



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUZ STRESİ ALTINDAKİ ELMA
FİDANLARINDA SNP VE CaSiO₃
UYGULAMASININ MDSOS1 VE MDNHX1
GENLERİNİN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Merve KILIÇ





YÜKSEK LİSANS

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül-2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Merve KILIÇ tarafından hazırlanan “Tuz Stresi Altındaki Elma Fidanlarında SNP ve CaSiO₃ Uygulamasının MdSOS1 Ve MdNHX1 Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması 21/09/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri		İmza
	Başkan	
Prof.Dr.Muhittin DİNÇ		
	Danışman	
Prof.Dr.Emine ARSLAN		
	Üye	
Prof.Dr.Emine ARSLAN		
	Üye	
Prof.Dr.Tuna UYSAL		
	Üye	
Prof.Dr.Muhittin DİNÇ		

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP Koordinatörlüğü tarafından 17201034 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Merve KILIÇ

Tarih: 22.09.2017



ÖZET

YÜKSEK LİSANS

TUZ STRESİ ALTINDAKİ ELMA FİDANLARINDA SNP VE CaSiO_3 UYGULAMASININ *MDSOS1* VE *MDNHX1* GENLERİNİN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Merve KILIÇ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Emine ARSLAN

2017, ... Sayfa

Jüri

Prof.Dr.Emine ARSLAN

Prof.Dr.Tuna UYSAL

Prof.Dr.Muhittin DİNÇ

Tuz stresi, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkilerin gelişimini etkileyerek ürün verimliliğini ve kalitesini sınırlandıran önemli stres faktörlerinden biridir. Toprakta su potansiyelinin azalması sonucunda tuz konsantrasyonunun artması bitki hücrelerinin ozmotik potansiyelini düşürmektedir. Çeşitli kimyasal maddelerin uygulanmasıyla bitkilerin tuzu belli ölçüde tolere edebilmesi sağlanabilmektedir. Stres koşulları altında meyve ağaçları üzerine etkileri henüz bilinmeyen sodyum nitropurissid (SNP) ve kalsiyum silikat (CaSiO_3) kimyasallarının araştırılması önem arz etmektedir.

Çalışmamızda, MM106 anacında istatistiksel olarak çok önemli bir fark görülmemesine rağmen M9 anacında 1 aylık süreçte 1 mM SNP ve 2 mM CaSiO_3 dozlarında hem *SOS1* hemde *NHX1* genlerinin ifadesi azalarak tuzsuz kontrole yaklaşmıştır. 4 aylık süreç sonunda M9 anacında hem *SOS1* geninin hem de *NHX1* geninin ifadesi 2 mM CaSiO_3 dozu hariç tüm dozlardan artarak bitkinin tuza toleransını artırmıştır. MM106 anacında ise *SOS1* geninin ifadesinde bir değişiklik gözlenmezken *NHX1* geninin ifadesini sadece 4 mM'lık SNP dozu ve diğer CaSiO_3 'ün 3 dozunda azaltmıştır. Hem M9 hem MM106 anaçlarında 1 ve 4 aylık stres uygulaması ve tedavi sonucunda gen ifadeleri birbirine genelde paralellik göstermesine rağmen, 4 aydan sonra CaSiO_3 'ün en yüksek dozunun (2 mM) her iki genin her iki kontrolden de ifadesini oldukça düşürmüştür. Bu da bu dozun bitki için toksik etki yapmış olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tuz stresi, Elma Fidanı, *MdSOS1*, *MdNHX1*, SNP, CaSiO_3

ABSTRACT

MS

THE EFFECT OF SNP AND CaSiO₃ APPLICATION ON THE EXPRESSION OF MDSOS1 AND MDNHX1 GENES IN APPLE SEEDLINGS UNDER SALT STRESS

Merve KILIÇ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY

Advisor: Prof.Dr.Emine ARSLAN

2017, ... Pages

Jury

Prof.Dr.Emine ARSLAN

Prof.Dr.Tuna UYSAL

Prof.Dr.Muhittin DİNÇ

Salt stress is one of the important stress factors limiting crop yield and quality, especially affecting the growth of plants in arid and semi-arid regions. Increased salt concentration as a result of reduced water potential in the soil lowers the osmotic potential of plant cells. By applying various chemical substances, plants can be able to toss salt to a certain extent. It is important to investigate the effects of SNP and CaSiO₃ on fruit trees under stress conditions.

In this study, although there was no statistically significant difference in MM106, there was a decrease in the expression of both *SOS1* and *NHX1* genes at 1 mM SNP and 2 mM CaSiO₃ doses in the M9 seedlings for 1 month. At the end of 4 months, the expression of both the *SOS1* gene and the *NHX1* gene in the M9 seedlings increased from all doses except 2 mM CaSiO₃ doses, increasing the salt tolerance of the plant. In the MM106 seedlings, there was no change in the expression of the *SOS1* gene, the expression of the *NHX1* gene was reduced only by of 4 doses mM SNP and 3 doses CaSiO₃. Although the gene expression in both M9 and MM106 seedlings was generally parallel to 1 and 4 months of stress and treatment results, the highest dose of CaSiO₃ (2 mM) after 4 months significantly reduced expression of both genes in both controls. This suggests that this dose may have been toxic to the plant.

Keywords: Salt stress, Apple Seedling, MdsOS1, MdNHX1, SNP, CaSiO₃

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Prof.Dr. Emine ARSLAN'a, bitkimizin yetiştirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Arş.Gör. Servet ARAS'a, istatistiki verilerin değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Doç.Dr. Haluk ÖZPARLAK'a;

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarından dolayı Arş.Gör.Dr. Elif GÜLBAHÇE MUTLU'ya, çok değerli arkadaşlarım Dr. Aevan ASHRAF KHORSHED'e, İlkyaz YILMAZ'a, Yakup ELARSLAN'a ve Fulden GÜLTEKİN'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Son olarak, hayatım boyunca her zaman beni destekleyen, maddi manevi yanımda olan ve asla yalnız bırakmayan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım annem Leman KILIÇ ve canım babam Yusuf KILIÇ'a bana duydukları güven ve gösterdikleri fedakarlıklar için sonsuz teşekkür ediyorum. Çalışmamı aileme ithaf ediyorum.

Ayrıca 17201034 nolu proje ile yüksek lisans tezime maddi destek sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Merve KILIÇ
KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Fuji Elma Çeşidi (<i>Malus communis</i>)	3
2.2. Toprak Tuzluluğu	4
2.3. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkisi	5
2.3.1. Tuz stresinin algılanması	7
2.4. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Geliştirdikleri Uyum Mekanizmaları.....	8
2.5. Stres Koşullarında Bitkilerin Verdiği Cevaplar	9
2.5.1. İyon homeostasisının düzenlenmesi ve SOS (Salt Overly Sensitive: Aşırı Tuz Hassasiyeti) sinyal iletim yolu	10
2.5.2. Düzenleyici osmolitlerin biyosentezi.....	12
2.6. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumu	17
2.6.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$):.....	17
2.6.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2):	18
2.6.3. Hidroksil radikali (OH^{\bullet}):	18
2.7. Antioksidan Sistemler	18
2.7.1. Enzimatik antioksidanlar	19
2.7.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	21
2.8. Tuz Stresi Süresince İndüklenen Sinyal İletim Yolları	22
2.9. Tuz Stresi İle İndüklenen Genlerin Fonksiyonu	23
2.9.1. Efektör moleküller	23
2.9.2. Regülatör moleküller	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Araştırmada Kullanılacak Anaç ve Elma Çeşitleri	27
3.1.2. Kimyasal maddeler	27
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Yapraftan RNA izolasyonu	28
3.2.2. mRNA örneklerinden gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR = RT-PZR) yöntemi ile cDNA sentezi	31
3.2.3. Elde edilen cDNA'lar ile <i>MDH</i> , <i>SOS1</i> ve <i>NHX1</i> genlerinin PZR ile optimizasyonu	32
3.2.4. <i>MDH</i> , <i>SOS1</i> ve <i>NHX1</i> genlerinin RT-PZR ile ifadesi	33
3.2.5. İstatistiksel analiz	35

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
5.1. Sonuçlar	46
5.2. Öneriler	46
KAYNAKLAR	48
EKLER	58
ÖZGEÇMİŞ	60



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABA	: absisik asit
AOT	: aktif oksijen türleri
APX	: askorbat peroksidaz
bç	: baz çifti
CaSiO ₃	: kalsiyum silikat
CAT	: katalaz
CAX1	: vaküolar katyon\proton deęiřtirici
e ⁻	: elektron
EtBr	: etidyum bromür
GB	: glisin betain
GR	: glutatyon redüktaz
GSH	: glutatyon
GSSG	: okside glutatyon
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
HKT1	: yüksek afiniteli K ⁺ taşıyıcısı
Hsp	: ısı şoku proteinleri
LEA	: geç embriyogenez proteinleri
mM	: mili molar
MDA	: malondialdehit
MDH	: malat dehidrojenaz
µl	: mikrolitre
NaCl	: sodyum klorür
NHX	: vaküolar Na ⁺ /H ⁺ taşıyıcısı
NO	: nitrik oksit
O ₂ ⁻	: süper oksit radikali
OH	: hidroksil radikali
POX	: peroksidaz
P5CS	: Δ1-pirrolin karboksilat sentetaz
P5CR	: Δ1-pirrolin karboksilat redüktaz
ROS	: reaktif oksijen türleri
RT-PZR	: gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SNP	: sodyum nitropurissit
SOD	: süperoksit dismutaz
SOS1	: plazma membranı Na ⁺ /H ⁺ antiporter taşıyıcısı
SOS2	: serin\treonin protein kinaz
SOS3	: kalsiyum sensörü
SOS4	: kök gelişiminde yavaşlama
SOS5	: anormal kök gelişimi
TF	: transkripsiyon faktörleri

1. GİRİŞ

Canlılar doğaları gereği dış ortam ile sürekli ilişki halindedirler. Bitkiler çevre şartlarının elverişsiz olması durumunda stres koşullarına maruz kalırlar ve stres etmenlerinin oluşturduğu zarar bitkinin çevreye genetik adaptasyon derecesine bağlı olarak değişiklik gösterirler. Stres, bitkilerde önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına, hatta bitkinin veya organlarının ölümüne yol açabilmektedir (Kadioğlu, 1999). Stres kavramının; bitkilerin hayatta kalabilmesi, özümleme, biyokütle birikimi, ürün verebilmesi ile ilişkili olarak açıklanması gerekmektedir. Bitkilerde nadir olarak tek başlarına etki eden stres faktörleri etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, kimyasal maddeler, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerinin azalmasına, normal fonksiyonlarının değişmesine ve bitki ölümüne yol açabilecek zararlara neden olmaktadır (Lichtenthaler, 1996; Gong ve ark., 2005; Mahajan ve Tuteja, 2005). Stres kavramı, bitkilerin uygunsuz ortam koşulları ile başa çıkma yeteneği yani stres toleransı kavramı ile yakından ilişkilidir (Taiz ve ark., 2008).

Yeryüzünde karaların bulunduğu 14 milyar hektarlık alanın % 10'luk kısmında bitkisel üretim yapılmaktadır. Dünyadaki toplam toprakların % 7'si tuzluluktan etkilenirken, Türkiye'de 1.5 milyon ha alanda tuzluluk sorunu baş göstermektedir (Sönmez, 2008). Tuzdan etkilenmiş bu toprakların % 60'ı tuzlu, % 19.6'sı orta derecede tuzlu, % 0.4'ü orta derecede alkali, % 12'si hafif tuzlu-alkali, % 8'i ise orta derecede tuzlu-alkali olarak sınıflandırılmaktadır (TEPE ve ark., 2008). Bilinçsiz sulama ve çoraklık sebebiyle bu alanlar artmaya devam etmektedir. Artan tuzluluk sebebiyle sürdürülebilir tarım yapılabilen toprakların 25 yıl içerisinde % 30'unun, 21. yüzyılın ortalarında ise % 50'sinin tahribata uğrayabileceği bildirilmektedir (Munns, 2002; Bonilla ve ark., 2004; Ahmadi ve ark., 2009).

Tuzluluk; yıkanarak yeraltı suyuna karışan çözünebilir tuzların, yüksek taban suyuyla birlikte kapilarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve toprak yüzeyinde birikmesidir. Tuz stresi; kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir (Kuşvuran, 2010; Nawaz ve ark., 2010; BAYAT ve ark., 2014). Ekilebilir alanlarda abiyotik stres kaynaklı kayıplar, artan talep

ile paralellik göstermekte ve ürün kalitesi ile birim alandan elde edilen verimi önemli ölçüde etkilemektedir (Golldack ve ark., 2011). Tuzluluk, bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve verimini sınırlayan en önemli stres faktörüdür ve her yıl giderek büyüyen toprak tuzluluğu sonucunda oluşan verim kayıpları, ülkemiz için ciddi anlamda dikkate alınması ve üzerinde çalışılması gereken öncelikli konulardan birisidir (Allakhverdiev ve ark., 2000).

Bu tez çalışmasında tuz stresine maruz bırakılmış elma fidanlarında (M9 ve MM106 anaç fideleri kullanılmıştır) daha önce meyve ağaçlarında hiç denenmemiş sodyum nitropurussit (SNP) ve kalsiyum silikat (CaSiO_3)'in 3'er dozları ile muamele edilerek tuz stresinde plazma membranı Na^+H^+ antiporter taşıyıcısı (*MdSOS1*) ve vaküolar Na^+H^+ taşıyıcısı (*MdNHX1*) genlerinin ifadelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Çözünebilir tuzlar, bitkinin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan miktarlardan daha fazla olduğunda çeşitli sorunlar ortaya çıkmaya başlar. Toprakta tuz konsantrasyonu arttıkça bitkinin su alımı zorlaşmaktadır. Kullanılabilir su potansiyelini azaltan tuzluluk (0.5-1.0 bar) bitki hücrelerinin ozmotik potansiyeli düşürür, bitki hücrelerinin bölünmesi ya da uzaması birden yavaşlayarak bitki strese girer ve bu şartlar ortadan kalkmayıp devam etmesi halinde gelişim tamamen durabilir (Ashraf, 1994).

Bitkiler yüksek tuz konsantrasyonuna gösterdikleri toleransa göre halofitler ve glikofitler şeklinde ikiye ayrılırlar. Halofitler tuzlu topraklarda doğal olarak yetişebilen ve yaşam döngülerini bu çevrede tamamlayabilen bitkilerdir. Halofitlerin büyük bir çoğunluğu, topraktaki tuz oranının % 2-6 olduğu alanlarda gelişmesini tamamlayabilir ve hatta bazıları % 20 tuz oranına bile dayanabilirler (Strogonov, 1964). Glikofitler, tuzsuz topraklarda başarı ile gelişebilen ve tuzlu alanlarda yaşamlarını sürdüremeyen bitkilerdir. Bu bitkiler topraktaki tuz oranının % 0.01 oranından yüksek olduğu topraklarda, ya çok sınırlı bir gelişim gösterirler ya da ölürlük. Glikofit bitkiler, bünyelerine tuz alımını sınırlandırır ve prolin, glisinbetain, çözünür şekerler gibi uyumlu çözünenlerin senteziyle ozmotik basınçlarını ayarlarlar (Greenway ve Munns, 1980).

Bitkiler, yaşam şartlarına adapte olabilmek ve hayatta kalabilmek için hücresel mekanizmalarını çevresel faktörlere göre değiştirmişler ve savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Homeostasi, ozmotik homeostasi, iyon homeostasi (temel tuz stresi), stres hasar kontrolü ve tamiri (detoksifikasyon) ve büyümenin kontrol altına alınması olarak üç grupta incelenmektedir (Kaur ve ark., 2016).

2.1.Fuji Elma Çeşidi (*Malus communis*)

Ülkemizde gerçekleştirilen tarım yetiştiriciliğinde bitkisel üretimde en önemli pay meyvelere (% 70) aittir. Yaklaşık olarak senelik 218,388 ton olan organik meyve ve sebze üretimi içerisinde, 52,670 tonluk üretim miktarı ile % 24.12'lik bir paya sahip olan elma birinci sırada gelmektedir (Anonymous, 2006).

Elmalar, Rosales takımının, Rosaceae familyasından *Malus* cinsine aittir. Asya kıtasının önemli bir kısmının, elmanın bazı türlerine gen merkezi olması ve buralarda çeşitli tür, alt tür ve formlarının bulunması, elma yetiştiriciliğinin bu kıtada

yayılmasında etkili olmuştur (Özçağırın ve ark., 2004). Anadolu; birçok meyve türünün anavatanı ve meyveciliğin beşiği olması sebebiyle yetiştiriciliği binlerce yıldır yapılan elmanın da doğal yayılım alanıdır (Özbek, 1978). Kuzey Anadolu, Karadenizin kıyı bölgeleri ile İç Anadolu ve Doğu Anadolu'daki yaylaların geçit bölgeleri ve son yıllarda güneyde Göller bölgesi elmanın önemli yetiştiricilik alanlarını oluşturmaktadır (Anonim, 2001).

Meyve yetiştiriciliğinde anaç, son derece önemli olup bitkiyi toprağa bağlama özelliğinin yanında üzerindeki bitkinin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığını, su stresi, besin elementi eksikliği, uygun olmayan toprak koşullarından kaynaklanan stres vb. gibi koşullara uyum ve dayanıklılığına yön veren önemli bitkisel bir parametredir (Hartman, 1990; Barritt ve ark., 1995). Ülkemizde klon anaçları ile ilgili verim denemelerinde bazı standart elma çeşitlerinde en yüksek verim M9 ve MM106 anaçlarından elde edilmiş ve bu anaçlar ülkemiz için de önerilmiştir (Burak ve ark., 1997; Pamir ve Öz, 1997).

2.2. Toprak Tuzluluğu

Toprak, yaşamın temel besin kaynağı ve bitkisel üretimin vazgeçilmez bir parçasıdır. Çöllerde bitkilerin, suyun ve dolayısıyla diğer canlı yaşamının sınırlı kalması, o alanlarda toprak denilebilecek materyalin çok yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır. Toprak içeriğinde; karbonat, sülfat, klorür, nitrat ve borat gibi bitkilerin büyümesi ve gelişmesi üzerine farklı derecelerde etkili olan tuz tipleri bulunmaktadır. En yaygın rastlanılanı sodyum klorürdür (NaCl) ve çözünürlüğü fazla olduğu için toksik etkisi en fazla olan tuz tipidir (Somun, 2010).

Tuzluluk Derecesi	Alan (hektar)	Toplam (%)
Hafif Tuzlu	614617	41
Tuzlu	504603	33
Alkali	8641	0.5
Hafif Tuzlu Alkali	125863	8.0
Tuzlu Alkali	264958	17.5
Toplam	1518722	100

Çizelge 2.1. Türkiye'de bulunan toprakların tuzluluk oranı (Anonim, 2001)

Tuzlu topraklarda yetişebilecek bitki deseninin bilinmesi, ideal arazi kullanımı ve tarımsal planlamalar için gereklidir. Türkiye'de sulamaya uygun 12.5 milyon

hektarlık arazinin yaklaşık olarak 1.5 milyon hektarında tuzluluk ve alkalilik, 2.8 milyon hektarında ise drenaj sorunu vardır. Bu rakamlar, ülkemizde halen sulanan ve gelecekte sulu tarıma açılacak arazilerin yaklaşık 1/3'ünde tuzluluk ve alkalilik sorunları olduğunu göstermektedir (Almaca ve ark., 1999).

Tuzlar; bitkilerin vejetasyon süresince, evaporasyon ve transpirasyondan kalan kalıntılar olarak bitki bünyesinde birikebilmektedir. Tuzlar, yaprak ve diğer kısımların ölüp yere düşmelerinden sonra yağışlarla birlikte toprağa tekrar geri dönebilmektedir. Tuzluluk, topraktan oluşan evaporasyonun yıl boyunca toprağa süzülen yağış miktarından daha fazla olduğu kurak bölgelerde büyük oranda artış göstermektedir. Çözünen tuzlar, bitkiler üzerinde beslenme ve metabolizmayı bozarak toksik etki yaparlar. Ayrıca toprakta tuzluluğun artmasıyla birlikte, bitkinin su alımı zorlaşmakta, toprağın yapısının dejenere olmasıyla bitki gelişimi yavaşlamakta, hatta durmaktadır birim alandan elde edilen verim miktarı da azalmaktadır. (Köşkeröğlu, 2006).

Bitkisel üretimde stres; bitkinin yetiştiği ortamda çeşitli etkenlerin, büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilemesiyle, sonuçta verim düşüklüğü yaşanan bir dizi gerilemeye neden olmaktadır. Tuz birikimi, doğal bir süreç olarak ortaya çıkmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda ürün verimliliğini ve biyoçeşitliliği ciddi şekilde etkiler (Munns, 2005).

2.3.Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkisi

Yüksek miktarlardaki tuzluluk, dünyanın birçok bölgesinde bitkilerin doğal ortamlarında yayılmasını sınırlandırır ve şiddetle artan tarımsal bir sorun oluşturmaktadır. Tuzun bitkilerin büyümesi üzerindeki zararları etkileri genel olarak iki şekildedir. Birincisi kökleşme ortamının osmotik potansiyelinin azaltılması ve ikinci olarak özel iyon toksitesidir (Zhou ve ark., 2007). Bitkilerde tuzun en basit etkisi, topraktaki sudan bitkinin faydalanamamasının yanında bitkilerin besin alımının azalmasıdır. Bitkilerin suyu yeteri kadar kullanamamasının sebebi osmotik potansiyelin artması ya da ortamda aşırı miktarlarda bulunan Na^+ ve Cl^- 'un neden olduğu toksik etkiden dolayıdır. Tuzlu ortamlarda yetiştirilen bitkilerin iyon dengesinin bozulmasına paralel olarak mineral madde miktarlarında da önemli sayılabilecek oranlarda değişimler olmaktadır. Tuz stresinden etkilenmeyen ya da göreceli olarak daha az etkilenen bitkilerin dokularında Na^+ ve Cl^- iyonları az, prolin miktarı ise daha fazladır. Ayrıca toprakta tuz konsantrasyonunun artmasıyla, bitkinin topraktan su alımı

güçleşmekte, toprağın yapısı bozularak bitki gelişimi yavaşlamakta, hatta durmaktadır (Kanber, 1992). Toprak içerisinde yeterli miktarda su bulunmasına rağmen bitki kökleri yüksek osmotik basınç nedeniyle topraktaki mevcut suyu alamazlar ve bitkiler solmaya başlar. Bu durum genellikle yüksek toprak tuzluluğunun yarattığı fizyolojik kuraklık durumundan kaynaklanmaktadır (Ayyıldız, 1990).

Tuzlar bitki büyümesine üç şekilde etki ederler;

1. Fiziksel Etki; osmotik basıncın yükselmesi sonucu bitkinin su ve besin alımı yavaşlar veya tamamıyla durur. Bitkinin su alımı zorlaşır. Buna osmotik basıncın etkisi de denmektedir.

2. Kimyasal Etki; bir kısım tuzlar, bitki besin maddelerinin alımını zorlaştırıp, metabolizmayı bozarak bitkinin büyümesine zarar verirler. Buna özel iyonların toksisitesi de denir.

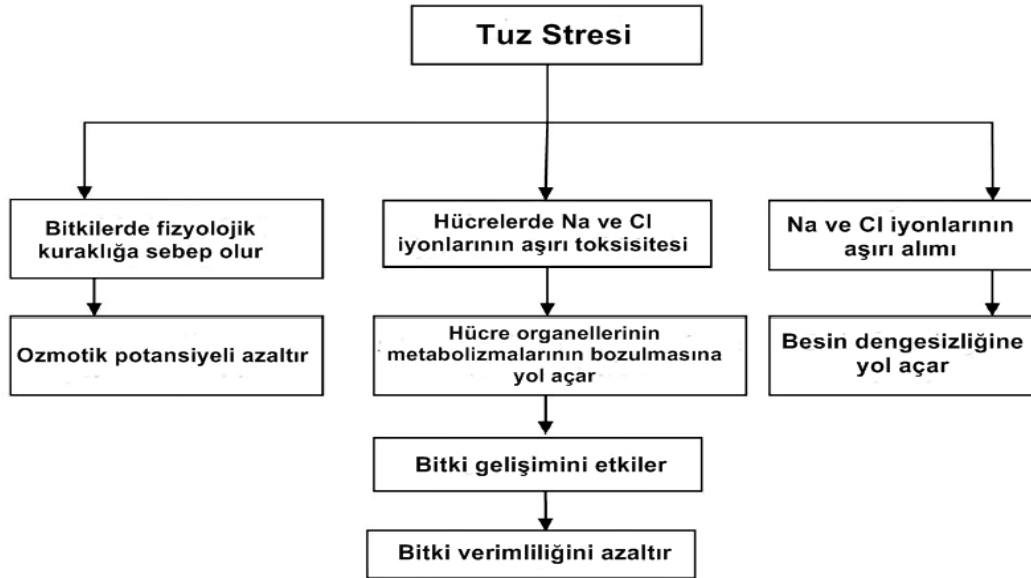
3. Dolaylı Etkiler; tuzluluğun toprakta meydana getirdiği değişiklikler, metabolik enerjinin su alımı için kullanılması ve verimin azalması gibi bitki gelişimine de etki eder.

Bu etkilerin hepsi, bitkilerin büyüme ve gelişiminde biyokimyasal (Levitt, 1980; Munns, 2002), fizyolojik ve moleküler seviyede (Mansour, 2000; Tester ve Davenport, 2003) negatif pleiotropik (tek bir genin birden fazla karakterden sorumlu olması) etkilere neden olmaktadır. Kök rizosferinde tuz miktarının artması ve kullanılabilir su miktarının azalması ile birlikte ilk olarak osmotik stres oluşmaktadır (Tuteja, 2007). İyon stresi evresi osmotik stresin devamında ortaya çıkar, ortamda artan Na ve Cl iyonlarının K⁺, Ca²⁺ ve NO₃⁻ gibi önemli besin elementleri ile rekabet içerisine girmesiyle bitkilerde, NO₃⁻ gibi besin elementlerinin alımı azalarak besin eksikliği veya besin dengesizliği meydana gelir (Kirkby ve Knight, 1977; Gunes ve ark., 1994; Inal ve ark., 1995; Hasegawa ve ark., 2000; Hu ve Schmidhalter, 2005). Na⁺'un hücreler arasında birikmesi metabolizma için toksik etki gösterir ve bu birikme sayesinde duyarlı bitkiler için gelişme inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır (Mengel, 2001).

Tuz stresi, bodurlaşmaya ve bitki büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Bu stresin artması ile yapraklar küçülmekte, tomurcuklanma gecikmekte, sürgün boyu kısalmakta ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca yaprak kenarlarında,

köklerde ve sürgünlerde nekrozlar oluşur, yapraklar sararır ve sürgün uçlarında kurumalar oluşmaktadır. Bitkilerde hormonal denge, toprak tuzluluk tarafından etkilenen önemli bir faktördür. Düşük seviyelerdeki sitokin ve aratan miktarlardaki absisik asit ile etilen, olgunlaşmanın erken başlamasında etkili olmaktadır. Tuz stresi, bitkilerde ölüme sebebiyet vermekte, tuz konsantrasyonu ve bitkinin direncine göre büyümeyi engellemekte, yaprak yanıklığı gibi nekrozlara, döllenme bozukluklarına, klorozlara, meyvelerin küçük kalmasına, kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Özcan, 2001).

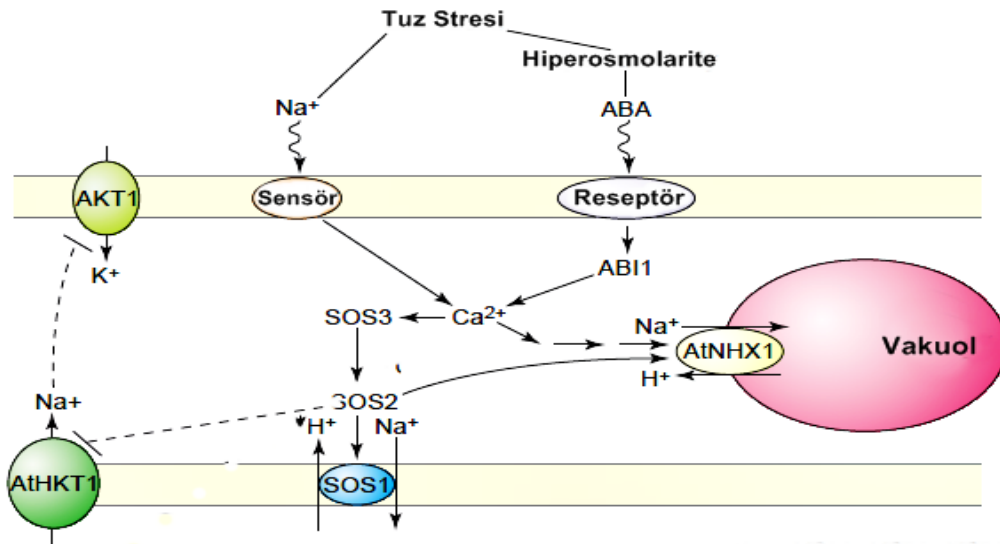
Bitki tarafından alınan fazla tuzun hücre fonksiyonlarını etkileyerek, hücre ve organel zarlarında meydana gelen bozulmalar nedeniyle fotosentez, solunum vb. işlevlerin sekteye uğraması tuzun zararlı etkisinin başka bir sonucudur (Leopold ve Willing, 1984).



Şekil 2.1. Tuz stresinin bitkiler üzerine etkileri (Evelin ve ark., 2009)

2.3.1. Tuz stresinin algılanması

Bitki hücreleri hem tuz stresinin hiperozmolaritesini hem de iyona özgü sinyalleri algılayabilirler. İyon spesifik sinyalleri Na taşınımının düzenlenmesinde hiperozmolariteden daha muhtemel olsa da, ozmotik strese de rol oynar (Şekil 2.).



Şekil 2.2. Tuz stresi altında düşük bir sitoplazmik Na konsantrasyonunu korumak için iyon taşıyıcılarının ifadelerini ve aktivitelerini düzenleyen sinyal yolları gösterilmektedir

Osmotik stres, vakuoler Na/H taşıyıcısı (*NHX1*)'in transkripsiyonunu upregüle edebilen abisik asit (ABA) sentezini aktive eder (Shi ve Zhu, 2002). Osmotik stres kısmen gergin şekilde aktive olan kanallar ve iki komponentli histidin kinazlar (Urao ve ark., 1999) ve duvarla ilişkili kinazlar (Kohorn ve Kohorn, 2012) gibi transmembran protein kinazlar tarafından hissedilebilir. Hücre içi Na, bir membran reseptörü tarafından algılanabilirken, intraselüler Na, ya membran proteinleri ya da sitoplazmadaki Na'a duyarlı enzimlerin herhangi biri tarafından algılanabilir. Plazma membranı Na/H antiporter taşıyıcıları (*SOS1*) olası bir Na sensörüdür (Shi ve ark., 2000). Na akışı için gerekli Na/H eşanjörü aktivitesine sahip olan *SOS1* proteininin 10-12 transmembran alanı vardır ve sitoplazmada yer alması beklenen uzun bir kuyruğa sahiptir (Shi ve ark., 2000; Qiu ve ark., 2002; Quintero ve ark., 2002). *SOS1*'in olağandışı uzun sitoplazmik kuyruğu, sadece Na'un taşınması için gerekli olmadığını, aynı zamanda bu iyonu algılayabileceğini de düşündürmektedir. Örneğin, *Escherichia coli*'deki şeker permeaz BglF, b-glukozidleri algılama ve taşıma yönünden ikili bir role sahiptir (Chen ve ark., 1997). Maya amonyum taşıyıcı Mep2p, amonyak algılamada işlev görür ve hücrelere naklederek ipliksi büyümeyi düzenleyen besleyici sinyaller başlatır (Marini ve ark., 1997; Lorenz ve Heitman, 1998). Dolayısıyla, *SOS1*'in hem bir taşıyıcı hem de Na algılayıcı olabileceği akla uygundur.

2.4. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Geliştirdikleri Uyum Mekanizmaları

Bitkiler tuz stresine karşı çeşitli mekanizmalar ile tepki vermektedirler.

Na pompaları (dışa verme)

Bitkiler yüksek tuzlulukla karşı karşıya kaldıklarında köklerde bulunan Na pompaları ile tolere edilemeyen Na'u ortama geri vererek hücre içi Na seviyesini dengede tutmaya çalışmaktadırlar (Schubert ve Läuchli, 1990).

Vakuollerde biriktirme

İyon dengesini bozan stres koşullarında, tuzun tolere edilemediğinde, Na iyonları vakuollerde biriktirilerek bitkiye vereceği zarardan ve tuz toksisitesinden korunması sağlanmış olacaktır (Munns, 2002).

Hücre zarı geçirgenliği

Tuza duyarlılığı az olan bitkiler stresten kaçınmak için Na ve K iyonlarının geçişlerinin engelleyerek tuzları ya hiç içeriye almamakta yada enerji kullanarak dışarıya pompalamaktadır.

Sitoplazma ve organellerde çeşitli çözünebilir madde birikimi ve bu maddelerin enzim ve membran bütünlüğü üzerindeki pozitif etkisi, strese maruz kalan bitkilerde ozmotik dengeyi sağlamaktadır (Ashraf ve Foolad, 2007).

2.5. Stres Koşullarında Bitkilerin Verdiği Cevaplar

Yüksek tuz miktarı, yüksek ya da düşük pH, hava kirliliği ve ağır metaller gibi faktörlerin seviyeleri olması gereken sınır değerlerden uzaklaştıkça abiyotik strese neden olmaktadır. Bitkiler, tuzun etkilerinden kaçınmasına rağmen geliştirdikleri tolerans mekanizmaları ile tuzlu habitatlarda yetişebilirler (Çulha ve Çakırlar, 2011). Stresi tolere edebilme yeteneği düşük *Arabidopsis thaliana* (model organizma) bitkisi kullanılarak yapılan araştırmalardan (Boscai ve ark., 2008) elde edilen veriler sonucunda bitkilerde stres koşullarına karşı oluşan moleküler cevap mekanizmaları; iyon homeostasisının düzenlenmesi ve SOS sinyal iletim yolu, düzenleyici osmolitlerin sentezi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve antioksidan sistemleri olmak üzere üç grupta toplanmıştır.

2.5.1. İyon homeostasisının düzenlenmesi ve SOS (Salt Overly Sensitive: Aşırı Tuz Hassasiyeti) sinyal iletim yolu

Tuzluluğun bitkiler üzerindeki zararlı etkileri hem ozmotik strese neden olan bir su eksikliği hem de aşırı sodyum iyonlarının kritik biyokimyasal süreçler üzerindeki etkisinin bir sonucudur (Wyn Jones, 1981).

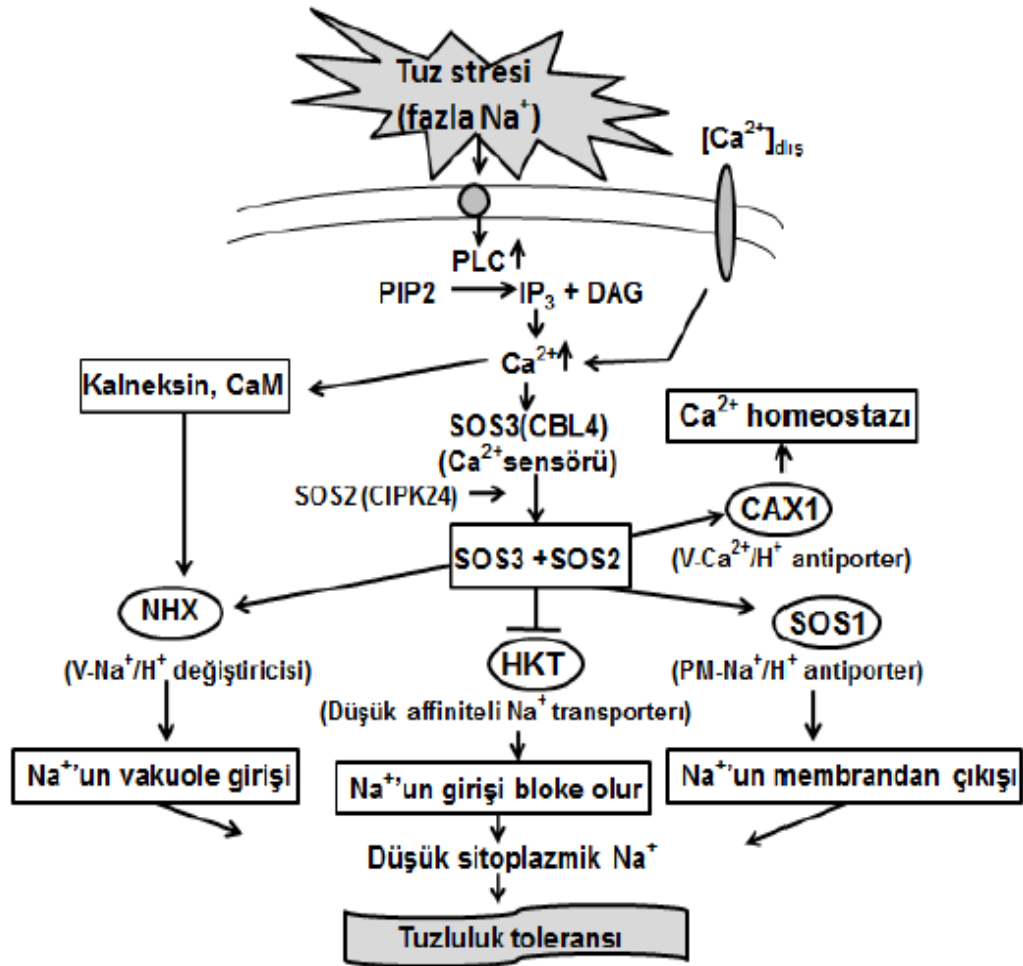
Bitkilerin, tuzlu ortamlarda yaşamaya devam edebilmesi; düşük K^+/Na^+ oranına sahip ortamlarda sitozolik K^+/Na^+ oranını koruyarak, sitoplazmada bulunan Na^+ iyonunun miktarını toksik düzeye ulaşmasını engelleyerek ve turgor basıncının devamlılığı için yeterli miktardaki su girişini korumasıyla sağlanır (Reinhold ve Guy, 2002).

İster glikofit ister halofit olsun bitkiler büyümede meydana gelen azalışı veya hücre ölümlerini engellemek amacıyla fazla miktardaki Na iyonunu vakuolde bölümlere ayırırlar (Zhu, 2003; Parida ve Das, 2005). Vakuoldeki Na^+/H^+ antiporter aracılığıyla Na^+ 'un vakuole taşınım mekanizması ile bu iyonun sitoplazmada meydana getireceği zararların engellenmesi ve vakuolde Na^+ birikimi ile osmotik dengenin korunarak hücreye su girmesi sağlanmış olur (Apse ve ark., 1999).

$NaCl$ sebebiyle meydana gelen tuzluluk, hücrelerde Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} ve K^+ gibi iyonların sabit hallerinin bozulmasına neden olur. Hücre zarında yer alan çeşitli taşıyıcılar ile hücre dışında artan Na^+ 'ların hücreye alınımı gerçekleşir. Na^+ ile K^+ 'un yarıçap yakınlığı, K^+ taşıyıcılarının bu iyonlar arasında ayırım yapmasını zorlaştırarak, Na^+ ve K^+ 'un rekabete girmesine neden olur (Aharon ve ark., 2003). K^+ 'a karşı yüksek, Na^+ 'a karşı ise düşük ilgi gösteren içe yöneltici K^+ kanalları (KIRCs) (AKT1 gibi), dışa yöneltici K^+ kanalları (KORCs) ve K^+/H^+ simport taşıyıcıları, hücre dışında Na^+ miktarının fazla olmasıyla Na^+ 'un hücre zarından sitoplazmaya geçişini sağlarlar (Rus ve ark., 2001; Çulha ve Çakırlar, 2011). Na^+/H^+ antiportunun plazma zarında (*SOS1*) ve tonoplastta (*NHX1*) bu çıkışa aracılık ettiği fizyolojik ve biyokimyasal veriler sonucunda belirlenmiştir (Niu ve ark., 1995). Bu proteinin, hücresel pH'yı ve Na^+ homeostasisını sağlanmada önemli bir rolü vardır (Shi ve Zhu, 2002).

Fazla $NaCl$ 'ün sitozolde Ca 'un artışı tetikler ve önemli fonksiyonlara sahip olan Ca , tuz tolere eden sinyal iletim yollarını uyarmaktadır (Tuteja, 2007). Tuz varlığı ile artan sitozolik Ca miktarı, *SOS3* (kalsiyum sensörü) tarafından algılanır ve *SOS* yolağını başlatır. *SOS3*, kalsiyum varlığında bir serin/treonin protein kinaz olan *SOS2* ile etkileşerek *SOS2*'yi aktifleştirir (Halfter ve ark., 2000; Liu ve ark., 2000). *SOS2*-

SOS3 protein kinaz kompleksinin, membran Na^+/H^+ antiportu olan *SOS1*'i aktive etmesiyle fazla Na^+ 'u hücre dışına atılır (Shi ve ark., 2002). *SOS2-SOS3* kompleksi, yüksek afiniteli K^+ taşıyıcı (*HKT1*) geninin ifadesini azaltarak veya *HKT1* proteinini inaktif hale getirerek Na^+ 'un hücreye girişini engeller (Zhu, 2002). *SOS2*'nin, *NHX1* ile etkileşime girmesiyle, *NHX1* aktif hale gelir ve aşırı Na^+ 'un vakuolde birikimini sağlayarak iyon homeostasisına ilave katkı sağlamış olur (Mahajan ve ark.; 2008). *SOS2* aynı zamanda bir $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$ antiportu olan vaküolar katyon/proton değiştirici (*CAX1*) ile de etkileşerek *CAX1*'in aktivitesini düzenler ve Ca homeostasisının korunmasını sağlar (Pittman ve ark., 2004).



Şekil 2.3. Tuzluluk stresi toleransı ile ilişkili yollar ve *SOS* tarafından iyon (örn; Na^+ , K^+ ve Ca^{+2}) homeostasisının düzenlenmesi (Tuteja, 2007)

Tuz stresi ile *SOS1* transkriptlerinin ifadesi artarken, ABA ve soğuk stresi *SOS1* transkriptlerinin azalışına neden olmaktadır. Bitki organları incelendiğinde ise, *SOS1*

mRNA'sı kökte daha fazla bulunmuştur. *SOS1*'in ifadesinin artmasına *SOS2-SOS3* yolağının aracılık ettiği *SOS2* ve *SOS3* genlerine ait mutasyon içeren bitki analizleriyle kanıtlanmıştır. *SOS1*'in, *SOS3* mutant bitkilerinde kökte ve sürgünde tuzluluğa cevap olarak artmadığı, *SOS2* mutant bitkilerinde ise kökte artarken sürgünde artmadığı bildirilmiştir. Bu durumun *SOS1*'in regülasyonunda en azından bir bölümüne *SOS2-SOS3* yolağının aracılık ettiğini göstermektedir (Mahajan ve ark., 2008). *SOS2-SOS3* arasındaki etkileşim ise, aynı yolda 2 genin fonksiyonel olduğunu gösteren *SOS2-SOS3* çift mutant analizleri ile desteklenmiştir (Halfter ve ark., 2000). *SOS4* (kök gelişiminde yavaşlama) ve *SOS5* (anormal kök gelişimi) mutant bitkilerinin köklerinde yapılan analizlerle *SOS4*'ün tuz stresi koşullarında Na^+ ve K^+ iyon homeostasisinin düzenlenmesi ve *SOS5*'in ise büyümenin düzenlenmesinde rolü olduğu bildirilmiştir. *SOS* yolağı sadece *Arabidopsis*'te değil, diğer yüksek bitkilerde de yaygın olarak bulunmaktadır (Mahajan ve ark., 2008).

2.5.2. Düzenleyici osmolitlerin biyosentezi

Yüksek miktarda tuza maruz kalan bitkiler, ozmotik düzenlemelere aracılık eden ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif zararı azaltan (Hare ve ark., 1998) osmotik koruyucu bileşikler biriktirirler (Hussain ve ark., 2008). Osmolit olarak da adlandırılan düşük molekül ağırlığına sahip bu bileşenler bitki hücrelerini dehidrasyona karşı koruyan, hücre metabolizmasını için zararsız olan ve molar konsantrasyonlarda biriken nötral maddelerdir (Djilianov ve ark., 2005). Ozmotik koruyucular esas olarak polioller (Orthen ve ark., 1994; Bohnert ve ark., 1995), çözünebilir şekerler (Bohnert ve Jensen, 1996; Kerepesi ve Galiba, 2000) ve bazı azotlu bileşiklerdir (Kerepesi ve Galiba, 2000; Khatkar ve Kuhad, 2000; Singh ve ark., 2000; Wang ve Nii, 2000). Amino asitler, amidler, imino asitler, proteinler, poliaminler ve kuaterner amonyum bileşikleri tuz şartlarında biriken azot içeren bileşiklerdir. Bu bileşikler, tuzlu ortamlarda büyüeyebilen bitkilerde önemli görevleri olmalarına rağmen, ozmotik düzenlemeye olan katkıları türler, çeşitler ve hatta bir bitkinin farklı organları arasında bile farklılık göstermektedir (Ashraf, 1994) (Çizelge 2.2.).

Ürün Grubu	Spesifik Bileşik	Fonksiyonu
İyonlar	Sodyum, Klor	Ozmotik düzenleme, Potasyum çıkışı
Proteinler	Ozmotin, Süperoksit dismutaz/Katalaz	Patojeniz ilişkili proteinler, Ozmoprotektan, Radikal detoksifikasyonu
Amino asitler	Prolin, Ektoin	Ozmotik düzenleme, Ozmoprotektan
Şekerler	Glukoz, Fruktoz, Sükroz, Fruktanlar	Ozmotik düzenleme, Ozmoprotektan, Karbon kaynağı
Polioller	Mannitol, Pinitol	Karbon kaynağı, Ozmotik düzenleme, Ozmoprotektan, PSII'nin fotokimyasal etkinliği, Radikal temizleyici,
Poliaminler	Spermin, Spermidin,	İyon dengesi, Kromatin korunması
Kuaterner Aminler	Glisinbetain, β-Alanin betain, Dimetil-sülfonyopropionat, Kolin-o-sülfat, Trigonellin	Ozmoprotektan, Tilakoid ve plazma membran bütünlüğünün korunması
Pigmentler	Karotenoidler, antosiyaninler, betalainler	Fotoinhibisyona karşı koruma

Çizelge 2.2. Tuz stresine karşılık biriktirilen bileşikler ve bu bileşiklerin toleranstaki muhtemel fonksiyonları (Parida ve Das, 2005)

2.5.2.1.Karbohidratlar

Çözünabilir şekerler tuz stresine maruz kalan glükofit bitkilerde diğer organik ozmotiklere göre toplam ozmotik potansiyelin yaklaşık olarak yarısını oluşturmaktadır (Cram, 1973). Karbonhidratlardan sukroz ve glukoz osmotik düzenlemelerde görev alırken; fruktoz hem osmotik düzenlemelerde hem de osmotik korumada görevlidir (Parida ve Das, 2005). Trihalozlar bir disakarit şekerdir ve bitkilerde eser miktarda sentezlenip biriktirilirler, çevresel stres şartlarında osmotik koruyucu olarak biyolojik yapıların istikrarını sağlar (Djilianov ve ark., 2005). Tuz stresinde çözünabilir karbonhidratların birikimi artmakta ve CO₂ asimilasyon oranı azalmaktadır (Murakeözy ve ark., 2003).

2.5.2.2.Polioller

Tuzun tolere edilmesiyle ilişkili olarak biriken polioller (polihidrik alkoller), bitkilerde asiklik (lineer; örn., mannitol, gliserol, sorbitol) ve siklik (örn., ononitol ve pinitol) formları bulunmaktadır (Sun ve ark., 1999). Asiklik formdaki polioller gliserol, sorbitol, mannitol iken; siklik formda olanlar ononitol ve pinitol bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. Polioller, osmotik ayarlamalar ile osmotik basıncın korumasında görev alırlar ve inorganik iyonların neden olduğu ozmotik düzensizliklerin üstesinden gelebilmek için sitoplazmada birikmektedirler (Conde ve ark., 2007). Osmotik ayarlamalar ile, suyun sitoplazmada tutulmasını kolaylaştırır ve Na⁺'un vakuole veya apoplasta gönderilmesine yardımcı olurken (Bohnert ve ark., 1995) ; osmotik korumada ise; zarlar, protein kompleksleri ve enzimlerle ilişki kurarak bu hücrel yapıları aktif oksijen türlerine (AOT) karşı korurlar (Djilianov ve ark., 2005).

2.5.2.3. Amino asitler ve amidler

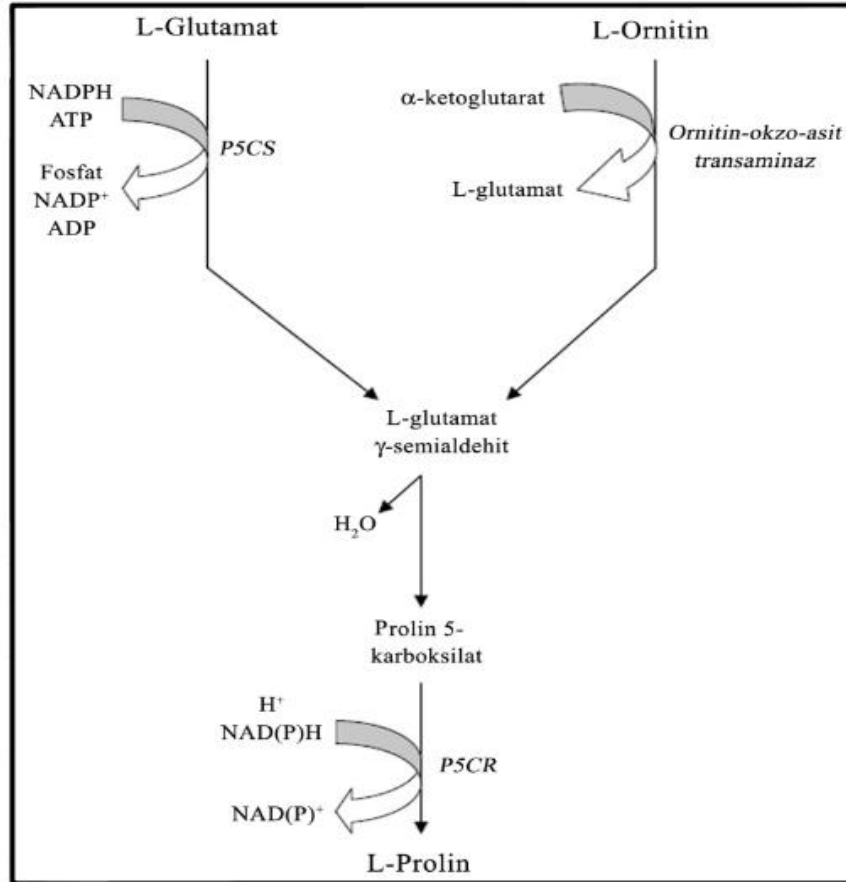
Tuz stresine maruz kalan bitkilerde amidlerin (glutamin ve asparajin) ve amino asitlerin (serin, glisin, alanin, arjinin, bir imino asit olan prolin ve sitrulin ve non-protein amino asitler ornitin) biriktiği görülmektedir (Mansour, 2000). Bitkilerde biriken en yaygın ozmolitlerden biri olan prolindir, glutamat veya ornitinden sentezlenmesine rağmen, yoğun olarak glutamattan sentezlenir ve stres koşullarında bitkilerde en fazla üretilen aminoasitlerdendir (Yıldız ve ark., 2010).

Prolin stres koşullarında altındaki bütün bitki türlerinde birikir. Prolinin sentezlenmesi için $\Delta 1$ -pirrolin karboksilat sentetaz (*P5CS*) geninin tüm dokularda hızlıca ifade olunması gerekir (Hong ve ark., 2000).

Osmotik olarak oldukça aktif olan prolinin sentezlenebilmesi için üç enzimatik yol vardır (Atienza ve ark., 2004; Ueda ve ark., 2004) (Şekil 2.4.):

- i) P5CS'ın $\Delta 1$ - γ -glutamil kinaz aktivitesi,
- ii) P5CS'ın glutamik- γ -semialdehit dehidrogenaz aktivitesi,

iii) $\Delta 1$ -pirrolin karboksilat redüktazın (P5CR) iki izogeni glutamatu prolin imino asidine dönüştürmesidir.

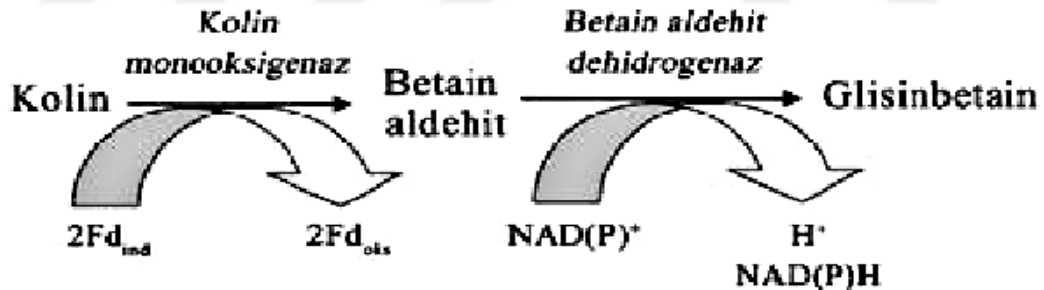


Şekil 2.4. Prolin biyosentez yolu. P5CS: $\Delta 1$ -pirrolin karboksilat sentetaz, P5CR: $\Delta 1$ -pirrolin karboksilat redüktaz (Delauney ve ark., 1993)

Proteinojenik bir amino asit olan prolin; membran kararlılığına katkıda bulunmakta ve NADP⁺ ihtiyacını iyileştirerek stres altındaki hücrelerde oluşan redoks potansiyeli değişimlerini iyileştirici etki yapmasının yanında (Hare ve ark., 1998; Mansour, 1998), radikal temizleyicisi, makromolekül stabilize edici ve hücre duvarı bileşeni olarak da işlev görmektedir (Matysik ve ark., 2002). Prolinin, proteinlerin yapısını stabilize eden moleküler şaperonlar olarak işlev gördüğü ve prolin birikiminin sitosolik pH'ı ve hücrenin redoks durumunu dengede tutabildiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, prolin birikimi stres cevabını etkileyen stres sinyalinin bir parçası olabilmektedir (Maggio ve ark., 2002).

2.5.2.4. Kuaterner amonyum bileşikleri

Glisin betain (GB) N atomları ile metillenmiş kuaterner amonyum bileşiklerinden olan betainlerin en bilinenidir. GB, kolinin oksidasyonu ile kolin monooksijenaz ve betain aldehit dehidrogeaz enzimleri aracılığıyla ve stres tolerans düzeyi ile orantılı bir şekilde sentezlenip birikir (Sakamoto ve Murata, 2002) (Şekil 2.5.). GB'ler kloroplast yapısının ve tilakoid membranların korunmasında önemli bir role sahiptir (Yokoi ve ark., 2002). Enzimlerin ve kompleks proteinlerin kuaterner yapılarını stabilize edip ve fizyolojik olmayan sıcaklıklarda ve tuz konsantrasyonlarında membran kararlılığının sürdürülmesi önemli görevleri arasındadır (Papageorgiou ve Murata, 1995). Dışsal betain uygulaması ile stres koruyucu proteinlerin sentezinin artması (Khedr ve ark., 2003) ve lipid zarlarının oksidasyonunun azalması (Demiral ve Türkan, 2004) sonucu tuza toleransın geliştiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, stres sonucunda GB birikmekte ve tuzu tolere edebilen mekanizmalarının stimülasyonuna katkıda bulunmaktadır (Demiral ve Türkan, 2006).



Şekil 2.5. Glisinbetain biyosentez yolu. Fdind : İndirgenmiş ferrodoksin, Fdoks: Okside ferrodoksin (Weretilnyk ve ark., 1989)

2.5.2.5. Poliaminler

Poliaminler iki ya da daha fazla amino grubu içeren polivalent bileşiklerdir (Mansour, 2000). Bitkilerde poliaminler ozmotik stres, mineral besin eksikliği, yüksek ve düşük sıcaklık stresi ve tuz stresi gibi abiyotik streslerde savunma mekanizmalarına sahiptir (Bouchereau ve ark., 1999; Kakkar ve ark., 2000; Sairam, 2004). Poliaminlerin

içeriğindeki değişimler tuz stresi koşullarında hem prolin birikimini teşvik edebilmekte hem de kontrol edebilmektedir (Larher ve ark., 1998). Artan prolin içeriği veya poliamin biyosentezi tuz stresine karşı koruyucu bir mekanizma ve tuza toleransla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kishor ve ark., 1995; Iqbal ve Ashraf, 2005).

2.6. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumu

Tuzluluk, bilhassa yüksek ışık yoğunluğunda veya diğer stres faktörleri bir arada bulunduğu vejetatif dokularda fotosentezi engellerken fotorespirasyonu artırır. Hücre dengesini bozan bu olay reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine sebep olmaktadır ve bitkilerde kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki krebs döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşan en yoğun serbest radikallerdir (Sairam, 2004; Van Breusegem ve Dat, 2006). ROS birikimi çevresel stresler sırasında bitkiye zarar verebileceği gibi önemli sinyal molekülleri olarak da görev almaktadırlar. Kloroplastlarda ve mitokondride elektron taşınımı esnasında elektronların oksijen ile reaksiyonu sonucunda süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet}) oluşurken, durağan oksijenin enerjisiyle etkinleşerek singlet oksijen gibi bir başka O_2 türevini sentezlemektedir (Apel ve Hirt, 2004). Sentezlenen oksijen türevleri lipitler, proteinler ve nükleik asitler üzerine etki ederek oksidatif hasara neden olmakta ve bunun sonucunda metabolizmada ciddi sorunlar oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1985; Davies, 1987).

2.6.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$):

Neredeyse tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron (e^-) alarak indirgenmesi $O_2^{\bullet-}$ radikali ile oluşur. $O_2^{\bullet-}$ radikali direkt olarak zararlı etkiye sahip olmamakla birlikte, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması nedeniyle dolaylı etkilere sahiptir ve lipid peroksidasyonuna, membran hasarına, hücrel toksisiteye ve DNA kırıklarına neden olabilmektedir. $O_2^{\bullet-}$ 'nin iki e^- alması veya $O_2^{\bullet-}$ 'in bir e^- alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesiyle hidrojen peroksit oluşur ve Haber-Weiss reaksiyonunda $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek hidroksil radikali üretilir (Acar, 1999; Kuşvuran, 2010). $O_2^{\bullet-}$,

süperoksit dismutazla (SOD) katalizlenen dismutasyon reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksit'e dönüştürülür.



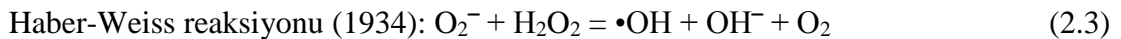
Haber-Weiss Reaksiyonu (Acar, 1999)

2.6.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂):

Süperoksitlerin katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmesi ile hidrojen peroksit meydana gelmektedir. H₂O₂, reaktif oksijen türleri içerisinde en duranıdır ve kuvvetli nükleofilik oksidanttır fakat gerçekte reaktif değildir. H₂O₂, S-H bağlarının oksidasyonu ile kelvin döngüsü enzimleri ve diğer enzimlerin indüklenmesinde görevli olmakla birlikte Fenton ile Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla yıkıcı hidroksil radikale dönüşür ve kloroplastlarda askorbat peroksidaz (APX), peroksizomlarda katalaz (CAT) ve ile ortamdan temizlenir (Kaiser, 1979).

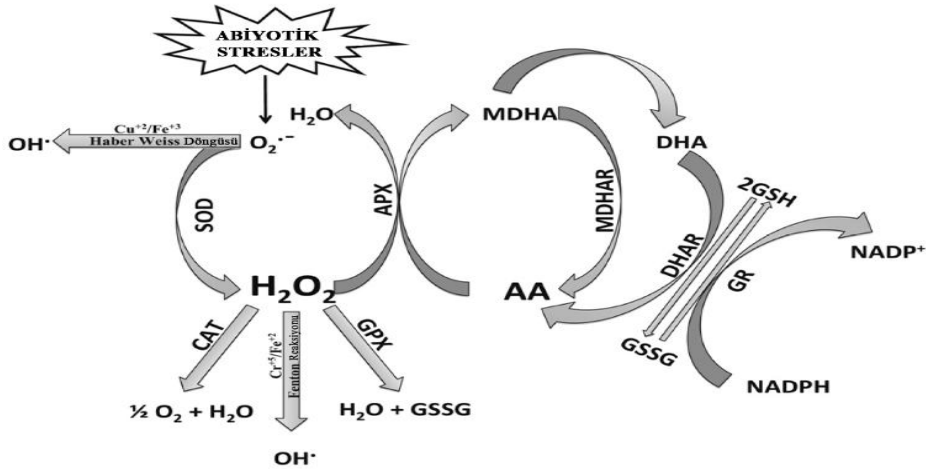
2.6.3. Hidroksil radikali (OH•):

Hidroksil radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu H₂O₂'ten oluşmaktadır ve hücrede bulunan en reaktif oksidanttır (Haber ve Weiss, 1934). OH•, mutajenik potansiyeli ve yüksek yıkıcı etkisiyle DNA mutasyonuna, aminoasitleri okside etmek suretiyle proteinlerin bozulmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Vaidyanathan ve ark., 2003).



2.7. Antioksidan Sistemler

Bitkiler, stres koşulları altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için ROS'un kontrolünü ve detoksifikasyonunu sağlamak amacıyla enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptir.



Şekil 2.6. ROS oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları (Gill ve Tuteja, 2010)

2.7.1. Enzimatik antioksidanlar

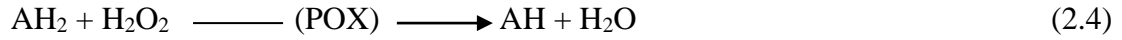
ROS düzenlenmesine dahil olan enzimler koruyucu enzimler olarak adlandırılmaktadır. Bitki hücresinde temel koruyucu enzimler süperoksit dismutaz, peroksidaz, katalaz, askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz'dır.

2.7.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Yüksek derecede reaktif olan süperoksit anyon radikallerini ($O_2^{\bullet-}$) katalizleyen süperoksit dismutaz enzimi, organizmalara O_2 'li ortamlarda hayatta kalma imkanı sunmaktadır. SOD'lar vasıtasıyla $O_2^{\bullet-}$ 'yi, H_2O_2 'e ve O_2 'e dönüştüren bu katalitik mekanizma metal iyonunun ardışık oksidasyon ve redüksiyonuna dayanmakla birlikte oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Oksijen toksisitesine karşı koruyucu etkileri ve doku hücrelerindeki $O_2^{\bullet-}$ düzeylerinin kontrol altında tutulması gibi görevlerinden dolayı SOD'lar büyük bir öneme sahiptir (Nordberg ve Arnér, 2001).

2.7.1.2. Peroksidaz (POX)

Peroksidaz, SOD'un $O_2^{\bullet-}$ radikallerini süpürmesiyle ortaya çıkan H_2O_2 'in kloroplastlarda süpürülmesinde rol oynayan enzimlerden biridir ve H_2O_2 'nin elektron yakalayıcısı olarak kullanılmasıyla substratı okside etmektedir. (Asada, 1999).



POX, bir heme (Fe-porfirin) grubu içeren glikoproteindir ve heme kısmındaki Fe iyonu katalitik hareket için yanıt vericidir. Bu reaksiyon;

- a) Hücre duvarında lignin ve süberin biyosentezleriyle sonuçlanan serbest fenollerin oksidatif polimerizasyonunu sağlar.
- b) Hücre duvarı bileşenlerine, fenollerin oksidatif polimerizasyonla bağlanmasını sağlar.

2.7.1.3. Askorbat peroksidaz (APX)

ROS'a karşı gerçekleştirilen savunmada önemli görevlere sahip olduğu düşünülen askorbat peroksidaz enzimi, askorbat-glutasyon döngüsünün ilk adımında askorbik asidi elektron vericisi olarak kullanarak H_2O_2 detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. tAPX, gmAPX, sAPX, cAPX gibi en az beş farklı izoformdan oluşan APX ailesinin, CAT ve POX'a kıyasla H_2O_2 'ye karşı daha yüksek bir afiniteye sahip olması APX'u stres şartlarında ROS'ların yıkımında en önemli enzim yapmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

2.7.1.4. Katalaz (CAT)

H_2O_2 , reaktif bir oksijen türüdür ve hücreler tarafından yağ asitlerinin peroksizomlarda β -oksidasyonu, pürin katabolizması, fotorespirasyon gibi normal aerobik reaksiyonlarda oluşturulmaktadır. Farklı konsantrasyon seviyelerinde mitojenik büyümeden hücre ölümüne kadar bir çok hücrel cevap mekanizmasında etkinlik gösterir. Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 , hücrelere zarar verir ve hücrelerde

birikimi protein, lipit ve DNA gibi hücresel hedeflerin oksidasyonuna yol açar. Bu durum ise mutasyonların oluşmasına ve/veya hücre ölümüne yol açar. Bu sebeple H₂O₂'nin hücreden uzaklaştırılması oksidatif hasardan korunmak için önemlidir ve bu görevde katalaz tarafından yürütülür. Katalaz, stres faktörlerine karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır ve patojenlerin öldürülmesinde savunma sistemi hücreleri tarafından üretilir.

Katalaz, H₂O₂'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen özel bir proteindir ve hidroperoksidaz olarak da isimlendirilir. CAT aynı zamanda, H₂O₂ seviyesinin kontrolünü sağlar ve hidrojen peroksitin bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Bu reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması aerobik ortamda yaşamayı kolaylaştırır.

2.7.1.5. Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonun (GSSG) glutatyona (GSH) redüksiyonunu katalizleyen bir enzimdir ve hücre içerisinde yoğun olarak kloroplastlarda, az miktarda da sitoplazma, mitokondri ve peroksizomlarda bulunmaktadır. GR, serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, amino asit taşınımında görev alır. İndirgenmiş hücresel GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlayan önemli bir enzimdir ve antioksidan olarak da görev yapmaktadır. (Edwards ve ark., 1990; Creissen ve ark., 1994).

2.7.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan savunma antioksidan maddeler olarak bilinen glutasyon, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E) ve flavonoidler, lignin, tanin gibi bileşikler tarafından yürütülür.

Düşük moleküler ağırlığa sahip, sistein içeren bir tripeptit olan glutasyon (γ -Glu-Cys-Gly) bitkilerde oksidatif strese karşı rolü olan en önemli metabolitlerden biridir. GSH en fazla kloroplastlarda bulunur, fakat önemli bir miktar sitozolde olmakla birlikte neredeyse bütün hücre kısımlarında buldukları gözlenmiştir (Jiménez ve ark., 1998; Rausch ve Wachter, 2005). GSH ikinci bir GSH molekülü ile sülfidril grubundan

bağlanarak bir disülfit bağı oluşturarak okside glutatyon (GSSG) meydana gelir ve lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkan açıl peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısının kararlılığına katkı sağlaması (Davies, 2000; Cicerali, 2004), ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, stresle ilişkili genlerin ifadeleri hücre farklılaşması, sülfat taşınımının düzenlenmesi, patojen direnci, enzimatik düzenleme ve hücre ölümü gibi birçok büyüme ve gelişme ile ilgili bir çok fizyolojik olayda merkezi bir role sahiptir (Khan ve Singh, 2008).

Askorbik asit bitki hücrelerdeki en güçlü, en bol, en kapsamlı çalışan moleküldür ve ROS'a bağlı olarak oluşan hasarın etkilerini en aza indirmede ve önlemede rol oynamaktadır (Foyer ve ark., 1995). Bitkilerde normal fizyolojik koşullar altında özellikle fotosentetik hücrelerde ve meristemlerde yüksek, yaprak ve kloroplastlarda düşük miktarlarda bulunur ve stres koşullarına maruz kalan bitki hücrelerinde konsantrasyonu artar. O₂- ve OH-'ın direkt temizlenmesinde rol oynayarak, oksidatif stresin indirgenmesinin yanında, ayrıca bitki metabolizmasının düzenlenmesi ve farklılaşma gibi farklı bir çok fizyolojik süreçler üzerinde önemli görevleri vardır (Foyer ve Noctor, 2003).

Tokoferoller (vitamin E) biyolojik membranlarda özellikle kloroplastların tilakoid membranlarında yoğun olarak bulunur ve membran stabilizasyonu sağlamada kritik öneme sahiptir. Bitkilerde bulunan dört izomeri arasında (α -, β -, γ - ve δ -) yer alan α tokoferoller en bilinenidir. ROS'ların süpürücüsü olarak görülmektedir ve moleküler yapılarında üç metil grubu bulunması nedeniyle yüksek antioksidatif aktiviteye sahiptir (Kamal-Eldin ve Appelqvist, 1996; Gang ve ark., 2007).

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunur ve genellikle glikozit olarak bitki vakuolünde birikirler. Yapılan çalışmalarda; bitki enfekte olduğunda, yaralandığında, düşük sıcaklık ve düşük besin koşulları gibi olumsuz koşullar karşısında feniloproponoid metabolizmasında ve fenolik bileşik miktarlarında artış meydana geldiği belirlenmiştir (Temple ve ark., 2005; Quan ve ark., 2008). Flavonoidler, ROS süpürücüsüdür ve bu radikallerin zararlarının ortadan kaldırılmasında görev alırlar (Løvdal ve ark., 2010).

2.8. Tuz Stresi Süresince İndüklenen Sinyal İletim Yolları

Bitkilerde abiyotik streslere karşı oluşturulan cevaplarda birden fazla sinyal iletim yolu işlev görmektedir ve çok sayıda bitki geninin ifadesini düzenlediği

bildirilmektedir. Bu genleri düzenleyen sinyal yollarının bir kısmının ABA tarafından kontrol edilmektedir. Diğer kısmı ise tuz stresi tarafından indüklenmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda; tuz stresi sonucunda indüklenen gen ifadelerinin, genel olarak ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız sinyal iletim yolu tarafından etkilendiği bildirilmiştir. (Cheong ve Yun, 2007).

Stresin algılanması sinyal iletimini başlatır ve sonrasında ikincil habercinin oluşumu (örn., inositol fosfat) başlatılarak, hücre içi Ca^{+2} düzeyi ayarlanır ve protein fosforilasyon aşamaları başlatılmaktadır. Stres düzenleyici genlerin kontrolünde yer alan transkripsiyon faktörleri ve hücrel korumayı içeren proteinler fosforilasyon aşamalarında hedef proteinleri oluşturmaktadır (Xiong ve ark., 2002). Sinyal iletimi ile stres koşullarına karşı oluşturulan cevaplarda yer alan genler iki tiptir:

- 1. Erken cevap genleri;** çok hızlı (dakikalar içinde) ve geçici olarak indüklenir. Tüm sinyal bileşenleri önceden mevcut olduğu için indüklemeye yeni protein sentezine gereksinim duymazlar.
- 2. Geç cevap genleri;** strese cevapta yer alan genlerin büyük bir çoğunluğunu oluştururlar. Strese karşı daha yavaş (saatler içinde) indüklenir ve ifadeleri çoğunlukla devamlıdır. Geç cevap genlerinin erken cevap genleri tarafından aktive edilmesiyle transkripsiyon faktörleri kodlanmaktadır (Sairam, 2004).

2.9. Tuz Stresi İle İndüklenen Genlerin Fonksiyonu

Stres şartlarında artan indüklenmiş genlerin ifadesi ve bu genlerin ürünleri olan moleküller görevlerine göre; çevresel streslere karşı koruyucu olarak (efektör) görev alan moleküller ve stres cevaplarında sinyal iletimi ile gen ifadelerini düzenleyici olarak görev alan (regülatör) moleküller olmak üzere iki grupta toplamaktadır (Seki ve ark., 2003; Wu ve ark., 2005).

2.9.1. Efektör moleküller

Normal şartlar altında birçok bitkinin tohumlarında, çeşitli stres koşulları altında vejetatif dokularda biriken geç embriyogenez (LEA) proteinleri ilk olarak tohum embriyolarında tanımlanmıştır ve stres savunmasında koruyucu etkilere sahip olduğu

bilinmektedir (Holmberg ve Bülow, 1998; Hundertmark ve Hinch, 2008). Stres koşullarında LEA genleri, hidrofilik LEA proteinlerini aktive eder. Hidrofilik LEA proteinleri suyu bağlama kapasiteleri sayesinde dehidrasyona karşı suyun tutulmasını sağlayarak su eksikliği etkilerini en aza indirmede ve hücrel bütünlüğün korunmasında önemli rol oynamaktadırlar (Sairam, 2004; Wise ve Tunnacliffe, 2004).

Akuaporin olarak da adlandırılan su kanal proteinleri, canlı bütün organizmalarda bulunan içsel zar proteinleridir ve hücrel düzeyde suyun çift lipid tabakasından geçişini kolaylaştırır, dokusal düzeyde ise hücre içine suyun iletiminde görevlidir (Maurel ve Chrispeels, 2001). Her ne kadar stresin çeşidine göre farklı akuaporinlerin verdikleri cevaplar farklı olabilsede genel olarak akuaporinler bitkilerde hücrel homeostazı ve su dengesini korumada rol almaktadır (Kaldenhoff ve ark., 2008).

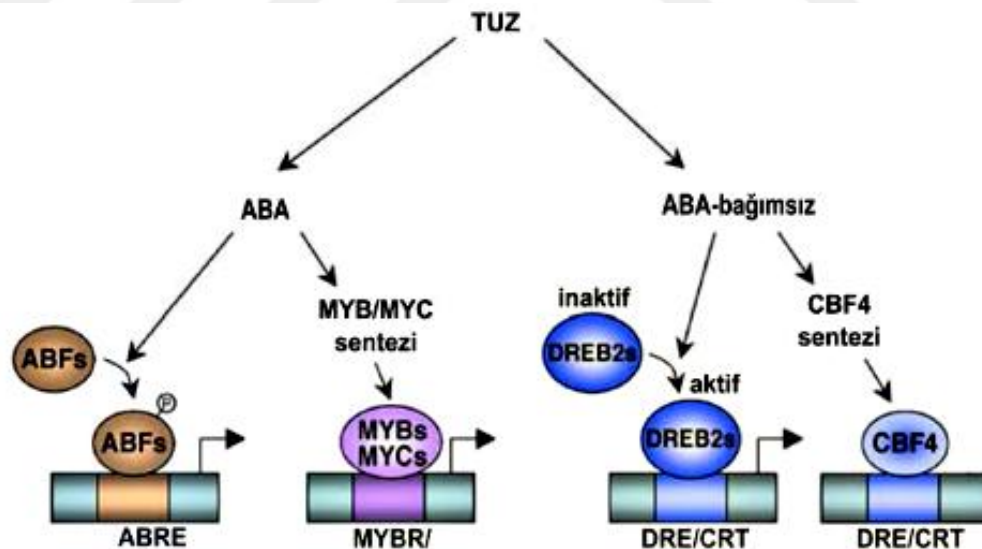
Isı şok proteinleri (Hsp'ler) abiyotik streslere maruz kalınması durumunda sentezi artan, moleküler şaperon gibi davranan yani proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesi işleminde yer alan koruyucu protein grubunu oluşturmaktadır (Gorovits ve Czosnek, 2008). Protein katlanması ve uygun olmayan proteinlerin hücrede birikiminin engellenmesi gibi birçok konuda etkin rol oynamalarının yanı sıra (Henle ve ark., 1998), hasarlanmış ve yanlış katlanmış polipeptitleri bağlama potansiyeline sahip olmaları sayesinde polipeptitlerin yıkımını önleyerek potansiyel olarak hücreyi strese karşı korumada rol oynarlar (Chiba ve ark., 2006).

2.9.2. Regülatör moleküller

Protein kinazlar, regülatör moleküllerin bir grubunu oluştururlar. Sinyal iletim yolunda ATP'yi fosfat vericisi olarak kullanarak protein fosforilasyonunda görev alırlar. Ca²⁺ bağlı protein kinazlar (CPDK'lar) ve MAP kinazlar (Mitojen aktive edilen protein kinazlar) sinyal yollarında etkin rol oynayan protein kinazlardır. Ökaryotik hücrelerde bulunan MAPK (mitogen activated protein kinase), (Bartels ve Sunkar, 2005), hiperozmotik stres ile aktif hale gelir ve ozmolitlerin sentezini aktive ederek ozmolit birikimine neden olabilir. Ozmolitlerin birikmesiyle LEA/dehidrin tip stres genleri indüklenerek tamir mekanizmasının oluşturulmasını sağlarlar ve ozmotik dengenin tekrar düzenlenebilmesi için hücreyi stres hasarından korumakta görev alırlar (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Fosfatazlar; protein kinazların aktivitesi fosfatazların modülasyonu ve fosforegülatör mekanizmanın dönüşümü sonucunda gelişme göstermektedir. Fosfatazları substratlarına göre, fosfotirozinler (protein/tirozin fosfotazlar veya PPTase) ve fosfoproteinler (serin/treonin) olmak üzere iki ana gruba ayırmak mümkündür (Cohen, 1989). Mayalarda MAPK yolağında tirozin spesifik fosfatazlar önemli rol oynarlar (Shiozaki ve Russell, 1995).

Transkripsiyon faktörleri (TF), çeşitli genlerin promotor bölgesinde yer alan sis elementlerle (aynı etkili elementler) bağlantı kurarak bu genlerin ifadesini düzenleyen önemli regülatör moleküllerdir. TF'yi kodlayan genler, stres koşullarında strese ilk cevap olarak ifade olunan genlerdir. (Agarwal ve ark., 2007). Çeşitli stres koşullarında aktivitesi artan bu genler ve sentezlenen transkripsiyon faktörleri, stresi indükleyen genlerin ifade olmasını sağlamaktadır (Hasegawa ve ark., 2000). Tuz ve kuraklık stresine bağlı olarak genlerin ifade olmasını sağlayan sinyal yolları ABA bağımlı ve ABA bağımsız olduğu için bu yollarda yer alan TF'lerde, ABA bağımlı ve ABA bağımsız transkripsiyon faktörleri olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Kurak ve tuz stres koşullarında ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda gen ifadesinin düzenlenmesi (Boudsocq ve Laurière, 2005)

Stres hormonu olarak da adlandırılan ABA, bitkilerde abiyotik strese cevapta içsel (endojen) mesajcı olarak görev yapar. ABA bağımlı yolda bulunan transkripsiyon faktörleri; MYB/MYC ve bZIP (basic leucine zipper), ABA bağımsız yolda bulunan

transkripsiyon faktörleri; DREB2'dir (Mahajan ve Tuteja, 2005). NAC transkripsiyon faktörleri ise hem ABA bağımlı hem de ABA bağımsız yolda bulunarak bitki gelişiminde, patojene karşı cevapta ve tuz toleransında rol oynayan çeşitli genlerin aktivasyonunda görev almaktadırlar (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmanın fidan dikimi, tuz ve kimyasal uygulamaları kısmı, 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait arazide gerçekleştirilmiştir. Moleküler çalışmalar ise Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada MM106 ve M9 elma klon anaçlarına aşılı Fuji çeşidi (*Malus communis*) kullanılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada Kullanılacak Anaç ve Elma Çeşitleri

M9 Anacı: İngiltere' de East Malling Enstitüsü'nde elde edilmiş tam bodur bir elma klon anacıdır. Düşük sıcaklıklara ve ağır bünyeli toprak şartlarına dayanıklıdır.

MM106 Anacı: Yarı bodur bir elma klon anacı olup standart çöğür anaçlarının % 50'si kadar gelişme göstermektedir.

Fuji Çeşidi: Ralls Jannet x Red Delicious melezi olup kuvvetli gelişen bir çeşittir. Kendine verimlidir. Meyveleri geç dönemde olgunlaşır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

RNA izolasyon kiti, cDNA izolasyon kiti ve Real-Time PZR kiti Vivantis Technologies (Vivantis, Malezya), primerler Biomers (Almanya), STZ sigma Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, 89552, Steinheim, Almanya) firmasından elde edilmiştir.

Metanol, etanol gibi kimyasal maddeler Merck (KgaA, 64271, Darmstadt, Almanya) marka kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Uygulamalar tesadüf parselleri deneme desenine göre 2 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 bitki olacak şekilde kurulmuş olup toplamda 84 elma fidanı kullanılmıştır. Fidanlar, torf, perlit ve toprak içeren 13 litrelik saksılara dikilmiştir. Fidan sürgünleri 10 cm boyuna geldiğinde (yaklaşık 1 ay sonra) 35 mM NaCl' lü sulama suyu ile sulanmıştır (1 ay sadece tuz uygulanmıştır). Fidanların bakım işlemleri ve zirai mücadelesi genel

yetiştiricilik prensiplerine göre yapılmıştır. Deneme boyunca ortam EC'si kontrol edilerek 3.0 mS/cm sınırını geçmemesi sağlanmıştır. SNP ve CaSiO_3 kimyasalları iki ayrı dönemde (1 aylık tuz stresinden sonra kimyasal uygulamalarına başlanıp, 1 ay ve 4 ay sonraki yaprak örnekleri alınmıştır) bitkilere topraktan verilerek uygulanmıştır ve bu dönemlerde tuz stresi uygulanması devam etmiştir. Deneme boyunca iki dönemde (kimyasalların uygulanmaya başlamadan bir gün önce ve deneme sonunda) yaprak örnekleri moleküler analizler yapılmak üzere alınmıştır. Buna göre deneme deseni aşağıdaki gibi olmuştur:

1. M9 Anacı (Tuzsuz kontrol grubu)
2. M9 Anacı (Tuzlu kontrol grubu)
3. M9 Anacı + SNP (1 mM)
4. M9 Anacı + SNP (2 mM)
5. M9 Anacı + SNP (4 mM)
6. M9 Anacı + CaSiO_3 (0.5 mM)
7. M9 Anacı + CaSiO_3 (1 mM)
8. M9 Anacı + CaSiO_3 (2 mM)
9. MM106 Anacı (Tuzsuz kontrol grubu)
10. MM106 Anacı (Tuzlu kontrol grubu)
11. MM106 Anacı + SNP (1 mM)
12. MM106 Anacı + SNP (2 mM)
13. MM106 Anacı + SNP (4 mM)
14. MM106 Anacı + CaSiO_3 (0.5 mM)
15. MM106 Anacı + CaSiO_3 (1 mM)
16. MM106 Anacı + CaSiO_3 (2 mM)

Her iki dönemde de uygulamalar sonucunda alınan yaprak örnekleri moleküler analizler için -80° 'de saklanmıştır.

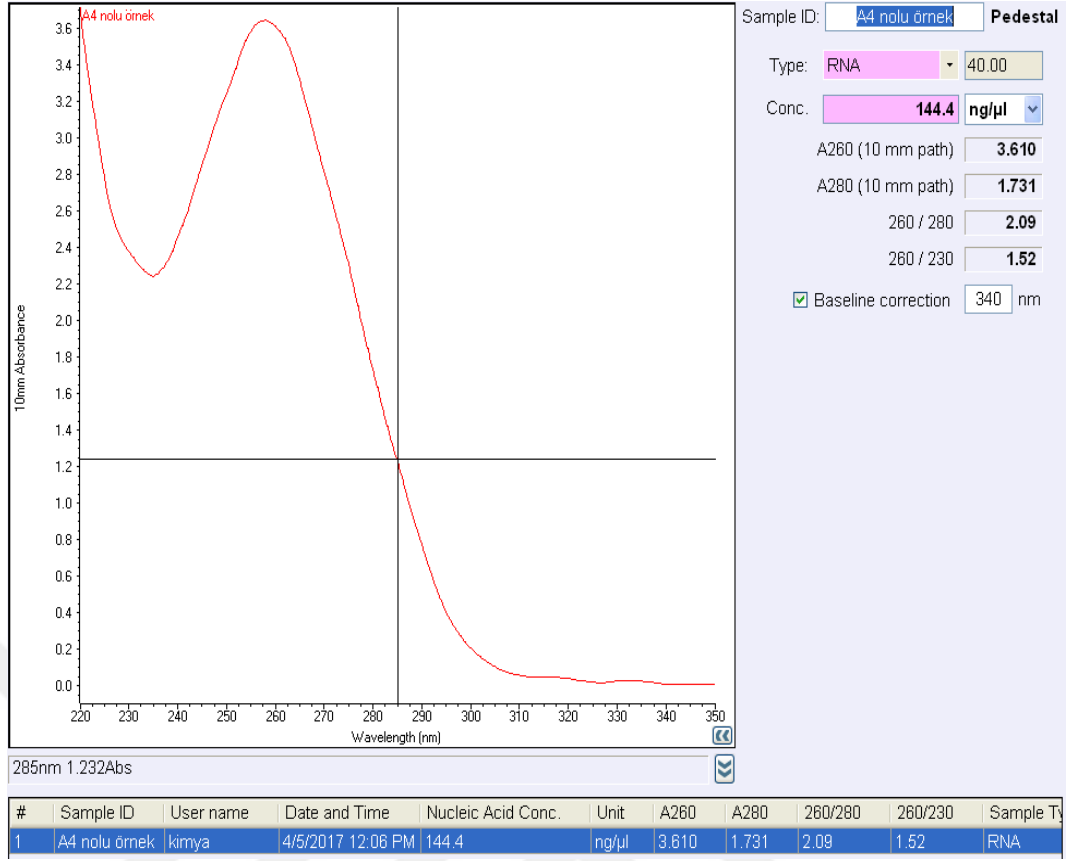
3.2.1. Yapraktan RNA izolasyonu

-80°C 'de saklanan yaprak örneklerinden *SOS1* ve *NHX1* genlerinin ifade analizlerinin yapılması için hazır ticari kit (GF-TR-100-Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) kullanılarak total RNA izole edilmiştir.

Yaprak örneklerinden 30 mg alınıp havan içerisinde sıvı azot ilavesi ile dondurularak ezilmiştir. Ezilen donmuş örneğin erimesine izin verilmeden ependorf tüp

içerisine aktarılarak üzerine 700 µl lizis buffer-TR (RNA izolasyon reaktifi) konulmuş ve mekanik parçalama gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından kitin kılavuzunda belirtildiği gibi 15000 × g'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant homojenizasyon kolonuna aktarılmıştır. Homojenizasyon kolonuna aktarılan süpernatant 15000 × g'de 2 dakika santrifüj edilerek diğer hücre kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Sonrasında süpernatant miktarı kadar % 70'lik etanol eklenerek hafifçe vortekslenmiştir. Bu şekilde hazırlanan ve içerisinde RNA bulunan çözelti, RNA bağlama kolonuna aktarılmıştır. Santrifüj ile kolonlardan geçirilen lizatın toplama tüpünde kalan kısımları dökülmüştür. Lizatın içerisinde bulunan ve kolondaki reçineye bağlanan RNA'yı daha saf elde edebilmek amacıyla kolon yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Bu işlemden sonra kolondaki reçineye 70 µl Dnaz parçalama karışımı ilave edilerek oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon ilave edilerek 15000 × g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından kolon yıkama solüsyonu ile en az 3 kez yıkanmıştır. En son kolondan Rnaz içermeyen su geçirilerek RNA saf olarak elde edilmiştir.

Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığını belirlemek için nanodrop (ND-2000, Thermo Scientific) kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Bu aşamada optik dansitelerinden hareketle (OD260/280) OD260/280 oranı 1.9 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.1. RNA saflığının belirlenmesi (A4 nolu örneğe ait saflık grafiği)

Çizelge 3.1. Çalışılan RNA'ların saflığı ve miktarı

GRUPLAR M9	OD 260/280	MİKTAR(ng/ml)	GRUPLAR MM106	OD 260/280	MİKTAR(ng/ml)
TUZLU KONTROL GRUBU					
A1	2.14	118.7	I1	2.06	62.4
A2	2.11	238.3	I2	2.06	106.2
A3	2.13	223.9	I3	2.09	144.0
A4	2.13	198.9	I4	2.10	119.1
A5	2.09	327.8	I5	2.06	220.8
A6	2.12	287.6	I6	2.02	231.5
TUZSUZ KONTROL GRUBU					
B1	2.13	192.1	J1	2.15	83.5
B2	2.07	79.6	J2	2.08	139.2
B3	2.13	45.2	J3	2.11	142.7
B4	2.08	340.2	J4	2.08	300.1
B5	2.13	148.2	J5	2.11	227.8
B6	2.11	314.4	J6	2.10	211.1
1mM SNP + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP					
C1	2.12	171.5	K1	2.09	116.5
C2	2.10	180.1	K2	2.10	161.4
C3	2.12	87.3	K3	2.08	156.1
C4	2.10	270.7	K4	2.08	175.0
C5	2.11	203.3	K5	2.14	274.6
C6	2.14	124.1	K6	2.11	158.2
2 mM SNP + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP					
D1	2.12	288.9	L1	2.11	72.8
D2	2.08	153.7	L2	2.10	244.6
D3	2.11	117.0	L3	2.07	160.8
D4	2.04	196.0	L4	2.09	327.4

D5	2.11	345.8	L5	2.09	301.5
D6	2.05	331.8	L6	2.12	187.9
4 mM SNP + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP					
E1	2.12	290.1	M1	2.11	159.4
E2	2.10	215.7	M2	2.08	187.5
E3	2.10	150.9	M3	2.13	162.3
E4	2.13	174.7	M4	2.22	212.9
E5	2.11	285.5	M5	2.07	146.9
E6	2.08	351.3	M6	2.09	211.3
0,5 mM CaSiO₃ + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP					
F1	2.11	338.8	N1	2.09	166.6
F2	2.10	145.0	N2	2.16	211.7
F3	2.11	130.5	N3	2.10	212.6
F4	2.13	285.8	N4	2.14	232.0
F5	2.10	383.7	N5	2.11	127.8
F6	2.14	242.4	N6	2.09	193.1
1 mM CaSiO₃ + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP					
G1	2.10	150.1	O1	2.11	229.3
G2	2.09	163.6	O2	2.10	234.6
G3	2.09	105.3	O3	2.14	252.4
G4	2.09	268.0	O4	2.15	181.2
G5	2.11	253.0	O5	2.04	136.9
G6	2.07	122.4	O6	2.04	315.0
2 mM CaSiO₃ + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP					
H1	2.12	260.8	P1	2.12	157.3
H2	2.10	181.8	P2	2.08	200.6
H3	2.10	205.0	P3	2.11	114.6
H4	2.09	226.3	P4	2.09	235.4
H5	2.10	265.2	P5	2.08	139.0
H6	2.12	201.3	P6	2.05	375.3

3.2.2. mRNA örneklerinden gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR = RT-PZR) yöntemi ile cDNA sentezi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için hazır ticari kit (Vivantis-RTPL12, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) kullanılmış ve her bir örnekten eşit miktarda 10 µl RNA kullanılarak protokolda belirtilen basamaklar sırası ile uygulanmıştır.

Öncelikle Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi RNA-primer karışımı hazırlanarak 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek denatüre edilmiştir.

Çizelge 3.2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan RNA-primer karışımı

Bileşim	Miktar
Total RNA	10 µl
Primer, Oligod(T) ₁₈	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl

Ardından çizelge 3.3.'de belirtildiği gibi cDNA sentez karışımı hazırlanmış ve her bir örnek için 10 µl bu karışımdan alınıp RNA-primer karışımı üzerine ilave

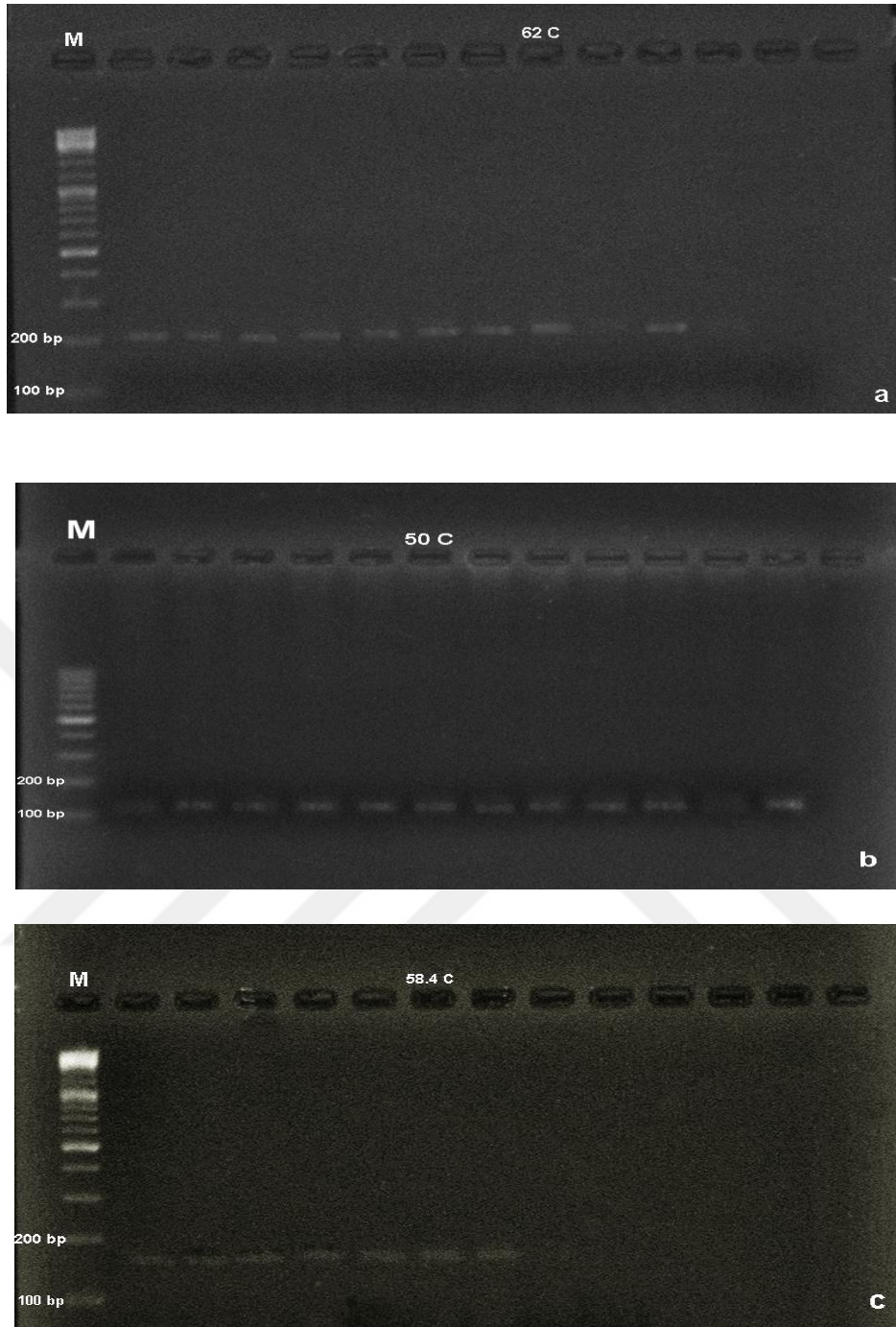
edilmiştir. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldıktan sonra Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile revers transkripsiyon programı çalıştırılmıştır. Bu program öncelikle 65°C’de 5 dakika primer bağlanması, 42°C’de 60 dakika cDNA sentezi, 85°C’de 5 dakika denatürasyon ve +4°C’de bekleme basamağını içermiştir. Elde edilen cDNA’lar RT-PZR yapılarına kadar -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.3. mRNA’dan cDNA elde etmek için uygulanan cDNA sentez karışımı

Bileşim	Miktar
10× Buffer M-MulV	2 µl
M-MulV reverse transkriptaz	0.5 µl
RNAse içermeyen su	10µl’ye tamamlanır.

3.2.3. Elde edilen cDNA’lar ile *MDH*, *SOS1* ve *NHX1* genlerinin PZR ile optimizasyonu

Çalışmamızdaki genlerin optimizasyonu için 10 µl’lik hazırlanan sentez karışımı ile belirlenen örneklerin gradiyenti yapılmıştır. Her bir cDNA örneğinden 1 µl alınmış ve üzerine sırasıyla 1 µl 10×Buffer, 1 µl 25 mM MgCl₂, 0.2 µl 25 mM dNTP, 0.3 µl 10 pmol’luk ileri ve geri primerler [malat dehidrojenaz (*MDH*), plazma membranı Na⁺/H⁺ antiporter taşıyıcısı (*SOS1*) ve vaküolar Na⁺/H⁺ taşıyıcısı (*NHX1*)], 0.2 µl taq polimeraz ve üzerine total hacim 10 µl olacak şekilde dH₂O koyulmuştur. Gradient koşulları ilk denatürasyon; 95°C’de 5 dk, 40 döngü, denatürasyon; 95°C’de 40 sn, bağlanma; *SOS1* geni için 62°C’de 40 sn, *NHX1* geni için 59°C’de 40 sn; uzatma; 72°C’de 40 sn; son uzantı 72°C’de 5 dk olacak şekilde Thermal Cycler PZR’da (Thermo Scientific) programlanmıştır. Elde edilen ürünler % 2’lik agaroz jelde yürütülerek primer için uygun sıcaklık belirlemesi yapılmıştır (Şekil 3.2.). Agaroz jel için 0.6 gr agaroz tartılıp, 30 mL TAE tamponu içinde çözülüp kaynatılmıştır. Üzerine 30 µl EtBr eklenerek hazırlanan jel elektroforez plateine dökülerek, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takılıp jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra PZR ürünleri kuyucuklara yüklenmiş ve çoğaltılan bölgenin büyüklüğünü tespit etmek için 100 bp’lik markır (VIVANTİS NL1401) kullanılarak 110 volta 20 dk yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında UV ışık altında PZR ürünleri incelenerek jelin görüntüsü UV Transillüminatör cihazı ile çekilerek bilgisayar ortamında kayda alınmıştır.



Şekil 3.2. Optimize edilmiş *MDH*, *SOS1* ve *NHX1* genlerine ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, M:Marker, a) *SOS1* geni, b) *MDH* geni, c) *NHX1* geni

3.2.4. *MDH*, *SOS1* ve *NHX1* genlerinin RT-PZR ile ifadesi

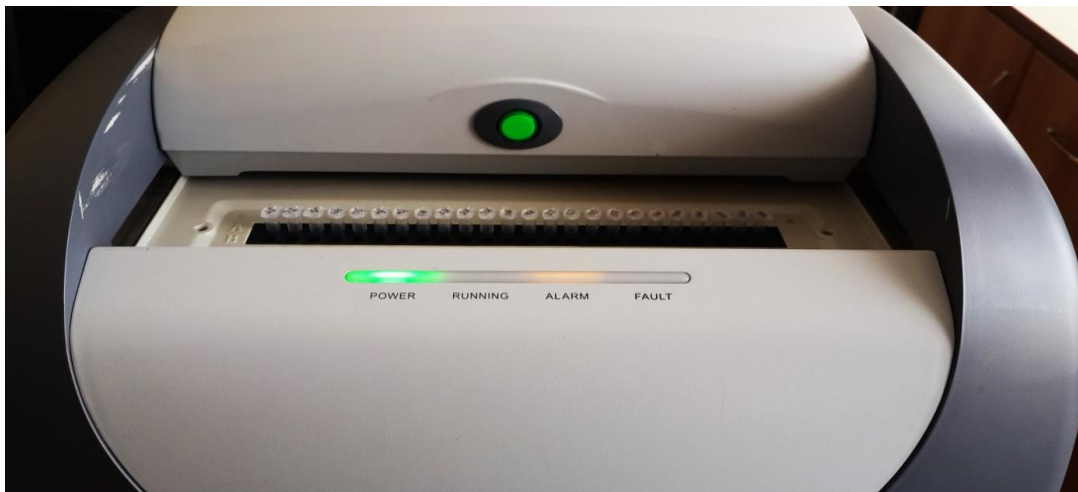
SOS1 ve *NHX1* genlere ait primer çiftleri (Liu ve ark., 2012)'nin makalesinden elde edilmiştir. *MDH* genine (housekeeping gene) ait primer çifti, NCBI Gen Bankası'ndaki *Malus hupensis* dizilerinden <http://www.idtdna.com> adresindeki online primer dizayn programı ile tasarlanmıştır (Çizelge 3.4.).

Cizelge 3.4. *MDH*, *SOSI* ve *NHXI* gen bölgeleri için kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri

Gen	Primer dizisi	Ürün büyüklüğü	Fonksiyonu	Referans
<i>MDH</i> geni ileri	5'- CGTGATTGGGTACTTGGAAC -3'	113 bp	Referans gen	Bu tezde tasarlandı
<i>MDH</i> geni geri	5'- TGGCAAGTGAAGTGGGAATGA -3'	113 bp	Referans gen	Bu tezde tasarlandı
<i>SOSI</i> geni ileri	5'-TCCGGTTAATCCATCACACACCGT-3'	~200 bp	Hedef gen	Liu ve ark. (2012)
<i>SOSI</i> geni geri	5'-TTTGCTGCCCTGGAGGATTTGTTG-3'	~200 bp	Hedef gen	Liu ve ark. (2012)
<i>NHXI</i> geni ileri	5'-AAGCGACAGTCCTGGAACATCAGT-3'	157 bp	Hedef gen	Liu ve ark. (2012)
<i>NHXI</i> geni geri	5'- TATTATCACTTGTCTGCCGGAGCT -3'	157 bp	Hedef gen	Liu ve ark. (2012)

RT-PZR reaksiyonları için hazır ticari kit Vivantis Maxima SYBR Green qPZR Master Mix (2×), kullanılmıştır. Reaksiyonlar toplamda 10 µl hacimde uygulanmıştır. Reaksiyon içeriği; 5 µl SYBR Green karışımı (enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 1 µl (100ng) cDNA, 0.2 µl ileri ve 0.2 µl geri primerler (10pmol/µl) ve 3.6 µl RNase içermeyen su şeklinde hazırlanmıştır.

RT-PZR şartları; ilk denatürasyon, 95°C'de 10 dakika, denatürasyon 95°C'de 20 saniye, *MDH* geni için bağlanma 52 °C'de 40 saniye, *SOSI* geni için bağlanma 62°C'de 40 saniye, *NHXI* geni için bağlanma 59°C'de 40 saniye ve polimerizasyon 72°C'de 10 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Döngü sayısı 40 olarak yapılmıştır. Tüm reaksiyonlar ESCO spectrum 48 (Esco Technologies, Inc., USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.3.)

**Şekil 3.3.** RT-PZR cihazı

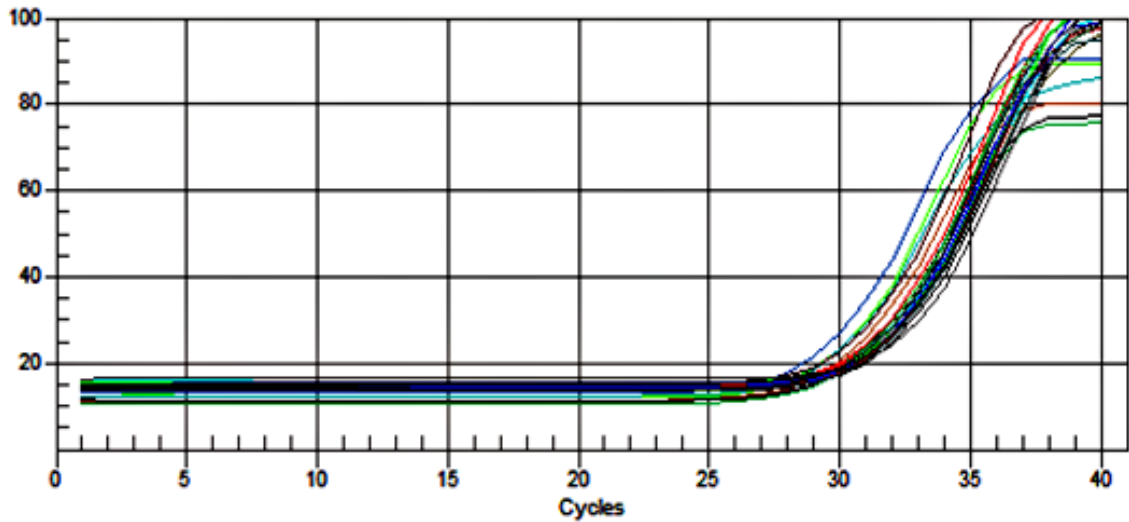
3.2.5. İstatiksel analiz

Gerçek zamanlı PZR sonuçları ile ortaya çıkan C_T değerlerine tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Gruplar arası farkın belirlenmesi için Duncan testinden faydalanılmıştır. İstatistiksel analizler uygulanırken paket program (SPSS 2004) kullanılmıştır.

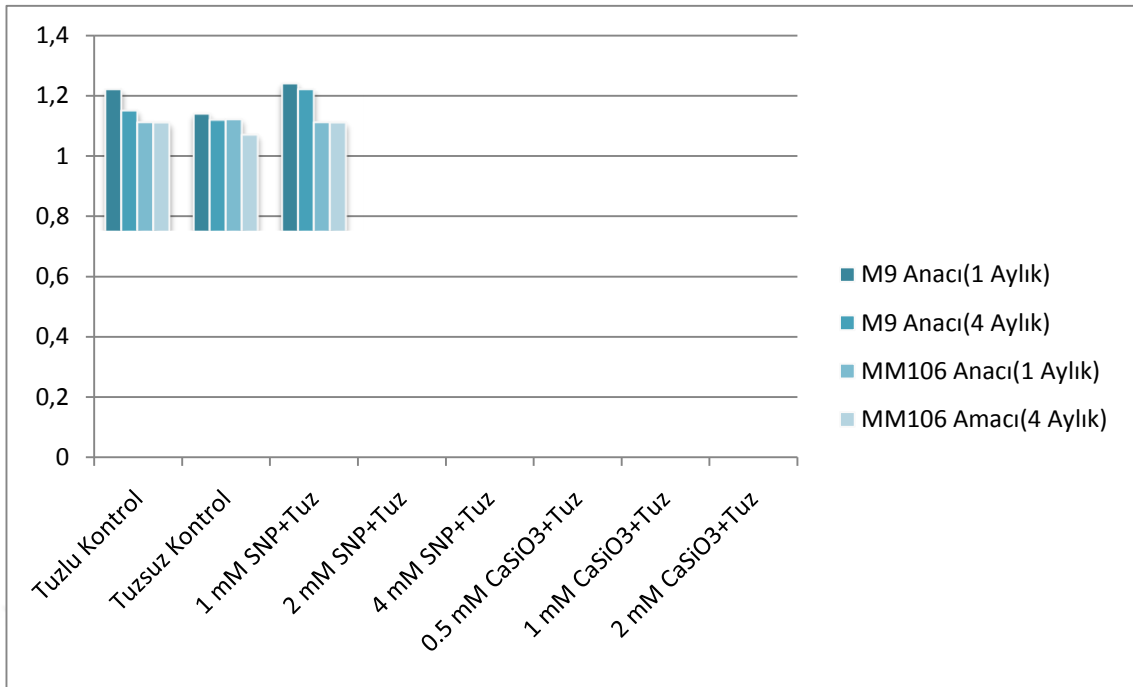


4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

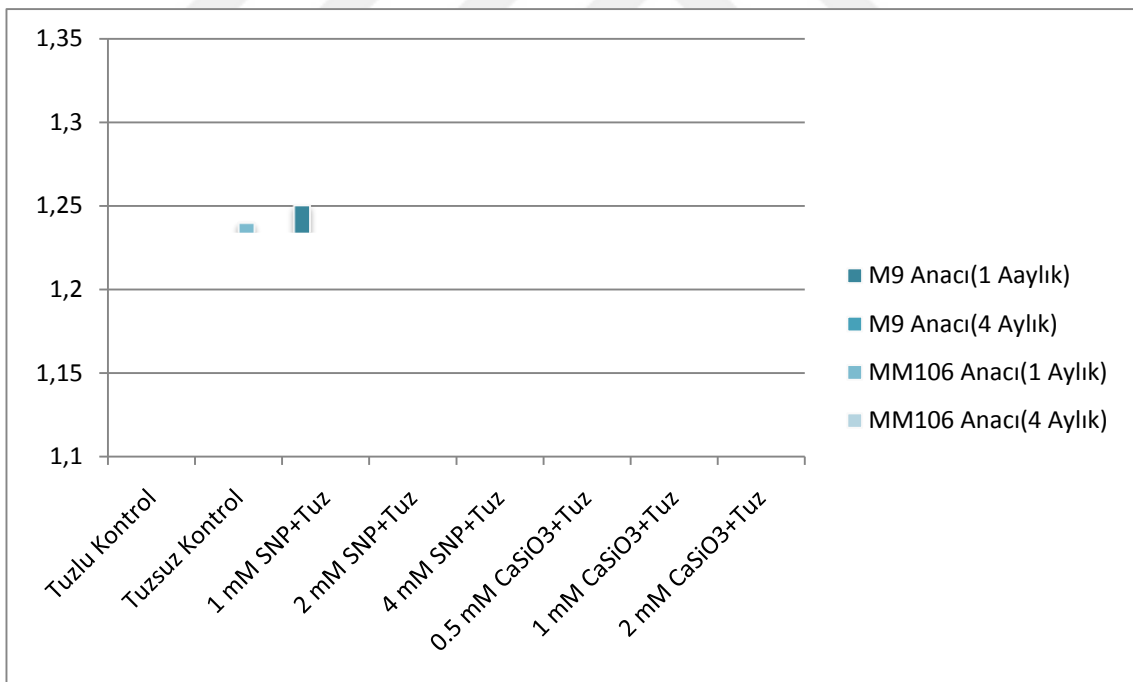
Total RNA izolasyonunun ardından oligo_(dT)18 primerler ve ters transkriptaz enzimi ile mRNA'ların cDNA'ya dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen cDNA'lar kullanılarak RT-PZR yöntemi ile *MdSOS1* ve *MdNHX1* genlerinin ifade düzeyleri iki primer çifti kullanılarak belirlenmiştir. Çalışılan örneklerin amplifikasyon eğrileri şekil 4.1'de gösterilmiştir. Verilerin normalizasyonu için referans gen olarak *MDH* geni (housekeeping gene=referans gen=ifadesi değişmeyen gen) kullanılmış ve *SOS1* ile *NHX1* genlerinin ifade düzeyleri *MDH* genine oranlanarak belirlenmiştir (şekil 4.2. ve şekil 4.3.). Ayrıca elde edilen C_T değerleri çizelge 4.1' de verilmiştir. RT-PZR sonuçlarına göre açığa çıkan C_T değerlerinin istatistiksel analizleri Duncan testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışılan örneklerin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.2. *SOS1* geninin C_T değerlerinin *MDH* geninin C_T değerlerine oranı



Şekil 4.3. *NHX1* geninin C_T değerlerinin *MDH* geninin C_T değerlerine oranı

Çizelge 4.1. Çalışılan örneklerin RT-PZR sonuçlarına göre C_T değerleri

GRUPLAR	ORTALAMA C _T DEĞERLERİ			GRUPLAR	ORTALAMA C _T DEĞERLERİ		
	MDH	SOSI	NHXI		MDH	SOSI	NHXI
M9				MM106			
TUZLU KONTROL GRUBU							
A1	17.98	21.94	21.62	I1	25.41	29.01	32.79
A2	18.85	23.54	22.48	I2	25.4	27.36	29.63
A3	18.36	22.04	21.38	I3	26.18	29.24	32
A4	18.8	23	22.77	I4	26.23	29.27	30.95
A5	19	23.91	25	I5	26.47	27.97	31.72
A6	28.72	29.84	31.29	I6	26.58	28.47	31.34
TUZSUZ KONTROL GRUBU							
B1	17.31	21.21	20.71	J1	25.43	28.76	32.59
B2	26.82	29.89	30.92	J2	24.49	27.79	30.2
B3	26.27	29.73	30.82	J3	24	27.01	29.22
B4	28.01	26.42	30.26	J4	26.86	28.23	31.4
B5	21.81	26.66	27.15	J5	26.78	28.14	30.78
B6	20	25.27	25.26	J6	25.11	28.13	31.38
1mM SNP + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP							
C1	17.57	21.62	21.38	K1	25.27	29.4	31.77
C2	17.81	22.56	22.16	K2	26.45	28.49	31.6
C3	23.94	29.48	31.16	K3	25.9	29.04	30.97
C4	18.69	23.3	23.1	K4	24.9	28.37	30.95
C5	18.4	22.47	22	K5	25.1	28.61	31.25
C6	18.19	22.2	22.03	K6	26.12	28.18	31.05
2 mM SNP + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP							
D1	17.4	21.1	21.57	L1	27	28.36	31.12
D2	18.37	23.31	23.79	L2	25.47	28.57	31.45
D3	19.66	23.38	23.61	L3	25.77	29.08	31.75
D4	17.56	24.45	25.52	L4	26.38	28.52	30.74
D5	18.56	23.3	23.27	L5	25.37	28.95	31.59
D6	18.27	22.61	22.2	L6	24.77	28.71	31.3
4 mM SNP + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP							
E1	17.5	21.32	21.32	M1	26.55	28.52	31.95
E2	18.12	22.48	21.72	M2	26.66	28.84	32.49
E3	15.53	22.49	21.34	M3	25.56	27	33.49
E4	18	23.43	22.38	M4	26.53	29	31.83
E5	18.6	21.77	22.98	M5	26.2	28.7	32.59
E6	18.77	23.78	23.75	M6	26.93	28.77	32.04
0,5 mM CaSiO₃ + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP							
F1	17.19	21	21.54	N1	26.19	27.74	32.26
F2	18.28	23.1	22.62	N2	26.7	28.55	31.87
F3	18.58	22.8	23.03	N3	26.22	27.62	32.22
F4	19.35	23.92	23.13	N4	26.65	28.17	32.21
F5	18.05	22.92	22.25	N5	26.83	27.81	31.28
F6	18	23.44	23.1	N6	26.12	27.75	33.07
1 mM CaSiO₃ + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP							
G1	17.57	21.15	20.86	O1	26	28.22	33.6
G2	18.26	22.55	21.97	O2	25.39	28.7	33.76
G3	18.05	23	22.04	O3	26.35	28.52	32.64
G4	19	24.02	23.49	O4	25.87	28.25	33.03
G5	18.62	24	22.58	O5	25.29	28.32	32.19
G6	18.56	23.6	23.04	O6	26.13	28.19	31.69
2 mM CaSiO₃ + TUZ İLAVE EDİLEN GRUP							
H1	15.56	21.42	21.2	P1	26.26	28	33.23
H2	25.93	29.79	32.04	P2	26.39	29.39	32.54
H3	25.54	28.72	30.47	P3	25.99	28.35	32.4
H4	26.06	28.82	30.57	P4	25.86	29.26	33.64
H5	25.98	28.35	32.67	P5	25.3	29.3	33.3
H6	25.86	29.81	30.69	P6	26.04	29.21	33.75

1 aylık tuz stresi uygulamasında M9 anacından *SOS1* geninin tuzlu kontrolde ifadesi ile 2 mM SNP, 4 mM SNP, 0.5 mM CaSiO₃ ve 1 mM CaSiO₃ dozlarının uygulaması sonucu genin ifadesi değişmemiştir ($p>0.05$). İstatistik olarak gruplar arasında önemli bir fark gözlenmemesine rağmen 1 mM SNP uygulamasında bu genin ifadesi tuzsuz kontrole göre artarken tuzlu kontrole göre azalmıştır. 2 mM CaSiO₃ dozunda ise gen tuzsuz kontrolle aynı şekilde ifade olmuştur.

Her ne kadar gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmese de ($p>0.05$) *NHX1* geninin ifadesi tuzsuz kontrole göre tuzlu kontrolde artmıştır. 1 mM SNP dozunda genin tuzsuz kontrole göre ifadesi artarken tuzlu kontrole göre ifadesi azalmıştır. 2 mM CaSiO₃ dozu diğer dozlara göre *NHX1* geninin ifadesini azaltarak tuzsuz kontrolle aynı olmuştur.

M9 anacına bir aylık tuz stresi uygulaması sonucunda 1 mM SNP dozunun tuzsuz kontrole göre hem *SOS1* geninin hemde *NHX1* geninin stres karşısında ifadesini artırarak tuza tolerans sağlamıştır. Tuzlu kontrole göre genlerin ifadesinin azalması tuzu bloke edebildiğini ve bitkiyi stressiz ortamdaymış gibi hissettirebileceğini düşündürmüştür. CaSiO₃'ün en yüksek dozunun (2 mM) diğer dozlara nazaran tuzu bloke edebildiğini göstermiştir.

M9 anacında 4 aylık tuz stresi sonucunda tuzlu kontrole göre SNP'nin her üç dozunda özellikle 1 ($p<0.05$) ve 4 mM'lık SNP dozlarının *SOS1* geninin ifadesini artırdığı gözlenmiştir. 0.5 mM CaSiO₃ ve 1 mM CaSiO₃ aynı oranlarda *SOS1* geninin ifadesini artırmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç bize SNP'nin 1 ve 4 mM'lık dozları ile CaSiO₃'ün 0.5 ve 1 mM'lık dozlarının bitkinin tuzu tolere edebilmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Fakat en yüksek doz olan 2 mM'lık CaSiO₃'ün *SOS1* geninin ifadesini oldukça düşürmüştü ve diğer tüm gruplardan istatistiki olarak önemli düzeyde farklıdır ($p<0.05$). Genin tuzsuz kontrolden de daha aşağı seviyede ifade olması CaSiO₃'ün en yüksek dozunun hücre için toksik etkisi olabileceğini düşündürmüştür. Aynı şekilde *NHX1* geninin ifadesinde SNP'nin her 3 dozundan özellikle 1 mM'lık olanı hem tuzlu hem tuzsuz kontrolden istatistik olarak önemli bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). CaSiO₃'ün 0.5 ve 1 mM'lık dozlarından özellikle 0.5 mM'lık doz tuzsuz kontrole göre istatistiki olarak önemli seviyede genin ifadesini artırmıştır ($p<0.05$). Fakat 2 mM'lık CaSiO₃'da gen ifadesi tuzlu kontrolün yanı sıra tuzsuz kontrolün de altına düşmüştü ve diğer tüm gruplardan istatistiki olarak önemli düzeyde farklıdır ($p<0.05$) (Çizelge 4.2.). Bu da hücreye toksik etki etmiş olabileceğini düşündürmüştür.

MM106 anacında 1 aylık tuz stresi uygulamasında hem SNP dozunda hem de CaSiO_3 dozlarında *SOSI* geninin ifadesinde istatistiki olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *NHX1* geninin ifadesinde 4 mM SNP ve 1 ve 2 mM CaSiO_3 dozları tuzsuz kontrole göre genin ifadesi azalmış ve istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu dozlar ve 0.5 mM CaSiO_3 dozu istatistiki olarak her ne kadar anlamlı olmasa da ($p>0.05$) tuzlu kontrole göre genin ifadesini azaltmıştır (Çizelge 4.3.). Bu dozların tuzu bloke edebileceğini yada hücre için toksik etki edebileceğini düşündürmüştür.

MM106 anacında 4 aylık uygulama sürecinde her ne kadar SNP ve CaSiO_3 'un en yüksek dozları tuzlu ve tuzsuz kontrole göre istatistiki olarak önemli bir fark görülmekle birlikte ($p<0.05$) bütün gruplar arasında ortalama C_T değerleri çizelge 4.3.'te görüldüğü gibi birbirine çok yakındır. *NHX1* geninin ifadesinde ise tuzlu, tuzsuz ve SNP nin 1 mM lık ve 2 mM'lık dozlarında hiç bir gen ifadesinde fark gözlenmezken ($p>0.05$), 4 mM'lık SNP'nin ve CaSiO_3 'ün 0.5 ve 1 mM'lık dozları kontrollere göre genin ifadesini azaltmıştır ($p<0.05$). İstatistiki olarak bütün diğer gruplardan önemli oranda farklı olan 2 mM'lık en yüksek CaSiO_3 dozu *NHX1* geninin ifadesini azaltmıştır. Bu anaçta uzun dönemli tuz stresinde 1 ve 2 mM'lık SNP dozlarının bitkinin tuza toleransında hiç etkisi olmadığını, 4 mM'lık SNP ve her üç CaSiO_3 dozlarının ise tuzu bloke edebileceği veya toksik etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.2. M9 anacına ait örneklerin C_T değerlerinin aritmetik ortalaması ve standart sapması

M9 ANACI 1 AYLIK TUZ STRESİ UYGULAMASI			
	Ort±SS* (MDH)	Ort±SS* (SOSI)	Ort±SS* (NHX1)
Tuzlu kontrol (n=3)	18.3967±0.43616 ^{ab}	22.5067±0.89629 ^a	21.8267±0.57839 ^a
Tuzsuz kontrol (n=3)	23.4667±5.33892 ^b	26.9433±4.96586 ^a	27.4833±5.86609 ^a
1 mM SNP+tuz (n=3)	19.7733±3.61043 ^{ab}	24.5533±4.29243 ^a	24.9000±5.43533 ^a
2 mM SNP+tuz (n=3)	18.4767±1.13377 ^{ab}	22.5967±1.29662 ^a	22.9900±1.23305 ^a
4 mM SNP+tuz (n=3)	17.0500±1.35237 ^a	22.0967±0.67263 ^a	21.4600±0.22539 ^a
0.5 mM CaSiO_3 +tuz (n=3)	18.0167±0.73146 ^{ab}	22.3000±1.13578 ^a	22.3967±0.76970 ^a
1mM CaSiO_3 +tuz (n=3)	17.9600±0.35369 ^{ab}	22.2333±0.96480 ^a	21.6233±0.66199 ^a
2 mM CaSiO_3 +tuz (n=3)	22.3433±5.87777 ^{ab}	26.6433±4.55507 ^a	27.9033±5.85809 ^a
M9 ANACI 4 AYLIK TUZ STRESİ UYGULAMASI			
Tuzlu kontrol (n=3)	22.1733±5.67046 ^{abc}	28.9933±0.74527 ^d	26.3533±4.41828 ^{bc}
Tuzsuz kontrol (n=3)	23.2733±4.20072 ^{bc}	23.8733±0.23692 ^{abc}	27.5567±2.52468 ^c
1 mM SNP+tuz (n=3)	18.4267±0.25106 ^{ab}	23.4267±0.50013 ^{abc}	22.3767±0.62660 ^a
2 mM SNP+tuz (n=3)	18.1300±0.51449 ^a	22.9933±1.07379 ^{ab}	23.6633±1.69459 ^{ab}
4 mM SNP+tuz (n=3)	18.4567±0.40452 ^{ab}	23.4533±0.92953 ^{abc}	23.0367±0.68676 ^{ab}
0.5 mM CaSiO_3 +tuz (n=3)	18.4667±0.76540 ^{ab}	22.6567±0.57327 ^a	22.8267±0.49963 ^{ab}
1mM CaSiO_3 +tuz (n=3)	18.7267±0.23861 ^{ab}	26.1167±0.74299 ^c	23.0367±0.45501 ^{abc}
2 mM CaSiO_3 +tuz (n=3)	25.9667±0.10066 ^c	25.5833±3.71436 ^{bc}	31.3100±1.17932 ^d

Ort: aritmetik ortalama, SS: standart sapma, *:3 verinin ortalaması

Çizelge 4.3. MM106 anacına ait örneklerin C_T değerlerinin aritmetik ortalaması ve standart sapması

MM106 ANACI 1 AYLIK TUZ STRESİ UYGULAMASI			
	Ort±SS* (MDH)	Ort±SS* (SOSI)	Ort±SS* (NHXI)
Tuzlu kontrol (n=3)	25.6633±0.44747 ^b	28.5367±1.02549 ^a	31.4733±1.64452 ^{ab}
Tuzsuz kontrol (n=3)	24.6400±0.72670 ^a	27.8533±0.87672 ^a	30.6700±1.73346 ^a
1 mM SNP+tuz (n=3)	25.8733±0.59045 ^b	28.9767±0.45829 ^a	31.4467±0.42147 ^{ab}
2 mM SNP+tuz (n=3)	26.0800±0.81074 ^b	28.6700±0.37027 ^a	31.4400±0.31512 ^{ab}
4 mM SNP+tuz (n=3)	26.2567±0.60583 ^b	28.1200±0.98306 ^a	32.6433±0.78137 ^{bc}
0.5 mM CaSiO ₃ +tuz (n=3)	26.3700±0.28618 ^b	27.9700±0.50587 ^a	32.1167±0.21455 ^{abc}
1mM CaSiO ₃ +tuz (n=3)	25.9133±0.48583 ^b	28.4800±0.24249 ^a	33.3333±0.60575 ^c
2 mM CaSiO ₃ +tuz (n=3)	26.2133±0.20404 ^b	28.5800±0.72298 ^a	32.7233±0.44433 ^{bc}
MM106 ANACI 4 AYLIK TUZ STRESİ UYGULAMASI			
Tuzlu kontrol (n=3)	26.4267±0.17898 ^{ab}	29.2567±0.04509 ^e	33.5633±0.23459 ^d
Tuzsuz kontrol (n=3)	26.2500±0.98808 ^{ab}	28.2533±0.06506 ^{abc}	32.3033±0.67715 ^c
1 mM SNP+tuz (n=3)	25.3733±0.65432 ^a	27.9100±0.22716 ^a	32.1867±0.89523 ^{bc}
2 mM SNP+tuz (n=3)	25.5067±0.81365 ^{ab}	28.8233±0.15695 ^{de}	32.1533±0.39247 ^{bc}
4 mM SNP+tuz (n=3)	26.5533±0.36556 ^b	28.7267±0.21548 ^{cd}	31.2100±0.43209 ^a
0.5 mM CaSiO ₃ +tuz (n=3)	26.5333±0.36910 ^b	28.3867±0.21548 ^{abcd}	31.0833±0.15275 ^a
1mM CaSiO ₃ +tuz (n=3)	25.7633±0.43004 ^{ab}	28.1667±0.05508 ^{ab}	31.1867±0.35233 ^a
2 mM CaSiO ₃ +tuz (n=3)	25.7333±0.38592 ^{ab}	28.5700±0.65574 ^{bcd}	31.3367±0.38501 ^{ab}

Ort: aritmetik ortalama, SS: standart sapma, *:3 verinin ortalaması

Kuraklık (su stresi) ve topraktaki yüksek tuzluluk gibi çevresel stres, bitki büyümesini ve verimliliğini sınırlandıran başlıca faktörlerdir (Epstein ve ark., 1980; Yancey ve ark., 1982). Deneysel gözlemlere dayanarak, bitkilerin ozmotik streslere adaptasyonunun veya toleransının altında yatan bir çok mekanizma bulunmaktadır (Greenway ve Munns, 1980). Son yıllarda yapılan çalışmalar, düşük molekül ağırlıklı metabolitlerin biyosentezinden sorumlu genlerin genetik manipülasyonunun, transgenik tütün bitkilerinde kuraklığa veya tuz stresi için toleransı arttırdığını göstermiştir (Kishor ve ark., 1995; Chen ve ark., 1997). Bu ozmoprotektanların fazla sentezlenmesi, ekstra enerji ve yapı blokları gerektirir ve bu da bitki büyümesini engeller. Dolayısıyla, transgenik bitkilerde bir transgenin ekspresyonunu tahrik etmek için bir stres-indüklenebilir promotör kullanmak arzu edilmektedir. (Delauney ve ark., 1993).

Bu çalışmada *Malus communis* fidanlarında tuza duyarlılığı veya toleransını belirlemek için moleküler fizyolojik proseslerin anlaşılmasına katkı sağlamak amaçlanmıştır. SNP ve CaSiO₃ kimyasalları, büyüme ve üretkenlik açısından zararlı önemli bir abiyotik faktör olan tuz kaynaklı stresin hafifletilmesinde moleküler seviyelerde meydana gelen değişiklikleri test etmek için uygulanmıştır.

Na⁺ ve K⁺ gibi iyon homeostazı tuz aşırı hassas (SOS) yolla düzenlenir. Yüksek Na⁺ stresi, SOS3-SOS2 protein kinaz kompleksini aktive eden bir kalsiyum sinyali başlatır. Bu daha sonra SOS1'in Na⁺/H⁺ değişim aktivitesini uyarır ve transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olarak bazı genlerin ekspresyonunu düzenler. SOS3-SOS2 ayrıca, vakuoler H⁺-ATPazlar ve pirofosfatazlar, vakuoler Na⁺/H⁺ eşanjörü ve plazma membranı K⁺ ve Na⁺ taşıyıcıları da dahil olmak üzere tuz stresi altında iyon homeostazı ile ilişkili diğer taşıyıcıların aktivitelerini uyarabilir veya bastırabilir (Zhu, 2002).

Sitosolde yüksek bir K⁺/Na⁺ oranının muhafaza edildiği stratejiler öncelikli olarak vakuollerde Na⁺ ekstrüzyonu ve/veya Na⁺'nın hücre içi bölümlenmesini içerir (Blumwald, 2000). SOS sinyal iletim yolu, tuzluluk toleransı açısından açıkça önemlidir. Kök hücelere giren Na⁺'ların büyük bir çoğunluğu, SOS2 ve SOS3'ün SOS1'in ekspresyonunu düzenleyen plazma membranı Na⁺/H⁺ antiportteri ile yoluyla pompalanır. Köklerde kalmış Na⁺ daha sonra vakuollerde tutulabilir veya sürgünlere taşınabilir. Vakuollerdeki bölümlenmeler, *Arabidopsis*'teki *NHX* ailesine ait olanlar gibi tonoplast Na⁺/H⁺ antiportterleri ile sağlanır (Pardo ve ark., 2006). *MdNHX1*'in M.26 elma anaçlarının aşırı ekspresyonunun tuzluluk toleransını tuzluluk stresinde arttırdığı daha önce doğrulanmıştır (Li ve ark., 2013). Bu çalışmada da önceki ile uyumlu olarak 1 ve 4 mM'lık SNP ve 0.5 ve 1mM'lık CaSiO₃ dozları hem *SOS1* hemde *NHX1* geninin ifadesini artırarak M9 anacının tuz toleransını artırmıştır. Bir başka çalışmada *M. prunifolia* bitkisindeki *MdNHX1* transkriptinin düşük miktarı fazla Na⁺'un vakuole hareket edemediği şeklinde açıklanırken tam tersi olarak *M. hupensis*'de *MdNHX1*'in transkriptinin fazla olması Na⁺'un transportuna yardım ettiğini ve daha iyi bir hücre ortamı sürdürmesine yardımcı olabileceği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2004). Liu ve ark., (2012)'nin yaptığı benzer çalışmada bu tez çalışmasının aksine *MdNHX1* ve *MdSOS1* genlerinin tuz stresinin uygulandığı birinci ve altıncı günlerde *M. prunifolia*'den daha çok *M. hupensis*'de yüksek transkript seviyelerine sahip olduğunu, 12. ve 15. ilerleyen günlerde ise ifadelerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Bitkilerin çoklu abiyotik strese maruz kalma durumlarında, SNP gibi kimyasal ajanların toleransı artırdığı görülmüştür (Savvides ve ark., 2016). SNP'in domates bitkisine püskürtülerek uygulaması sonucunda donörü olduğu NO'un (nitrit oksit) reaktif oksijen içeriğini azaltarak ve bazı antioksidant aktivitelerini artırarak domates bitkilerinde tuz stresi ile mücadele eden antioksidan sinyali görevi gördüğü gösterilmiş ve SNP'nin meyve dokularındaki Na⁺

birikimini azaltarak plazma membran bütünlüğünü lipooksijenatif süreçlere karşı koruyabileceği savunulmuştur (Ali ve Ismail, 2014).

Silikatın tuz stresi şartları altında bakla bitkisinin beslenmesi ve büyümesine katkı sağladığı rapor edilmiştir (West, 1982). Toprağa eklenen kalsiyum silikatın, yüksek tuzluluktan etkilenen parametreleri iyileştirdiğini, sodyum ve klorürü düşürdüğünü ve tuz stresindeki börülce ve fasulye sürgünlerinde ve köklerinde az miktarda kalsiyum ve potasyum konsantrasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Amador, 2007). Bu tez çalışmasının sonuçları ile uyumlu olarak başka bir çalışmada, bitki büyümesi ve beslenme davranışı üzerindeki etkileri göz önüne alınarak domates üzerinde tuzluluğun zararlı etkilerini azaltmanın alternatif bir yolu olarak kalsiyum silikat uygulaması önerilmiştir (Wasti ve ark., 2017). Benzer şekilde birçok çalışma, CaSiO_3 'ün bitki için bir çok abiyotik strese dayanıklılık sağladığını bildirmiştir (Taylor, 1990; Lopez-Carrion ve ark., 2008).

Arabidopsis thaliana ile yapılan çalışmada, tuz toleransı için gerekli *SOS1* geninin plazma zarında Na^+/H^+ antiporter kodladığı görülmüş ve transgenik *A. thaliana*'da *SOS1*'in aşırı ifadesinin tuz toleransını arttırdığı bildirilmiştir. Transgenik bitkilerde artan tuz toleransı, tuz stresi altında azalan Na^+ birikimi ile korelasyon göstermiştir. Bu, bir Na^+ atık taşıyıcının ektopik olarak bitkilerde eksprese edildiği ilk çalışmadır. Sonuçlar, bitkilerde Na^+ birikimini sınırlandırarak tuz toleransını artırmak için yeni bir strateji oluşturmaktadır (Shi ve ark., 2002).

Kalsiyum silikatın ve tuzluluğun tek başına uygulanmasının domates bitki büyüme ve beslenme davranışı ve fotosentetik pigmentler üzerindeki etkisi araştırılan çalışmada sodyum klorür (NaCl) uygulaması bitki gelişimi ve büyüme parametrelerinde belirgin azalmaya neden olmuştur. Tuz stresinde ayrıca sodyum (Na^+) birikimi ve potasyum (K^+) konsantrasyonunda bir azalma meydana gelmiştir. Si, NaCl stresli bitkilerin büyüme potansiyelinde iyileştirici etkilere sebep olmuştur (Wasti ve ark., 2017).

Araştırmacılar, *Malus hupehensis Rehd* bitkisinde dopaminin tuza aşırı duyarlı patojenleri tuzluluk derecesinde kontrol edip etmediğini araştırdıklarında; *MdHKT1*, *MdNHX1* ve *MdSOS1* genlerinin köklerde ve yapraklarda büyük ölçüde upregüle edildiğini, bunun muhtemelen iyon homeostazının muhafaza edilmesine ve dolayısıyla eksojen dopaminin daha önce tuza maruz bırakılan bitkilerde tuzluluk direncinin geliştirilmesine katkı sağladığını açıklamışlardır (Li ve ark., 2015).

Arpa çeşitlerinin tuzluluğa toleransını ve tuzlu koşullar altında arpa bitkilerinin spesifik anatomik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, bitkiler hidrofobik koşullar altında kontrol, 50 mM NaCl ve 100 mM NaCl olmak üzere üç farklı varyeteye yetiştirilmiştir. Arpacıkların tuzluluğa toleranslı ve hassas çeşitleri saptanmıştır. Tuzluluğun bitkilerin büyüme ve biyokütle birikimini azalttığını, üst ve alt epidermisin kalınlığını azalttığını, yaprakların vasküler demetlerinin çapını ve köklerin merkez silindirin çapını azalttığını ve bazılarında exodermis/endodermis köklerinin oranını arttırdığını göstermiştir (Atabayeva ve ark., 2013).

Tuz stresi oksidatif hasarını giderme potansiyelini araştırmak için, tuz stres altındaki arpa üzerindeki nitrik oksidin koruyucu rolü araştırılmıştır. Arpa yapraklarında tuz stresinde iyon sızıntısı, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu artmıştır. Arpa yapraklarının aynı anda 50 µM sodyum nitroprussid ile işlenmesi, azalan iyon sızıntısıyla ve tuzlu stresin hasarını hafifletir; aralık yapraklarında malondialdehit (MDA), karbonil ve hidrojen peroksit içeriği nitrik oksid vericisinin varlığı, süperoksit dismutazlar (SOD), askorbat peroksidazlar (APX) ve katalazların (CAT) aktivitelerini arttırmıştır. Bu arada, sodyum nitroprussid ilavesi, protein seviyesinde ferritin birikimini artırmış; nitrik oksitin doğrudan ferritin birikimini düzenlediğini göstermiştir. Bu sonuçlar nitrik oksidin, tuz stresinden kaynaklanan aşırı reaktif oksijen türlerini söndürmek ve ferritin birikiminin çoğaltılmasını tetikleyerek çok sayıda demirli iyonu şelatlamak için antioksidan enzimlerin etkinliklerini artırarak, tuz stresi hasarından fidanları etkili bir şekilde koruyabileceğini düşündürmektedir (Li ve ark., 2008).

Bitkilere stres faktörlerine tolerans sağlaması amacıyla son zamanlarda kullanımı önem kazanmış kalsiyum silikat ($\text{Ca}(\text{SiO}_3)_3$) ve SNP (sodyum nitroprussit) kimyasalları bitkileri kuraklık, düşük sıcaklık, tuz stresi gibi birçok çevresel etmenlere karşı dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir. Kalsiyum silikat Ca_2SiO_4 bileşenidir, kalsiyum ortosilikat olarak da adlandırılmakla beraber kalsiyum oksit ve silika bileşenlerinden oluşan bir grupta bulunmaktadır (Taylor, 1990). Kalsiyum metabolizmada düzenleyici rolüyle bilinmektedir (Cramer ve ark., 1986). Sunulan hipotezlere göre yüksek kalsiyum seviyesi hücre membranlarını tuzluluğun olumsuz etkilerinden koruyucu niteliktedir (Busch, 1995). Diğer bir yandan ise silikatın biyotik ve abiyotik streslerine karşı bitkilerde savunma mekanizması oluşturarak bitki büyümesinde büyük olumlu etkileri bulunduğu bildirilmiştir (Marschner, 1995; Epstein, 1999; Murillo-Amador ve ark., 2007). Tuz stresi (NaCl) koşulları altında yapılan bir

çalışmada silikatın iki bakla çeşidi üzerinde büyümeye katkı sağladığı, bitki beslenmesinde olumlu sonuçlar verdiği belirtilmiştir (West, 1982). Tuz stresi varlığında bitkilerin nitrik oksite (NO) tepkisi araştırılan bir çalışmada, çalışılan bitkiler 100 mM NaCl ve SNP (NO donörü) farklı konsantrasyonlarda maruz bırakılmışlardır. Bitkiler düşük miktarlarda SNP uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra uyarılan NaCl miktarında azalma gözlemlenmiştir. NO'nun tuz stresini azaltıcı yönde etki gösterdiğini ileri sürülmüştür (Lopez-Carrion ve ark., 2008).



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Kısa dönem tuz stresi uygulamasında M9 ve MM106 anaçlarında, hem *SOS1* hemde *NHX1* genlerinde en fazla etki göstererek tuza tolerans sağlayan dozların 1 mM SNP ve 2 mM CaSiO₃ olduğu görülmüştür.

Uzun dönem tuz uygulamasında ise; MM106 anacında gruplar arası önemli fark görülmezken, M9 anacında *SOS1* geninde SNP'nin 1 ve 4 mM dozları, *NHX1* geninde SNP'nin 1 mM dozu ve CaSiO₃'ün 0.5 mM dozunda genin ifadesi önemli derecede artarak tuzu tolere edebildikleri belirlenmiştir.

Elma türüne ait yerel genotiplerin materyal olarak kullanıldığı, dışsal SNP ve CaSiO₃ uygulamalarının tuz stresine tolerans üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada; tuz stresinin yol açtığı zararlı etkilerin azaltılmasında olumlu etki yapabilecek fizyolojik temelli bir yardımcı uygulama olarak değerlendirilebilir.

5.2. Öneriler

Elma yetiştiriciliğinde verim ve kalite açısından önemli olan pek çok pomolojik ve kimyasal içerikler kantitatif kalıtım karakterinde olmalarından dolayı değişebilen ekolojik şartlardan oldukça etkilenebilmektedir. Dünyada son yıllardaki iklim değişikliklerinin sonucu olarak ortaya çıkan yanlış sulama tekniklerinden kaynaklanan tuzluluk, toprakta Na⁺ ve Cl⁻ gibi iyonların birikimiyle bitki gelişimini olumsuz yönde etkileyen tuz stresinin oluşumuna sebebiyet veren ciddi tehditler içermektedir. Günümüzde, stres koşullarında tarımsal öneme sahip bitki türlerinin üretimini kolaylaştıracak ekonomik olarak etkin teknolojik araç ve yöntemler bulunmamaktadır. Streslere (biyotik ve abiyotik) maruz kalınmaya devam edilmesi halinde tarım ürünlerinin verimliliklerinin azalarak artan insan nüfusunun besin ihtiyaçlarının karşılanamaması sorunu ortaya çıkacaktır ki bu da bitkilerin diğer stres faktörleri ile birlikte tuzluluğa dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi ve besin değerleri yüksek toleranslı bitkilerin geliştirilmesinin gerekliliğini meydana getirir. Kültür bitkisi yetiştirilemeyecek kadar yüksek tuz bulunan alanlarda, stresinin bitkiler üzerine etkisi ile bitkilerin tuza tolerans mekanizmalarının anlaşılması için hem osmotik hem de iyon stresinin tüm bitki, doku ve hücresel düzeydeki etkilerinin morfolojik, fizyolojik,

biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar düzeyinde incelenmesi, düzenleyici noktaların anlaşılması bitki ıslahı çalışmalarının daha etkili sonuçlara ulaşılmasında önemli olacaktır.



KAYNAKLAR

- Acar, O., 1999, Kurağa dayanıklı bazı arpa (*Hordeum ssp.*) çeşitlerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin araştırılması, *Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), İzmir.*
- Agarwal, P., Agarwal, P. K., Nair, S., Sopory, S. ve Reddy, M., 2007, Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity, *Molecular genetics and genomics*, 277 (2), 189-198.
- Aharon, G. S., Apse, M. P., Duan, S., Hua, X. ve Blumwald, E., 2003, Characterization of a family of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Soil*, 253 (1), 245-256.
- Ahmadi, A., Emam, Y. ve Pessarakli, M., 2009, Response of various cultivars of wheat and maize to salinity stress, *Journal of Food, Agriculture Environment*, 7 (1), 123-128.
- Ali, H. E. M. ve Ismail, G. S. M., 2014, Tomato fruit quality as influenced by salinity and nitric oxide, *Turkish Journal of Botany*, 38 (1), 122-129.
- Allakhverdiev, S. I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. ve Murata, N., 2000, Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus sp.*, *Plant physiology*, 123 (3), 1047-1056.
- Almaca, A., Alkan, A., Çullu, M., Baytekin, H., Öztürkmen, A. ve Kaptan, H., 1999, Farklı Tuz İçeriğine Sahip Topraklarda Yetiştirilen Mısır ve Darı Türlerinin Gelişim Durumları, *GAP*, 1, 26-28.
- Amador, B. M., Yamada, S., Yamaguchi, T., Puente, E.R., Serrano, N.A., Hernández, J.L.G., Aguilar, R.L., Diéguez, E.T., Garibay, A.N., , 2007, Influence of Calcium Silicate on Growth, Physiological Parameters and Mineral Nutrition in Two Legume Species Under Salt Stress', 193 (6), 413–421.
- Anonim, D., 2001, VIII. Beş Yıllık Kalkınma Planı, Hayvancılık Özel Dhtisas Komisyonu Raporu, Ankara.
- Anonymous, 2006, Tarımsal Yapı ve Üretim. Basbakanlık DDE.
- Apel, K. ve Hirt, H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. ve Blumwald, E., 1999, Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*, *Science*, 285 (5431), 1256-1258.
- Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual review of plant biology*, 50 (1), 601-639.
- Ashraf, M., 1994, Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*, *Biologia Plantarum*, 36 (2), 255-259.
- Ashraf, M. ve Foolad, M., 2007, Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environmental and Experimental Botany*, 59 (2), 206-216.
- Atabayeva, S., Nurmahanova, A., Minocha, S., Ahmetova, A., Kenzhebayeva, S., Aidosova, S., Nurzhanova, A., Zhardamaliev, A., Asrandina, S. ve Alybayeva, R., 2013, The effect of salinity on growth and anatomical attributes of barley seedling (*Hordeum vulgare* L.), *African Journal of Biotechnology*, 12 (18), 2366.
- Atienza, S. G., Faccioli, P., Perrotta, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, A. M. ve Cattivelli, L., 2004, Large scale analysis of transcripts

- abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions, *Plant Science*, 167 (6), 1359-1365.
- Ayyıldız, M., 1990, Sulama Suyu Kalitesi ve Tuzluluk Problemleri.
- Barritt, B., Konishi, B. ve Dilley, M., 1995, Performance of three apple cultivars with 23 dwarfing rootstocks during 8 seasons in Washington, *Fruit varieties journal (USA)*.
- Bartels, D. ve Sunkar, R., 2005, Drought and salt tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (1), 23-58.
- BAYAT, R. A., KUŞVURAN, Ş., ELLİALTIOĞLU, Ş. ve ÜSTÜN, A. S., 2014, Tuz Stresi Altındaki Genç Kabak (*Cucurbita pepo* L. ve *C. moschata* Poir.) Bitkilerine Uygulanan Prolin'in, Antioksidatif Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri*, 1 (1), 25-33.
- Blumwald, E., 2000, Sodium transport and salt tolerance in plants, *Current opinion in cell biology*, 12 (4), 431-434.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. ve Jensen, R. G., 1995, Adaptations to environmental stresses, *The plant cell*, 7 (7), 1099.
- Bohnert, H. J. ve Jensen, R. G., 1996, Strategies for engineering water-stress tolerance in plants, *Trends in Biotechnology*, 14 (3), 89-97.
- Bonilla, I., El-Hamdaoui, A. ve Bolaños, L., 2004, Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress, *Plant and Soil*, 267 (1), 97-107.
- Boscaiu, M., Lull, C., Lidon, A., Bautista, I., Donat, P., Mayoral, O. ve Vicente, O., 2008, Plant responses to abiotic stress in their natural habitats, *Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 65 (1), 53-58.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. ve Martin-Tanguy, J., 1999, Polyamines and environmental challenges: recent development, *Plant Science*, 140 (2), 103-125.
- Boudsocq, M. ve Laurière, C., 2005, Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families, *Plant physiology*, 138 (3), 1185-1194.
- Burak, M., Büyükyılmaz, M. ve Öz, F., 1997, Granny Smith elma çeşidinin farklı anaçlar üzerindeki verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi, *Yumuşak Çekirdekli Meyveler Sempozyumu Bildirileri*, 2-5.
- Busch, D., 1995, Calcium regulation in plant cell and his role in signalling, *Annu. Rev. Plant Physiol*, 46, 95-102.
- Chen, Q., Arents, J. C., Bader, R., Postma, P. W. ve Amster-Choder, O., 1997, BglF, the sensor of the E. coli bgl system, uses the same site to phosphorylate both a sugar and a regulatory protein, *The EMBO Journal*, 16 (15), 4617-4627.
- Cheong, M. S. ve Yun, D.-J., 2007, Salt-stress signaling, *Journal of Plant Biology*, 50 (2), 148-155.
- Chiba, S., Yokota, S.-i., Yonekura, K., Tanaka, S., Furuyama, H., Kubota, H., Fujii, N. ve Matsumoto, H., 2006, Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis, *Journal of the neurological sciences*, 241 (1), 39-43.
- Cicerali, I., 2004, Effect of salt stress on antioxidant defense systems of sensitive and resistant cultivars of lentil (*Lens culinaris* M.), *MSc Thesis. Middle East Technical University, Ankara Turkey*.
- Cohen, P., 1989, The structure and regulation of protein phosphatases, *Annual review of biochemistry*, 58 (1), 453-508.

- Conde, C., Silva, P., Agasse, A., Lemoine, R., Delrot, S., Tavares, R. ve Gerós, H., 2007, Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance, *Plant and Cell Physiology*, 48 (1), 42-53.
- Cram, W., 1973, Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plant cells, *Journal of Experimental Botany*, 24 (2), 328-341.
- Cramer, G. R., Läuchli, A. ve Epstein, E., 1986, Effects of NaCl and CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton, *Plant physiology*, 81 (3), 792-797.
- Creissen, G., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A. ve Mullineaux, P., 1994, Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plants' responses to environmental stress, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 102, 167-175.
- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H., 2011, Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları (021002)(11-34), *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi; Cilt: 11 Sayı: 2*.
- Davies, D. D., 1987, *The Biochemistry of Plants: Biochemistry of Metabolism*, Academic Pr, p.
- Davies, K. J., 2000, Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *IUBMB life*, 50 (4-5), 279-289.
- Delauney, A., Hu, C., Kishor, P. ve Verma, D., 1993, Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (25), 18673-18678.
- Demiral, T. ve Türkan, I., 2004, Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?, *Journal of plant physiology*, 161 (10), 1089-1100.
- Demiral, T. ve Türkan, I., 2006, Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress, *Environmental and Experimental Botany*, 56 (1), 72-79.
- Djilianov, D., Georgieva, T., Moyankova, D., Atanassov, A., Shinozaki, K., Smeeken, S., Verma, D. ve Murata, N., 2005, Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants—gene transfer approach, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19 (sup3), 63-71.
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S. ve Mullineaux, P. M., 1990, Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.), *Planta*, 180 (2), 278-284.
- Epstein, E., Norlyn, J. D., Rush, D. W., Kingsbury, R. W., Kelley, D. B., Cunningham, G. A. ve Wrona, A. F., 1980, Saline culture of crops: a genetic approach, *Science*, 210 (4468), 399-404.
- Epstein, E., 1999, Silicon, *Annual review of plant biology*, 50 (1), 641-664.
- Evelin, H., Kapoor, R. ve Giri, B., 2009, Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review, *Annals of botany*, 104 (7), 1263-1280.
- Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.-J., Pruvost, C. ve Jouanin, L., 1995, Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees, *Plant physiology*, 109 (3), 1047-1057.
- Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2003, Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiologia plantarum*, 119 (3), 355-364.

- Gang, W., Zhen-Kuan, W., Yong-Xiang, W., Li-Ye, C. ve Hong-Bo, S., 2007, The mutual responses of higher plants to environment: physiological and microbiological aspects, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 59 (2), 113-119.
- Gill, S. S. ve Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12), 909-930.
- Golldack, D., Lüking, I. ve Yang, O., 2011, Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network, *Plant cell reports*, 30 (8), 1383-1391.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S. ve Zhang, C., 2005, Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought, *Plant Science*, 169 (2), 313-321.
- Gorovits, R. ve Czosnek, H., 2008, Expression of stress gene networks in tomato lines susceptible and resistant to Tomato yellow leaf curl virus in response to abiotic stresses, *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (4), 482-492.
- Greenway, H. ve Munns, R., 1980, Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes, *Annual review of plant physiology*, 31 (1), 149-190.
- Gunes, A., Post, W. N., Kirkby, E. A. ve Aktas, M., 1994, Influence of partial replacement of nitrate by amino acid nitrogen or urea in the nutrient medium on nitrate accumulation in NFT grown winter lettuce, *Journal of plant nutrition*, 17 (11), 1929-1938.
- Haber, F. ve Weiss, J., 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 332-351.
- Halfter, U., Ishitani, M. ve Zhu, J.-K., 2000, The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (7), 3735-3740.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M., 1985, Free radicals in biology and medicine, Pergamon.
- Hare, P., Cress, W. ve Van Staden, J., 1998, Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress, *Plant, cell & environment*, 21 (6), 535-553.
- Hartman, H. T., Kester, D.E., Davies, F.T., 1990, Plant Propagation, Principles and Practices.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K. ve Bohnert, H. J., 2000, Plant cellular and molecular responses to high salinity, *Annual review of plant biology*, 51 (1), 463-499.
- Henle, K. J., Jethmalani, S. M. ve Nagle, W. A., 1998, Stress proteins and glycoproteins, *International journal of molecular medicine*, 1 (1), 25-57.
- Holmberg, N. ve Bülow, L., 1998, Improving stress tolerance in plants by gene transfer, *Trends in plant science*, 3 (2), 61-66.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. ve Verma, D. P. S., 2000, Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress, *Plant physiology*, 122 (4), 1129-1136.
- Hu, Y. ve Schmidhalter, U., 2005, Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168 (4), 541-549.
- Hundertmark, M. ve Hinch, D. K., 2008, LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana, *BMC genomics*, 9 (1), 118.

- Hussain, T. M., Hazara, M., Sultan, Z., Saleh, B. K. ve Gopal, G. R., 2008, Recent advances in salt stress biology a review, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3 (1), 8-13.
- Inal, A., Günes, A. ve Aktas, M., 1995, Effects of chloride and partial substitution of reduced forms of nitrogen for nitrate in nutrient solution on the nitrate, total nitrogen, and chloride contents of onion, *Journal of plant nutrition*, 18 (10), 2219-2227.
- Iqbal, M. ve Ashraf, M., 2005, Changes in growth, photosynthetic capacity and ionic relations in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) due to pre-sowing seed treatment with polyamines, *Plant Growth Regulation*, 46 (1), 19-30.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Río, L. A. ve Sevilla, F., 1998, Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves, *Plant physiology*, 118 (4), 1327-1335.
- Kadıoğlu, A., 1999, Bitki fizyolojisi, 348-370.
- Kaiser, W. M., 1979, Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide, *Planta*, 145 (4), 377-382.
- Kakkar, R., Nagar, P., Ahuja, P. ve Rai, V., 2000, Polyamines and plant morphogenesis, *Biologia Plantarum*, 43 (1), 1-11.
- Kaldenhoff, R., RIBAS-CARBO, M., Sans, J. F., Lovisolo, C., Heckwolf, M. ve Uehlein, N., 2008, Aquaporins and plant water balance, *Plant, cell & environment*, 31 (5), 658-666.
- Kamal-Eldin, A. ve Appelqvist, L.-Å., 1996, The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids*, 31 (7), 671-701.
- Kanber, R., Kırdar, C., Tekinel, O., 1992, Sulama Suyu Niteliği ve Sulamada Tuzluluk Sorunları.
- Kaur, V., Singh, S. ve Behl, R. K., 2016, Heat and drought tolerance in wheat: Integration of physiological and genetic platforms for better performance under stress.
- Kerepesi, I. ve Galiba, G., 2000, Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings, *Crop Science*, 40 (2), 482-487.
- Khan, N. A. ve Singh, S., 2008, Abiotic stress and plant responses, *IK International, New Delhi*.
- Khatkar, D. ve Kuhad, M., 2000, Short-term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages, *Biologia Plantarum*, 43 (4), 629-632.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P. ve Abogadallah, G. M., 2003, Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress, *Journal of Experimental Botany*, 54 (392), 2553-2562.
- Kirkby, E. A. ve Knight, A. H., 1977, Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants, *Plant physiology*, 60 (3), 349-353.
- Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A. A. ve Verma, D. P. S., 1995, Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants, *Plant physiology*, 108 (4), 1387-1394.
- Kohorn, B. D. ve Kohorn, S. L., 2012, The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors, *Frontiers in plant science*, 3.

- Köşkeroğlu, S., 2006, Tuz ve su stresi altındaki mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde profilin birikim düzeyleri ve stres parametrelerinin araştırılması, *Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Kuşvuran, Ş., 2010, Kavunlarda Kuraklık ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar, 355.
- Larher, F., Aziz, A., Deleu, C., Lemesle, P., Ghaffar, A., Bouchard, F. ve Plasman, M., 1998, Suppression of the osmoinduced proline response of rapeseed leaf discs by polyamines, *Physiologia plantarum*, 102 (1), 139-147.
- Leopold, A. ve Willing, R., 1984, Evidence for toxicity effects of salt on membranes.
- Levitt, J., 1980, Responses of plants to environmental stresses.
- Li, C., Wei, Z., Liang, D., Zhou, S., Li, Y., Liu, C. ve Ma, F., 2013, Enhanced salt resistance in apple plants overexpressing a *Malus vacuolar Na⁺/H⁺* antiporter gene is associated with differences in stomatal behavior and photosynthesis, *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 164-173.
- Li, C., Sun, X., Chang, C., Jia, D., Wei, Z., Li, C. ve Ma, F., 2015, Dopamine alleviates salt-induced stress in *Malus hupehensis*, *Physiologia plantarum*, 153 (4), 584-602.
- Li, Q.-Y., Niu, H.-B., Yin, J., Wang, M.-B., Shao, H.-B., Deng, D.-Z., Chen, X.-X., Ren, J.-P. ve Li, Y.-C., 2008, Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*), *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 65 (2), 220-225.
- Lichtenthaler, H. K., 1996, Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants, *Journal of plant physiology*, 148 (1-2), 4-14.
- Liu, C., Li, C., Liang, D., Wei, Z., Zhou, S., Wang, R. ve Ma, F., 2012, Differential expression of ion transporters and aquaporins in leaves may contribute to different salt tolerance in *Malus* species, *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 159-165.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S. ve Zhu, J.-K., 2000, The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (7), 3730-3734.
- Lopez-Carrion, A., Castellano, R., Rosales, M., Ruiz, J. ve Romero, L., 2008, Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism, *Biologia Plantarum*, 52 (3), 587-591.
- Lorenz, M. C. ve Heitman, J., 1998, The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*, *The EMBO Journal*, 17 (5), 1236-1247.
- Løvdaal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Verheul, M. ve Lillo, C., 2010, Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato, *Phytochemistry*, 71 (5), 605-613.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., Damsz, B., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., Joly, R. J. ve Bressan, R. A., 2002, Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction?, *The Plant Journal*, 31 (6), 699-712.
- Mahajan, S. ve Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Archives of biochemistry and biophysics*, 444 (2), 139-158.

- Mahajan, S., Pandey, G. K. ve Tuteja, N., 2008, Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway, *Archives of biochemistry and biophysics*, 471 (2), 146-158.
- Mansour, M., 2000, Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress, *Biologia Plantarum*, 43 (4), 491-500.
- Mansour, M. M. F., 1998, Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36 (10), 767-772.
- Marini, A.-M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. ve André, B., 1997, A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and cellular biology*, 17 (8), 4282-4293.
- Marschner, H., 1995, Saline soils, *Mineral nutrition of higher plants*. Academic press, New York, 1, 657-680.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B. ve Mohanty, P., 2002, Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, *Current Science*, 525-532.
- Maurel, C. ve Chrispeels, M. J., 2001, Aquaporins. A molecular entry into plant water relations, *Plant physiology*, 125 (1), 135-138.
- Mengel, K. a. K., E.A., , 2001, Principles of plant nutrition, 848.
- Munns, R., 2002, Salinity, growth and phytohormones, *Salinity: environment—plants—molecules*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 271-290.
- Munns, R., 2005, Genes and salt tolerance: bringing them together, *New Phytologist*, 167 (3), 645-663.
- Murakeözy, É. P., Nagy, Z., Duhazé, C., Bouchereau, A. ve Tuba, Z., 2003, Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary, *Journal of plant physiology*, 160 (4), 395-401.
- Murillo-Amador, B., Yamada, S., Yamaguchi, T., Rueda-Puente, E., Ávila-Serrano, N., García-Hernández, J., López-Aguilar, R., Troyo-Diéguéz, E. ve Nieto-Garibay, A., 2007, Influence of calcium silicate on growth, physiological parameters and mineral nutrition in two legume species under salt stress, *Journal of agronomy and crop science*, 193 (6), 413-421.
- Nawaz, K., Hussain, K., Majeed, A., Khan, F., Afghan, S. ve Ali, K., 2010, Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects, *African Journal of Biotechnology*, 9 (34).
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. ve Pardo, J. M., 1995, Ion homeostasis in NaCl stress environments, *Plant physiology*, 109 (3), 735.
- Nordberg, J. ve Arnér, E. S., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free radical biology and medicine*, 31 (11), 1287-1312.
- Orthen, B., Popp, M. ve Smirnoff, N., 1994, Hydroxyl radical scavenging properties of cyclitols, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 102, 269-272.
- Özbek, S., 1978, Özel Meyvecilik, *Ç.Ü.Z.F. Yayınları*, 486.
- Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001, Bitki Biyoteknolojisi –II- 308- 313.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M., 2004, Ilıman İklim Meyve Türleri (Yumuşak Çekirdekli Meyveler), *Cilt: II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir* (556).
- Pamir, M. ve Öz, M., 1997, Bazı elma anaç-çeşit kombinasyonlarının Erzincan şartlarına adaptasyonu üzerine araştırmalar, *Yumuşak Çekirdekli*

- Sempozyumu. Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü. Yalova*, 61-69.
- Papageorgiou, G. C. ve Murata, N., 1995, The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex, *Photosynthesis Research*, 44 (3), 243-252.
- Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O. ve Quintero, F. J., 2006, Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 57 (5), 1181-1199.
- Parida, A. K. ve Das, A. B., 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and environmental safety*, 60 (3), 324-349.
- Pittman, J., Zhu, J. ve Hirschi, K., 2004, The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H (+)/Ca (2+) antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. ve Zhu, J.-K., 2002, Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (12), 8436-8441.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W. ve Li, H. Y., 2008, Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (1), 2-18.
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K. ve Pardo, J. M., 2002, Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (13), 9061-9066.
- Rausch, T. ve Wachter, A., 2005, Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations, *Trends in plant science*, 10 (10), 503-509.
- Reinhold, L. ve Guy, M., 2002, Function of membrane transport systems under salinity: plasma membrane, In: *Salinity: Environment-Plants-Molecules*, Eds: Springer, p. 397-421.
- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.-h., Matsumoto, T. K., Koiwa, H., Zhu, J.-K., Bressan, R. A. ve Hasegawa, P. M., 2001, AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (24), 14150-14155.
- Sairam, R., Tyagi, A., 2004, Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants.
- Sakamoto, A. ve Murata, N., 2002, The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants, *Plant, cell & environment*, 25 (2), 163-171.
- Savvides, A., Ali, S., Tester, M. ve Fotopoulos, V., 2016, Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible?, *Trends in plant science*, 21 (4), 329-340.
- Schubert, S. ve Läuchli, A., 1990, Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars, In: *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, Eds: Springer, p. 183-187.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2003, Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (2), 194-199.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. ve Zhu, J.-K., 2000, The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (12), 6896-6901.

- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. ve Zhu, J.-K., 2002, The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants, *The plant cell*, 14 (2), 465-477.
- Shi, H. ve Zhu, J.-K., 2002, Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid, *Plant molecular biology*, 50 (3), 543-550.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007, Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 58 (2), 221-227.
- Shiozaki, K. ve Russell, P., 1995, Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast, *Nature*, 378 (6558), 739.
- Singh, S., Sharma, H., Goswami, A., Datta, S. ve Singh, S., 2000, In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride, *Biologia Plantarum*, 43 (2), 283-286.
- Somun, G., 2010, Arpada (*Hordeum vulgare* L.) tuzluluğa toleransın in vitro koşullarda belirlenmesi.
- Sönmez, B., 2008, Türkiye çoraklık kontrol rehberi.
- Strogonov, B. P., 1964, Physiological basis of salt tolerance in plants.
- Sun, W. Q., Li, X. P. ve Ong, B. L., 1999, Preferential accumulation of d-pinitol in *Acrostichum aureum* gametophytes in response to salt stress, *Physiologia plantarum*, 105 (1), 51-57.
- Taiz, L., Zeiger, E. ve Türkan, İ., 2008, Bitki fizyolojisi, Palme Yayıncılık, p.
- Taylor, H. F. W., 1990, Cement Chemistry, 33-34.
- Temple, M. D., Perrone, G. G. ve Dawes, I. W., 2005, Complex cellular responses to reactive oxygen species, *Trends in cell biology*, 15 (6), 319-326.
- TEPE, A., ERTOK, R. ve YILMAZ, M., 2008, BAZI HIYAR (*CUCUMİS SATİVUS* L.) GENOTİPLERİNİN FİDE DÖNEMİNDE TUZA TOLERANS DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ.
- Tester, M. ve Davenport, R., 2003, Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants, *Annals of botany*, 91 (5), 503-527.
- Tuteja, N., 2007, Chapter twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants, *Methods in enzymology*, 428, 419-438.
- Ueda, A., Kathiresan, A., Inada, M., Narita, Y., Nakamura, T., Shi, W., Takabe, T. ve Bennett, J., 2004, Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does, *Journal of Experimental Botany*, 55 (406), 2213-2218.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. ve Shinozaki, K., 1999, A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor, *The plant cell*, 11 (9), 1743-1754.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. ve Thomas, G., 2003, Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)—differential response in salt-tolerant and sensitive varieties, *Plant Science*, 165 (6), 1411-1418.
- Van Breusegem, F. ve Dat, J. F., 2006, Reactive oxygen species in plant cell death, *Plant physiology*, 141 (2), 384-390.
- Wang, Y. ve Nii, N., 2000, Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75 (6), 623-627.

- Wasti, S., Manaa, A., Mimouni, H., Nsairi, A., Ibtissem, M., Gharbi, E., Gautier, H. ve Ben Ahmed, H., 2017, Exogenous application of calcium silicate improves salt tolerance in two contrasting tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars, *Journal of plant nutrition*, 40 (5), 673-684.
- Weretilnyk, E. A., Bednarek, S., McCue, K. F., Rhodes, D. ve Hanson, A. D., 1989, Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons, *Planta*, 178 (3), 342-352.
- West, D. W., L. E. Francois, 1982, Effects of salinity on germination, growth and yield of cowpea.
- Wise, M. J. ve Tunnacliffe, A., 2004, POPP the question: what do LEA proteins do?, *Trends in plant science*, 9 (1), 13-17.
- Wu, C.-A., Yang, G.-D., Meng, Q.-W. ve Zheng, C.-C., 2004, The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress, *Plant and Cell Physiology*, 45 (5), 600-607.
- Wu, Y., Wang, Q., Ma, Y. ve Chu, C., 2005, Isolation and expression analysis of salt up-regulated ESTs in upland rice using PCR-based subtractive suppression hybridization method, *Plant Science*, 168 (3), 847-853.
- Wyn Jones, R. G., 1981, in *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*.
- Xiong, L., Schumaker, K. S. ve Zhu, J.-K., 2002, Cell signaling during cold, drought, and salt stress, *The plant cell*, 14 (suppl 1), S165-S183.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. ve Somero, G. N., 1982, Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science*, 217 (4566), 1214-1222.
- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan Terzi, E. S. ve Uruşak, B., 2010, Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri.
- Yokoi, S., Bressan, R. A. ve Hasegawa, P. M., 2002, Salt stress tolerance of plants, *JIRCAS working report*, 23 (01), 25-33.
- Zhou, S. F., Chen, X. Y., Xue, X. N., Zhang, X. G. ve Li, Y. X., 2007, Physiological and growth responses of tomato progenies harboring the betaine aldehyde dehydrogenase gene to salt stress, *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (5), 628-637.
- Zhu, J.-K., 2002, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annual review of plant biology*, 53 (1), 247-273.
- Zhu, J.-K., 2003, Regulation of ion homeostasis under salt stress, *Current opinion in plant biology*, 6 (5), 441-445.

EKLER

EK-1 Uygun bir başlık buraya yazılmalıdır.



EK-2 Uygun bir başlık buraya yazılmalıdır.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : MERVE KILIÇ
Uyruğu : TC.
Doğum Yeri ve Tarihi : SAMSUN 04.01.1993
Telefon : 05415780108
e-mail : mervekilic55@windowslive.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Atakum Teknik Lise, Atakum, Samsun	2011
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2015
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2017
Doktora	:	

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Aras , S., Kılıç, M., Arslan, E., Eşitken, A., ‘‘ Soğuk Katlama Süresince Kuş Kirazı (*Mazzard*) Tohumlarında Polipeptid Değişimi’’, Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 1-4 Eylül 2015, Erzurum.

Kılıç, M., Arslan, E., Khorshed, A.A., ‘‘ Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolated From Clinical Samples by Repetitive Extragenic Palindromic Elements Polymerase Chain Reaction (REP-PCR)’’, International Conference on Biological Sciences, 21-23 October 2016, Konya.

Kılıç, M., Arslan, E., Aras, S., Eşitken, A., ‘‘ The Effects of Calcium Silicate Application on the Expressions of *MdSOS1* and *MdNHX1* Genes in Apple Plant Under Salt Stress’’, International DNA Day and Genome Congress, 24-28 April 2017, Kırşehir, (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).