



**KURAKLIK STRESİ VE HUMİK ASİTİN  
EKMEKLİK BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.)  
BAZI GENLERİN mRNA İFADE SEVİYELERİ VE  
DNA KONFORMASYON DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ**

**Esra ARSLAN**

**Doktora Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı  
Prof. Dr. Güleray AĞAR  
2018  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KURAKLIK STRESİ VE HUMİK ASİTİN EKMEKLİK  
BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) BAZI GENLERİN mRNA İFADE  
SEVİYELERİ VE DNA KONFORMASYON  
DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ

Esra ARSLAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KURAKLIK STRESİ ve HUMİK ASİTİN  
EKMEKLİK BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.)  
BAZI GENLERİN mRNA İFADE SEVİYELERİ ve DNA  
KONFORMASYON  
DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Esra ARSLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 20/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora olarak oybirliği/oy çokluğu (5./5) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Sedat BOZARI

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .17./01./2019 tarih ve .03./...41..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2015/346

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### KURAKLIK STRESİ VE HUMİK ASİTİN EKMEKLİK BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) BAZI GENLERİN mRNA İFADE SEVİYELERİ VE DNA KONFORMASYON DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ

Esra ARSLAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Araştırmada, -6 bar ve -8 bar PEG6000 ile oluşturulan kuraklık stresi, absisik asit (ABA) (100 µM) ve humik asit (HA) (%10 (w/v)'luk HA solüsyonundan %1 oranında) uygulamalarının toleranslı (Aksel 2000 ve Kırkpınar 79) ve hassas (Atlı 2002 ve Kırmızı Kılçık) ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinde bazı biyokimyasal parametrelere, kuraklık genlerinin mRNA transkript seviyelerine ve DNA formları üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Biyokimyasal parametrelerden malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), total oksidan (TOS) ve total antioksidan durumu (TAS) seviye ölçümleri yapılmıştır. Kuraklık stresi ile ilgili olduğu bilinen TaSRG, TaCP, Sal1, Era1 ve TdPIP1 genleri ile miR172, miR396, miR397, miR398 ve miR408 hedef genlerinin sırasıyla AP2, GRF, lakkaz, CSD1/CSD2 ve plastosiyanın'ın mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca, ATR-FTIR spektrometrik ölçümler yapılarak kemometrik analizlerden hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ve temel bileşen analizi (PCA) metotları kullanılarak araştırmadaki uygulamalar sınıflandırılmış, kalitatif analizler ile DNA topolojik değişimleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, uygulanan kuraklık dozlarının MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinde artışa neden olduğu, ABA ve özellikle HA uygulamalarının ise MDA seviyesini azalttığı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını ise artırdığı belirlenmiştir. Toleranslı genotiplerin stres uygulamalarına karşı tolerans mekanizmalarını oksidan miktarlarını azaltan, antioksidan sistemlerini artıran tolerans mekanizmalarını daha fazla harekete geçirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışığımız genlerin ifadelerinin genotipe ve dokuya bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve yaptığımız promotör analizlerinde genlerin strese toleransın sağlanmasında ABA-bağımlı ya da ABA-bağımsız mekanizmalardan hangisini kullandığı saptanmıştır. Bu genlerden Sal1, Era1, lakkaz ve CSD1/CSD2 genlerinin toleranslı ve hassas genotipleri belirlemede biyoteknolojik olarak yararlı olduğu düşünülmektedir. Bunun yanısıra, stres uygulamaları ile DNA formlarının hassas genotiplerde B-DNA'dan Z-DNA'ya dönüşümü ile hipermetilasyonun, toleranslı genotiplerde ise B-DNA ve A-DNA formlarında artışın görülmesi ile demetilasyonun meydana geldiği, ABA ve HA uygulamalarının ise bu değişikliği düzenlediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, kuraklık stresinin bitkide oluşturduğu gerek biyokimyasal gerek DNA topolojisinde ve genlerde oluşturduğu düzensizliklerin ABA ile iyileştirilebildiği ancak humik asitin genler üzerindeki olumlu etkileri göz önüne alındığında ABA'ya alternatif olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

2018, 194 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Triticum aestivum*, kuraklık stresi, absisik asit, humik asit, Q-PCR, ATR-FTIR

## ABSTRACT

PH. D. Thesis

### **THE EFFECT OF DROUGHT STRESS AND HUMIC ACID ON mRNA EXPRESSION LEVELS OF SOME GENES AND DNA CONFORMATION CHANGES IN BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.)**

Esra ARSLAN

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AGAR

The research was aimed to determine the effects of the drought stress generated by -6 bar and -8 bar PEG6000, abscisic acid (ABA) (100  $\mu$ M) and humic acid (HA) (10% (w / v) 1% of the HA solution) treatments on some biochemical parameters, mRNA transcript levels of drought genes and the DNA forms on tolerant (Aksel 2000 and Kırkpınar 79) and sensitive (Atlı 2002 and Kırmızı Kılçık) bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) were measured from biochemical parameters. The mRNA transcript levels of TaSRG, TaCP, Sall1, Era1 and TdPIP1 genes known to be related to drought stress and the target genes of miR172, miR396, miR397, miR398 and miR408, respectively AP2, GRF, laccase, CSD1/ CSD2 and plastocyanine genes were determined with qRT-PCR. In addition, the treatments in the research were classified with Hierarchical Clustering Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) methods from chemometric analysis and DNA topological changes were determined with qualitative analyses by taking ATR-FTIR spectrometric measurements. According to the results, it was determined that the treated drought doses caused an increase in MDA and  $H_2O_2$  levels, whereas ABA and especially HA applications decreased MDA and increased  $H_2O_2$  levels. Tolerant genotypes have been found to provide tolerance mechanisms against stress treatments by decreasing oxidant amounts and increasing antioxidant systems. Also, the expression of the genes varied depending on genotype and tissue and it was determined whether the genes used ABA-dependent or ABA-independent mechanisms to provide tolerance to stress in our promoter analysis. Sall1, Era1, laccase and CSD1/CSD2 genes from these genes are thought to be biotechnologically useful in determining tolerant and sensitive genotypes. In addition, hypermethylation was occurred when DNA forms are transformed from B-DNA to Z-DNA in sensitive genotypes and demethylation was occurred when B-DNA and A-DNA forms were increased in tolerant genotypes, also ABA and HA treatments were regulated this change. As a result, it was determined that the irregularities of the biochemical, DNA topological and the genes that were caused by drought stress could be improved by ABA, but humic acid could be used as an alternative to ABA considering the positive effects on genes.

**2018, 194 pages**

**Keywords:** *Triticum aestivum*, drought stress, abscisic acid, humic acid, Q-PCR, ATR-FTIR

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji, Ziraat Fakóltesi Tarla Bitkileri Bitki Moleküler Genetiđi ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarlarında yürütölmüştür.

Çalışmalarım boyunca bana göstermiş olduğu anlayış, yardım ve yönlendirmelerinden dolayı saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını esirgemeyerek tezime katkıda bulunma nezaketini gösteren Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a, Sayın Dr. Ögr. Üyesi Emre İLHAN'a, Sayın Dr. Ögr. Üyesi Nihal şimşek ÖZEK'e, laboratuvar imkanlarını sunan Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na, tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji ile Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarlarında alışan hocalarım ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman arkamda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Esra ARSLAN**

**Aralık, 2018**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Bitki materyali .....	32
3.1.2. Kullanılan cihaz ve aletler .....	33
3.1.3. Kullanılan çözeltiler .....	34
3.2. Yöntem .....	34
3.2.1. Kullanılan çözelti ve solüsyonların hazırlanışı .....	34
3.2.1.a. Uygulamada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı .....	35
3.2.1.b. Biyokimyasal analizleri belirlemede kullanılan çözeltilerin hazırlanışı .....	36
3.2.1.c. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	37
3.2.2. Buğday genotiplerinin yetiştirilmesi ve PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları .....	39
3.2.3. Biyokimyasal testler .....	40
3.2.3.a. Lipid peroksidasyon (MDA) ölçümü .....	40
3.2.3.b. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ölçümü.....	41
3.2.3.c. Total oksidan (TOS) ölçümü .....	41
3.2.3.d. Total antioksidan (TAS) ölçümü.....	42
3.2.4. mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesi .....	43
3.2.4.a. RNA izolasyonu .....	43
3.2.4.b. RNA'ların kalitatif ve kantitatif tayini .....	43
3.2.4.c. cDNA sentezi.....	44

3.2.4.d. Primer seçimi ve dizaynı .....	44
3.2.4.e. qPCR ile gen ifade analizi .....	46
3.2.4.f. qPCR verilerinin analizi .....	47
3.2.5. DNA konformasyonlarının belirlenmesi .....	47
3.2.5.a. DNA izolasyonu .....	47
3.2.5.b. DNA'ların kalitatif ve kantitatif tayini .....	48
3.2.5.c. Buğday yaprak DNA'larına ait infrared (kızılötesi) spektrumlarının elde edilmesi .....	48
3.2.5.d. Spektral verilerin analizi .....	49
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>50</b>
4.1. Biyokimyasal Analizler .....	50
4.1.1. MDA seviyesinin belirlenmesi .....	50
4.1.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> seviyesinin belirlenmesi .....	56
4.1.3. Total oksidan (TOS) seviyesinin belirlenmesi .....	62
4.1.4. Total antioksidan (TAS) seviyesinin belirlenmesi .....	67
4.2. qPCR Analizleri .....	72
4.2.1. TaSRG, TaCP, Sal1, Era1 ve TdPIP1 genlerinin ifade analizleri .....	72
4.2.2. miR172, miR396, miR397, miR398 ve miR408 hedef genlerinin ifade analizleri.....	96
4.3. Infrared Spektroskopi Analizleri .....	119
4.3.1. Kemometrik analizler .....	119
4.3.1.a. Temel bileşen ve hiyerarşik kümeleme analizi.....	119
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>132</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>134</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>155</b>
EK 1. ....	155
EK 2. ....	161
EK 3. ....	165
EK 4. ....	167
EK 5. ....	173
EK 6. ....	175
EK 7. ....	176

EK 8. ....	181
EK 9. ....	184
EK 10. ....	190
ÖZGEÇMİŞ .....	195



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$^1\text{O}_2$	Tekli oksijen
A	Absorbans
AAO	Absisik aldehit oksidaz
ABA	Absisik asit
ABF	ABRE bağlayıcı faktörler
ABH1	ABA hipersensitivity 1/ABA yüksek hassasiyet 1
ABR1	ABA repressor 1/ABA baskılayıcı 1
ABRE	ABA-duyarlı element
ALK	Alkaloidler
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AO	Askorbat oksidaz
AP2/ERF	APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor/etilenden sorumlu bağlayıcı faktör elementi
AsA	Askorbik asit
AtFTA	Arabidopsis farnesiltransferaz A
ATP	Adenozin trifosfat
bZIP	Basic-domain leucine zipper/ bazik lösün fermuarlı
CAT	Katalaz
CCS1	Copper chaperone for SOD 1/ SOD1 bakır şaperonu
CE	Coupling elements/ bağlayıcı elementler
CK	Sitokinin
cm	Santimetre
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CP	Sistein proteaz
CRT	C-tekrar cis- elementleri
CSD	Copper superoksit dismutaz/bakır süperoksit dismutaz
Ct	Cycle Treshold/ döngü eşiği
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
Cu	Bakır

Cys	Sistein
DEPC	Dietil pirokarbonat
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRE	Dehidrasyona-duyarlı element
DREB	DRE-bağlanma proteini
Fe	Demir
fry1	Fiery1
g	Gram
GA	Gibberellin
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GRF	Growth Regulating Factors/ Büyüme Düzenleyici Faktörleri
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Glutasyon-S- transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HA	Humik asit
HCA	Hiyerarşik kümeleme analizi
HD-Zip	Homedomain lösün zipper transkripsiyon faktörü
HO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Perhidroksil radikali
IP3	İnositol 1,4,5-trisfosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Potasyum fosfat
KI	Potasyum iyodür
L	Litre
LAC	Lakkaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
MCSU	Molibdat kofaktör sülfüraz
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
mg	Miligram

ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
MYB	Myeloblastosis
MYC	Myelocytomatosis
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
ncRNA	Nonkoding RNA/ kodlamayan RNA
ng	Nanogram
NO	Nitrik oksit
NO <sub>3</sub> T	Nitrat taşıyıcıları
O	Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit radikali
OD	Okuma değeri
OH•	Hidroksil radikali
OŞK	Orta şiddette kuraklık
PA	Poliamin
PAP	3'-fosfoadenozin 5'-fosfat
PARE	RNA uçlarının paralel analizi
PCA	Temel bileşen analizi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG6000	Polietilen glikol
PIP	Plazma intrinsik proteinler
POX	Peroksidaz
RNA	Ribonükleik asit
RNAp	RNA polimeraz
RNaz	Ribonükleaz
RO•	Alkoksi radikali
ROT	Reaktif oksijen türleri
rRNA	Ribozomal RNA
SBP	Squamosa-promotör bağlanma proteini

SCL-6	Scarecrow benzeri transkripsiyon faktörü
SDR	Kısa zincirli dehidrogenaz
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
SPL7	Squamosa promotör binding protein- like7/ Squamosa promotör bağlanma benzeri proteini 7
TBA	Tiobarbiturik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TE	Transpozıbil elementler
TF	Transkripsiyon faktörleri
TOS	Total oksidan durumu
TR	Transkripsiyonel düzenleyiciler
VIGS	Virüs indüklü gen sessizleştirme
XRN	Ekzoribonükleaz
YŞK	Yüksek şiddette kuraklık
ZEP	Zeaksantin epoksidaz
ZFHD	Zinc finger home domain/Çinko parmak domaini
Zn	Çinko
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> Kuraklık stresinde ABA-bağımlı ve bağımsız yollarda yer alan transkripsiyon faktörleri .....	5
<b>Şekil 1.2.</b> Sal1 geni ve PAP sinyal yolağı.....	8
<b>Şekil 1.3. (a)</b> Triticeae’de abiyotik strese cevapta rol aldığı belirlenen miRNA ve hedef genleri <b>(b)</b> Abiyotik streste miRNA’ların hedefledikleri moleküller ...	10
<b>Şekil 1.4.</b> miR398 sinyal yolağı .....	14
<b>Şekil 1.5.</b> HA sinyal yolları.....	17
<b>Şekil 4.1.</b> Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki MDA miktarları (uMol/gr) ....	53
<b>Şekil 4.2.</b> Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki MDA miktarları (uMol/gr) .....	53
<b>Şekil 4.3.</b> Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarları (uMol/gr) .....	59
<b>Şekil 4.4.</b> Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarları (uMol/gr) .....	59
<b>Şekil 4.5.</b> Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TOS miktarları (umol/L) .....	64
<b>Şekil 4.6.</b> Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TOS miktarları (umol/L) ..	64
<b>Şekil 4.7.</b> Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TAS miktarları (mmol/L) .....	69
<b>Şekil 4.8.</b> Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TAS miktarları (mmol/L) ..	70
<b>Şekil 4.9.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki TaSRG geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta$ Ct).....	76
<b>Şekil 4.10.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki TaSRG geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta$ Ct).....	77
<b>Şekil 4.11.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki TaCP geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta$ Ct).....	81
<b>Şekil 4.12.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki TaCP geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta$ Ct).....	82

<b>Şekil 4.13.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki Sal1 geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	86
<b>Şekil 4.14.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki Sal1 geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	87
<b>Şekil 4.15.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki Era1 geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	90
<b>Şekil 4.16.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki Era1 geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	91
<b>Şekil 4.17.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki TdPIP1 geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	94
<b>Şekil 4.18.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki TdPIP1 geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	95
<b>Şekil 4.19.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR172 hedef geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	98
<b>Şekil 4.20.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR172 hedef geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	99
<b>Şekil 4.21.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR396 hedef geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	102
<b>Şekil 4.22.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR396 hedef geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ ).....	103

<b>Şekil 4.23.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR397 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).....	107
<b>Şekil 4.24.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR397 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).....	108
<b>Şekil 4.25.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR398 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).....	112
<b>Şekil 4.26.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR398 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).....	113
<b>Şekil 4.27.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR408 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).....	117
<b>Şekil 4.28.</b> -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR408 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).....	118
<b>Şekil 4.29.</b> Kırmızı Kılçık buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400 $cm^{-1}$ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği.....	121
<b>Şekil 4.30.</b> Atlı 2002 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400 $cm^{-1}$ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği.....	121
<b>Şekil 4.31.</b> Kırmızı Kılçık buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400 $cm^{-1}$ spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı .....	122

- Şekil 4.32.** Atlı 2002 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı ..... 122
- Şekil 4.33.** Kırkpınar 79 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği..... 123
- Şekil 4.34.** Aksel 2000 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği..... 124
- Şekil 4.35.** Kırkpınar 79 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı ..... 124
- Şekil 4.36.** Aksel 2000 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı. .... 125
- Şekil 4.37.** 1800-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde Kırmızı Kılçık kontrol grubuna ait DNA absorbans ve vektör normalizasyonu yapılmış ikincil türev spektrumu ..... 126
- Şekil 4.38.** Kırmızı Kılçık genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA, -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar ..... 127

<b>Şekil 4.39.</b> Atlı 2002 genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000 cm <sup>-1</sup> spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar .....	128
<b>Şekil 4.40.</b> Aksel 2000 genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000 cm <sup>-1</sup> spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar .....	130
<b>Şekil 4.41.</b> Kırkpınar 79 genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000 cm <sup>-1</sup> spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar .....	131

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Buğdayda kuraklık stresi ile ilgili genler ve fonksiyonları .....	6
Çizelge 1.2. Triticeae’de kuraklık stresine cevapta rol oynayan miRNA ve hedef bölgeleri .....	11
Çizelge 3.1. Fizyolojik elemelerde kullanılan buğday çeşitleri .....	32
Çizelge 3.2. -8 bar PEG6000 ve -6 bar PEG6000’e toleranslı ve hassas buğday genotipleri.....	33
Çizelge 3.3. Kullanılan cihazlar ve modelleri.....	33
Çizelge 3.4. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar .....	34
Çizelge 3.5. Uygulamalar ve kombinasyonları.....	40
Çizelge 3.6. cDNA Sentez Karışımı .....	44
Çizelge 3.7. qRT- PCR ile ifade düzeyleri belirlenen genlere ait primerler ve bağlanma sıcaklıkları .....	45
Çizelge 3.8. qRT- PCR ile ifade düzeyleri belirlenmeye çalışılan miRNA’ların hedef genlerine ait primerler ve bağlanma sıcaklıkları.....	46
Çizelge 4.1. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki MDA miktarları (uMol/gr).....	50
Çizelge 4.2. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki MDA miktarları (uMol/gr).....	51
Çizelge 4.3. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarları (uMol/gr).....	57
Çizelge 4.4. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarları (uMol/gr).....	57
Çizelge 4.5. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TOS miktarları (umol/L) ...	62
Çizelge 4.6. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TOS miktarları (umol/L) .....	63
Çizelge 4.7. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TAS miktarları (mmol/L) ..	67
Çizelge 4.8. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TAS miktarları (mmol/L).....	68

## 1. GİRİŞ

Her yıl %1,09 oranında artan dünya nüfusuna oranla yiyecek sıkıntısının artması dünyanın karşılaştığı en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir. FAO'nun 2018 yılı verilerine göre dünya nüfusunun yaklaşık %10,7'si yetersiz beslenme ve dolayısıyla açlık sorunu yaşamaktadır. Özellikle buğday başta olmak üzere mısır, çeltik gibi tarım ürünlerinin tarıma uygun arazilerde yetiştirilmesi ile açlık sorununun bir miktar iyileştirileceği düşünülmektedir. Yaklaşık 8000 yıl boyunca pek çok medeniyetin en önemli gıda ürünlerinden olan buğday, belirli derecede nem ve sıcaklık istememesi, özel toprak koşullarına gereksinim duymadan çok geniş arazilerde yetiştirilmesi, agronomik adaptasyon kabiliyeti, kışlık ve yazlık üretilebilmesi, depolanmasında kolaylık gibi pekçok nedenden ötürü 240 milyon hektarlık ekim alanıyla Dünya'da ve Türkiye'de en çok üretilen tahıldır (FAO 2018).

Ülkemizde yüksek orandaki buğday çeşitliliğine rağmen, son yıllarda verim ve üretiminde belirgin artışlar sağlanamamıştır. Bunun nedeninin, ekim alanlarının tarla alanları üst sınırına ulaşması ve üretimin kurak koşullarda yapılması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte buğday gibi ekonomik öneme sahip bitki türlerinin pek çok çevresel stres faktörlerine maruz kalması da gelişimini, verimini, hatta yaşamını tehlikeye sokan en büyük unsurdur.

Bitkiler hareket edemeyen canlılar olmaları nedeniyle buldukları yerin çevresel koşullarının optimum sınırlardan sapması durumunda, bu değişimin süresi ve şiddetine bağlı olarak bitkilerin normal metabolik faaliyetlerinde büyüme ve gelişme olaylarını olumsuz yönde etkileyen önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Bu duruma yol açan çevrenin her bir elemanına stres faktörü, bitkinin içine düştüğü bu tür durumlara da stres adı verilmektedir. Biyolojik stresin en pratik tanımı, bitkiler gibi biyolojik bir sistemin normal işleyişini engelleyen olumsuz bir kuvvet veya bir durumdur. Abiyotik (kuraklık, tuzluluk, ışık, sıcaklık, aşırı karbondioksit, ozon vb.) ve biyotik (böcekler, hayvanlar, patojenler vb.) olmak üzere 2 gruba ayrılan stres faktörlerinden biri olan kuraklık, genel anlamıyla toprağın içerdiği sınırlı miktardaki su ile bitkinin yaşamını

tehlikeye sokacak kadar uzun süren, ortalama yağış miktarından daha düşük olan meteorolojik bir kavram olarak tanımlanmaktadır (Kalefetoğlu and Ekmekçi 2005). Toprağın su tutma kapasitesi ve bitkilerin evapo-transpirasyon hızına bağlı olarak, kuraklık bitkiler için önemli bir tehdit unsuru oluşturabilmektedir. Buğday, kuraklığın olumsuz etkilerine karşı önlem alınması gereken tarımsal ürünlerin ilk sıralarında yer almaktadır. Araştırmalara göre, 2025 yılına kadar dünya nüfusunun yarısı su kıtlığının olduğu bölgelerde yaşayacaktır (WHO 2016). Mevcut suyun yaklaşık %92'sinin tarımsal üretim için kullanıldığı (Hoekstra and Mekonnen 2011) düşünülecek olursa su kıtlığının bir nebze iyileştirilebilmesi için kuraklığa dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesi ve kuraklığa toleranslı buğday ıslahı için kuraklık tolerans mekanizmalarının tam olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Diğer stres faktörlerinin etkilerini de artırabilme özelliğinden dolayı kuraklık; bitkileri morfolojik, fizyolojik ve hatta biyokimyasal olarak çeşitli yönlerden etkilemektedir (Nezhadahmadi *et al.* 2013). Kuraklık, hücre membran ve organel yapılarında değişikliklere, su ile ilgili olan biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde sorunlara neden olan doku dehidrasyonuna neden olabilmektedir. Ayrıca, uzun süreli stres durumunda reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi de artmaktadır. ROT'lar kısmen azaltılmış veya uyarılmış atmosferik oksijen formlarıdır. Normal şartlar altında bitkinin kloroplast, mitokondri ve peroksizom kısımlarında yan ürün olarak sürekli sentezlenen (Gill and Tuteja 2010) ancak stres koşullarında miktarları artan ROT'lar, hücre zarlarının fosfolipitlerini (özellikle doymamış yağ asitlerini), proteinleri, nükleik asitleri ve klorofili parçalayan, pek çok genin ve sinyal iletim yollarını indükleyen toksik ürünler olup oksidatif hasara yol açmaktadırlar (Gill and Tuteja 2010). ROT'ların serbest radikal [süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), perhidroksi radikali ( $HO_2$ ) ve alkoksi radikali ( $RO\cdot$ )] ile radikal olmayan (moleküler) [hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve tekli oksijen ( $^1O_2$ )] olmak üzere yarı ömürleri ve oksidasyon potansiyelleri farklı olan formları bulunmaktadır (Zhao *et al.* 2001). ROT miktarlarına bakılarak stresin hücrenin hangi kısımlarında ne boyutta bir hasara yol açtığı tespit edilebilmektedir. Kuraklık stresi altındaki pek çok bitki türünde lipid peroksidasyonunun belirleyicisi olan malondialdehit (MDA) ölçümü yapılarak buğdayda (Liu *et al.* 2013), pamukta (Zhang

*et al.* 2014), meyanda (Zhang *et al.* 2018), mısırdada (Correa de Souza *et al.* 2014), arpada (Kamran *et al.* 2015) stresin etkileri belirlenmiştir.

Bitkiler, artan ROT üretimine karşı oksidatif hasardan korunmak için stratejiler geliştirmişlerdir. Bir bitkide oksidatif strese karşı ilk savunma hattı, ROT üretiminin önlenmesidir. ROT oluşuktan sonra hasarı en aza indirmek için etkin bir şekilde detoksifikasyon mekanizmaları devreye girmektedir. Antioksidan enzimler, bu mekanizmaları katalizleyen veya ROT'un doğrudan uzaklaştırılmasında rol oynayan ve kontrolsüz oksidasyon basamaklarını engelleyen enzimlerdir (Gratão *et al.* 2005).

Bitkilerde antioksidan savunma sistemleri; enzimatik [(süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX), monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidro askorbat redüktaz (DHAR), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon-S- transferaz (GST)] ve enzimatik olmayan [(askorbik asit (AsA), glutatyon (GSH), fenolik bileşikler, alkaloidler, protein olmayan amino asitler, prolin ve  $\alpha$ -tokoferoller)] savunma sistemleri şeklinde 2 gruba ayrılmaktadır. Her iki grupta, ROT'ları temizleyerek kontrolsüz oksidasyonlara neden olan sinyal yollarını kontrol ederek bitki hücrelerini oksidatif hasarlardan korumaktadırlar (Gill and Tuteja 2010).

Stres esnasında bir taraftan miktarı artan ROT'ların antioksidan enzimlerle temizlenmesi devam ederken, diğer taraftan bitkide farklı koruma mekanizmaları da geliştirilmektedir. Su stresine karşı verilen ilk yanıt, fotosentez oranlarının azaltılması ve gelişimin sürgünden köklere doğru kaymasıdır (Praba *et al.* 2009). Bu değişim, bitkinin su alım kapasitesinde bir artışa yol açmaktadır. Osmotik stresin zamanla şiddetlenerek artmasına (Munne Bosch and Alegre 2004) ve bu süreçte bitkinin aklımasyona uğrayarak su dengesini düzenlemek için hem içsel hem de dışsal değişikliklere yol açmasını sağlamaktadır. Bitkiler genel olarak membranlarını ve proteinlerini koruyarak, oluşan hasarı onararak, ilgili genlerini aktive ederek ve diğer eşzamanlı streslere karşı kendilerini koruyarak olumsuz koşullara uyum sağlayabilirler. Hücredeki su kaybını önleyen çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Örneğin, prolin, fruktan gibi osmolitler dehidrasyon süresince hücredeki turgoru dengede tutarak, protein ve lipit

stabilizasyonunu sağlayarak bu işi üstlenirken, iyon kanalları ve akuaporin gibi taşıyıcı proteinlerde bariyer görevi üstlenerek hücrenin su çıkışını önlemektedirler (Munne Bosch and Alegre 2004).

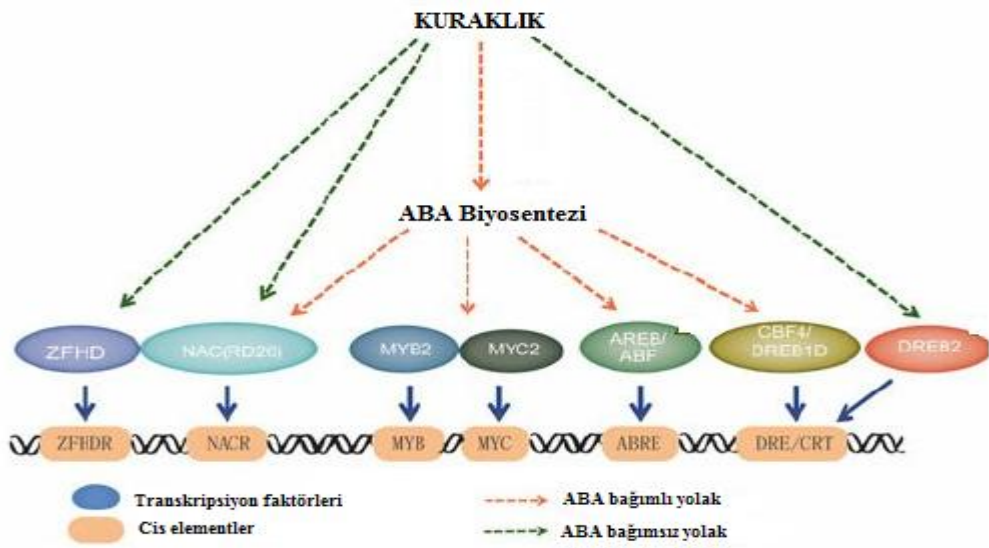
Stres hormonu olarak bilinen absisik asit (ABA), bitki ile su arasındaki ilişkiyi düzenleyen önemli bir fitohormon olup, aynı zamanda strese cevabın düzenleyicisidir (Taiz and Zeiger 2008). ABA, kuraklık sırasında aşırı üretilmekte ve ilk sentezlendiği yer olan köklerden gövde ve yapraklara taşınarak su kaybını önlemek için stomaların kapanmasına neden olurken (Yordanov *et al.* 2003; Osakabe *et al.* 2014) aynı zamanda pek çok genin indüklenmesine yol açmaktadır. Birçok çalışmada stres altındaki bitkilere dışarıdan ABA uygulamasının kuraklıkla ilgili olan bazı genleri aktive ettiği bazılarını ise etkilemediği görülmüştür (Khan *et al.* 2012). Bu yüzden kuraklığa karşı verilen yanıtın transkripsiyonel düzeyde transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle iki ayrı mekanizma (ABA-bağımsız ve ABA-bağımlı yollar) ile düzenlendiği öne sürülmüştür (Şekil 1.1) (Shinozaki and Shinozaki 2005; Budak *et al.* 2013).

ABA-bağımsız yollar, erken stres yanıtlarında yüksek seviyelerde ABA gerektirmeyen genleri ve genellikle koruyucu proteinleri içermektedir. ABA-bağımsız yollarda yer alan genler, kuraklıktan sorumlu element (DRE) ve C-tekrar (CRT) cis-elementler ile DRE-bağlanma proteini (DREB) ve Zinc finger home domain (ZFHD) transkripsiyon faktörlerinin kontrolündedir (Liu *et al.* 2018).

ABA bağımlı yollar, endojen ABA birikimini gerektiren genler ile antioksidan ve osmoprotektan mekanizmada görev alan yapıları içermektedir. Cis-element analizinde, ABA-bağımlı kuraklıkla ilgili birçok genin, promotör bölgelerinde ACGT dizilerine sahip, korunmuş ABA-duyarlı element (ABRE) içerdiği belirlenmiştir (Uno *et al.* 2000). Bu genlerin ifadesi çoğunlukla ABRE bağlayıcı proteinler (AREB) veya ABRE bağlayıcı faktörler (ABF) içeren (basic-domain leucine zipper/ bazik lösün fermuarlı) (bZIP) transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir (Uno *et al.* 2000; Fujita *et al.* 2013). Myelocytomatosis (MYC) ve Myeloblastosis (MYB) transkripsiyon faktörleri de

bu yolda yer alan ve hedef genlerin ekspresyonunu aktive eden transkripsiyon faktörlerindedir.

Ek olarak, NAC transkripsiyon faktörü, hem ABA'ya bağımlı hem de ABA-bağımsız sinyallemede, kuraklık stresi altında önemli rol oynamaktadır (Hu *et al.* 2006).



**Şekil 1.1.** Kuraklık stresinde ABA-bağımlı ve bağımsız yollarda yer alan transkripsiyon faktörleri (Yin *et al.* 2014)

Kuraklık stresi süresince pek çok genin aktive olduğu bilinmektedir. Transkripsiyonel düzeyde kuraklık stresi ile indüklenen bazı genler yakın zamanda çeşitli türlerde tanımlanmıştır. Bu genlerin fonksiyonları, hücrelerin kuraklığa karşı korunmasında rol alan ve benzer sekans homolojisine sahip olduğu bilinen proteinlerin fonksiyonlarından yola çıkarak belirlenmiştir. Bu genler 2 grupta toplanmaktadır. Birinci grupta; membranlar boyunca suyun hareketini sağlayan su kanalı proteinleri, çeşitli osmoprotektanların biyosentezi için gerekli enzimler (şekerler, Pro- ve Gly-betain), makromolekül ve membranları koruyabilen proteinler (LEA proteinler, antifriz proteinleri, şaperonlar ve mRNA bağlayıcı proteinler), protein dönüşümü için proteazlar (tiyol proteazları, Glp proteaz ve ubikuitin) ve detoksifikasyon enzimleri (glutatyon S-transferaz, çözünür epoksit hidrolaz, katalaz ve süperoksit dismutaz) gibi stres toleransında işlev gören protein genleri yer almaktadır. İkinci grup genler ise; sinyal

transdüksiyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan proteinleri, fosfolipid metabolizmasında rol oynayan ve stres tepkilerinde işlev gören protein kinazları, ilgili transkripsiyon faktörlerini ve enzim genlerini içermektedir (Zhang *et al.* 2010).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kuraklığın artması ile birlikte kuraklığa toleranslı genotiplerin yetiştirilmesi, moleküler biyolojik, fonksiyonel genomik ve transgenik teknolojilerindeki hızlı gelişmeler kuraklığa bağlı çalışmaları kolaylaştırmış, ilgili genlerin ve gen bölgelerinin tanımlanmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Budak *et al.* (2013), buğdayda kuraklık stresi ile ilgili genler ve fonksiyonlarını farklı çalışmalardan derlemişlerdir (Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** Buğdayda kuraklık stresi ile ilgili genler ve fonksiyonları (Budak *et al.* (2013))

<b>Gen</b>	<b>Fonksiyonu</b>
TaPIMP1	Transkripsiyon faktörü: R2R3 tip MYB TF
TaSRG	Transkripsiyon faktörü: <i>Triticum aestivum</i> tuz yanıt geni
TaMYB3R1	Transkripsiyon faktörü: MYB3R tip MYB TF
TaNAC2a	Transkripsiyon faktörü: Bitkiye özgü NAC
TaMYB33	Transkripsiyon faktörü: R2R3 tip MYB TF
TaWRKY2	Transkripsiyon faktörü: WRKY tip TF
TaWRKY19	Transkripsiyon faktörü: WRKY tip TF
TdicDRF1	Transkripsiyon faktörü: DRE bağlanma proteini
TaABC1	Kinaz: protein kinaz ABC1 (BC1 kompleksinin aktivitesi)
TaSnRK2.4	Kinaz: SNF1 tip serin/treonin protein kinaz
TaSnRK2.7	Kinaz: SNF1 tip serin/treonin protein kinaz
TdTMKP1	Fosfataz: MAP kinaz fosfataz
TaCHP	CHP'ce zengin çinko parmak proteini
TaCP	Protein degradasyonu: sistein proteaz
TaEXPB23	Hücre duvarının genişlemesi: expansin
TaL5	5S ribozomal RNA'nın nükleositoplazmik taşınması: ribozomal L5 geni
Sal 1	ABA bağımlı ve ABA bağımsız mekanizmanın negatif düzenleyicisi: İnositol polifosfat 1 fosfataz
Era 1	ABA düzenlenmesi
TdicAtg8	Otofaj: Otofaj geni
TDPIP1; TDPIPI2	Koruyucu protein: Plazma membran intrinsik proteini
TdicTMPIT1	Otofaj: İntegral transmembran protein
TaSIP	Tuz stresi ile indüklenen protein: SOS sinyali düzenleyicisi

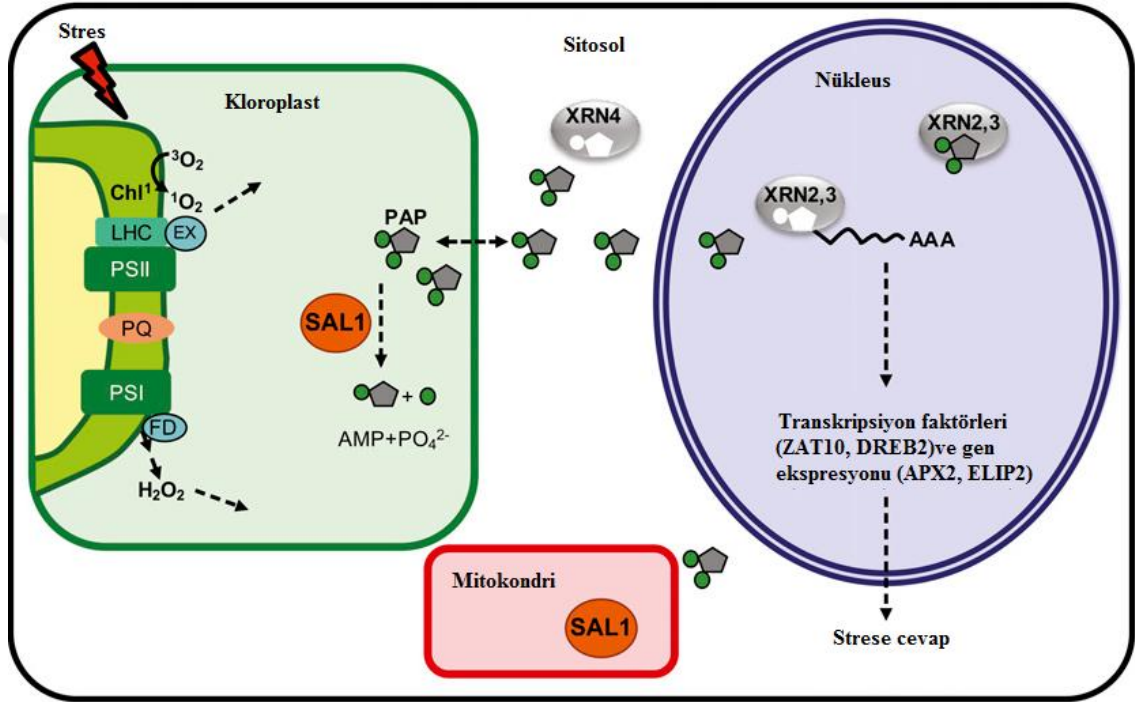
Araştırmamızda Çizelge 1.1’de verilen genlerden TaSRG, TaCP, Sal1, Era1 ve TdPIP1’in ifade düzeylerine bakılmıştır. Bu genlerle ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

TaSRG geni; tuza yanıt transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. ABA-bağımlı ve bağımsız yollarda yer alan transkripsiyon faktörlerine ek olarak, yeni keşfedilen bir transkripsiyon faktörüdür (He *et al.* 2011). İlk kez çeltikte ve Arabidopsis’te tanımlanan bu genin homoluğu da buğdayda tanımlanmıştır (Xiaoliang *et al.* 2011). Esas olarak, tuzlu topraklarda yetişen bitkilerde tuz toleransını artıran bir transkripsiyon faktörüdür (He *et al.* 2011). Ancak kuraklık, soğuk (He *et al.* 2011), sıcak ve ağır metal streslerinde de (Ergün *et al.* 2014) ifadesinin değiştiği belirlenmiştir.

TaCP geni; bir sistein proteazdır (CP). CP’ler yaklaşık 21-30 kDa’lık moleküler kütleyle sahip olan ve tüm canlı organizmalarda bulunan proteinlerdir. CP’ler birçok biyokimyasal süreçten sorumludur. Tohum oluşumu, bitki gelişimi, senesens ve apoptoziste görev alan CP’lerin esas rolü peptitleri ve proteinleri metabolik degradasyona uğratarak strese yanıtta protein remobilizasyonunu sağlamaktır (Grudkowska and Zagdanska 2004). CP’lerin bu aktivitesini gerçekleştirmesi, uygun gen transkripsiyonu, proteaz sentezi ve degradasyon oranına ve de spesifik inhibitörlerin düzenlenmesine bağlıdır. Buğdayda, iyi sulanan bitkilere kıyasla kuraklığa maruz kalan bitkilerde hücre içi CP’lerin aktivitesinde artışın gözlenmesi bu genin kuraklıkta miktarının arttığına göstergesidir (Zagdanska and Wisniewski 1996; Khanna Chopra *et al.* 1999).

Stres sinyalinin negatif düzenleyicisi olarak tanımlanan Sal1 geni, bitkilerde strese cevapta yakından ilgilidir. Sal1, hem 3’(2’), 5’-bisfosfat nükleotidaz (3’-fosfoadenozin 5’-fosfat) (PAP) hem de inositol polifosfat 1-fosfataz aktiviteleri olan bifonksiyonel bir enzimi kodlamaktadır (Quintero *et al.* 1996). Kuraklık stresi ile birlikte aktive olan Sal1 geni substratı olan PAP birikimini indüklemekte, kloroplasttan nükleusa taşınan PAP, strese cevap genlerini inaktive etmektedir (Şekil 1.2). Sal1 geni nükleotidaz aktivitesinin, RNA susturulmasını düzenleyen posttranskripsiyonel mekanizmadan

sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Gy *et al.* 2007). Fakat nükleotidaz aktivitesinin streste gen regülasyonuna katkısı henüz bilinmemektedir. Arabidopsis'te yapılan farklı çalışmaların tamamında Sal1'in yokluğunda kuraklığa tolerans artmıştır (Wilson *et al.* 2009; Estavillo *et al.* 2011; Hirsch *et al.* 2011).



**Şekil 1.2.** Sal1 geni ve PAP sinyal yolağı (Estavillo *et al.* 2011)

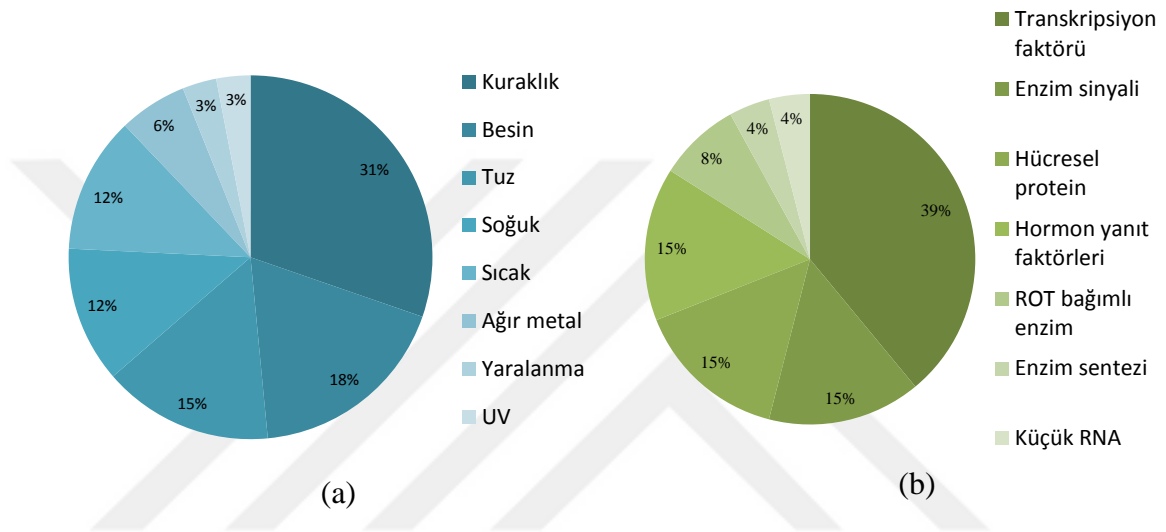
Era1 geni; protein farnesilasyonunda görev alan farnesiltransferaz enziminin substrat spesifitesini belirleyen  $\beta$  alt ünitesini kodlamaktadır. Kuraklık stresi boyunca, ABA, bekçi hücrelerindeki iyon taşınımını değiştirerek stomanın açılmasına engel olmaktadır. Bu durum bitkinin transpirasyon yoluyla su kaybını önlemektedir. Stoma iletkenliğindeki azalma protein farnesilasyonu yoluyla da olabilmektedir. Protein farnesilasyonu membran lipitleri ve sinyal proteinleri arasındaki iletişimi düzenleyen posttranslasyonel bir modifikasyondur. Farnesilasyon, bekçi hücrelerinde ABA sinyal yolunun negatif düzenleyicisidir. Bitkilerde protein farnesilasyonu, ABA-bağımlı kuraklığa yanıtın verilmesi ile en iyi şekilde tanımlanmıştır (Cutler *et al.* 1996; Pei *et al.* 1998). Arabidopsis'te Era1'in fonksiyonunu yitirmesi ile sitosolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu

artmış, yapraklardaki transpirasyon hızı azalmış, kuraklık boyunca kuruma olayı yavaşlamıştır (Allen *et al.* 2002).

Su kanalları olarak bilinen akuaporinler (plazma intrinsik proteinler; PIP) korunmuş majör yapısal proteinlerden olup, özellikle plazma ve intraselüler membranlarda bol bulunurken, toplam membran proteinlerinin %5-50'sini oluşturmaktadırlar (Karlsson *et al.* 2003; Maurel *et al.* 2008). Yaklaşık 20-35 kDa ağırlığında olup (Johansson *et al.* 2000; Siefritz *et al.* 2002), 240-323 aminoasit uzunluğundadırlar (Quigley *et al.* 2001). Akuaporinler pek çok gen tarafından kodlanmaktadırlar. İlk olarak Arabidopsis'te daha sonra mısır, çeltik ve domateste keşfedilen akuaporin genleri allohexaploid bir tür olmasından ve genomuna henüz ulaşılmasından dolayı buğdayda tam olarak keşfedilememiştir. Akuaporin genlerinden biri plazma membran intrinsik proteini olan TdPIP1 genidir. Şiddetli kuraklık veya tuza maruz kalan bitkilerde hücreden hücreye su transferinde bir artış gözlenirken, membran proteinleri bitkinin hızlı solmasını önlemek için mevcut su durumunun korunmasını sağlamaktadırlar (Aharon *et al.* 2003).

Son yapılan çalışmalarda, bitkilerin strese cevabında pekçok genin ifade edilmesinin yanısıra miRNA'ların da strese cevapta etkin rol oynadıkları bilinmektedir (Akdogan *et al.* 2016). Bitki miRNA'ları; 21-24 nükleotid uzunluğunda, korunmuş, kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) sınıfında yer alıp herhangi bir proteini kodlamayan ancak gen ekspresyonunu düzenlemede rol oynayan küçük RNA molekülleri grubudur (Cech and Steitz 2014; Morris and Mattick 2014). Bu düzenlemeyi posttranskripsiyonel degradasyon, translasyonun baskılanması (Jones Rhoades *et al.* 2006; Rogers and Chen 2013), metilasyon (Chellappan *et al.* 2010; Wu *et al.* 2010) veya histon modifikasyonu (Chuang and Jones 2007; Singh and Campbell 2013) aracılığıyla yapmaktadırlar. Bitkilerde çeşitli biyolojik süreçlerde etkin rol oynadıkları bilinmektedir. Bu biyolojik süreçler arasında organ gelişimi (Aukerman and Sakai 2003), hormon sinyalleme (Mallory *et al.* 2005), patojenlere karşı savunma (Navarro *et al.* 2006) ve abiyotik strese yanıt (Sunkar and Zhu 2004; Sunkar *et al.* 2007; Lu and Huang 2008; Eldem *et al.* 2013) bulunmaktadır. Bu abiyotik stresler tuzluluk (Li *et al.* 2011), kuraklık (Zhao *et al.* 2007; Covarrubias and Reyes 2010; Eldem *et al.* 2012), soğuk (Zhou *et al.* 2008) ağır

metaller (Huang *et al.* 2009) besin stresleri (Lu and Huang 2008) vb. olabilmektedir. Şekil 1.3 (a)'da Triticeae üyelerinde en çok çalışılan stres çeşitlerinde tanımlanan miRNA ve hedef genlerinin yüzde değerleri, Şekil 1.3 (b)'de ise abiyotik strese cevapta miRNA'ların hedefledikleri farklı protein ve moleküllerin yüzdeleri verilmiştir (Alptekin *et al.* 2017).



**Şekil 1.3. (a)** Triticeae'de abiyotik strese cevapta rol aldığı belirlenen miRNA ve hedef genleri **(b)** Abiyotik streste miRNA'ların hedefledikleri moleküller (Alptekin *et al.* 2017)

Kuraklık stresi cevabında yer alan miRNA düzenleyici ağlar hakkında daha fazla bilgi edinmek için miRNA'ların hedefleri belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı miRNA ailesinin sadece birkaç baz ile farklılık gösteren farklı üyeleri farklı mRNA transkriptlerini hedefleyebilir ve farklı yolların düzenlenmesinde görev alabilmektedirler. Bu gibi miRNA'ların, ilgili hedefleriyle birlikte ifadesi, stres koşulları altında farklılık gösterebilmektedir (Kumar *et al.* 2014; Liu *et al.* 2015; 2016). Hedef genleri ile birlikte stres altında farklı şekillerde ifade edilen miRNA'ların tanımlanması, bu küçük riboregülatörlerin strese karşı bitkinin dayanıklı kalmasındaki rolü açısından kritik öneme sahiptir. Korunan ve korunmayan miRNA'ların hedef tercihi de farklılık gösterebilir. Kimi miRNA'lar biyosentetik ve katabolik süreçlerde görev alan enzimleri, transport ve protein modifikasyonu gibi metabolizmada işlev gören proteinleri hedef alırken, kimi korunmuş miRNA'lar stresle ilişkili transkripsiyon faktörlerini hedeflemektedirler.

Yüksek verimli sekanslama teknolojilerinin geliştirilmesiyle, Degradome Sequencing veya PARE (RNA uçlarının paralel analizi) yöntemleri ile abiyotik strese rol alan miRNA hedeflerinin doğru seçimi yapılabilmektedir (German *et al.* 2008). Bu yöntemi kullanarak, Arabidopsis (Addo Quaye *et al.* 2008), çeltik (Li *et al.* 2010), soya fasulyesi (Shamimuzzaman and Vodkin 2012) ve buğdayda (Alptekin *et al.* 2017) çok sayıda miRNA hedef geni başarıyla tanımlanmıştır. Triticeae'nin farklı üyelerinde kuraklık stresine cevapta tanımlanan miRNA ve hedef bölgeleri Çizelge 1.2'de verilmiştir (Alptekin *et al.* 2017).

**Çizelge 1.2.** Triticeae'de kuraklık stresine cevapta rol oynayan miRNA ve hedef bölgeleri (Alptekin *et al.* 2017)

miRNA	Organizma	Hedef bölge
miR1432	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i> , <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> , <i>T. aestivum</i>	Fenil alanin tRNA sentetaz benzeri
miR1450	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i>	Mn superoksit dismutaz
miR156	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i> , <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>H. vulgare</i>	Squamosa-promotör bağlanma proteinine (SBP) benzer transkripsiyon faktörü
miR159	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> , <i>T. aestivum</i>	MYB transkripsiyon faktörü
miR166	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>H. vulgare</i>	Homedomain lösin zipper (HD-Zip) transkripsiyon faktörü
miR171	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>H. vulgare</i>	Scarecrow benzeri (SCL-6) transkripsiyon faktörü
miR172	<i>T. aestivum</i> , <i>H. vulgare</i>	Apetela2 benzeri etilenden sorumlu transkripsiyon faktörü
miR1867	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i>	DUF1242 superfamily
miR396	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i> , <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> , <i>H. vulgare</i>	Growth regulating factor (Büyüme düzenleyici faktörü) benzeri (GRF) transkripsiyon faktörü
miR397	<i>T. aestivum</i>	Lakkaz, bakır oksidaz domaini
miR398	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i> , <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>H. vulgare</i>	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
miR408	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> , <i>H. vulgare</i>	Supredoksin ve fitosiyenin ile mavi bakır proteinleri içeren Cu- bağlanma domaini
miR474	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i>	Kinesin
miR528	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i>	Plantasiyanin benzeri
miR894	<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicocoides</i>	Protein fosfataz PP2A-4 benzeri

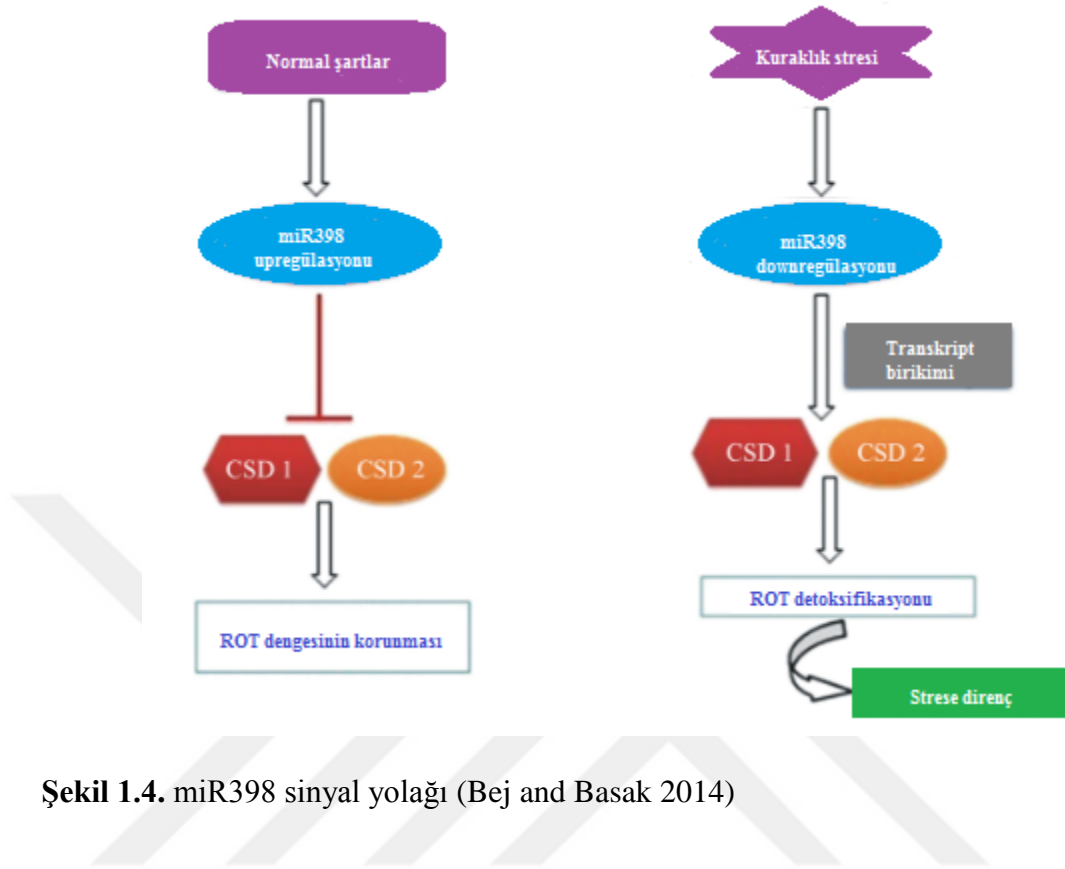
Hedef bölgeleri ve fonksiyonları tanımlanan bu miRNA'lerden miR172, miR396, miR397, miR398 ve miR408'in hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri bu çalışmada incelenmiştir.

İlk olarak Arabidopsis'te tanımlanan mir172'nin (Park *et al.* 2002) beş paraloğunun olduğu (miR172a-e) ve bitkilerdeki faz geçişlerinin düzenlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Wu *et al.* 2009; Huijser and Schmid 2011). Tohum çimlenmesi, tomurcuklanma, çiçeklenme ve meyve olgunlaşması gibi süreçlerde görev alan etilenin sinyal mekanizmasında çevresel stres esnasında strese cevabın düzenlenmesinde rol alan bir transkripsiyon faktörü superfamilyası bulunmaktadır. APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor (etilenen sorumlu bağlayıcı faktör elementi) (AP2/ERF) transkripsiyon faktörü monokotiller içerisindeki en büyük superfamilyalardan biridir (Singh *et al.* 2002) ve miR172 tarafından hedeflenmektedir (Aukerman and Sakai 2003; Chen 2004). Transgenik çeltikte yapılan moleküler ve genetik araştırmalarından elde edilen bulgular, çeltikte AP2/ERF genlerinin aşırı ekspresyonunun, transgenik bitkilerin kuraklık stresine karşı toleransını artırdığını göstermiştir (Pan *et al.* 2012).

miR396; (GRF) (Growth Regulating Factors/ Büyüme Düzenleyici Faktörlerini hedef olarak yaprak boyutunu düzenlemektedir (Jones Rhoades and Bartel 2004). GRF'ler, bitki spesifik transkripsiyon düzenleyicilerinin bir sınıfıdır ve miR396'nın direkt hedefleridir. miR396'nın GRF hedeflerinin seviyelerini kontrol ederek yaprak gelişiminde rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Liang *et al.* 2013). Bir GRF proteini QLQ ve WRC domainleri olmak üzere iki bölgeden oluşmaktadır. QLQ domaini, protein etkileşmesinden sorumlu iken; WRC domaini, fonksiyonel bir nükleer lokalizasyon sinyali ve DNA bağlanması görev yapan bir çinko-parmak motifi içermektedir (Kim *et al.* 2003). miR396'nın aşırı ifadesi ile GRF genlerinin ifadesi baskılanmış ve pistil anomalilerine neden olmuştur (Liu *et al.* 2009). Bunun yanısıra miR396'nın promotör bölgesinde ABRE'nin (ABA-response elements/ ABA-yanıt elementleri) olması, bu miRNA'nın pekçok stres cevap mekanizmasıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir (Jia *et al.* 2009).

miR397; lakkaz enzimini hedeflemektedir. Bitki lakkaz (LAC) enzimleri, mavi bakır oksidaz ailesine aittir ve monolignolleri lignine dönüştürmektedir (O'Malley *et al.* 1993; Gavnholt and Larsen 2002). Lakkaz, genellikle yüksek yapılı bitkilerde bulunurken, bitkilerdeki damarlanma sistemlerinin daha iyi anlaşılması için monokotil ve gymnospermlere aktarılmıştır. Yapılan çalışmalarda biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bitkilerin lignin bileşimini değiştirebildiği, ekspresyonu artan bazı lakkaz genlerinin flavonoidlerin oksidasyonuna katıldığı, bu da lakkazın bitki büyümesinde ve savunma yanıtlarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Pourcel *et al.* 2007; Turlapati *et al.* 2011). Ayrıca bitkilerde ksilemlere su taşımada görevli olan ve sekonder hücre duvarının yapısına katılan ligninin, farklı stres şartlarında farklı kompozisyonlar taşıdığı bilinmektedir (Moura *et al.* 2010). Fan *et al.* (2006) mısır bitkisinin köklerinin su stresi altındaki bazal kısmının, apikal bölgeye göre büyümede daha büyük bir azalma gösterdiğini ve bunun nedenin bazal bölgede hücre duvarı uzayabilirliğini ve hücre duvarı genişlemesini azaltan sertleştirilmiş lignin birikimi ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir.

miR398, stres esnasında miktarı artan ROT'lara karşı üretilen antioksidan enzimlerden biri olan SOD'ların bakır-çinko metal kofaktörü içeren sitoplazmada CSD1 (copper superoksit dismutaz/bakır süperoksit dismutaz) ve kloroplastta CSD2 izozimlerini hedeflemektedir. miR398 ve CSD1 ve CSD2 hedef bölgeleri dikotiledon ve monokotiledonlu bitkilerde korunmuştur (Jones Rhoades and Bartel 2004; Sunkar and Zhu 2004; Sunkar *et al.* 2005). Stres süresince miR398 downregüle olurken, CSD1 ve CSD2 mRNA transkriptleri birikmekte, bu da oldukça toksik olan süperoksit radikallerinin birikimini azaltmaktadır (Şekil 1.4). miR398'in CSD1 ve CSD2 genlerini hedeflediği miRNA yolu ve CSD1 ve CSD2 regülasyonu arasında doğrudan bir bağlantı olduğu pek çok araştırmacı tarafından desteklenmiştir (Rhoades and Bartel 2004; Sunkar and Zhu 2004; Sunkar *et al.* 2005).



Şekil 1.4. miR398 sinyal yolağı (Bej and Basak 2014)

miR408 ise bitkide bakır homeostazının sağlanmasında rol alan bir gendir. Hedef geni plantasiyanin ve plastosiyanindir. Arabidopsis'te normal metabolizmada miktarı minimum iken, Cu eksikliğinde maksimuma ulaşmıştır (Yamasaki *et al.* 2007, 2009; Abdel Ghany and Pilon 2008). Cu eksikliğine maruz kalan bitki, strese cevap olarak SPL7 (Squamosa promoter binding protein- like7/ Squamosa promotör bağlanma benzeri proteini 7) transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği spesifik sinyal yollarını kullanabilmektedir. SPL7, miR408 promotöründe GTAC motifine bağlanarak, bitki büyümesi ve gelişiminde rolü olan miR408'in görevine devam etmesini sağlamaktadır. Sadece Cu stresinde değil mekanik strese (Lu *et al.* 2005), dehidrasyon stresinde (Li *et al.* 2010) ve kuraklıkta da (Kantar *et al.* 2010) miR408'in ifadesinin artması; bu genin stres sinyallerini entegre eden genel bir merkez olduğunu düşündürmüştür. Bu stres koşulları altında miR408'in indüklenmesiyle Cu proteinlerini kodlayan transkriptlerin birikimi engellenerek hücrel Cu'nun plastosiyanine dönüşümü gerçekleşmekte, böylelikle fotosentezin korunması sağlanmaktadır (Burkhead *et al.* 2009).

Abiyotik stres faktörlerinin gen ifadesinde neden olduğu değişimlerin yanı sıra, gen ifadesi DNA metilasyonu gibi kromatin yapısında meydana gelen epigenetiksel değişikliklerden de etkilenmektedir. Çevresel stres etmenleri tüm genomda sitozin metilasyonunda önemli değişikliklere neden olmaktadır. Bitkiler bu koşullara uyum sağlamak zorunda olduğundan DNA nükleotid dizisinde herhangi bir değişim olmadan metilasyona uğrayarak genomik plastisitesini korumaktadırlar (Tan 2010). Stresin neden olduğu metilasyon DNA formlarında değişikliğe yol açmaktadır. DNA omurgasının esas yapısı, doğada en çok bulunan form olan B-DNA formudur. Ancak stres şartları B-DNA formunun Z-DNA'ya dönüşümünü tetikleyebilmektedir. Oluşumuna sebep olan faktörler henüz tam olarak aydınlatılamasa da özellikle yüksek tuz konsantrasyonlarında hem metillenmiş hem metillenmemiş CpG bölgelerine sahip B-DNA'nın Z-DNA'ya dönüşümü gerçekleşmekte ve bu da genomik kararsızlıklara neden olmaktadır (Dumat *et al.* 2016).

Bitki gelişiminde, büyümesinde, ürün veriminde stresin sebep olduğu tüm olumsuzluklara karşın hayatta kalma mücadelesi veren bitkiler, sayısız mekanizmalar geliştirmiştir. Buna ilaveten tarımsal üretimde daha fazla ürün eldesi için toprak koşullarının iyileştirilmesi insan çabasına bağlıdır. Geçen yüzyılda tarımsal üretimdeki yoğunluk, sentetik gübreler gibi yenilenemeyen enerji kaynaklarından elde edilen ürünlerden kaynaklanmaktaydı (Canellas *et al.* 2015). Ancak, bu çözüm, ormanların azalması, toprak erozyonu, endüstriyel kirlilik, yüzey ve yer altı su kalitesindeki düşüşler ve biyoçeşitlilik kaybı gibi olumsuz durumlarla sonuçlanabilmektedir. Bu sorunlara karşı alınacak önlemlerden biri, hümik maddelere dayalı bitki biyo-uyarıcılarının kullanılmasıdır.

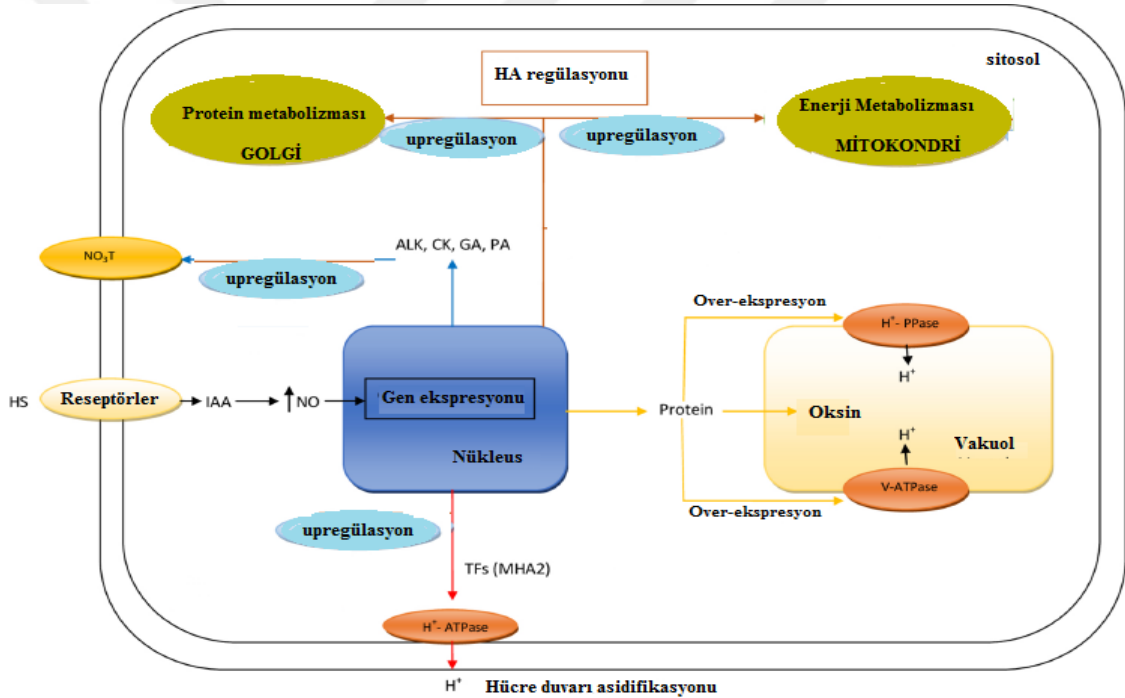
Organik karbon havuzu olarak bilinen hümik maddeler, topraktaki biyolojik veya kimyasal dönüşümler yoluyla bitki veya hayvan kalıntılarında oluşmaktadır (Canellas *et al.* 2015). Humus materyalleri ayrıca toprak bilimcileri tarafından hümik asitler (HA) olarak tanımlanmaktadır (Hayes 2006). Toprağa yumuşak ve kolay işlenebilir özellik kazandıran HA, killi, balçık ve sıkıştırılmış zeminleri parçalayarak yumuşak ve geçirgen bir yapı oluşturmaktadır. Toprağın solunum ve su tutma kabiliyetini artırarak, tohumun

çimlenme oranını artırmaktadır. Ayrıca HA'lar topraktan suyun buharlaşmasını azaltmaktadır. Bu özelliği kurak bölgelerde büyük önem taşımaktadır (Ay 2014). HA'nın büyüme, karbon ve azot döngüsünün düzenlenmesi ve ağır metallerin bitkilerde taşınması gibi önemli rolleri vardır (Piccolo *et al.* 1996). Ayrıca düşük moleküler ağırlığı sayesinde bitkiler tarafından kolaylıkla alınırken topraktaki makro ve mikro besin elementlerinin bitki kök bölgesinden uzaklaşmasını engelleyerek alınımını teşvik etmektedir. Optimum bitki gelişimi için uygun pH dengesini ayarlamaktadır. HA'lı topraklarda ürün veriminin %10-30 oranında arttığı kaydedilmiştir. Hormon benzeri moleküller gibi davranarak, bitki büyüme ve gelişiminde de etkin rol oynamaktadır (Nardi *et al.* 2002).

Tüm bu özelliklerinin yanı sıra, HA'ların abiyotik stres koşullarına karşı bitkilerde koruyucu rol üstlendiklerine dair bilgiler mevcuttur. Kuraklık altında *Agrostis palustris* ve *Festuca arundinacea*'da HA uygulamasının yaprak su içeriği, antioksidan yeteneği, kök ve gövde büyümesinde iyileştirici etkisi olduğu bulunmuştur (Zhang and Ervin 2008; Van Oosten *et al.* 2017). HA'nın stres esnasında büyüme üzerindeki iyileştirici etkisi, köklerdeki H-ATPaz'ın artan aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Leonard and Hodges 1973). Bu enzim, protonları hücre apoplastına taşımak ve mineralleri hücre zarının karşı tarafına taşımak için gerekli olan enerjiyi içeren elektrokimyasal gradientin oluşumundan sorumludur. Dolayısıyla, mineral alımını hızlandırmak köklerdeki büyümeyi teşvik etmektedir. Ayrıca HA, bitkilerde N alımını yolunda rol oynayan yapısal genler aracılığıyla N metabolizmasını düzenlemektedir (Colla *et al.* 2014). Nitratın taşınımı için kullanılan enerjiyi hidrolize eden plazma membranındaki H-ATPaz'ların uyarımı da yine HA tarafından tetiklenmektedir (Jindo *et al.* 2012).

HA uygulamasının en belirgin sonuçlarından biride hücre sinyalizasyonu ve hormonal kontrol ile ilişkili olan redoks homeostazisini sağlamasıdır. Bununla birlikte, antistres yanıtlarını düzenlemede ROT ve oksinler arasındaki bağlantıyı açıklayan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılabilen değildir (Tognetti *et al.* 2012). Ayrıca HA'nın nitrik oksit (NO) biyosentezini stimüle ettiği mısırdaki kanıtlanmıştır (Zandonadi *et al.* 2010). NO antioksidan özelliktedir ve ROT katalizi ile ilgili enzimlerin sentezinde sinyal görevi

üstlenmektedir. Çeşitli abiyotik streslerde (kuraklık, tuz, ağır metal) bitki direncinin korunmasında etkin rolü vardır (Siddiqui *et al.* 2011). Özellikle köklerde humik bileşenler NO-IAA sinyal yolağını ortaya çıkararak, ABA konsantrasyonunu artırmaktadır (Mora *et al.* 2014). Ayrıca ABA'nın stres esnasında stomalardaki aktiviteye aracılık yaptığı bilinmektedir (Huang *et al.* 2013). Benzer şekilde HA'nın *Pisum sativum* L.'da stomaların açılma mekanizmasında rolünün saptanması oksin benzeri bir molekül olabileceğini ve fotosentezin etkinliğini artırmada da etkin rol oynadığını düşündürmüştür (Russell *et al.* 2006). HA'nın hücrede bulunduğu sinyal yolları ve etkileri Şekil 1.5'te verilmiştir.



### Şekil 1.5. HA sinyal yolları

(ALK: alkaloidler, CK: sitokininler, GA: giberellik asitler, PA: poliaminler, NO<sub>3</sub>T: nitrat taşıyıcıları) (Shah *et al.* 2018)

Humik bileşenlerin strese karşı, biyokimyasal bileşenler ve sinyal yolları ile transkripsiyonel etkileşimler içerisinde olduğu bilinmesine rağmen humik maddelerin moleküler mekanizmadaki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Garcia *et al.* 2016). Stresin yol açtığı oksidatif hasara karşı bitkilerde DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve gen ekspresyonunu farklı yollardan düzenleyen kodlamayan

RNA'ların ekspresyonu gibi mekanizmalar devreye girmektedir. Humik bileşenlerin aşırı genomik değişimleri sınırlayarak, retrotranspozon aktivitesini kısıtlamada rolünün olduğu belirlenmiştir (Shah *et al.* 2018). Bitkiler, çok sayıda inaktif transpozibil elementler (TE'ler) ile daha az sayıda transpozisyonel olarak aktif TE'ler içeren kompleks genomlara sahiptirler (Casacuberta and Gonzalez 2013). Çeşitli abiyotik stres faktörlerinin retrotranspozon hareketliliğini artırarak genetik modifikasyonlara, mutasyonlara ve genomik kararsızlıklara yol açtığı bilinmektedir (Casacuberta and Gonzalez 2013). Humik bileşenlerin TE aktivitesinin azaltılmasında rolleri olduğu belirlenmiştir (Yigider *et al.* 2016; Shah *et al.* 2018). Gen ekspresyonu, DNA hipo ve hiper metilasyon gibi modifikasyonlarla, aynı şekilde, çeşitli biyolojik yollar (transkripsiyonel gen susturma ve TE inaktivasyonu) ile bağlantılıdır (Cheng *et al.* 2012; Büyükkeskin *et al.* 2014).

Çağımızın en büyük sorunlarından biri haline gelen ve çok yakın gelecekte tüm canlıların yaşamını sınırlayacak olan kuraklık stresi ile mücadele etmenin en önemli yollarından biri mevcut su kaynaklarının en rasyonel şekilde kullanılmasını sağlamak, diğeri ise insanoğlunun en çok tükettiği gıda maddelerden biri olan buğday gibi tarım ürünlerinin özellikle kuraklığa toleranslı genotiplerinin geliştirilmesini sağlamaktır. Bu problem göz önüne alındığında, hazırlanan mevcut çalışmamızda, buğday genotiplerinden kuraklığa hassas ve toleranslı olanlarının belirlenmesi, aynı zamanda dışarıdan yapılan ABA ve humik asit uygulamalarının bitkide meydana getirdiği biyokimyasal değişimlere, DNA topolojisine ve kuraklık stresi ile ilgili genlere ve miRNA hedef genlerinin ifade düzeylerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kuraklık, dünyada özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitki büyümesini, gelişimini ve üretkenliğini sınırlayan kritik abiyotik streslerden biridir (Bodner *et al.* 2015). Kuraklık stresi, nem kaybını artırarak köklerden yapraklara su ve besin taşınımını azaltmakta, böylece bitki metabolizmasında aksamalara ya da anormal durumların oluşmasına sebep olmaktadır. Kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda sürekli sentezlenip detoksifikasyon mekanizması ile aralarındaki denge sayesinde zararlı etki oluşturmayan ROT'lar, stres ile tehlikeli hale dönüşmektedir. Artan ROT'lar nükleik asitlerde degradasyonlara, proteinlerin oksidasyonuna ve organellerde hasarlara sebep olmaktadır (Gill and Tuteja 2010).

ROT'lardan biri olan  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  radikalinin öncüsüdür ve yüksek seviyede birikimi membran hasarına ve lipit peroksidasyonuna (LPO)'ya yol açmaktadır (Mittler 2002). Hasheminasab *et al.* (2012) kuraklığa en dayanıklı ve en hassas buğday çeşitlerini belirlemek üzere yaptıkları çalışmalarında dayanıklı çeşitlerin stres esnasında ortaya çıkan  $H_2O_2$  seviyesinin hassas olanlara kıyasla daha az olduğunu belirtmişlerdir.

*Phaseolus vulgaris*'te kuraklık stresi ile yapraklarda  $H_2O_2$  ve  $OH^\bullet$  üretiminin artmasıyla birlikte LPO ve membran hasar indeksinin de arttığı bildirilmiştir (Zlatev *et al.* 2006). Simova Stoilova *et al.* (2008), buğdayda kuraklık koşullarındaki hassas çeşitlerde, membran stabilitesinin azaldığı ve lipidlerde oksidatif hasarın belirgin olduğunu belirtmişlerdir.

LPO'nun son ürünlerinin, keton, MDA, vb. gibi küçük hidrokarbon fragmentler ve bunlarla ilgili bileşikler içeren çoklu doymamış öncülerden oluştuğu bilinmektedir. Bu yüzden, bitkide stres boyunca LPO ile meydana gelen hasar MDA ölçümü yapılarak belirlenebilmektedir.

%20 PEG6000 uygulanmış beş farklı buğday çeşidinde MDA analiz sonuçlarına göre hassas ve dayanıklı çeşitler belirlenmiştir (Sultan *et al.* 2012). Yine kuraklık stresine maruz kalan buğdayda (Dong *et al.* 2018), salatalıkta (Zhang *et al.* 2011) kontrole kıyasla MDA içeriğinde önemli bir artış gözlenmiştir. Diğer taraftan, stomatal cevaplarda ve ROT üretiminde transkripsiyon faktörlerinin de fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir. Örneğin, kuraklık ve tuz toleransı çinko-parmak transkripsiyon faktörü olan DST (Drought and salt tolerance), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostazında rol oynayan genlerin ifadesini kontrol etmektedir. DST'nin çeltikte abiyotik stres toleransı ve ROT kaynaklı stoma kapanmasına aracılık ettiği tespit edilmiştir (Huang *et al.* 2009). Arabidopsis'te kuraklıkla indüklenebilen nükleer transkripsiyon faktörü NFYA5, stoma açıklığını kontrol etmekte ve kuraklığa toleransta rol oynamaktadır (Li *et al.* 2008).

Artan ROT üretimine karşı bitkinin aldığı ilk önlem antioksidan savunma mekanizmasını devreye sokmaktır. Bunun için SOD, APX, CAT, POD, GR, DHAR, GPX, gibi hücrel lokasyonları ve rolleri farklı olan antioksidan enzimlerin çalışmasını teşvik etmektedirler.

Kuraklığa hassas ve dayanıklı buğday çeşitlerinin kıyaslandığı bir çalışmada (Hasheminasab *et al.* 2012) kuraklık stresinde dayanıklı çeşitlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve membran hasarı düşük, CAT, POD, APX ve SOD enzim aktiviteleri oldukça yüksek iken, hassas çeşitlerde ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA içeriği yüksek, antioksidan enzim aktivitesinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, Sharma and Dubey (2005) %20 PEG6000 uygulanmış *Oryza sativa* fidelerinde MDHAR, DHAR ve GR aktivitesinde önemli bir artış kaydetmiştir.

Bir yandan ROT'lar antioksidan enzimler tarafından uzaklaştırılmaya devam ederken, diğer taraftan hücrel su kaybına bağlı olarak, stres hormonu ABA miktarında artış meydana gelmektedir.

Stres esnasında ABA ve ROT birikimi arasındaki ilişki araştırmacıların ilgisini çekmiş yapılan çalışmalarda stres altında ABA birikiminden önce ROT üretiminin yapıldığı ve

ROT'ların ABA sinyal iletiminde görev yaptığı ve gen ifadesi yoluyla ABA biyosentezine neden olabileceği bildirilmiştir (Finkel 1998; Kamata and Hirata 1999; Guan *et al.* 2000). Nitekim Zhao *et al.* (2001) kuraklık stresine maruz bırakılan buğday köklerinde artan ROT ve nitrik oksitin bitkideki su dengesinin oluşmasında görev aldıklarını, ROT ve nitrik oksitin kuraklık stresi esnasında erken ya da ilk stres sinyalleri oluşturarak ABA birikiminde rolleri olduğunu bildirmişlerdir.

Dışarıdan ABA uygulamasının kuraklık stresi altındaki *Zea mays* L.'de yaprak sayısı ve boyutunu artırmada, klorofil konsantrasyonunda, nisbi su içeriğinde, antioksidan enzim aktivitesinin artmasında, ayrıca MDA miktarının azalmasında rolü olduğu belirlenmiştir (Abdelaal *et al.* 2017).

Kuraklık esnasında ABA birikimi ile stoma açıklığı azaltılarak transpirasyon yoluyla su kaybı sınırlanmaktadır (Taiz and Zeiger 2008). *Arabidopsis thaliana*'nın ABA duyarsız mutantlarında dışarıdan uygulanan ABA'nın, stoma bekçi hücreleri üzerindeki biyokimyasal etkisinden ötürü, stomatal transpirasyonun azaldığı ve stomaların kapandığı belirtilmiştir (Pantin *et al.* 2013). Stomadaki hareketliliğin azalmasıyla, CO<sub>2</sub>'nin kloroplast stromasına difüzyon oranı ve ribuloz-1,5-bis-fosfat karboksilaz/oksijenazın karboksilasyon etkinliği değişmiş, bu durum fotosentezin durmasına sebep olmuştur (Guóth *et al.* 2009).

Yapılan çalışmalarda, stres durumunda ABA'nın artması ile birlikte ABA biyosentezi ile alakalı bazı genlerin zeaksantin epoksidaz (ZEP), absisik aldehit oksidaz (AAO) ve molibdat kofaktör sülfüraz (MCSU), kısa zincirli dehidrogenaz (SDR) miktarında da bir artış görülmüştür (Xiong *et al.* 2002). Bu genlerin yanısıra çoğu strese uyum durumu, ABA'nın aracılık ettiği çok sayıdaki genin ifadesindeki değişiklikleri de içermektedir. Yapılan çalışmalarda dışarıdan ABA uygulaması ile gen ifadesinde değişim görülüyorsa o gen ABA bağımlı, genin ifadesinde herhangi bir değişiklik görülüyorsa ABA bağımsız yolları kullanmaktadır sonucuna varılmıştır (Khan *et al.* 2012).

ABA, PEG, NaCl ve soğuk stresi uygulamalarının yapıldığı RH8706-49 buğday yapraklarında TaSRG geninin ifade düzeyine bakılmış, en yüksek artış diğer stres etmenlerine karşı 7,2-fold değeriyle ABA uygulamasında gözlenmiştir. Köklerde ise PEG ve ABA uygulaması ile gende upregülasyon oluşmuş ancak en yüksek değere 1,8-fold ile NaCl stresinde ulaşılmıştır. Soğuk stresi ise genin ifadesini durdurmuştur (He *et al.* 2011).

TaCP geninin hem kuraklıkla ilişkisini hem de ABA'ya bağımlı olup olmadığını transgenik bitkilerde belirleyebilmek için yapılan bir çalışmada, *Triticum aestivum*'dan izole edilip Arabidopsis'e aktarılan TaCP mRNA transkriptlerinin PEG6000 uygulandığı ilk 6 saat içerisinde arttığı ancak stres devam ettikçe azaldığı gözlenmiştir. Buradan bu genin transkripsiyonel aktivasyonunun dehidrasyonun ilk anlarında ortaya çıkıp sonradan azalmasıyla genin yarı ömrünün oldukça kısa olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca ABA uygulamasına karşı çok yavaş cevap verdiği görülmüştür (Zang *et al.* 2010). Benzer bir çalışmada aynı dizi homolojisine sahip olduğu bilinen ve sistein proteazı (CP) kodlayan RD19 transkriptinin Arabidopsis'te desikasyon ve tuz stresine indüklendiği ancak soğuk, sıcak stresine ve ABA'ya karşı seviyesinin değişmediği belirlenmiştir (Koizumi *et al.* 1993).

Arabidopsis'te Sal1 geninin mutasyona uğramasıyla yani downregüle olmasıyla hem bitkinin kuraklığa toleransı artmış, hemde ABA birikimi artmıştır (Wilson *et al.* 2009). Sal1 geninin, ağırlıklı olarak ABA-bağımsız, nadiren de ABA-bağımlı stres yanıt yollarının negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı tespit edilmiştir.

Sal1 fonksiyonunu kaybeden mutantlar ABA'ya, tuz stresine ve soğuğa (Xiong *et al.* 2001; 2004) hassasiyet gösterirken, kuraklığa ve yüksek ışığa karşı daha yüksek tolerans göstermiştir (Rossel *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2009; Estavillo *et al.* 2011). Bu mutantlar farklı isimlerle anılabilmektedir (fry1, hos2, alx8, fou8, ron1 and sup1) (Xiong *et al.* 2001; 2004; Rossel *et al.* 2006; Robles *et al.* 2010; Rodriguez *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011). Fiery1 (fry1), ilk olarak, ABA ve stres sinyalizasyonunu etkileyen gen olarak

adlandırılmıştır (Xiong *et al.* 2001). Fry1 mutantlarında osmotik stres altında yapraklarda beyazlaşma görülmüştür (Chen *et al.* 2011).

Bitkilerde protein farnesilasyonunda görev yapan farnesiltransferaz enziminin  $\beta$  alt ünitesini kodlayan Era1 enzimi ABA sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. Era1'in susturulduğu transgenik *Brassica napus*'ta, artan ABA hassasiyeti ile birlikte, kuraklık stresi koşullarında stoma iletiminde ve su transpirasyonunda belirgin azalma gözlenmiştir (Wang *et al.* 2005).

Era1'in kuraklık toleransının sağlanmasında biyoteknolojik hedef olarak yararlılığı kanola (Wang *et al.* 2005), buğday (Manmathan *et al.* 2013) ve soya fasülyesi (Ogata *et al.* 2017) gibi türlerde incelenmiştir. Bu türlerde Era1'in downregülasyonu ile ABA'ya cevap artmış, stoma iletkenliği ve yaprak transpirasyonu azalmış, kuraklığa tolerans ise artmıştır (Wang *et al.* 2005; Manmathan *et al.* 2013; Ogata *et al.* 2017).

Genlerin fonksiyonlarının daha iyi test edilmesi amacıyla virüs indüklü gen sessizleştirme (VIGS) tekniğinin kullanıldığı bir çalışmada Arabidopsis'te tanımlanan Era1 ve Sal1 genlerinin homoloğu buğdayda tespit edilmiş ve bu genler BSMV virüsüne aktarılmıştır. Era1 ve Sal1 susturulan bitkilerde ABA ile ilişkili olarak stomaların kapandığı, fotosentezin azaldığı gözlenmiştir (Manmathan *et al.* 2013).

Bazı akuaporinlerin ekspresyonunda gibberellin (GA), ABA, sitokinin ve oksin gibi bitki hormonlarının regülatör olarak görev yaptığı tanımlanmıştır. *A. thaliana*'da AtPIPIb'nin promotörünün GA ve ABA tarafından aktive edildiği bilinmektedir. Esas olarak köklerde ve olgun yapraklarda sentezlenen ABA'nın, kuraklık stresi ile birlikte bazı akuaporinlerin varlığı ile seviyesinin arttığı bulunmuştur (Johansson *et al.* 2000). İki haftalık *A. thaliana* fidelerine 100  $\mu$ M ABA uygulandığında yaprak ve köklerde AtPIP'lerin farklı ekspresyon seviyelerinde ifade olduğu belirlenmiştir. Örneğin AtPIP2.6 yapraklarda, AtPIP1.5 ise köklerde daha az eksprese olurken, AtPIP2.5'te ABA uygulamasına karşı ekspresyon seviyesinde bir değişiklik olmamıştır. Diğer

tarafından, mısırdaki ABA biyosentezinden sorumlu NCED/VP14 geni ile akuaporinler arasında bir ilişkinin olduğu bulunmuştur (Parent *et al.* 2009).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, miRNA'ların da ABA ile etkileşim halinde olduğu ve bazı miRNA'ların ve hedefledikleri genlerin ekspresyonlarının ABA tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Bir karaçam türü olan *Larix leptolepis*'in embriyogenik kalluslarında miR159, miR169, miR172 genlerinin ABA tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2010).

Mısır köklerinde miR169 familyasının tüm genleri ABA tarafından downregüle edilmiş, hedef geni olan NFYA5 ise upregüle olmuştur (Li *et al.* 2008). Bunun aksine miRNA'lar bitkilerin ABA'ya olan hassasiyetini değiştirmektedirler. Arabidopsis'te gelişim boyunca miR172'nin aşırı regülasyonu ile ABA'ya hassasiyeti artmıştır (Zou *et al.* 2013). Bununla birlikte, dışardan ABA uygulaması downstream genlerini düzenleyen bazı miRNA'ların ekspresyonlarını da etkilemektedir. ABA, miR394'ü pozitif regüle ederken, hedef geni olan LCR'nin negatif düzenlenmesine neden olmuştur (Li *et al.* 2012).

miR172 geninin hedef geni olan AP2 domaini RAP2.1 transkripsiyon faktörünü ihtiva etmektedir. Bu transkripsiyon faktörü ABA-bağımsız yolda yer alan DRE motiflerine bağlanmaktadır. *Solanum tuberosum*'da RAP2.1'in ifadesi, ABA-bağımsız yolda kuraklık ve soğuk stresi ile kuvvetli bir şekilde upregüle olmuştur (Dong *et al.* 2010).

Arabidopsis'te miR398 hedef geni olan CSD1'in ifadesinde 100µM ABA uygulamasından 72 saat sonra azalma görülmüştür. Buna karşın, tuz stresi uygulamasında ise artış görülmüştür. Yine aynı çalışmada *Populus tremula*'da Arabidopsis'in tam aksine ABA uygulamasında CSD1'in ifadesi daha fazla, tuz uygulamasında ise daha düşük olmuştur (Jia *et al.* 2009).

miR408'in ifadesini kontrol eden düzenleyici yolağı belirlemek için yapılan bir çalışmada ise (Mutum *et al.* 2013) ABA, hem hassas hem dayanıklı çeltik çeşitlerinde

osa-miR408'in ekspresyonunun regülasyonunu, ABA'ya bağımlı stres sinyali transdüksiyon yolağını kullanarak pozitif bir şekilde düzenlemiştir. Araştırma sonucunda ABA'nın transkripsiyon düzeyindeki etkisi belirlenmiştir.

ABA uygulaması yapılmadan bitkilere uygulanan kuraklık stresinde bu genlerin ifadelerinin nasıl düzenlendiği üzerine de pek çok çalışma literatüre kazandırılmıştır.

TaSRG transkripsiyon faktörünün ifade düzeyine bakılmak üzere tuza toleranslı (Kharchia 65) ve hassas (HD 2009) iki buğday çeşidinin kullanıldığı bir çalışmada köklerde toleranslı çeşidin ifadesi hassas olana göre daha yüksek iken, gövdede köke göre artış daha az olmuştur (Rana *et al.* 2015). Yine, TaSRG geninin tuza toleranslı buğday mutantında (RH8709-49) NaCl uygulaması ile ifadesinin artmasıyla bu genin tuzluluğa toleransta rolünün olduğu düşünülmüş, genin Arabidopsis ve çeltiğe transfer edildikten sonra verilen tuz uygulaması ile de aynı şekilde ifadesinin arttığı ve bu genin eksikliğinde tuza olan hassasiyetin de arttığı görülmüştür (Ma *et al.* 2016).

TaCP geninin hedefi olan sistein proteaz enzim aktivitesinin kuraklık stresinin yol açtığı orta ya da şiddetli su eksikliği ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Grudkowska and Zagdska 2010; Stoilova *et al.* 2010). Proteoliz, denatüre proteinlerin uzaklaştırılması ve çeşitli stres etmenlerinin indüklediği proteinlerin aktivasyonundan oluşmaktadır. Ayrıca olumsuz çevresel faktörlere karşı bitki cevabının önemli bir unsuru olarak kabul edilmektedir (Van der Hoorn and Jones 2004). Yapılan bir çalışma, bir sistein proteazı kodlayan bir genin kuraklık koşulları altında indüklendiğini ve buğdaydaki su açığı toleransını düzenlediğini ileri sürmüştür (Zang *et al.* 2010).

Gasparic *et al.* (2013), *Aureobasidium pullulans* fungus türünden alınarak Arabidopsise yerleştirilen Sal1 geninin bitkiye uygulanan 2 hafta susuzluk (orta kuraklık) ve 3 hafta susuzluk (yüksek kuraklık) koşullarının her ikisinde Sal1 upregülasyonunun dereceli olarak arttığını belirtmişlerdir.

Kuraklık, soğuk ve tuzluluk gibi abiyotik stresler altında kök ve yapraklardaki akuaporinlerin regülasyonu üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. *A. thaliana*'da (Boursiac *et al.* 2005), *Phaseolus vulgaris*'te (Aroca *et al.* 2007), *Vitis sp*'de (Galmes *et al.* 2007), *Brassica napus*'ta (Gao *et al.* 1999) *Oryza sativa*'da (Li *et al.* 2008) ve *Nicotiana tabacum*'da (Mahdieh *et al.* 2008) çalışmalar mevcuttur. Stres altında akuaporinlerin ifadelerindeki farklılıklar, türlere, doku tipine ve büyüme koşullarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. *Nicotiana tabaco*'da NtPIP1.1 ve NtPIP2.1'in ifadesi düşükken, NtAQPI'in ifadesi kuraklık stresi altında oldukça fazladır (Mahdieh *et al.* 2008). Hatta aynı transkriptin (AtPIP1.2) farklı çalışmalarda ifadesinin ya oldukça yüksek (Jang *et al.* 2004) ya da oldukça düşük (Alexandersson *et al.* 2005) olduğu da literatüre geçmiştir.

Bazı çalışmalar, akuaporinlerin az ifade edildiğinde ozmotik su geçirgenliğini azalttığını, aşırı ekspresyonunun ise membranlardaki su iletkenliğini artırdığını göstermiştir (Martre *et al.* 2002). Akuaporinlerin düşük ifade edildiği bitki grubu ile kontrol grubu kıyaslanmış ve uygulama grubundaki bitkilerin azalan akuaporinlerin seviyelerini telafi edebilmek için kök büyümesinde artışa geçildiği belirlenmiştir (Aharon *et al.* 2003). Bununla birlikte, uygulama grubundaki bitkiler, su eksikliği nedeniyle gaz değişimi ve genel metabolizma açısından dezavantaj yaşamışlardır (Martre *et al.* 2002; Aharon *et al.* 2003).

Akuaporinlerin açılma veya kapanma durumlarında ROT'larında etkili olduğu bilinmektedir. Ancak mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Henzler *et al.* 2004). OH<sup>\*</sup> radikalinin akuaporinlerden geçerken sistein rezidülerini oksidasyona uğrattığı böylece proteinlerin yapısını değiştirerek kanalın kapanmasını tetiklediği bulunmuştur. Diğer bir hipoteze göre plazma membranından geçen OH<sup>\*</sup> radikali lipitleri oksidasyona uğratarak lipid radikallerini üretirken, akuaporinlere saldırarak porların kapanmasına neden olmuşlardır (Henzler *et al.* 2004).

Akdogan *et al.* (2016), kuraklığa hassas Atay 85 ekmeçlik buğday çeşidi ile kuraklığa dayanıklı Sivas 111/33 buğday çeşidinde dokuya özel olarak ifadesi artan miRNA ve

hedef genlerini tespit etmeye yönelik amaçladıkları çalışmalarında, miR172 hedef geni AP2, Atay 85 çeşidinde daha fazla upregüle olurken, Sivas 111/33 buğday çeşidinde daha az upregüle olmuştur. Yine aynı çalışmada, miR398'in hedef transkriptleri olan CSD1/CSD2, Atay 85 çeşidinin, Sivas 111/33 buğday çeşidine göre önemli ölçüde indüklendiği bulunmuştur.

Huat *et al.* (2014) kuraklığa hassas ve toleranslı çeltik çeşitlerinde miR397, miR398, miR408 ve diğer miRNA hedef genlerinin ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. Kök ve yaprak arasında çok büyük farklar oluşmazken, en az ifade olanın miR397 olduğunu belirlemişlerdir.

miR397 geninin lakkaz enzimini hedefleyerek özellikle buğday, çeltik, arpa gibi tarım ürünlerinde, tane boyutunun büyüklüğü ve veriminin artması gibi durumlarda etkili olduğu bilinmektedir. miR397'nin tane verimini nasıl artırdığına yönelik aydınlatılan moleküler mekanizmasında hedef geni olan Lac genini downregüle ettiği, böylece bitkinin brassinosteroidlere olan ilgisinin arttığı keşfedilmiştir. OsmiR397'nin brassinosteroid sinyalini artırdığı, ancak bunu brassinosteroid birikimini sağlayarak değil, OsLAC genini downregüle ederek, tahıl verimini artırdığı sonucuna varılmıştır (Zhang *et al.* 2013). Brassinosteroidlerin bitki verimini artırmasının yanısıra abiyotik stres faktörlerine karşı bitkiyi korudukları bilinmektedir. Kuraklık (Behnamnia *et al.* 2009), sıcak (Dhaubhadel *et al.* 1999), soğuk (Fariduddin *et al.* 2011) ve tuz stresinde (Shahbaz and Ashraf 2007) brassinosteroidlerin stres ile ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirerek, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin ve osmotik koruyucuların birikimini artırarak, lipid peroksidasyonunu azaltarak stres tolerans mekanizmasında etkin rol aldıkları belirlenmiştir (Surgun vd 2012).

Sunkar *et al.* (2006), transgenik *Arabidopsis thaliana*'da miR398'in downregüle olduğunu, hedef genleri olan CSD1 ve CSD2 mRNA transkriptlerinin ise birikiminin arttığını bildirmişlerdir.

Tuz ve kuraklık stresinde miR172, miR396, miR397 ve miR398'in ve hedef genlerinin ekspresyonlarının pamukta araştırıldığı bir çalışmada (Wang *et al.* 2013) bu genlerin ekspresyonlarının doza ve dokuya bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada, tüm miRNA hedef genlerinin gövdedense kökte daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaştığı bulunmuştur. Gövdede %1'lik PEG6000 dozunda GRF1 (miR396) downregüle iken %2,5 PEG6000 dozunda upregülasyon gözlenmiştir. Bunun aksine AP2 (miR172) ise %2,5 PEG6000 dozunda downregüle olmuş, %1'lik PEG6000 dozunda ise upregüle olduğu bildirilmiştir.

Yine kuraklık stresinde, bazı miRNA'lar ve hedef genleriyle yapılan bir çalışmada C-306 ve NI-5439 dayanıklı buğday çeşitleri ile HUW-468, WL-711 hassas çeşitlerinde miR172 hedef geni dayanıklıların birinde (C-306) down, diğerinde (NI-5439) up, hassasların birinde (HUW-468) down, diğerinde (WL-711) up, miR397; hedef geni dayanıklıların birinde (C-306) down, diğerinde (NI-5439) up, hassasların birinde (HUW-468) up, diğerinde (WL-711) down, miR398 hedef geni; dayanıklıların birinde (C-306) down, diğerinde (NI-5439) up, hassasların ikisinde up, miR408 hedef geni dayanıklıların birinde (C-306) down, diğerinde (NI-5439)up, hassasların ikisinde downregüle olduğu bildirilmiştir (Kaur *et al.* 2017).

Kuraklığa cevap veren miRNA'ların ve hedef transkriptlerinin hem dokuya hem de türe özgü spesifik mekanizmalarını tamamen anlamak için, dokuya ve türe özel miRNA ile hedef transkriptlerinin ekspresyonunu belirleyen çalışmalarda mevcuttur. Kuraklığa hassas miRNA ifade modelleri Triticeae'nin farklı üyeleri arasında değişkenlik göstermiştir. miR172 aile üyelerinin buğday yapraklarında upregüle, arpa yapraklarında downregüle olduğu ve birbiriyle yakın ilişkili bu iki türdeki farklı hedef düzenleme modelleri oluşturduğu gösterilmiştir. Aksine, bazı miRNA aileleri de, farklı Triticeae üyelerinin aynı dokusunda korunmuş ifade modelleri göstermiştir. Bakır süper oksit dismutazı hedefleyen miR398'in hem makarnalık buğdayda hem de arpanın yapraklarında upregüle olduğu belirlenmiştir (Kantar *et al.* 2011). Ancak *Arabidopsis*'te aynı hedef gen downregüle olmuştur (Sunkar *et al.* 2006).

Stresin gen ifadesinde yol açtığı değişikliklerin yanısıra DNA metilasyonuna sebep olarak B-DNA formundan Z-DNA'ya dönüşümün olduğu bilinmektedir. Gonzales *et al.* (1998), tuz stresinin indüklediği kinetikle Z-DNA formunda artışın meydana geldiğini belirlemişlerdir. Kabir and Kumar (2013) ve Ruiz Herrera *et al.* (1995), poliaminlerin DNA ile etkileşimde olduğu ve DNA'yı özellikle oksidatif stresten, zararlı ajanlardan ve radyasyondan koruduğu ve DNA'nın A formundaki major oluklardan taşınıp B formundaki metilasyonun az görüldüğü minör oluklara yerleşerek metilasyonu önlediklerini belirlemişlerdir.

Kuraklık stresinin etkisiyle, bitki gelişiminin, üretiminin ve veriminin sınırlandırıcı etkisi sadece bitkilerin stres mekanizmaları ile aşılmamakta, aynı zamanda toprak koşullarının iyileştirilmesine de bağlıdır. Bu anlamda tarım arazilerinde özellikle buğday, arpa, çavdar, mısır gibi tüketimin fazla olduğu tarım ürünlerinin yetiştirildikleri arazilerde toprağa çeşitli toprak düzenleyicileri uygulanmaktadır. Bu toprak düzenleyicilerden birisi de humik maddelerdir. Humik maddeler (humik asit ve fulvik asit) kısmen veya tamamı ile çürümüş bitki veya hayvan artıklarının oluşturduğu siyah veya koyu kahverenkli maddelerdir.

Yapılan çalışmalarda humik bileşenlerin abiyotik strese toleransın düzenlenmesinde de rolünün olduğu pek çok bitki türünde kanıtlanmıştır (Oosten *et al.* 2017). Kurak topraklarda yetişen *Festuca arundinacea* ve *Agrostis palustris*'de HA'nın kök ve sürgün büyümesi ile yaprak hidrasyonunu artırmasının yanısıra antioksidan kapasitesinin artırılmasında da katkısı olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, HA ile birlikte artan içsel sitokinin miktarı ile bitkinin kuraklığa toleransının sağlandığı kaydedilmiştir (Zhang and Ervin 2008).

*Oryza sativa* L.'ye uygulanan humik madde ekstraktları, antioksidatif enzimatik fonksiyonun aktive edilmesinde ve ROT uzaklaştırıcı enzimlerin artmasında, ayrıca hücre membranında koruyucu rol oynamıştır (Garcia *et al.* 2012).

Yapılan çalışmalarda (Tahir *et al.* 2011; Cordeiro *et al.* 2011; García *et al.* 2012; 2016) PEG aracılı ozmotik ve su stresi altında HA uygulamasının çeltik ve mısır bitkilerinde SOD ve POX gibi antioksidan enzimlerdeki artışla humik asit uygulamasının koruyucu bir rolünün olduğunu bildirmişlerdir.

Humik madde ekstraktlarının vakuoller ve plazma membranında bulunan proton ATP-azların regülasyonunu düzenlediği bilinmektedir. Domatese uygulanan humik madde ekstraktının plazma membranındaki proton ekstrüzyonunu artırdığı, böylece hem büyümesinde hem de topraktan besin maddelerinin alınımında %40 artış sağlandığı kaydedilmiştir. Bununla birlikte oksin duyarsız mutantlarda humik madde ekstraktının proton ekstrüzyonunda bir değişikliğe yol açmaması, humik bileşenlerin bitki büyümesinde oksin sinyal yolağını kullandığının göstergesidir (Zandonadi *et al.* 2016).

Jarosova *et al.* (2016), HA ve NaCl'nin birlikte uygulandığı arpada askorbik asit ve GSH birikiminin uyarıldığını, ayrıca plazma membranında oksidatif stres altında süperoksit anyon radikallerinin kaynağı olan NOX birikimine de sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Torres and Dangl (2005), HA ve stres uygulanan buğday yapraklarında NOX ve SOD aktivitesinin indüksiyonunun, sırasıyla, süperoksit anyon radikalleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini artırdığını, ancak CAT ve enzimatik olmayan bileşiklerin aktivitelerini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin azalmasını tetiklediğini belirlemişlerdir.

Ozfidan *et al.* (2018), kadmium stresi ile birlikte verilen HA'nın enzimatik savunma sistemini (SOD, CAT) artırdığını, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipid peroksidasyon içeriğinin ise strese göre daha azaldığını kaydetmişlerdir.

Garcia *et al.* (2016) tarafından yapılan bir çalışmada PEG uygulaması çeltik köklerinde O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimini artırdığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, HA uygulaması SOD aktivitesinde bir artışa sebep olmuşken, HA+ PEG uygulamasındaki SOD kontrole

yakın bir değer göstermiştir. Aynı zamanda PEG uygulaması ile köklerdeki MDA miktarı HA uygulamasına göre daha fazla artmıştır.

Aydin *et al.* (2012), HA'nın tuz stresi altında *Phaseolus vulgaris*'te POX enzimatik aktivitesini uyardığı, böylece yaprak ve kök dokularında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azalttığını belirlemiştir. Bu durum HA'nın bitkilerde strese bağlı lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu ve hücre membranı geçirgenliğinin koruduğunu göstermiştir. Aynı HA, kuraklık koşullarında toprakta yetiştirilen çeltik bitkilerinin yapraklarına da uygulanmıştır. HA uygulamasına yanıt olarak POX enzimatik aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Bitki stresi toleransı, kuraklık koşullarında bile bitkilerin büyümesi ve gelişmesinde iyileşme gösterdiği gibi artmıştır. Ayrıca, olgun kök dokularında ABA üretimi HA'nın uygulanmasıyla uyarılmamış ve stres koşulları altında, ABA içeriği normal şartlarda yetiştirilen bitkilere benzer olmuştur (Hernández *et al.* 2012). Ayrıca, HA'nın, bitkilerde N alımı yolunda rol oynayan yapısal genler aracılığıyla N metabolizmasını düzenlediği bulunmuştur (Colla *et al.* 2014).

HA'nın fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar olmasına rağmen, HA'nın moleküler etkisini açıklayan çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Mısırdaki köklerden nitrat alımını teşvik eden plazma membranındaki HC-ATPaz enzimini kodlayan MHA2 geninin upregüle olması ile düşük moleküler ağırlıklı humik maddenin nitrat alımını hızlandırdığı, genin downregüle olması ile yavaşladığı tespit edilmiştir (Quaggiotti *et al.* 2004).

Yildirim *et al.* (2014), HA'nın antitoksik ve antimutajenik etkilerinden ötürü dikambaya karşı HA'nın DNA'yı koruduğu ve iyileştirici etki yaptığını belirtmişlerdir.

Shah *et al.* (2018), humik bileşenlerin retrotranspozon aktivitesini sınırlayarak, genomik kararsızlığın azaltılmasında rollerinin olduğunu vurgulamışlardır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan ekmeklik buğday genotipleri (*Triticum aestivum* L.) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilmiştir. 2007 milli çeşit listesinde yer alan ve lokal genotiplerden oluşan toplam 63 ekmeklik buğday genotipi içerisinde -8 bar PEG6000 (yüksek şiddette kuraklık) ve -6 bar PEG6000'e (orta şiddette kuraklık) toleranslı 2 ve hassas 2'şer genotip belirlenmiştir. Buğday genotipleri Çizelge 3.1'de, bu genotiplerden fizyolojik eleme sonucu belirlenenler ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Fizyolojik elemelerde kullanılan buğday genotipleri

Zerin	Sultan 95	Zencirci 2002	Bereket
Es 26	Gerek 79	Karahan 99	Sürak 1593
Bezostaja-1	Polatlı Kösesi	Mızrak	Pehlivan
Haymana 79	Demir 2000	Yayla 305	Gün 91
Alparslan	Soyer 02	Süzen 97	Aldane
Altay 2000	Sert Buğday	İkizce 96	Ak 702
Kılçıksız Buğday	Müfitbey	Aytın 98	Kırık
Aksel 2000	Nenehatun	Koca Buğday	Tosunbey
Kırmızı Kılçık	Çetinel 2000	Kate A-1	Atlı 2002
Sönmez 2001	Kutluk 94	Yakar 99	Nacibey
Dağdaş 94	Bayraktar 2000	Köse 220/39	Özlu Buğday
Hawk (Şahin)	Kırgız 95	İzgi 2001	Kırkpınar 79
Tir	Ak Buğday	Prostor	Karasu 90
Lancer	Bağcı 2002	Kıraç 66	Kırmızı Yerli
Ankara 093/44	Conkesme	Harmankaya 99	Palandöken 97
Türkmen	Uzunyayla	Bolal 2973	

**Çizelge 3.2.** -8 bar PEG6000 ve -6 bar PEG6000'e toleranslı ve hassas buğday genotipleri

<b>Toleranslı genotipler</b>	<b>Hassas genotipler</b>
Aksel 2000	Atlı 2002
Kırkpınar 79	Kırmızı Kılçık

### 3.1.2. Kullanılan cihaz ve aletler

Çalışma esnasında Çizelge 3.3'de belirtilen cihaz ve aletler kullanılmıştır.

**Çizelge 3.3.** Kullanılan cihazlar ve modelleri

<b>Cihazlar</b>	<b>Modelleri</b>
Otoklav	Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00
Santrifüj	Hettich, GERMANY, EBA-20
PCR	Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA
RT-PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q GERMANY
ATR- FTIR Spektrometre	Bruker Vertex 70 FTIR
Elektroforez Tankı (yatay)	OWL B2, U.S.A
Elektroforez Akım Sağlayıcı	OWL OSP300-2Q, U.S.A.
Jel Görüntüleme Sistemi	DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL
Su Banyosu	Memmert WNB14, GERMANY
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
Nanodrop	Qiagen/Qiexpert 200061 24V F 2.5A
Magnetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A, KOREA
pH Metre	InoLab pH730 wtw Series, GERMANY
Derin Dondurucu	Nuarie, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK
Hassas Terazı	Mettler Toledo AL204, CHINA
Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Saf Su Cihazı	GFL 2004, GERMANY
Steril Kabin	Esco AC2-4E1, SINGAPORE
Mikrodalga Fırın	Arçelik, TÜRKİYE, MD 592
Kar makinesi	Scotsman, U.S.A. , AH 19828 5
Etüv	Memmert, UN55
Vortex	Velp Scientifica, F202A0173
Sıvı azot tankı	Termo, Electron Corporation

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözelti ve solüsyonlar Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

<b>Uygulamada kullanılan çözeltiler</b>
* Polietilen glikol (PEG6000) çözeltisi
* Absisik asit (ABA) çözeltisi
* Humik asit çözeltisi
* Besin çözeltisi
<b>Biyokimyasal analizleri belirlemede kullanılan çözeltiler</b>
*%0,1 Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi
*%20 Tiobarbiturik asit (TBA) çözeltisi
*10 mM Potasyum fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) çözeltisi
*1 M Potasyum iyodür (KI) çözeltisi
<b>Sterilizasyon işlemlerinde kullanılan çözeltiler</b>
*%10'luk NaOCl
*%75'lik Etil Alkol
* DEPC (Dietil piro karbonat)
<b>DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler</b>
*1M Tris-HCl
*0,5 M EDTA
*5 M NaCl
*1X TE buffer
*3 M Sodyum Asetat
*250 mM Amonyum Asetat
* DNA ekstraksiyon tamponu
* Proteinaz K
* Ribonükleaz (RNaz)
*%70'lik Etil Alkol

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Kullanılan çözelti ve solüsyonların hazırlanışı

Çalışmada kullanılan çözelti ve solüsyonların hazırlanışları aşağıdaki gibidir:

### **3.2.1.a. Uygulamada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı**

#### **Polietilen glikol (PEG6000) çözeltisi:**

Osmotik potansiyeller Michel and Kaufmann (1973)'a göre PEG6000 (Sigma, 1546580) kullanılarak sağlanmıştır. -6 bar PEG6000 çözeltisi hazırlamak için 223,7 g/l, -8 bar PEG6000 çözeltisi hazırlamak için ise 262 g/l PEG6000 tartılarak 700 ml suda çözüldükten sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

#### **Absisik asit (ABA) çözeltisi:**

Öncelikle 66,05 mg ABA (Sigma, A1049) tartılarak 1 mM'lık 250 ml stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra 100 µM ABA çözeltisi hazırlamak için bu solüsyondan 100 ml alınarak toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

#### **Humik asit (HA) çözeltisi:**

Martin (1975)'e göre elde edilen %10 (w/v)'luk HA solüsyonundan %1'lik HA solüsyonu hazırlamak için 100 mg %10'luk HA tartılmış ve hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

#### **Besin çözeltisi:**

16 g Hoagland ve Arnon (1938) (Sigma H2395-10L) tuzu 10 L saf su içerisinde çözdürülmüştür.

**3.2.1.b. Biyokimyasal analizleri belirlemede kullanılan çözeltilerin hazırlanışı****%0,1 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi:**

0,1 g TCA (Sigma, T9159) 100 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür.

**%20 tiobarbiturik asit (TBA) çözeltisi:**

20 g TBA (Sigma, T5500) 100 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür.

**10 mM potasyum fosfat ( $K_2HPO_4$ ) çözeltisi:**

17,4 gr  $K_2HPO_4$  (Sigma, 1551128) 100 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür.

**1 M potasyum iyodür (KI) çözeltisi:**

16,6 gr KI (Sigma, 60399) 100 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür.

**3.2.1.c. Sterilizasyon işlemlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı****%10'luk NaOCl:**

Ticari ABC® marka çamaşır suyundan 100 ml alınarak hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**%75'lik etil alkol:**

%100'lük etil alkolden (Sigma, 32205) 750 ml alınmış ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**DEPC (Dietyl piro karbonat):**

0,1 ml DEPC (Sigma, D5758) 100 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür. Oda sıcaklığında gece boyu bekletilmiş ve ardından otoklavlanarak steril edilmiştir.

**3.2.1.c. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı****1M tris-HCl çözeltisi:**

121,1 g Tris-base (Sigma, Tris-Ro) 700 ml saf suda çözdürülüp pH'ı HCl ile ayarlanarak hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

**0,5 M EDTA çözeltisi:**

136,1 g EDTA (Sigma, EDS) 800 ml suda çözdürülüp pH'ı NaOH• ile ayarlanarak hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış ve filtreden geçirilerek otoklavlanmıştır.

**5 M NaCl çözeltisi:**

146,1 g NaCl (Sigma, S7653) 450 ml suda çözdürülüp hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

**1X TE buffer çözeltisi:**

1 M Tris-HCl'den 100 ml, 0,5 M EDTA'dan 20 ml alınarak üzeri 880 ml dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır. 1X TE buffer çözeltisi için bu stok solüsyondan 100 ml alınıp saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**3 M sodyum asetat çözeltisi:**

40,8 g sodyum asetat (Sigma, S8625) 80 ml ultra saf suda iyice eritilmiş ve pH=5,2 oluncaya kadar glasiyel asetik asit eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**250 mM amonyum asetat çözeltisi:**

19,3 g amonyum asetat (Sigma, A1542) 200 ml saf su içerisinde çözülerek hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır.

**DNA ekstraksiyon tamponu:**

DNA ekstraksiyon tamponu hazırlamak için aşağıdaki kimyasallar sırayla eklenmiş ve 50 örnek için hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

- \*1 g toz CTAB (Setil trimetil amonyum bromür) (Sigma, H9151)
- \*0,5 g (%0,1) Sodyum bisülfid ( $\text{NaHS}_3$  ve  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  karışımı) (Sigma, 243973)
- \*5 ml Tris-HCl (1 M)
- \*14 ml NaCl (5 M)
- \*2 ml EDTA (0.5 M)
- \*0,1 ml (%0,2)  $\beta$ -merkaptoetanol (v/v) (Sigma, M6250)

**Proteinaz K:**

10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma, P2308).

**Ribonükleaz (RNaz):**

10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma, R6513).

**%70'lik etil alkol:**

700 ml saf etil alkolün (Sigma, 32205) hacmi steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**3.2.2. Buğday genotiplerinin yetiştirilmesi ve PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları**

Çalışmada kullanılacak olan kuraklığa toleranslı ve hassas buğday genotiplerini belirlemek için 63 ekmeklik buğday genotipinin ekiminden önce, ilk aşamada yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Bunun için her bir genotipten eşit boyutlarda seçilen tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 1 dk karıştırılıp steril saf sudan geçirilmiş ardından %10'luk NaOCl'de 10 dakika bekletilmiştir. Tohumlar dört kez saf su ile durulanmış ve steril filtre kağıdında kurutulmuştur. Tohumların çimlendirilmesinde 219x155x85mm boyutlarında kapaklı plastik kaplar kullanılmıştır. Her genotip için 4 tekrar olacak şekilde steril edilen kapların içerisine Hoagland solüsyonu ile nemlendirilen filtre kağıtları yerleştirilmiş ve içlerine 100 adet steril tohum ekilmiştir.  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık (floresans lambası- $300 \text{ lmol/ m}^2\text{s}^{-1}$ ) 8 saat karanlık şartlarda 14 gün çimlendirilmiştir. Daha sonra kapların içerisine Hoagland solüsyonu + -8 bar PEG6000 (yüksek şiddette kuraklık) içeren solüsyonlar eklenmiştir. 7 gün süre ile yüksek şiddette kuraklığa maruz bırakılan 63 çeşit içerisinde bitkilerin çimlenme ve sürgün-kök gelişimleri incelenerek fizyolojik bir ön eleme yapılmış ve toleranslı (Aksel 2000; Kırkpınar 79) ve hassas (Atlı 2002; Kırmızı Kılıçık) 4 genotip belirlenmiştir.

Belirlenen 4 genotip; -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000,  $100 \mu\text{M}$  ABA ve %10 (w/v)'luk humik asitin %1'lik dozu ve bunların kombinasyonları uygulanmak üzere 14 gün süre ile sıvı hidroponik sistemde çimlendirilmiştir. Bu sistemde; hoagland çözeltisi ve uygulamada kullanılan solüsyonların konulduğu plastik kapların kapak kısımlarına yerleştirilen file saksılara eşit miktarda konulan hidrotonların içerisine steril edilen 20'şer adet tohum bırakılmıştır. Plastik kaplara hidrotonun temas edeceği miktarda

hoagland solüsyonu eklenmiştir. Kesintisiz bir şekilde elektrikli hava motoru kullanılarak havalandırılan bu sistemde tohumlar  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık (Floresans lambası-300  $\text{Imol/ m}^2\text{s}^{-1}$ ) 8 saat karanlık şartlarda 14 gün çimlendirilmiştir. Çizelge 3.5'te belirtilen her bir uygulama için her saksı 1 tekerrür olarak kabul edilmiş ve her bir uygulama için 3 tekerrür yapılmıştır. Kuraklık stresi uygulamaları için PEG6000 içeren çözeltiler Hoagland solüsyonu ile birlikte plastik kaplara konulurken, ABA ve humik asit uygulamaları yapraktan sprey şeklinde verilmiştir. Çizelge 3.5'te uygulamalara ait uygulama zamanları ve örneklerin toplandığı zaman belirtilmiştir. Bu süreler sonunda hem kök hem de yapraktan bitki örnekleri DNA ve RNA izolasyonu için hasat edilerek sıvı azotta bir süre tutulmuş, çalışma yapılacağı güne kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Uygulamalar ve kombinasyonları

No	Uygulamalar	Uygulama zamanı	Örneklerin Toplandığı zaman
1	-6 bar PEG6000	15.gün	22. gün
2	-8 bar PEG6000	15.gün	22. gün
3	ABA	15. ve 16. gün	22. gün
4	-6 bar PEG6000 + ABA	15.gün + 15. ve 16. gün	22. gün
5	-8 bar PEG6000 + ABA	15.gün + 15. ve 16. gün	22. gün
6	Humik asit	15. ve 16. gün	22. gün
7	-6 bar PEG6000 + Humik asit	15.gün + 15. ve 16. gün	22. gün
8	-8 bar PEG6000 + Humik asit	15.gün + 15. ve 16. gün	22. gün
9	Kontrol	-	22. gün

### 3.2.3. Biyokimyasal testler

#### 3.2.3.a. Lipid peroksidasyon (MDA) ölçümü

Lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarı, tiobarbiturik reaksiyonunu kullanarak Madhava and Stresty (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Bunun için her gruptan 0,5 g yaprak örneği TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatanta TBA (tiobarbitürük asit) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiştir. Tüm deney tüpleri  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk ısıtılmıştır. Karışım  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de

10,000 g'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. MDA konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.2.3.b. Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ölçümü

$\text{H}_2\text{O}_2$  düzeyi Velikova *et al.* (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemine göre her gruptan 0,1 g yaprak örneği 5 ml TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. 15 dk boyunca  $+4^\circ\text{C}$ 'de 12,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. 0,5 ml süpernatant 0,5 ml buffer (potasyum fosfat 10 mM, pH: 7) solusyonu ve 1 ml 1M KI tampon maddesi ile karıştırılmıştır. UV-VIS spektrofotometre yardımı ile 390 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

### 3.2.3.c. Total oksidan (TOS) ölçümü

Total oksidan miktarını belirlemek için Rel Assay Diagnostic TOS kiti kullanılmıştır. Buğday genotiplerine ait 0,1 g kök ve yaprak örnekleri 0,9 ml fosfat tamponunda homojenize edildikten sonra santrifüj edilerek üst faz alınmış, aşağıda verilen kit protokolü doğrultusunda spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.

	Örnek	Standart
Örnek	7,5 $\mu\text{l}$	-
Standart	-	7,5 $\mu\text{l}$
Reagent 1	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
İyice pipetaj yapıldıktan sonra 530 nm'de ilk ölçümü yapılmıştır (A1).		
Reagent 2	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
İyice pipetaj yapıldıktan sonra 5 dk bekletilmiş ve 530 nm'de ikinci ölçümü yapılmıştır (A2).		

Analizi için aşağıdaki hesaplama yapılmıştır.  $A2 - A1 = \Delta\text{Abs}$  (Standart veya örnek)

$$\text{Sonuç} = (\Delta\text{Abs}_{\text{örnek}} - \Delta\text{abs}_{\text{standart}}) \times 10$$

### 3.2.3.d. Total antioksidan (TAS) ölçümü

Total antioksidan miktarını belirlemek için Rel Assay Diagnostic TOS kiti kullanılmıştır. Buğday genotiplerine ait 0,1 gr kök ve yaprak örnekleri 0,9 ml fosfat tamponunda homojenize edildikten sonra santrifüj edilerek üst faz alınmış, aşağıda verilen kit protokolü doğrultusunda spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.

	Örnek	Standart/ saf su
<b>Örnek</b>	3 µl	-
<b>Standart</b>	-	3 µl
<b>Reagent 1</b>	50 µl	50 µl
İyice pipetaj yapıldıktan sonra 530 nm'de ilk ölçümü yapılmıştır (A1).		
<b>Reagent 2</b>	7,5 µl	7,5 µl
İyice pipetaj yapıldıktan sonra 5 dk bekletilmiş ve 530 nm'de ikinci ölçümü yapılmıştır (A2).		

Analizi için aşağıdaki hesaplama yapılmıştır.  $A2 - A1 = \Delta\text{Abs}$  (Standart veya örnek)

$$\text{Sonuç} = (\Delta\text{Abs}_{\text{safsu}} - \Delta\text{abs}_{\text{örnek}}) / (\Delta\text{Abs}_{\text{safsu}} - \Delta\text{abs}_{\text{standart}})$$

### 3.2.3.e. Biyokimyasal ölçümlerin istatistiksel analizi

Biyokimyasal ölçümlere ait veriler 9 (uygulama) x 4 (genotip) faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre SAS PROC GLM (SAS version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC) programı kullanılarak varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Karakterlere ait ortalamalar arasındaki farklılıklar Fisher's LSD (Least significant Difference) çoklu karşılaştırma testi ile %5 seviyesinde karşılaştırılmıştır.

### 3.2.4. mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesi

#### 3.2.4.a. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- 1) Önceden sterilizasyonu yapılan porselen havan içerisinde sıvı azot muamelesi ile öğütülen örnekler yaklaşık 100 mg doku gelecek şekilde tartılarak mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
- 2) Üzerlerine 350 µl Buffer RLT eklenmiş ve 1 dakika vortexlenmiştir.
- 3) Toplam hacim 700 µl olacak şekilde %70'lik ethanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- 4) 700 µl'lik hacim alınıp RNeasy mini kit pembe spin kolonlarına yüklenmiş ve kapaklar kapatılmıştır (2 ml'lik toplama tüpleri kolon altına geçirilmiştir) 15 saniye 8000 g'de santrifüj yapılmış, altta oluşan süzüntü atılmıştır.
- 5) 700 µl Buffer RW1 pembe spin kolonun üzerine eklenmiştir. 15 saniye 8000 g'de santrifüj yapılmış, altta oluşan süzüntü atılmıştır.
- 6) 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonun üzerine eklenmiştir. 15 saniye 8000 g'de santrifüj yapılmış, altta oluşan süzüntü atılmıştır.
- 7) 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonlarına yüklenmiştir. 2 dakika 8000 g'de santrifüj yapılmış, toplama tüpleri atılmıştır.
- 8) 1.5 ml'lik tüpler içine kolonlar yerleştirilmiştir. Üzerlerine 30-50 µl RNase Free Water eklenmiş, 1 dakika 8000 g'de santrifüj yapılarak RNA elüsyonları elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra kolonlar bir kenara ayrılmıştır.
- 9) Elde edilen RNA örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### 3.2.4.b. RNA'ların kalitatif ve kantitatif tayini

Total RNA konsantrasyonlarını belirlemek için Nanodropta (Qiagen Qiaxpert)  $A_{260/280}$  O.D. değerindeki ölçümler alınmış ve tüm örneklerin RNA konsantrasyonları 0,5 µg

olacak şekilde eşitlenmiştir. Ayrıca RNA'ların %1,2'lik agaroz jelde yürütülerek kantitatif tayini yapılmıştır.

### 3.2.4.c. cDNA sentezi

Total RNA'lardan cDNA eldesi Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA sentez kitinin (#K1622) üretici firma talimatları doğrultusunda aşağıda verilen basamaklar sırasıyla uygulanarak yapılmıştır.

- 1) Konsantrasyonu 0,5 µg/µl olacak şekilde ayarlanan RNA örnekleri steril PCR tüplerine konulmuş, 1 µl oligo (dT)<sub>18</sub> primeri eklenerek son hacim Water- nuclease free ile 12 µl'ye tamamlanmıştır.
- 2) Mini santrifüj yapılarak 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- 3) Her bir tüp içerisine Çizelge 3.6'da miktarları verilen cDNA sentez karışımı ilave edilerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
- 4) Mini santrifüj yapılan tüpler PCR cihazına yerleştirilip 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

### Çizelge 3.6. cDNA Sentez Karışımı

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid RT (200 U/ µl)	1 µl

### 3.2.4.d. Primer seçimi ve dizaynı

Çalışmada TaCP, TaSRG, Sal1, Era1 ve TdPIP1 genleri (Metabion International AG, steinkirchen, Germany) kullanılmıştır. Housekeeping gen olarak adlandırılan referans gen için β-Aktin tercih edilmiştir. Kullanılan genlere ait primer çiftleri Çizelge 3.7'de belirtilen çalışmalardan alınmıştır.

**Çizelge 3.7.** qRT- PCR ile ifade düzeyleri belirlenen genlere ait primerler ve bağlanma sıcaklıkları

Gen adı	Primerler (5' >3')	Bağlanma sıcaklığı (T <sub>m</sub> ) (°C)	Kaynak
<b>TaCP</b>	<b>F</b> GAGTGCGACCCAGCAGAAC	62,0	Zhang <i>et al.</i>
	<b>R</b> ACTCCGCCGATGTATGTCTG	60,0	2010
<b>TaSRG</b>	<b>F</b> ATAGGATGCAGGGCGAAGTG	60,0	He <i>et al.</i>
	<b>R</b> TTGTCCCTGACCTCCATCTTC	61,0	2011
<b>Sall</b>	<b>F</b> ACAATTGGTTGTGGTGCTGA	56,0	Manmathan
	<b>R</b> AAAAACGAGGCATTCCTGG	56,0	<i>et al.</i> 2013
<b>Era1</b>	<b>F</b> TGAAGCTCATGGTGGGTACA	58,0	Manmathan
	<b>R</b> AGCCAATCAAGCTAGGCAA	56,0	<i>et al.</i> 2013
<b>TdPIP1</b>	<b>F</b> GAGCACACCCAAGTGCACACTG	66,0	Ayadi <i>et al.</i>
	<b>R</b> ACAATGCCTGGAACGACCAATGG	65,0	2011
<b>β-Aktin</b>	<b>F</b> TGCTATCCTTCGTTTGGACCTT	60,0	Du <i>et al.</i>
	<b>R</b> AGCGGTTGTTGTGAGGGAGT	60,0	2013

*Triticum aestivum* genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ile ilgili veri tabanlarından yararlanılarak miRNA hedef genleri için primer tasarımı yapılmıştır. İlk olarak miRbase (<http://www.mirbase.org/>) veritabanı kullanılarak buğdayda miRNA'ların hedef genleri bulunmuş ve Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) veritabanı ile protein sekanslama yapılarak bu genlerin işlevlerine ulaşılmıştır. Daha sonra bitki genomik kaynağı olan Phytozom (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) veri tabanı kullanılmıştır. Veri tabanında *Triticum aestivum* bitki türü seçilmiş ve erişim numarası girilerek genlerin sekans dizilerine ulaşılmıştır. İfade olabilen bu sekans dizilerinden birbirine en uzak olan diziler seçilmiştir. Bu sayede ekzon-ekzon bölgeleri seçilmiş olup RNA izolasyonu sonrası başka bir işleme (DNA kirliliğini temizleme) gerek duyulmamıştır. Son olarak seçilen baz dizilerinden Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programı kullanılarak primerler oluşturulmuştur (Çizelge 3.8). Araştırma sürecinde kullanılacak olan primerler elde edildikten sonra firmanın önerdiği miktarda

sulandırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra yapılan hesaplamalar sonucunda 0,3 µM olacak şekilde çalışma solüsyonlarına seyreltilmiştir.

**Çizelge 3.8.** qPCR ile ifade düzeyleri belirlenmeye çalışılan miRNA'ların hedef genlerine ait primerler ve bağlanma sıcaklıkları

miRNA hedef gen adı	Primerler (5' >3')	Bağlanma sıcaklığı (T <sub>m</sub> ) (°C)
Traes_2AL_5BA7E2623 (ath-miR172a)	F CTGCCATCAAGTGCAACG	56,1
	R GAGGCTGCCCCCTCTTGTT	58,4
Traes_5DL_90BD9F306 (sbi-miR408)	F GCGGACGTCCTAGTGTTCA	59,5
	R TGTAGACCTTGGCTCCCTTG	60,5
Traes_6AL_EEA5F4238 (lja-miR396)	F AGCACCAGGCGCTCATATAC	60,5
	R CTCCGGATCCACCTTCTTG	59,5
Traes_1BS_A2F5A3F39 (sly-miR397)	F CTTCTTCTGCCGTTTGCTCT	58,4
	R GCAGAGCTGGCTAATGGAGA	60,5
Traes_2DS_3C3A2A12A (ptc-miR398a)	F ATCCCCCTTACTGGACCAAA	58,4
	R CGTTTCCAGTGCTCTTGCTA	58,4
β-Aktin	F TGCTATCCTTCGTTTGGACCT	60,3
	R AGCGGTTGTTGTGAGGGAGT	60,5

### 3.2.4.e. qPCR ile gen ifade analizi

qPCR işlemini gerçekleştirmek için Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Kiti kullanılmıştır. Protokol üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde aşağıdaki gibi yapılmıştır.

#### PCR Bileşenleri

SyberGreen Master Mix	12.5 µl
İleri Primer (0,3 µM)	1 µl
Geri Primer (0,3 µM)	1 µl
Ultra saf su	5.5 µl
cDNA (500 ng)	5 µl
Son hacim	25 µl

Çalışılacak her bir örneğe ait cDNA için 3 tekerrür yapılmış, ayrıca her bir gene ait negatif kontrol için içerisinde cDNA yerine saf su bulunan bir reaksiyon tüpü hazırlanmıştır. Karışım tüplere aktarılıp, kapakları kapatılarak Qiagen Rotor-Gene cihazına yerleştirilmiştir. Amplifikasyon aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

1. Hot Start	95°C 10 dk	40 döngü
2. Ayrışma	95°C 15 s	
3. Bağlanma (Primere göre değişken sıcaklık)	...°C 30 s	
4. Uzama	72°C 30 s	

#### 3.2.4.f. qPCR verilerinin analizi

Gen ifade analizi sonucunda örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. Cycle Treshold (Ct) değeri polimeraz zincir reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artışa geçilen ilk noktayı belirtmektedir. Real time PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen pik profillerinden her bir örneğe ait Ct değerleri belirlenmiştir. PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Genlerin ifade oranları Livak and Schmittgen (2001)'e göre  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. Genlerin ifadesi  $\beta$ -Aktin referans geninin ifadesine göre gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.5. DNA konformasyonlarının belirlenmesi

##### 3.2.5.a. DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda aşağıda verilen basamaklar sırasıyla uygulanmıştır:

a. Sıvı azotta ezilip 2 ml'lik eppendorf tüplere alınan her bir bitki örneği üzerine 1000  $\mu$ l DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda 60 dk bekletilen tüpler arada bir alt üst edilerek karıştırılmıştır.

- b. 12000 g ve 4°C'de 10 dk santrifüj sonunda üst faz temiz bir tüpe aktarılmıştır.
- c. Her bir tüpe 1000 µl Fenol: Kloroform: İzooamil alkol eklenerek alt üst edilmiştir. 12000 g ve 4°C'de 5 dk. santrifüj sonunda üst faz dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe aktarılmıştır.
- d. Her bir tüpe 1000 µl Kloroform: İzooamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilmiştir. 12000 g ve 4°C'de 5 dk. santrifüj sonunda üst faz dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe aktarılmıştır.
- f. DNA'yı çöktürmek için 0,5 hacim soğuk izopropanol eklenerek -20°C'de 10 dk. bekletilmiştir.
- g. 12000 g ve 4°C'de 10 dk. santrifüj sonunda üst faz dökülmüştür.
- h. Pelet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- i. Yıkanan pelet bir gece oda ısısında bekletilerek kurutulmuştur.
- j. Kurutulan DNA'nın 100 µl TE tamponunda çözülmesi sağlanmıştır.
- k. Kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### **3.2.5.b. DNA'ların kalitatif ve kantitatif tayini**

Elde edilen DNA'ların spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri okunmuştur. Konsantrasyonları 1060 ile 1737 arasında değişen ve OD (okuma değeri) 260/280 değeri 1,7-1,99 arasında olan saf DNA'lar elde edilmiştir. Ayrıca DNA'ların %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek kantitatif tayini yapılmıştır.

### **3.2.5.c. Buğday yaprak DNA'larına ait infrared (kızılötesi) spektrumlarının elde edilmesi**

Her bir genotipte yer alan gruplardaki örneklere ait yaprak DNA spektrumu Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan ATR- FTIR (Bruker Vertex 70 FTIR) spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. Spektral ölçümler 4000-400 cm<sup>-1</sup> spektral bölgede 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte 64 tarama sayısı ile OPUS 7.5 yazılımı (Bruker Optics, GmbH) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Öncelikle DNA'nın içinde çözöldüğü TE tamponun DNA spektrumundaki katkısını ortadan kaldırmak amacıyla TE tampon spektrumu background olarak çekilmiş ve DNA spektrumlarından otomatik olarak çıkartılmıştır. Her grupta yer alan örnek DNA'sından emin olmak için, her grup DNA'sından 5er kez spektrul toplanılmıştır. Elde edilen spektrumlar hem kemometrik hem de kalitatif spektral analizler için kullanılmıştır.

#### **3.2.5.d. Spektral verilerin analizi**

##### **-Kemometrik analizler**

Çalışılan grupların sınıflandırılması amacıyla, kemometrik analiz metotlarından olan gözetimsiz (unsupervised) örüntü tanıma yöntemlerinden, hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ile temel bileşen analizi (PCA) metotları kullanılmıştır. Hiyerarşik kümeleme analizi ve temel bileşen analizi için Unscrambler X 10.3 (Camo Software, Inc.) programı kullanılmıştır. PCA analizleri için ham spektrumlar kullanılmıştır. HCA analizleri içinse örnek spektrumlarının ikincil türev alınmış, daha sonra vektör normalizasyonu yapılmıştır. PCA sonuçları skor grafikleri, HCA sonuçları ise dendrogram grafikleri şeklinde verilmiştir.

##### **-Kalitatif spektral analizler**

Kemometrik analizlerden elde edilen DNA spektrumlarındaki farklılıklara dayalı gruplar arası farklılaşmanın nedenini ortaya koymak amacıyla, bantları daha iyi karakterize etmek amacıyla elde edilen absorbands spektrumların, OPUS 7.5 yazılımı (Bruker Optics, GmbH) kullanılarak 1800-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgede ikincil türevi alınarak vektör normalizasyonu yapılmıştır. Literatüre göre karakteristik B, A ve Z tip DNA bantları belirlenmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çalışmada, -8 bar PEG6000 (yüksek şiddette kuraklık) uygulanan 63 ekmeklik buğday genotipi içerisinde fizyolojik olarak kuraklığa en toleranslı (Aksel 2000; Kırkpınar 79) ve hassas (Atlı 2002; Kırmızı Kılçık) 4 genotip belirlenmiştir. 14 gün süre ile normal şartlarda üç yapraklı döneme kadar yetiştirilen bu genotipler, -6 bar PEG6000 (orta şiddette kuraklık/OŞK), -8 bar PEG6000 (yüksek şiddette kuraklık/YŞK), 100 µM ABA ve %10 humik asitin %1'lik dozu ve bu uygulamaların kombinasyonlarına 7 gün süre ile maruz kalmıştır (Çizelge 3.5). Kök ve yaprak kısımları hasat edilen örneklerden biyokimyasal analizler (MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TAS, TOS), total RNA izolasyonu ve DNA izolasyonu yapılarak aşağıda belirtilen analiz sonuçlarına ulaşılmıştır.

#### 4.1. Biyokimyasal Analizler

##### 4.1.1. MDA seviyesinin belirlenmesi

Hücre membran hasarının bir göstergesi olan MDA miktarı üzerine her iki doku tipinde de (kök ve yaprak) uygulama ve genotipin ana etkileri ile bunların interaksiyon etkisi çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1.** Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki MDA miktarları (uMol/gr)

Uygulamalar	Genotipler				Ortalama
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Atlı 2002	Kırmızı Kılçık	
Kontrol	6,86	6,22	6,20	6,96	6,56
OŞK	7,34	8,86	8,63	10,67	8,87
YŞK	11,14	11,16	12,23	13,10	11,90
ABA	5,87	5,80	6,04	6,03	5,93
ABA + OŞK	6,84	7,21	8,35	9,86	8,06
ABA + YŞK	10,28	9,42	12,05	12,34	11,24
HA	5,87	5,74	5,21	4,87	5,42

**Çizelge 4.1.** (devam)

HA + OŞK	6,43	7,70	7,45	8,80	7,60
HA + YŞK	10,09	9,45	10,32	10,98	10,21
<b>Ortalama</b>	<b>7,86</b>	<b>7,95</b>	<b>8,50</b>	<b>9,29</b>	<b>8,40</b>
F Değeri (Uygulama) (U)	848,79**				
F Değeri (Genotip) (G)	159,50**				
F Değeri (U x G)	24,71**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	0,22				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	0,15				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	0,44				
VK%	3,22				

\*\* çok önemli (p&lt;0,01)

**Çizelge 4.2.** Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki MDA miktarları (uMol/gr)

Uygulamalar	Genotipler				Ortalama
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Ath 2002	Kırmızı Kılçık	
Kontrol	7,14	6,70	7,70	8,69	7,56
OŞK	8,20	9,59	13,16	11,46	10,59
YŞK	14,28	14,50	18,65	18,5	16,48
ABA	6,14	6,81	6,32	8,83	7,02
ABA + OŞK	7,96	9,26	9,59	10,82	9,43
ABA + YŞK	13,28	12,37	14,76	16,04	14,11
HA	5,69	6,21	8,03	7,84	6,94
HA + OŞK	7,66	8,34	10,60	11,45	9,51
HA + YŞK	10,24	10,28	13,54	14,57	12,16
<b>Ortalama</b>	<b>8,95</b>	<b>9,34</b>	<b>11,37</b>	<b>12,02</b>	<b>10,42</b>

F Değeri (Uygulama) (U) 1574,728\*\*

F Değeri (Genotip) (G) 739,05\*\*

F Değeri (U x G) 28,483\*\*

LSD<sub>(0,05)</sub> (U) 0,23LSD<sub>(0,05)</sub> (G) 0,15LSD<sub>(0,05)</sub> (UXG) 0,47

VK% 2,76

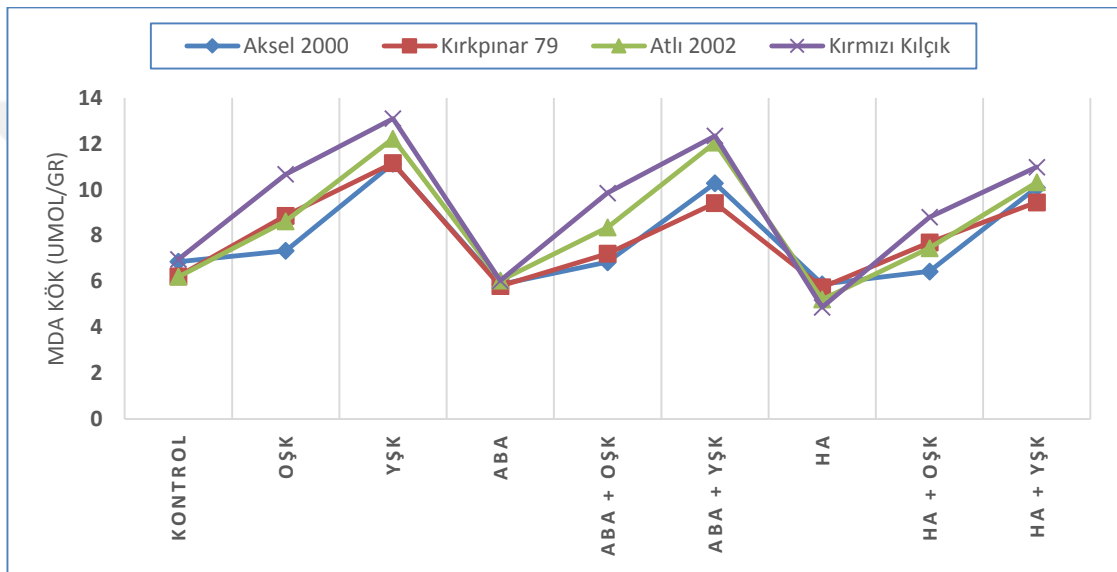
\*\* çok önemli (p&lt;0,01)

Uygulamaların ortalamasına göre genotiplerin kök dokusundaki MDA miktarı 7,86-9,29 uMol/gr arasında değişim göstermiş, ortalama ise 8,40 uMol/gr olarak belirlenmiştir. Genotiplerin MDA miktarına göre sıralanışı Kırmızı Kılçık > Atlı 2002 > Kırkpınar 79 > Aksel 2000 şeklinde olmuştur. Uygulamaların ortalamasına göre hassas genotiplerin (Kırmızı Kılçık ve Atlı 2002) toleranslı genotiplere kıyasla daha yüksek MDA miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Yine kök dokusunda uygulamanın ana etkisi incelendiğinde genotiplerin ortalamasına göre uygulamaların MDA miktarı 5,42 uMol/gr ile 11,90 uMol/gr arasında değişim göstermiştir. En düşük MDA miktarı HA uygulamasında 5,42 uMol/gr ile elde edilirken; en yüksek MDA miktarı 11,90 uMol/gr ile YŞK uygulamasından elde edilmiştir. Diğer taraftan, yaprak dokusunda genotiplerin ortalama MDA miktarı 8,95-12,02 uMol/gr arasında değişmiş ve ortalama 10,42 uMol/gr olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Genotiplerin MDA miktarı bakımından sıralaması kök dokusundaki ile aynı olmuştur. Genotiplerin ortalamasına göre ise uygulamaların MDA miktarı 6,94-16,48 uMol/gr arasında değişmiştir. Kök dokusundaki bulgulara benzer olarak en yüksek (16,48 uMol/gr) MDA miktarı YŞK uygulamasından; en düşük ise (6,94 uMol/gr) HA uygulamasından elde edilmiştir.

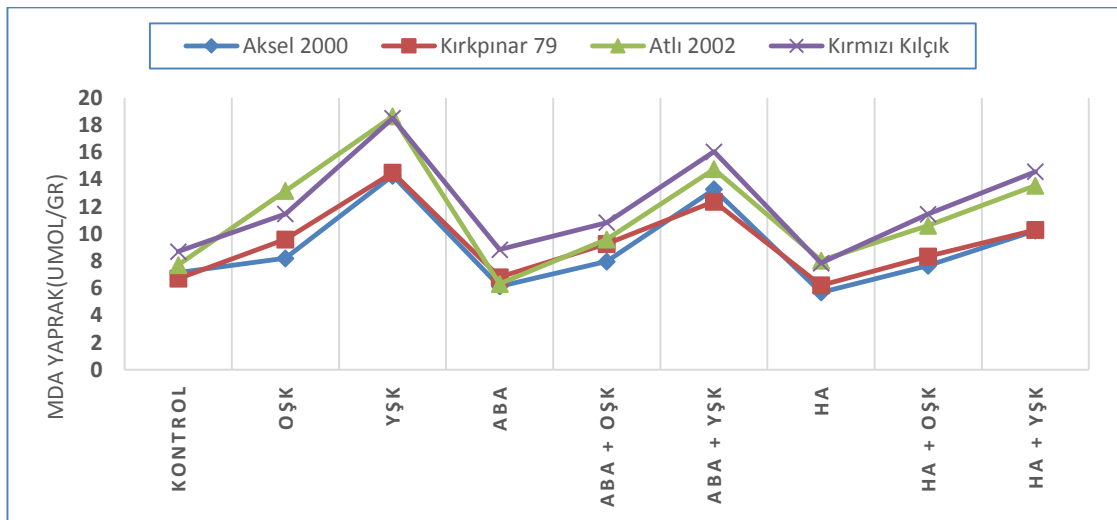
Araştırmada her iki doku tipinde de genotiplerin ortalamasına göre OŞK ve YŞK uygulamalarında kontrole göre daha yüksek MDA değeri elde edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Lipit peroksidasyonu sürecinin son ürünü olan MDA, membrandaki oksidasyonu belirleyen ve hücreler için oldukça toksik olan bir üründür (Al Ghamdi 2009). Aşırı strese maruz kalan bitkilerde aktive edilmiş oksijen türlerinin artması ile birlikte lipit peroksidasyonu meydana gelmektedir. Lipitlerin peroksidasyona uğraması tüm organizmalar için bilinen en tehlikeli durumdur (Renu and Devarshi 2007). Bunun yanısıra, çalışmamızda tüm uygulamalarda genel olarak kök ve yaprak MDA analiz sonuçları kıyaslandığında yaprakta elde edilen değerler kökten elde edilen değerlerden oldukça yüksek çıkmıştır (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2). Suyun bitki gelişimi için yetersiz olduğu koşullarda yeterli miktarda su alamayan bitkilerde kök:sürgün oranı her zaman daha fazladır. Toprakta ulaşabildiği her yerden su alabilmek için kök uzunluğunu artıran bitkilerde, köklerdeki hassasiyet gövde ve yapraklara göre daha düşüktür (Wu and

Cosgrove 2000). Dolayısıyla MDA miktarının bu doku tipinde daha düşük çıkması kaçınılmaz bir sonuçtur.

Hem kök dokusunda hem de yaprak dokusunda genotiplerin MDA miktarının uygulamalara göre değişim göstermesi genotip x uygulama interaksiyonunun etkisinin önemli olmasına neden olmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki MDA miktarları (uMol/gr)



Şekil 4.2. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki MDA miktarları (uMol/gr)

Kök dokusunda, genotiplerin MDA miktarı kontrolde 6,20 uMol/gr (Atlı 2002) ile 6,96 uMol/gr (Kırmızı Kılçık) arasında; yaprakta ise, 6,70 uMol/gr (Kırkpınar 79) ile 8,69 uMol/gr (Kırmızı Kılçık) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kontrol uygulamasında kök dokusunda MDA miktarı bakımından genotiplerin sıralaması Kırmızı Kılçık > Aksel 2000 > Kırkpınar 79 > Atlı 2002 iken; yaprak dokusunda Kırmızı Kılçık > Atlı 2002 > Aksel 2000 > Kırkpınar 79 şeklinde olduğu belirlenmiştir. Kök ve yaprak dokusundaki genotiplerin sıralanışının farklılık göstermesinin nedeni buğday genotiplerinin büyüme ve gelişim süreçlerinin genotipe göre farklılık göstermesinden kaynaklanmış olabilir.

Genotiplerin tamamında MDA miktarı hem kök hem de yaprak dokularında kontrole göre tek başına OŞK (orta şiddette kuraklık) ve YŞK (yüksek şiddette kuraklık) uygulamalarında doz artışına bağlı olarak yüksek miktarlarda olduğu belirlenmiştir. Bu miktarlar, hassas genotiplerde (Atlı 2000 ve Kırmızı Kılçık) toleranslı genotiplere kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Çalışmamızda toleranslı genotiplerin MDA içeriğinin hassas olanlara göre daha düşük çıkması MDA testinin stresin bitkilerdeki olumsuz etkilerinin ölçümünü sağlaması bakımından güvenilir bir test olduğunu teyit eder niteliktedir. Çalışmamıza benzer olarak su stresine maruz bırakılan kuraklığa hassas (Sids-1) ve toleranslı (Veery) buğday genotiplerinin kullanıldığı bir çalışmada (Al Ghamdi 2009), ölçülen MDA miktarları hassas genotipte toleranslı olana göre daha yüksek sonuç vermiştir. Yine kuraklık stresi altında, hassas buğday genotiplerinde lipitlerin oksidatif hasara uğradığı ve membran bütünlüğünün zayıfladığı belirlenmiştir (Simova Stoilova *et al.* 2010). Toleranslı genotiplerin daha düşük MDA miktarına sahip olmaları, onların daha yüksek anti-oksidatif kabiliyetlerine sahip olmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim, Dhanda *et al.* (2004), kuraklığa toleranslı genotiplerin antioksidatif kabiliyetlerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, 5 farklı buğday genotipinde çalışan Sultan *et al.* (2012) kuraklık stresi altında toleranslı genotiplerin daha yüksek prolin miktarına sahip olduğunu ve yüksek ozmotik konsantrasyonun varlığında hücrel proteinlerin ve membranların stabilizasyonunda prolinin önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Öte yandan, stres şartlarında oluşan membran hasarını H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği ile ilişkilendirmek de mümkündür. Her iki doku tipinde de tüm genotiplerde hem MDA seviyesi hem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesi kuraklık doz artışına

bağlı olarak artış göstermiştir (Sonuçlar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> analizleri başlığında verilmiştir). Araştırmamıza benzer olarak yapılan çalışmalarda kuraklığın artmasıyla birlikte bitkilerde hem MDA, hem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinde artış görülmüştür (Moussa and Abdelaziz 2008; Singh and Bhardwaj 2016).

Tüm genotiplerde tek başına ABA ve HA uygulamaları her iki doku tipinde de kontrolde elde edilen MDA miktarına yakın ve genelde daha düşük MDA miktarı elde edilmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2).

Diğer taraftan stres şartlarında (OŞK ve YŞK) uygulanan ABA ve HA'nın genotiplerde ki etkilerine bakıldığında hem ABA ve hem de HA uygulamasının tüm genotiplerde her iki doku tipinde de MDA miktarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bulgularımıza benzer olarak Kaur *et al.* (2014), kuraklığa hassas ve toleranslı buğday genotiplerinde yapmış olduğu çalışmalarında stres şartlarında ABA uygulamasının MDA miktarında azalışa neden olduğunu ve MDA üretim mekanizmasında ABA'nın rolünün olabileceğini bildirmişlerdir. ABA'nın buradaki muhtemel rolü hücre membran hasarını azaltan  $\alpha$ -tokoferolün miktarını artırmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Mohammadi and Moradi (2016), kuraklık stresinde ABA uygulamasından sonra  $\alpha$ -tokoferolün miktarının daha fazla arttığını tespit etmişlerdir. ABA'nın MDA miktarının azalışındaki muhtemel rolü ROT'ların plazma zarı üzerindeki olumsuz etkisini bastırmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemini indüklemesiyle açıklanabilir. Nitekim Jiang and Zhang (2001), ABA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunu indükleyerek Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD, CAT gibi antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonlarını artırdığı ve SOD, CAT, APX, GR, ASC, GSH gibi enzimatik antioksidanların aktivitelerini artırdığını rapor etmiştir. Bununla birlikte, kuraklıkla birlikte dışsal ABA uygulamasının etkisini tam anlamak için olayın temelinde yatan mekanizmalar hakkında daha iyi bilgi edinilmesi gerekmektedir. Öte yandan, Aydın *et al.* (2012) fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) tuz stresi koşullarında HA uygulamasının tuz koşullarına bitkinin uyum sağlamasına yardımcı olarak prolin içeriğini artırdığı ve lipit peroksidasyonunu inhibe ederek hücre mebranı geçirgenliğini koruduğunu belirtmişlerdir. Yine, çeltikte yapılan bir çalışmada (Garcia *et al.* 2012) kuraklık

stresinde HA uygulamasının hücre membranının yapısında koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada, stres hormonu olarak bilinen ve stres esnasında miktarı artıp bitkiyi aklımasyona yönlendirerek stres sinyalinin oluşmasına neden olan ABA ve HA uygulamalarının MDA miktarındaki azalış oranları dikkate alındığında yaprak dokusunda OŞK şartlarında ABA ve HA uygulamalarının MDA miktarını azaltmadaki oranı benzer olurken; YŞK şartlarında HA uygulamasının MDA miktarındaki azalış oranına etkisi daha fazla olmuştur. Kök dokusunda ise her iki kuraklık stresinde de HA uygulaması ABA uygulamasına göre daha fazla MDA miktarında azalışa neden olmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Bu sonuçlar, özellikle HA uygulamasının kuraklık stresine toleransta ABA'dan daha etkili olabileceğini göstermiştir. HA'nın MDA miktarında azalmaya sebep olması membranlardaki lipit tabakasının akışkanlığını değiştirmesine bağlanabilir. Humik maddelerin hem karboksilik ve fenolik gruplar gibi hidrofilik hem de alifatik ve aromatik parçalar gibi hidrofobik alanları içeren yüzey aktif madde benzeri yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Humik maddelerin bu amfifilik özelliklerinden dolayı humik maddeler doğal yüzey aktif maddeler olarak davranırlar ve biyolojik membranlarda dahil olmak üzere çok sayıda doğal yüzey üzerinde adsorbe olabilirler. Humik maddelerin biyolojik membranlarla olan ilişkileri ve yüzey aktif özellikleri, humik maddelerin lipit tabakasının yapısını ve akışkanlığını, hücre zarı geçirgenliğinin etkileneceği bir düzeye getirme potansiyelleri vardır (Visser 1982). Nitekim Vigneault *et al.* (2000), humik asidin fitoplanktonların membran yapısını değiştirerek, akuatik ortamdaki toksik ve çözünebilen maddelerin fitoplanktonlar tarafından alınması ve bunların düzenlenmesinde etkili olduğunu belirlemişlerdir.

#### **4.1.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin belirlenmesi**

Radikal olmayan (moleküler) ROT'lardan biri olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı üzerine her iki doku tipinde uygulama ve genotipin ana etkileri ile bunların interaksiyon etkisi çok önemli (p<0,01) olmuştur (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.3.** Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları (uMol/gr)

Uygulamalar	Genotipler				Ortalama
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Athı 2002	Kırmızı Kılçık	
Kontrol	760,7	679,7	883,7	690,0	753,5
OŞK	895,7	745,3	1145,7	959,3	936,5
YŞK	1251,0	969,0	1058,7	1128,3	1101,8
ABA	756,3	689,0	890,7	709,3	761,3
ABA + OŞK	722,7	699,0	921,0	691,7	758,6
ABA + YŞK	829,3	892,7	998,7	1061,0	945,4
HA	898,0	690,7	972,0	791,7	838,1
HA + OŞK	954,0	764,3	1221,0	823,3	940,7
HA + YŞK	1118,3	1040,7	1274,0	1191,0	1156,0
<b>Ortalama</b>	<b>909,6</b>	<b>796,7</b>	<b>1040,6</b>	<b>894,0</b>	<b>910,2</b>
F Değeri (Uygulama) (U)	2388,46**				
F Değeri (Genotip) (G)	2470,58**				
F Değeri (U x G)	195,58**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	8,5				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	5,7				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	17,1				
VK%	1,2				

\*\* çok önemli (p&lt;0,01)

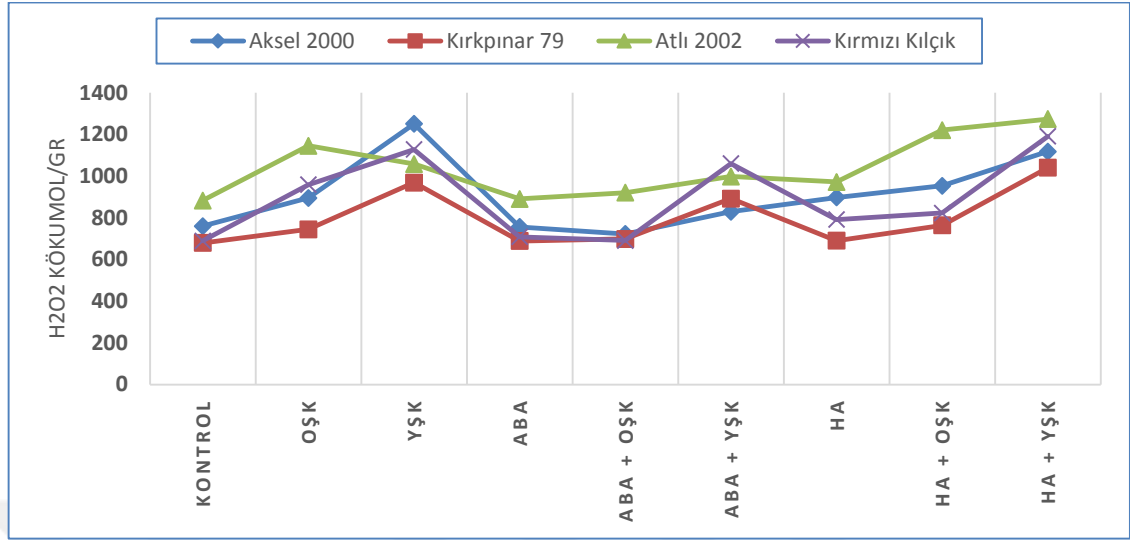
**Çizelge 4.4.** Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları (uMol/gr)

Uygulamalar	Genotipler				Ortalama
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Athı 2002	Kırmızı Kılçık	
Kontrol	819,0	729,3	959,7	777,2	821,3
OŞK	985,0	871,7	1241,3	1062,5	1040,1
YŞK	1372,0	1054,3	1303,2	1232,0	1240,4
ABA	832,4	756,2	923,8	817,7	832,5
ABA + OŞK	842,7	785,7	1059,3	781,7	867,4
ABA + YŞK	922,5	947,7	1151,0	1161,3	1045,6
HA	968,5	756,7	1067,4	834,7	906,8
HA + OŞK	1038,0	893,1	1235,7	908,7	1018,9
HA + YŞK	1454,1	1139,6	1315,3	1309,1	1304,5
<b>Ortalama</b>	<b>1026,0</b>	<b>881,6</b>	<b>1139,6</b>	<b>987,2</b>	<b>1008,6</b>
F Değeri (Uygulama) (U)	967,3**				
F Değeri (Genotip) (G)	823,2**				
F Değeri (U x G)	49,9**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	15,7				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	10,5				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	31,4				
VK%	1,9				

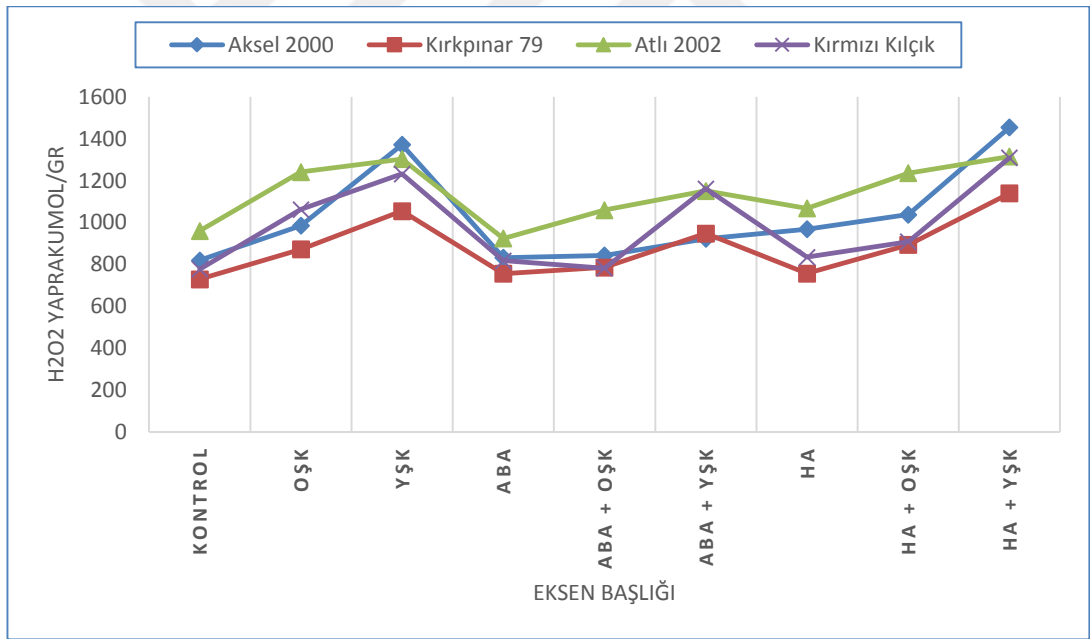
Uygulamaların ortalamasına göre genotiplerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı kök dokusunda 796,7-1040,6 uMol/gr arasında; yaprak dokusunda ise 881,6-1139,6 uMol/gr arasında değişmiştir. Uygulamaların ortalamasına göre her iki doku tipinde de en yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı hassas genotiplerden Atlı 2002'de, en düşük ise toleranslı genotip olan Kırkpınar 79'da belirlenmiştir. Her iki doku tipinde de genotiplerin toleransına göre sıralanışı Atlı 2002>Aksel 2000>Kırmızı Kılıçık>Kırkpınar 79 şeklinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Diğer taraftan uygulamanın ana etkisi incelendiğinde tek başına OŞK ve YŞK uygulamalarının her iki doku tipinde de kontrole göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Yine, iyileştirici olarak kullanılan ABA ve HA uygulamalarının kontrole göre hem kök hem de yaprak dokusundaki etkileri incelendiğinde ABA'nın kontrole yakın ancak önemsiz bir artışa, HA uygulamasının ise kontrole göre daha yüksek bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. ABA'nın OŞK ve YŞK şartlarındaki etkisine bakıldığında kök dokusunda bu stres şartlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında azalmaya neden olduğu; yaprak dokusunda ise OŞK şartlarında azda olsa bir artışa; YŞK şartlarında ise dikkate değer bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir iyileştirici faktör olarak kullanılan HA'nın OŞK ve YŞK şartlarındaki etkileri değerlendirildiğinde kök dokusunda her iki stres şartında da artışa, yaprak dokusunda ise OŞK şartlarında bir azalışa, YŞK şartlarında ise bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4).

Uygulama ve genotiplerin ortalamasına göre yaprak dokusunun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının kök dokusuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni yapraklardaki fotorespirasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, peroksizomlarda glikolat oksidaz reaksiyonu ile çok yüksek oranlarda üretilmesinden kaynaklanmış olabilir (Noctor *et al.* 2000).

Genotiplerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının uygulamalara göre değişim göstermesi her iki doku tipinde de uygulama x genotip interaksiyon etkisinin önemli çıkmasına neden olmuştur (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları (uMol/gr)



Şekil 4.4. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları (uMol/gr)

Uygulamalara göre genotipler karşılaştırıldığında kontrol uygulamasında genotiplerin kök dokusundaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı 679,7-883,7 uMol/gr arasında değişim gösterirken, yaprak dokusunda 729,3-959,7 uMol/gr arasında değişim göstermiştir. Kök dokusunda en düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> değeri Kırkpınar 79 toleranslı genotipinde belirlenirken (679,7 uMol/gr) bunu sırayla Kırmızı Kılçık (690,0 uMol/gr), Aksel 2000 (760,7 uMol/gr) ve Atlı 2002

(883,7 uMol/gr) genotipleri izlemiştir. Yaprakta genotiplerin sıralaması yine aynı şekilde olmuştur.

Kuraklık stresinin artışına bağlı olarak kök dokusunda  $H_2O_2$  miktarı Atlı 2002 genotipi hariç diğer 3 genotipte arttığı belirlenirken, yaprak dokusunda ise tüm genotiplerde arttığı tespit edilmiştir. Her iki doku tipinde de OŞK şartlarında hassas genotiplerin daha yüksek  $H_2O_2$  miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. YŞK şartlarında ise her iki doku tipinde de en yüksek  $H_2O_2$  miktarına Aksel 2000 genotipinin, en düşük ise Kırkpınar 79 genotipinin sahip olduğu belirlenmiştir. Bu iki genotipin her iki dokusunun dayanıklı olması dikkat çekici bir durum olarak belirlenmiştir. Bir ROT olarak bilinen  $H_2O_2$  ilk kez redoks algılama, sinyalleme ve regülasyonunda başlıca redoks metaboliti olduğu düşünülmüştür. Ancak daha sonra yapılan incelemelerde  $H_2O_2$ 'nin hücrelerden ve dokulardan içeri alınarak hücre şekil değişiklikleri, proliferasyonun başlatılması gibi hücrel olayları başlatmak için sinyal molekülü olarak görev yaptığı, böylece metabolizmada hasar sinyalcisi rolünün ötesinde, temel düzenleyici işlevlere de hizmet ettiği tespit edilmiştir (Sies 2017). Nitekim daha önceki çalışmalarda,  $H_2O_2$ 'nin oksidatif metabolizmanın bir parçası olduğu ve kök uzunluğunun artırılması, bitki hücre duvarının güçlendirilmesi, ksilem farklılaşması, stoma kontrolünde hücre duvarının gevşetilmesi gibi bitki büyüme ve gelişimi için önemli olan çeşitli metabolizma ve sinyal kaskatlarıyla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Dempsey and Klessig 1995). Dolayısıyla, çalışmamızda stres dozu arttıkça  $H_2O_2$  miktarının artmasının sebebinin strese karşı toleransı güçlendirme amaçlı olduğu söylenebilir. Bu yönden bakınca, hassas genotiplerin  $H_2O_2$  değerlerinin daha yüksek olması beklenirken, toleranslı genotip Aksel 2000'de YŞK'da en yüksek değere ulaşmıştır. Ancak, diğer toleranslı genotip olan Kırkpınar 79 ise her iki doku tipinde de (kökte, 969,0; yaprakta, 1054,3) YŞK'da hassas genotiplerden daha düşük bir değere sahip olmuştur. Bhagi *et al.* (2013), kuraklığa hassas ve toleranslı buğday genotiplerini kullandığı çalışmalarında kuraklık stresinde toleranslı genotipte  $H_2O_2$  miktarının hassas genotipe göre daha düşük değerde seyretmesinin nedenini strese cevabın oluşturulması için genotipte yeterince  $H_2O_2$  olduğundan daha fazla miktarını artırmaya gerek duymadığına bağlamışlardır. Burdan yola çıkarak, kuraklığa toleranslı olduğu bilinen Aksel 2000'in örneklerin toplandığı

dönemde (15gün stressiz+7gün stresli=22gün) strese tolerans sağlanma mekanizmalarını harekete geçirdiği ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını artırarak tolerans sağlamış olduğu söylenebilir.

Tek başına ABA uygulaması kontrole kıyasla Aksel 2000 kök ve Atlı 2002 yaprak hariç diğer tüm genotiplerin her iki dokusunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının artmasına neden olmuştur. Verilerimize uygunluk gösteren farklı çalışmalarda buğdayda (Kaur *et al.* 2014) ve mısırdaki (Zhang *et al.* 2006; 2007) ABA uygulaması ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artış görülmesinin sebebinin ABA sinyalizasyonu boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin downstream sinyal olarak davranması ile açıklamışlardır. Ayrıca, Kaur *et al.* (2014) ABA ile birlikte kuraklık stresi uygulamasında bazı genotiplerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde artışın olmasının o genotipte ABA-bağımlı mekanizmanın azlığından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda genel olarak ABA ile birlikte uygulanan OŞK ve YŞK uygulamaları sonucu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinde kademeli bir artış görülmektedir. Bazı genotiplerde (Aksel 2000 kök, Kırmızı Kılçık kök, Kırmızı Kılçık yaprak) ABA+OŞK uygulamasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında bir düşüş ardından ABA+YŞK uygulamasında tekrar bir artışın görülmesi (Şekil 4.3, Şekil 4.4) strese toleransın kazanılması için genotiplerin geçirdiği bir uyum olarak yorumlanabilir.

Tek başına HA uygulaması tüm genotiplerde kontrole kıyasla her iki doku tipinde de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışa yol açmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.3, Çizelge 4.4, Şekil 4.3). Garcia *et al.* (2012) çeltik kök ve yapraklarına HA uygulamasının ROT'lardan özellikle O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimini artırdığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda HA ile birlikte uygulanan OŞK ve YŞK uygulamalarında her iki doku tipinde genotiplerin hepsinde strese bağlı olarak artış görülmüştür (Çizelge 4.3, Şekil 4.3, Çizelge 4.4, Şekil 4.3). Çeltikle yapılan bir çalışmada (Sheteiwy *et al.* 2017) çinko oksit nanopartikülleri ile ağır metal stresi uygulamasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, APX miktarının streste oldukça düşük, ancak stres ile birlikte HA uygulamasıyla APX miktarında hızlı bir artışın görülmesi ile bağlantılı olarak APX'in stres esnasında oluşan O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerini moleküler oksijen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye

dönüştürdüğü ileri sürülmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin sinyal görevi üstlenerek stres cevap yolağını aktive ettiği ve strese karşı toleransı artırdığı kaydedilmiştir. Çalışmamızda kuraklık stresi uygulamaları ile birlikte HA uygulanmasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin diğer tüm uygulamalardan daha yüksek seviyelerde seyretmesi strese toleransın sağlanmasında HA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini artırarak bunu başardığı söylenebilir.

#### 4.1.3. Total oksidan (TOS) seviyesinin belirlenmesi

Çalışmadaki tüm uygulamaların genotiplerin oksidan miktarlarındaki artış veya azalışları üzerine olan genel etkilerini belirlemek için TOS miktarına bakılmıştır. Kök ve yaprakta uygulama ve genotipin ana etkileri ile bunların interaksiyon etkisi çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.5.** Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TOS miktarları (umol/L)

Uygulamalar	Genotipler				
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Atlı 2002	Kırmızı Kılçık	Ortalama
Kontrol	8,940	5,923	12,930	10,057	9,463
OŞK	10,557	8,910	15,637	11,160	11,566
YŞK	13,350	10,190	21,160	19,150	15,963
ABA	7,943	4,270	10,937	8,897	8,012
ABA + OŞK	9,557	6,887	13,200	9,187	9,708
ABA + YŞK	12,160	8,883	18,190	17,190	14,106
HA	4,533	4,090	9,140	6,910	6,168
HA + OŞK	4,960	5,057	12,160	7,653	7,458
HA + YŞK	5,943	6,817	17,143	14,193	11,024
<b>Ortalama</b>	<b>8,660</b>	<b>6,781</b>	<b>14,500</b>	<b>11,600</b>	<b>10,385</b>
F Değeri (Uygulama) (U)	38253,6**				
F Değeri (Genotip) (G)	98549,1**				
F Değeri (U x G)	2411,20**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	0,046				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	0,030				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	0,09				
VK%	0,54				

\*\* çok önemli ( $p < 0.01$ )

**Çizelge 4.6.** Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TOS miktarları (umol/L)

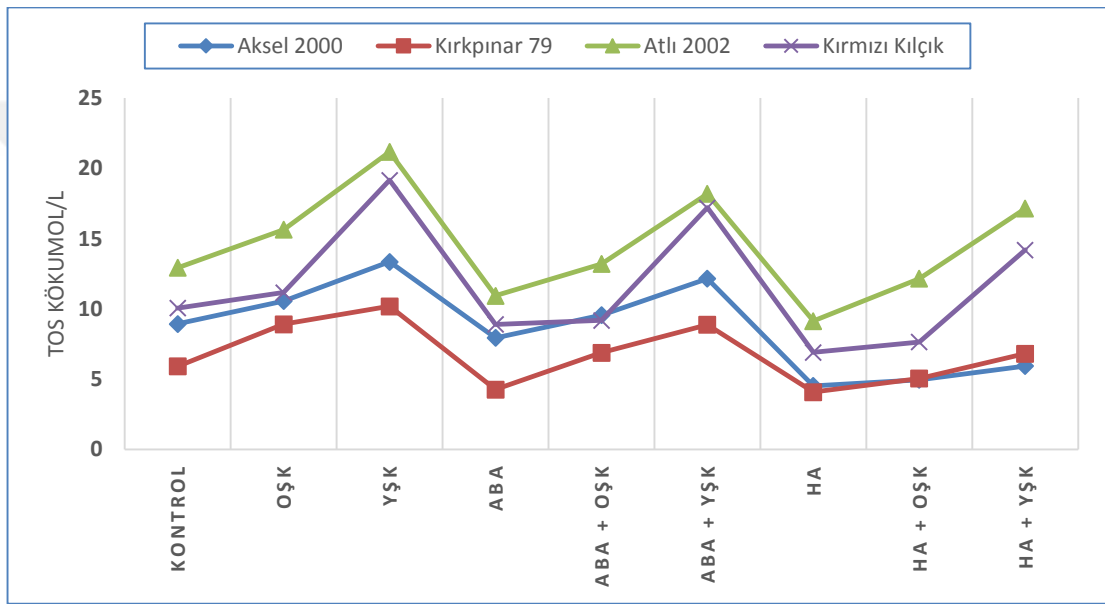
Uygulamalar	Genotipler				Ortalama
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Atlı 2002	Kırmızı Kılçık	
Kontrol	9,356	6,590	13,528	10,655	10,032
OŞK	11,124	9,157	17,711	14,812	13,201
YŞK	15,217	11,220	22,551	22,202	17,797
ABA	8,875	4,582	11,540	9,480	8,619
ABA + OŞK	10,190	7,351	15,167	11,160	10,967
ABA + YŞK	13,160	9,952	20,177	19,207	15,624
HA	5,225	4,608	10,133	7,374	6,835
HA + OŞK	5,045	5,919	14,532	8,211	8,427
HA + YŞK	6,664	7,042	19,320	15,847	12,218
<b>Ortalama</b>	<b>9,428</b>	<b>7,380</b>	<b>16,073</b>	<b>13,216</b>	<b>11,524</b>
F Değeri (Uygulama) (U)	33782,5**				
F Değeri (Genotip) (G)	89652,6**				
F Değeri (U x G)	2156,13**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	0,055				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	0,037				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	0,011				
VK%	0,6				

\*\* çok önemli (p<0,01)

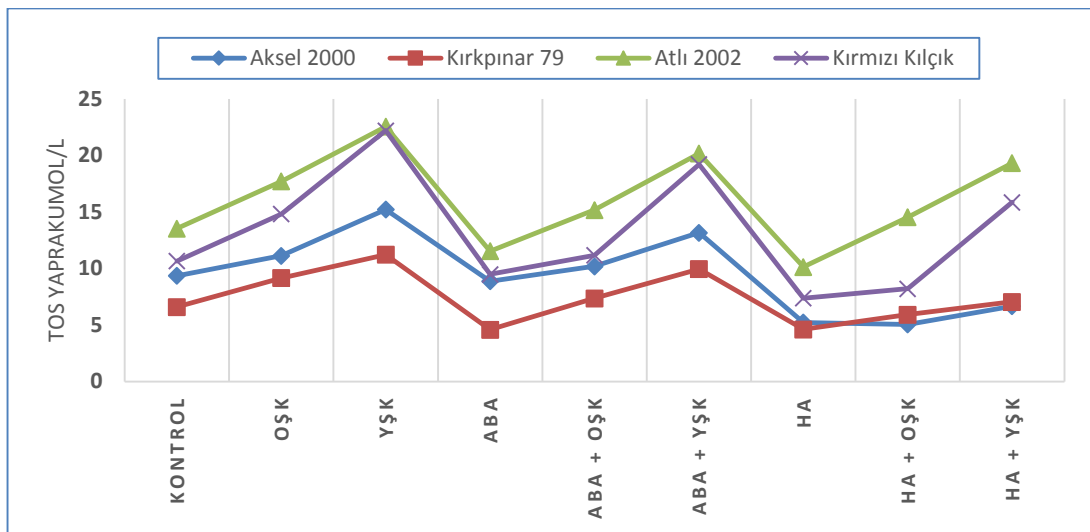
Uygulamaların ortalamasına göre genotiplerin kök dokusunda TOS miktarı 6,781-14,500 umol/L arasında değişkenlik göstermiş ve ortalama 10,385 umol/L olarak tespit edilmiştir. Genotiplerin TOS miktarı bakımından sıralanışı; Atlı 2002>Kırmızı Kılçık>Aksel 2000>Kırkpınar 79 şeklindedir. Uygulamaların ortalamasına göre hassas genotiplerin toleranslı genotiplerden daha yüksek TOS değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Kökte uygulamanın ana etkisi incelendiğinde genotiplerin ortalamasına göre TOS miktarının 6,168-15,963 umol/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. En düşük TOS miktarı HA uygulamasında (6,168 umol/L), en yüksek TOS miktarı ise YŞK (15,963 umol/L) uygulamasında olmuştur. Yaprak dokusuna bakıldığında, genotiplerin ortalama TOS miktarları 7,380-16,073 umol/L arasında değişiklik göstermiş ve ortalama 11,524 umol/L olarak belirlenmiştir. Genotiplerin TOS miktarı bakımından sıralaması kök dokusu ile aynı olmuştur. Genotiplerin ortalamasına göre ise uygulamaların TOS miktarı 6,835-17,797 umol/L arasında değişmiştir. Kök dokusundan elde edilen verilerle benzer olarak, en yüksek TOS miktarı YŞK (17,797 umol/L), en

düşük TOS miktarı ise HA (6,835 umol/L) uygulamalarından elde edilmiştir (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6).

Çalışmamızda, her iki doku tipinde de genotiplerin TOS miktarlarının uygulamalara göre değişim göstermesi genotip x uygulama interaksiyonunun etkisinin önemli olmasına neden olmuştur (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TOS miktarları (umol/L)



Şekil 4.6. Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TOS miktarları (umol/L)

Kökte genotiplerin kontrol uygulamasında TOS miktarı 5,923 umol/L (Kırkpınar 79)- 12,930 umol/L (Atlı 2002) arasında; yaprakta ise 6,590 umol/L (Kırkpınar 79)- 13,528 umol/L (Atlı 2002) aralığında değiştiği belirlenmiştir.

TOS miktarı bakımından genotiplerin her iki doku tipinde de, kontrole kıyasla OŞK ve YŞK uygulamalarında tüm genotiplerde doz arttıkça kademeli bir artış görülmüştür. Hassas ve toleranslı genotipler kıyaslandığında ise, stres uygulamalarında her iki doku tipinde de toleranslı genotiplerin hassas genotiplere oranla daha düşük TOS değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Bu durum toleranslı genotiplerin stres şartlarında sahip oldukları tolerans mekanizmaları sayesinde TOS uygulamalarına karşı bitkide tolerans mekanizmalarını TOS üretimini minimize etmekte olduklarını göstermektedir. Çeşitli abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde aşırı ROT üretimini indüklediği pek çok çalışmada belirlenmiştir (Zlatev *et al.* 2006; Dong *et al.* 2018). Kuraklık stresinin ROT oluşturma mekanizması sadece suyun alınımı ile ilgili olarak değil, stomalar üzerindeki etkisi de göz önüne alınarak aydınlatılmıştır. Buna göre, artan kuraklık stresinde ABA ve diğer sinyal düzenleyicilerinin stomaları kapatması sonucu fotosentez azalmakta, mezofil hücrelerindeki CO<sub>2</sub> oranı düşmekte ve buna paralel olarak NADPH<sub>2</sub> birikimi artmaktadır. Bu durumda, oksijen, tilakoidlerde elektron taşıma zincirinden elektronların alternatif bir alıcısı görev yapmakta ve O<sub>2</sub>' radikalinin oluşmasına neden olmaktadır (Zlatev *et al.* 2006). O<sub>2</sub>' radikali ve indirgenmiş ürünü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potansiyel olarak toksik bileşiklerdir. Bu radikallerin aynı zamanda Haber-Weiss reaksiyonu ile birleşmesi sonucunda son derece toksik OH• radikali oluşmaktadır. Böylece kuraklık stresi sonucu oluşan bu ROT'lar lipid peroksidasyonuna, membran hasarlarına, protein degradasyonlarına, DNA ve RNA'da zincir kırıklarına ve enzim inaktivasyonlarına yol açmaktadırlar (Sairam *et al.* 2005; Zlatev *et al.* 2006). ROT'ların bu zararlı etkileri göz önüne alındığında hassas genotiplerde TOS miktarının daha yüksek, toleranslı olanlarda ise daha düşük çıkması beklenen bir durumdur.

Ayrıca, çalışmamızda tek başına ABA ve HA uygulamaları sonucu elde edilen TOS miktarları kontrole kıyasla oldukça düşük çıkmıştır (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). Bunun yanısıra, OŞK ve YŞK uygulamaları ile birlikte uygulanan hem ABA, hem de HA

uygulamalarının tüm genotiplerde her iki doku tipinde de TOS miktarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Nitekim dışarıdan ABA uygulamasının ROT miktarını azaltması üzerine literatürde çeşitli çalışmalara rastlamak mümkündür. Düşük sıcaklığa maruz bırakılan kışlık buğday genotiplerine dışarıdan ABA uygulaması ile kontrole kıyasla ROT'larda düşüş görülmüştür (Li *et al.* 2014). Kuraklığa hassas ve toleranslı mısır genotiplerine su stresi uygulaması sonucunda, stresin ilk günlerinde dışarıdan uygulanan ABA'nın sinyal görevi üstlenerek içsel ABA miktarını artırdığı ve böylece antioksidan enzimlerin aktivitesini indüklemek amacıyla ROT'ların artmasına sebep olduğu, ancak stresin 10. gününde ROT'ların tamamen uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada toleranslı genotipin stresin 10. gününde hassas genotipe kıyasla daha düşük enzim aktivitesi gösterirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının hassas genotipte oldukça fazla miktarda belirlenmiştir. Bu durumun, hassas genotipte oksidatif stres kontrolünün çok iyi sağlanmasından kaynaklandığı ve bu nedenle aşırı miktarda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hassas genotipte lipid peroksidasyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Correa de souza *et al.* 2014). Çalışmamızda hassas genotiplerin toleranslı genotiplere kıyasla TOS miktarında daha fazla artışın görülmüş olması bu araştırmadaki bulgular ile uyumluluk arz etmektedir.

Diğer taraftan, humik maddelerin tuz stresi altında ki *Phaseolus vulgaris*' in kök ve yaprak dokularında ROT'ları azalttığı ve bunu antioksidan enzim aktivitelerini uyararak yaptığı belirlenmiştir (Aydin *et al.* 2012). Bu durum, HA'nın bitkilerde oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkabilen lipid peroksidasyonunun oluşumunu önlemek suretiyle hücre zarının yapısını koruduğunu işaret etmektedir. Nitekim HA'nın strese karşı TOS miktarları üzerine benzer iyileştirici etkisi çeltikte de tespit edilmiştir (Hernandez *et al.* 2012). Bunun yanısıra, HA'nın bitkilere uygulandığı ilk saatlerde ROT üretimini artırdığına dair metabolik yollar araştırılmış olup, bu çalışmalardan elde edilen bulgulara göre HA bitkide oksin gibi davranmaktadır. Şöyle ki; HA bitkiye köklerden alınmakta ve tıpkı oksin gibi hücredeki hormonal reseptörler tarafından tanınmaktadır (Nardi *et al.* 2002). Oksin veya HA verilen bitkide kök büyümesi ve sekonder kök oluşumunun teşvik edilmesi bunun en belirgin kanıtıdır. Öte yandan oksinin bir diğer etkisi, bitkide redoks olaylarının düzenlemesini sağlamasıdır. Arabidopsiste yapılan

transkriptom çalışmaları oksin sinyalinin ve homeostazının ROT'lar tarafından modifiye edildiğini göstermiştir (Blomster *et al.* 2011). Stres savunma mekanizmasında ROT'lar protein biyosentezi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde sekonder mesajcı olarak rol alırken, aşırı sentezlenen ROT'ların sitotoksik etki yaptığı bilinmektedir (Jiang and Zhang 2002). Buradan yola çıkarak HA'nın stres tolerans mekanizmasına ROT seviyesini düşük miktarlarda artırarak katkıda bulunduğu bilinse de, çalışmamızda bitkilere kuraklık stresi nispeten daha uzun süreli uygulanmış olduğundan HA uygulanan bitkilerde TOS miktarının kontrole kıyasla oldukça düşük seviyelere düşmüş olması HA'nın strese karşı koruyucu rolünü, TOS oluşumunu sınırlayarak gerçekleştirdiği söylenebilir.

#### 4.1.4. Total antioksidan (TAS) seviyesinin belirlenmesi

Çalışmada uygulamaların genotiplerdeki antioksidan miktarlarına olan etkilerini belirlemek için TAS miktarları da analiz edilmiştir. Her iki doku tipinde TAS miktarı üzerine uygulama ve genotipin ana etkileri ile bunların interaksiyon etkilerinin çok önemli ( $p<0,01$ ) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.7.** Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TAS miktarları (mmol/L)

Uygulamalar	Genotipler				
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Atlı 2002	Kırmızı Kılçık	Ortalama
Kontrol	0,594	0,384	0,377	0,694	0,512
OŞK	0,314	0,394	0,495	1,046	0,562
YŞK	0,336	0,309	0,465	0,880	0,497
ABA	0,696	0,612	0,584	0,785	0,669
ABA + OŞK	0,594	0,499	0,882	1,126	0,775
ABA + YŞK	0,496	0,389	0,791	0,994	0,667
HA	0,701	0,782	0,815	0,919	0,804
HA + OŞK	0,794	0,578	0,985	1,292	0,912
HA + YŞK	0,683	0,454	1,006	1,105	0,812
<b>Ortalama</b>	<b>0,579</b>	<b>0,489</b>	<b>0,711</b>	<b>0,982</b>	<b>0,690</b>
F Değeri (Uygulama) (U)	11810,3**				
F Değeri (Genotip) (G)	57583,0**				
F Değeri (U x G)	2475,16**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	0,004				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	0,003				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	0,001				
VK%	0,674				

\*\*çok önemli ( $p<0,01$ )

**Çizelge 4.8.** Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TAS miktarları (mmol/L)

Uygulamalar	Genotipler				
	Aksel 2000	Kırkpınar 79	Atlı 2002	Kırmızı Kılçık	Ortalama
Kontrol	0,619	0,442	0,410	0,811	0,570
OŞK	0,346	0,471	0,588	1,342	0,687
YŞK	0,387	0,374	0,547	0,989	0,574
ABA	0,720	0,694	0,692	0,858	0,741
ABA + OŞK	0,692	0,587	0,992	1,461	0,933
ABA + YŞK	0,555	0,459	0,892	1,094	0,750
HA	0,722	0,837	0,906	1,063	0,882
HA + OŞK	0,843	0,624	1,038	1,518	1,006
HA + YŞK	0,717	0,499	1,202	1,258	0,919
<b>Ortalama</b>	0,622	0,554	0,807	1,155	0,785
F Değeri (Uygulama) (U)	7250,10**				
F Değeri (Genotip) (G)	46896,8**				
F Değeri (U x G)	1941,18**				
LSD <sub>(0,05)</sub> (U)	0,005				
LSD <sub>(0,05)</sub> (G)	0,003				
LSD <sub>(0,05)</sub> (UXG)	0,001				
VK%	0,823				

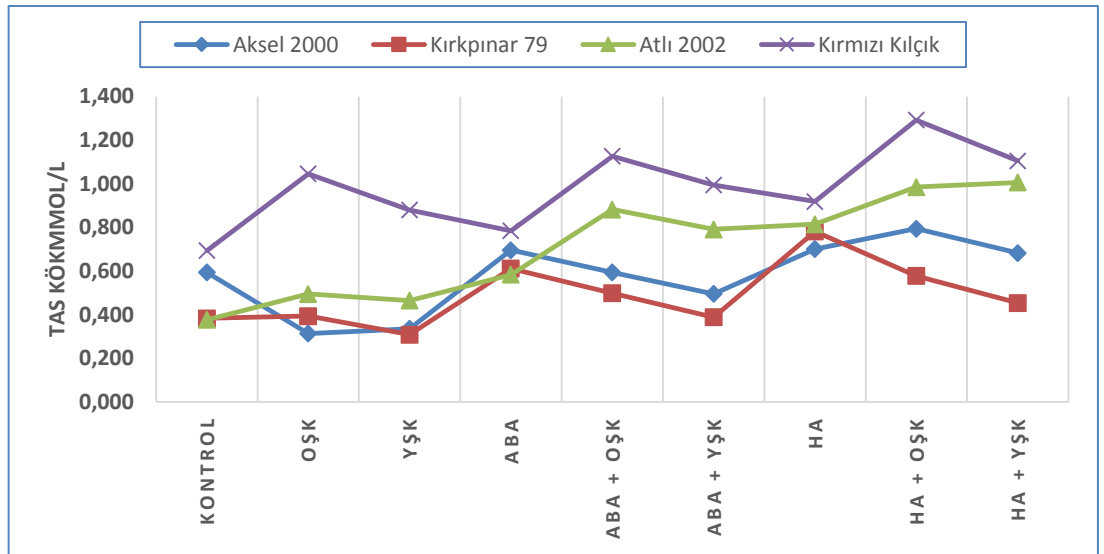
\*\* çok önemli (p<0,01)

Uygulamaların ortalamasına göre, genotiplerin kök dokusundaki TAS miktarı 0,489-0,982 mmol/L arasında değişkenlik göstermiş, ortalama ise 0,690 mmol/L olarak belirlenmiştir. Genotiplerin TAS miktarına göre sıralanışı; Kırmızı Kılçık>Atlı 2002>Aksel 2000>Kırkpınar 79 şeklinde olmuştur. Uygulamaların ortalamasına göre hassas genotiplerin toleranslı genotiplere kıyasla daha yüksek TAS miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Kuraklığa toleranslı genotipler kuraklık stresi altında sadece metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmek için yeterli suyu bünyelerinde tutma eğiliminde olmayıp aynı zamanda bahsedilen oksidatif hasarlardan kendilerini korumak için oldukça geliştirilmiş bir antioksidan mekanizmaya sahiplerdir (Ren *et al.* 2016). Dolayısıyla, çalışmamızda toleranslı genotiplerde stresin uygulandığı ilk anlarda TAS miktarlarının fazla olup, ilerleyen günlerde (7 gün) TAS miktarlarını azalttıkları, hassas genotiplerin ise hayatta kalabilmek için TAS miktarlarını korudukları söylenebilir.

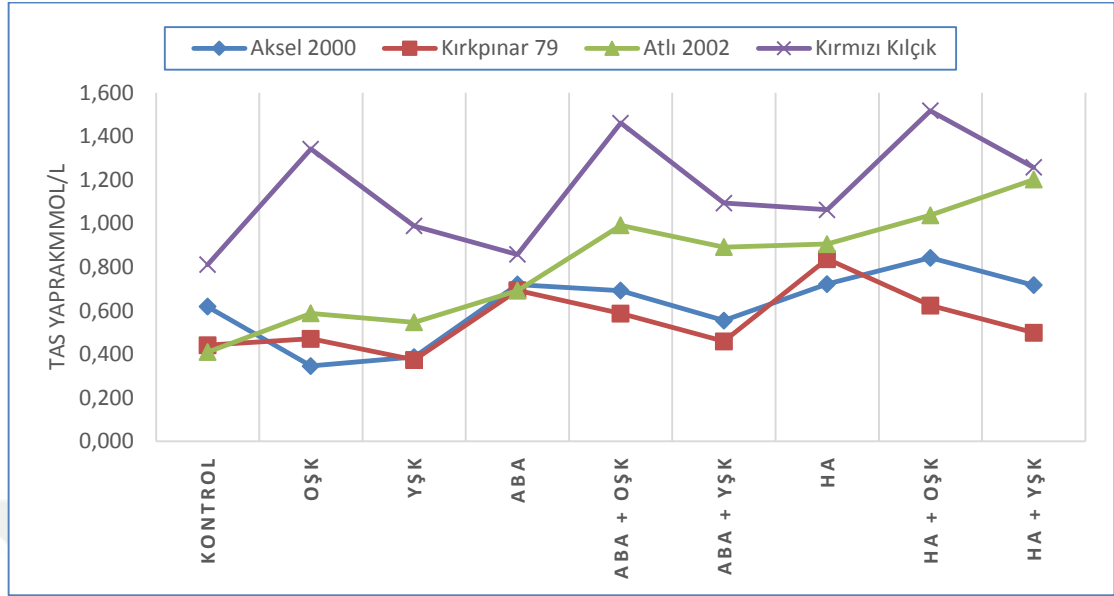
Genotiplerin ortalamasına göre uygulamanın ana etkisi kök dokusunda incelendiğinde uygulamaların TAS miktarının 0,497-0,912 mmol/L arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. En düşük TAS miktarı (0,497 mmol/L) YŞK uygulamasında, en yüksek TAS miktarı ise (0,912 mmol/L) HA+OŞK uygulamasında elde edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8).

Uygulamaların ortalamasına göre, genotiplerin yaprak dokusundaki TAS miktarları ise 0,554-1,155 mmol/L arasında belirlenmiş ve genotiplerin sıralamasının kök dokusu ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, en yüksek TAS değeri (1,155 mmol/L) Kırmızı Kılçık genotipinde en düşük TAS değeri (0,554 mmol/L) ise Kırkpınar 79 genotipinde olmuş ve ortalama 0,785 mmol/L olarak belirlenmiştir. Genotiplerin ortalamasına göre yaprakta uygulamaların TAS miktarları 0,570-1,006 mmol/L arasında olup, kök dokusundan farklı olarak en yüksek TAS miktarı (1,006 mmol/L) HA+OŞK uygulamasından, en düşük TAS miktarı (0,570 mmol/L) ise kontrol uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8).

Diğer parametrelerde olduğu gibi genotiplerin TAS miktarı uygulamalar arasında farklılık göstermiştir. Bunun sonucu olarak TAS miktarı üzerine genotip x uygulama etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Uygulamalara göre genotiplerin köklerindeki TAS miktarları (mmol/L)



**Şekil 4.8.** Uygulamalara göre genotiplerin yapraklarındaki TAS miktarları (mmol/L)

Çalışmada, uygulamalara göre genotiplerin TAS miktarı incelendiğinde her iki doku tipinde de kontrole kıyasla OŞK uygulamasında Aksel 2000 toleranslı genotipinde azalma, diğer 3 genotipte artış; YŞK uygulamasında ise toleranslı genotiplerde azalma, hassas genotiplerde ise artış tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, stres dozu arttıkça hem kök hem de yaprakta TAS miktarında sadece Aksel 2000 toleranslı genotipinde bir artış belirlenirken, diğer 3 genotipte ise doz arttıkça TAS miktarı da azalmıştır (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8). Guo *et al.* (2006), kuraklığa ve soğuğa maruz bırakılan toleranslı ve hassas çeltik genotiplerinde stresin uygulandığı ilk 3 gün içerisinde toleranslı genotipte hassas genotipe kıyasla SOD, CAT, APX antioksidan enzimlerinde oldukça yüksek bir artışın görüldüğünü ancak stres süresi 5 güne ulaştığında her iki genotipte de enzim aktivitesinde azalışın olduğunu belirlemiştir. Çalışmamızda, toleranslı olduğu bilinen Aksel 2000 genotipinin OŞK uygulamasında TAS miktarını azaltıp, daha şiddetli olan YŞK uygulamasında ise TAS miktarını artırmasının, strese karşı geliştirilen bir tolerans mekanizması olduğu düşünülebilir. Ayrıca “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> analizleri”nde Aksel 2000 toleranslı genotipinin YŞK şartlarında her iki doku tipinde de diğer genotiplere kıyasla en yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına ulaştığı ve bu durumun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hem hasar sinyalcisi rolünün olmasından, hemde temel düzenleyici işlevlerde görev almasından dolayı da strese karşı toleransı güçlendirme fonksiyonu olduğundan bahsedilmiştir. Aksel 2000 genotipinin

YŞK şartlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının bu kadar yüksek olmasının nedeni, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye yüksek derecede afinitesi olduğu bilinen POX enziminin miktarının fazlalığından kaynaklı olabilir. Çünkü bu enzim, NADPH gibi moleküllerin oksidasyonu yoluyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimine katkı sağlamaktadır (Ranieri *et al.* 2005). Nitekim hücredeki yerine göre ve etki ettiği ROT türüne göre antioksidanların her birinin miktarı değişkenlik gösterebilmektedir. Bu antioksidanlardan, SOD'lar, organellerde ve sitosolda O<sub>2</sub><sup>·</sup> radikalinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalize eden bir enzim ailesi iken, CAT'lar fotorespirasyonda üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi peroksizomlardan uzaklaştırmada rol oynamakta, POX'lar ise vakuollerde yer alan ve geniş bir ROT yelpazesine etki eden antioksidan çeşitlerindedir. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan olan askorbat ve glutatyon ise dokularda milimolar konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Noctor and Foyer 1998). Askorbat, direkt olarak OH<sup>·</sup>, O<sub>2</sub><sup>·</sup> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub> radikalleriyle tepkimeye giren askorbat-glutatyon yolağındaki sekonder antioksidandır. Glutatyon ise askorbat-glutatyon yolağında askorbatın indirgenmiş formda tutulmasını sağlayan bir antioksidandır (Noctor and Foyer 1998). Zhang *et al.* (2004) kuraklığa toleranslı buğday genotipinde hassas genotipe kıyasla orta şiddette kuraklığın Mn-SOD-1, Mn-SOD-2 and Fe-SOD aktivitelerinde artışa sebep olduğunu belirtirken, Simova Stoilova *et al.* (2008), su stresine maruz bırakılan kışlık buğday çeşitlerinde stresin uygulandığı ilk anlarda SOD ve CAT miktarında az miktarda artışın görüldüğünü, GPX miktarında ise daha fazla artışın olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmada iyileştirici olarak kullanılan ABA ve HA'nın etkileri incelendiğinde tek başına ABA ve HA uygulamalarının her iki doku tipinde de kontrole kıyasla tüm genotiplerde TAS miktarında artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Hem ABA hem de HA'nın bitkilerde hücre sinyali ve hormonal kontrollerle ilgili olarak redoks homeostazını sağladığı bilinmektedir (Berbara and Garcia 2014). Nitekim Jiang and Zhang (2002), dışarıdan uygulanan düşük konsantrasyondaki (100 µM) ABA'nın mısırdaki SOD, CAT, APX, GR aktivitelerini stimüle ettiğini bildirmişlerdir.

Diğer taraftan, OŞK ve YŞK uygulamaları ile birlikte uygulanan ABA ve HA'nın tüm genotiplerde her iki doku tipinde de tek başına OŞK ve YŞK uygulamalarına kıyasla

TAS miktarında artışa neden oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8). ABA, oksidatif stresin başladığı ilk anlarda ROT üretimini tetikleyerek antioksidan genlerin ekspresyonlarını indüklemekte ve antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirmeye yardımcı olmaktadır (Zhang *et al.* 2006). Yine, düşük sıcaklıkta ABA'nın buğday genotiplerinde SOD, POD ve CAT aktivitelerinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Li *et al.* 2014). Hu *et al.* (2005), ABA'nın ROT oluşumunu indükleyerek hücrenin her bölgesinde koordineli olarak TAS aktivitesini artırdığından bahsetmiştir. Bunun yanısıra, yapılan çalışmalarda (Tahir *et al.* 2011; Cordeiro *et al.* 2011; García *et al.* 2012; 2016) PEG aracılı ozmotik ve su stresi altında çeltik ve mısır bitkilerinde SOD ve POX antioksidan enzimlerinin artışının HA uygulamasına bağlı olarak arttığı ve HA'nın koruyucu rolünün olduğu tespit edilmiştir. Yine, kadmiyum stresi altında buğdayda, HA'nın SOD ve CAT miktarında artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Ozfidan Konakci *et al.* 2018).

## 4.2. qPCR Analizleri

### 4.2.1. TaSRG, TaCP, Sal1, Era1 ve TdPIP1 genlerinin ifade analizleri

Buğday genotiplerine yapılan uygulamalar sonucunda kök ve yapraklardan elde edilen TaSRG, TaCP, Sal1, Era1 ve TdPIP1 gen ifade sonuçları aşağıda açıklanmıştır.

TaSRG geni mRNA ifade analiz sonuçlarına göre her iki doku tipinde de OŞK ve YŞK uygulamalarında ifade oranında artış meydana gelmiştir. Kök dokusunda yaprak dokusuna kıyasla, toleranslı genotiplerde hassas genotiplere kıyasla daha yüksek ifade oranları belirlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Çalışmamızda elde edilen bulgulara benzer olarak, Rana *et al.* (2015) tuzluluğa toleranslı ve hassas buğday genotiplerinde, NaCl ve CaCl<sub>2</sub> ile oluşturulan tuz stresinde toleranslı genotipin TaSRG ifade oranının hassas genotipe kıyasla daha fazla olduğunu; bu genin ifade oranının yaprakta köke kıyasla daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Yine bu bulgularımıza benzer olarak Xiaoliang *et al.* (2011), tuzluluğa toleranslı transgenik çeltik ve Arabidopsis bitkilerinin TaSRG gen ifade oranı hassas genotiplere kıyasla daha yüksek olduğunu

belirlemişlerdir. Tuz stresi altında TaSRG geninin upregüle olduğu Arabidopsis'te  $\text{Na}^{2+}$  oranının düşük,  $\text{K}^+/\text{Na}^{2+}$  oranının ise oldukça yüksek olduğu, ancak mutant tipte  $\text{K}^+/\text{Na}^{2+}$  oranının düşük olduğu belirlenmiş ve tuz toleransının sağlanmasında bu iyonların miktarını dengeleyerek görev yaptığı bildirilmiştir (Armengaud *et al.* 2004). Yine, TaSRG geninin aşırı ifade edildiği Arabidopsis'te prolin miktarının aşırı bir şekilde artış gösterirken, mutant tipte prolin seviyesinde herhangi bir değişime rastlanılmamıştır (Armengaud *et al.* 2004). Bu da, TaSRG geninin iyon dengesindeki bu görevinin yanısıra bir osmoregülatör olan prolin miktarında etki ederek ozmotik strese toleransta etkili olduğunu işaret etmektedir.

Kuraklık stresi, bitkilerde diğer tüm stres faktörleri ile stres mekanizma yolları ortak olan bir stres çeşididir. Kuraklık ve tuz stresi arasındaki ortak etki kuraklık stresi oluşturmada kullanılan PEG gibi osmotik ajanların, tuz stresi ile aynı osmotik basıncı oluşturmaktan kaynaklanmaktadır (Yeo *et al.* 1991). Dolayısıyla tuza yanıt geni olarak bilinen ve normalde tuz stresi ile ifade düzeyi değişmesi beklenen TaSRG geninin, bu çalışmada kuraklık stresi ile de up-regüle olması her iki stres çeşidinin benzer stres yollarını kullandıklarının göstergesidir. Nitekim tuz stresinin yanısıra, kuraklık, soğuk, sıcak, ağır metal ve ABA'ya karşı bu genin ifadesinin arttığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (He *et al.* 2011; Ergun *et al.* 2014).

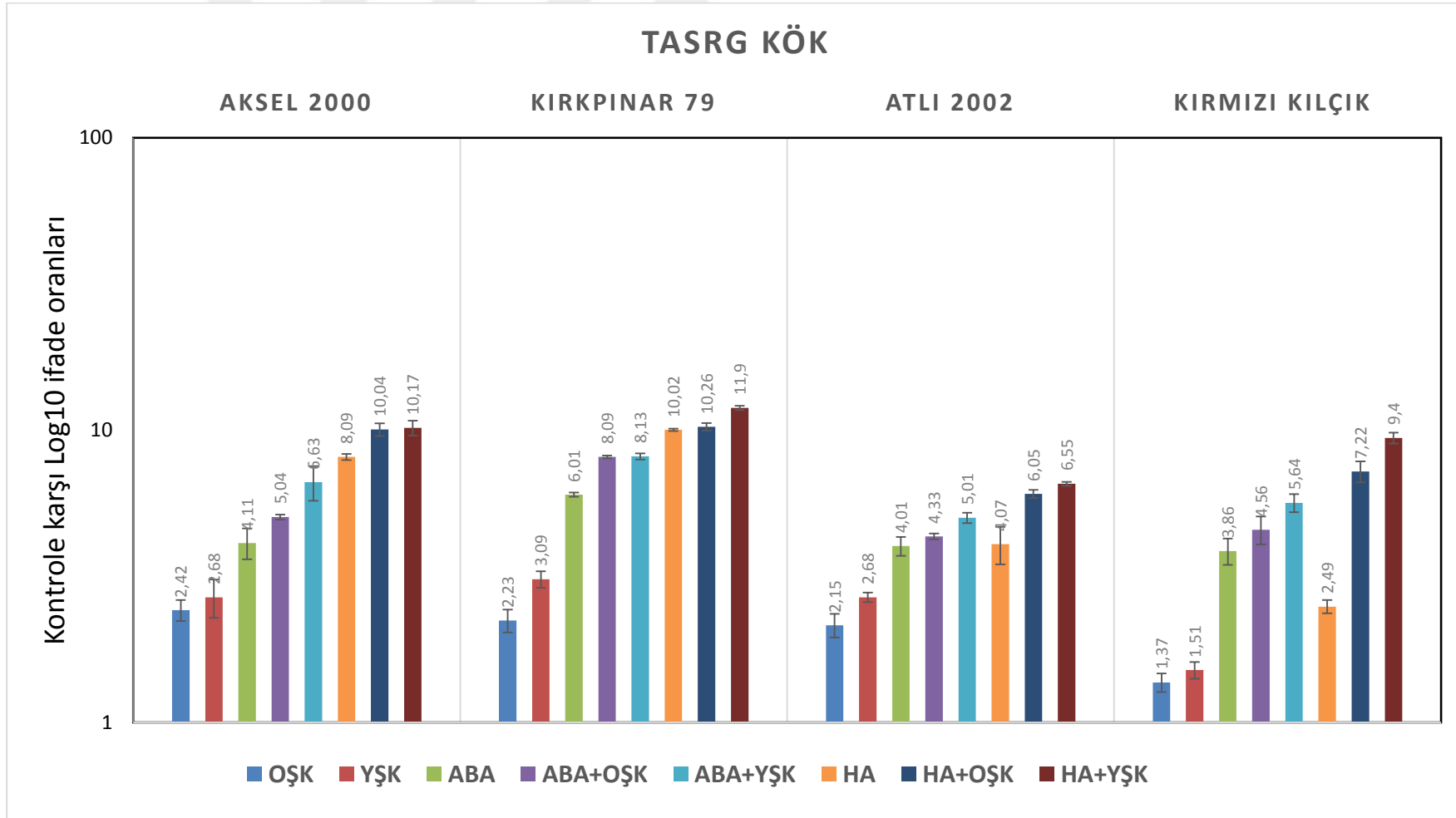
Çalışmamızda, tek başına ABA uygulamasının her iki doku tipinde de TaSRG geninin oldukça yüksek değerlerde upregüle olmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Bu bulgumuza benzer olarak He *et al.* (2011), tuza toleranslı mutant RH8706-49 buğday genotipinin kök ve yapraklarına uyguladıkları ABA'nın özellikle uygulamanın ilk saatlerinde TaSRG geninin oldukça yüksek seviyelerde upregüle olmasına, ilerleyen saatlerde ise gen ifade oranında kademeli bir düşüş olmasına rağmen yine de genin yüksek bir değerde ifade olmasına yol açtığını belirlemişlerdir.

Bunun yanısıra araştırmamızda, OŞK ve YŞK şartlarında uygulanan ABA, TaSRG mRNA transkript birikiminin her iki doku tipinde de tek başına stres uygulamalarına kıyasla daha yüksek olmasına sebep olmuştur (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Stres esnasında

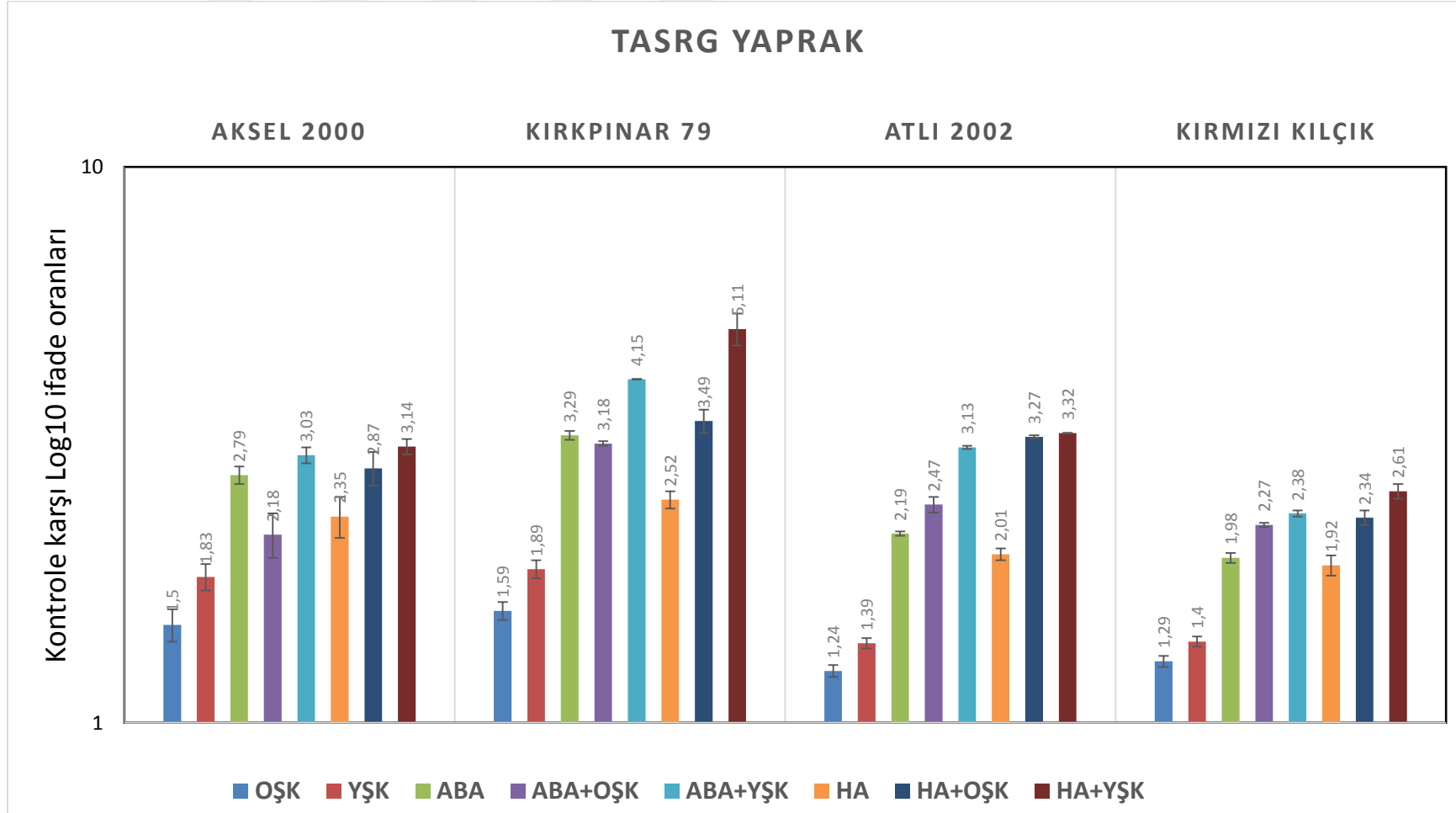
bitki dokularını aklımasyona yönlendirmek için sinyal görevi üstlenen ABA seviyesinin arttığı ve dışarıdan uygulanan ABA'nın içsel ABA seviyesini daha fazla artırarak strese karşı daha güçlü bir aklımasyon sağlandığı bilinmektedir (Nemoto and Sasakuma 2002). Kuraklık stresi boyunca kuraklık stresi ile ilgili pek çok gen indüklenmektedir. Çoğunun ABA'ya duyarlı olduğu bilinen bu genler iki önemli özelliğe sahiptir. Birincisi, promotörlerinde korunmuş ABA-duyarlı elementler (ABRE'ler) içerirler (Hattori *et al.* 1995; Shen *et al.* 1996). ABRE'ler, EmBP-1 (Guiltinan *et al.* 1990), TAF-1 (Oeda *et al.* 1991), ABF'ler (Choi *et al.* 2000) ve bZIP gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleridir. İkinci olarak, ABRE'lerin işlevsel olabilmeleri için bazı bağlantı elementleri (coupling elements/ CE'ler) ile birlikte olması gerekir (Shen *et al.* 1996; Shen and Ho 1997). CE'lerin sekans spesifitesi ABRE'lerden daha düşük olabilir. Ayrıca, ABRE'lerin kendileri ve dehidrasyona-duyarlı element (DRE) gibi diğer fonksiyonel elemanlar da CE'ler olarak işlev görebilir (Guiltinan *et al.* 1990; Hobo *et al.* 1999; Narusaka *et al.* 2003). Narusaka *et al.* (2003), Arabidopsis rd29A geninde yaptığı cis element analizinde dehidrasyon stresinde DRE'nin bağlantı elementinin ABRE olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız cis element analizinde TaSRG geninin promotör bölgesinde ABRE, ABRE3a ve ABRE4 olmak üzere ABA ile ilgili 3 element, kuraklıkla ilgili olarak DRE core ve DRE1 elementleri belirlenmiştir (Ek 1). Son zamanlarda keşfedilen transkripsiyon faktörlerinden biri olan TaSRG'nin ABA-bağımlı ya da ABA-bağımsız yollardan hangisini kullandığı üzerine mekanizması daha önceden tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, yaptığımız çalışmada dışarıdan ABA uygulaması ile bu genin ekspresyonunun artmasının ABRE elementlerinin varlığından kaynaklanmış olabileceği söylenebilir. Nitekim Nemoto and Sasakuma (2002), tuz stresinin ve ABA'nın WESR genlerinin ifadesi üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında WESR1 ve WESR2 genlerinin ifadelerinin hem tuz hem ABA uygulaması ile arttığını belirleyerek bu genlerin promotör bölgelerinde hem ABRE elementinin hem de osmotik strese cevap elementinin olduğunu, WESR3 geninin ifadesinin ise sadece ABA uygulaması ile arttığını tespit ederek bu genin promotör bölgesinde ise sadece ABRE elementinin olduğunu belirlemişlerdir. Böylece bu genlerin aktivasyonunun tek bir faktör tarafından değil, pekçok faktör tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmamızda, tüm genotiplerde ABA+OŞK ve ABA+YŞK uygulamalarında elde edilen gen ifade oranları tek başına ABA uygulamasına kıyasla, kökte tüm genotiplerde, yaprakta ise sadece hassas genotiplerde belirgin oranlarda daha yüksek çıkmıştır. Toleranslı genotiplerin yaprak dokularında ise tek başına ABA uygulaması, ABA+OŞK uygulamasına nazaran daha yüksek gen ifade oranına sahip olmuştur (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Bunun nedeni, ABA'nın stres esnasında yapraklardaki fonksiyonunun daha fazla olmasından dolayı toleranslı genotiplerde strese karşı koruma amaçlı TaSRG geninin ifadesinin daha fazla artmasına yol açması olabilir.

Çalışmamızda, tek başına HA uygulamasında hem kök hem de yaprakta TaSRG gen ifadesinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. HA ile ABA uygulamalarının TaSRG geninin ifade seviyesine olan etkisi kıyaslanacak olursa kök dokusunda HA uygulaması toleranslı genotiplerde ABA'ya göre daha yüksek ifade oranına, yaprak dokusunda ise tüm genotiplerde ABA'dan daha düşük gen ifade oranlarına sahip olmasına neden olmuştur (Şekil 4.9, Şekil 4.10). HA'nın sinyal, mineral alımı, abiyotik stres toleransı, ağır metal genotoksisitesinin azaltılması, mikrobiyal aktivite, taşınım gibi pek çok süreçte fizyolojik aktivitesinin olduğu bilinmekle birlikte, moleküler aktivitesi üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır. Dolayısıyla HA'nın genler üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu üzerine çok az literatür bilgisi mevcuttur. HA'nın TaSRG gen ifadesini artırması hormon benzeri aktivite göstererek sinyal görevi yapması ile açıklanabilir. Bu fonksiyonunu özellikle köklerde plazma membranında H<sup>+</sup>-ATPaz aktivasyonunu sağlayarak oksin ve NO bağımlı yolaklarının aktifleşmesine yol açmaktadır. Ramos *et al.* (2015), HA'nın bu yolakların aktive edilmesinde kalsiyum-bağımlı protein fosforilasyonu yoluyla posttranskripsiyonel düzeyde ekspresyonunu sağladığını belirlemişlerdir. Ayrıca, OŞK ve YŞK şartlarında uygulanan HA uygulamasının tüm genotiplerde her iki doku tipinde de, diğer uygulamalardan oldukça yüksek TaSRG gen ifadesinin meydana gelmesine neden olmuştur (Şekil 4.9, Şekil 4.10).



**Şekil 4.9.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki TaSRG geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



Şekil 4.10. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki TaSRG geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

TaCP geni ifade analiz sonuçlarına göre, kök ve yaprakta tüm genotiplerde OŞK ve YŞK uygulamalarında TaCP geninin upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12). Çalışmamıza benzer olarak, Simova Stoilova *et al.* (2010), sistein proteazları kodlayan TaCP geninin proteolitik aktivitesinin buğdayda su stresi altında arttığını tespit etmişlerdir. Sistein proteaz enzimi oksidatif strese yanıt olarak aktivitesi artmakta ve oksidatif stres koşulları altında hücre metabolizmasının korunmasında rol oynamaktadır (Masatoshi *et al.* 2007). Bitkilerin kuraklık stresine karşı geliştirdiği tolerans mekanizmalarından biri de, proteaz enzim aktivitesi ile proteoliz olayını gerçekleştirmesidir. Proteoliz olayı bitki çoğalmasında protein dönüşümlerine yol açan kısa ömürlü fonksiyonel ya da yararlı proteinlerin parçalanması olayıdır. Genellikle vakuollerde gerçekleşen bu olay sitosolde ve nükleusta da görülebilir. Proteazlar içinde en iyi karakterize edileni endoproteaz sınıfında yer alan ve aktif bölgesinde sistein bulunan sistein proteazdır. Abiyotik stres faktörleri ile meydana gelen ROT'lar bitkiyi erken senesense zorlamakta ve protein denatürasyonuna neden olmaktadır. Strese bağlı olarak aktivitesi artan sistein proteazları, stres şartlarında oluşan bu denatüre proteinleri degradasyona uğratarak veya protein döngüsünü artırarak metabolizmayı yönlendirmektedir (Grudkowska and Zagdańska 2004; Kidrič *et al.* 2014). Sistein proteazların DNA replikasyonu, transkripsiyonu, gen ekspresyonu, nekroz, otoliz, apoptozis, büyüme ve gelişme ayrıca biyotik ve abiyotik strese cevap gibi pek çok metabolik olayda rolü bulunmaktadır. Ancak stres mekanizmasında sistein proteazların aktivitesi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Botha *et al.* 2017). Bunun yanı sıra, stres koşulları altında denatüre olmuş proteinlerin bozulmasıyla elde edilen amino asitlerin, yeni proteinlerin sentezi için kullanılabilmesi ve böylece zararlı çevresel faktörlerin neden olduğu geri dönüşümsüz hasarın önlenebileceği öne sürülmüştür (Callis 1995). Bu nedenle, abiyotik stres boyunca proteinaz aktivitesindeki artış, bitkiler için faydalı olarak kabul edilebilir.

Çalışmamızda hem kök hem de yaprak dokusunda toleranslı genotiplerde OŞK ve YŞK uygulamalarında belirlenen TaCP gen ifade oranlarının hassas genotiplere kıyasla oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12). Benzer şekilde, Hieng *et al.* (2004), kuraklığa hassas *Phaseolus vulgaris* L. genotipinde proteinaz enzim

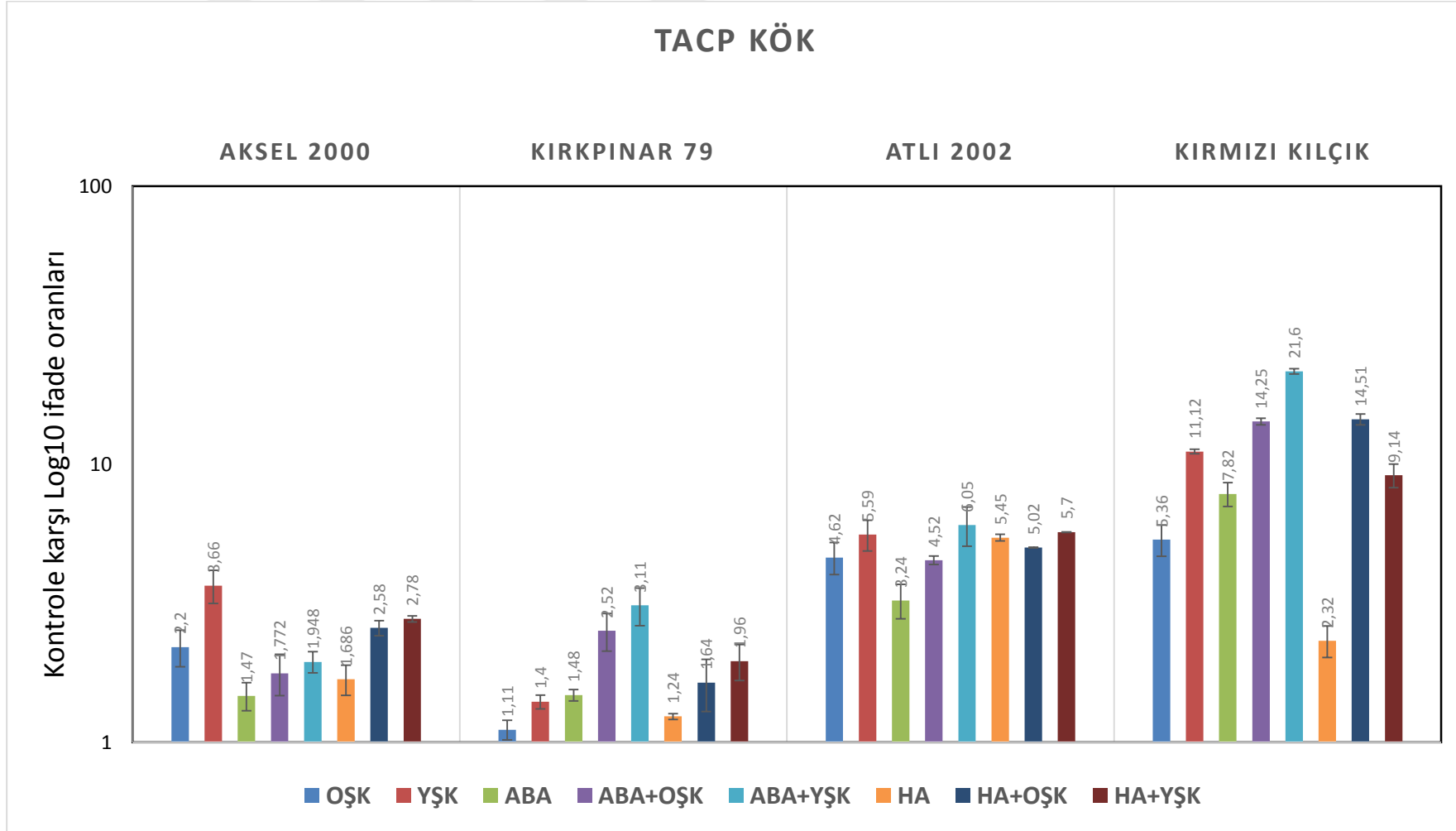
aktivitesindeki artışın daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Gerek bu çalışmadan ve gerekse bizim çalışmamızdan elde edilen bu bulgulardan hareketle, proteinaz enzim aktivitesindeki artışın hassas genotiplerde daha fazla oluşunun, strese dayanıklılık sağlandığının bir işareti olarak değil de, hassas genotiplerde bitkiyi ölüme götüren senesens olaylarının hızlandığını, oysa dirençli genotiplerde, bu enzimin aktivitesi sonucu normal şartlarda büyüme ve gelişme için gerekli olan proteinlerin en azından bir kısmının, stres şartlarına mukavemet için gerekli olan proteinlerin sentezlenebilmesi için yapıtaşı olarak kullanılması amacıyla aminoasitlere parçalandığını düşünmekteyiz.

Araştırmada, tek başına ABA uygulamasının TaCP geninin mRNA ifadesine olan etkisi incelendiğinde, her iki doku tipinde özellikle kök dokusunda hassas genotiplerde TaCP geninin daha fazla upregüle olmasına neden olduğu görülmüştür. Yaprak dokusunda ise ABA uygulamasının toleranslı genotiplerde bu genin transkript seviyesinin düşmesine neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12). Fukayama *et al.* (2010), çeltik yapraklarında ABA'nın proteaz enzim aktivitesini artırdığını bildirmiştir. Poret *et al.* (2017), *Brassica napus*'ta senesens süresince protein degradasyonunun artmasında ABA'nın teşvik edici rolünün olduğunu belirtirken, dışarıdan uygulanan ABA'nın içsel ABA seviyesini artırarak özellikle sistein proteinaz aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir. Bunun yanısıra, Zhang *et al.* (2010) buğdayda PEG6000 ile oluşturulan kuraklık stresinde ABA uygulamasına karşı TaCP geninin çok yavaş cevap verdiğini tespit etmişlerdir.

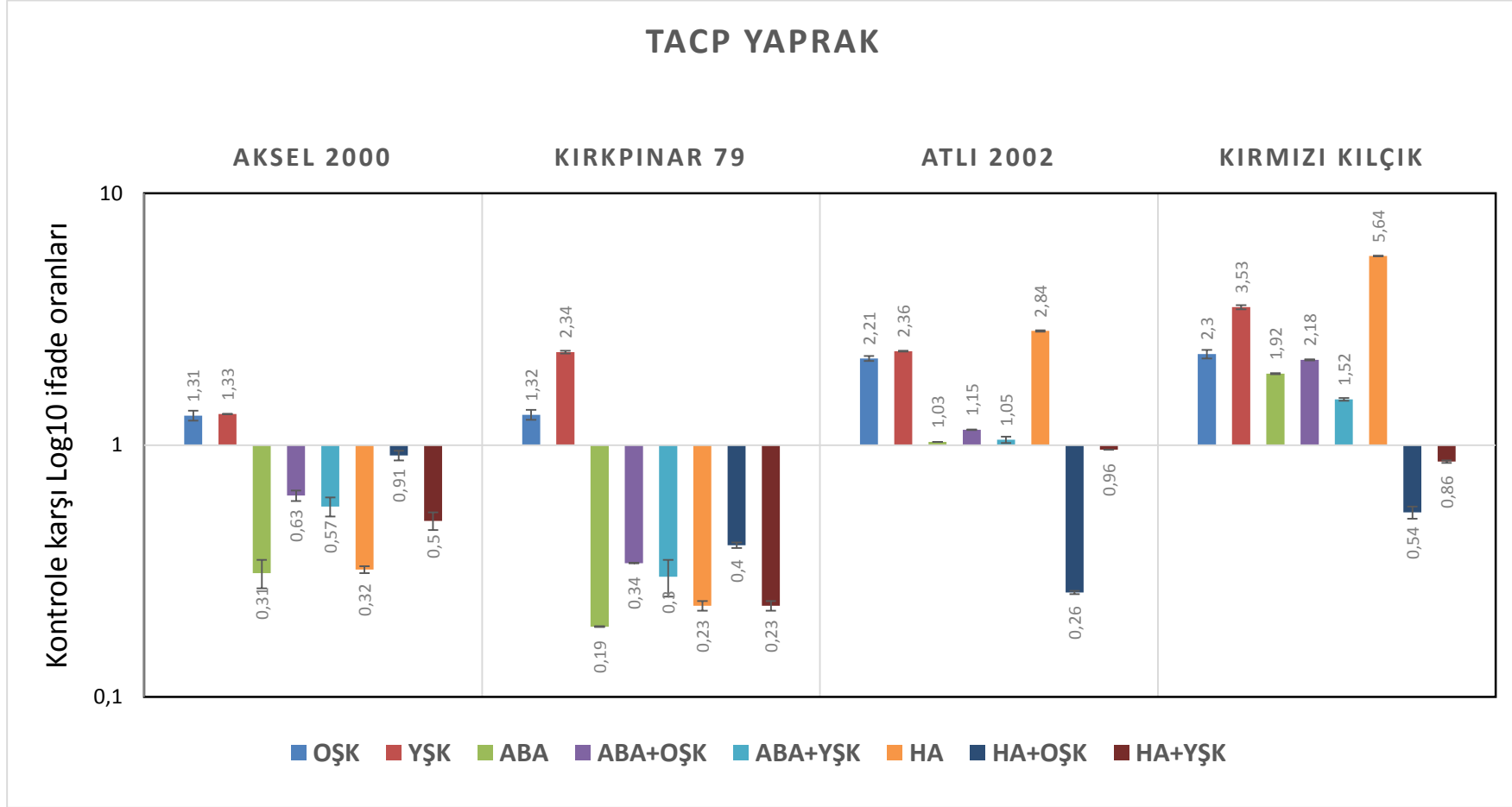
Ayrıca OŞK ve YŞK şartlarında ABA uygulamasının TaCP geninin ifade oranlarının her iki doku tipinde de tek başına OŞK ve YŞK uygulamalarına kıyasla oldukça değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Yaptığımız cis element analizinde TaCP geninin promotor bölgesinde yer alan ABRE elementi ile giberellin cevap elementinin (P-BOX) varlığı bu genin ifadesinin ABA ve giberelline bağlı olabileceğini göstermiştir (Ek 2). ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız sinyalleme yolları arasındaki etkileşimde bazı genler yer alsın da (Roychoudhury *et al.* 2013), bu iki yolun kuraklık stresi altındaki etkileşimleri hala belirsizdir. Liu *et al.* (2018), ABA bağımlı genlerin ABA sinyali ile ilgili olduğunu, ABA bağımsız genlerin ise jasmonik asit ve/veya giberellin ile

bağlantılı olduğunu hormonların etkileşim içinde oldukları proteinler ve transkripsiyon faktörlerinden yola çıkarak bildirmişlerdir. Ancak ABA'nın hem jasmonik asit hem de giberellin -bağımlı yollar ile ortak proteinlere sahip olması aslında ABA bağımlı ve ABA bağımsız yolağın belirgin farkla ayrılmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, çalışmamızda ABA'nın TaCP gen ifadesini hem upregüle hem de downregüle etmesi bu genin ABA ya da giberellin bağımlı mekanizmadan hangisini kullandığı hakkında net bir bilgi elde edilememiştir.

Araştırmamızda HA uygulamasının kök dokusunda TaCP geninin özellikle toleranslı genotiplerde düşük seviyelerde upregüle olmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Yaprak dokusunda ise HA uygulaması toleranslı genotiplerde bu genin downregüle olmasına, hassas genotiplerde ise upregüle olmasına yol açmıştır (Şekil 4.12). Düşük moleküler ağırlığa sahip olan humik maddelerin hem konformasyonel esnekliği, hem de hidrofilik özelliğinden ötürü bitki dokularında plazma membranlarında yer alan proteinlerle etkileşim içerisinde olduğu ve protein sentezine katkısı olduğu bilinmekte olup humik maddelerin mısırdaki transkripsiyon ve translasyon inhibitörlerini aktifleştirerek protein sentezini posttranskripsiyonel seviyede düzenledikleri belirlenmiştir (Nardi *et al.* 1996, 2012; Vaccaro *et al.* 2015). Ayrıca, HA uygulanan mısırdaki protein ekspresyon değişimlerine HA'nın etkisinin incelendiği bir çalışmada (Carletti *et al.* 2008) pek çok proteinin downregüle olduğu belirlenirken, HA'nın proteinler üzerindeki etkisi tam olarak açıklanamamıştır.



**Şekil 4.11.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki TaCP geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ )



Şekil 4.12. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki TaCP geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Abiyotik stres mekanizmasında strese direncin oluşturulmasında negatif düzenleyici olarak rol alan genlerden biri Sal1 genidir. Kuraklığın yanı sıra tuz stresinde (Xiong *et al.* 2001), kadmiyum stresinde (Xi *et al.* 2016) ve soğuk stresinde (Quintero *et al.* 1996) Sal1 geninin transkripsiyonel ve metabolik yolları negatif düzenleyerek strese toleransın sağlandığı belirlenmiştir. Araştırmamızda, Sal1 geninin kök dokusunda OŞK ve YŞK uygulamalarında hassas genotiplerin her ikisinde de upregüle, toleranslı genotiplerde ise downregüle olduğu belirlenmiştir. Yaprak dokusunda ise sadece hassas Kırmızı Kılçık genotipinde Sal1 geninin upregüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14).

Fry1olarak da adlandırılan Sal1 geninin iki farklı enzimatik aktiviteye sahip bifonksiyonel bir enzimi kodladığı bilinmektedir. Bu enzimin aktivitelerinden biri 3' fosfoadenozin-5' fosfatı (PAP) AMP'ye hidrolize eden nükleotidaz aktivitesidir. Kloroplast ve mitokondride yer alan PAP'lar kuraklık, ışık gibi abiyotik stres faktörleri altında aşırı birikerek hücrenin farklı kısımlarına taşınmaktadırlar. Nükleusa taşınan PAP'lar, nükleusta yer alan XRN'lerin (ekzoribonükleaz) aktivitesini engellemektedirler (Estavillo *et al.* 2011). RNA metabolizmasına, bazı sofistike ekzo-veya endo-ribonükleazlar aracılık etmektedir. XRN'ler ökaryotlarda korunmuş bir 5'-3' ekzoribonükleaz protein ailesi sınıfında yer almaktadır. Arabidopsis'te 3 farklı XRN homoluğu (XRN2, XRN3 ve XRN4) belirlenmiştir. XRN2 ve kısmen XRN3 ribozomal RNA'ların olgunlaşmasında etkilidirler. Ayrıca, XRN3 miRNA'ların 3' kalıntılarının giderilmesinde ve mRNA transkripsiyon olaylarının sona ermesinde rol oynamaktadır. Buna karşın, XRN4 strese cevapta hedef mRNA'ların miRNA aracılığıyla parçalanmasına yol açmaktadır (Kurihara 2017). Dolayısıyla, normal şartlarda PAP'ın AMP'ye dönüşümünü katalizleyen Sal1 geni, stres şartlarında downregüle olarak bu dönüşümü gerçekleştirilemeyerek PAP birikimine neden olmakta ve XRN4'lerin stresle ilgili bazı genlerin (APX2, ELIP2) ekspresyonunu engellemesini önlemektedir. Sal1 geninin enzimatik aktivitelerden diğeri ise sinyal molekülü inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) içeren inositol polifosfatların parçalanmasını katalizleyen inositol polifosfat 1-fosfataz aktivitesidir (Chen *et al.* 2011).

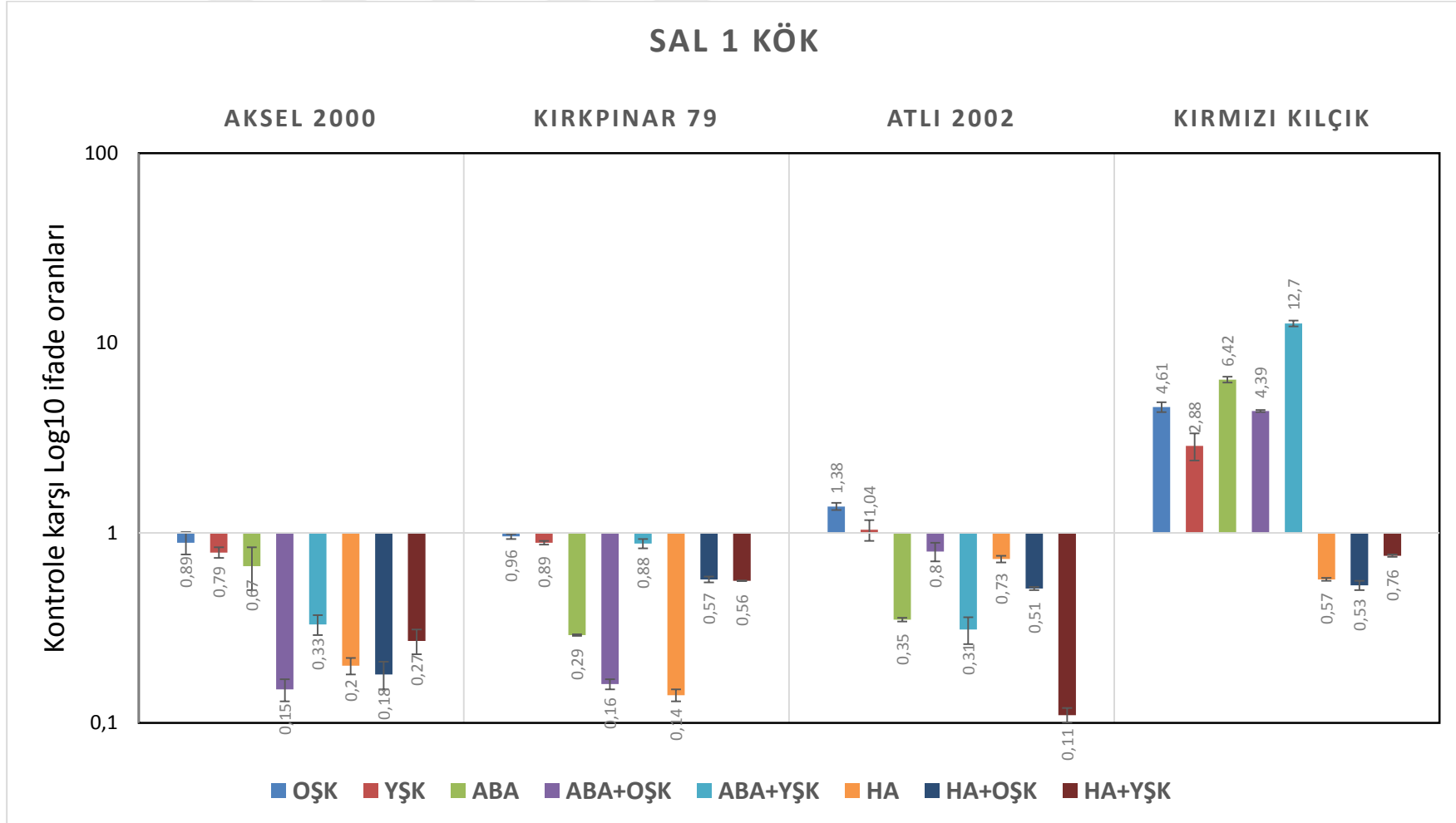
Gasparic *et al.* (2013) Arabidopsis'te Sal1 geninin yokluğunda kuraklığa toleransın arttığını belirlemişlerdir. Yaptığımız araştırmada toleranslı genotiplerde Sal1'in downregüle olması strese tolerans mekanizmasında genotiplerin korunduğunu göstermektedir. Ancak, kuraklığa hassas olan Kırmızı Kılçık genotipinde her iki doku tipinde de Sal1 geninin upregüle olması hassas olan bu genotipin kuraklığa tolerans mekanizmasında yeterince korunmadığının göstergesidir. Kuraklığa hassas ve toleranslı genotiplerin belirlenmesi sırasında Kırmızı Kılçık genotipinin en hassas genotip olarak ortaya çıkması Sal1 geninin upregülasyonu ile açıklanabilir.

Çalışmamızda, tek başına ABA uygulaması Aksel 2000, Kırkpınar 79 ve Atlı 2002 genotiplerinin kök ve yaprak dokularında Sal1 geninin yok denecek kadar az bir değerinde downregüle olmasına, Kırmızı Kılçık genotipinde ise Sal1 geninin upregüle olmasına sebep olmuştur (Şekil 4.13). Sal1 yoksun mutantları ABA'ya karşı yüksek derecede hassasiyet göstermektedirler (Xiong *et al.* 2004). Fry1 proteini ABA sinyalinin negatif düzenleyicisidir. Chen *et al.* (2011) ABA uygulamasının Arabidopsis'te Fry1 geninin ifadesinin artmasına sebep olduğunu ve Fry1 geninin ABA düzenleyicilerinden olan ABH1 (ABA hypersensitivity) ile aynı metabolik yolağı kullandıklarını belirlemişlerdir. Sal1 geninin büyük çoğunlukla ABA-bağımsız yolağın, kısmen de ABA-bağımlı yolağın negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız Sal1 geninin promotör bölgesinde ABA ile ilgili bir cis elementinin olmaması bu genin stres mekanizmasında ABA bağımsız yolağı kullandığının göstergesidir (Ek 3).

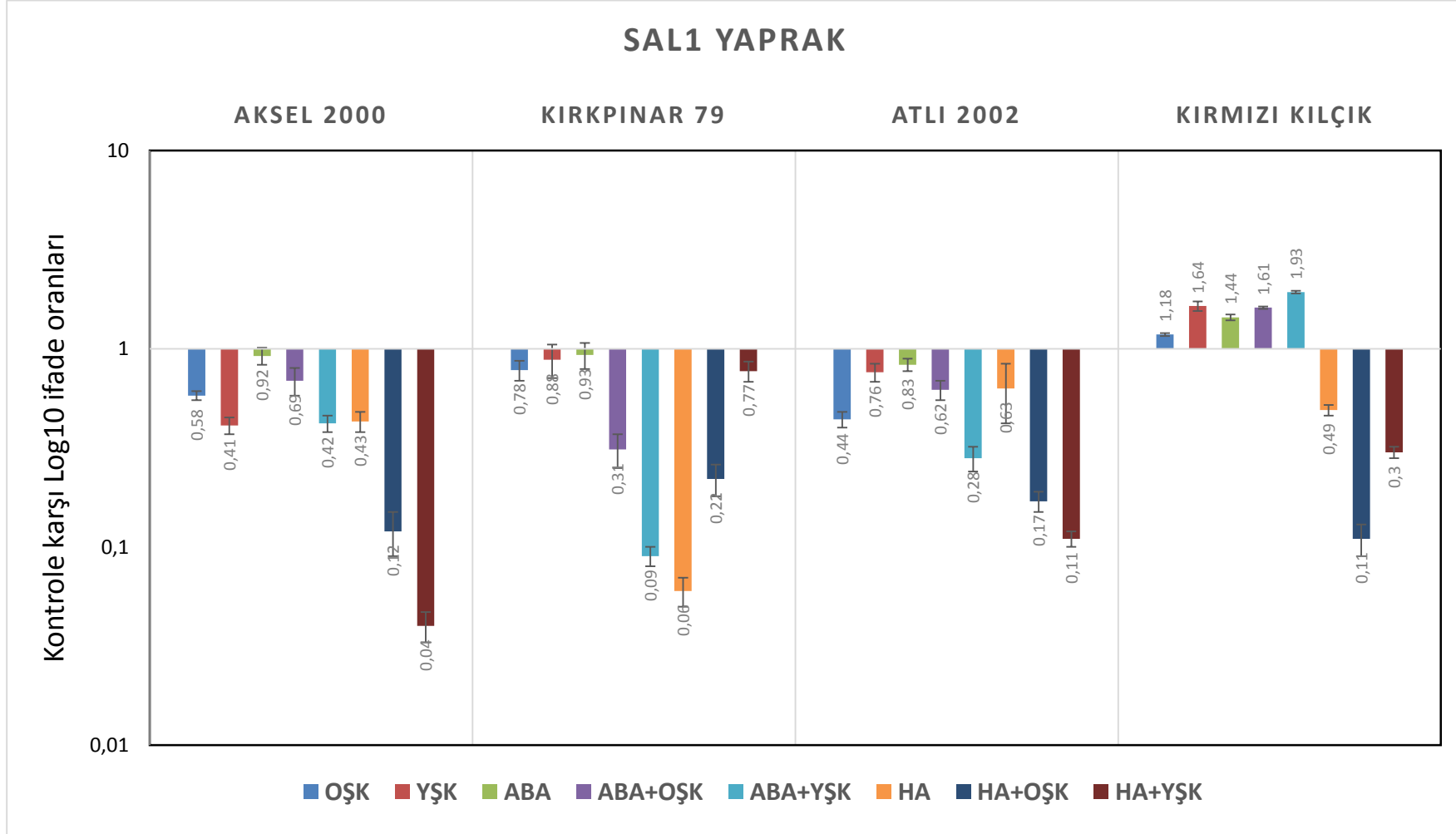
Ayrıca, araştırmamızda hem tek başına HA uygulamasının hem de HA+OŞK ve HA+YŞK uygulamalarının tüm genotiplerde her iki doku tipinde de Sal1 geninin downregüle olmasına sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14). Chan *et al.* (2016) Sal1'in fosfataz aktivitesinin dimerizasyon, intramoleküler disülfid oluşumu ve glutatyon mekanizmasıyla baskılanarak, PAP birikiminin indüklendiği ve plastidlerde redoksla ilgili nükleer genlerin (PRANGs) ifadesini düzenleyen negatif bir stres sinyali olduğunu belirlemişlerdir. Humik bileşenlerin abiyotik stres şartları altında alanin, prolin, glutatyon gibi organik metabolitlerin içeriklerini yükselttiği bilinmektedir

(Akıncı 2017). Buna bağlı olarak alışmamızda, HA uygulaması ile Sal1 geninin tüm genotiplerde downregüle olmasının nedeninin glutasyon mekanizmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.





**Şekil 4.13.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki Sal1 geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



Şekil 4.14. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki Sal1 geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

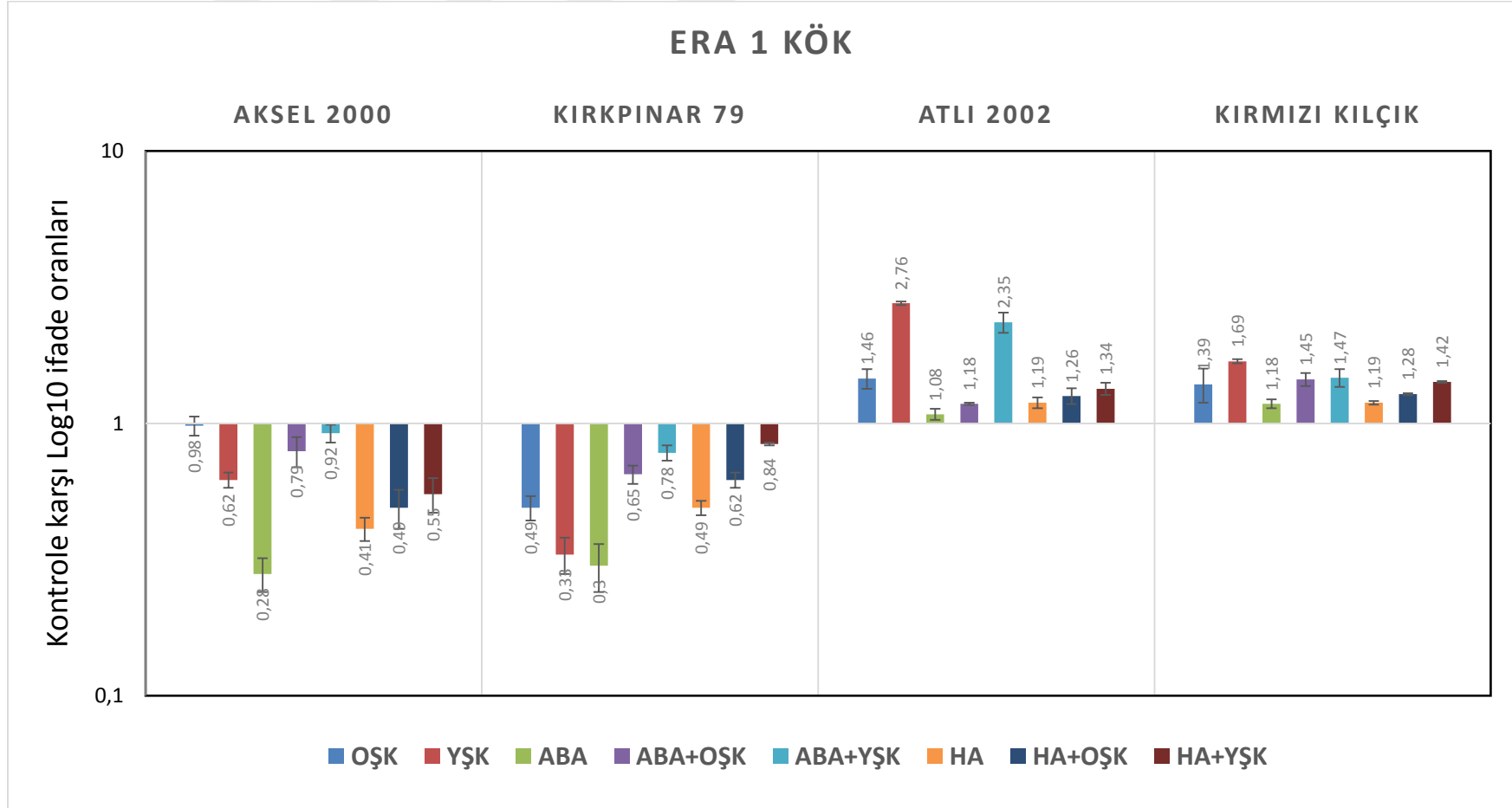
Era1 geni kök ve yaprak ifade analiz sonuçlarına göre; toleranslı genotiplerde OŞK ve YŞK uygulamalarında Era1 geninin downregüle olduğu, hassas genotiplerde ise genin upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Era1'in fonksiyonunu kaybetmesiyle Arabidopsis'te su kaybının azaldığı, büyüme ve gelişme olaylarında birtakım değişikliklerin yaşandığı (senesensin gecikmesi, apikal ve floram meristemin değişmesi, tohum veriminde azalma) gözlenmiştir (Donetta *et al.* 2000; Yalovsky *et al.* 2000; Ziegelhoffer *et al.* 2000). Era1 geni ABA'ya duyarlılığı azaltan farnesiltransferaz enziminin  $\beta$  alt ünitesini kodlamaktadır. Era1 geni bitkinin ABA'ya duyarlılığını azaltan, ABA'nın negatif düzenleyicisi olarak görev yapan bir gen olarak bilinmektedir. Esas olarak bitkilerde protein farnesilasyonu, ABA'ya verilen yanıtlarda en fazla kabul görmektedir, çünkü protein farnesilasyonunda oluşan bir mutasyona sahip bitkilerin ABA'ya karşı yanıtının daha iyi olduğu belirlenmiştir (Cutler *et al.* 1996; Pei *et al.* 1998; Goritschnig *et al.* 2008). Era1'in kuraklık toleransı için biyoteknolojik hedef olarak yararlılığı kanola (Wang *et al.* 2005), buğday (Manmathan *et al.* 2013) ve soya fasülyesi (Ogata *et al.* 2017) gibi türlerde incelenmiştir. Kanolada farnesiltransferazın kuraklık toleransı için antisense downregülasyonunu çalışan Wang *et al.* (2005), transgenik bitkilerin çiçeklenme sırasında meydana gelen su kıtlığının neden olduğu tohum dökmeye daha dirençli olduğunu ve farnesiltransferazın antisense downregülasyonunun topraktaki mevcut suyun miktarına bağlı olan koşullu ve geri dönüşümlü bir işlem olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, tek başına ABA uygulamasında her iki doku tipinde de toleranslı genotiplerin oldukça yüksek oranlarda downregüle olduğu belirlenmiştir. Nitekim yaptığımız cis element analizinde Era1 geninin promotor bölgesinde ABRE elementinin olması Era1 geninin ABA-bağımlı mekanizmada yer aldığı göstergesidir (Ek 4). ABA kuraklık stresi esnasında bekçi hücrelerinde iyon kanallarını aktive ederek stomaları kapatmaktadır. Era1 gen allelinin fonksiyonel kaybı stomaların kapanmasında görev alan bekçi hücrelerinin ABA'ya olan duyarlılığını artırmaktadır. Arabidopsis'te Era1 mutantlarının kuraklık stresi altında daha az solma gösterdiği ve dışardan uygulanan ABA'nın daha sıkı bir stoma kapanmasını sağladığı belirlenmiştir (Allen *et al.* 2002; Hugouvieux *et al.* 2002). Wang *et al.* (2005), Arabidopsis'te Arabidopsis

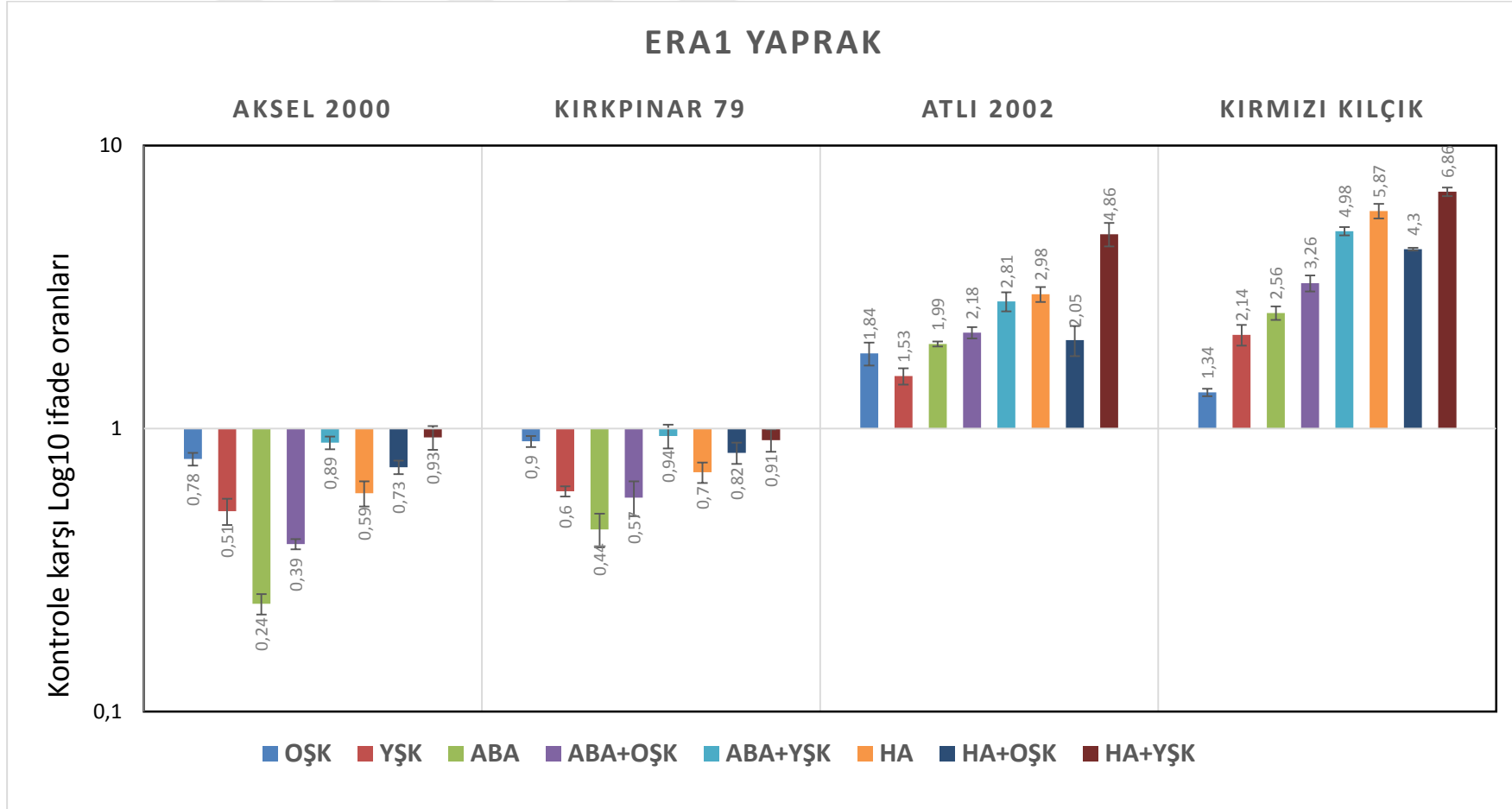
farnesiltransferaz geninin (AtFTA veya AtFTB) downregülasyonunun, hem ABA duyarlılığının artmasına, hem de kuraklık stres toleransının artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan araştırmamızda Era1 geninin yaprak dokusundaki downregülasyonu ABA'nın stomalardaki fonksiyonu ile örtüşmektedir.

Araştırmamızda, hassas genotiplerde ise ABA uygulamasında hem kök hem de yaprakta Era1 geninin upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Era1 geni ile ilgili yapılan literatür taramalarında bu genin upregüle olması ile ABA'nın kuraklık stresi esnasında stomaların kapanmasında görevini yerine getiremediği, dolayısıyla stomaların açık kalarak kuraklık stresi süresince transpirasyonla su kaybının olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Nitekim hassas genotiplerin kuraklığa hassas olmasının muhtemel nedeni Era1 geninin upregüle olmasına bağlı olarak ABA'ya olan ilginin azalması ve transpirasyonla su kaybetmesidir.

Araştırmamızda tek başına HA ile HA+OŞK ve HA+YŞK uygulamalarının her iki doku tipinde de, toleranslı genotiplerde Era1 geninin downregüle, hassas genotiplerde ise upregüle olmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Huang *et al.* (2013), ABA'nın stres esnasında stomalar üzerindeki aktivitesinde HA'nın aracılık ettiği, yani kuraklık stresi ile birlikte daha güçlü bir stoma kapanmasının gerçekleştiğini belirlenmiştir. Araştırmada HA uygulamasının toleranslı genotiplerde Era1 geninin downregülasyonuna ya da başka bir yolla stomaların kapanmasına ve transpirasyonla oluşacak su kaybının engellemesine sebep olduğu söylenebilir. Nitekim Russel *et al.* (2006), *Pisum sativum*'da stres altında stomaların açılıp kapanma mekanizmalarında HA'ların etkili olmasını oksin benzeri bir hormon gibi görev yapmalarına bağlamışlardır.



**Şekil 4.15.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki Era1 geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

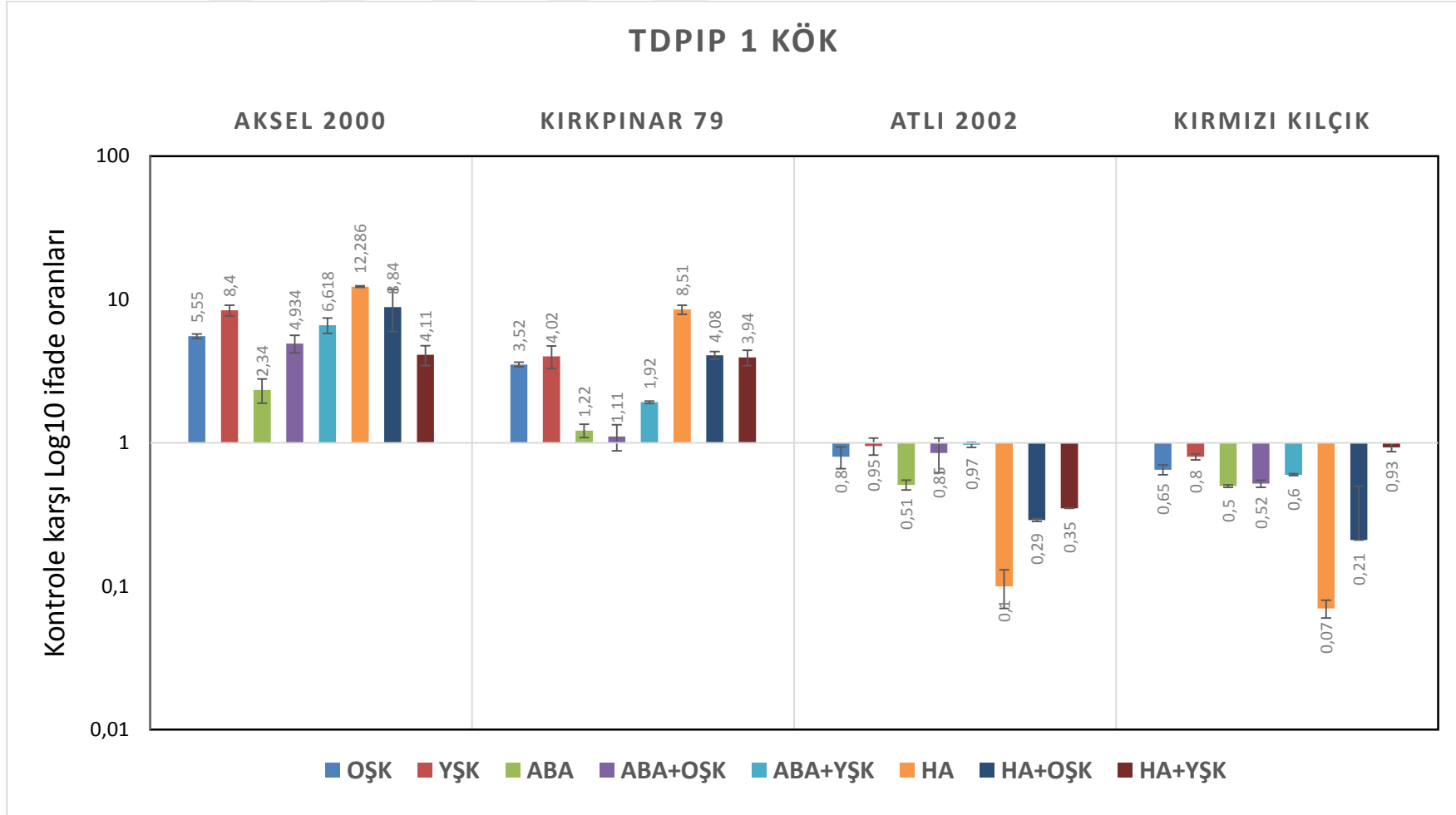


**Şekil 4.16.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki Era1 geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

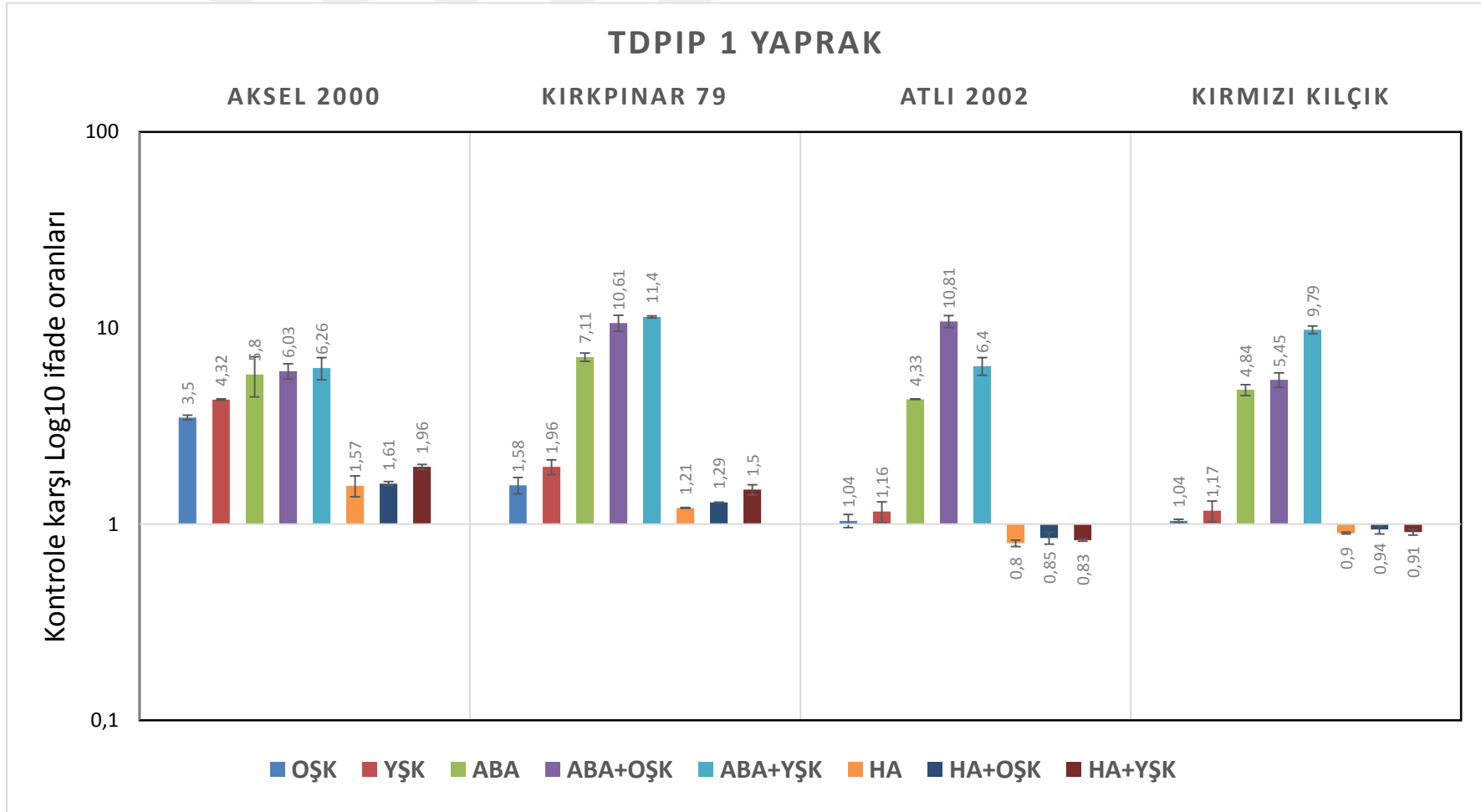
TdPIP1 geni ifade analiz sonuçlarına göre; OŞK ve YŞK uygulamalarında yaprak dokusunda tüm genotiplerde TdPIP1 geni upregüle olurken, kök dokusunda toleranslı genotiplerde TdPIP1 geni upregüle, hassas genotiplerde ise yok denecek kadar az oranlarda downregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Akuaporinler membranlardan su ve CO<sub>2</sub>, gliserol gibi küçük moleküllerin taşınmasını sağlayan, bakterilerden gelişmiş tüm canlılara kadar var olan integral membran proteinleridir. Bitkilerde tohum çimlenmesi, hücre bölünmesi, stoma hareketleri, reproduktif gelişme ve strese yanıt oluşturma gibi birçok süreçte aracılık ettikleri bilinmektedir (Eisenbarth and Weig 2005; Gao *et al.* 2010). Amino asit dizi yapısına ve hücredeki konumuna göre sınıflandırılan akuaporinlerden biri olan PIP'ler transmembran taşınımının düzenlenmesinden ve hücresel iyon konsantrasyonunun dengelenmesinden sorumludurlar (Wang *et al.* 2018). Çalışmamıza benzer olarak daha önce yapılan çalışmalarda (Guo *et al.* 2006; Cui *et al.* 2008; Mahdieh *et al.* 2008; Peng *et al.* 2008; Gao *et al.* 2010; Sade *et al.* 2010) kuraklık, tuz, soğuk stresi gibi abiyotik stres faktörlerinin akuaporin genlerinin upregülasyonuna neden olduğu ve strese toleransın sağlandığı belirlenmiştir. PIP'lerin stres mekanizmasında ROT birikimini engelleyerek hücre membranlarının korunmasını sağladığı düşünülmektedir. PIP'ler özellikle sinyal molekülü olarak görev yapan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün normal şartlarda taşınmasını sağlarken, stresin olduğu durumlarda miktarı artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin birikimini engelleyerek antioksidan enzimlerin artmasını indüklemektedirler (Tian *et al.* 2016). Zhou *et al.* (2012), TaAQP7 geninin, Wang *et al.* (2018) ThPIP2;5 geninin kuraklık ve tuz stresinde upregüle olduklarını ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA miktarlarının kontrole kıyasla azaldığını, antioksidan enzim miktarlarının ise arttığını bildirmişlerdir. Ancak PIP genlerinin kuraklık stresindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Zhou *et al.* 2012). Bunun yanısıra, bitki çeşidine, doku tipine ve aynı bitkinin farklı genotiplerine göre kuraklık stresine karşı akuaporin genlerinin up/downregüle olma durumları farklılık göstermektedir (Lian *et al.* 2006). Arabidopsis'te kuraklık stresinde PIP1;5, PIP2;2, PIP2;3 ve PIP2;6 genleri downregüle olurken (Jang *et al.* 2004), PIP1;4, PIP2;5 genlerinin ise upregüle olduğu belirlenmiştir (Alexandersson *et al.* 2005). Çalışmamızda kök dokusunda hassas genotiplerin downregüle, toleranslı genotiplerin upregüle olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, ABA uygulaması ile ABA+OŞK ve ABA+YŞK uygulamalarında yaprak dokusunda tüm genotiplerde TdPIP1 geninin upregüle olduğu, kök dokusunda ise toleranslı genotiplerin upregüle, hassas genotiplerin ise downregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Dışarıdan uygulanan ABA'nın özellikle köklerde su iletkenliğini güçlendirdiği ve akuaporinlerin ekspresyonlarını değiştirdiği ayçiçeği, mısır, Arabidopsis, tütün gibi bitkilerde kanıtlanmıştır (Mariaux *et al.* 1998, Siefritz *et al.* 2001). Bu bitkilerde ABA uygulamasına karşı akuaporin genlerinin up/downregüle olma durumları farklılık göstermiştir. Genler hem ABA-bağımlı hem de ABA-bağımsız sinyal yolları ile ilişkilidir denilebilir. Strese toleransın sağlanmasında ABA'nın yanısıra giberellin, salisilik asit, etilen, metil jasmonat gibi hormonlarında görev yaptıkları bilinmektedir. Hu *et al.* (2012), tütünde ABA'nın TaAQP8 geninin ekspresyonunu engellediğini, giberellin ve etilenin ise geni indüklediğini belirlemiştir. Dolayısıyla akuaporin genlerinin ABA'nın dışında diğer hormonlara bağımlı olması söz konusudur. Nitekim, yaptığımız TdPIP1 geni promotör analizinde hem ABRE hem de TGACG/CGTCA-motif (MeJa-bağımlı cis element) ve P-Box (giberellin-bağımlı cis element) cis elementlerinin olması bu kanıyı doğrular niteliktedir (**EK 5**).

Çalışmamızda tek başına HA uygulaması ve beraberinde HA+OŞK ve HA+YŞK uygulamalarında her iki doku tipinde de toleranslı genotiplerde TdPIP1 geninin upregüle, hassas genotiplerde ise genin downregüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). HA'nın "MDA analizleri" bölümünde bahsedilen amfililik özelliğinden dolayı lipit tabakasının yapısını, akışkanlığını ve hücre zarı geçirgenliğini değiştirdiği ve MDA miktarını önemli ölçüde azalttığından bahsedilmiştir. Ayrıca HA'nın antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkisi de yadsınamayacak kadar büyüktür. Dolayısıyla toleranslı genotiplerde HA uygulamasının TdPIP1 geninin upregüle olmasına sebep olması ROT miktarını azaltıp, antioksidan enzim aktivitesini artırarak stres tolerans mekanizmasına bu şekilde bir katkı sağladığı düşünülmektedir.



**Şekil 4.17.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki TdPIP1 geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



**Şekil 4.18.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki TdPIP1 geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

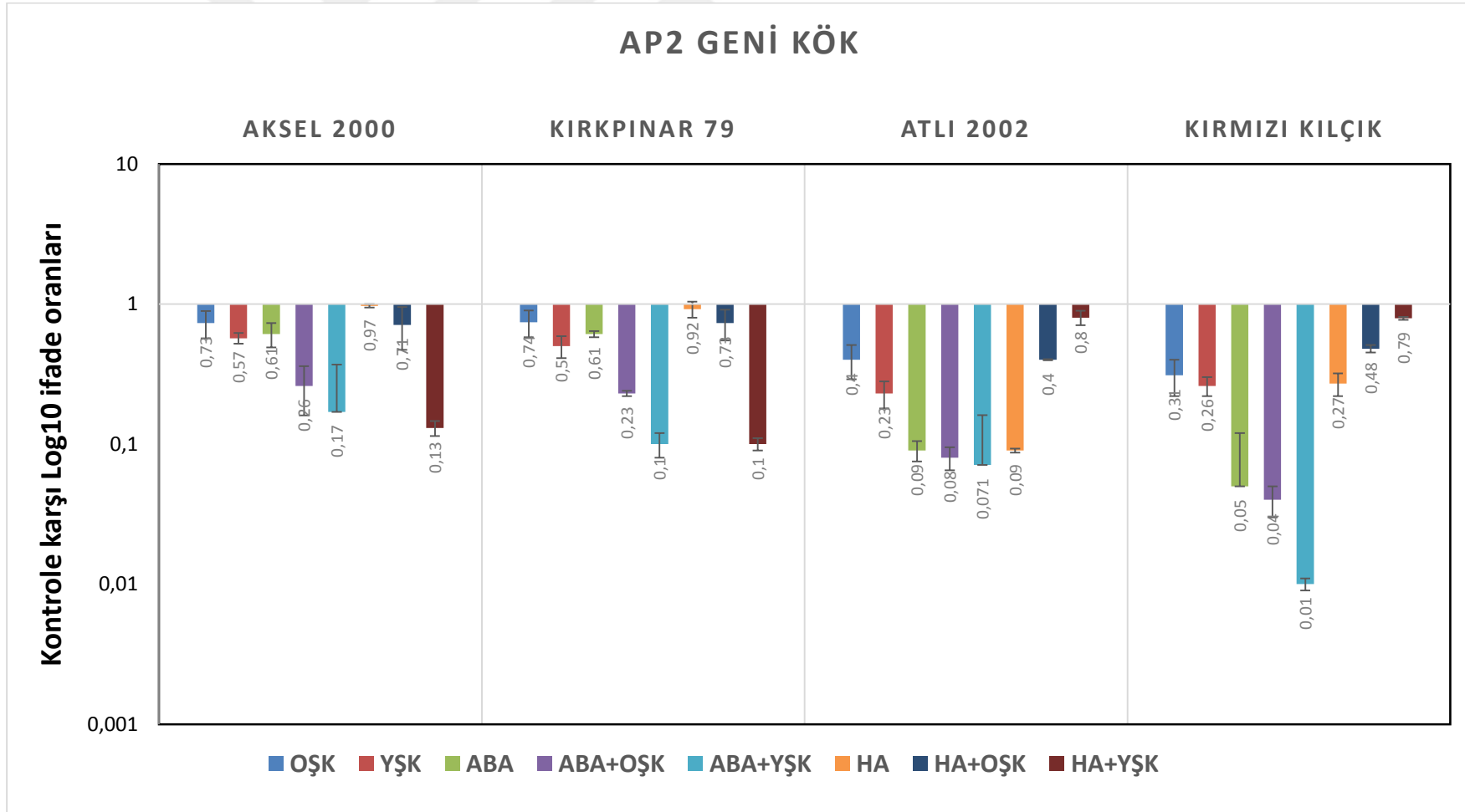
#### 4.2.2. miR172, miR396, miR397, miR398 ve miR408 hedef genlerinin ifade analizleri

Buğday genotiplerinde yapılan uygulamalar sonucunda kök ve yapraklardan elde edilen miR172, miR396, miR397, miR398 ve miR408'in sırasıyla AP2, GRF, lakkaz, CSD1/CSD2 ve plastosiyanin hedef genlerinin ifade sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

miR172'nin hedef geni olan AP2 geninin ifade sonuçlarına göre; OŞK ve YŞK uygulamalarında AP2'nin kök dokusunda tüm genotiplerde downregüle, yaprak dokusunda ise upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19, Şekil 4.20). Wang *et al.* (2013), pamukta tuz ve kuraklık stresinde AP2 geninin stres dozuna ve doku tipine bağlı olarak farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Birden fazla hedef geninin olduğu bilinen miR172 geni monokotillerde özellikle üreme döneminde aktif rol alan Apetala2 (AP2) geninin translasyonel baskılanmasından sorumludur (Chen 2004). Kuraklık stresinde bitkilerin geliştirdiği savunma mekanizmalarından biri de gövde büyümesinin ve bitki gelişiminin baskılanmasıdır. Dolayısıyla stres esnasında özellikle yaprak ve gövde aksamalarında miR172 geninin ekspresyon düzeyini artırarak AP2 geninin baskılanmasını sağladığı böylece strese toleransın kazanıldığı düşünülmektedir. Ayrıca, miRNA hedef genlerinin dayanıklı ve hassas genotiplerde de farklı düzeylerde ifade olduğuna dair çalışmalara rastlamak mümkündür. Akdoğan *et al.* (2016), AP2'nin buğdayda kuraklığa toleranslı genotipte daha fazla, hassas genotipte ise daha az upregüle olduğunu tespit etmişlerdir. Kaur *et al.* (2017), AP2'nin kuraklığa hassas buğday genotiplerinden birinde upregüle, diğerinde downregüle, kuraklığa toleranslı genotiplerin birinde upregüle diğerinde downregüle olduğunu belirlemişlerdir. miRNA hedef genlerinin ifadelerindeki bu farklılıklar birkaç mekanizmayla açıklamak mümkündür. Birincisi, abiyotik stres komplike bir süreçtir ve miRNA'ların yanısıra farklı moleküler faktörler bu süreci etkilemektedir. Diğer ihtimal, korunmuş miRNA'ların hedef genleri aynı türün tüm genotipleri için evrensel olmayabilir. Ya da hedef gen sadece belirlediğimiz miRNA tarafından değil de farklı miRNA'lar tarafından da yönlendirilebilir (Wang *et al.* 2013).

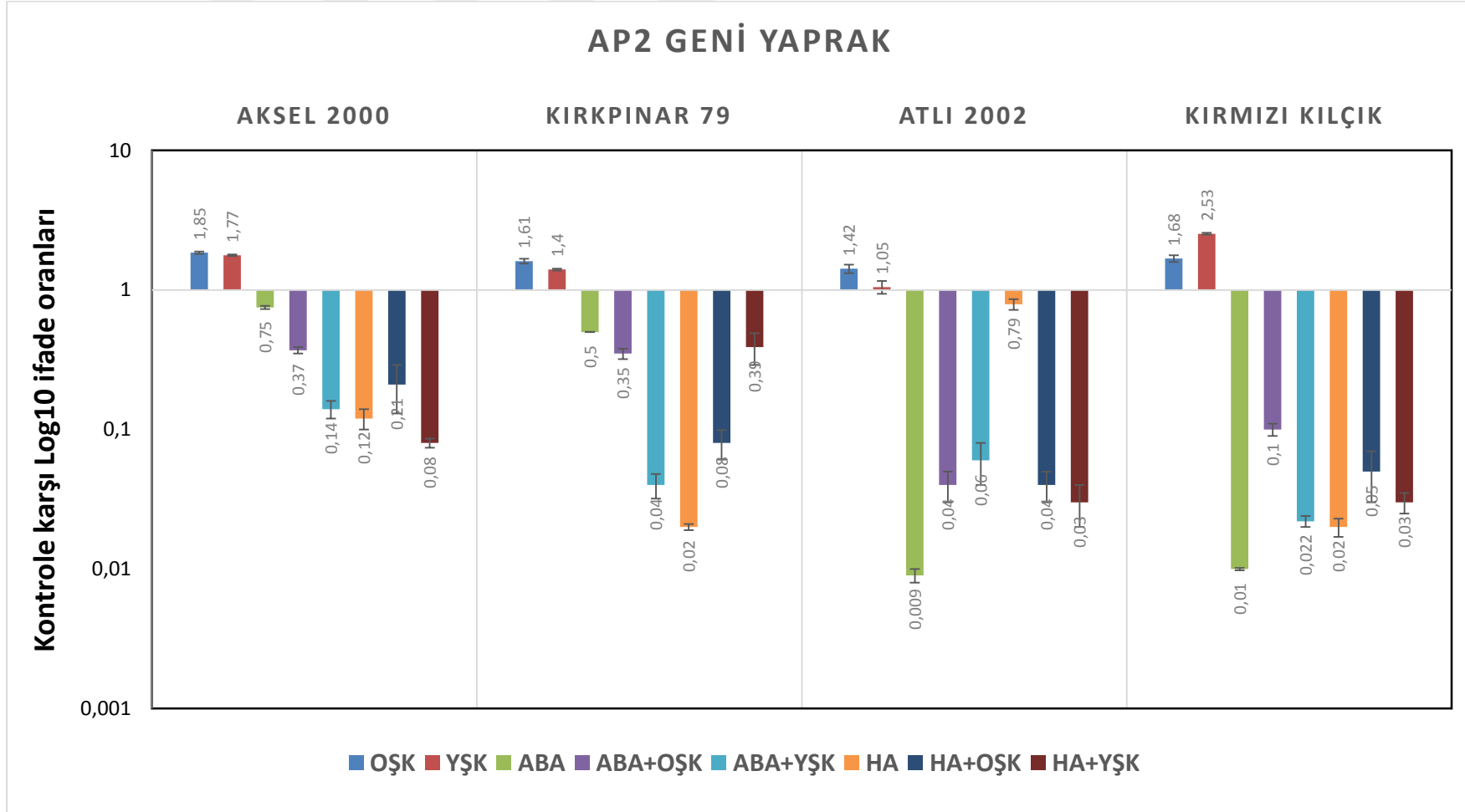
Bunun yanısıra, çalışmamızda ABA uygulaması her iki doku tipinde de hem toleranslı hem hassas genotiplerde AP2 geninin downregüle olmasına neden olmuştur. ABA stres esnasında stomaları kontrol altında tutan bir fitohormon olsa da son yapılan çalışmalarda stres esnasında stomaların kapanma durumlarının ABA-bağımsız mekanizmalarla sürdürülebildiğini göstermiştir (Abiri *et al.* 2017). Ancak yaptığımız miR172 hedef geni promotör analizinde, ABA ile ilgili bir cis elementi bulunamamıştır (Ek 6). Dolayısıyla, AP2 geninin ABA-bağımsız mekanizmada kuraklık stresine toleransı sağladığı düşünülmektedir. Hwang *et al.* (2011), AP2 domaininin RAP2.1 transkripsiyon faktörü içerdiğini ve bu transkripsiyon faktörünün DRE motiflerine bağlandığını ileri sürmüştür. Dong *et al.* (2010), *Solanum tuberosum*'da RAP2.1'in ekspresyonunun ABA-bağımsız yolda kuraklık ve soğuk stresinde arttığını belirlemişlerdir. Pandey *et al.* (2005), AP2 domaininin ABR1 (ABA repressor 1) proteini taşıdığını ve ABR1 geninin ABA cevabının negatif düzenlenmesinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Dışarıdan ABA uygulamasının ABR1 geninin ekspresyonunu indüklediği ve bu genin fonksiyonu gereği ABA'nın işlevinin baskılandığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ABA uygulamasının AP2 geninin downregüle olmasına neden olarak ABR1 geninin ifade olması engellenmiş, böylece strese karşı koruma mekanizmasında ABA fonksiyonunu sürdürmüştür denilebilir.

Araştırmamızda, her iki doku tipinde tüm genotiplerde tek başına HA uygulaması AP2 geninin downregülasyonuna neden olmuştur (Şekil 4.19, Şekil 4.20). Stres şartlarında HA uygulaması ile AP2 geninin up/downregülasyon durumları dokuya ve genotipe bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler yaşam döngülerini tamamlamak için hızlı bir şekilde gelişim süreçlerini tamamlayarak kuraklıktan kaçmaktadırlar. Araştırmamızda stres altında HA uygulaması ile AP2 geninin tüm genotiplerde ve her iki doku tipinde downregüle olmasının sebebi, HA'nın stresin genotipler üzerindeki etkisini ortadan kaldırarak kuraklıktan kaçış mekanizmasının indüklenmesini engellemiş olabilir. Bu durumda bitki gelişiminde özellikle çiçeklenmede etkili olan AP2 geninin upregülasyonunun HA tarafından baskılanarak downregüle olmasına neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.19. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR172 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

## AP2 GENİ YAPRAK



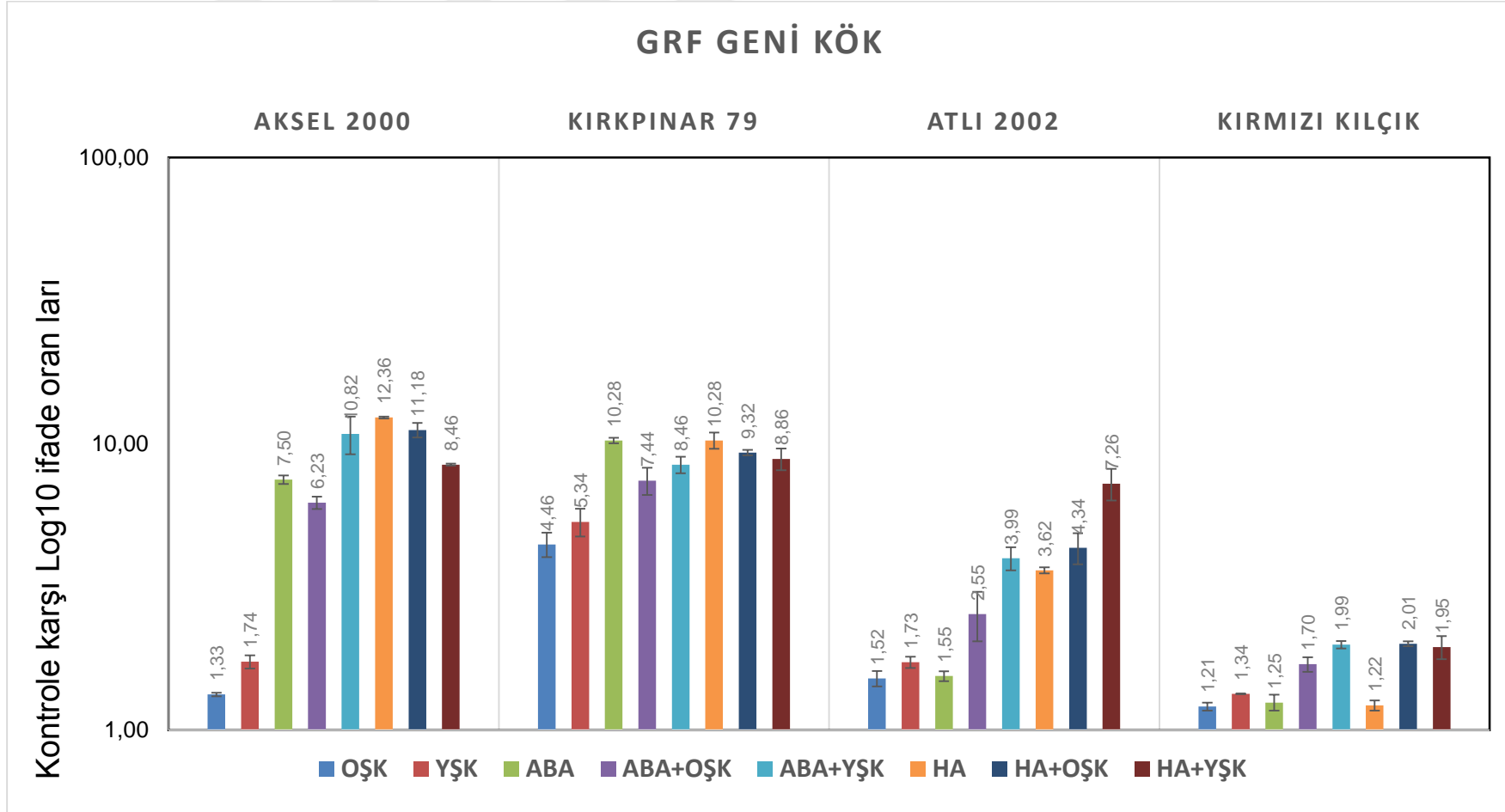
Şekil 4.20. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR172 hedef geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta Ct$ )

miR396 hedef geni olan GRF (Growth regulating factor/Büyüme düzenleyici faktör) OŞK ve YŞK uygulamalarında kök dokusunda hem toleranslı hem hassas genotiplerde upregüle olurken, yaprak dokusunda toleranslı genotiplerde downregüle, hassas genotiplerde ise upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21, Şekil 4.22). miR396, bitki büyüme ve gelişmesi üzerine özellikle yaprak boyutu ve kalınlığının düzenlenmesinden sorumlu olan GRF genlerinin ekspresyonunu baskılamak suretiyle görev yapmaktadır (Liu *et al.* 2009). miR396'nın aşırı ifadesinin kuraklık stresinde GRF genlerini baskılayarak stoma indeksini ve transpirasyon oranını düşürdüğü bilinmektedir. Dolayısıyla GRF genlerinin baskılandığı bitkilerde transpirasyonla oluşan su kaybı daha az olduğu için bu bitkiler kuraklığa daha yüksek tolerans göstermektedirler (Liu *et al.* 2009). Nitekim çalışmamızda OŞK ve YŞK stres uygulamalarının toleranslı genotiplerin yapraklarında GRF geninin downregülasyonuna sebep olarak strese toleransın kazanıldığı belirlenmiştir. Bunun aksine, Kim *et al.* (2012), Arabidopsis bitkisinde yapmış oldukları çalışmalarında GRF7 eksikliğinin stres şartlarında normal şartlara kıyasla DREB2A transkript seviyeleri üzerinde daha az etkiye sahip olduğunu, GRF7'nin stres koşulları altında fonksiyonunun olmadığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacıların yaptığı farklı bir çalışmada ise GRF7'nin aşırı ifadesinin, stresli ya da stressiz şartlar altında DREB2A ifadesinde anlamlı bir fark oluşturmadığını ve normal boyutta rozet yapraklar ve kök uzunluğu ile su stresine toleranslı bitkilerin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, Wang *et al.* (2013) pamukta düşük dozdaki kuraklık stresinde GRF geninin downregüle, yüksek kuraklık dozunda ise upregüle olduğunu belirlemişlerdir.

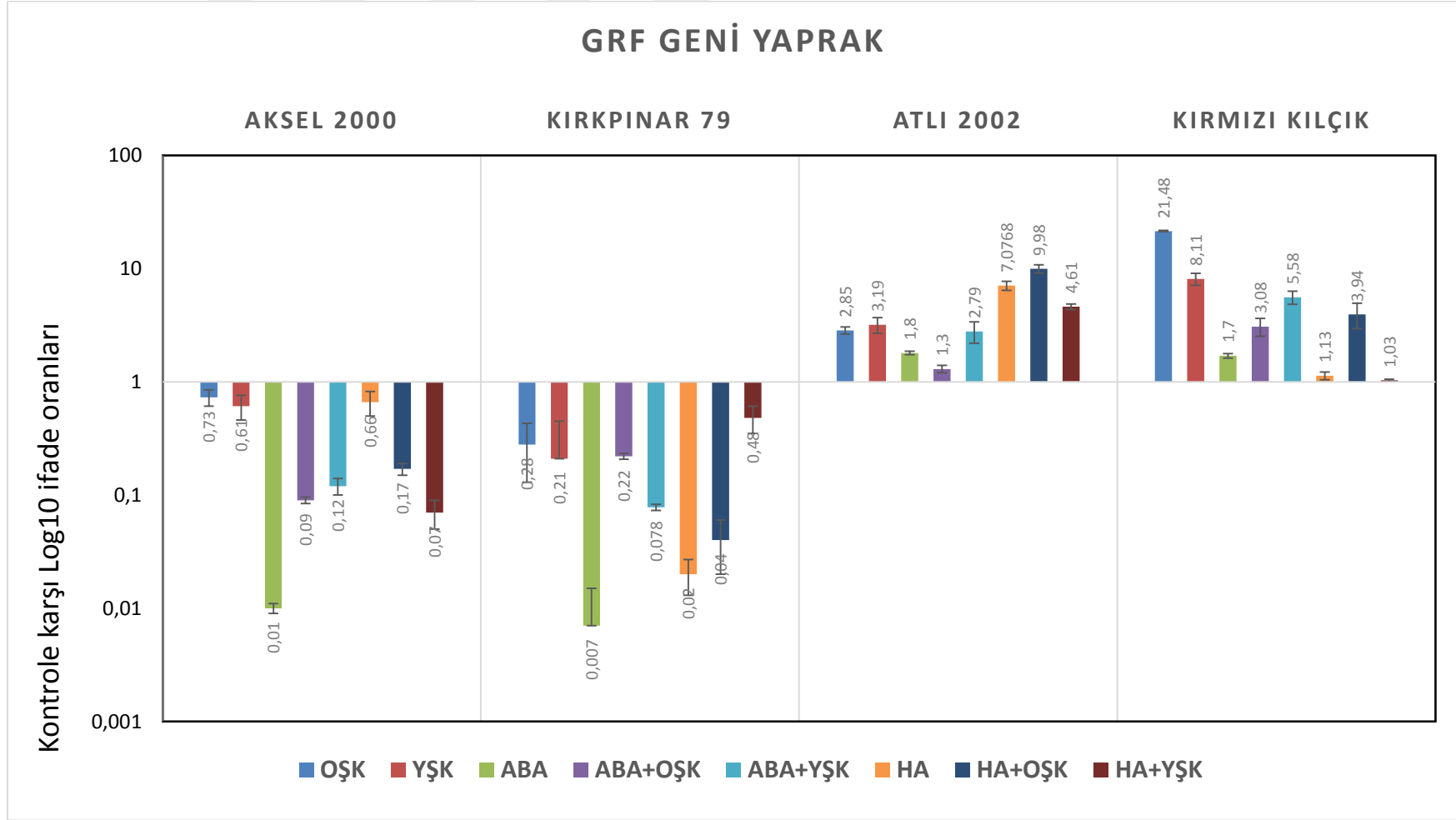
Çalışmamızda ABA uygulamasının ve beraberinde ABA+OŞK, ABA+YŞK uygulamalarının yaprak dokusunda toleranslı genotiplerde GRF geninin downregülasyonuna, hassas genotiplerde ise düşük sayılabilecek oranlarda upregülasyonuna, kök dokusunda ise hem toleranslı hem hassas genotiplerde upregülasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21 Şekil 4.22). Arabidopsis'te GRF7 geninin aktivitesi üzerine ABA'nın etkisinin incelendiği bir çalışmada GRF geninin ABA uygulamasında downregüle olduğu, ayrıca GRF geninin ABA'ya ve kuraklığa yanıt genlerinin baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız GRF

geni promotor bölge analizinde 3 farklı ABA cis elementinin olması (ABRE, ABRE3a, ABRE4) GRF geninin ABA-bağımlı mekanizmada düzenlendiğinin göstergesidir. Ancak hassas genotiplerde hem kök hem yaprak dokusunda ABA uygulaması ile GRF geninin düşük oranlarda değişim göstermesi ABA'nın dışında farklı hormonların ya da büyüme düzenleyicilerinin bu genin ifadesinde rolünün olabileceğini göstermektedir. Nitekim GRF geni cis element analizinde ABA'nın yanısıra giberellin (GARE-motif, P-Box), MeJa (CGTCA- motif, TGACG-motif) ve oksin (TGA-Box, TGA-element) hormonlarına ait elementlerin de bulunması GRF geninin stres mekanizmasında bu hormonlarla ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir (**EK 7**).

Araştırmada, HA uygulaması ve HA+OŞK ile HA+YŞK uygulamaları GRF geninin kök dokusunda toleranslı genotiplerde oldukça yüksek değerlerde upregüle olmasına neden olurken, hassas genotiplerde bu oran biraz daha düşük olmuştur. Yaprak dokusunda ise toleranslı genotiplerde HA uygulaması GRF geninin downregülasyonuna, hassas genotiplerde ise upregülasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Humik bileşenlerin stres esnasında köklerden gövde ve yapraklara kadar olan su iletkenliğinin sağlanmasında ABA, NO, IAA gibi hormonların etkisini artırarak su alımını artırdığı bilinmektedir (Olaetxea *et al.* 2015). Araştırmamızda HA uygulamasının ABA uygulamasında olduğu gibi GRF geninin up/downregülasyonuna neden olması HA'nın bir sinyal molekülü olarak diğer sinyal faktörlerine etki ederek GRF geninin düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir.



Şekil 4.21. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR396 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



**Şekil 4.22.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR396 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

miR397 hedef geni olan lakkaz geni ifade analiz sonuçlarına göre kök dokusunda tüm genotiplerde uygulamaların tamamında lakkaz geninin upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). Lakkaz enziminin özellikle buğday, arpa, çeltik gibi tarım ürünlerinde verimin artmasına yönelik katkısı olduğu, aynı zamanda abiyotik ve biyotik stres şartlarında strese tolerans mekanizmasında rol aldığı bilinmektedir (Zhang *et al.* 2013). Araştırmamızda, her iki stres dozunda da kuraklık stresinin şiddetiyle doğru orantılı olarak ilgili genin ifade seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.23). Lakkaz enziminin biyokimyasal fonksiyonları göz önüne alındığında; birincisi bitki dokularında monolignollerin lignine dönüşümünü katalizleyen bir peroksidaz ve bakır oksidaz enzimi olmasıdır (Berthet *et al.* 2012). Lignin fenilpropanoid bileşeklerin çok dallı bir polimeri olup ksilemlere su taşımada görevli olan hücre duvarının bir parçasıdır. Bitkiler, farklı streslere maruz kaldıklarında lignin kompozisyonu ve içeriği değişmektedir (Moura *et al.* 2010). Fan *et al.* (2006) mısır bitkisinin köklerinin su stresi altındaki bazal kısmının, apikal bölgeye göre büyümede daha büyük bir azalma gösterdiğini ve bunun nedenin bazal bölgede hücre duvarı uzayabilirliğini ve hücre duvarı genişlemesini azaltan sertleştirilmiş lignin birikimi ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bazal bölgedeki büyümedeki azalmanın en uç apikal kısımda genç hücrelerin minimum büyümesini ve hayatta kalmasını sağlamak için gerekli faktörler olan su, mineral ve şekerlerin bulunabilirliğini artırabileceğini ve rehidrasyon sonrası yeniden büyümeyi kolaylaştıracağını bildirmişlerdir. Lakkaz enziminin önemli fonksiyonlarından bir diğeri de flavonoid oksidasyonunu katalizleyen ana enzimlerden biri olmasıdır. Flavonoidler, reaktif oksijen türleri (ROT) gibi serbest radikallerin temizleyicileri olarak hareket ederler (Pourcel *et al.* 2007). Bu yönüyle de dikkate alındığında lakkaz enziminin kuraklık stresinin neden olduğu oksidatif stresi bu yolla da azaltabildiği ihtimal edilmektedir.

Araştırmada kök dokusunun aksine yaprak dokusunda OŞK ve YŞK şartlarında toleranslı genotiplerde lakkaz geninin downregüle, hassas genotiplerde ise upregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24). Vincent *et al.* (2005), su stresine maruz kalan mısır bitkisinin yapraklarındaki lignin içeriğinin iyi bir şekilde sulanan kontrol bitkilerine göre daha düşük olduğunu ve bundan dolayı kuraklık stresinden sonra büyümeye devam

edebildiğini bildirmişlerdir. Bu durum bizim sonuçlarımızı doğrular niteliktedir. Bunun yanısıra, Zhang *et al.* (2013), miR397'nin tarım ürünlerinde verimi hangi mekanizma ile artırdığına dair yaptıkları çalışmalarında, mir397'nin Lac genini downregüle ederek brassinosteroid birikimini artırma yoluyla bunu başardığını belirlemişlerdir. Brassinosteroidlerin hem verimi artırmada hem de strese tolerans mekanizmasında koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Behnamnia *et al.* (2009), kuraklık stresine maruz bırakılan domateste brassinosteroid uygulamasının lipid peroksidasyonunu azaltarak ve antioksidan seviyesini artırarak strese toleransın sağlandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Wang *et al.* (2013) pamukta tuz ve kuraklık stresinde lakkaz genini doza ve dokuya bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini, gövdedense kökte daha yüksek ekspresyon oranlarının elde edildiğini tespit etmişlerdir.

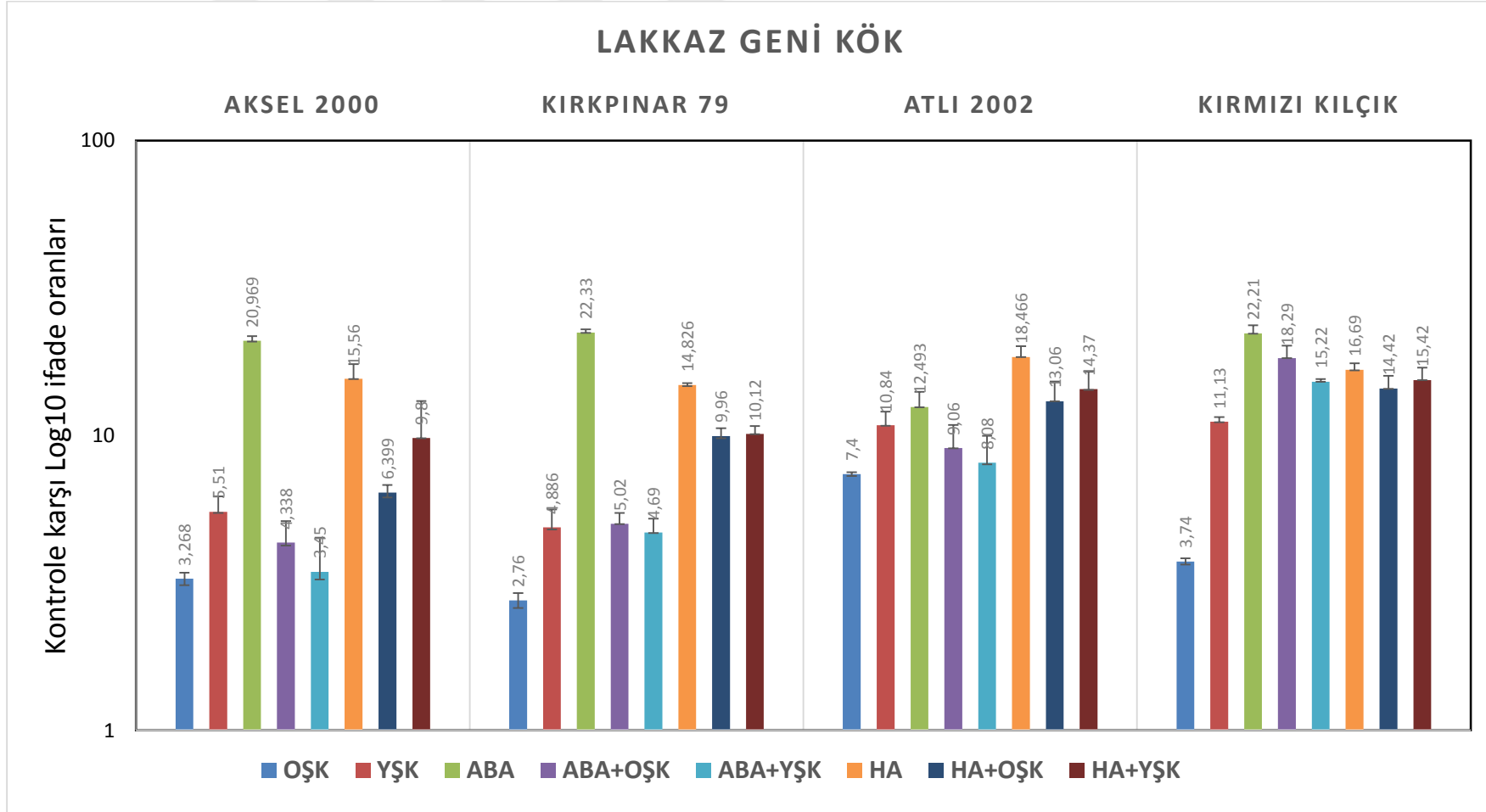
Çalışmamızda ABA uygulamasının kök dokusunda tüm genotiplerde lakkaz geninin yüksek oranlarda upregülasyonuna, yaprak dokusunda ise toleranslı genotipler ile Atlı 2002 genotipinde downregülasyonuna, Kırmızı Kılçık genotipinde ise yok denecek kadar az oranda upregülasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23, Şekil 4.24). Araştırmada, ABA uygulamasının yaprak dokusunda toleranslı genotipler ile Atlı 2002 hassas genotipinin lakkaz geninin downregülasyonuna sebep olmasında ABA'nın brassinosteroid birikimini teşvik ederek strese toleransın kazanıldığı düşünülmektedir. Divi *et al.* (2009) brassinosteroidler ile ABA'nın ortak bir yolakta sinyal alışverişi yaptıklarını belirlemişlerdir. Bununla birlikte, ABA'nın yanısıra, salisilik asit ve metiljasmonatın lignin genlerinin downregülasyonunda etkin görev aldıkları tespit edilmiştir (Le Roy *et al.* 2017). Dolayısıyla yaprak dokusunda lignin genlerinin downregüle olmasının sebebi salisilik asit ve metil jasmonattan kaynaklanmış olabilir. Nitekim yaptığımız promotör analizinde lakkaz geninin promotör bölgesinde ABA ile ilgili ABRE, salisilik asit ile ilgili TCA-elementi ve metiljasmonat ile ilgili CTCTA-motif ve TGACG-motifinin olması genin düzenlenme mekanizmasında bu hormonların aktif rol aldıklarının göstergesidir.

Araştırmada kullanılan HA uygulamasının kök dokusunda tüm genotiplerde, yaprak dokusunda ise Kırmızı Kılçık genotipinde lakkaz geninin upregülasyonuna, yaprak

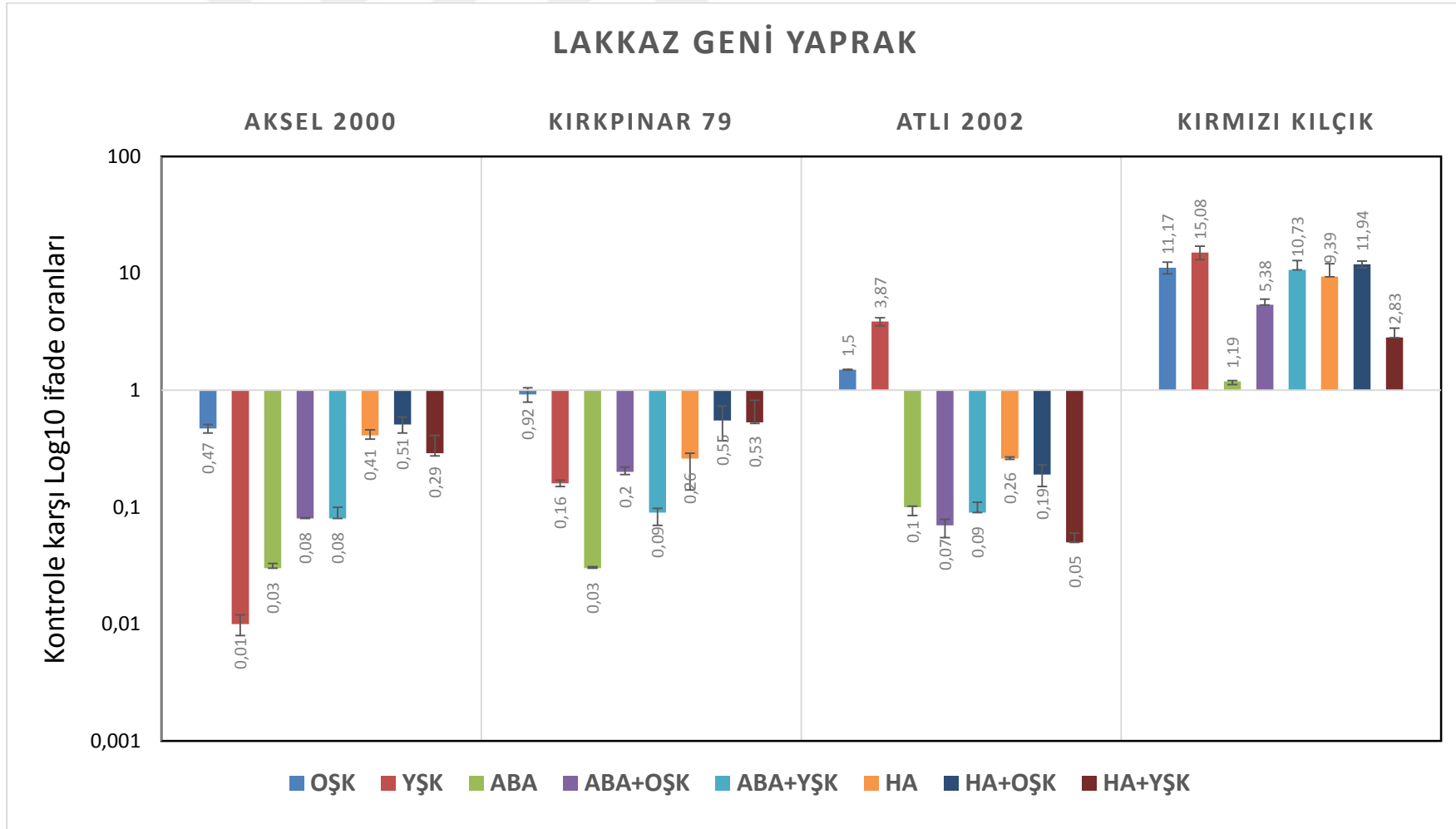
dokusunda toleranslı genotipler ile Atlı 2002 genotipinde ise downregülasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23, Şekil 4.24). HA'nın köklerde NO-IAA sinyal yolağını aktifleştirerek ABA birikimini artırdığı bilinmektedir (Mora *et al.* 2014). Dolayısıyla HA uygulamasının lakkaz geninin ifadesini ABA aracılığıyla düzenlediği belirlenmiştir.



## LAKKAZ GENİ KÖK



Şekil 4.23. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR397 hedef geninin ifade değişimleri (2-ΔΔCt)



Şekil 4.24. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR397 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

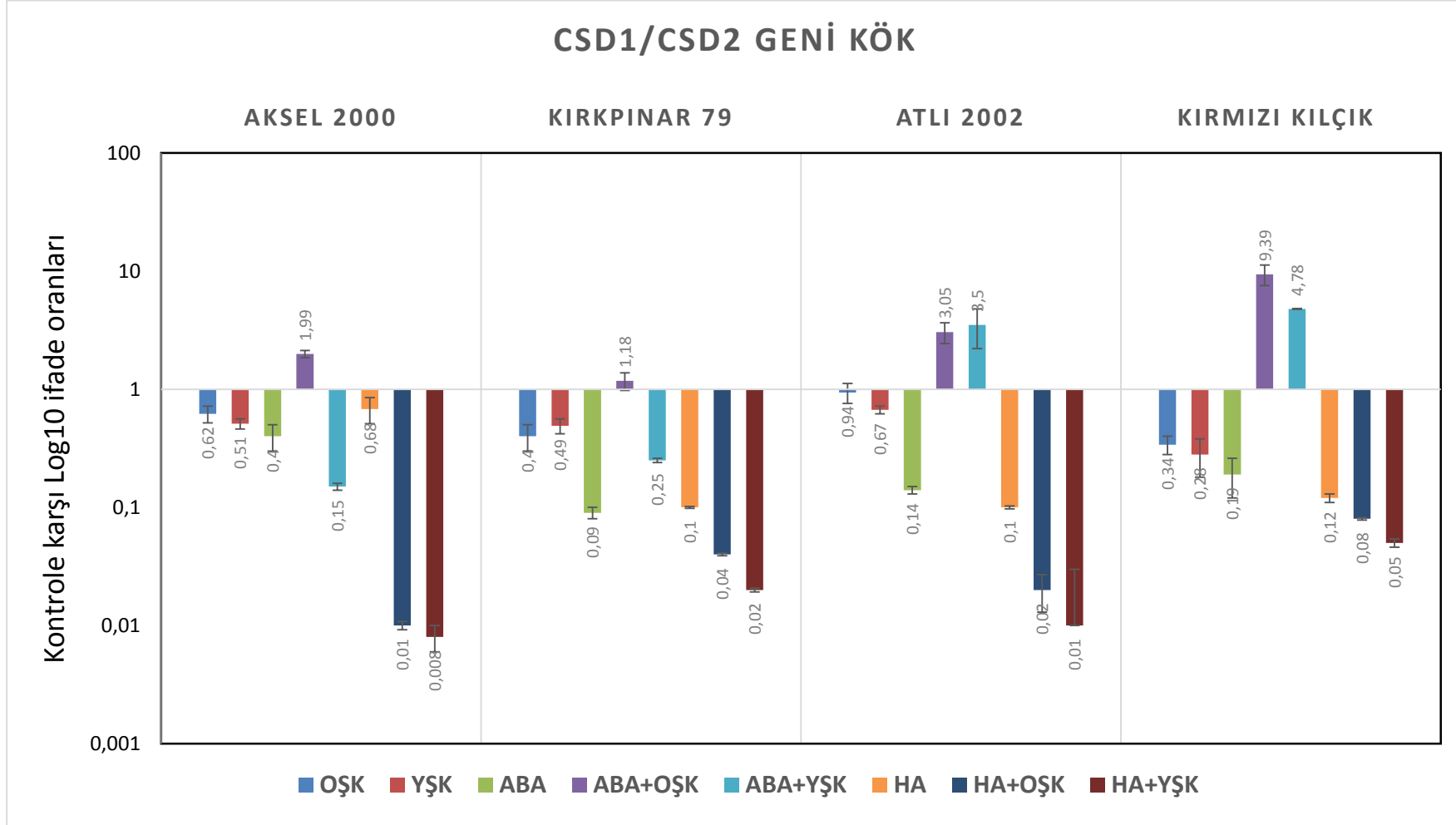
miR398 hedef geni (CSD1/CSD2) ifade analiz sonuçlarına göre; her iki doku tipinde de OŞK ve YŞK uygulamalarında hem toleranslı hem hassas genotiplerde CSD1/CSD2 geninin downregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25, Şekil 4.26). Ayrıca genel olarak hem genotipler arasında hem kök ve yaprak dokusu arasında hedef genin ekspresyon seviyeleri bakımından farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25, Şekil 4.26). Benzer şekilde, Trindade *et al.* (2010), *Medicago truncatula*'da su eksikliğinde CSD1/CSD2 geninin bitkinin hem kök hem gövde kısımlarında downregüle olduğunu belirlemişlerdir. Huat *et al.* (2014) kuraklığa toleranslı ve hassas buğday genotiplerinde miR398 hedef geninin ekspresyonunun kök ve yaprak dokusunda çok büyük farklılıklar oluşturmadığını tespit etmişlerdir. miR398 hedef geni olan CSD1 ve CSD2 izozimleri bakır-çinko metal kofaktörü içermekte olup CSD1 sitoplazmada, CSD2 ise kloroplastta bulunmaktadır ve Cu/Zn-SOD'ların düzenlenmesinden sorumlulardır. Transgenik bitkilerde Cu/Zn-SOD'lar ile bitki stres toleransını artırmak için çalışmalar yapılmıştır (Perl *et al.* 1993; Gupta *et al.* 1993). CSD1/CSD2 enziminin oksidatif strese (Sunkar *et al.* 2006), bakır stresinde (Sunkar *et al.* 2006; Yamasaki *et al.* 2007) ve sükröz stresinde (Dugas and Bartel 2008) strese cevap mekanizmasında rol aldığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Trindade *et al.* (2010), su stresinde miR398'in bakır homeostazının sağlanmasında da rol aldığını bildirmişlerdir. Arabidopsis'te miR398 transkriptlerinin bir şaperon proteinini (CCS1) kodladığı ve bu şaperonun Cu/Zn-SOD'lara bakır iyonlarını aktardığı belirlenmiştir (Chu *et al.* 2005). Su stresi esnasında stomaların kapanmasıyla birlikte yapraklardaki CO<sub>2</sub> akışı da azalmaktadır. Bu azalma fotosentezi etkilemekte, ayrıca stres altında fotosentetik metabolizma sonucu meydana gelen ROT'ların uzaklaştırılmasını mecbur kılmaktadır. Bu durumda strese karşı savunmada aktif CSD1/CSD2 genlerinin ROT'ları uzaklaştırmadaki görevinin yanısıra bu genlere, plastosiyonine bakır temin etmede daha çok ihtiyaç duyulacağından, miR398 upregüle olarak hem Cu/Zn-SOD'lara hem de plastosiyonine bakır temin etmektedir. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada OŞK ve YŞK uygulamalarında tüm genotiplerde miR398'in upregüle olarak CSD1 ve CSD2 genlerini downregüle ettiği ve bunun sebebinin ilgili yerlere serbest bakır iyonlarını ulaştırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Araştırmamızda, tek başına ABA uygulamasının her iki doku tipinde de tüm genotiplerde CSD1/CSD2 geninin downregüle olmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25, Şekil 4.26). Jia *et al.* (2009), Arabidopsis'te CSD1 geninin ABA uygulamasından 72 saat sonra downregüle olduğunu belirlemişlerdir. Bunun tam aksine aynı çalışmada, *Populus tremula*'da ABA uygulaması ile CSD1 geninin upregüle olduğu tespit edilmiştir. Böylece miR398'in ve hedef genlerinin oldukça dinamik bir yapı sergilediklerini bildirmişlerdir. Nitekim, araştırmamızda kuraklık stresi altında ABA uygulamasının CSD1/CSD2 geninin farklı ifade düzeylerine sebep olduğu belirlenmiştir. ABA'nın farklı türlerde farklı ifade edilmesinin nedeni ABA hassasiyeti, alımı ve düzenlenmesinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Ya da bu türler aynı strese maruz kaldıklarında hücrel stresin farklı evrelerinde olabilirler. Bir türde mevcut olan otoregülasyon sistemi diğer türde olmayabilmektedir. Bunun yanısıra, ABA'nın kuraklık stresinde stomaların kapanma mekanizmalarında ve ROT'lara karşı antioksidan savunma sisteminde görev aldığı bilinmektedir. Dolayısıyla ABA'nın kuraklık stresi altında doku ve genotipe bağlı olarak CSD1/CSD2'nin up/downregülasyonuna sebep olması stomalar üzerindeki etkisiyle açıklanabilir. Ayrıca miR398 hedef genine ait yaptığımız cis element analizinde ABRE elementinin olması genin ABA'ya bağımlı olduğunu göstermektedir (**EK 9**).

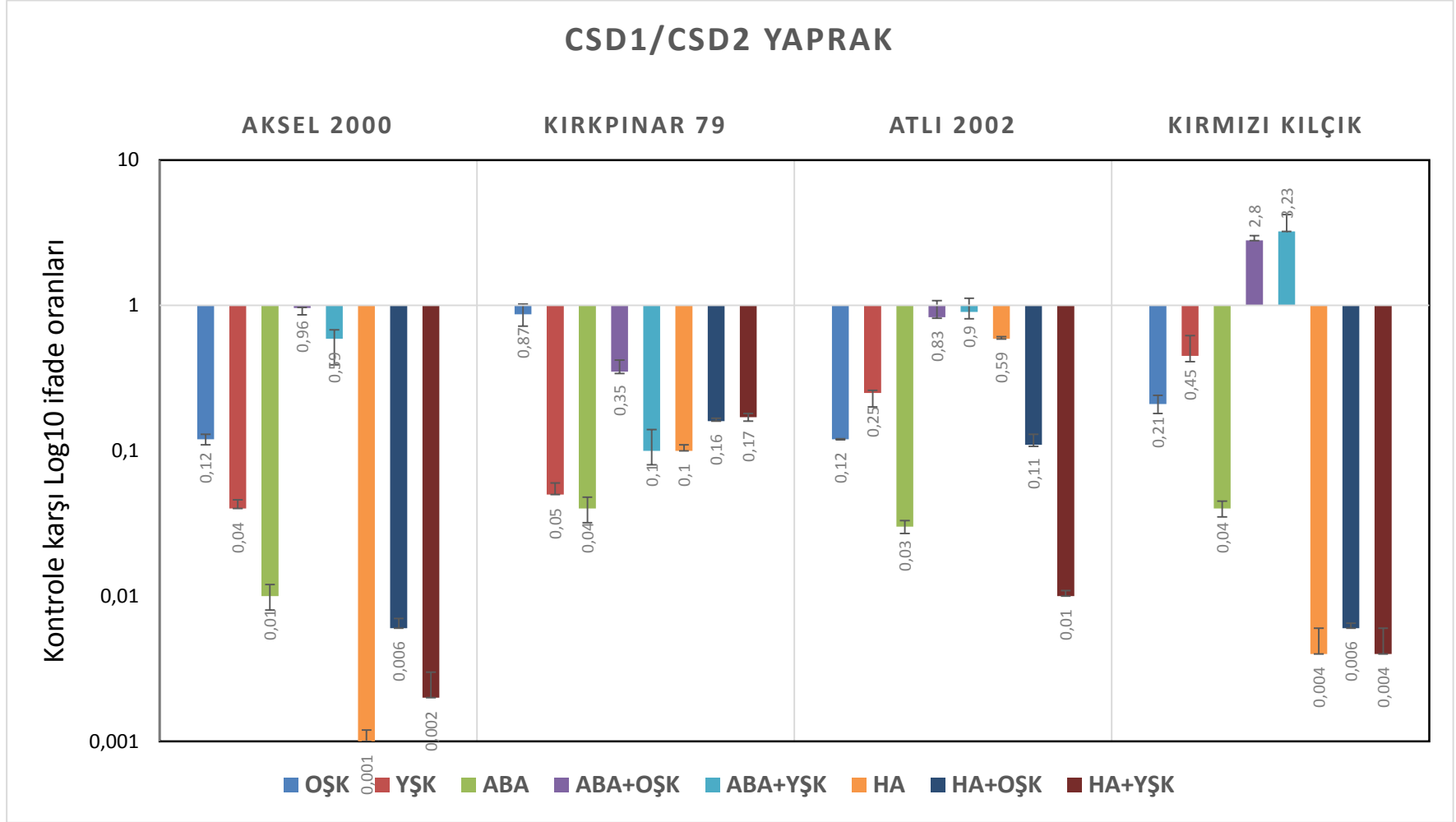
Araştırmamızda HA uygulamasının her iki doku tipinde de tüm genotiplerde CSD1/CSD2 geninin downregüle olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Stres şartlarında HA'nın, CSD1/CSD2'nin downregülasyon oranını artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.25, Şekil 4.26). HA'nın özellikle yapraklara yapılan uygulamasının yapraklardaki fotosentez kapasitesini artırdığı bilinmektedir (Delfine *et al.* 2005). Araştırmamızda, kuraklık stresi altında buğday genotiplerinin yapraklarına uyguladığımız HA'nın fotosentez oranını artırmak için miR398'in plastosiyonine bakır iyonlarını aktarmasını teşvik ettiği, bu durumda CSD1 ve CSD2 hedef genlerinin downregülasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir. Bunun yanısıra, HA'nın stres esnasında meydana gelen ROT'ları azalttığı ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Aydin *et al.* 2012; Shah *et al.* 2018). Ancak, araştırmamızda HA uygulamasının Cu/Zn-SOD'ların enzimatik faaliyetlerini

artırması için CSD1 ve CSD2 genlerinin upregülasyonuna değil de bakır iyonlarını hem plastosiyanine hem de Cu/Zn-SOD'lara aktarmak için miR398'in upregülasyonuna izin vermesi, stres uygulamasının 7. gününde bitkinin fotosentezi düzenlediğinin göstergesi olduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.25. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR398 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



**Şekil 4.26.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR398 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Bitkilerde Cu homeostazının sağlanmasından sorumlu genlerin posttranskripsiyonel düzenlenmesinde görev alan miRNA'lardan biri de miR408'dir. Hedeflediği bölge plastosiyanindir. Araştırmamızda, plastosiyanın geni kök ve yaprak ifade analizi sonuçlarında, toleranslı genotiplerde OŞK uygulamasında genin upregüle, YŞK uygulamasında ise downregüle olduğu belirlenmiştir. Hassas genotiplerde ise; Atlı 2002 genotipinde her iki kuraklık dozunda genin downregüle, Kırmızı Kılıçık'ta ise upregüle olduğu görülmüştür (Şekil 4.27, Şekil 4.28). Mutum *et al.* (2013), çeltikte miR408 hedef genlerinin kuraklık stresinde farklı doku kısımlarında farklı ifade edildiğini belirlemişlerdir. Aynı zamanda çalışmada kullandıkları çeltik genotiplerinde farklı sonuçlar elde ederek miR408'in farklı çeltik genotiplerinde farklı gen ekspresyon düzenleyici mekanizmalar geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Plastosiyanın nohutta kuraklık stresinde downregüle olmuştur (Hajyzadeh *et al.* 2015). Esas olarak bakır stresine (Ma *et al.* 2015) cevabın düzenlenmesinden sorumlu olan bu genin kuraklıkta (Huat *et al.* 2014), azot ve kükürt eksikliğinde (Liang *et al.* 2015) fotosentez ve tane verimini düzenlemedeki kritik rolünde (Zhang *et al.* 2017) ve demir alınımı (Paul *et al.* 2016) gibi pek çok stres çeşidine karşı transkripsiyonel yanıtı belirlenmiştir. Bu bulgular miR408 ve hedef geninin çoklu biyolojik süreçlerde çok önemli bir düzenleyici olarak rol oynadığını göstermektedir. Çevresel stres etmenlerine maruz kalan bitkiler, miR408 birikimini artırıp, hedef geni olan plastosiyanın posttranskripsiyonel baskılanması için SPL7 (Squamosa promotor binding like protein 7) transkripsiyon faktörü gibi spesifik sinyal yollarını kullanabilirler. Böylece miR408 transkriptlerinin artmasıyla Cu<sup>2+</sup> iyonları plastosiyonine aktarılmakta ve fotosentezin korunumu sağlanmaktadır (Zhang *et al.* 2017). Fotosentezin yanı sıra Cu<sup>2+</sup>, bitkilerde oksidasyon-redüksiyon mekanizmalarında, birçok enzimin yapısında, bitkilerde su akışının sağlanmasında, membran oluşumunda ve çiçeklenmede görev almaktadır. Dolayısıyla, stres esnasında Cu<sup>2+</sup> iyonlarındaki dengesizlik, metabolizmada bozukluklara yol açmaktadır. Çalışmamızda, plastosiyanın geninin stres koşulları altında baskılanması veya indüklenmesi Cu<sup>2+</sup> iyonunun dengelenmesi bakımından strese karşı oluşturulan önemli bir cevap olduğu düşünülmektedir.

Araştırmada, tek başına ABA uygulamasının toleranslı genotiplerde her iki doku tipinde de plastosiyanın geninin downregülasyonuna, hassas genotiplerde ise upregülasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte stres şartları altında ABA uygulamasına karşı genin verdiği cevaplar her genotipte farklı olmuştur (Şekil 4.27, Şekil 4.28). Mutum *et al.* (2013), çeltikte ABA uygulamasının hem hassas hem dayanıklı çeşitte osa-miR408'in ABA'ya bağlı stres sinyali transdüksiyon yolağı yoluyla regülasyonunun pozitif bir şekilde düzenlendiğini belirlemişlerdir. Benzer olarak, ABA uygulamasının çeltikte (Shen *et al.* 2010) ve *Populus tremula*'da (Jia *et al.* 2009) miR408 ifadesini artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmada, ABA uygulaması ile toleranslı genotiplerde plastosiyanın geninin downregüle olarak miR408'in upregülasyonu ile Cu homeostazının sağlandığı düşünülmektedir. Dışarıdan uygulanan ABA'nın fotorespirasyon oranını artırarak fotorespirasyonda görev enzimlerin (RuBP oksijenaz ve glikolat oksidaz) aktivitesini artırdığı ve CO<sub>2</sub> oranını artırmak için stomadaki düzenlemeleri yaptığı bilinmektedir (Popova *et al.* 1996). Buna göre, ABA'nın fotosentezin gerçekleşmesine katkısı olduğu ve bunun için de plastosiyanın geninin downregülasyonuna sebep olarak Cu<sup>2+</sup> iyonlarının plastosiyanine aktarılmasına aracılık ettiği varsayılmaktadır. Bununla birlikte yaptığımız cis element analizinde ABA ile ilgili 3 farklı bölgenin (ABRE, ABRE3a, ABRE4) olduğu belirlenmiştir (**EK 10**).

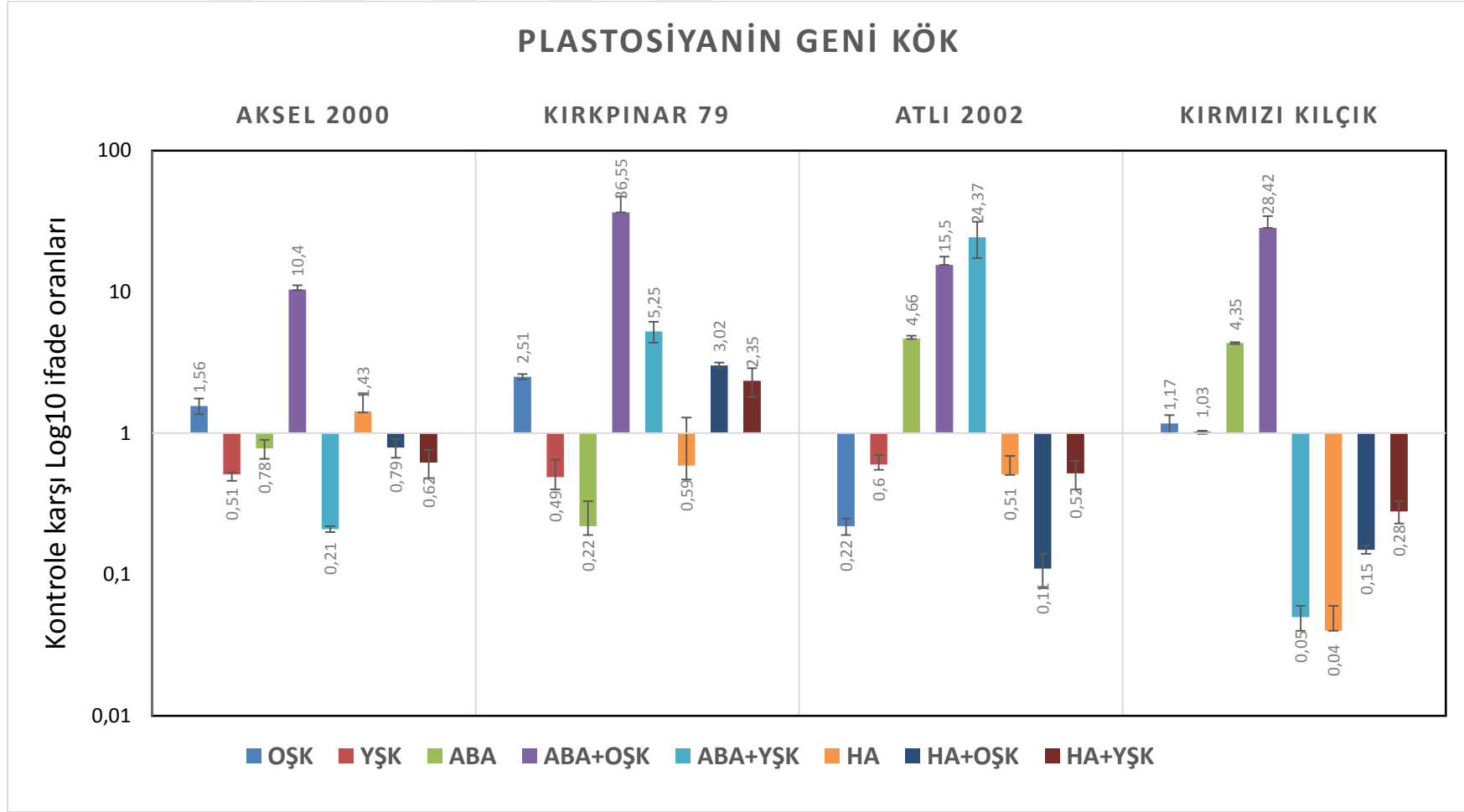
Çalışmada, HA uygulamasının toleranslı ve hassas genotiplerde her iki doku tipinde de plastosiyanın geninin oldukça değişken bir şekilde ifade olmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28). Bunun yanısıra, kuraklık stresi altında uygulanan HA'nın her iki doku tipinde de toleranslı ve hassas genotiplerde ilgili genin oldukça farklı seviyelerde ifade olmasına sebep olduğu da tespit edilmiştir.

miR398 analizinde bahsedildiği üzere HA'nın yapraktan uygulamasının yapraklardaki fotosentez kapasitesini artırdığı bilinmektedir (Delfine *et al.* 2005). Araştırmamızda, kuraklık stresi altında buğday genotiplerinin yapraklarına uyguladığımız HA'nın fotosentez oranını artırmak için miR408'in plastosiyonine bakır iyonlarını aktarmasını teşvik ettiği düşünülebilir. Ancak HA uygulaması ile miR408'in ifade durumunun

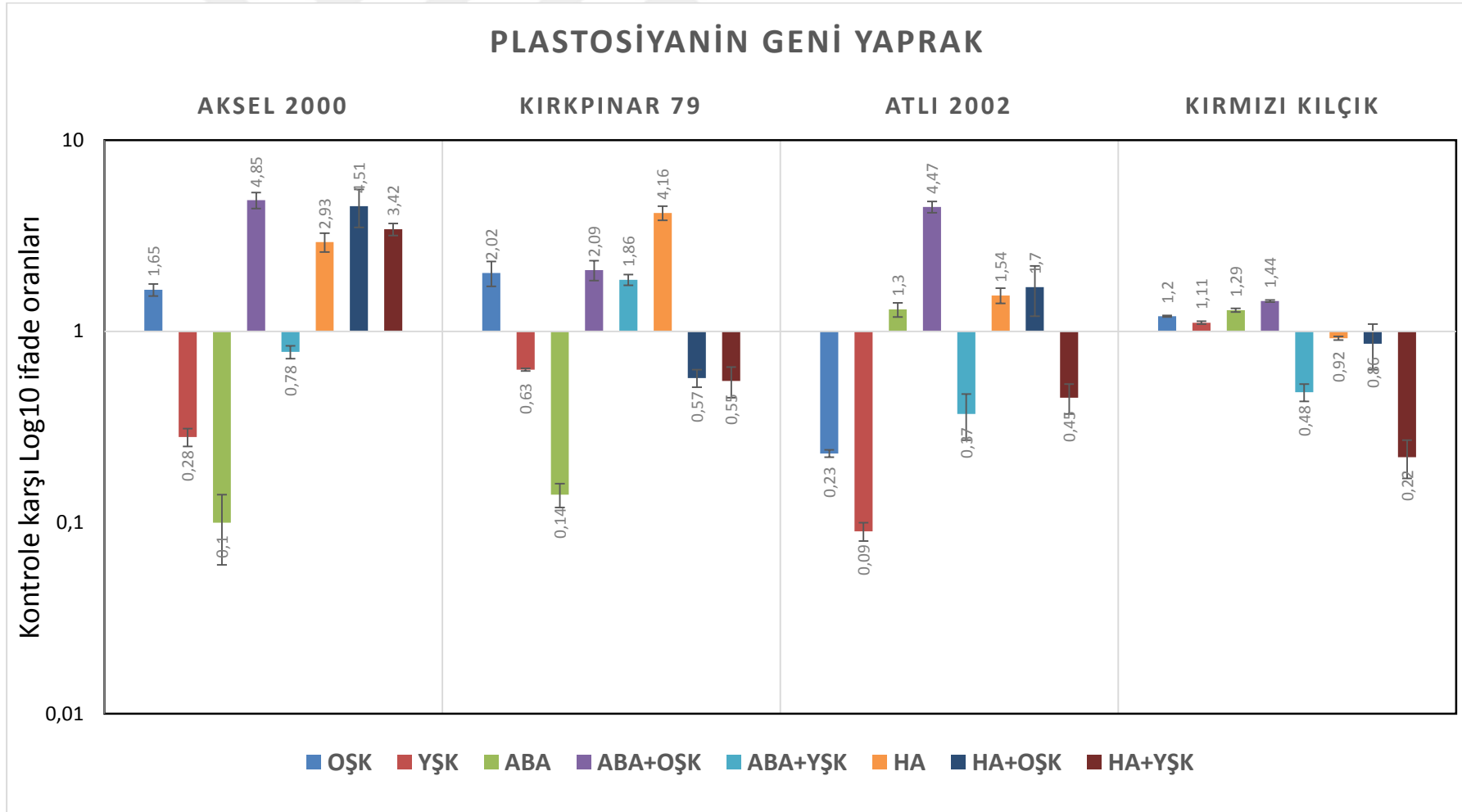
oldukça değişken olması HA'nın farklı metabolik yolakları aktive/inaktive ederek strese toleransın kazanılmasında katkısının olduğu düşünölmektedir.



## PLASTOSİYANİN GENİ KÖK



Şekil 4.27. -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin köklerindeki miR408 hedef geninin ifade değişimleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )



**Şekil 4.28.** -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, ABA ve humik asit uygulamaları altındaki genotiplerin yapraklarındaki miR408 hedef geninin ifade değişimleri (2- $\Delta\Delta C_t$ )

### 4.3. Infrared spektroskopi analizleri

#### 4.3.1. Kemometrik analizler

##### 4.3.1.a. Temel bileşen ve hiyerarşik kümeleme analizi

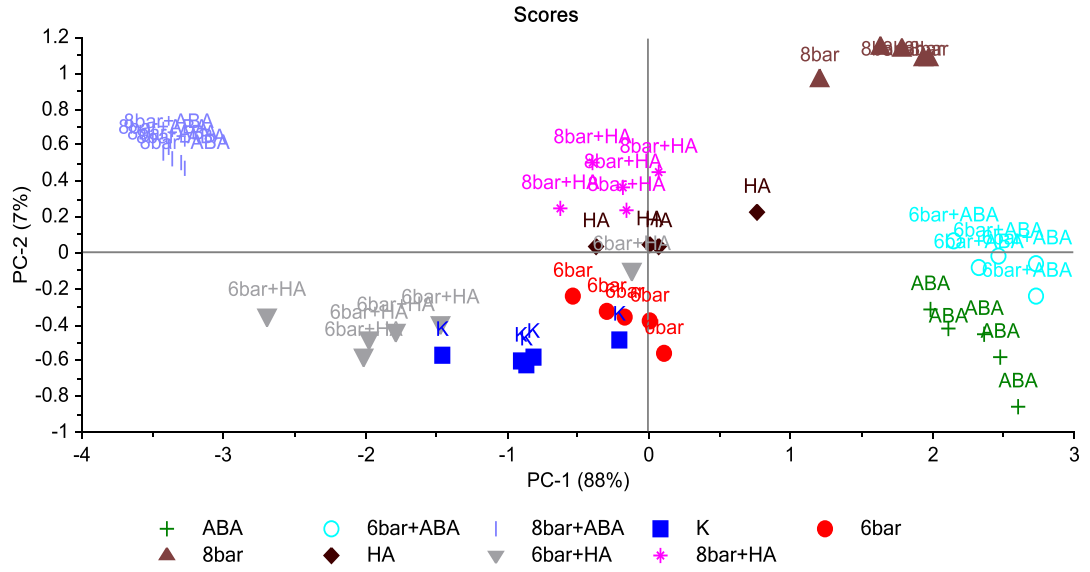
Kuraklık stresi, ABA ve humik asit uygulamalarında kuraklığa hassas ve toleranslı buğday genotiplerinde gruplararası farklılaşmaları belirlemek amacıyla yaprak DNA'larına ait spektrumlara gözetimsiz örüntüleme yöntemlerinden Temel Bileşen Analizi [Principal Component Analysis (PCA)] ve Hiyerarşik Kümeleme Analizi [Hierarchical Cluster Analysis (HCA)] uygulanmıştır. Bu metotların kullanılmasının nedeni spektrumlardaki değişimlere dayalı gruplararası ilişkilerin belirlenmesi ve dolayısıyla çalışılan örneklerin gruplarının sınıflandırılmasına olanak sağlamalarıdır. Her iki analiz için  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesi kullanılmıştır. PCA için elde edilen spektrumların herhangi bir spektral ön işlem görmemiş ham halleri, HCA için ise; ikincil türevi alınıp, vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar kullanılmıştır.

Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'de kuraklığa hassas buğday genotiplerinden Kırmızı Kılçık ve Atlı 2002 için elde edilen PCA skor grafikleri verilmektedir. Bu grafikler analiz edilen gruplar arasında benzerlik veya farklılıkların belirlenmesi dolayısıyla gruplararası bağlantıların ortaya konulmasını sağlamaktadır. Bu grafikler örnekler arası değişkenlikleri ifade eden temel bileşenlere dayalı olarak çizilmektedir. En çok varyasyon birinci ve ikinci temel bileşende açıklanmaktadır. Şekillerden de görüleceği üzere birinci ve ikinci temel bileşenler için varyasyon yüzdesi Kırmızı Kılçık için %95, Atlı 2002 için %98 olarak bulunmuştur. Skor grafikleri detaylı olarak analiz edildiğinde, Kırmızı Kılçık genotipinde tüm gruplar birbirinden belirgin bir şekilde ayrılmıştır. -6 bar PEG6000 grubu kontrol grubuna yakın iken, -8 bar PEG6000 grubunun ise uzak olduğu görülmektedir. -8 bar PEG6000 grubunun uzak olması yüksek doz kuraklık uygulamasının yaprak DNA'sında yapısal ve miktarsal anlamda değişimlere neden olduğunu göstermektedir. HA, HA+ -6bar PEG6000 ve HA+ -8bar PEG6000 gruplarında kontrol grubuna yakın oldukları bulunmuştur. Özellikle HA+ -8bar

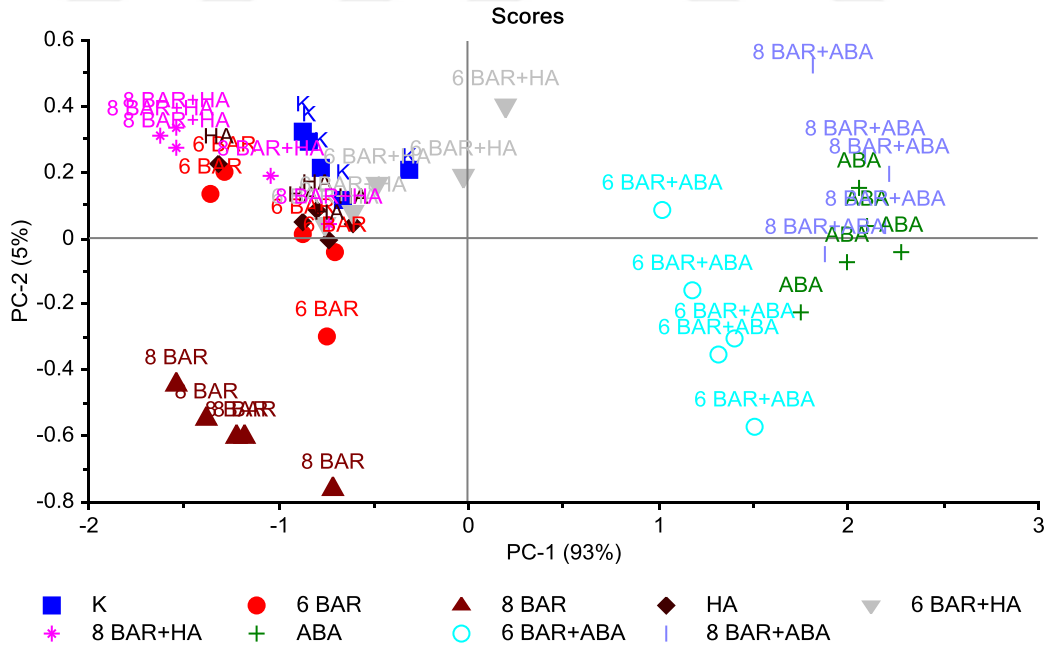
PEG6000 grubunun yakın olması HA'nın, yüksek doz kuraklığın DNA'da neden olduğu değişimleri düzelttiğini göstermektedir. Bununla birlikte ABA, ABA+ -6bar PEG6000 grupları kontrole göre 1. Temel bileşen ekseninde yer alırken ABA+ -8bar PEG6000 grubu ise ikinci temel bileşen ekseninde bulunmaktadır ki, buda bize ABA'nın yüksek doz kuraklık uygulamasının DNA'da neden olduğu değişimleri üzerinde HA'nın iyileştirme etkisine göre farklı bir etkisinin bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Atlı 2002 genotipine ait skor grafiğine bakıldığında, -8 bar PEG6000 yüksek doz kuraklık uygulanmış grubun kontrole ve diğer gruplara göre farklı bir bölgede konumlandığı görülmektedir. Bununla birlikte, -6 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000 ve HA+ -8bar PEG6000 gruplarının kontrol grubu ile aynı tarafta yer aldığı belirlenmiştir ki bu da bize HA'nın yüksek doz kuraklığın neden olduğu DNA'daki değişimleri elimine edebildiğini göstermektedir. Diğer taraftan ABA, ABA+ -6bar PEG6000 ve ABA+ -8bar PEG6000 gruplarının diğer gruplara göre farklı bir bölgede bulunması ABA'nın etki mekanizmasının farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

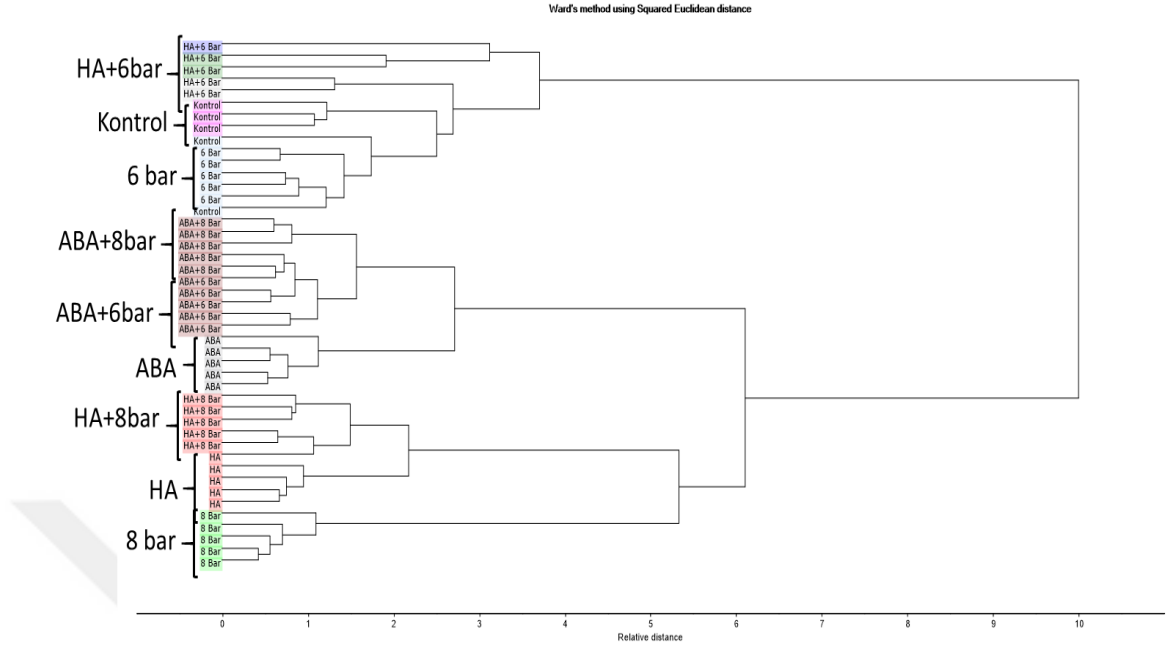
Elde edilen PCA grafiklerini desteklemek ve grupların birbirinden ayrılıp ayrılmadığını tespit etmek amacıyla HCA analizi de yapılmıştır. Şekil 4.31 ve Şekil 4.32'de kuraklığa hassas buğday genotiplerinden Kırmızı Kılçık ve Atlı 2002 için elde edilen HCA dendrogram grafikleri verilmektedir. Her iki genotipe ait dendrogramlar incelendiğinde, analiz edilen gruplar arasındaki ayırım deseninin PCA verileriyle örtüştüğünü göstermektedir.



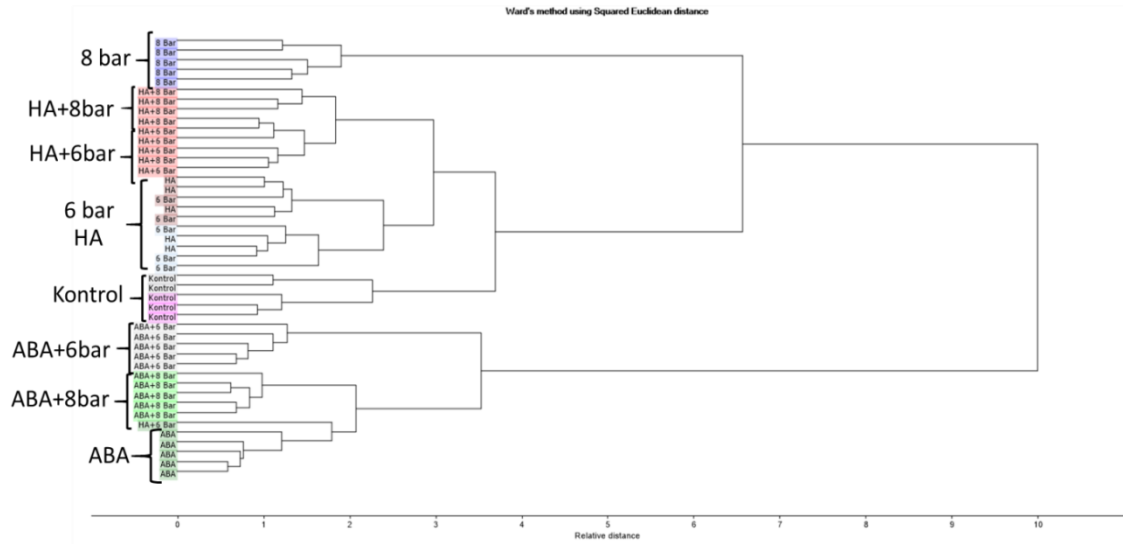
**Şekil 4.29.** Kırırmızı Kılıçık buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği



**Şekil 4.30.** Atlı 2002 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği

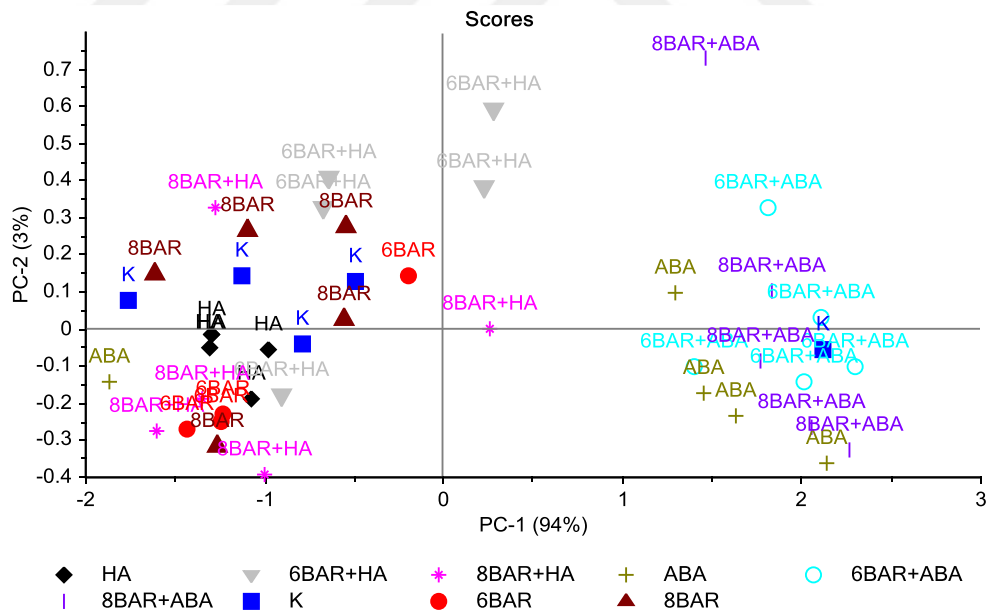


**Şekil 4.31.** Kırmızı Kılıçık buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı

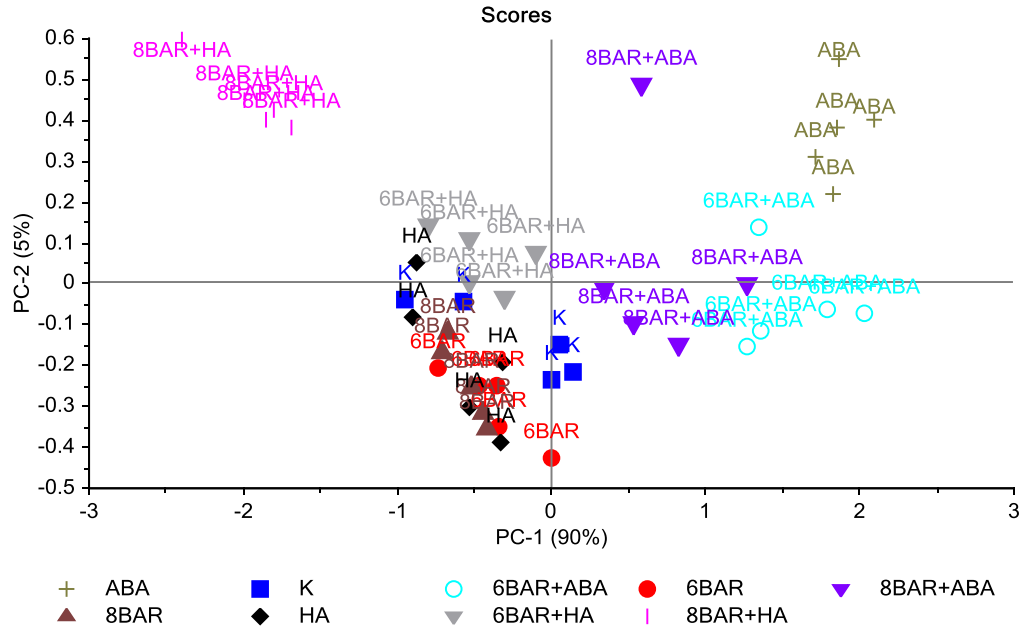


**Şekil 4.32.** Atılı 2002 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı

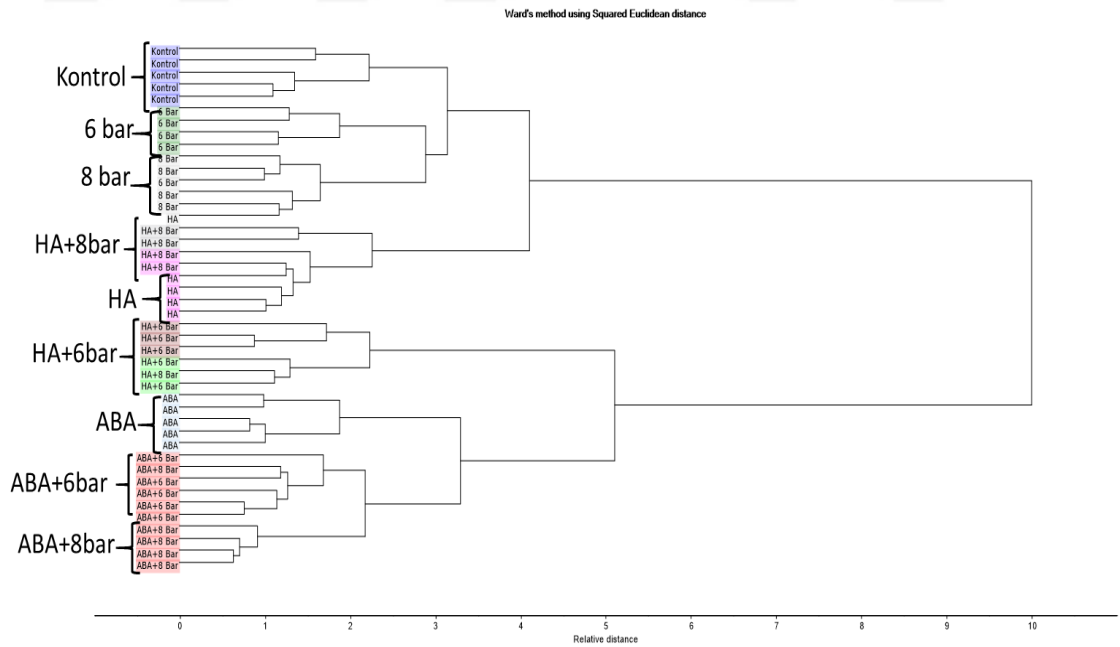
Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'te kuraklığa dayanıklı buğday genotiplerinden Kırkpınar ve Aksel 2000 için elde edilen PCA skor grafikleri verilmektedir. Kırkpınar genotipinin skor grafiğine bakıldığında gruplardan kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000 gruplarının birbirlerinden belirgin bir şekilde ayırmadığını, HA, HA+ -6 bar PEG6000 ve HA+ -8bar PEG6000 gruplarının bu gruplara göre belirgin olmasada farklı bir konumda yer aldığı, ABA gruplarının ise diğer gruplara göre farklı bir bölgede konumlandığı görülmektedir. Özellikle -6 bar PEG6000 ve -8 bar PEG6000 kuraklık uygulanan grupların kontrole yakın olması, bitkinin DNA'sında topolojik ve yapısal açıdan belirgin bir değişimlere neden olmadığını ortaya koymaktadır. ABA grubunda ayrılma Aksel 2000 grubuna ait skor grafiğinde de görülmektedir. PCA skor grafiklerinde gruplararası ayrılma özellikle ABA ve HA gruplarının kontrol, -6 bar PEG6000 ve -8 bar PEG6000 gruplarına göre farklı bir dalda yer almaları Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da gösterilen dendrogram grafiklerinde de açıkça görülmektedir.



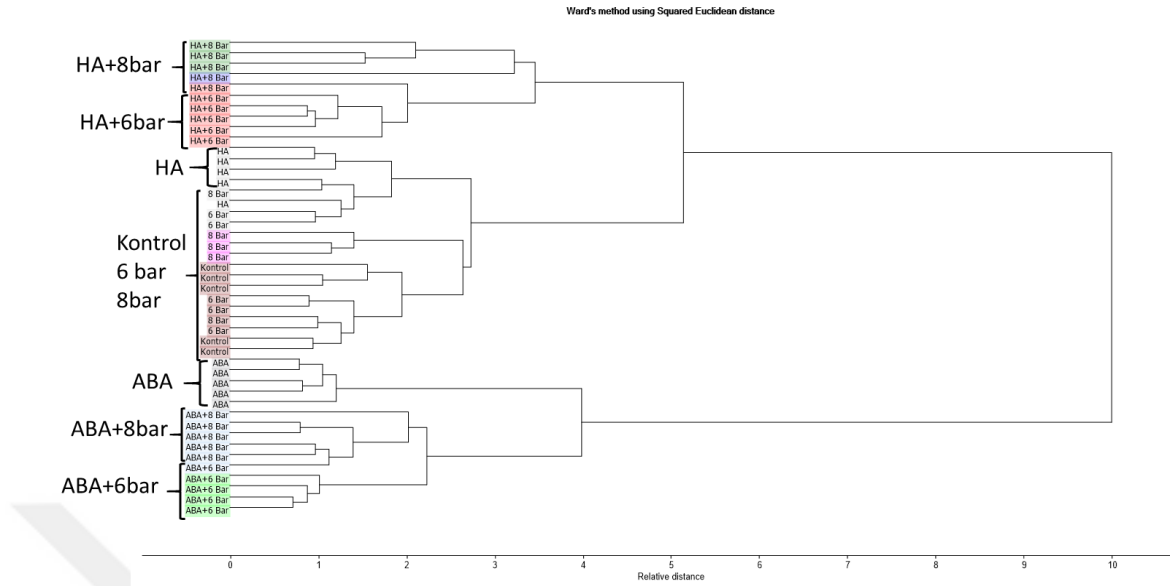
**Şekil 4.33.** Kırkpınar 79 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında 4000-400 cm<sup>-1</sup> spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği



**Şekil 4.34.** Aksel 2000 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafiği



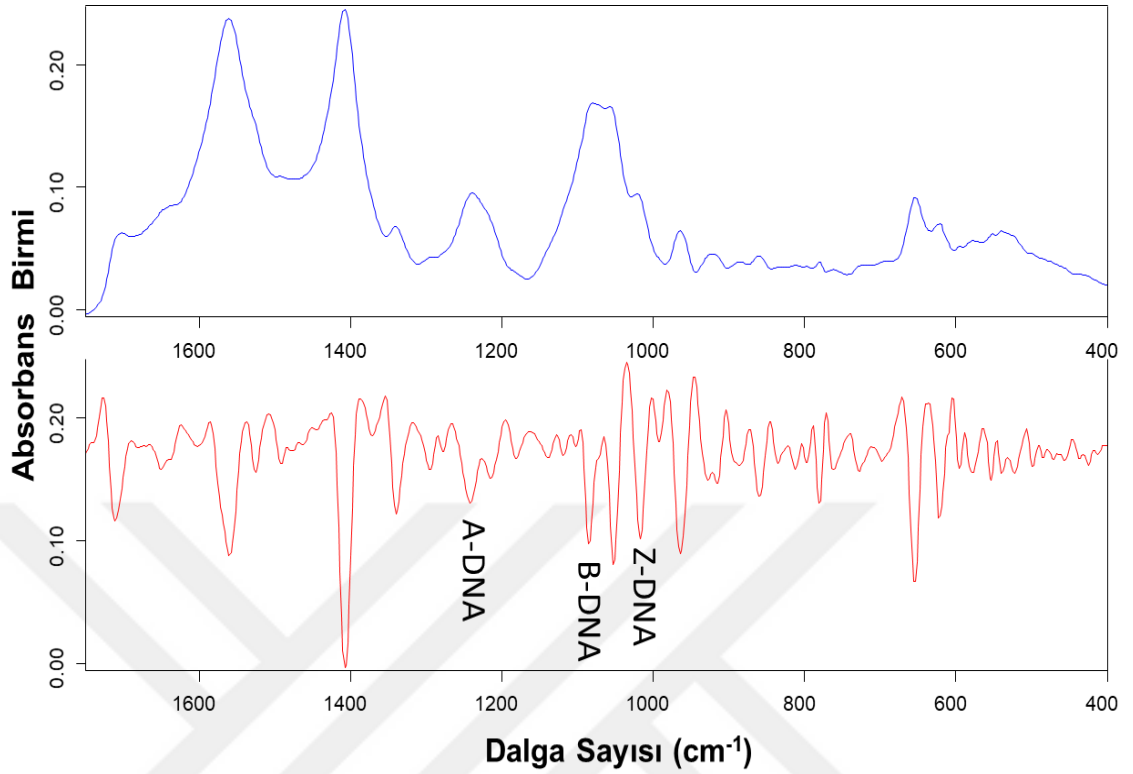
**Şekil 4.35.** Kırkpınar 79 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı



**Şekil 4.36.** Aksel 2000 buğday genotipinde kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarında  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde yapılan hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı.

#### 4.3.2. Kalitatif spektral analizler

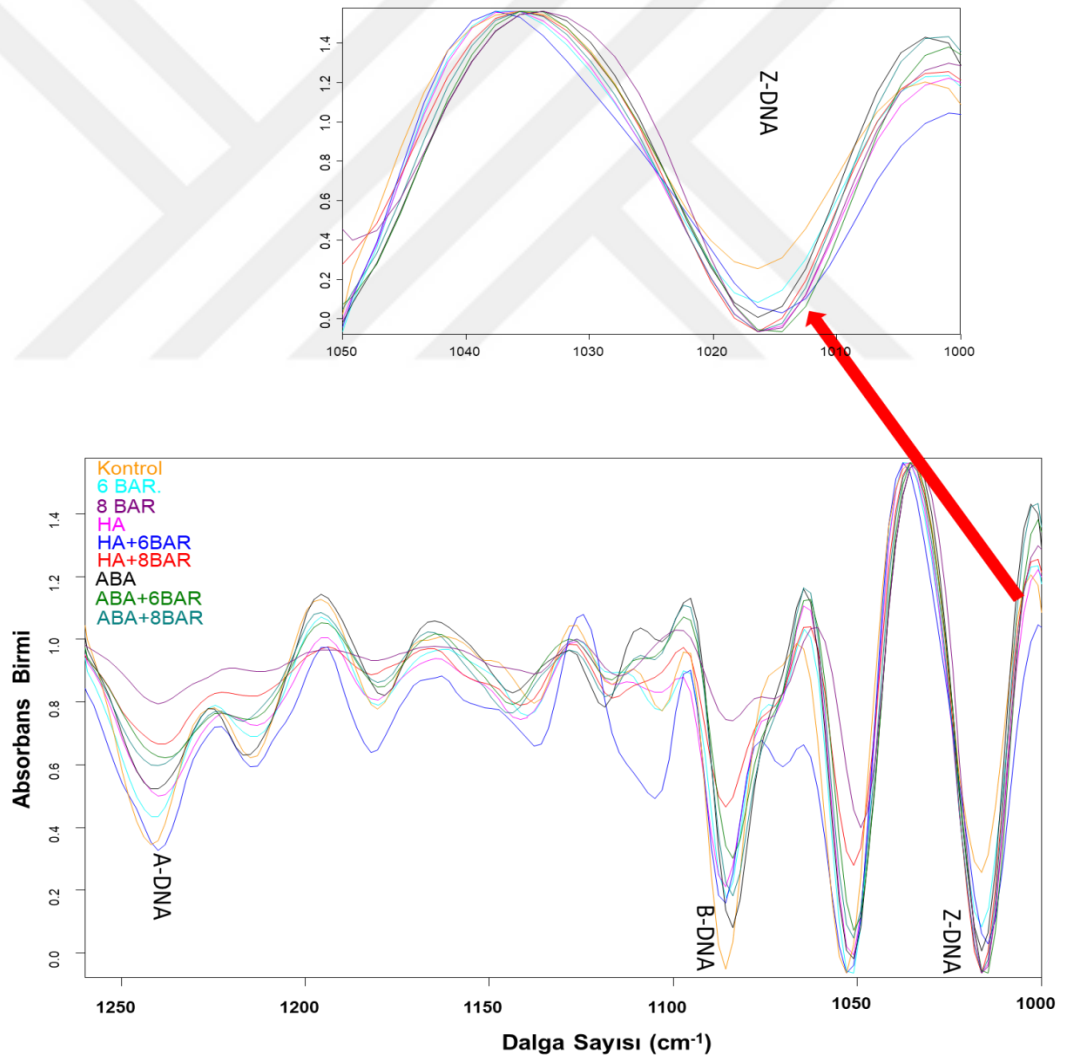
Elde edilen kemometrik analiz sonuçlarına göre orta ve yüksek doz kuraklık stresinde kuraklığa hassas ve toleranslı bitki DNA'larında topolojik olarak meydana gelen değişimler ile HA ve ABA uygulamasının bu değişimleri elimine etme yönünden farklılıklar göstermektedir. Söz konusu yapısal farklılıkları ortaya koymak amacıyla, elde edilen DNA spektrumların da B, Z ve A tip DNA kaynaklı bantlar belirlenmiş ve söz konusu tip DNA miktarlarında kuraklık, HA ve ABA uygulamasında meydana gelen değişimler, kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.37'de  $1800-400\text{ cm}^{-1}$  spektral bölgesinde Kırmızı Kılıç kontrol grubuna ait DNA absorbans ve ikincil türev spektrumu gösterilmektedir. Literatürdeki karakterize edilmiş spektral DNA bantlarına dayanarak tanımlanan B, A ve Z tip DNA kaynaklı bantların yerleri şekilde işaretlenmiştir.  $1240\text{ cm}^{-1}$ 'de yer alan bant A tip DNA,  $1086\text{ cm}^{-1}$ 'de yer alan bant B tip DNA ve  $1015\text{ cm}^{-1}$ 'de yer alan bant Z tip DNA'den kaynaklanmaktadır.



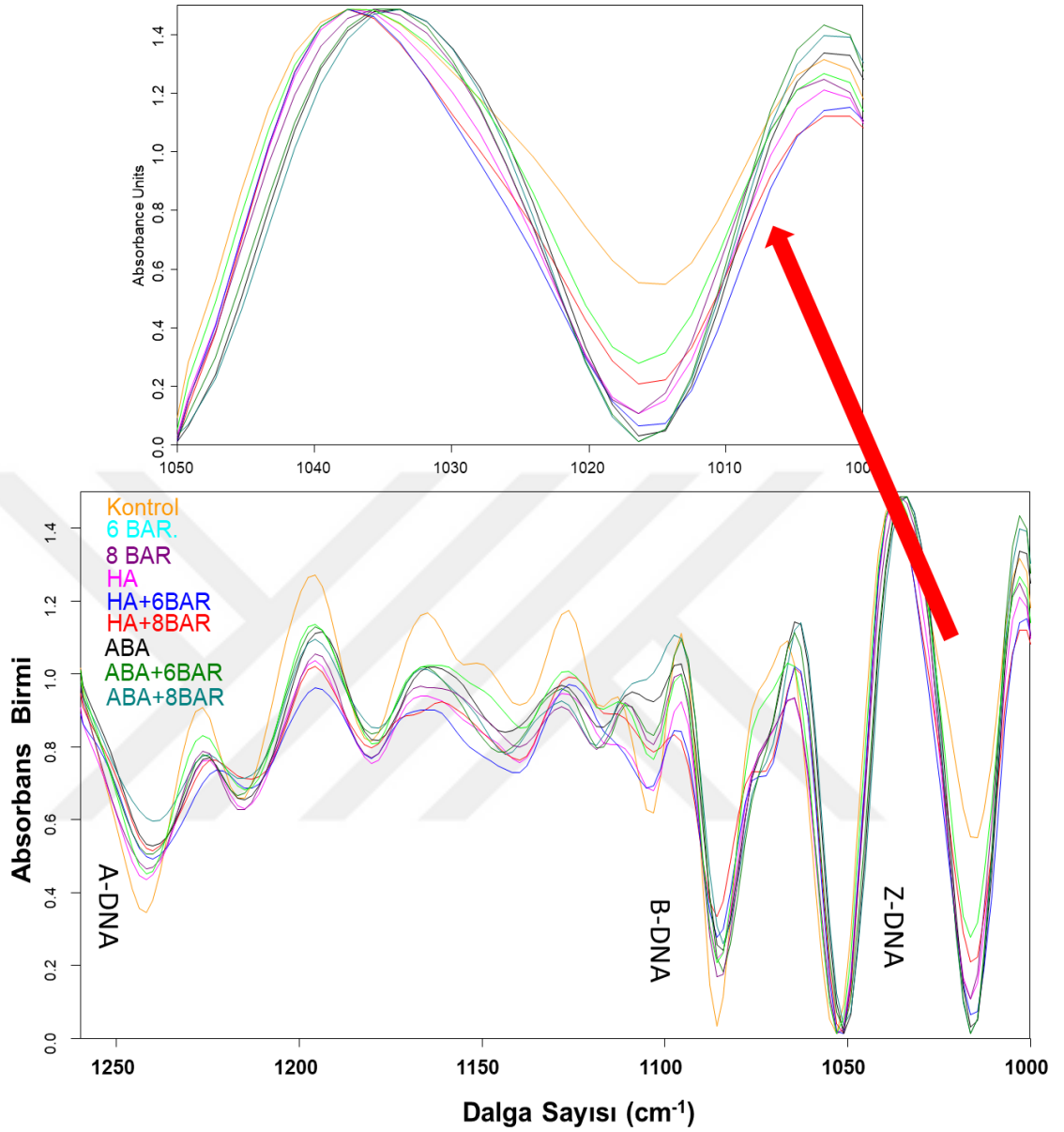
**Şekil 4.37.** 1800-400  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde Kırmızı Kılçık kontrol grubuna ait DNA absorbans ve vektör normalizasyonu yapılmış ikincil türev spektrumu

Şekil 4.38’de kuraklığa hassas Kırmızı Kılçık genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6 bar PEG6000, HA+ -8 bar PEG6000, ABA, ABA+ -6 bar PEG6000 ve ABA+ -8 bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar görülmektedir. Normalize edilmiş spektrumlar bantlarda meydana gelen bant şiddeti, bant dalga sayısı gibi parametrelerde gruplararası farklılıkları kalitatif olarak göstermek için kullanılır. Beer-Lambert yasasına göre bant sinyal şiddeti bandın karakterize edildiği maddeye özgü fonksiyonel grubunun miktarı hakkında bilgi verir. Şekilden de görüleceği üzere, kuraklık uygulanmış -6 bar PEG6000 ve -8 bar PEG6000 gruplarda kontrol grubuna göre B ve A tip DNA’da azalma, Z tip DNA’da artış görülmektedir. En çok değişim yüksek doz kuraklık uygulanmış grupta elde edilmiştir. Bununla birlikte HA ve ABA uygulanan gruplarda B-DNA’da artış Z-DNA miktarında azalma görülmektedir. Benzer değişimler Atlı 2002 genotipinde de görülmektedir (Şekil 4.39). Kuraklık stresine bağlı B ve A DNA’daki azalma, Z DNA’daki artış, strese bağlı DNA konformasyonunda

değişimlerin olduğunu göstermektedir. Diğer bir deyişle strese bağlı B DNA'dan Z DNA formuna geçiş görülmektedir. Bu değişim kuraklığa hassas olan bitkilerde, strese bağlı olarak DNA metilasyonunda artışla ilgili yani hipermetilasyonla ilişkili olabilir. Çünkü metilasyonun konformasyon değişikliğine özellikle B DNA'dan Z DNA formuna dönüşe neden olduğu Temiz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Temiz *et al.* 2012). Diğer taraftan HA ve ABA uygulamasında Z DNA'daki azalma B DNA'daki artış Z DNA'dan B DNA formuna dönüşün olduğunu yani her iki uygulamanın strese bağlı metilasyonu azalttığını göstermektedir.



**Şekil 4.38.** Kırmızı Kılçık genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA, -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000 cm<sup>-1</sup> spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar

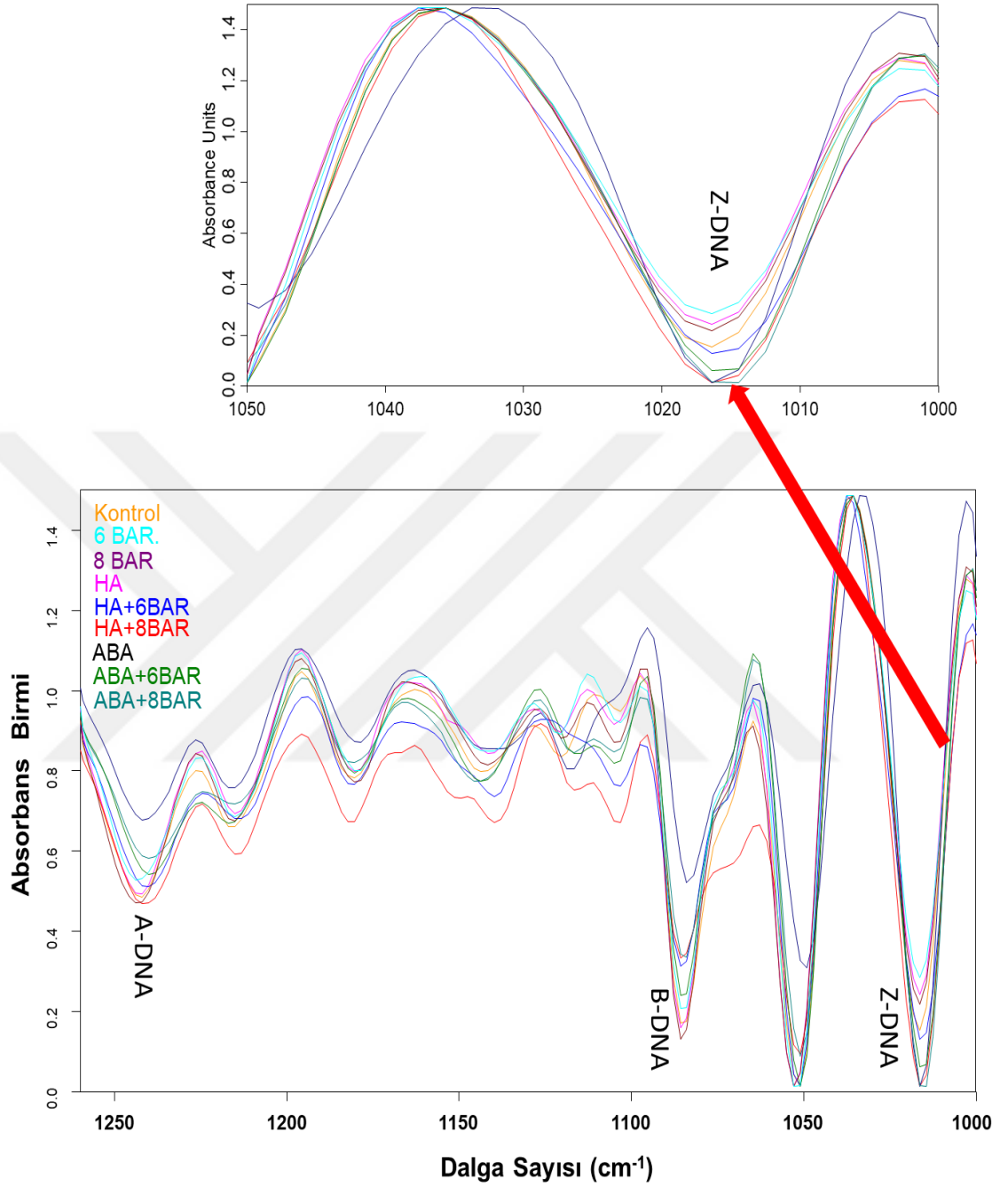


**Şekil 4.39.** Atlı 2002 genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar

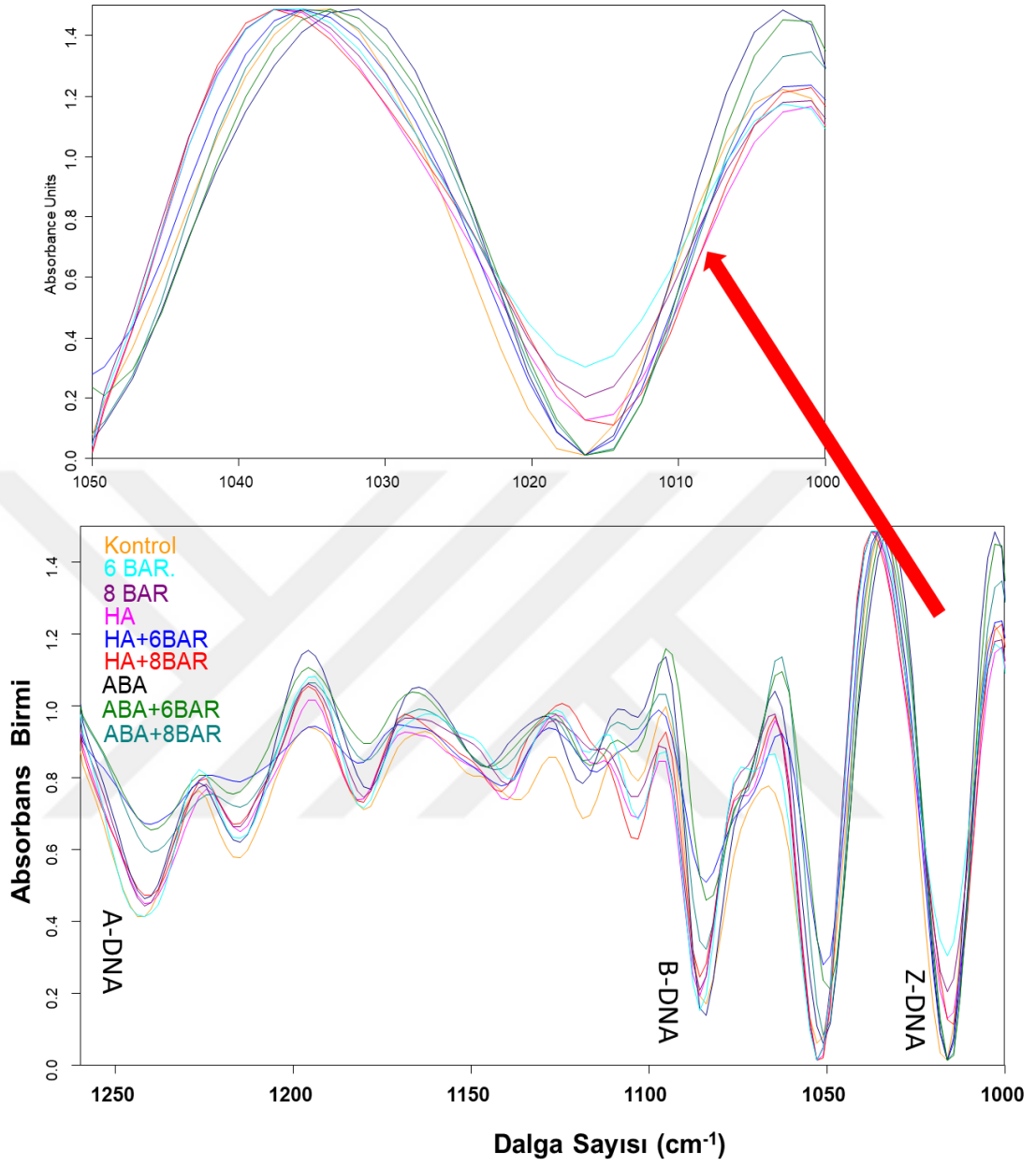
Şekil 4.40'da kuraklığa toleranslı Aksel 2000 genotipinde; kontrol, +6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar görülmektedir. Şekilden de görüleceği üzere, 6 bar PEG6000 ve 8 bar PEG6000 uygulanmış gruplarda

kontrol grubuna göre B ve A tip DNA'da artma varken, Z tip DNA kısmen azalma görülmektedir. Bununla birlikte HA ve ABA uygulanan gruplarda B-DNA'da azalma Z-DNA miktarında kısmen artma görülmektedir. Strese dayanıklı Kırkpınar 79 genotipinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.41). Strese bağlı görülen DNA konformasyonundaki bu değişim DNA demetilasyonu ile ilgili olabilir. Çünkü metilenmiş formda Z DNA miktarındaki azalma strese bağlı metilasyonun azaldığını göstermektedir ki, kuraklık stresine dayanıklı buğdayda demetilasyonun daha yüksek olduğu Kaur *et al.* (2018) tarafından da gösterilmiştir. Diğer taraftan kuraklığa toleranslı genotiplerde HA ve ABA uygulamasında görülen Z DNA miktarındaki artış, kuraklığa hassas genotiplere göre DNA konformasyonunu daha farklı bir mekanizma ile etkilediklerini göstermektedir.

Kalitatif spektral analiz sonuçları, kuraklık stresi HA ve ABA uygulamasının kuraklığa hassas ve toleranslı genotiplerin DNA'larında farklı şekilde konformasyonel değişimlere neden olduğunu göstermektedir. Söz konusu sonuçların karakteristik DNA bantlarının bant sinyal şiddeti ve oranları gibi kantitatif spektral analizlerle doğrulanması gerekmektedir.



**Şekil 4.40.** Aksel 2000 genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000 cm<sup>-1</sup> spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar



**Şekil 4.41.** Kırkpınar 79 genotipinde, kontrol, -6 bar PEG6000, -8 bar PEG6000, HA, HA+ -6bar PEG6000, HA+ -8bar PEG6000, ABA, ABA+ -6bar PEG6000, ABA+ -8bar PEG6000 gruplarına ait 1260-1000  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde ikincil türevi alınıp vektör normalizasyonu uygulanmış spektrumlar

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlardan yola çıkarak ileride yapılacak çalışmalara yönelik öneriler aşağıda belirtilmiştir.

1. Araştırmamızda orta ve yüksek şiddette kuraklık stresi uygulamalarının belirlediğimiz toleranslı (Aksel 2000 ve Kırkpınar 79) ve hassas genotiplerde (Atlı 2002 ve Kırmızı Kılçık) bazı biyokimyasal parametrelerden MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TAS ve TOS durumlarını olumsuz yönde etkilediği, stresin özellikle hassas genotiplerde hücre membranında hasarın belirleyicisi olan lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesinde hasarlara yol açtığı belirlenmiştir. Stres süresince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin sinyal görevi üstlendiği, TOS miktarında artışın görüldüğü ve bitkinin koruma mekanizması olarak TAS miktarını artırdığı belirlenmiştir. Stresin oluşturduğu bu etkilerin özellikle toleranslı genotiplerde ABA ve HA uygulamaları ile iyileştirilebildiği, HA'nın bitkide çeşitli yapısal ve fonksiyonel mekanizmalarda sinyal düzenlemesi yaparak ABA ile yarışır nitelikte iyileştirici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

2. Sal1 ve Era1 genlerinin toleranslı ve hassas genotiplerde ifade durumlarının farklı olmasından ötürü, sadece stres uygulaması yapılarak fizyolojik bir ön eleme ile belirlenen toleranslı ve hassas genotipleri ayırt etmede geleneksel yöntemlerin yanısıra, gen düzeyinde bu genlerin ifade düzeylerine bakılarak daha etkin bir eleme yapılabileceği önerilebilir.

3. Posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonlarını düzenlemede rol alan miRNA'ların hedef bölgelerinin stres şartlarında duruma göre up/downregüle olmalarında miRNA'ların genlerin ifadesini baskılayarak ya da artırarak dolaylı yoldan gen ifadesinin değiştirilebileceği önerilebilir.

4. Humik asitin gerek biyokimyasal parametreler gerekse DNA tiplerinde ve genler üzerine olan etkisinin ABA ile neredeyse eş değerde, bazı durumlarda ise daha etkin görev yaptığı belirlenmiştir. Araştırmamızda yapraktan uyguladığımız humik asitin

bitkiler tarafından köklerden alınması ekolojik olarak daha uygun iken, yapraklardan uygulanabilirliği daha zor olmakla birlikte strese karşı iyileştirici etkileri göz önüne alındığında bu şekilde bir uygulamanın yapılması kaçınılmaz olmaktadır.

5. Araştırmamızda tüm analizler göz önüne alındığında hem kök hem yaprak dokularında en toleranslı genotipin Aksel 2000, en hassas genotipin ise Kırmızı Kılçık olduğu belirlenmiştir. Böylece ileride yapılabilir stres toleransı çalışmalarında kullanılabilir buğday genotipleri belirlenmiştir. Ayrıca toleranslı genotipler ile yapılacak olan tarla denemelerinde doğal şartlarda oluşan kuraklık stresine karşı humik asitin yapraktan uygulamasının strese toleranslı buğday yetiştirilmesinde etkin olacağı tespit edilmiştir.

**KAYNAKLAR**

- Abdel Ghany, S.E. and Pilon, M., 2008. MicroRNA-mediated systemic downregulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 15932-15945.
- Abdelaal, K.A., Hafez, Y.M., El Sabagh, A. and Saneoka, H., 2017. Ameliorative effects of abscisic acid and yeast on morpho-physiological and yield characteristics of maize plant (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(12), 7372-7383.
- Abiri, R., Shaharuddin, N.A., Maziah, M., Yusof, Z.N.B., Atabaki, N., Sahebi, M. and Hanafi, M.M., 2017. Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 134, 33-44.
- Addo Quaye, C., Eshoo, T.W., Bartel, D.P. and Axtell, M.J., 2008. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Current Biology*, 18(10), 758-762.
- Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. and Galili, G., 2003. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell*, 15, 439-447.
- Akdogan, G., Tufekci, E.D., Uranbey, S. and Unver, T., 2016. miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, 16(3), 221-233.
- Akıncı, Ş. 2017. Humik Asitlerin Stres Altındaki Bitkilerin Büyümesine ve Besleyicilerin Alınmasına Etkileri I: Tuzluluk. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 29(4), 137-150.
- Al Ghamdi, A.A., 2009. Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(1), 7-12.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjøvall Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. and Kjellbom, P., 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 59, 469-484.
- Allen, G.J., Murata, Y., Chu, S.P., Nafisi, M., Schroeder, J.I., 2002. Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the Arabidopsis farnesyltransferase mutant era1-2. *Plant Cell*, 14, 1649-1662.
- Alptekin, B., Langridge, P. and Budak, H., 2017. Abiotic stress miRNomes in the Triticeae. *Functional and Integrative Genomics*, 17, 145-170.
- Anonim, 2018. FAO web sitesi. <http://fao.org/publications/save-and-grow/maize...wheat/en>. (14.08.2018).
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-De, M.G. Savoure, A., 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia and Plantarum*, 120, 442-450.
- Aroca, R., Ferrante, A., Vernieri, P. and Chrispeels, M.J., 2006. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression

- and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany*, 98(6), 1301-1310.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H., 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 15, 2730-2741.
- Ay, F., 2014. Hümik asit ve hümik asit kaynaklarının jeolojik ve ekonomik önemi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi (CFD)*, 36, 1.
- Aydin, A., Kant, C. and Turan, M., 2012. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 1073-1086.
- Behnamnia, M., Kalantari, K.M. and Ziaie, J., 2009. The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. *Turkish Journal of Botany*, 33, 417-428.
- Bej, S. and Basak, J., 2014. MicroRNAs: the potential biomarkers in plant stress response. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 748-759.
- Berbara, R.L. and García, A.C., 2014. Humic substances and plant defense metabolism. In *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment* (pp. 297-319). Springer, New York, NY.
- Berthet, S., Thevenin, J., Baratiny, D., Demont-Caulet, N., Debeaujon, I., Bidzinski, P. and Lapierre, C., 2012. Role of plant laccases in lignin polymerization. In *Advances in Botanical Research*, 61, 145-172.
- Bhagi, P., Zhawar, V. K. and Gupta, A.K., 2013. Antioxidant response and *Lea* genes expression under salt stress and combined salt plus water stress in two wheat cultivars contrasting in drought tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 746-757.
- Blomster, T., Salojärvi, J., Sipari, N., Brosché, M., Ahlfors, R., Keinä, M. and Kangasjärvi, J., 2011. Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 157, 1866-1883.
- Bodner, G., Nakhforoosh, A. and Kaul, H.P., 2015. Management of crop water under drought: a review. *Agronomic and Sustainable Development*, 35, 401-442.
- Botha, A.M., Kunert, K.J. and Cullis, C.A., 2017. Cysteine proteases and wheat (*Triticum aestivum* L) under drought: A still greatly unexplored association. *Plant, Cell and Environment*, 40(9), 1679-1690.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.T., Sorieul, M., van den Dries, N. and Maurel, C., 2005. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*, 139, 790-805.
- Budak, H., Kantar, M. and Kurtoglu, K.Y., 2013. Drought tolerance in modern and wild wheat. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-16.
- Burkhead, J.L., Reynolds, K.A., Abdel Ghany, S.E., Cohu, C.M. and Pilon, M., 2009. Copper homeostasis. *New Phytology*, 182, 799-816.
- Buyukkeskin, T., Akinci, S. and Eroglu, A.E., 2014. The effects of humic acid on root development and nutrient uptake of *Vicia faba* L. (Broad Bean) seedlings grown under aluminum toxicity. *Communication of Soil Science and Plant Analysis*, 46, 277-292.
- Callis, J., 1995. Regulation of protein degradation. *The Plant Cell*, 7(7), 845.

- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P. and Piccolo, A., 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Science Horticulture*, 196, 15-27.
- Carletti, P., Masi, A., Spolaore, B., De Laureto, P.P., De Zorzi, M., Turetta, L. and Nardi, S., 2008. Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *Journal of chemical ecology*, 34(6), 804.
- Casacuberta, E. and Gonzalez, J., 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology*, 22, 1503-1517.
- Cech, T.R. and Steitz, J.A., 2014. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 157, 77-94.
- Chan, K.X., Mabbitt, P.D., Phua, S.Y., Mueller, J.W., Nisar, N., Gigolashvili, T., and Jackson, C.J., 2016. Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplasts by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(31), 4567-4576.
- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., Vazquez, F., Zhang, W. and Jin, H., 2010. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Research*, 38, 6883-6894.
- Chen, H., Zhang, B., Hicks, L.M. and Xiong, L., 2011. A nucleotide metabolite controls stress-responsive gene expression and plant development. *Plos One*, 6: e26661.
- Chen, X., 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 303, 2022-2025.
- Cheng, T.F., Choudhuri, S. and Muldoon Jacobs, K., 2012. Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 643-653.
- Choi, H.I., Hong, J.H., Ha, J.O., Kang, J.Y. and Kim, S.Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1723-1730.
- Chu, C.C., Lee, W.C., Guo, W.Y., Pan, S.M., Chen, L.J., Li, H.M. and Jinn, T.L., 2005. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1), 425-436.
- Chuang, J.C. and Jones, P.A., 2007. Epigenetics and microRNAs. *Pediatric Research*, 61, 24-29.
- Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E. and Cardarelli, M., 2014. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers of Plant Science*, 5.
- Cordeiro, F.C., Santa-Catarina, C., Silveira, V. And Souza, S.R.D., 2011. Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75, 70-74.
- Correa de Souza, T., Magalhaes, P.C., Mauro de Castro, E., Carneiro, N.P., Padilha, F.A. and Junior, C.C.G., 2014. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. *Plant Growth Regulation*, 73, 205–217.
- Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L., 2010. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environment*, 33, 481-489.

- Cui, X.H., Hao, F.S., Chen, H., Chen, J. and Wang, X.C., 2008. Expression of the *Vicia faba* VfPIP1 gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *Journal of Plant Research*, 121(2), 207-214.
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S. and McCourt, P., 1996. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science*, 273, 1239-1240.
- Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E. and Alvino, A., 2005. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agronomy for sustainable Development*, 25(2), 183-191.
- Dempsey, D.A. and Klessig, D.F., 1995. Signals in plant disease resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 93, 167-186.
- Dhanda, S.S., Sethi, G.S. and Behl, R.K., 2004. Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190(1), 6-12.
- Dhaubhadel, S., Chaudhary S., Dobinson K.F. and Krishna P., 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Molecular Biology*, 40, 333-342.
- Divi, U.K. and Krishna, P., 2009. Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology*, 26(3-4), 131-136.
- Donetta, D., Bayliss, P., Sun, S., Sage, T. and McCourt, P., 2000. Farnesylation is involved in meristem organization in *Arabidopsis*. *Planta*, 211, 182-190.
- Dong, C.J. and Liu, J.Y., 2010. The *Arabidopsis* EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC Plant Biology*, 10, 47.
- Dong, Z., Liu, H. and Yang, X., 2018. Effects of drought stress on some physiological and biochemical indexes of wheat seedlings. *Asian Journal of Botany*, 1(1), 11-19.
- Dugas, D. and Bartel, B., 2008. Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Molecular Biology*, 67, 403-417.
- Dumat, B., Larsen, A. F. and Wilhelmsson, L.M., 2016. Studying Z-DNA and B-to Z-DNA transitions using a cytosine analogue FRET-pair. *Nucleic Acids Research*, 44(11), 1-10.
- Eisenbarth, D.A. and Weig, A.R., 2005. Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1831-1842.
- Eldem, V., Akcay, U.C., Ozhuner, E., Bakir, Y., Uranbey, S. and Unver, T., 2012. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by highthroughput deep sequencing. *Plos One*, 7, 14.
- Eldem, V., Okay, S. and Unver, T., 2013. PlantmicroRNAs: new players in functional genomics. *Turkish Journal of Agricultural Forestry*, 37, 1-21.
- Ergun, N., Ozcubukcu, S., Kolukirik, M. and Temizkan, O., 2014. Effects of temperature heavy metal interactions, antioxidant enzyme activity and gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica*, 65(4), 439-50.
- Estavillo, G.M., Crisp, P.A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E. and

- Pogson, B.J., 2011. Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23, 3992-4012.
- Fan, L., Linker, R., Gepstein, S., Tanimoto, E., Yamamoto, R. and Neumann, P.M., 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology*, 140(2), 603-612.
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Chalkoo, S., Hayat, S. and Ahmad, A., 2011. 28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress. *Photosynthetica*, 49(1), 55-64.
- Fujita, Y., Yoshida, T. and Yamaguchi Shinozaki, K., 2013. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 147, 15-27.
- Fukayama, H., Abe, R., Uchida, N., 2010. SDS-dependent proteases induced by ABA and its relation to Rubisco and Rubisco activase contents in rice leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 808-812.
- Galmes, J., Pou, A., Alsina, M.M., Tomas, M., Medrano, H. and Flexas, J., 2007. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis sp.*): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 226, 671-681.
- Gao, Y.P., Young, L., Bonham Smith, P. and Gusta, L.V., 1999. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Molecular Biology*, 40, 635-644.
- Gao, Z., He, X., Zhao, B., Zhou, C., Liang, Y., Ge, R. and Huang, Z., 2010. Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, TaNIP, enhances salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 51(5), 767-775.
- Garcia, A.C., Berbara, R.L.L., Fariás, L.P., Izquierdo, F.G., Hernández, O.L., Campos, R.H. and Castro, R.N., 2012. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology*, 11, 3125-3134.
- Garcia, A.C., Olaetxea, M., Santos, L.A., Mora, V., Baigorri, R., Fuentes, M., Zammareno, A.M., Berbera, R.L.L. and Garcia Mina, J.M., 2016. Involvement of hormone-and ROS-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. *BioMed Research International*, Article ID. 3747501,1-13.
- Gasparic, M.B., Lenassi, M., Gostinčar, C., Rotter, A., Plemenitaš, A., Gunde-Cimerman, N. and Žel, J., 2013. Insertion of a specific fungal 3'-phosphoadenosine-5'-phosphatase motif into a plant homologue improves halotolerance and drought tolerance of plants. *Plos One*, 8(12), e81872.
- Gavnholt, B. and Larsen, K., 2002. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiologia Plantarum*, 116, 273-280.
- German, M.A., Pillay, M., Jeong, D.H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P., Kannan, V., Rymarquis, L.A., Nobuta, K., German, R., De Paoli, E., Lu, C., Schroth, G., Meyers, B.C. and Green, P.J., 2008. Global identification of microRNA-target

- RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *National Biotechnology*, 26(8), 941-946.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Drought tolerance in wheat the scientific world journal. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- González, V.M., Fuertes, M.A., Pérez, J.M. and Alonso, C., 1998. Kinetics of the salt-induced B-to Z-DNA transition. *European biophysics journal*, 27(4), 417-423.
- Goritschnig, S., Weihmann, T., Zhang, Y., Fobert, P., McCourt, P. and Li, X., 2008. A novel role for protein farnesylation in plant innate immunity. *Plant Physiology*, 148(1), 348-357.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481.
- Grudkowska, M. and Zagdanska, B., 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51, 609-624.
- Guan, L.M., Zhao, J. and Scandalios, J.G., 2000. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal*, 22, 87-95.
- Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R. and Quatrano, R.S., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250, 267-271.
- Guo, Z., Ou, W.Z., Lu, S.Y. and Zhong, Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11-12), 828-836.
- Guóth, A., Tari, I., Gallé, Á., Csiszár, J., Pécsváradi, A., Cseuz, L. and Erdei, L., 2009. Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grainfilling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels and grain yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 167-73.
- Gupta, A.S., Webb, R.P., Holaday, A.S. and Allen, R.D., 1993. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiology*, 103(4), 1067-1073.
- Gy, I., Gascioli, V., Laressergues, D., Morel, J.B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H. and Mallory, A.C., 2007. Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *Plant Cell*, 19, 3451-3461.
- Hajyzadeh, M., Turktas, M., Khawar, K.M. and Unver, T., 2015. miR408 overexpression causes increased drought tolerance in chickpea. *Gene*, 555, 186-193.
- Hasheminasab, H., Assad, M.T., Aliakbari, A. and Sakhafi, S.R., 2012. Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Journal of Agricultural Science*, 4(8), 20.
- Hattori, T., Terada, T. and Hamasuna, S., 1995. Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *The Plant Journal*, 7(6), 913-925.
- Hayes, M.H.B., 2006. Solvent systems for the isolation of organic components from soils. *Soil Science Society of America Journal*, 70, 986-994.

- He, X., Hou, X., Shen, Y. and Huang, Z., 2011. TaSRG, a wheat transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic rice and Arabidopsis. *FEBS Letters* 585, 1231-1237.
- Henzler, T., Ye, Q. and Steudle, E., 2004. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in Chara by hydroxyl radicals. *Plant, Cell and Environment*, 27, 1184-1195.
- Hernández, R., García, A., Portuondo, L., Muñiz, S., Berbara, R. and Izquierdo, F., 2012. Protección antioxidativa de los ácidos húmicos extraídos de vermicompost en arroz (*Oryza sativa* L.) var. IACuba30. *Revista de Protección Vegetal*, 27, 102-110.
- Hieng, B., Ugrinovic, K., Sustar-Vozlic, J. and Kidric, M., 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology*, 161(5), 519-530.
- Hirsch, J., Misson, J., Crisp, P.A., David, P., Bayle, V., Estavillo, G.M., Javot, H., Chiarenza, S., Mallory, A.C., Maizel, A., Declerck, M., Pogson, B.J., Vaucheret, H., Crespi, M., Desnos, T., Thibaud, M.C., Nussaume, L. and Marin, E., 2011. A novel fry1 allele reveals the existence of a mutant phenotype unrelated to 5'->3' exoribonuclease (XRN) activities in Arabidopsis thaliana roots. *Plos One*, 6, e16724.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ. Berkeley, CA.*, 347-353.
- Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y. and Hattori, T., 1999. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6), 679-689.
- Hoekstra, A.Y. and Mekonnen, M.M., 2011. The water footprint of humanity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 3232-3237.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. and Xiong, L., 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12987-12992.
- Hu, W., Yuan, Q., Wang, Y., Cai, R., Deng, X., Wang, J. and Ma, Z., 2012. Overexpression of a wheat aquaporin gene, TaAQP8, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 53(12), 2127-2141.
- Hu, X., Jiang, M., Zhang, A. and Lu, J., 2005. Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*, 223(1), 57.
- Huang, A.X., Sheb, X.P., Zhang, Y.Y and Zhao, J.L., 2013. Cytosolic acidification precedes nitric oxide removal during inhibition of ABA induced stomatal closure by fusicoccin. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60, 60-68.
- Huang, S.Q., Peng, J., Qiu, C.X. and Yang, Z.M., 2009. Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 282-287.
- Huang, X.Y., Chao, D.Y., Gao, J.P., Zhu, M.A., Shi, M. and Lin H.X., 2009. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes and Development*, 23, 1805-1817.

- Huat, C.B., Nadarajah, K. and Ratnam, W., 2014. Identification of drought-responsive microRNAs in leaf and stem tissues of *Oryza sativa* by Solexa sequencing. In AIP Conference Proceedings, 1614(1), 587-590.
- Hugouvieux, V., Murata, Y., Young, J.J., Kwak, J.M., Mackesy, D.Z. and Schroeder, J.I., 2002. Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiology*, 130(3), 1276-1287.
- Huijser, P. and Schmid, P., 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138, 4117-4129.
- Hwang, E.W., Shin, S.J., Park, S.C., Jeong, M. J. and Kwon, H.B., 2011. Identification of miR172 family members and their putative targets responding to drought stress in *Solanum tuberosum*. *Genes and Genomics*, 33(2), 105-110.
- Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S. and Kang, H., 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54, 713-725.
- Jarosova, M., Klejdus, B., Kovacik, J., Babula, P. and Hedbavny, J., 2016. Humic acid protects barley against salinity. *Acta Physiologia Plantarum*, 38(6), 161.
- Jia, X., Wang, W.X., Ren, L., Chen, X.J., Mendu, V., Willcut, B., Dinkins, R., Tang, X. and Tang, G., 2009. Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 71, 51-59.
- Jiang, M. and Zhang, J., 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2401-2410.
- Jindo, K., Martim, S.A., Navarro, E.C., Pérez Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C., Aguiar, N.O. and Canellas, L.P., 2012. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil* 353, 209-220.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. and Kjellbom, P., 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 324-342.
- Jones Rhoades, M.J. and Bartel, D.P., 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress induced miRNA. *Molecular Cell*, 14, 787-799.
- Jones Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 19-53.
- Kabir, A. and Kumar, G.S., 2013. Binding of the biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction. *Plos One*, 8(7), e70510.
- Kalefetoğlu, T. and Ekmekçi, Y., 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.U. Journal of Science*, 18 (4), 723-740.
- Kamran, R.V., Toorchi, M., Moghadam, M. and Mohammadi, H., 2015. The effect of cold stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA contents in barely genotypes. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 7(3), 66-75.

- Kantar, M., Unver, T. and Budak, H., 2010. Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Functional and Integrative Genomics*, 10(4), 493-507.
- Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjoval, S., Johansson, I., Hedfalk, K., Engel, A. and Kjellbom, P., 2003. Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 537, 68-72.
- Kaur, A., Grewal, A. and Sharma, P., 2018. Comparative analysis of DNA methylation changes in two contrasting wheat genotypes under water deficit. *Biologia Plantarum*, 62(3), 471-478.
- Kaur, A., Gupta, O.P., Meena, N.L., Grewal, A. and Sharma, P., 2017. Comparative temporal expression analysis of MicroRNAs and their target genes in contrasting wheat genotypes during osmotic stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(2), 613-626.
- Kaur, M., Gupta, A.K. and Zhawar, V.K., 2014. Antioxidant response and Lea genes expression under exogenous ABA and water deficit stress in wheat cultivars contrasting in drought tolerance. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(1), 18-30.
- Khan, S., Bano, A., Uddin, J. and Gurmani, A.R., 2012. Abscisic acid and salicylic acid seed treatment as potent inducer of drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 44, 43-49.
- Khanna Chopra, R., Srivalli, B. and Ahlawat, Y.S., 1999. Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 255(2), 324-327.
- Kidrič, M., Kos, J. Sabotič, J., 2014. Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Serbica*, 38(1), 139-158.
- Kim, J.H., Choi, D. and Kende, H., 2003. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant Journal*, 36, 94-104.
- Kim, J.S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K. and Yoshizumi, T., 2012. Arabidopsis GROWTH-REGULATING FACTOR7 Functions as a Transcriptional Repressor of Abscisic Acid-and Osmotic Stress-Responsive Genes, Including DREB2A. *The Plant Cell*, 24, 3393-3405.
- Koizumi, M., Yamaguchi Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K., 1993. Structure and expression of two genes that encode distinct drought inducible cysteine proteases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 129, 175-182.
- Kumar, D., Singh, D., Kanodia, P., Prabhu, K.V., Kumar, M. and Mukhopadhyay, K., 2014. Discovery of novel leaf rust responsive microRNAs in wheat and prediction of their target genes. *Journal of Nucleic Acids*, 570176.
- Kurihara, Y., 2017. Activity and roles of Arabidopsis thaliana XRN family exoribonucleases in noncoding RNA pathways. *Journal of Plant Research*, 130(1), 25-31.
- Le Roy, J., Blervacq, A.S., Créach, A., Huss, B., Hawkins, S. and Neutelings, G., 2017. Spatial regulation of monolignol biosynthesis and laccase genes control developmental and stress-related lignin in flax. *BMC Plant Biology*, 17(1), 124.
- Leonard, R. and Hodges, T., 1973. Characterization of plasma membrane-associated adenosine triphosphase activity of oat roots. *Plant Physiology*, 52, 6-12.

- Li, B., Qin, Y., Duan, H., Yin, W. and Xia, X., 2011. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3765-3779.
- Li, D., Luo, Z., Mou, W., Wang, Y., Ying, T. and Mao, L., 2014. ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 90, 56-62.
- Li, G.W., Peng, Y.H., Yu, X., Zhang, M.H., Cai, W.M., Sun, W.N. and Su, W.A., 2008. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1879-1888.
- Li, L., Ren, J. and Qu, B., 2005. Effects of water stress on active oxygen metabolism in apple leaves. *Sciences*, 30(6), 58-60.
- Li, T., Li, H., Zhang, Y.X. and Liu, J.Y., 2010. Identification and analysis of seven HO-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Nucleic Acids Research*, 39, 2821-2833.
- Li, W., Cui, X., Meng, Z., Huang, X., Xie, Q., Wu, H., 2012. Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and argonaute1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiology*, 158, 1279-1292.
- Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H. and Zhu, J.K., 2008. The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell*, 20(8), 2238-2251.
- Li, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W. And Jiang, D., 2014. Exogenous abscisic acid application during grain filling in winter wheat improves cold tolerance of offspring's seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6), 467-478.
- Li, Y.F., Zheng, Y., Addo Quaye, C., Zhang, L., Saini, A., Jagadeeswaran, G., Axtell, M.J., Zhang, W. and Sunkar, R., 2010. Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant Journal*, 62(5), 742-759.
- Lian, H.L., Yu, X., Lane, D., Sun, W.N. and Tang, Z.C., 2006. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell Research*, 16, 651-660.
- Liang, G., Ai, Q. and Yu, D., 2015. Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 5, 11813.
- Liang, G., He, H., Li, Y., Wang, F. and Yu, D., 2013. Molecular mechanism of miR39 mediating pistil development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Preview*, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.225144>.
- Liu, D., Song, Y., Chen, Z. and Yu, D., 2009. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum*, 136, 223-236.
- Liu, H., Able, A.J. and Able, J.A., 2016. Water-deficit stress-responsive microRNAs and their targets in four durum wheat genotypes. *Functional and Integrative Genomics*, 1-15.
- Liu, H., Searle, I.R., Watson Haigh, N.S., Baumann, U., Mather, D.E., Able, A.J. and Able, J.A., 2015. Genome-wide identification of microRNAs in leaves and the developing head of four durum genotypes during water deficit stress. *Plos One*, 10: e0142799.

- Liu, H., Zhang, Y.H., Yin, H., Wang, W.X., Zhao, X.M. and Du, Y.G., 2013. Alginate oligosaccharides enhanced *Triticum aestivum* L. tolerance to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 33-40.
- Liu, S., Lv, Z., Liu, Y., Li, L. and Zhang, L., 2018. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), 624-637.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lu, S., Sun, Y.H., Shi, R., Clark, C., Li, L. and Chiang, V.L., 2005. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 2186-2203.
- Lu, X.Y. and Huang, X.L., 2008. Plant miRNAs and abiotic stress responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 458-462.
- Ma, C., Burd, S. and Lers, A., 2015. miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 84, 169-187.
- Ma, X.L., Cui, W.N., Zhao, Q., Zhao, J., Hou, X.N., Li, D.Y. and Huang, Z.J., 2016. Functional study of a salt-inducible TaSR gene in *Triticum aestivum*. *Physiologia plantarum*, 156(1), 40-53.
- Madhava, R.K.V. and Sresty, T.V.S., 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157, 113-12.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T. and Katsuhara, M., 2008. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiology*, 49(5), 801-813.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Bartel, B., 2005. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, 17, 1360-1375.
- Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N. and Lapitan, N., 2013. Virus induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 64, 1381-1392.
- Mariaux, J.B., Bockel, C., Salamini, F. and Bartels, D., 1998. Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology*, 38, 1089-1099.
- Martin, F., 1975. Humic acids from lignite analytical characteristics and thermal degradation. *Fuel*, 54, 236-240.
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G., Nobel, P. and Chrispeels, M., 2002. Plasma membrane aquaporin play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*, 130, 2101-2110.
- Masatoshi, U., Satoshi, T., Hitoshi, M., Yoshimi, S. and Yuzo, S., 2007. Characterization of cysteine protease induced by oxidative stress in cells of *Chlamydomonas* sp. strain W80; *Physiologia Plantarum*, 131, 519-526.

- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T. and Santoni, V., 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Reviews of Plant Biology*, 59, 595-624.
- Michel, B.E. and Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiologia*, 51, 914-916.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mohammadi, H. and Moradi, F., 2016. Effects of growth regulators on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in leaves of two contrasting wheat cultivars under water stress. *Brazilian Journal of Botany*, 39(2), 495-505.
- Mora, V., Olaetxea, M., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarreño, A.M. and Garcia Mina, J.M., 2014. Abiotic stress tolerance in plants: exploring the role of nitric oxide and humic substances. In *Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology*. Springer, Cham. 243-264.
- Morris, K.V. and Mattick, J.S., 2014. The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics*, 15, 423-437.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C. and Mazzafera, P., 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4), 360-376.
- Moussa, H.R. and AbdelAziz, S.M., 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1(1), 31-36.
- Munne Bosch, S. and Alegre, L., 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31, 203-216.
- Mutum, R.D., Balyan, S.C., Kansal, S., Agarwal, P., Kumar, S., Kumar, M. and Raghuvanshi, S., 2013. Evolution of variety-specific regulatory schema for expression of osa-miR408 in indica rice varieties under drought stress. *The FEBS journal*, 280(7), 1717-1730.
- Nardi, S., Concheri, G. and Dell'Agnola, G., 1996. Biological activity of humus, Chapter 2, Humic substances in terrestrial ecosystems. Elsevier Press Italy, 361-406.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. and Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology Biochemistry*, 34, 1527-1536.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34(2), 137-148.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J.D.G., 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312, 436-439.
- Nemoto, Y. and Sasakuma, T., 2002. Differential stress responses of early salt-stress responding genes in common wheat. *Phytochemistry*, 61(2), 129-133.
- Nezhadahmadi, A., Prodhan, Z. H. and Faruq, G., 2013. Drought tolerance in wheat the scientific world journal. Hindawi Publishing Corporation, 1-12.

- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. and Foyer, C.H., 2000. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 355, 1465-1475.
- O'Malley, D.M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.L. and Sederoff, R.R., 1993. The role of laccase in lignification. *Plant Journal*, 4, 751-757.
- Oeda, K., Salinas, J. and Chua, N.H., 1991. A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes. *The EMBO Journal*, 10(7), 1793-1802.
- Ogata, T., Nagatoshi, Y., Yamagishi, N., Yoshikawa, N. and Fujita, Y., 2017. Virus-induced down-regulation of GmERA1A and GmERA1B genes enhances the stomatal response to abscisic acid and drought resistance in soybean. *Plos One*, 12 (4), e0175650.
- Olaetxea, M., Mora, V., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Garnica, M., Fuentes, M. and Ederra, I., 2015. ABA-regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene-expression is crucial to the plant shoot rise caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiology*, 169, 2587-2596.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Tran, L.S.P., 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 86.
- Ozfidan Konakci, C., Yildiztugay, E., Bahtiyar, M. and Kucukoduk, M., 2018. The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 155, 66-75.
- Pan, Y., Seymour, G.B., Lu, C., Hu, Z., Chen, X. and Chen, G., 2012. An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Reports*, 31(2), 349-360.
- Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Li, L. and Luan, S., 2005. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(3), 1185-1193.
- Pantin, F., Monnet, F., Jannaud, D., Costa, J.M., Renaud, J., Muller, B., Simonneau, T. and Genty, B., 2013. The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytologist*, 197(1), 65-72.
- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F. and Tardieu F. 2009. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiology*, 149, 2000-2012.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12, 1484-1495.
- Paul, S., Gayen, D., Datta, S.K. and Datta, K., 2016. Analysis of high iron rice lines reveals new miRNAs that target iron transporters in roots. *Journal of Experimental Botany*, 67, 5811-5824.
- Pei, Z.M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P. and Schroeder, J.I., 1998. Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* 282, 287-290.

- Peng, Y., Arora, R., Li, G., Wang, X. and Fessehaie, A., 2008. *Rhododendron catawbiense* plasma membrane intrinsic proteins are aquaporins, and their over-expression compromises constitutive freezing tolerance and cold acclimation ability of transgenic Arabidopsis plants. *Plant, Cell and Environment*, 31(9), 1275-1289.
- Perl, A., Perl Treves, R., Galili, S., Aviv, D., Shalgi, E., Malkin, S. and Galun, E., 1993. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 560-576.
- Piccolo, A., Conte, P. and Saccomandi, F., 1996. Interactions of different classes of herbicides with humic substances from European soils under monocultures and in a climate gradient. *Environmental Fate Xenobiotics*, 239-244.
- Popova, L.P., Tsonev, T.D., Lazova, G.N. and Stoinova, Z.G., 1996. Drought-and ABA-induced changes in photosynthesis of barley plants. *Physiologia Plantarum*, 96(4), 623-629.
- Poret, M., Chandrasekar, B., van der Hoorn, R.A., Coquet, L., Jouenne, T. and Avice, J.C., 2017. Proteomic investigations of proteases involved in cotyledon senescence: a model to explore the genotypic variability of proteolysis machinery associated with nitrogen remobilization efficiency during the leaf senescence of oilseed rape. *Proteomes*, 5(4), 1-18.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L. and Debeaujon, I., 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29-36.
- Praba, M.L., Cairns, J.E., Babu, R.C. and Lafitte, H.R., 2009. Identification of physiological traits underlying cultivar differences in drought tolerance in rice and wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195, 30-46.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V. and Nardi, S., 2004. Effect of low molecular size humic substances on the expression of genes involved in nitrate transport and reduction in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55, 803-813.
- Quigley, F., Rosenberg, J., Shachar Hill, Y. and Bohnert, H., 2001. From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome Biology*, 3(1), 1-17.
- Quintero, F.J., Garcíadeblas, B. and Rodríguez Navarro, A., 1996. The SAL1 gene of Arabidopsis, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* 8, 529-537.
- Ramos, A.C., Dobbss, L.B., Santos, L.A., Fernandes, M.S., Olivares, F.L., Aguiar, N. O., and Canellas, L.P., 2015. Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2(1), 3.
- Rana, V., Ram, S., Nehra, K. and Sharma, I., 2015. Differential expression analysis of salt stress related genes TaSRG and TaRUB1 in contrasting wheat genotypes. *Journal of Wheat Research*, 7(1), 71-73.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G. and di Toppi, L.S., 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(1), 45-54.

- Ren, J., Sun, L.N., Zhang, Q.Y. and Song, X.S., 2016. Drought tolerance is correlated with the activity of antioxidant enzymes in *Cerasus humilis* seedlings. *BioMed Research International*, Article ID 9851095, 1-9.
- Renu, K.C. and Devarshi, S., 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistance than susceptible wheat cultivars under field conditions. *Journal of Experimental Botany*, 60, 276-283.
- Robles, P., Fleury, D., Candela, H., Cnops, G., Alonso Peral, M.M., Anami, S., Falcone, A., Caldana, C., Willmitzer, L., Ponce, M.R., Lijsebettens, M.V. and Micol, J.L., 2010. The RON1/FRY1/SAL1 gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 152, 1357-1372.
- Rodriguez, V.M., Chetelat, A., Majcherczyk, P. and Farmer, E.E., 2010. Chloroplastic phosphoadenosine phosphosulfate metabolism regulates basal levels of the prohormone jasmonic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiology*, 152, 1335-1345.
- Rogers, K. and Chen, X., 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25, 2383-2399.
- Rossel, J.B., Walter, P.B., Hendrickson, L., Chow, W.S., Poole, A., Mullineaux, P.M. and Pogson, B.J., 2006. A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant Cell Environment*, 29, 269-281.
- Roychoudhury, A., Paul, S. and Basu, S., 2013. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 32(7), 985-1006.
- Ruiz-Herrera, J., Ruiz-Medrano, R., Dominguez, A., 1995. Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines. *FEBS Letters*, 357, 192-196.
- Russell, L., Stokes, A.R., Macdonald, H., Muscolo, A. and Nardi, S., 2006. Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. *Plant Soil*, 283, 175-185.
- Sade, N., Gebretsadik, M., Seligmann, R., Schwartz, A., Wallach, R. and Moshelion, M., 2010. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiology*, 152(1), 245-254.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Agarwal, S. and Meena, R.C., 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49(1), 85.
- Shah, Z.H., Rehman, H.M., Akhtar, T., Alsamadany, H., Hamooh, B.T., Mujtaba, T., Daur, I., Zahrani, Y.A., Alzaharani, H.A.S., Ali, S., Yang, S.H. and Chung, G., 2018. Humic substances: determining potential molecular regulatory processes in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9(263), 1-12.
- Shahbaz, M. and Ashraf, M., 2007. Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 39(2), 513-522.
- Shamimuzzaman, M. and Vodkin, L., 2012. Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing. *BMC Genomics*, 13, 310.

- Sharma, P. and Dubey, R.S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46(3), 209-221.
- Shen, Q., Zhang, P. and Ho, T.H.D., 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 8, 1107-1119.
- Shen, J., Xie, K. and Xiong, L., 2010. Global expression profiling of rice microRNAs by one-tube stem-loop reverse transcription quantitative PCR revealed important roles of microRNAs in abiotic stress responses. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(6), 477-488.
- Shen, Q. and Ho, T.H., 1995. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *The Plant Cell*, 7(3), 295-307.
- Sheteiwy, M.S., Dong, Q., An, J., Song, W., Guan, Y., He, F., Huang, Y. and Hu, J., 2017. Regulation of ZnO nanoparticles-induced physiological and molecular changes by seed priming with humic acid in *Oryza sativa* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 83(1), 27-41.
- Siddiqui, M.H., Al Whaibi, M.H. and Basalah, M.O., 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248, 447-455.
- Siefritz, F., Biela, A., Eckert, M., Otto, B. and Uehlein, N., 2001. The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1953-1957.
- Siefritz, F., Tyree, M., Lovisolo, C., Schubert, A. and Kaldenhoff, R., 2002. PIP1 Plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *The Plant Cell*, 14, 869-876.
- Sies, H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619.
- Simova Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N. and Feller, U., 2008. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environment*, 54(12), 529-536.
- Simova Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K. and Feller, U., 2010. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 200-206.
- Singh, K.B., Foley, R.C. and Oñate Sánchez, L., 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion Plant Biology*, 5(5), 430-436.
- Singh, N. and Bhardwaj, R.D., 2016. Ascorbic acid alleviates water deficit induced growth inhibition in wheat seedlings by modulating levels of endogenous antioxidants. *Biologia*, 71(4), 402-413.
- Singh, P.K. and Campbell, M.J., 2013. The interactions of microRNA and epigenetic modifications in prostate cancer. *Cancer*, 5, 998-1019.
- Sultan, M.A.R.F., Hui, L., Yang, L.J. and Xian, Z.H., 2012. Assessment of drought tolerance of some *Triticum* L. species through physiological indices. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 48(4), 178-184.
- Sunkar, R. and Zhu, J.K., 2004. Novel and stress-regulated micro-RNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 2001-2019.

- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J.H. and Zhu, J.K., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Science*, 12, 301-309.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K. and Zhu, J.K., 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 17, 1397-1411.
- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.
- Surgun, Y., Yilmaz, E., Bekir, Ç.Ö.L. and Bürün, B., 2012. Altıncı Grup Bitki Hormonu: Brassinosteroidler. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 27-46.
- Tahir, M.M., Khurshid, M., Khan, M.Z., Abbasi, M.K. and Kazmi, M.H., 2011. Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. *Pedosphere*, 21, 124-131.
- Taiz, L. and Zeiger E., 2008. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, 690p, USA.
- Tan, M., 2010. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 21-26.
- Temiz, N.A., Donohue, D. E., Bacolla, A., Luke, B. T. and Collins, J.R., 2012. The role of methylation in the intrinsic dynamics of B- and Z-DNA. *Plos One*, 7(4), e35558.
- Tian, S., Wang, X., Li, P., Wang, H., Ji, H., Xie, J. and Dong, H., 2016. Plant aquaporin AtPIP1; 4 links apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction to disease immunity pathways. *Plant Physiology*, 171, 1635-1650.
- Tognetti, V.B., Mühlenbock, P. and van Breusegem F., 2012. Stress homeostasis the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environment*, 35, 321-333.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L., 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion Plant Biology*, 8, 397-403.
- Trindade, I., Capitão, C., Dalmay, T., Fevereiro, M.P. and Dos Santos, D.M., 2010. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231(3), 705-716.
- Turlapati, P.V., Kim, K.W., Davin, L.B. and Lewis, N.G., 2011. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta*, 233(3), 439-470.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi Shinozaki, K., 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 11632-11637.
- Vaccaro, S., Ertani, A., Nebbioso, A., Muscolo, A., Quaggiotti, S., Piccolo, A. and Nardi, S., 2015. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2(1), 5.

- van der Hoorn, R.A. and Jones, J.D., 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion In Plant Biology*, 7(4), 400-407.
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S. and Maggio, A., 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 5.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective roles of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
- Vigneault, B., Percot, A., Lafleur, M. and Campbell, P.G., 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 34(18), 3907-3913.
- Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L. and Zivy, M., 2005. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology*, 137(3), 949-960.
- Visser, S.A., 1982. Acid functional group content of aquatic humic matter: Its dependence upon origin, molecular weight and degree of humification of the material. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 17(6), 767-788.
- Wang, L., Zhang, C., Wang, Y., Wang, Y., Yang, C., Lu, M. and Wang, C., 2018. *Tamarix hispida* aquaporin ThPIP2; 5 confers salt and osmotic stress tolerance to transgenic *Tamarix* and *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 152, 158-166.
- Wang, M., Wang, Q. and Zhang, B., 2013. Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 26-32.
- Wang, Y., Ying, J., Kuzma, M., Chalifoux, M., Sample, A., McArthur, C., Uchacz, T., Sarvas, C., Wan, J., Dennis, D.T., McCourt, P. and Huang, Y., 2005. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant Journal*, 43, 413-424.
- WHO, 2016. Drinking-water fact sheet. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en>. (16.08.2018).
- Wilson, P.B., Estavillo, G.M., Field, K.J., Pornsiriwong, W., Carroll, A.J., Howell, K.A., Woo, N.S., Lake, J.A., Smith, S.M., Harvey Miller, A., von Caemmerer, S. and Pogson, B.J., 2009. The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 58, 299-317.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.W., Weigel, D. and Poethig, R.S., 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138, 750-759.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. and Qi, Y., 2010. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular Cell*, 38, 465-475.
- Wu, Y. and Cosgrove, D.J., 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1543-1553.
- Xi, H., Xu, H., Xu, W., He, Z., Xu, W. and Ma, M., 2016. A SAL1 loss-of-function *Arabidopsis* mutant exhibits enhanced cadmium tolerance in association with alleviation of endoplasmic reticulum stress. *Plant and Cell Physiology*, 57(6), 1210-1219.

- Xiaoliang, He., Xiaona, H., Yin Zhu, S. and Zhanjing Huang, H., 2011. TaSRG, a wheat transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic rice and Arabidopsis. *FEBS Letters*, 585, 1231-1237.
- Xiong, L., Lee, B., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. and Zhu, J.K., 2001. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes Development*, 15, 1971-1984.
- Xiong, L., Lee, H., Huang, R. and Zhu, J.K., 2004. A single amino acid substitution in the Arabidopsis FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. *Plant Journal*, 40, 536-545.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M. and Zhu, J.K., 2002. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 8588-96.
- Yalovsky, S., Kulukian, A., Rodriguez Concepcion, M., Young, C.A. and Grissem, W., 2000. Functional requirement of plant farnesyltransferase during development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12, 1267-1278.
- Yamaguchi Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 2005. Organization of cis acting elements in osmotic and cold stress responsive promoters. *Trends Plant Science*, 10, 88-94.
- Yamasaki, H., Abdel Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. and Pilon, M., 2007. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 16369-16378.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y. and Shikanai, T., 2009. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21, 347-361.
- Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J. and Flowers, T.J., 1991. Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 42, 881-889.
- Yigider, E., Taspinar, M.S., Sigmaz, B., Aydin, M. and Agar, G., 2016. Humic acids protective activity against manganese induced LTR (long terminal repeat) retrotransposon polymorphism and genomic instability effects in *Zea mays*. *Plant Gene*, 6, 13-17.
- Yildirim, N., Agar, G., Taspinar, M. S., Turan, M., Aydin, M. and Arslan, E., 2014. Protective role of humic acids against dicamba-induced genotoxicity and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 64(2), 141-148.
- Yin, H., Chen, C.J., Yang, J., Weston, D.J., Chen, J.G., Muchero, W., Ye, N., Tschaplinski, T.J., Wullschlegel, S.D., Cheng, Z.M., Tuskan, G.A. and Yang, X., 2014. Functional genomics of drought tolerance in bioenergy crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33, 205-224.
- Yordanov, V.V. and Tsonev, T., 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue*, 187-206.
- Zagdanska, B. and Wisniewski, K., 1996. Endoproteinase activities in wheat leaves upon water deficit. *Acta Biochemica Polonica*, 43, 515-519.
- Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Dobbss, L.B., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Binzel, M.L., Okorokova Façanha, A.L. and Façanha, A.R., 2010. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation. *Planta*, 231, 1025-1036.

- Zang, Q.W., Wang, C.X., Li, X.Y., Guo, Z.A., Jing, R.L., Zhao, J. and Chang, X.P., 2010. Isolation and characterization of a gene encoding a polyethylene glycol-induced cysteine protease in common wheat. *Journal of Bioscience*, 35, 379-388.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X. and Tan, M., 2007. Nitric oxide induced hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytology*, 175, 36-50.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M. and Hu, X., 2006. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141, 475-487.
- Zhang, F., Guo, J.K., Yang, Y.L., He, W.L. and Zhang, L.X., 2004. Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(3), 345-352.
- Zhang, H. and Li, L., 2013. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 74(1), 98-109.
- Zhang, J., Vanneste, S., Brewer, P.B., Michniewicz, M., Gronos, P., Kleine-Vehn, J., Löffke, C., Teichmann, T., Bielach, A., Cannoot, B., Hoyerová, K., Chen, X., Xue, H.W., Benková, E., Zažimalová, E. and Friml, J., 2011. Inositol trisphosphate-induced  $Ca^{2+}$  signaling modulates auxin transport and PIN polarity. *Developmental Cell*, 20, 855-866.
- Zhang, J.P., Yu, Y., Feng, Y.Z., Zhou, Y.F., Zhang, F. and Yang, Y.W., 2017. MiR408 regulates grain yield and photosynthesis via a phytoeyanin protein. *Plant Physiology*, 175.
- Zhang, L., Peng, J., Chen, T.T., Zhao, X.H., Zhang, S.P., Liu, S.D., Dong, H.L., Feng, L. and Yu, S.X., 2014. Effect of drought stress on lipid peroxidation and proline content in cotton roots. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(6), 1729-1736.
- Zhang, S., Zhou, J., Han, S., Yang, W., Li, W., Wei, H., Li, X. and Qi, L., 2010. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 398, 355-360.
- Zhang, W., Yu, X., Li, M., Lang, D., Zhang, X and Xie, Z., 2018. Silicon promotes growth and root yield of *Glycyrrhiza uralensis* under salt and drought stresses through enhancing osmotic adjustment and regulating antioxidant metabolism. *Crop Protection*, 107, 1-11.
- Zhang, X. and Ervin, E.H., 2008. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Science*, 48, 364-370.
- Zhang, Y.C., Yu, Y., Wang, C.Y., Li, Z.Y., Liu, Q., Xu, J. and Xin, P., 2013. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nature Biotechnology*, 31(9), 848-854.
- Zhang, Z., 2011. Drought stress on the physiological indicators of cucumber seedlings. *South China Agricultural Journal*, 42(12), 1466-1468.

- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., Ruan, K., and Jin, Y., 2007. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 585-590.
- Zhao, Z., Chen, G. and Zhang, C., 2001. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 1055–1061.
- Zhou, S., Hu, W., Deng, X., Ma, Z., Chen, L., Huang, C. and He, G., 2012. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *Plos One*, 7(12), e52439.
- Zhou, X., Wang, G., Sutoh, K., Zhu, J.K. and Zhang, W., 2008. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1779, 780-788.
- Zhu, J.K., 2008. The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 20, 2238-2251.
- Ziegelhoffer, E.C., Medrano, L.J. and Meyerowitz, E.M., 2000. Cloning of the Arabidopsis WIGGUM gene identifies a role for farnesylation in meristem development. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97, 7633-7638.
- Zlatev, Z.S., Lidon, F.C., Ramalho, J.C. and Yordanov, I.T., 2006. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum*, 50(3), 389-394.
- Zou, Y., Wang, Y., Wang, L., Yang, L., Wang, R. and Li, X., 2013. miR172b controls the transition to autotrophic development inhibited by ABA in Arabidopsis. *Plos One*, 8, e64770.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi kadrosunda göreve başladı. Halen bu göreve devam etmektedir.

