17 cm'lik IPG (pH 5-8 ReadyStrip, BioRad) şeritleri 2D analizleri için kullanıldı. Bu analizler için aşağıdaki işlem basamakları takip edildi.

1. 2D rehidrasyon tamponu ile izole edilen protein örneklerinden 200 µg karıştırılarak içerisine %1 Amphylote ve %1 TBP eklendi ve odaklama kaseti içine yerleştirilerek 50 µA/IPG akım uygulandı.
2. Akım uygulaması başladıktan 30 dakika sonra şeritler üzerine mineral yağ ilave edilerek bir gece boyunca rehidrasyona bırakıldı.
3. Ertesi gün proteinler üç aşamalı bir program ile odaklandı.
4. 1 (S1: 250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı hızlı, S3: 10.000 volt/IPG Lineer).
5. Ardından şeritler 30 dakikalık sürelerle tampon I ve tampon II içerisinde yıkandı.
6. Elde edilen şeritler SDS poliakrilamid jellere (%12) bu şeritler yerleştirilerek ikinci boyutta (2D) ayırımı sağlandı. Elektroforez işleminden sonra jeller %10 asetik asit ve %40 metanol içerisinde bir saat bekletildi. Hemen ardından SyproRuby (BioRad) boyası içerisinde gece boyu boyandı.

4.3.3.3. 2D Jellerinin Görüntülenmesi, Protein Leke Analizi ve Leke Kesimi

Boyanan jeller dikkatli bir şekilde alınarak görüntülendi ve protein leke analizleri yapıldı. Bu görüntüleme ve protein leke analizi aşağıdaki sıralama ile yapılmıştır.

1. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad, USA) ile uygun ışık kaynağı, filtreler kullanılarak yapıldı.
2. Quantity One programı (BioRad, USA) kullanılarak jellerin ilk değerlendirmeleri yapılarak proteinlerin leke kaliteleri gözlemlendi. Analiz için uygun boyutlarda görüntüler saklandı.
3. PDQuest Advanced programı (BioRad, USA) ile protein lekelerinin analizi yapılarak jellerin karşılaştırması yapıldı.
4. Tanımlama için uygun olan protein lekelerinin kesimi Lekekesim robotu (BioRad) ile yapıldı.

4.3.3.4. Jel İçi Tripsin Kesimi ve MALDI TOF/TOF MS Analizi

In-Gel Tryptic Digestion Kit, Thermo Scientific yöntemi ile kesilen her bir protein lekesi için jel içi triptik kesim yapıldı. ABI Sciex'ın MALDI TOF/TOF 5800 serisi cihazı kullanılarak tanımlamaları yapılan peptidler jel matriksinden 5µL %50 aseto nitril (ACN) ve %0,1 trifluoro asetik asit (TFA) ile özütlenerek, C18 ZipTip pipet uçları kullanarak (Millipore) %0,1 TFA ile 2µL'ye konsantre edildi. Peptidler, 0,8 µL örnek 0,2 µL matriks solüsyonu (%50 ACN ve %0,1 TFA içerisinde 10 mg/mL R-siyano-4-hidroksisinamik asit) ile karıştırıldı. Daha sonra MALDI plakası üzerine yerleştirilerek eksternal (dışsal) veya internal(içsel) kalibrant kullanılarak MALDI kalibrasyonu yapıldı. Her bir spektrum için yaklaşık 200 lazer vuruşu kullanılarak tüm spektrumlar (m/z), MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

4.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi STATISTICA 13.3 paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Uygulamalar arasındaki istatistiksel farklılıklar Duncan's multiple range tests ile hesaplandı ($P < 0.05$).

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

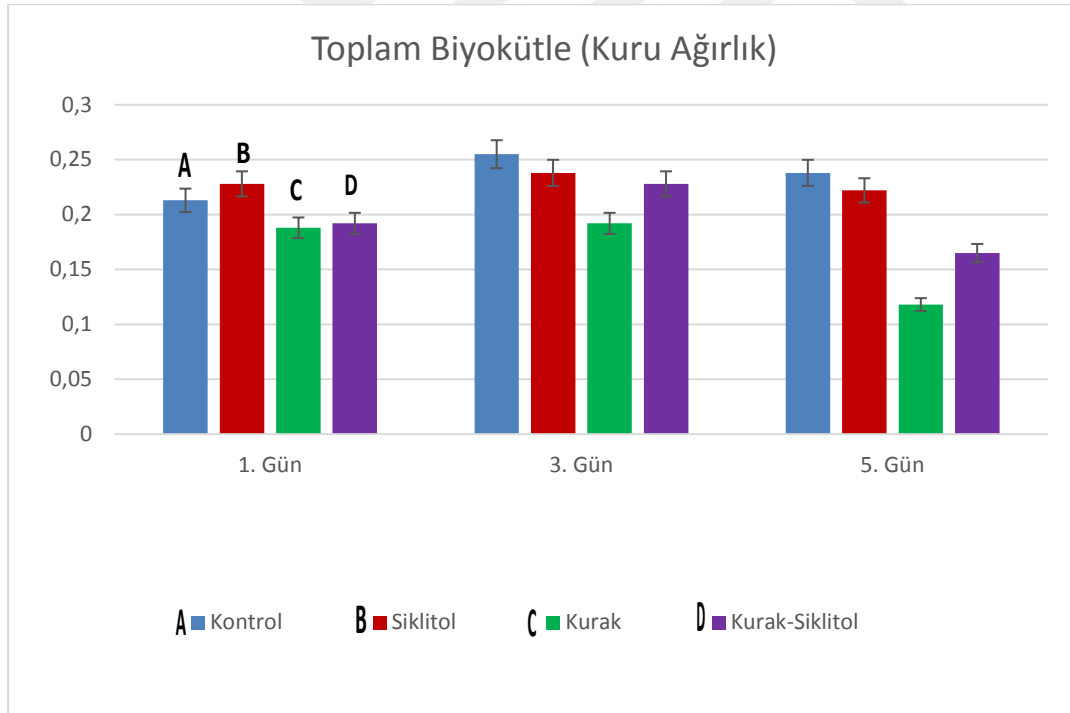
5.1. Bulgular

5.1.1. Toplam Biyokütlede Meydana Gelen Değişimler

Kuraklık stresi bitkilerde toplam biyokütleyi azaltmıştır. Özellikle kuraklık stresinin 3 ve 5. gününde bu azalış çok daha belirgindir. Bununla birlikte sıklitol uygulaması gerek kontrol gerekse kurak gruplarda toplam biyokütleyi arttırmıştır.(Şekil 5.1.)(Grafik 5.1.)



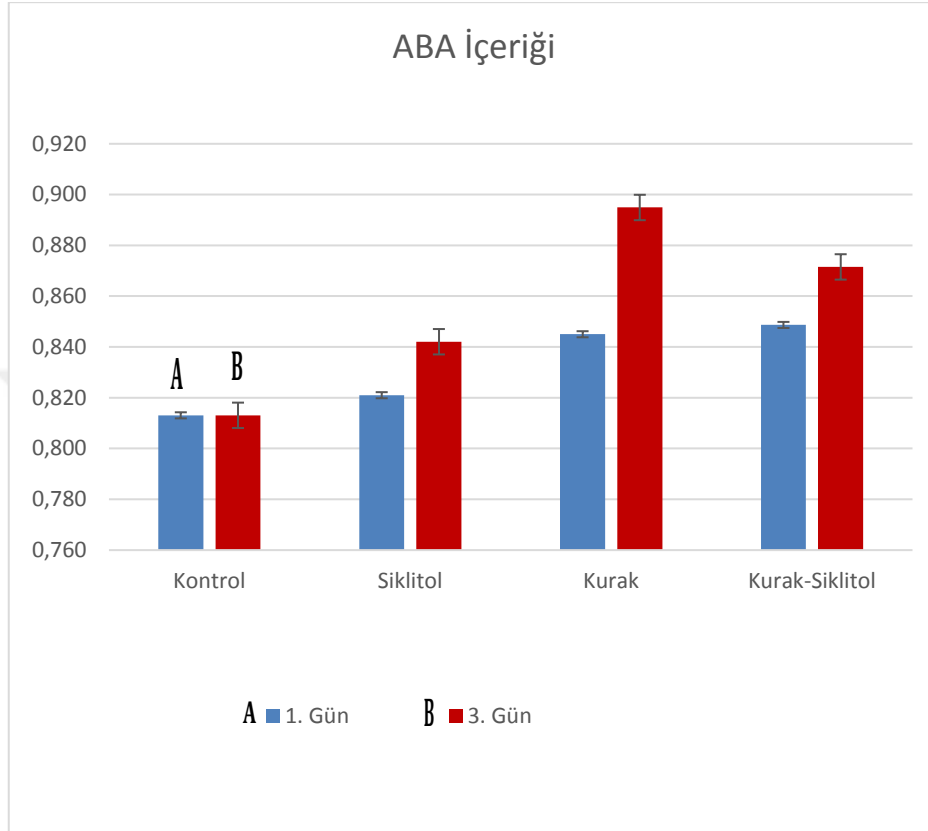
Şekil 5.1. Bitkilerin genel görünüşü



Şekil 5.2. Ortalama biyokütle kuru ağırlık miktarındaki değişim

5.1.2. ABA Seviyesindeki Değişimler

Kuraklık stresi ile birlikte özellikle 3. günde ABA miktarının arttığı belirlenmiştir (Grafik 5.1.2.). Siklitol uygulamasıyla birlikte ABA miktarı kuraklık stresi uygulanan grupta azalmıştır.

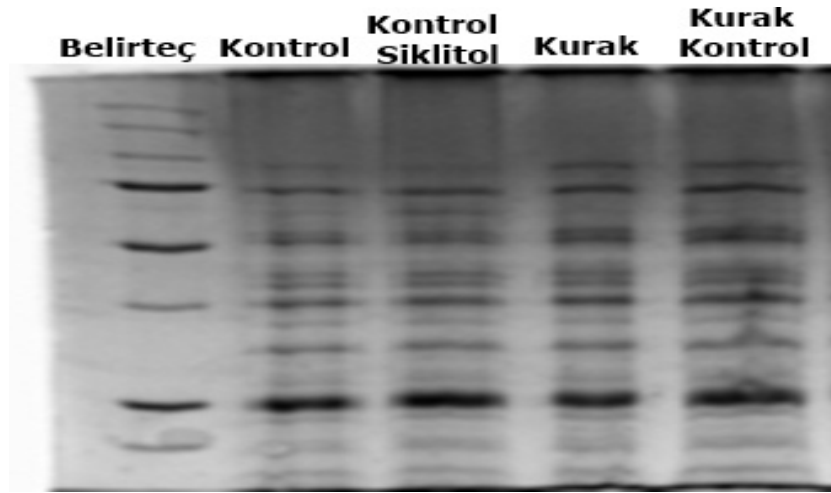


Şekil 5.3. Stresin birinci ve üçüncü günlerinde ABA içeriği

5.1.3. Protein Analizleri

5.1.3.1 SDS-PAGE Analizleri

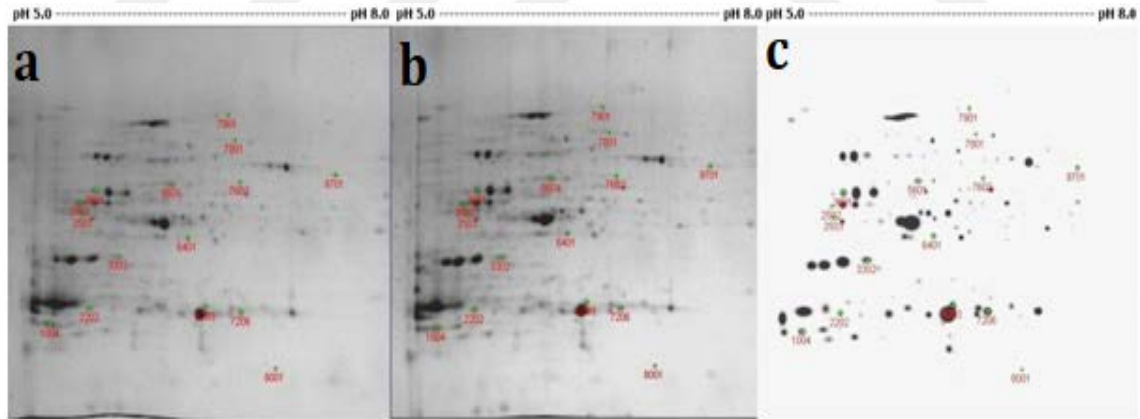
Protein izolasyonunun ardından elde edilen örnekler 1 boyutlu elektroforezde (%12'lik SDS-PAGE) yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 5.1.3.). Jel görüntüsünden de anlaşıldığı üzere, protein izolasyonu başarılı olmuş ve izole edilen protein miktar ve kalitesi sonraki analizleri yapmaya uygun bulunmuştur.



Şekil 5.4. Proteinlerin elektroforezde yürütüldüğü görüntü

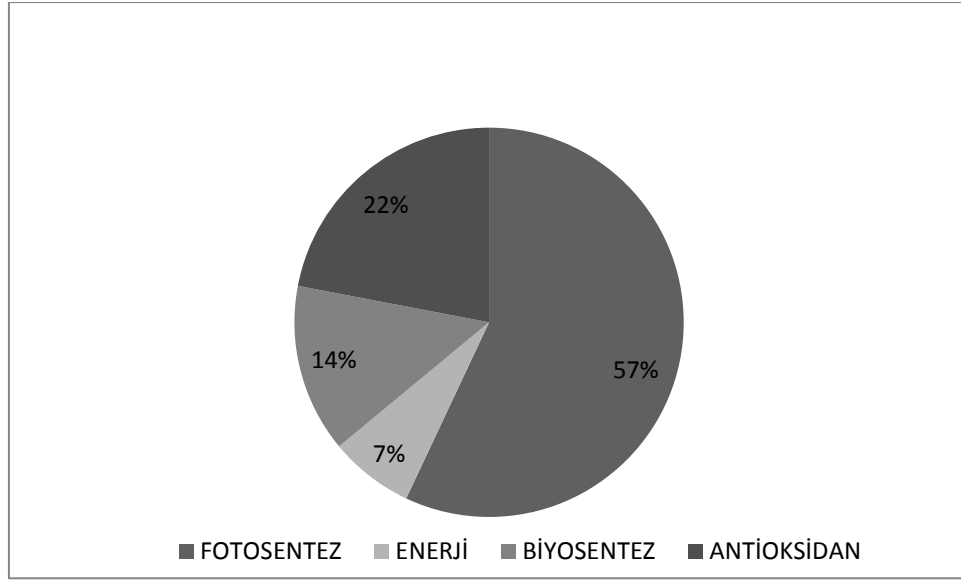
5.1.3.2. 2D Jel Elektroforezi Analizleri

Kuraklık stresi altındaki Arpa bitkilerinde siklitol uygulamasının meydana getirdiği proteom değişimlerinin incelenebilmesi için 2-DE elektroforetik ayrımı ve devamında ABSCIEX MALDI-TOF/TOF-5800 cihazı kullanılarak kütle spektrometresinde protein tanımlamaları yapılmıştır. (Çizelge 5.1, Çizelge 5.2). Yapılan analizler sonucunda kontrol bitkilerinde yaklaşık olarak 500 protein lekesi belirlenmiş ve bu protein lekeleri içerisinde 15 tanesinin ifadesinde değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 5.1.4.).

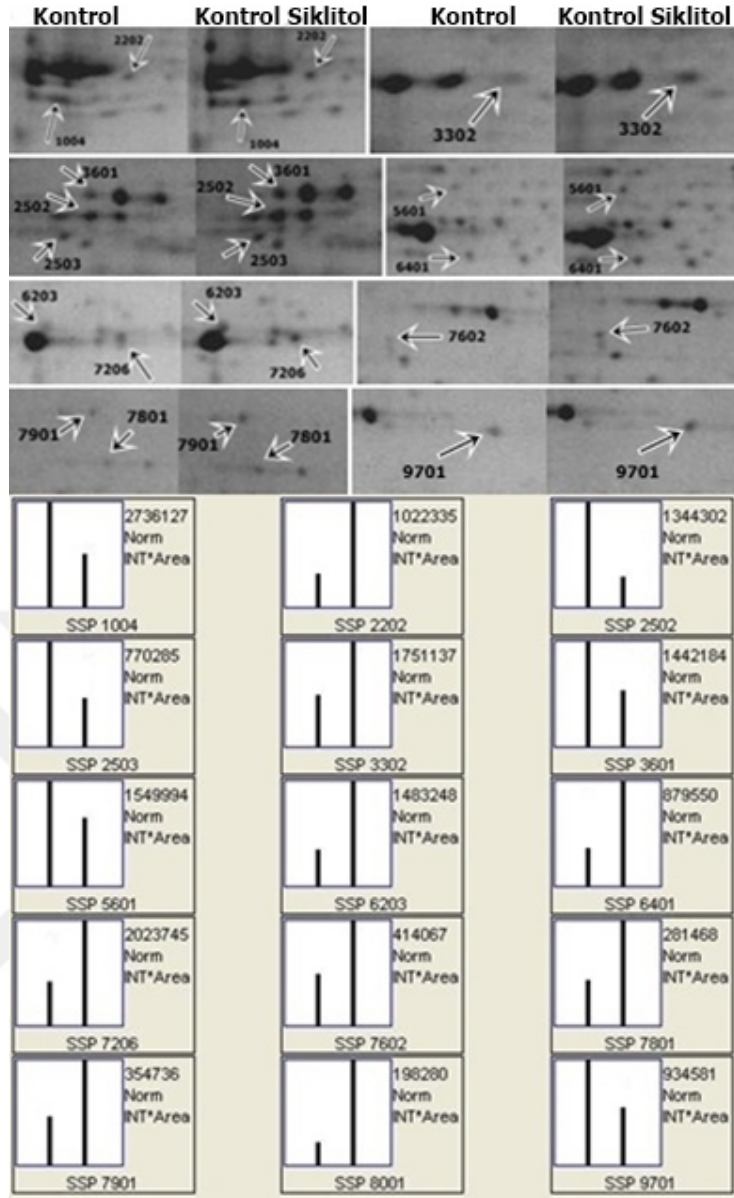


Şekil 5.5. a) Kontrol şartlarındaki *Hordeum vulgare* bitkilerine ait protein lekelerinin 2D-sanal jel görüntüleri b) Siklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri c) İki grubun karşılaştırılması.

Kontrol bitkilerinde 3. günde siklitol uygulamasıyla proteinlerden 9 tanesinin ifadesi artarken 6 tanesinin ifadesi azalmıştır. İfadesi değişen proteinlerin büyük bir kısmı fotosentez mekanizması (% 57) ile ilgili proteinler olurken, onu sırasıyla antioksidan, biyosentez ve enerji mekanizmalarıyla ilişkili proteinler takip etmiştir (Şekil 5.1.5.).



Şekil 5.6. Kontrol bitkilerinde 3. gün Siklitol uygulamasıyla birlikte ifadesi değişen proteinlerin işlevleri



Şekil 5.7. Kontrol şartlarındaki *Hordeum vulgare* bitkilerinde siklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri ve ifade değişim oranları

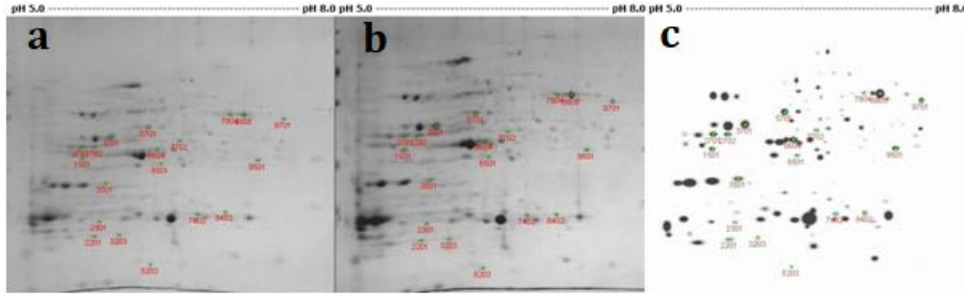
Tablo 5.1. Siklitol uygulamasıyla, 3.gün kontrol bitkilerinde ifadeleri değişen protein listesi

Kontrol-Kontrol Siklitol-3.Gün									
Spot ID	Belirlenen protein	Swissprot Numarası	Protein Skoru	Eşlenen Peptid Sayısı	% Eşleşen Dizi	Protein Kütlesi	pI	Lokasyon	Değişiklik
1004	2-Cys Peroksiredoksin BAS1 <i>H. vulgare</i>	BAS1A_HORVU	444	18	55	23284	5,48	Kloroplast	Azaldı
2202	20 kDa Şaperonin <i>Populus euphratica</i>	CH10C_POPEU	88	2	18	5466	4,69	Kloroplast	Arttı
2502	Fosforibulokinaz <i>Triticum aestivum</i>	KPPR_WHEAT	488	21	26	45113	5,72	Kloroplast	Azaldı
2503	Fosforibulokinaz <i>Triticum aestivum</i>	KPPR_WHEAT	378	30	48	45,113	5.72	Kloroplast	Arttı
3302	Oksijen oluşumunu arttıran protein 1S. <i>tuberosum</i>	PSBO_SOLTU	181	12	24	35367	5,84	Kloroplast	Arttı
3601	Fosfoglisarat kinaz <i>Triticum aestivum</i>	PGKH_WHEAT	453	20	37	49809	6,58	Kloroplast	Azaldı
5601	S-adenozilmetiyonin sentaz 3 <i>Hordeum vulgare</i>	METK3_HORVU	503	20	39	42739	5,51	Sitozol	Azaldı
6203	Ribozom-geri dönüşüm faktör <i>Oryza sativa</i>	RRFC_ORYSI	142	11	29	29634	9,35	Kloroplast	Arttı

Tablo 5.1. (devamı)

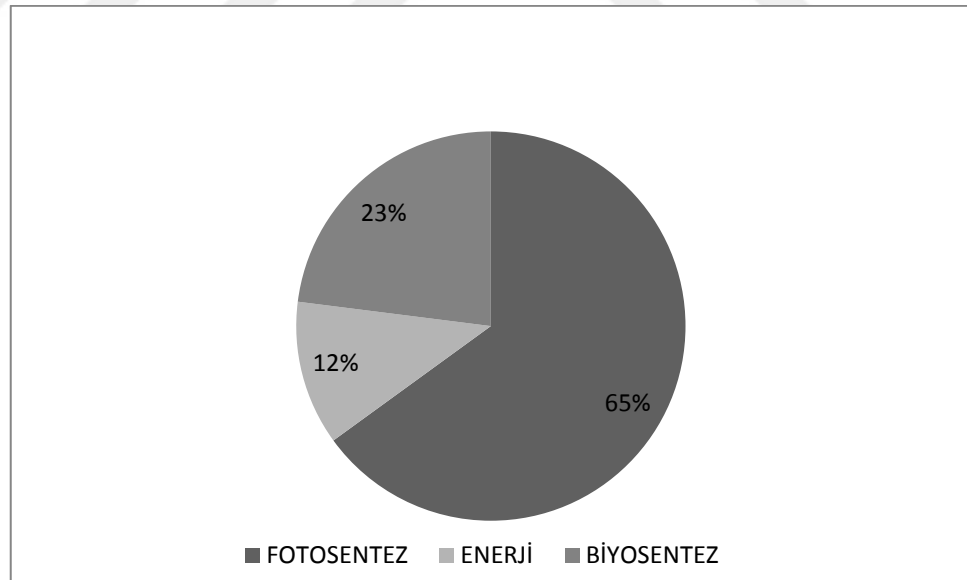
6401	Ferredoksin-NADP redüktaz <i>Vicia faba</i>	FENR_VICFA	105	13	32	40553	8,7	Kloroplast	Arttı
7206	Karbonik anhidraz <i>H.Vulgare</i>	CAHC_HORVU	180	13	27	35052	8,93	Kloroplast	Arttı
7602	Glutamil-tRNA redüktaz <i>H.Vulgare</i>	HEM11_HORV U	38	8	11	57616	8,69	Kloroplast	Arttı
7801	Ferredoksin-nitrit redüktaz <i>Oryza sativa</i>	NIR_ORYSJ	61	7	8	66101	6,83	Kloroplast	Arttı
7901	Putative sitokrom c oksidaz PS17 <i>Pinus strobes</i>	PS17_PINST	48	4	100	1707	9,63	Mitokondr i	Arttı
8001	Putative LRR reseptör kinaz PS16 <i>Pinus strobes</i>	PS16_PINST	40	2	100	870	9,63	Sitozol	Arttı
9701	Maturaz <i>Ephedra sinica</i>	MATK_EPHSI	48	9	4	64340	9,64	Kloroplast	Arttı

Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde yaklaşık olarak 550 protein lekesi belirlenmiş ve bu protein lekeleri içerisinde 17 tanesinin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 5.1.7.).

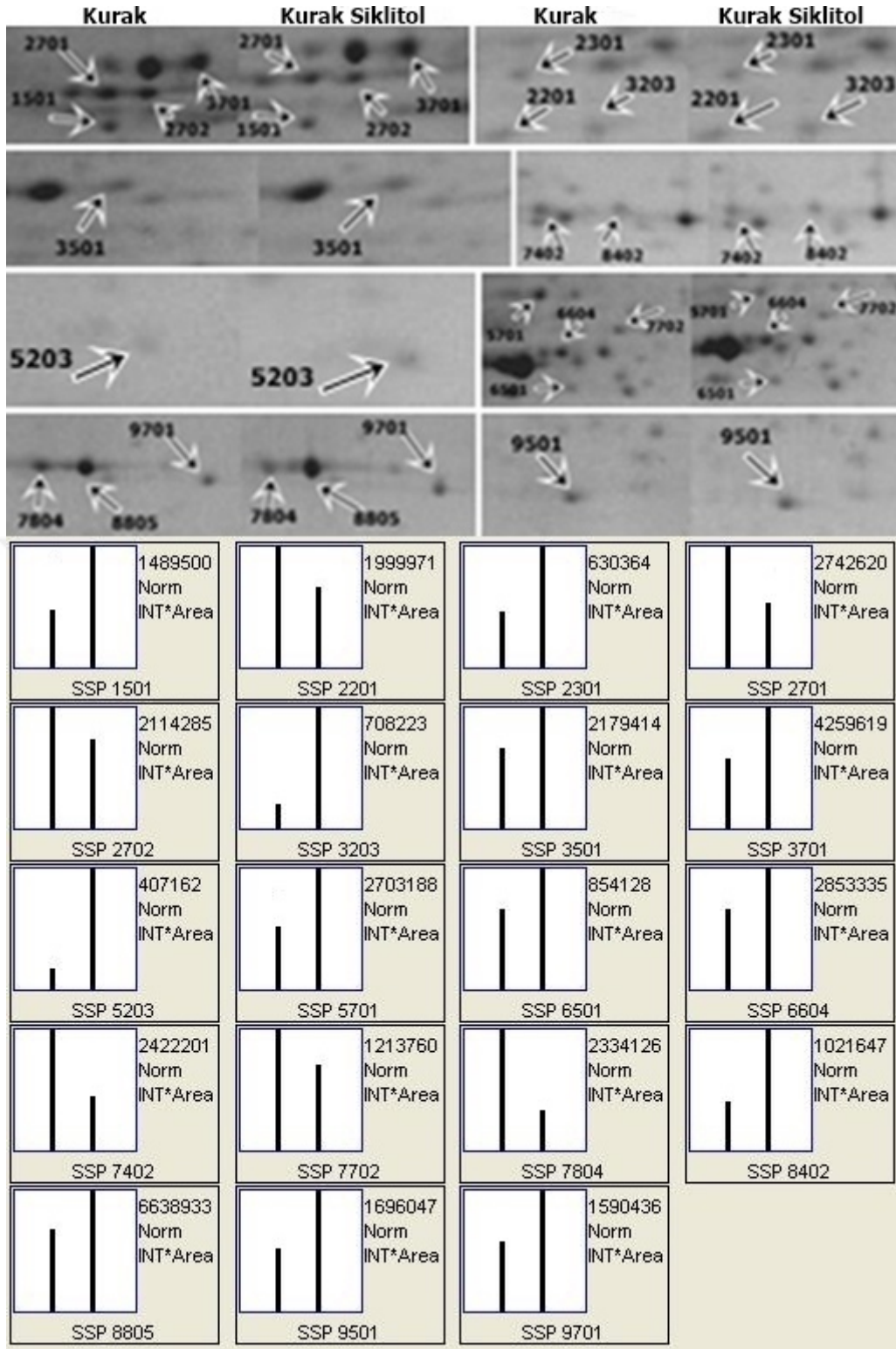


Şekil 5.8. a) Kuraklık altındaki *Hordeum vulgare* bitkilerine ait protein lekelerinin 2D-sanal jel görüntüleri ve b) Siklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri c) İki grubun karşılaştırılması.

Kuraklık stresi altındaki bitkilerde siklitol uygulamasıyla birlikte 16 proteinin ifadesi artarken 1 tanesinin ifadesi azalmıştır. İfadesi değişen proteinlerin büyük bir kısmı yine fotosentez mekanizması ile ilgili proteinler olurken, onu sırasıyla biyosentez ve enerji mekanizmalarıyla ilişkili proteinler takip etmiştir (Şekil 5.1.8.).



Şekil 5.9. Kuraklığa maruz bırakılan bitkilerde Siklitol uygulamasıyla birlikte ifadesi değişen proteinlerin işlevleri



Şekil 5.10. Kuraklık altındaki *Hordeum vulgare* bitkilerinde siklitol uygulamasıyla birlikte ifade farklılıkları oluşan protein lekeleri ve ifade değişim oranları

Tablo 5.2. Siklitol uygulaması ile 3. gün kurak bitkilerinde ifadeleri değişen protein listesi

Kurak-Kurak Siklitol – 3.Gün									
Spot ID	Belirlenen protein	Swissprot Numarası	Protein Skoru	Eşlenen Peptid Sayısı	% Eşleşen Dizi	Protein Kütlesi	pI	Lokasyon	Değişiklik
1501	Kinon oksidoredüktaz At1g23740A. <i>Thaliana</i>	KON923_LACCA	144	7	12	40961	8,46	Kloroplastik	Arttı
2201	Klorofil a-b bağlayıcı protein <i>Hordeum vulgare</i>	CB121_HORVU	129	9	14	26447	5,84	Kloroplastik	Azaldı
2301	Klorofil a-b bağlayıcı protein 8 <i>S. lycopersicum</i>	CB13_SOLL	119	6	13	29344	8,96	Kloroplastik	Arttı
3203	Putative LRR reseptör kinaz PS16 <i>Pinus strobes</i>	PS16_PINS	31	2	100	870	9,63	Sitozolik	Arttı
3501	Oksijen oluşumunu arttıran protein 1 <i>S. tuberosum</i>	PSBO_SOLTU	197	15	26	35367	5,84	Kloroplastik	Arttı
3701	Fosfoglisarat kinaz <i>Triticum aestivum</i>	PGKH_WHEAT	500	22	29	49809	6,58	Kloroplastik	Arttı
5203	Putative sitokrom c oksidaz PS17 <i>Pinus strobus</i>	PS17_PINS	39	3	100	1707	9,63	Mitokondriyal	Arttı

Tablo 5.2. (devamı)

5701	S-adenozilmetiyonin senteaz <i>3Hordeum vulgare</i>	METK3_H ORVU	420	26	40	42739	5,51	Sitozolik	Arttı
6501	Ferredoksin-NADP redüktaz <i>Pisum sativum</i>	FENR1_PE A	169	12	23	40169	8,56	Kloroplastik	Arttı
6604	Malat dehidrogenaz <i>Zea mays</i>	MDHC_MA IZE	288	17	39	35567	5,77	Sitoplazmik	Arttı
7402	Karbonik anhidraz <i>Hordeum vulgare</i>	CAHC_HO RVU	386	20	39	35052	8,93	Kloroplastik	Arttı
7702	Fosfogiliserat kinaz <i>Triticum aestivum</i>	PGKY_WH EAT	200	15	29	42096	5,64	Sitozolik	Arttı
7804	Rubiscobüyük altbirim <i>Triticum aestivum</i>	RBL_WHE AT	559	36	44	52817	6,22	Kloroplastik	Arttı
8402	Karbonik anhidraz <i>Hordeum vulgare</i>	CAHC_HO RVU	119	10	21	35052	8,93	Kloroplastik	Arttı
8805	Rubisco büyük altbirim <i>Triticum aestivum</i>	RBL_WHE AT	550	33	46	52817	6,22	Kloroplastik	Arttı
9501	Malat dehidrogenaz <i>Fragaria ananassa</i>	MDHM_FR AAN	103	11	20	35600	8,72	Mitokondriyal	Arttı
9701	Kalsiyum bağlayıcı protein <i>CML42A. thaliana</i>	CML42_AR ATH	157	7	19	21134	4,59	Sitozolik	Arttı

5.2. TARTIŞMA

Aktif hareket edemeyen bitkiler yaşamları boyunca çevresel stres etmenleri ile karşılaşmaktadırlar. Bitkilerde ciddi verim kaybına neden olan bu stres etmenleri; biyotik ve abiyotik stres etmenleri olarak iki büyük gruba ayrılmaktadır [63]. Dünyada meydana gelen doğal olmayan hızlı değişimler özellikle abiyotik stres etmenlerinin şiddetini ve süresini arttırmıştır [61]. Uluslararası bilim kuruluşlarının birçok raporda belirttiği gibi; iklim değişimine bağlı olarak dünya büyük bir kuraklık tehdidi ile karşı karşıyadır. Kuraklık stresi ürün verimini en çok etkileyen streslerin başında gelmektedir [64]. Kuraklık koşulları altında ürün verimini korumaya yönelik yapılan çalışmalarla ilerlemeler kaydedilmiş olsa da bu istenilen düzeyde değildir [61].

Çevresel stresler bitkilerin genetik potansiyellerini ve fizyolojilerini etkileyerek, bitki büyüme, gelişme, verimini ve buna bağlı olarak biyokütlede ciddi etkilere neden olmaktadır.

Ogbonnaya ve ark. [65] yaptıkları çalışmada kuraklığa maruz kalan bitkilerin biyokütlesinin azaldığını belirtmişlerdir. Benzer bir şekilde F. Fazeli ve ark. [37] kuraklığa maruz bırakılan susam bitkilerinde biyokütlenin azaldığını belirtmişlerdir. E. H. Hoggve ark. [66] Canada aspen ormanlarında kuraklık nedeniyle buradaki bitkilerin biyokütlelerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. G. O. Edmeades ve ark. [67] kalan tropikal mısır bitkilerinde kuraklık stresi etkisiyle biyokütle miktarında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Rigoberto Rosales-Serna ve ark. [68] fasulye bitkisinde kuraklık etkisi sonucunda biyokütle miktarında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Tüm bu yapılan çalışmaları destekler nitelikte yaptığımız çalışmada kuraklığa maruz bırakılan arpa bitkisinin biyokütle miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. Siklitol uygulanan gruplarda ise biyokütle miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir. Böylece kuraklığa maruz kalan bitkiye dışsal siklitol uygulanması ile bitki veriminin korunduğunu söyleyebiliriz.

ABA önemli bir stres hormonudur ve özellikle stres koşullarında bitkilerde meydana gelen cevaplarda önemli roller üstlenmiştir. Bu rollerden belki de en önemlisi su stresi koşullarında stomaların kapanmasına aracılık etmesidir [4]. Çalışmamızda kuraklık stresi uygulamasıyla birlikte özellikle 3. günde ABA hormonunun miktarında artış meydana gelmiştir. Literatürde kuraklık stresiyle birlikte farklı bitkilerde ABA hormonunun miktarında meydana gelen artışların raporlandığı çok sayıda çalışma vardır [69] , [70] , [71] . ABA'nın bitki büyümesine olumsuz yönde etki ettiği düşünülse de son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle stres altında toleransın artırılması için bir miktar artmasının önemli olduğu da vurgulanmıştır [72]. ABA miktarının kuraklık stresi ile birlikte yükselmesi stomaların kapanması için kritik ve gereklidir. Bu durumda bitki bünyesinde bulunan suyun buharlaşarak kaçması önlenmiş olur. Bununla birlikte stomaların kapanması içsel karbondioksit miktarının azalmasına ve içsel oksijen miktarının artışına neden olarak radikal artışına neden

olabilmektedir. Bu durum ciddi hücre hasarlarına yol açarak verim kaybı ile sonuçlanan bir süreci başlatır. Çalışmamızda siklitol uygulaması kuraklık koşullarında ABA miktarını azaltmıştır. Bu durum stomaların stres koşulları altında daha uzun süre açık kalmasına ve fotosentez veriminin daha uzun süre korunmasına yardım edebilir. Bununla birlikte siklitol uygulamasıyla birlikte turgor durumunun kuraklık altında kısmen korunabiliyor olması da, açık olan stomalardan kaybolan su miktarını belirli oranda telafi edebilir. Bu konuda literatürde siklitollerin stres koşullarında bitkilerin su durumlarını koruduklarına dair raporlar mevcuttur [73] , [74] , [75]. Tüm bu durumlar bir arada düşünüldüğünde, kuraklık koşullarında siklitol uygulaması su durumunu koruduğu gibi stomaların daha uzun süre açık kalmasını sağlayarak fotosentez verimini de kısmen korumuş olur.

Bitkilerin kuraklık stresine karşı geliştirmiş oldukları yanıtları anlayabilmek için meydana gelen proteomik değişimlerin incelenmesi çok önemlidir [76]. Çalışmamızda 2DE jellerin analizi ile her bir jel üzerinde 500'den fazla protein lekesi belirlenmiş ve toplamda 34 proteinin ifadesinde değişiklikler meydana gelmiştir. İfadesi değişen proteinlerin büyük bir kısmı fotosentez, biyosentez, enerji ve antioksidan savunma sisteminde rol oynayan proteinlerden oluşmaktadır.

Bitki gelişimi ve büyümesi için fotosentez kilit mekanizmadır. Fotosentez mekanizması ile bitki, organik moleküller ve enerji elde eder [77]. Fotosentez mekanizması kuraklık stresinden ciddi bir şekilde etkilenir [61]. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde, büyüme-gelişme ve fotosentez sınırlanır. Ayrıca bitkinin ürün verim ve kalitesi düşer.

Çalışmamızda siklitol uygulaması gerek kontrol gerekse kurak koşulları altında fotosentezin mekanizmasında rol oynayan; Oksijen oluşumunu arttıran protein 1 (OEE1), Klorofil a-b bağlayıcı protein, Fosfogliserat kinaz, Rubisco, Karbonik anhidraz, Ferredoksin-NADP redüktaz ve Fosforibulokinaz gibi proteinlerin miktarlarında artışlara neden olmuştur. Bu proteinlerin miktarlarında siklitol uygulamasıyla meydana gelen artışlar özellikle kuraklık koşullarında bitkinin fotosentez veriminin korunması adına oldukça önemlidir. Bununla birlikte bu proteinler içinde OEE1 gibi proteinler özellikle stres koşullarında fotosistem 2 stabilitesi için oldukça önemlidir. OEE1 proteininin radikal saldırısına karşı reaksiyon merkezlerini korudukları rapor edilmiştir [61]. Koichi Sugihara ve ark. [78] tuz stresi altında da benzer bir koruma mekanizmasının OEE1 proteini ile geliştirildiğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda ilginç bir şekilde siklitol uygulaması kontrol bitkilerinde Calvin döngüsü elemanlarından Fosforibulokinaz ile Fosfogliserat kinaz miktarlarında azalmaya neden olmuştur. Bu bulgularımızla ilişkili olarak 2-Cys Peroksiredoksin BAS1 proteininin miktarında da azalma meydana gelmiştir. Dietz ve ark. [79] yaptıkları bir çalışmada *Arabidopsis* bitkisinde 2-Cys Peroksiredoksin BAS1 proteininin ekspresyonunu baskıladıklarında Calvin döngüsü elemanlarının aktivitelerinin azaldığını bildirmişlerdir. Siklitol uygulamasıyla kontrol

şartlarında bu proteinlerde meydana gelen düşüşlerin ayrıca daha detaylı olarak araştırılması gerekmektedir.

Siklitol uygulaması ile ifadesi artan diğer bir protein karbonik anhidrazdır (CA). C4 bitkilerindeki rolleri ayrıntılı bir şekilde çalışılan ve bilinen bu proteinin C3 bitkilerinde rolleri ile ilgili ciddi boşluklar vardır. Karbonik anhidraz CO₂'nin bikarbonata geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizler [80]. CA'lar, C4 ve CAM bitkilerinde fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEPC) CO₂ tedarikini ve C3 bitkilerinde Rubisco'ya CO₂ tedarikini kolaylaştırır [81]. Çalışmamızda, siklitol uygulaması tüm kuraklık stresi gruplarında CA miktarını arttırdı. Bu artış, kuraklık stresi altındaki Calvin döngüsü için gerekli olan yüksek CO₂ konsantrasyonu için önemli olabilir. Öte yandan, Hu ve diğerleri [82] ve Stimler ve ark. [83] karbonik anhidrazların erken CO₂ sinyal yolu ve stoma kapanmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu nedenle, yüksek CA miktarı stomanın açık kalmasına neden olabilir ve bu verimli fotosentezi korumak için önemli olabilir.

Siklitol uygulaması özellikle kurak grupta enerji ile ilişkili proteinler olan Malat dehidrogenaz ve sitosolik Fosfogliserat kinazın miktarlarında artışlara neden olmuştur. Stres altındaki bitkilerde stresle başa çıkabilmeleri adına yüksek bir enerji ihtiyacı vardır [84]. Siklitol uygulamasının özellikle stres koşullarında bu proteinlerin miktarlarını arttırması stres koşullarında bitkiye aktif cevap oluşturmak adına avantaj sağlamış olabilir.

Biyosentez mekanizması ile alakalı protein olan S-adenosilmetionin sentazın miktarı siklitol uygulaması ile birlikte kontrol grubunda azalırken kurak grupta ise artmıştır. Bu protein etilen ve poliamin biyosentezinin öncü maddelerinden birisi olan S-adenosilmetioninin biyosentezinen sorumludur [85]. Bu proteinin miktarının siklitol uygulamasıyla kontrol grubunda azalması etilen ve poliamin miktarının azalmasına neden olarak hem gereksiz enerji sarfiyatının önüne geçebilir, hem de etilen biyosentezi baskılanarak büyüme gelişmenin teşvikini sağlamış olabilir.

Çalışmamızda 20 kDa Şaperonin miktarı da siklitol uygulamasıyla birlikte yükselmiştir. 20 kDa Şaperonin proteinlerin doğru bir şekilde katlanabilmeleri sırasında işlev göstermektedir [86]. Bu proteinin miktarının siklitol uygulamasıyla birlikte yükselmiş olması yeni protein sentezi sırasında proteinlerin doğru bir şekilde katlanarak aktivite göstermeleri adına önemli olabilir.

Siklitol uygulaması ile birlikte kurak gruplarda Kalsiyum bağlayıcı protein (CML42)'nin ifadesi artmıştır. Scholz ve arkadaşları [87] CML42'nin kuraklık stresi ile uyarılan ABA birikiminin negatif düzenleyicisi olarak hareket ettiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla siklitol uygulaması ile birlikte CML42'nin miktarının artması ABA hormonunun miktarının düşmesine neden olarak stomaların daha uzun açık kalmasını sağlamış olabilir. Bu durum ABA sonuçlarımızla da uyumluluk göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre;

- ✓ Kuraklık stresine maruz bırakılmış *Hordeum vulgare* L. yapraklarına bir siklitol türeviden olan dlsiklopentan-1,2,3-triol püskürtüldüğünde bitkinin hem yaş hem de kuru biyokütlesi artmıştır. Özellikle stres koşullarında siklitol uygulamasıyla biyokütlenin yüksek olması verimin korunması açısından oldukça önemlidir.
- ✓ Kuraklık stresi ABA miktarını yükseltmişken siklitol uygulaması ABA miktarını düşürmüştür. ABA miktarının siklitol uygulamasıyla birlikte düşmüş olması stres altında stomaların daha uzun süre açık kalmasına ve buna paralel olarak daha yüksek fotosentez verimine neden olmuş olabilir. Bu durum stres altında verimin korunması için çok önemlidir.
- ✓ Kuraklık stresi birlikte fotosentez başta olmak üzere enerji, biyosentez ve antioksidan sisteminde rol oynayan proteinlerin miktarlarında değişiklikler meydana gelmiştir. Bu durum bu yolların kuraklık stresinden ciddi derecede etkilendiklerinin göstergesi olabilir.
- ✓ Siklitol uygulamasıyla birlikte özellikle fotosentez ve enerji yolağında rol oynayan proteinlerin miktarlarında artışlar meydana gelmiştir. Bu durum siklitolün bu mekanizmaları uyararak yüksek verim eldesi ve aktif stres cevabı konusunda bitkiye avantaj sağladığının göstergesi olabilir.
- ✓ Tüm bu veriler siklitol uygulamasının bitkinin biyokütlesini arttırarak, ABA seviyesini düşürerek ve özellikle fotosentetik proteinleri uyararak stres altında ciddi bir avantaj sağladığını göstermektedir. İleride yapılacak detaylı moleküler çalışmalarla tartışma kısmında değindiğimiz noktalar aydınlığa kavuşturulabilirse, maliyeti oldukça uygun olan bu maddenin tarımsal olarak kullanım potansiyelinin artacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1]. Agarwal, S., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Tyagi, A., Meena, R.C. (2005). Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Science*, 169,559–570.
- [2]. Ahn, J., Hao, C., Yan, J., DeLucia, M., Meherns, J. Wang, C., Gronenborn, A. M., Skowronski, J. (2012) 6;287(15):12550-8. doi: 10.1074/jbc.M112.340711.
- [3]. Akkaya, A. (1984). Kırac Koşullarda Farklı Gübre Uygulamalarının Bazı Kışlık Arpa Çeşitlerinin Kışa Dayanıklılık, Verim, Verim Unsurlarına Etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Erzurum.
- [4]. Anjos, V.A., da Silva, F.M., Souza, M.M. (2014). Cell damage induced by copper: an explant model to study anemone cells. *Toxicology in Vitro*, 28,365-72.
- [5]. Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L, Saleem, M.F., Man, C., Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, Vol. 6(9), pp. 2026-2032.
- [6]. Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science* 82, 1227–1238.
- [7]. Balci, M., Kaya, N., Yardımcı, D. Ş. (2006). *Tetrahedron*, Vol. 62,10633-10638.
- [8]. Başgül, A., Engin, A., Özkara, R., Yücalan, T. (1999). Efes pilsen arpa geliştirme çalışmaları. *Hububat Sempozyumu* (s. 602-607). Konya.
- [9]. Benlioğlu, B., Özkan, U. (2015). Bazı Arpa Çeşitlerinin (*Hordeum vulgare* L.) Çimlenme Dönemlerinde Farklı Dozlardaki Tuz Stresine Tepkilerinin Belirlenmesi, Cilt 24, Sayı 2.
- [10]. Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. Oct 29;218,(4571),443-8.
- [11]. Bradford. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7;72,248-54.
- [12]. Carvalho, C. R., Clarindo, W. R., Praça, M.M., Araújo, F.S., Carels, N. (2008). Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science*, 174, 613-617.
- [13]. Chmielewska, K., Swarczewicz, B., Rodziewicz, P., Sawikowska, A. (2016). Analysis of Drought-Induced Proteomic and Metabolomic Changes in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Leaves and Roots Unravels Some Aspects of Biochemical Mechanisms Involved in Drought Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, July 7,(428),1108.
- [14]. Çamoğlu, G., Genç, L., Aşık, Ş. (2011). Tatlı Mısırdaki (*Zea mays saccharata* Sturt) Su Stresinin Fizyolojik ve Morfolojik Parametreler Üzerine Etkisi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. , 48,(2), 141-149.

- [15]. Çevik, S., Akpınar, G., Yildizli, A., Kasap, M., Karaosmanoğlu, K., Ünyayar, S. (2019). Comparative physiological and leaf proteome analysis between drought-tolerant chickpea *Cicer reticulatum* and drought-sensitive chickpea *C. Arietinum*. *Journal of Biosciences* March, 44,20.
- [16]. Çevik, S., Ünyayar, S. (2015). The Effects of Exogenous Application of Ascorbate and Glutathione on Antioxidant System in Cultivated *Cicer arietinum* and Wild Type *C. reticulatum* under Drought Stress. *Suleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Science*.
- [17]. Daszkowska, A. (2016). Golec The Role of Absciscic Acid in Drought Stress: How ABA Helps Plants to Cope with Drought Stress *Drought Stress Tolerance in Plants. Molecular and Genetic Perspectives*, Vol 2 pp.123-151.
- [18]. Deeba, F., Pandey, A. K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y.K., Shirke, P. A., Pandey, V. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum L.*) to drought stress. *Plant Physiol Biochem*, 53,6-18.
- [19]. Dolferus, R. (2014). To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Sci.* 2229, 247-261.
- [20]. Edmeades, G.O., Bolanos, J., Chapman, S.C., Lafitteand, H.R., Anziger, M. B. (1999). Selection Improves Drought Tolerance in Tropical Maize Populations: I. Gains in Biomass, Grain Yield, and Harvest Index. Vol. 39 No. 5, p. 1306-1315.
- [21]. Eduardo, C., Lopez, Orlando Borrás-Hidalgo; Pritchard, L., Loake, G.J., Gilroy, E. M., Hein, I., Hoorn, R. (2007). Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *The Plant Journal*, 52, 1–13.
- [22]. Fan, S., Blake, T. J., Blumwald, E. (1994). The relative contribution of elastic and osmotic adjustments to turgor maintenance of woody species. *First published*, Cited by: 42
- [23]. Farooq, M., Wahid, A., Fujita D. (2009). Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1), with11,131.
- [24]. Fazeli, F., Niknam, V., Ghorbanli, M. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Article in Biologia Plantarum*, 51,(1),98-103.
- [25]. Golec, A.D. (2016). The Role of Absciscic Acid in Drought Stress: How ABA Helps Plants to Cope with Drought Stress. *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 2 Molecular and Genetic Perspectives (pp.123-151).
- [26]. Guo, Z.Q., Liu, X.Y., Zhang, J.R. (2000). Study on Physiological Criteria of Drought Resistance in Soybean. *Shanxi-Agricultural Science*, No: 4, 6-9, 7
- [27]. Gültekin, M. S., Çelik, M., Balcı, M. (2004). Cyclitols and related compounds, *Current Organic Chemistry*, 8,1159.

- [28]. Hajheidari, M., Eivazi, A., Buchanan, B. B., Wong, J. H., Majidi, I., Salekdeh, G. H. (2007). Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *J. Proteome Res.* 6, 1451–1460.
- [29]. Hartree, E.F. (1972). Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422-427.
- [30]. Hogg, E. H., Brandt, J. P., Michaelian, M. (2008). Impacts of a regional drought on the productivity, dieback, and biomass of western Canadian aspen forest. *Canadian Journal of Forest Research*, Vol. 38, No. 6 , pp. 1373-1384.
- [31]. Horling, F., Kinig, J., Dietz, K.J. (2002). Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiological Biochemistry*, 40:491-499.
- [32]. Hudlicky, T., Luna, H., Price, J. D., Rulin, F. (1990). Microbial oxidation of chloroaromatics in the enantiodivergent synthesis of pyrrolizidine alkaloids: trihydroxyheliotridane. *Journal of Organic Chemistry*, 55,4683.
- [33]. Jedmowski, C., Bayramov, S. & Brüggemann, W. (2014). Comparative analysis of drought stress effects on photosynthesis of Eurasian and North African genotypes of wild barley. *Photosynthetica*, Cilt 52, Sayı 4 , s 564–573
- [34]. Kacar, B., Katkat, A.V., Öztürk, Ş. (2006). *Bitki Fizyolojisi (2. Baskı)*, Nobel Yayınları, 563.
- [35]. Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y. (2005). The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.U. Journal of Science* 18, (4), 723-740.
- [36]. Kim, R., Saxena, S., Gordon, D.M. (2001). J-domain Protein, Jac1p, of Yeast Mitochondria Required for Iron Homeostasis and Activity of Fe-S Cluster Proteins *J Biol Chem.* May,
- [37]. Kumar, P., Tewari, R. K., Sharma, P. N. (2008). Cadmium Enhances Generation of Hydrogen Peroxide and Amplifies Activities of Catalase, Peroxidases and Superoxide Dismutase in Maize. *J. Agronomy & Crop Science*, ISSN 0931-2250.
- [38]. Levitt, J. (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses. *Physiological Ecology* Academic Press: New York Vol. 177, Issue 4051, pp. 786. DOI: 10.1126/science.177.4051.786
- [39]. Liu, S., Lv, Z., Liu, Y., Li, L., Zhang, L. (2018). Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genet Mol Biol.* 41,(3),624-637.
- [40]. Mao, D., Yu, F., Li, J., Van de poel, B., Tan, D., Li, J., Liu, Y., Li, X., Dong, M., Chen, L., Li, D., Luan, S. (2015). Feronia receptor kinase interacts with S-adenosylmethionine synthetase and suppresses S-adenosylmethionine production and ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 38, 2566–2574.

- [41]. Marwal, A., Sahu, A. K., Gaur, R. K. (2014). New Insights in the Functional Genomics of Plants Responding to Abiotic Stress. *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*, 1st ed., 232-247.
- [42]. Moghaieb, R. E. A., Saneoka, H., Fujita, K. (2004). Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betain aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. *Plant Science*, 166, 1345-1349.
- [43]. Mohammadi, A., Mousavi-Avval, S.H., Rafiee, S., Jafari, A. (2011). Optimization of energy consumption for soybean production using data envelopment analysis (DEA) approach. *Applied Energy*, 88, 3765-3772.
- [44]. Morgan, J. M. (1995). Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. *Field Crops Research*, 40, 143-152.
- [45]. Nouri, Q., Ellouz, Jbir-Koubaa, R., Charfeddine, S., Ellouz, W., Saidi, M.N., Drira, N., Gargouri-Bouid, R. (2015). Investigation of the response to salinity and to oxidative stress of interspecific potato somatic hybrids grown in a greenhouse. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 120, Issue 3, pp 933-947.
- [46]. Ogonnaya, C.I., Sarr, B., Brou, C., Diouf, O., Diop, N.N., Roy-Macauley, H. (2003). Selection of cowpea genotypes in hydroponics, pots and field for drought tolerance. *Crop Sci.* 43, 1114-1120.
- [47]. Ozturk Gokce, N. Z. (2015). Bitkilerin Kuraklık Stresine Tepkilerinde Bilinenler ve Yeni Yaklaşımlar , February with 917.
- [48]. Örs, S., Ekinci, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. 32, (2), 237-250.
- [49]. Özyurt, İ.K., Akça, Y. (2017). Su stresinin Mahlep (*Prunus mahaleb* L.) Anaçlarında Biyokimyasal Değişimler Üzerine Etkileri, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, cilt:14
- [50]. Pattanagul, W., Madore, M.A. (1999). Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 987-993.
- [51]. Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, Aug 17;406,(6797),731-4.
- [52]. Poehlman, J. M. (1985). Agronomy Monograph, Barley, 26, 1-17.
- [53]. Popova, L. P., Metodiev, M., Tsonev, M. (1996). Effect of jasmonic acid on the stomatal and nonstomatal limitation of leaf photosynthesis in barley leaves *ournal of, Plant Growth Regulation* April , 15,(2),75-80 with191.

- [54]. Reddy, R., Yao, J.K., Kammen, D. P. (1992). Educued level of plasma antioxidant uric acid in schizopfhrenia. *Psychiatry Res*, 80, 29-39.
- [55]. Rosales-Serna, R., Kohashi-Shibata, J., Acosta-Gallegos, J.A., López, C.T. (2004). Ortiz-Cereceres, J.; Kelly, J. D., Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field Crops Research* February, Volume 85, Issues 2–3, 10, Pages 203-211.
- [56]. S. Çevik, S., Yıldızlı, A., Yandım, G., Göksu, Y., Gultekin, M.S., Çelik, A., Kus Simsek, N., Ünyayar, S. (2014). Some synthetic cyclitol derivatives alleviate the effect of water deficit in cultivated and wild-type chickpea species. *Journal of Plant Physiology* 171, 807–816.
- [57]. Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Saxena, D.C. (2000). Increased Antioxidant Activity under Elevated Temperatures: A Mechanism of Heat Stress Tolerance in Wheat Genotypes. *Biologia Plantarum*, August, Volume 43, Issue 2, pp 245–251.
- [58]. Salekdeh, G.H., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B., Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2,(9),1131-45.
- [59]. Sambe, M. A. N., He, X., Tu, Q., Guo, Z. (2014). A cold-induced myo-inositol transporter-like gene confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *First published*, 05 August, Cited by: 12 153,(3),355-64.
- [60]. Scholz, S. Vadassery, J., Mithöfer, A. (2014). Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory. *Published in Molecular plant*, DOI,10.1093/mp/ssu102.
- [61]. Schroder, J., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., Waner, D. (2001). *Plant Physiol Plant Mol Biol*. 52, 627-658.
- [62]. Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C.A., Zhao C.X.C. (2008). Biol. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants, 331,(3). 215-25 .
- [63]. Sly, W.S., Hu, P.Y. (1995). Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 375-401.
- [64]. Smirnoff, N. (1998) Plant resistance to environmental stres. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 214-219.
- [65]. Smith, P. K., Hermunson, G.T., Mallia, K., Krohn R.L. (1985). Measurements of protein using Bicinchoninic acid *Article in Analytical Biochemistry*, 15,(1),76-85.
- [66]. Stimler, K., Berry, J. A., Yakir, D. (2012). Effects of carbonyl sulfide and carbonic anhydrase on stomatal conductance. *Plant Physiol*. 158,(1), 524–530.
- [67]. Streeter, J. G., Fioritto, R. J. (2001). Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 24,429-438.

- [68]. Studer, A.J., Gandin, A., Allison, R., Kolbe, Wang, L., Asaph, B. (2014). Cousins, and Thomas P. Brutnell A Limited Role for Carbonic Anhydrase in C₄ Photosynthesis as Revealed by a *ca1ca2* Double Mutant in Maize. *Plant Physiol.* 165,(2), 608–617.
- [69]. Sugihara, K., Takemura, T., Hanagata, N., Baba, S., Karube, I., Dubinsky Z. (2010). Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany* Volume 68, Issue 1, Pages 15-281, P.15-28.
- [70]. Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Responses and adaptations to abiotic stress. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. pp. 755-778. ISBN 978-0-87893-866-7.
- [71]. Teiz, L., Zeiger, S.C.E. (1998). *Plant Physiology*, University of California, Los Angeles Sinauer Associates, Inc., Publisher, 726-735.
- [72]. Tosun, F., Altın, M. (1986). Mera Yayla Kültürü ve Bunlardan Faydalanma Yöntemleri, Ondokuzmayıs Üniversitesi Yayınları: 5, Samsun. Anonim , 2007.
- [73]. Ünyayar, S., Keleş, Y., Çekiç, F.Ö. (2005). The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Gen cilt:1 sayfa:2*.
- [74]. Vabulas, R.M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., Hartl, U. (2010). Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2,(12),a004390.
- [75]. Vernon, D.M., Ostrem, J.A., Bohnert, H.J. (1993). Stress perception and response in a facultative halophyte, the regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ*, 16, 437–444.
- [76]. Waltham, M. (2010). Simplified Workflow for Immunosuppressant Analysis Saves Time and Improves Results. *Thermo Scientific*, Jul 26.
- [77]. Wanek, W., Richter, A. (1997). Biosynthesis and accumulation of D-ononitol in *Vigna umbellata* in response to drought stress. *Physiol Plant*, 101,416–424.
- [78]. Wang, K., Zhou, Y.J., Liu, H., Cheng, K., Mao, J., Wang, F., Liu, W., Ye, M., Zhao, Z.K., Zou, H. (2015). Proteomic analysis of protein methylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteomics*, 114:226-33.
- [79]. Wei, S., Hu, W., Deng, X., Zhang, Y., Liu, X., Zhao, X., Luo, Q., Jin, Z., Li, Y., Zhou, S., Sun, T., Wang, L., Yang, G., He, G. (2014). A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. *BMC Plant Biology*, 14,133.
- [80]. Weraduwege, M. Sarathi, Chen, Jin, Anozie, C. Fransisca, Morales, Alejandro, Weise, E. (2015). Sean ;and Sharkey, D. Thomas. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 6: 167.

- [81]. Wery J., Silim S.N., Knights E.J., Malhotra R.S., Cousin R. (1994). Screening techniques and sources and tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. *Euphytica*, 73, 73–83.
- [82]. Wilkinson, S., Davies, W. J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *First published*, Cited by: 494.
- [83]. Xu, Y., Zhu, L., Wang, J., Li, J., Zhu, B. (2008). Amphiphilic ABA copolymers used for surface modification of polysulfone membranes, Part 1: Molecular design, synthesis, and characterization. Volume 49, Issue, Pages 3256-32647 July 2008, Pages 3256-3264.
- [84]. Yang, W., Zhang, W., Wang, X. (2016). Post-translational control of ABA signalling: the roles of protein phosphorylation and ubiquitination. *First published*, Cited by: 16.
- [85]. Yildizli, A., Çevik, S., Ünyayar, S. (2018). Effects of exogenous *myo*-inositol on leaf water status and oxidative stress of *Capsicum annuum* under drought stres. *Acta Physiologiae Plantarum* June, 40, 122.
- [86]. Zhang, L., Becker, D. F. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence, *Front Plant Sci.* 6, 552.
- [87]. Zhang, M., Duan, L., Zhai, Z., Li, J., Tian, X., Wang, B., He, Z., Li, Z. (2004). Effects of Plant Growth Regulators on Water Deficit Induced Yield Loss in Soybean. *Australian Agronomy Conference*, 12 th AAC, 4 th ICSC.

EKLER**İstatistiksel Yöntem**

Elde edilen biyokütle ve ABA değerlerinin grup ve zaman interaksyonundan etkilenip etkilenmediğinin kontrolü Tekrarlanan Ölçümlü Faktöriyel ANOVA ile değerlendirildi.

Ayrıca her bir zaman diliminde, deney gruplarının birbirlerinden farklarını kontrol etmek için tek yönlü ANOVA kullanılmıştır.

Bunların yanı sıra her bir deney grubundaki zamansal farkın değerlendirilmesi için Biyokütle ölçümleri için Tekrarlı ölçümler Varyans Analizi kullanılırken, ABA ölçümleri için Eşleştirilmiş t testi kullanılmıştır.

Özet istatistik olarak Ort $\pm$ Std.Sapma değerleri verilmiştir. İstatistik anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak alınmıştır.

Sonuçlar ortalama değerlerine ait çizgi grafik gösterimi ile de özetlenmiştir.

Tablo 1. Biyokütle Ölçümlerine ait tanımlayıcı İstatistikler ve Tekrarlanan Ölçümlü Faktöriyel ANOVA Sonucu

Günler	Gruplar	Ort $\pm$ Std.Sapma	P
1.gün	Kontrol	0,11400 $\pm$ 0,001732	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,11833 $\pm$ 0,000577	
	Kurak	0,11833 $\pm$ 0,000577	
	Kurak Siklitol	0,12600 $\pm$ 0,001732	
3.gün	Kontrol	0,25567 $\pm$ 0,001155	
	Kontrol Siklitol	0,23767 $\pm$ 0,000577	
	Kurak	0,23067 $\pm$ 0,000577	
	Kurak Siklitol	0,22767 $\pm$ 0,000577	
5.gün	Kontrol	0,23867 $\pm$ 0,000577	
	Kontrol Siklitol	0,22133 $\pm$ 0,001155	
	Kurak	0,18867 $\pm$ 0,001155	
	Kurak Siklitol	0,19133 $\pm$ 0,000577	

Zaman*Grup interaksyonu Biyokütle ölçümleri bakımından istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Hem deney grubu değiştikçe hem de takip süresi arttıkça elde edilen biyokütle değerlerinde farklılık görülmüştür.

Tablo 2. Biyokütle Ölçümlerine ait tanımlayıcı İstatistikler ve Tek yönlü ANOVA Sonucu

Günler	Gruplar	Ort±Std.Sapma	P
1.gün	Kontrol	0,11400±0,001732	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,11833±0,000577	
	Kurak	0,11833±0,000577	
	Kurak Siklitol	0,12600±0,001732	
3.gün	Kontrol	0,25567±0,001155	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,23767±0,000577	
	Kurak	0,23067±0,000577	
	Kurak Siklitol	0,22767±0,000577	
5.gün	Kontrol	0,23867±0,000577	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,22133±0,001155	
	Kurak	0,18867±0,001155	
	Kurak Siklitol	0,19133±0,000577	

Biyokütle değerleri bakımından her bir zaman dilimi içinde gruplar arasında farklılık kontrolü ANOVA ile değerlendirildi.

1.Gün ölçümlerinde kontrol siklitol ve kurak grupları arasında istatistiksel anlamlı fark yoktur ($p=1,000$).

Bu sonuç dışındaki tüm karşılaştırmalar istatistiksel anlamlı seviyede farklıdır($p<0,05$).

Tablo 3. Biyokütle Ölçümlerine ait tanımlayıcı İstatistikler ve Tekrarlı ölçümler Varyans Analizi Sonucu

GRUP	Gün	Ort±Std.Sapma	P
Kontrol	1.gün	0,11400±0,001732	<0,001
	3.gün	0,25567±0,001155	
	5.gün	0,23867±0,000577	
Kontrol Siklitol	1.gün	0,11833±0,000577	<0,001
	3.gün	0,23767±0,000577	
	5.gün	0,22133±0,001155	
Kurak	1.gün	0,11833±0,000577	<0,001
	3.gün	0,23067±0,000577	
	5.gün	0,18867±0,001155	
Kurak Siklitol	1.gün	0,12600±0,001732	<0,001
	3.gün	0,22767±0,000577	
	5.gün	0,19133±0,000577	

Deney gruplarının kendi içinde zamansal farklılık gösterip göstermediği Tekrarlı ölçümler Varyans Analizi ile değerlendirildi.

Kontrol grubundaki ölçümler tüm günlerde farklılık göstermiştir.

1.gün ile 3. Gün ($p<0,001$).

1.gün ve 5.gün ($p<0,001$).

3.gün ve 5.gün ($p=0,003$).

Kontrol Siklitol grubundaki ölçümler tüm günlerde farklılık göstermiştir.

1.gün ile 3. Gün ($p<0,001$).

1.gün ve 5.gün ($p<0,001$).

3.gün ve 5.gün ($p=0,001$).

Kurak grubundaki ölçümler tüm günlerde farklılık göstermiştir ($p<0,001$).

1.gün ile 3. Gün ($p<0,001$).

1.gün ve 5.gün ($p<0,001$).

3.gün ve 5.gün ($p<0,001$).

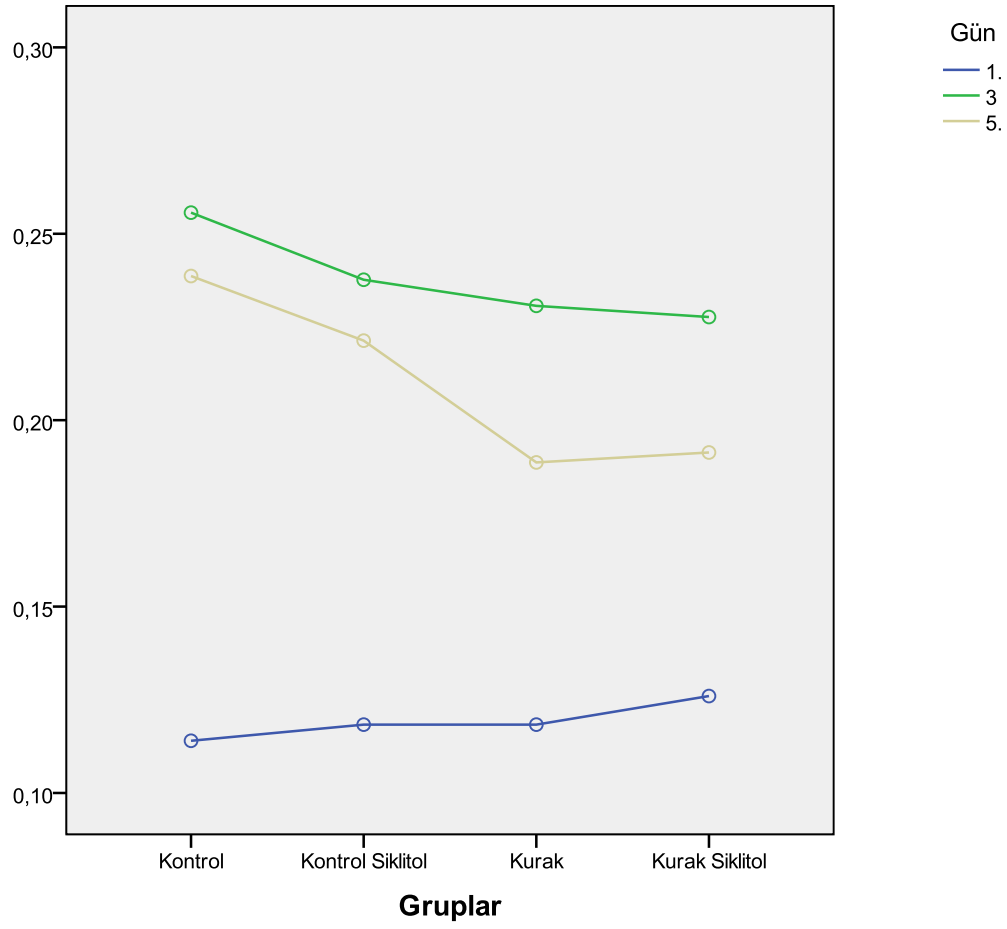
Kurak Siklitol grubundaki ölçümler tüm günlerde farklılık göstermiştir.

1.gün ile 3. Gün ($p<0,001$).

1.gün ve 5.gün ($p=0,001$).

3.gün ve 5.gün ($p<0,001$).

Grafik 1. Grup ve Zaman Değişimine göre Biyokütle Değerleri



ABA**Tablo 4.** ABA Ölçümlerine ait tanımlayıcı İstatistikler ve Tekrarlanan Ölçümlü Faktöriyel ANOVA Sonucu

Gün	GRUP	Ort±Std.Sapma	P
ABA1.gün	Kontrol	0,812333±0,0011547	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,874333±0,0015275	
	Kurak	0,849333±0,0005774	
	Kurak Siklitol	0,878667±0,0005774	
ABA3. gün	Kontrol	0,814333±0,0015275	
	Kontrol Siklitol	0,841667±0,0005774	
	Kurak	0,848333±0,0011547	
	Kurak Siklitol	0,815667±0,0011547	

Zaman*Grup interaksyonu ABA ölçümleri bakımından istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Hem deney grubu değiştiğinde hem de takip süresi arttıkça elde edilen ABA değerlerinde farklılık görülmüştür.

Tablo 5. Biyokütle Ölçümlerine ait tanımlayıcı İstatistikler ve Tek Yönlü ANOVA Sonucu

Gün	GRUP	Ort±Std.Sapma	P
ABA1.gün	Kontrol	0,812333±0,0011547	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,874333±0,0015275	
	Kurak	0,849333±0,0005774	
	Kurak Siklitol	0,878667±0,0005774	
ABA3. gün	Kontrol	0,814333±0,0015275	<0,001
	Kontrol Siklitol	0,841667±0,0005774	
	Kurak	0,848333±0,0011547	
	Kurak Siklitol	0,815667±0,0011547	

ABA değerleri bakımından her bir zaman dilimi içinde gruplar arasında farklılık kontrolü tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi.

3.gün kontrol ve kurak siklitol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark yoktur ($p=0,195$).

Bu sonuç dışındaki tüm karşılaştırmalarda gruplar birbirinden istatistiksel anlamlı seviyede farklılık göstermiştir ($p<0,001$).

Tablo 6. ABA Ölçümlerine ait Tanımlayıcı İstatistikler ve Eşleştirilmiş t Testi Sonucu

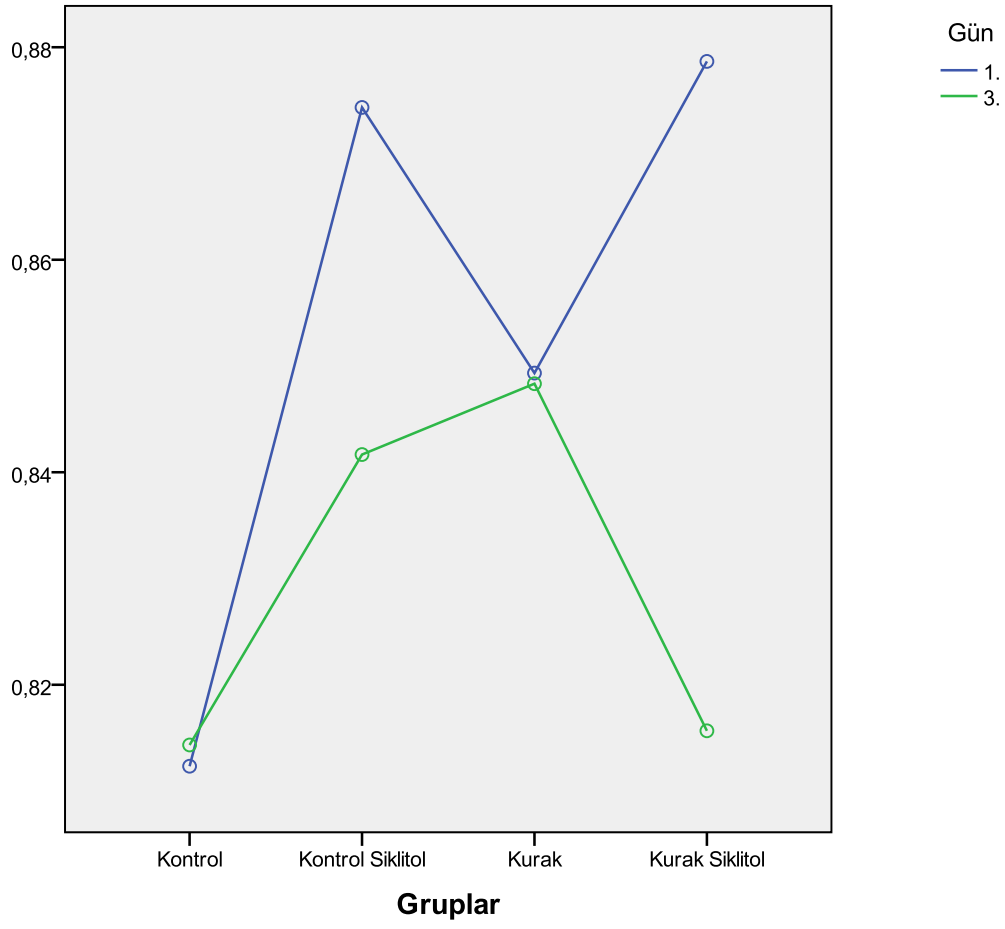
GRUP	GÜN	Ort±Std.Sapma	p
Kontrol	1.gün	0,812333±0,0011547	0,184
	3. gün	0,814333±0,0015275	
Kontrol Siklitol	1.gün	0,874333±0,0015275	0,001
	3. gün	0,841667±0,0005774	
Kurak	1.gün	0,849333±0,0005774	0,225
	3. gün	0,848333±0,0011547	
Kurak Siklitol	1.gün	0,878667±0,0005774	<0,001
	3. gün	0,815667±0,0011547	

Her bir deney grubu içinde ABA değerleri bakımından zamansal farklılık kontrolü Eşleştirilmiş t testi ile yapıldı.

Kontrol ($p=0,184$) ve kurak ($p=0,225$) gruplarında elde edilen 1.gün ve 3.gün ABA değerleri bakımından istatistiksel anlamlı farklılık yoktur.

Kontrol siklitol ($p=0,001$) ve kurak siklitol ($p<0,001$) gruplarında elde edilen 1.gün ve 3.gün ABA değerleri bakımından istatistiksel anlamlı farklılık vardır.

Grafik 2. Grup ve Zaman Değişimine göre ABA Değerleri



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : AYŞE İŞLEK

Doğum Tarihi : 25.04.1991

E-mail : 3aysegok3@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Ahi Evran Üniversitesi	2009-2013
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Mersin Üniversitesi	2014-2019
Doktora			

Görevler : Biyoloji Öğretmeni

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğretmen	Mersin	2009-2019