

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BÜTÜNLEŞTİRİLMİŞ DOKTORA TEZİ

**TUZ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GELİŞTİRİLMİŞ DOMATES
(*Solanum lycopersicum* L.) BİTKİSİNDE KATALAZ GENİ mRNA İFADE
SEVİYESİNİN REAL TIME PCR İLE BELİRLENMESİ**

Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Esra GÜNDÜZER tarafından hazırlanan “**Tuz ve kuraklık stresi altında geliştirilmiş domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde katalaz geni mRNA ifade seviyesinin real time pcr ile belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda **BÜTÜNLEŞTİRİLMİŞ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan: Prof. Dr. Ali ERGÜL
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Üye : Prof. Dr. Füsün EYİDOĞAN
Başkent Üniversitesi Sınıf Öğretmenliği

Üye : Prof. Dr. İrfan KANDEMİR
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

08.01.2015

Esra GÜNDÜZER

ÖZET

Bütünleştirilmiş Doktora Tezi

TUZ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GELİŞTİRİLMİŞ DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BİTKİSİNDE KATALAZ GENİ mRNA İFADE SEVİYESİNİN REAL TIME PCR İLE BELİRLENMESİ

Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Abiyotik stres faktörlerinin, dokularda reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna neden olan bir dizi morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere yol açarak, büyüme, verimlilik ve bitkilerin dağılımı üzerinde olumsuz etkileri vardır. Bu çalışma domates (*Solanum lycopersicum* L.) fidelerinde, tuz (NaCl) ve tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresinin lipid peroksidasyonu ve katalaz gen ekspresyonu seviyesine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Fideler hidroponik olarak 15 gün geliştirilmiştir. Daha sonra 100 - 150 mM tuz ve 100 - 150 mM kuraklık ile muamele edilmiştir.

Çalışmada çeşitli zaman aralıklarında (0, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h) tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılan domates bitkilerinde lipid peroksidasyonu malondialdehit içeriği belirlenerek ölçülmüş ve malondialdehit seviyesi büyük ölçüde değişkenlik göstermiştir. Katalaz geninin ekspresyonu, stres uygulamalarının etkisini hücre içi kararlı mRNA birikimini belirlemek amacıyla kantitatif real time PCR ile çalışılmıştır. Sonuçlar bir housekeeping gen (aktin) ve stres uygulanmamış kontrol grubu ile normalize edilmiştir. Katalaz gen ekspresyonu seviyesinde hızlı fakat sürekli olmayan bir düşüşün ardından kademeli bir artış olduğu gözlenmiştir. Sonuçlara göre 100 mM NaCl uygulamasında 9. saat, 150 mM NaCl uygulamasında 24. saat, 100 ve 150 mM PEG uygulamasında ise 6. saat katalaz gen ekspresyonu seviyesinin en yüksek olduğu zamanlardır. Tuz stresi sırasında ROT'ların üretimi büyük olasılıkla kuraklık stresi ile benzerlik göstermekte ve daha çok CO₂ fiksasyonun azalmasıyla O₂'ye elektron akışında artış meydana gelmesi ile ilgilidir.

Ocak 2015, 176 sayfa

Anahtar Kelimeler: Abiyotik stres, MDA, gen ekspresyonu, qPCR, katalaz, *Solanum lycopersicum* L.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF CATALASE GENE mRNA EXPRESSION LEVEL WITH REAL TIME PCR IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) PLANT GROWN UNDER SALT AND DROUGHT STRESS

Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Abiotic stresses have negative impact on the growth, productivity and distribution of plants which lead to a series of morphological, biochemical and molecular changes that trigger the formation of reactive oxygen species (ROT) in tissues. The present study was conducted to evaluate the effect of salt (NaCl) and drought (PEG) stress with the equivalent salt stress on growth and catalase antioxidant levels in (*Solanum lycopersicum* L.) tomato seedlings. The seedlings were grown hydroponically for 15 days. Then were treated with 100 - 150 mM salt and 100 - 150 mM drought.

In this study the level of lipid peroxidation was measured under salt and drought stresses in various time intervals (0, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h) by estimating malondyaldehyde content and malondyaldehyde concentration demonstrated a significant variance. Expression of catalase gene was investigated by quantitative real-time PCR to observe the effect of stress treatments by measuring the steady state level of mRNA in the cell. Results, normalized with a housekeeping gene (actin) and unstressed control group indicated that there was a rapid but temporary drop in catalase gene expression level followed by a gradual recovery. The results showed that application of 100 mM NaCl at 9h, 150 mM at 24h, 100-150 mM PEG at 6h, are the times when the maximum catalase gene expression level was determined. The generation of ROT during salt stress is probably similar to drought stress and is mainly attributed to increased leakage of electrons to O₂, ensuring from a decline in CO₂ fixation.

January 2015, 176 pages

Key Words: Abiotic stress, MDA, gene expression, qPCR, catalase, *Solanum lycopersicum* L.

TEŞEKKÜR

Beni bu konuda çalışmaya yönlendiren, tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek, sonsuz destek ve sabır gösteren, akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), doktora tez izleme komitemde yer alan ve deneysel aşamalarda büyük desteğini gördüğüm, benden ilgisini ve bilgisini esirgemeyerek tezime katkıda bulunma nezaketini gösteren sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), moleküler teknikler ve istatistiksel hesaplamalar konusunda kendisinden çok şey öğrendiğim sayın Prof. Dr. İrfan KANDEMİR'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), bilimsel anlamda daima beni cesaretlendirip olanak ve fırsatlar sunan, yeniliklerden haberdar ederek ufkumu genişleten, her zaman pozitif düşünmeye yönelten ve tezimin tamamlanmasında desteğini benden esirgemeyen sayın müdürüm Doç. Dr. Turgay TEKİNAY'a (Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü), çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve yönlendiren, bilimsel çalışmaların yanında her aşamada pratik çözümleriyle bir hoca ve bir arkadaş olarak destek olan sayın Yrd. Doç. Dr. Semra SOYDAM AYDIN'a, çeşitli hesaplama ve istatistiksel analizlerin yapılmasında emeği geçen arkadaşım Öğr. Gör. İlker BÜYÜK'e, projeler kapsamında birlikte çalıştığım, hayatımın her aşamasında yanımda olan ve yardıma ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan değerli arkadaşlarım Uzm. Bio. Zeynep KILIÇ, Öğr. Gör. Esin BAŞARAN, Arş. Gör. Çiğdem DÖNMEZ ile laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, bu tezin yazımı sırasında emeği geçen ve hiçbir zaman benden kıymetli yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Uzm. Bio. Nur YILDIRIM'a, yaşamımın her aşamasında ve çalışmalarım süresince her açıdan beni destekleyen teyzem sayın Prof. Dr. Aylin KALAYCI'ya (Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi), beni bugünlere getiren, birçok fedakârlık göstererek sevgi ve anlayış ile beni destekleyen hayat kaynağım sevgili annem Havva GÖKÇE, babam Mahir GÖKÇE ve kardeşim Hülya GÖKDEMİR'e, bana huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan, bu tezin oluşturulması esnasında her konuda yardım eden, pek çok fedakârlığa katlanan ve sabırla tezimin bitmesini bekleyen eşim Makine Yüksek Mühendisi Onur GÜNDÜZER'e ve yakın bir zamanda ailemize katılacak olan Gökçe bebeğime annesinin bitmek bilmeyen çalışmalarına katlandığı ve sabırla beklediği için en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Esra GÖKÇE GÜNDÜZER
Ankara, Ocak 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Tarihçe	2
1.2 Sınıflandırılması	3
1.3 İklim İsteği	4
1.4 Besin Değerleri ve Önemi	5
1.5 Dünya ve Türkiye’de Üretimi	5
1.6 Bitkilerde Stres	10
1.7 Strese Karşı Bitki Tepkileri	10
1.7.1 Stresten kaçınma	11
1.7.2 Strese tolerans.....	11
1.8 Stres Faktörleri.....	12
1.9 Abiyotik Stres Faktörleri.....	13
1.9.1 Kuraklık stresi (Su stresi).....	13
1.9.2 Tuz stresi.....	15
1.9.3 Oksidatif stres.....	17
1.10 Katalaz	21
1.11 Lipid Peroksidasyonu	23
1.12 Real Time PCR.....	26
1.12.1 Floresan prob sistemleri	27
1.12.2 Hibridizasyon prob yöntemi	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43

3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi.....	43
3.2 Hoagland Besi Ortamı	44
3.3 Bitki Stres Koşulları	46
3.3.1 100 mM tuz (NaCl) stresi.....	46
3.3.2 150 mM tuz (NaCl) stresi.....	47
3.3.3 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi	47
3.3.4 150 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi	48
3.4 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi).....	49
3.5 Total RNA İzolasyonu	50
3.5.1 RNA pürifikasyonu (saflaştırılması)	51
3.6 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	52
3.7 cDNA (komplementer DNA) Sentezi	53
3.8 Primer ve Prob Dizaynı	54
3.9 Real - Time PCR Reaksiyonu	58
3.10 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	62
4.1 Domates Bitkisinde Stres Uygulamaları	62
4.2 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi).....	64
4.3 Total RNA izolasyonu	68
4.4 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	69
4.5 cDNA Sentezi	69
4.6 Real - Time PCR Reaksiyonu	73
4.6.1 100 mM tuz (NaCl) stresi.....	75
4.6.2 150 mM tuz (NaCl) stresi.....	85
4.6.3 100 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi	94
4.6.4 150 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi	102
4.7 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz	112
4.7.1 100 mM tuz (NaCl) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi	113
4.7.2 150 mM tuz (NaCl) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi	121

4.7.3 100 mM kuraklık (PEG) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi.....	129
4.7.4 150 mM kuraklık (PEG) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi.....	137
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	145
5.1 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi).....	145
5.1.1 100 mM ve 150 mM NaCl stresi ile MDA seviyesinde meydana gelen değişim.....	146
5.1.2 100 mM ve 150 mM PEG stresi ile MDA seviyesinde meydana gelen değişim	148
5.2Katalaz (CAT)	149
5.2.1 100 mM ve 150 mM NaCl stresi ile katalaz seviyesinde meydana gelen değişim.....	151
5.2.2 100 mM ve 150 mM PEG stresi ile katalaz seviyesinde meydana gelen değişim.....	154
KAYNAKLAR	159
ÖZGEÇMİŞ.....	174

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad
As	Arsenik
B	Bor
C	Sitozin
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Kalsiyum Nitrit
Ca ⁺²	Kalsiyum
Cl ⁻	Klor
CO ₂	Karbondioksit
CO ₃ ²⁻	Karbonat
Cr	Krom
Cu	Bakır
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat
Fe	Demir
g	Gram
g	Relatif Santrifüj Kuvveti
G	Guanin
G6FD	Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GAPDH	Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrojenaz
gs	Stomatal İletkenlik
h	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₃ BO ₃	Borik Asit
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
IU	Biyolojik Ünite
K	Potasyum
K ₂ SO ₄	Potasyum Sülfat
KCl	Potasyum Klorür
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum Hidrojen Fosfat
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn	Mangan
MnSO ₄	Mangan Sülfat
MOPS	4-Morfolinpropansulfonik asit
Mpa	Megapaskal
Na	Sodyum
NaAc	Sodyum Asetat
NaCl	Sodyum Klorür

NADPH	İndirgenmiş Glutasyon
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCED	9' –Epoksikarotenoid Dioksigenaz
ng	Nanogram
NH ₄	Amonyum
NH ₄ Mo	Amonyum Molibdat
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO ₃	Nitrat
O ₂	Oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
P	Fosfor
pmol	Pikomol
PP2Acs	Protein Fosfataz 2A
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
S	Kükürt
SO ₄ ²⁻	Sülfat
TBA	2-Tiyobarbiturik Asit
TCA	Triklor Asetik Asit
U	Ünite
Zn	Çinko
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko Sülfat
α	Alfa
β	Beta
Ψ_w	Su Potansiyeli
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

Kısaltmalar

A	Adenin
ABS	Absorbans
ACT	Aktin
APX	Askorbat Peroksidaz
bç	Baz Çifti
BHT	Butil Hidroksi Toluen
C	Sitozin
CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	PCR ürün miktarında ilk önemli artışın olduğu değer
DEPC	Dietil Pyrokarnonat
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzim Komisyonu Numarası

EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EF	Uzama Faktörü
EtBr	Etidyum Bromür
EtOH	Etil Alkol
FAOSTAT	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FeEDTA	Demir Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
Gst1	Glutasyon S-transferaz 1
HsfA2	Sıcaklık ile Uyarılabilen Transkripsiyon Faktörü A2
Hsp	Isı Şoku Proteini
kb	kilobaz
MDA	Malondialdehit
MÖ	Milattan Önce
mRNA	Mesajcı RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
PGK	Fosfoglisarat Kinaz
POD	Peroksidaz
PSII	Fotosistem II
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RPL2	Ribozomal Protein L2
SA	Salisilik Asit
SOD	Süperoksit Dismutaz
T	Timin
TB	Turgor Basıncı
TBA	2-Tiyobarbiturik Asit
TCA	Triklor Asetik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Ünite
UBI	Ubiquitin
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Dünyada domates üretiminde Türkiye'nin yeri (FAOSTAT Agriculture Data, Anonymous 2012)	6
Şekil 1.2 Türkiye'de Bölgelere Göre Domates Üretimi (%) (TÜİK 2012)	8
Şekil 1.3 Bitki hücrelerinde farklı organallerde antioksidant enzimlerin aktivitesi.....	20
Şekil 1.4 Lipid peroksidasyonu zincirleme reaksiyonları ve malondialdehit oluşumu	25
Şekil 1.5 MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı	25
Şekil 1.6 Real Time PCR metodunun şematik gösterimi.....	27
Şekil 1.7 Hibridizasyon Prob yönteminin şematik gösterimi (Günel 2007)	28
Şekil 3.1 İklim ve bitki yetiştirme odası	43
Şekil 3.2 İklim ve bitki yetiştirme odasında yetiştirilen bitkilere Hoagland besi ortamı içerisinde tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresinin uygulanması	44
Şekil 3.3 Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ve standartları.....	46
Şekil 3.4 CAT gen bölgesi için dizayn edilen primer ve prob bağlanma yerleri.....	57
Şekil 3.5 ACT gen bölgesi için dizayn edilen primer ve prob bağlanma yerleri	57
Şekil 3.6 cDNA seri dilüsyonları	59
Şekil 4.1 100 mM NaCl stres bitkileri	62
Şekil 4.2 150 mM NaCl stres bitkileri	63
Şekil 4.3 100 mM PEG stres bitkileri	63
Şekil 4.4 150 mM PEG stres bitkileri	64
Şekil 4.5 100 mM Tuz Stresi, zamana bağlı MDA seviyesi	65
Şekil 4.6 150 mM Tuz Stresi, zamana bağlı MDA seviyesi	66
Şekil 4.7 100 mM Tuz Stresi ile eş kuraklık (PEG) stresi, zamana bağlı MDA seviyesi.....	67
Şekil 4.8 150 mM Tuz Stresi ile eş kuraklık (PEG) stresi, zamana bağlı MDA seviyesi.....	68
Şekil 4.9 İzole edilen total RNA örneklerinden bazılarının ait formaldehit agaroz (FA) jel görüntüsü	69

Şekil 4.10 Katalaz (CAT) standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla PCR'ı yapılmış cDNA'ya ait seri dilüsyonlar sonucu elde edilen pik görüntüsü...	73
Şekil 4.11 Katalaz (CAT) standart eğri grafiği	74
Şekil 4.12 Aktin (ACT) standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla PCR'ı yapılmış cDNA'ya ait seri dilüsyonlar sonucu elde edilen pik görüntüsü...	74
Şekil 4.13 Aktin (ACT) standart eğri grafiği	75
Şekil 4.14 Stres uygulanmış bitkileri karşılaştırmak amacıyla kullanılan stres uygulanmamış (kontrol) bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	76
Şekil 4.15 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	76
Şekil 4.16 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	77
Şekil 4.17 9 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	77
Şekil 4.18 12 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	78
Şekil 4.19 24 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	78
Şekil 4.20 48 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili.....	79
Şekil 4.21 Stres uygulanmış bitkileri karşılaştırmak amacıyla kullanılan stres uygulanmamış (kontrol) bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	81
Şekil 4.22 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili.....	81
Şekil 4.23 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili.....	82
Şekil 4.24 9 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili.....	82
Şekil 4.25 12 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili.....	83

Şekil 4.26 24 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	83
Şekil 4.27 48 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	84
Şekil 4.28 3 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT	
real time PCR pik profili.....	86
Şekil 4.29 6 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT	
real time PCR pik profili.....	86
Şekil 4.30 9 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT	
real time PCR pik profili.....	87
Şekil 4.31 12 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT	
real time PCR pik profili.....	87
Şekil 4.32 24 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT	
real time PCR pik profili.....	88
Şekil 4.33 48 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT	
real time PCR pik profili.....	88
Şekil 4.34 3 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	90
Şekil 4.35 6 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	90
Şekil 4.36 9 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	91
Şekil 4.37 12 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	91
Şekil 4.38 24 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	92
Şekil 4.39 48 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT	
real time PCR pik profili.....	92
Şekil 4.40 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi	
uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	94
Şekil 4.41 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi	
uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	95

Şekil 4.42	9 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	95
Şekil 4.43	12 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	96
Şekil 4.44	24 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	96
Şekil 4.45	48 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	97
Şekil 4.46	3 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili.....	99
Şekil 4.47	6 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili.....	99
Şekil 4.48	9 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili.....	100
Şekil 4.49	12 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili.....	100
Şekil 4.50	24 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili.....	101
Şekil 4.51	48 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili.....	101
Şekil 4.52	3 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	103
Şekil 4.53	6 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	104
Şekil 4.54	9 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	104
Şekil 4.55	12 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	105
Şekil 4.56	24 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	105
Şekil 4.57	48 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili	106

Şekil 4.58	3 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	108
Şekil 4.59	6 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	108
Şekil 4.60	9 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	109
Şekil 4.61	12 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	109
Şekil 4.62	24 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	110
Şekil 4.63	48 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili	110
Şekil 4.64	100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi.....	115
Şekil 4.65	150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi.....	123
Şekil 4.66	100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi	131
Şekil 4.67	150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Domatesin Sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2 Şekil, irilik, renk ve dilimliliğe göre domatesin sınıflandırılması	4
Çizelge 1.3 Sayısal olarak Türkiye'nin domates üretiminde dünya sıralamasındaki yeri.....	6
Çizelge 1.4 Türkiye istatistik kurumuna ait Türkiye'de domates üretim verileri (Ton) (TÜİK 2012)	7
Çizelge 1.5 Türkiye'de bölgelere göre domates üretimi (ton) (TÜİK 2012).....	9
Çizelge 1.6 Çevresel Stres Faktörleri (Larcher 1995).....	13
Çizelge 1.7 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant savunma sistemleri	19
Çizelge 1.8 Antioksidanların ve antioksidan enzimlerin miktarlarının ve aktivitelerinin artmasına neden olan stres koşulları.....	20
Çizelge 3.1 Hoagland besi ortamı makro besin çözeltisi içeriği.....	44
Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamı mikro besin çözeltisi içeriği	44
Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamında bulunan iyonların son konsantrasyonları	45
Çizelge 3.4 Örneklerin numaralandırılması	49
Çizelge 3.5 FA jel hazırlamada kullanılan tamponların içeriği	52
Çizelge 3.6 Total RNA - primer karışımı.....	53
Çizelge 3.7 Ters Transkripsiyon (RT-PCR) Reaksiyonu Komponentleri.....	53
Çizelge 3.8 Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program	54
Çizelge 3.9 CAT ve ACT gen bölgeleri için tasarlanan primer ve prob dizileri	56
Çizelge 3.10 Real Time PCR reaksiyonu komponentleri	58
Çizelge 3.11 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program.....	59
Çizelge 4.1 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri.....	70
Çizelge 4.2 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresine eş PEG (kuraklık) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri	71
Çizelge 4.3 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri	79

Çizelge 4.4 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri	84
Çizelge 4.5 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri	89
Çizelge 4.6 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri	93
Çizelge 4.7 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri.....	97
Çizelge 4.8 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri	102
Çizelge 4.9 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) geni mRNA ifade seviyeleri.....	106
Çizelge 4.10 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri	111
Çizelge 4.11 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri.....	113
Çizelge 4.12 100 mM Tuz (NaCl) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri	114
Çizelge 4.13 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) Verileri.....	116
Çizelge 4.14 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri	117
Çizelge 4.15 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	120
Çizelge 4.16 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri.....	121
Çizelge 4.17 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri	122
Çizelge 4.18 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) Verileri.....	124

Çizelge 4.19 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri	125
Çizelge 4.20 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	128
Çizelge 4.21 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri	129
Çizelge 4.22 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri	130
Çizelge 4.23 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) Verileri	132
Çizelge 4.24 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri	133
Çizelge 4.25 100 mM PEG stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	136
Çizelge 4.26 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri	137
Çizelge 4.27 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri	138
Çizelge 4.28 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi Verileri).....	140
Çizelge 4.29 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri	141
Çizelge 4.30 150 mM PEG stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	144

1. GİRİŞ

Yaşamları boyunca bitkiler birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadırlar. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler, bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltmakta, normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açarak önemli miktarda ürün kaybına neden olmakta, bitkinin ölümüne yol açabilmekte, insan ve hayvanların beslenmelerini olumsuz şekilde etkilemektedir. Bu stres koşullarından bir veya birkaçına önemli ölçüde maruz kalan bitkiler, bu stres durumunu ortadan kaldırmak, sakınmak veya aşmak için çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarını devreye sokmaktadırlar (Lichtenthaler 1996, Kacar vd. 2002, Kadioğlu 2004).

Abiyotik stres koşulları içerisinde en önemlileri olarak sayılan tuz ve kuraklık streslerine karşı bitkiler; büyümede azalma, bitki su potansiyelinde düşüş ve turgorun kaybolması şeklinde yanıt vermekte ve her iki streste de toprak su potansiyeli azalmaktadır (Robinson ve Jones 1986). Bu durum reaktif oksijen türlerinin (ROT) yoğun şekilde birikmesine neden olur. ROT'lar oksidatif hasar ile hücre yapı ve fonksiyonunu bozabildikleri için hücre açısından potansiyel zarara sahiptirler. Organellerdeki kontrolsüz oksidasyonu engellemek amacıyla süper oksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler etki göstermektedirler (Cakmak ve Marschner 1992, Cakmak 1994, Gossett vd. 1994). Bitki hücrelerinde diğer aerobik organizmalara oranla hücre içi moleküler oksijen konsantrasyonu daha yüksek olduğundan bitkiler oksidatif strese daha sık maruz kalırlar. Oksidatif stres durumunda hücrelerde, transkripsiyon faktörlerinin, savunmada görev alan enzimleri kodlayan genlerin ve bazı yapısal proteinleri kodlayan genlerin “aktivasyonu” veya “inaktivasyonu” söz konusudur (Scandalios 2001). Bu nedenle reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getiren enzimleri kodlayan genlerin izolasyonu, tanımlanması ve regülasyonunun belirlenmesi önem taşımaktadır.

Herhangi bir organizmada çeşitli koşullarda (hastalık, strese maruz kalma vb) belirli genlere ait anlatım profillerinin çıkarılmasında kullanılan en yaygın teknolojilerden biri kantitatif eş zamanlı PCR yöntemidir. Real-time PCR teknolojisi ile araştırılan genlere ait transkript seviyelerindeki değişimler oldukça doğru bir biçimde saptanabilmekte, sonuç alma süresi önemli derecede kısaltmakta ve insan kaynaklı hata payı en aza düşürülmektedir (Dorak 2007).

Bu çalışma ile ülkemizde ve dünyada her geçen gün daha büyük bir problem olarak karşımıza çıkan ve bitkilerde verimliliği olumsuz yönde etkileyen tuz ve kuraklık streslerine karşı önemli bir tepki olarak oluşan CAT izozimlerine ait genel ifade seviyesi real time PCR teknolojisi kullanılarak gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir. Oksidatif stresin hassas göstergelerinden biri olan malondialdehit (MDA) analizi ile de bitkilerde stres oluşumu gösterilmiştir. Domates gibi önemli bir tarım bitkisinde CAT genleri ile ilgili böyle bir çalışma daha önce yapılmamış olup, domatesin stres koşullarına göstermiş olduğu tepkinin genetik mekanizması henüz açıklığa kavuşmamıştır. Tuz ve kuraklık stres koşullarında antioksidan enzim mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla bu koşullarda geliştirilen domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkilerinde hücrede bulunan kararlı katalaz (CAT) genine ait mRNA ifade seviyesi araştırılmıştır.

1.1 Tarihçe

Anavatanı Orta ve Güney Amerika olan domates, Perulular tarafından, MÖ 5000 yılından beri kullanılmaktadır. Domatesin Meksika'dan diğer ülkelere yayıldığı tahmin edilmektedir (Jenkins 1948). Orta çağda Avrupa'ya getirilen domatese çok az kimse rağbet etmiş olup meyvesi zehirli bir bitki sanılarak bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmeye başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda domatesin çok faydalı "olduğu" anlaşılmış ve yetiştiriciliği 1900'lü yıllarda ağırlık kazanmıştır.

1.2 Sınıflandırılması

Çizelge 1.1 Domatesin sınıflandırılması (Anonim 2011)

Domain:	Eukarya (Ökaryotikler)
Alem:	Plantae (Bitkiler)
Bölüm:	Angiospermae (Kapalı tohumlular)
Sınıf:	Dicotyladoneae (Çift çenekliler)
Takım:	Solanales
Aile:	Solanaceae (Patlıcangiller)
Cins:	<i>Solanum</i>
Tür:	<i>S. lycopersicum</i>
İkili adı:	<i>Solanum lycopersicum</i> L
Sinonimler:	<i>Lycopersicon esculentum</i>

Bu botanik sınıflandırma (Anonim 2011) yanında domates; bitkinin boyuna uzamasının kısıtlanmasına ve serbest kalmasına göre yer domatesleri ve sırık domatesler olmak üzere iki çeşide ayrılır. Yer domatesi, daha çok sanayide kullanılan domates çeşidi olup salça yapımı için yetiştirilmektedir, sofralık üretimleri kısmen yapılmaktadır. Sırık domates, yer domatesinden farklı olarak, sadece taze yemeklik olarak yetiştirilmektedir. Diğer yandan bu sınıflandırma şekli kullanım amacına göre sanayi ve yemeklik domates olarak da yapılabilmektedir. Becker-Dillingen (1956) ise domatesi meyvelerinin özelliğine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırmaktadır.

- a) Yuvarlak ve dilimsiz
- b) Meyveleri şekilsiz dilimli
- c) Meyveleri kiraz şeklinde
- d) Meyveleri armut şeklinde

Ayrıca domates meyvelerinin kırmızı veya sarı renkli, tüylü ve tüysüz olabilecekleri

vurgulanmaktadır. Bazı sistematikçiler ise domatesi şekil, irilik, renk ve dilimliliğe göre dört sınıfa ayırıp, her bir sınıfı da kendi içinde alt gruplara ayırmaktadır.

Çizelge 1.2 Şekil, irilik, renk ve dilimliliğe göre domatesin sınıflandırılması (Anonim 2012b)

Meyve şekli		Meyve iriliği	Meyve Dilimliliği	Meyve rengi
Yuvarlak ve basık	Ortası boğumlu	Küçük	Düz, dilimsiz	Muhtelif tonda kırmızı
Yuvarlak	Kiraz	Orta	Az dilimli	Sarı
Basık	Erik	İri	Çok dilimli	Siklamen
Çok basık	Armut	Çok iri		Beyaz
Konik	Yürek			

Domates çeşitlerinin yetiştirilme yerlerine uyacak kendine özgü nitelikleri bulunduğu son yıllarda domatesin yetiştirildiği yere göre belirlenen diğer bir sınıflandırma şekli daha ortaya çıkmıştır. Bu yeni sınıflandırma sisteminde domates, açıkta ve örtü altında yetiştirilmesine göre ikiye ayrılmaktadır (Anonim 2012b).

1.3 İklim İsteği

Domates değişik iklim koşullarında yetiştirilebilen ticari olarak büyük öneme sahip bir bitkidir. Dünya domates üretiminin %30'u Akdeniz ülkelerinde yapılmakla birlikte, yarı kurak bölgelerinde daha yüksek verim elde edilmektedir (Cuartero ve Fernandez-Munoz 1999, Seniz 1992). Domates ılık ve sıcak iklimlerde iyi gelişmektedir. Domates tohumlarının çimlenmesi için gerekli olan en düşük sıcaklık 10 °C, optimum sıcaklık 30 °C, en yüksek sıcaklık ise 35 °C 'dir. En iyi gelişim sıcaklığı 15-28 °C arasındadır. Sıcaklık 0 °C'nin altına düştüğünde bitki canlılığını kaybeder, 30 °C'nin üzerine çıktığında ise bitki gelişimi devam etmesine rağmen dölleme olmaz, çiçekler dökülür ve çekirdeksiz küçük meyve oluşumuna neden olur. Domates büyüme döneminde iken yüksek nem miktarı bitki gelişimi üzerine olumlu etki yaparken meyve olgunlaşması döneminde hastalık ve zararlıların artmasına neden olmaktadır. Domates genellikle her tür toprak tipinde gelişebilmekte birlikte daha çok süzek, humus ve organik maddece

zengin, su tutma kabiliyeti iyi, tınlı topraklarda ve pH 5,5-7,0 olan topraklarda daha iyi yetişmektedir. Domatesin veya aynı familyadan başka bitkilerin aynı alanda arka arkaya yetiştirilmesi verimi olumsuz etkilemektedir. Bu şekilde ekimi yapıldığı takdirde topraktaki aynı besin maddelerinin tüketimine sebep olmaktadır. Bu nedenle ekim nöbeti (rotasyon) uygulaması yapılmalı, farklı familyadan sebzeler ekilerek topraktaki organik maddeler ile azot miktarının artması sağlanmalıdır.

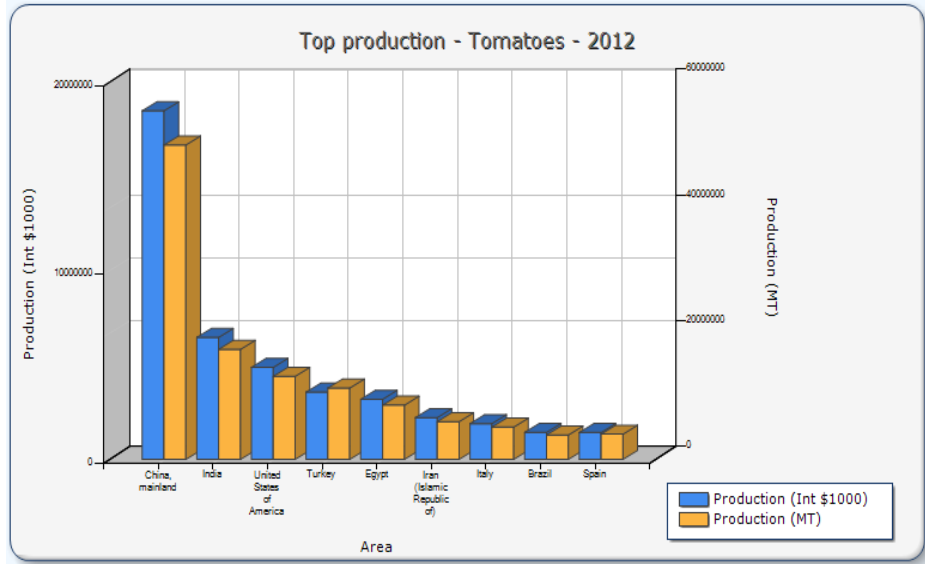
1.4 Besin Değerleri ve Önemi

Günümüzde araştırmacılar, bitkisel kökenli gıdaların toplum sağlığı açısından yararlı ve kimi hastalık etmenlerini azaltmaya ve yaşlılığı geciktirmeye yönelik olmasına önem vermektedirler. Özellikle son yıllarda yoğunlaşan araştırmalar domatesin antioksidan özelliğini ön plana çıkarmakta ve kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Yapılan araştırmalar, domateste bol miktarda bulunan likopen adlı bir karetonoidin (3,0 mg likopen / 100 g domates) kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedir (Boileau vd. 2003). 100 g domatesin bileşiminde %94.2 su, 6,0 g kuru madde, 3,5 g karbonhidrat, 1,0 g protein, 0,2 g yağ, 0,7 g kaba selüloz, 19 kalori, 1600 IU A vitamini, 0,06 mg B1 vitamini, 0,05 mg B2 vitamini, 35,0 mg C vitamini, 14,0 mg kalsiyum, 26,0 mg fosfor, 6,3 mg sodyum, 0,5 mg demir ve 297,0 mg potasyum bulunmaktadır (Günay 1992).

1.5 Dünya ve Türkiye’de Üretimi

Domates, dünyada yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir. FAOSTAT kayıtlarına göre dünya toplam domates üretimi 159.023.383 tondur. Türkiye 11.003.400 ton toplam üretimi ile önemli üretici ülkeler arasında yer almaktadır (FAOSTAT Agriculture Data, 2012). 2012 kayıtlarına göre Çin domates üretiminde birinci sırada yer almaktadır. Türkiye ise domates üretiminde dördüncü sırada yer alan önemli domates üreticilerinden biridir (Şekil 1.1 ve Çizelge 1.3). 2010 yılına göre domates üretimi %9,5 oranında artmıştır (10.052.000 ton, FAOSTAT Agriculture Data, Anonymous 2012) (Çizelge 1.4). 2012 TÜİK kayıtlarına göre ülkemizde sofralık domates üretiminde

Akdeniz Bölgesi (3.527.494 ton, %35), salçalık domates üretiminde ise Ege Bölgesi (1.426.272 ton, %25) birinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.2 ve Çizelge 1.5). 2012 TÜİK kayıtlarına göre de Türkiye’de üretilen domatesin 7.697.961 tonu sofralık, 3.652.039 tonu ise salçalık kullanım için üretilmiştir.



Şekil 1.1 Dünyada domates üretiminde Türkiye’nin yeri (Anonymous 2012)

Çizelge 1.3 Sayısal olarak Türkiye’nin domates üretiminde dünya sıralamasındaki yeri (Anonymous 2012)

Sıra	Ülke	Üretim (Ton)
1	Çin	48.576.853
2	Hindistan	16.826.000
3	ABD	12.624.700
4	Türkiye	11.003.400
5	Mısır	8.105.260
6	İran	6.824.300
7	İtalya	5.950.220
8	Brezilya	4.416.650
9	İspanya	3.821.490
10	Meksika	2.585.000
11	Özbekistan	2.435.790
12	Rusya Federasyonu	2.200.590

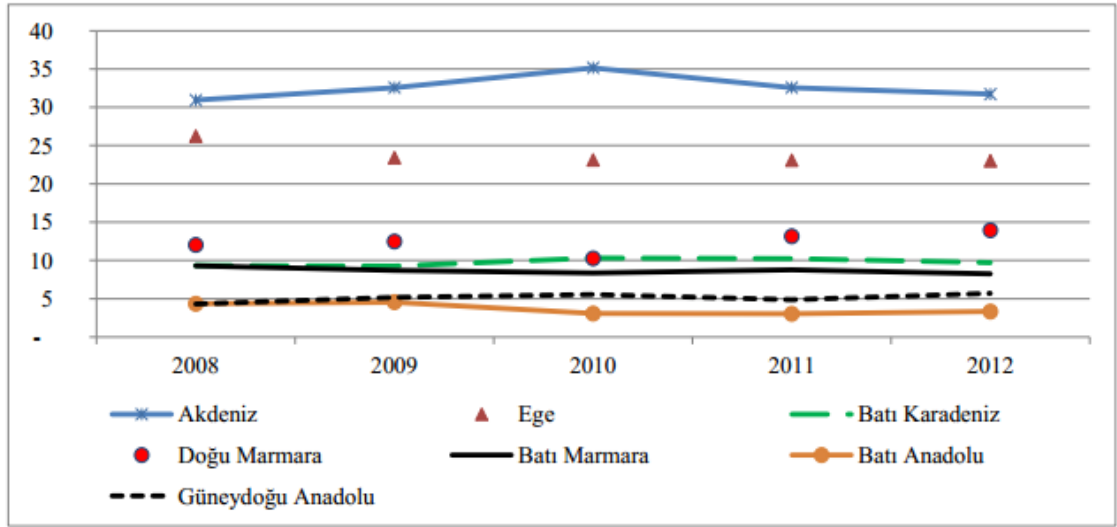
Çizelge 1.3 Sayısal olarak Türkiye'nin domates üretiminde dünya sıralamasındaki yeri
(Anonymous 2012) (devam)

Sıra	Ülke	Üretim (Ton)
13	Ukrayna	2.111.600
14	Nijerya	1.504.670
15	Portekiz	1.284.000
16	Fas	1.245.360
17	Irak	1.236.170
18	Tunus	1.169.900
19	Yunanistan	1.154.990
20	Endonezya	1.059.540

Çizelge 1.4 Türkiye istatistik kurumununa ait Türkiye'de domates üretim verileri (Ton)
(Anonim 2012a)

Yıl*	Toplam	Sofralık Domates	Salçalık Domates
2005	10.050.000	7.067.000	2.983.000
2006	9.854.877	6.912.745	2.942.132
2007	9.936.552	6.963.159	2.973.393
2008	10.985.355	7.419.814	3.565.541
2009	10.745.572	7.205.961	3.539.611
2010	10.052.000	7.173.188	2.878.812
2011	11.003.433	7.573.431	3.430.002
2012	11.350.000	7.697.961	3.652.030

*Veriler 2005 yılından itibaren derlenmeye başlamıştır.



Şekil 1.2 Türkiye’de bölgelere göre domates üretimi (%) (Anonim 2012a)

Çizelge 1.5 Türkiye’de bölgelere göre domates üretimi (ton) (TÜİK 2012)

Bölgeler	Sofralık					Salçalık				
	2008	2009	2010	2011	2012	2008	2009	2010	2011	2012
Akdeniz	3.294.901	3.395.047	3.445.315	3.504.844	3.527.494	104.358	104.566	89.604	78.572	74.037
Ege	1.353.473	1.115.236	1.121.091	1.208.773	1.186.146	1.530.195	1.400.442	1.203.205	1.330.256	1.426.272
Batı Karadeniz	949.692	912.999	945.302	1.028.846	1.007.938	74.795	81.761	92.950	98.390	94.670
Doğu Marmara	450.841	445.217	407.158	468.160	486.416	869.910	896.229	623.273	979.795	1.093.018
Batı Marmara	433.302	406.624	381.407	427.010	415.424	588.951	526.667	459.730	539.576	521.054
Batı Anadolu	321.805	328.889	259.692	281.434	302.488	155.333	158.575	48.840	50.900	75.001
Güneydoğu Anadolu	253.148	223.838	226.093	223.558	323.714	219.233	330.524	332.534	311.467	321.252
OrtaAnadolu	119.888	136.764	131.523	163.009	170.630	12.053	13.074	12.746	25.388	31.221
Kuzeydoğu Anadolu	100.742	107.580	113.425	120.432	125.994		17.000	5.085	4.000	3.905
Ortadoğu Anadolu	104.321	100.420	107.606	113.177	118.894	10.612	8.886	8.958	10.447	10.617
İstanbul	22.155	20.694	19.960	21.262	20.519		125	138	125	171
Doğu Karadeniz	15.546	12.653	14.616	12.926	12.304	101	1.762	1.749	1.086	821
Toplam	7.419.814	7.205.961	7.173.188	7.573.431	7.697.961	3.565.541	3.539.611	2.878.812	3.430.002	3.652.039

Kaynak: TÜİK 2012

1.6 Bitkilerde Stres

Yaşam için optimal olan koşullardan önemli sapmalar olarak açıklanabilen stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik olaylarda belirgin değişimler meydana getirmesidir (Özcan vd. 2001, Kadioğlu 2004). Başka bir deyişle, büyüme, gelişme ve üretim için genetik potansiyelin ifadesini olumsuz şekilde etkileyen herhangi bir çevresel faktörü veya bunların etkileşimlerini içermektedir (Jones ve Qualset 1984). Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişikliklere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilemesi yanında, üründe nitelik ve niceliğin yitmesine, bitkinin ve bitki organlarının yaşantısını yitirmesine neden olabilmektedir (Kacar vd. 2002).

Canlıya herhangi bir stres uygulandığında organizma kendini bir noktaya kadar koruyabilir, stresin kaldırılmasından sonra stres şiddeti ve süresine bağlı olarak organizma tekrar eski haline dönebilir. Fakat bütün stres reaksiyonları bu şekilde olmayıp, bazı stres durumlarında organizma hasar görür, deforme olur ve eski haline dönemez. Stresin çok aşırı olduğu durumlarda meydana gelen bu tür reaksiyonlar sonucu bitkide aşırı hasar ve ölüm meydana gelebilir (Kadioğlu 2004).

Bitkilerin çevresel strese karşı reaksiyonları oldukça komplekstir. Basit kimyasal ya da biyokimyasal cevaplar ile hormonal ve kalıtsal olarak ortaya çıkan birçok fizyolojik cevap yolları bulunmaktadır (Kadioğlu 2004).

1.7 Strese Karşı Bitki Tepkileri

Tüm bitkiler, belirli bir derecede strese karşı koyma ve canlı kalabilme potansiyeline sahiptirler. Bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuklar ve dormant hücreler) strese daha dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) daha az dayanıklıdır. Stres dayanıklılığı bitkinin büyüme ve gelişmesine göre de değişebilir. Bitki, gelişiminin bir safhasında strese karşı duyarlı, diğer bir büyüme safhasında dayanıklı olabilir.

Bitkilerde stres faktörlerine karşı iki farklı tepki gözlenmektedir: Bunlar; stres faktörlerinden kaçınma veya bunlara karşı toleranstır. Bu iki dayanıklılık tipi, stres durumu arttıkça gelişir ve her ikisi aynı bitkide bulunabilir (Kadıoğlu 2004).

1.7.1 Stresten kaçınma

Stres faktörlerinin bitki dokularına girişinin önlenmesini veya azaltılmasını ifade etmektedir. Bu mekanizma, iki yolla gerçekleşmektedir:

a) Bitkinin çevre ile temas halinde olduğu yüzeylerinde morfolojik ve kimyasal kompozisyondaki değişiklikler: yaprak ayasının alanı ve kalınlığı, stomaların büyüklüğü ve yoğunluğu, kütikulanın kalınlığı ve kimyasal kompozisyonu, yaprak ve kök salgılarında toksik ve engelleyici komponentlerin oluşumu.

b) Ontogenetik değişimler (stres faktörlerinden mevsimsel olarak kaçınma): stres olayından önce dormant ontogenetik faza (tohum, yumru oluşumu) geçiş sağlanarak, bitki üretkenliği korumaya alınmaktadır.

1.7.2 Strese tolerans

Stres faktörlerinin etkisini elimine etme, azaltma veya tamir etme mekanizmalarını ifade etmektedir. Bitkinin aşırı dış stres şartlarında olduğu kadar içsel stres altında da bir dereceye kadar fonksiyonlarını ya da canlılığını devam ettirme yani strese dayanma kapasitesidir. Bu tepki tipi, doku seviyesindeki değişiklikleri (sakızların, yara periderminin oluşumu gibi), subselüler seviyedeki değişiklikleri (duvar ilavelerinin; membran, kloroplast ve hücre duvarı modifikasyonlarının oluşumu gibi), moleküler (sekonder metabolitlerin, polisakkaritlerin, fenol polimerlerinin ve stres proteinlerinin sentezi) ve submoleküler seviyedeki değişiklikleri (elektronlar, iyonlar, serbest radikaller gibi) kapsamaktadır. Kısaca strese tolerans, dayanıklı olmayan türler ya da bireylerde organizmaların canlı kalması için letal ya da inhibe edici şartlar altında özel

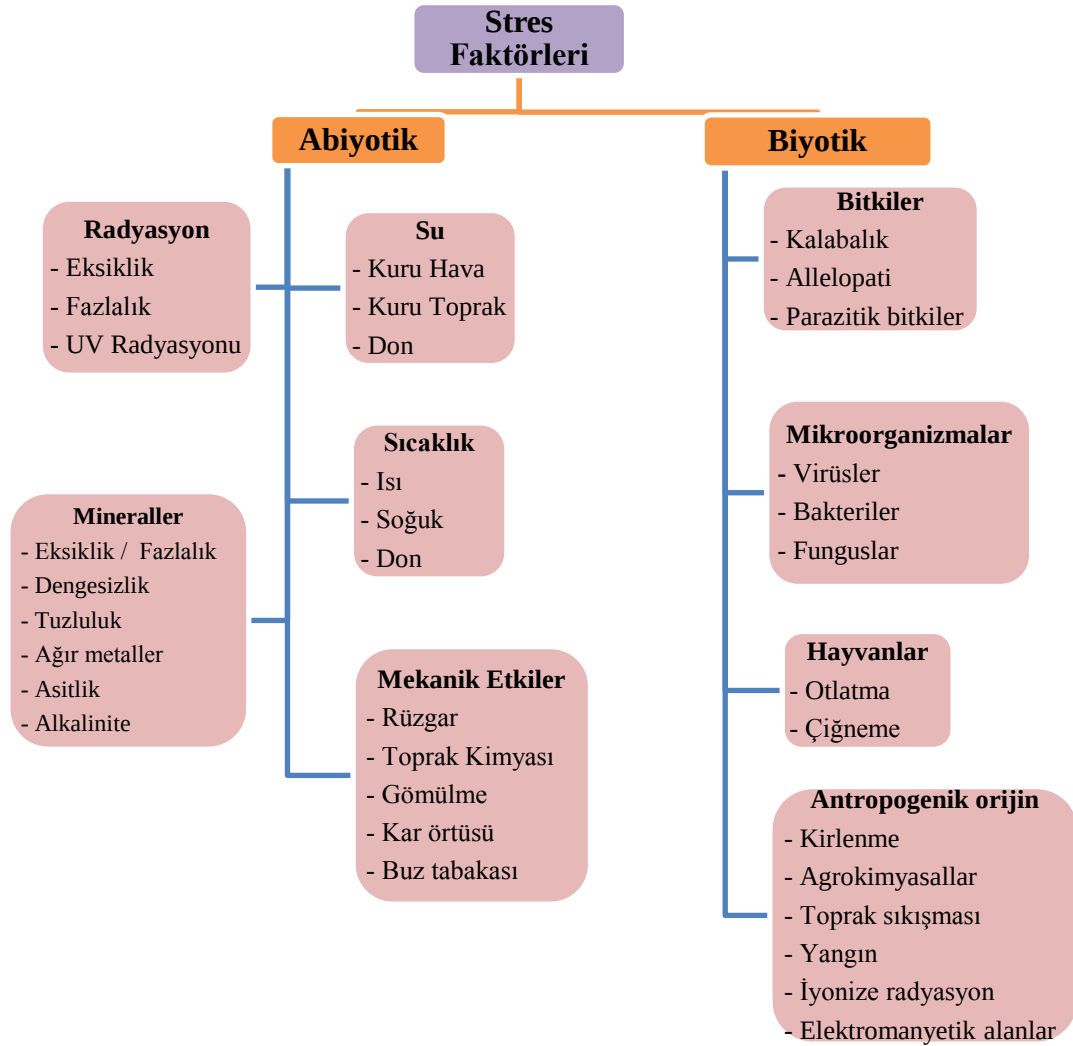
biyolojik mekanizmaların gelişmesini ifade etmektedir (Edreva 1998, Taiz and Zeiger 2002, Kadioğlu 2004).

1.8 Stres Faktörleri

Bitkiler yaşamları sürecinde pek çok stres olayları ve çok sayıda stres faktörleri ile karşılaşmaktadırlar. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres olayları veya faktörleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Stres faktörleri ‘biyotik’ ve ‘abiyotik’ olarak iki grupta sınıflandırıldığında, biyotik faktörler; enfeksiyon oluşturan mikroorganizmaları (fungus, bakteri, virüs), zararlıları (böcek, nematod) ve diğer organizmalarla rekabeti içermektedir. Abiyotik faktörler ise; kuraklık (su), tuzluluk, su taşkını (fazla su), sıcaklık, soğuk, ışık, radyasyon (UV), kimyasal, manyetik, elektriksel etkiler gibi çevre parametrelerindeki sapmalardan oluşmaktadır (Özcan vd. 2001).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26’lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Kuraklık stresinden sonra en yaygın görülen stres tipi ise tuzluluktur. Bunu mineral stresi, soğuk ve don stresi takip etmektedir. Dünyada yalnızca %10’luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Dünyadaki tarım alanlarının %45’i kuraktır ve bu alanların %30’u insanların yaşadığı alanlardır (Larcher 1995).

Çizelge 1.6 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)



1.9 Abiyotik Stres Faktörleri

1.9.1 Kuraklık stresi (Su stresi)

Bitkilerde belirli bir süre içerisinde terlemeyle (transpirasyon) yitirilen suyun, çevreden alınan su miktarından fazla olması durumunda ortaya çıkar. Transpirasyon ile yitirilen su miktarının alınan su miktarından fazla olması durumunda iletim boruları içerisinde oluşan negatif basınç (tension) nedeniyle bitki organları arasında suyun alınması için rekabet başlar. Başka bir ifadeyle bitkinin değişik organlarının su potansiyelleri arasındaki su dengesi bozulur. Hücrede turgor basıncının (TB) daima pozitif olması

gerekir. Turgor basıncı düştüğü zaman bitkide solma meydana gelir. Bu nedenle turgor potansiyeli; su stresi ya da kuraklık stresi oluşan bitkilerdeki su potansiyelinin temel ögesidir.

Su stresi, toprakta bitkiye yarayışlı su miktarının azalması, atmosferik koşulların etkisiyle transpirasyon ve evaporasyon sonucu su yitmesinin sürmesi durumunda ortaya çıkmaktadır. Stres günlük ya da uzun süreli olabilir. Su stresinin uzun sürmesi ve yeterince su alımının gerçekleşmemesi bitkilerde ölüme yol açabilir (Kacar vd. 2002).

a) Bitkilerde kuraklık zararları : Su eksikliği; hücre hacminin azalmasına, hücre özsuyu konsantrasyonunun artmasına ve protoplazmada artan bir dehidrasyona sebep olur. Su eksikliğinde bitkilerin büyüme fonksiyonlarında yavaşlama ve turgorlarında azalma meydana gelmektedir. Protein ve klorofil olumsuz olarak etkilenirken, tohumların çimlenme yeteneklerini kaybettikleri görülür. Hücre büyümesindeki gerileme yaprakların küçülmesine, bununla birlikte de fotosentez ürünlerinin daha da azalmasına yol açar (Pugnaire vd. 1994). Su stresi bitkilerde enzim aktivitesi ve enzim miktarı üzerine de önemli bir etki yapar (Walton 1980, Salisbury ve Marinos 1985, Plaut 1995).

b) Kuraklığa adaptasyon: Bazı bitkiler büyümelerini zamanlayarak kuraklıktan kaçınır ve yeterli su sağlandığında kısa sürede büyümesini devam ettirir (Larcher 1995). Bitkilerde suyu muhafaza eden ve harcayan tiplere rastlanılmaktadır. Suyu muhafaza edenler, suyun bir kısmını depo ederler, suyu harcayan bitkiler ise suyu aşırı şekilde ve fazla miktarda tüketirler (Taiz ve Zeiger 1998).

Bitkilerin dokularındaki uygun su içeriklerini, koruyucu mekanizmalarının yardımıyla, hava ve toprak kuruluşuna rağmen, korumaları mümkün olabilmektedir. Bu ise; topraktan iyileştirilmiş su alımı, difüzyona dayanıklılıkta erken ve etkili bir artış, transpirasyon yüzeyinin azaltılması ile sağlanan su kaybının önlenmesi, yüksek bir su iletim kapasitesi veya su depolanması ile gerçekleştirilebilmektedir. Kuraklıktan kaçınmak için bitkiler bazı fonksiyonel önlemler meydana getirmişlerdir. Su eksikliği

durumunda, yaprak dökümü teşvik edilmekte, fotosentez sınırlanmakta ve yapraklarda enerji dağılımı değişmektedir. Yaprak alanının küçülmesi, nemli toprak tabakalarına doğru derinlemesine kök gelişimi ve stomaların kapanması, yaprak yüzeyinde mum birikiminin artması gibi kuraklığa karşı savunma mekanizmaları oluşturmuşlardır. Sukkulent bitkiler ise hücrelerarası boşluklarını genişleterek bünyelerinde suyu tutabilen özel dokular geliştirmişlerdir (Larcher 1995, Taiz ve Zeiger 1998).

1.9.2 Tuz stresi

Tuz stresi, kurak ve yarı kurak bölgelerde yetiştirilen kültür bitkilerinde görülür (Kalaji ve Pietkiewicz 1993). Yağışlı bölgelerde toprak yıkandığından tuzlar yer altı sularına karışır ve bu sayede tuzlulaşma (salinizasyon) yağışlı bölgelerde oluşmaz. Kurak ve yarı kurak bölgelerde yağış azlığı nedeniyle tuzların yıkanması yok denecek kadar azdır. Buharlaşma (evaporasyon) nedeniyle su yitiminin yüksek olduğu bu tip bölgelerde toprakta ve toprak yüzeyinde tuzlar birikir. Sulama suyunda ve taban suyunda bulunan tuzlar zaman içerisinde toprak yüzeyine çıkarak tuzluluğun artmasına yol açar. Ayrıca aşırı gübreleme de toprakların çoraklaşmasına, kireçlenmesine ve tuzlanmasına neden olmaktadır (Munns 2002).

Tuz stresi bitkilerde genellikle iki nedenle ortaya çıkmaktadır. Kök bölgesinde çözünmüş tuzların fazlalığı sonucunda osmotik potansiyelin artması nedeniyle bitkinin suyu almakta güçlük çekmesi ve bazı iyonların miktarındaki artışa bağlı olarak toksik etkiler göstermesiyle tuz stresi görülmektedir (Larcher 1995). Tuzlu topraklarda genellikle Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ve K^+ katyonları ile Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- ve CO_3^{2-} anyonları bulunmaktadır (Kacar vd. 2002).

a) Bitkilerde tuz stresinin zararları : Tuzluluğun bitki üzerindeki etkileri nem, sıcaklık, sulama, gübreleme, hava kirliliği ve ışık yoğunluğu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Kantar ve Elkoca 1998). Yüksek tuz konsantrasyonunun bitkilerde oluşturduğu zarar temelde suyun osmotik olarak tutulmasından ve protoplazma üzerinde belli iyonların zarar oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Böylelikle tuz konsantrasyonu artarken, bitkilere suyun girişi daha az gerçekleşmektedir. Bitkilerde suyun azalması ve

tuzluluğa bağı iyonların artmasıyla enzim aktivitesi azalırken, protein sentezi geriler, zar geçirgenliği azalır, kloroplastlar ve diğ er hücrese yapılar önemli ölçüde zarar görür. İyonlar arasındaki denge bozulduğundan tuzu oluşturan iyonlarla bitki için gerekli besinler arasında rekabet görülür ve bitkiler kendileri için gerekli elementleri yeterli miktarda alamazlar. NaCl tuzunun yüksek olduğı topraklarda, bitkilerde özellikle NO_3^- , K^+ ve Ca^{2+} alımı önemli derecede azalır (Taban ve Katkat 2000).

Ekstrem tuz stresi, bodurlaşmaya ve kök büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Bu stresin etkisi ile tomurcuk açması gecikmekte, sürgünlerin boyu kısalmakta, yapraklar küçülmekte ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca köklerde, tomurcularda, yaprak kenarlarında ve sürgün uçlarında nekrozlar oluşmakta, yapraklar sararmakta ve sürgünün tüm kısımlarında kurumalar meydana gelmektedir (Poljakoff-Mayber ve Lerner 1994, Larcher 1995).

Tuz stresi, bitkilerde ölüme yol açabilmekte, tuz konsantrasyonu ve bitkinin dayanıklılığına göre büyümeyi engellemekte, yaprak yanıklığı gibi nekrozlara, klorozlara, dölleme bozukluklarına, meyvelerin küçük kalmasına, kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Sivritepe ve Eriş 1996 a)

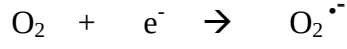
b) Tuza adaptasyon : Tuzlu habitatlarda büyüyen bitkiler, tuz etkilerinden kaçınmayabilirler ve bu nedenle en azından bir miktar dayanıklılık geliştirmek zorundadırlar. Tuza dayanıklılık, bir bitkinin ya protoplazmada ulaşılan aşırı tuz miktarlarının düzenlenmesi ile olan kaçınma veya alternatif olarak, artan iyon konsantrasyonu ile bir araya gelen toksik ve ozmotik etkileri tolere etme yeteneğı ile sağlanabilmektedir (Levitt 1972, Larcher 1995, Sivritepe ve Eriş 1996b). Bazı halofitler, hafif tuzlu topraklar üzerinde gelişmekle birlikte tuz miktarının arttığı durumlarda büyümeleri kısa sürede engellenmektedir. Halofitler kendi tuz içeriklerini birkaç yolla düzenleyerek tuzdan kaçınmaya çalışırlar. Bunlar; tuzu bünyeye almama, tuz eliminasyonu (Munns 1993, Larcher 1995), tuzun seyreltilmesi (Levitt 1972, Larcher 1995), tuzun protoplastlardaki bölmelerde biriktirilmesi (Larcher 1995). Familya, cins ve türler arasında, hatta aynı türe ait çeşitler arasında tuza toleranslılık bakımından farklılıklar bulunmaktadır (Çopur ve Oğlakçı 1995, Larcher 1995).

1.9.3 Oksidatif stres

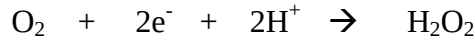
Bitkilerde kuraklık stresinin metabolik ve mekanik etkilerinin yanında oksidatif etkisi de vardır. Oksidatif stres, hücelere zarar veren ya da hüceleri öldüren reaktif oksijen türlerinin bitki hücelerinde oluşması ile ortaya çıkar (Scandalios 2002). Çoğu zaman hücre ölümüne sebep olan oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ortamdan uzaklaştırılması arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Birçok stres faktörü fazla miktarda reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna ve bunun sonucunda hücrenin normal redoks dengesinin bozularak hücresel fonksiyonlarının zarar görmesine neden olmaktadır. Bu durum ‘oksidatif stres’ olarak tanımlanmaktadır (Asada 1999, Bowler vd. 1992, Scandalios 1993, 2001). Oksidatif strese neden olan serbest radikaller, yapılarında bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller arasında oksijen serbest radikalleri en önemlileridir. Oksijen ortaklanmamış elektronları nedeniyle indirgenme eğiliminde olduğundan toksik özellik göstermektedir. Hücre içinde oksijenin son indirgenme basamağı sudur. Ancak oksijenin indirgenmesi sırasında reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilen ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünlerin başlıcaları olan süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türleri (ROT) bütün aerobik organizmalarda hücre içinde üretilmektedir ve normalde antioksidant moleküller ile denge halindedir. Bu kritik denge bozulduğunda, antioksidantların uzaklaştırılmaması veya ROT’ların aşırı birikmesi sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres meydana geldiğinde oksidant etkileri ortadan kaldırmak için hüceler aktivite göstermekte ve redoks dengesini korumaya çalışmaktadırlar. Bütün organizmalar oksidatif strese karşı adapte olucu cevaplar oluşturmaktadır. Yapraklarda H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$ miktarındaki değişiklikler, transkripsiyon faktörleri, yapısal proteinler ve savunma enzimlerine ait genlerin kodlanmasını aktive etmekte veya susturmaktadır (Scandalios 2002).

Ara ürünlerden süperoksit radikali diğerlerine göre fazla reaktif değildir, daha çok H_2O_2 ve sonrasında $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturmak suretiyle etkisini göstermektedir. Bunlar arasında organizma içinde en aktif dolayısıyla en toksik olanı hidroksil radikalidir (Feldman vd. 1993, Marletta 1993, 1994, Aruoma 1994).

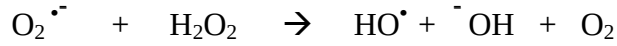
O₂ molekülüne 1 elektronun transfer edilmesiyle oksijen indirgenir ve süperoksit radikali (O₂^{•-}) oluşur.



O₂ molekülüne 2 elektron transfer edilmesiyle hidrojen peroksit (H₂O₂) serbest radikali oluşur (Borrelli vd. 2002).



O₂^{•-} diğerlerine göre fazla reaktif olmamasına rağmen oksidatif strese neden olan bir dizi reaksiyonu da başlatabilir. Bu reaksiyonlardan bir tanesi Haber-Weiss Reaksiyonu'dur (Aydın vd. 2001).

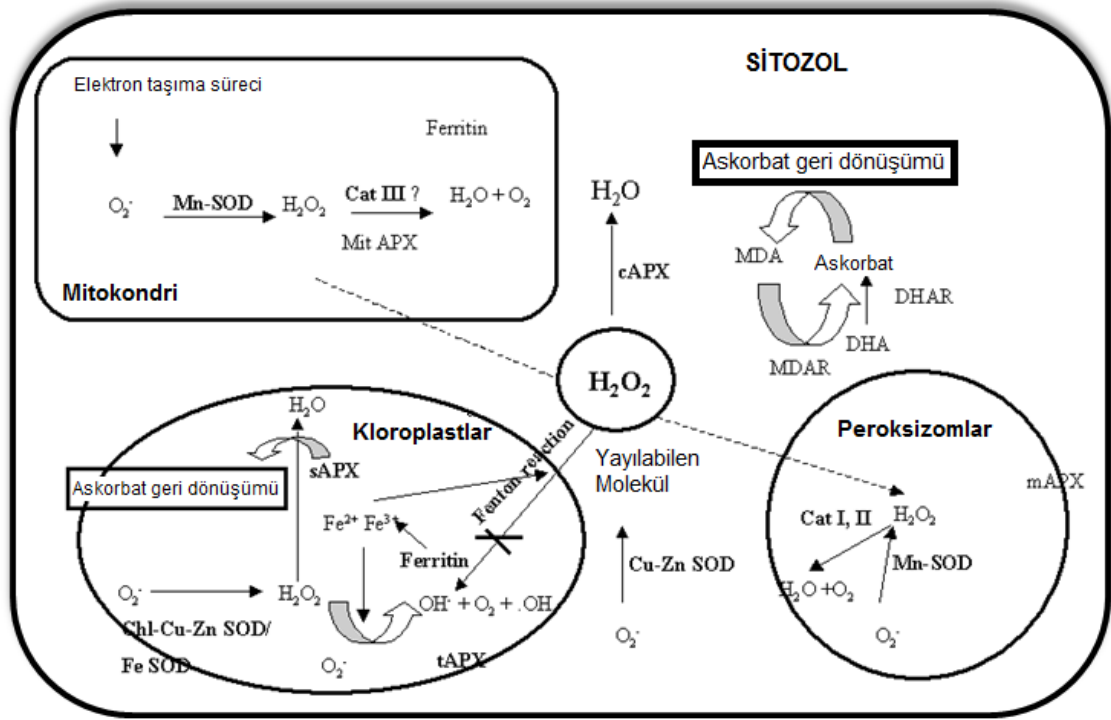


Bitkiler oksijenin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant savunma sistemleri geliştirmişlerdir (Ingram ve Bartels 1996, Baily vd. 2000, Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Bu savunma sistemleri çizelge 1.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.7 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant savunma sistemleri

Enzimatik Savunma Sistemleri	Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri
Superoksit dismutaz (SOD)	α -Tokoferol (E vitamini)
Glutasyon peroksidaz	Askorbat (C vitamini)
Katalaz (CAT)	İndirgenmiş Glutasyon (GSH)
NADPH-kinaz-okside redüktaz	Flavanoidler
Epoksit hidrolaz	Bazı kimyasallar
Konjugasyon enzimleri (Glutasyon-S-transferaz vs)	Karotenoidler (β -Karoten)
Glutasyon redüktaz (GR)	Ürat
NADPH'ya bağlı bazı enzimler (G6FD)	Bazı plazma proteinleri

Abiyotik stres koşulları içerisinde en önemlileri olarak sayılan tuz ve kuraklık bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) yoğun şekilde birikmesine neden olur. ROT'lar oksidatif hasar ile hücre yapı ve fonksiyonunu bozabildikleri için hücre açısından potansiyel zarara sahiptirler. Buna karşın hücreler, organellerdeki kontrolsüz oksidasyonu engellemek için süper oksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlere sahiptirler. (Cakmak ve Marschner 1992, Cakmak 1994, Gossett vd. 1994). Bitki hücrelerinde farklı organellerde antioksidant enzimlerin aktivitesi şekil 1.4'de gösterilmektedir (Jithesh vd. 2006a). Bitkiler reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşı hücre içinde bu enzimlerin sentezini arttırarak antioksidan savunma sağlarlar. Bitkilerde oksidatif strese karşı antioksidanların ve antioksidan enzimlerin miktarlarının ve aktivitelerinin artmasına neden olan stres koşulları çizelge 1.8'de verilmiştir (Kacar vd. 2002).



Şekil 1.3 Bitki hücrelerinde farklı organellerde antioksidant enzimlerin aktivitesi

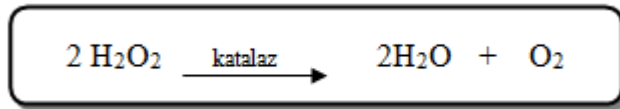
Çizelge 1.8 Antioksidanların ve antioksidan enzimlerin miktarlarının ve aktivitelerinin artmasına neden olan stres koşulları

Antioksidanlar ve antioksidan enzimler	Stres koşulları
Aniyonik peroksidaz	Soğuk, CO ₂ fazlalığı
Askorbat peroksidaz	Kuraklık, CO ₂ fazlalığı, yüksek ışık şiddeti, ozon, bitki ilaçları
Katalaz	Soğuk, UV-B stresi (Cantarello vd. 2005)
Glutasyon	Soğuk, kuraklık, sıcak, CO ₂ fazlalığı, ozon, α ışınları, SO ₂
Glutasyon redüktaz	Soğuk, kuraklık, CO ₂ fazlalığı, ozon, bitki ilaçları
Poliamin	K, P, Ca, Mg, Fe, Mn, S ve B eksikliği, kuraklık, sıcak, ozon
Süperoksit dismutaz	Soğuk, CO ₂ fazlalığı, yüksek ışık şiddeti, O ₂ fazlalığı, ozon, bitki ilaçları, SO ₂

Oksidatif strese neden olan çevre koşulları arasında kuraklık, sıcaklık, soğuk, ağır metaller, kök nodülasyonu, yaralanma, hava kirliliği (artan miktarlarda ozon veya kükürt dioksit), UV ışığı ile fotoinhibisyonu artıran yüksek ışık miktarı başta gelir. ROT'lar düşük konsantrasyonlarda savunma ile ilgili genlerin uyarılmasında, savunma cevaplarının oluşmasında görev yapmasına karşın yüksek konsantrasyonlarda rastgele reaksiyonlarla lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına, protein denatürasyonuna, programlı hücre ölümüne (apoptosis) ve karbonhidratlar da dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısındaki neredeyse bütün biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşü olan veya olmayan etkiler oluşturmaktadır (Laurent ve Ardaillou 1986, Paller vd. 1984, Nath ve Norby 2000, Zushi ve Matsuzoe 2009).

1.10 Katalaz

Katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase; EC 1.11.1.6, CAT) glikoprotein yapısında bir proteindir, molekül kütlesi 240.000 daltondur. Her biri ferriprotoporfirin grubu (heme- Fe^{+3}) içeren dört alt birimden oluşmaktadır. Bitkilerde peroksizomlarda ve glioksizomlarda bulunan katalaz peroksizomlarda daha etkilidir. Katalazın çimlenmekte olan tohumlarda yağ asitlerinin β -oksidasyonu sırasında fotosolunumda işlevi vardır ve hidrojen peroksitin su ile oksijene indirgenmesinde görevlidir (Scandolis 1987, Canvin 1990, Jithesh vd. 2006b ve Willekens vd. 1997). Bu görevi ile CAT, hücrel bileşiklerin zarar görmesini engelleyen bir koruyucu antioksidan enzimdir. Hidrojen peroksit CAT tarafından parçalanmadığında hidroksil radikallerin öncüsü olarak işlev görmektedir ve bu radikaller hücrede kalıcı hasara neden olabilmektedir (Lanir ve Schejter 1975, Jones ve Maters 1976, Nicholls vd. 2000).



Bitkilerde katalaz; fotosolunum, çimlenen tohumlarda yağ asitlerinin β -oksidasyonu, tuz ve diğer abiyotik stres şartları sırasında H_2O_2 'nin ortamdaki uzaklaştırılmasında görev yapmaktadır (Canvin 1990, Willekens vd. 1995, Willekens vd. 1997). Bitki

katalazlarının çok yönlü fonksiyonlarını yerine getirmek için bitki sistemlerinde çeşitli görevleri olan bu önemli enzimin farklı izozimleri bulunmaktadır. Bu nedenle bitkiler küçük bir gen ailesi tarafından kodlanan birçok CAT izozimi geliştirmiştir. Hint yağı bitkisinde 2 izozim (Ota vd. 1992) , tütün (*Nicotiana tabacum*) (Havir ve Mc Hale 1987), *Nicotiana plumbaginifolia* (Willekens vd. 1994), mısır (Scandolis vd. 1980) ve *Arabidopsis*'te (Frugoli vd. 1996) 3 izozim bulunmaktadır.

Bitki katalazları 3 ana sınıfa ayrılmıştır. Yapılan bu fonksiyonel filogenetik sınıflandırmanın en ilgi çekici üyesi sınıf I'dir. Bu sınıf monokot (tek çenekli) ve dikot (iki çenekli) katalazları içermektedir. Bunların ifade edilmesi ve düzenlenmesinde farklılıklar bulunmaktadır. Fotosolunum ve glioksizomal fonksiyonlarda yer almaktadırlar (Guan ve Scandolis 1996).

Sınıf II katalazlar, çoğunlukla dikot katalazlardır. Sınıf II katalazların bitkilerde strese verilen yanıtta önemli bir rolü vardır. Örneğin bazı Sınıf II katalaz genleri, yaralanma (kabak; Esaka vd. 1997), patojen enfeksiyonu (patates; Niebel vd. 1995), bozulma sonrası yanıt (manyok bitkisi, *Manihot esculenta*; Reilly vd. 2001), ultraviyole ve ozon radyasyonu (*Nicotiana plumbaginifolia*; Willkens vd. 1994) ile tuz stresi (Savoure vd. 1999, Jithesh vd. 2006b) gibi abiyotik stres faktörleri tarafından uyarılan oksidatif stres faktörlerine karşı duyarlıdır. Bu katalazların yeni lokalizasyon ve fonksiyonlar kazanmak üzere fotosolunumda yer alan katalazlardan uzaklaşmış olması mümkündür. Örneğin patatestte sınıf II katalazlar peroksizomlarda bulunmaktadır (Niebel vd. 1995).

Sınıf III katalazlar monokotlara özgüdür ve diğer iki sınıf üyelerinden farklılık gösterir. Filogenetik analizler, mısır Cat3, arpa Cat2 ve pirinç Cat1'lerini içeren Sınıf 3 monokot katalazların belirgin şekilde ayrı bir grup olduğunu ortaya koymuştur (Guan ve Scandolis 1996). Bitkilerde katalazlar yaprak peroksizomlarında veya çimlenmekte olan tohumlarda glioksizomlarda bulunmaktadır. Ancak mısır CAT3'üne özgü olarak peroksizomlar yerine mitokondride yer aldığı görülmüştür (Scandolis vd. 1980).

Tuz stresinin katalaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada boyama metotları ile veya spektrofotometrik olarak total katalaz aktivitesine bakılmıştır. Ancak total katalaz aktivitesi ölçümleri katalazın farklı izoformlarının görevleri ile ilgili bilgi vermemektedir. Diğer taraftan elektroforez jelleri ile aktivite belirlenmesine dayalı metotlar da kesin sonuç vermemektedir. Çünkü katalaz izozimleri birkaç bant verebilmektedir (Eising vd. 1990). Bu nedenle benzer metotlar ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin güvenilir olmayabileceği düşünülmektedir. Alternatif bir metot ise stres uygulaması sonrasında üç katalaz sınıfının her birinin enzimleri için mRNA düzeyinde meydana gelen değişikliklerin gözlemlenmesidir (Jithesh vd. 2006a).

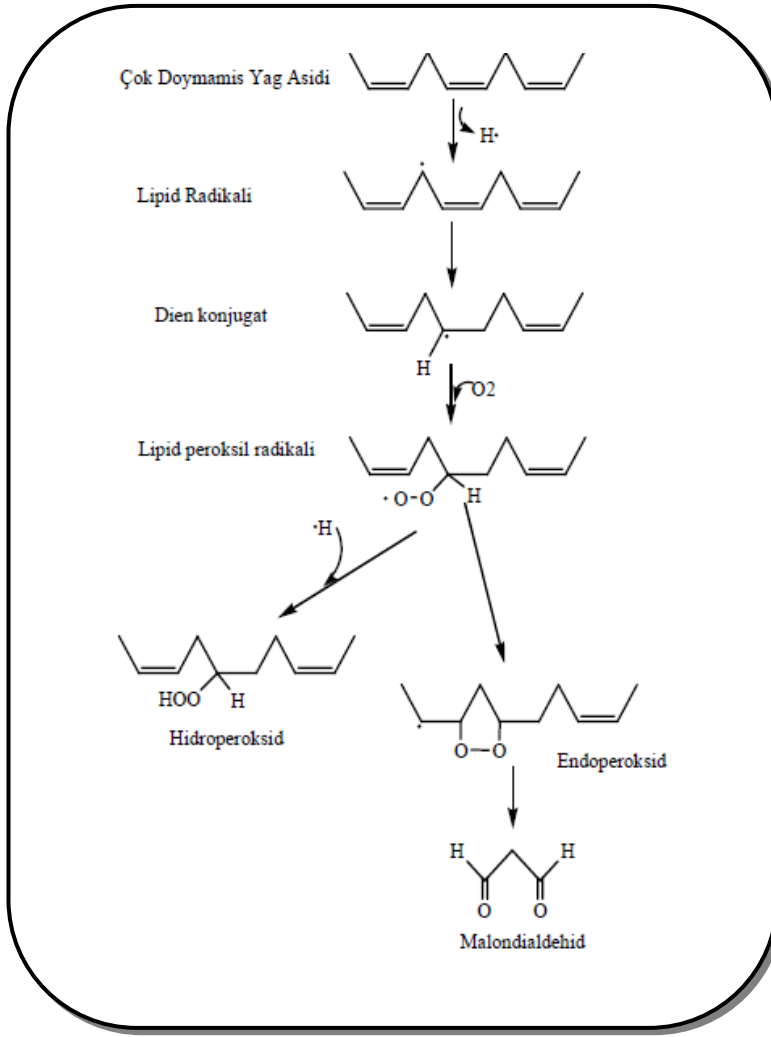
Birçok kuraklık durumu altında total CAT aktivitesi iki katına çıksa bile yaprak H_2O_2 içeriği artmaktadır. CAT1 ve CAT2'nin günlük regülasyonu, mRNA miktarı bütün koşullarda belirlenmekte, gece/gündüz CAT1 ve CAT2 ekspresyon patterni az veya çok kurak şartlar altında modifiye edilmektedir. CAT1 transkriptlerinin varlığı sirkadiyen kontroller ile düzenlenmekte olup sürekli karanlıkla ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte CAT2 ise ışık ile aktive olmaktadır. Kuraklık miktarının azalması CAT1 ve CAT2 mRNA'larının modifiye olmasına neden olmaktadır. CAT mRNA'sının kompleks olan regülasyonu özellikle translasyon basamağında yaprak H_2O_2 birikiminin kontrol edilmesini sağlamaktadır (Luna vd. 2005).

1.11 Lipid Peroksidasyonu

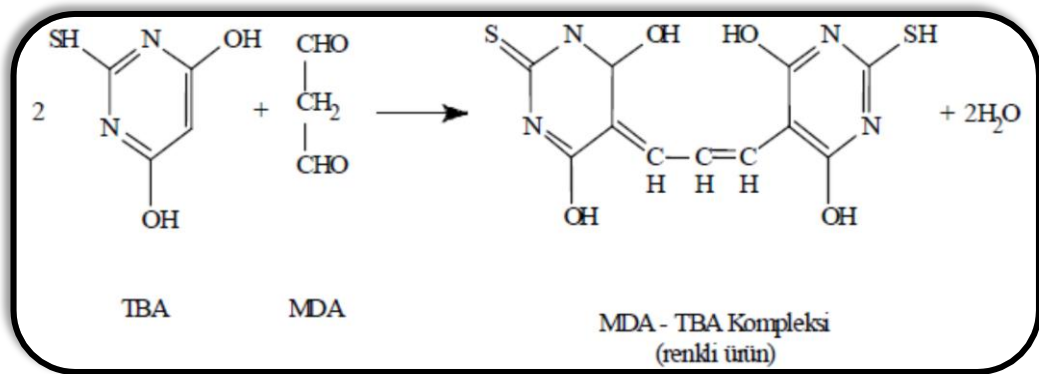
Serbest radikaller hücreyi oluşturan tüm yapılarla reaksiyona girebilirler ancak bu etkileşime en hassas yapılar lipidlerdir (Cheeseman 1993). Bu radikallerin en yaygın bilinen zararı, zincir reaksiyonlardan oluşan lipid peroksidasyonunu başlatmalarıdır. Serbest oksijen radikallerinin dokulara etkisi ile oluşan, lipid peroksidasyonu esnasında, oldukça reaktif bir metabolik ürün olan malondialdehit (MDA) oluşmaktadır (Weinberger vd. 2004). Plazma MDA düzeyinin belirlenebilmesi dokulardaki lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden biridir (Knight vd. 1988). Lipid peroksidasyonunun ürünleri ileriki aşamalarda membran proteinlerinde hasara yol açarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (Wu ve Cederbaum, 2003).

Lipid peroksidasyonu, zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açarak zar lipid yapısını değiştiren, hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (Thomas 1999). Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar. Böylece yağ asidi zinciri bir lipid radikali özelliği kazanır (Buege ve Aust 1985). Kendi kendine devam eden bu zincir reaksiyonlarında hücre membranında meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu, membran lipoproteinlerinin oksidasyonuna ve yapısal bütünlüğün bozulmasına sebep olarak iyon dengesinin bozulmasıyla hücre ölümüne neden olmaktadır (Uzan 2000). Lipid peroksidasyonu zincirleme reaksiyonları ve malondialdehit oluşumu şekil 1.5’de gösterilmiştir (Murray vd. 1996).

Malondialdehid (MDA) hücreler ve hücre içi membranlar ile reaktif oksijen türleri arasındaki etkileşimden sonuçlanan lipid peroksidasyonunun son ürünüdür (Uzun vd. 2010). MDA, üç ya da daha fazla sayıda çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Oluşan MDA, hücre membranlarında gerçekleşen iyon alışverişi sırasında membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına, hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara neden olmaktadır (Rio vd. 2005). Bu durum iyon geçirgenliğinde, enzim aktivitesinde ve diğer membran özelliklerinde olumsuz değişikliklere neden olmaktadır. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA’nın azot bazları ile reaksiyona girebilecek bir üründür (Kalender vd. 2002, Niki 1987, Porter 1984, Akkuş 1995).



Şekil 1.4 Lipid peroksidasyonu zincirleme reaksiyonları ve malondialdehit oluşumu



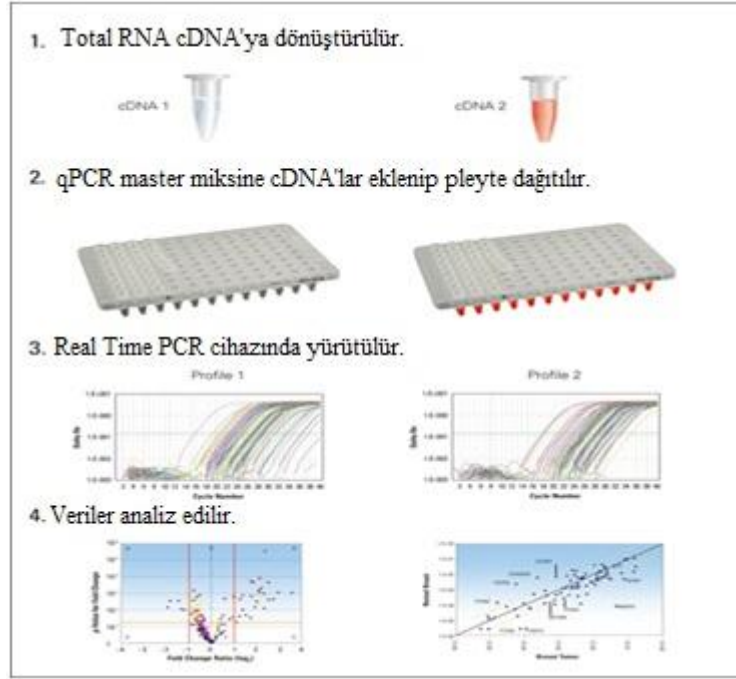
Şekil 1.5 MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı

1.12 Real Time PCR

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan yakın bir zamanda uygulamaya konulan güncel bir metottur (Gibson vd. 1996). Bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (Şekil 1.7). Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Günel 2007). Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (Bustin 2000).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra; mutasyon analizi, patojen belirleme, gen ekspresyonunun belirlenmesi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (Kubista vd. 2006).

Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi ile görüntülenme işlemine gerek kalmamaktadır. Real-time PCR analizlerinde, diziye özgü olmayan floresans boyalardan ya da diziye özgü problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (Güngör 2006). Gen ekspresyonu analizinde daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken olması tercih edilmesinin sebebidir (Günel 2007).



Şekil 1.6 Real Time PCR metodunun şematik gösterimi (www.sabiosciences.com 2010)

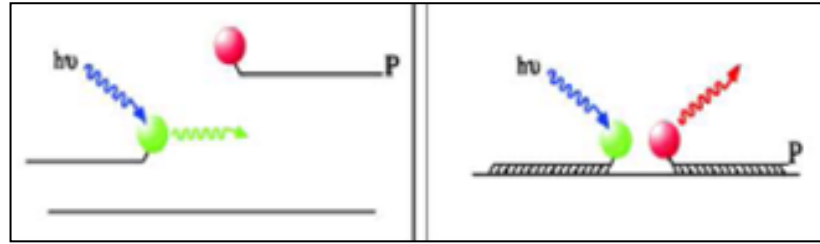
1.12.1 Floresan prob sistemleri

- DNA'ya bağlanan boyalar: SYBR Green
- Hidroliz problemleri: TaqMan, Moleküler Boncuk
- Hibridizasyon problemleri: Light Cyler (Roche)

1.12.2 Hibridizasyon prob yöntemi

Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler®” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (verici), 5' ucunda LC Red 640 boyası (alıcı) bulunmaktadır. İki oligonükleotitin dizileri, amplifiye olan DNA fragmentlerine “baş-kuyruk” şeklinde hibridize olabilecekleri şekilde seçilmiştir. Oligonükleotitler bu düzende hibridize olduklarında iki floresans boya birbirlerine yakın yerleşmiş olur. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı gerçekleşir. İlk boya (fluorescein) uyarılır ve uzun dalga boyunda olan yeşil floresans

ışık yayar. İki boya birbirlerine yaklaştıklarında enerji “verici” boyadan “alıcı” boyaya transfer olur. Yayılan enerji ikinci probun üzerinde bulunan LC Red 640’ı uyarır ve kırmızı floresans ışığını daha da uzun bir dalga boyunda yayar. Bu enerji transferi FRET (floresans rezonans enerji transferi) olarak tanımlanır. FRET’in sağlanması için iki prob arasındaki uzaklık çok önemlidir (1-5 baz). Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar. Hibridizasyon probleleriyle duyarlılık ve yüksek özgüllük sağlanmış olur (Güngör 2006, Günel 2007).



Şekil 1.7 Hibridizasyon Prob yönteminin şematik gösterimi (Günel 2007)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkilerde evrimi şekillendiren ve şekillendirmeye devam eden abiyotik stres faktörleri arasında su durumu çok önemlidir. Daha geniş bir ifadeyle su sıkıntısı özellikle tuz ve kuraklık stresi ile ortaya çıkmaktadır. Tuz, kuraklık ve düşük sıcaklık stresi, bitkilerin tüm genetik yapısını etkilediğinden, tarım için en önemli sorunlardır (Zhu 2002). Tuz stresi, dünyanın pek çok yerinde bitki tarımını etkilemektedir (Epstein vd. 1980). Bitkiler tarafından kolayca alınabilen suda çözünen tuzlar çeşit ve miktarlarına göre belli bir konsantrasyonun üzerine çıktığında, bitkide beslenme ve metabolizmayı bozarak zehirleyici etki yapmaktadırlar. Toprakta artan tuz konsantrasyonu bitkinin topraktan suyu almasını zorlaştırmakta, toprak yapısının bozulmasıyla bitki gelişimi yavaşlamakta, hatta durmaktadır (Köşkeroglu 2006). Tuz stresi ile karşılaştırıldığında, kuraklık sorunu daha yaygın olmakla birlikte ekonomiyi de büyük ölçüde etkilemektedir (Boyer 1982). Bu nedenle, kuraklık stresi, kesinlikle ayrı bir şekilde ele alınmalıdır. Bununla birlikte su stresi üzerine yapılan araştırmaların çoğu öncelikle tuz stresi üzerine odaklanmıştır. Çünkü tuz ve kuraklık stresine karşı bitki mekanizmalarında oluşan cevaplar birbiri ile yakından ilişkilidir ve benzerlik göstermektedir. Kuraklık stresi ile karşılaştırıldığında tuz stresi, laboratuvar ortamında daha kolay ve hassas bir şekilde uygulanabilmektedir. Tuz ve kuraklık stresindeki sinyallerin önemi uzun zaman önce tespit edilmesine rağmen moleküler mekanizma tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Tuz stresi tohum çimlenmesi, fide büyümesi ve güçlenmesi, vejetatif büyüme, çiçek açma ve meyve üretimi gibi yönlerden bitki gelişimini etkilemektedir (Sairam ve Tyagi 2004). Tuzdan etkilenen bitkilerde öncelikle iyonik dengesizlik ve hiper ozmotik stres görülmektedir. Bu durum hücre ve tüm bitki seviyesinde kendini göstermektedir. İyonik ve su dengesindeki çok büyük değişiklikler (veya bozulmalar) moleküler hasara ve büyümenin durmasına sebep olmaktadır. Sonuçta ekstrem tuz şartları bitkide doku ölümüne ve sonunda bitki ölümüne yol açmaktadır (Zhu vd. 1997; Xiong ve Zhu 2002). Bu hasarın en önemli sonucu bitki hücrelerinin farklı hücre kısımları içerisinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimidir (Smirnoff 1993). ROT'lar bitkilerde normal metabolik olaylar sırasında rutin olarak üretilmektedir. Kloroplastlar, mitokondri ve peroksizomlar O_2^- ve H_2O_2 gibi ROT'ların hücre içi üretiminde en önemli üreticilerdir. Ayrıca ROT'lar mitokondriyal elektron transportunda da gözlenmiştir (Zhag vd. 1990,

Hernandez vd. 1993, Hamilton ve Heckathorn 2001). Aktif oksijen türleri yüksek derecede reaktiftir ve bitkilerde savunma mekanizmalarının yokluğunda hücre yapı ve fonksiyonunda farklı açılardan ciddi zararlara yol açabilmektedirler. Örneğin süperoksit radikali Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşumuna yol açmaktadır. Hidroksil radikali son derece toksik bir radikaldir ve lipid peroksidasyonu, DNA, protein ve diğer küçük moleküllerde hasar oluşumuna sebep olabilmektedir (Arora vd. 2002). Bu nedenle bitkiler ROT üretiminin zararlı etkilerine karşı koymak üzere serbest radikalleri uzaklaştırmak için enzimatik ve enzimatik olamayan güçlü süpürme yolları geliştirmişlerdir (Salin 1988). Bunların dışında demir depo proteini ferritin de reaktif oksijen türlerinin süpürülmesi ağına dahildir (Morel ve Barouki 1999, Mittler vd. 2004).

Scandalios, J.G. 1974 ve 1994 yıllarında yaptıkları çalışmalarda mısırdaki, birbirinden bağımsız yapısal genler olan Cat1, Cat2, ve Cat3'ün biyokimyasal olarak farklı CAT-1, CAT-2 ve CAT-3 izozimlerini kodladığını göstermiştir. CAT-1 ve CAT-2 izozimlerinin sitozol ve/veya glioksizomlarda/peroksizomlarda bulunurken, CAT-3'ün hücrede mitokondrilerde yer aldığını göstermişlerdir (Scandalios 1974, 1994).

Yaniv ve Werker 1983 yılında Solanaceae familyasında yer alan *Solanum khasianum*, *S. laciniatum*, *S. melongena*, *S. nigrum*, *S. tuberosum*, *Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum* ve *Hyoscyamus boveanus* türlerinde su tutucu bir madde olan polietilen glikol (PEG)'ün neden olduğu su stresi ile meydana gelen tepkileri incelemişlerdir. Bu bitkiler %4,5 PEG 1500, 4000 ve 6000 çözeltileri içine koyulduğunda yapraklarından çözelti salgılandığı gözlenmiştir. Mekanik hasara uğrayan köklerde bu salgının 20 dk sonra fidelerden salgılandığı, hasar olmayan sağlam kökleri olan bitkilerde ise 24 saat sonra yaprakların üzerinde kalan beyaz maddenin protoplast füzyonu ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ile PEG olduğu tespit edilmiştir (Yaniv ve Werker 1983).

Guan ve Scandalios (1995) yaptıkları çalışmada; embriyogenez ve çimlenme evrelerinden mısır katalaz genlerinin (*Cat1*, *Cat2* ve *Cat3*) salisilik asit (SA) uygulamasına verdiği tepkileri araştırmışlardır. Tohum çimlenmesi ile ilişkili olarak her bir mısır katalaz geninin çeşitli dozlardaki SA uygulamalarına farklı yanıtlar verdiği

gözlemlenmiştir. *Cat2* transkripti ve Cat-2 izozim proteininin birikimi total katalaz aktivitesinin artışına büyük katkı sağlamıştır. Bu evrede görülen artış çimlenen tohumların gelişim hızı ile paraleldir. Cat-2 içermeyen bir bireyde ise SA varlığında CAT-1 izozimi ile total katalaz aktivitesinin maksimum seviyede olduğu görülmüştür. Bu durum katalazın normal hücrel süreçlerin stres şartları altında korunmasında önemli olduğunu ortaya koymuştur (Guan ve Scandalios 1995).

Shalata ve Tal 1998 ile Shalata vd. 2001'de domates yaprak ve köklerinde antioksidant sistem üzerinde tuzla indüklenen değişiklikleri çalışmışlardır. 100 mM NaCl stresi altında tuza hassas çeşitlerin kök ve yapraklarında H_2O_2 ve lipid peroksidasyonunda artış ile birlikte antioksidant enzimlerin aktivitesinde, askorbik asit ve glutatyon içeriğinde düşüş gözlenmiştir (Shalata ve Tal 1998, Shalata vd. 2001).

Polidoros ve Scandalios (1999) yılında yaptıkları çalışmada; mısır (*Zea mays* L.)'da hidrojen peroksit (H_2O_2)'in *Cat* ve *Gst1* genlerinin ekspresyonun düzenlenmesinde birçok antioksidantın rolü araştırılmıştır. Düşük H_2O_2 konsantrasyonun *Cat1*, *Cat3*, ve *Gst1* gen ekspresyonunu inhibe ettiği, daha yüksek dozlarda ise bu genlerin güçlü bir şekilde uyarıldığı görülmüştür. Zamana bağlı deneylerde yüksek konsantrasyonda H_2O_2 'nin *Cat1*, *Cat2* ve *Gst1* genlerinin daha yüksek seviyede ve düşük H_2O_2 konsantrasyonuna göre daha kısa sürede eksprese olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar mısırdaki antioksidant gen cevabının düzenlenmesinde H_2O_2 'nin doğrudan sinyal iletiminde görevli olduğunu göstermiştir (Polidoros ve Scandalios 1999).

Hamilton ve Heckathorn (2001) yaptıkları çalışmada, *Zea mays* (mısır)'da NaCl stresinin mitokondriyal elektron transportunda ROT'ların meydana getirdiği hasardan kaynaklandığını ortaya koymuşlardır (Hamilton ve Heckathorn 2001).

Takemura vd. (2002) *B. gymnorrhiza*'da NaCl uygulaması sonrası NaCl uygulanmayan kontrol grubuna göre katalaz mRNA düzeyindeki değişiklikler incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan katalaz cDNA'sı katalaz proteinin bir kısmına ait proteini

kodlamakta tümünü karakterize edememektedir. Bu belirli izoformun tuz stresine verilen yanıtta görev almadığı düşünülmektedir (Takemura vd. 2002).

Mittova vd. (2003 ve 2004) yaptıkları çalışmalarda, 100 mM NaCl stresi altında tuza hassas domates çeşitlerinin kloroplast, mitokondri, plastidler ve peroksizomlarında antioksidant enzimlerin aktivitesinde ve antioksidant içeriklerinde tuz stresi ile bir artış meydana gelmediğini belirlemişlerdir. Artan H₂O₂ içeriği ve lipid peroksidasyonu ile oksidatif stresin indüklendiğini ortaya koymuşlardır (Mittova vd. 2003, 2004).

Wang vd. (2004) *Thellungiella halophila* ile yapılan çalışmalarında ilginç bulgular ortaya koymuşlardır. *T. halophila* neredeyse 500 mM NaCl'ye dayanabilmekte, *A. thaliana*'nın yaşayamadığı tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedir (Wang vd. 2004).

Bolu ve Polle (2004) *Populus x canescens* 'a hidroponik kültür içinde 3 hafta süresince 25 mM ve 100 mM NaCl uygulamışlardır. 100 mM NaCl ile yüksek tuzluluğun lipid peroksidasyonuna yol açtığını, tuzlulukla SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış olduğunu, uygulama süresinin artması ile SOD enzim aktivitesinde artış olurken CAT enzim aktivitesinde değişiklik olmadığını belirlemişlerdir. Bu nedenle uzun dönem uygulanan NaCl ile membranlarda meydana gelen oksidatif hasarın savunma sistemlerinin dengesizliğine neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Bolu ve Polle 2004).

Turhan ve Ekici 2005 yılında yaptıkları çalışmada tuzluluk ve kuraklık kombinasyonlarının ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Tuz stresi için 0, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl, kuraklık stresi için %9 ve %18 PEG (4000), kombinasyonlar için ise 50 mM tuz + %4.5 PEG, 100 mM tuz + %9 PEG ½ Hoagland çözeltisine eklenerek uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre NaCl ve PEG miktarlarında meydana gelen artış bitkilerin çimlenmesini ve gelişimini olumsuz etkilemiş ve kontrole göre çimlenmede 1-4 gün gecikmeye sebep olmuştur. Yüksek konsantrasyonda tuz uygulandığında ise çimlenme yüzdesi %50-60' a kadar düşmüştür. Aynı ozmotik basınca sahip tuz ve PEG

çözeltilerinin fide gelişimi üzerindeki etkisi farklı olmuştur. PEG'in fide gelişimi üzerine etkisi NaCl'ye göre daha fazla olmuştur. Çalışmada uygulanan tuz ve kuraklık stresleri ile ayçiçeğinde bitki performanslarının belirlenmesinde kullanılabileceği, bununla birlikte kuraklık oluşturmada kullanılan PEG'in kullanımında daha dikkatli olunması gerektiği ortaya koyulmuştur (Turhan vd. 2005).

Romero vd. 2005'te *Lycopersicon esculentum*'a (domates) %12 PEG uygulayarak oluşturdukları kuraklık stresi sonrası CAT enzim aktivitesinde kontrole göre %47 artış belirlemişlerdir. Serbest radikallerin düzeyi %32 artarken H₂O₂ miktarında %52, lipid peroksidasyonunda ise %105 oranında artış görülmüştür (Romero vd. 2005).

Jithesh vd. (2006) gerçekleştirdikleri bir çalışmada; Sınıf II grubunda yer alan Cat1' in *A. marina*'da tuz ve yapraklara H₂O₂ ve ışık uygulanması ile oluşan oksidatif stres durumunda indüklendiği görülmüştür. *A. marina* köklerinden RNA izole edilerek yapılan çalışmada Cat1'e özgü prob kullanılmıştır ve benzer sonuç elde edilmiştir. Cat1 mRNA düzeyi 12 saat 500 mM NaCl stresi ile artmış olup hemen sonrasında azalmıştır. Normal mRNA düzeyi 24 saate kadar korunurken sonrasında gerileme gözlenmiştir (Jithesh vd. 2006a).

Cervilla vd. (2007) yaptıkları çalışmada; bor toksisitesine maruz bırakılan domates (*Solanum lycopersicum*) bitkilerinde oksidatif stres ve antioksidant enzim aktivitesini araştırmışlardır. Bor (B) toksisitesi bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Ancak bitki savunma sisteminde bor toksisitesinin etkileri hakkında hala çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bor toksisitesi uygulamaları büyümeyi azaltmaktadır. Artan bor miktarı ise çalışmada kullanılan iki çeşitin (Josefina ve Kosaco) yapraklarında malondialdehid ve H₂O₂ artışına sebep olmuştur. Bor toksisitesi her iki çeşitte de askorbat konsantrasyonunun artmasına, glutatyon seviyesinin ise sadece Kosaco’da yükselmesine sebep olmuştur. Bitki besin ortamında bor miktarının artması domates yapraklarında oksidatif hasara sebep olmakta, antioksidant enzim aktivitesinde ise genel bir artışa yol açmaktadır (Cervilla vd. 2007).

Kuşvuran vd. (2007) gerçekleştirdikleri araştırmada; kavunda tuza tolerans yönünden genotipler (36 adet genotip) seviyesinde farklılık olup olmadığını, biyomas değerleri ile tuza toleransı, yapraklarda iyon birikimi düzeyinin kullanılma olanağını ve tuz stresi sırasında yapraklarda MDA miktarında meydana gelen artışı incelemişlerdir. Kavunda meydana gelen tuz hasarının Na^+ ve Cl^- iyonlarının toksik etkisinden kaynaklandığı, bu iyonları daha az konsantrasyonda bulunduran genotiplerde tuza toleransın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırmada çalışılan genotipler arasından Midyat, Besni ve Şemame kavun genotipleri tuza toleranslı, Ananas ve Yuva çeşitlerinin ise tuza en duyarlı kavun çeşitleri olduğu bulunmuştur (Kuşvuran vd. 2007).

Kuşvuran vd.'nin (2008) yaptıkları başka bir çalışmada ise; *Cucumis* sp bitkilerine uyguladıkları 100mM tuz stresi sonrası bitki yapraklarında Na^+ , K^+ , Cl^- iyon miktarı, lipid peroksidasyonu ve klorofil miktarında meydana gelen değişimleri incelemişlerdir. Çalışmalarında iki adet tuza toleransı yüksek olan ticari çeşit (Galia C8 ve Galia F1), üç adet tuza orta seviyede toleranslı yerel çeşit (Besni, Midyat ve Şemame), iki adet hassas kavun çeşiti (Ananas ve Yuva) ile bir adet acur hattı (*C. flexuosus*) kullanmışlardır. Kontrol bitkileri ile tuz uygulanan genotipler karşılaştırıldığında, tuz uygulanan genotiplerde Na^+ ve Cl^- iyonları önemli seviyede artarken, K^+ iyonunda ise azalma belirlenmiştir. Tuz stresi uygulanan tuza hassas genotiplerde MDA miktarında artış kaydedilirken, klorofil miktarında değişen seviyelerde azalma görülmüştür (Kuşvuran vd. 2008).

Doğan vd. (2008) araştırmalarında 22 yerli (*Lycopersicum esculentum*), 3 yabani (*L. peruvianum*, *L. pennellii*, *L. hirsutum*) olmak üzere 25 çeşit domates tohumuna 25 °C'de 15 gün boyunca 0, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM NaCl stresi uygulamışlardır. Fizyolojik özellikler bakımından sınıflandırılan tohumlar tuz toleransına en duyarlı olabilecekleri çimlenme devresinde, çimlenme yüzdesi esas alınarak incelenmiştir. Tuzluluğun çimlenme yüzdesine ne şekilde etki ettiği incelenerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında, tuza dayanıklı olduğu bilinen yabani çeşitlere en çok benzerlik gösteren yerli türler dayanıklı, en çok farklılık gösteren türler ise hassas olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan domates çeşitleri arasında maksimum tuz konsantrasyonu toleranslı genotiplerde 125-150 mM NaCl

ortamında, hassas genotiplerde ise 50-75 mM NaCl ortamında belirlenmiştir (Doğan vd. 2008).

Doğan vd. (2009) gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada; tuz stresi uygulanan domates (*Lycopersicon* sp) fidelerinde kalsiyum miktarında meydana gelen değişimleri incelemiştir. 150 mM NaCl stresi uyguladıkları 3 yabancı, 22 yerel türe ait toplam 25 genotip üzerinde çalışma yapmışlardır. Literatürde dayanıklı çeşitlere en çok benzerlik gösteren *L. esculentum* (TR-55711 ve TR-68516) 'da Ca^{+2} miktarında belirgin bir düşüş gözlenirken, yabancı türlere göre en çok farklılık gösteren *L. esculentum* (TR-47815 ve TR-47882)'da belirli ölçüde artış belirlenmiştir. Özellikle dayanıklı türler stres şartları altında bitki içine kalsiyum alımını azaltarak stres süresi ve şiddetine bağlı olarak kendini savunmaya çalışmıştır. Hassas türlerde ise hücre zarı geçirgenliği bozularak fazla miktarda kalsiyum ile birlikte diğer iyonların da bitki içine alındığı gösterilmiştir (Doğan vd. 2009).

Dai vd. (2009) kanola (*Brassica napus* L.) bitkisinde antioksidan enzimler üzerine tuz stresinin etkilerini araştırmışlardır. 0, 100, 150, 200, 250 ve 300 mmol L⁻¹ NaCl 24 saat uygulandıktan sonra kanola fidelerinin yaprak bağıl su içeriğinde ve elektriksel iletkenliğinde kademeli olarak bir azalma görülmüştür. Artan tuz stresi altında peroksidaz (POD), superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri yavaş yavaş artmıştır. 24 saat sonrasında POD ve SOD aktiviteleri 200 mmol L⁻¹ iken, CAT 150 mmol L⁻¹'den daha düşük seviyededir. Daha sonra bu antioksidan enzimlerin tümünün aktivitesi azalmıştır. Kantitatif real time PCR analizleri bu genlerin tuz ile uyarılabilen genler olduğunu, tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte dereceli olarak transkript düzeylerinin de artış gösterdiğini ortaya koymuştur. POD ve SOD enzim aktiviteleri ile benzer şekilde POD ve SOD transkript seviyeleri 24 saat 200 mmol L⁻¹ NaCl uygulaması sonrasında en yüksek seviyeye gelmiştir. CAT ise 150 mmol L⁻¹ NaCl altında en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar POD, SOD ve CAT genlerinin NaCl stresi ile uyarıldıklarını ve enzim aktivitelerinin de genlerin ekspresyonları ile pozitif şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir (Dai vd. 2009).

Goupil vd. (2009) gerçekleştirdikleri çalışmalarında; 0-80-160-320-640 μ M As (V) ve Cr (VI) ile 24 saat muamele ettikleri domates kök ve sürgünlerinden RNA izole ederek kantitatif real time PCR ile Hsp 90-1, MT2 ve GR1 ile ilişkili protein genlerini araştırmışlardır. MT2 ve GR1 ile ilişkili transkriptler As(V) ile muamele edildiğinde domates köklerinde birikmektedir, fakat Cr(VI) uygulaması ile çok az etkilenmiştir. Domates bitkileri Cr(VI) uygulanarak ağır metal toksistensine maruz bırakıldığında fenotipik semptomlar göstermekle birlikte As(V) uygulaması ile bu değişimler gözlemlenmemektedir. 1280 μ M Cr(VI) uygulamasında bitki ölümü gerçekleşmiştir. Bu çalışmadaki araştırılan şartlar altında domates bitkilerinin As stresine Cr stresinden daha toleranslı olduğu ortaya koyulmuştur (Goupil vd. 2009).

Lovdal ve Lillo (2009) sürekli ifade edilen genler olduğu varsayılan aktin (ACT), β -tubulin, uzama faktörü 1 α (EF1), gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), fosfogliseratkinaz (PGK), ribozomal protein L2 (RPL2), ubiquitin (UB1) ve protein fosfataz 2A (PP2Acs)'nın katalitik alt ünitesinin domates yapraklarında gen ekspresyonunun normalizasyonu için referans olarak kullanılabilme potansiyelini araştırmışlardır. Azot azlığı (noksanlığı) düşük sıcaklık ve yetersiz ışık gibi şartlar altında geliştirilen domateslerde aday referans genlerin ekspresyon kararlılığı test edilmiştir. Bu amaçla karşılıklı çapraz doğrulama ile büyük bir grup aday referans gen uygulanmıştır. Yaygın olarak kullanılan referans genlerden GAPDH ve PGK ışık stresi durumunda üst sırada yer almıştır, azot ve soğuk stresi altında ise yetersiz kalmıştır. Bunun aksine azot ve soğuk stresinde EF1 üst sıraya geçerken ışık stresi uygulandığında sıralamanın altında kalmıştır. Sık kullanılan ACT ve UBI referanslarının yanı sıra, araştırmalarda sık kullanılmayan RPL2 ve PP2Acs'nin bir bütün olarak veriler incelendiğinde sabit bir düzeyde ifade oldukları görülmüştür. Bütün deney şartları altında diğer genlerden başka herhangi birinden daha iyi bir şekilde sabit ekspresyon düzeyi gösteren olmamıştır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar domatesten gen ekspresyonunun normalizasyonu için özenle (dikkatli bir şekilde) seçilen referans genlerin geometrik ortalamasının alınması gerektiğini ortaya koymuştur (Lovdal ve Lillo 2009).

Zushi ve Matsuzoe (2009) iki domates çeşitinde iki hasat mevsimi boyunca tuz stresinin oksidatif parametreler, antioksidan içeriği ve antioksidan enzimler üzerine etkisini araştırmışlardır. Besin çözeltisine 100 mM NaCl eklenerek tuz stresi uygulanmıştır. Tuz ile indüklenen oksidatif stresten kendilerini korumak amacıyla, domates meyvelerinin, antioksidan sistemleri olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçları lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit düzeyleri ile de desteklemişlerdir. Bununla birlikte bu antioksidan sistemlerin domates çeşidine ve hasat mevsimine bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Yaz mevsimindeki hasatta antioksidan sistemler tuz stresinde "House Momotaro" (normal meyveli) domates çeşidinde askorbat peroksidaz (EC.1.11.1.11) ve glutatyon redüktaz (EC 1.6.4.2) enzimatik reaksiyonlarına bağlıdır. "Mini Carol " çeri domates çeşidinde ise askorbat ve glutatyonun enzimatik olmayan reaksiyonları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Kış mevsiminde yapılan hasatta her iki domates çeşidinde de antioksidan sistemler tuz stresi ile etkilenmemiştir. Ancak her iki çeşitte de iki mevsimde yapılan hasatlarda prolin içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Antioksidan sistemlerde tuz ile indüklenen değişikliklerin mevsim ve çeşide göre farklılığının, çeşitlerin antioksidan kapasitelerinin farklı olmasından ve sıcaklık, radyasyon gibi büyüme/gelişme şartları ile tuz stresi arasındaki ilişkiden kaynaklanabileceğini ortaya koymuşlardır (Zushi ve Matsuzoe 2009).

Zribi vd. (2009) tuz stresine karşı domateste (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Grande) oluşan tepkileri, strese karşı oluşturdıkları yanıtları, bitki gelişimi üzerine etkilerini, su ilişkilerini, stoma iletkenliğini ve klorofil ışınımını araştırmışlardır. Domates bitkileri kontrollü şartlar altında torf içerisinde geliştirmiştir. 0, 25, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl içeren konsantrasyonlarda 28 gün tuz stresine maruz bırakılmıştır. Denemeler sonrasında bitki gelişiminin artan tuz konsantrasyonu ile önemli derecede düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Üç hafta boyunca tuz uygulamasının ardından, stomatal iletkenlik (gs) ve su potansiyelinde (Ψ_w) azalma kaydedilmiştir. Tuz uygulamasının klorofil ışınım parametrelerinde değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür. Dördüncü haftada su potansiyeli ve stoma iletkenliği önemli ölçüde azalmıştır. PSII (fotosistem II) fotokimyası tuz stresi uygulanan bitkilerin ışığa adapte olmuş yapraklarında modifiye olmuştur. Karanlığa adapte olmuş yapraklarda PSII fotokimyasının maksimum kuantum verimliliğinde değişiklik olmadığı görülmüştür (Zribi vd. 2009).

Giornio vd. (2010) sıcaklığa toleranslı bir domates çeşidinin gelişmekte olan anterlerinde sıcaklık stresi sisteminin iki önemli üyesi olan HsfA2 ve Hsp17-CII'nin kapsamlı bir ekspresyon analizini yapmışlardır. Anter veya polenlerin farklı gelişme basamaklarında transkripsiyonel analizi yarı kantitatif (sayısal) real-time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Gen ve protein ekspresyon profillerinin analizine göre, HsfA2 ve Hsp17-CII anter gelişimi sırasında çok iyi bir şekilde regüle edilmiştir. Ayrıca kısa ve uzun süreli sıcaklık stresi şartlarında da indüklenmiştir. Bu verilere göre HsfA2'nin sıcaklık stresi altında domates anterlerinde savunma mekanizmalarının aktivasyonunda doğrudan doğruya rolü olabileceği gösterilmiştir. Dolayısıyla olumsuz sıcaklıklarda domateste meyve oluşumunda bu genlerin rolü olabileceği düşünülmüştür (Giornio vd. 2010).

Hamayun vd. (2010) *Glycine max*'a (soya fasulyesi) çimlenme öncesi ve sonrasında 15 gün boyunca uyguladıkları %8 ve %16 PEG 10000 ile oluşturdukları kuraklık stresinin büyüme, ürün niteliği ve hormonlar üzerine etkisini araştırmışlardır. Çiçeklenme öncesi ve sonrası her iki periyotta da kuraklık stresi altında büyüme ve ürün niteliğinde azalma belirlenmiştir. En büyük zarar çiçeklenme öncesi %16 PEG uygulanan bitkilerde görülmüştür (Hamayun vd. 2010).

Mhadhbi vd. (2011) gerçekleştirdikleri çalışmada; tuz stresi uygulanan *Medicago truncatula* bitkisinde nodüllerde tuzluluğun etkisini, nitrojenaz gibi azot fikse eden proteinleri ve lipid peroksidasyon seviyelerini analiz etmişlerdir. Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), superoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) ve guaiakol peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzim aktivitelerinin düzeylerini, artan konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamda 24 ve 48 saat muamele edilmiş nodül, kök ve yapraklarda analiz etmişlerdir. Bütün genotiplerde 24 saat tuz uygulaması sonrası köklerde gen ekspresyonu cevabının genellikle enzim aktiviteleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu kolerasyon hassas ve referans genotiplerde 48 saat uygulaması sonrasında bozulmuştur. Fakat 48 saat tuz uygulaması sonrasında toleranslı bir çeşitte bütün test edilen genler için yüksek bir indüklenme görülmüştür. Gerçekten bitki köklerinde antioksidan genlerin indüklenmesinin, yeterli miktarda enzim uyarılması ve savunma ile ilişkisi olabileceğini ortaya koymuşlardır (Mhadhbi vd. 2011).

Chen vd. (2011) yaptıkları çalışmada; *Helianthus tuberosus* L.'nin (yer elması) tuza toleranslı ve tuza hassas iki çeşidine hidroponik kültür içinde uyguladıkları 250 mM NaCl stresi ile MDA içerikleri ve antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikleri araştırmışlardır. Tuza toleranslı çeşit köklerinde MDA içeriği tuza hassas çeşit ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Ancak tuza hassas çeşidin CAT enzim aktivitesinin toleranslı çeşide göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Chen vd. 2011).

Ma vd. (2012)'nin yaptıkları çalışmada; *Triticum aestivum* L. 'ye (buğday) uygulanan 150 mM NaCl stresi ile MDA içeriği kontrole göre 1,5 kat artış gösterirken katalaz enzim aktivitesi de buna paralel olarak %13 artış göstermiştir (Ma vd. 2012).

Rasool vd. (2013) 8 nohut genotipi üzerine farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM) uyguladıkları NaCl'nin bazı antioksidan enzimler üzerine etkisini, lipid peroksidasyonu, kök ve sürgün yaş ve kuru ağırlığı ile klorofil içeriğinde meydana gelen değişikliği incelemişlerdir. Malondialdehit içeriğini belirlemek suretiyle yaptıkları lipid peroksidasyonu çalışmasında NaCl konsantrasyonundaki artışla birlikte lipid peroksidasyonun da bütün genotiplerde arttığını görmüşlerdir. Fakat tuza dayanıklı 2 genotip diğer genotiplerle karşılaştırıldığında çok daha az etkilenmiştir. NaCl konsantrasyondaki artış klorofil içeriğinde de değişime yol açmıştır. Genotiplerin tümünde artan tuz konsantrasyonu; SOD, CAT, askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitelerinde de artışa sebep olmuştur. Maksimum aktivite ise çalışmada kullanılan tuza dayanıklı 2 genotipte görülmüştür. Bu tuza dayanıklı ve tuza duyarlı çeşitler real time PCR ile daha detaylı analiz edildiğinde SOD, CAT ve APX ekspresyonları tuza dayanıklı çeşitlerde NaCl artışı ile artış göstermiştir. Tuza dayanıklı bitkilerde tuz stresine karşı dayanıklılığın artması, antioksidatif süreçte yer alan genlerin çevresel değişimin neden olduğu oksidatif stres ile tetiklendiğini göstermektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar NaCl'nin yol açtığı oksidatif stresin hücrenin normal fonksiyonunu engellediğini ortaya koymuştur (Rasool vd. 2013).

Jiang vd. (2013) kurak ve yarı kurak alanlarda yaşayan, kuraklığa son derece dayanıklı bir bitki olan ve baklagiller familyasından bir bakla tohumu olarak bilinen çim bezelyesi

(*Cathyrus sativus* L.)’ni incelemişlerdir. Çalışmada çim bezelyesi ve bahçe bezelyesi fideleri %20 polietilen glikol (PEG) 6000 ile 5 gün stres uygulanarak analiz edilmiştir. PEG çim bezelyelerinin gelişimini bahçe bezelyelerinden daha az engellemiştir. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve malondialdehit (MDA) birikimi bahçe bezelyelerinde çim bezelyelerine göre daha fazla olmuştur. Bahçe bezelyeleri ile karşılaştırıldığında çim bezelyesinde %20 PEG stresi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitelerinde önemli ölçüde artışa yol açmıştır. Bu enzimler çim bezelyesi yapraklarında transkripsiyonel düzeyde belirgin bir artış göstermiştir (Jiang vd. 2013).

Sen ve Alikamanoğlu (2013) *Beta vulgaris* L.’ye (şeker pancarı) uyguladıkları PEG 6000 konsantrasyonundaki artışla (10, 40, 80 g l⁻¹) birlikte MDA düzeyinde ve CAT enzim aktivitesinde paralel bir artış belirlenmiştir. Artan antioksidan içeriğinin lipid peroksidasyonu seviyesindeki artışı engelleyemediği görülmüştür (Sen ve Alikamanoğlu 2013).

Sikha vd. (2013) Solanaceae familyasından *Capsicum annuum* ‘Solan Bharpur’ un (biber) tohum gelişimi ve büyümesi üzerine PEG 6000 (%5 PEG, %10 PEG) ve NaCl (50 mM NaCl, 100 mM NaCl)’nin etkisini ve bu abiyotik stresler ile MDA düzeyinde meydana gelen değişimi incelemişlerdir. PEG ve NaCl konsantrasyonunun artmasıyla tohum çimlenmesinde azalma görülmüştür. PEG ile oluşturulan kuraklık stresi NaCl ile karşılaştırıldığında tohum gelişimini daha çok etkilediği, tuz ve kuraklık stresinin MDA düzeyinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Sikha vd. 2013).

Rout ve Sahoo (2013) Solanaceae familyasının tıbbi amaçlı kullanılan bir üyesi olan Aswagandha veya kış kirazı olarak da adlandırılan *Withania somnifera* L. ile yaptıkları çalışmada 7 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µM) uyguladıkları bakır (Cu) stresinin yaprak ve köklerdeki CAT, POX ve SOD’un gen ekspresyonu düzeyinde meydana gelen değişiklikleri bu genlere özgü primerler ile yapılan PCR bant yoğunluklarına göre değerlendirmişlerdir. CAT ve SOD gen ifade düzeyinde artış görülürken, POX gen ifadesinde değişiklik belirlenmemiştir. CAT gen

ifadesi düzeyi yapraklarda kontrole göre 25 ve 50 μM Cu uygulaması ile artış gösterirken, 100 ve 200 μM uygulamasında kontrole göre azalma gözlenmiştir. 200 μM Cu stresi ile CAT gen ifadesi kontrole kıyasla yaklaşık olarak %50 azalma göstermiştir. Köklerde ise CAT gen ifadesi uygulanan tüm Cu konsantrasyonlarında kontrole göre artmıştır. 25 ve 50 μM Cu stresine karşı bitkide oluşan ROT'lara karşı üretilen CAT seviyesi yüksekken, konsantrasyon artışıyla 100 ve 200 μM 'da bitki savunma mekanizması yetersiz kalarak CAT seviyesinde azalma görülmüştür. Bu çalışma ile bakır stresi altında farklı genlerin ifadelendiği ortaya koyulmuştur (Rout ve Sahoo 2013).

Marok vd. (2013) *Hordeum vulgare*'nin (arpa) kuraklığa duyarlı (Express) ve dayanıklı (Saida) iki çeşidine 15 gün boyunca sulama kesilerek uyguladıkları kuraklık stresi sonrası 8 gün suladıkları bitkilerin CAT ve SOD enzim aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Saida'da CAT enzim aktivitesi kurak şartlar altında daha yüksek belirlenirken, Express çeşidinde daha düşük miktarda belirlenmiştir (Marok vd. 2013).

Zhang vd. (2013)'nin *Broussonetia popyrifera* (acem dutu) bitkisine uyguladıkları 100 mM NaCl katalaz enzim aktivitesini düşürürken 150 mM NaCl katalaz enzim aktivitesinde belirgin bir artışa sebep olmuştur (Zhang vd. 2013).

Safari vd. (2013) *Corylus avellana* L.'ye (findık) düşük seviyede uyguladıkları düşük ses enerjili ses dalgaları ile oluşturdukları stres sonrasında CAT gen ekspresyonu ve enzim aktivitesinde meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. CAT enzim aktivitesi kontrole göre 4 kat artarken, CAT gen ekspresyonu uygulamadan 24 saat sonra artmaya başlamıştır (Safari vd. 2013).

Yıldızıtugay vd. (2013) çalışmasında *Sphaerophysa kotschyana*'ya (Hürmüz otu) 14 gün süre ile uygulanan 150 mM NaCl ile MDA içeriğinin kontrole göre %16 artış gösterdiği, buna karşılık katalaz enzim aktivitesinin ise %35 oranında azaldığı belirlenmiştir (Yıldızıtugay vd. 2013).

Kavas vd. (2013) yaptıkları çalışmada, Kırkağaç ve Galia kavun çeşitlerinin PEG ile oluşturulan ozmotik stres altında oluşan oksidatif hasarı ve antioksidant savunma cevapları karşılaştırılmıştır. Kavun fideleri iki farklı ozmotik potansiyele (0,2 Mpa ve 0,4 Mpa) ayarlanan PEG-6000 çözeltileri ile muamele edilmiştir. Fizyolojik parametrelerden MDA, prolin içeriği ile CAT, APX ve GR antioksidant enzimlerinin miktarı ölçülmüştür. Ayrıca kök ve sürgün dokularının taze ve kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Her iki çeşitte de artan ozmotik potansiyel ile önemli miktarda prolin belirlenmiştir. Kırkağaç' ta 0,4 Mpa ozmotik potansiyeli MDA içeriğinde önemli bir artışa sebep olmuştur. Galia çeşitinde de PEG konsantrasyonunun artmasıyla H₂O₂ miktarında artış kaydedilmiştir. CAT aktivitesi sadece 0,4 Mpa ozmotik potansiyeli her iki çeşitte de belirgin artış göstermiştir. PEG ile indüklenen ozmotik stres her iki çeşitte de GR aktivitesini değiştirmiştir. Bu sonuçlara göre Galia çeşidinin Kırkağaç'a göre kuraklığa daha toleranslı olduğu, kuraklık stresinin her iki çeşitte de antioksidant enzim aktivitesinde artış kapasitesine ve prolinin ozmotik stresten koruyucu fonksiyonu ile yakından ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu cevapların karşılaştırılması, kavun çeşitlerinde kuraklığa tolerans mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamıştır (Kavas vd. 2013).

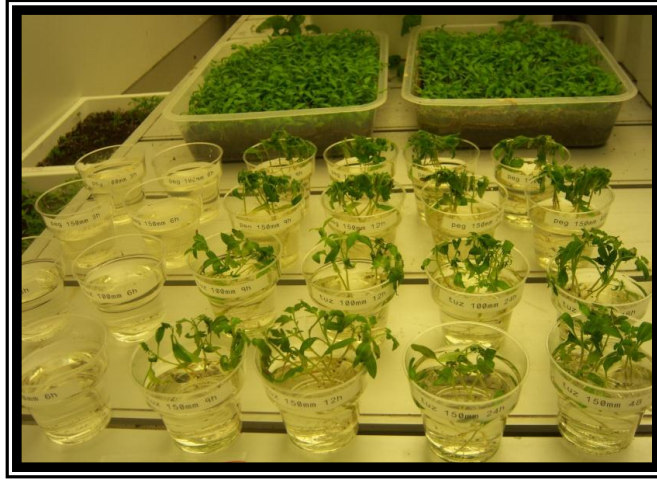
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

Beta Ziraat ve Ticaret A.Ş. Ankara’ dan temin edilen Falcon çeşidi domates (*Solanum lycopersicum* L.) tohumları, %1 sodyum hipoklorid ve saf su ile yüzey sterilizasyonunun ardından kurutma kağıtları üzerinde çimlendirildikten sonra, iki gerçek yapraklı bitkicik (yaklaşık 25 günlük fideler) haline gelinceye kadar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında bulunan, sıcaklık ve nem açısından kontrollü iklim ve geliştirme odasında Hoagland besisi ortamı içerisinde geliştirilmiştir. Her bir stres uygulaması için; 3 bağımsız kaptaki (biyolojik tekrar) 10’ar adet yetiştirilen toplam 30 bitki stres uygulama süreleri sonunda alınarak bir havuz oluşturulmuş, daha sonra RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örnekten de 3’er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir



Şekil 3.1 İklim ve bitki yetiştirme odası



Şekil 3.2 İklim ve bitki geliştirme odasında yetiştirilen bitkilere Hoagland besi ortamı içerisinde tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresinin uygulanması

3.2 Hoagland Besi Ortamı

Hoagland besi ortamı içeriği aşağıdaki gibidir:

Çizelge 3.1 Hoagland besi ortamı makro besin çözeltisi içeriği

Makro besin çözeltisi (10X)		
K_2SO_4	15.7 g	2 L saf su içerisinde çözülür
KH_2PO_4	2.7 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24 g	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	47.23 g	
KCl	0.0746 g	

Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamı mikro besin çözeltisi içeriği

Mikro besin çözeltisi (1X)		
H_3BO_3	0.124 g	2 L saf su içerisinde çözülür
$MnSO_4$	0.066 g	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.100 g	
NH_4Mo	0.048 g	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1553 g	

Hoagland besi ortamını hazırlamak için, 10 L 10X makro besin çözeltisi içine 50 ml mikro besin çözeltisi eklendikten sonra hazırlanan bu çözelti 1/10 seyreltilmiştir. Elde edilen 1L 1X konsantrasyonundaki çözeltiye 1 ml 1000X FeEDTA çözeltisi kullanımdan hemen önce eklenerek kontrol çalışma ortamı olarak kullanılmıştır. 1000X FeEDTA; 365 g FeEDTA 1 L dH₂O içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamında bulunan iyonların son konsantrasyonları

Çözelti içerisinde iyonların son konsantrasyonları:			
Ca	2 mM	Mn	10 ⁻⁶ M
NO₃	4 mM	Cu²⁺	10 ⁻⁷ M
Mg	1 mM	NH₄	10 ⁻⁸ M
K	2 mM	Zn	10 ⁻⁶ M
P	0.2 mM	Fe	10 ⁻⁴ M
B	10 ⁻⁶ M		

Tuz gibi katı ortamlar, bitkilerin iyon alımını engellediğinden bu tip olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ve bitkileri direkt olarak strese sokmak amacıyla, bitki yetiştirme ve uygulamaları hidroponik sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Hidroponik sistemlerde bitkiler ihtiyaç duydukları mineralleri toprak yerine bir besin solüsyonundan alırlar. Tuz ve kuraklık stresini aynı anda görebilmek ve inceleyebilmek amacıyla hidroponik sistemlerde tuz uygulamaları ön değerlendirmelerle gerçekleştirilirken, uygulanacak tuz miktarına benzer kuraklık stresini yaratmak amacıyla PEG 6000 (polietilenglikol) kullanılmıştır. Tuz ve PEG konsantrasyonları Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ile belirlenerek birbirlerine denkleştirilmiştir. Osmometre cihazının kullanım klavuzunda belirtildiği gibi sırasıyla 290, 1000 ve 100 mmol/kg basınç oluşturan standartlar ile cihazın kalibrasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.3 Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ve standartları

3.3 Bitki Stres Koşulları

3.3.1 100 mM tuz (NaCl) stresi

5 L 1/10 Hoagland besi ortamına NaCl son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 29,22 g NaCl eklenmiştir. Elde edilen 100 mM NaCl çözeltisinin osmotik basıncı yaklaşık olarak 190 mmol/kg olarak belirlenmiştir. 25 günlük bitkiler her kap içerisinde 10 fide olacak şekilde 100 mM NaCl içeren 7 kap içerisine alınmış, iklim ve geliştirme odasında tutularak 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. 100 mM NaCl stresi altında 3 farklı kapta 10'ar adet yetiştirilen toplam 30 örnek stres uygulama süreleri sonunda alınarak bir havuz oluşturulmuş ve RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örnekten de 3'er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 150 mM tuz (NaCl) stresi

5 L 1/10 Hoagland besi ortamına NaCl son konsantrasyonu 150 mM olacak şekilde 43,83 g NaCl eklenmiştir. Elde edilen 150 mM NaCl çözeltisinin osmotik basıncı yaklaşık olarak 290 mmol/kg olarak belirlenmiştir. 25 günlük bitkiler her kap içerisinde 10 fide olacak şekilde 150 mM NaCl içeren 7 kap içerisine alınmış, iklim ve geliştirme odasında tutularak 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. 150 mM NaCl stresi altında 3 farklı kapta 10'ar adet yetiştirilen toplam 30 örnek stres uygulama süreleri sonunda alınarak bir havuz oluşturulmuş ve RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örnekten de 3'er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.3.3 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi

100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi oluşturmak amacıyla; 1/10 seyreltilmiş kontrol Hoagland besi ortamına 100 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturacak miktarda, gerekli PEG 6000 miktarları tespit edilmiştir. Bu sayede tuz ve kuraklık stresleri dengeli olarak uygulanmıştır. Besi ortamına PEG 6000 belirli aralıklarla ve düşük miktarlarda ilave edilerek osmotik basınç ölçülmüş, 100 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturan madde miktarı tespit edilmiştir (%15,955). 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi için hazırlanan PEG 6000 solüsyonları benzer şekilde iki gerçek yapraklı bitkilere 48 saat süre ile uygulanarak örneklem alımı tuz stresi ile aynı saatlerde (0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde) yapılmıştır. 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında 3 farklı kapta 10'ar adet yetiştirilen toplam 30 örnek stres uygulama süreleri sonunda alınarak bir havuz oluşturulmuş ve RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örnekten de 3'er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 150 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi

150 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi oluşturmak amacıyla; 1/10 seyreltilmiş kontrol Hoagland besi ortamına 150 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturacak miktarda, gerekli PEG 6000 miktarları tespit edilmiştir. Bu sayede tuz ve kuraklık stresleri dengeli olarak uygulanmıştır. Besi ortamına PEG 6000 belirli aralıklarla ve düşük miktarlarda ilave edilerek osmotik basınç ölçülmüş, 150 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturan madde miktarı tespit edilmiştir (%23,93). 150 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi için hazırlanan PEG 6000 solüsyonları benzer şekilde iki gerçek yapraklı bitkilere 48 saat süre ile uygulanarak örneklem alımı tuz stresi ile aynı saatlerde (0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde) yapılmıştır. 150 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında 3 farklı kapta 10'ar adet yetiştirilen toplam 30 örnek stres uygulama süreleri sonunda alınarak bir havuz oluşturulmuş ve RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örnekten de 3'er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Stres uygulamaları sonrasında örneklem alımının hemen ardından alınan tüm bitki örnekleri, ribonükleik asit (RNA) izolasyonu işlemine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Alınan örneklerin numaralandırılması çizelge 3.4'te olduğu gibidir.

Çizelge 3.4 Örneklerin numaralandırılması

Numara	Uygulanan Stres	Numara	Uygulanan Stres
1	100 mM NaCl kontrol	15	100 mM PEG kontrol
2	100 mM NaCl 3 saat	16	100 mM PEG 3 saat
3	100 mM NaCl 6 saat	17	100 mM PEG 6 saat
4	100 mM NaCl 9 saat	18	100 mM PEG 9 saat
5	100 mM NaCl 12 saat	19	100 mM PEG 12 saat
6	100 mM NaCl 24 saat	20	100 mM PEG 24 saat
7	100 mM NaCl 48 saat	21	100 mM PEG 48 saat
8	150 mM NaCl kontrol	22	150 mM PEG kontrol
9	150 mM NaCl 3 saat	23	150 mM PEG 3 saat
10	150 mM NaCl 6 saat	24	150 mM PEG 6 saat
11	150 mM NaCl 9 saat	25	150 mM PEG 9 saat
12	150 mM NaCl 12 saat	26	150 mM PEG 12 saat
13	150 mM NaCl 24 saat	27	150 mM PEG 24 saat
14	150 mM NaCl 48 saat	28	150 mM PEG 48 saat

3.4 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi)

Bitkide stres oluşumunu göstermek (kanıtlamak) amacıyla öncelikle malondialdehit (MDA) analizi ile lipid peroksidasyonu belirlenmiştir (Hodges vd. 1999).

Malondialdehit (MDA) Analizi:

- 1- 100 mg yaprak örneği %80'lik 1 ml alkol ile homojenize edilir. 3000 g de +4 °C'de 10 dk santrifüj edilir.
- 2- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ikiye bölünür;
 - a. 1 hacim alınır + 1 hacim %20'lik TCA (trichloroaceticacid) + 1 hacim %0,01'lik BHT (butylated hydroxytoluene) eklenir. (-TBA)
 - b. 1 hacim alınır + 1 hacim %0,65 TBA (2-thiobarbituric acid) içeren %20'lik TCA + 1 hacim %0,01'lik BHT eklenir. (+TBA)
- 3- a ve b şeklinde ayrılmış ve yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan tüpler 95 °C'de 25 dk inkübasyon sonrası ani bir şekilde soğutma amacıyla buza alınır.

- 4- Soğuyan örnek 3000 g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant alınır.
- 5- Birinci aşamada 532-600 nm'de, ikinci aşamada ise 532-600-440 nm'de ölçülür. Spektrofotometrede okunan değerler ile yüzde MDA seviyelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

ABS=Absorbans

MDA=Malondialdehit

- 1- $[(ABS\ 532+TBA)-(ABS\ 600+TBA)-(ABS\ 532-TBA)-(ABS\ 600-TBA)]=A$
- 2- $[(ABS\ 440+TBA)-(ABS\ 600+TBA)\times 0,0971]=B$
- 3- $nmolMDA/ml = (A-B)/157000\times 10^6$

3.5 Total RNA İzolasyonu

Stres uygulamaları sonrasında alınan tüm bitki örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar $-80\ ^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir. MDA analizi ile stres oluşumu gösterilmiş bitki örneklerinden RNA izolasyonu Trizol protokolüne (Chomczynski ve Mackey, 1995) göre gerçekleştirilmiş, RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazında belirlenmiştir.

Trizol Protokolü:

- 1- Örnekler porselen havan içinde sıvı azotta ezilir.
- 2- 2 ml'lik eppendorf tüpe 1 ml trizol eklenir.
- 3- Üzerine 300-500 mg örnek eklenir.
- 4- Tüp kuvvetli bir şekilde elle sallanarak karışım sağlanır, vortekslenir ve örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
- 5- Üzerine 250 µl kloroform eklenir, karıştırılır.
- 6- Oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
- 7- 14.000 rpm'de $4\ ^\circ C$ 'de 10 dk santrifüj edilir ve üst sıvı yeni tüpe aktarılır.
- 8- Üzerine 250 µl 1.2 M NaCl, 250 µl 0.8 M Na-citrate ve 250 µl isopropanol eklenir.
- 9- $-20\ ^\circ C$ 'de 10 saat bekletilir.

10- 14.000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilir, üst sıvı atılır, pellet tüp dibinde gözlenir.

11- Pellet %70 EtOH ile yıkanır ve dikkatlice buz ile teması kesilmeden kurutulur.

12- 20-50 µl DEPC ile muamele edilmiş suda çözülür.

İzole edilen RNA'ların saflık ve miktarlarının kontrol edilmesi, daha sonra yapılacak işlemlerin optimizasyonu ve standartlaştırılması için gereklidir. Bu nedenle izole edilen RNA'lar hem % 1,2'lik FA (formaldehit agaroz) jelde yürütülerek, hem de Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı ile spektroskopik olarak ölçülerek saflık ve miktarları kontrol edilmiştir.

3.5.1 RNA pürifikasyonu (saflaştırılması)

Trizol protokolü ile izole edilen RNA'lardan 50-70 µg alınıp RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat No: 74104) kullanılarak pürifiye edilmiş, cDNA sentezi için gerekli RNA miktarını belirlemek üzere saflık ve miktarları Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı ile ölçülmüştür. Pürifikasyon sonrasında 260/280 oranının 1,9 – 2,1; 260/230 oranının ise 2,0 – 2,2 arasında olması RNA saflığının iyi olduğunun göstergesidir.

Rneasy Mini Kit Protokolü:

- 1.** 10 µl beta merkapt etanol kit içeriğinde bulunan RLT çözeltisinden 1 ml eklenerek karıştırılır (1 ay içinde kullanılabilir).
- 2.** 50-70 µg RNA alınarak Rnaz'ı uzaklaştırılmış su ile hacim 100 µl'ye tamamlanır.
- 3.** Üzerine kit içeriğinde bulunan RLT çözeltisinden 350 µl eklenip pipetle karıştırılır.
- 4.** Üzerine 250 µl saf alkol eklenip pipetle karıştırılır.
- 5.** Yaklaşık 700 µl karışım 2 ml tüp içerisine yerleştirilen RNeasy kolonuna aktarılır.
- 6.** 15 sn 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilir.
- 7.** Kolona kit içeriğinde bulunan RPE çözeltisinden 500 µl eklenerek 15 sn 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilir, alt süzöntü atılır.

8. Kolona kit içeriğinde bulunan RPE çözeltisinden 500 µl eklenerek 2 dk 14.000 rpm'de (maksimum hızda) 4 °C'de santrifüj edilir, alt süzöntü atılır.
9. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alınarak maksimum hızda 1 dk 4 °C'de santrifüj edilir.
10. Kolon 1.5 ml eppenndorf tüpe yerleştirilir, kolon membranına 30-50 µl RNase'ı uzaklaştırılmış su eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilir. Bu aşama iki defa yapılır.

3.6 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

%1,2 FA agaroz jel DEPC ile muamele edilmiş su (Çizelge 3.5) ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz kaynatılıp 65°C'ye soğutulur, üzerine 1,8 ml %37 formaldehit (12.3 M) ve 1 µl etidyum bromür (EtBr) eklenerek jel tepsisine dökülür. Donması için 30 dk bekletilir. 1 hacim 5x jel yükleme boyası ve 4 hacim RNA karıştırılıp 3-5 dk 65 °C'de inkübe edildikten sonra buz üzerine alınır. Örnekler 1x FA tamponu içinde 70-80 voltta 1 saat koşturulur. FA jel hazırlamada kullanılan tamponların içeriği çizelge 3.5'deki gibidir.

DEPC (Dietilpirokarbonat)' li su: 0,1 ml DEPC 100 ml saf suda çözülür. 37 °C'de 12 saat inkübe edildikten sonra 121°C 'de 20 dakika otoklavlanır.

Çizelge 3.5 FA jel hazırlamada kullanılan tamponların içeriği

10x FA jel tamponu	1x FA jel tamponu	5x jel yükleme boyası
200 mM MOPS	100 ml 10x FA jel tamponu	1,6 µl bromfenol mavisi
50 mM NaAc	20 ml %37 formaldehit (12.3 M)	8 µl 500 mM EDTA pH 8.0
10 mM EDTA	880 ml DEPC muamele edilmiş su	72 µl %37 formaldehit (12.3 M)
NaOH ile pH: 7.0		200 µl %100 gliserol
		300 µl formamid
		400 µl 10x FA jel tamponu
		17,4 µl DEPC ile muamele edilmiş su

3.7 cDNA (komplementer DNA) Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi first-strand cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit - Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Katalaz (CAT) ve aktin (ACT), gen bölgelerinin 400 bç'nin üzerinde olması nedeni ile anchored-oligo(dT)₁₈ ile çalışılmıştır. Çizelge 3.6'da cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA – primer karışımı içerisinde bulunan bileşenler ve final konsantrasyonları verilmektedir.

Çizelge 3.6 Total RNA - primer karışımı

Komponent	Final Konsantrasyon
Total RNA	10 ng – 5 µg total RNA
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer, 50 pmol/µl	2.5 µM
Saf su	Toplam hacim 13 µl'ye ayarlanır

Total RNA – primer karışımı Biorad marka ısı döngü cihazında 65 °C'de 10 dakika bekletilerek RNA'nın ikincil yapısının denatürasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler hemen buz üzerine alınmış olup ters transkripsiyon reaksiyonunu gerçekleştirecek diğer bileşenler çizelge 3.7'de belirtilen sıra ile buz üzerindeki 0,2 ml eppendorf tüp içine eklenmiştir.

Çizelge 3.7 Ters Transkripsiyon (RT-PCR) Reaksiyonu Komponentleri

Komponent	Final Konsantrasyon
Yüksek kesinlikte ters transkriptaz reaksiyon tamponu (Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer), 5x konsantrasyonunda	1× (8 mM MgCl ₂)
RNaz inhibitör koruyucu (Protector RNase Inhibitor), 40 U/µl	20 U
Deoksinnükleotid karışımı (Deoxynucleotide Mix), her biri 10 mM	1 mM her biri
Yüksek kesinlikte ters transkriptaz (Transcriptor Reverse Transcriptase), 20 U/µl	10 U

Ters transkripsiyon reaksiyonu çizelge 3.8’de belirtilen programda, Biorad marka ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.8 Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

Primer	Hedef mRNA	RT Reaksiyonu İnkübasyon Süresi
Anchored-oligo(dT)18 primer	4 kb a kadar	55 °C’de 30 dk 85 °C’de 5 dk

Elde edilen cDNA’lar Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.8 Primer ve Prob Dizaynı

Optimal reaksiyon şartlarının belirlenebilmesi için CAT ve ACT gen bölgeleri üzerinde iki adet ileri (Forward), iki adet geri (Reverse) primer dizayn edilmiştir. Katalaz genine ait CAT 2 izoformunun 1479 baz uzunluğundaki dizisi aşağıda yer almaktadır (NCBI Entrez Gene ID: 5257184). Bu dizi üzerinden primer ve prob dizaynı yapılmıştır (CAT geni Gen Bank numarası: AF112368.1).

ATGGATCCTTACAAGTACCGTCCGTCAAGTGCTTTCAATTCACCTTTCTGTACCACTAATTCT
GGTGCTCCTGTTTTTAATAACAATTCATCTCTTACGGTTGGTGCAAGAGGTCCTGTGTTGCTT
GAGGATTACCATTTGGTGAGAACTTGCCAACTTTGACAGGGAACGTATTGCAGAACGTGT
TGTTTCATGCCCCGAGGTGCTAGTGCCAAAGGGTTTTTTGAAGTTACTCATGACATTGCTCACCT
TACCTGTGCTGATTTCCCTTCGAGCTCCTGGTGTACAGACTCCAGTCATTGTGAGATTCTCTAC
TGTTATTCATGAAAGGGGTAGTCCTGAACTCTGAGGGATCCTCGTGGTTTTTGCTGTCAAGTT
TTACACCAGAGAGGGGAACTTTGATCTGGTAGGGAACAACCTCCCCGTCTTCTTCATCCGTG
ATGGAATGAAGTTCCCTGACATGGTCCATGCTCTGAAGCCAAATCCTAAGTCCCATATCCAG
GAGAATTGGAGGGTCCTTGATTTTTTCTCTCATCATCCCGAAAGCCTGCACATGTTCACTTTC
CTCTTCGACGATATTGGTATTCCTCAAGATTACAGGCATATGGACGGGTCTGGTGTCCACAC
ATTCACATTGATCAACAGGGCTGGAAAATCAACTTATGTGAAGTTCCACTGGAAGCCCACAT
GTGGTGTCAAGTCTTTGTTGGAAGAAAAGGCAATCCGAGTCGGAGGAGCAAATCACAGCCA

TGCTACTCAGGACCTCTATGACTCTATTGCAGCTGGAAATTATCCTGAATGGAAACCCTCCA
TTCAGATTATGGGTCCAGAACATGAAGACAAATTTGACTTTGATCCACTTGATGTGACAAAA
ACTTGGCCAGAGGACATCTTGCCTTTGCAGCCGGTGGGAAGATTAGTTCTGAACAAGAACAT
TGATAACTTCCTTTATATGAATGAGCAGCTAGCTTTCTGCCCTTCTATTGTGGTTCCAGGTGT
TTATTACTCAGATGATAAGATGCTTCAAACCTCGTATTTTCTCCTACTCTGATACCCAGAGGTA
TCGACTTGGACCAAACCTATTTGCAACTTCCTGCTAATGCTCCAAAGTGTGCTCATCACAACA
ATCACTATGATGGCTCTATGAATTTTATGCACAGGGATGAGGAGATCGACTACTTCCCTTCA
AGGTATGATCAAGTTCGCCATGCTGAGGTGTATCCTATTCTTCAACAGTTTGCAGTGGCAA
ACGCGAGAAGTGTATCATTCAAAAAGAGAACAATTTCAAGCAACCAGGAGAAAGGTACCGC
TCATTACACCCGACAGACAAGAACGCTTTATTCGTCGGTGGGTGGAGGCCTTGTCTGATCC
TCGTATCACTTATGAAATACGCAGCATTGGATCACATACTGGTCTCAGGCTGACAAGTCTTT
GGGTCAAAGCTTGCATCTAGGCTTAATGTGAGACCAAGCATATGA

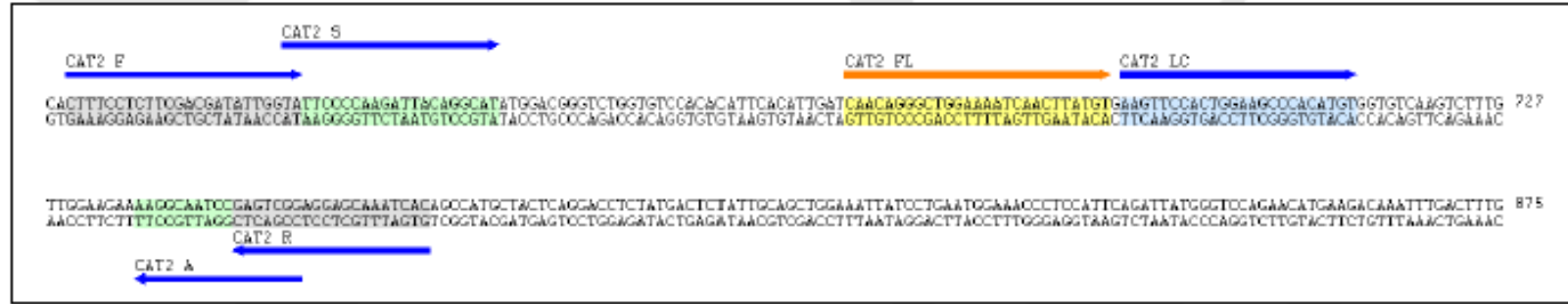
Housekeeping gen olarak kullanılacak aktin geni 460 baz uzunluğunda olup aşağıda gösterildiği gibi belirlenmiş (NCBI Entrez Gene ID: 543519) ve bu diziler ile primer ve prob tasarımı gerçekleştirilmiştir (ACT geni Gen Bank numarası: BT013707).

AAGGTTGTTGCACCACCTGAGAGGAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCCATTCTTGCATC
CCTCAGCACATTCCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGCGAGTATGATGAGTCTGGTCCTTCCA
TTGTCCACAGAAAGTGCTTCTAAGGTGCTGCTATAATTACTTAAAAGTGCGAGTGTCTGTCT
GTTTCCCGGTTTTGCTATTATGTTGCCAGTCAATTTGTTTTTTTGATGGGATGGAGAAGTTTG
GTGGTGGGGGCTATGAATGCACGGTAGCAAACAACAGATTGCCAGTATTATCTCATGTTTCC
ATTTAATGTGGTTAATATTCTCTACATACTTGAGAGGTGCCTGATGCATTGCCCTCTTCTGTC
TGGCTACACCATCCCTTGGTCGAAGCGTCTCTTTTTTAGGTTGTTTGTAGTTGAAGGAGAGTG
ATTGTGATGTTTTCTCCTCGTC

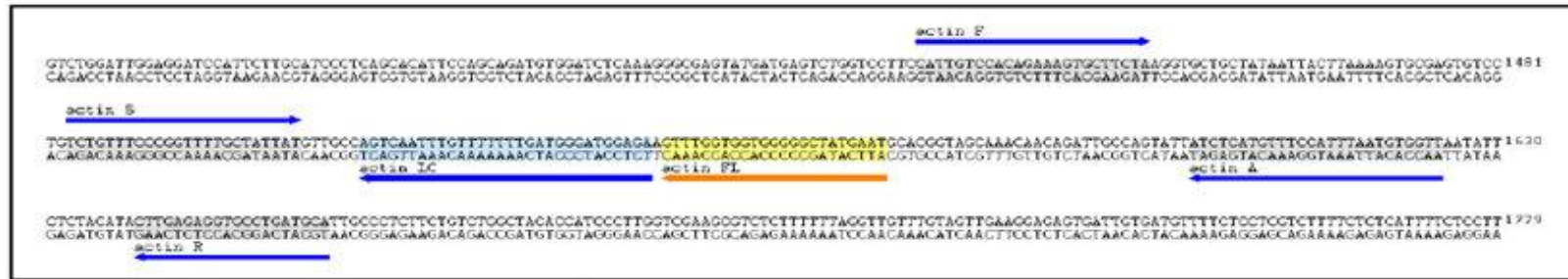
CAT ve ACT gen bölgeleri için dizayn edilen primer ve floresan ışıma oluşturan prob dizileri çizelge 3.9’da görülmektedir. Gen bölgeleri üzerindeki primer ve prob bağlanma yerleri ise şekil 3.4 -3.5’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 3.9 CAT ve ACT gen bölgeleri için tasarlanan primer ve prob dizileri
(F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

Primer	Sekans (5'→3')	Primer uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (T _m)
CAT2 F	CTT TCC TCT TCG ACG ATA TTG GTA	24	56.4 °C
CAT2 S	TAT TCC CCA AGA TTA CAG GCA T	22	55.4 °C
CAT2 A	CCG ACT CGG ATT GCC TT	17	55.9 °C
CAT2 R	GTG ATT TGC TCC TCC GAC TC	20	55.5 °C
CAT2 FL prob	CAA CAG GGC TGG AAA ATC AAC TTA TGT—FL	27	62.6 °C
CAT2 LC prob	LC640-AAG TTC CAC TGG AAG CCC ACA TGT--PH	24	62.6 °C
ACT F	CAT TGT CCA CAG AAA GTG CTT CTA	24	56.6 °C
ACT S	TCT GTT TCC CGG TTT TGC TAT TAT	24	58.5 °C
ACT A	AAC CAC ATT AAA TGG AAA CAT GAG AT	26	56.7 °C
ACT R	TGC ATC AGG CAC CTC TCA AG	20	58.1 °C
ACT FL prob	ATT CAT AGC CCC CAC CAC CAA AC— FL	23	63.4 °C
ACT LC prob	640—TCT CCA TCC CAT CAA AAA AAC AAA TTG ACT--P	30	64.4 °C



Şekil 3.4 CAT gen bölgesi için dizayn edilen primer ve prob bağlanma yerleri



Şekil 3.5 ACT gen bölgesi için dizayn edilen primer ve prob bağlanma yerleri

3.9 Real - Time PCR Reaksiyonu

Kontrol grubu ile CAT2 gen bölgesi için tasarlanan bütün primer ve prob kombinasyonlarının real time PCR reaksiyonları denenerek optimizasyonu sağlanmıştır. En iyi sonucu veren CAT2 F - CAT2 R primeleri ve CAT2 FL probu ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem ACT gen bölgesi için de yapılarak ACT F - ACT S primerleri ve Actin FL probu ile optimal çoğaltmanın gerçekleştiği belirlenmiştir. Kontrol örneği ile gerçekleştirilen primer optimizasyonu çalışması sonrasında bütün örneklerin real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. Stres uygulamaları sonrasında seçilen örneklerin real time PCR reaksiyonları 3'er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Real Time PCR reaksiyonu çizelge 3.10'da verilen komponentler ile hazırlanmış olup saf su ile toplam hacim 20 µl'ye ayarlanarak Light Cyclers® 480 System (Roche), thermal cycler cihazında çizelge 3.11'de verilen programda çoğaltılmıştır. Reaksiyon Pfaffl (2001) tarafından açıklanmış olan program üzerinde değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.10 Real Time PCR reaksiyonu komponentleri

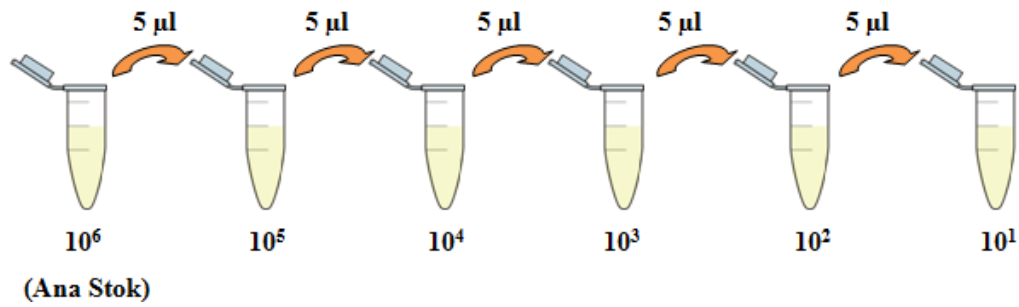
Komponent	Son Konsantrasyon
cDNA	2 µg
İleri (Forward) Primer	10 µM
Geri (Reverse) Primer	10 µM
FL Prob	3 µM
LC Prob	3 µM
Light Cyclers® 480 Probe	1X
Master	
Toplam hacim 20 µl'dir.	

Çizelge 3.11 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

Primer	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	10 s	45
Bağlanma	60 °C	30 s	
Uzama	72 °C	15 s	

ACT ve CAT genlerinin tuz ve kuraklık stresi (100-150 mM) uygulamalarında farklı zamanlarda alınmış örnekler Real time PCR reaksiyonu ile gerçek zamanlı olarak izlenerek pik profilleri kaydedilmiştir. 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. Elde edilen Ct değerleri ve her iki gen için de oluşturulan standart eğri grafikleri ile mRNA ifade seviyeleri kantitatif olarak tespit edilmiştir.

Örneklerin konsantrasyonları cDNA seri dilüsyonları ile oluşturulan katalaz (CAT) ve aktin (ACT) standart eğri grafikleri ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.6 cDNA seri dilüsyonları

cDNA seri dilüsyonları 1/10 sulandırma ile ana stok 6 kat dilüe edilerek yapılmıştır. İlk sulandırma

1/10 = 5 µl cDNA + 45 µl su şeklinde yapılmıştır.

Standart eğri grafiği oluştururken dikkat edilmesi gereken özellikler:

1. Hedef gen ve referans gen (house keeping gen) için ayrı ayrı standart eğriler oluşturulmalıdır.
2. Verimin (efficiency değerinin) 2' ye yakın olması gerekir, 1,85-2,00 uygundur, bu değer 2'ye yaklaştıkça güvenilirliği artar, 2'nin üzerine çıktığı zaman o örnek iptal edilir. Verimin maksimum 2 olma nedeni her döngüde PCR ile oluşan ampikon miktarının 2 katına çıkmasıdır.
3. En düşük konsantrasyondan daha düşük bir konsantrasyon çıktığında formüle yerleştirilir.
4. Doğru bir standart eğri grafiği oluşturabilmek için oluşturulan grafik en az 3 cDNA dilüsyonuna karşılık gelen logaritmik konsantrasyon değerinden geçmelidir.

3.10 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz

Stres uygulamalarında, 3 bağımsız kaptaki (biyolojik tekrar) 10'ar adet yetiştirilen toplam 30 bitki stres uygulama süreleri sonunda alınarak bir havuz oluşturulmuş, daha sonra RNA izolasyonu yapılmıştır. Seçilen bu örneklerden de 3'er tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Farklı sürelerde tuz ve kuraklık stresi uygulanmış bitkilere ait transkript profilleri kontrol profilleri ve aktin ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre ve One Way ANOVA (Dunnett) ile yapılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001). Araştırmacıların bir kontrol grubunu birden fazla deney grubu ile karşılaştırması gerektiğinde Dunnet testini kullanmaları önerilmektedir (Dunnet 1955). Post-Hoc testi ise (Multiple Comparisons Dependent Variable: Expression Dunnet T3) eğer varyans analizi sonucunda gruplar arasında bir fark bulunmuşsa, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için kullanılmaktadır (Roscoe 1975).

Konsantrasyon ve Ct değeri olarak belirlenen gen ekspresyonu sonuçları housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan ACT (aktin) ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Bu verilerin ortalama, standart sapma,

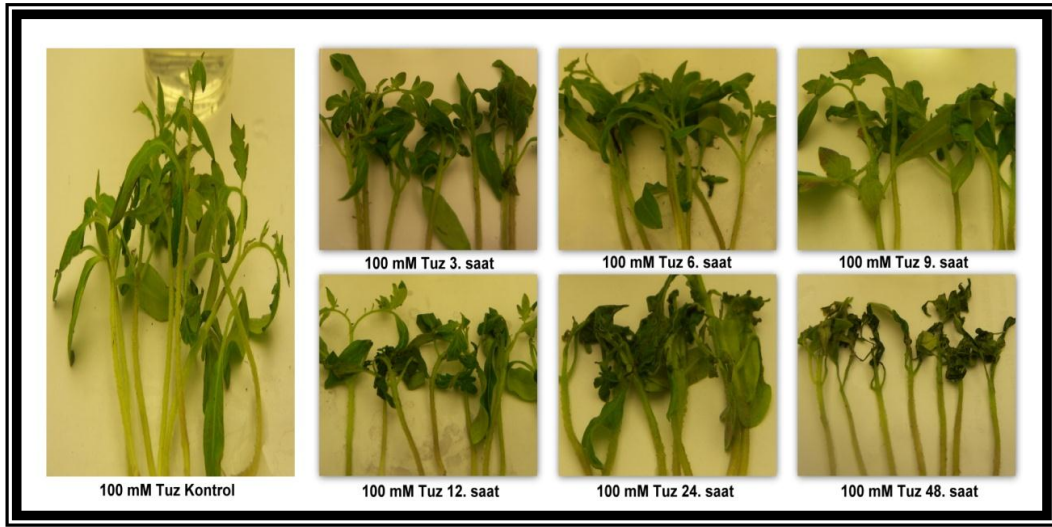
standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (SPSS 16) ile hesaplanmıştır. Bu şekilde tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresi altında geliştirilmiş olan örneklerde katalaz (CAT) geni mRNA ifade seviyesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Domates Bitkisinde Stres Uygulamaları

Falcon çeşidi domates (*Solanum lycopersicum* L.) tohumları, iki gerçek yapraklı bitkicik (yaklaşık 25 günlük fideler) haline gelinceye kadar iklim ve geliştirme odasında, 1/10'luk Hoagland besi ortamı içerisinde geliştirilmiştir. Geliştirilen 25 günlük fidelere 100 mM - 150 mM NaCl (tuz), 100 mM - 150 mM PEG (tuz stresine eş kuraklık stresi) uygulanarak 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler hemen -80 °C'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır.

100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen *Solanum lycopersicum* L. örnekleri şekil 4.1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.1 100 mM NaCl stres bitkileri

150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen *Solanum lycopersicum* L. örnekleri şekil 4.2'de görüldüğü gibidir.



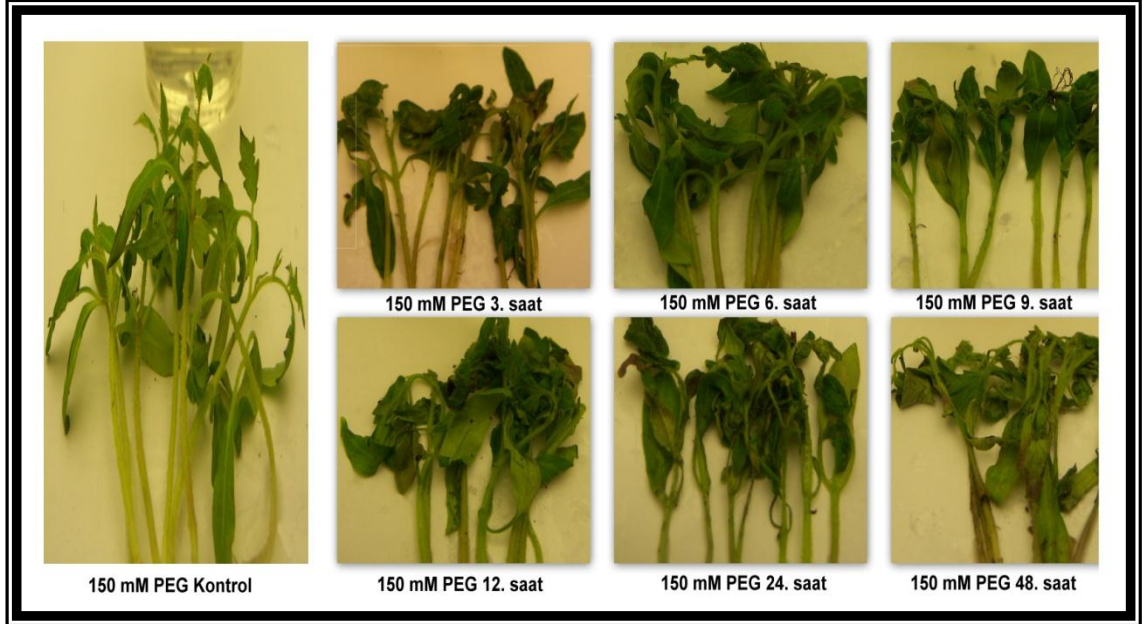
Şekil 4.2 150 mM NaCl stres bitkileri

100 mM PEG (tuz stresine eş kuraklık) stresi altında yetiştirilen *Solanum lycopersicum* L. örnekleri şekil 4.3'te görüldüğü gibidir.



Şekil 4.3 100 mM PEG stres bitkileri

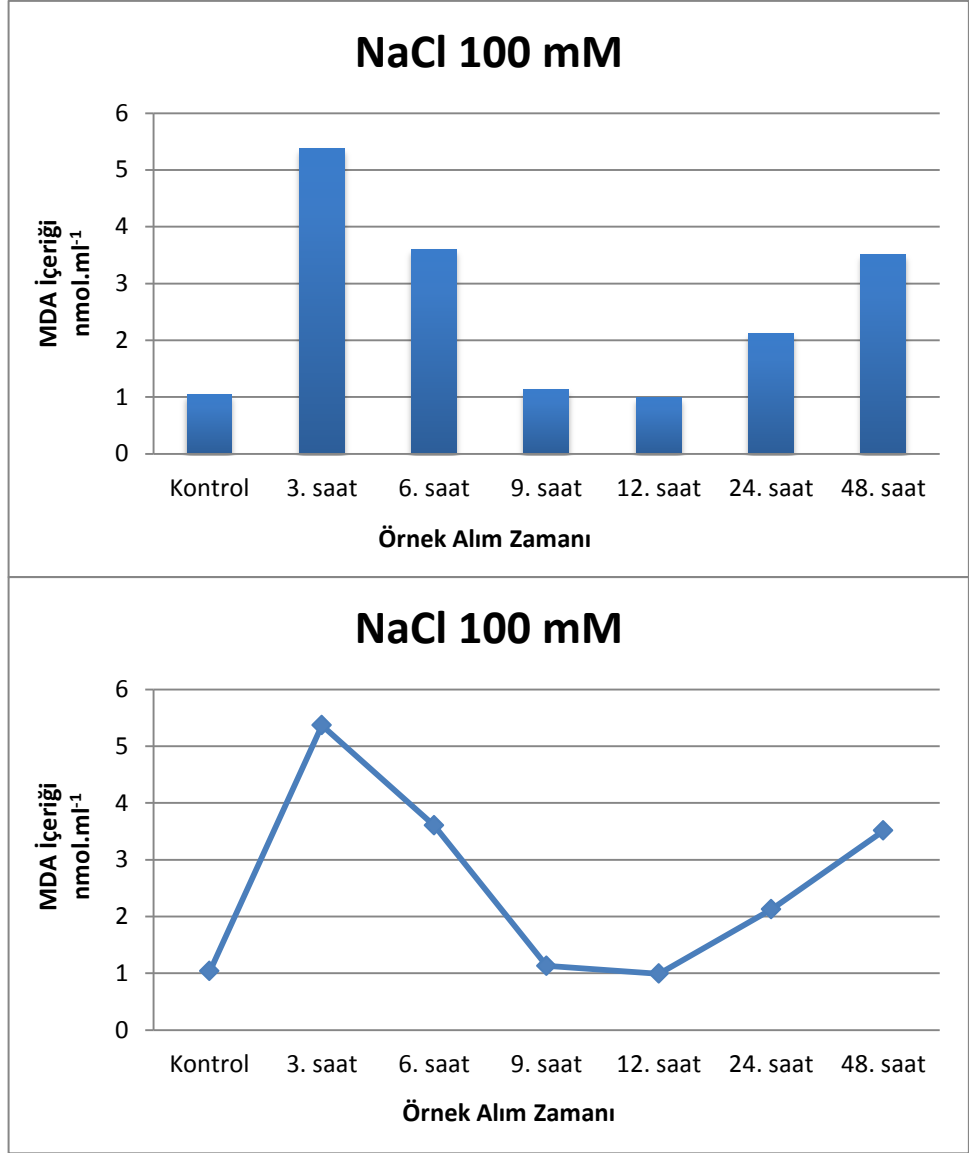
150 mM PEG (tuz stresine eş kuraklık) stresi altında yetiştirilen *Solanum lycopersicum* L. örnekleri şekil 4.4'te görüldüğü gibidir.



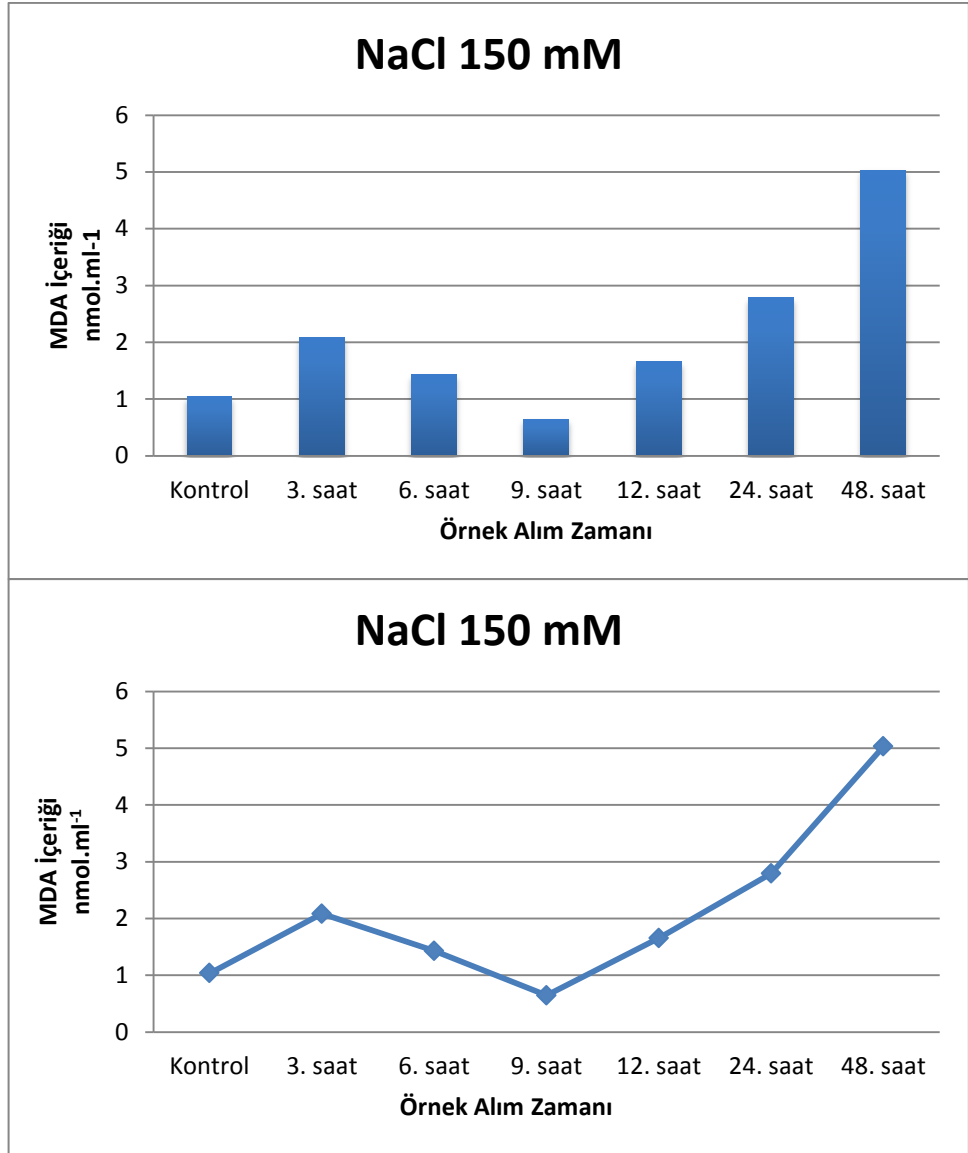
Şekil 4.4 150 mM PEG stres bitkileri

4.2 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi)

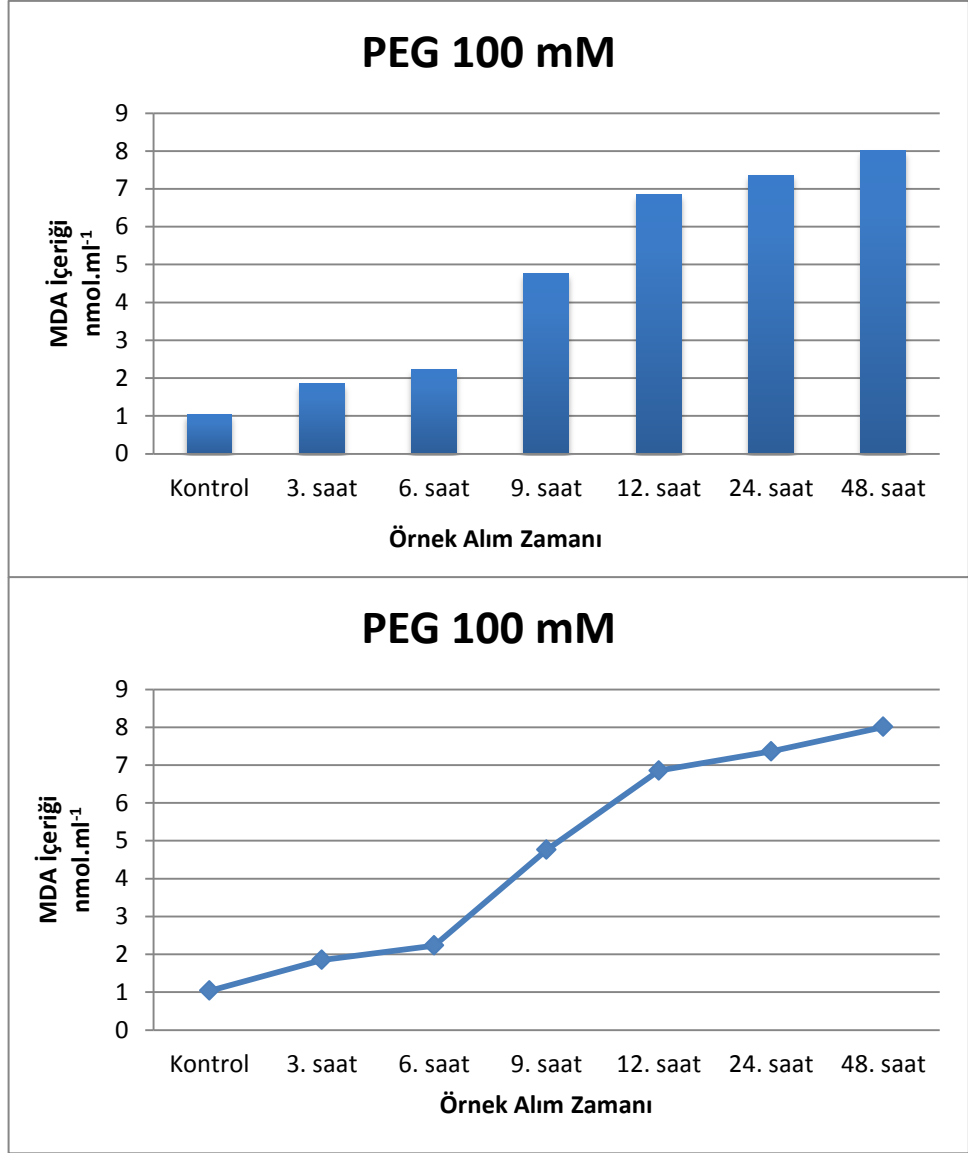
Tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresi uygulanmış domates fideleri kontrol ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinde belirgin bir artış görülmüştür. 100 mM NaCl stresi uygulamasında 3h ($5,368 \text{ nmol.ml}^{-1}$) (Şekil 4.5), 150 mM NaCl stresi uygulamasında 48h ($5,033 \text{ nmol.ml}^{-1}$) (Şekil 4.6), 100 mM PEG stresi uygulamasında 48h ($8,007 \text{ nmol.ml}^{-1}$) (Şekil 4.7), 150 mM PEG stresi uygulamasında 6h ($11,529 \text{ nmol.ml}^{-1}$) (Şekil 4.8) MDA miktarının en yüksek seviyede olduğu zamanlardır. Kontrole kıyasla belirlenen bu artış oksidatif stresin meydana geldiğini göstermektedir. Yüzde MDA seviyeleri şekil 4.5 - 4.8’de gösterilmektedir.



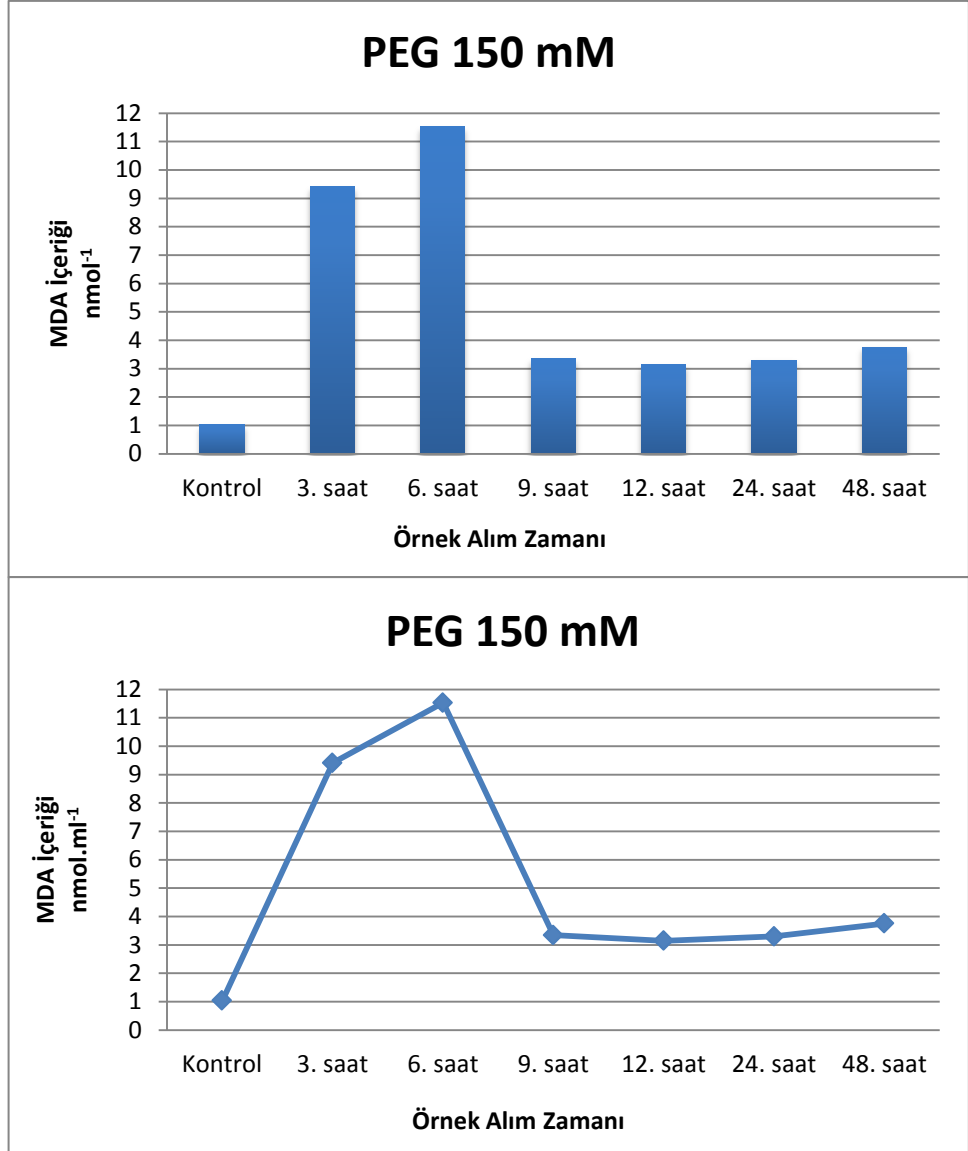
Şekil 4.5 100 mM Tuz Stresi, zamana bağlı MDA seviyesi



Şekil 4.6 150 mM Tuz Stresi, zamana bağlı MDA seviyesi



Şekil 4.7 100 mM Tuz Stresi ile eş kuraklık (PEG) stresi, zamana bağlı MDA seviyesi



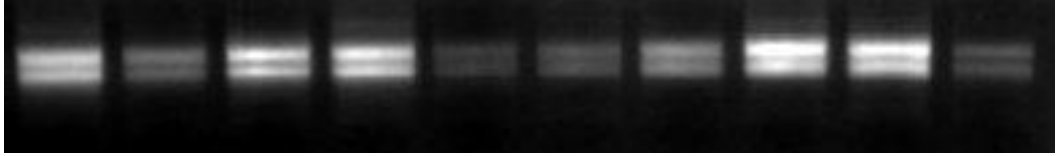
Şekil 4.8 150 mM Tuz Stresi ile eş kuraklık (PEG) stresi, zamana bağlı MDA seviyesi

4.3 Total RNA izolasyonu

Stres uygulamaları sonrasında örneklem alımının hemen ardından alınan tüm bitki örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C 'lik buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bitki örneklerinden RNA izolasyonu Trizol protokolüne (Chomczynski ve Mackey, 1995) göre gerçekleştirilmiş, RNA saflık ve miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazında belirlenmiştir. İzole edilen her bir örnekten 50-70 μg RNA alınarak Rnaeasy Mini Kit protokolüne göre pürifiye edilmiştir.

4.4 Formaldehit AgaroZ Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA'lar %1,5'lik FA (formaldehit agaroz) jelde yürütölerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 İzole edilen total RNA örneklerinden bazılarına ait formaldehit agaroz (FA) jel görüntüsü

4.5 cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi first-strand cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit - Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1 – çizelge 4.4'te RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar ölçümleri yer almaktadır.

Çizelge 4.1 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	A260	A280	260/280	ng/ul
1.	100 mM Tuz Kontrol	38,113	20,415	1,87	1905,67
2.	100 mM Tuz Kontrol	53,247	28,477	1,87	2662,34
3.	100 mM Tuz Kontrol	52,624	28,068	1,87	2631,21
4.	100 mM Tuz 3 saat	51,643	27,532	1,88	2582,14
5.	100 mM Tuz 3 saat	50,227	26,880	1,87	2511,34
6.	100 mM Tuz 3 saat	48,695	26,093	1,87	2434,74
7.	100 mM Tuz 6 saat	52,582	28,048	1,87	2629,08
8.	100 mM Tuz 6 saat	52,288	27,923	1,87	2614,38
9.	100 mM Tuz 6 saat	51,048	27,393	1,86	2552,42
10.	100 mM Tuz 9 saat	52,020	27,701	1,88	2601,00
11.	100 mM Tuz 9 saat	51,179	27,298	1,87	2558,96
12.	100 mM Tuz 9 saat	47,759	25,568	1,87	2387,95
13.	100 mM Tuz 12 saat	51,192	27,312	1,87	2559,59
14.	100 mM Tuz 12 saat	52,533	28,182	1,86	2626,65
15.	100 mM Tuz 12 saat	47,696	25,429	1,88	2384,78
16.	100 mM Tuz 24 saat	34,421	18,340	1,88	1721,05
17.	100 mM Tuz 24 saat	50,027	26,727	1,87	2501,33
18.	100 mM Tuz 24 saat	35,903	18,921	1,89	1795,13
19.	100 mM Tuz 48 saat	55,870	30,027	1,86	2793,48
20.	100 mM Tuz 48 saat	52,708	28,166	1,87	2635,41
21.	100 mM Tuz 48 saat	54,247	29,599	1,86	2712,37
22.	150 mM Tuz Kontrol	45,690	24,284	1,88	2284,52
23.	150 mM Tuz Kontrol	50,931	27,22	1,87	2546,56
24.	150 mM Tuz Kontrol	48,115	25,698	1,87	2405,74
25.	150 mM Tuz 3 saat	51,069	27,344	1,87	2553,46
26.	150 mM Tuz 3 saat	45,126	23,784	1,90	2256,29
27.	150 mM Tuz 3 saat	47,698	25,632	1,86	2384,89
28.	Tuz 150mM 6 saat	51,062	27,258	1,87	2553,11
29.	Tuz 150mM 6 saat	45,046	23,774	1,89	2252,31
30.	Tuz 150mM 6 saat	40,705	21,675	1,88	2035,26

Çizelge 4.1 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri (devam)

No	Stres Uygulaması	A260	A280	260/280	ng/ul
31.	150 mM Tuz 9 saat	50,931	27,216	1,87	2546,53
32.	150 mM Tuz 9 saat	44,648	23,678	1,89	2232,38
33.	150 mM Tuz 9 saat	54,879	29,996	1,83	2743,95
34.	Tuz 150mM 12 saat	45,505	24,235	1,88	2275,24
35.	Tuz 150mM 12 saat	44,545	23,615	1,89	2227,27
36.	Tuz 150mM 12 saat	41,042	21,880	1,88	2052,08
37.	150 mM Tuz 24 saat	45,306	24,153	1,88	2265,29
38.	150 mM Tuz 24 saat	44,623	23,609	1,89	2231,14
39.	150 mM Tuz 24 saat	55,015	29,934	1,88	2750,73
40.	150 mM Tuz 48 saat	50,014	26,695	1,87	2500,72
41.	150 mM Tuz 48 saat	44,471	23,471	1,89	2223,56
42.	150 mM Tuz 48 saat	34,767	18,643	1,86	1738,19

Çizelge 4.2 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresine eş PEG (kuraklık) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri

No	Stres Uygulaması	A260	A280	260/280	ng/ul
1.	100 mM PEG Kontrol	50,584	27,056	1,87	2529,22
2.	100 mM PEG Kontrol	43,962	23,233	1,89	2198,12
3.	100 mM PEG Kontrol	49,226	26,481	1,86	2461,30
4.	100 mM PEG 3 saat	51,802	27,744	1,87	2590,10
5.	100 mM PEG 3 saat	43,366	22,872	1,90	2168,29
6.	100 mM PEG 3 saat	50,770	26,931	1,86	1934,61
7.	100 mM PEG 6 saat	43,867	23,185	1,89	2193,33
8.	100 mM PEG 6 saat	44,301	23,444	1,89	2215,04
9.	100 mM PEG 6 saat	45,055	23,852	1,89	2250,82
10.	100 mM PEG 9 saat	52,425	28,050	1,87	2621,26
11.	100 mM PEG 9 saat	44,324	23,450	1,89	2216,20

Çizelge 4.2 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresine eş PEG (kuraklık) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri (devam)

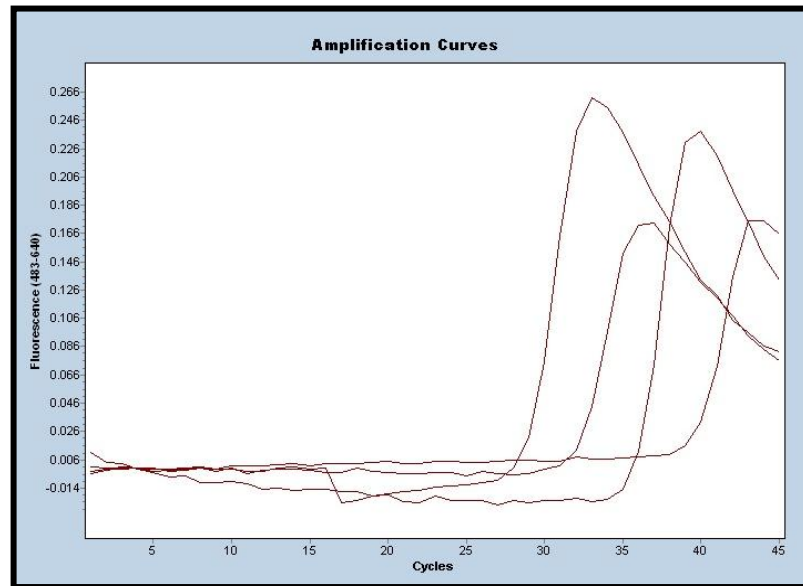
No	Stres Uygulaması	A260	A280	260/280	ng/ul
12.	100 mM PEG 9 saat	56,110	30,814	1,82	2805,50
13.	100 mM PEG 12 saat	50,543	27,149	1,86	2527,16
14.	100 mM PEG 12 saat	44,455	23,494	1,89	2222,76
15.	100 mM PEG 12 saat	44,510	23,481	1,89	2236,25
16.	100 mM PEG 24 saat	54,410	29,233	1,86	2720,49
17.	100 mM PEG 24 saat	43,637	23,131	1,89	2181,85
18.	100 mM PEG 24 saat	43,712	23,195	1,88	2093,78
19.	100 mM PEG 48 saat	54,495	29,175	1,87	2724,77
20.	100 mM PEG 48 saat	43,997	23,283	1,89	2199,87
21.	100 mM PEG 48 saat	43,285	22,920	1,88	2168,39
22.	150 mM PEG Kontrol	51,588	27,567	1,87	2579,41
23.	150 mM PEG Kontrol	43,726	23,090	1,89	2186,28
24.	150 mM PEG Kontrol	43,967	23,238	1,89	2196,65
25.	150 mM PEG 3 saat	52,392	27,938	1,88	2619,61
26.	150 mM PEG 3 saat	43,889	23,164	1,89	2194,43
27.	150 mM PEG 3 saat	44,435	23,521	1,89	2228,02
28.	150 mM PEG 6 saat	48,197	25,733	1,87	2409,86
29.	150 mM PEG 6 saat	43,868	23,242	1,89	2193,38
30.	150 mM PEG 6 saat	42,451	22,939	1,85	2125,24
31.	150 mM PEG 9 saat	50,715	27,221	1,86	2535,75
32.	150 mM PEG 9 saat	44,625	23,611	1,89	2231,25
33.	150 mM PEG 9 saat	43,318	23,259	1,86	2156,02
34.	150 mM PEG 12 saat	51,379	27,493	1,87	2568,97
35.	150 mM PEG 12 saat	42,758	23,101	1,85	2137,91
36.	150 mM PEG 12 saat	41,726	22,582	1,85	2090,12
37.	150 mM PEG 24 saat	52,566	28,092	1,87	2628,29
38.	150 mM PEG 24 saat	43,288	22,922	1,89	2164,38
39.	150 mM PEG 24 saat	42,692	23,210	1,84	2132,54

Çizelge 4.2 100 mM ve 150 mM NaCl (Tuz) stresine eş PEG (kuraklık) stresi uygulanmış domates bitkilerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri (devam)

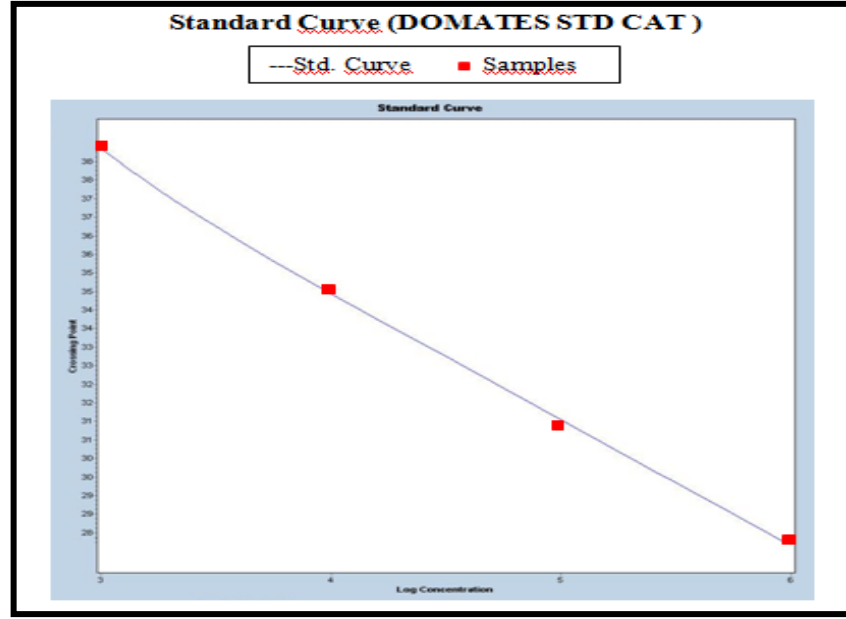
No	Stres Uygulaması	A260	A280	260/280	ng/ul
40.	150 mM PEG 48 saat	51,226	27,404	1,87	2561,32
41.	150 mM PEG 48 saat	43,815	23,209	1,89	2190,77
42.	150 mM PEG 48 saat	44,287	23,941	1,85	2215,81

4.6 Real - Time PCR Reaksiyonu

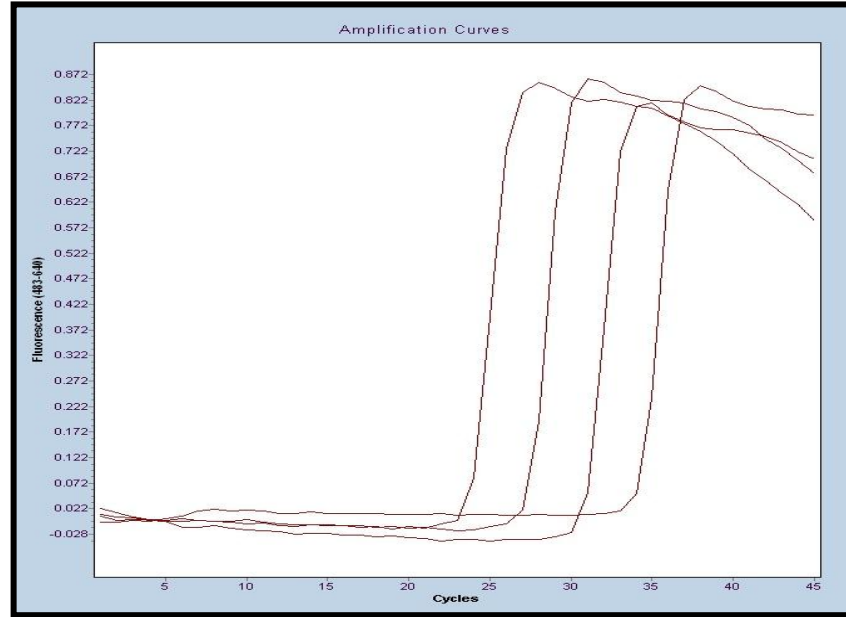
Real Time PCR reaksiyonu 3 tekrarlı olacak şekilde Light Cycler ® 480 System (Roche), thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Katalaz ve aktin standart eğri grafiklerini oluşturmak amacıyla altı adet logaritmik konsantrasyon kullanılmıştır. Ancak iki konsantrasyon için doğrular üzerinde istenilen noktalarda sayısal değerler elde edilememiştir. Bu nedenle bu iki değer elimine edilerek dört logaritmik konsantrasyon değerinden geçecek şekilde, kullanılabilir nitelikte standart eğri grafikleri oluşturulmuştur. CAT ve ACT genleri için elde edilen standart eğri grafikleri şekil 4.11 ve şekil 4.13'te gösterilmiştir.



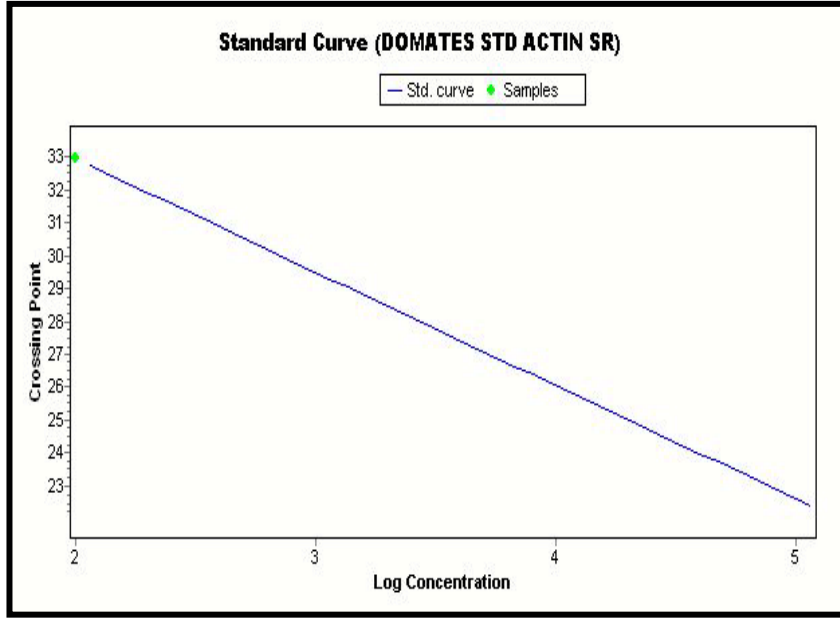
Şekil 4.10 Katalaz (CAT) standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla PCR'ı yapılmış cDNA'ya ait seri dilüsyonlar sonucu elde edilen pik görüntüsü



Şekil 4.11 Katalaz (CAT) standart eğri grafiği
(Efficiency: 1,969; Error: 0,0138; Slope: -3,398; YIntercept: 48,84)



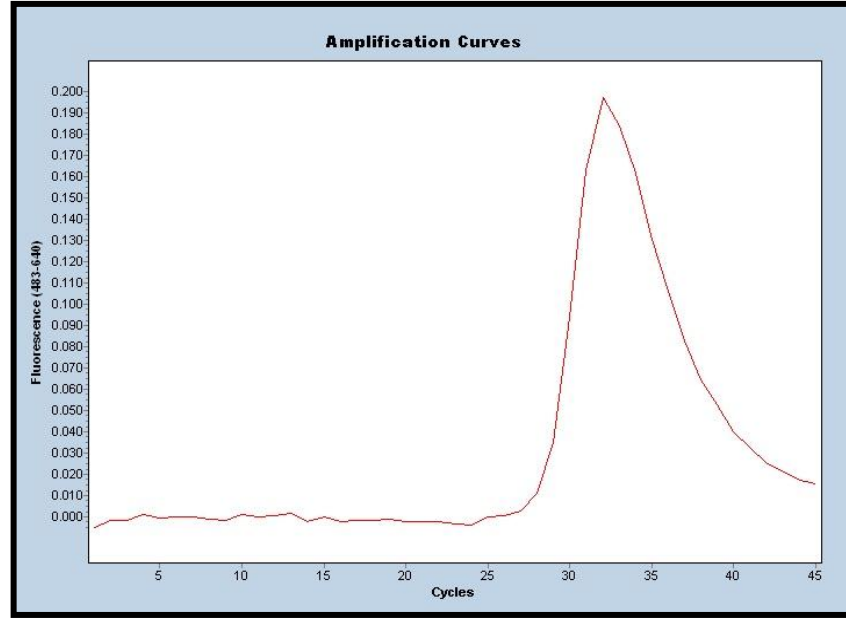
Şekil 4.12 Aktin (ACT) standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla PCR'ı yapılmış cDNA'ya ait seri dilüsyonlar sonucu elde edilen pik görüntüsü



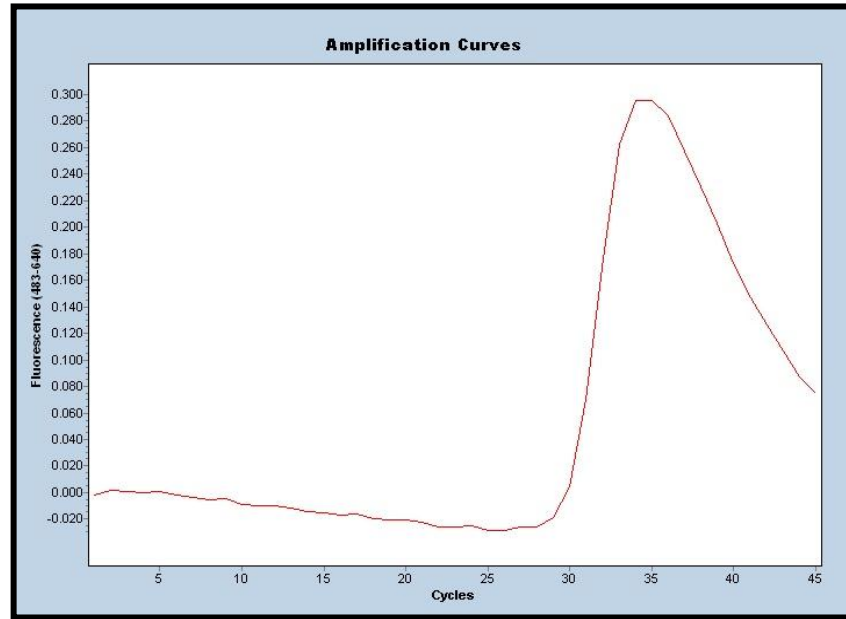
Şekil 4.13 Aktin (ACT) standart eğri grafiği
(Efficiency: 1.954; Error: 0.000454; Slope: -3.438; YIntercept: 39.65)

4.6.1 100 mM tuz (NaCl) stresi

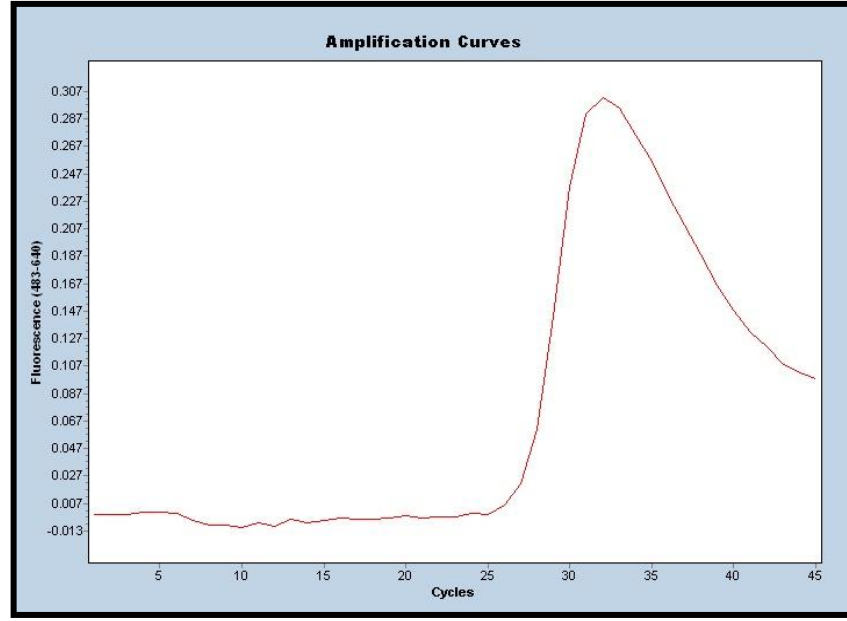
Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ile 100 mM tuz osmotik basıncı ≈ 190 mmol/kg olarak tespit edilmiştir. 100 mM tuz stresi altında 48 saat muamele edilen 25 günlük *Solanum lycopersicum* L. (domates) fidelerinden 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler hemen -80 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. CAT ve ACT için üçer tekrarlı olarak real time PCR reaksiyonları Light Cycler ® 480 System (Roche), thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct (Cycle threshold - PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış olan değer) değerleri belirlenmiştir. 100 mM tuz stresi uygulanan bitki örneklerinin CAT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.14 - 4.20).



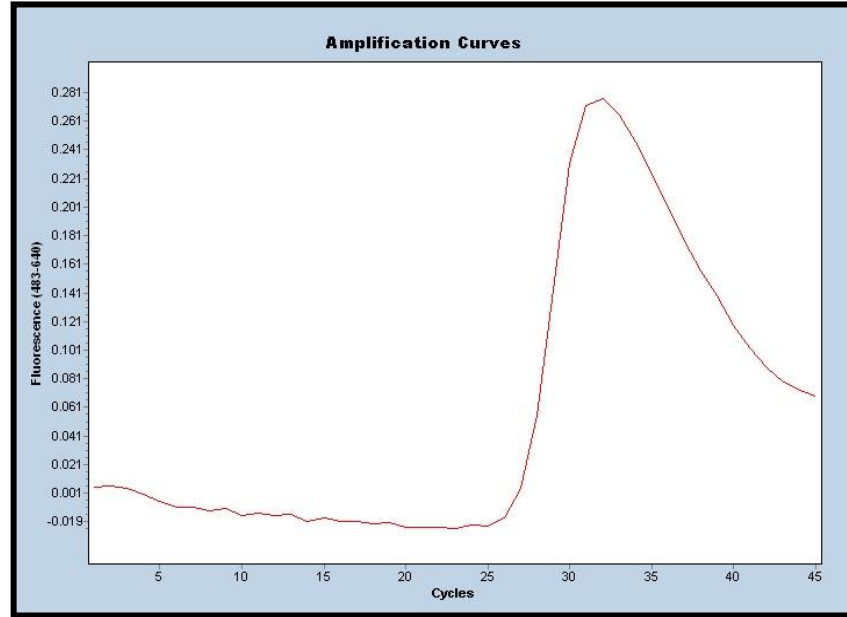
Şekil 4.14 Stres uygulanmış bitkileri karşılaştırmak amacıyla kullanılan stres uygulanmamış (kontrol) bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



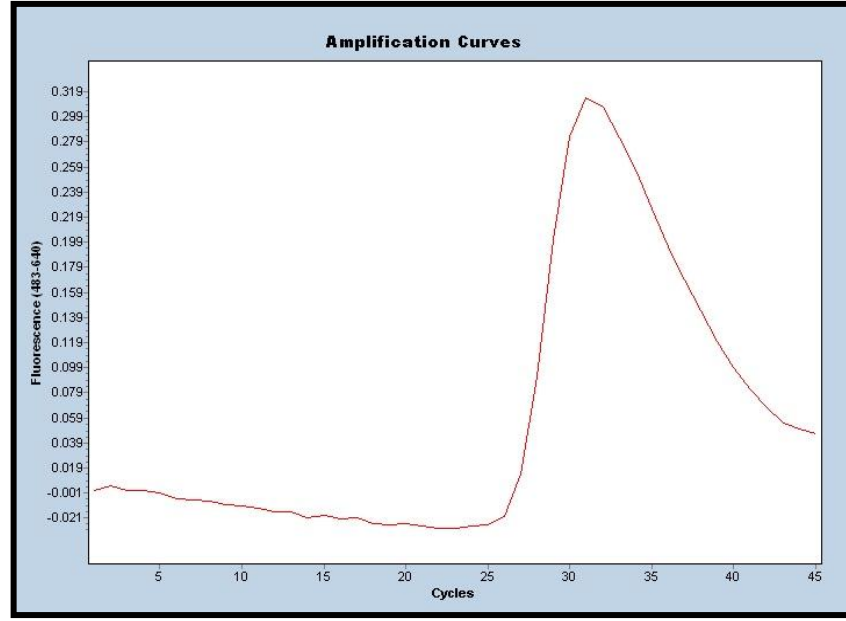
Şekil 4.15 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



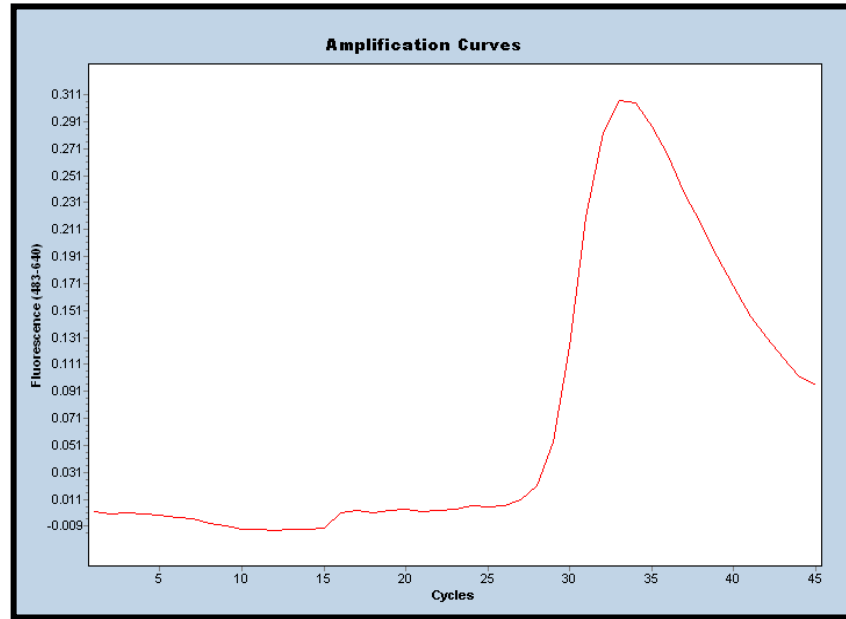
Şekil 4.16 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



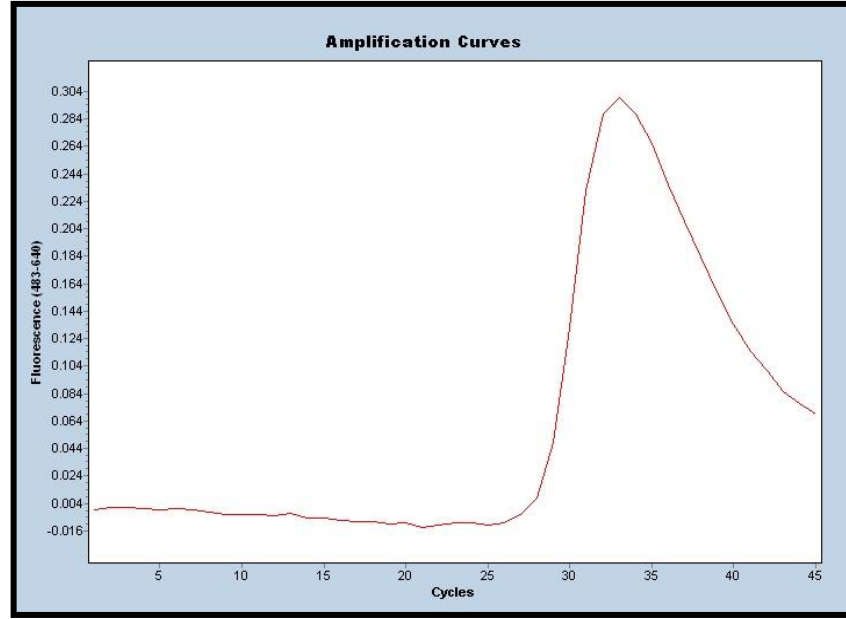
Şekil 4.17 9 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.18 12 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.19 24 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.20 48 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili

100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği kullanılarak CAT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

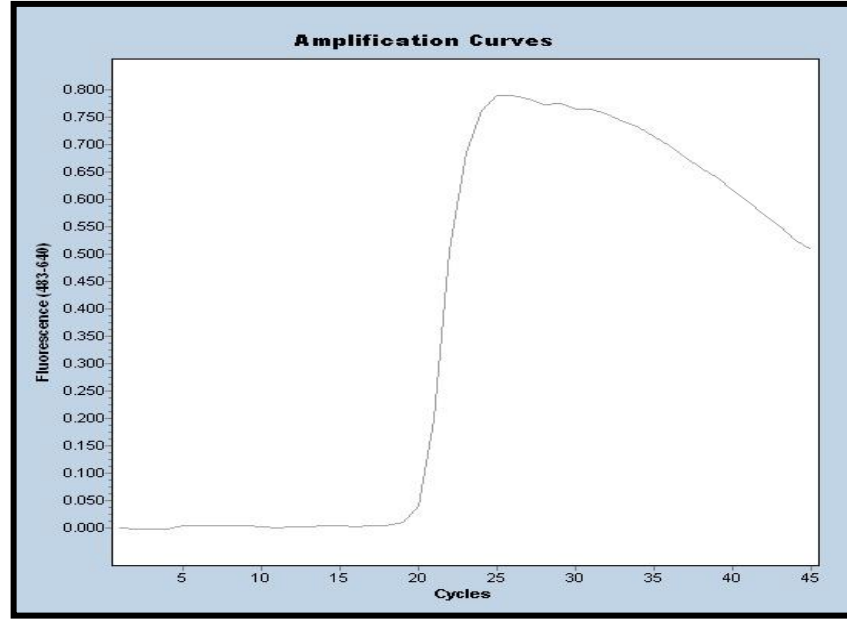
Çizelge 4.3 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri

No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	Tuz 100 mM Kontrol	27,04	2,24E+05
2.	Tuz 100 mM Kontrol	26,89	2,50E+05
3.	Tuz 100 mM Kontrol	27,24	2,22E+05
4.	Tuz 100 mM 3 saat	28,79	7,03E+05
5.	Tuz 100 mM 3 saat	28,60	8,00E+05
6.	Tuz 100 mM 3 saat	28,87	7,01E+05
7.	Tuz 100 mM 6 saat	26,59	3,11E+06
8.	Tuz 100 mM 6 saat	26,19	4,09E+06
9.	Tuz 100 mM 6 saat	26,36	4,06E+06

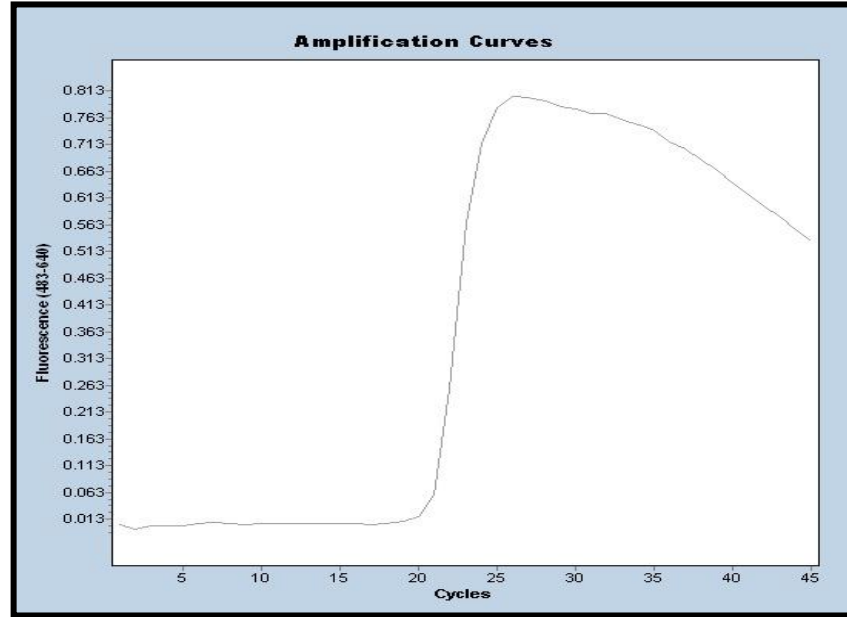
Çizelge 4.3 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri (devam)

No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
10.	Tuz 100 mM 9 saat	25,94	4,84E+06
11.	Tuz 100 mM 9 saat	25,93	4,89E+06
12.	Tuz 100 mM 9 saat	25,86	4,90E+06
13.	Tuz 100 mM 12 saat	27,17	2,10E+06
14.	Tuz 100 mM 12 saat	27,66	2,06E+06
15.	Tuz 100 mM 12 saat	27,57	2,07E+06
16.	Tuz 100 mM 24 saat	27,53	8,04E+05
17.	Tuz 100 mM 24 saat	27,62	8.19E+05
18.	Tuz 100 mM 24 saat	27,80	8,16E+05
19.	Tuz 100 mM 48 saat	27,24	2,01E+06
20.	Tuz 100 mM 48 saat	27,01	2,20E+06
21.	Tuz 100 mM 48 saat	26,98	2,21E+06

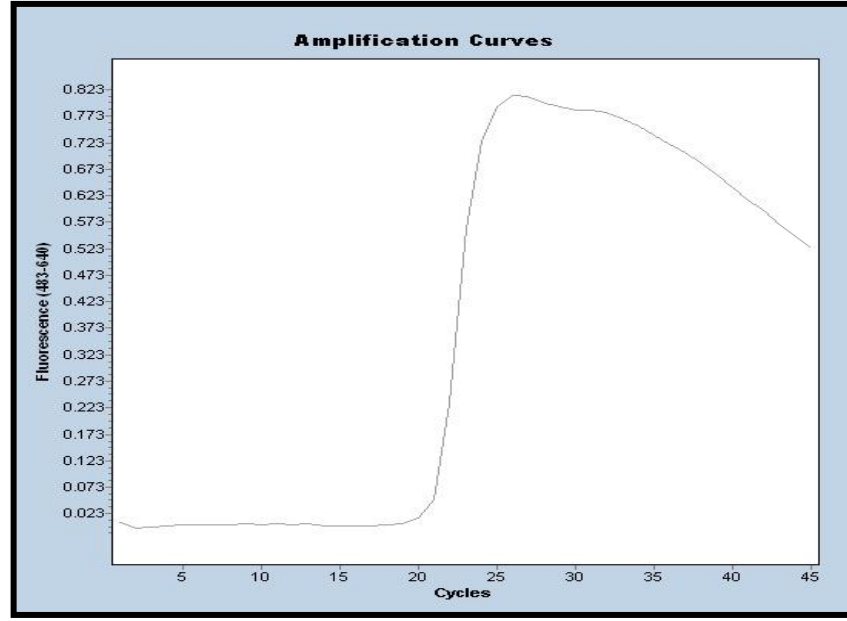
100 mM Tuz (NaCl) stresi uygulanarak yetiştirilen örneklerin, ACT gen bölgesini çoğaltmak amacıyla yapılan real time PCR reaksiyonları üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığının şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 100 mM tuz stresi uygulanan bitki örneklerinin ACT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.21 – 4.27).



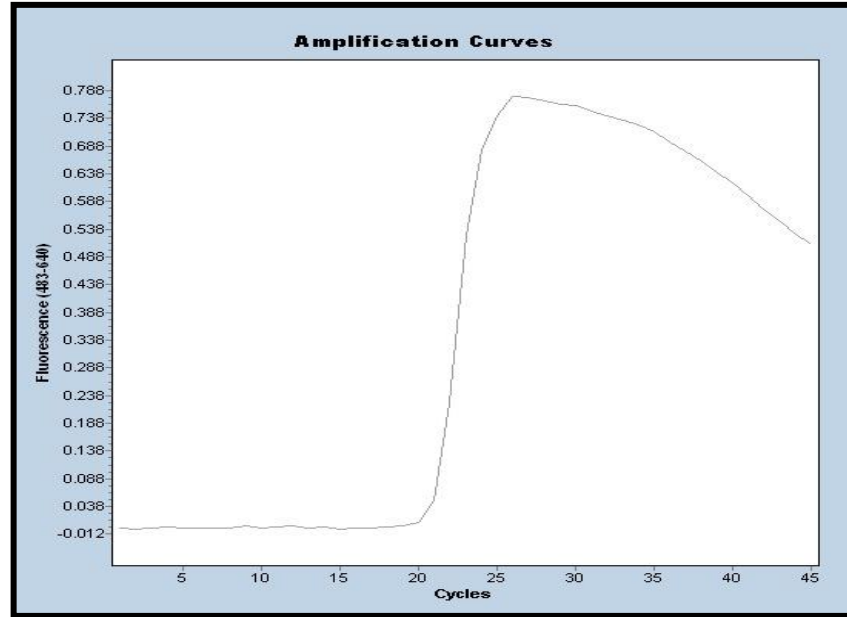
Şekil 4.21 Stres uygulanmış bitkileri karşılaştırmak amacıyla kullanılan stres uygulanmamış (kontrol) bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



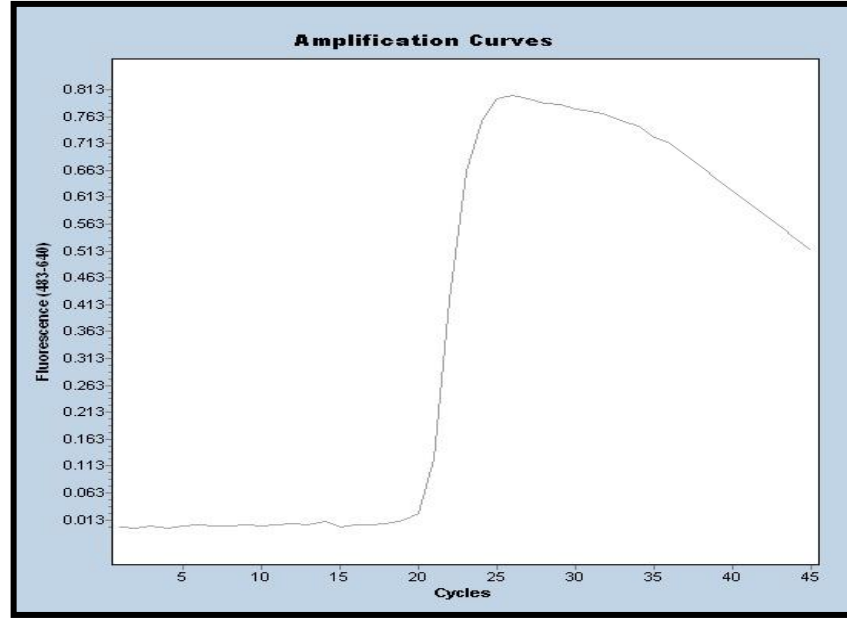
Şekil 4.22 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



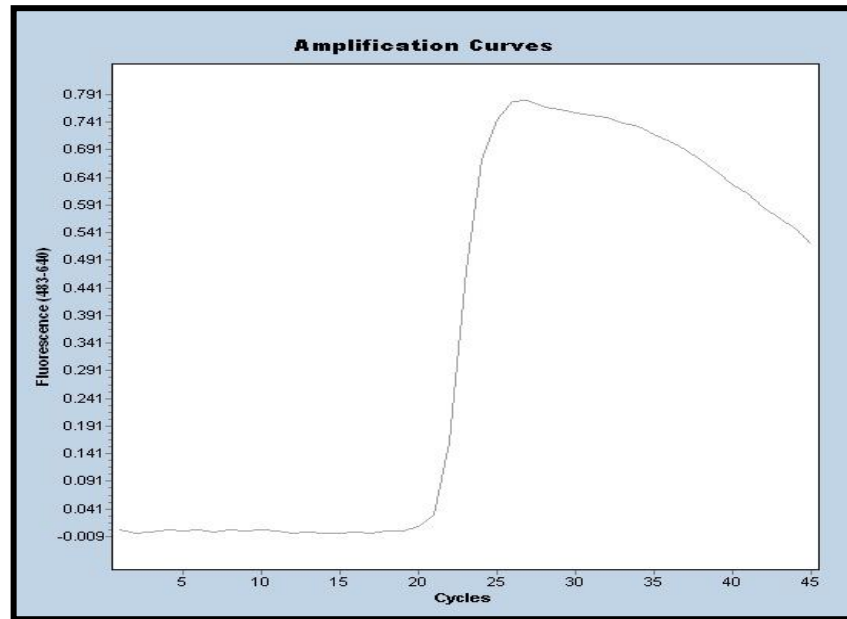
Şekil 4.23 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



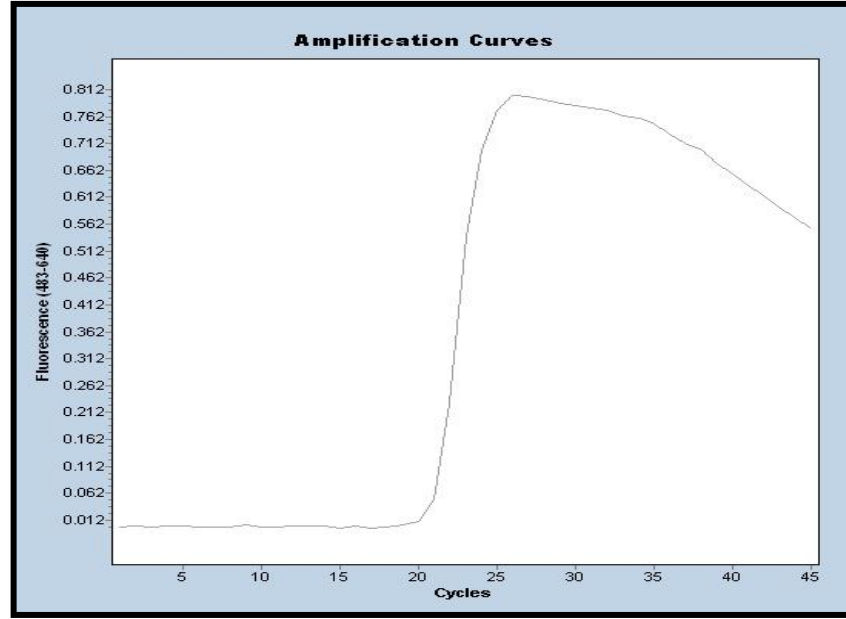
Şekil 4.24 9 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.25 12 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.26 24 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.27 48 saat süre ile 100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili

100 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile ACT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri

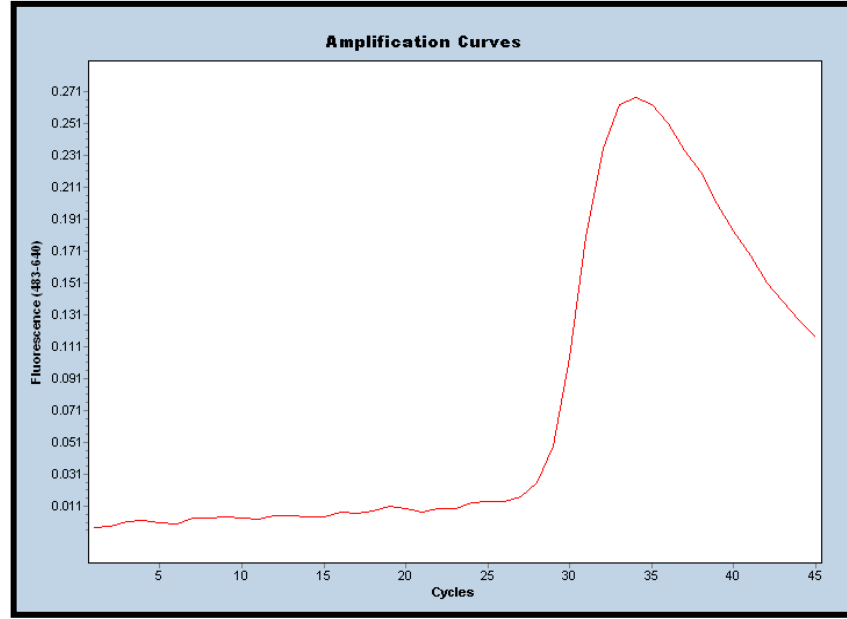
No	Örnek Adı	ACT Ct Değeri	ACT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	Tuz 100 mM Kontrol	18,93	3,60E+06
2.	Tuz 100 mM Kontrol	18,98	3,48E+06
3.	Tuz 100 mM Kontrol	19,06	3,46E+06
4.	Tuz 100 mM 3 saat	19,75	2,08E+06
5.	Tuz 100 mM 3 saat	19,73	2,11E+06
6.	Tuz 100 mM 3 saat	19,54	2,13E+06
7.	Tuz 100 mM 6 saat	19,81	2,01E+06
8.	Tuz 100 mM 6 saat	19,86	1,94E+06
9.	Tuz 100 mM 6 saat	19,78	2,01E+06

Çizelge 4.4 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri (devam)

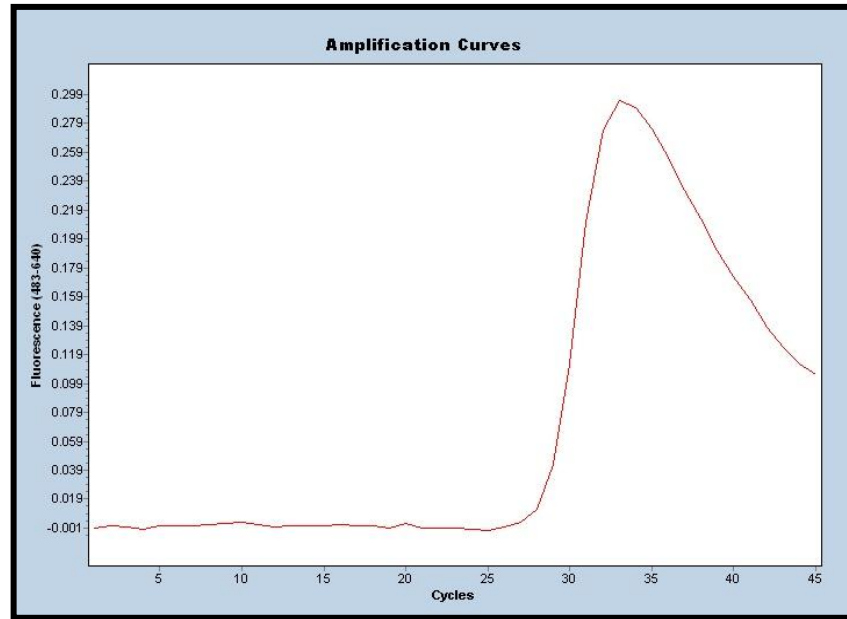
No	Örnek Adı	ACT Ct Değeri	ACT Ekspresyonu Konsantrasyonu
10.	Tuz 100 mM 9 saat	19,81	2,00E+06
11.	Tuz 100 mM 9 saat	19,90	1,89E+06
12.	Tuz 100 mM 9 saat	19,59	2,02E+06
13.	Tuz 100 mM 12 saat	19,23	2,95E+06
14.	Tuz 100 mM 12 saat	19,19	3,03E+06
15.	Tuz 100 mM 12 saat	19,06	3,05E+06
16.	Tuz 100 mM 24 saat	20,02	1,75E+06
17.	Tuz 100 mM 24 saat	19,84	1,97E+06
18.	Tuz 100 mM 24 saat	19,81	1,98E+06
19.	Tuz 100 mM 48 saat	19,82	1,99E+06
20.	Tuz 100 mM 48 saat	19,87	1,93E+06
21.	Tuz 100 mM 48 saat	19,61	2,01E+06

4.6.2 150 mM tuz (NaCl) stresi

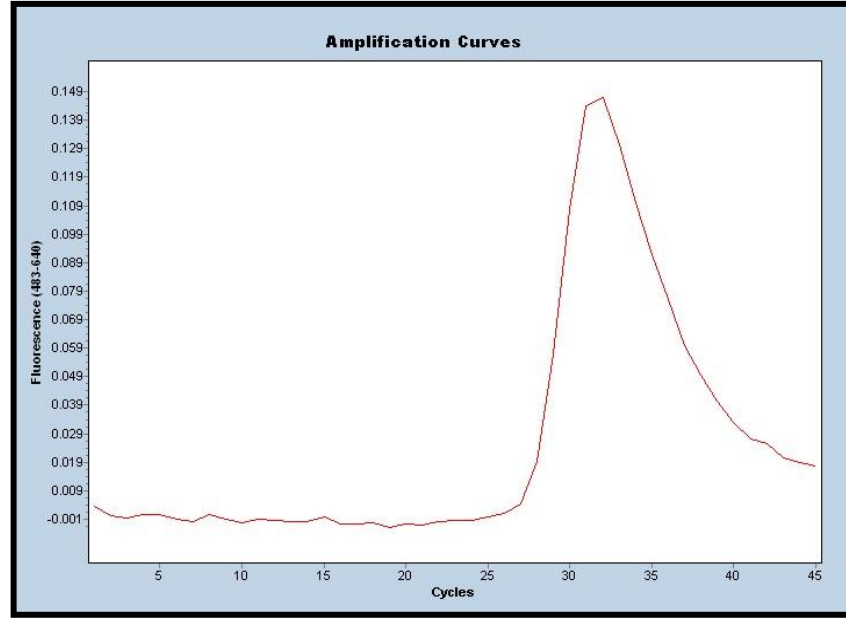
Osmometre cihazı ile 150 mM tuz osmotik basıncı $\approx$ 290 mmol/kg olarak tespit edilmiştir. 150 mM tuz stresi altında 48 saat muamele edilen 25 günlük *Solanum lycopersicum* L. (domates) fidelerinden 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler hemen -80 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. CAT ve ACT için üçer tekrarlı olarak real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 150 mM tuz stresi uygulanan bitki örneklerinin CAT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.28-4.33).



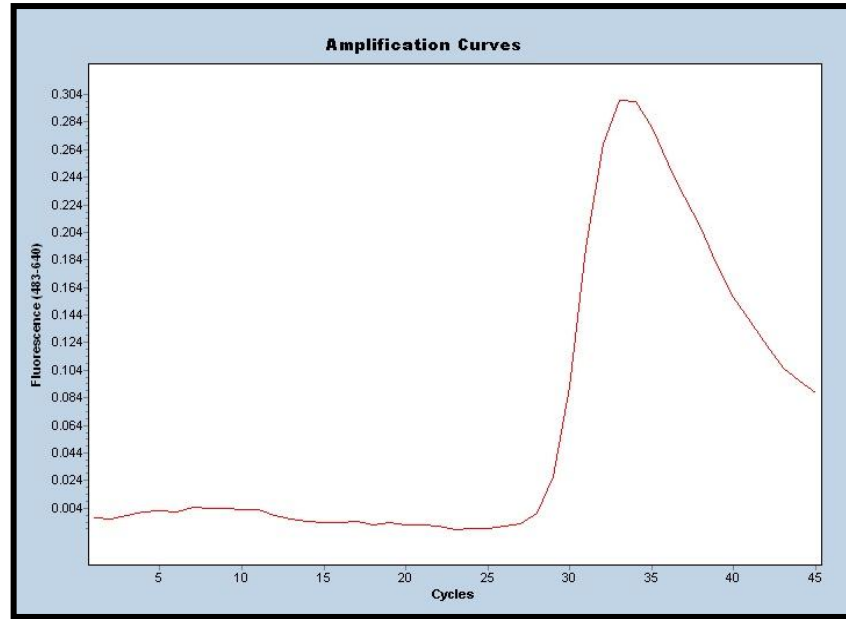
Şekil 4.28 3 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



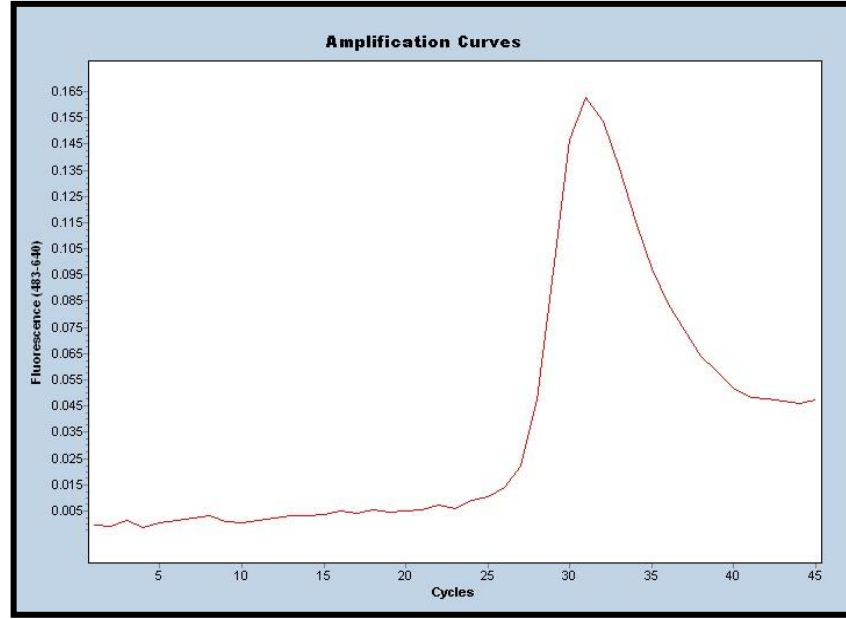
Şekil 4.29 6 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



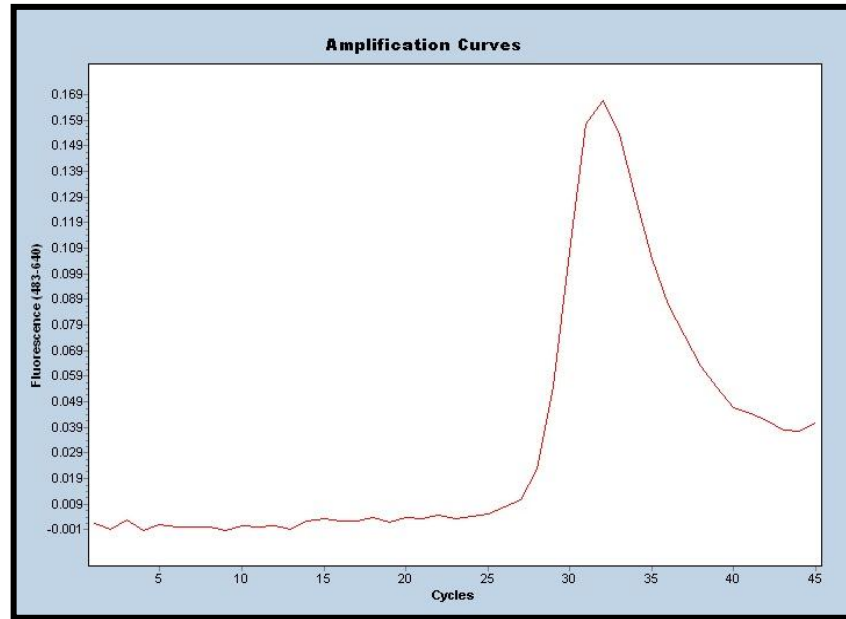
Şekil 4.30 9 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.31 12 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.32 24 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.33 48 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili

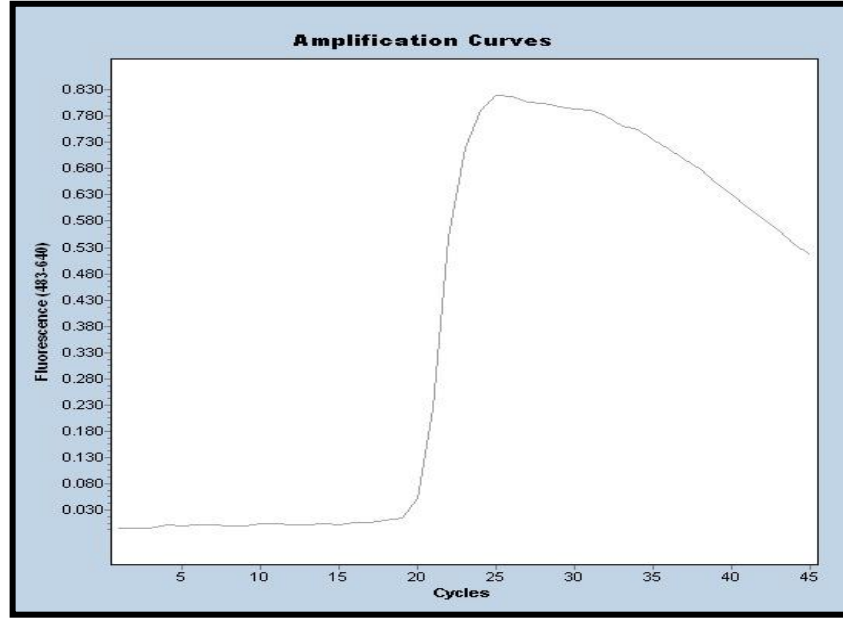
150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile CAT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri

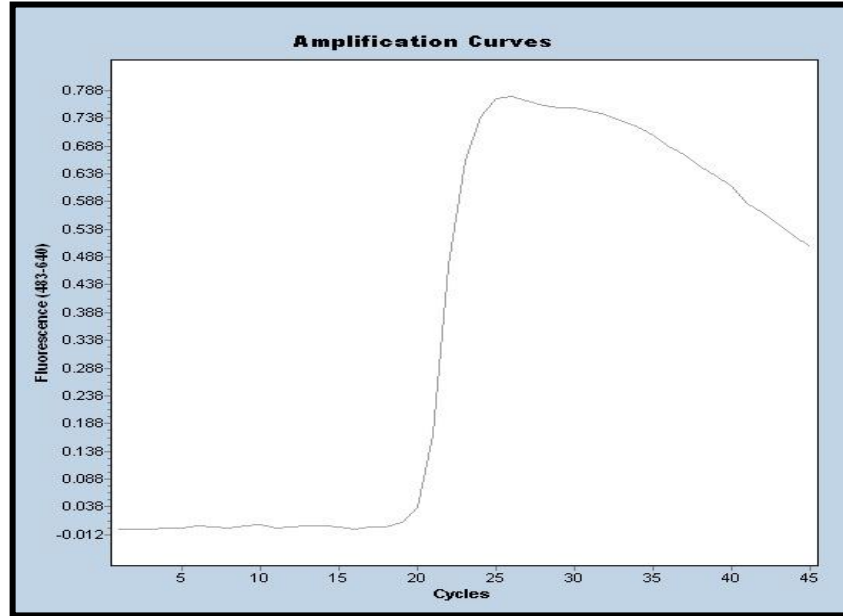
No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	Tuz 150 mM Kontrol	27,04	2,24E+05
2.	Tuz150 mM Kontrol	26,89	2,50E+05
3.	Tuz 150 mM Kontrol	26,98	2,49E+05
4.	Tuz 150 mM 3 saat	25,58	8,69E+04
5.	Tuz 150 mM 3 saat	24,89	1,48E+05
6.	Tuz 150 mM 3 saat	25,69	8,65E+04
7.	Tuz 150 mM 6 saat	27,56	1,62E+06
8.	Tuz 150 mM 6 saat	27,53	1,65E+06
9.	Tuz 150 mM 6 saat	27,28	1,67E+06
10.	Tuz 150 mM 9 saat	26,76	2,78E+05
11.	Tuz 150 mM 9 saat	26,46	3,52E+05
12.	Tuz 150 mM 9 saat	26,71	2,79E+05
13.	Tuz 150 mM 12 saat	27,99	1,20E+06
14.	Tuz 150 mM 12 saat	27,70	1,47E+06
15.	Tuz 150 mM 12 saat	27,85	1,21E+06
16.	Tuz 150 mM 24 saat	27,42	1,78E+06
17.	Tuz 150 mM 24 saat	27,01	1,81E+06
18.	Tuz 150 mM 24 saat	27,26	1,79E+06
19.	Tuz 150 mM 48 saat	26,65	3,79E+04
20.	Tuz 150 mM 48 saat	26,89	3,13E+04
21.	Tuz 150 mM 48 saat	27,21	3,09E+04

150 mM Tuz (NaCl) stresi uygulanarak yetiştirilen örneklerin, ACT gen bölgesini çoğaltmak amacıyla yapılan real time PCR reaksiyonları üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans

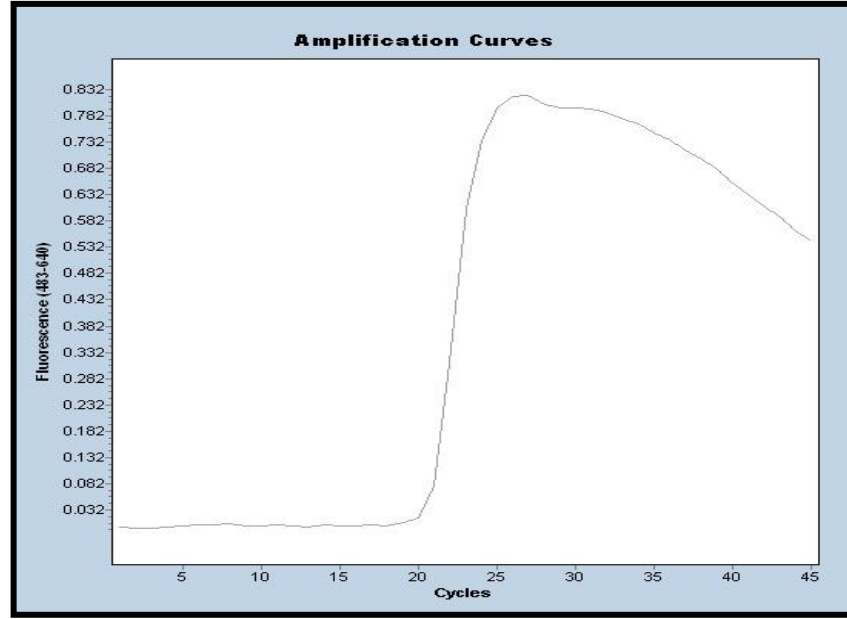
ışığın şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 150 mM tuz stresi uygulanan bitki örneklerinin ACT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.34 – Şekil 4.39).



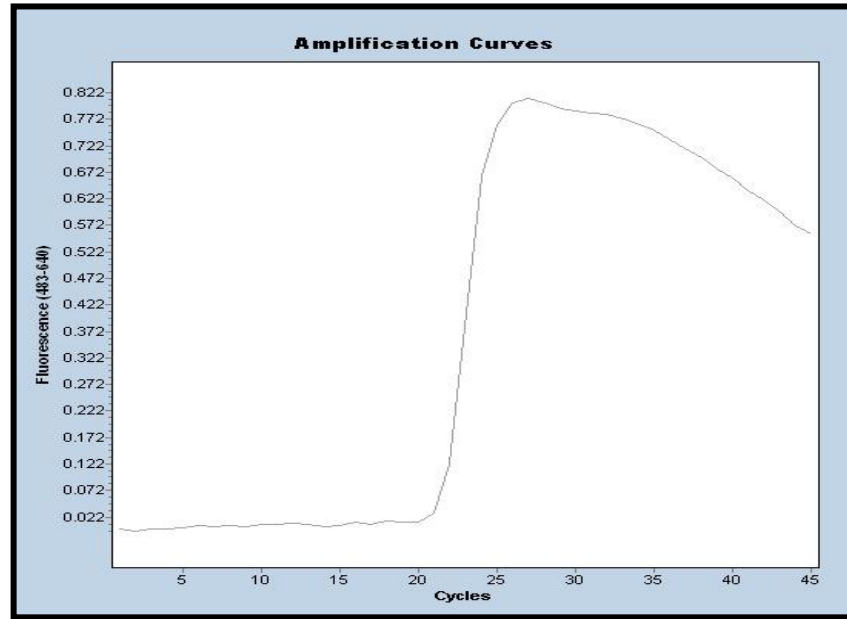
Şekil 4.34 3 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



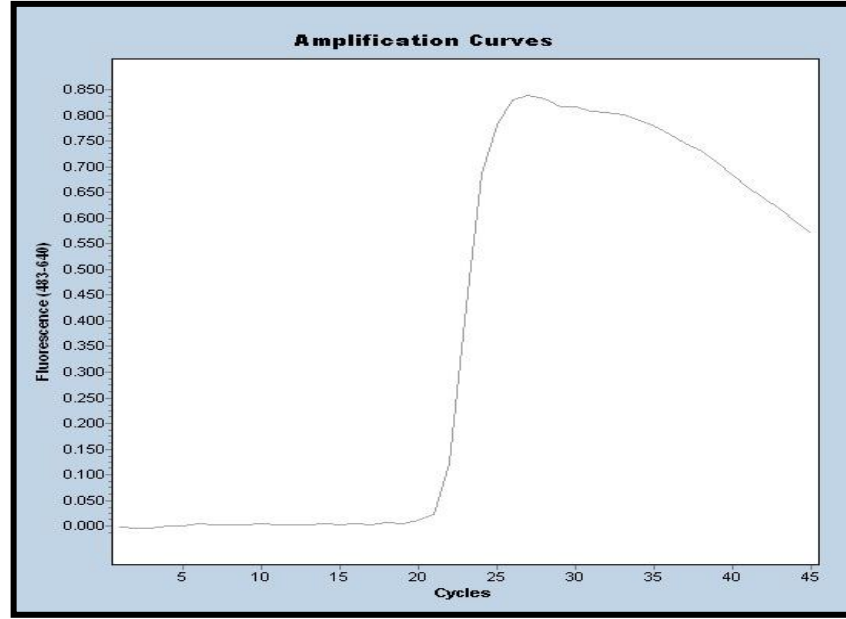
Şekil 4.35 6 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



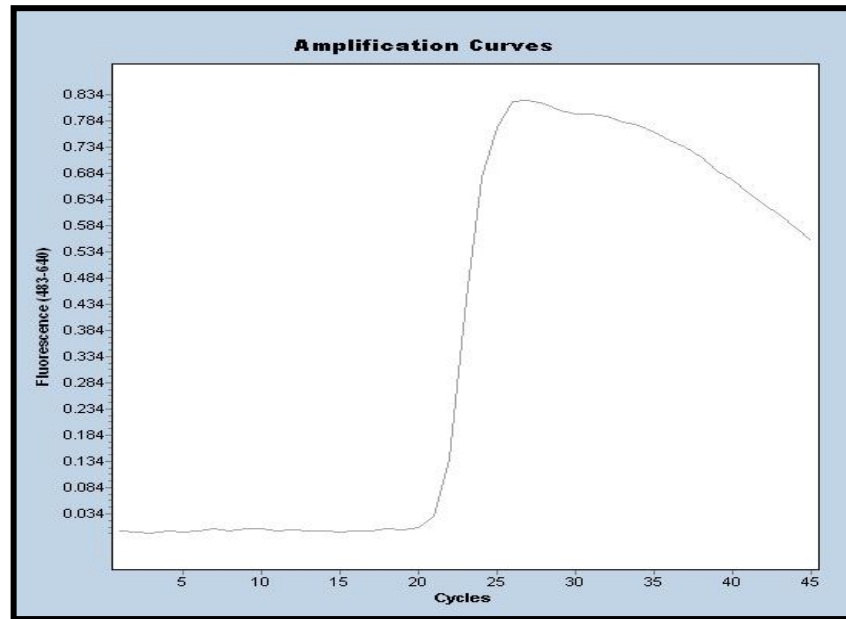
Şekil 4.36 9 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.37 12 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.38 24 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.39 48 saat süre ile 150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili

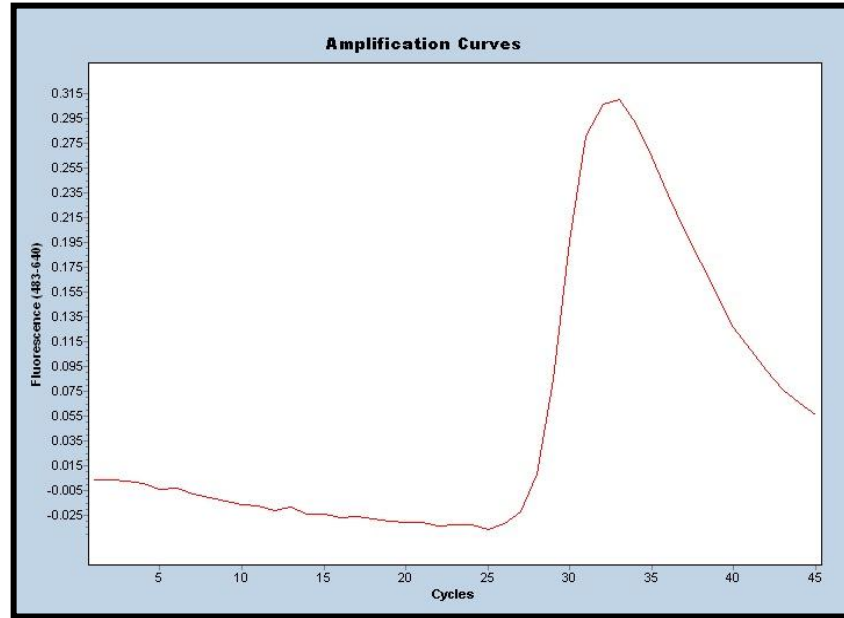
150 mM NaCl stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile ACT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri

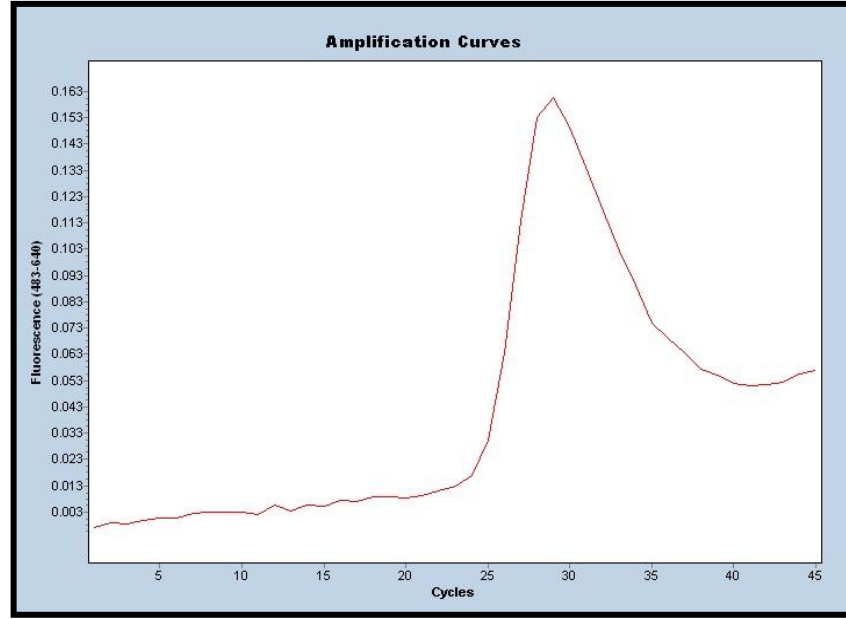
No	Örnek Adı	ACT Ct Değeri	ACT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	Tuz 150 mM Kontrol	19,78	2,05E+06
2.	Tuz150 mM Kontrol	19,89	1,90E+06
3.	Tuz150 mM Kontrol	19,75	2,05E+06
4.	Tuz 150 mM 3 saat	18,87	3,74E+06
5.	Tuz 150 mM 3 saat	18,96	3,51E+06
6.	Tuz 150 mM 3 saat	18,93	3,52E+06
7.	Tuz 150 mM 6 saat	19,00	3,42E+06
8.	Tuz 150 mM 6 saat	19,07	3,28E+06
9.	Tuz 150 mM 6 saat	19,11	3,27E+06
10.	Tuz 150 mM 9 saat	19,62	2,27E+06
11.	Tuz 150 mM 9 saat	19,67	2,21E+06
12.	Tuz 150 mM 9 saat	19,52	2,28E+06
13.	Tuz 150 mM 12 saat	20,31	1,44E+06
14.	Tuz 150 mM 12 saat	20,28	1,47E+06
15.	Tuz 150 mM 12 saat	20,37	1,44E+06
16.	Tuz 150 mM 24 saat	20,27	1,48E+06
17.	Tuz 150 mM 24 saat	20,48	1,29E+06
18.	Tuz 150 mM 24 saat	20,23	1,48E+06
19.	Tuz 150 mM 48 saat	20,20	1,56E+06
20.	Tuz 150 mM 48 saat	20,24	1,52E+06
21.	Tuz 150 mM 48 saat	19,99	1,58E+06

4.6.3 100 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi

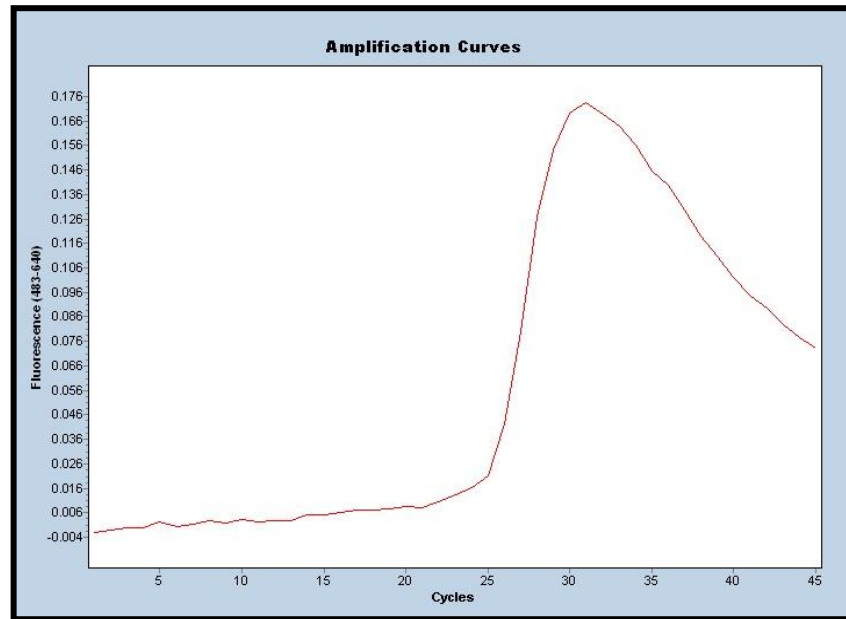
100 mM tuz uygulaması ile benzer kuraklık stresini yaratmak amacıyla PEG (polietilenglikol) kullanılmıştır. Tuz ve PEG konsantrasyonları osmometre ile belirlenerek birbirlerine denkleştirilmiştir. 100 mM tuz ile eş miktarda osmotik basınç (≈ 190 mmol/kg) oluşturacak miktarda (%15,955) Polietilen Glikol 6000 (PEG 6000) ile kuraklık stresi uygulanmıştır. 48 saat 100 mM PEG ile muamele edilen 25 günlük, iki gerçek yapraklı *Solanum lycopersicum* L. (domates) fidelerinden 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler hemen -80 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. CAT ve ACT için üçer tekrarlı olarak real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 100 mM PEG stresi uygulanan bitki örneklerinin CAT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.40 - 4.45).



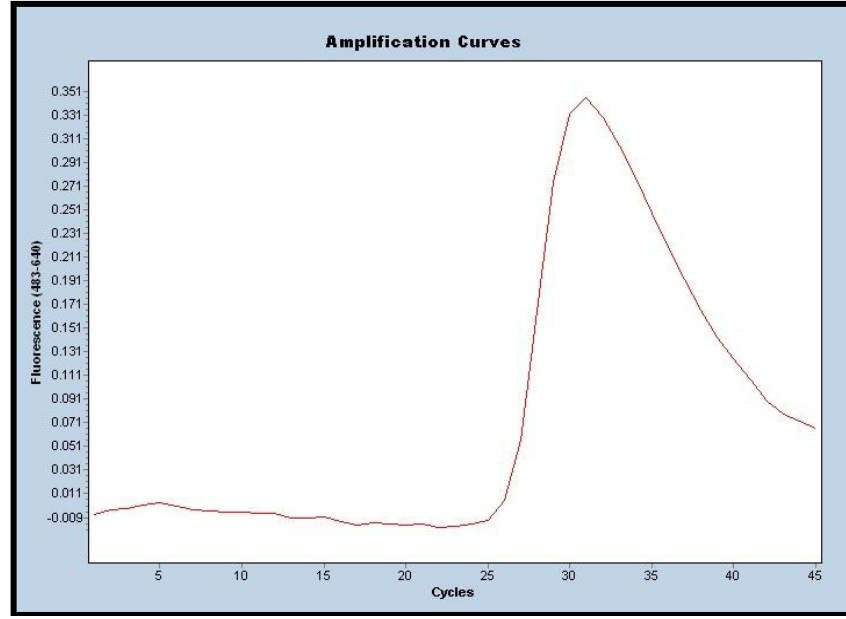
Şekil 4.40 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



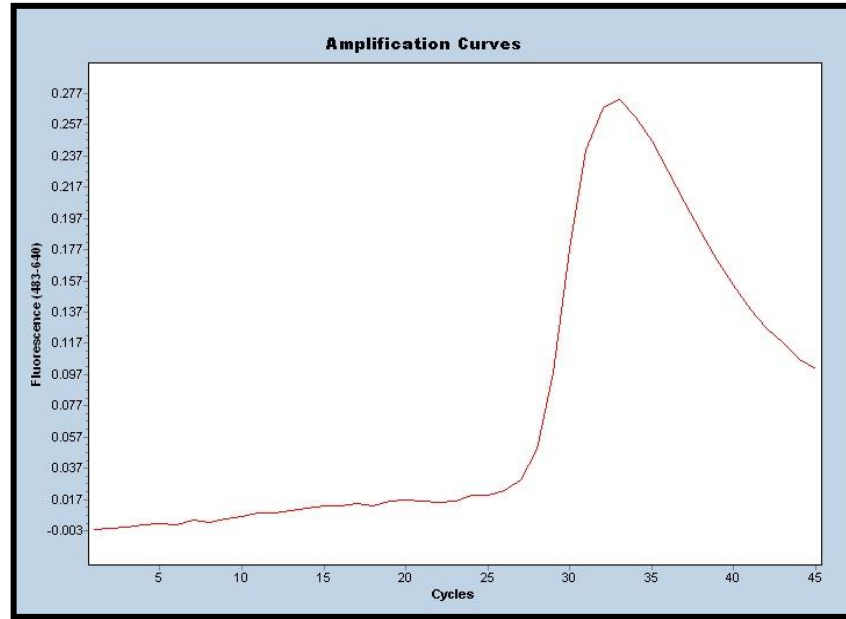
Şekil 4.41 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



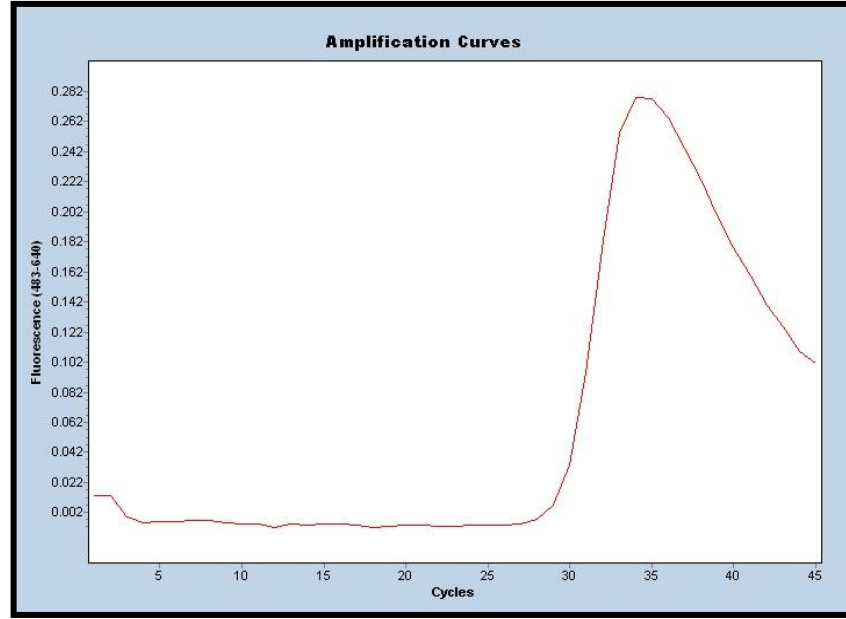
Şekil 4.42 9 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.43 12 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.44 24 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.45 48 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili

100 mM NaCl stresine eş miktarda kuraklık stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile CAT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

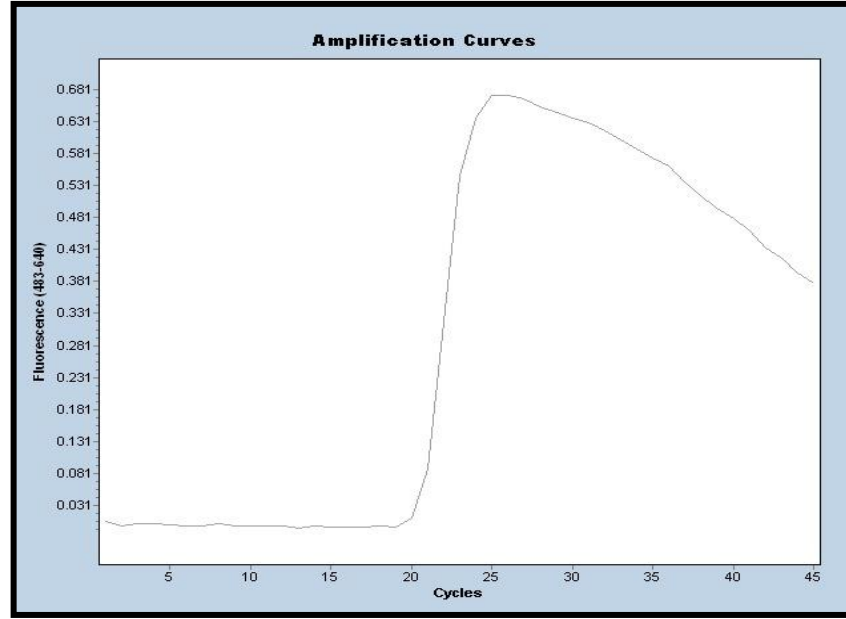
Çizelge 4.7 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri

No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	PEG 100 mM Kontrol	27,04	2,24E+05
2.	PEG 100 mM Kontrol	26,89	2,50E+05
3.	PEG 100 mM Kontrol	26,92	2,49E+05
4.	PEG 100 mM 3 saat	26,65	2,99E+06
5.	PEG 100 mM 3 saat	26,53	3,24E+06
6.	PEG 100 mM 3 saat	26,60	3,00E+06
7.	PEG 100 mM 6 saat	24,00	2,95E+05
8.	PEG 100 mM 6 saat	23,56	4,15E+05
9.	PEG 100 mM 6 saat	23,60	4,14E+05

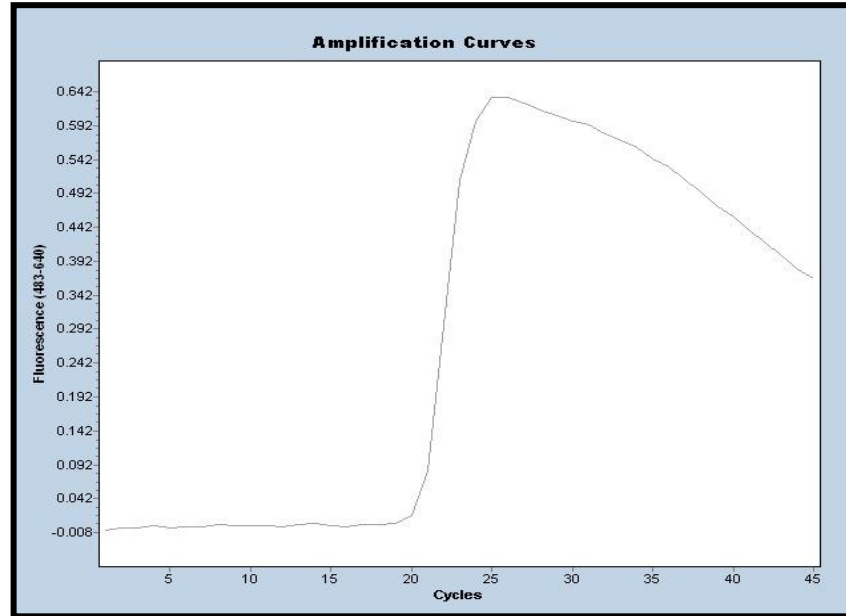
Çizelge 4.7 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) gen ekspresyonu verileri (devam)

No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
10.	PEG 100 mM 9 saat	24,46	2,06E+05
11.	PEG 100 mM 9 saat	24,65	2,04E+05
12.	PEG 100 mM 9 saat	24,63	2,04E+05
13.	PEG 100 mM 12 saat	23,01	6,34E+05
14.	PEG 100 mM 12 saat	25,13	8,40E+06
15.	PEG 100 mM 12 saat	23,17	6,30E+05
16.	PEG 100 mM 24 saat	26,04	4,52E+06
17.	PEG 100 mM 24 saat	26,48	4,44E+06
18.	PEG 100 mM 24 saat	26,39	4,46E+06
19.	PEG 100 mM 48 saat	28,76	7,15E+05
20.	PEG 100 mM 48 saat	28,64	7,76E+05
21.	PEG 100 mM 48 saat	28,59	7,77E+05

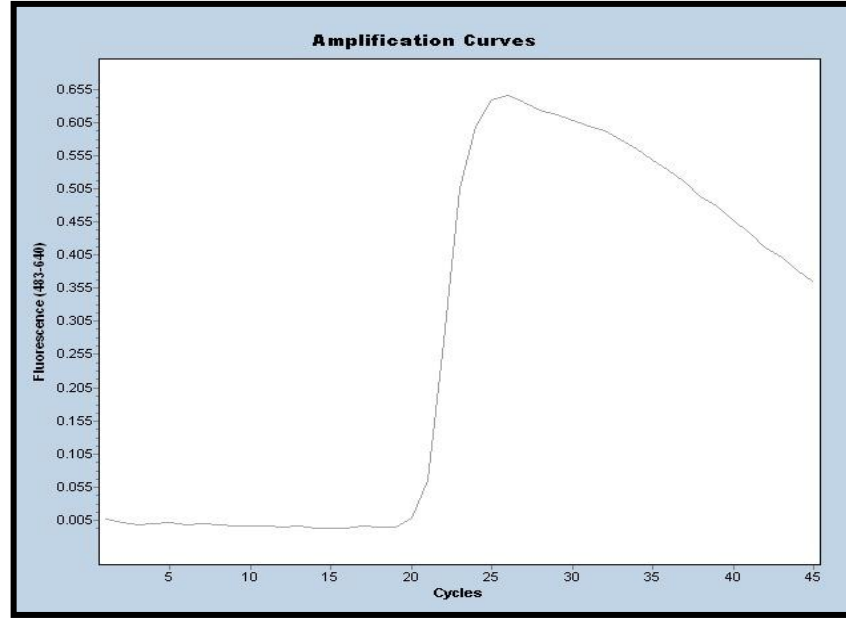
100 mM tuz stresine eş kuraklık stresi uygulanarak yetiştirilen örneklerin, ACT gen bölgesini çoğaltmak amacıyla yapılan real time PCR reaksiyonları üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 100 mM tuz stresine eş kuraklık stresi (PEG stresi) uygulanan bitki örneklerinin ACT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.46 – 4.51).



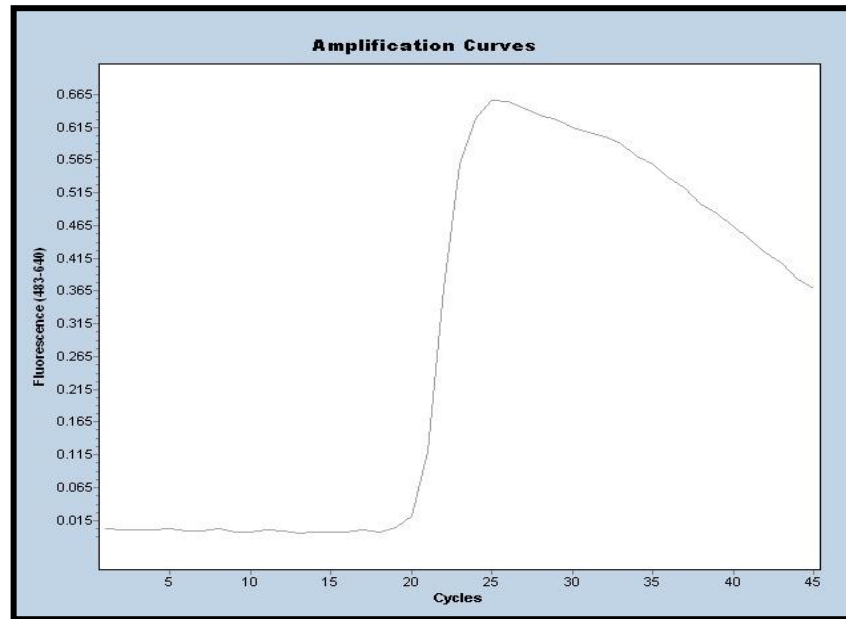
Şekil 4.46 3 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili



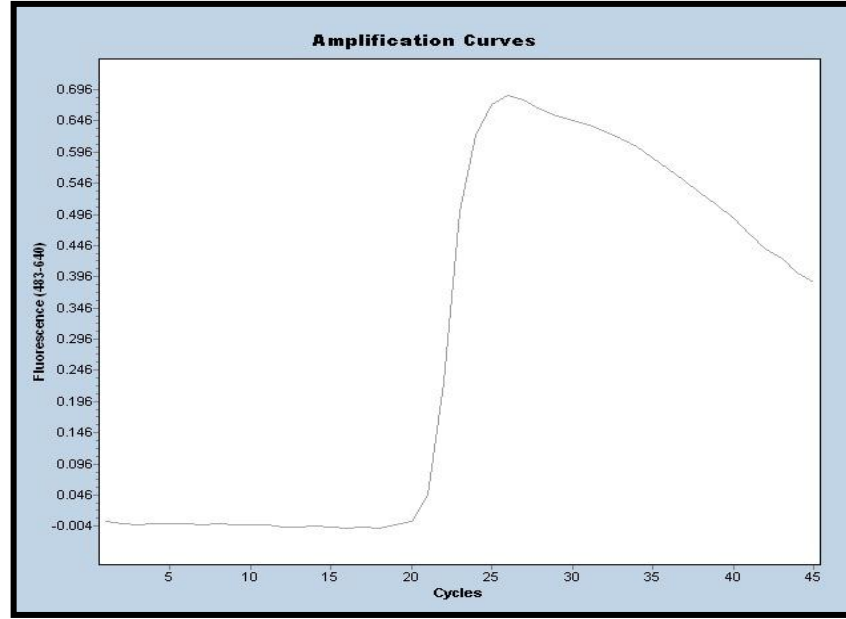
Şekil 4.47 6 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili



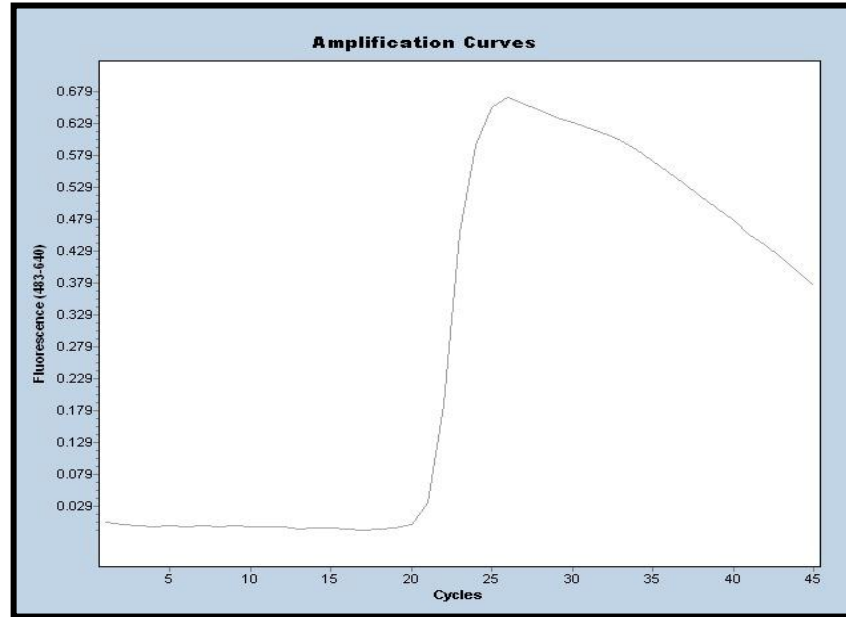
Şekil 4.48 9 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili



Şekil 4.49 12 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili



Şekil 4.50 24 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili



Şekil 4.51 48 saat süre ile 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT (aktin) real time PCR pik profili

100 mM NaCl stresine eş miktarda kuraklık stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile ACT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

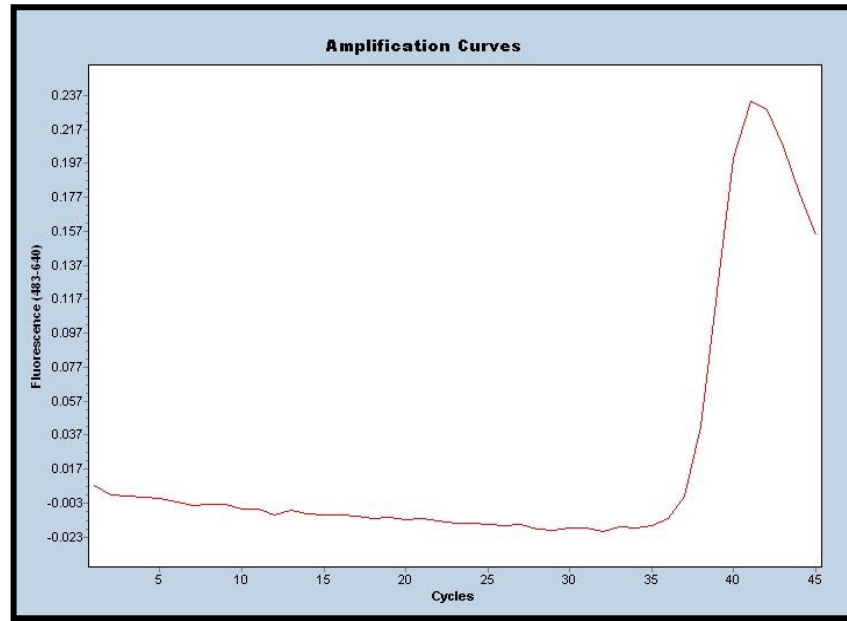
Çizelge 4.8 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri

No	Örnek Adı	ACT Ct Değeri	ACT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	PEG 100 mM Kontrol	19,57	1,17E+04
2.	PEG 100 mM Kontrol	19,75	1,03E+04
3.	PEG 100 mM Kontrol	19,65	1,17E+04
4.	PEG 100 mM 3 saat	19,41	1,30E+04
5.	PEG 100 mM 3 saat	19,45	1,27E+04
6.	PEG 100 mM 3 saat	19,32	1,31E+04
7.	PEG 100 mM 6 saat	19,43	1,28E+04
8.	PEG 100 mM 6 saat	19,43	1,28E+04
9.	PEG 100 mM 6 saat	19,40	1,28E+04
10.	PEG 100 mM 9 saat	19,50	1,22E+04
11.	PEG 100 mM 9 saat	19,55	1,18E+04
12.	PEG 100 mM 9 saat	19,53	1,18E+04
13.	PEG 100 mM 12 saat	19,10	1,59E+04
14.	PEG 100 mM 12 saat	19,02	1,68E+04
15.	PEG 100 mM 12 saat	19,01	1,68E+04
16.	PEG 100 mM 24 saat	19,69	1,08E+04
17.	PEG 100 mM 24 saat	19,79	1,00E+04
18.	PEG 100 mM 24 saat	19,65	1,08E+04
19.	PEG 100 mM 48 saat	19,80	9,98E+03
20.	PEG 100 mM 48 saat	19,84	9,76E+03
21.	PEG 100 mM 48 saat	19,82	9,97E+03

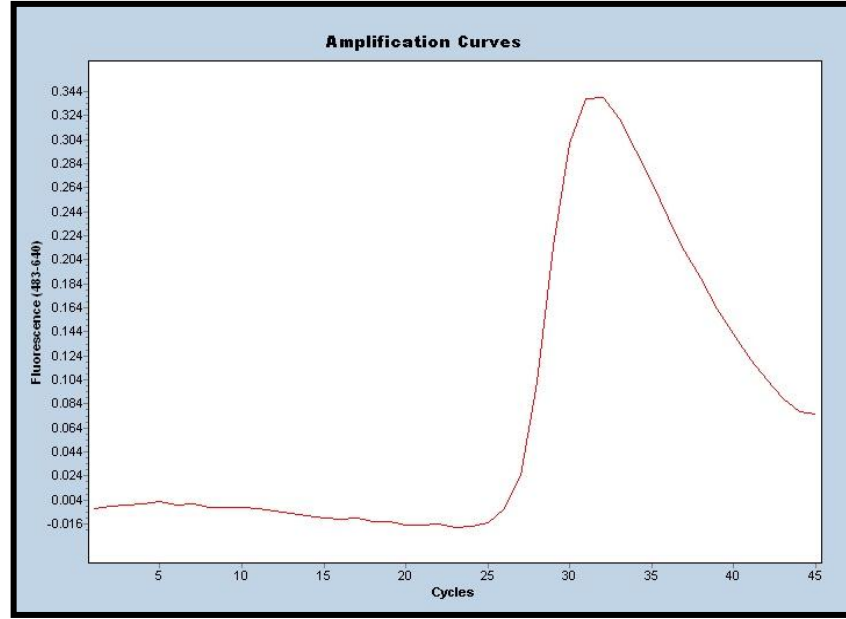
4.6.4 150 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi

150 mM tuz uygulaması ile benzer kuraklık stresini yaratmak amacıyla PEG (polietilenglikol) kullanılmıştır. Tuz ve PEG konsantrasyonları osmometre ile belirlenerek birbirlerine denkleştirilmiştir. 150 mM tuz ile eş miktarda osmotik basınç (≈ 290 mmol/kg) oluşturacak miktarda (%23,93) Polietilen Glikol 6000 (PEG 6000) ile kuraklık stresi uygulanmıştır. 48 saat 150 mM PEG ile muamele edilen 25 günlük, iki

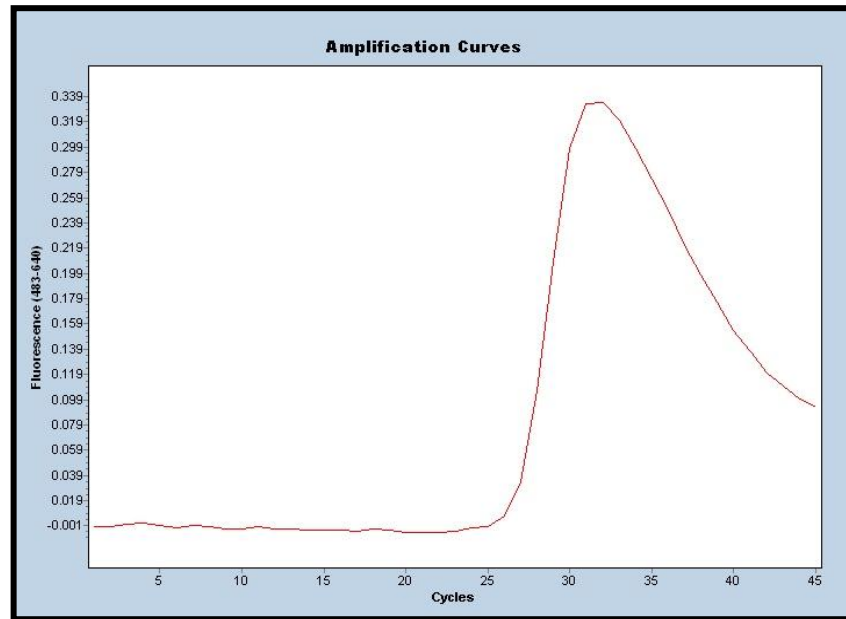
gerçek yapraklı *Solanum lycopersicum* L. (domates) fidelerinden 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler hemen -80 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve real time PCR reaksiyonu yapılmıştır. CAT ve ACT için üçer tekrarlı olarak real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 150 mM PEG stresi uygulanan bitki örneklerinin CAT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.52 –4.57).



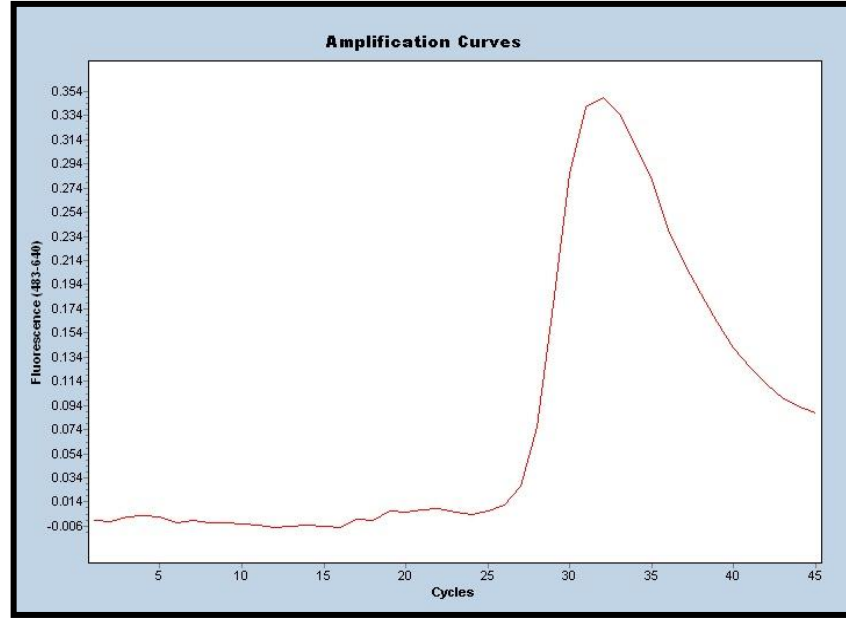
Şekil 4.52 3 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



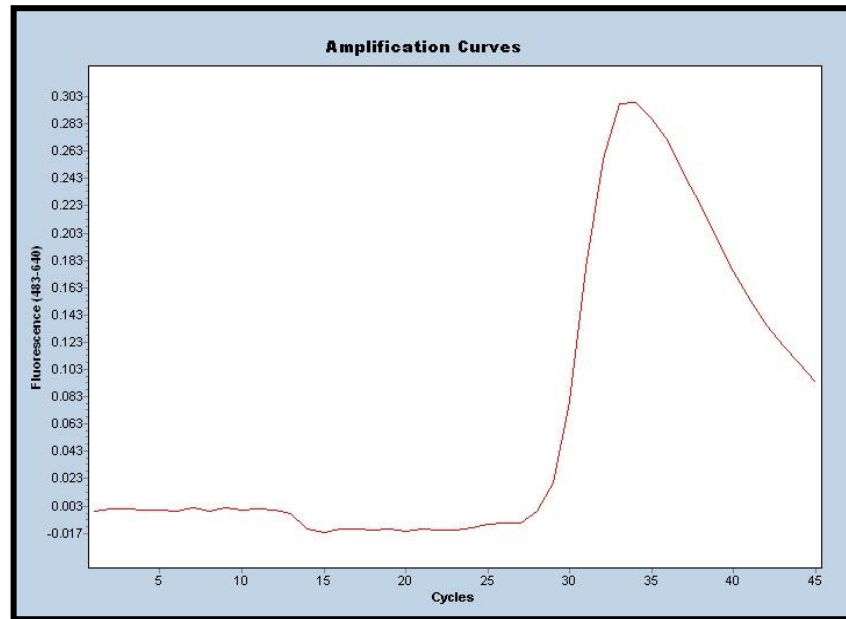
Şekil 4.53 6 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



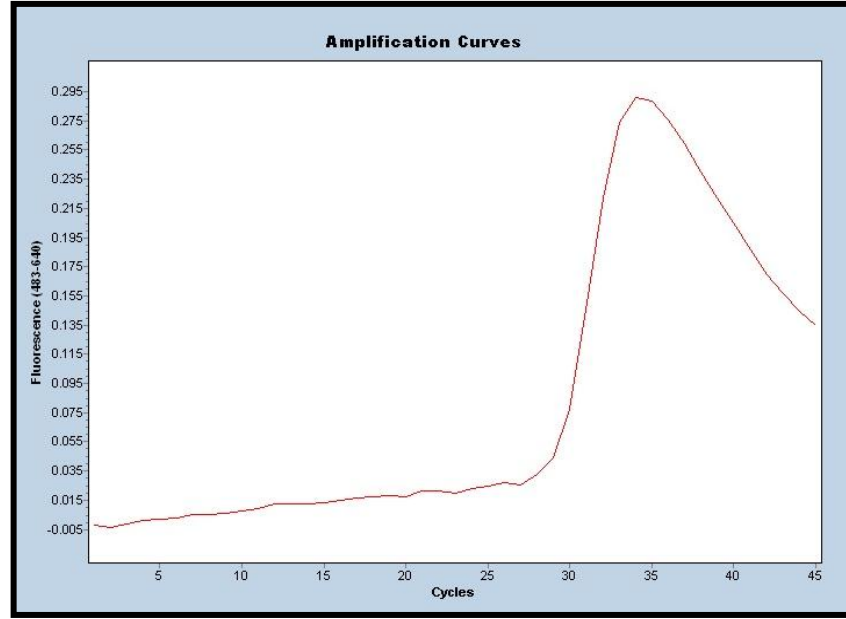
Şekil 4.54 9 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.55 12 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.56 24 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili



Şekil 4.57 48 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin CAT real time PCR pik profili

150 mM NaCl stresine eş miktarda kuraklık stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile CAT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

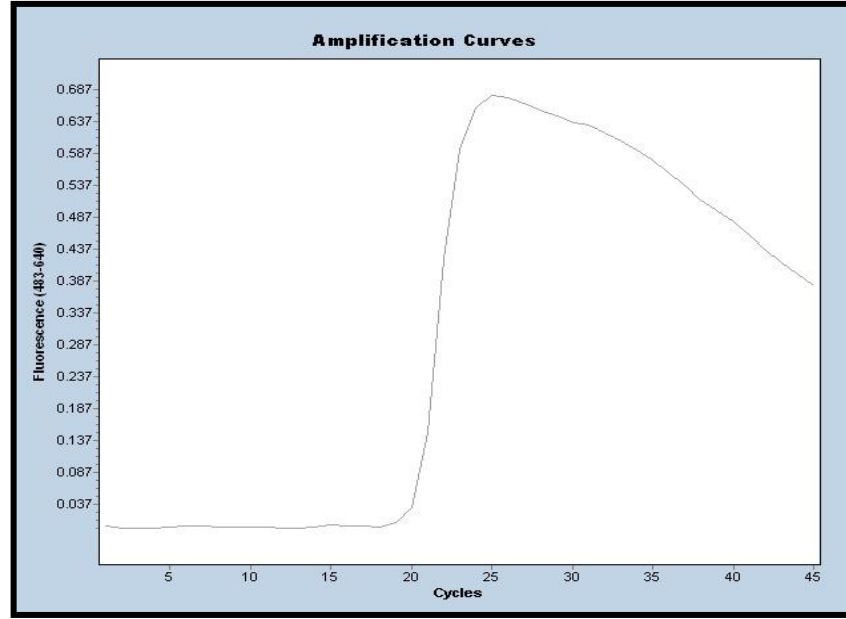
Çizelge 4.9 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) geni mRNA ifade seviyeleri

No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	PEG 150 mM Kontrol	27,04	2,24E+05
2.	PEG 150 mM Kontrol	26,89	2,50E+05
3.	PEG 150 mM Kontrol	26,94	2,50E+05
4.	PEG 150 mM 3 saat	35,94	5,80E+03
5.	PEG 150 mM 3 saat	36,61	3,90E+03
6.	PEG 150 mM 3 saat	36,90	3,87E+03
7.	PEG 100 mM 6 saat	25,80	5,33E+06
8.	PEG 100 mM 6 saat	25,69	5,72E+06
9.	PEG 100 mM 6 saat	25,75	5,71E+06

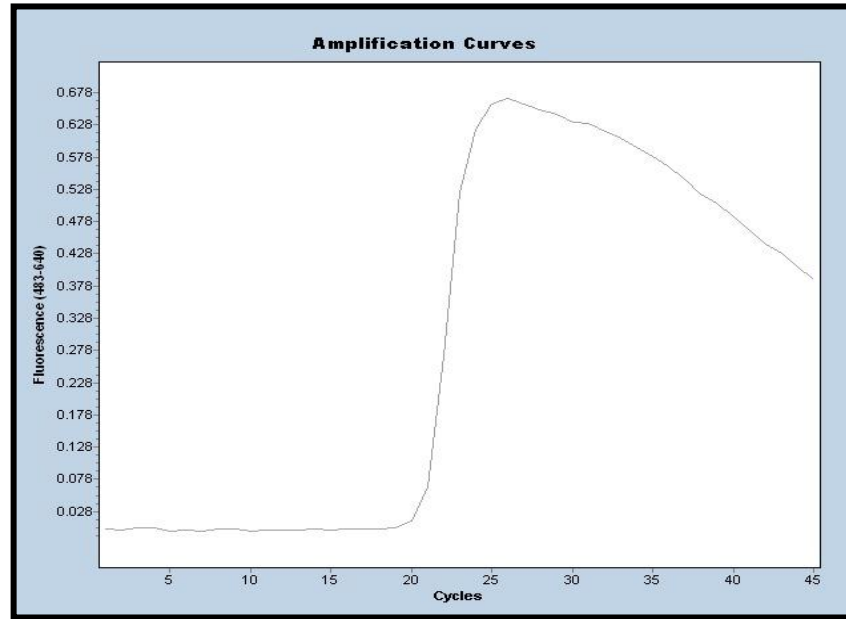
Çizelge 4.9 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) geni mRNA ifade seviyeleri (devam)

No	Örnek Adı	CAT Ct Değeri	CAT Ekspresyonu Konsantrasyonu
10.	PEG 150 mM 9 saat	25,76	5,49E+06
11.	PEG 150 mM 9 saat	25,78	5,39E+06
12.	PEG 150 mM 9 saat	25,81	5,38E+06
13.	PEG 150 mM 12 saat	26,12	4,29E+06
14.	PEG 150 mM 12 saat	26,00	4,64E+06
15.	PEG 150 mM 12 saat	26,19	4,28E+06
16.	PEG 150 mM 24 saat	27,85	1,33E+06
17.	PEG 150 mM 24 saat	29,84	3,45E+05
18.	PEG 150 mM 24 saat	27,80	1,33E+06
19.	PEG 150 mM 48 saat	28,32	9,63E+05
20.	PEG 150 mM 48 saat	28,14	1,09E+06
21.	PEG 150 mM 48 saat	28,29	9,64E+05

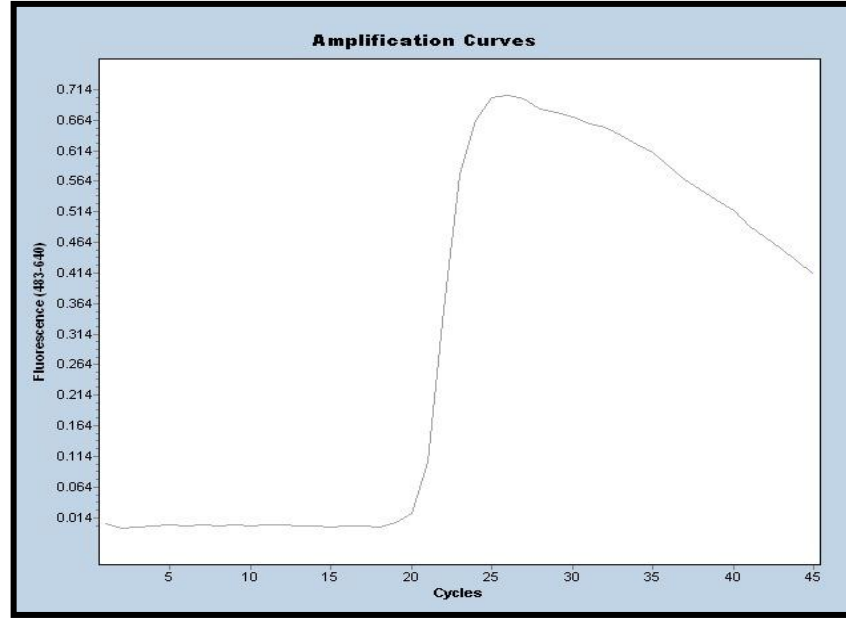
150 mM tuz stresine eş kuraklık stresi uygulanarak yetiştirilen örneklerin, ACT gen bölgesini çoğaltmak amacıyla yapılan real time PCR reaksiyonları üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR döngüsünde ürün artışına bağlı olarak oluşan floresans ışığın şiddetine göre örneklerin Ct değerleri belirlenmiştir. 150 mM tuz stresine eş kuraklık stresi (PEG stresi) uygulanan bitki örneklerinin ACT real time PCR pik profilleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.58 –4.63).



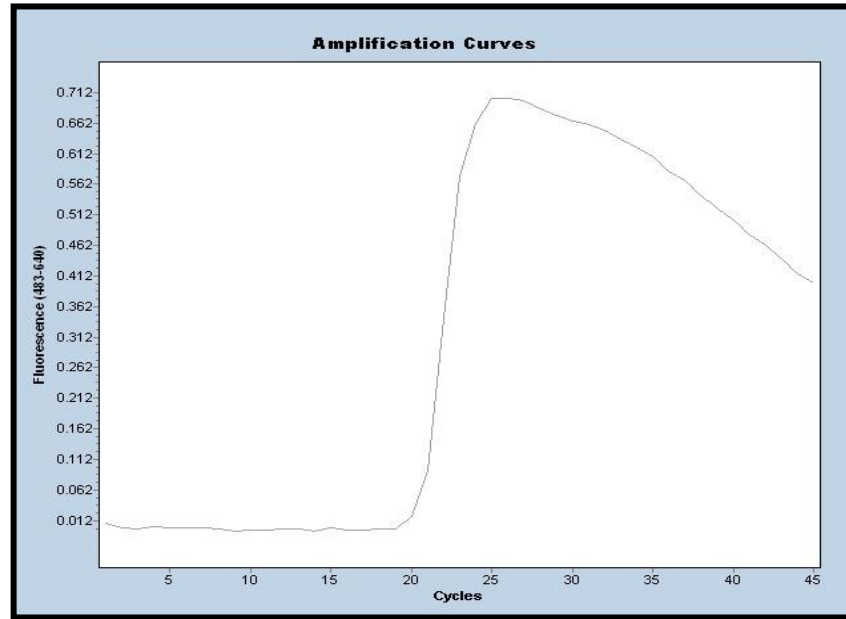
Şekil 4.58 3 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



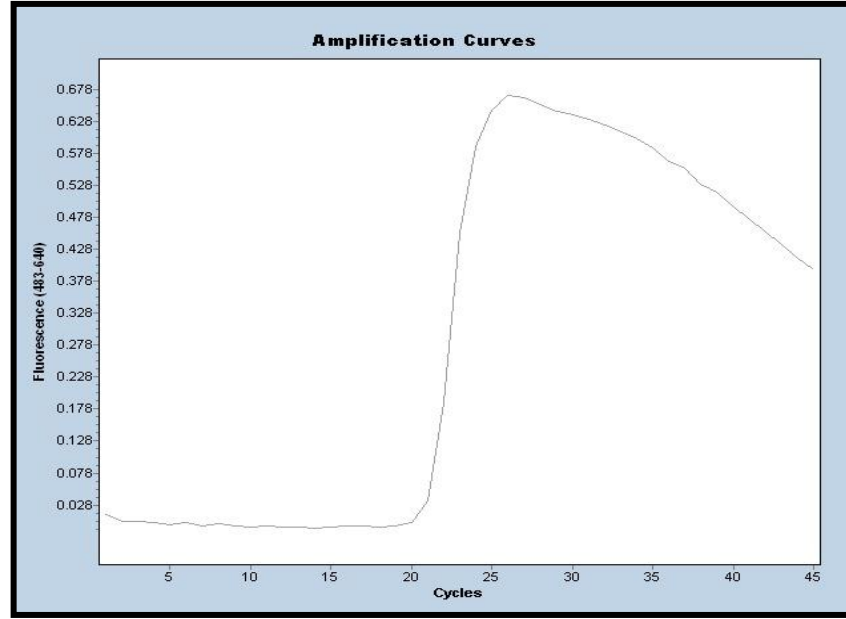
Şekil 4.59 6 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



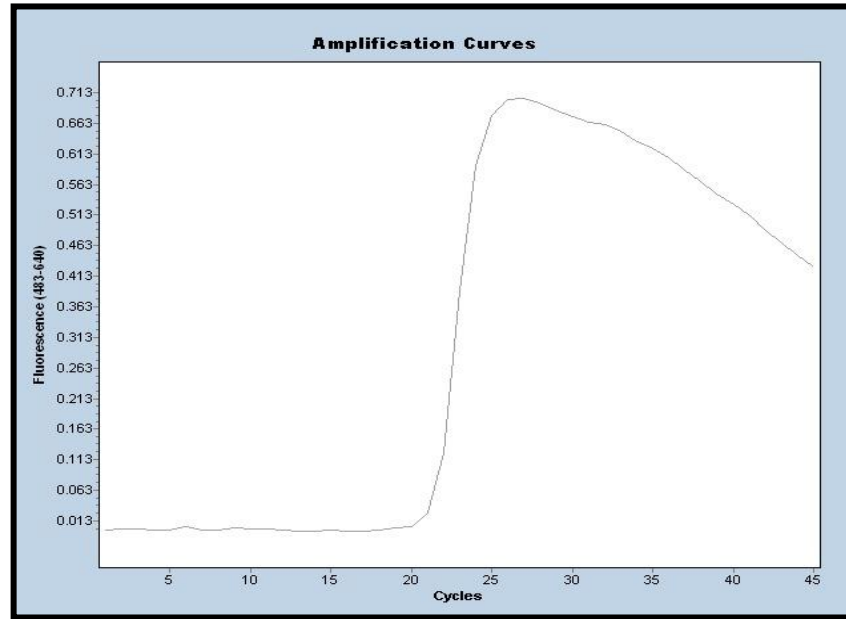
Şekil 4.60 9 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.61 12 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.62 24 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili



Şekil 4.63 48 saat süre ile 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitki örneğinin ACT real time PCR pik profili

150 mM NaCl stresine eş miktarda kuraklık stresi uygulanan bitki örneklerinin real time PCR sonrasında elde edilen pik profilleri ve oluşturulan standart eğri grafiği ile ACT gen ekspresyonu konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin ACT (aktin) gen ekspresyonu verileri

No	Örnek Adı	ACT Ct Değeri	ACT Ekspresyonu Konsantrasyonu
1.	PEG 150 mM Kontrol	19,59	1,15E+04
2.	PEG 150 mM Kontrol	19,58	1,15E+04
3.	PEG 150 mM Kontrol	19,53	1,15E+04
4.	PEG 150 mM 3 saat	18,99	1,72E+04
5.	PEG 150 mM 3 saat	18,97	1,75E+04
6.	PEG 150 mM 3 saat	18,95	1,75E+04
7.	PEG 100 mM 6 saat	19,55	1,18E+04
8.	PEG 100 mM 6 saat	19,55	1,18E+04
9.	PEG 100 mM 6 saat	19,55	1,18E+04
10.	PEG 150 mM 9 saat	19,26	1,43E+04
11.	PEG 150 mM 9 saat	19,28	1,41E+04
12.	PEG 150 mM 9 saat	19,20	1,43E+04
13.	PEG 150 mM 12 saat	19,30	1,40E+04
14.	PEG 150 mM 12 saat	19,44	1,27E+04
15.	PEG 150 mM 12 saat	19,37	1,39E+04
16.	PEG 150 mM 24 saat	19,82	9,86E+03
17.	PEG 150 mM 24 saat	19,96	9,00E+03
18.	PEG 150 mM 24 saat	19,94	9,01E+03
19.	PEG 150 mM 48 saat	20,13	8,00E+03
20.	PEG 150 mM 48 saat	20,15	7,91E+03
21.	PEG 150 mM 48 saat	20,18	7,90E+03

4.7 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz

Farklı sürelerde tuz ve kuraklık stresi uygulanmış bitkilere ait transkript profilleri kontrol profilleri ve aktin ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre ve One Way ANOVA (Dunnett) ile yapılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001). Varyans analizi iki ya da daha fazla gruba ait ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili hipotezleri test etmek için kullanılmaktadır. Eğer ikiden fazla grubun ortalamaları karşılaştırılacak ise F Testi diğer bir ismiyle Varyans Analizi (ANOVA, Analysis Of Variance) uygulanmaktadır. Araştırmacıların bir kontrol grubunu birden fazla deney grubu ile karşılaştırması gerektiğinde Dunnet testini kullanmaları önerilmektedir (Dunnet 1955). Post-Hoc testi ise (Multiple Comparisons Dependent Variable: Expression Dunnet T3) eğer varyans analizi sonucunda gruplar arasında bir fark bulunmuşsa, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için kullanılmaktadır (Roscoe 1975).

Bu yolla stres uygulamalarında farklılaşan gen ekspresyon (konsantrasyon ve Ct değeri olarak belirlenmiş) sonuçları housekeeping gen olan ACT (aktin) ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (SPSS 16) ile hesaplanmıştır. Bu şekilde tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresi altında geliştirilmiş olan örneklerde katalaz (CAT) geni mRNA ifade seviyesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

4.7.1 100 mM tuz (NaCl) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi

Çizelge 4.11 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri

100 mM Tuz Stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
3 saat	0,524858	0,456916	0,506980	0,473029
3 saat	0,590496	0,514057	0,570382	0,532185
3 saat	0,517632	0,450625	0,500000	0,466516
3 saat	0,598739	0,521233	0,578344	0,539614
6 saat	2,514027	2,188587	2,428390	2,265768
6 saat	3,434262	2,989698	3,317278	3,095130
6 saat	3,317278	2,887858	3,204280	2,989698
6 saat	2,602684	2,265768	2,514027	2,345670
9 saat	3,944931	3,434262	3,810552	3,555371
9 saat	4,228072	3,680751	4,084049	3,810552
9 saat	4,198867	3,655326	4,055838	3,784231
9 saat	3,972370	3,458149	3,837056	3,580100
12 saat	1,125058	0,979420	1,086735	1,013959
12 saat	3,182146	2,770219	3,07375	2,867910
12 saat	1,094294	0,952638	1,057018	0,986233
12 saat	3,271608	2,848100	3,160165	2,948538
24 saat	0,742262	0,646176	0,716978	0,668964
24 saat	1,337928	1,164734	1,292353	1,205808
24 saat	0,655197	0,570382	0,632878	0,590496
24 saat	1,515717	1,319508	1,464086	1,366040

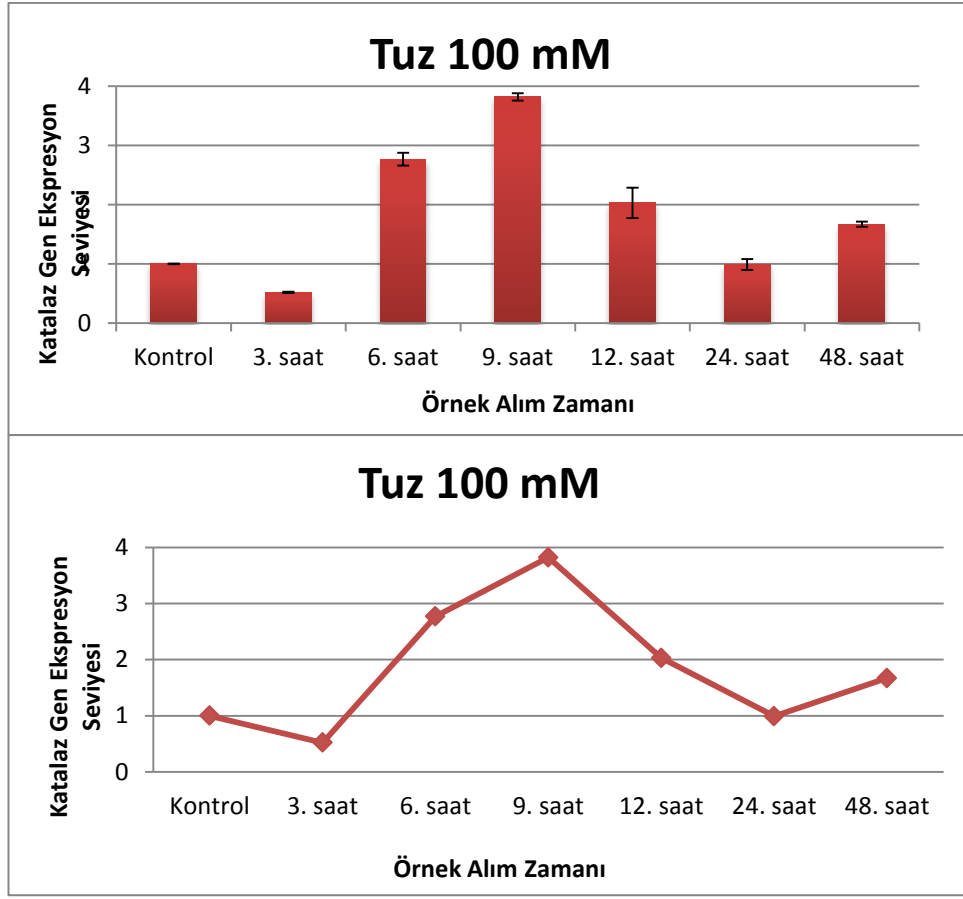
Çizelge 4.11 100 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri (devam)

100 mM Tuz Stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
48 saat	1,613284	1,404445	1,558329	1,453973
48 saat	1,958841	1,705270	1,892115	1,765406
48 saat	1,892115	1,647182	1,827663	1,705270
48 saat	1,670176	1,453973	1,613284	1,505247

Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.12). 100 mM tuz stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile zamana bağlı CAT gen ekspresyon düzeyini gösteren grafik çizilmiştir (Şekil 4.64).

Çizelge 4.12 100 mM Tuz (NaCl) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri

Stres Uygulama Süresi	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
Kontrol	1,00	0,004	0,014
3 saat	0,52	0,012	0,046
6 saat	2,77	0,107	0,428
9 saat	3,82	0,062	0,249
12 saat	2,03	0,258	1,030
24 saat	0,99	0,091	0,363
48 saat	1,67	0,042	0,169



Şekil 4.64 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi

100 mM NaCl stresi ile muamele edilen örneklerin zamana karşı farklılaşan gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı One Way ANOVA (Dunnet) metodu kullanılarak tespit edilmiştir. ANOVA tablosunun Sig. (Anlamlılık) sütunundaki değer ,00 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.13). Sig değeri 0,05'den küçük olması, 100 mM NaCl stresinde zamana bağlı olarak gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelen değişikliğin $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) Verileri

Varyansın Kaynağı (Ekspresyon)	Kareler Toplamı	Sebestlik Dereceleri (df)	Kareler Ortalaması	Farklılık (F) ¹	Anlamlılık (Sig.) ²
Gruplar arası ³	128,127	6	21,355	101,782	,000
Gruplar içi	22,030	105	0,210		
Toplam	150,157	111			

¹ F, verilerdeki sistematik varyans miktarını sistematik olmayan varyansla karşılaştırmaktadır.

² sig. değerinin 0,05'ten küçük olması karşılaştırılan grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

³ Gruplar arası ifadesi ile anlatılmak istenen, 100 mM Tuz (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h) verilerinin kendi içinde değerlendirilmesidir.

Çizelge 4.14 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
1 (kontrol)	2 (3 saat)	0,479	0,012	4,44089E-16	0,43673616	0,52075775
	3 (6 saat)	-1,772	0,107	9,47528E-10	-2,15309554	-1,39175995
	4 (9 saat)	-2,818	0,062	0	-3,03960036	-2,59651419
	5 (12 saat)	-1,026	0,258	0,021855143	-1,94209739	-0,10993195
	6 (24 saat)	0,007	0,091	1	-0,31562496	0,32963168
	7 (48 saat)	-0,667	0,042	1,6686E-09	-0,81712692	-0,51599951
2 (3 saat)	1 (kontrol)	-0,479	0,012	4,44089E-16	-0,52075775	-0,43673616
	3 (6 saat)	-2,251	0,108	2,18962E-11	-2,63260134	-1,86974807
	4 (9 saat)	-3,297	0,063	0	-3,51971405	-3,07389441
	5 (12 saat)	-1,505	0,258	0,000635566	-2,42115288	-0,58837038
	6 (24 saat)	-0,472	0,091	0,002051261	-0,79527620	-0,14821099
	7 (48 saat)	-1,145	0,044	5,37348E-14	-1,29803209	-0,99258827
3 (6 saat)	1 (kontrol)	1,772	0,107	9,47528E-10	1,39175995	2,15309554
	2 (3 saat)	2,251	0,108	2,18962E-11	1,86974807	2,63260134
	4 (9 saat)	-1,046	0,124	2,39737E-07	-1,46028267	-0,63097638

Çizelge 4.14 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
3 (6 saat)	5 (12 saat)	0,746	0,279	0,225759352	-0,20683823	1,69966438
	6 (24 saat)	1,779	0,140	4,32754E-12	1,31772211	2,24114010
	7 (48 saat)	1,106	0,115	1,56179E-07	0,71152511	1,50020393
4 (9 saat)	1 (kontrol)	2,818	0,062	0	2,59651419	3,03960036
	2 (3 saat)	3,297	0,063	0	3,07389441	3,51971405
	3 (6 saat)	1,046	0,124	2,39737E-07	0,63097638	1,46028267
	5 (12 saat)	1,792	0,265	7,28076E-05	0,86503974	2,71904545
	6 (24 saat)	2,825	0,110	0	2,46001343	3,19010784
	7 (48 saat)	2,151	0,075	4,44089E-16	1,90162488	2,40136322
5 (12 saat)	1 (kontrol)	1,026	0,258	0,021855143	0,10993195	1,94209739
	2 (3 saat)	1,505	0,258	0,000635566	0,58837038	2,42115288
	3 (6 saat)	-0,746	0,279	0,225759352	-1,69966438	0,20683823
	4 (9 saat)	-1,792	0,265	7,28076E-05	-2,71904545	-0,86503974
	6 (24 saat)	1,033	0,273	0,024321785	0,09157860	1,97445746
	7 (48 saat)	0,359	0,261	0,955742434	-0,56138769	1,28029059

Çizelge 4.14 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
6 (24 saat)	1 (kontrol)	-0,007	0,091	1	-0,32963168	0,31562496
	2 (3 saat)	0,472	0,091	0,002051261	0,14821099	0,79527620
	3 (6 saat)	-1,779	0,140	4,32754E-12	-2,24114010	-1,31772211
	4 (9 saat)	-2,825	0,110	0	-3,19010784	-2,46001343
	5 (12 saat)	-1,033	0,273	0,024321785	-1,97445746	-0,09157860
	7 (48 saat)	-0,674	0,100	2,27797E-05	-1,01324560	-0,33388756
7 (48 saat)	1 (kontrol)	0,667	0,042	1,6686E-09	0,51599951	0,81712692
	2 (3 saat)	1,145	0,044	5,37348E-14	0,99258827	1,29803209
	3 (6 saat)	-1,106	0,115	1,56179E-07	-1,50020393	-0,71152511
	4 (9 saat)	-2,151	0,075	4,44089E-16	-2,40136322	-1,90162488
	5 (12 saat)	-0,359	0,261	0,955742434	-1,28029059	0,56138769
	6 (24 saat)	0,674	0,100	2,27797E-05	0,33388756	1,01324560

***p<0.05 ise anlamlı olduğunu ifade etmektedir.**

Çizelge 4.15 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

Tuz 100 mM	Kontrol	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	-						
3 saat	*	-					
6 saat	*	*	-				
9 saat	*	*	*	-			
12 saat	*	*	Ns	*	-		
24 saat	Ns	*	*	*	*	-	
48 saat	*	*	*	*	Ns	*	-

* $p < 0.05$, Ns:Anlamsız (non significant)

Çizelge 4.14 - 4.15'te stres uygulanan grupların tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet Test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmıştır.

4.7.2 150 mM tuz (NaCl) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi

Çizelge 4.16 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri

150 mM Tuz Stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
3 saat	0,61132	0,532185	0,590496	0,550953
3 saat	1,328686	1,156688	1,283426	1,197479
3 saat	0,650671	0,566442	0,628507	0,586417
3 saat	1,248331	1,086735	1,205808	1,125058
6 saat	0,732043	0,63728	0,707107	0,659754
6 saat	0,784584	0,68302	0,757858	0,707107
6 saat	0,768438	0,668964	0,742262	0,692555
6 saat	0,747425	0,650671	0,721965	0,673617
9 saat	1,958841	1,70527	1,892115	1,765406
9 saat	2,496661	2,17347	2,411616	2,250117
9 saat	2,027919	1,765406	1,958841	1,827663
9 saat	2,411616	2,099433	2,329467	2,17347
12 saat	1,347234	1,172835	1,301342	1,214195
12 saat	1,613284	1,404445	1,558329	1,453973
12 saat	1,319508	1,148698	1,274561	1,189207
12 saat	1,647182	1,433955	1,591073	1,484524
24 saat	5,81589	5,063026	5,61778	5,241574
24 saat	2,250117	1,958841	2,17347	2,027919
24 saat	6,727171	5,856343	6,498019	6,062866
24 saat	1,94531	1,693491	1,879045	1,753211

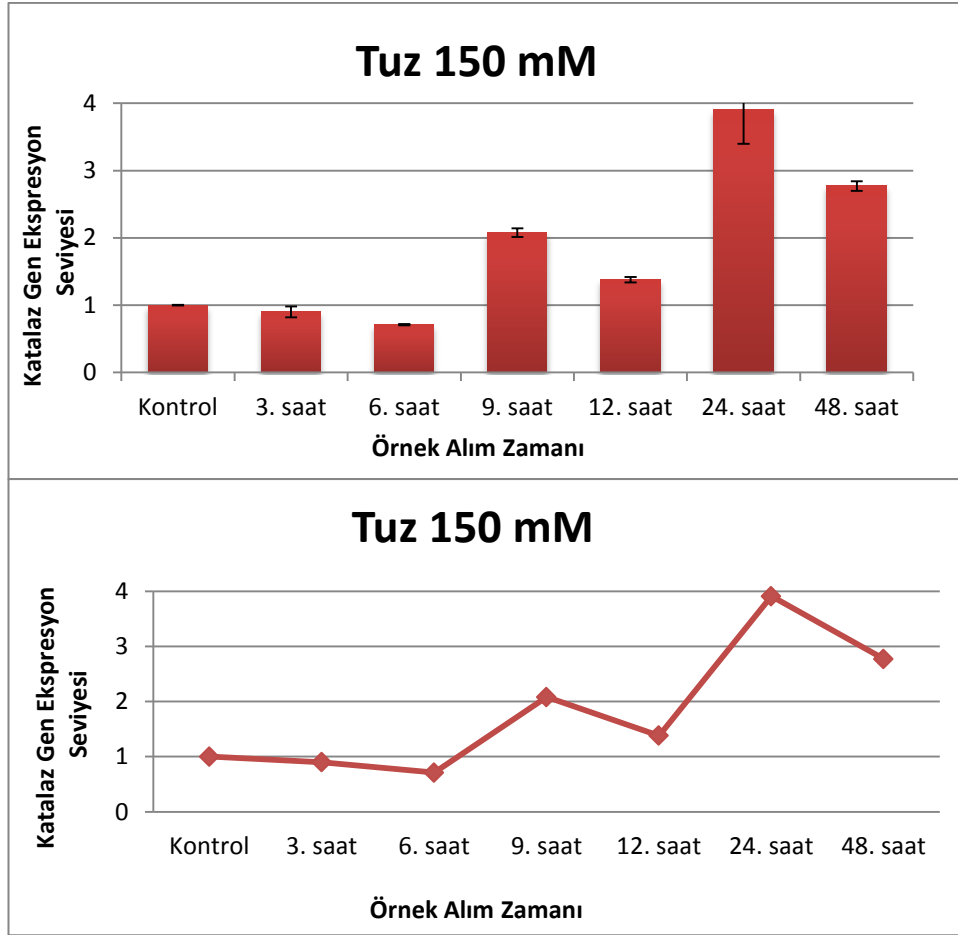
Çizelge 4.16 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri (devam)

150 mM Tuz Stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
48 saat	3,160165	2,751084	3,052518	2,8481
48 saat	2,751084	2,394957	2,657372	2,479415
48 saat	3,24901	2,828427	3,138336	2,928171
48 saat	2,675855	2,329467	2,584706	2,411616

Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.17). 150 mM tuz stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile zamana bağlı CAT gen ekspresyon düzeyini gösteren grafik çizilmiştir (Şekil 4.65).

Çizelge 4.17 150 mM Tuz (NaCl) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri

Stres Uygulama Süresi	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
Kontrol	1,00	0,014	0,004
3 saat	0,90	0,323	0,081
6 saat	0,71	0,044	0,011
9 saat	2,08	0,255	0,064
12 saat	1,38	0,164	0,041
24 saat	3,91	2,056	0,514
48 saat	2,77	0,287	0,072



Şekil 4.65 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi

150 mM NaCl stresi ile muamele edilen örneklerin zamana karşı farklılaşan gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı One Way ANOVA (Dunnet) metodu kullanılarak tespit edilmiştir. ANOVA tablosunun Sig. (Anlamlılık) sütunundaki değer ,00 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.18). Sig değeri 0,01'den küçük olduğundan, 100 mM NaCl stresinde zamana bağlı olarak gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelen değişiklik $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) Verileri

Varyansın Kaynağı (Ekspresyon)	Kareler Toplamı	Sebestlik Dereceleri (df)	Kareler Ortalaması	Farklılık (F) ¹	Anlamlılık (Sig.) ²
Gruplar arası ³	132,455	6	22,076	34,294	,000
Gruplar içi	67,590	105	0,644		
Toplam	200,044	111			

¹ F, verilerdeki sistematik varyans miktarını sistematik olmayan varyansla karşılaştırmaktadır.

² sig. değerinin 0,05'ten küçük olması karşılaştırılan grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

³ Gruplar arası ifadesi ile anlatılmak istenen, 150 mM Tuz (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h) verilerinin kendi içinde değerlendirilmesidir.

Çizelge 4.19 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
1 (kontrol)	2 (3 saat)	0,103	0,081	0.975590875	-0,18427901	0,39082367
	3 (6 saat)	0,292	0,012	3.67579E-14	0,25121018	0,33215367
	4 (9 saat)	-1,078	0,064	6.56201E-10	-1,30436468	-0,85135415
	5 (12 saat)	-0,385	0,041	2.192973E-6	-0,53072012	-0,23837792
	6 (24 saat)	-2,910	0,514	8.864462E-4	-4,73817934	-1,08213491
	7 (48 saat)	-1,765	0,072	2.91230E-12	-2,02026816	-1,50957247
2 (3 saat)	1 (kontrol)	-0,103	0,081	0.975590875	-0,39082367	0,18427901
	3 (6 saat)	0,188	0,082	0.430559574	-0,10007713	0,47689631
	4 (9 saat)	-1,181	0,103	7.13563E-11	-1,52051686	-0,84174664
	5 (12 saat)	-0,488	0,091	4.154232E-4	-0,79394708	-0,18169563
	6 (24 saat)	-3,013	0,520	5.832431E-4	-4,85017097	-1,17668795
	7 (48 saat)	-1,868	0,108	1.99319E-15	-2,22359175	-1,51279355
3 (6 saat)	1 (kontrol)	-0,292	0,012	3.67579E-14	-0,33215367	-0,25121018
	2 (3 saat)	-0,188	0,082	0.430559574	-0,47689631	0,10007713
	4 (9 saat)	-1,370	0,065	8.92696E-12	-1,59726276	-1,14181993

Çizelge 4.19 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
3 (6 saat)	5 (12 saat)	-0,676	0,043	2.10813E-10	-0,82443686	-0,52802503
	6 (24 saat)	-3,202	0,514	3.194767E-4	-5,03000245	-1,37367565
	7 (48 saat)	-2,057	0,073	1.34108E-13	-2,31301470	-1,80018978
4 (9 saat)	1 (kontrol)	1,078	0,064	6.56201E-10	0,85135415	1,30436468
	2 (3 saat)	1,181	0,103	7.13563E-11	0,84174664	1,52051686
	3 (6 saat)	1,370	0,065	8.92696E-12	1,14181993	1,59726276
	5 (12 saat)	0,693	0,076	3.067329E-8	0,44115039	0,94547040
	6 (24 saat)	-1,832	0,518	0.050194134	-3,66562547	0,00103005
	7 (48 saat)	-0,687	0,096	1.296354E-6	-1,00247881	-0,37164298
5 (12 saat)	1 (kontrol)	0,385	0,041	2.192973E-6	0,23837792	0,53072012
	2 (3 saat)	0,488	0,091	4.154232E-4	0,18169563	0,79394708
	3 (6 saat)	0,676	0,043	2.10813E-10	0,52802503	0,82443686
	4 (9 saat)	-0,693	0,076	3.067329E-8	-0,94547040	-0,44115039
	6 (24 saat)	-2,526	0,516	0.003586933	-4,35578718	-0,69542902
	7 (48 saat)	-1,380	0,083	2.40252E-13	-1,65754380	-1,10319879

Çizelge 4.19 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
6 (24 saat)	1 (kontrol)	2,910	0,514	8.864462E-4	1,08213491	4,73817934
	2 (3 saat)	3,013	0,520	5.832431E-4	1,17668795	4,85017097
	3 (6 saat)	3,202	0,514	3.194767E-4	1,37367565	5,03000245
	4 (9 saat)	1,832	0,518	0.050194134	-0,00103005	3,66562547
	5 (12 saat)	2,526	0,516	0.003586933	0,69542902	4,35578718
	7 (48 saat)	1,145	0,519	0.494616572	-0,68958881	2,98006243
7 (48 saat)	1 (kontrol)	1,765	0,072	2.91230E-12	1,50957247	2,02026816
	2 (3 saat)	1,868	0,108	1.99319E-15	1,51279355	2,22359175
	3 (6 saat)	2,057	0,073	1.34108E-13	1,80018978	2,31301470
	4 (9 saat)	0,687	0,096	1.296354E-6	0,37164298	1,00247881
	5 (12 saat)	1,380	0,083	2.40252E-13	1,10319879	1,65754380
	6 (24 saat)	-1,145	0,519	0.494616572	-2,98006243	0,68958881

***p <0.05 ise anlamlı olduğunu ifade etmektedir.**

Çizelge 4.20 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

Tuz 150 mM	Kontrol	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	-						
3 saat	Ns	-					
6 saat	*	Ns	-				
9 saat	*	*	*	-			
12 saat	*	*	*	*	-		
24 saat	*	*	*	*	*	-	
48 saat	*	*	*	*	*	Ns	-

* $p < 0.05$, Ns: Anlamsız (non significant)

Çizelge 4.19 - 4.20'de stres uygulanan grupların tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet Test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmıştır.

4.7.3 100 mM kuraklık (PEG) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi

Çizelge 4.21 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri

100 mM PEG stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
3 saat	1,827663	1,591073	1,765406	1,647182
3 saat	2,042024	1,777685	1,972465	1,840375
3 saat	1,879045	1,635804	1,815038	1,693491
3 saat	1,986185	1,729074	1,918528	1,79005
6 saat	11,63178	10,12605	11,23556	10,48315
6 saat	15,77972	13,73705	15,24221	14,22148
6 saat	11,63178	10,12605	11,23556	10,48315
6 saat	15,77972	13,73705	15,24221	14,22148
9 saat	8,876556	7,727491	8,574188	8
9 saat	4,027822	3,506423	3,89062	3,630077
9 saat	3,89062	3,386981	3,758091	3,506423
9 saat	9,189587	8	8,876556	8,282119
12 saat	18,37917	16	17,75311	16,56424
12 saat	4	3,482202	3,863745	3,605002
12 saat	4,228072	3,680751	4,084049	3,810552
12 saat	17,38776	15,13692	16,79547	15,67072
24 saat	3,386981	2,948538	3,271608	3,052518
24 saat	2,17347	1,892115	2,099433	1,958841
24 saat	3,630077	3,160165	3,506423	3,271608
24 saat	2,027919	1,765406	1,958841	1,827663

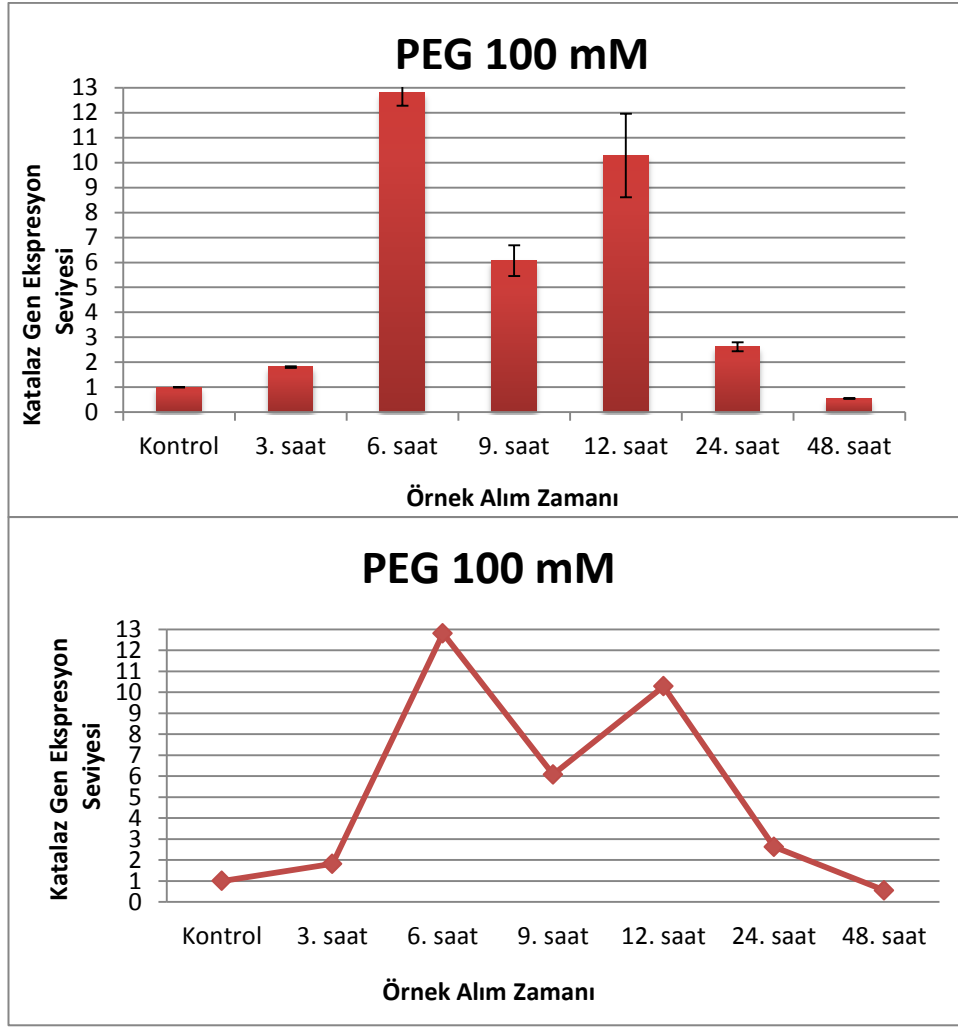
Çizelge 4.21 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri (devam)

100 mM PEG stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
48 saat	0,554785	0,482968	0,535887	0,5
48 saat	0,619854	0,539614	0,598739	0,558644
48 saat	0,570382	0,496546	0,550953	0,514057
48 saat	0,602904	0,524858	0,582367	0,543367

Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.22). 100 mM PEG stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile zamana bağlı CAT gen ekspresyon düzeyini gösteren grafik çizilmiştir (Şekil 4.66).

Çizelge 4.22 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri

Stres Uygulama Süresi	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
Kontrol	1,00	0,014	0,004
3 saat	1,81	0,131	0,033
6 saat	12,81	2,131	0,533
9 saat	6,07	2,479	0,620
12 saat	10,28	6,689	1,672
24 saat	2,62	0,703	0,176
48 saat	0,55	0,040	0,010



Şekil 4.66 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi

100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi ile muamele edilen örneklerin zamana karşı farklılaşan gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı One Way ANOVA (Dunnet) metodu kullanılarak tespit edilmiştir. ANOVA tablosunun Sig. (Anlamlılık) sütunundaki değerin ,00 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.23). Sig değeri 0,01'den küçük olduğundan, 100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulamasında zamana bağlı olarak gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelen değişiklik $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) Verileri

Varyansın Kaynağı (Ekspresyon)	Kareler Toplamı	Sebestlik Dereceleri (df)	Kareler Ortalaması	Farklılık (F) ¹	Anlamlılık (Sig.) ²
Gruplar arası ³	2265,903	6	377,651	47,259	,000
Gruplar içi	839,065	105	7,991		
Toplam	3104,968	111			

¹ F, verilerdeki sistematik varyans miktarını sistematik olmayan varyansla karşılaştırmaktadır.

² sig. değerinin 0,05'ten küçük olması karşılaştırılan grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

³ Gruplar içi ifadesi ile anlatılmak istenen, 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h) verilerinin kendi içinde değerlendirilmesidir.

Çizelge 4.24 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
1 (kontrol)	2 (3 saat)	-0,807	0,033	2,04046E-12	-0,92357757	-0,69011390
	3 (6 saat)	-11,807	0,533	1.46093E-11	-13,70251518	-9,91154002
	4 (9 saat)	-5,070	0,620	1.319048E-5	-7,27444568	-2,86580353
	5 (12 saat)	-9,278	1,672	0.001094795	-15,22578140	-3,32924481
	6 (24 saat)	-1,621	0,176	0,000002908	-2,24587102	-0,99538498
	7 (48 saat)	0,452	0,011	0	0,41520046	0,48800381
2 (3 saat)	1 (kontrol)	0,807	0,033	2,04046E-12	0,69011390	0,92357757
	3 (6 saat)	-11,000	0,534	3.66372E-11	-12,89698087	-9,10338285
	4 (9 saat)	-4,263	0,621	1.035744E-4	-6,46872530	-2,05783243
	5 (12 saat)	-8,471	1,672	0.002699476	-14,41935057	-2,52198416
	6 (24 saat)	-0,814	0,179	0,006246117	-1,44324635	-0,18431817
	7 (48 saat)	1,258	0,034	0	1,13967618	1,37721957
3 (6 saat)	1 (kontrol)	11,807	0,533	1,46093E-11	9,91154003	13,70251518
	2 (3 saat)	11,000	0,534	3,66372E-11	9,10338286	12,89698088
	4 (9 saat)	6,737	0,817	8.332596E-8	4,04725043	9,42655556

Çizelge 4.24 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
3 (6 saat)	5 (12 saat)	2,530	1,755	0.940763218	-3.55015451	8,60918351
	6 (24 saat)	10,186	0,561	8,40665E-12	8,24565455	12,12714467
	7 (48 saat)	12,259	0,533	8,36571E-12	10,36303670	14,15422279
4 (9 saat)	1 (kontrol)	5,070	0,620	0,000013190	2,86580353	7,27444568
	2 (3 saat)	4,263	0,621	0,000103574	2,05783244	6,46872531
	3 (6 saat)	-6,737	0,817	8.332596E-8	-9,42655556	-4,04725043
	5 (12 saat)	-4,207	1,783	0.390405026	-10,34105423	1,92627722
	6 (24 saat)	3,449	0,644	0,000972534	1,20768915	5,69130408
	7 (48 saat)	5,522	0,620	0,000004512	3,31731500	7,72613850
5 (12 saat)	1 (kontrol)	9,278	1,672	0,001094795	3,32924481	15,22578140
	2 (3 saat)	8,471	1,672	0,002699476	2,52198417	14,41935057
	3 (6 saat)	-2,530	1,755	0.940763218	-8,60918351	3,55015450
	4 (9 saat)	4,207	1,783	0.390405026	-1,92627722	10,34105423
	6 (24 saat)	7,657	1,681	0,006869263	1,69625135	13,61751887
	7 (48 saat)	9,729	1,672	0,000668161	3,78081337	15,67741713

Çizelge 4.24 100 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
6 (24 saat)	1 (kontrol)	1,621	0,176	0,000002908	0,99538498	2,24587102
	2 (3 saat)	0,814	0,179	0,006246117	0,18431817	1,44324635
	3 (6 saat)	-10,186	0,561	8.40665E-12	-12,12714467	-8,24565454
	4 (9 saat)	-3,449	0,644	9.725345E-4	-5.69130407	-1,20768914
	5 (12 saat)	-7,657	1,681	0.006869263	-13.61751887	-1,69625135
	7 (48 saat)	2,072	0,176	0,000000107	1,44666518	2,69779509
7 (48 saat)	1 (kontrol)	-0,452	0,011	0	-0,48800381	-0,41520046
	2 (3 saat)	-1,258	0,034	0	-1,37721957	-1,13967618
	3 (6 saat)	-12,259	0,533	8.36571E-12	-14,15422279	-10,36303669
	4 (9 saat)	-5,522	0,620	4.512415E-6	-7,72613849	-3,317314998
	5 (12 saat)	-9,729	1,672	6.681613E-4	-15,67741712	-3,78081336
	6 (24 saat)	-2,072	0,176	0,000000107	-2,69779509	-1,44666518

***p<0.05 ise anlamlı olduğunu ifade etmektedir.**

Çizelge 4.25 100 mM PEG stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

PEG 100 mM	Kontrol	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	-						
3 saat	*	-					
6 saat	*	*	-				
9 saat	*	*	*	-			
12 saat	*	*	Ns	Ns	-		
24 saat	*	*	*	*	*	-	
48 saat	*	*	*	*	*	*	-

* $p < 0.05$, Ns: Anlamsız (non significant)

Çizelge 4.24 - 4.25'te stres uygulanan grupların tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet Test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmıştır.

4.7.4 150 mM kuraklık (PEG) stresi sonuçlarının normalizasyon ve istatistiksel analizi

Çizelge 4.26 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri

150 mM PEG stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
3 saat	0,002182	0,001900	0,002108	0,001967
3 saat	0,001353	0,001178	0,001307	0,001219
3 saat	0,002152	0,001874	0,002079	0,00194
3 saat	0,001372	0,001194	0,001325	0,001236
6 saat	3,630077	3,160165	3,506423	3,271608
6 saat	3,917681	3,410540	3,784231	3,530812
6 saat	3,630077	3,160165	3,506423	3,271608
6 saat	3,917681	3,410540	3,784231	3,530812
9 saat	3,052518	2,657372	2,948538	2,751084
9 saat	0,00044	0,000383	0,000425	0,000397
9 saat	0,000446	0,000388	0,000431	0,000402
9 saat	3,010493	2,620787	2,907945	2,713209
12 saat	2,445281	2,128740	2,361985	2,203810
12 saat	2,928171	2,549121	2,828427	2,639016
12 saat	2,694467	2,34567	2,602684	2,42839
12 saat	2,657372	2,313376	2,566852	2,394957
24 saat	1,057018	0,920188	1,021012	0,952638
24 saat	0,293209	0,255253	0,283221	0,264255
24 saat	1,164734	1,013959	1,125058	1,049717
24 saat	0,266093	0,231647	0,257028	0,239816

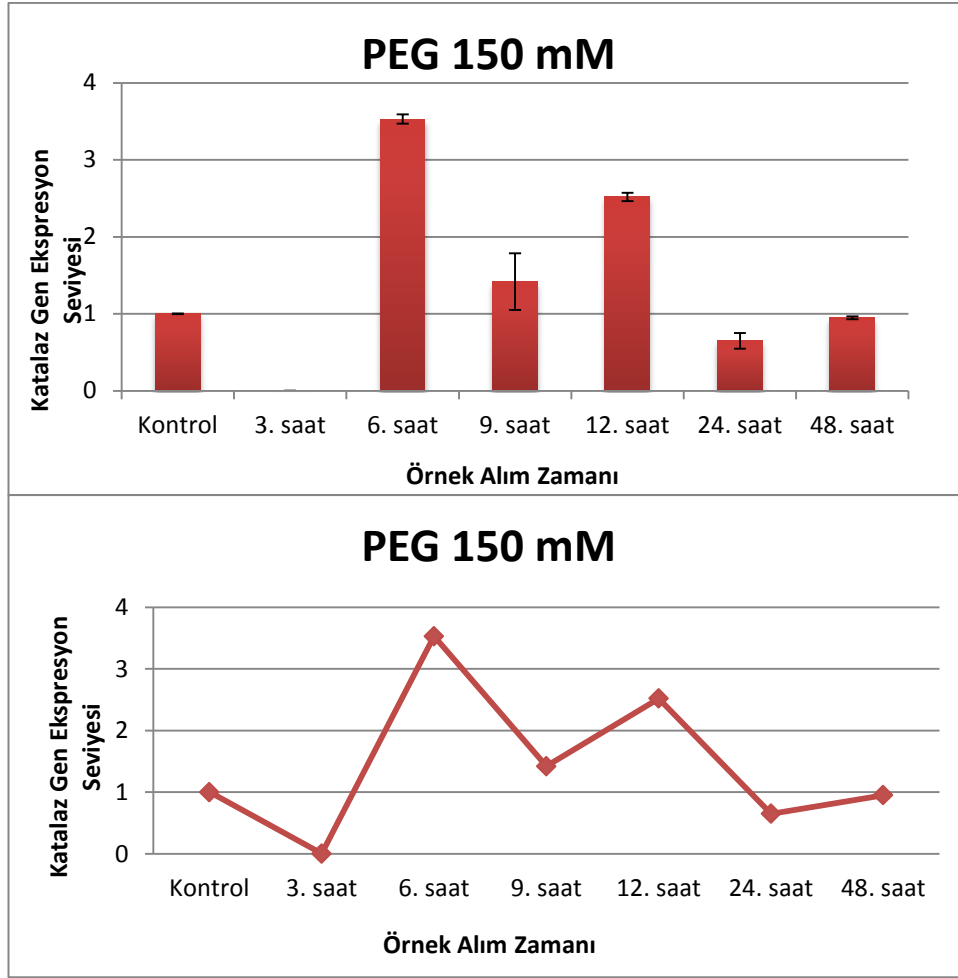
Çizelge 4.26 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verileri (devam)

150 mM PEG stresi Uygulamaları	CAT Geni Normalize Edilmiş Ekspresyon Verileri			
48 saat	0,946058	0,823591	0,913831	0,852635
48 saat	1,086735	0,946058	1,049717	0,97942
48 saat	0,959264	0,835088	0,926588	0,864537
48 saat	1,071773	0,933033	1,035265	0,965936

Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.27). 150 mM Tuz NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile zamana bağlı CAT gen ekspresyon düzeyini gösteren grafik çizilmiştir (Şekil 4.67).

Çizelge 4.27 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin CAT (katalaz) genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinde ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri

Stres Uygulama Süresi	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
Kontrol	1,00	0,014	0,004
3 saat	0,0015	0,004	0,002
6 saat	3,53	0,243	0,061
9 saat	1,42	1,467	0,367
12 saat	2,51	0,218	0,054
24 saat	0,65	0,405	0,101
48 saat	0,95	0,082	0,020



Şekil 4.67 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi

150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi ile muamele edilen örneklerin zamana karşı farklılaşan gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı One Way ANOVA (Dunnet) metodu kullanılarak tespit edilmiştir. ANOVA tablosunun Sig. (Anlamlılık) sütunundaki değer $0,00$ olduğu görülmektedir (Çizelge 4.28). Sig değeri $0,01$ 'den küçük olduğundan, 150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulamasında zamana bağlı olarak gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelen değişiklik $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi Verileri)

Varyansın Kaynağı (Ekspresyon)	Kareler Toplamı	Sebestlik Dereceleri (df)	Kareler Ortalaması	Farklılık (F) ¹	Anlamlılık (Sig.) ²
Gruplar arası ³	137,867	6	22,978	66,194	,000
Gruplar içi	36,448	105	0,347		
Toplam	174,316	111			

¹ F, verilerdeki sistematik varyans miktarını sistematik olmayan varyansla karşılaştırmaktadır.

² sig. değerinin 0,05'ten küçük olması karşılaştırılan grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

³ Gruplar içi ifadesi ile anlatılmak istenen, 150 mM Tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h) verilerinin kendi içinde değerlendirilmesidir.

Çizelge 4.29 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
1 (kontrol)	2 (3 saat)	0,998	0,004	1.63199E-15	0,98562472	1,01127226
	3 (6 saat)	-2,526	0,061	1.74876E-15	-2,74267262	-2,31001660
	4 (9 saat)	-0,416	0,367	0.991753117	-1,72117417	0,88821168
	5 (12 saat)	-1,505	0,055	4.88694E-13	-1,69939444	-1,31145069
	6 (24 saat)	0,350	0,101	0.060375633	-0,00997632	0,71081551
	7 (48 saat)	0,051	0,021	0.350692847	-0,02233171	0,12383537
2 (3 saat)	1 (kontrol)	-0,998	0,004	1.63199E-15	-1,01127226	-0,98562472
	3 (6 saat)	-3,525	0,061	0	-3,74098024	-3,30860597
	4 (9 saat)	-1,415	0,367	0.027950774	-2,71959949	-0,11025999
	5 (12 saat)	-2,504	0,054	1.07504E-15	-2,69768551	-2,31005660
	6 (24 saat)	-0,648	0,101	2.388753E-4	-1,00834069	-0,28771711
	7 (48 saat)	-0,948	0,020	1.18611E-15	-1,02033795	-0,87505538
3 (6 saat)	1 (kontrol)	2,526	0,061	1.74876E-15	2,31001660	2,74267262
	2 (3 saat)	3,525	0,061	0.0	3,30860597	3,74098024
	4 (9 saat)	2,110	0,372	7.144564E-4	0,79823518	3,42149156

Çizelge 4.29 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
3 (6 saat)	5 (12 saat)	1,021	0,082	4.93582E-12	0,75253051	1,28931360
	6 (24 saat)	2,877	0,118	0	2,48177380	3,27175462
	7 (48 saat)	2,577	0,064	0	2,35552356	2,79866932
4 (9 saat)	1 (kontrol)	0,416	0,367	0.991753117	-0,88821168	1,72117417
	2 (3 saat)	1,415	0,367	0.027950774	0,11025999	2,71959949
	3 (6 saat)	-2,110	0,372	7.1445641E-4	-3,42149156	-0,79823518
	5 (12 saat)	-1,089	0,371	0.1549019691	-2,39914822	0,22126559
	6 (24 saat)	0,767	0,380	0.6214299692	-0,55868855	2,09249023
	7 (48 saat)	0,467	0,367	0.9764030697	-0,83818582	1,77265197
5 (12 saat)	1 (kontrol)	1,505	0,055	4.886941E-13	1,31145069	1,69939444
	2 (3 saat)	2,504	0,054	1.075040E-15	2,31005660	2,69768551
	3 (6 saat)	-1,021	0,082	4.935824E-12	-1,28931360	-0,75253051
	4 (9 saat)	1,089	0,371	0.1549019691	-0,22126559	2,39914822
	6 (24 saat)	1,856	0,115	1.021405E-12	1,46871167	2,24297263
	7 (48 saat)	1,556	0,058	2.069525E-15	1,35615960	1,75618918

Çizelge 4.29 150 mM Tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verileri (devam)

(I) Zaman saat	(J) Zaman saat	(I-J) Ortalama Fark	Standart Hata	Anlamlılık	95% Güven Aralığı	
					Üst Sınır	Alt Sınır
6 (24 saat)	1 (kontrol)	-0,350	0,101	0.060375633	-0,71081551	0,00997632
	2 (3 saat)	0,648	0,101	2.388755006	0,28771711	1,00834069
	3 (6 saat)	-2,877	0,118	0	-3,27175462	-2,48177380
	4 (9 saat)	-0,767	0,380	0.621429969	-2,09249023	0,55868855
	5 (12 saat)	-1,856	0,115	1.02140E-12	-2,24297263	-1,46871167
	7 (48 saat)	-0,300	0,103	0.162685539	-0,66289125	0,06355573
7 (48 saat)	1 (kontrol)	-0,051	0,021	0.350692847	-0,12383537	0,02233171
	2 (3 saat)	0,948	0,020	1.18611E-15	0,87505538	1,02033795
	3 (6 saat)	-2,577	0,064	0	-2,79866932	-2,35552356
	4 (9 saat)	-0,467	0,367	0.976403069	-1,77265197	0,83818582
	5 (12 saat)	-1,556	0,058	2.06952E-15	-1,75618918	-1,35615960
	6 (24 saat)	0,300	0,103	0.162685539	-0,06355573	0,66289125

***p<0.05 ise anlamlı olduğunu ifade etmektedir.**

Çizelge 4.30 150 mM PEG stresi altında yetiştirilen örneklerin Post Hoc Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

PEG 150 mM	Kontrol	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	-						
3 saat	*	-					
6 saat	*	*	-				
9 saat	Ns	*	*	-			
12 saat	*	*	*	Ns	-		
24 saat	Ns	*	*	Ns	*	-	
48 saat	Ns	*	*	Ns	*	Ns	-

* $p < 0.05$, Ns: Anlamsız (non significant)

Çizelge 4.29 - 4.30'da stres uygulanan grupların tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet Test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, 0, 3, 6, 9, 12 24, 48 saat boyunca 100 ve 150 mM NaCl ile bu tuz konsantrasyonlarına eş ozmotik basınçta kuraklık stresiyle (PEG) muamele edilen domates bitkilerinde lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA içeriğinde meydana gelen değişim incelenmiş, ayrıca antioksidant savunma mekanizmasında önemli genlerden biri olan CAT geninin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar kantitatif Real Time PCR ile belirlenerek bu stres koşullarına karşı geliştirilen stres cevabı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.1 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi)

Bitkilerde stresin öncelikli etkilerinden biri olarak gösterilen lipid peroksidasyonu sırasında son derece reaktif bir metabolit ürün olan malondialdehid (MDA) oluşmaktadır (Weinberger et al. 2004). Dolayısıyla plazma MDA konsantrasyonunun belirlenmesi, dokularda lipid peroksidasyonu ve stres oluşumunun belirlenmesinde son derece hassas göstergelerden biridir (Mittler 2004). Yapılan birçok çalışmada uygulanan çeşitli stres faktörleri ve MDA konsantrasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır (Mazhoudi vd. 1997, Ming ve Wang 2002, Sergio vd. 2012, Cvikrova vd. 2013, Landi vd. 2013, Ramakrishna ve Rao 2013, Çanakcı ve Karaboğa 2014, Manaa vd. 2013, Aydın vd. 2014, Gao vd. 2014, Voronin vd. 2014). Çeşitli stres faktörlerine maruz bırakılmış bitkilerde MDA miktarında meydana gelen değişimi inceleyen çalışmaların bir çoğunda MDA seviyesinde artış görülmüş olup *Lycopersicon esculentum*’da (domates) bakır stresi (Mazhoudi vd. 1997) *Pistia stratiotes* L.’de (su marulu) krom stresi (Sinha vd. 2005), *Bacopa monnieri* L.’de (kekik) demir stresi (Sinha ve Saxena 2006), *Solanum lycopersicum*’da (domates) tuz stresi (Manaa vd. 2013), *Oryza sativa* L.’de (pirinç) demir stresi (Gao vd. 2014), *Cucumis sativus* L. ‘de (salatalık) kadmiyum stresi (Çanakcı ve Karaboğa 2014), *Nicotiana tabacum* L.’de (tütün) kuraklık ve sıcaklık stresi (Cvikrova vd. 2013), *Raphanus sativus*’da (turp) çinko stresi (Ramakrishna ve Rao 2013), *Ocimum basilicum* L.’de (fesleğen)’de bor stresi (Landi vd. 2013) MDA miktarında artışı gösteren çalışmalardan bazılarıdır. Bazı bitkilerde ise

MDA miktarında azalma tespit edilmiştir. *Cichorium intybus* L.'da (hindiba) tuz stresi (Sergio vd. 2012), *Cucumis sativus*'da (salatalık) tuz ve silikon stresi (Khoshgoftarmanesh vd. 2014) MDA miktarında azalma olduğunu gösteren çalışmalardan birkaçıdır. Stres uygulama dönemine veya süresine bağlı olarak, MDA düzeyinde önce artma daha sonra azalma ve tam tersi şekilde önce azalma sonra ise artmanın birlikte olduğu [*Glycyrrhiza uralensis* (meyan kökü) (Ming ve Wang 2002)] çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Bununla birlikte MDA miktarında değişimin olmadığı stres uygulaması çalışmaları da literatürde yer almaktadır [*Zea mays* L.'da (mısır) kuraklık stresi (Voronin vd. 2014)].

Bu tez çalışmasında bütün NaCl ve PEG konsantrasyonlarında MDA konsantrasyonu önemli ölçüde değişkenlik göstermiştir. 100 mM tuzda 3h (Şekil 4.5), 150 mM tuzda 48h (Şekil 4.6), 100 mM PEG'de 48h (Şekil 4.7), 150 mM PEG'de 6h (Şekil 4.8) MDA düzeyinin maksimum olduğu zamanlardır. MDA düzeyinde meydana gelen değişiklikler, uygulanan NaCl ve PEG konsantrasyonlarının hücre membranına zarar verdiğini ve lipid peroksidasyonuna yol açtığını göstermektedir.

5.1.1 100 mM ve 150 mM NaCl stresi ile MDA seviyesinde meydana gelen değişim

100 mM NaCl 3. saatte MDA içeriğini maksimum düzeye çıkarmıştır. 12. saate kadar MDA içeriğinde kademeli bir azalma kaydedilerek kontrol seviyesine kadar inmiştir. 24. ve 48. saatlerde ise MDA içeriğinde doğrusal bir artış görülmüştür (Şekil 4.5). Bitki 3., 6., 9. ve 12. saatlerde kendisine uygulanan tuz stresine karşılık oluşan ROT'lara karşı savunma mekanizması sayesinde antioksidan üretmiş olabileceğinden 3. saatten sonra MDA düzeyi azalmış olabilir. Ancak 24. ve 48. saatlerde üretilen antioksidan hücrede üretilen ROT miktarı için yetersiz kalmış görünmektedir. MDA düzeyinin tekrar artmaya başlamasının nedeni büyük olasılıkla bu nedendendir. Tuza hassas domates çeşitleriyle 100 mM tuz konsantrasyonunda lipid peroksidasyonu ve H₂O₂ içeriğinde meydana gelen artış ile oksidatif stresin indüklendiği Shalata vd. (2001)'nin çalışmasında antioksidant enzim aktivitesinde düşüş görülürken, Mittova vd. (2003 ve 2004)'nin çalışmalarında enzim aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir.

150 mM NaCl domates bitkisinde lipid peroksidasyonu seviyesini 3. saatte kontrole göre 2 katına çıkarmış olsa da 6. ve 9. saatlerde kademeli bir azalma görülmüştür. 9. saat tüm uygulama ve zamanlar arasında MDA seviyesinin en düşük olduğu zamandır. 12. saatten itibaren MDA içeriğinde artış meydana gelmiş olup 48. saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.6). Büyük bir olasılıkla bitkinin stres durumunda oluşan ROT'lara karşı ürettiği antioksidan miktarı 9. saatten sonra azalmaya başlamıştır. Bu nedenle MDA düzeyi de tekrar artmaya başlamıştır. Ma vd. (2012)'nin yaptıkları çalışmada *Triticum aestivum* L. 'ye (buğday) 10 gün uygulanan 150 mM NaCl stresi ile MDA içeriği kontrole göre 1,5 kat artış göstermiştir. Yıldızıtugay vd. (2013) çalışmasında ise *Sphaerophysa kotschyana*'ya (Hürmüz otu) 14 gün süre ile uygulanan 150 mM NaCl ile MDA içeriğinde kontrole göre %16 artış belirlemiştir.

Çalışmamızda her iki konsantrasyonda da (100 mM ve 150 mM NaCl) bitki stres uygulama süresindeki artışa bağlı olarak MDA seviyesinde paralel bir dalgalanma göstermiştir. 3. saatte kontrole göre gözle görülür bir artış kaydedilmiş; fakat 9. saatte kontrol seviyelerine gerilemiştir. 12. saatten sonra MDA seviyesinde artış olmuştur. 100 mM tuz konsantrasyonunda 3. saatte MDA içeriği kontrole göre 5 katı geçen bir artış göstermişken, 150 mM tuz konsantrasyonunda 2 kat artış olduğu görülmüştür. 100 mM tuz uygulaması ile 6. saatte kontrole göre yaklaşık 4 kat belirlenen artış, 150 mM tuz uygulanmış bitkilerde kontrol grubu ile aynı seviyede kalmıştır. 24. saatte ise her iki konsantrasyonda da kontrole göre 2 kat artış gözlenmiştir (Şekil 4.5 –4.6). Bu durum, bitkinin ürettiği antioksidan miktarının, 100 mM tuz konsantrasyonunda 12. saatten sonra yetersiz kalıp MDA miktarının tekrar artmaya başlamış, derişimi daha yüksek olan 150 mM tuz konsantrasyonunda ise 9. saatten sonra artmaya başlamış olmasıyla ilişkili görünmektedir. Ming ve Wang'ın 2002 yılında meyan kökü ile yaptıkları çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da MDA düzeyinde artma ve azalma birlikte görülmüştür. Ahire vd. (2013)'nin *Bacopa monnieri* (Brahma) bitkisi ile yaptıkları çalışmada ise; uyguladıkları 0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl konsantrasyon artışıyla paralel olarak MDA içeriği doğrusal bir artış göstermiştir.

5.1.2 100 mM ve 150 mM PEG stresi ile MDA seviyesinde meydana gelen değişim

100 mM PEG uygulamasında MDA içeriğinde 3. saat ile 48. saat arasında kademeli bir artışın ardından 48. saat lipid peroksidasyonunun en yüksek olduğu saattir (kontrole göre 8 kat). Grafikte örnek alım zamanları arasındaki MDA içeriğindeki artış 6. saatten 9. saate kadar kontrole göre 2 kattan 5 kata çıkarken, 12. saate kadar ise kontrole göre 7 katına çıkmıştır. Fakat diğer zaman aralıklarında çok belirgin bir artış olmamıştır. (Şekil 4.7). Bu gözlemler 100 mM PEG uygulanma süresine bağlı olarak hücrede ROT miktarında artış olduğunu ve buna bağlı olarak MDA düzeyinde de paralel bir artış olabileceğini göstermektedir. Sikha vd. 2013 yılında Solanaceae familyasından *Capsicum annuum* ‘Solan Bharpur’ a (biber) 25 gün boyunca %5 ve %10 PEG 6000 uygulamışlar ve konsantrasyon artışına paralel olarak MDA düzeyinde artışa neden olduğunu belirlemişlerdir (Sikha vd. 2013).

150 mM PEG uygulamasında bulgularımız sonucunda, 6. saatin tüm stres uygulamaları ve zamanları arasında en yüksek artışla, MDA içeriğinin en üst seviyede olduğu zaman olarak belirlenmiştir. Bu saatten sonra MDA miktarında önemli bir azalma meydana gelmiş ve 48. saate kadar belirgin bir artış görülmemiştir (Şekil 4.8). Bu sonuçlar 150 mM PEG uygulandığında bitkinin bu yoğun konsantrasyon karşısında ilk 6 saatte antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmış olabileceğini, ancak stres uygulama süresinin artmasıyla birlikte hücrede antioksidan miktarı artmış ve MDA düzeyinin azalarak yakın seviyede kalmış olabileceğini işaret etmektedir.

100 mM PEG uygulamasında kontrole göre 3. saatte 2 kat artış gerçekleşmişken 150 mM PEG uygulamasında bu oran 9 kat olarak belirlenmiştir. Beklenenin aksine 48. Saatte 100 mM PEG konsantrasyonunda kontrole göre 8 kat artış olurken 150 mM PEG konsantrasyonunda 4 kat artış görülmüştür. 100 mM PEG konsantrasyonunda grafikte doğrusal bir artış görülürken, 150 mM PEG uygulamasında 6. saate kadar MDA düzeyi artmış, 9, 12 ve 24. saatlerde kontrole göre 3 kat artış gösteren bir seviye belirlenmiştir (Şekil 4.7 – 4.8).

Bu çalışmada uygulanan PEG konsantrasyonunun artmasıyla (100 mM PEG, 150 mM PEG) birlikte MDA düzeyindeki artışı gösteren grafikler (Şekil 4.7 - 4.8) incelendiğinde Sikha vd.'nin sonuçlarıyla bazı farklılıklar göstermektedir. Sikha vd. Solanaceae familyasının bir üyesi olan biberde, PEG 6000 konsantrasyonunun artmasıyla (%5 ve %10 PEG) MDA düzeyinin paralel şekilde arttığını belirlemişlerdir (0-25 gün) (Sikha vd. 2013). Bizim çalışmamızda 100 mM PEG uygulama süresinin artmasıyla (0-48 saat) birlikte MDA düzeyi de benzer şekilde doğrusal artmıştır. Ancak 150 mM PEG uygulamasında bitki ani bir şekilde tepki vererek 3. ve 6. saatlerde MDA düzeyi kontrole göre 9 ve 11 kat artış göstermiş, sonraki saatlerde ise düşüş göstererek kontrol grubunun yaklaşık 3 kat üstünde seyretmiştir. Stres uygulama süresinin farklılık göstermesi, Sikha vd.'nin sadece kontrol grubu ile 25 gün stres uygulaması arasındaki farkı incelemiş olmaları, bu farklılığın görülmesinde etken olabileceğini düşündürmektedir. Sen ve Alikamanoğlu'nun 2013 çalışmasında ise *Beta vulgaris* L. bitkisine (şeker pancarı) uygulanan PEG 6000 konsantrasyonundaki artışla (10, 40, 80 g l⁻¹) birlikte MDA düzeyinde de paralel bir artış belirlenmiştir.

5.2 Katalaz (CAT)

CAT; çeşitli stres koşulları altında oluşan zararlı H₂O₂'in H₂O ve O₂'ye direkt olarak dönüşümünü sağlayarak hücreleri strese karşı korumada görevli en önemli enzimatik antioksidanlardan biridir. Yüksek bitkilerde tanımlanmış katalaz izozimleri; *Helianthus annuus* L. (ayçiçeği) (Azpilicueta vd. 2007), *L. esculentum*, *L. pennellii* (yabani, tuza toleranslı domates çeşidi) (Mittova vd. 2003), *Zea mays* L. (mısır), *Corylus avellana* L. (findık) (Safari vd. 2013), *Withania somnifera* L. (Aswagandha veya kış kirazı) (Rout ve Sahoo 2013), *Capsicum annuum* (acı biber) (Lee ve An 2005), *Triticum aestivum* L. (buğday) (Luna vd. 2005) gibi birçok bitkide çalışılmıştır. Yapılan birçok çalışmada uygulanan çeşitli stres faktörleri ve katalaz enzim aktivitesi arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Stres uygulamaları sonrasında gen ifadesi düzeyinde meydana gelen değişiklikleri araştırmak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda *L. pennellii* (yabani, tuza toleranslı domates çeşidi) (Mittova vd. 2003), *Oryza sativa* (pirinç) (Matsumura vd. 2002), *Triticum aestivum* L. (buğday) (Luna vd. 2004) *Corylus avellana* L. (findık)

(Safari vd. 2013), *Withania somnifera* L. (Aswagandha veya kış kirazı) (Rout ve Sahoo 2013) ve daha pek çok bitkide katalaz enzimini kodlayan genlerin stresle bağlantılı bir şekilde ifade seviyelerinde artış belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda katalazın farklı stres şartları ve farklı bitkilerde değişik düzeylerde koruma sağladığı görülmüştür. Bununla birlikte katalaz gen ifadesinde önemli bir değişimin olmadığı stres uygulaması çalışmaları da literatürde yer almaktadır [*Bruguiera gymnorrhiza*'da (mangrov veya Hindistan sakız ağacı) tuz stresi (Takemura vd. 2002)].

Çeşitli stres faktörlerinin bitkilere uygulanması ile yapılan birçok çalışmada, katalaz enzim aktivitesindeki değişim çalışılmıştır. Domateste de CAT enzim aktivitesindeki değişim birçok çalışma (Mittova vd. 2003, 2004, Çekiç 2004, Gökmen 2006, Carvalho vd. 2008) ile gösterilmiştir. Ancak tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresi ile CAT gen ifadesinde mRNA düzeyinde meydana gelen değişimi doğrudan gösteren herhangi bir çalışma bilginiz dahilinde bulunmamaktadır. PEG'in farklı konsantrasyonlarda uygulanması ile yapılan çalışmalarda daha çok PEG'in bitki gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır (Yaniv ve Werker 1983).

Ayrıca domateste, katalaz gen ifadesinde meydana gelen değişim ile MDA düzeyi arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Katalaz gen ifadesini NaCl ve PEG ile ilişkilendiren çalışma sayısı da oldukça azdır. Bu nedenle katalaz gen ifadesi sonuçları doğrudan tartışılamamış, MDA düzeyi ile ilişkilendirilememiş, Jithesh vd.'nin yaptığı çalışmada da olduğu gibi literatürde yer alan enzim aktivitesi sonuçlarından örnekler verilmiştir (Jithesh vd. 2006a).

Bu çalışmada tüm NaCl ve PEG konsantrasyonlarında katalaz geni ifade düzeyinde önemli ölçüde değişiklik meydana geldiği belirlenmiştir. 100 mM tuzda 9h (Şekil 4.64), 150 mM tuzda 24h (Şekil 4.65), 100 mM PEG'de 6h (Şekil 4.66), 150 mM PEG'de 6h (Şekil 4.67) CAT gen ifade düzeyinin maksimum olduğu zamanlardır. CAT gen ifadesi düzeyinde meydana gelen değişiklikler, uygulanan NaCl ve PEG konsantrasyonlarında hücrede oluşan ROT'lara karşı antioksidan savunma mekanizmasında görevli

enzimlerden biri olan katalazın, domateste tuz ve kuraklık stresine karşı savunmada rol aldığını göstermektedir.

5.2.1 100 mM ve 150 mM NaCl stresi ile katalaz seviyesinde meydana gelen değişim

100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen domates fidelerinin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi kontrol ile karşılaştırıldığında, en düşük seviye %50 azalma ile 3. saatte bulunmuştur (Şekil 4.64). Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.15), 100 mM NaCl stresi altında CAT gen ekspresyon seviyesi ile MDA içeriğini gösteren grafikler incelendiğinde iki grafik arasında bir korelasyon olduğu açıkça görülmektedir. Bu bulgular; 3. saatte MDA düzeyindeki keskin artışın hücredeki stres artışını ve membran tahribatını gösterdiğini ve bu aşamada henüz katalaz enziminin (muhtemelen tüm antioksidan sistemlerin) devreye giremediği sonucunu düşündürmektedir. İlk 9 saat uygulanan tuz stresine bağlı olarak CAT gen ekspresyon seviyesi artarken MDA içeriği de bu durumla uyumlu olarak azalma göstermiştir. Sergio vd. de yaptıkları çalışmada *Cichorium intybus* L.'de (hindiba) tuzluluk artışıyla yaprak ve köklerde MDA miktarının azalırken CAT enzim aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir (Sergio vd. 2012). 6. ve 9. saatlerde gen ekspresyonu düzeylerinin kontrole göre kademeli bir artış gösterdiği belirlenmiş, 6. saatte neredeyse 3 kat artış gözlenirken 9. saatte 4 kat artış kaydedilmiş ve bu artışın kontrole, 3. saate ve birbirlerine karşı istatistiksel olarak $p<0.05$ seviyesinde anlamlı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.15). Sonraki süreçte ise 12-48. saat arasında geçen zamana bağlı olarak hücrede CAT gen ekspresyon seviyesinde azalma görülürken MDA düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç antioksidan savunma sisteminin bu süre içerisinde yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Zhang vd. (2013)'nin *Broussonetia popyrifera* (acem dutu) bitkisi ile yaptıkları çalışmada, 100 mM NaCl'nin katalaz enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu görülmüştür (Zhang vd. 2013). Çalışmamızda 12. saatte gen ekspresyon seviyesi kontrole göre 2 kat artış gösterirken 24. saatte kontrol ile aynı ekspresyon düzeyinin gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu artış 12. saatte $p<0.05$ düzeyinde anlamlı iken 24. saatte görülen gen ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 48. saatte kontrole göre CAT gen ekspresyon

seviyesinde neredeyse 2 kat görülen artış 12. saat dışında diğer saat dilimlerine ve kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlıdır. Tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.14). Çizelge 4.15’de görüleceği gibi 24. saat dışındaki stres uygulama saatlerinde ekspresyon seviyesindeki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu; stres uygulama sürelerinin birbirleri ile değerlendirildiğinde genel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada tuza hassas *L. esculentum* (Lem) ve tuza toleranslı olan *L. pennellii* (Lpa)’ya uygulanan 100 mM tuz stresi ile *L. esculentum*’da CAT enzim aktivitesi zamana karşı azalma göstermiş, tuza toleranslı olan *L. pennellii*’de ise CAT enzim aktivitesi artmıştır. Bu artış ile antioksidant savunma sisteminin daha kolay düzenlenebileceği belirtilmiştir (Shalata vd. 2001).

Bolu ve Polle 2004’te *Populus x canescens*’a hidroponik kültür içinde 3 hafta süresince 25 mM ve 100 mM NaCl uygulamışlardır. 100 mM NaCl ile yüksek tuzluluğun lipid peroksidasyonuna yol açtığını, tuzlulukla CAT enzim aktivitesinde artış olduğunu, uygulama süresinin artması ile aktivitede değişiklik olmadığını belirlemişlerdir (Bolu ve Polle 2004).

150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen domates fidelerinin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi kontrol ile karşılaştırıldığında, 3. saatte küçük bir miktar düşüş gözlenmiş, 6. saatte düşüşün devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.65). 3. saatten 6. saatte devam eden bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.20). 100 mM NaCl stresi altında 6. saatte ekspresyon seviyesinde kontrole göre neredeyse 3 kat artış olurken 150 mM tuz stresi altında düşüş görülmesi dikkat çekicidir. Yıldızıtugay vd. (2014)’nin *Arpera intermedia* (puslu ipekçimi) ile yaptıkları çalışmada Hoagland besiyerinde 7-14 gün boyunca uygulanan 150 mM NaCl stresi ile katalaz enzim aktivesinde azalma olduğu görülmüştür (Yıldızıtugay vd. 2014). Çalışmamızda daha yüksek tuz konsantrasyonunda (150 mM) domateste muhtemelen savunma sistemi

yetersiz kalmış CAT gen ifade düzeyi azalma göstermiştir. Genellikle CAT gen ifade düzeyi ile MDA içeriği arasında ters orantı olduğu görülmektedir. Çünkü MDA stres oluşumunun belirlenmesinde bitkide meydana gelen tahribatın göstergelerinden biridir (Mittler 2003). Bitki savunma sisteminde görev alan CAT ise stres koşulları altında oluşan zararlı H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü sağlayarak hücreleri strese karşı korumaktadır (Jithesh vd. 2006a). Dolayısıyla CAT miktarı yetersiz kaldığında MDA miktarı artış gösterebilmektedir. 6. saatte CAT gen ifade düzeyinde düşüş belirlenmiş olup, MDA içeriğinde kontrole göre artma beklenirken tam tersi şekilde azalma görülmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında 9. saatte meydana gelen 2 kat artışın $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.19). CAT gen ifadesini gösteren grafik incelendiğinde 9. saatte hücrede oluşan tuz stresine karşı üretilen hücre içi CAT mRNA miktarı artarken, şekil 4.6'da görüldüğü gibi MDA düzeyi de uyumlu şekilde azalmıştır. 9. saat sonrasında 12. saatte CAT gen ifadesinde görülen azalma MDA içeriğini gösteren grafik ile de uyumludur. 24 ve 48. saatlerde görülen CAT gen ifadesi değişimi ise MDA içeriğini gösteren grafik ile uyum göstermemektedir. 24. ve 48. saatlerde MDA içeriğinde artış görülürken CAT gen ifadesi düzeyinin de buna bağlı olarak azalması beklenmiştir; ancak grafikler incelendiğinde iki grafik arasında tam bir uyum görülmemiştir. Radic vd. (2013)'nin *Centaurea ragusina* L. bitkisine uyguladıkları artan tuz konsantrasyonları da (0, 150, 300, 450, 600 mM NaCl) katalaz enzim aktivitesi grafiğinde dalgalanma göstermiştir. 150 ve 300 mM NaCl konsantrasyonunda katalaz enzim aktivitesi artarken diğer konsantrasyonlarda azalmıştır (Radic vd. 2013). Zhang vd. (2013)'nin *Broussonetia popyrifera* (acem dutu) bitkisine uyguladıkları 150 mM NaCl de katalaz enzim aktivitesinde belirgin bir artışa sebep olmuştur (Zhang vd. 2013). Araştırmamızda tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet test, Post Hoc testi) ile zamana karşı domateste katalaz gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.19). Çizelge 4.20'de görüleceği gibi 3. saat dışındaki stres uygulama saatlerinde ekspresyon seviyesindeki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu; stres uygulama saatlerinin birbirleri ile değerlendirildiğinde de genel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

Takemura vd.'nin 2002 yılında yaptıkları çalışmada *Bruguiera gymnorrhiza*'ya (mangrov veya Hindistan sakız ağacı) 5 gün boyunca uygulanan 500 mM NaCl stresi sonrasında yapılan northern blot analizi ile, CAT gen ifadesinde belirgin bir değişim olmadığı görülmüştür (Takemura vd. 2002). Jithesh vd.'nin 2006 yılında *Avicennia marina* (Forsk.)'ya (tuza toleranslı gri mangrov) 48 saat boyunca (0h, 12h, 24h, 48h) uyguladıkları 500 mM NaCl stresi sonrasında yapılan northern blot analizi ile ise, 12. saatte Cat1 mRNA düzeyinde artış görülmüş, 24 ve 48. saatlerden sonra mRNA düzeyinin düştüğü belirlenmiştir (Jithesh vd. 2006a). Diğer çalışmalarda gen ifadesi düzeyinde meydana gelen değişimi gösteren bulgular enzim aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Fakat burada bahsedilen iki çalışma real time PCR ile değil northern blot analizi ile yapılmış olsa da gen ifadesi çalışılmış olması açısından önemlidir.

5.2.2 100 mM ve 150 mM PEG stresi ile katalaz seviyesinde meydana gelen değişim

100 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen domates fidelerinin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi kontrol ile karşılaştırıldığında, 3. saatte alınan örneklerin gen ekspresyonu düzeyinde 100 mM tuz stresinde kaydedilen %50 azalmanın aksine, 2 kat artış meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.66). Bu artış $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu durum 100 mM PEG stresi altında bitkinin 100 mM NaCl stresi ile karşılaştırıldığında, CAT genlerini daha fazla ifade ettiğini göstermektedir. MDA grafikleri de incelendiğinde 3. saat örneklerinde 100 mM PEG uygulaması sonrası MDA düzeyi, 100 mM NaCl uygulamasına göre daha düşüktür. 100 mM tuz stresi uygulanan örneklerin 3. saat normalize gen ekspresyonu verilerinin ortalaması 0,52 iken (Çizelge 4.12) aynı saatte kuraklık stresi altındaki bitkilerde bu değer 1,81 olduğu görülmüştür (Çizelge 4.22). Bu değer 1'in altında olması kontrole göre gen ekspresyon seviyesinin azaldığını, 1'in üzerine çıkması ise gen ekspresyonunun arttığını ifade etmektedir. 6. saatte tüm koşullar ve zamanlar altındaki uygulamalar arasında kontrole kıyasla 12 katı geçen gen ekspresyonu seviyesinin maksimum değere ulaştığı belirlenmiştir. CAT gen ekspresyon seviyesini gösteren grafik MDA içeriğini gösteren grafik ile kıyaslandığında 6. saatteki MDA içeriğindeki artış düzeyine kıyasla CAT gen ekspresyon seviyesinde beklenen seviyenin üzerinde bir

artış gözlenmiştir. 6. saatte kuraklık stresi uygulanan örneklerde maksimum normalize gen ekspresyon seviyesi 12,81 olarak kaydedilmiştir. 100 mM tuz stresi uygulanan domates bitkilerinde maksimum normalize CAT gen ekspresyonu seviyesine 9. saatte (3,82) ulaşılmıştır (Çizelge 4.12). Aynı saatte 100 mM PEG stresi altındaki normalize gen ekspresyonu seviyesi 6,07'dir (Çizelge 4.22). 9. saatte MDA içeriğindeki artışa bağlı olarak CAT gen ifadesi kontrole göre 6 kat artış göstermiştir. MDA içeriğini gösteren grafik göz önüne alındığında 9. saatten sonra bitkinin CAT gen ekspresyon seviyesinde kademeli bir azalma olması beklenmektedir. Bu nedenle 12. saatte CAT gen ekspresyon seviyesinde meydana gelen artışın yanlış bir pozitif değer olduğu düşünülmektedir. 24. saatte ise CAT gen ifadesi kontrolün 2,5 kat üzerindedir. Tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmış (Çizelge 24), kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.25). 48. saatte kontrole göre gen ekspresyonunda görülen azalma da istatistiksel olarak anlamlıdır. MDA içeriğini gösteren grafik ile karşılaştırıldığında bu saatte CAT gen ifadesi düzeyinin düşmesi beklenmektedir. 100 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerden elde edilen veriler 100 mM tuz stresi uygulanan örneklerin verileri ile karşılaştırıldığında, bitkilerin kuraklık stresine daha toleranslı olduğunu düşündürmektedir. Ancak sadece CAT gen ifadesi düzeylerinin karşılaştırılması ile bu sonuca ulaşmak çok da doğru olmadığından antioksidan savunma sisteminde rol alan diğer genlerin yeni çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir.

150 mM NaCl stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen domates fidelerinin zamana bağlı CAT gen ekspresyon seviyesi kontrol ile karşılaştırıldığında, 3. saatte 100 mM ve 150 mM tuz streslerinde de görüldüğü gibi düşüş olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak incelendiğinde bu düşüşün $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu görülmektedir (Çizelge 4.30). MDA içeriğini gösteren grafik incelendiğinde ise 150 mM PEG uygulaması ile 3. saatte kontrol ile karşılaştırıldığında bu azalma beklenen bir durumdur. Bu saatte MDA içeriğinin diğer konsantrasyonlardaki NaCl ve PEG konsantrasyonlarına göre daha yüksek olmasının nedeni, yüksek PEG konsantrasyonunda bitkinin daha fazla tahribat aldığını düşündürmektedir. 150 mM tuz

stresi altında yetiştirilen örneklerde 3. saat normalize CAT gen ekspresyon seviyesi ortalaması 0,90'dır (Çizelge 4.17). Aynı saatte 150 mM tuz stresine eş kuraklık stresi altında yetiştirilen bitkilerde bu değer 0,0015 (Çizelge 4.27) iken 100 mM tuz stresine eş kuraklık uygulanan örneklerde 1,81'dir (Çizelge 4.12). Bu değer 1'in altında olması kontrole göre gen ekspresyon seviyesinin azaldığını, 1'in üzerine çıkması ise gen ekspresyonunun arttığını ifade etmektedir. 6. saatte gen ekspresyon seviyesi kontrole göre 3,5 katına çıkmıştır (Şekil 4.67). Bu artış $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak da anlamlıdır. Bu durum 6. saatte bitkide savunma mekanizmalarının devreye girdiğini göstermektedir. Ancak MDA içeriğini gösteren grafik incelendiğinde 6. saatte bitkinin hem MDA içeriği hem de CAT gen ekspresyonunda artış görülmüştür. 150 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi altında yetiştirilen örneklerde 6. saatte maksimum normalize gen ekspresyonu seviyesine ulaşılmıştır (3,53) (Çizelge 4.27). Meydana gelen artış kontrol ile karşılaştırıldığında %71 olarak belirlenmiştir. Bu durum; bitkinin 3 saate kadar 150 mM PEG stresine bir cevap vermediğini, 6. saate kadar ise savunma mekanizmalarının devreye girdiğini göstermektedir. Tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA Dunnet test, Post Hoc testi) ile zamana karşı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlılık dereceleri karşılaştırılmış (Çizelge 4.29), çizelge 4.30'de görüleceği gibi kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. 9. saatten 48. saate kadar bitkinin MDA içeriğinde birbirine yakın değerler gözlenirken, bitki CAT gen ifade düzeyinde dalgalanmalar göstererek savunma mekanizması elemanlarından biri olan katalazı devreye sokmaya çalışmıştır. 24 ve 48. saatlerde kontrole göre gen ekspresyonunda belirlenen azalma (0,65 ve 0,95) istatistiksel olarak da anlamlı değildir (Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.30). 150 mM tuz stresi uygulanan örneklerde ise 24 ve 48. saatlerde kontrole göre neredeyse 4 ve 3 kat artış gözlenmiştir (Şekil 4.65) ve bu artışlar istatistiksel olarak da $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.20). Bu verilere göre 150 mM tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresi uygulanan bitkilerde savunma sisteminin daha çok zarar gördüğü ve strese cevap vermekte güçlük çektiği anlaşılmaktadır.

Romero vd. 2005'te *Lycopersicon esculentum*'a (domates) %12 PEG uygulayarak oluşturdukları kuraklık stresi sonrası CAT enzim aktivitesinde kontrole göre %47 artış belirlemişlerdir (Romero vd. 2005).

Sen ve Alikamanoğlu'nun 2013 çalışmasında ise *Beta vulgaris* L.'ye (şeker pancarı) uyguladıkları PEG 6000 konsantrasyonundaki artışla (10, 40, 80 g l⁻¹) birlikte MDA düzeyinde ve CAT enzim aktivitesinde paralel bir artış belirlenmiştir (Sen ve Alikamanoğlu 2013).

Ming ve Wang 2002 yılında *Glycyrrhiza uralensis*'e (meyan kökü) uyguladıkları PEG 6000 (-2.5 Mpa,-1.5 Mpa) ile oluşturdukları ozmotik stres ile MDA miktarının -2.5 Mpa PEG stresi altında arttığını ancak stresin ilk evrelerinde düştüğünü daha sonra ise, -1.5 Mpa PEG stresinin başlangıcına doğru arttığını gözlemlemişlerdir (Ming ve Wang 2002).

Xu ve Huang 2010 yılında *Agrostis stolonifera* L.'ye (sarmaşık türü çimen) 28 gün boyunca uyguladıkları ozmotik potansiyeli -0,66 Mpa olan PEG solusyonu sonrasında katalaz enzim aktivitesinde artış belirlemişlerdir. Çok yıllık çimenlerde antioksidant savunma sisteminin PEG ile oluşturulan su stresine adaptasyonda rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır (Xu ve Huang 2010).

Literatürde yer alan birçok çalışmada stres uygulanmamış bitkiler ile uygulanan bitkiler karşılaştırıldığında CAT enzim aktivitesinin önemli ölçüde baskılandığı gösterilmektedir (Foyer ve Noctor 2000, Lee vd. 2001, Shim vd. 2003, Cavlcanti vd. 2004, Demiral ve Türkan 2004). Tuz stresi altında bitkilerde CAT'ın H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında tek başına etkili olamayacağı bildirilmiştir (Cavlcanti vd. 2004). Ancak, aynı zamanda CAT aktivitesinin stres toleransının belirlenmesinde önemli bir faktör olabileceği de ileri sürülmektedir (Shim vd. 2003, Sahu vd. 2010).

Sonuç olarak; dünyada ekonomik değere sahip olan domateste (*Solanum lycopersicum* L.) yapılan araştırmalarda katalaz ezim aktivitesindeki değişimi gösteren çalışmalara yer verilmiştir, katalaz gen ifadesini NaCl ve PEG ile ilişkilendiren herhangi bir çalışma bilğimiz dahilinde bulunmamaktadır. Ayrıca CAT gen ifadesinde mRNA düzeyinde meydana gelen değişim ile MDA düzeyi arasındaki ilişki de domateste çalışılmamıştır. Uygulanan tuz (100 mM ve 150 mM NaCl) ve tuz stresine eş ozmotik basınçta kuraklık

(100 mM ve 150 mM PEG) stresleri altında domateste antioksidant savunma sisteminde önemli bir rolü olan katalaz geninin mRNA düzeyinde meydana gelen değişiminin kantitatif olarak real time PCR ile belirlenmesine yönelik ilk olma niteliği taşıyan bu çalışma ile katalazın bir dereceye kadar bitki savunmasında görev aldığı, ancak MDA düzeyi ile CAT arasında beklenen ters orantıda sapmalar olduğundan bitkinin savunmada tek başına yetersiz kaldığı ortaya koyulmuştur. MDA düzeyinde meydana gelen değişimler ile CAT gen ifadesinde tam bir korelasyon belirlenememiştir. Yapılan analizler ile uygulanan tuz ve kuraklık streslerinin uygulama süreleri ile doğrusal bir çizgiyi takip etmediği görülmüştür. Bitki farklı saatlerde gen ifadesi düzeyinde artan veya azalan eğriler oluşturmuştur. Çalışmamız sonuçlarının günümüzde ve gelecekte ülkemizde yürütülecek benzer kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahire, M.L., Walunj, P.R., Kishor, P. B. K., and Nikam, T.D. 2013. Effect of sodium chloride-induced stress on growth, proline, glycine betaine accumulation, antioxidative defence and bacoside A content in in vitro regenerated shoots of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1943–1953.
- Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları, s.106-111, Konya.
- Anonim. 2010. Web Sitesi: http://www.sabiosciences.com/images/HOWitWORKS_400.jpg, Erişim Tarihi: 07.03.2010.
- Anonim. 2011. Web Sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Domates>, Erişim Tarihi: 04.07.2011.
- Anonim. 2012a. Web Sitesi: <http://www.tuik.gov.tr/>, Erişim Tarihi: 18.05.2012.
- Anonim. 2012b. Web sitesi. <http://www.bahcesel.net/forumsel/genel-ve-ozel-sebzecilik-profdratila-gunay/18925-domates-s305n305fland305r305lmas305/>, Erişim Tarihi: 18.12.2012.
- Anonymous. 2011. Web Sitesi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NCBI Entrez Gene ID: 543519 ve 5257184, Erişim Tarihi: 24.11.2011.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, Erişim Tarihi: 24.11.2012.
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science*, 82, 1227–1238.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639.
- Auroma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), 671-683.
- Aydın, A., Sayal, A. ve Işimer, A. 2001. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 156 s., Ankara.
- Aydın, S., Büyük, İ. and Aras, E.S. 2014. Expression of SOD gene and evaluating its role in stress tolerance in NaCl and PEG stressed *Lycopersicum esculentum*. *Turkish Journal of Botany*, 38, 89-98.

- Azpilicueta, C.E., Benavides, M.P., Tomaro, M. L. and Gallego, S. M. 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 589-95.
- Baily, C., Audiger, C., Ladonne, F., Wanger, H.M., Coste, F., Come, D. and Corbineau, F. 2000. Change in oligosaccharide content and antioxidant enzymes activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality'' *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 701-708.
- Becker-Dillingen, J. 1956. *Handbuch des Gesamten Gemüsebaues. Einschliesslich der Küchenkrauter*. Paul Parey, Berlin.
- Boileau, T.W.M., Liao, Z., Kim, S., Lemeshow, S., Erdman, J.R.J.W. and Clinton, S. K. (2003). Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energyrestricted diets. *Journal of National Cancer Institute*, 95, 1578–1586.
- Bolu, W. H. and Polle, A. 2004. Growth and stress reactions in roots and shoots of a salt-sensitive poplar species (*Populus x canescens*). *Tropical Ecology*, 45(1), 161-171.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F. and Ialenti, A. 2002. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 73, 53-63.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 83–116.
- Boyer, J. S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443–48.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. 1985. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods of Enzymology*, 5, 302-310.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25; 169-93.
- Cakmak, I. 1994. Activity of ascorbate-dependent H₂O₂ scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium deficient leaves, but not in phosphorus deficient leaves. *Journal of Experimental Botany*, 45, 1259-1266.
- Cakmak, I. and Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98, 1222-1226.
- Cantarello, C., Volpe, V., Azzolin, C. and Berteà, C. 2005. Modulation of enzyme activities and expression of genes related to primary and secondary metabolism

- in response to UV-B stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) Journal of Plant Interactions, 1(3), 151-161.
- Canvin, D.T. 1990. Photorespiration and CO₂ concentrating mechanisms. In Plant physiology, biochemistry and molecular biology (ed. D. T. Dennis and D. H. Turpin), pp. 253-273. Longman Scientific and Technical, Harlow.
- Carvalho, L.C., Santos, S., Vilela, B.J. and Amancio, S. 2008. *Solanum lycopersicon* Mill. and *Nicotiana benthamiana* L. under high light show distinct responses to anti-oxidative stress. Journal of Plant Physiology 165, 1300—1312.
- Cavalcanti, F R., Oliveira, J.T.A., Martins-Miranda, A.S., Viegas, R.M. and Silveria, J. A. G. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stress cowpea leaves. New Phytologist, 163, 563-571.
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Romero, L. and Ruiz, J. M. 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. Annals of Botany, 100, 747-756.
- Cheeseman, K.H. 1993. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. Molecular Aspects of Medicine, 14(3), 191-197.
- Chen, Q., Zhang, M. and Shen, S. 2011. Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of *Jerusalem artichoke* (*Helianthus tuberosus* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 33, 273–278.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. 1995. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Biotechniques Short technical report, 19(6), 942-945.
- Cuartero, J. and Fernandez-Munoz, R. 1999. Tomato and Salinity. Scientia Horticulturae, 78, 83-125.
- Cvikrova, M., Gemperlova, L., Martincova, O. and Vankova, R. 2013. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. Plant Physiology and Biochemistry, 73, 7-15.
- Çanakcı, S. and Karaboğa, Z. 2013. Some physiological and biochemical responses to cadmium in salicylic acid applied cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. Pakistan Journal of Botany, 45(6), 1963-1968.
- Çekiç, F.Ö. 2004. Tuz (NaCl) ve ağır metal (kadmiyum) stresine maruz bırakılan domates birkisinde bazı fizyolojik parametrelerin ve antioksidant savunma sisteminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 93, Mersin.

- Çopur, O. ve Oğlakçı, M. 1995. Tarımsal üretimde tuzluluk sorunu ve öneriler. Hacettepe Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 1(13), 18.2.
- Dai, Q., Chen, C., Feng, B., Liu, T., Tian, X., Gang, Y., Sun, Y., Wang, J. and Du, S. 2009. Effects of different NaCl concentration on the antioxidant enzymes in oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings. Plant Growth Regulation, 59(3), 273-278.
- Demiral, T. and Türkan, I. 2004. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? Journal of Plant Physiology, 161(10), 1089-1100.
- Doğan, M., Avu, A., Nida Can, E. and Aktan, A. 2008. Farklı domates tohumlarının çimlenmesi üzerine tuz stresinin etkisi. SDÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi (E-dergi), 3(2), 174-182.
- Doğan, M., Kılıç, H., Aktan, A. and Can, N.E. 2009. Tuz stresi altındaki domates (*Lycopersicon* sp.) fidelerinde kalsiyum miktarı değişimleri. Fırat Üniversitesi Journal of Science, 21(2), 103-108.
- Dorak, M.T. 2007. Real-time PCR. Taylor & Francis Group, 333 p., New York.
- Dunnett, C.W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Journal of the American Statistical Association, 50, 1096-1121.
- Edreva, A. 1998. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, 22-26 Haziran, İzmir.
- Eising, R., Trelease, R.N., and Ni, W.T. 1990. Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. Archives of Biochemistry and Biophysics, 278, 258-264.
- Epstein, E., Norlyn, J.D., Rush, D.W., Kingsbury, R.W. and Kelly, D.B. 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. Science, 210, 399-404.
- Esaka, M., Yamada, N., Kitabayashi, M., Setoguchi, Y., Tsugeki, R., Kondo, M. and Nishimura, M. 1997. cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. Plant Molecular Biology, 33, 141-155.
- Feldman, P. L., Griffith, O. W. and Stuehr, D.J. 1993. The surprising life of nitric oxide. Chemical and Engineering News, 71(51), 26-38.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2000 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytologist, 146, 359-388.
- Frugoli, J. A., Zhong, H. H., Nuccio, M. L., McCourt, P., McPeck, M. A., Thomas, T. L. and McClung, C. R. 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Physiology, 112, 327-336.

- Gao, P. P., Zheng, G. H., Wu, Y. H. and Liu, P. 2014. Effect of exogenous potassium on photosynthesis and antioxidant enzymes of rice under iron toxicity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(1), 47–52.
- Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6; 995-1001.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Grillo, S., Schorf, K., Vriezen, W.H. and Mariani, C. 2010. Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 453-462.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P. and Lucas, M.C. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*, 34, 706-714.
- Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O., Hitmi, A. and Ledoigt, G. 2009. Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1446-1452.
- Gökmen, Ö. Ö. 2006. Domateste Soğuk Stresinin Antioksidatif Mekanizmalar Yönünden Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, 84, Adana.
- Guan, L. and Scandalios, J. G. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5930-5934.
- Guan, L. and Scandalios, J.G. 1996. Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. *Journal of Molecular Evolution*, 42, 570–579.
- Günay, A. 1992. Özel Sebze Yetistirciliği Seriler C:2, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bağ-Bahçe Kürsüsü: 92 s. Ankara.
- Günel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri. Journal of Medical Science*, 27; 763-767.
- Güngör, O. 2006. Mikotoksin Üreten Fungusları PCR ile Saptama Yöntemleri (Diploma Çalışması) Bornova/İzmir.
- Hamayun, M., Khan, S.Z., Shinnwari, Z.K., Khan, A.L. and Ahmad, N., I.J. 2010. Effect of polyethylene glycol induced drought stress on physio-hormonal attributes of soybean. *Pakistan Journal of Botany*, 42(2), 977-986.

- Hamilton, E.W. III. and Heckathorn, S.A. 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl: complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, 126(3), 1266–1274.
- Havir, E. A. and McHale, N. A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84(2), 450–455.
- Hernandez, J. A., Corpas, F. J., Gomez, M., del Rio, L. A. and Sevilla, F. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 89, 103–110.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Ingram, J. and Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377–403.
- Jenkins, J.A. 1948. The Orgin of The the Cultivated Tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392.
- Jiang, J., Su, M., Chen, Y., Gao, N., Yiao, C., Sun, Z., Li, F. and Wang, C. 2013. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment. *Biologia*, 68(2), 231-240.
- Jithesh, M N., Parashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. and Parida, A.K. 2006a. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their rle in stress defence. *Journal of Genetics*, 85(3), 237-254.
- Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. and Parida, A K. 2006b. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. *Plant Cell Reports*, 25, 865-876.
- Jones, G. L. and Masters, C. J. 1976. On the comparative characteristics of mammalian catalases. *Biochemistry and Molecular Biology*, 55(4), 511-518.
- Jones, R.A. and Qualset, C.O. 1984. Application of Genetic Engineering to Crop Improvement. Dordrecht, 305-340, Netherlands.
- Kacar, B., Katkat. V. ve Öztürk, Ş. 2002. Bitki Fizyolojisi. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, 563 s., Bursa.
- Kadioğlu, A. 2004. Bitki Fizyolojisi. Lokman Yayın, 453 s., Trabzon.

- Kalaji, H. M. and Pietkiewicz, S. 1993. Salinity effects on plant growth and other physiological processes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 15(2), 89-124.
- Kalefetoğlu, T. and Ekmekçi, Y. 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G. U. Journal of Science*, 18(4), 723-740.
- Kalender, S., Kalender, Y., Ögütçü, A., Uzunhisarcıklı, M., Durak, D. and Açıkgöz, F. 2002. Endosulfan-Induced Cardiotoxicity and Free Radical Metabolism in Rats: The Protective Effect of Vitamin E. *Toxicology*, 202, 227-235.
- Kantar, F. ve Elkoca, E. 1998. Kültür Bitkilerinde Tuza Dayanıklılık (Salt resistance in crop plants, Turkish). *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 29(1), 163-174.
- Kavas, M., Baloğlu, M. C., Akça, O., Köse, F. S. and Gökçay, D. 2013 Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. *Turkish Journal of biology*, 37, 491-498.
- Khoshgoftarmanesh A. H., Khodarahmi, S. and Haghighi, M. 2014. Effect of silicon nutrition on lipid peroxidation and antioxidant response of cucumber plants exposed to salinity stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(5), 639–653.
- Knight, J.A., Pleper, R.K. and Macellon, L. 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: Its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chemistry*. 34, 2433-2438.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J. and Lind, K. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27; 95-125.
- Kuşvuran, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Abak, K. ve Yaşar, F. 2007 Bazı kavun (*Cucumis* sp.) Genotiplerinin Tuz Stresine Tepkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(4), 395-404.
- Kuşvuran, Ş., Yaşar, F., Abak, K. ve Ellialtıoğlu, Ş. 2008. Tuz stresi altında yetiştirilen tuza toleran ve duyarlı *Cucumis* sp'nin bazı genotiplerinde lipid peroksidasyonu, klorofil ve iyon miktarlarında meydana gelen değişimler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (The Journal of Agricultural Science)*, 18(1), 11-18.
- Landi, M., Remorini, D., Pardossi, A. and Guidi, L 2013. Purple versus green-leaved *Ocimum basilicum*: Which differences occur with regard to photosynthesis under boron toxicity? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176, 942–951.
- Lanir, A. and Schejter, A. 1975. On the Sixth coordination position of beef liver catalase. *FEBS Letters*, 15; 55(1), 254-256.

- Larcher, W. 1995. Physiological Plant Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups, Springer, 506 p., Berlin.
- Laurent, B. and Ardaillou, R. 1986. Reactive Oxygen Species: Production and Role in the Kidney. The American Journal of Physiology, 251, F765-F776.
- Lee, D. H., Kim, Y. S. and Lee, C. B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Physiology, 158, 735-745.
- Lee, S.H. and An, C.S. 2005. Differential Expression of Three Catalase Genes in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). Molecules and Cells, 20(2), 247-255.
- Levitt, J. 1972. Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, 698 p., New York.
- Lichtenthaler, H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. Journal of Plant Physiology, 48, 4-14.
- Livak, J. K., and Schmittgen, D. T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25(4), 402-408.
- Lovdal, T. and Lillo, C. 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. Analytical Biochemistry, 387, 238-242.
- Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. and Foyer, C. H. 2005. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. Journal of Experimental Botany, 56(411), 417-423.
- Ma, L., Li, Y., Yu, C., Wang, Y., Li, X., Li, N., Chen, Q. and Bu, N. 2012. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. Protoplasma, 249, 393-399.
- Manaa, A., Mimouni, H., Wasti, S., Gharbi, E., Aschi-Smiti, S., Faurobert, M., and Ben-Ahmed, H. 2013. Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. Plant Omics Journal, 6(4), 268-277.
- Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. The Journal of Biological Chemistry, 268 (17), 12231-12234.
- Marletta, M.A. 1994. Nitric oxide synthase: aspect concerning structure and catalysis. Cell, 78, 927-930.
- Marok, M.A., Tarrago, L., Ksas, B., Henri, P., Abrous-Belbachir, O., Havaux, M. and Rey, P. 2013. A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds

- during water deficit compared to a tolerant variety. *Journal of Plant Physiology*, 170, 633– 645.
- Matsumura T, Tabayashi N, Kamagata Y, Souma C, and Saruyama H. 2002. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 116(3), 317-37.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habib Ghorbal, M. and El Ferjani, E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), *Plant Science*, 127 , 129–137.
- Mhadhbi, H., Fotopoulos, V., Mylona, P. V., Jebara, M., Aouani, M. E. and Polidoros, A. N. 2011. Antioxidant gene – enzyme responses in *Medicago truncatula* genotypes with different degree of sensitivity to salinity. *Physiologia Plantarum*, 141(3), 201–214.
- Ming, L. and Wang, G. 2002. Effect of Drought Stress on Activities of Cell Defense Enzymes and Lipid Peroxidation in *Glycyrrhiza uralensis* Seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 22, 503-507.
- Mittler, R., van der Auwerra, S., Gollery, M., and Breusegem, F .V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 10, 490–498.
- Mittova V, Tal M, Volokita M and Guy M. 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell & Environment*, 26, 845–856.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. and Volokita, M., 2004. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *The Journal of Experimental Botany*, 55, 1105–1113.
- Morel, Y., and Barouki, Y. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*, 342, 481–496.
- Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ*, 16, 15-24.
- Munns, R. 2002. Comparative Physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 239-250.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, R. A. and Rodwell, V.W. 1996. Fizyolojik Öneme Sahip Lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. Harper’ın Biyokimyası, 24. Baskı, Barış Kitabevi, 312-322, İstanbul.
- Nath, K. A. and Norby, S. M. 2000. Reactive Oxygen Species and Acute Renal Failure. *American Journal Medicine*, 109, 655-678.

- Niki, E. 1987. Antioxidant in Relation to Lipid Peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 227-253.
- Nicholls, P., Fita, I. and Loewen, P.C. 2000. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51, 51-106.
- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inz'e, D., Van Montagu, M., and Gheysen, G. 1995. Characterization of a pathogen induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 8, 371–378.
- Ota, Y., Ario, T., Hayashi, K., Nakagawa, T., Hattori, T., Maeshima, M., and Asahi, T. 1992. Tissue-specific isoforms of catalase subunits in castor bean seedlings. *Plant & Cell Physiology*, 33, 225–232.
- Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M. 2001. *Bitki Biyoteknolojisi*. Selçuk Üniversitesi Yayınları, 456 s., Konya.
- Paller, M.S., Hoidal, J. R. and Ferris, T.F. 1984. Oxygen Free Radicals in Ischemic Acute Renal Failure in Rat. *The Journal of Clinical Investigation*, 74, 1156-1164.
- Pfaffl, W.M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2002-2007.
- Plaut, Z. 1995. *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Marcel Dekker, 587 p., New York.
- Polidoros, A.N. and Scandalios, J.G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different sinifes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.) *Physiologia plantarum*, 106, 112-120.
- Poljakoff-Mayber, A. and Lerner, H. R. 1994. *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcel Dekker Inc., 654 p., New York.
- Porter, N.A. 1984. Chemistry of Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*, 105, 273-283.
- Pugnaire, F.I., Endolz, L.S. and Pardos, J. 1994. *Handbook of plant and Crop Stress*, p. 247, Marcel Dekker, New York.
- Radic, S., Stefanica, P.P., Lepedus, H., Rojec, V. and Pevalek-Kozlina, B. 2013. Salt tolerance of *Centaurea ragusina* L. is associated with efficient osmotic adjustment and increased antioxidative capacity. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 39– 48.
- Ramakrishna, B. and Rao, S.S.R. 2013. Preliminary studies on the involvement of glutathione metabolism and redox status against zinc toxicity in radish seedlings by 28-Homobrassinolide. *Environmental and Experimental Botany*, 96, 52– 58.

- Rasool, S., Ahmad, A., Siddigi, T. O. and Ahmad, P. 2013. Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1039-1050.
- Reilly, K., Han, Y., Tohme, J. and Beeching, J. R. 2001. Isolation and characterisation of a cassava catalase expressed during post-harvest physiological deterioration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1518(3), 317-323.
- Rio, D. D., Stewart, A. J. and Pellegrini, N. 2005. A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, 15, 316-328.
- Robinson, S. P. and Jones, G. P. 1986. Accumulation of glycine-betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 659-668.
- Romero-Romeroa, T., Sa'nchez-Nietob, S., SanJuan-Badillob, A., Anayaa, A.L. and Cruz-Ortegaa, R., 2005. Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae). *Plant Science*, 168, 1059–1066.
- Roscoe, J. T. 1975. *Fundamental research statistics for the behavioral sciences*. New York: Holt, Rinehart and Winston, Inc. 63.
- Rout, J. R. and Sahoo, S. L. 2013. Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L. *Plant Growth Regulation*, 71, 95–99.
- Safari, M., Ghanati, F., Behmanesh, M., Hajnorouzi, A., Nahidian, B. and Mina, G. 2013. Enhancement of antioxidant enzymes activity and expression of CAT and PAL genes in hazel (*Corylus avellana* L.) cells in response to low-intensity ultrasound. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (9), 2847-2855.
- Sahu, S., Das, P., Ray, M. and Sabat, S. C. 2010. Osmolyte modulated enhanced rice leaf catalase activity under salt-stress. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1, 39-46.
- Sairam, R. K. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86(3), 407–421.
- Salin, M.L. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*. 72, 681–689.
- Salisbury, F.B. and Marinos, N. G. 1985. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. II., Springer-Verlag, 706-707, Berlin.

- Savoure, D.A., Davey, M.T.T., Hua, J.X., Mauro, M.S., Van Montagu, M., Inze, D., and Verbruggen, N. 1999. NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant, Cell & Environment*, 22, 387–396.
- Scandalios, J.G. 1974. Subcellular localization of catalase variants coded by two genetic loci during maize development. *The Journal of Heredity*, 65, 28-32.
- Scandalios, J., Tong, W. J., and Roupaklas, D. G. 1980. *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intercellular location, and some biochemical properties. *Molecular and General Genetics MGG*, 179(1), 33–41.
- Scandalios, J.G. 1987. The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: Regulation, functional significance, and molecular biology. In: Rattazi, M. C., Scandalios, J. G., Whitt, G. S., eds. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*. Alan, R. Liss, New York, 19–43.
- Scandalios, J. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101, 7–12.
- Scandalios, J.G. 1994. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense systems in plants*, eds, Foyer, C. H. & Mullineaux, P. M. (CRC, Boca Raton, FL), pp. 275-315.
- Scandalios, J. 2001. Molecular responses to oxidative stress, in: *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Hawkesford, M. J. and Buncher, P. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 181-208.
- Scandalios, J. G. 2002. Oxidative stress responses-what genome-scale studies taught us? *Genome Biology*, 3(7), 1019.1-1019.6.
- Sen, A. and Alikamanoğlu, S. 2013. Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. *Plant*, 49, 396–404.
- Seniz, V. 1992. *Domates, Biber ve Patlıcan Yetistiriciligi*. Uludag Üniversitesi Ziraat Fakültesi TAV Yayınları, 26, 174 s. Yalova.
- Sergio, L., De Paola, A., Cantore, V., Pieralice, M., Cascarano, N.A., Bianco, V.V. and Di Venere, D. 2012. Effect of salt stress on growth parameters, enzymatic antioxidant system, and lipid peroxidation in wild chicory (*Cichorium intybus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6), 2349-2358.
- Shalata, A., and Tal, M. 1998. The effects of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 104(2), 169–174.

- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. and Tal, M., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physologia Plantarum*, 112(4), 487–494.
- Shim, I. S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. W. and Usui, K. 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 39, 285-292.
- Sikha, S., Sunil, P., Arti, J. and Sujata, B. 2013. Impact of Water-deficit and Salinity stress on Seed Germination and Seedling Growth of *Capsicum annuum* ‘Solan Bharpur’. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(8), 9-15.
- Sinha, S., Saxena, R. and Singh, S. 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 58, 595–604.
- Sinha, S. and Saxena, R. 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62, 1340–1350.
- Sivritepe, N. ve Eriş, A. 1996 a. Tuz stresi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12, 209-222.
- Sivritepe, N. ve Eriş, A. 1996 b. Bitkilerde tuza dayanım mekanizması, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12, 223-234.
- Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *The New Phytologist*, 125, 27–58.
- Taban, S. and Katkat, A. V., 2000. Effect of Salt Stress on Growth and Mineral Elements Concentrations in Shoot and Root of Maize Plant. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 6(2), 119-122.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, p. 104.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, 3th Edition. Sinauer Associates, Inc., 602-611. Sunderland.
- Takemura, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z. and Karube, I. 2002. Molecular characterization and response to salt stress of mRNAs encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and catalase from *Bruguiera gymnorhiza*. *Trees*, 16, 94–99.
- Thomas, J. A. 1999. Including Glutathione, a Peptide for Cellular Defense Against Oxidative Stress. Department Of Biochemistry And Biophysics, Iowa State University, Ames, Ia. 50011.

- Turhan, H. ve Ekinci, H. 2005. PEG, NaCl ve kombinasyonlarının ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) bitki çıkışı ve fide gelişimi üzerine etkisi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Antalya (Araştırma Sunusu Cilt I, s. 35-40).
- Uzan, M. 2000. Medulla Spinalis Yaralanmalarında Fizyopatoloji, in Hancı M; Medulla Spinalis Yaralanmaları, 152-161.
- Uzun, F.G., Demir, F., Kalender, S., Baş, H. and Kalender, Y. 2010. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. Food and Chemical Toxicology, 48, 1714-1720.
- Voronin, P.Y., Rakhmankulova, Z.F., Maevskaya, S.N., Nikolaeva, M. K. and Shuiskaya, E.V., 2014. Changes in photosynthesis caused by adaptation of maize seedlings to short-term drought. Russian Journal of Plant Physiology, 61(1), 131–135.
- Walton, D. C. 1980. Biochemistry and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology, 31, 453-489.
- Wang, Z. L., Li, H. P., Fredricksen, M., Gong, Z. Z., Kim, C. S. and Zhang, C. Q. 2004. Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt tolerance. Plant Science, 166, 609–616.
- Weinberger, B., Anwar, M., Henien, S., Sosnovsky, A., Hiatt, M., Jochnowitz, N., Witz, G. and Hegyi, T. 2004. Association of lipid peroxidation with antenatal betamethasone and oxygen radical disorders in preterm infants. Biology of the Neonate, 85(2), 121-7.
- Willekens, H., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inz'e, D., and Van Camp, W. 1994. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). FEBS Letters, 352, 79–83.
- Willekens, H., Mol. Breed Inz'e, D., Van Montagu, M., and Van Camp, W. 1995. Catalase in plants. Molecular Breeding: new strategies in plant improvement, 1, 207–228.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C. and Van Montagu, M. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. The EMBO Journal, 16, 4806-4816.
- Wu, D., Cederbaum, A. I. 2003. Alcohol, Oksidative Stress and Free Radical Damage. Alcohol Research & Health, 27(4), 277-284.
- Xiong, L., and Zhu, J. K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant, Cell & Environment, 25, 131–139.

- Xu, C. and Huang, B. 2010. Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1477–1485.
- Yaniv, Z. and Werker, E. 1983. Absorption and Secretion of Polyethylene Glycol by Solanaceous Plants. *Journal of Experimental Botany*, 34 (11), 1577-1584.
- Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C. and Kucukoduk, M. 2013. *Sphaerophysa kotschyana*, an endemic species from Central Anatolia: antioxidant system responses under salt stress. *Journal of Plant Research*, 126, 729–742.
- Yıldızıtugay, E., Özfidan Konakçı, C., Küçüködük, M. and Duran, Y. 2014. Modulation of osmotic adjustment and enzymatic antioxidant profiling in *Apera intermedia* exposed to salt stress. *Turkish Journal of Botany*, 38, 99-111.
- Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., and Davies, K. J. A. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 16330–16336.
- Zhang, M., Fang, Y., Ji, Y., Jiang, Z. and Wang., L. 2013. Effects of salt stress on ion content, antioxidant enzymes and protein profile in different tissues of *Broussonetia papyrifera*. *South African Journal of Botany*, 85, 1–9.
- Zhu, J. K., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A. 1997. Molecular aspects of osmotic stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16, 253–277.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247–73.
- Zribi. L., Fatma, G., Fatma, R., Salwa, R., Hassan, N. and Nejib. R. M. 2009. Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato "*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)". *Scientia Horticulturae*, 120, 367-372.
- Zushi, K. ve Matsuzoe, N. 2009. Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Scientia Horticulture*, 120, 181-187.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyad : Esra GÖKÇE GÜNDÜZER

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 04.07.1984

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Gölbaşı Anadolu Lisesi (2002)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2003)

Bütüneştirilmiş Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji, A. B. D.
(Eylül 2007 – Ocak 2015)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar

Gazi Üniversitesi, Uzman, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2010 – Devam.

Gazi Üniversitesi, Uzman, Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
(Görevlendirme), 2010 –2013.

Gazi Üniversitesi, Uzman, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi
(Görevlendirme), 2013 – Devam.

Yayınları (SCI ve diğer)

Uluslar arası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Soydam Aydın, S., **Gokce, E.**, Büyük, İ., Aras, S. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters, Mutation Research, 746(1): 49 – 55 (2012).
2. Aras, S. Beyaztaş, T., Cansaran-Duman, D., **Gökçe-Gündüzer, E.** Evaluation of genotoxicity of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf by RAPD analysis. Genetics and Molecular Research, 10(4): 3760-3770 (2011).

Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Soydam Aydın, S., **Gokce, E.**, Aras, S. Relationship among lipid peroxidation, enzyme activity and gene expression profiles of superoxide dismutase in *Solanum lycopersicum* L. Exposed to cold stres. Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium 12-14 April 2012, Kayseri, Turkey.
2. **Gokce, E.**, Soydam, S., Aydın, Aras, S. Catalase gene expression profiles of *Solanum lycopersicum* L. under salinity and drought stres. Abstracts / Current Opinion in Biotechnology, G31, 22S (2011) S15–S152. European Biotechnology Congress, 2011, 28 September – 1 October, İstanbul, Turkey.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **Gündüzer Gökçe, E.**, Öner, Ö., Doğan Yiyit, S., Aslım, B. 2012. Geleneksel yöntemlerle üretilmiş peynirlerden izole edilen laktobasillerin tanımlanmasında moleküler ve biyokimyasal yöntemlerin karşılaştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
2. Aksoy, D., **Gökçe, E.**, Kılıç, Z., Binzet, R., Aras, S. Bazı Onosma türlerine ait yaprak örneklerinden ITS bölge dizi analizine uygun DNA izolasyon optimizasyonu. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, 28-31 Ekim 2009, İstanbul, Turkey.
3. Soydam Aydın, S., **Gökçe, E.**, Aras, S. Bamya (*Abelmoschus esculentus* L.) genetik yapısı üzerine kadmiyum (Cd) etkilerinin RAPD tekniği ile araştırılması. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, 28-31 Ekim 2009, İstanbul, Turkey.

Ödüller

1. Gazi Üniversitesi II. Bilim Şenliği Proje Pazarı Yarışması İkincilik Ödülü, 2014 (GAZITTO).