

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**HASSAS VE TOLERANT EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE
KURAKLIK BASKISININ BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Pınar YILMAZ
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**HASSAS VE TOLERANT EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE
KURAKLIK BASKISININ BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Pınar YILMAZ

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından Fen ve Mühendislik proje grubu içerisinde FYL-2019-8415 proje kodu ile desteklenerek tamamlanmıştır.

VAN-2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı'nda Dr. Öğretim Üyesi Can YILMAZ danışmanlığında, Pınar YILMAZ tarafından yürütülen “**Hassas ve Tolerant Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Kuraklık Baskısının Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 13/04/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Şevki ARSLAN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.

İmza

Pınar YILMAZ



ÖZET

HASSAS VE TOLERANT EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE KURAKLIK BASKISININ BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

YILMAZ, Pınar

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ

Nisan 2021, 105 sayfa

İklim değişikliği tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kuraklık baskısını artırmış, bu durum da pek çok endüstriyel ürünle birlikte buğday üretimini de olumsuz yönde etkilemektedir. Tez çalışmasında, kuraklığa karşı tolerant olduğu rapor edilmiş Bezostaja ile görece hassas Tosunbey ekmeçlik buğday varyeteleri için, kısa süreli kuraklığın farklı derecelerinin fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerinin geniş bir çerçevede bir arada incelenmesi; hem aynı varyetede artan kuraklığın gerçekleştirdiği değişimlerin, hem de bu iki varyetenin benzer koşullarda verdiği yanıtın karşılaştırılması amaçlanmıştır. Gövde ve kök uzunluklarında, yaş ve kuru ağırlıklarında, RWC değerlerinde, beklenildiği şekilde, kuraklık artışı ile beraber azalmalar meydana gelmiştir. GSH havuzunda Tosunbey buğdayında yüksek oranda bir değişiklik kaydedilemezken Bezostaja buğdayında GSH havuzunun daha yüksek ölçüldüğü kaydedilmiştir. GSH miktarlarının ise kuraklığa bağılı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Toplam GST enzim aktivitesinde kuraklık artışına bağılı olarak her iki buğday çeşidinde de önce bir düşüş ardından artış olduğu belirlenmiştir. Ancak GSTT1-1 enzim aktivitesinde gözlemlenen düşüşün doğrudan kuraklığa bağılı olup olmadığı daha ileri analizleri gerektirmektedir. Klorofil ve karotenoid miktarlarında kısa süreli kuraklık stresine bağılı olarak artışlar görülmüştür. Prolin içeriğinde ise her iki çeşitte de artış ölçülmüştür. UPGMA filogramları orta ve yüksek kuraklık uygulamalarının ortaya çıkardığı protein profillerinin kontrol ve düşük kuraklık baskısında izlenenden istatistiksel olarak farklı olduğunu her iki varyete için de ortaya koymuştur. Bezostaja varyetesi kontrol ve %5 PEG örneklerinin protein profilleri aynı varyetenin orta ve yüksek kuraklık uygulanan örneklerinin profillerinden daha çok Tosunbey'in örneklerindeki benzerlik göstermiştir. Bu durum, tolerant Bezostaja varyetesinin, orta ve yüksek kuraklıktan sakınmak için protein profilinde ne denli etkin bir değişikliğe gittiğinin de göstergesidir.

Anahtar kelimeler: Bezostaja, biyokimyasal belirteçler, fizyolojik cevap, kuraklık, Tosunbey, UPGMA

ABSTRACT

EFFECTS OF DROUGHT PRESSURE ON CERTAIN PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN SENSITIVE AND TOLERANT BREAD WHEAT VARIETIES

YILMAZ, Pınar

Master in Science Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Can YILMAZ

April 2021, 105 pages

Climate change has increased the pressure of drought in our country as well as all over the world, and this situation negatively affects wheat production along with many industrial products. In this thesis, a comprehensive study of the effects of different degrees of short-term drought on physiological and biochemical parameters for two bread wheat varieties: Bezostaja, which is reported to be drought tolerant, and Tosunbey which is relatively sensitive, were evaluated. It is aimed to compare both the changes caused by the increased drought in the same variety and the response of these two varieties under similar conditions. Stem and root lengths, wet and dry weights, RWC values, as expected for both varieties, decreased with the increase in drought. While a high rate of change was not recorded in Tosunbey wheat in the GSH pool, it was noted that the GSH pool was measured higher in Bezostaja wheat. It was determined that the amount of GSH decreased due to drought. It was determined that there was a decrease and then an increase in the total GST enzyme activity in both wheat varieties due to the increase in drought. However, whether the decrease in GSTT1-1 enzyme activity is directly related to drought requires further analysis. Increases in the amount of chlorophyll and carotenoids were observed due to short-term drought stress. Proline content was increased in both cultivars. UPGMA phylograms revealed that the protein profiles of medium and high drought applications were statistically different from those observed in control and low drought pressure for both varieties. The protein profiles of the Bezostaja variety control and 5% PEG samples were more similar to that of Tosunbey's samples than the profiles of the same variety in medium and high drought conditions. This is also an indication of how effectively the tolerant Bezostaja variety changes its protein profile to avoid medium and high drought.

Keywords: Bezostaja, biochemical markers, drought, physiological response, Tosunbey, UPGMA



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, lisans ve yüksek lisans öğrenimim dahil olmak üzere yükseköğrenimim boyunca tüm sabrı ve bilgisiyle her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ'a değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca deneylerimin bir kısmını gerçekleştirebilmem için ihtiyaç duyduğum her anda laboratuvarının kapılarını açan ve bu süreçte desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL'a, tez değerlendirme jürimde yer alan ve kıymetli katkılarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a teşekkür ederim. Buğday tohumlarının filizlendirilmesinde yardımcı olan Serap DEMİR'e, enzim aktivite ölçümlerinde katkıda bulunan Ceylan FİDAN'a ve tüm yaşamım boyunca her durumda eğitimim için fedakarlıklarını esirgemeyen başta ablam Yağmur YILMAZ olmak üzere kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmayı FYL-2019-8415 proje kodu ile destekleyen, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü'ne, vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

2021

Pınar YILMAZ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Buğday, Tür sınıflandırması, Yayılımı ve İnsanlık İçin Önemi.....	1
1.2. İklim Değişikliği, Kuraklık ve Yarattığı Ekolojik Problemler.....	7
1.3. Bitkilerin Çevresel Baskı Koşullarına Karşı Savunma Mekanizmaları.....	9
1.3.1. Kuraklık baskısının bitkilerdeki etkileri ve yanıt mekanizmaları.....	14
1.4. Glutasyon ve Glutasyon S-transferazlar	18
1.4.1. Bitkilerde GSH ve GST sistemleri.....	24
1.5 Tezin Amacı.....	28
2. KAYNAK BİLDİRİŞİ.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kimyasallar	37
3.1.2. Buğday örnekleri.....	37
3.1.3. Deneyleerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri.....	38
3.2. Yöntemler	38
3.2.1. Buğday tohumlarının yetiştirilmesi.....	38
3.2.2. Fizyolojik ölçümler	43
3.2.3. Buğday örneklerinin hazırlanması	45
3.2.4. Homojenatların hazırlanması	46
3.2.5. Klorofil ve toplam karotenoid içeriğinin belirlenmesi.....	48
3.2.6. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	49
3.2.7. Toplam tiyol miktarının belirlenmesi	50
3.2.8. GST spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi	51
3.2.9. TLC İnce tabaka kromatografisi	53
3.2.10. SDS-PAGE Uygulaması	54
3.2.11. Prolin miktar tayini	55

	Sayfa
3.2.12. İstatistiksel analizler.....	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. Fizyolojik Parametrelerin Artan Kuraklığa Bağlı Değişimi	59
4.1.1. Kuraklığın kök ve gövde büyümesi üzerine etkileri	59
4.2. Biyokimyasal parametrelerde kuraklık baskısının yarattığı değişimler.....	66
4.2.1. Toplam glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesinde değişimler	66
4.2.2. Toplam tiyol miktarı	70
4.2.3. Kuraklık stresinin klorofil miktarları üzerine etkileri	72
4.2.4. Prolin miktarı üzerine artan kuraklığın etkisi.....	78
4.2.5. Buğday karotenoid içeriği	80
4.2.6. TLC (İnce tabaka kromatografisi).....	81
4.2.7. SDS-PAGE uygulaması ve bant analizleri.....	84
4.2.8. UPGMA protein küme analizleri	86
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	91
KAYNAKLAR	98
ÖZ GEÇMİŞ	105

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Altı kıta için büyük ölçekli kuraklık oluşumları.....	8
Çizelge 3.1. Hoagland solüsyonunun içerisinde eklenen kimyasallar ve miktarları	39
Çizelge 3.2. Mikrobesein stok solüsyonunun içerisinde eklenen kimyasallar ve miktarları.....	39
Çizelge 3.3. FeEDTA stok solüsyonunun içerisinde eklenen kimyasallar ve miktarları.....	40



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Buğday bitkisinin kökeni.....	2
Şekil 1.2. Buğday tohum tipleri	3
Şekil 1.3. Dünyada 2018 yılı tahıl üretim yüzdeleri	4
Şekil 1.4. Dünya’da buğday üretim haritası.....	4
Şekil 1.5. Dünya’da buğday üretimi verileri 1996-2018.	5
Şekil 1.6. Buğdayın ölçek fiyatındaki değişim 1866-2015.....	6
Şekil 1.7. Türkiye buğday ekim alanlarının değişimi 2000-2019.....	6
Şekil 1.8. Türkiye’nin buğday ithalatının maaliyeti	7
Şekil 1.9. Global kuraklık haritası	8
Şekil 1.10. Kuraklık stresine cevap oluşturan bitki yapraklarındaki metabolik olaylar ve değişimler.....	10
Şekil 1.11. Bitkilerin kuraklık baskısına karşı savunma sistemleri ve stratejileri	11
Şekil 1.12. Abiyotik stres esnasında ROS detoksifikasyon mekanizmalarında görev alan çeşitli antioksidan enzimler	12
Şekil 1.13. İndirgenmiş ve oksitlenmiş glutatyonun bitki cansız stres yanıt mekanizmasının temel gösterim şeması.....	13
Şekil 1.14. Bitkide uzun ve kısa dönem oluşabilecek kuraklık baskısına karşı gelişen yanıtlar	14
Şekil 1.15. Kuraklık stresine maruz kalan bitkide gerçekleşen bazı değişimler.....	16
Şekil 1.16. Bitkide oluşan kuraklık stresi sonucu fotosentez oranındaki düşüşün sebepleri ...	17
Şekil 1.17. Glutatyon molekülünün 2 ayrı gösterim şekli	19
Şekil 1.18. Glutatyon Metabolizması.....	21
Şekil 1.19. GSH biyosentezi reaksiyonu.....	22
Şekil 1.20. GST enzim süperailisi	23
Şekil 1.21. GST enzim süperailisi üyeleri ve bitkilere özel izozimler	25
Şekil 1.22. GST monomerlerinin birleştirilmiş haldeki dimer yapısı ve yapıya substrat bağlanması ile oluşan kompleks	26
Şekil 1.23. Bitkilerde bulunan GST enzimlerinin işlevleri.....	27
Şekil 1.24. Triticum aestivum ve Arabidopsis thaliana bitki türlerindeki GST genlerinin filogenetik haritası	28
Şekil 3.1. Hoagland solüsyonu içerisine eklenen kimyasallar	39

Şekil 3.2. Buğdayların ekimlerinin yapılması ve PEG 6000 ile kuraklık stresinin uygulanması.....	42
Şekil 3.3. Sürgün Boy Uzunluğu Ölçümü	44
Şekil 3.4. Bitki Turgor Ağırlığı ölçümleri	45
Şekil 3.5. Bitki kurutma işlemi	45
Şekil 3.6. Buğdayların sıvı nitrojen ile toz hale getirilmesi.....	46
Şekil 3.7. Bitki homojenatları	47
Şekil 3.8. Klorofil ve karotenoid içeriklerinin ölçümleri için hazırlanan örnek setler	48
Şekil 3.9. İndirgenmiş tiyol içeriğinin belirlenmesi reaksiyonu (Ellman tepkimesi)	50
Şekil 3.10. GSH varlığında GST ile ortak substratların enzimatik konjugasyonu	51
Şekil 3.11. CDNB substratının DNB 'ye dönüşmesi.....	52
Şekil 3.12. Prolin-ninhidrin reaksiyonu	55
Şekil 4.1. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök uzunlukları	59
Şekil 4.2. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök uzunlukları.....	60
Şekil 4.3. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök yaş ağırlıkları	61
Şekil 4.4. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök yaş ağırlıkları	61
Şekil 4.5. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök kuru ağırlıkları	62
Şekil 4.6. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök kuru ağırlıkları	62
Şekil 4.7. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök turgor ağırlıkları.....	63
Şekil 4.8. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök turgor ağırlıkları.....	64
Şekil 4.9. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök RWC değerleri	65
Şekil 4.10. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök RWC değerleri.....	65
Şekil.4.11. Bezostaja buğday çeşidinde toplam GST spesifik enzim aktivite değerlerinin artan kuraklığa bağlı değişimi.....	66
Şekil 4.12. Tosunbey buğday çeşidinde toplam GST spesifik enzim aktivite değerlerinin artan kuraklığa bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.13. Bezostaja buğday çeşidinde GSTT1-1 spesifik enzim aktivite değerlerinin kuraklık artışı ile beraber değişim grafiği.....	68
Şekil 4.14. Tosunbey buğday çeşidinde GSTT1-1 spesifik enzim aktivite değerlerinin kuraklık artışı ile beraber değişim grafiği.....	69
Şekil 4.15. Bezostaja buğday çeşidinde artan kuraklığa bağlı olarak toplam tiyol miktarındaki değişim	70

Şekil 4.16. Tosunbey buğday çeşidinde artan kuraklığa bağlı olarak toplam tiyol miktarındaki değişim	71
Şekil 4.17. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%80 aseton ile).....	72
Şekil 4.18. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%80 aseton ile).....	72
Şekil 4.19. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%95 etanol ile)	73
Şekil 4.20. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%95 etanol ile)	74
Şekil 4.21. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 aseton ile).....	75
Şekil 4.22. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 aseton ile).....	75
Şekil 4.23. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 metanol ile).....	76
Şekil 4.24. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 metanol ile).....	77
Şekil 4.25. Bezostaj buğday çeşidinde prolin içeriğinin artan kuraklık stresine karşı değişimi.....	78
Şekil 4.26. Tosunbey buğday çeşidinde prolin içeriğinin artan kuraklık stresine karşı değişimi	79
Şekil 4.27. Bezostaja varyetesinde artak kuraklık ile birlikte toplam karotenoid içeriğinin değişimi	80
Şekil 4.28. Tosunbey varyetesinde artak kuraklık ile birlikte toplam karotenoid içeriğinin değişimi	80
Şekil 4.29. GelQuant yazılımı ve TLC analizine ait uygulama görüntüsü	82
Şekil 4.30. Bezostaja örnekleri için gerçekleştirilen TLC analizine ait sonuçlar	83
Şekil 4.31. Tosunbey örnekleri için gerçekleştirilen TLC analizine ait sonuçlar	83
Şekil 4.32. %4-20 gradyan jelde koşturulan ve CCB ile boyanan protein örnekleri	84
Şekil 4.33. GelAnalyzer 19.1 yazılımının genel kullanım ve analiz özellikleri	85
Şekil 4.34. SDS-PAGE jellerinin analizi sonucu, RBA ve RKA proteinlerine ait bantların işlenmemiş bant hacimleri arasındaki ilişki.....	86

Şekil 4.35. PyElph 1.14 yazılımı ile gerçekleştirilen UPGMA analizi ve yazılımın genel kullanımı.....	87
Şekil 4.36. Tosunbey ve Bezostaja örnek gruplarının UPGMA protein kümeleme analiz sonuçlarına ait filogenetik ağaç gösterimi.....	87
Şekil 4.37. Tosunbey ve Bezostaja örnek gruplarının "neighbour joining" protein kümeleme analiz sonuçlarına ait filogenetik ağaç gösterimi	89
Şekil 5.1. PEG 6000 ile ozmotik potansiyel arasındaki ilişki.....	92



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
GST	Glutasyon S- Transferaz
GSH	Glutasyon
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
DNB	1,3-Dinitrobenzene
EPNP	Epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan
PEG	Polietilenglikol
BSA	Sığır serum albümini
TLC	İnce tabaka kromatografisi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
FeCl₃.6H₂O	Demir (III) klorid hekzahidrat
MgSO₄.7H₂O	Magnezyum sülfat hepta hidrat
Ca(NO₃)₂.4H₂O	Kalsiyum nitrat tetrahidrat
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KNO₃	Potasyum nitrat
TEMED	Tetrametiletildiamin
GSSG	Glutasyon disülfid
UV	Ultraviyole
nm	Nanometre



1. GİRİŞ

1.1. Buğday, Tür sınıflandırması, Yayılımı ve İnsanlık İçin Önemi

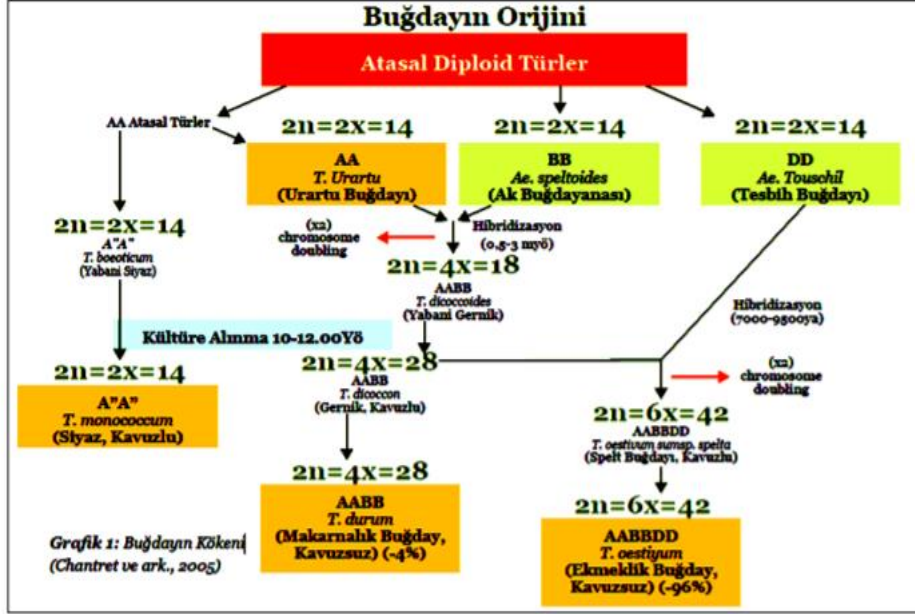
Buğday (*Triticum*); insanlığın tüm tarihi boyunca, ülkemizde ve dünyada büyük bir öneme sahip olan, ekimi ve ıslahı en çok yapılan tahıl ürünleri arasında yer alan tek yıllık ve otsu bir tarımsal bitki türüdür. Başak, kök ve sap kısımlarından oluşur. Karasal iklimlerde yetiştirilmesi daha kolaydır. Buğday, ekmek gıdasının da ana maddesidir. Ayrıca un ve yem üretiminde de temel besin kaynağı olarak kullanılan bir tahıl çeşididir. İnsanların günlük besin ihtiyaçlarının karşılanmasında da buğday oldukça önemli bir yere sahiptir (El-Afry ve ark., 2012).

İlk olarak Neolitik dönemde üretiminin yapıldığına dair kanıtlar bulunan buğday bitkisi insanlığın varlığından beri çok büyük bir öneme sahip olmuştur. Buğdayın ilk olarak Mezopotamya'da ekiminin yapıldığı düşünülmektedir. Mısır'da çeşitli kazılar esnasında piramitler içerisinde buğday taneleri bulunmuş ve bazı duvarlar üzerinde buğday bitkisine ait olduğu düşünülen betimlemeler tespit edilmiştir.

Buğdayın üretimi, verimli ve dirençli türlerinin geliştirilmesi, dünya nüfusunun giderek artması ile yeryüzünde oluşabilecek besin sıkıntısının oluşmasının önlenmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bir tahıl ürünü olması ve hem insanlar hem de hayvanların tüketebileceği bir besin olması nedeni ile de üretiminin devamlılığı oldukça önemlidir (Türkiye'nin buğday atlası, 2016).

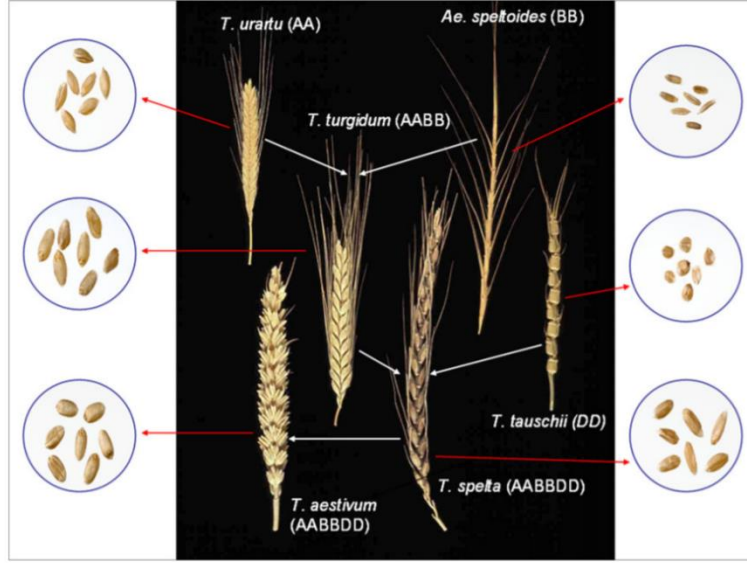
Ülkemizde Diyarbakır'ın Karacadağ bölgesinde yaklaşık olarak 10 bin yıl öncesinde kültüre alındığı düşünülen buğday bitkisinin Anadolu topraklarında 23'ü yabani 400'den fazla çeşidi bulunmaktadır. 1987 yılında Vavilov tarafından yapılan araştırmalar sonucunda oluşturduğu 8 gen merkezinden 2'si Türkiye'de yer almaktadır. Kültüre alınan ilk buğday türleri kavuzludur ve kırılğan başak yapısına sahiptir. Hekzaploid ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L., $2n=42$, AABBDD), tetraploid sert veya makarnalık buğday (*T.durum*, $2n=28$, AABB) günümüz buğday üretiminde en çok yer alan çeşitlerdendir. Bu türler arasında da en çok ekimi ve üretimi yapılan ekmeklik buğdaylardır. Ekmeklik buğdayların verim ve

kalitesinin yüksek olması, kuraklık ve sıcaklığa karşı direnç gösterebilmesi sebebi ile tercih edilen bir tür halini almıştır. Belirtilen türler için A, B, D genomlarının sırası ile *T. urartu* Thumanjan ex Gandilyan, *Ae. speltoides* Tausch ve *Ae. tauschii* Coss.'den geldiği kabul görmektedir (Özberk ve ark., 2016) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Buğday bitkisinin kökeni (Özberk ve ark., 2016).

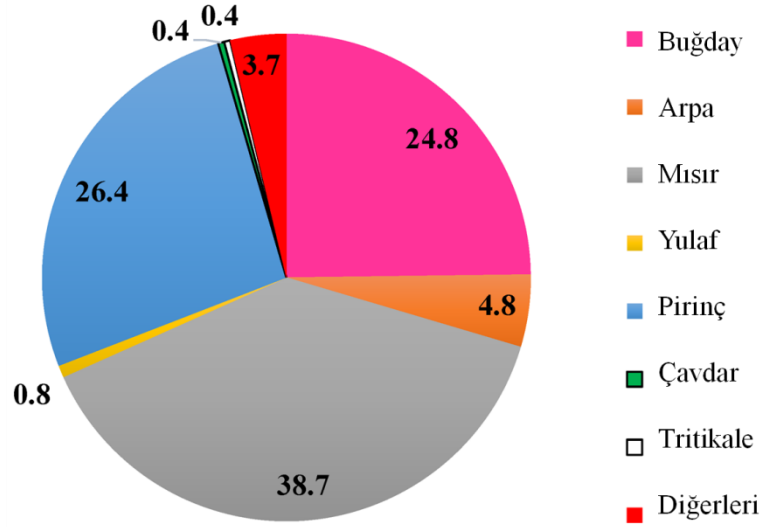
Diploid buğdayların genom yapılarının gösterimi (AA) şeklinde, kromozom sayısı ($2n=14$) olarak, tetraploid buğdayların gösterimi (AABB) şeklinde, kromozom sayısı ($2n=28$) olarak, hekzaploid buğdayların gösterimi ise (AABBDD) şeklinde ve kromozom sayısı ($2n=42$) olarak ifade edilir. Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*), Doğu (İran) buğdayı (*Triticum carthlicum*), Topbaş buğday (*Triticum compactum*), Gernik (*Triticum dicoccon*), Durum buğdayı (*Triticum durum*), Kaplıca buğdayı (*Triticum monococcum*), Polonya buğdayı (*Triticum polonicum*), Kavuzlu buğday (*Triticum spelta*), Turnadili buğday (*T. turanicum*), İngiliz (kaba tahıl) buğday (*Triticum turgidum*) bazı buğday çeşitlerindedir (Atak, 2017; Şekil 1.2).



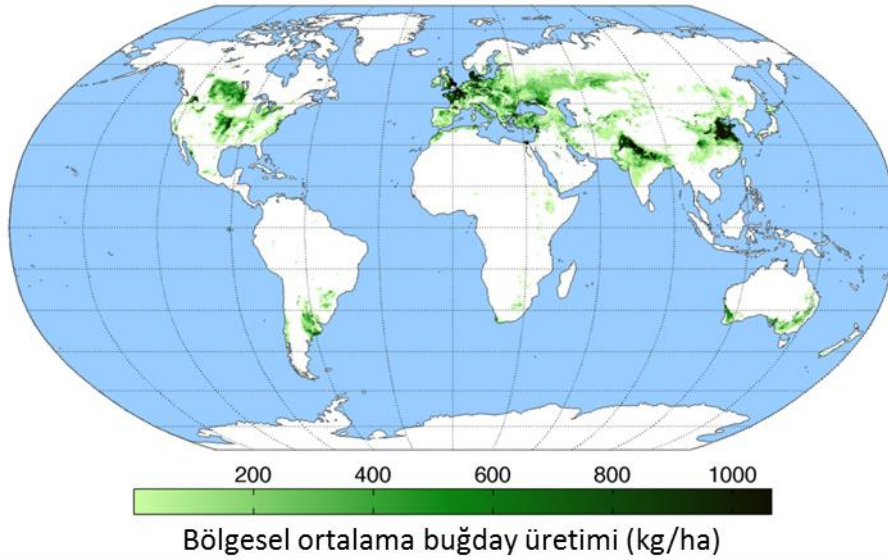
Şekil 1.2. Buğday tohum tipleri (Shewry, 2009).

İnsanlığın uygarlığa geçişindeki temel faktörler hayvan ırklarının evcil hale getirilmesi ve bitki türlerinin kültüre alınıp yetiştirilmesidir. Farklı uygarlıkları bünyesinde barındıran Anadolu toprakları, tüm dünyada beslenmede kullanılan ve oldukça önemli olan bazı bitkilerin yetiştirilmesinde ve dünyaya yayılış göstermesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Anadolu'dan çıkan bu bitkilerin genetik orijinlerinin burası olması ve tüm dünyaya buradan yayılış göstermesi konusunda Anadolu toprakları vazgeçilmez bir coğrafyadır (Atak, 2017).

Buğday, dünya nüfusunun beslenmesi ve gıda güvenilirliğinin oluşturulması yönünden hayati bir öneme sahip olmasının yanı sıra dünya üzerindeki bitki biyolojik çeşitliliğinin de en önemli unsurlarındandır. Dünya'da en çok üretimi yapılan tahıl bitkilerinin başında buğday gelir (Şekil 1.3). Bunun yanında oldukça geniş bir coğrafyada tarımı yapılmaktadır (Şekil 1.4).



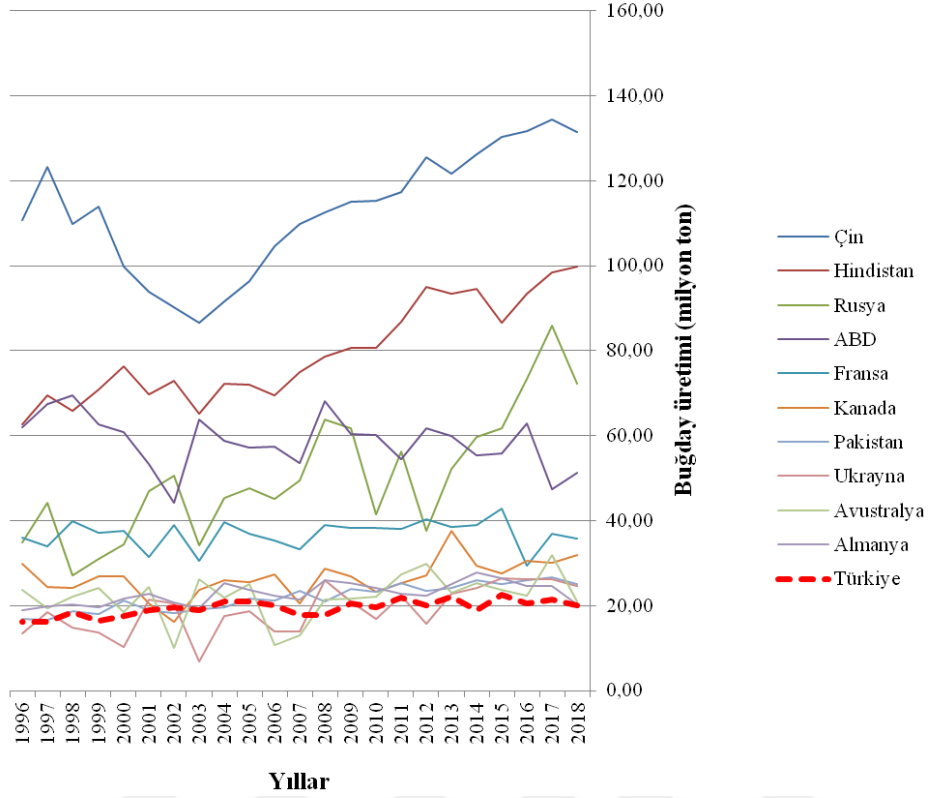
Şekil 1.3. Dünyada 2018 yılı tahıl üretim yüzdeleri (FAOSTAT, FAO Statistics Division, 2020).



Şekil 1.4. Dünya'da buğday üretim haritası (Monfreda ve ark., 2008).

Buğday insanların hem geçim kaynağı olması hem tükettiği bir besin olması hem de sanayide birçok üründe ham madde olarak kullanılmasından dolayı oldukça önemlidir (Türkiye'nin buğday atlası, 2016; Karagöz, 2020; Kasim ve ark., 2013). Artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacının karşılanmasında bu denli önemli bir yere sahip olan buğdayın tarımına dair faaliyetler de zamanla yoğunlaşmakta ve üretim kapasitelerinin artırılması için çaba sarfedilmektedir (Şekil 1.5.).

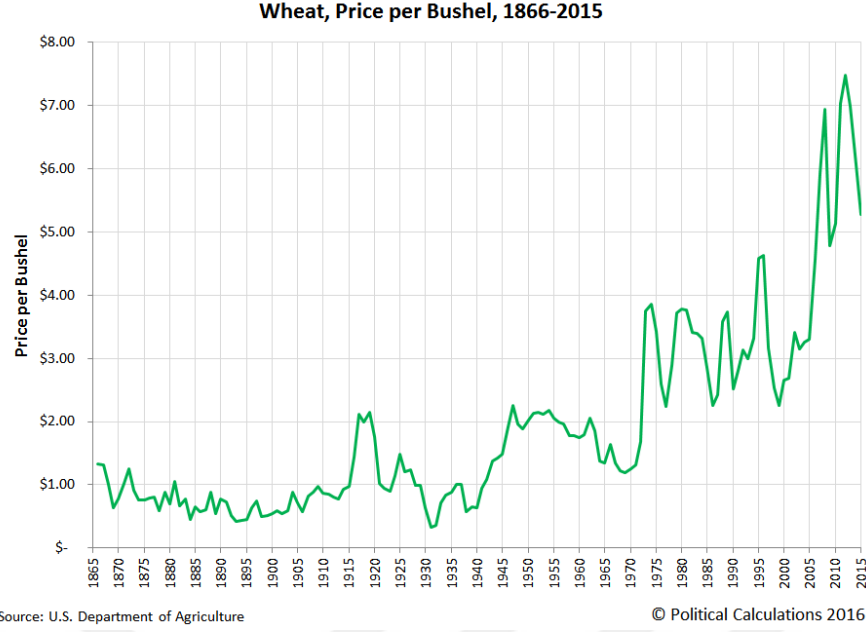
Dünyanın en büyük buğday üreticilerinin 1996-2018 arasında yıllık üretimlerindeki değişim



Şekil 1.5. Dünya’da buğday üretimi verileri 1996-2018. Türkiye dünyadaki en büyük 11. buğday üreticisidir. (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) veritabanı).

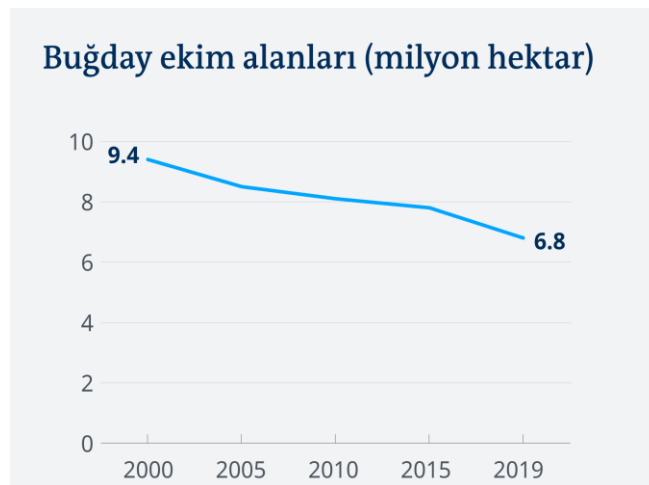
Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü verilerine dayanarak, tabloda da belirtildiği üzere 2018 ile 1996 yılları arasında Dünya’da buğday üretiminin en çok yapıldığı ülkelerin en başında 131,40 milyon ton ile Çin gelmektedir. Sıralamada 2. sırada 99,70 milyon ton ile Hindistan ve 3. sırada 72,10 milyon ton ile Rusya bulunmaktadır. Dünya’da 2018 yılında toplam buğday üretimi 734.00 milyon tondur. Türkiye ise 20 milyon ton üretimle Dünya sıralamasında 11. sırada yer almaktadır.

Buğday ölçek fiyatı 1866 yılından günümüze kadar geçen süreçte sürekli olarak dalgalanmalı artışlar göstermektedir. 1866 yılında buğday ölçek fiyatı 1 doların biraz üzerinde iken 2015 yılında 7,5 dolara yakın olduğu Amerikan Tarım Bakanlığı veri grafiğine göre söylenebilir (Şekil 1.6).



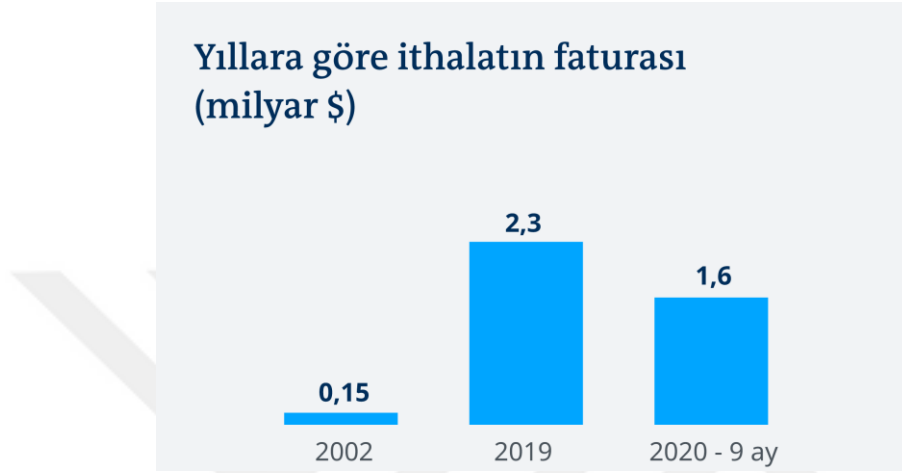
Şekil 1.6. Buğdayın ölçek fiyatındaki değişim 1866-2015 (Amerikan Tarım Bakanlığı- USDA).

Buğday fiyatlarında meydana gelen yükseliş artan taleple birlikte ekim alanlarındaki daralma ve iklim değişiminin getirdiği kuraklık gibi çevresel faktörlerin birleşimi sonucudur. Ülkemiz de bu büyük problemin etkisi altındadır. Türkiye’de buğday ekim alanlarının yıllara göre değişimlerine ait grafikte (Şekil 1.7) görüldüğü gibi her 5 yılda bir veriler toplanmış ve işlenmiştir. Ziraat Mühendisleri Odası’nın 2018 tarihli Buğday Raporu’na göre Türkiye’de 2000 yılında 9,4 milyon hektarı bulan ekim alanı yıllar geçtikçe azalmış, son olarak 2019 yılında ise 6,8 milyon hektara kadar azaldığı kaydedilmiştir.



Şekil 1.7. Türkiye buğday ekim alanlarının değişimi 2000-2019 (TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 2018 Buğday Raporu).

Toplam ekim alanındaki azalma görünürde rekoltede bir düşüşe sebep olmamakla birlikte, artan ihtiyacı karşılamanın önünde bir engel olarak değerlendirilebilir. Türkiye işlenmemiş buğday tohumundan un üreterek yarı işlenmiş mamul ihracından kazanç sağlamakla birlikte, yine Ziraat Mühendisleri Odasının çalışmaları buğday ithalatının toplam maaliyetinin artış gösterdiğini de raporlamaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Türkiye'nin buğday ithalatının maaliyeti (TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 2018 Buğday Raporu).

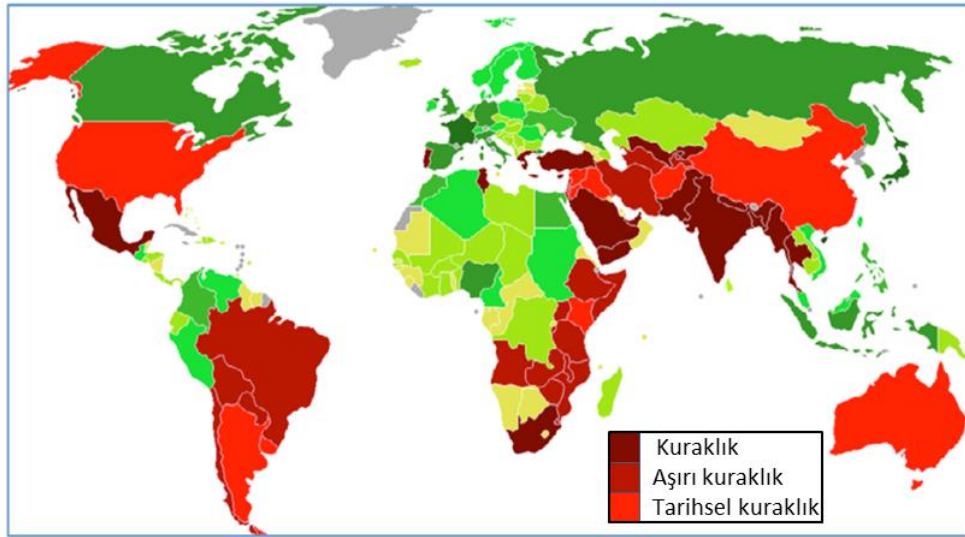
Ziraat Mühendisleri Odası'nın 2018 yılı verilerine göre Türkiye'de 2002 yılında ithalatın faturası 0,15 milyar dolar iken 2019 yılında bu değer 2,3 milyar dolara ulaşmış ve 2020 yılının ilk 9 ayı için 1,6 milyar dolar olarak hesaplanmıştır. Bu noktada iklim değişikliğinin etkilerinin ayrı bir başlıkta incelenmesi önem arz etmektedir.

1.2. İklim Değişikliği, Kuraklık ve Yarattığı Ekolojik Problemler

Dünya'daki insan nüfusu her geçen yıl artmaya devam etmekte ve artışla beraber 2050 yılında Dünya'daki insan sayısının da 9 milyarı geçeceği tahmin edilmektedir. İnsanlar için gıda yetersizliği oluşması gelecek yakın zamanda en büyük sorunlardan biri haline gelecektir. Bu doğrultuda ürün artışının gerçekleşebilmesi için ise ürünlerin verimliliğinde ve dayanıklılığında bir artış sağlanması gerekir. Çeşitli buğday türlerinin üretilmesinde çevresel faktörler, iklim değişikliği, biyotik ve abiyotik stres faktörleri oldukça önemli etmenlerdir. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri sebebi ile neredeyse mahsüllerin ürün verimi yarı yarıya bir oranda düşüş gösterebilmektedir. Üretimdeki düşüşte en büyük rolü olan etmen ise

abiyotik stres faktörleridir. Kuraklık, aşırı tuzluluk ve sıcaklık, sel oluşumu, toksik metal birikimi, radyasyon gibi faktörler ürün verimliliğini olumsuz şekilde etkiler.

İklim değişikliği sonucu karşılaştığımız sorunlardan biri olan küresel ısınma sebebiyle yakın gelecekte birçok tarım ürününün yetiştirilmesinde ciddi riskler oluşacağı öngörülmektedir. Özellikle kuraklık stresinin yakın gelecekte daha büyük bir sorun teşkil edeceği düşünülmektedir. Topraktaki nem oranının düşmesi sonucu ekilebilir tarım alanlarındaki oranın %29'lardan daha da düşük seviyede olması beklenmektedir (Aksay ve ark., 2005). Üstelik bu tür kuraklık baskısının en yoğun yaşanacağı coğrafyaların başında ülkemizin de yer aldığı Orta Doğu ile Güney-Güneybatı Asya yer almaktadır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Global kuraklık haritası (Motiee ve Mcbean, 2012).

Çizelge 1.1. Altı kıta için büyük ölçekli kuraklık oluşumları (Motiee ve Mcbean, 2012)

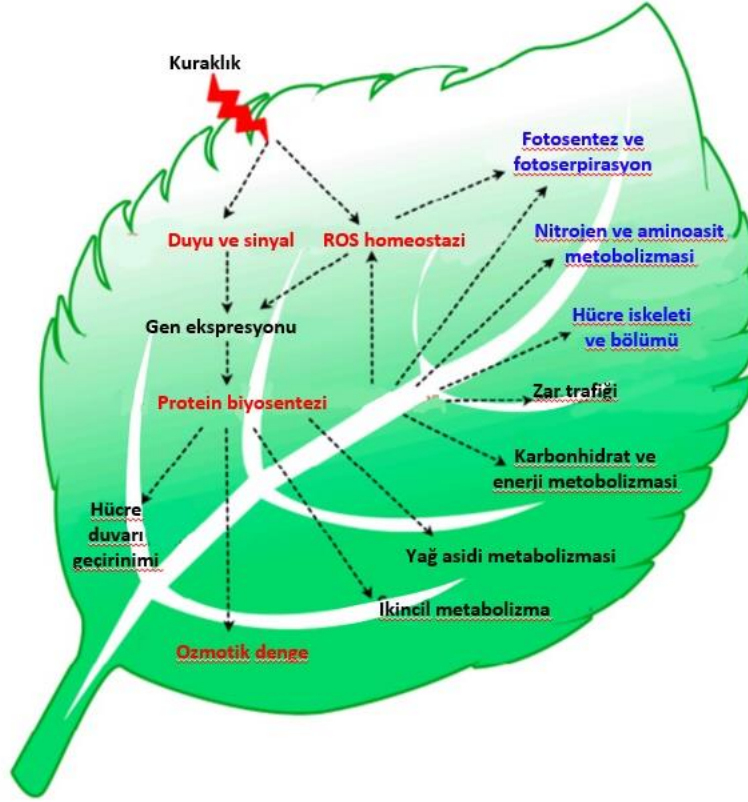
	No. of drouhts	No. of drouhts ≤ 6 months	No. of drouhts ≥ 12 months	Longest duration (months)	Maximum spatial extent (km ²)
Africa	44	28	4	19 (1982-84)	40.0%
Asia	86	37	22	49 (1984-88)	18.5%
Europe	40	24	4	20 (1959-61)	42.8%
North America	57	34	8	44 (1950-53)	39.3%
Oceania	24	17	1	12 (1951-52)	80.2%
South America	45	37	4	16 (1958-59)	51.2%

Altı kıtadaki kuraklık durumları 6 aydan az ve 12 aydan çok olacak şekilde incelendiğinde (Çizelge1.1) kıtalarda kuraklık oluşum sıralarının Afrika, Asya, Avrupa, Kuzey Amerika, Okyanusya ve Güney Amerika olacak şekilde sıralandığı görülmektedir.

Türkiye, iklim değişikliği ve kuraklık olaylarının insidansı için oluşturulan simülasyonlarda ve nihai tahminlerde en çok etkilenecek ülkeler arasında bulunmaktadır. Bu durum buğdayın gelecekte güvenli ve kontrollü şekilde üretilmesi açısından risk oluşturmaktadır. Tüm bu sorunlara karşın, diğer yandan, dünya genelinde üretilen buğday miktarının da yaklaşık olarak %70 oranında artırılması gerekmektedir (Hasanuzzaman ve ark., 2013; Semenov ve ark., 2014). Bu senaryolar insanların tarım alanlarını en akılcı şekilde kullanmalarının yanında, daha dayanıklı ve verimli buğday türlerini ekmelerini de zorunlu hale getirmiştir. Buğdayın kuraklık gibi çevresel etmenlere daha dayanıklı hale getirilebilmesi için de öncelikle, fizyolojik ve metabolik dinamiklerin iyi anlaşılması esastır.

1.3. Bitkilerin Çevresel Baskı Koşullarına Karşı Savunma Mekanizmaları

Bitkiler hayatta kaldıkları süre boyunca farklı tip çevresel baskı koşullarına maruz kalırlar. Bu çevresel baskılar biyotik ve abiyotik çevresel baskı olmak üzere temelde 2 gruba ayrılır. Biyotik stres faktörleri mikroorganizmalar, patojenler ve herbivorların oluşturduğu stres faktörleri iken, abiyotik stres faktörleri ise kuraklık, aşırı düşük ve yüksek sıcaklık, su fazlalığı, aşırı tuzlu ortamlar, kirleticiler, radyasyon gibi çevre etmenli faktörlerdir. Hem biyotik hem de abiyotik stres türü bitkilerde verimi ve bitkilerin hayatta kalma çabasını olumsuz şekilde etkileyen faktörleri içerir. Oluşan abiyotik stres baskısı tarımı da azaltır. Tüm bu stres baskısına karşı bitki, stresi tolere edebilmek ve etkilerini en aza indirebilmek için çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar (Şekil 1.10) geliştirir (Gall ve ark., 2015).

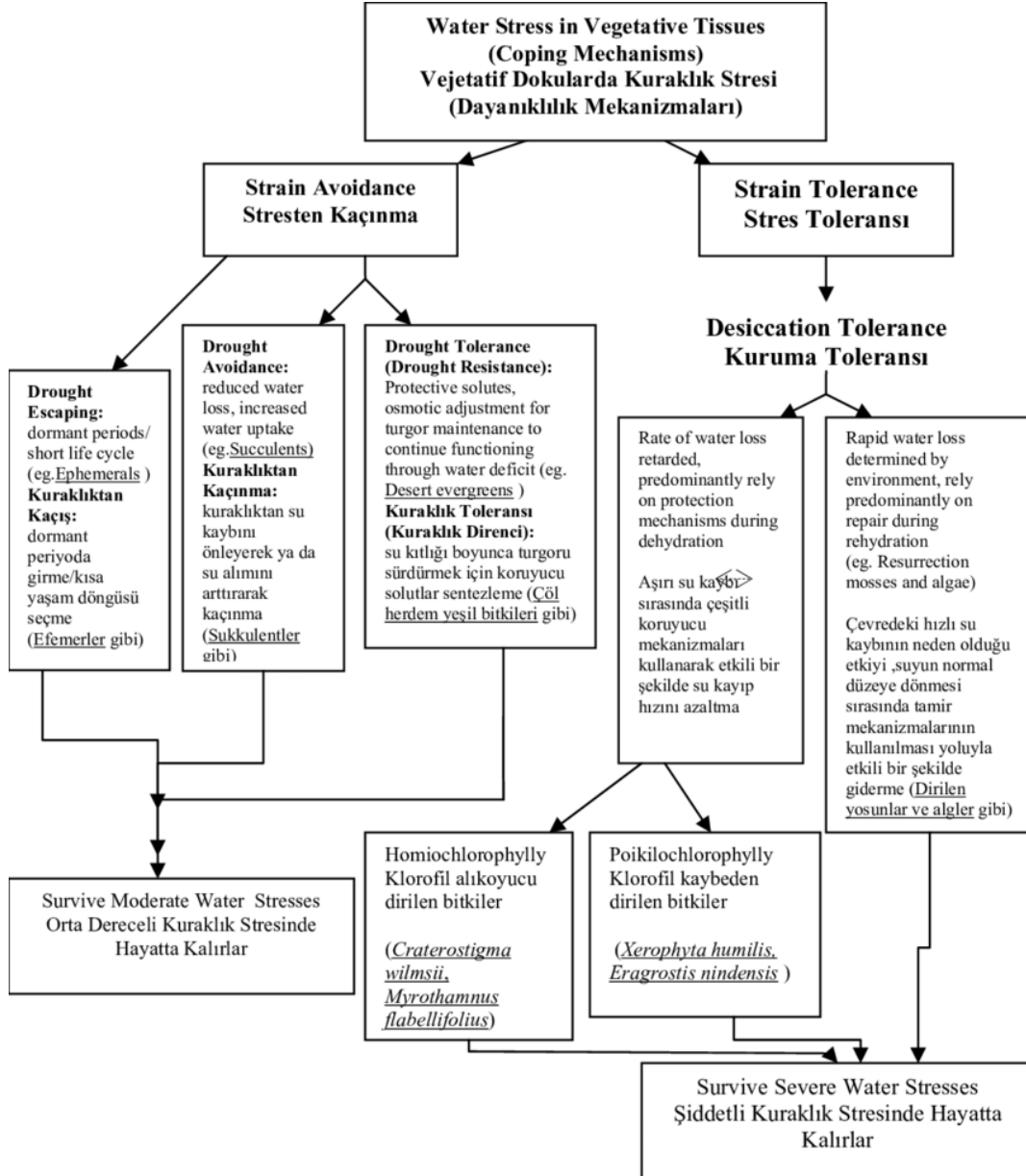


Şekil 1.10. Kuraklık stresine cevap oluşturan bitki yapraklarındaki metabolik olaylar ve değişimler (Wang ve ark., 2016).

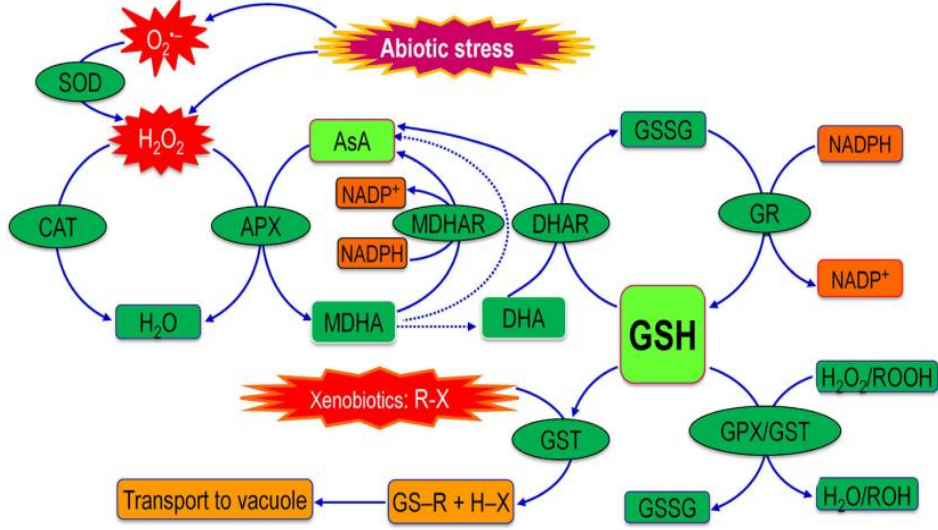
Bitkilerde kuraklık stresi oluşumu ile beraber büyüme ve verim potansiyelleri ciddi şekilde etkilenir. Toleranslı olan türde strese karşı oluşan tepki şiddeti de azalır. Dallanmış kök yapısı bitkinin topraktan daha fazla su almasına ve bu suyun fotosentez için taşınımının yapılmasına yardımcı olarak stresin etkilerini en aza indirmek için çabalar. Fotosentetik pigmentlerde oluşan değişimler de kuraklığın tolere edilmesinde oldukça önemli rol oynarlar. Özellikle karotenoidler bitkiyi kuraklığın sebep olduğu oksidatif stresten korumak için farklı yöntemler uygularlar. Bu nedenle de bitkideki kuraklık stresinin tolere edilebilmesi açısından karotenoidler önemli fotosentetik pigmentlerdir (Jaleel ve ark., 2009).

Kuraklık stresi ile karşı karşıya kalan bitkide 3 farklı savunma mekanizması gerçekleşir. Kuraklık stresine karşı tolerans, kaçınma ve kaçış. Kaçınma mekanizması stresten dolayı bitki üzerinde oluşan olumsuz etkilerinin giderilmesi veya geciktirilmesi için gerçekleşir. Bu mekanizma sayesinde kuraklık sonucu oluşacak su kaybı en aza indirilmiştir olur. Kaçış mekanizması için ise yine su kaybını en aza indirmek için bitki stomalarının

kaplanması şeklinde bir tepki geliştirmiştir. Tolerans mekanizmasında ise su taşınımının engellenmesinin bitki tarafından tolere edilmesi ve ksilem direncinin oluşması ile gerçekleşir. Kaçış mekanizmasında yine asıl hedef bitkideki su kaybının geçici de olsa tolere edilip en aza indirilmesini sağlamaktır (Delzon, 2015; Basu ve ark., 2016; Şekil 1.11).



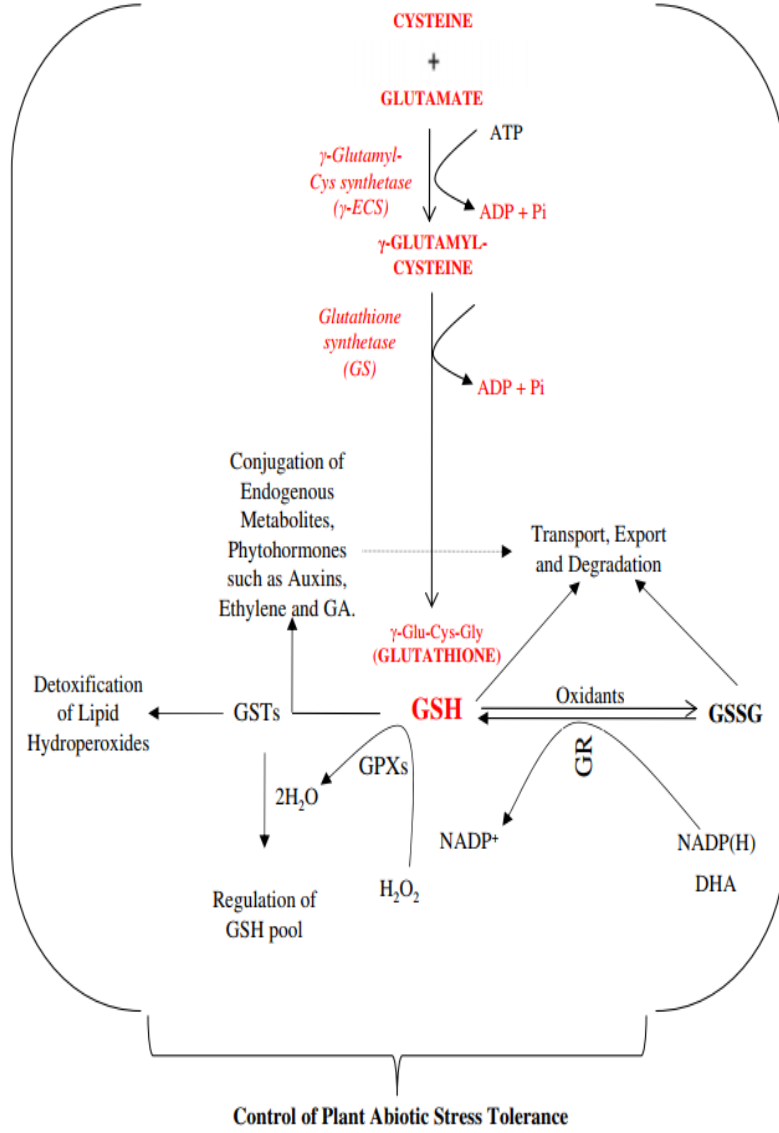
Şekil 1.11. Bitkilerin kuraklık baskısına karşı savunma sistemleri ve stratejileri (Delzon, 2015; Díaz-López ve ark., 2012).



Şekil 1.12. Abiyotik stres esnasında ROS detoksifikasyon mekanizmalarında görev alan çeşitli antioksidan enzimler (Hasanuzzaman ve ark., 2017).

Şekil 1.12’de görüldüğü gibi reaktif oksijen çeşitleri (ROS) detoksifikasyon mekanizmalarında AsA-GSH döngüsü AsA ve glutatyon (GSH) molükülünden, antioksidan enzimler askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat (MDHAR), dehidroaskorbat (DHA), glutatyon redüktaz (GR) moleküllerinden oluşur.

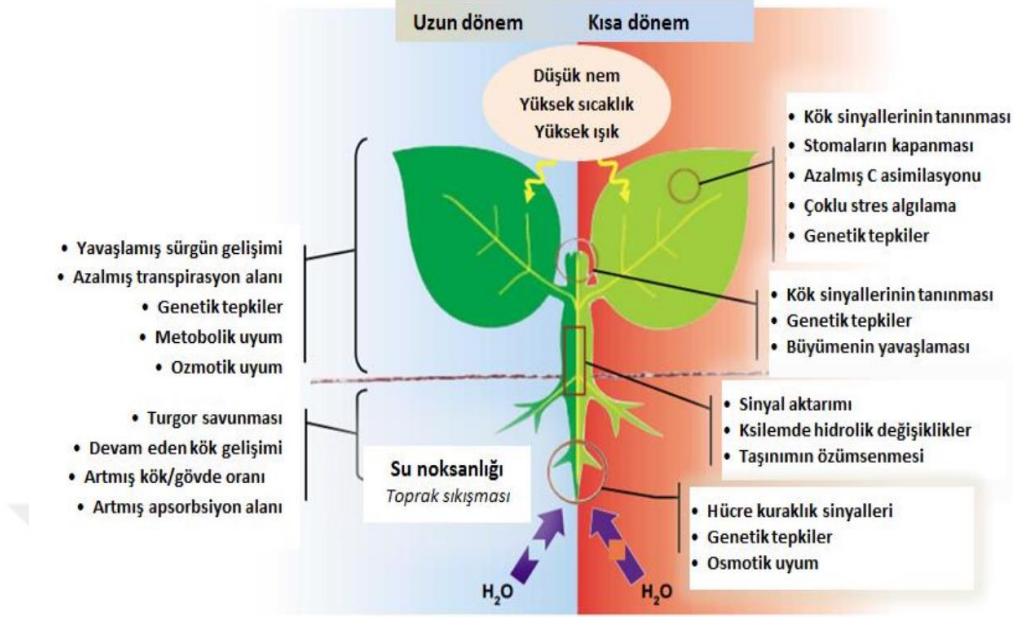
Şekil 1.12 üzerinde noktali çizgilerle gösterilen kısımlar enzimatik olmayan geçişleri ifade eder. R yan grup olarak aromatik, alifatik ya da heterosiklik grubu temsil eder. X ile gösterim nitrit, sülfat, halojenür gruplarından biri olabilir. Abiyotik stres sonucu bitkide ROS üretimi meydana gelir. ROS detoksifikasyonunda ilk savunma SOD (süperoksitdismutaz) kullanımınıdır. O_2^- , H_2O_2 ’ye dönüşmüştür. Oluşan H_2O_2 katalaz (CAT) enzim aktivitesi sayesinde H_2O ’ya dönüşür ya da H_2O_2 AsA-GSH döngüsü içerisine girer ve bu döngü içinde APX ve ASA kullanılarak H_2O ’ya dönüştürülür. ROS detoksifikasyonuna katılan ASA, DHA’ya oksitlenir. AsA-GSH döngüsünde yer alan enzimler olan MDHAR ve DHAR AsA yolu reaksiyonlarında görev alır. GSH molükülü ROS (glutatyon peroksidaz veya GST aktivitesi ile) veya ksenobiyotik (GST aktivitesi ile) detoksifikasyonunda rol alır. GSH molükülü ROS detoksifikasyonu sırasında glutatyon disülfür molükülü (GSSG)’ye dönüştürülür. Bu GSSG molükülü, glutatyon redüktaz aktivitesi ile tekrar GSH molükülüne dönüştürülür (Hasanuzzaman ve ark., 2017).



Şekil 1.13. İndirgenmiş ve oksitlenmiş glutatyonun bitki cansız stres yanıt mekanizmasının temel gösterim şeması (Gill ve ark., 2013).

Glutatyon redüktaz flavoenzim grubunun bir üyesidir ve disülfid yan grubu içerir. GSSG'nin bir molünün GSH molekülüne dönüştürülmesi için bir mol NADPH kullanılır. GR mekanizması ile ilgili olarak burada (Şekil 1.13) var olan substrat ile GR redoks dönüşümlerinin kontrol edildiği şematize edilmiştir (Gill ve ark., 2013).

1.3.1. Kuraklık baskısının bitkilerdeki etkileri ve yanıt mekanizmaları



Şekil 1.4. Bitkide uzun ve kısa dönem oluşabilecek kuraklık baskısına karşı gelişen yanıtlar (Örs ve Ekinci, 2015; Chaves ve Pereira, 2003).

Kuraklık etkisi altında bitkilerdeki büyüme ve gelişme fonksiyonları olumsuz yönde değişir. Bitkideki değişimler bitkinin maruz kaldığı kuraklık süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Farooq ve ark., 2014). Kuraklığın olduğu ilk evrelerde, bitki topraktan daha fazla su alabilmek için kök gelişimini destekleyerek ihtiyacı olan suyu topraktan almaya çalışır. Ancak toprakta oluşabilecek uzun süreli bir kuraklık karşısında bitkide kök ve gövde gelişimi bir süre sonra yavaşlar ve durur. Bu durumda bitki yaprak yüzey alanını ve yaprak sayısını azaltır. Yapraklarda sararmalar görülebilir ve yaprak kayıpları meydana gelebilir. Bitkide gerçekleşen bu değişimler kök ve gövde kısımlarındaki hücre bölünmelerinin zayıflamasına sebep olur. Bunun sonucunda ise kuraklık sebebiyle fotosentez oranı düşer (Öztürk, 2015). Kuraklık stresi ile beraber yaprakta sinyal yollarının aktive edilmesi, genlerin ekspresyonu ve protein biyosentezi teşvik edilir. Bunların yanı sıra fotorespirasyon, fotosentez, hücre iskeleti ve hücre bölünmesinin, azot ve amino asit metabolizmasının inhibisyonunu sağlar (Şekil 1.14) (Wang ve ark., 2016). Ayrıca kuraklık, su ile köklere taşınımı sağlanan bazı besinlerin alımını ve kullanılmasını da engelleyen bir durumdur (Maheshwari, 2012).

Doğal yollarla oluşan kuraklık stresi ek olarak bir de laboratuvar ortamında oluşturulan kuraklık stresi vardır. Bu da polietilenglikol (PEG) kimyasalı tarafından oluşturulabilir.

PEG solüsyonu birden fazla farklı konsantrasyona sahiptir. Bu sebeple farklı konstantrasyon testleri yapmak kolaydır. PEG kimyasalının moleküler ağırlığı yüksektir ve bitkinin aldığı suyun bitki hücre duvarına geçişine engel olur. Bu özelliği sebebi ile de çimlenme deneyleri yapılırken bitkinin su potansiyelinin kontrol edilmesinde PEG solüsyonu kullanılır. Çimlenme deneyleri yapılırken tohumlar çeşitli konsantrasyonlarda PEG solüsyonu ile muamele edilirler. Üreticiler, denenen türler için ayırt edici özellik olması yönünden PEG solüsyonunun farklı konsantrasyonlarını kullanarak en ideal konsantrasyonu tespit ederler ve o konsantrasyonu kullanırlar. Tespit edilen konsantrasyon seçilebilecek en yüksek konsantrasyon olup bitkinin de tolere edebileceği maksimum kuraklık sınırındır (Sallam ve ark., 2019).

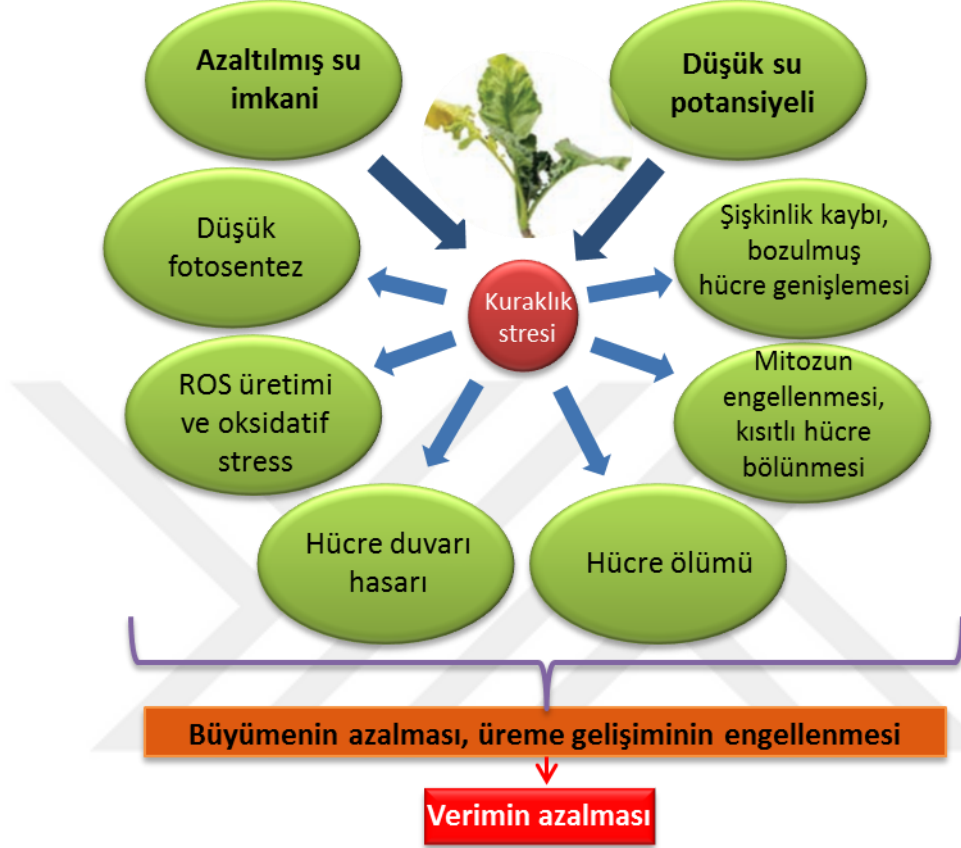
1.3.1.1. Kuraklık baskısının fizyolojik etkileri

Bitkilerde kuraklık stresine yanıt olarak geçmişte birçok tepki mekanizması tespit edilmiştir. Özellikle buğday ve arpa bitkilerinde kuraklığın oluşturduğu etkileri azaltan birçok fizyolojik değişim tespit edilmiştir. Belirli genler tarafından kontrol edilen bu fizyolojik değişimler genetikçiler ve üreticiler için oldukça önemli göstergelerdir. Kuraklığa direnç gösteren ve kuraklığa duyarlı buğdaylarda oluşan fizyolojik değişiklikler şekildeki gibidir (Anjum ve ark., 2011; Sallam ve ark., 2019; El-Afry ve ark., 2012).

Kuraklık stresi buğday çeşitlerinde kök uzunluğu ve sürgün uzunluğu, RWC değeri yani bağıl su içeriği, yaprak gelişimi ve tohum çimlenmesi gibi fizyolojik gelişimlerde azalmaya sebep olan önemli faktörler arasındadır. Ayrıca oluşan kuraklık stresinin derecesi bitkinin fizyolojik gelişimi ile ters orantılı şekilde etki eder (Hasanuzzaman ve ark., 2013).

Bitkinin kuraklığa maruz kalması sonucunda genel olarak bitkide kök ve gövde oranlarında strese bağlı olarak değişimler meydana gelir. Absisik asit, sitokinin, etilen, malat gibi bazı moleküller stres toleransında miktarlarını arttırarak rol oynarlar. Aba genel olarak bitki terlemesinde etkin rol oynayan bir moleküldür. Ayrıca stres durumunda bitki yanıt olarak stomalarını kapatma eyleminde bulunur ve bu şekilde su kaybını en aza indirmeye çalışır. Klorofil pigmentlerinin azalması ile bitkinin kuraklık stresine yanıt mekanizması düzenlenmeye çalışılır. Kuraklık stresi altında bitkide klorofil içeriğinde azalma meydana gelir. Bu azalmanın sebebinin kuraklık stresinin klorofil pigmentlerini bozduğuna yönelik bir durum olduğu düşünülür. Bağıl su içeriğindeki değişimler de yine bitkinin kuraklığa

toleransında rol oynayan diğerk bir parametredir. Yaprak RWC değerleri gelişimin ilk evrelerinde yüksek değerlerde iken kuraklığa maruz kalma süresi ile beraber bu değerlerde azalmalar beklenir (Anjum ve ark., 2011).



Şekil 1.15. Kuraklık stresi maruz kalan bitkide gerçekleşen bazı değişimler (Vurukonda ve ark., 2016).

Kuraklık stresi ayrıca bitki su alım yeteneğini ve turgoru da etkiler. Bitkinin ihtiyacı olan besini kökleri sayesinde topraktan alamaması ve bitkiye iletilmemesine sebep olur. Bu sebeple suda çözünen besinlerden olan nitrat, kalsiyum, sülfat, magnezyum gibi besinlerin difüzyonunu olumsuz yönde etkiler. Kuraklık bitkide antioksidan savunma sistemine etki ederek serbest radikal oluşumunu da tetikler. Sonuçta kuraklık stresi bitkilerde büyüme, gelişme ve ürün kalitesini olumsuz şekilde etkileyen en önemli faktörler arasındadır (Vurukonda ve ark., 2016; Şekil 1.15).

1.3.1.2. Kuraklık baskısının metabolizmaya etkisi

Bitkilerde kuraklık stresi sonucu oluşabilecek metabolizma hasarının en aza indirilmesi için bitki savunma mekanizmaları mevcuttur. Reaktif oksijen türleri ile antioksidan enzim aktivitesi arasında oluşan denge oksidatif hasarın meydana gelip gelmeyeceğini belirler. Oluşabilecek oksidatif hasarın en aza indirilmesi için bitki tarafından düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler geliştirilir. Bu antioksidanlar; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon s-transferaz (GST) enzimleridir. Bitkide yüksek düzeyde enzim aktivitesi oluşması oksidatif hasara karşı kapasiteyi artırarak kuraklık toleransına katkıda bulunabilir (Anjum ve ark., 2011).

Benzer fizyolojik parametrelerde olduğu gibi fotosentez de çevresel etmenlerden dolayı etkilenir. Kuraklık stresi de bitki üzerinde önemli derecede olumsuz etki bırakır (Hasanuzzaman ve ark., 2013; Anjum ve ark., 2011).



Şekil 1.16. Bitkide oluşan kuraklık stresi sonucu fotosentez oranındaki düşüşün sebepleri (Hasanuzzaman ve ark., 2013).

Bitkilerde kuraklık stresi sırasında hormon seviyesinde değişiklikler, dengesizlikler oluşur. Hormon dengesizliği sebebi ile bitkilerdeki fotosentez seviyesinde de azalma meydana gelir. Bununla beraber bitkideki RWC değeri ve yaprak su tutma kapasitesinde de azalma ve stomaların kapanması olayları görülür. Stoma kapanması bitkinin strese maruz kaldığı esnada gösterdiği en erken tepkilerdendir. Stomaların kapanması sonucu mezofil hücreleri ile alınan CO₂'nin alınmasında düşüş meydana gelir ve sonuçta karboksilasyon (CO₂ asimilasyonu) düşer (Hasanuzzaman ve ark., 2013; Ganji Arjenaki ve ark., 2012; Şekil 1.16).

1.4. Glutasyon ve Glutasyon S-transferazlar

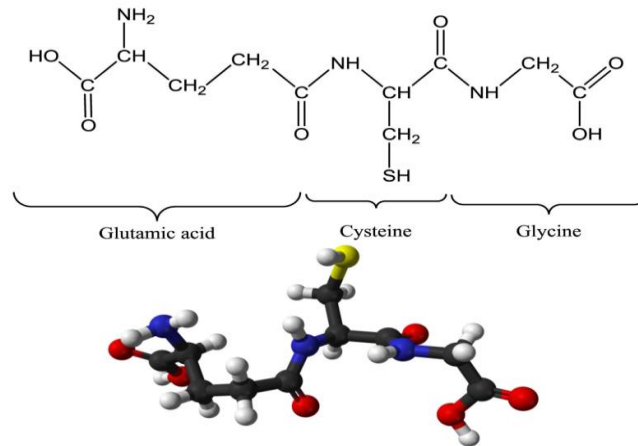
Abiyotik stresin birçok çeşidi buğday türleri için risk faktörü oluştururlar. Bu abiyotik baskı bitkide reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı oranda üretimine sebep olurlar. Reaktifler ve toksik maddeler hücrenin oksidatif hasardan korunması için en aza indirilir. Bitkide enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan bileşenler sayesinde ROS türleri hücrelerden temizlenir.

Reaktif oksijen türleri, bitkiler ve aerobik organizmalarda metabolik reaksiyonların yan ürünü olarak sentezlenmektedirler. Abiyotik baskı olarak nitelenen kuraklık, ağır metal birikimi, düşük ve yüksek besin miktarı, radyasyon, aşırı yağış vb. çevresel etkilere maruz kalan bitkilerde ROS üretiminin hızlı bir şekilde arttığı gözlemlenmesi ile beraber abiyotik baskı ve ROS arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve takibi oldukça önemlidir. ROS seviyesinin düşük olarak ölçüldüğü durumlarda bu moleküller abiyotik strese karşı bitkinin vereceği tepkiyi ve bitki için hayati fonksiyonların planlanma ve düzenlenme görevini üstlenirler. Metabolik fonksiyonların doğru şekilde devam edebilmesi için bitkideki ROS üretimi ile metabolizma reaksiyon ürünleri arasındaki dengenin korunabilmesi hayati bir önem taşır. Bitkilerdeki askorbat glutasyon yolağı ROS'un olumsuz etkileri ile mücadele edilmesinde kilit bir rol oynar. Bu yolak enzimatik (glutasyon S-transferaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutasyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz, glutasyon peroksidaz, gayakol peroksidaz) ve enzimatik olmayan (glutasyon, askorbik asit) antioksidanları içerir.

Glutasyon; sistein, glutamik asit ve glisinin bir araya gelmesi ile oluşan bir tripeptiddir. Düşük molekül ağırlığına sahiptir. Hücrelerin sitozolünde bulunur. Hücrede yaygın olarak bulunan tiyol intrasellüleri GSH'dır (Anderson, 1998; Tekeli, 2012).

GSH, sülfidril yan grubu içeren, çok işlevli, tripeptid ve substrat özelliği taşıyan suda çözünebilme yeteneği olan önemli bir üründür (Şekil 1.17). Bitkilerde sinyal iletim yollarında rol alır. Baskı altındaki bitkilerde toleransın belirlenmesinde de oldukça önemli bir parametredir. GSH bitkilerde milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Tiyol grubu ile indirgenmiş olarak serbest halde veya disülfid ile okside edilmiş halde 2 ayrı formda bulunabilir. GSH molekülü peptidaz tarafından hidroliz edilen bir moleküldür ancak yapısında bulundurduğu glutamat ve sistein arasındaki g-peptid bağlarından dolayı GSH moleküllerinin hidrolizi önemli oranda azalır. Sisteinin varlığı GSH'ın tiyol grubunun suda çözünürlüğü ve strese karşı büyüme, gelişmelerinde önemli bir metabolit olmasına neden olur. Sistein yapısında bulunan tiyol grubunun varlığı ve yüksek oranda bulunması sebebi ile hücrede antioksidan görevi gören glutasyonun çok büyük bir kısmı (%99'undan fazlası) indirgenmiş halde bulunur. GSH, yapısı nedeni ile oldukça karmaşıktır ve farklı abiyotik stres faktörlerine karşı stresi tolere edebilmek için farklı şekillerde değişip düzenlenirler (Tekeli, 2012; Anderson, 1998).

Oluşan oksidatif strese karşı GSH etkin bir rol oynayarak hücre içerisindeki dengeyi sağlamaya yardımcı olur. Aynı zamanda antioksidan enzimler, antioksidan vitaminler ve GSH sayesinde hücreler reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif hasardan korunmuş olurlar ve antioksidan kapasitenin korunması sağlanır (Aksoy, 2002).

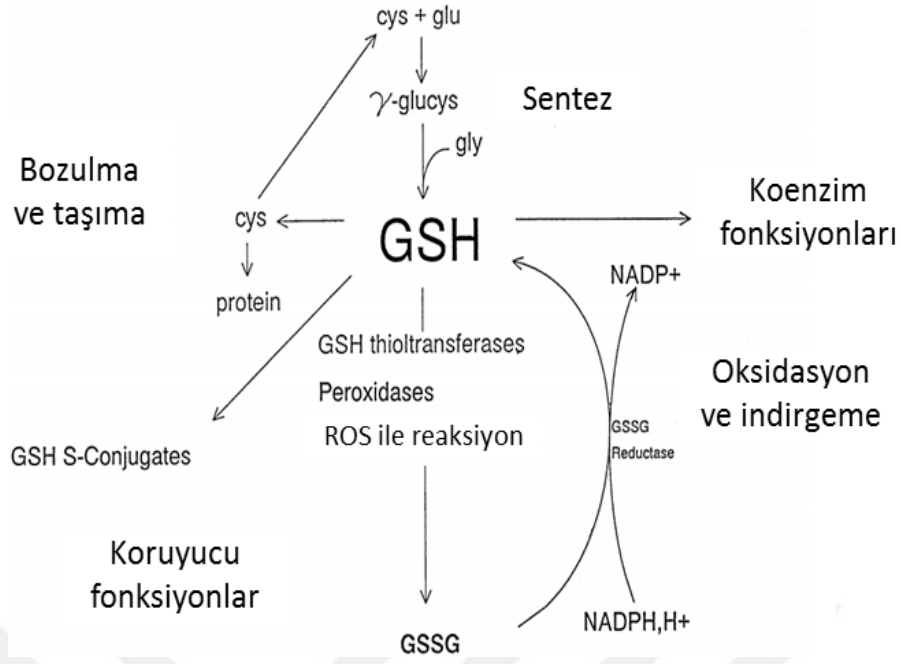


Şekil 1.17. Glutasyon molekülünün 2 ayrı gösterim şekli (Hasanuzzaman ve ark., 2017).

GSH'nin hücre içerisinde indirgenmiş glutatyon şeklinde kalabilmesi pentoz-fosfat metabolizması sayesinde olur. İndirgeme özelliği güçlü olan GSH hücre içerisinde bulunan proteinlerin, sistenin, dihidrolipoatların, koenzim-A gibi tiyol grubuna sahip moleküllerin ve antioksidan yapıdaki moleküllerin zarar görmesini engellemede önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca GSH, ribonükleotidleri indirgeyerek deoksiribonükleozid öncüllerinin oluşmasını sağlar. Hücrede oluşabilecek oksidatif hasara karşı da GSH bir koruma sağlar. Hücresel düzeydeki GSH dengesi biyosentez, oksidasyon, import-eksport arasındaki ilişki ile sağlanır iken doku düzeyindeki GSH dengesi dokulardaki GSH akışı ile sağlanır. Hücrelerde gerçekleşen GSH salınımı, hücre içi dengeyi sağlayan mekanizmalar açısından oldukça önemlidir. Lambda-glutamil döngüsü GSH molekülünün sentezinden, kullanılmasından, hücrenin korunmasından, metabolik reaksiyonlardan, taşınma ve depolanma olaylarından sorumludur (Aksoy, 2002).

Glutatyon, dokularda iki farklı formda bulunur; indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG). İndirgenmiş glutatyonda serbest halde bir sülfidril grubu bulunur. Bu sülfidril grubu sayesinde hemoglobin sistenlerinin ve hücre içi diğer proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmiş formda stabil oluşu sağlanır. Tiyol grupları enzim ve proteinlerde indirgenerek, indirgenmiş olan formların dengede kalması sağlanır. Böylece GSH sistenlerindeki -SH yan grubu sayesinde GSH'nin fizyolojik özellikleri yerine getirilir.

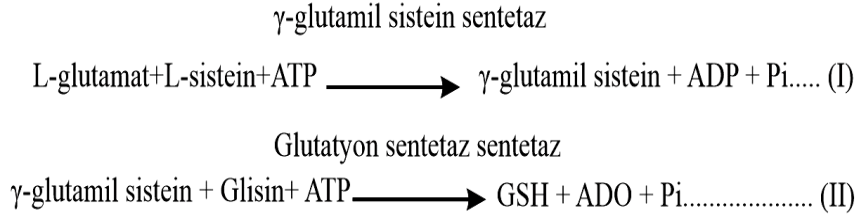
Tiyol grubu içeren enzim çeşitlerinin çalışma hızı/aktivitesi daha düşüktür fakat enzim O_2 ile muamele edilip okside olursa aniden enzim aktivitesi düşer. Bu düşüş ile beraber GSH oksidasyona uğrar ve tiyol gruplarını tekrar indirger ve ardından tiyol gruplarının aktivitesinde artış olur (Tekeli, 2012; Şekil 1.18).



Şekil 1.18. Glutatyon Metabolizması (Anderson, 1998).

Canlılarda GSH molekülünün sentezi 2 kademe gerçekteşir. İlk kademe glutamil sentetaz enzimlerinin kullanıldığı, ikinci kademe ise GSH sentetaz enzimlerinin kullanıldığı aşamadır (Aksoy, 2002; Chaves ve Pereira, 2003; May ve ark., 1998).

İlk aşamada γ -Glutamil sisteinil sentetaz enzimi aracılığıyla, L-glutamat ile L-sistein birleşmesi sonucu olur. Reaksiyonda katalizör olarak görev alan γ -glutamil sistein sentetaz enzimi glutatyon sentez reaksiyonunu durdurabilen bir enzim çeşididir. İkinci aşamada γ -glutamil sistein ve glisin biraraya gelmesi ile olur (Şekil 1.19). GSH dengesinin sağlanmasında enzim sentezinin önemi büyüktür. Buna ek olarak, hücrede GSH sentezinin arttığı durumlarda siklotransferaz enzim yardımı ile γ -glutamil5-oxoproline dönüştürülebilir. Hücre içi GSH sentezinin oluşabilmesi için GSH'ın hücre dışında degradasyona uğraması ve degradasyon sonucunda oluşan ürünlerin hücre içerisine alınması gerekir (Tekeli, 2012; May ve ark., 1998).



Şekil 1.19. GSH biyosentezi reaksiyonu (Tekeli, 2012).

İlk basamakta γ -glutamil sisteinil sentetaz katalizörü kullanılarak glutamat ve sisteinin birleşmesi ile ve ATP bağımlı olarak gerçekleşen reaksiyon zincirinin ikinci basamağında glutasyon sentetaz katalizörü kullanılarak glutamil sistein ve glisin birleşmesi ile ve ATP bağımlı olarak GSH oluşur (May ve ark., 1998).

Glutasyon konsantrasyonu, glutasyonun sentez reaksiyonlarında kullanılan substratların ve enzimlerin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Hücrelerde glutamat ve glisin yoğunluğu fazla iken sistein miktarı kısıtlıdır. Hücrelerin bazılarında sistein oluşumu serin aminoasidinin metiyonin kullanılarak transsülfürasyonu ile olur. Sistein dokulardaki proteinin yıkılması sonucu ve beslenme yolu ile alınan proteinlerle alınabilir (Aksoy, 2002; May ve ark.; 1998; Tekeli, 2012).

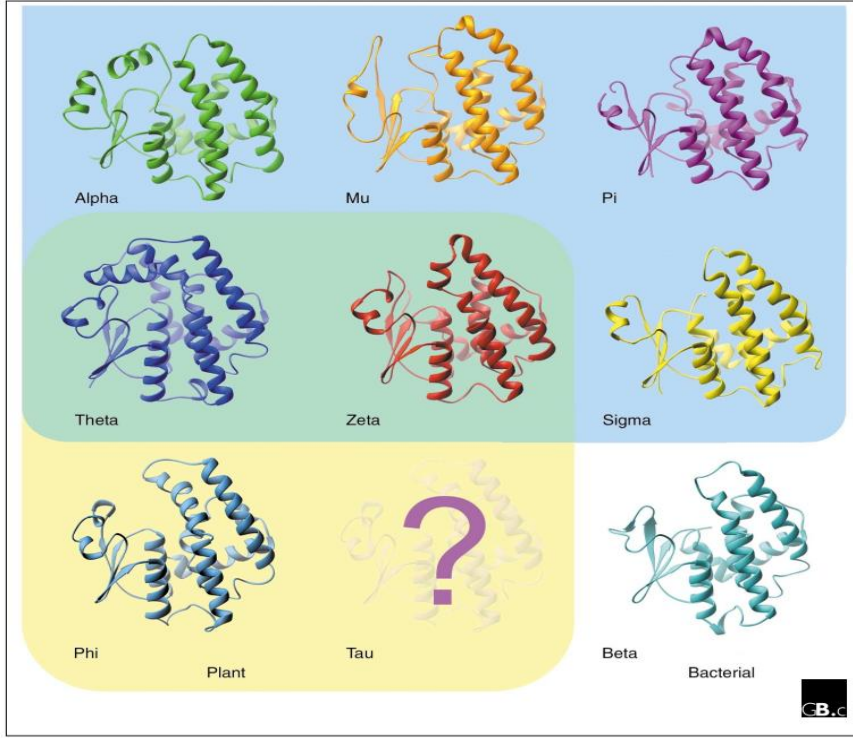
Glutasyon S-transferaz enzimleri 20-25 kDa molekül ağırlığında olan, hücre moleküllerini reaktiflere karşı koruyan Faz-II enzim ailesi üyelerindedir. GST'ler substrat olarak glutasyonu kullanırlar ancak genel olarak çok substratlı bir enzim çeşididir. Ksenobiyotiklerin metabolizmasında GST enzimleri oldukça önemlidir. Glutasyon, kosubstrat molekülüne özgül olarak bir G bölgesi ile bir H bölgesi içerir. GSH içerdiği tiyol grubu sayesinde başka substratlara bağlanır. GST ayrıca hücre içerisinde molekülleri indirgeme özelliğine sahiptir. Bu sayede hücre membranında oluşabilecek lipid peroksidasyonundan hücreyi korur. Bu özelliği ile GST'ler hücrede koruyucu bir rol üstlenmektedirler (Tekeli, 2012; Arı ve ark., 2002; Moron ve ark., 1979) ve GST enzimleri genellikle çok çeşitli organizmaların -insan, fare, sıçan ve bitki gibi-farklı bölgelerinden elde edilerek çalışılmıştır (Tekeli; 2012; Orhan ve Şahin, 1995).

DNA hiperoksitler ve lipid peroksidasyonu ile oluşan fosfolipidler GST enzimleri tarafından indirgenen bazı bileşiklerdir. GST enzimleri tüm bunların dışında tiyol grubunun bir molekülden diğerine aktarımını sağlayan enzim olma özelliği göstererek tiyolaz ve izomerizasyonda görev alır. GST tarafından katalizlenen izomerizasyon için 3 farklı mekanizma bilinmektedir. Bunlar; C=C çift bağ kaymaları, molekül içi redoks tepkimeleri, sis-trans izomerizasyonlarıdır (Allocati, 2018).

GST'lerin enzimatik olmayan aktivitelerinden bazıları ise; apoptoz esnasında oluşan hücre sinyal iletim yollarında, protein kinaz aile üyelerinin aktivitesinin kontrolünün sağlanmasında görev almaktadır.

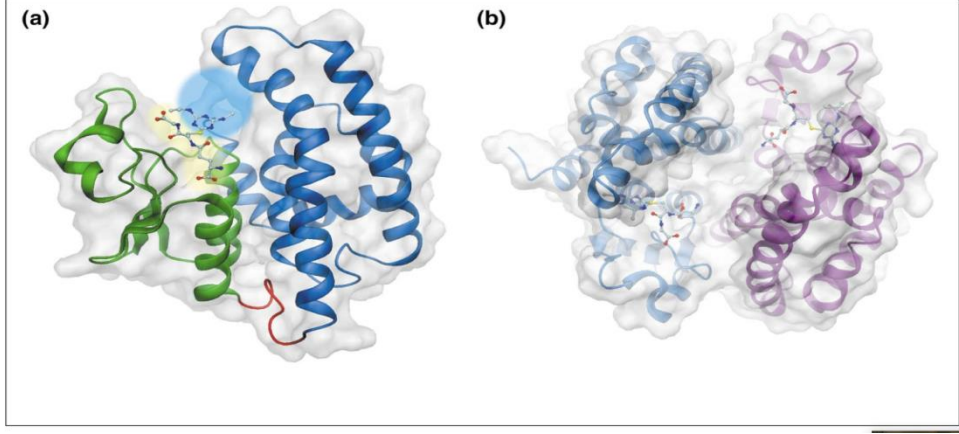
1.4.1. Bitkilerde GSH ve GST sistemleri

GST enzimleri ilk olarak 1960'lı yıllarda hayvan karaciğerinde keşfedildi. Bitkilerdeki ilk keşfi ise hayvanlardaki keşfinden kısa bir süre sonra 1970 yılında mısır bitkisinde oldu. GST enzimleri hücrelerde yaygın olarak bulunan enzim süper ailesinin bir üyesidir. Çok işlevlidirler ve hücrel fonksiyonlarda görev alırlar. 1970 yılında bitkilerde GST enzimlerinin keşfinden sonra çalışmalar devam etmiş ve 1980'li yıllarda mısır bitkisinden elde edilen gst enzimlerinin memelilerde bulunan GST enzimlerinde oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.20). Bu tespitin ardından çok sayıda GST enzimi farklı bitki türlerinden saflaştırılarak incelenmiştir. İlk zamanlarda GST enzim sınıflandırması sadece 3 çeşitle sınırlı kalacak şekilde yapılmıştır. Ancak hem bitki hem de memeli GST'leri iyice araştırılıp öğrenildikten sonra bu sınıflandırmanın yetersiz kaldığı anlaşılmıştır. Bu nedenle daha yüksek yapılı bitkilerdeki araştırmalarla bitki GST'leri çözümlenmiştir (Şekil 1.21).



Şekil 1.51. GST enzim süper ailesi üyeleri ve bitkilere özel izozimler (sarı çerçeve içerisinde gösterilmektedir) (Dixon ve ark., 2002).

Bitkilerde phi, tau, teta, zeta, lambda GST çeşitleri bulunur. Bu GST'ler arasında teta ve zeta GST'lerin hayvanlarda benzerleri vardır fakat diğer çeşitler bitkilere özeldir. Phi ve tau GST sınıfları bitkide en fazla bulunan çeşitlerdir. Zeta ve teta GST enzimleri hem hayvan hem de bitkilerde bulunan GST çeşitleridir. Ksenobiyotiklerin metabolizasyonunda önemli bir rol oynarlar. Tau ve phi GST'ler sırasıyla bitkide en çok bulunan GST çeşitleridir. GST'ler koenzim ya da kofaktör işleviyle glutatyonu kullanıp çeşitli reaksiyonları gerçekleştirir. GST enzimleri çoğunlukla sitozolde ifade edilir. Sitozolde, oksidatif stres anında GSH bağımlı katalitik reaksiyonların katalizlenmesini gerçekleştirir. Ayrıca GST enzimleri koful içerisinde de bulunabilir. Burada ise katalitik olmayan reaksiyonlarda görev alır. Daha önce tespit edildiği üzere GST'ler hücre içi sinyal yollarında da görev alırlar. GST enzimleri şekilsel ve yapısal olarak çeşitlilikleri sayesinde farklı görevler üstlenme yeteneği kazanmışlardır (Dixon ve ark., 2002; Hao ve ark., 2021; Kumar ve ark., 2013; Mauch ve Dudler, 1993).



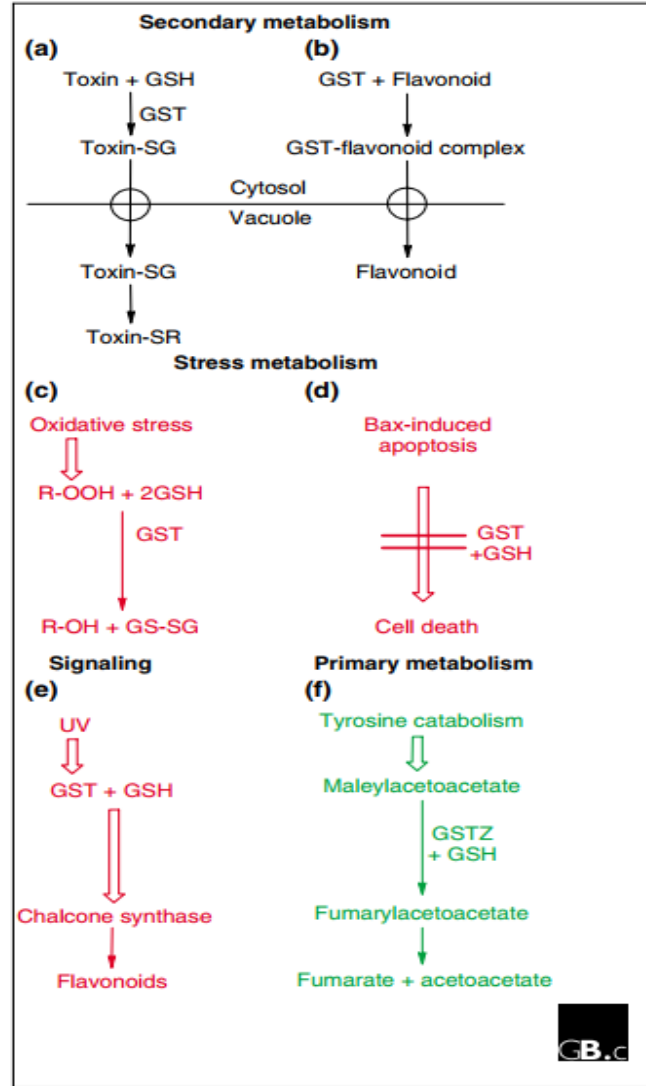
Şekil 1.22. GST monomerlerinin birleştirilmiş haldeki dimer yapısı ve yapıya substrat bağlanması ile oluşan kompleks (Dixon ve ark., 2002).

Şekil 1.22'de üç boyutlu konfigürasyonu resmedilen GST enzim yapısında:

(a) Standart bir GST alt biriminde yeşil ile gösterilen kısım (Şekil 1.22) enzimin amino-terminal alanını, kırmızı ile gösterilen kısım bağlayıcı bölgeyi, mavi ile gösterilen kısım karboksi-terminal alanını, gri ile gösterilen kısım ise protein yüzeyini ifade eder. GSH substratının bağlandığı bölge sarı renk ile ifade edilmiştir, hidrofobik bölge ise mavi renk ile gösterilmiştir.

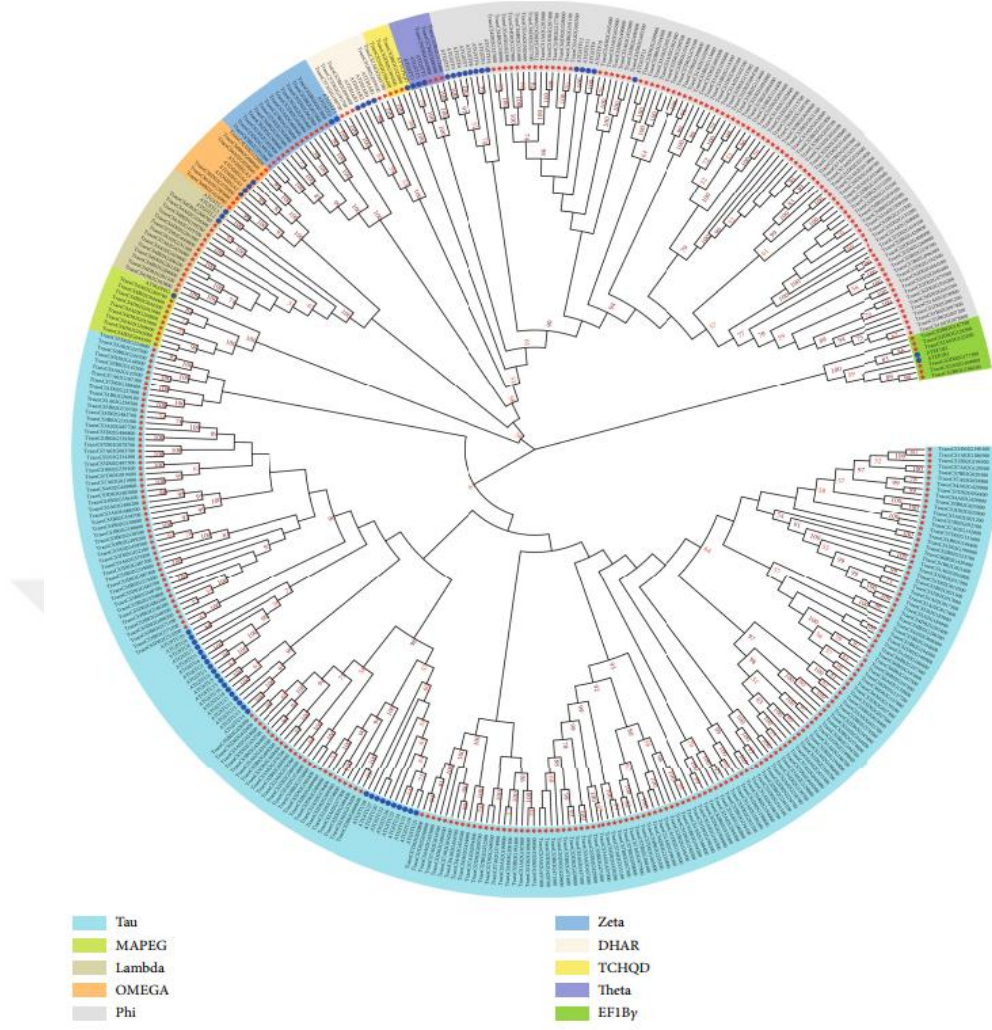
(b) Mavi ve mor renklerle gösterilen kısımlar amino-terminal alanlarıdır. Alt birimlerin aktif bölgesine bağlı olan çubuk ve top şeklindeki gösterim atrazin-glutasyon konjugatıdır (Dixon ve ark., 2002).

Şekil 1.23'te ifade edilen mekanizmada; (a) sekonder metabolizmada GST enzimleri GSH molekülleri ile konjugasyonla toksinlerin detoksifikasyonunu sağlarlar ve konjugatlar, dairelerle gösterilmiş olan ABC taşıyıcıları ile kofullara taşınırlar. (b) bazı phi ve tau GST enzimleri ile flavanoidlerin kofullara taşınımı gerçekleşir. (c, d, e) GST enzimlerinin stres metabolizmasındaki görevi (c) glutasyon peroksidazlar (d) Antioksidan aktivite esnasında hücre ölümüne karşı koruma sağlanması (e) stres metabolizmasında stres sinyal yolağında, bitkinin UV ışığa maruz kalmasının ardından kalkon sentetaz indüklenmesinde GST+GSH kompleksi rol alır. Kalın okla gösterim indüksiyon, ince okla gösterim enzimsel reaksiyonlardır (Wang ve ark., 2016).



Şekil 1.23. Bitkilerde bulunan GST enzimlerinin işlevleri (Wang ve ark., 2016).

GST enzimlerinin buğday türündeki gen sayıları pek çok araştırmaya konu olmuştur. Şekil 1.24'te gösterilen haritada *T.aestivum* GST genleri kırmızı yıldızlarla, *A.thaliana* GST genleri ise mavi noktalarla ifade edilmiştir. 10 farklı GST sınıfı 10 farklı arka plan rengi ile gösterilmiştir.



Şekil 1.24. *Triticum aestivum* ve *Arabidopsis thaliana* bitki türlerindeki GST genlerinin filogenetik haritası (Hao ve ark., 2021).

1.5 Tezin Amacı

Dünya üzerinde yakın gelecekte karşılaşılabilecek tahmin edilen kuraklık sebebi ile temel besin kaynaklarının üretiminin ciddi zararlara uğraması sonucu oluşabilecek gıda sıkıntısının ve buna bağlı olarak ülke ekonomisinin göreceği zararlar pek çok çalışmada ve raporda bildirilmektedir. Tez çalışmasında amaçlanan, kuraklığa karşı tolerant olduğu rapor edilmiş Bezostaja ile görece hassas Tosunbey buğday varyeteleri üzerinde kısa süreli kuraklığın farklı derecelerinin fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerinin geniş bir çerçevede bir arada incelenmesi, hem aynı varyetede artan kuraklığın gerçekleştirdiği değişimlerin hem de bu iki varyetenin benzer koşullarda verdiği yanıtın karşılaştırılmasıdır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞİ

Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıkları durumda stresin etkilerini en aza indirmek veya hafifletmek için bazı fizyolojik değişimler gösterirler. Bitkinin fiziksel ve morfolojik özellikleri bakımından bitkinin kuraklık toleransı ve adaptasyonu oldukça önemlidir. Bu fizyolojik değişkenlerin kontrolünü sağlayan genlerin ve özelliklerinin belirlenmesi de kuraklığa toleransın geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Buğday bitkisinin kuraklığa toleranslı şekilde geliştirilmesinin farklı sebeplerden dolayı zor olduğu bilinmektedir. İlk olarak kuraklık stresi; bu sebeple bitkide fizyolojik parametrelerde oluşan ciddi değişimler sebebi ile toleranslı tür haline getirilmesi zordur. İkinci olarak genotip-çevre etkileşimi; seçimi etkilemesi sebebi ile üçüncü olarak ise; birçok gen tarafından kontrol edilen karmaşık özellikleri. Bunların yanı sıra buğday genomunun karmaşıklığı ve ekin durumu da toleransı etkileyen özelliklerdir. Kuraklık toleransının artırılması için farklı alanlarda farklı birçok yöntem önerilmektedir. Bitkideki kuraklık toleransının artırılmasına yönelik ilerleme fizyoloji, biyokimya, üreme ve genetik araştırma ilkelerine dayalıdır (Sallam ve ark., 2019).

Li ve arkadaşları çalışmalarında ikisi kuraklığa toleranslı ikisi hassas olmak üzere dört arpa çeşidi kullanmış ve bir grup iyi sulanmış koşullarda diğer grup aşırı kurak koşullarda yetiştirilmiştir. Hasattan hemen sonra kök ve gövde kısımlarını birbirinden ayırıp taze ağırlık ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. Ardından klorofil içeriğinin ölçümlerini yapmışlar ve sonuçta kuraklık toleransı daha yüksek olan 2 arpa çeşidinde kuraklık stresine bağlı olarak klorofil içeriğinin %10,7 ve %1,6 oranında azaldığını, kuraklığa karşı daha hassas olan diğer 2 arpa çeşidinde ise kuraklık stresine bağlı olarak klorofil içeriğinin %31,3 ve %30,1 oranında azaldığını tespit etmişlerdir (Li ve ark., 2006).

Rehman 2016 yılında yürüttüğü çalışmasında tarla koşullarında 50 ekmeklik buğday çeşidi üzerinde 10 günlük kuraklık stresi uygulaması gerçekleştirmiştir. Toprak nem oranını %25 olacak şekilde sulamayı durdurmuş ve toprakta kuraklık oluşumunu sağlamıştır. Çalışmada klorofil içeriğinin ölçümü yapılmış ve kuraklık stresi aşamasındaki buğdaylarda toplam klorofil miktarında %43'lük bir artma olduğu tespit edilmiştir (Rehman ve ark., 2016).

Kuraklık stresinin farklı buğday tipleri üzerindeki etkisiyle buğdayda verim, yaprak klorofil içeriği ve bağıl su içeriğinin belirlenmesi amacı ile 2009-2010 yılları arasında Bijanzadeh ve Emam tarafından Şiraz Üniversitesi'nde serada yapılan çalışmada kuraklık stresine bağlı olarak bitki RWC değerinin iki farklı tür olan Şiraz ve Yavaros buğdaylarında sırasıyla %27,5 ve %23,9 oranında azalış gösterdiği kaydedilmiştir (Bijanzadeh ve Emam, 2010).

Acar ve arkadaşlarının 2020 yılında yürüttüğü çalışma, Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden getirilen kuraklık stresine karşı hassas olan Sultan-95 ve kuraklık stresine karşı dayanıklı olan Tosunbey buğday çeşitleri ile gerçekleştirilmiştir. Tohumlar ekimden önce %5 oranında NaClO içeren çözelti ile sterilize edilmiştir. Bitkiler Hoagland solüsyonu ile yetiştirilmiştir. Çalışmada buğday kök ve gövde uzunlukları, klorofil içeriği ve nispi su içeriği ile bazı enzim aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; kök uzunluğu Sultan-95 çeşidinde kontrol grubuna kıyasla %14, Tosunbey çeşidinde kontrol grubuna kıyasla %21 oranında anlamlı olarak ifade edilebilecek şekilde azalmıştır. Gövde uzunluğu Sultan-95 çeşidinde kuraklığa bağlı olarak kontrole göre %5 oranında azalırken Tosunbey çeşidinde kontrole göre %2 oranında bir artış olduğu belirlenmiştir. Bağıl su içerikleri ise Sultan-95 buğdayında kontrole kıyasla %30, Tosunbey buğdayında kontrole kıyasla %27 oranında azalmıştır. Toplam klorofil içeriğinin Sultan-95 buğdayında kontrole göre %30 oranında, Tosunbey buğdayında kontrole göre %8 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Acar ve ark., 2020).

Slama ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmalarında eski ve yeni çeşitlerden seçilmiş olan beş çeşit makarnalık buğday genotipi üzerinde kuraklık stresinin yarattığı agrofizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin değişimini incelemişlerdir. Buğdaylar 2015-2016 ve 2016-2017 olmak üzere iki ayrı büyüme mevsiminde ve yarı kurak olarak Tarla Bitkileri İstasyonu (INRAT)'nın araştırma alanında yetiştirilmiştir ve iki set halinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elektrolit sızıntısı, bağıl su içeriği, klorofil, prolin, çözülmüş şekerler, spesifik peroksidaz aktivitesi ve verim değerleri ölçülmüştür. Ölçüm sırasında bitki iki kısma ayrılarak ilk kısmı kurutulup kuru ağırlık değeri için ölçümler yapılmış ikinci kısım ise prolin ölçümlerinde kullanılmıştır. Prolin içeriği 528 nm absorban değerinde ve ninhidrin yöntemine dayalı olarak ölçülmüştür. Sonuçta prolin sentezinin artması ve birikimi başta kuraklık olmak üzere birçok farklı strese karşı bir yanıt olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Kontrol grubu ve stresle muamele edilmiş grup arasındaki farklar incelendiğinde strese maruz

kalmış gruptaki buğdaylarda prolin miktarında kontrol grubuna göre %86,9 ile %700 oranlarında artış olduğu tespit edilmiştir. Buğday çeşitleri arasında prolin içeriğindeki artış miktarının da farklı olduğu bulunmuştur. En yüksek toleransa sahip bitkide prolin içeriğinin hassas olan buğday çeşidine göre iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da buğdaylar prolin birikimine göre iki grupta tanımlanmıştır. Deney sonucunda prolin birikiminin strese yanıt ile doğrudan ilişkili olduğu kanısına varılmıştır. Klorofil floresan içeriği ise en genç yapraklar seçilerek florometre (Hansatech Instruments Handy, PEA) ile ölçülmüştür. Atasal buğday çeşitleri olan ve nispeten daha toleranslı çeşitlerde verim oranlarının da diğer çeşitlere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Slama ve ark., 2018).

Hindistan'da Sharma ve Dubey tarafından 2005 yılında yürütülen çalışmada 20 gün boyunca plastik kaplar içerisinde yetiştirilen ve bitki büyüme besini olarak Hoagland solüsyonu kullanılmış iki farklı pirinç çeşidine 24 saat boyunca %17 ve %41,2'lik konsantrasyonda PEG 6000 solüsyonu ile kuraklık stresi uygulanmıştır. Araştırmacılar 20 günün sonunda pirinçte toplam glutatyon havuzunun konsantrasyonunda meydana gelen değişimi incelemiş ve sonuçta daha yüksek kuraklık stresine maruz kalan pirinç çeşidinde toplam glutatyon havuzunun yanı sıra glutatyon konsantrasyonunda da %20 -38 oranında bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Sharma ve Dubey, 2005).

Kojić ve arkadaşları 2012 yılında kum kültüründe yetiştirdikleri mısır bitkilerinden iki grup oluşturup bir grubu ATN ile muamele etmiş diğer grubu ise kontrol grubu olarak oluşturmuşlardır. Ardından kontrol grubu sulu ve kurak koşullarda yetişen mısırlar, ATN ile muamele edilmiş sulu ve kurak koşullarda yetişen mısırlar olmak üzere dört farklı deney grubu oluşturmuşlardır. 35 günlük bir büyüme süresinin ardından bitkiler hasat edilmiş ve fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri ölçülmüştür. Glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi Habig ve arkadaşlarının önerdiği şekliyle (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) CDNB substratı kullanılarak ölçülmüş ve sadece bitki köklerinde GST enzim aktiviteleri bulunmuştur. Her iki gruptaki mısır bitkilerinde GST aktivitesinin kurak koşullarda arttığı, kontrol grubunda kurak ortam koşullarında büyüyen mısırlarda GST aktivitesinin 255.5 ila 711.6 u/mg protein arttığı ve ATN'den etkilenmediği sonucuna varmışlardır (Kojić ve ark., 2012).

Hasanuzzaman ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada buğday türlerinin PEG 6000 ile oluşturulan kuraklık stresine karşılaşmasının ardından kontrol grubuna göre diğer gruplarda kök ve sürgün uzunluğunun azaldığını tespit etmişlerdir. Benzer olarak pirinç

bitkisinde de kuraklık stresinin bitki kök uzunluğunda, yaprak gelişiminde azalmaya sebep olduğu ve bağıl su içeriği -yani RWC değerlerinde- kontrol gruplarına kıyasla %50-60 oranında bir azalma ve uç yapraklarda yuvarlanmalara sebep olduğu bulunmuştur (Hasanuzzaman ve ark., 2013).

Sallam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada buğday ve arpa bitkileri kullanılmış ve bu bitkiler için kuraklık stres toleransları incelenmiştir. Yapılan çalışmanın sonucuna göre bitki su içeriğinde, membranın stabilitesinde ve fotosentetik bazı aktivitelerde azalmalar olduğu gözlemlenmiştir. Prolin, klorofil, enzimatik ve enzimatik olmayan bazı antioksidanlar, aminoasitler gibi bazı moleküllerin biriktiği tespit edilmiştir (Sallam ve ark., 2019).

Kuraklık stresi, bitki-su potansiyelinde ve turgorda değişimlere sebep olan önemli bir etkidir. Fizyo-morfolojik özelliklerde de değişimler görülür (Parvaneh Rahdar, 2012). Vurukonda ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada kuraklık stresine maruz kalan buğday, mısır ve pirinç bitkilerini incelemiştir. Çalışmaları sonucunda kuraklık stresine maruz kalan bu bitkilerde büyümenin azalış gösterdiği görülmüştür. Bununla beraber bitkinin yaş ağırlığının ve içerdiği su miktarının da kuraklıktan etkilendiği gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak kuraklık stresine maruz kalan bitkide serbest radikal oluşumu da artış gösterir. Antioksidan savunma sistemlerini ve ROS oluşumunu da etkiler. Hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oksidatif strese sebep olan etmenlerdir. Yüksek oranda ROS bitkide membran yapısında, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında hasara sebep olur. Klorofil içeriğinde azalma görülmesi de yine kuraklık stresine bağlı olarak ortaya çıkan sebepler arasındadır. Fizyolojik etkilerin yanında bitkide bir de biyokimyasal değişimler gözlenir. Sonuçta kuraklık stresi bitki büyümesinde, gelişmesinde olumsuz etkiler yaratan bir abiyotik stres çeşididir. Bu sebeple de buğday üretiminin artırılması için kuraklık stresinin azaltılması hedeflenmelidir (Vurukonda ve ark., 2016).

Maslennikova ve Shakirova'nın birlikte yürüttüğü bu çalışmada bitki materyali olarak buğday bitkisi kullanılmıştır. Bitkiye uygulanan kuraklık şekli PEG solüsyonudur. Kuraklığa karşı bitkinin nitrik asitle koruyuculuk etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda PEG solüsyonunun neden olduğu kuraklık stresiyile oluşan oksidatif stresin askorbat ve glutatyon havuzununun azalmasına sebep olduğu bulunmuştur (Maslennikova ve Shakirova, 2021).

Yapılan çalışmada kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde stresin tolere edilmesi için fizyolojik bazı değişimler olur. Kuraklığa dirençli olan bitkilerin su içeriğinde, membran stabilitesinde ve fotosentetik aktivitelerinde hassas olan bitkilere göre daha az bir düşüş meydana geldiği bilinmektedir. Toleranslı grupta çözünmüş şeker, prolin, amino asit, klorofil, enzimsel ve enzimsel olmayan antioksidanların biriktiği gözlemlenmiştir (Sallam ve ark., 2019).

Alaei (2011) laboratuvar ortamında yaptığı çalışmada 11 farklı ekmeklik buğdayın çimlenmesi esnasında yapraklar üzerinde amino asidin etkisini araştırmıştır. Çalışmasında buğdayda kuraklık stresinin klorofil miktarı üzerinde etkisine rastladı. Artan klorofil içeriği ile beraber tohum veriminin arttığını fark etmiştir. Buna ek olarak fosmotren solüsyonunun buğday sulamada kullanılmasının da verimi ve kuraklık stresine karşı direnci arttıracığı sonucu bulunmuştur. Alaei, normal seviyede su oranına sahip toprakta yetişen buğdayda, su miktarı az olan toprakta yetişen buğdaya kıyasla klorofil miktarının daha fazla olduğunu da tespit etti (Alaei, 2011).

Din ve ark. (2011) kumlu balçıkla doldurulmuş saksı içerisinde seralarda yetiştirdikleri kanola çeşitlerinde kuraklık toleransını araştırmak ve farklı fizyolojik parametrelerdeki (klorofil, prolin ve protein içeriği) değişimleri incelemek için yaptıkları çalışmada protein içeriği için anlamlı derecede bir artış veya azalış değerlerine rastlamadıklarını ancak prolin ve klorofil içeriğinde anlamlı farklar tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuçta klorofil a ve b içeriğinde azalmalar olduğunu ve prolin birikiminde artış olduğunu ve çeşitli büyüme aşamalarında tohum verimi ve gelişiminde azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Din ve ark., 2011).

Aydın ve ark. (2016) çalışmalarında Kırmızı Kılçık, Müfitbey, Hawk, Pehlivan buğday çeşitleri üzerinde kuraklık stresinin ve putressin hormonunun etkisi ile büyüme parametrelerinde oluşan değişimleri incelemişlerdir. Kuraklık stresi oluşturması için bitkiler 10 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda PEG 6000 solüsyonu ile muamele edilmiştir. Artan stres koşullarında bitkide kök ve sürgün uzunluğunda önemli bir azalma meydana geldiğini tespit etmiştir. PEG konsantrasyonunun artması ile bitkide kuraklık stresinin arttığına ve kök büyümesinin gerilediğine dair bir sonuca ulaşmışlardır (Aydın ve ark., 2016).

Shamsi, (2010) ekmeklik buğday çeşitleriyle yürüttüğü deneylerinde buğday verimi, nispi su içeriği, prolin içeriği, klorofil içeriğinin miktarlarını tespit etmiştir. Kuraklık stresinin yoğunluğunun artması ile birlikte nispi su içeriği ve toplam klorofil içeriğinde bir azalma olduğunu belirlemiştir. Prolin miktarında kuraklığa bağlı olarak bir artış gözlemlemiştir. Kuraklık sebebi ile buğday bitkisinin sürgün kısımlarında prolin birikmesi olduğunu tespit etmiştir. Prolin birikiminin bitkinin kuraklığa verdiği erken yanıtlardan biri olduğu da bilinmektedir (Shamsi, 2010).

Ganji ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada buğdayda kuraklık stresi karşısında 6 farklı buğday genotipinin nispi su içerikleri ve klorofil içerikleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda bitki klorofil içeriğinin ve nispi su içeriğinin dirençli olan buğday genotiplerinde en yüksek seviyede çıktığı tespit edilmiştir. Hassas buğday genotiplerinde ise klorofil miktarı en düşük seviyede ölçülmüştür. Ganji ve arkadaşları çalışmalarında daha önce yapılan çalışmalara yer vermiş ve burada kuraklık stresinin bitki klorofil pigment içeriğinde azalmalar yaratabileceğinden ve hatta klorofili yok edebileceğinden bahsetmişlerdir. Bitkide RWC değerlerinin ölçümü için taze yapraklar kullanılmıştır. RWC değerleri $RWC = (FW-DW/TW-DW) \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır. Deneyler 2008 yılında İran'ın Karaj bölgesinde üç tekrarlı olacak şekilde ve randomize tam blok tasarımına dayanan bir yöntemle yapılmıştır (Ganji Arjenaki ve ark., 2012).

Fotosentetik pigmentler bitkilerde temel olarak ışığı tutma-toplama ve indirgeme görevi görürler. Kuraklık stresi altındaki pirinç bitkisi incelenerek Jaleel ve arkadaşları tarafından yapılan deneylerde stres ile beraber fotosentetik pigmentler olan klorofil a ve klorofil b oranlarında normal koşullarda yetişen bitkilere göre değişiklik olduğu sonucuna varılmıştır. Karotenoid değişimleri incelendiğinde kuraklık stresine karşı karotenoidin bitkilerde koruma sağlayabileceği tespit edilmiştir. Jaleel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada fotosentetik pigmentler için bahsedilen sonuçlara varmış ve çalışmalarında ek olarak ayçiçeği ve pamuk ile yapılan başka araştırma sonuçlarına da yer vermişlerdir. Bu sonuçların da Jaleel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayı destekler nitelikte sonuçlandığı belirtilmiştir (Jaleel ve ark., 2009).

Melatonin hormonunun bitkide abiyotik ve biyotik stres karşısında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir ancak buğdayın kuraklık karşısındaki toleransı daha az bilinmektedir. Cui ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada melatoninin rolünün doğrulanması için tarla

üzerinde %60'lık kapasite ile buğday fideleri yetiştirilmiş ve melatonin ile muamele edilmiştir. Sonuçta GSH molekülüne bağlı detoksifikasyondan sorumlu olan GST enziminin melatonin uygulaması sonucu kuraklığa karşı toleransta miktarının arttığı bulunmuştur (Cui ve ark., 2017).





3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Bradford solüsyonu, redükte glutatyon (GSH), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoicacid) (DTNB), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1,2-epoksi-3-(p-nitro) fenoksi propan (EPNP), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Bovine serum albumin (BSA), Bromofenol mavisi, Amonyum persülfat, Proteaz inhibitör kokteyli, 4-tetrametil-etilen diamin (TEMED), Akrlamid Bis (2-metil-bisakrlamid), Tris, 2-Merkaptoetanol, Etanol, Metanol, Aseton, Hekzan, Kloroform, Toluen, Etil asetat, Asetik asit, Asit ninhidrin, Sülfosalisilik asit, Prolin, Ortofosforik asit, PVPP, polietilen glikol (PEG 6000), HCl, NaOCl, Tris-Buffer, Fosfat-Buffer, Sülfosalisik asit, Bradford solüsyonu, dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), monosodium dihidrojen fosfat (KH_2PO_4).

3.1.2. Buğday örnekleri

Tosunbey buğday tohumları çalışmada çeşitli deneylerde kullanılmak üzere Tarla Bitkileri Araştırma Enstitüsü'nden 2012 yılında temin edildi. Bezostaja buğday tohumları ise Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden 2012 yılında temin edildi. Yerli iki ekmeklik buğday çeşidi olan Tosunbey ve Bezostaja'dan Tosunbey buğday çeşidi, kuraklık baskısına karşı Bezostaja buğday çeşidine göre nispeten daha hassas bir türdür ve çalışmamızda bu iki çeşit buğday kullanılmıştır.

Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nın bitki doku kültürü için ayrılmış odasında stabil koşullarda, belirli kimyasallar ve solüsyonlar uygulanarak iki yerli ekmeklik buğday tohumlarının ekimi ve yetiştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Yetiştirilen buğdaylardan elde edilen buğday bitkisi doku örnekleri sıvı nitrojen ile dolu kutularda, soğuk zincir bozulmadan Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'na getirilmiştir. Burada örnekler, gerekli etiketlemeler yapılarak ilgili deneylerde kullanılmak üzere -80 °C soğutucu dolaba kaldırılmıştır.

3.1.3. Deneyleerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

Thermofisher ELISA Mikroplaka okuyucu, Thermo Scientific MicroCL 17R Santrifüj, Mrc pH metre, Nuve OT 40L Otoklav, Microtest MC155 Çalkalamalı inkubator, UV-VIS Spektrofotometre, Velp Scientific Classic Vortex, UVP CI5G TLC UV lamba ve kabin, Manyetik karıştırıcı, Steril kabin, Ultra-Turrax Homojenizatör, BIORAD Mini dikey elektroforez seti, çeker ocak, Thermo -86 °C laboratuvar tipi dondurucu.

Havan ve havan eli, Kuvars ve plastik küvetler, mikropipetler ve uçları, cam pipetler, cam şale, beher, mezür, karanlık cam şişe, falcon tüpler, ependorf tüpler, kuyucuklu mikroplate, multichannel pipet ve uçları, TLC aluminum silica jel plaka, plastic bardak, tel, gazsız sargı bezi, makas, parafilm, folyo, köpük kutular, kilitli poşetler, saklama kapları, etiketler, kurutma kağıtları, makas.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Buğday tohumlarının yetiştirilmesi

3.2.1.1. Sıvı besiyeri olan Hoagland solüsyonunun hazırlanması

Deneğin yapıışı

- Karanlık şişede 1.5 litre distile su içerisinde belirlenen oranlarda (Çizelge 3.1) kimyasallar (Şekil 3.1) eklendi.
- Manyetik karıştırıcı kullanılarak çözündürülüp, damla damla HCl (hidroklorik asit) eklenerek pH metre ile pH 5,7-5,8 aralığına getirildi.
- Ardından pH'ı ayarlanan solüsyon mezür yardımı ile 1980 ml'ye distile su ile tamamlandı (2000 ml'den 20 ml FeEDTA eksik olacak şekilde bu miktar ayarlandı).
- Solüsyon karanlık şişeye tekrar alındı ve şişenin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı.
- 20 dk boyunca otoklavlandı.
- Otoklavdan sonra 20 ml FeEDTA eklendi. Böylece hazırlanan Hoagland (Hoagland, 1949) solüsyonu 2 litreye tamamlanmış oldu.

- Bu hazırlanan solüsyon sıvı besiyeri olarak kullanıldı.

Çizelge 3.1. Hoagland solüsyonunun içerisine eklenen kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Son konsantrasyon (mM)
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,495
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1,13
KH ₂ PO ₄	0,24
KNO ₃	1,23
Mikrobesin karışımı	1,27
FeEDTA	0,86



Şekil 3.1. Hoagland solüsyonu içerisine eklenen kimyasallar.

Mikrobesin stok solüsyonunun hazırlanışı:

- Belirtilen miktarlarda kimyasallar (Çizelge 3.2) tartıldı.
- 50 ml distile suda çözüldürüldü.
- Son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- Hoagland solüsyonunda kullanılmak üzere karanlık şişede +4 °C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.2. Mikrobesin stok solüsyonunun içerisine eklenen kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Konsantrasyon (M)
H ₃ BO ₃	2,86 g/l
MnCl ₂ H ₂ O	1,82 g/l
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,22 g/l
Na ₂ Mo ₂ H ₂ O	0,09 g/l
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,09 g/l

FeEDTA stok solüsyonunun hazırlanışı:

- 225 ml distile su içerisine belirlenen miktarlarda kimyasallar (Çizelge 3.3) eklendi.
- Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp son hacmi 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Çizelge 3.3. FeEDTA stok solüsyonunun içerisine eklenen kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Son konsantrasyon (g/l)
FeCL ₃ 6H ₂ O	0,484
EDTA	1,5

3.2.1.2. PEG 6000 solüsyonunun hazırlanması

PEG 6000 topraktaki suyun ozmotik kontrolünü sağlar. Bitkilerde kuraklık stresi oluşmasına sebep olur. Hoagland sıvı besiyeri içerisinde çözdürülerek hazırlanır. PEG'ler genel olarak suda iyi çözünürler. 1500-20000 arasında değişen molekül ağırlığına sahip PEG'lerin, molekül ağırlıkları arttıkça suda çözünürlüğü azalır. Ancak birden fazla organik çözücü içerisinde iyi çözümleri PEG'lerin kullanımı açısından bir avantajdır (Biswal ve ark., 2008; Whilliams, 1969).

PEG'lerin farklı oranları farklı erime noktalarına sahiptirler ve en yüksek erime noktası olarak 65°C'de çözüldükleri tespit edilmiştir. PEG 1000 için erime noktası 30–40°C, PEG 4000 için erime noktası 50–58°C, PEG 6000 için erime noktası 55–63°C, PEG 20000 için erime noktası 60–63°C olarak ölçülmüştür (Biswal ve ark.,2008).

PEG 6000, kuraklık basıncına dirençli türleri kontrollü olarak *in vitro* şekilde test etmek açısından oldukça güvenilir bir belirteç/ayıraç olarak kullanılır. PEG'lerin ozmotik bir ajan görevi görmesi ile topraktaki çözünen oranının artmasına ve kökler tarafından topraktan su emiliminin yapılamamasına neden olması sebebi ile kuraklığa dirençli türlerin test edilmesinde güvenle kullanılabilir (Chutia ve Borah, 2012).

200 ml %5'lik, %10'luk ve %20'lik PEG 6000 solüsyonunun hazırlanışı:

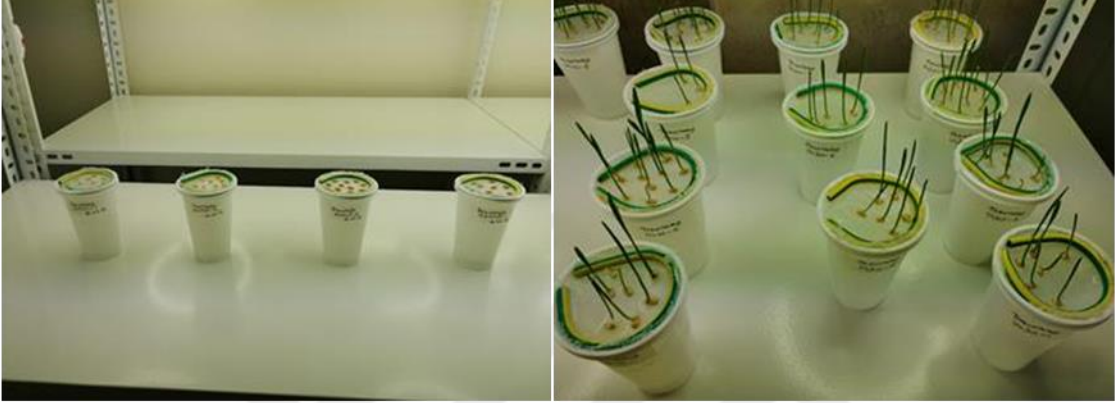
- %5'lik PEG 6000 solüsyonu için; 1500 ml Hoagland solüsyonu içerisine 100 gr PEG 6000 eklendi ve çözdürüldü. %10'luk PEG 6000 solüsyonu için; 1500 ml Hoagland solüsyonu içerisine 200 gr PEG 6000 eklendi ve çözdürüldü. %20'lik PEG 6000 solüsyonu için; 1500 ml Hoagland solüsyonu içerisine 400 gr PEG 6000 eklendi ve çözdürüldü.
- Her bir solüsyona damla damla ve kontrollü şekilde HCl eklenerek pH 5,7-5,8 aralığına ayarlandı (pH ayarında HCl ve NaOH kimyasalları kullanıldı).
- Hazırlanan çözelti mezür içerisine aktarıldı. Mezür içerisinde iken hacmi distile su ile 1980 ml'ye tamamlandı.
- Şişelerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavlandı.
- Son olarak solüsyona 2000 ml için 20 ml FeEDTA eklendi ve son hacim böylelikle 2000 ml'ye tamamlanmış oldu.
- Bitkide kuraklık baskısı oluşturulmak üzere ekimi yapılan buğdaylara uygulandı.

3.2.1.3. Buğday Tohumlarının Ekimi

3.2.1.3.1. Buğdayın sterilizasyonu

- Tosunbey ve Bezostaja buğday tohumları iki ayrı 50 ml'lik falkon tüpe alındı ve her bir buğday çeşidinden 3'er gram tartıldı.
- Üzerine % 3'lük NaClO eklendi.
- Çalkalayıcı inkübatörde 24°C'de 5 dk inkübe edildi.
- Buğdaylar süzülerek NaClO uzaklaştırıldı. Ardından 3-4 defa distile su ile yıkandı.
- Ekimin yapılacağı bardaklara Hoagland solüsyonları koyuldu ve buğday tohumları her bardağa 10'ar adet olacak şekilde belirli aralıklarla ekildi (Şekil 3.2).
- Ekim yapıldıktan sonra buğday tohumları kontrollü iklimlendirme odasında 7 gün süre ile 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüde büyümeye bırakıldı. Bardaklarda eksilen Hoagland solüsyonları zaman zaman tamamlanarak büyümenin devamlılığı sağlandı.

- Büyümenin 7.gününden itibaren, bitkide kuraklık baskısı oluşturması için, çimlenen buğdaylara 5 gün boyunca farklı konsantrasyonlardaki PEG 6000 solüsyonları muamele edildi.
- Kontrol gruplarında PEG 6000 solüsyonları bulunmamaktadır. Ancak kontroldeki Hoagland solüsyonları, diğer gruplara PEG 6000 stresi uygulanması esnasında yenilendi.



a) Ekimin 1.günü (Tosunbey ve Bezostaja) b) Ekimin 7.günü (Tosunbey)



c) Ekimin 7.günü (Bezostaja)

d) Ekimin 12.günü (Tosunbey ve Bezostaja)

Şekil 3.2. Buğdayların ekimlerinin yapılması ve PEG 6000 ile kuraklık stresinin uygulanması.

3.2.1.3.2. Bitkiye farklı konsantrasyonlarda PEG 6000 solüsyonlarının uygulanması

- %5'lik, %10'luk ve %20'lik PEG 6000 solüsyonları hazırlandı.
- Ekimi yapılan buğdayların bulunduğu bardaklara gerekli etiketlemeler yapıldı ve buğdaylar kontrol, %5'lik, %10'luk ve %20'lik PEG 6000 şeklinde gruplara ayrıldı.

- 7 gün boyunca büyütülmüş olan buğday tohumlarının Hoagland solüsyonları döküldü ve ilgili gruplara ait bardaklara PEG 6000 solüsyonları, kontrol gruplarına ait bardaklara yeni Hoagland solüsyonu eklendi.
- Zaman zaman eksilen solüsyonlar bardaklara eklendi ve 5 gün süre ile buğdayların gelişimi gözlemlendi.
- Sonuçta toplam 32 örnek olacak şekilde 4 set Tosunbey (her birinde kontrol ve %5-10-20 PEG 6000 grupları bulunmaktadır) ve 4 set Bezostaja örnekleri hazırlandı.

3.2.2. Fizyolojik ölçümler

Bitkilerde fizyolojik parametreler olan gövde ve kök uzunluğu, kuru ve yaş ağırlığı, turgor ağırlığı gibi parametrelerde meydana gelen değişimler bitki üzerinde gelişen stresin ve strese karşı toleransın varlığını gösteren durumlardır.

Farklı PEG 6000 konsantrasyonlarına maruz bırakılan Tosunbey ve Bezostaja buğday çeşitlerinde gövde ve kök uzunlukları, kuru ağırlıkları (DW), yaş ağırlıkları (FW) ve turgor ağırlıkları (TW) ölçülmüştür. Ek olarak gövde ve köklerde nispi su içerikleri de hesaplanmıştır. Boy uzunlukları cetvel yardımı ile düz bir zeminde ölçüldü ve kaydedildi.

Yaş ağırlıkları hassas terazide tartım yapılarak, turgor ağırlıkları gövde ve köklerin 24 saat saf suda bekletilip ardından kurutma kağıdında kurutulup hassas terazide tartılarak, kuru ağırlık ölçümleri örneklerin 48 saat boyunca 72°C inkübatörde bekletilip hassas terazide tartılarak ölçüldü. Yaş ve kuru ağırlıklar ile turgor ağırlıklarının ölçüm sonuçları kullanılarak bitkinin nispi su içerikleri hesaplandı (Smart ve Bingham, 1974).

$$RWC (\%) = [FW-DW] / [TW-DW] \times 100$$

3.2.2.1. Bitkilerin yaş ağırlıklarının ve sürgün boy uzunluklarının ölçümü

- Yetiştirilen buğday bitkisinin sürgün kısımları makasla kök bölgesinden ayrılarak kesildi.
- Düz bir zeminde cetvel yardımıyla hızlıca boyu (cm cinsinden) ölçüldü (Şekil 3.3).

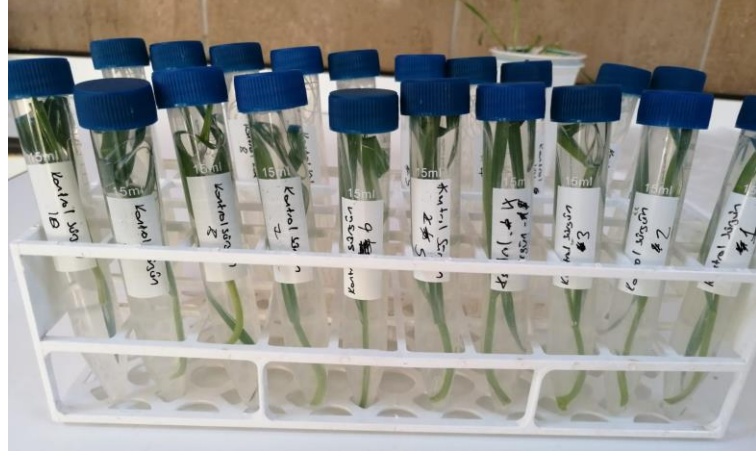
- Hemen sonrasında vakit kaybetmeden, kesilen sürgün kısmı hassas terazide (gram cinsinden) tartılır. Böylelikle her bir sürgün örneği için yaş ağırlık tespit edildi. Sonuçlar ölçüm tablosuna not edildi.



Şekil 3.3. Sürgün Boy Uzunluğu Ölçümü (soldan sağa kontrol-%5-%10-%20 PEG 6000).

3.2.2.2. Bitkilerin turgor ağırlıklarının ölçülmesi

- Kesilen sürgün kısımlarının boyları ve yaş ağırlıkları ölçülüp kaydedildikten sonra 15 ml'lik falkon tüplerine uygun numaralandırma ve isimlendirmeler yapıldı. (Her bir sürgün örneğine, ait olduğu grup ismi ve numarası yazıldı.)
- Sürgün kısımları falkon tüplere koyuldu ve üzerine distile su eklendi (Şekil 3.4).
- 24 saat inkübatörde bekletildi.
- Ardından turgor ağırlıklarının belirlenmesi için sürgünler hassas terazide tartıldı. Değerler anında not edildi.



Şekil 3.4. Bitki turgor ağırlığı ölçümleri.

3.2.2.3. Bitkilerin kuru ağırlıklarının ölçülmesi

- Turgor ağırlığı ölçülen sürgün kısımları numaralarla kodlanmış kurutma kağıtlarının arasına koyuldu ve 72 °C’de 24 saat etüvde bekletildi (Şekil 3.5).
- Daha sonra kuru ağırlıkların belirlenmesi için hassas terazide tartım yapıldı.
- Elde edilen değerler her bir örnek için ölçüm sırasında not edildi.



Şekil 3.5. Bitki kurutma işlemi.

3.2.3. Buğday örneklerinin hazırlanması (buğdayların öğütülmesi):

- 7 gün büyütülen ve 5 gün de PEG 6000 solüsyonu uygulanan buğdaylar 12 günün sonunda yaprakları kesilerek 4 ayrı set oluşturulacak şekilde etiketlendi.

- Donmuş buz içerisinde yerleştirilen havanlara buğday yaprakları ve sıvı nitrojen koyularak buğday yapraklarının toz hale gelene kadar ezilerek öğütülmesi sağlandı (Şekil 3.6).
- Öğütülen, 4 farklı set halinde olan ve farklı PEG 6000 konsantrasyonları ile muamele görmüş olan toz haldeki buğday örnekleri özel plastik tüplere aktarıldı ve daha sonra deneylerde kullanılmak üzere -80°C soğutuculara kaldırıldı.



Şekil 3.6. Buğdayların sıvı nitrojen ile toz hale getirilmesi.

3.2.4. Homojenatların hazırlanması

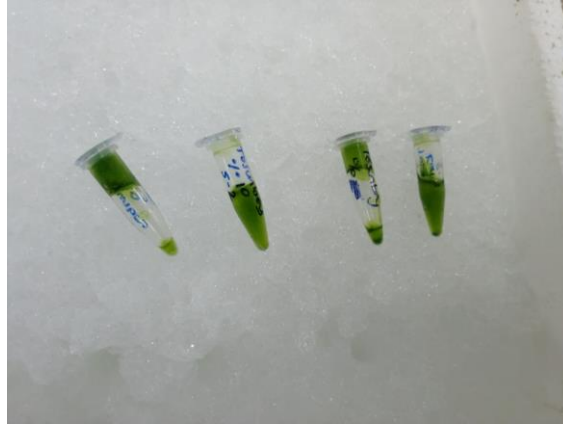
Deneyin yapılışı

- İlk olarak ependorf tüplere gerekli etiketlemeler yapıldı.
- Daha önceden öğütülmüş -80°C 'de muhafaza edilen toz haldeki buğday doku örnekleri buz üzerinde çözünmeye bırakıldı.
- Buğday doku örneklerinin her birinden 0,2 gram hassas terazide tartıldı.
- Örneklerin üzerine 0,02 gram PVPP ve 2 ml soğutulmuş homojenizasyon tamponu eklendi.
- 15 saniye boyunca 13500 rpm'de Ultra-Turrax T25 ile 4 kez 15 sn (15 sn x 4 kez) aralıklarla buz içerisinde homojenizasyon yapıldı.
- Homojenat 12000 g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.
- İlk santrifüj sonrası supernatant kısmı yeni ependorflara alındı.
- Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika ikinci santrifüj işlemi yapıldı.
- Son olarak supernatant kısımları ependorflar içerisinde 300 mikrolitrelik alikotlara ayrıldı.

- -80°C’de ependorflarda kilitli poşetler içerisinde, etiketlemeler yapılarak deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edildi (Şekil 3.7).

0,1 Molar 100 ml homojenizasyon tamponunun hazırlanması (pH=7,4)

- 20 mM 100 ml 2-merkaptoetanol, 2 mM 100 ml EDTA, %0,5 100 ml Nonidet P-40 belirtilen oranlar için hesaplamaları yapılarak ayrı ayrı hazırlanır. Ayrıca 1 ml dH₂O içerisinde proteaz inhibitör kokteyli (100X)’nin çözünmesi sağlanır.
- Ardından Tris-HCl tamponu hazırlanır. Bunun için;
 - 2,4 gram Tris tartılır.
 - 20-25 ml dH₂O içerisinde çözdürülür.
 - Seyreltik HCl ile pH=7,4’e ayarlanır.
 - Çözelti hacmi dH₂O ile 40 ml’ye tamamlanır.
- Daha sonra Tris-HCL stoğundan 20 ml çekilir.
- Çözelti hacmi dH₂O ile 70 ml’ye tamamlanır.
- 0,075 gram EDTA tartılıp çözeltiye eklenir.
- 0,5 ml Nonidet P-40 pipet yardımı ile çözeltiye eklenir.
- Çözeltinin hacmi dH₂O ile mezür yardımıyla 100 ml’ye tamamlanır. Üzerine proteaz inhibitör kokteyli eklenir.
- Bir cam şişeye alınır.
- Çözelti hemen kullanılacaksa bu aşamada 140 mikrolitre 2-merkaptoetanol çözeltiye eklenir. Bu işlem çeker ocak içerisinde yapılmalı ve şişenin ağzı hemen kapatılmalıdır.



Şekil 3.7. Bitki homojenatları.

3.2.5. Klorofil ve toplam karotenoid içeriğinin belirlenmesi

Deneyin yapılışı

Etanol ile yapılan ölçümlerde 664 nm ve 648 nm, metanol ile yapılan ölçümlerde 665 nm ve 652 nm, aseton ile yapılan ölçümlerde 661 nm ve 645 nm dalga boylarında ölçümler yapılmıştır. Toplam karotenoid için ise 470 nm dalga boyunda ölçümler tamamlanmıştır (Khan ve Mitchell, 1987).

- Öğütülmüş toz haldeki buğdaydan 0,05 gram tartıldı.
- Hacmi ilgili solvent ile 2 ml'ye tamamlandı.
- Vortexlendi.
- +4 °C'de 1 gece inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından 1500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant kısmı yeni ependorf tüplerine alındı.
- Blank olarak ilgili solvent kullanılarak istenen λ_{\max} 'lerde (dalga boylarında) spektrofotometrede okuma yapıldı (Şekil 3.8).

İlgili solventler:

Klorofil-a ve klorofil-b için %95'lik etanol, %100'lük metanol, %100'lük aseton, %80'lik aseton kullanıldı. Toplam karotenoid için ise yalnızca %80'lik aseton kullanıldı.



Şekil 3.8. Klorofil ve karotenoid içeriklerinin ölçümleri için hazırlanan örnek setler.

3.2.6. Bradford yöntemiyle protein tayini

Bradford protein tayini deneyi, Coomassie Brilliant Blue (G250) boya reaktifinin proteinlere bağlanması esasına dayanır. Bu boyanın varlığı ile zara bağlı proteinlerin varlığının ve miktarının belirlenmesine imkan tanır (Fanger, 1987).

Deneyin yapılışı

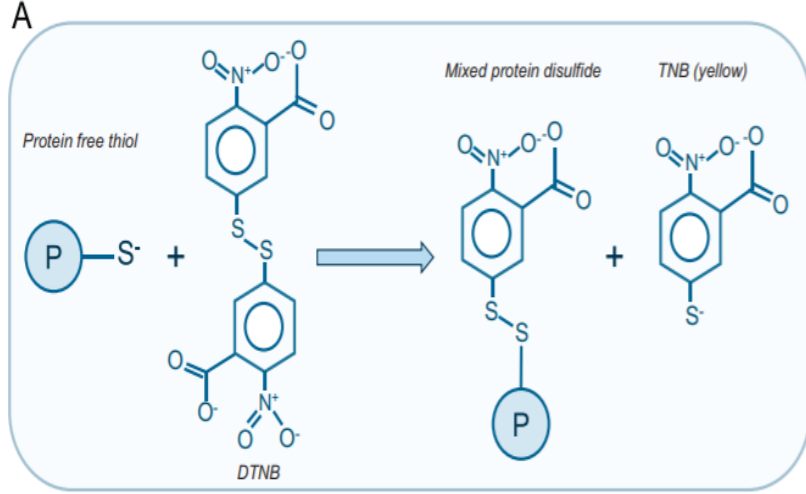
- Mikro plaka kuyucuklarına öncelikle standart ölçümü yapmak için 5 µl BSA standardı ve 250 µl bradford solüsyonu eklendi.
- Blank kuyucuğuna 5 µl dH₂O ve 250 µl bradford solüsyonu eklendi.
- 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından 595 nm dalga boyunda ELISA Mikroplaka okuyucu cihazda blank kuyucuğuna göre okuma yapıldı.
- Örnek ölçümleri için ise 5 µl örnek ve 250 µl bradford solüsyonu eklenir. Aynı işlemler uygulandı.
- Son olarak elde edilen ölçüm sonuçları ile bir standart eğri grafiği çizilir. Standart eğri eğimi hesaplandı.

BSA (Bovine Serum Albumin) standartlarının hazırlanması

3 mg BSA (Stok):

- 0,0031 g BSA tartılır.
- 1 ml distile suda çözündürülür.
- Ardından distile su kullanılarak gerekli seyreltmeler yapılır.
- 3 mg/ml BSA stok solüsyonundan yapılan seyreltmeler ile 1.5 mg/ml BSA, 1 mg/ml BSA, 0.5 mg/ml BSA, 0.25 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml BSA stok solüsyonları hazırlandı.

3.2.7. Toplam tiyol miktarının belirlenmesi



Şekil 3.9. İndirgenmiş tiyol içeriğinin belirlenmesi reaksiyonu (Ellman tepkimesi) (Rudyk ve Eaton, 2014).

Tiyol içeriğinin saptanması esnasında gerçekleşen reaksiyon 5, 5-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) molekülüne serbest haldeki tiyol grubunun bağlanması ve DTNB’de bulunan çift bağ kırılarak molekülün indirgenmesi temeline dayanır (Şekil 3.9). Reaksiyon ürünleri olarak disülfür ve sarı renkli 5-tiyol-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşur. Üretilen TNB miktarı ile tiyol içeriği ilişkilidir (Rudyk ve Eaton, 2014).

Deneyin yapılışı

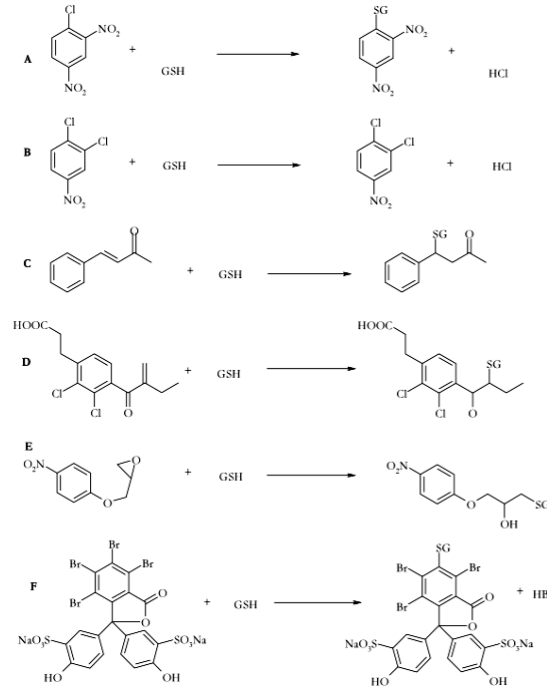
- 20 mM EDTA içeren 30 µl 200 mM pH’sı 8,2’ye ayarlanmış Tris-tampon içerisine 10 µl örnek eklendi.
- Her bir mikrolaka kuyucuğa 2 mM 20 µl DTNB ve 140 µl metanol eklendi.
- 30 dakika boyunca karanlıkta 25 °C’de inkübe edildikten sonra ELISA Mikrolaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.
- Standart eğrinin eğim değeri kullanılarak örneklerdeki toplam tiyol miktarı hesaplandı.

GSH standartlarının hazırlanması:

- 0,1 mM GSH standard için; 300 µl dH₂O içerisinde 0,922 mg GSH çözüldürüldü.
- 0,075 mM mM GSH standard için; 0,1 mM GSH standardından 75 µl alınıp üzeri dH₂O ile 100 µl'ye tamamlandı.
- 0,050 mM mM GSH standard için; 0,1 mM GSH standardından 100 µl alınıp üzeri dH₂O ile 200 µl'ye tamamlandı.
- 0,020 mM mM GSH standard için; 0,050 mM GSH standardından 80 µl alınıp üzeri dH₂O ile 100 µl'ye tamamlandı.
- 0,010 mM mM GSH standard için; 0,020 mM GSH standardından 50 µl alınıp üzeri dH₂O ile 100 µl'ye tamamlandı.

3.2.8. GST spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi

Bitki dokularından elde edilen homojenatlarda GST enzim aktivitesi ölçüm deneylerinde (Şekil 3.10)'da belirtilenler arasında 2 ayrı çeşit substrat olan CDNB ve EPNP substratları kullanıldı.



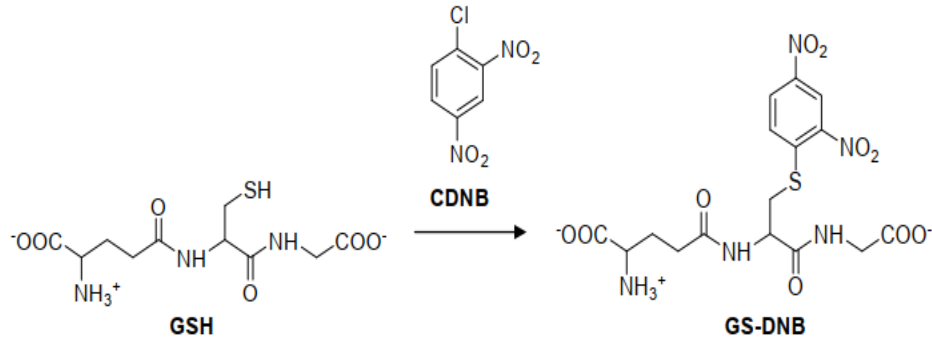
Şekil 3.10. GSH varlığında GST ile ortak substratların enzimatik konjugasyonu. (A) CDNB, (B) DCNB, (C) PBO, (D) EA, (E) EPNP ve (F) BSP (Alias, 2016).

3.2.8.1. Toplam GST enzim aktivitesinin CDNB substratı ile ölçülmesi

Deneyin yapılışı

Ölçümler CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) substratı kullanılarak 340 nm'de (Habig ve ark., 1974)'nin belirlediği metodun (Şekil 3.11) ELISA Mikroplaka Okuyucu sisteme göre optimize edilmiş biçimiyle (Yılmaz ve Işcan, 2014) tamamlandı.

- Her bir kuyucuk içerisine pH'sı 7,4'e ayarlanmış 100 mM fosfat tamponu, 1 mM GSH, 1 mM CDNB, ardından enzim eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonda her bir kuyucuğa Tosunbey için 48 µg/ml -150 µg/ml aralığında, Bezostaja için 9,6 µg/ml -30 µg/ml aralığında protein eklendi.
- ELISA Mikroplaka okuyucuda 10 dakika boyunca her 20 saniyede bir absorbans değerleri okundu.
- Blank kuyucuğuna örnek yerine aynı hacimde 10 mM fosfat tamponu eklendi.



Şekil 3.11. CDNB substratının DNB 'ye dönüşmesi (Viljanen, 2008).

Toplam GST spesifik aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{dA/dt}{9,6 \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})} \times \text{SF} \times \frac{1}{\text{mg protein/ml}}$$

dA/dt bir dakikada abzorbansta meydana gelen değişimi, SF seyreltme faktörünü simgelemektedir.

3.2.8.2. GST-Teta izoziminin aktivitesinin EPNP substratı ile belirlenmesi

Deneyin yapılışı

GSH ölçüm deneylerinden farklı olarak bu deneyde substrat olarak 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi)-propan (EPNP) substratı kullanıldı.

Deneyimiz EPNP substratı kullanılarak 360 nm'de Habig ve ark. (1974)'nın belirlediği metodun ELISA Mikroplaka Okuyucu sisteme göre optimize edilmiş biçimiyle (Yılmaz ve ark., 2020) tamamlandı.

- Her bir mikroplaka kuyucuk içerisine pH'sı 6,5'e ayarlanmış 100 mM fosfat tampon, 0,5 mM GSH, 0,25 mM EPNP ve bitki homojenatı eklendi. Reaksiyonda her bir kuyucuğa Tosunbey için 48 µg/ml -150 µg/ml aralığında, Bezostaja için 9,6 µg/ml -30 µg/ml aralığında protein eklendi.

EPNP substratı ile GSTT1 izozimine ait spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{dA/dt}{0,5 \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})} \times \text{SF} \times \frac{1}{\text{mg protein/ml}}$$

dA/dt bir dakikada absorbansta meydana gelen değişimi, SF seyreltme faktörünü simgelemektedir.

3.2.9. TLC İnce tabaka kromatografisi

Solüsyonların hazırlanması:

Hekzan- Aseton (5:1):

25 ml hekzan+5 ml aseton

Hekzan-Etil Asetat (9:1):

27 ml hekzan+3 ml etil asetat

Toluen-Aseton (6:4):

18 ml toluene+12 ml aseton

Kloroform-Metanol (2:1):

20 ml kloroform+10 ml methanol

Katı faz (sabit faz): Silika jel, Alumina

Sıvı faz (hareketli faz): Hekzan, Toluen, Etil asetat, Kloroform, Aseton, Metanol, Asetik asit

- Hareketli faz tank içerisine yaklaşık 2-3 cm yükseklikte olacak şekilde konulur. Tankın ağzı bir süre kapatılarak inkübe edilir; böylece fazların dengeye ulaşması sağlanır.
- Kullanılacak plaka hazırlanır. Plakanın kenarları tank ile temas etmeyecek boyutlarda kesilir.
- Plaka üzerinde yükleme yapılacak noktalar belirlenir. Noktaların, küvet içerisindeki hareketli faza temas etmeyecek yükseklikte ayarlanması gerekir.
- Belirlenen noktalara pipet yardımı ile yavaş yavaş ve küçük hacimlerde 10 mikrolitre örnek yükleme yapılır (ekle-kurut-ekle). Örnekler toz halindeki dokuların asetonda inkübe edilmesi ve santrifüj sonrası süpernatanın eldesiyle hazırlanmıştır.
- Kuruma işleminden sonra plaka pens yardımı ile tanka yerleştirilir. Tankın ağzı kapak yardımı ile iyice kapatılır.
- Sıvı fazın plaka üzerinde yukarı doğru hareket ettiği gözlemlenir.
- Yürütme bittikten sonra plaka çıkartılıp örnekler UV ışık altında görünür hale getirilerek fotoğraflanır ve analizleri gerçekleştirilir.

3.2.10. SDS-PAGE Uygulaması

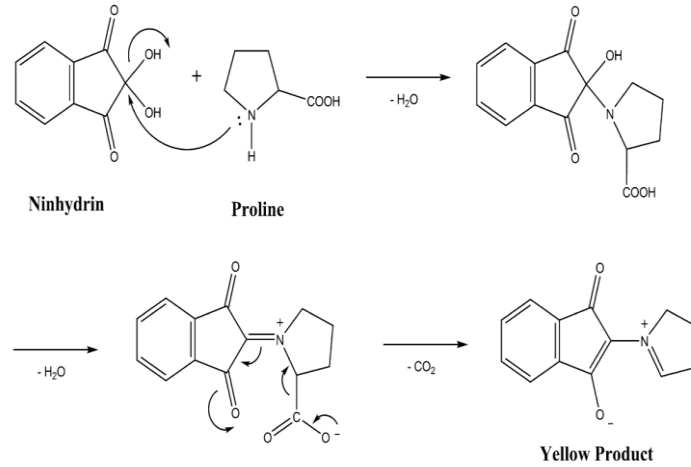
Örneklerin bant profillerinin gözlemlenmesinde Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulamasından faydalanılmıştır. 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (BioRad) kullanılmıştır. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific) marker, 5 µl hacminde eklenmiştir. Örnekler ise 25 µl hacimde ve 25 µg protein içeriği ile kuyucuklara yüklenmiştir. 100 V uygulanarak jeller yürütüldükten sonra Colloidal Coomassie Blue (CBB) metodu ile boyanmıştır. Metanol-asetik asit-distile su (5:1:4) karışımında yarım saat oda sıcaklığında sürekli çalkalama uygulanmıştır. Sonrasında %0,1 Coomassie Blue R250 içeren metanol-asetik asit-distile su (5:1:4) içerisinde yarım saat

inkübe edilmiştir. Sonrasında bir gece boyunca "destaining" uygulanarak jellerin görüntüleri masa üstü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Jel görüntüleri GelAnalyzer 19.1 açık kaynak ücretsiz yazılımı yardımıyla incelenerek, bant sayıları, pozisyonları ve işlenmemiş bant hacimleri hesaplanmıştır. Rubisco büyük altünite (RBA) ve Rubisco küçük altünite (RKA) için karşılaştırmalar yapılarak deney gruplarındaki fotosentez mekanizmasına dair sonuçlar çıkarılmaya çalışılmıştır.

3.2.11. Prolin miktar tayini

Prolin tayininde, bu amino asidin ninhidrin kimyasalı ile verdiği reaksiyonun (Şekil 3.12) kolorimetri özelliği temel alınmaktadır. Prolin amino asiti aynı zamanda bir imino asit olduğundan, ninhidrin totomerize olup 1, 2, 3-indantrion'a dönüşerek prolinle reaksiyona girmektedir. Reaksiyonun devamında, bir diğer ninhidrin molekülünün ara ürün olan 2-amino-1, 3-indion ile kondensasyona girmesi renk oluşumunu meydana getirmektedir.



Şekil 3.12. Prolin-ninhidrin reaksiyonu (Pires ve ark., 2014).

100 ml %3'lük sülfosalisilik asit hazırlanması:

Sülfosalisilik asitten 3 gram tartıldı. 100 ml saf suda çözdürüldü.

Asit ninhidrin hazırlanması:

Ninhidrinden 0,31 gram tartıldı. 7,5 ml asetik asit içerisinde çözdürüldü.

2 ml %85'lik fosforik asit ve 3 ml distile su eklendi. Karanlıkta +4°C'de saklandı.

100 ml %96'lık asetik asit hazırlanması:

96 ml asetik asit üzerine 4 ml distile su eklendi.

Standartların hazırlanması:

5M 10ml prolin standart (Stok)

0,25 gram prolin tartılır.10 ml sülfosalisilik asit içinde çözülür.

İstenen standart konsantrasyonuna göre sülfosalisilik asit kullanılarak seri dilüsyonlar yapılır.

Standartlar ölçümleri için hazırlanmış ependorf tüplerin her birine sırasıyla;

- 200 mikrolitre asit ninhidrin
- 200 mikrolitre %96'lık asetik asit
- 100 mikrolitre sülfosalisilik asit
- 100 mikrolitre ilgili standart eklenir ve okuma yapılır.

Deneyin yapılışı

- 1,5 ml %3'lük sülfosalisilik asit hazırlandı.
- Asit ninhidrin hazırlandı.
- 100 ml %96'lık asetik asit hazırlandı.
- Ependorf içerisinde 400 mg toz halde buğday örneği tartıldı. 40 mg PVPP eklendi.
- Üzerine 1,5 ml %3'lük sülfosalisilik asitten eklendi.
- Vortexlendi.
- 15000 g'de +4°C'de 6 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yeni tüplere alındı.
- Boş ependorf tüplere 200 mikrolitre asit ninhidrin, 200 mikrolitre %96'lık asetik asit, 100 mikrolitre sülfosalisilik asit, 100 mikrolitre örnek süpernatantı eklendi.
- Vortexlendi. Kapaklara iğne ile delik açıldı.
- 96°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından soğutuldu. Yeni ve etiketlenmiş tüplere alındı.
- Tüplere 1'er ml Toluen eklendi. +4 °C'de 15000 g'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni tüplere alındı.

- Bir epp tüpe sadece toluen konuldu ve kör (blank) olarak kullanıldı.
- 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede kuvars küvet içerisinde ABS değerleri okundu. Standart grafiğin eğimi kullanılarak prolin konsantrasyonu hesaplandı.
- Standart eğri hesaplama prosedüründe farklı olarak örnek yerine prolin çözeltisi eklendi.

3.2.12. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SigmaPlot.13 lisanslı yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel grupların karşılaştırılmasında, birden fazla grubun karşılaştırılması için One Way ANOVA testi ve uzantıları (Holm-Šidák, Dunn's, Tukey's) ile yazılımın önerdiği durumlarda Mann-Whitney U kullanılmıştır. Bazı grupların karşılaştırılmasında ayrı ayrı ikili t-test uygulanmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grafiklerde, gruplar arasındaki karşılaştırmaların istatistiksel değerini ifade etmek için "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır. Jel görüntüleri, bantlar arası UPGMA analizleri için PyElph açık kaynak ücretsiz yazılım ve eklentileri kullanıldı.



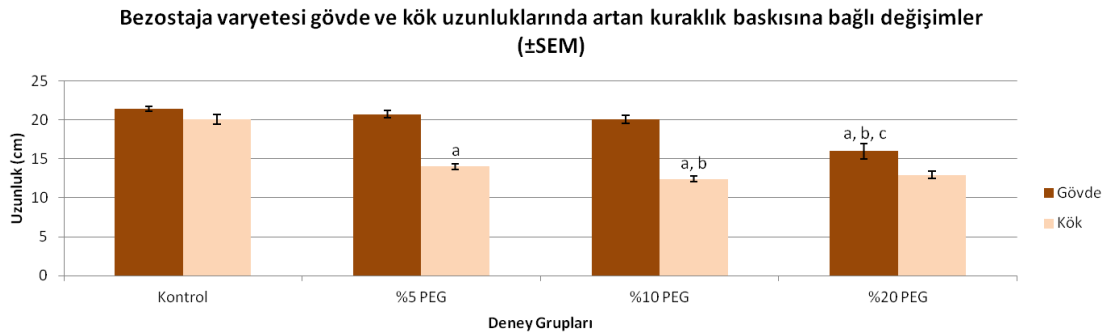
4. BULGULAR

Bu çalışmada; PEG 6000 solüsyonunun farklı konsantrasyonları ile bitki gelişimi sırasında bir süre kuraklığa maruz bırakılan iki yerli ekmeklik buğday çeşidinin, kuraklık sonucunda bitki kök ve sürgün gelişimleri, bitkide oluşan oksidatif strese karşı bitkinin bazı savunma mekanizması enzimlerinin ve proteinlerin konsantrasyon değişimleri, stres sonucu bitkideki prolin, klorofil ve karotenoid içeriklerinin tayin edilmesi gibi bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler araştırıldı.

DeneySEL çalışmalarda, ekmeklik buğday çeşitlerinden olan Bezostaja ve Tosunbey buğday tohumlarının uygun laboratuvar ortamı sağlanarak 7 gün büyütülmesinin ardından PEG-6000 solüsyonunun farklı konsantrasyonları ile 5 gün boyunca bitkide kuraklık baskısının oluşması sağlanmıştır. DeneySEL gruplar ise kontrol, PEG 6000 (%5), PEG 6000 (%10), PEG 6000 (%20) şeklinde oluşturulup isimlendirilmiştir.

4.1. Fizyolojik Parametrelerin Artan Kuraklığa Bağlı Değişimi

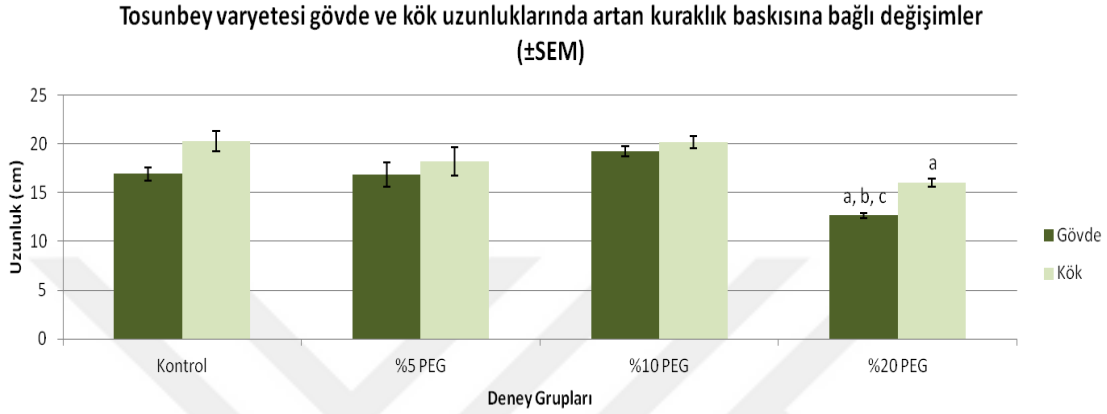
4.1.1. Kuraklığın kök ve gövde büyümesi üzerine etkileri



Şekil 4.1. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök uzunlukları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

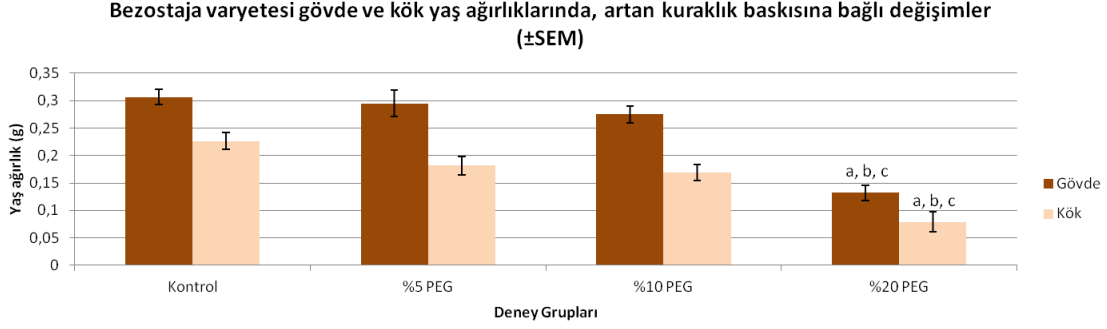
%5'lik PEG uygulaması yapılan Bezostaja bitkilerinin kök uzunluklarının kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %25 oranında azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir

fark olduğu sonucuna varılmıştır. %10'luk PEG uygulanan gruptaki buğdayların kök uzunluğunun hem %5'lik gruptan hem de %10'luk gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu sonucuna varılmıştır. %20'lik PEG uygulanan grubun gövde uzunluğunun kontrolden, %5'lik ve %10'luk gruptan daha az olduğu, istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) şekilde farklı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1).



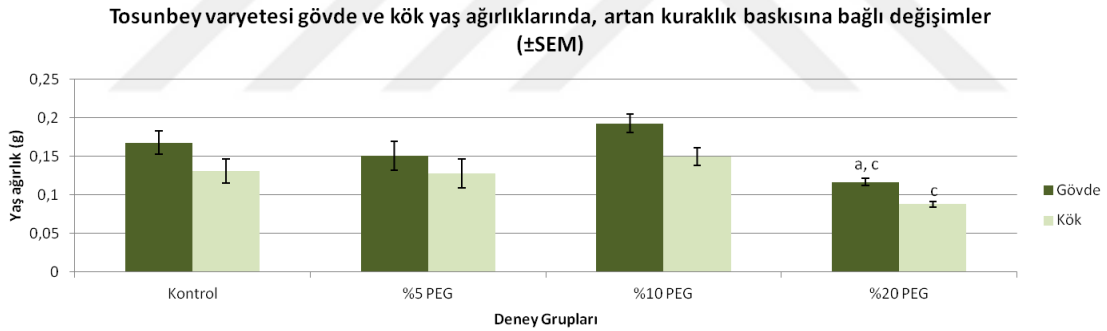
Şekil 4.2. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök uzunlukları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Tosunbey buğday çeşidi için yapılan gövde ve kök uzunluk ölçümlerinde %20'lik PEG uygulanan grup için ölçülen değerlerin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) şekilde azaldığı grafikte de belirtilmiştir (Şekil 4.2). Gövde için yapılan ölçümlerde %20'lik grubun kontrol ve %5'lik gruplara göre yaklaşık olarak %23 oranında daha az uzama gösterdiği kaydedilmiştir. Bununla beraber %10'luk gruba göre ise yaklaşık %30 daha az uzama gösterdiği kaydedilmiştir. Kök için yapılan ölçümlerde ise sadece %20'lik grubun kontrol grubuna göre yaklaşık %20 oranında daha az uzadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök yaş ağırlıkları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

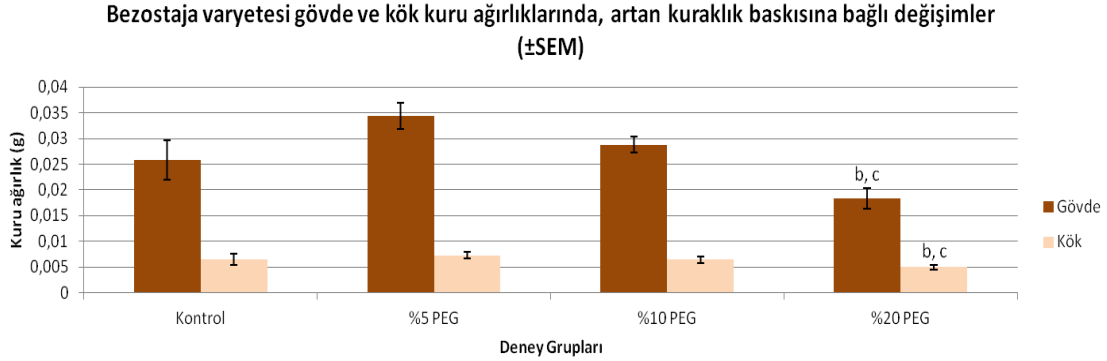
Bezostaja'da %20 lik PEG uygulaması kök ve gövdede diğer uygulamalara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) şekilde bir düşüşe sebep olmuştur. Kontrolle göre düşüş oranı ise yaklaşık olarak %70'tir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök yaş ağırlıkları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

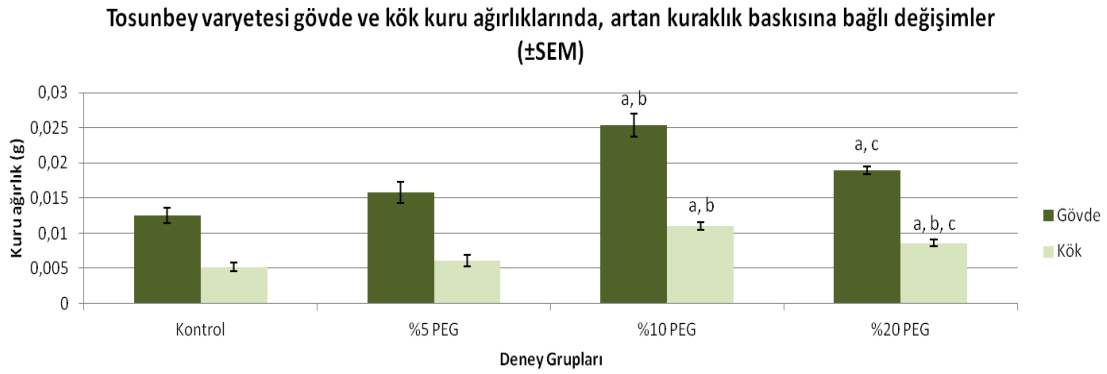
Gövde ve kök yaş ağırlıklarının Tosunbey varyetesinde ölçülen değerlerine bakıldığında gövde yaş ağırlığı %20'lik grupta kontrol grubuna göre yaklaşık %30 oranında azalma göstermiş, %10'luk gruba göre ise yaklaşık olarak %40 oranında bir azalma göstermiştir. Kök yaş ağırlığı değerlerine bakıldığında ise yalnızca %20'lik grup %10'luk gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p < 0,05$) fark göstermiştir. Bu fark yaklaşık

olarak %41 oranındadır. Gövde ve kök yaş ağırlık ölçümleri için bulunan sonuçlar istatistiksel hesaplamalar yönünden anlamlı ($p<0,05$) kabul edilir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök kuru ağırlıkları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

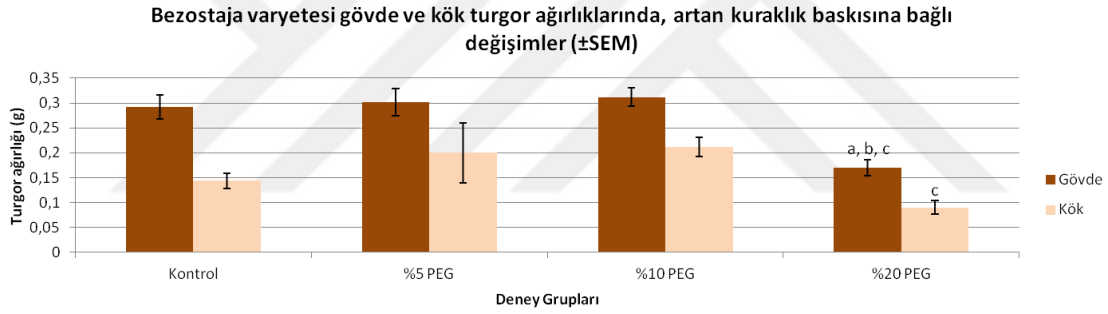
%20'lik PEG uygulaması yapılan grupta gövde ve kök kuru ağırlıkları için %5 ve %10'luk gruplara göre istatistiksel olarak ($p<0,05$) çok belirgin bir azalma meydana geldiği hesaplanmıştır. Bu değişim yaklaşık olarak %45 oranında anlamlı bir azalmadır (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök kuru ağırlıkları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Kuru ağırlık ölçümlerinde Tosunbey buğdayı gövde kısmı için yapılan hesaplamalarda %20 ve %10'luk PEG uygulanan grupların kontrol grubuna göre sırası ile %33 ve %50 oranlarında daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir. %10'luk grupta yer alan buğdayların kuru ağırlıklarının %5'lik grupta yer alanlarınkine göre %38 daha fazla olduğu hesaplanmıştır. %20'lik grupta yer alan buğdayların kuru ağırlıklarının ise %10'luk gruptakilere göre %25 daha az olduğu kaydedilmiştir. Kök kısmı için yapılan hesaplamalarda %20'lik grupta yer alan buğdayların kontrole göre %40 daha fazla, %5'e göre %28 daha fazla ve %10'a göre %22 oranında daha az olduğu, %10'luk grubun kontrole göre %53 daha fazla, %5'e göre de %44 oranında daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.6).

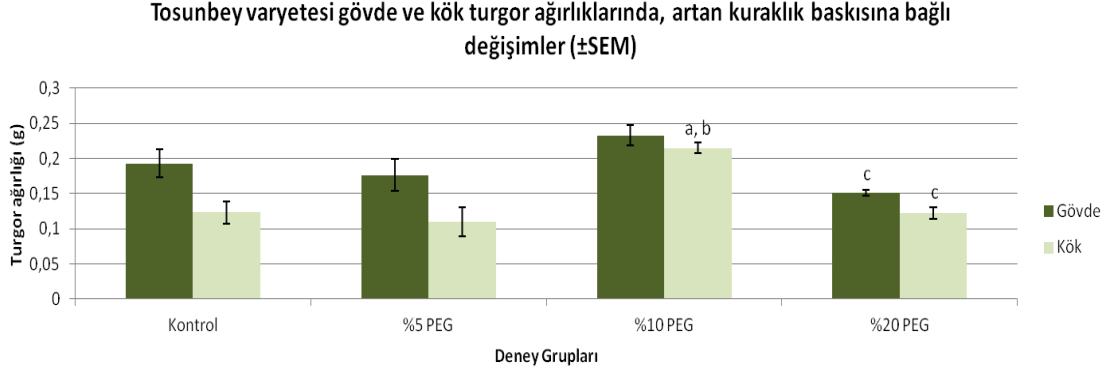
Ölçülen değerler neticesinde yapılan istatistiki hesaplamalara göre yorumlanan bu sonuçların istatistiksel olarak değerli ($p < 0,05$) bulunduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.7. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök turgor ağırlıkları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

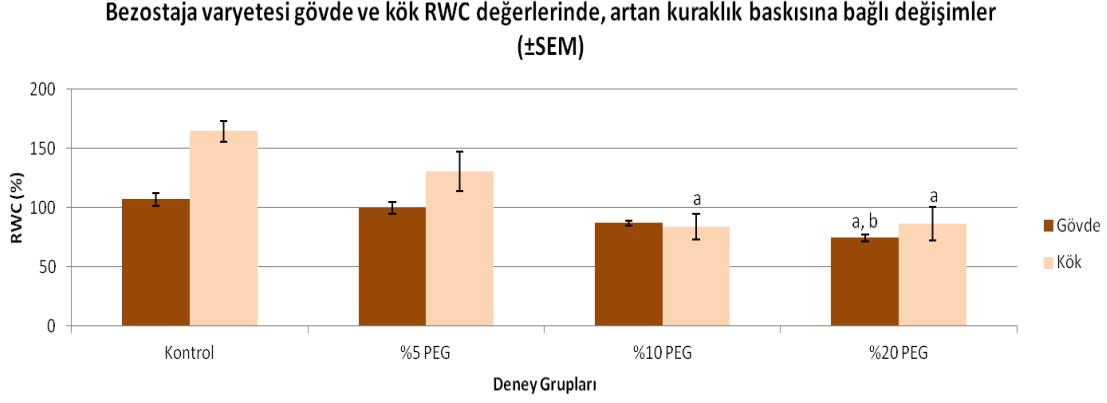
Bezostaja varyetesinde kuraklık stresi sonucu ölçülen gövde ve kök turgor ağırlıklarına baktığımızda hem gövde hem de kök için %20'lik PEG uygulaması yapılan gruplarda %5'lik ve %10'luk gruplara göre bir azalma meydana geldiği görülmektedir. %20'lik PEG uygulamasında gövde turgor ağırlığında kontrol ve %5 grubuna göre yaklaşık olarak %42 oranında, %10'a göre yaklaşık olarak %45 oranında bir azalma ölçülmüştür. %20'lik gruptaki kök turgor ağırlığında ise %10'luk gruba göre yaklaşık olarak %57 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bezostaja gövde ve kök turgor ağırlıklarındaki bu

değişimlerin, belirtilen değerler açısından, istatistiki olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



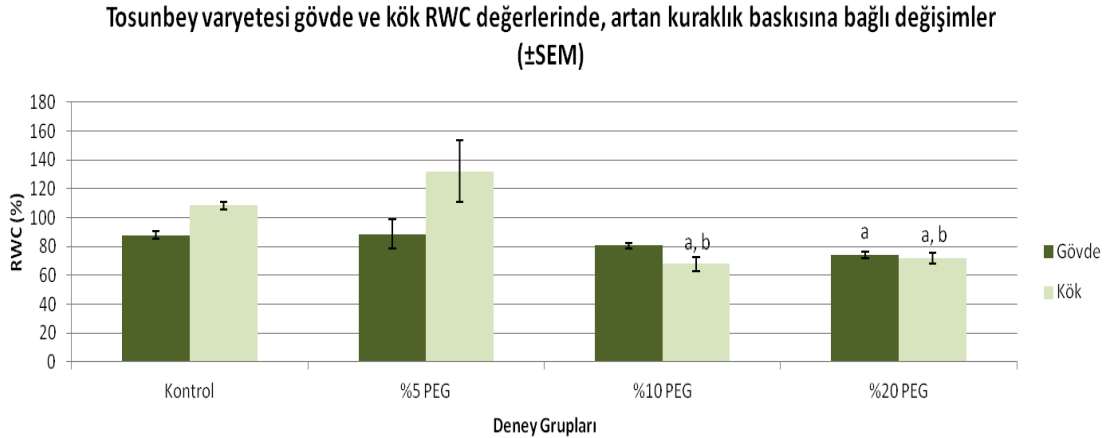
Şekil 4.8. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök turgor ağırlıkları. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Tosunbey kök turgor ağırlık ölçümlerinde %10'luk PEG ile muamele edilmiş buğday örneklerinde kökte, kontrol buğday örneklerine göre %42'lik bir artış olduğu, %5'lik PEG ile muamele edilmiş buğday örneklerine göre %48'lik bir artış olduğu hesaplanmıştır. %20'lik PEG ile muamele edilmiş örneklerin kök turgor ağırlığı %10'luk gruba göre %43'lük bir azalma göstermiştir. %20'lik PEG ile muamele edilmiş örneklerin gövde turgor ağırlığı %10'luk gruba göre %35'lik bir azalma göstermiştir (Şekil 4.8). Örnek turgor ağırlık ölçümleri arasındaki hesaplamaların istatistiksel olarak ifadesi de anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.9. Bezostaja buğday çeşidinde gövde ve kök RWC değerleri. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Gövde ve kök RWC değerlerinin hesaplanması sonucunda Bezostaja buğdayında %10'luk PEG uygulanan grupta kök RWC değerinin kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %49 oranında, %20'lik grupta kontrole göre yaklaşık olarak %47 oranında azaldığı ve gövde RWC değerinin ise %20'lik grupta kontrol grubuna göre %30, %5'lik grubuna göre de yaklaşık %25 oranında azalma olduğu kaydedilmiştir. Bu değerler doğrultusunda, yorumlanan değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.9).

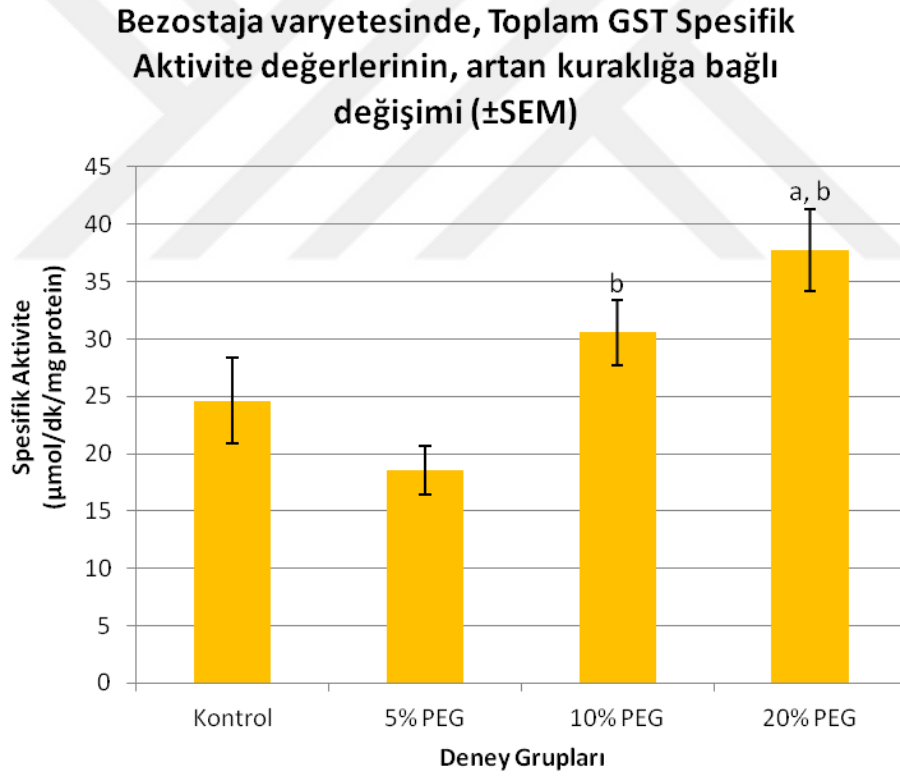


Şekil 4.10. Tosunbey buğday çeşidinde gövde ve kök RWC değerleri. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Tosunbey varyetesi için hesaplanan gövde ve kök RWC değerlerine bakıldığında gövde ölçümlerinde %20'lik PEG uygulanan grup kontrol grubuna göre %15 oranında bir azalma göstermiştir. Kök ölçümlerinde %10'luk grup kontrol grubuna göre %38 oranında, %20'lik grup kontrol grubuna göre %33 oranında, %10'luk grup %5'lik gruba göre %50 oranında ve %20'lik grup %5'lik gruba göre %46 oranında bir azalma göstermiştir (Şekil 4.10). RWC ölçümlerinin sonucunda değerler için istatistiki hesaplamalar anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.

4.2. Biyokimyasal parametrelerde kuraklık baskısının yarattığı değişimler

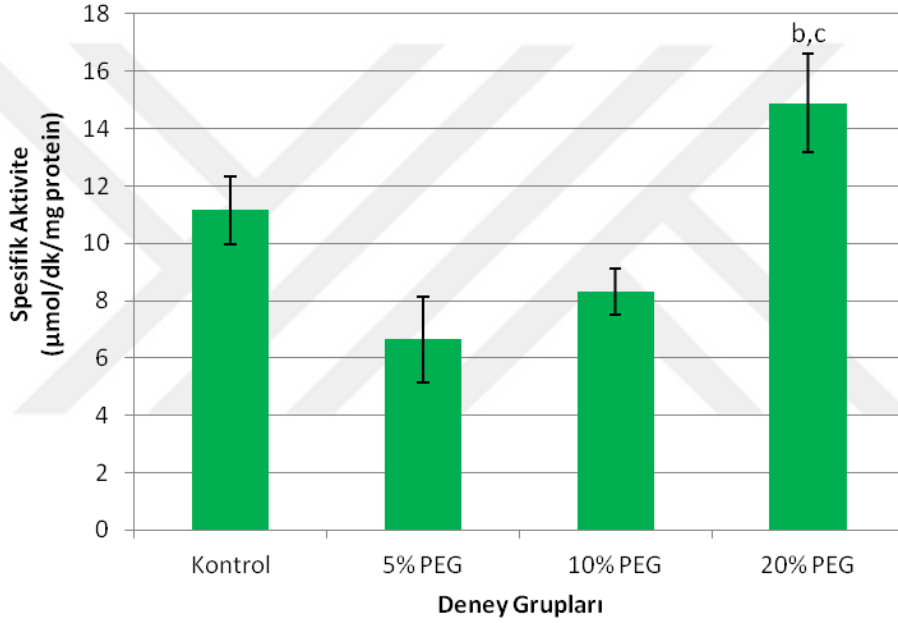
4.2.1. Toplam glutasyon s-transferaz (GST) aktivitesinde değişimler



Şekil 4.11. Bezostaja buğday çeşidinde toplam GST spesifik enzim aktivite değerlerinin artan kuraklığa bağlı değişimi. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Bezostaja buğdaylarında toplam GST miktarlarında, %20'lik deney grubundaki buğdaylarda kontrol grubundaki buğdaylara göre %35, %5'lik gruptaki buğdaylara göre %51 oranında bir artış olduğu ve %10'luk gruptaki buğdaylarda %5'lik gruptaki buğdaylara göre %39 oranında artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil.4.11). Toplam GST miktarında görülen artış miktarları istatistiksel olarak değerli ve anlamlı ($p<0,05$) kabul edilmiştir.

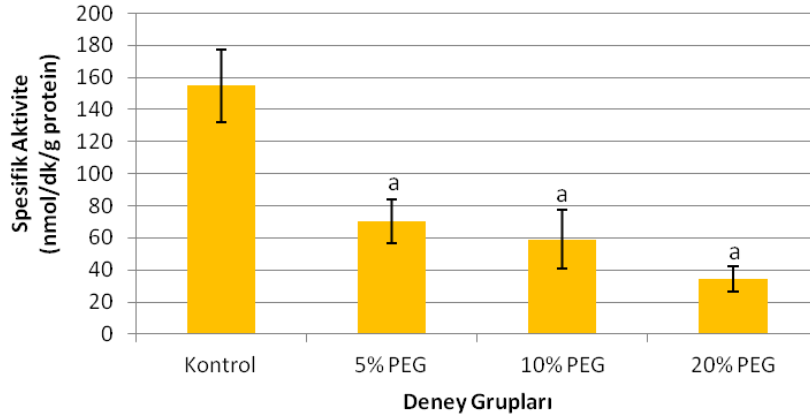
Tosunbey varyetesinde, Toplam GST Spesifik Aktivite değerlerinin, artan kuraklığa bağlı değişimi (\pm SEM)



Şekil 4.12. Tosunbey buğday çeşidinde toplam GST spesifik enzim aktivite değerlerinin artan kuraklığa bağlı değişimi. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Tosunbey buğdaylarında toplam GST miktarlarında %20'lik deney grubundaki buğdaylarda %5'lik gruptaki buğdaylara göre %55, %10'luk gruptaki buğdaylara göre %47 oranında bir artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Toplam GST miktarında görülen artış miktarları istatistiksel olarak değerli ve anlamlı ($p<0,05$) kabul edilmiştir.

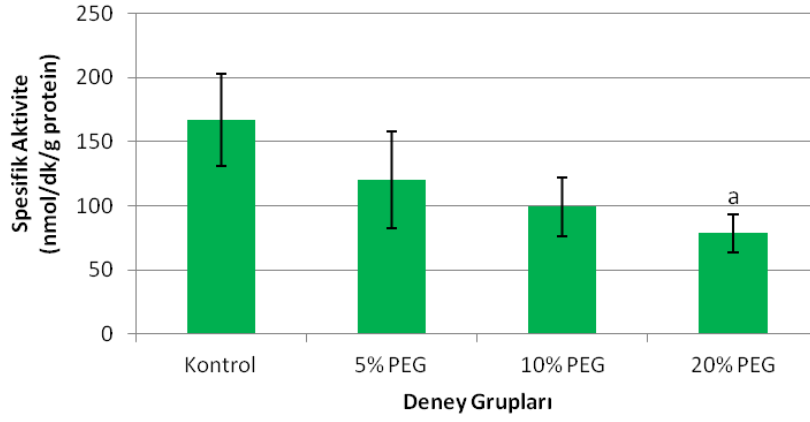
Bezostaja varyetesinde, GSTT1-1 Spesifik Aktivite değerlerinin, artan kuraklığa bağlı değişimi (\pm SEM)



şekil 4.13. Bezostaja buğday eşidinde GSTT1-1 spesifik enzim aktivite değerlerinin kuraklık artışı ile beraber değişim grafiği. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Bezostaja buğdayında kuraklık şiddetinin artması ile beraber GSTT1-1 spesifik aktivite değeri için kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı ($p < 0,05$) şekilde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. %5'lik PEG uygulaması yapılan buğdaylarda kontrol grubu buğdaylara göre GSTT1-1 spesifik aktivite değerlerinde yaklaşık olarak %54 oranında, %10'luk PEG uygulaması yapılan buğdaylarda kontrol grubu buğdaylara göre GSTT1-1 spesifik aktivite değerlerinde yaklaşık olarak %61 oranında ve %20'lik PEG uygulaması yapılan buğdaylarda kontrol grubu buğdaylara göre GSTT1-1 spesifik aktivite değerlerinde yaklaşık olarak %78 oranında bir azalma olduğu ölçülmüştür (şekil 4.13).

Tosunbey varyetesinde, GSTT1-1 Spesifik Aktivite değerlerinin, artan kuraklığa bağlı değişimi (\pm SEM)

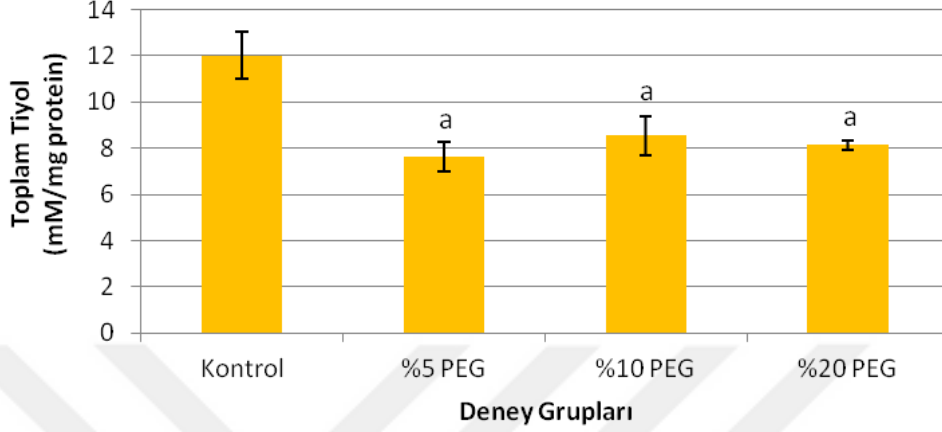


Şekil 4.14. Tosunbey buğday çeşidinde GSTT1-1 spesifik enzim aktivite değerlerinin kuraklık artışı ile beraber değişim grafiği. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Tosunbey buğdayında kuraklığın artması ile beraber GSTT1-1 spesifik aktivite değeri sadece %20'lik PEG ile kuraklığa maruz bırakılmış grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstererek %53 oranında bir düşüş yaratmıştır (Şekil 4.14). Bu azalma istatistiki olarak ($p < 0,05$) değerlendirildiğinde kayda değer bir azalmadır. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı hesaplanmasa da, azalış eğilimi Bezostaja varyetesinde izlenen değişim ile benzerlik göstermektedir.

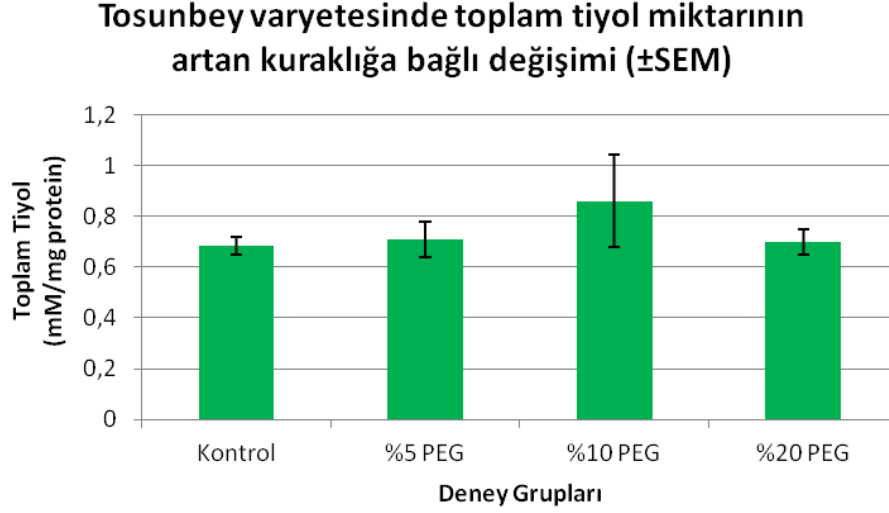
4.2.2. Toplam tiyol miktarı

Bezostaja varyetesinde toplam tiyol miktarının artan kuraklığa bağlı değişimi (\pm SEM)



Şekil 4.15. Bezostaja buğday çeşidinde artan kuraklığa bağlı olarak toplam tiyol miktarındaki değişim. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

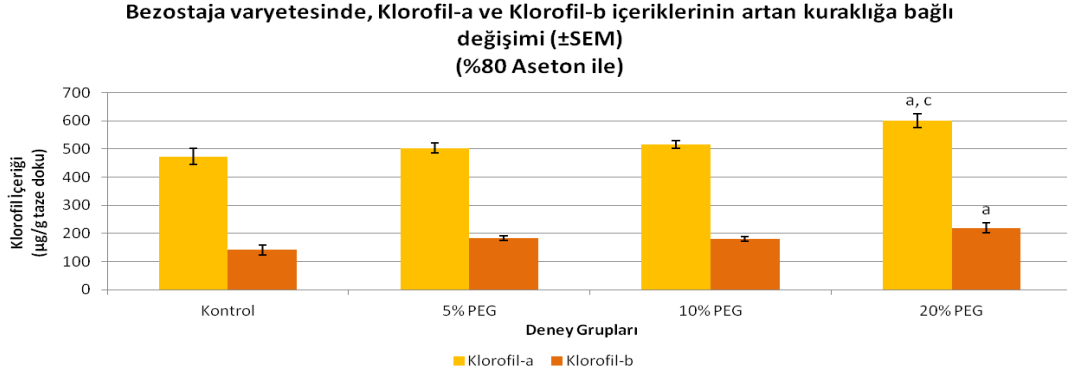
Bezostaja buğdayları üzerinde yapılan deneylerde toplam tiyol miktarları %5'lik PEG uygulanan gruptaki buğdaylarda kontrole göre %37 oranında, %10'luk PEG uygulanan gruptaki buğdaylarda kontrole göre %29 oranında ve %20'lik PEG uygulanan gruptaki buğdaylarda kontrole göre %32 oranında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.15). Toplam tiyol miktarındaki bu azalma istatistiki açıdan anlamlı ($p < 0,05$) bir azalmadır.



Şekil 4.16. Tosunbey buğday çeşidinde artan kuraklığa bağlı olarak toplam tiyol miktarındaki değişim. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

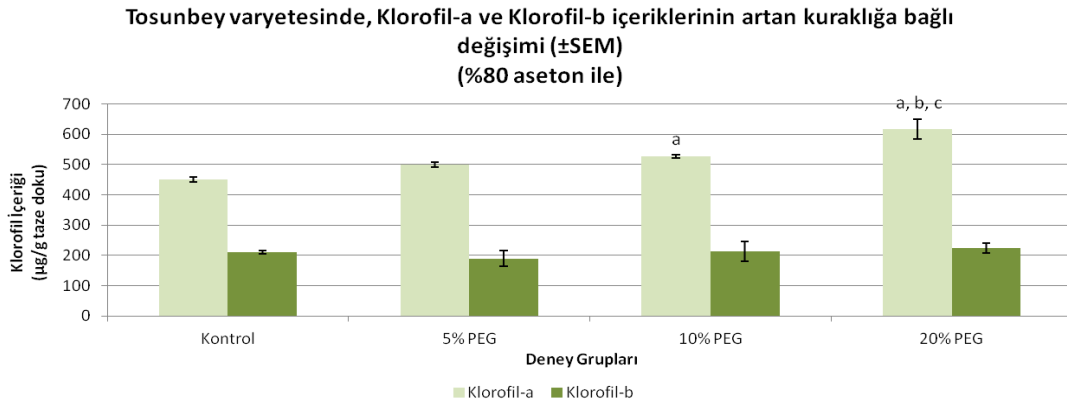
Tosunbey buğdayları üzerinde yapılan toplam tiyol miktarının ölçülmesi sonucunda bitkide toplam tiyol miktarında gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p < 0,05$) sayılabilecek bir artış veya azalışa rastlanmamıştır (Şekil 4.16).

4.2.3. Kuraklık stresinin klorofil miktarları üzerine etkileri



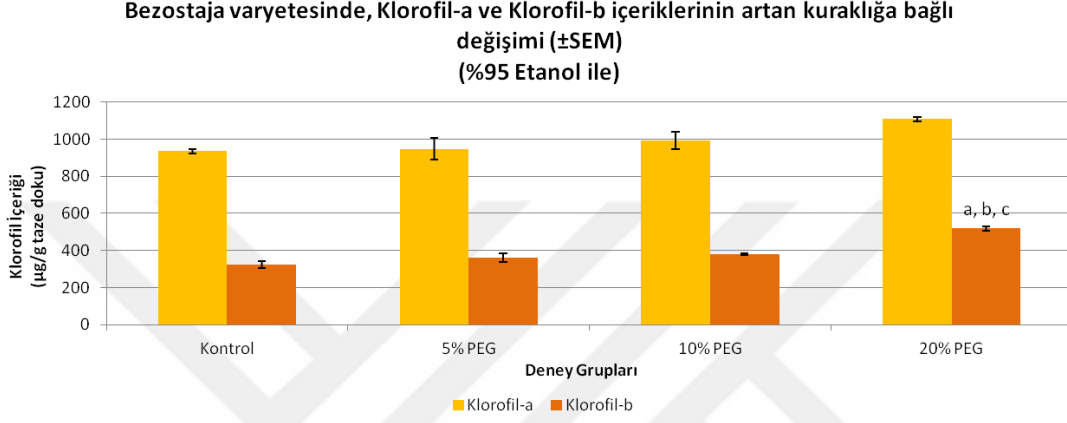
Şekil 4.17. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%80 aseton ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

%80 Aseton kullanılarak yapılan klorofil-a ölçümlerinde %20'lik PEG ile kuraklık stresi yaratılmış Bezostaja buğdaylarında kontrol grubuna göre %21'lik bir artış, %5'e göre %16'lık bir artış olduğu hesaplanmıştır. Klorofil-b ölçümlerinde ise %20'lik grupta kontrol buğdaylarına göre %35 oranında bir artış olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.17). Bu hesaplamalar istatistiki açıdan değerlidir ($p < 0,05$) şeklinde ifade edilebilir.



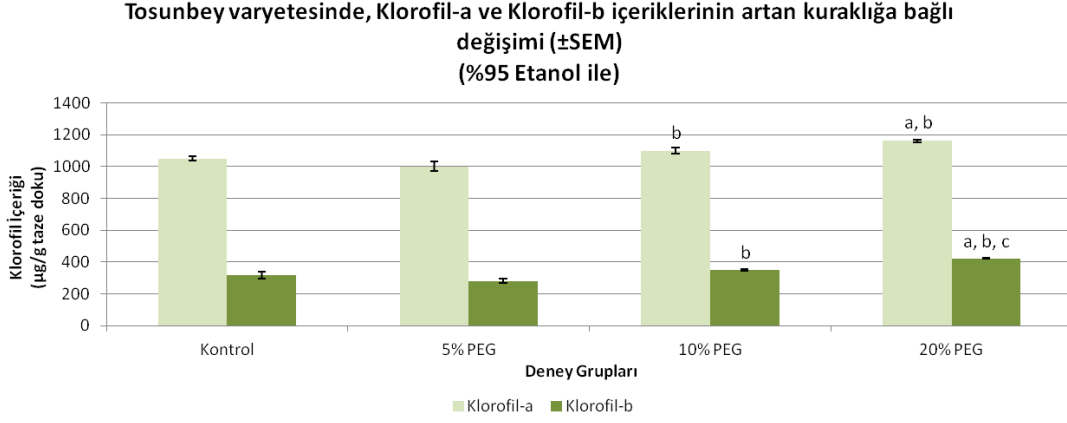
Şekil 4.18. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%80 aseton ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

%80 aseton kullanılarak yapılan klorofil-a ölçümlerinde %10'luk PEG ile kuraklık stresi yaratılmış Tosunbey buğdaylarında kontrol grubuna göre %14'lük bir artış, %20'lik PEG uygulanmış grupta kontrole göre %31, %5'lik PEG uygulanmış gruba göre %19 ve %10'luk PEG uygulanmış gruba göre %14'lük bir artış olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.18). Bu sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde anlamlı ($p<0,05$) olarak değerlendirilmiştir. Klorofil-b ölçümlerinde ise Tosunbey için istatistiki olarak anlamlı değerler bulunamamıştır.



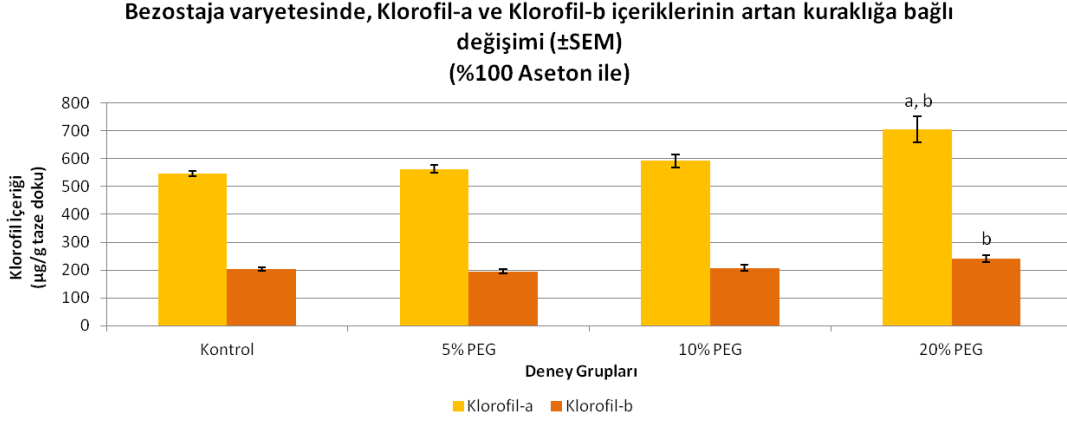
Şekil 4.19. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%95 etanol ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Bezostaja buğdayları için klorofil-b miktarı %95'lik etanol ile yapılan deneylerde klorofil-b ölçümlerinde %20'lik deney grubundaki buğdaylar kontrol grubundaki buğdaylara göre %37, %5'lik deney grubundaki buğdaylara göre %30, %10'luk deney grubundaki buğdaylara göre %27 oranında artmıştır (Şekil 4.19). Bu artış istatistiki olarak kıymetli ($p<0,05$) bir artıştır. Ancak klorofil-a miktarının ölçümü ile ilgili anlamlı herhangi bir artış görülmemiştir.



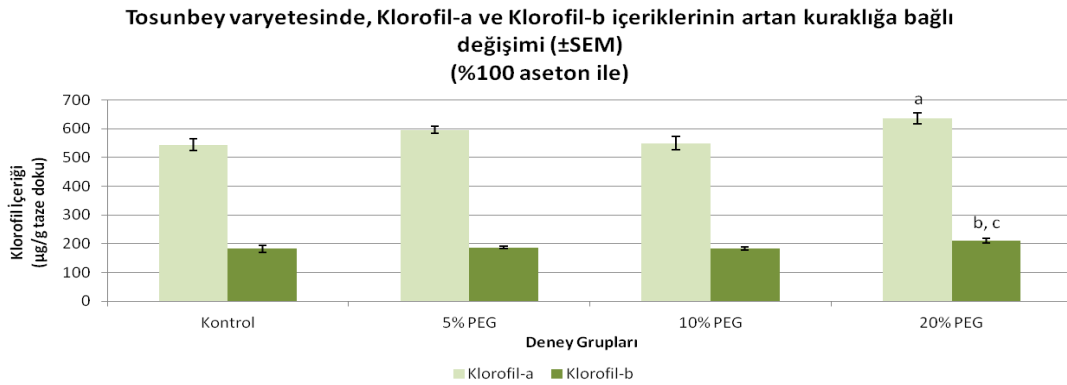
Şekil 4.20. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%95 etanol ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Tosunbey buğday çeşidinde %95'lik etanol ile yapılan ölçümlerde klorofil-a miktarı %20'lik PEG uygulanan gruptaki buğdaylarda kontrole göre %10 oranında, %5'lik gruba göre ise yaklaşık olarak %15 oranında daha fazla iken %10'luk PEG uygulanan gruptaki buğdaylarda klorofil-a miktarı %5'lik gruba göre yaklaşık olarak %10 oranında daha fazladır. Klorofil-b miktarı %20'lik PEG grubundaki buğdaylarda kontrole göre %25, %5'lik gruba %33, %10'luk gruba göre %18 oranında daha fazladır. %10'luk PEG uygulanan gruptaki buğdaylarda %5'lik gruba göre %20 oranında daha fazladır (Şekil 4.20). Bu değerler istatistiki açıdan anlamlı ($p < 0,05$) değerlerdir.



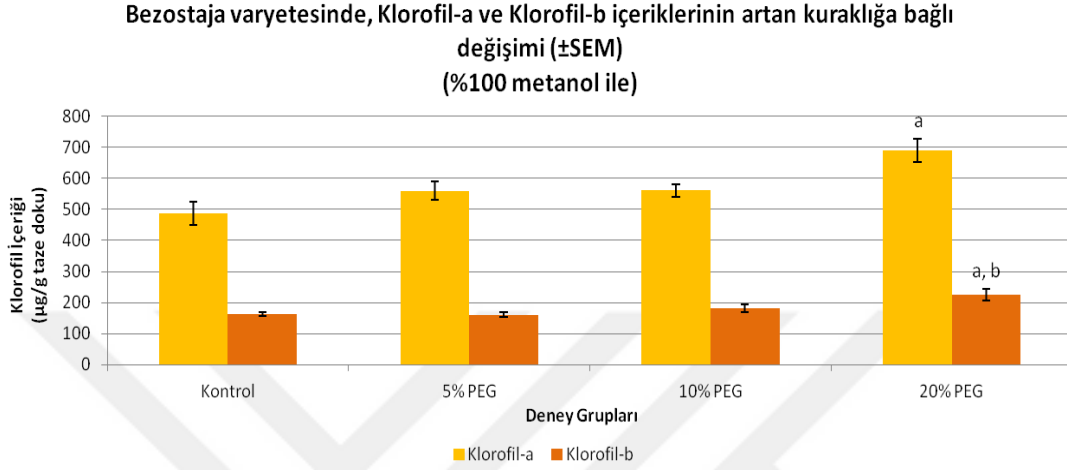
Şekil 4.21. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 aseton ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Bezostaja buğdayları için klorofil-a miktarı %100'lük aseton ile yapılan ölçümlerde, %20'lik deney grubundaki buğdaylarda kontrol grubundaki buğdaylara göre %22, %5'lik deney grubundaki buğdaylara göre %20 oranında artmıştır. Klorofil-b miktarı ise %20'lik deney grubundaki buğdaylarda %5'lik deney grubundaki buğdaylara göre %19 oranında artmıştır (Şekil 4.21). Bu artış istatistiki olarak değerli ($p < 0,05$) bulunmuştur.



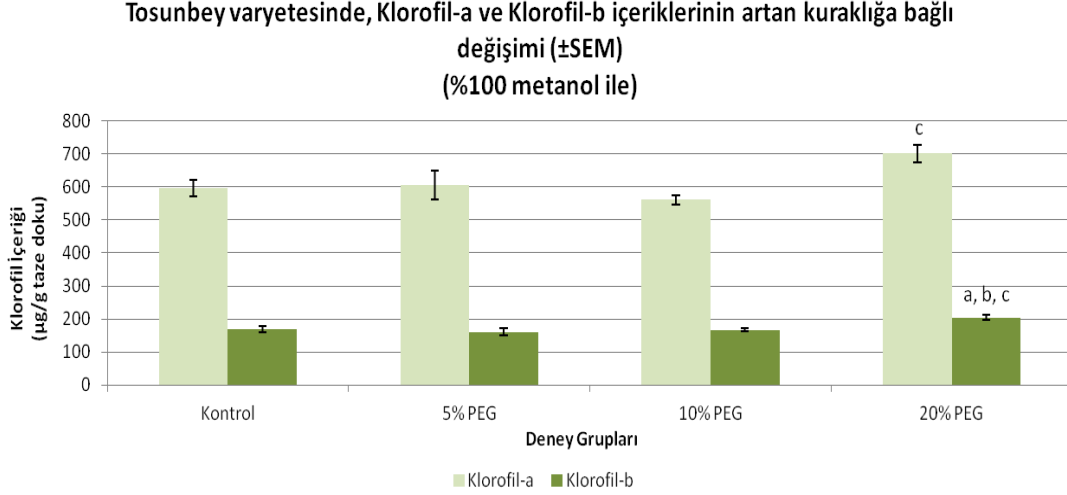
Şekil 4.22. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 aseton ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Klorofil-a miktarı Tosunbey %20'lik PEG deney grubunda kontrole göre %15 oranında artmıştır. Klorofil-b miktarı ise %20'lik grupta %5'e göre %11 oranında, %10'a göre ise %13 oranında artmıştır (Şekil 4.22). Klorofil-a ve klorofil-b miktarlarındaki bu artış istatistiksel olarak anlam ifade eden ($p<0,05$) bir artıştır.



Şekil 4.23. Bezostaja buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 metanol ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

%100 metanol kullanılan analizlerde, Bezostaja buğday çeşidinde, %20'lik deney grubundaki buğdaylarda klorofil-a miktarı kontrole kıyasla istatistiki olarak anlamlı ($p<0,05$) olarak belirlenen %30 oranında, klorofil-b miktarı ise kontrole göre %27 oranında, klorofil-b miktarı %20'lik grupta %5'lik gruba göre %28 oranında artmıştır (Şekil 4.23).

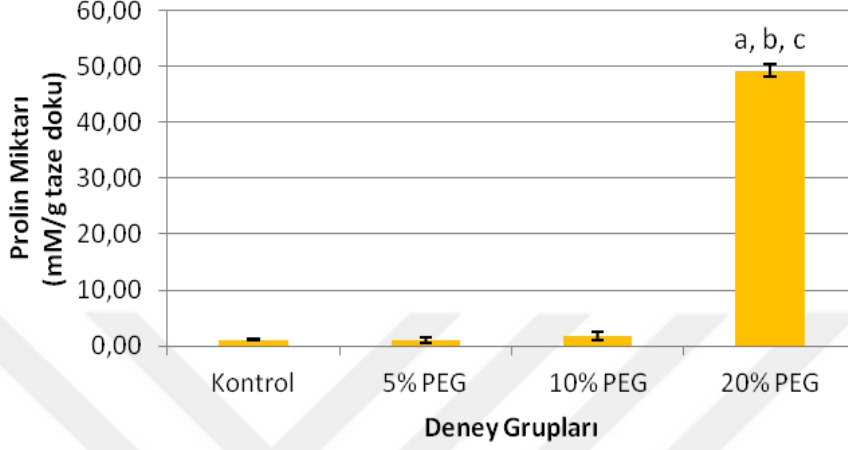


Şekil 4.24. Tosunbey buğdayında klorofil-a ve klorofil-b içeriklerinin artan kuraklığa bağlı değişimi (%100 metanol ile). "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

%100 metanol kullanarak yapılan deneylerde Tosunbey buğday çeşidinde istatistiki olarak anlamlı ($p < 0,05$) olarak belirlenen sonuçlara göre %20'lik deney grubundaki buğdaylarda klorofil-b miktarı kontrole oranla %16 oranında, %10'luk gruba oranla %18 oranında, %5'lik gruba oranla %21 oranında; klorofil-a miktarı ise %10'luk gruba göre %20 oranında artış göstermiştir. Klorofil-b miktarı %20'lik grupta %5'lik gruba göre %21 oranında artmıştır (Şekil 4.24).

4.2.4. Prolin miktarı üzerine artan kuraklığın etkisi

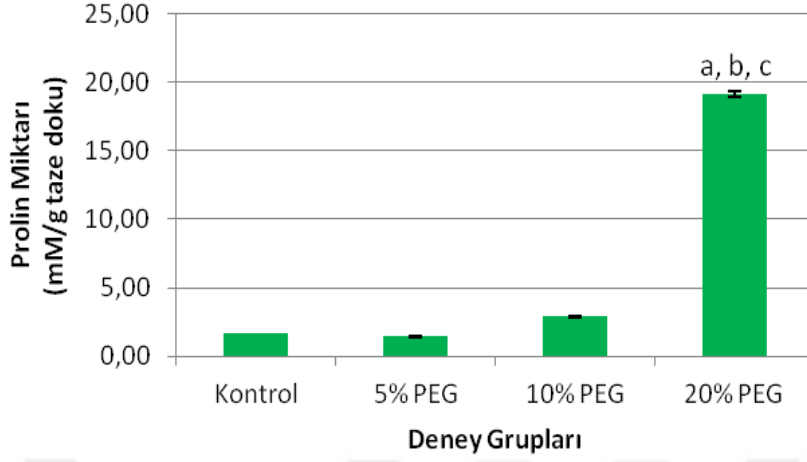
Bezostaja varyetesinde prolin içeriğinin artan kuraklığa bağlı değişimi (\pm SEM)



Şekil 4.25. Bezostaja buğday çeşidinde prolin içeriğinin artan kuraklık stresine karşı değişimi. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Bezostaja buğdayında prolin içeriğinde %20'lik grupta kontrole ve %5'lik gruba göre %98, %10'luk gruba göre %96'lık bir artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Prolin içeriğindeki bu artış istatistiki olarak değerli ve oldukça anlamlı ($p < 0,05$) bir artıştır.

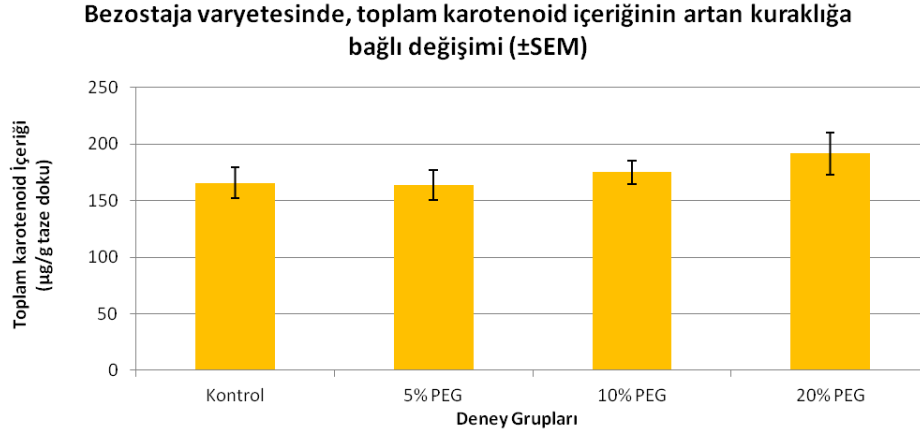
Tosunbey varyetesinde prolin içeriğinin artan kuraklığa bağlı değişimi (\pm SEM)



Şekil 4.26. Tosunbey buğday çeşidinde prolin içeriğinin artan kuraklık stresine karşı değişimi. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

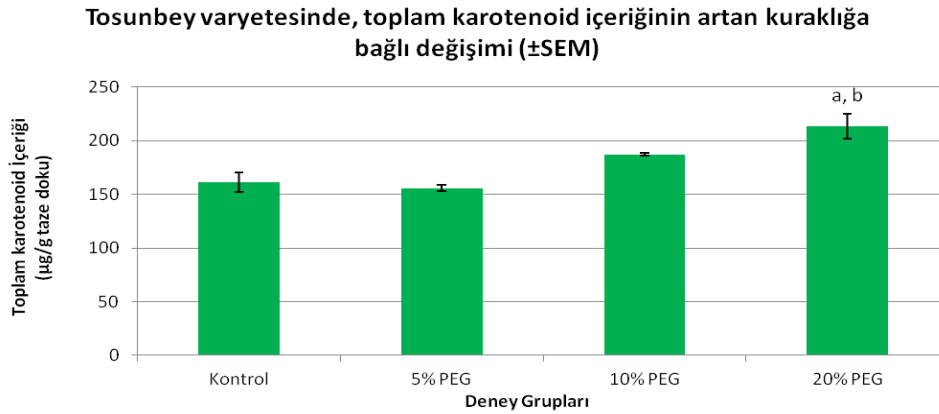
Tosunbey buğdayında prolin içeriğinde %20'lik grupta kontrole göre %91, %5'lik gruba göre %92, %10'luk gruba göre %85'lik bir artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Stresin artması ile birlikte oluşan prolin içeriğindeki bu artış istatistiki olarak değerli ve oldukça anlamlı ($p < 0,05$) bir artıştır.

4.2.5. Buğday karotenoid içeriği



Şekil 4.27. Bezostaja varyetesinde artan kuraklık ile birlikte toplam karotenoid içeriğinin değişimi. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Bezostaja buğdayları için toplam karotenoid miktarlarında ölçülen değerlerde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir fark elde edilememiştir (Şekil 4.27).



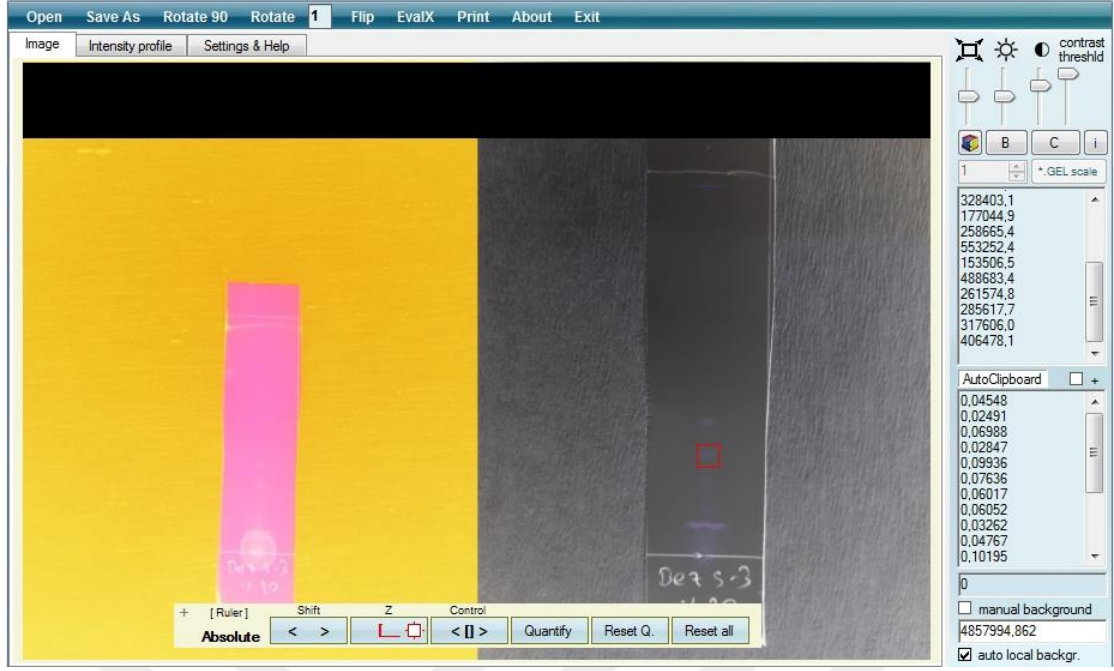
Şekil 4.28. Tosunbey varyetesinde artan kuraklık ile birlikte toplam karotenoid içeriğinin değişimi. "a, b ve c" terimleri, sırasıyla, kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$), %5 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) ve %10 PEG uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0,05$) belirtmek için kullanılmıştır.

Toplam karotenoid içeriği Tosunbey buğdaylarında %20'lik deney grubunda kontrol grubuna göre %25 oranında artmış, %5'lik gruba göre ise %27 oranında artmıştır (Şekil 4.28). Tosunbey buğdayları için toplam karotenoid miktarlarında ölçülen değerlerde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) farklar elde edilmiştir.

4.2.6. TLC (İnce tabaka kromatografisi)

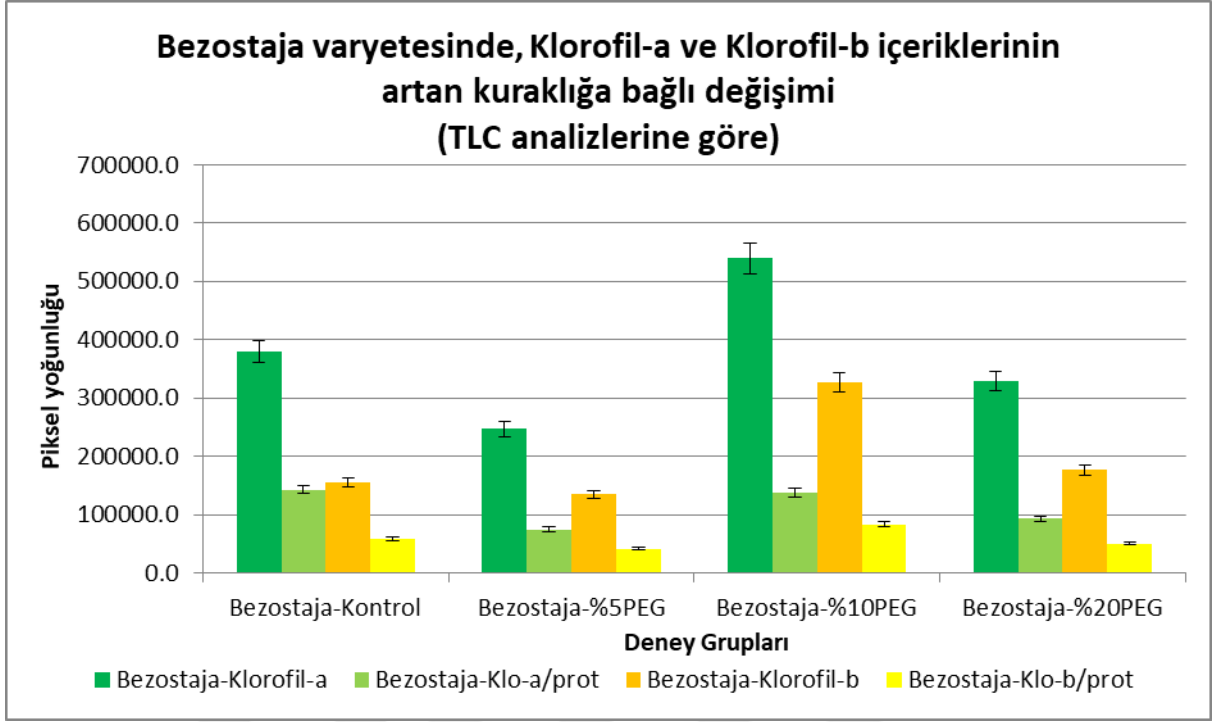
İnce tabaka kromatografisi (TLC) ince tabaka kromatografisi yöntemi kloroplast pigmentlerinin ayrılması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntem kromatografik adsorpsiyon esasına dayalı olarak gerçekleşir. Silika jel üzerinde polar veya apolar çözücülerin karıştırılması ile kloroplast pigmentlerinin yürütülmesi şeklinde gerçekleşir. Klorofil-a ve klorofil-b pigmentleri böylelikle birbirlerinden ayrılarak jel üzerinde bantlar halinde bölgesel izler bırakır. Böylece örnek içerisinde bulunan klorofil pigmentleri ayrıştırılmış olur (Anwar, 1963).

Çalışmada dört farklı çözücü sistemi kullanılmasına rağmen, yalnızca hekzan-aseton uygulamasında analiz edilebilecek kalitede TLC bant profilleri elde edilmiştir. TLC plakalarından elde edilen görüntüler, açık kaynak bir yazılım olan GelQuant ile analiz edilerek (Şekil 4.29) lekelerin piksel yoğunlukları, ait oldukları pigmentlerin miktarları için bir gösterge olarak kabul edilmiş ve karşılaştırmalarda kullanılmıştır (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31).

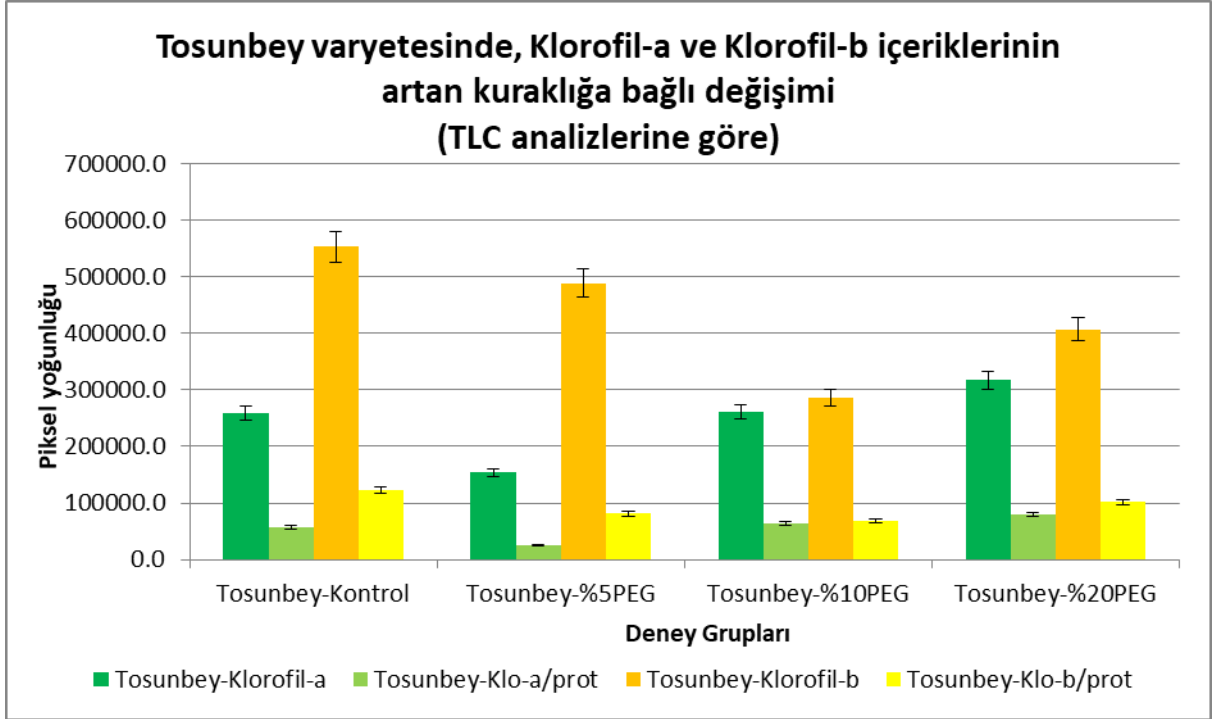


Şekil 4.29. GelQuant yazılımı ve TLC analizine ait uygulama görüntüsü.

TLC tabakalarında yeşil renkli ana leke klorofil-a, altındaki turuncu leke ise klorofil-b pigmentine aittir. Karotenoidler, TLC analizlerinde, hekzan-aseton da dahil olmak üzere, çoğu çözücü sisteminde "solvent front" ile veya hemen altında hareket etmektedirler. Plakalarda, analizde kullanılacak kadar yoğun karotenoid lekeleri gözlemlenememiştir. TLC tabakalara örnekler sabit miktarlarda (10 µl hacim) yüklendiğinden, piksel yoğunluğu değerleri protein miktarları ile normalize edilmiştir; ancak, genel değişim deseninde/eğiliminde bir farklılık ortaya çıkmamıştır.



Şekil 4.30. Bezostaja örnekleri için gerçekleştirilen TLC analizine ait sonuçlar.



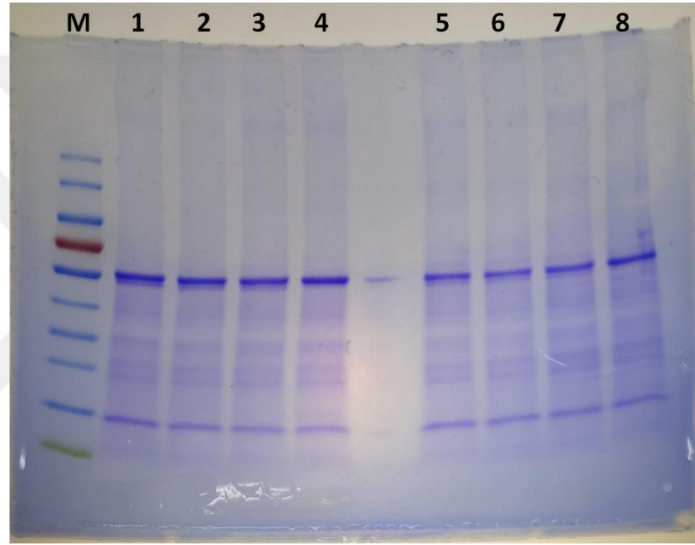
Şekil 4.31. Tosunbey örnekleri için gerçekleştirilen TLC analizine ait sonuçlar.

TLC analizleri Tosunbey örneklerinde klorofil-a ve klorofil-b pigmentlerinde %5 PEG uygulamasında bir düşüşü, artan kuraklık baskısıyla, yani %10 ve %20 PEG uygulamalarında ise, tekrar bir yükselişi göstermektedir. Bezostaja'da ise artış eğilimi %10

PEG uygulamasında maksimum değerine ulaşmış; %20 PEG uygulamasıyla oluşturulan en yüksek kuraklık baskısında ise tekrar düşüğe geçerek kontrol grubunda ölçülen değerlere yakın sonuçlar elde edilmiştir.

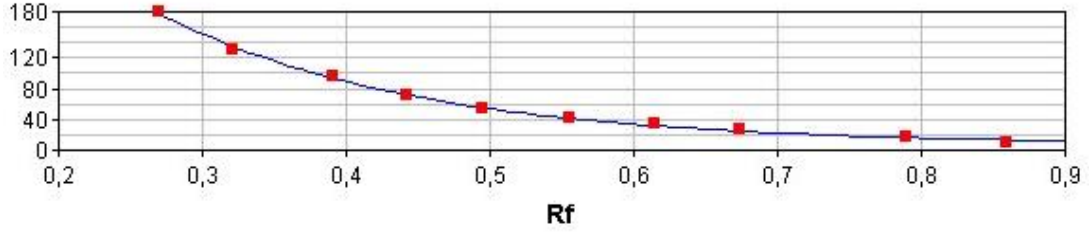
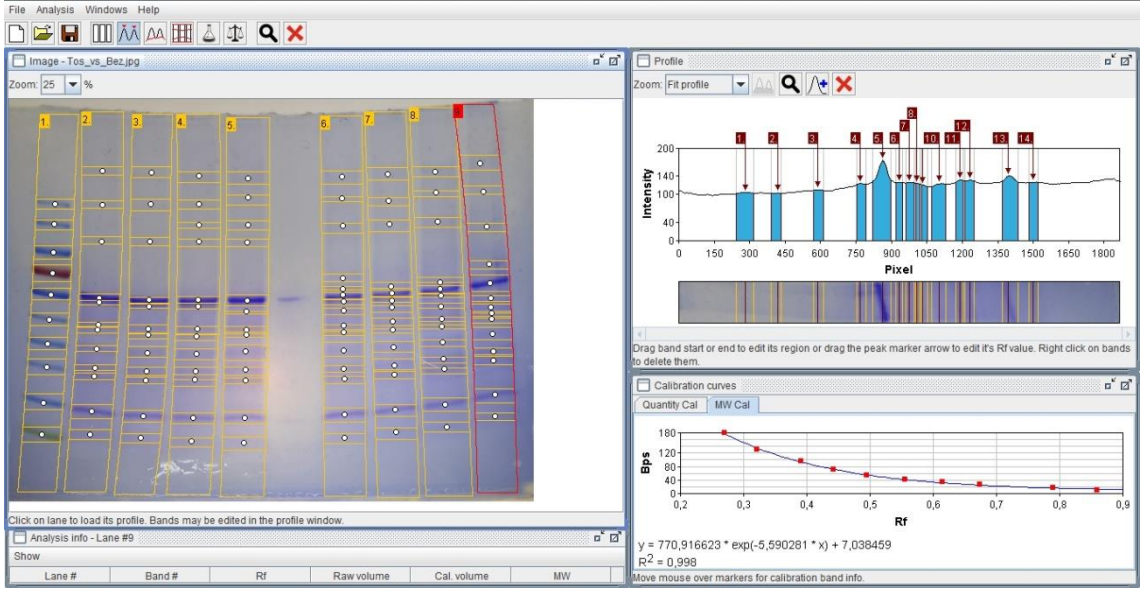
4.2.7. SDS-PAGE uygulaması ve bant analizleri

İki türe ait deneysel gruplardan elde edilen homojenatlar, eşit miktarlarda eklendikleri %4-20 gradyan jellerde geniş aralık protein moleküler ağırlık (MA) belirtici ile koşturularak profilleri CCB boyamaları ile gözlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. %4-20 gradyan jelde koşturulan ve CCB ile boyanan protein örnekleri. M: protein MA belirtici (yukarıdan aşağıya sırasıyla: 180 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa), 1-4: Tosunbey örnekleri (sırasıyla: Kontrol, %5 PEG, %10 PEG, %20 PEG), 5-8: Bezostaya örnekleri: (sırasıyla: Kontrol, %5 PEG, %10 PEG, %20 PEG).

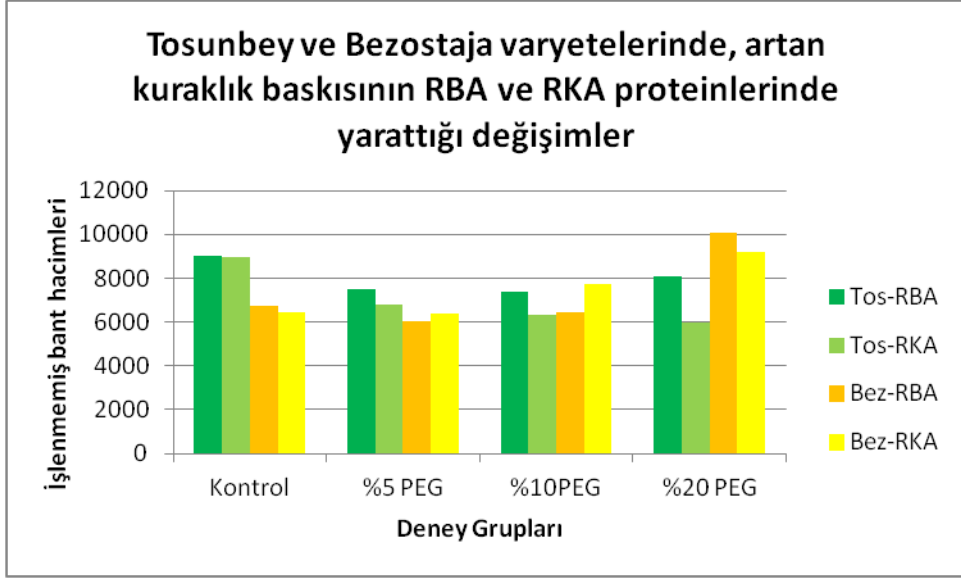
GelAnalyzer 19.1 yazılımı ile yapılan analizler (Şekil 4.33), kuraklık baskısının her iki türe ait protein örneklerinde, toplam bant sayısında anlamlı bir değişime sebep olmadığını göstermiştir.



$$770,916623 * \exp(-5,590281 * x) + 7,038459 = 0,998$$

Şekil 4.33. GelAnalyzer 19.1 yazılımının genel kullanım ve analiz özellikleri. Kullanılan protein MA belirticideki bantlara ait MA değerleri sisteme girildikten ve Rf için kalibrasyon yayları yerleştirildikten sonra kalibrasyon grafiği, $R^2=0,998$ değeri ile oluşturulmuştur.

Fotosentez mekanizmasının durumuna dair ve dolayısıyla bitkilerin kuraklığa karşı direnç durumlarıyla ilgili yargıda bulunulmasına katkı vermesi için, aynı zamanda en belirgin bantlar olarak gözlemlenen, RBA ve RKA proteinlerine ait bantlar karşılaştırılmıştır (Şekil 4.34).

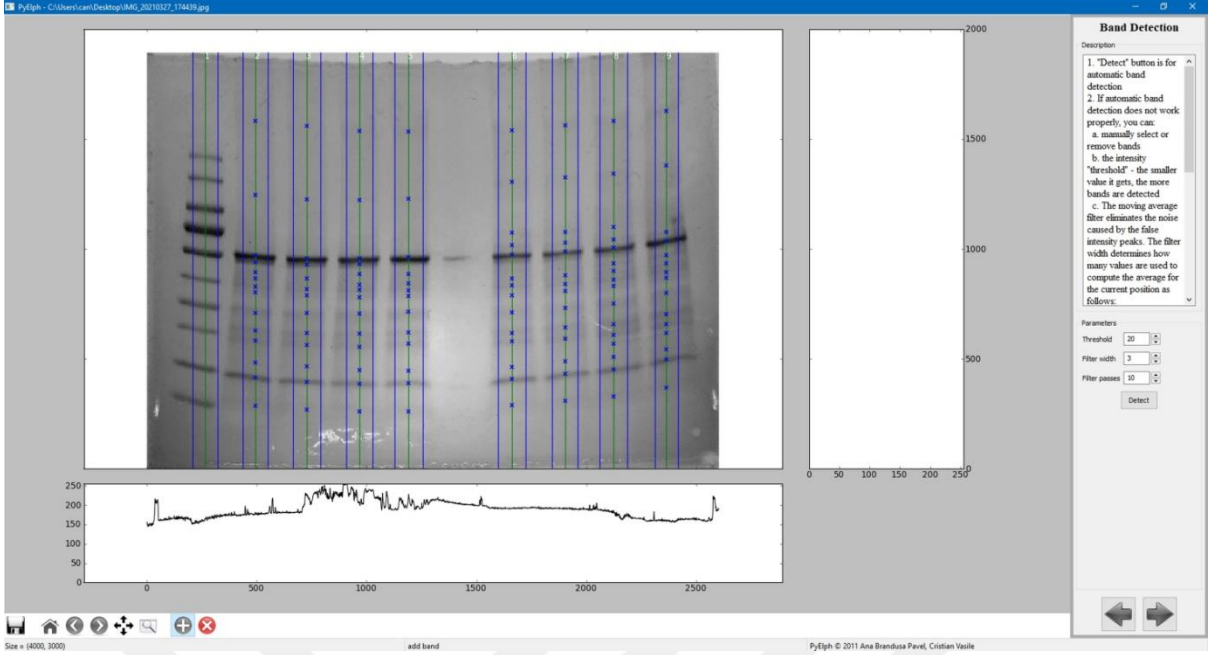


Şekil 4.34. SDS-PAGE jellerinin analizi sonucu, RBA ve RKA proteinlerine ait bantların işlenmemiş bant hacimleri arasındaki ilişki.

İşlenmemiş bant hacimleri, sadece bant kalınlıklarını verdiği için ve banttaki yoğunluğu yansıtmadığından, doğrudan, protein miktarının karşılığı olarak değerlendirilemezler. Ancak, bu ölçüm genel durum hakkında fikir vermektedir. Tosunbey'de, artan kuraklıkla birlikte, RBA ve RKA proteinlerinde bir azalma, ancak %20 PEG uygulamasında RBA için, tekrar bir yükselme ifade edilebilir. Kuraklığa nispeten daha toleranslı olan Bezostaja'da ise, artan PEG konsantrasyonu ve dolayısıyla artan kuraklık baskısı hem RBA'da hem de RKA'da yükselmeye sebep olmuştur.

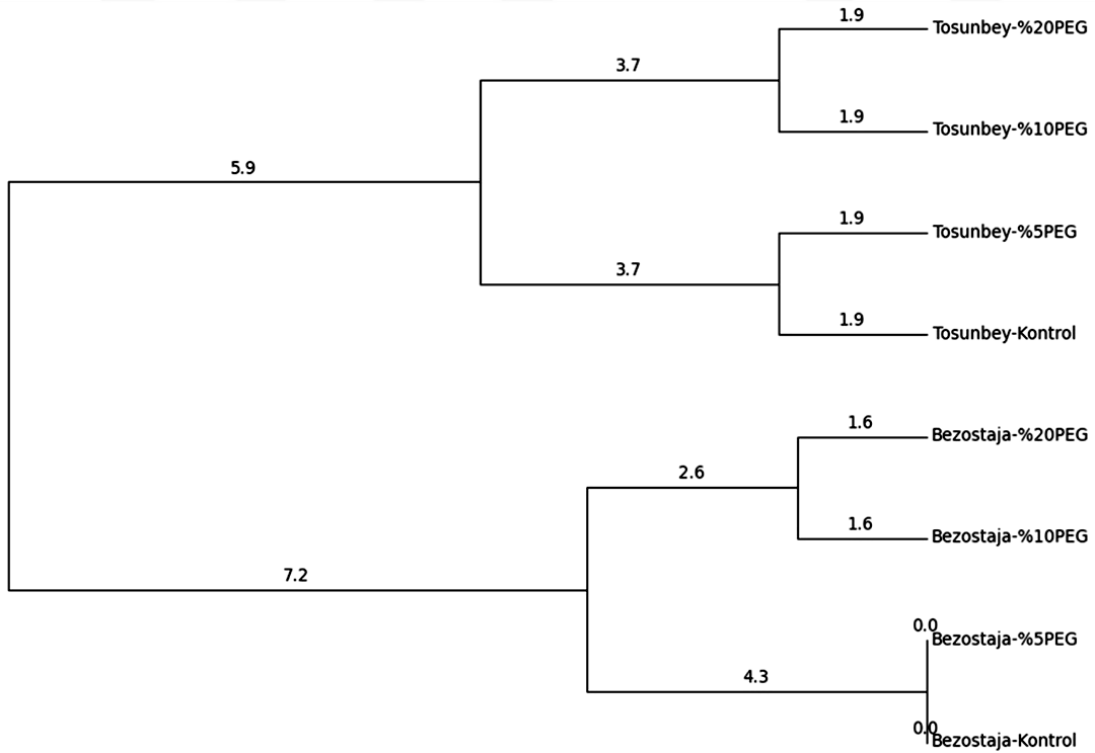
4.2.8. UPGMA protein küme analizleri

SDS-PAGE uygulaması sonrasında elde edilen jel görüntüsü üzerinde bantlar için protein küme analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kullanılan PyElph 1.14 yazılımının genel kullanım özellikleri ve bantların hiyerarşik yerleşimi Şekil 4.35'te gösterilmektedir.



Şekil 4.35. PyElph 1.14 yazılımı ile gerçekleştirilen UPGMA analizi ve yazılımın genel kullanımı.

Yapılan analizin sonuçları UPGMA filogenetik ağacı (Şekil 4.36) ve matrislerle (Çizelge 3.4) gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Tosunbey ve Bezostaja örnek gruplarının UPGMA protein kümeleme analiz sonuçlarına ait filogenetik ağaç gösterimi.

Çizelge 3.4. Tosunbey ve Bezostaja örnek gruplarında uygulanan UPGMA protein küme analizlerine ait matriks değerleri. Sütunlar (soldan sağa) ve satırlar (yukarıdan aşağıya) sırasıyla Tosunbey-Kontrol, Tosunbey %5 PEG, Tosunbey %10 PEG, Tosunbey %20 PEG, Bezostaja-Kontrol, Bezostaja %5, Bezostaja %10, Bezostaja %20

A. UPGMA mesafe (*distance*) matriksi

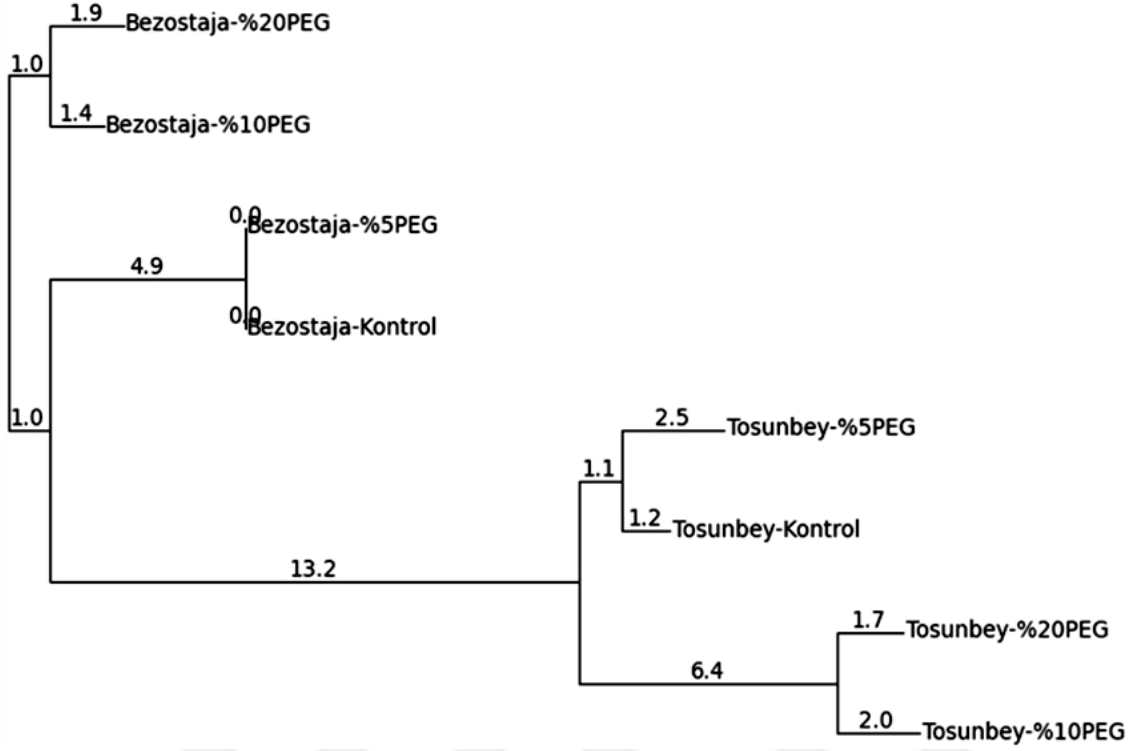
0.00	3.70	7.14	11.11	21.43	21.43	20.00	7.24
3.70	0.00	11.11	15.38	18.52	18.52	24.14	21.43
7.14	11.11	0.00	3.70	28.57	28.57	26.67	24.14
11.11	15.38	3.70	0.00	25.93	25.93	24.14	21.43
21.43	18.52	28.57	25.93	0.00	0.00	6.67	10.34
21.43	18.52	28.57	25.93	0.00	0.00	6.67	10.34
20.00	24.14	26.67	24.14	6.67	6.67	0.00	3.23
17.24	21.43	24.14	21.43	10.34	10.34	3.23	0.00

B. UPGMA benzerlik (*similarity*) matriksi

100.00	96.30	92.86	88.89	78.57	78.57	80.00	82.76
96.30	100.00	88.89	84.62	81.48	81.48	75.86	78.57
92.86	88.89	100.00	96.30	71.43	71.43	73.33	75.86
88.89	84.62	96.30	100.00	74.07	74.07	75.86	78.57
78.57	81.48	71.43	74.07	100.00	100.00	93.33	89.66
78.57	81.48	71.43	74.07	100.00	100.00	93.33	89.66
80.00	75.86	73.33	75.86	93.33	93.33	100.00	96.77
82.76	78.57	75.86	78.57	89.66	89.66	96.77	100.00

Filogenetik ağaç ve matriks değerleri, her iki tür için ayrı ayrı geçerli olmak üzere, %10 ve %20 PEG-6000 uygulamalarının, kontrol ve %5 PEG-6000 uygulamalarından (yani düşük kuraklık baskısından) farklı protein kümelenmelerine yol açtığını net şekilde ortaya koymuştur. Bu fark özellikle Bezostaja için oldukça belirgindir. UPGMA'ye ek olarak, "neighbour joining" kümelemesi (Şekil 4.37), Tosunbey varyetesindeki yüksek kuraklık (%10 PEG-6000 ve üzeri) uygulamasının protein profillerinde oldukça farklı değişimler yarattığını göstermekte; ancak, daha göze çarpacak şekilde, Bezostaja'nın yüksek kuraklık

gruplarının, Tosunbey de dahil olmak üzere, diğer tüm örneklerden farklı bir kümeleme açığına çıkardığını da ortaya koymaktadır.



Şekil 4.37. Tosunbey ve Bezostaja örnek gruplarının "neighbour joining" protein kümeleme analiz sonuçlarına ait filogenetik ağaç gösterimi.



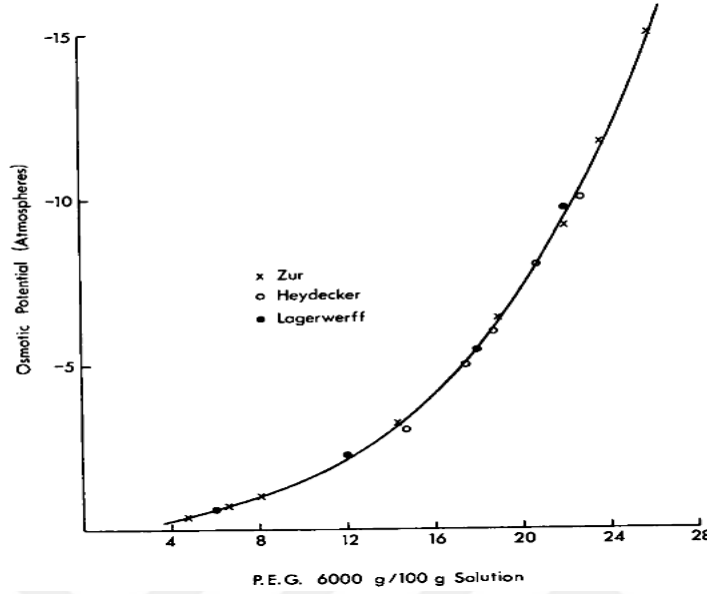
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Buğday hem günümüzde hem de gelecekte temel ve stratejik bir besin kaynağı olarak görülen ve en yaygın tüketime sahip tahıl ürünüdür. Dünya üzerinde 2000'li yıllarda günlük besin enerjisinin yaklaşık olarak %48'i tahıl ve tahıldan üretilen besinlerin tüketilmesi ile karşılanır. 2050 yılında ise bu oranın %43 olacağı tahmin edilmektedir. Tahıl yüzdelere bakıldığında buğdayın yerinin ise tahıllar arasında yaklaşık %25 olduğu bildirilmiştir. Günümüz dünyasında kişi başı tahıl tüketim miktarlarına bakıldığında gelişmiş ülkelerde yıllık olarak kişi başı tahıl üretiminin 160 kg gelişim göstermekte olan ülkelerde 150 kg olduğu bilinmektedir. Dünya nüfusunun yıllık kişi başı ortalama tahıl tüketiminin ise 173 kg olduğu belirtilmiştir. Türkiye ortalamasına bakıldığında ise 2007 ile 2015 yılları arasında yıllık kişi başı tahıl tüketiminin ortalama olarak 215 kg olduğu kayıtlara geçmiştir. 2000 yılında Dünya'da ekilebilir tarım alanları 4.92 milyar hektar iken 2017 yılında bu sayı 4.83 milyar hektar seviyesine düşmüştür (Journal ve ark., 2020). Tahıl üretim alanlarının içerisinde ekmeklik buğday çeşitlerinin yetiştirilme oranı %30 civarındadır ve Dünya üzerindeki nüfusun besin ihtiyacının da %20'si kadarını ekmeklik buğday çeşidi karşılar. Yapılan çalışmalar yalnızca ülkemizde değil tüm Dünya'da tahıl tüketiminde belirtilen oranların pek de değişmeyeceğini ortaya koymuştur. Tüm bu yapılan çalışmalar ülkemiz ve dünya için buğdayın önemini ciddi ve açık şekilde ortaya koymuştur (Atar, 2017; Bi ve ark., 2017).

Kuraklık dünya tarım alanlarının büyük bir bölümünde bitkisel üretimi sınırlandıran önemli bir faktördür. Dünya üzerindeki ekilebilir alanlarda görülen stres faktörleri içinde kuraklık stresi % 26'lık payla en büyük dilimi almaktadır (Kutlu, 2010). Kuraklık stresi bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişime sebep olmakta ve buna bağlı olarak bitkiler, sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak tolerans mekanizmaları geliştirebilmektedirler (Bi ve ark., 2017; Oyewole, 2016). Oluşan bu mekanizmaların anlaşılabilmesi açısından çalışmamız son zamanlardaki benzer çalışmalar gibi oldukça önem arz etmektedir.

Çalışmada Tosunbey ve Bezostaja ekmeklik buğday çeşitleri üzerinde kuraklık sonucu gelişen ve değişen fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri incelenmiştir. PEG6000 maddesinin artan konsantrasyonlarının yarattığı ozmotik potansiyel üstel bir değişim karakterine sahiptir. Bu durum, mevcut çalışmada uygulanan kuraklık baskısının da, %5

PEG'den %20 PEG'e doğru üstel şekilde kuvvetlendiğini ifade eder (Şekil 5.1). Deneysel çalışmaların sonuçları bu ilişki göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.



Şekil 5.1. PEG 6000 ile ozmotik potansiyel arasındaki ilişki (Williams ve Shaykewich, 1969).

Kuraklık stresinin farklı buğday tipleri üzerindeki etkisiyle buğdayda verim, yaprak klorofil içeriği ve bağıl su içeriğinin belirlenmesi amacı ile 2009-2010 yılları arasında Bijanzadeh ve Emam tarafından Şiraz Üniversitesi'nde serada yapılan çalışmada kuraklık stresine bağlı olarak bitki RWC değerinin iki farklı tür olan Şiraz ve Yavaros buğdaylarında sırasıyla %27,5 ve %23,9 oranında azalış gösterdiği kaydedilmiştir (Bijanzadeh ve Emam, 2010). Mevcut çalışmada literatürdekine benzer şekilde RWC içeriği Bezostaja buğdayı için kontrole göre %47 oranında azalmış, Tosunbey buğdayı için %33 oranında azalmış şekilde ölçülmüştür.

Acar ve arkadaşlarının 2020 yılında yürüttüğü çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; kuraklık baskısı altında, kök uzunluğu Sultan-95 çeşidinde kontrol grubuna kıyasla %14, Tosunbey çeşidinde kontrol grubuna kıyasla %21 oranında anlamlı olarak ifade edilebilecek şekilde azalmıştır. Gövde uzunluğu Sultan-95 çeşidinde kuraklığa bağlı olarak kontrole göre %5 oranında azalırken Tosunbey çeşidinde kontrole göre %2 oranında bir artış olduğu belirlenmiştir (Acar ve ark., 2020). Projede elde edilen sonuçlar Acar ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara benzer şekilde kök ve gövde uzunluklarında baskı şiddeti arttıkça kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %20 oranında azalma olduğunu göstermiştir.

2013 yılında Hasanuzzaman ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, uygulanan kuraklık stresi sonucunda buğday çeşitlerinde kök ve gövde uzunluklarında azalmalar olduğunu, pirinç bitkisinde ise RWC değerinde kontrole göre %50-60 oranında azalma olduğunu bulmuşlardır (Hasanuzzaman ve ark., 2013). Buğday çeşitleri ile yapılan mevcut çalışmada PEG 6000 ile oluşturduğumuz kuraklık stresi sonucunda buğday çeşitlerinde kök ve gövde uzunluklarında stres şiddeti arttıkça kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %20 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir. RWC içeriği Bezostaja buğdayı için kontrole göre %47 oranında azalmış, Tosunbey buğdayı için %33 oranında azalmış, ve belirtilen bu çalışmadaki sonuçlarla uyumlu değişimler gözlenmiştir.

Bezostaja varyetesinde artan kuraklığa bağlı olarak kök ve gövde uzunlukları ile yaş ağırlık değerleri azalmıştır. Kuru ağırlıkta istatistiksel olarak anlamlı azalış yalnızca %20 PEG uygulamasında gerçekleşmiştir. Aynı şekilde, bu defa hem kök hem de gövde için, hesaplanan RWC %20 PEG uygulamasında anlamlı bir düşüş göstermiştir. Tosunbey varyetesinde ise %20 PEG uygulamasında, kontrole göre anlamlı olmak üzere, kök ve gövde uzunlukları ile yaş ağırlık azalmıştır. İki tür birbirleriyle karşılaştırıldığında, özellikle kuru ağırlık için ilginç bir durum göze çarpmaktadır. Her iki örneklem grubunda da, ve ayrıca hem kök hem de gövde için, kuru ağırlık artak kuraklık baskısıyla artış eğiliminde olmakla birlikte %20 PEG grubunda tekrar azalmıştır. Ancak, kuru ağırlıktaki artışı kuraklığa karşı bir cevap olarak değerlendirirsek, bu cevap görece daha tolerant olan Bezostaja varyetesinde en düşük kuraklık baskısında (%5 PEG) başlamışken, Tosunbey'de kuru ağırlık artışı %10 PEG'de göze çarpmaktadır. Tolerant varyete daha düşük kuraklık baskısında, yani daha erken dönemde kuru ağırlığını artırmıştır. Literatürde, erken dönemde yüksek yaş ve kuru ağırlığa sahip varyeteler kuraklık-tolerant olarak nitelendirilmektedir (Ahmed ve ark., 2019). Bu durum, çalışmada elde edilen fizyolojik verilerle de gösterilmiştir; Bezostaja, Tosunbey'e kıyasla, kuraklığa karşı daha dayanıklı bir varyetedir. Ayrıca Bezostaja'nın toplam kuru ağırlık değerleri, kuraklık baskısından bağımsız olmak üzere, Tosunbey'den yüksektir.

Li ve arkadaşları çalışmalarında kuraklık toleransı daha yüksek olan 2 arpa çeşidinde kuraklık stresine bağlı olarak klorofil içeriğinin %10,7 ve %1,6 oranında azaldığını, kuraklığa karşı daha hassas olan diğer 2 arpa çeşidinde ise kuraklık stresine bağlı olarak klorofil içeriğinin %31,3 ve %30,1 oranında azaldığını tespit etmişlerdir (Li ve ark., 2006). Diğer bir çalışmada Rehman 2016 yılında tarla koşullarında 50 ekmeklik buğday çeşidi üzerinde 10 günlük kuraklık stresi uygulaması gerçekleştirmiştir. Toprak nem oranını %25 olacak şekilde sulamayı durdurmuş ve toprakta kuraklık oluşumunu sağlamıştır. Çalışmada klorofil içeriğinin ölçümü yapılmış ve kuraklık stresi aşamasındaki buğdaylarda toplam klorofil

miktarında %43'lük bir artma olduğu tespit edilmiştir (Rehman ve ark., 2016). Tez çalışmasında Tosunbey ve Bezostaja klorofil içeriklerinde kuraklığa maruz kalan buğday çeşitlerinin her ikisinde de klorofil pigmentlerinden klorofil-a ve klorofil-b miktarlarında kontrole kıyasla %15-%35 oranında istatistiki olarak anlamlı sayılabilecek bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu yönüyle sonuçlar, literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Bitkiler uzun kuraklık dönemlerinde, sürekli su eksikliğinde, diğer çoğu metabolik yolakta olduğu gibi fotosentez mekanizmasında da zarara uğramakta ve özellikle lipid peroksidasyonu ve ROS oluşumundaki yükselme sebebiyle hem kloroplast yapısını, tilakoid zarları hem de klorofil pigmentlerini kaybetmektedir. Ancak, kısa süreli kuraklık dönemlerinde, özellikle kuraklığa tolerant buğdaylarda, klorofil pigmentlerinin miktarlarında artış gerçekleştirilerek normal/bazal metabolizmayı sürdürmenin, kök-gövde-oranını optimal aralıkta tutmanın amaçlandığı rapor edilmektedir (Ashfaq ve ark., 2016). Her iki varyete de, yaklaşık aynı oranlarda olmak üzere, spektrofotometrik yöntemle ölçülen klorofil pigmentlerinde, artan kuraklığa bağlı ve ilişkili olarak, artış göstermiştir. TLC uygulamalarında elde edilen analiz sonuçları aynı tabloyu yansıtmamaktadır. Ancak bazı plakalarda lekelerin üstüste binmiş olması, yani tam ayırımın gerçekleşmemesi yanlış-pozitif ve/veya yanlış-negatif sonuçların eldesine sebep olmuş olabilir. Bu noktada, spektrofotometrik ölçümlerin sonuçları kabul edilerek yorumda bulunulmuştur. Ayrıca, SDS-PAGE analizlerinde, özellikle Bezostaja örneklerinde, %20 PEG uygulaması ile oluşturulan yüksek kuraklık baskısının Rubisco Büyük ve Küçük altbirimlerinde artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu durum, görece daha tolerant olan Bezostaja varyetesinin, klorofil pigmentlerindeki artışa paralel şekilde, fotosentez metabolizmasını artıracak yönde bir adaptasyon gerçekleştirdiğini işaret etmektedir.

Slama ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmaların sonucunda kontrol grubu ve kuraklık baskısı altındaki grup arasındaki farklar incelendiğinde, strese maruz kalmış gruptaki buğdaylarda prolin miktarında kontrol grubuna göre %86,9 ile %700 oranlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir (Slama ve ark., 2018). Gerçekleştirilen analizler sonucuna göre, test edilen buğdaylarda meydana gelen prolin birikiminin kuraklığa bağlı olarak kontrole kıyasla %91-%98 oranında istatistiki olarak çok net ve değerli ($p < 0,05$) bir artış gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Prolin kuraklık baskısında artış gösteren bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Her iki varyetede de %20 PEG uygulaması ile oluşturulan aşırı kuraklık koşullarında oldukça büyük artış göstermiştir. Ancak benzer bir artış, %5 ve %10 PEG uygulamalarından gözlemlenmemiştir. Bu durum, aşırı kuraklık koşullarında devreye giren prolin mekanizmasının bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

Sharma ve Dubey tarafından 2005 yılında yürütülen çalışmanın sonucuna göre kuraklık stresinin daha fazla uygulandığı pirinç çeşidinde kuraklık stresinin daha az uygulandığı pirinç çeşidine göre toplam tiyol havuzu ve glutatyon konsantrasyonunda %20 - 38 oranında bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Literatürdeki bu çalışmaya benzer şekilde yürütülen tez projemizde buğdayda kuraklık stresine bağlı olarak GSH seviyesinde Bezostaja buğday çeşidi için %5, %10 ve %20'lik PEG uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre sırası ile %37, %29 ve %32 oranında istatistiki olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir azalma meydana geldiği bulunmuştur. Tosunbey buğday çeşidi için ise gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

Kojić ve arkadaşlarının 2012 yılındaki çalışmalarının sonucunda her iki gruptaki mısır bitkilerinde GST aktivitesinin kurak koşullarda arttığı, kontrol grubunda kurak ortam koşullarında büyüyen mısırlarda GST aktivitesinin 255,5 ila 711,6 u/mg protein arttığı ve ATN'den etkilenmediği sonucuna varmışlardır (Kojić ve ark., 2012). Buğdaylar üzerinde yürütülen bu çalışmada artan kuraklık stresine bağlı olarak toplam GST enzim aktivitesinde Bezostaja buğdayı için kontrole kıyasla %35 oranında bir artış, Tosunbey buğdayı için ortalama %50 oranında artış tespit edilmiştir. Literatürde kuraklık stresine karşı GST enzim aktivitesindeki değişimin araştırıldığı çalışmaların azlığı ve bilime olan katkısının kısıtlı oluşu sebebi ile GST enzim aktivite deneylerine bu çalışmada yer verilmiştir. Bu tez, bu nedenle ve özellikle GSTT1-1 analizi sonuçlarıyla gelecekte yapılacak olan benzer çalışmalara yol gösterici nitelikte olacaktır.

Buğday varyetelerinde, gen seviyesindeki değişimler veya protein miktarıyla ilgili immunolojik çalışmalar bulunmakla birlikte, tez çalışmasına konu edilen türlerde bu şekildeki metotlarla GST'lerle ilgili çalışmalar son derece azdır. Üstelik, enzim aktivitesi ölçümleri literatürde gözlenmemiştir. GSTT1-1 izozimine dair, buğdaylarda, herhangi bir çalışma ise tespit edilememiştir. Oysaki GST enzimleri kuraklık da dahil olmak üzere, pek çok abiyotik baskı türüne karşı, bitkilerin devreye soktuğu direnç mekanizmasının önemli üyeleridir. Çevresel baskının yarattığı ROS'nin uzaklaştırılmasında önemli görevler üstlenmektedirler. GST genlerinin transgenik yöntemlerle artırıldığı (over-expression)

endüstriyel bitkilerde kuraklık baskısına karşı büyük avantaj sağlandığı rapor edilmektedir (Kumar ve Trivedi, 2018) .

%20 PEG uygulamasında, ölçülen toplam GST spesifik aktivitesi, tez çalışmasında konu edilen iki varyeteden Bezostaja'da kontrole göre %35, Tosunbey'de ise %5PEG uygulamasına göre %55 artış göstermiştir. Diğer bir ifadeyle, her iki varyete, aşırı kurak koşullarda toplam GST aktivitelerini değişen oranlarda artırmışlardır. Bu ölçümlerde dikkat çeken nokta, her iki varyetede de %5 PEG uygulamasında, kontrole göre azalan bu enzim aktivitesinin, benzer şekilde, her ikisinde de %10 PEG ve daha da fazla olmak üzere %20 PEG uygulamalarında yükselmiş olmasıdır. Ayrıca, tolerant varyete olan Bezostaja'da, tüm deneme gruplarında, Tosunbey'den daha yüksek spesifik aktivite değerleri hesaplanmıştır. Bütün bu ölçümlerle ilişkili şekilde toplam tiyol miktarında, ki toplam GSH havuzu için bir ölçü olarak kullanılmaktadır, artan kuraklıkla ters oranlı şekilde bir değişim vardır. Kısaca, toplam GST aktivitesinin arttığı uygulamalarda GSH havuzu küçülmüştür. Hem artan substrat ihtiyacı hem de özellikle artan antioksidan ihtiyacı bu değişimleri açıklamaktadır. Üstelik, toplam GST aktivitesi daha yüksek olan tolerant Bezostaja'da toplam GSH havuzu (8-12 mM/mg protein aralığındadır) Tosunbey'de ölçülenin (0,6-0,8 mM/mg protein aralığındadır) 10 katından daha büyük olarak tespit edilmiştir. Önümüzdeki dönemde daha da sık yaşanacak kısa süreli ancak yoğun kuraklık periyotlarında hayatta kalabilme ve ürün değerini koruyabilme açısından avantajlı olacak varyetelerin seçiminde GST aktivitesini görece daha hızlı yükseltebilenlerin, ve yine, GSH havuzu daha büyük olanların tercihi önem arzedecektir.

GSTT1-1 aktiviteleri, artan kuraklığa bağlı olarak, her iki varyetede de azalmıştır. Bu enzimin toksin katabolizmasında görev aldığı ve kuraklık baskısı altında gen seviyesinde bir azalmanın (down-regulation) olduğu rapor edilmiştir (Liao ve ark., 2018). Tez çalışmasında, bu sonuçları destekler şekilde, GSTT1-1 spesifik aktivite değerleri artan kuraklık baskısı ile ters orantılı şekilde düşüş göstermiştir. Bu tür bir değişim nedenine dair daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Tosunbey ve Bezostaja örneklem grupları kullanılarak ve eşit miktarda protein içerecek şekilde uygulanan SDS-PAGE prosedürleri sonrasında, en başarılı jel görüntüsü üzerinde protein küme analizleri gerçekleştirilmiştir. UPGMA analizlerindeki amaç, kuraklık baskısının aynı türe ait protein profillerine ne derece bir değişiklik yarattığı ve bu değişimin farklı PEG uygulamaları arasında nasıl bir değişim deseni yarattığının anlaşılmasıdır. UPGMA filogramları, çalışmanın başında tahmin edildiği gibi, orta ve yüksek kuraklık uygulamalarının (%10 PEG ve %20 PEG) ortaya çıkardığı protein profillerinin kontrol ve

düşük (0 ve %5 PEG) kuraklık baskısında izlenenden istatistiksel olarak farklı olduğunu her iki varyete için de ortaya koymuştur. Daha ilginç olan sonuç ise, Bezostaja varyetesinin orta ve yüksek kuraklık sonucu içerdiği protein profillerinin hem aynı varyetenin kontrol ve %5 PEG uygulamalarından, hem de diğer varyetenin tüm örnekleminde farklı olmasıdır. Başka bir deyişle, Bezostaja varyetesi kontrol ve %5 PEG örneklerinin protein profilleri aynı varyetenin orta ve yüksek kuraklık uygulanan örneklerinin profillerinden daha çok Tosunbey'in örneklerindeki daha büyük benzerlik göstermiştir. Bu durum, tolerant Bezostaja varyetesinin, orta ve yüksek kuraklıktan sakınmak için protein profilinde ne denli etkin bir değişikliğe gittiğinin de göstergesidir. Ancak kesin yargılarda bulunabilmek için daha kapsamlı deneylerin yapılması gerekmektedir.

Yürüttüğümüz bu tez çalışmasında, farklı konsantrasyonlarda PEG 6000 uygulanan iki çeşit buğdayda fizyolojik ve kimyasal parametreler incelenmiş ve kuraklık stresinin buğdaylar üzerinde incelenen bu parametrelerde ne gibi bir değişikliğe sebep olduğu araştırılmıştır.

Sonuçta; buğdaylarda gövde ve kök uzunluklarında, yaş ve kuru ağırlıklarında, RWC değerlerinde bulgular kısmında değiştiğimiz üzere ve beklenildiği şekilde kuraklık artışı ile beraber azalmalar meydana gelmiştir. GSH havuzunda Tosunbey buğdayında yüksek oranda bir değişiklik kaydedilemezken Bezostaja buğdayında GSH havuzunun daha yüksek ölçüldüğü kaydedilmiştir. GSH miktarlarının ise kuraklığa bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Toplam GST enzim aktivitesinde kuraklık artışına bağlı olarak her iki buğday çeşidinde de önce bir düşüş ardından artış olduğu belirlenmiştir. Ancak GSTT1-1 enzim aktivitesinde gözlemlenen düşüşün doğrudan kuraklığa bağlı olduğu söylenemez. Klorofil ve karotenoid miktarlarında literatürdeki çalışmalara benzer şekilde ve beklenildiği üzere kısa süreli kuraklık stresine bağlı olarak artışlar görülmüştür. Prolin içeriğinde ise net şekilde ve yine beklenildiği gibi her iki çeşitte de artış ölçülmüştür.

Çalışma sonuçlarının, bu alanda ileride yapılacak olan çalışmalara yol gösterici nitelikte olacağı düşünülmektedir. Daha fazla parametre ve daha fazla varyete dahil edilerek analizlerin genişletilmesi önerilir.



KAYNAKLAR

- Acar, O., Teker, M., Günay, E., Baltacıer, G. (2020). Kuraklık stresi altındaki buğdayda eksojen Glisin Betain'in fizyolojik ve biyokimyasal etkileri. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, **35**:446–455.
- Ahmed, H. G. M. D., Sajjad, M., Li, M., Azmat, M. A., Rizwan, M., Maqsood, R. H., Khan, S. H. (2019). Selection criteria for drought-tolerant bread wheat genotypes at seedling stage. *Sustainability (Switzerland)*, **11**(9):1–17.
- Aksay, C. S., Ketenoglu, O., Kurt, L. (2005). Küresel Isınma ve İklim Değişikliği Cemal. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, **1**(25):29–42.
- Aksoy, Y. (2002). Antioksidan Mekanizmada Glutasyonun Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **22**(4):442–448.
- Alaei, Y. (2011). The effect of amino acids on leaf chlorophyll content in bread wheat genotypes under drought stress conditions. *Middle-East Journal of Scientific Research*, **10**(1):99–101.
- Alias, Z. (2016). The Role of Glutathione Transferases in the Development of Insecticide Resistance. *Insecticides Resistance*.318.
- Allocati, N. (2018). Glutathione transferases : substrates , inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*.2-5.
- 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*. 6(9), 2026–2032.
- Anonim, 2018. Buğday Raporu. <https://www.dw.com/tr>. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara.
- Anwar, M. H. (1963). Separation of plant pigments by thin layer chromatography. *Journal of Chemical Education*, **40**(1):29–31.
- Ashfaq, W., Ul-Allah, S., Kashif, M., Sattar, A., Nabi, H. G. (2016). Genetic Variability Study Among Wheat Genotypes Under Normal and Drought Conditions. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*, **4**(3):111–116.
- Atak, M. (2017). *Buğday ve Türkiye Buğday Köy Çeşitleri*. *Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University*. **22**(2):71-88
- Aydın, M., Pour, A. H., Tosun, M., Haliloğlu, K. (2016). Effect of application of putrescine on seedling growth and cell division of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, **26**(3):319–332.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, **5**(0):1–10.
- Bi, H., Kovalchuk, N., Langridge, P., Tricker, P. J., Lopato, S., Borisjuk, N. (2017). The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biology*, **17**(1):1–13.
- Bijanazadeh, E., Emam, Y. (2010). Effect of defoliation and drought stress on yield components and chlorophyll content of wheat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **13**(14):699–705.
- Biswal, S., Sahoo, J., Murthy, P. N., Giradkar, R. P., Avari, J. G. (2008). Enhancement of dissolution rate of gliclazide using solid dispersions with polyethylene glycol 6000. *AAPS PharmSciTech*, **9**(2):563–570.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought. *Functional Plant Biology*, **30**:239–264
- Chutia, J., Borah, S. P. (2012). Water Stress Effects on Leaf Growth and Chlorophyll Content but Not the Grain Yield in Traditional Rice (*Oryza sativa* Linn .) Genotypes of Assam , India II . Protein and Proline Status in Seedlings under PEG Induced Water Stress.

- American Journal of Plant Sciences*, **3**:971–980.
- Cui, G., Zhao, X., Liu, S., Sun, F., Zhang, C., Xi, Y. (2017). Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, **118**:138–149.
- Delzon, S. (2015). New insight into leaf drought tolerance. *Functional Ecology*, **29**(10):1247–1249.
- Díaz-López, L., Gimeno, V., Simón, I., Martínez, V., Rodríguez-Ortega, W. M., García-Sánchez, F. (2012). *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. *Agricultural Water Management*, **105**:48–56.
- Din, J., Khan, S. U., Ali, I., Gurmani, A. R. (2011). Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. *Journal of Animal and Plant Sciences*, **21**(1):78–82.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Protein Family Review Genome Biology*, **3**: 1–10.
- El-Afry, M. M., El-Nady, M. F., Abdelmonteleb, E. B., Metwaly, M. M. S. (2012). Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*triticum aestivum* l.) treated with some bacterial strains. *Acta Biologica Szegediensis*, **56**(2):165–174.
- Fanger, B. O. (1987). Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Analytical Biochemistry*, **162**(1):11–17.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2020. FAO Statistics Division. <http://www.fao.org/home/en/>. America.
- Farooq, M., Hussain, M., Siddique, K. H. M. (2014). Drought Stress in Wheat during Flowering and Grain-filling Periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **33**(4), 331–349.
- Gall, H. Le, Philippe, F., Domon, J. (2015). *Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress*. *Plants J.* **4**:112–166.
- Ganji Arjenaki, F., Jabbari, R., Morshedi, A. (2012). Evaluation of Drought Stress on Relative Water Content, Chlorophyll Content and Mineral Elements of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, **4**(11): 726–729.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, **70**:204–212.
- Habig, W.-H., Pabst, M. J., Fleischnert, G., Gatmaitant, Z., Ariast, I. M., Jakoby, W. B. (1974). Ligandin, a Major Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**(10):3879–3882.
- Hao, Y., Xu, S., Wang, H., Kong, L. (2021). Comparative Analysis of the Glutathione S-Transferase Gene Family of Four Triticeae Species and Transcriptome Analysis of GST Genes in Common Wheat Responding to Salt Stress. *Microbiological Research*, S0944-5013(15)30038-0 .1-12
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **23**(2):249–268.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S., Fujita, M. (2013). Drought Stress Responses in Plants, Oxidative Stress, and Antioxidant Defense. *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, 209–250.
- Hoagland, D.R. , Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, Circular-347.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: A review on morphological

- characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, **11**(1):100–105.
- Journal, A., Acar, O., Günay, E. (2020). Kuraklık stresi altındaki buğdayda eksojen Glisin Betain'in fizyolojik ve biyokimyasal etkileri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* **35**:446–455.
- Karagöz, H. (2020). Determination of the Yield Quality and Winter Durability Characteristics of Some Bread Wheat (*Triticum aestivum*) Genotypes in Pasinler and Erzincan Locations. *Alinteri Journal of Agricultural Sciences*, **35**(2):30–36.
- Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., Meijer, J. (2013). Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, **32**(1):122–130.
- Khan, M. U., Mitchell, K. (1987). Chlorophylls Carotenoids. *Plant Physiol.* **148**:350–382.
- Kojić ve ark., 2012. (2012). Efficacy of natural aluminosilicates in moderating drought effects on the morphological and physiological parameters of maize plants, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **12**(1):113–123.
- Kumar, S., Asif, M. H., Chakrabarty, D., Tripathi, R. D., Dubey, R. S., Trivedi, P. K. (2013). Differential Expression of Rice Lambda Class GST Gene Family Members During Plant Growth, Development, and in Response to Stress Conditions. *Plant Molecular Biology Reporter*, **31**(3):569–580.
- Kumar, S., Trivedi, P. K. (2018). Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Frontiers in Plant Science*, **1**–9.
- Kutlu, İ. (2010). Tahıllarda Kuraklık Stresi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **3**(1):35–41.
- LI, R. hua, GUO, P. guo, Michael, B., Stefania, G., Salvatore, C. (2006). Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators of Drought Tolerance in Barley. *Agricultural Sciences in China*, **5**(10):751–757.
- Liao, W., Li, S., Lu, C., Peng, M. (2018). Tau GSTs involved in regulation of leaf abscission by comparison the gene profiling of MeGSTs in various abscission-promoting treatments in cassava abscission zones. *BMC Genetics*, **19**(1):1–10.
- Maheshwari, D. K. (2012). Bacteria in agrobiolology: Stress management. 1–333.
- Maslennikova, D., Shakirova, F. (2021). Contribution of Glutathione and Ascorbate to Realization of the Protective Effect of Nitric Oxide on Wheat Plants under Drought. *Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences*. 1-15
- Mauch, F., Dudler, R. (1993). Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiology*, **102**(4):1193–1201.
- May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: Implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, **49**(321):649–667.
- Monfreda, C., Ramankutty, N., Foley, J. A. (2008). Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000. *Global Biogeochemical Cycles*, **22**(1):1–19.
- Moron, M., Depierre, J., Mannervik, B. (1979). Levels of glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **582**:67–68.
- Motiee, H., Mcbean, E. (2012). Drought As A Water Related Disaster A Case Study of Lake Oroomiyeh. *Aqua-LAC journal*, **4**(2):7-18.
- ÖRS, S., EKİNCİ, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, **32**(2): 237.
- Oyewole, C. I. (2016). *The Wheat Crop*. Kogi State University ,Anyigba, Kogi State, Nigeria. 9-11
- Özberk, F., Karagöz, A., Özberk, İ., Atli, A. Y. (2016). Buğday Genetik Kaynaklarından Yerel ve Kültür Çeşitlerine; Türkiye’de Buğday ve Ekmek. *Tarla Bitkileri Merkez*

- Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **25**(2):218–233.
- Özberk, İ., Atay, S., Altay, F., Cabi, E., Özkan, H., Atlı, A. (2016). *Türkiye'nin Buğday Atlası*.
- Öztürk, N. Z. (2015). *Bitkilerin Kuraklık Stresine Tepkilerinde Bilinenler ve Yeni Yaklaşımlar. Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **3**(5):307–315.
- Parvaneh Rahdar. (2012). The studying effect of drought stress on germination, proline, sugar, lipid, protein and chlorophyll content in purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**(9):1539–1547.
- Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P., Do Nascimento, C. J. (2014). Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **20**(1):53–69.
- Rehman, S. U., Bilal, M., Rana, R. M., Tahir, M. N., Shah, M. K. N., Ayalew, H., Yan, G. (2016). Cell membrane stability and chlorophyll content variation in wheat (*Triticum aestivum*) genotypes under conditions of heat and drought. *Crop and Pasture Science*, **67**(7):712–718.
- Rudyk, O., Eaton, P. (2014). Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology*, **2**(1):803–813.
- Sallam, A., Alqudah, A. M., Dawood, M. F. A., Baenziger, P. S., Börner, A. (2019). Drought stress tolerance in wheat and barley: Advances in physiology, breeding and genetics research. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(13):2-5
- Semenov, M. A., Stratonovitch, P., Alghabari, F., Gooding, M. J. (2014). Adapting wheat in Europe for climate change. *Journal of Cereal Science*, **59**(3):245–256.
- Shamsi, K. (2010). The effects of drought stress on yield , relative water content , proline , soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of Animal Plant Sciences*, **8**(3):1051–1060.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **46**:209–221.
- Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, **60**(6):1537–1553.
- Slama, A., Mallek-Maalej, E., Mohamed, H. Ben, Rhim, T., Radhouane, L. (2018). A return to the genetic heritage of durum wheat to cope with drought heightened by climate change. *PLoS ONE*, **13**(5):1–11.
- Smart, R. E., Bingham, G. E., Agriculture, D., Wales, N. S., Bingham, G. E. (1974). Rapid Estimates of Relative. *Plant Physiol*, **53**:258–260.
- Tekel, H. (2012). Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Karaciğer Hasarında Glutatyon (Gsh) Ve Glutatyon Stransferaz (Gst) Aktivitesi Üzerine N-Asetil Sisteinin Etkisi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria in microbiological Research, *Elsevier GmbH*. 184.
- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q., Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**(10):18-19
- Williams, J., Shaykewich, C. F., (1969). An Evaluation Of Polyethylene Glycol (P.E.C.) 6000 And P.E.G. 20,000 In The osmotic control of soil water matric potential. *J. Soil Sci*, **49**:397-401.
- Yilmaz, C., Bulus, H., Oguztuzun, S., Cihan, M., Fidan, C. (2020). The activities of GST isozymes in stomach tissues of female obese patients. *Turkish Journal of Biochemistry*, **45**(6):883–889.
- Yilmaz, C., Işcan, M. (2014). Kuraklık baskısı altındaki *Pinus brutia* Ten. ağaçları iğne

yapraklarında Glutasyon S-Transferaz aktiviteleri ve glutasyon seviyeleri. *Turkish Journal of Biochemistry*, **39**(2):238–243.





ÖZ GEÇMİŞ

Pınar YILMAZ, İlk ve orta öğrenimini Adıyaman'da tamamladı. Ardından lise öğrenimine başladı ve Kahta Anadolu Lisesi'nden 2010 yılında mezun oldu. 2013 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik lisans bölümünden mezun olup aynı yıl yine Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 27//04/2021

Tez Başlığı / Konusu: HASSAS VE TOLERANT EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE KURAKLIK BASKISININ BAZI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 105 sayfalık kısmına ilişkin, 27/04/2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 (Sekiz) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Pınar YILMAZ

Öğrenci No:17910002064

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji Ve Genetik

Programı: Yüksek Lisans

Statüsü: Y. Lisans

Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)