

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**DERİN EKİLEN BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN  
GÖVDE UZAMASINDA  
REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS) VE BAZI  
ANTİOKSİDANT ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Turgut Yiğit AKYOL**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 401.01.00**

**Sunuş Tarihi : 30.06.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**



Turgut Yiğit AKYOL tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Derin Ekilen Buğday Çeşitlerinin Gövde Uzamasında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Bazı Antioksidan Enzimlerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30.06.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı** : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN  
**Raportör Üye** : Doç. Dr. Hediye SEKMEN  
**Üye** : Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA

**İmza**

  
.....  
  
.....  
  
.....



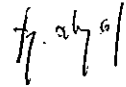
## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Derin Ekilen Buğday Çeşitlerinin Gövde Uzamasında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Bazı Antioksidant Enzimlerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30 / 06 / 2015

Turgut Yiğit AKYOL





**ÖZET****DERİN EKİLEN BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN GÖVDE  
UZAMASINDA REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS) VE BAZI  
ANTIOKSİDANT ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AKYOL, Turgut Yiğit

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Haziran 2015, 73 sayfa

Tahıl bitkileri yetiştirilirken tohumlar genellikle toprak yüzeyinin hemen altına ekilirler. Bununla birlikte, toprak üst katmanının yeterli derecede nemli olmadığı yarı kurak bölgelerde tahıl bitkileri derin ekim koşullarında yetiştirilebilir. Böylece tohumların çimlenmeleri için ihtiyaç duydukları suyu yer altı suyuyla nemlenmiş topraktan almaları sağlanır. Derin ekim koşullarında yetiştirilecek bitkinin derin ekim toleransına sahip olması gerekmektedir. Buğdayda derin ekim toleransı birinci internodyum uzaması aracılığıyla sağlanır. Birinci internodyum uzaması ile giberellinin ilişkisi üzerine çeşitli çalışmalar gerçekleştirildiyse de, bugüne kadar birinci internodyum uzaması ile ROS molekülleri arasındaki potansiyel ilişkiye dair herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bununla birlikte ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişiminde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda sunulan yüksek lisans tezinde, derin ekim toleransına sahip Tir buğdaylarına giberellin, uniconazole (GA biyosentez inhibitörü), potasyum ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış ve bitkiler normal ve derin ekim koşullarında yetiştirilmiştir. 7 günlük bitkiler hasat edilerek birinci internodyum, koleoptil ve sürgün uzunlukları ölçülmüş ve birinci internodyumların derin ekime yanıtı ve GA duyarlılığı belirlenmiştir. birinci internodyumlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesi, antioksidant enzimlerin aktiviteleri (SOD, POX, APX, GR) ve izoenzimleri, ROS üreten hücre duvarı POX ve NOX enzimlerinin aktiviteleri ve *Rht* genlerinin ifadeleri saptanarak, birinci internodyum uzamasında ROS, antioksidant enzimler ve GA arasındaki ilişki gösterilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Buğday, derin ekim, birinci internodyum, ROS, antioksidant sistem, giberellin



**ABSTRACT****INVESTIGATION OF THE ROLES OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND SOME ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE STEM ELONGATION OF DEEP SOWING WHEAT VARIETIES**

AKYOL, Turgut Yiğit

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

June 2015, 73 pages

Cultivation of grass plants is usually achieved by sowing the seeds just beneath the soil surface. However, in semi-arid regions, where the upper layer of the soil is not moist enough, the seeds can be sown deeper in the soil. Hence it is ensured the seeds can take up enough water for germination from the soil moistened by underground water. The cultivar that grown in deep sowing conditions should have deep sowing tolerance for a successful emergence. Deep sowing tolerance of wheat is established by first internode elongation. There are several studies that reveal the interaction between deep sowing tolerance of wheat and gibberellin, albeit there is no study that covers the potential roles of ROS molecules in first internode elongation. It is widely accepted ROS molecules critically involve in plant growth and development nevertheless. In this context, deep sowing tolerant Tir wheat seedlings were treated with GA, uniconazole (GA biosynthesis inhibitor), potassium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and were grown in both normal and deep sowing conditions. 7 day old seedlings were harvested; first internode, coleoptile and shoot lengths were measured and the GA sensitivity and the elongation response of the first internodes to deep sowing were determined. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, activities and isoenzymes of several antioxidant enzymes (SOD, POX, APX, GR), activities of ROS producing enzymes (cell wall POX and NOX) and expression of *Rht* genes in the first internodes were also ascertained. To sum up, in this thesis the interaction between GA, ROS and antioxidant enzymes in first internode elongation of Tir wheat is showed.

**Keywords:** Wheat, deep sowing, first internode, ROS, antioxidant system, gibberellin



## TEŞEKKÜR

Öncelikle, COST programı kapsamında 114Z034 numaralı proje aracılığıyla sunulan yüksek lisans tezini ve bursiyer olarak beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na çok teşekkür ederim. Ayrıca lisansüstü öğrenim sürecimde çalışmalarımı etkin bilgileri sayesinde tamamlayabildiğim; başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Doç Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN'e, Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Melike BOR'a ve Sayın Araş. Gör. Dr. Ali ÖZCAN'a; tüm çalışmalarında bana destek olan sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Rengin ÖZGÜR'e, Dr. Barış UZİLDAY'a, Uzm. Tolga YALÇINKAYA'ya, Uzm. Pelin YILDIZOĞLU'na, Uzm. Esra ÇANCIOĞLU'na, Uzm. Burcu ÇEBİ'ye, Azime GÖKÇE'ye, Gönül DÜNDAR'a ve Elif EKEROĞLU'na ve son olarak, tüm hatalarımı hoşgörüyü karşılayıp her zaman arkamda duran, annem Zerrin AKYOL'a, anneannem Nevin AKYOL'a ve ablam İpek AKYOL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xix
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Tahıl Bitkilerinde Derin Ekim Toleransı .....	3
1.1.1 Buğdayda birinci internodyum uzaması .....	5
1.2 ROS Molekülleri ve Antioksidant Mekanizma .....	8
1.2.1 ROS moleküllerinin biyokimyasal özellikleri .....	8
1.2.1 Bitki hücrelerindeki ROS kaynakları .....	9
1.2.3 Bitkilerde ROS detoksifikasyon mekanizmaları .....	12
1.3 ROS Moleküllerinin Bitki Büyüme ve Gelişimindeki Rolü .....	14
1.3.1 ROS ve uçtan büyüme .....	15
1.3.2 ROS moleküllerinin kinaz kaskadları ve iyon kanallarıyla ilişkisi .....	17
1.3.3 ROS moleküllerinin hücre duvarı üzerindeki etkileri .....	17

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
1.3.4 ROS, G-proteinleri ve uçtan büyüme.....	20
1.3.5 ROS ve kök uzaması.....	21
1.3.6 Ekstrasellüler ATP, ROS ve kök uzaması .....	23
2. MATERYAL VE METOT .....	25
2.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni .....	25
2.2 Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü .....	26
2.2.1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarının belirlenmesi.....	26
2.2.2 Antioksidant enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri .....	27
2.2.3 Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini .....	28
2.2.4 GA-insensitif ( <i>Rht</i> ) genlerinin ifadesi.....	29
3. BULGULAR .....	31
3.1 Birinci İnternodyum, Koleoptil ve Sürgün Uzunlukları .....	31
3.2 Biyokimyasal Parametreler .....	37
3.2.1 SOD aktivitesi ve izoenzimleri.....	37
3.2.2 POX aktivitesi ve izoenzimleri .....	38
3.2.3 APX aktivitesi .....	39
3.2.4 GR aktivitesi ve izoenzimleri.....	40

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.2.5 Hücre duvarı POX aktivitesi.....	41
3.2.6 NOX aktivitesi.....	42
3.2.7 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı .....	43
3.2.8 GA-insensitif ( <i>Rht</i> ) genlerinin ifadesi.....	43
4. TARTIŞMA.....	45
5. SONUÇLAR.....	53
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	73



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Buğday fidesinin kısımları .....	4
1.2 O <sub>2</sub> 'den ROS türevlenmesi .....	9
1.3 Bitkilerde çeşitli süreçlere katılan RBOH'lar.....	11
1.4 ROS ve antioksidant mekanizma.....	13
1.5 ROS moleküllerinin uçtan büyümedeki rolü .....	16
1.6 Uzayan kök tüylerinde ROS, Ca <sup>2+</sup> , hücre duvarı pH'si ve büyüme hızındaki dalgalanmalar.....	19
2.1 Deneme deseni şeması.....	25
2.2 7 günlük buğday fideleri (kontrol) .....	26
3.1 Kontrol, uniconazole (0.2 µM) ve GA gruplarında 2 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerin birinci internodyumları .....	31
3.2 Kontrol, GA ve uniconazole gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak birinci internodyum uzunluğundaki değişimi gösteren grafikler .....	32
3.3 Uniconazole gruplarında konsantrasyona bağlı olarak 2 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde birinci internodyum uzunluğundaki değişimleri gösteren grafikler .....	33
3.4 Kontrol, GA ve uniconazole gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak koleoptil uzunluğundaki değişimi gösteren grafikler .....	35
3.5 Farklı konsantrasyonlarda KCl ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış Tir buğdaylarında birinci internodyum uzunluklarındaki değişimi gösteren grafikler. ....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak SOD aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler ile kontrol ve GA gruplarında SOD izoenzimleri .....	38
3.7 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak POX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler ile kontrol ve GA gruplarında POX izoenzimleri .....	39
3.8 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak APX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler .....	40
3.9 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak GR aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler ile kontrol ve GA gruplarında GR izoenzimleri .....	41
3.10 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak hücre duvarı POX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler .....	42
3.11 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak NOX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler .....	42
3.12 Kontrol ve GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> seviyelerindeki değişimi gösteren grafikler .....	43
3.13 <i>Rht-A1</i> , <i>Rht-B1</i> ve <i>Rht-D1</i> genlerinde farklı gruplarda ifade değişimlerini gösteren grafikler .....	44

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Temel ROS süpürücü antioksidant enzimler .....	12
2.1 <i>Rht</i> genleri için primer listesi.....	30



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ABA	Absisik asit
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPI	Difenilyodonyum klorür
GA	Giberellin
GA <sub>3</sub>	Giberellin A <sub>3</sub>
GDP	Guanozin difosfat
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
MDHA	Monodehidroaskorbat

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NOX	NADPH oksidaz
POX	Peroksidaz
PRX	Peroksiredoksin
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
ROS	Reaktif oksijen türleri
RuBisCO	Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksigenaz
SOD	Süperoksit dismutaz

## 1. GİRİŞ

Kuraklık; tarım, su kaynakları ve çevre üzerinde yıkıcı etkilere sahip, en yaygın çevresel sınırlayıcılardan biridir (Sternberg, 2011). Küresel ısınmanın etkisiyle, bölgesel yağışların azalması ve buharlaşmanın artması sonucu, kuraklığın gelecekte daha da şiddetlenmesi beklenmektedir (Sheffield *et al.*, 2008; Dai, 2011). Kurak bölgelerde oldukça az miktarda yağış gerçekleştiği için kurak bölgeler, kuraklık stresinden özellikle etkilenmektedir (Sun *et al.*, 2006). Afrika, Güney Avrupa, Doğu ve Güney Asya ile Doğu Avustralya'daki kurumaya bağlı olarak 1970'lerden itibaren dünya genelinde kurak alanlarda önemli bir artış görülmektedir (Dai, 2011).

Kuraklık başta olmak üzere, abiyotik stres faktörlerinin tarımda verimliliği ciddi derecede düşürdüğü açıktır. Tarımda verimin ve sürdürülebilirliğin artırılması, artan dünya nüfusunun besin ihtiyacının karşılanabilmesi için oldukça önemlidir. Birleşmiş Milletler'in, 2014 yılında World Population Prospects (WPP) isimli bial yayınında belirtilen verilere göre, şu anda 7.2 milyar olan dünya nüfusunun, 2050 yılında 9.6 milyara, 2100 yılında ise 10.9 milyara ulaşabileceği saptanmıştır (Gerland *et al.*, 2014). Mahsül verimi üzerindeki çevresel faktörlerin sınırlayıcı etkileriyle birlikte, dünya nüfusundaki potansiyel artış da göz önünde bulundurulduğunda, gelecekteki olası besin güvenliği sorununun çözülebilmesi için tarımda stres faktörlerine toleranslı bitkilerin kullanımının yaygınlaşarak, verimin ve sürdürülebilirliğin artırılması sağlanmalıdır.

Tarımda toleranslı çeşitlerin kullanımı, aslında uzun yıllardır çiftçiler tarafından gerçekleştirilmektedir. Örneğin, yarı kurak alanlarda derin ekim toleransına sahip tahıl bitkileri kullanılmaktadır (Collins, 1914; Allan *et al.*, 1962; Takeda and Takahashi, 1999). Tahıl bitkileri yetiştirilirken tohumlar, genellikle toprak yüzeyinin hemen altına ekilse de, yarı kurak alanlarda toprağın en üst katmanı yeterince nemli olmadığı için bitkiler daha derine ekilir, böylece bitkilerin çimlenmeleri için ihtiyaç duydukları suyu yer altı suyuyla nemlenmiş topraktan almaları sağlanır. Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'nin güneybatısı ve Meksika'nın batı bölgelerinde 25-30 cm'lik toprak derinliğinden çıkabilen yerel bir mısır çeşidi yetiştirilmektedir (Collins, 1914; Troyer, 1997). Yarı kurak bir bölge olan Çin'in Loess Platosu'nda ise çiftçiler uzun yıllardır, derin ekim toleransına sahip yerel bir buğday çeşidi olan Hong Mang Mai'yi kullanmaktadır (Takeda and Takahashi, 1999). Hong Mang Mai'nin 18-20 cm'lik toprak derinliğinden birinci internodyum uzaması aracılığıyla çıkabildiği belirtilmiştir (Suge *et al.*, 1997).

Bugüne kadar, buğdayın derin ekim toleransı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular şöyle özetlenebilir: Hong Mang Mai'nin derin ekim toleransına koleoptil uzamasının herhangi bir katkısı olmadığı saptanmıştır (Suge *et al.*, 1997). Aynı çalışmada, etilenin birinci internodyum uzamasında görev aldığı belirtilse de, daha sonra etilenin üretimi ile derin ekime yanıt verme yeteneği arasında belirgin bir bağlantı olmadığı ve ekzojen GA<sub>3</sub> uygulamasının, birinci internodyum uzunluğunu artırdığı, ancak koleoptil uzunluğu üzerinde etkili olmadığı ifade edilmiştir (Nishizawa *et al.*, 2002). Ekzojen GA<sub>3</sub> uygulamasına Hong Mang Mai'nin sadece birinci internodyumun yanıt verdiğini ve endojen GA düzeyleri ile birinci internodyum uzunluğu arasında bağlantı bulunmadığı gösterilmiştir (Chen *et al.*, 2001). Daha sonra, Hong Mang Mai'de GA<sub>3</sub> ile uyarılmış birinci internodyum uzamasındaki artış, GA<sub>3</sub>'ün hücre duvarı esnekliğinde meydana getirdiği artışla açıklanmıştır (Chen *et al.*, 2003). Bu çalışmada glukanaaz gen ifadesinin Hong Mang Mai'de daha fazla olduğu ve GA<sub>3</sub> uygulamasıyla bu genin ifadesinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir. GA<sub>3</sub>'ün glukanaaz ifadesini etkileyerek hücre duvarındaki glukanaaz oranını düşürmesi hücre uzaması için gerekli olan hücre duvarı gevşemesine neden olmuştur. Son olarak, Hong Mang Mai'nin birinci internodyum uzama yeteneği hücre bölünmesiyle ilişkilendirilmiştir (Kato *et al.*, 2011). Ayrıca hücre genişlemesinin birinci internodyum uzamasında rol oynamadığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, ekzojen GA<sub>3</sub> uygulamasına Hong Mang Mai birinci internodyumundaki epidermis ve korteks hücrelerinin farklı yanıtlar verdikleri ortaya konmuştur. GA<sub>3</sub> uygulamasıyla epidermiste sadece hücre uzaması, kortekste ise sadece hücre çoğalması uyarılmıştır.

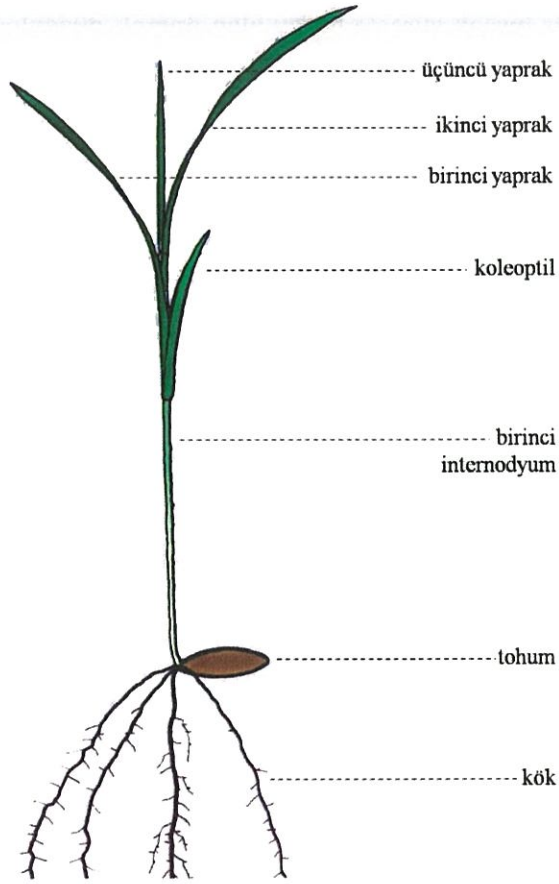
ROS molekülleri; proteinler, DNA ve lipitleri oksitleyerek hücresel zarara yol açan toksik moleküllerdir (Apel and Hirt, 2004). Bitkiler hücre içerisinde oluşan ROS moleküllerini detoksifiye etmek için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar üretmektedirler. AsA ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidantlar ve SOD, APX, CAT, GPX ve PRX gibi enzimatik antioksidantlar ROS detoksifikasyonunda rol almaktadırlar (Takahashi and Asada 1988; Mittler *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006; Türkan ve Demiral, 2009, Demiral *et al.*, 2011). ROS molekülleri, optimum büyüme koşullarında kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi organellerde ve apoplastta düşük düzeylerde üretilmektedir. Stres altında ise ROS üretiminde önemli bir artış görülmektedir. ROS moleküllerinin, bitkilerin biyotik ve abiyotik stres faktörlerinden korunabilmek için kullandığı süreçlerde kritik rollere sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Swanson and Gilroy, 2010). Ayrıca, ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişmesinde, hormonal sinyal iletiminden hücre duvarının polimer yapısının

modülasyonuna kadar birçok süreçte görev alan önemli düzenleyiciler oldukları da ortaya konmuştur (Potikha *et al.*, 1999; Schopfer, 2001; Pedreira *et al.*; 2004; Joo *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2009).

Bugüne kadar ROS moleküllerinin ve ROS süpüren enzimlerin, birinci internodyum uzamasındaki rolleri üzerine herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bununla birlikte, buğdayın derin ekim toleransı stratejisini oluşturan birinci internodyum uzamasındaki fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıtlarının bütünüyle anlaşılması, yukarıda da bahsedildiği üzere dünya genelinde kurak bölgelerdeki ve dünya nüfusundaki artış da düşünüldüğünde tarımda verimliliğin sürdürülebilir bir şekilde artırılabilmesi için oldukça önemlidir. Bu bağlamda, sunulan yüksek lisans tezinde, ROS ve ROS süpüren enzimlerin, Van'da tarımı yapılan ve 9 cm'lik derinlikten çıkabildiği belirtilen, derin ekim toleranslı *Triticum aestivum* cv. Tir buğdayının (Yagmur and Kaydan, 2009) birinci internodyum uzamasına katkısı belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulguların daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikle, tahıllarda derin ekim toleransı ve buğdayda birinci internodyum uzaması, bitkilerde ROS molekülleri ve antioksidant savunma mekanizması ile ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki rolleri detaylı bir şekilde anlatılacaktır.

### 1.1 Tahıl Bitkilerinde Derin Ekim Toleransı

Tahıl bitkileri, derin ekim adaptasyon stratejilerine göre üç sınıfa ayrılabilir. Mısır ve sorgum bitkileri derine ekildiklerinde, apikal meristemlerini toprak yüzeyine ulaştırabilmek için mezokotillerini uzatırlar. Bununla beraber, buğdayda, derin ekim koşullarında mezokotil uzaması görülmemektedir. Bunun yerine, buğdayda birinci internodyum uzaması gerçekleşmektedir (Şekil 1.1). Arpa ve pirinç bitkileri ise ara tür olup, derin ekim sonucunda hem mezokotillerini, hem de birinci internodyumlarını uzatırlar (Hoshikawa, 1969). Yani farklı tahıl türlerinin, derin ekim adaptasyonu için farklı fenotipik plastisiteye sahip olduğu söylenebilir (Suge *et al.*, 1997). Diğer bir deyişle, farklı tahıl türleri, farklı organlarının uzamasını sağlayarak, çimlenme sonrası sürgün apikal meristemlerini toprak yüzeyine ulaştırmayı başarırlar. Bitkilerin bu yeteneği derin ekim toleransı olarak adlandırılmaktadır (McCall, 1934; Hoshikawa, 1969).



Şekil 1.1. Buğday fidesinin kısımları. Tohum ile birinci nod arasında, koleoptilin altında yer alan birinci internodyumun uzaması aracılığıyla derin ekim toleransı oluşturulur (Hoshikawa'dan 1969).

Diğer taraftan, bazı yarı-sucul ve sucul bitkiler, su altından koleoptil, internodyum veya petiol uzaması aracılığıyla çıkabilmektedir (Ku *et al.*, 1970; Osborne, 1984; Jackson, 1985). Buğday çeşitleri arasındaki koleoptil uzunluğu varyasyonunun, fidelerin toprak yüzeyine çıkabilme yeteneğiyle uyumlu olduğunu belirten çalışmalar olsa da, bu çalışmalarda incelenen kültürler sayısı görece azdır (Schillinger *et al.*, 1998; Rebetzke *et al.*, 2005; Rebetzke *et al.*, 2007). Bununla birlikte, yakın zaman önce 662 buğday çeşidinin incelendiği çalışmada, koleoptil uzunluğunun buğdayın toprak yüzeyine çıkması için önemli olmadığı gösterilmiştir (Mohan *et al.*, 2013). Bahsedilen çalışmada, 9 cm'den daha uzun koleoptillerin, derine ekilen buğdayların toprak yüzeyine ulaşabilmelerini olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir. Ayrıca, derin ekim toleransına sahip Hong Mang Mai ile, derin ekim toleransı göstermeyen iki buğday çeşidi karşılaştırıldığında, bu üç çeşidin koleoptil uzunlukları arasında belirgin bir fark olmadığı ifade edilmiştir (Suge *et al.*, 1997). Sonuç olarak, koleoptil uzamasının buğdayın derin ekim toleransına katkısı tartışmalıdır.

### 1.1.1 Buğdayda birinci internodyum uzaması

Buğdayda birinci internodyum uzaması üzerine yapılan çalışmalarda genellikle Hong Mang Mai varyetesi kullanılmıştır. Bu bağlamda, buğdayın derin ekim toleransının anlaşılabilmesi için, Hong Mang Mai'ye dair çalışmalardan elde edilen bulgular verilecektir.

Suge *et al.* (1997), Hong Mang Mai fidelerinin derin ekim toleransı göstermeyen çeşitlere (Hope ve Norin 10) göre daha uzun birinci internodyumlara sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, ekim derinliği ile birinci internodyum uzunluğu arasında korelasyon saptayamamışlardır. En uzun birinci internodyum 8 cm'lik toprak derinliğinde elde edilmiştir. Aynı çalışmada üç buğday çeşidinin koleoptil uzunlukları arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır. Buna paralel olarak, Mohan *et al.* (2013), koleoptil uzamasının buğdayın derin ekim toleransına katkı sağlamadığını göstermişlerdir. Ayrıca Suge *et al.* (1997) tarafından, etilenin birinci internodyum uzamasında rol oynadığı öne sürülmüştür. Ancak Nishizawa *et al.* (2002), etilen üretimi ve etilen reseptörü ifadesiyle farklı buğday varyetelerinin derin ekime yanıt verme yeteneği arasında bağlantı olmadığını ifade etmişlerdir. Aynı çalışmada bitkilere farklı GA formları uygulanarak, GA<sub>3</sub>'ün birinci internodyum uzamasını önemli derecede indüklediği, koleoptil uzunluğunu ise etkilemediği belirtilmiştir. Diğer taraftan, yüksek dozda K<sup>+</sup> uygulamasının Hong Mang Mai'nin birinci internodyum uzamasını önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. Bu bulgu, Chen *et al.* (2001) tarafından da desteklenmiştir. Buğdayda, kuraklık stresine karşı oluşturulan ozmoregülasyon yanıtında K<sup>+</sup> önemli rol oynamaktadır (Morgan, 1992). Ayrıca farklı bitki türlerinde, GA aracılığıyla indüklenen uzama sürecine K<sup>+</sup> iyonunun katkı sağladığı bilinmektedir (Purves, 1966; Kawasaki *et al.*, 1978; De La Guardia and Benlloch, 1980). Bu bağlamda Nishizawa *et al.* (2002), Hong Mang Mai'de GA aracılığıyla indüklenen birinci internodyum uzamasında K<sup>+</sup> iyonu gereksiniminin, kuraklığa karşı adaptif bir yanıt olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bazı buğday varyetelerinde, ekzojen GA uygulaması aracılığıyla tüm sürgün uzunluğu artırılabilir (Radley, 1970). Bununla birlikte Chen *et al.* (2001), ekzojen GA<sub>3</sub> uygulamasına Hong Mang Mai'de sadece birinci internodyumun yanıt verdiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, GA<sub>3</sub> uygulanmış Hong Mang Mai'lerde birinci internodyumların 45 cm'ye kadar uzayabildiği, diğer varyetelerin (Hope, Norin 10, Norin 58, ve Norin 63) birinci internodyumlarının ise GA<sub>3</sub>'e yanıt vermediği saptanmıştır. Çalışmada ayrıca, endojen GA düzeyleri

ile birinci internodyum uzunluğu arasında bağlantı bulunmadığı öne sürülmüştür. Bu bulguya göre, Hong Mang Mai'de GA duyarlılığının, diğer varyetelere göre çok daha fazla olduğunu söylenebilir. Buna paralel olarak, ekzojen GA<sub>3</sub> uygulanmış Hong Mang Mai'de, GA aracılığıyla indüklenabilen genler için transkripsiyon faktörü olan *GAMYb*'nin gen ifade seviyeleri önemli derecede artmıştır. Hatta *GAMYb* ifadesindeki bu artışa 7 günlük fidelerin sadece birinci internodyumunda rastlanmış, yapraklarda ve koleoptilde herhangi bir artış saptanamamıştır. Bütün bu anlatılanlara göre, GA duyarlı buğdaylarda, birinci internodyum uzamasıyla diğer bitki kısımlarının uzama mekanizmalarının farklılık gösterdiği yorumu yapılabilir. Son olarak, Hong Mang Mai'lere uniconazole (GA biyosentezi inhibitörü) ve K<sup>+</sup> birlikte uygulandığında, K<sup>+</sup> iyonunun birinci internodyum uzamasını indükleyici etkisinin kaybolduğu saptanmış ve K<sup>+</sup> iyonunun, birinci internodyum uzamasını endojen GA ile birlikte iş görerek uyardığı öne sürülmüştür.

Chen *et al.* (2003) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, Hong Mang Mai'de GA<sub>3</sub> uygulamasıyla uyarılmış birinci internodyum uzamasıyla hücre duvarı esnekliği arasında korelasyon olduğu öne sürülmüştür. Hatta GA<sub>3</sub> uygulanmadığında bile, Hong Mang Mai'deki hücre duvarı esnekliğinin GA'ya duyarlı olmayan varyeteye (Norin 10) göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, hücre duvarı esnekliği ile otoliz, glukanaz aktivitesi ve glukan içeriği parametrelerinin uyum gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada glukanaz gen ifadesinin Hong Mang Mai'de daha fazla olduğu ve GA<sub>3</sub> uygulamasıyla genin ifadesinde artış gözleendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak GA<sub>3</sub>'ün glukanaz ifadesini etkileyerek hücre duvarındaki glukan oranını düşürmesi, hücre duvarı gevşemesine sebebiyet vererek, hücre genişlemesine yol açmaktadır. Buna paralel olarak; Lee and Kende (2002), Ogawa *et al.* (2003), Jan *et al.* (2004), Gallego-Bartolomé (2011), Ribeiro *et al.* (2012) ve Park *et al.* (2013) gibi farklı grupların gerçekleştirdiği çalışmalarda GA'nın hücre duvarı gevşemesini ekspansinlerin ve ksiloglukan endotransglukosilaz/endohidrolaz (XTH)'ların ifadelerini artırarak sağladığını rapor etmişlerdir. Ogawa *et al.* (2003) ve Gallego-Bartolomé (2011) ayrıca GA'nın öksin biyosentezi ve iletimi ile ilişkili genlerin ifadelerini kontrol ederek de hücre genişlemesi sürecinde rol oynadığını ifade etmişlerdir.

Hong Mang Mai'nin derin ekim toleransı ile ilgili gerçekleştirilen son çalışma 2011 yılına aittir. İlgili çalışmada, Hong Mang Mai'de derin ekim toleransının aydınlatılabilmesi için, farklı buğday kültürlerinin birinci internodyumlarındaki hücre genişlemesi ve hücre çoğalması yeteneklerini

araştırılmıştır (Kato *et al.*, 2011). Bu çalışmada birinci internodyum uzama yeteneği hücre bölünmesiyle ilişkilendirilerek, hücre genişlemesinin bu süreçte rol oynamadığı ifade edilmiştir. Hong Mang Mai birinci internodyumundaki epidermis ve korteks hücre sayılarının diğer kültürarlara (Hope ve Norin 10) göre daha fazla olduğu ve ekzojen GA<sub>3</sub> uygulamasına Hong Mang Mai birinci internodyumundaki epidermis ve korteks hücrelerinin farklı yanıtlar verdikleri ortaya konmuştur. GA<sub>3</sub> uygulamasıyla epidermiste sadece hücre uzaması, kortekste ise sadece hücre çoğalması uyarılmıştır. Dokuya özgü farklı GA<sub>3</sub> yanıtları sadece Hong Mang Mai birinci internodyumunda değil, diğer kültürarlarda da saptanmıştır, fakat Hong Mang Mai'de bu fark çok daha belirgindir. Bu bulgulara ilave olarak Nelissen *et al.* (2012) mısırdaki GA biyosentezinden sorumlu *AtGA20OX1* geninin aşırı ifadesi sonucu internodyumda hücre genişlemesinin, yapraklarda ise hücre çoğalmasının artış gösterdiğini saptamıştır. Bunun yanında Gonzalez *et al.* (2010), *Arabidopsis thaliana*'da aynı genin aşırı ifadesinin yapraklarda hem hücre çoğalmasını hem de hücre genişlemesini uyardığını bulmuşlardır. Buna göre organ büyümesini yürüten iki sürecin, yani hücre çoğalması ve hücre genişlemesinin GA aracılığıyla uyarımlarının dokuya, organa ve türe özgü olarak değişim gösterdiği söylenebilir.

Sonuç olarak, buğdayın derin ekim toleransı ile ilgili bildiklerimizi şöyle özetleyebiliriz: Derin ekim toleransına sahip Hong Mang Mai fidelerinin birinci internodyumlarında endojen GA seviyeleri ile toleransa sahip olmayan varyetelerinkiler arasında fark bulunmasa da; Hong Mang Mai'nin GA duyarlılığı, diğer buğday varyetelerine göre çok daha fazladır ve GA uygulanan Hong Mang Mai birinci internodyumları 45 cm'ye kadar uzayabilmektedir. Ayrıca K<sup>+</sup> birinci internodyum uzamasına katkı sağlamaktadır. Hong Mang Mai birinci internodyumlarında hücre duvarı esnekliğinin diğer varyetelere göre daha fazladır, ayrıca hücre duvarı esnekliği GA uygulamasıyla artmaktadır. Diğer taraftan birinci internodyum uzamasında, GA'ya yanıt olarak epidermiste hücre uzaması, kortekste ise hücre çoğalmasının uyarıldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, tüm bu kapsamlı çalışmalara rağmen buğdayda derin ekim toleransı tam olarak aydınlatılamamıştır. Diğer taraftan, bitki büyüme ve gelişmesinde, polen tübü büyümesi ve kök emici tüy uzaması gibi gibi çeşitli süreçlere dahil olduğu daha önce bir çok kez rapor edilen ROS moleküllerinin, birinci internodyum uzaması üzerindeki rollerinin belirlenebilmesi için herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi, ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki rollerine dair son yıllarda birçok çalışma gerçekleştirilmiş ve bu konuda çeşitli derlemeler yayımlanmıştır (Schopfer and

Liszkay, 2006; Gapper and Dolan, 2006; Swanson and Gilroy, 2010). Bu bağlamda, öncelikle ROS moleküllerinin özellikleri ve ROS moleküllerinin kontrolünden sorumlu antioksidant mekanizma açıklanacak, daha sonra da ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki rollerinden detaylı bir şekilde bahsedilecektir.

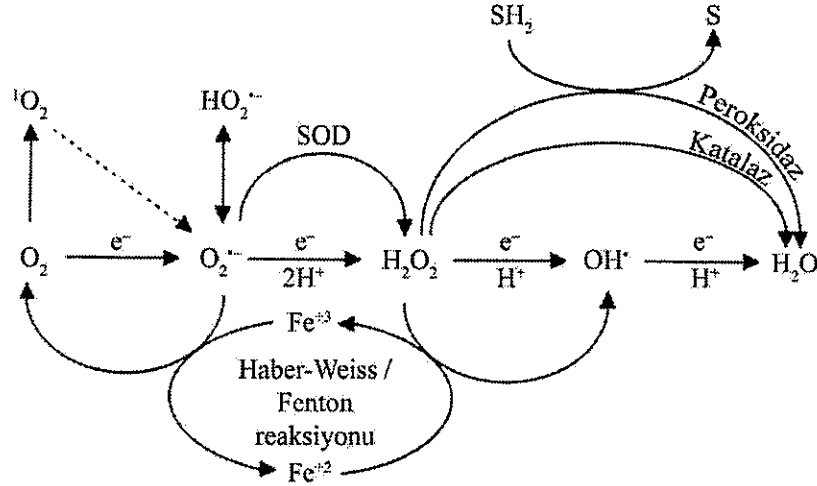
## 1.2 ROS Molekülleri ve Antioksidant Mekanizma

Solunum ve fotosentez gibi aerobik metabolik süreçlerin evrimi; hücrede mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda ROS üretimine neden olmuştur. ROS molekülleri protein, DNA ve lipidleri oksitleyerek hücrenel zararlara sebebiyet veren toksik moleküllerdir (Apel and Hirt, 2004). ROS molekülleri, sitotoksik özellikleri nedeniyle bitkilerde çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan detoksifikasyon mekanizmaları aracılığıyla süpürülmektedir. Giriş bölümünün bu kısmında bitkilerde ROS moleküllerinin üretimi, biyolojik etkileri ve fonksiyonlarıyla birlikte, ROS moleküllerinin detoksifikasyonundan sorumlu antioksidant sistem açıklanacaktır.

### 1.2.1 ROS moleküllerinin biyokimyasal özellikleri

Bitkiler, tüm aerobik organizmalar gibi, etkin bir enerji üretimi için oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Bununla birlikte,  $O_2$ 'nin  $H_2O$ 'ya indirgenme sürecinde ROS molekülleri oluşabilmektedir (Şekil 1.2). Reaksiyon zincirinin ilk basamağı için enerji girişi gerekirken, peşi sıra gelen basamaklar ekzotermiktir ve kendiliğinden gerçekleşmektedir (Dat *et al.*, 2000).  $O_2$ 'nin aşırı uyarımı,  $O_2$ 'ye göre oldukça reaktif bir molekül olan tekli oksijenin ( $^1O_2$ ) oluşmasına yol açmaktadır. Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) orta derecede reaktif bir moleküldür, yarı ömrü yaklaşık 2-4  $\mu s$ 'dir (Dat *et al.*, 2000).  $O_2^{\cdot-}$  biyolojik membranlardan geçemeyen bir moleküldür ve hızla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürülmektedir. Hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot-}$ ),  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin sulu çözeltilerde protonasyonu sonucu oluşur, biyolojik membranlardan geçebilir ve lipid oto-oksidasyonunu başlatabilir (Halliwell and Gutteridge, 1989).  $H_2O_2$  de orta derecede reaktiftir ve yarı ömrü 1 ms'dir, yani diğer ROS moleküllerine göre daha uzun ömürlü bir moleküldür; bu nedenle üretildiği bölgeden hücrenin diğer kısımlarına taşınabilmektedir (Dat *et al.*, 2000).  $H_2O_2$  enzimlerin tiyol gruplarını okside ederek enzim inaktivasyonuna sebebiyet verebilir. Örneğin, Calvin döngüsü enzimlerinden bakır/çinko SOD ile demir SOD  $H_2O_2$  tarafından inaktive edilmektedir (Bowler *et al.*, 1994; Charles and Halliwell, 1980). ROS molekülleri

içinde en reaktif ise,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den Haber-Weiss döngüsü veya Fenton reaksiyonları aracılığıyla oluşan hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) radikalidir (Halliwell and Gutteridge, 1989).  $\text{OH}^\bullet$  tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilme potansiyeline sahiptir ve hücrelerde  $\text{OH}^\bullet$  radikalini süpürebilecek herhangi bir enzimatik mekanizma bulunmadığı için, radikalın aşırı üretimi hücre ölümlerine yol açmaktadır.



Şekil 1.2.  $\text{O}_2$ 'den ROS türevlenmesi (Scheel and Wasternack'tan, 2002).

### 1.2.2 Bitki hücrelerindeki ROS kaynakları

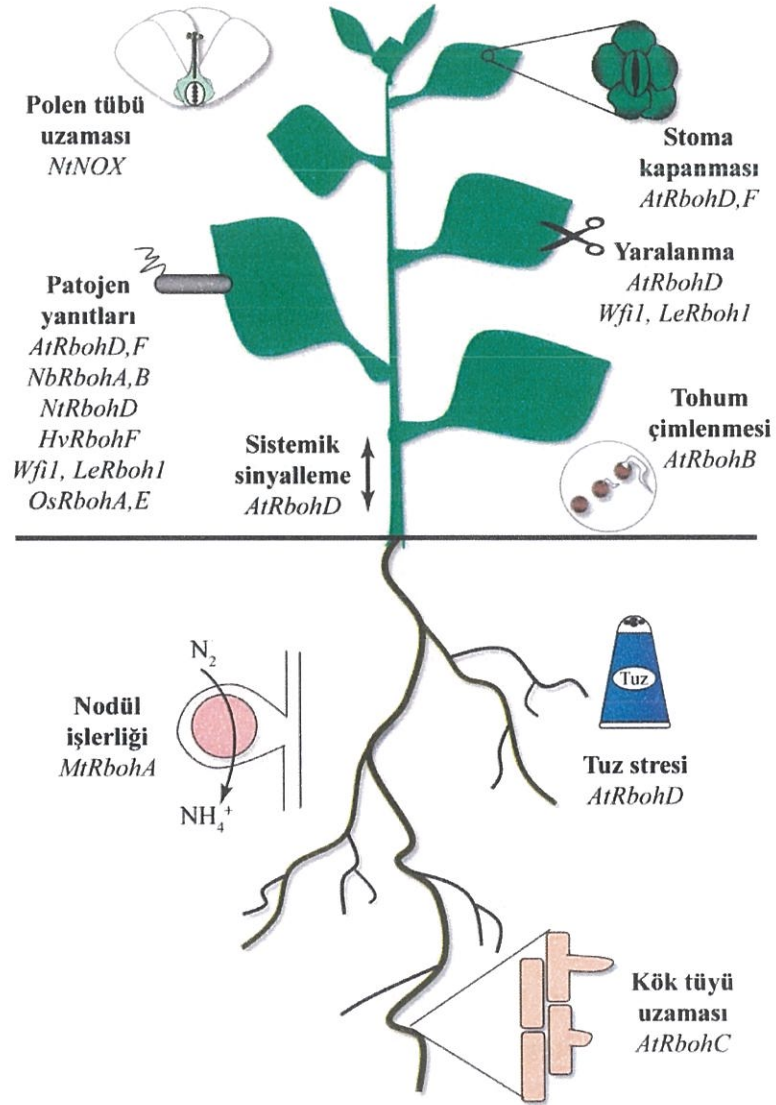
Hücrede organelerin çoğu ROS kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, bitkilerde en güçlü ROS kaynağının kloroplast olduğu düşünülmektedir. Işık enerjisi PSII ve PSI'deki anten kompleksi tarafından absorbe edilir ve elektron taşıma zinciri aracılığıyla son alıcıya, yani  $\text{NADP}^{+}$ 'ye iletilir.  $\text{NADPH}$  ise Calvin döngüsünde  $\text{CO}_2$ 'in indirgenmesinde kullanılır. Kuraklık, tuz stresi ve yüksek ya da düşük sıcaklık gibi  $\text{CO}_2$  fiksasyonunu sınırlayan faktörler, Calvin döngüsünde yeniden  $\text{NADP}^+$  oluşum oranını düşürerek fotosentetik elektron taşıma zincirinin aşırı indirgenmesine neden olur. Yüksek ışık koşullarında bu durum daha da şiddetlenir ve elektron taşıma zinciri bileşenlerinin oto-oksidasyonu sonucunda moleküler oksijen  $\text{O}_2$ 'den  $\text{O}_2^{\bullet-}$  radikaline indirgenir (Dat *et al.*, 2000). Ayrıca, fazla ışık eksitasyon enerjisi nedeniyle PSII veya PSI'de oluşan üçlü klorofil,  $\text{O}_2$ 'den  $^1\text{O}_2$  oluşmasına sebebiyet verebilir (Krause, 1994).  $\text{CO}_2$  fiksasyonunun sınırlı olduğu durumlarda elektron taşıma zincirinin aşırı indirgenerek kloroplastlardaki ROS oluşumunun engellenebilmesi için bitkilerde fotorespirasyon yolağı evrilmiştir (Kozaki and Takeba, 1996). Fotorespirasyon sırasında RuBisCO'nun oksijenaz aktivitesi aracılığıyla üretilen fosfoglikolat çeşitli hücre bölmelerinde metabolize edilir ve Calvin döngüsünün

sürdürülmesini ve  $\text{NADP}^+$ 'nin yeniden oluşumunu sağlayan fosfogliserat ve  $\text{CO}_2$  molekülleri oluşturulur (Kozaki and Takeba, 1996; Siedow and Day, 2000). Fotorespirasyon yolağının bileşenlerinden biri diğeri olan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroksizomlarda glikolatın gliksilata dönüşümü sırasında açığa çıkar (Siedow and Day, 2000).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ayrıca peroksizomlarda lipid katabolizması sırasında, yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunda yan ürün olarak da üretilebilir (Somerville *et al.*, 2000). Peroksizomlarda ayrıca pürin katabolizması da meydana gelmektedir (del Río *et al.*, 1998). Pürin katabolizması zincirinin ilk reaksiyonunda ksantin oksidaz aracılığıyla ksantin ürik aside okside olarak ve  $\text{O}_2^-$  açığa çıkmaktadır. İkinci basamakta ise ürik asidin allantoin oksidasyonu ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{CO}_2$  oluşmaktadır.

Bitkilerde önemli ROS kaynaklarından bir diğeri de mitokondridir (Rasmusson *et al.*, 2004). Bitkilerde stres maruziyeti sonucunda büyüme ya da diğeri enerji gerektiren süreçler yavaşladığında veya tamamen durduğunda, mitokondrideki elektron taşıma zinciri aşırı indirgenebilir ve sonuç olarak  $\text{O}_2^-$  açığa çıkar (Purvis and Shewfelt, 1993). Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde kompleks I ve III en bilinen  $\text{O}_2^-$  üretim bölgeleridir. Üretilen  $\text{O}_2^-$  SOD tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye indirgenir. Mitokondriyal  $\text{O}_2$  tüketiminin yaklaşık % 1-5 oranında bir kısmının  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimine yol açtığı belirtilmektedir (Moller, 2001).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ise indirgenmiş  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^+$  ile reaksiyona girerek yüksek derecede toksik bir molekül olan  $\text{OH}^\cdot$  radikalinin açığa çıkmasına neden olmaktadır.

ROS molekülleri önemli sinyal molekülleri oldukları için, sadece diğeri hücrel süreçlerin yan ürünü olarak açığa çıkmazlar, ayrıca bağımsız olarak enzimatik kompleksler tarafından da üretilirler. Plazma membranında bulunan NOX, ROS üreten enzimler içerisinde üzerinde en çok çalışmış olanıdır (Marino *et al.*, 2012). Bitki NOX'ları, "respiratory burst oxidase homologues" (RBOH'lar) olarak da bilinmektedirler ve memeli fagosit NOX'larının katalitik alt birimlerine ( $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ) homologdurlar (Sagi and Fluhr, 2006). NADPH, sitosolik elektron vericisi olarak iş görerek ekstraselüler  $\text{O}_2$ 'yi FAD ve iki bağımsız hem aracılığıyla  $\text{O}_2^-$  anyonuna indirger (Sagi and Fluhr, 2006).  $\text{O}_2^-$  plazma membranının dış yüzeyinde birikir ve daha sonra SOD aracılığıyla hızla  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dönüştürülür (Lamb and Dixon, 1997). Son yıllarda, RBOH'ların birçok bitki sürecinde önemli görevlere sahip olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yayımlanmıştır (Marino *et al.*, 2012) (Şekil 1.3). NOX'a ilave olarak, pH-bağımlı hücre duvarı peroksidazları, okzalit oksidazlar ve amin oksidazlar da apoplastta  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimine yol açan diğeri enzimler olarak sayılabilir (Bolwell and Wojtaszek, 1997). pH-bağımlı hücre duvarı peroksidazları alkalın pH ile aktive olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$

oluşumuna sebebiyet verebilir. Elisitör tanınmasını takiben apoplastın alkalizasyonu sonrasında pH bağımlı peroksidazlar tarafından  $H_2O_2$  oluşturulmasının biyotik stres sırasında alternatif bir ROS üretim yolu olduğu belirtilmektedir (Wojtaszek, 1997; Bolwell and Wojtaszek, 1997). Okzalit oksidaz, okzalitin  $CO_2$  ve  $H_2O_2$ 'ye dönüşümünü katalizler ve enzimin çeşitli bitki-patojen etkileşimleri için önemli olduğu bilinmektedir (Bolwell and Wojtaszek, 1997). Amin oksidazlar ise aminlerin, karşılık gelen aldehitlerine oksidasyonunu katalizleyerek  $NH_3$  ve  $H_2O_2$ 'nin açığa çıkmasına aracılık eder (Bolwell and Wojtaszek, 1997). Aminlerin oksidasyonu sonucunda açığa çıkan  $H_2O_2$  hücre duvarı peroksidazları tarafından büyüme sürecinde ya da yaralanma ve patojenez gibi dış etkenlere yanıt olarak lignifikasyon ve hücre duvarı güçlenmesinde kullanılabilir (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Allan and Fluhr, 1997).



Şekil 1.3. Bitkilerde çeşitli süreçlere katılan RBOH'lar (Marino *et al.*'dan 2012).

### 1.2.3 Bitkilerde ROS detoksifikasyon mekanizmaları

Bitkilerde yüksek/düşük sıcaklık, ağır metal stresi, kuraklık, tuz stresi, besin yetersizliği veya hava kirliliği gibi elverişsiz çevresel koşullar veya patojen saldırıları gibi biyotik stres faktörleri sonucunda ROS ( $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^{\cdot}$ ) üretimi artmaktadır. Bitkilerde bu toksik moleküllere karşı kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi çeşitli organellerde antioksidant savunma sistemleri devreye girmektedir. Hücrenel antioksidant savunma mekanizmasının uyarımının, bitkilerin stres faktörlerine karşı kendilerini koruyabilmelerindeki önemini gösteren çok sayıda çalışma yayımlanmıştır. Antioksidant savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlere sahiptir. Enzimatik antioksidantlar için SOD, CAT, APX, GPX, MDHAR, DHAR ve GR (Çizelge 1.1); enzimatik olmayan antioksidantlar için ise GSH, AsA, karotenoidler ve tokoferoller sayılabilir (Mittler *et al.*, 2004).

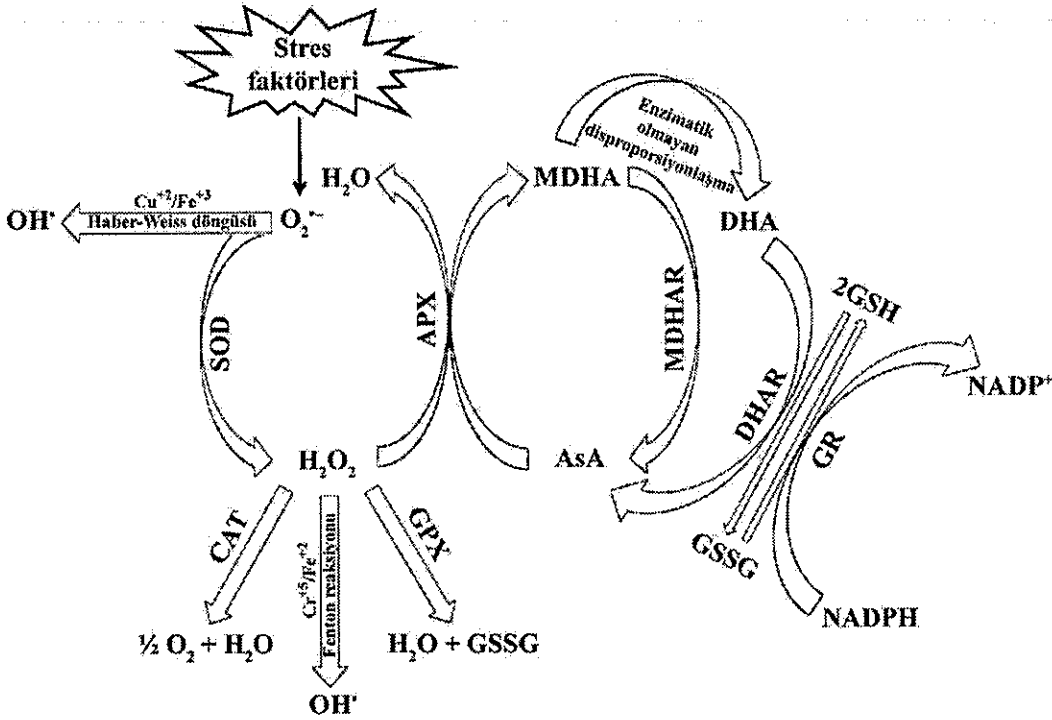
Çizelge 1.1 Temel ROS süpürücü antioksidant enzimler (Gill and Tuteja'dan 2010).

Enzimatik antioksidantlar	Enzim kodu	Katalizlenen reaksiyon
<b>SOD</b>	EC 1.15.1.1	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
<b>CAT</b>	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
<b>APX</b>	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AsA \rightarrow 2H_2O + DHA$
<b>GPX</b>	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
<b>MDHAR</b>	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AsA + NAD(P)^+$
<b>DHAR</b>	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AsA + GSSG$
<b>GR</b>	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

SOD,  $O_2^{\cdot-}$  anyonunun  $H_2O_2$ 'ye dönüşümünü katalizlemektedir. SOD'lar; kloroplast, mitokondri ve sitosol gibi  $O_2^{\cdot-}$  üretiminin yoğun derecede gerçekleştiği organellerde bulunmaktadır. SOD'ların ayrıca peroksizomal, nükleer ve ekstraselüler izoformları da rapor edilmiştir (Bowler *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*,

1996).  $H_2O_2$  ise CAT'lar ve POX'lar aracılığıyla indirgenmektedir. POX  $H_2O_2$ 'yi indirgeyebilmek için bir substrata ihtiyaç duyar. APX için bu substrat AsA'dır. AsA'nın yeniden oluşumu MDHAR veya GSH'yi indirgen substrat olarak kullanan DHAR aracılığıyla sağlanır. Oluşan GSSG NADPH'nin yardımıyla ve GR aracılığıyla GSH'ye indirgenir. Bu indirgenme/yükseltgenme reaksiyonları döngüsü askorbat-glutasyon döngüsü olarak adlandırılmaktadır. Askorbat-glutasyon döngüsü kloroplastlarda, sitosolde ve peroksizomlarda iş görmektedir. GPX ise GSH'yi indirgeyici olarak kullanarak, oksidatif stres nedeniyle gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan lipid hidroperoksitleri indirger. CAT'lar peroksizomda bulunmaktadır; fotorespirasyon ve yağ asidi ile pürin katabolizması sırasında oluşan  $H_2O_2$ 'yi parçalamaktadırlar. Okside proteinler hücrede tiyoredoksin peroksidazlar aracılığıyla ve tiyoredoksin [Trx-(SH)<sub>2</sub>] indirgen olarak kullanılarak indirgenmektedir. Okside tiyoredoksin (Trx-S-S) daha sonra tiyoredoksin redüktazlar aracılığıyla NADPH ve ferredoksin gibi substratların yardımıyla tekrar oluşturulur (Halliwell and Gutteridge, 1989).

ROS detoksifikasyonunda enzimatik olmayan antioksidantlar da iş görmektedir. AsA düzeyleri azaltılmış (Conklin *et al.*, 1996) ya da GSH içeriği değiştirilmiş (Creissen *et al.*, 1999) mutantların strese aşırı duyarlı oldukları bilinmektedir. Düşük veya yüksek sıcaklık, patojen saldırıları ve kuraklık gibi faktörlere yanıt olarak bitkilerde GSH biyosentezinden sorumlu enzimlerin aktiviteleri (Vanacker *et al.*, 2000; Vernoux *et al.*, 2002) ve GSH düzeyleri (Noctor *et al.*, 2002) artmaktadır. ROS süpürümü için indirgenmiş/yükseltgenmiş AsA ve GSH oranlarının yüksek olması gerekmektedir. Antioksidantların indirgenmiş halleri, daha öncede bahsedildiği üzere GR, MDHAR, DHAR ve NADPH aracılığıyla düzenlenmektedir (Tsugane *et al.*, 1999). Ayrıca farklı antioksidantlar arasındaki genel dengenin sıkı bir şekilde denetlenmesi gerekmektedir. Örneğin kloroplastlarında yüksek derecede GSH biyosentezi gerçekleşen hücrelerde oksidatif zarar görülmektedir (Cresissen *et al.*, 1999). Bitkilerdeki ROS detoksifikasyonunda flavonoidlerin ve  $\beta$ -karotenlerin katkısına dair fazla bulgu yoktur. Bununla birlikte, *A. thaliana*'da  $\beta$ -karoten hidrosilazın aşırı ifadesinin kloroplastta ksantofil düzeyinin artmasına yol açarak yüksek ışık nedeniyle oluşan oksidatif strese karşı oluşturulan toleransı artırdığı saptanmıştır (Davison *et al.*, 2002).



Şekil 1.4. ROS ve antioksidant mekanizma. SOD  $O_2^-$  iyonunu  $H_2O_2$ 'ye dönüştürür. CAT ise  $H_2O_2$ 'yi  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya parçalar. GPX,  $H_2O_2$ 'yi GSH yardımıyla suya indirger. Açığa çıkan GSSG, GR'nin katalizlediği ve NADPH'nin indirgen olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu tekrar GSH'ye dönüştürülür.  $H_2O_2$  suya ayrıca askorbat-glutasyon döngüsü aracılığıyla da indirgenir. APX tarafından katalizlenen birinci reaksiyonda indirgen olarak AsA görev almaktadır. APX AsA'yı MDHA'ya yükseltir. MDHAR ise NADPH'nin yardımıyla MDHA'yı AsA'ya indirger. DHA, MDHA'dan kendiliğinden oluşur ve DHAR tarafından AsA'ya indirgenir. Aynı reaksiyon sonucunda GSH de GSSG'ye yükseltir. Döngü GSSG'nin GSH'ye GR tarafından dönüştürülmesiyle son bulur. Son reaksiyonda indirgen olarak NADPH kullanılmaktadır. (Gill and Tuteja'dan 2010).

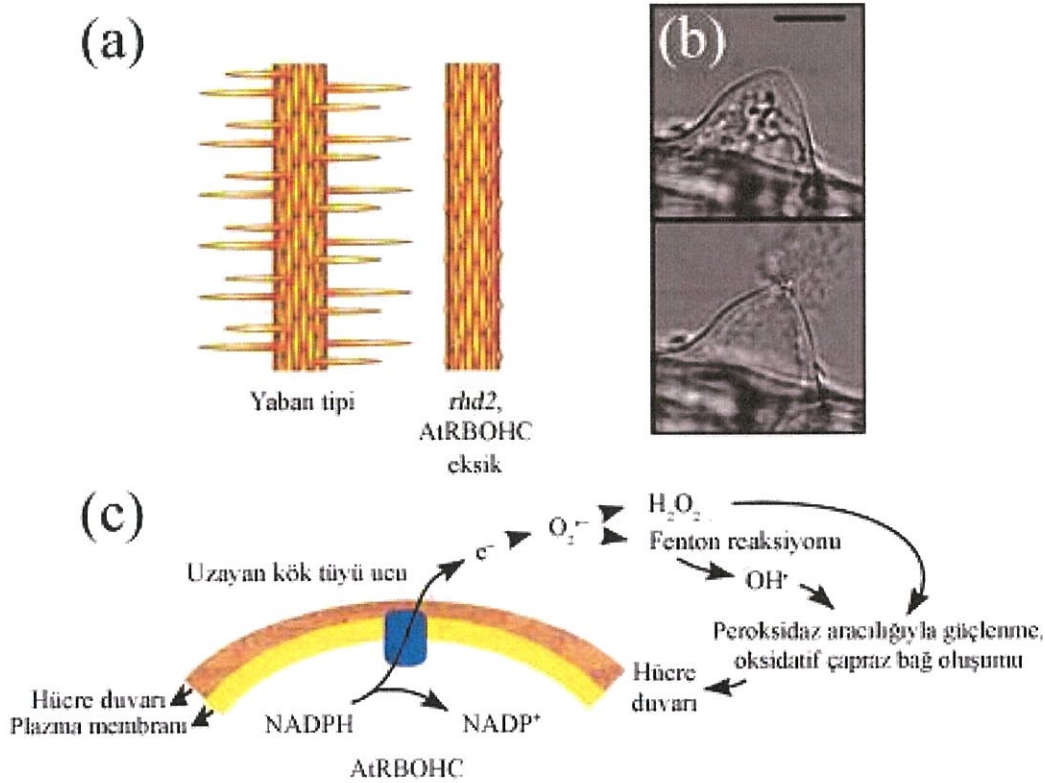
### 1.3 ROS Moleküllerinin Bitki Büyüme ve Gelişimindeki Rolü

ROS moleküllerinin bitkilerin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı geliştirdiği savunma süreçlerinde üstlendiği kritik roller yukarıda detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Bununla beraber, son yıllarda ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişiminde de önemli görevlere sahip olduğu ortaya konmuştur. ROS moleküllerinin, bitki gelişiminde hormonal sinyal iletiminden hücre duvarı polimer yapısının değişime kadar oldukça geniş bir görev aralığına sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Potikha *et al.*, 1999; Schopfer, 2001; Pedreira *et al.*, 2004; Joo *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2009). Bu bağlamda, giriş bölümünün bu kısmında ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimini nasıl etkilediğini aydınlatan son çalışmalardan derlenen bulgular verilecektir.

### 1.3.1 ROS ve uçtan büyüme

Öncelikle ROS moleküllerinin kök tüyü ve polen tübü hücrelerinde görülen uçtan büyüme sürecindeki düzenleyici görevleri üzerinde durulacaktır. Uçtan büyüme sonucunda, yeni hücre duvarı ve membranı bileşenlerinin uzayan hücrenin ucuna doğru birikmesiyle tüp benzeri yapılar oluşmaktadır. Hücre ucuna doğru artış gösteren sitosolik  $Ca^{2+}$  iyonunun, bu kutuplu sekresyonun organizasyonunda merkezi bir role sahip olduğu uzun süredir bilinmektedir. Artan  $Ca^{2+}$  düzeylerinin, bölgesel membran sekresyonu ve hücre bileşenlerinin düzenli bir şekilde katmanlaşması için gerekli olan hücre iskeleti organizasyonunu koordine ettiği düşünülmektedir (Cheung and Wu, 2008).  $Ca^{2+}$  gradiyenti ise hücrede kutuplu sekresyonu ve uçtan büyümeyi desteklemektedir. ROS moleküllerinin uçtan büyüme sürecindeki görevleri, *A. thaliana*'nın *root hair defective 2 (rhd2)* mutantları aracılığıyla saptanabilmiştir (Foreman *et al.*, 2003). *rhd2* mutantları kök tüylerinin gelişim sürecini başlatabilme yeteneğindedirler. Gelişen tüyler epidermal hücrelerin yanlarından çıkıntı benzeri yapılar oluştursa da uçtan büyümeye geçiş gerçekleşemez. *rhd2* mutantlarında neredeyse bütün kök tüylerinin patladığı görülmüştür (Şekil 1.5 a, b) (Macpherson *et al.*, 2008; Monshausen *et al.*, 2007). *rhd2* mutasyonunun çeşitli allelleri klonlandığında, mutasyonun "respiratory burst oxidase homolog C of *Arabidopsis*" (AtRBOHC)'yi kodlayan gende bulunduğu saptanmıştır. AtRBOHC, memeli NOX'unun gp91<sup>phox</sup> katalitik alt biriminin homologlarından birisidir. Daha önce de bahsedildiği gibi NOX'lar, sitosolik NADPH'yi okside eden plazma membranı enzimleridir, membran boyunca elektron transferini sağlayarak hücre duvarında  $O_2^{\cdot-}$  oluşumuna neden olurlar. Daha sonra  $O_2^{\cdot-}$  hızla  $H_2O_2$ 'ye dönüşür,  $H_2O_2$  tekrar hücre içine girer ve sitosolik düzenleyici olarak iş görür.  $O_2^{\cdot-}$ , hücre duvarında ayrıca OH<sup>•</sup> radikallerini de oluşturabilir (Şekil 1.5 c). DPI uygulanan *A. thaliana*'da da, aynı *rhd2* mutantı gibi kök tüyü oluşumu görülmemektedir. DPI, NOX gibi flavin içeren enzimlerin reaksiyon merkezlerine kovalent bağlanan bir inhibitördür (O'Donnell *et al.*, 1993). Bu bulgulara göre kök tüyü oluşumu sürecine ROS moleküllerinin rolü olduğu söylenebilir. AtRBOHC, kök tüyü başlangıç bölgesinde bulunan hücre membranlarında birikir (Takeda *et al.*, 2008). Bununla birlikte proteinin *rhd2* mutantının kök tüyü başlangıç sürecine katılım göstermediğinden yukarıda bahsedilmiştir. Kök tüyü uçtan büyüme safhasına geçtiğinde ise en fazla AtRBOHC birikimi, uzayan tüyün ucuna doğru görülmektedir. Büyüyen kök tüyü hücrelerinin uçlarında ROS düzeyleri, hücrenin diğer kısımlarına göre daha yüksektir. Bu bağlamda bölgesel ROS üretiminin kök tüyü büyüme mekanizmasına katıldığı söylenebilir.

Polen tübü uzaması da DPI uygulaması ya da NOX ifadelerinin baskılanması aracılığıyla inhibe edilebilir (Potocky *et al.*, 2007). Kök tüyü uzamasına benzer şekilde, bölgesel ROS üretimi polen tübü ucunda da gözlenmiştir (Potocky *et al.*, 2007). Uçtan büyümede NOX'ların görev aldığını gösteren diğer bir çalışmada, NAD(P)H düzeylerinin polen tüplerinin büyüme sürecinde inişli çıkışlı bir grafiğe sahip olduğu saptanmıştır (Cardenas *et al.*, 2006). Uçtan büyüyen hücreler de genellikle dalgalı bir büyüme hızı grafiğine sahiptir. Benzer şekilde, bir alg türü olan *Fucus serratus*'ta uçtan büyüyen rizoidlerde de uca doğru artan bir ROS ve  $Ca^{2+}$  gradiyentinin oluşarak büyüme yönünü belirlediği saptanmıştır (Coelho *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2008). Sonuç olarak ROS moleküllerinin kutuplu büyümenin düzenlenmesindeki rollerinin kök tüyleriyle sınırlı kalmadığı öne sürülebilir.



Şekil 1.5. ROS moleküllerinin uçtan büyümedeki rolü. (a) Yaban tipi *A. thaliana*'da kökün olgun bölgesinde bulunan kök tüyleri uzayabilirken AtRBOHC eksik *rhd2* mutantlarındaki kök tüyleri bunu başaramaz (Swanson and Gilroy'dan 2010). (b) *rhd2* mutantlarında başlangıç safhasından (üst) uzama safhasına (alt) geçen kök tüyleri. Düzgün bir şekilde iş görebilen AtRBOHC olmadan kök tüylerinin uçlarında hücre duvarı bütünlüğü sağlanamaz ve kök tüyleri patlar. Ölçek = 5  $\mu$ m, (Monshausen *et al.*'dan 2007). (c) AtRBOHC'nin kök tüylerindeki uçtan büyüme katılımını gösteren model (Swanson and Gilroy'dan 2010).

### 1.3.2 ROS moleküllerinin kinaz kaskadları ve iyon kanallarıyla ilişkisi

ROS moleküllerinin, “mitogen-activated protein kinase” (MAPK) kaskadları ve transkripsiyonel aktivite değişimleri gibi birçok hücresel süreci aktive ettiği bilinmektedir (Pitzschke *et al.*, 2009). Buna paralel olarak, *A. thaliana*'da bulunan MAPK 6'nın yonca homologu olan SIMK'in kök tüyü büyümesini düzenlediği bulunmuştur (Samaj *et al.*, 2002). Ayrıca, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen OXI1 serin/treonin protein kinazının kök tüylerinde ifade olduğu ve OXI1 mutantlarında kök tüyü uzamasının engellendiği görülmüştür (Anthony *et al.*, 2004; Rentel *et al.*, 2004). Bu bağlamda OXI1'in, ROS sinyallerinin hücre uzaması yanıtına dönüştürülmesinde iş gördüğü söylenebilir. Diğer taraftan, lipid fosfatidik asit aracılığıyla düzenlenen PDK1 protein kinazı OXI1'i aktive etmektedir (Anthony *et al.*, 2006). PTI1-2 protein kinazının ise OXI1 kinazının ileri yolaklarında iş gördüğü bilinmektedir. ROS sinyali PTI1-2'ye OXI1 aracılığıyla PDK-1'den bağımsız olarak etki ederken, lipid sinyalleri PTI1-2'ye PDK1/OXI1 kaskadı aracılığıyla etki eder (Anthony *et al.*, 2006). Literatürde lipid sinyalinin uçtan büyümenin düzenlenmesinde oynadığı rollere dair büyük miktarda veri bulunmaktadır (Lee and Yang, 2008). Sonuç olarak ROS ve yukarıda bahsedilen lipid sinyal sistemleri arasındaki etkileşimler, büyüme sürecinde iş gören sistemlerin ne denli bütünsel olduğunu gösterir niteliktedir.

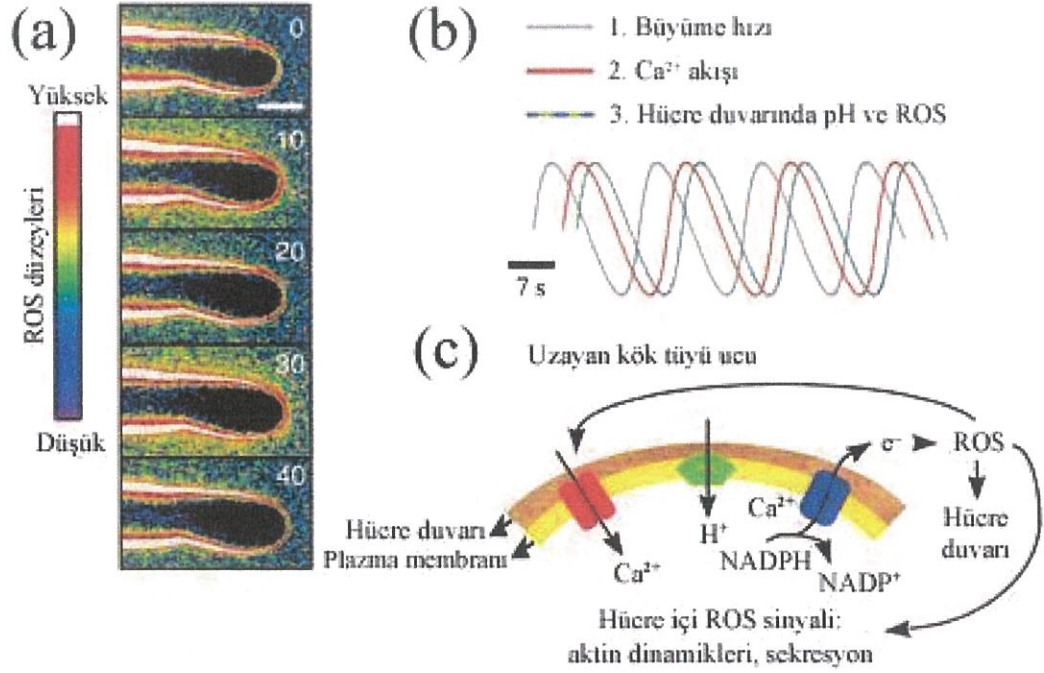
İyon kanalı aktivitesi de sitosolik ROS moleküllerinin ana hedeflerinden bir diğeridir (Demidchik *et al.*, 2003b, Mori and Schroeder, 2004). Apikal büyümenin düzenlenmesinde, uca doğru artış gösteren Ca<sup>2+</sup> gradiyentinin merkezi bir role sahiptir. Buna göre ROS moleküllerin uçtan büyümedeki düzenleyici görevlerinden birisi Ca<sup>2+</sup> kanalı aktivitesini ayarlamak olabilir. Buna paralel olarak, kök tüylerinden elde edilen protoplastlarda ROS-duyarlı ve Ca<sup>2+</sup>-geçirgen bir kanal tanımlanmıştır (Foreman *et al.*, 2003). *rhd2* mutantlarında da bu kanal bulunmasına rağmen, uç odaklı Ca<sup>2+</sup> gradiyenti oluşmaz. Bu bulgulara göre, AtRBOHC tarafından üretilen ROS moleküllerinin, kanal aktivitesinin bölgesel kontrolünü sağlayarak Ca<sup>2+</sup> gradiyenti oluşumuna sebebiyet verdiği öne sürülebilir.

### 1.3.3 ROS moleküllerinin hücre duvarı üzerindeki etkileri

NOX, sitosolik ROS değerlerini değiştirdiği gibi, direkt hücre duvarına O<sub>2</sub><sup>-</sup> salınımı yaparak (Şekil 1.5 c) hücre duvarı esnekliğini de etkilemektedir (Potikha

*et al.*, 1999; Schopfer *et al.*, 2001; Pedreira *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2009). Uçtan büyüme hücre iç turgor basıncı aracılığıyla yürütülen bir süreçtir. Hücrenin uzayabilmesi için, kök tüylerinin uç kısımlarında hücre duvarı gevşemesi gerçekleşerek hücre uzaması sağlanmalıdır. Bununla birlikte, kök tüyü uçlarının patlamaması için hücre duvarları yeterli derecede dayanıklı olmalıdır. Ayrıca, uç bölgesi haricindeki hücre duvarlarında çapraz bağlar oluşarak, genişleme uç bölgesiyle sınırlandırılmalıdır (Şekil 1.5 c). Yani hücre duvarı özellikleri uçtan büyüme için oldukça önemlidir. *rhd2* fenotiplerinde, başlangıç fazından uçtan büyüme safhasına geçiş anından az önce kök tüyü uçlarının patlaması (Şekil 1.5 a; Monshausen *et al.*, 2007), muhtemelen yukarıda bahsedilen genişleme ve duvar güçlenmesi arasındaki dengenin sağlanamamasından kaynaklanmaktadır. Gerçekten de, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması uçtan büyüme sürecini durdururken, ROS süpürümü kök tüyü uçlarının patlamasına sebebiyet vermektedir (Monshausen *et al.*, 2007). Büyüyen kök tüylerinde apoplasttaki O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalleri görüntülediğinde, yüzey boyunca O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretiminin gerçekleştiği fakat üretimin uzayan uca doğru azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, kök tüyü hücrelerinin uzayan uçları civarında dalgalı bir O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretimi gözlenmiştir (Şekil 1.6 a). Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, polen tüplerine benzer şekilde, kök tüylerinin de dalgalı büyüme gösterdiği saptanmıştır (Monshausen *et al.*, 2007, 2008). Bahsedilen dalgalı büyüme, hızlı ve hemen ardından gelen yavaş uzama periyodlarına sahiptir. *A. thaliana*'da, büyüme dalgası frekansının dakika başına 3 olduğu belirlenmiştir, buna paralel olarak ROS üretimi ve apikal Ca<sup>2+</sup> gradiyenti dalgaları da yaklaşık aynı frekanslara sahiptir (Monshausen *et al.*, 2008). Ayrıca, hızlı büyümenin 5. saniyesinde uç odaklı Ca<sup>2+</sup> gradiyentinde bir artış yaşandığı bulunmuş ve dalgalanmaların polen tüplerinde olduğu gibi mekano-duyarlı iyon kanalları tarafından düzenlendiği öne sürülmüştür (Messerli and Robinson, 2007). Ca<sup>2+</sup> gradiyenti maksimuma ulaştıktan 2 saniye sonra ise hücre duvarına doğru ROS üretimi başlamaktadır (Şekil 1.6 b). Böyle bir ROS üretiminin, polimerlerin kovalent çapraz bağ yaparak hücre duvarının güçlendirilmesine ve dolayısıyla hücrede diğer yönlere doğru gerçekleşebilecek genişlemenin ya da uç patlamasının önlenmesine aracılık ettiği söylenebilir (Monshausen and Gilroy 2009). Bununla birlikte, apoplastik ROS üretiminin uzama durduktan uzun süre sonra bile neden devam ettiği bilinmemektedir. Muhtemelen, ROS molekülleri büyüme kontrolünden başka süreçlerde de görev almaktadır. Subapikal apoplastik ROS üretimi hem yaban tipi bitkilerin hem de ortam pH'si yükseltilerek normal kök tüyü gelişimi göstermesi sağlanmış *rhd2-1* mutantlarının kök tüylerinde görülmektedir ve diğer NOX'lar, hücre duvarı POX'ları ve amin oksidazlar gibi

başka hücre duvarı ROS kaynaklarının aktivitesini işaret etmektedir (Passardi *et al.*, 2004; Torres and Dangl, 2005; Cona *et al.*, 2006).



Şekil 1.6. Uzayan kök tüylerinde ROS,  $Ca^{2+}$ , hücre duvarı pH'si ve büyüme hızındaki dalgalanmalar. (a) Büyüyen kök tüyünde zamana bağlı ROS değişimlerinin görüntülenmesi. Ekstrasellüler ROS seviyeleri dakikada yaklaşık 3 defa maksimum değere ulaşır. Şekilde süreler saniye cinsinden gösterilmiştir. Ölçek = 10  $\mu m$ , (Monshausen *et al.*'dan 2007). (b) Büyüyen kök tüylerinde büyüme hızı, hücre içine  $Ca^{2+}$  girişi ve hücre duvarında pH/ROS maksimum değerleri. Büyüme hızı maksimum seviyeye ulaştıktan 5 saniye sonra hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarı maksimum değerini alır, 2 saniye sonra da hücre duvarı pH/ROS değerleri maksimum seviyeye erişir (Monshausen *et al.*'dan 2008). (c) Uzayan kök tüyü ucunda gerçekleşen süreçleri anlatan model.  $Ca^{2+}$  iyonları mekanoduyarlı iyon kanalları (kırmızı) aracılığıyla hücre içine girer. Plazma membranlarında bulunan  $H^+$  taşıyıcıları (yeşil) aracılığıyla hücre içine  $H^+$  alınımı sağlanır. AtRBOHC (mavi) ile ROS üretimi gerçekleştirilir. Üretilen ROS daha sonra hücre duvarında çapraz bağların oluşumuna aracılık eder ve kök gelişiminde hücre içi sinyali olarak iş görür (Swanson and Gilroy'dan 2010).

ROS moleküllerinin hücre duvarı güçlenmesi ve büyüme sürecindeki işlevlerinin bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Buna göre uzayan uçlarda karmaşık bir geri besleme mekanizması öne sürülmüştür. Uçtan büyüyen hücrelerde NOX,  $Ca^{2+}$  bağlanması ve  $Ca^{2+}$  bağımlı protein kinaz aktivitesi aracılığıyla aktive olmaktadır (Ogasawara *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Yani sitoplazmada artış gösteren  $Ca^{2+}$  iyonları ROS üretimini uyarır, ROS molekülleri de bahsedildiği üzere  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivitesinde etkilidir (Şekil 1.6 c). Polen tüplerinde ise, ROS seviyeleri ortamdaki  $CaCl_2$  düzeyinin artırılması sonucunda

yükselmektedir, bu bulgu da  $Ca^{2+}$  alınımı ve ROS üretimi arasındaki bağı desteklemektedir (Potocky *et al.*, 2007).

### 1.3.4 ROS, G-proteinleri ve uçtan büyüme

Polen tüplerinde ve kök tüylerinde görülen uçtan büyüme ve ROS lokalizasyonunun, Rho sınıfı monomerik G-proteinleri (Rop'lar) ve GDP ayrılma inhibitörleri (RhoGDI'ler) ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. RhoGDI'lerin, G-proteinleri ile GDP'nin bağı olarak kalmasını sağlayarak, G-proteinlerini inaktif halde tuttuğu sanılmaktadır. Rop'lar uçtan büyüyen hücrelerin uçlarında konumlanarak apikal büyümenin düzenlenmesinde iş görürler (Lee and Yang, 2008). Örneğin Rop 2, 4 ve 6'nın konstitutif aktif mutantlarında kök tüyü uzunlukları artış göstermiştir. Kök tüylerinde ROP2'nin aşırı ifadesi, AtRBOHC aracılığıyla gerçekleşen ROS üretiminde artışa neden olurken, inaktif ROP2'nin ROS değerlerini aşağıya çektiği saptanmıştır (Jones *et al.*, 2007). Ayrıca pirinçte monomerik bir G-proteini olan OsRac1'in NOX'a *in vivo*'da  $Ca^{2+}$  iyonuna bağımlı bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir (Wong *et al.*, 2007). Aynı çalışmada, pirincin konstitutif aktif OsRac1 mutantlarında NOX B'nin aktive edildiği belirlenmiştir. Bu bulgular G-proteinlerinin ROS üretimi üzerindeki direkt etkilerini kanıtlamaktadır. Diğer taraftan, *A. thaliana*'nın RhoGDI eksik *supercentipede 1 (scn1)* mutantlarında, tek bir epidermal hücreden çok sayıda kök tüyü çıktığı görülmüştür (Carol *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2008). *scn1* mutantlarının ayrıca ROS moleküllerini tek bir bölgede lokalize edebilme yeteneklerini kayb ettikleri ve dolayısıyla tek hücreden birden fazla kök tüyü oluştuğu öne sürülmüştür. *scn1* mutantlarında hem AtRBOHC'nin, hem de ROP2'nin delokalize olduğu gözlenmiştir. Buna göre, RhoGDI'lerin Rop ve NOX'ların lokalizasyonu ayarlayarak bölgesel ROS üretimini düzenlediği söylenebilir. Buna ek olarak, *actin2* mutantlarının ve cytochalasin (aktin depolimerizasyon ajanı) uygulanan bitkilerin NOX'larında yanlış lokalizasyon gözlenmiştir (Ringli *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2008). Bu bağlamda NOX lokalizasyonunun, hücrenin uç kısmındaki mikrofilament yapısıyla yakından ilişkili olduğu söylenebilir. Ayrıca Rop'ların uçtan büyüyen hücrelerin uç kısımlarındaki aktin dinamiklerine önemli derecede katılım gösterdiği düşünülmektedir (Lee and Yang, 2008).

Uçtan büyümenin düzenlenmesinde rol oynayan birçok bileşen bulunsa da (Cheung and Wu, 2008); bunlardan ROS sinyali ile ilişkili olduğu için üzerinde durulması gereken nitrik oksit (NO)'in; kök tüyü, polen tübü ve eğrelti otlarında

spor büyümesinde pozitif regülatör olarak iş gördüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur (Prado *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2006; McInnis *et al.*, 2006; Bushart and Roux, 2007; He *et al.*, 2007; Reichler *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Kök tüylerinde, NO aktivitesinin öksin yolaklarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Lombardo *et al.*, 2006). ROS ve NO'nun etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir, örneğin ROS ile NO'nun reaksiyonu aracılığıyla ROS düzeyleri ayarlanmaktadır (Wilson *et al.*, 2008). Buna bağlı olarak, uçtan büyüme süreci için, NO'in katılım gösterdiği ve ROS seviyelerini düzenleyen bir döngüden bahsedilebilir.

Uçtan büyümeyi düzenleyen mekanizmanın ROS ve  $Ca^{2+}$  iyonu haricindeki bir diğer bileşeni ise hücre duvarı pH'sindeki değişimlerdir. Yüksek hücre duvarı pH'sinin, geri dönüşümlü olarak hücre duvarlarını güçlendirerek büyümeyi sınırlandırdığı düşünülmektedir. Kök tüyünde, ekstrasellüler pH salınımları, ROS molekülleriyle uyum göstermektedir ve büyüme ve  $Ca^{2+}$  salınımlarını takiben gerçekleşmektedir (Monshausen *et al.*, 2007) (Şekil 1.6 b). Buna benzer bir zamanlamaya sahip ve yine  $Ca^{2+}$ , pH ve büyüme ile ilişkili bir süreç polen tüplerinde de tanımlanmıştır (Messerli *et al.*, 2000; Messerli and Robinson, 2007). Bu bağlamda yüksek derecede korunmuş bir büyüme yanıtları kümesinden söz edilebilir. Ayrıca yüksek ortam pH'sinin, *rhd2* mutantlarında kök tüylerinin patlamasını engellediği ve uca doğru artış gösteren  $Ca^{2+}$  gradiyenti ile birlikte normal uzama gösteren kök tüylerinin gelişimine sebebiyet verdiği saptanmıştır (Monshausen *et al.*, 2007). Tüm bu bulgulara göre ROS ve pH arasında bir etkileşim olduğu söylenebilir. İki faktör de birbirini hücre duvarı dinamikleri ve sitosolik aktivite kontrolü düzeyinde kompanse eder ve büyümenin devamlılığı sağlanır. AtRBOHC eksik mutantlarda yüksek ortam pH'sinin büyümenin devamlılığını sağlayabilmesi, uçtan büyüme sürecinde diğer ROS kaynaklarının da rol oynayabileceğine dair kanıt sunmaktadır.

### 1.3.5 ROS ve kök uzaması

Kökler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, ROS moleküllerinin sadece uçtan büyümede değil, birçok bitki büyüme ve gelişim sürecinde daha önemli görevlere sahip olabileceği ortaya konmuştur. Örneğin *rhd2* köklerinin, yaban tipe göre yaklaşık % 20 daha kısa olduğu saptanmıştır (Foreman *et al.*, 2003; Renew *et al.*, 2005). Benzer şekilde, inhibitör çalışmaları sonucunda mısır köklerinde büyümenin NOX'ların kontrolünde olabileceği belirtilmiştir (Liskay *et al.*, 2004). *A. thaliana*'nın NOX D ve F mutantlarında sınırlı kök büyümesi

görülürken, her iki enzimin de eksik olduğu mutantlarda kök uzamasının önemli derecede azaldığı saptanmıştır (Torres *et al.*, 2002). Tüm bu bulgular, ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki yaygın rolünü desteklemektedir. ROS moleküllerinin, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi çevresel faktörlerin algınmasında ve hormon sinyalizasyonunda önemli roller oynayarak düzenlediği düşünülmektedir. Gerçekten de, ABA inhibisyonunun AtRBOHD/F mutantlarında bitki büyümesini daha az etkilediği bulunmuştur (Kwak *et al.*, 2003). Benzer şekilde, tropizma yanıtları üzerinde yapılan çalışmalarda, öksine bağımlı bitki gelişiminin kontrolünde de ROS moleküllerinin rolü olduğuna dair kanıtlar ortaya konmuştur.

Bilindiği üzere, bitki kök ve gövdeleri, gravistimülasyona yanıt olarak yer çekimi vektörünü algılar ve gravitropik büyüme gerçekleşir, genel olarak sürgünün yukarı, köklerinde aşağı doğru büyümesi sağlanır. Bitkilerde yer çekiminin algılanmasını sağlayan moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olsa da, genel olarak öksinin organların bir yanına doğru asimetric bir şekilde dağılarak bir tarafta büyümenin inhibe olması, diğer tarafta da hızlanması sonucu kıvrılmanın gerçekleştiği söylenebilir. Sonuç olarak yer çekimine yanıt, büyüme farklılaşması aracılığıyla gerçekleşen organ kıvrılmasıdır. Böyle bir gravitropizma hem mısır ve *A. thaliana* köklerinde (Joo *et al.*, 2001; 2005) hem de yer çekimi ile uyarılmış mısır pulvinusunda (Clare *et al.*, 2008) ROS üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Yer çekimi ile uyarılmış köklerde, uyarımdan 30 dakika sonra ROS moleküllerinin korteksin aşağısında asimetric olarak biriktiği görülmüştür; uyarımın süresi uzadıkça birikim simetric bir hal almıştır (Joo *et al.*, 2001). Ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren agar bloklarına asimetric bir şekilde maruz bırakılan kökler, agarlara doğru kıvrılma göstermiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasıyla hücre duvarı esnekliği üzerinde değişimler de gerçekleşebileceği için, bahsedilen çalışmada 1mM N-asetil-sistein aracılığıyla ROS süpürümü gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak büyüme oranında bir değişim olmadığı, fakat kıvrılmanın engellendiği bulunmuştur. Bu bulgu da, tropizma yanıtlarında görülen asimetric ROS üretimini desteklemektedir (Joo *et al.*, 2001). Sonuç olarak, kıvrılmanın gerçekleşeceği yön tarafında asimetric ROS birikimi büyüme inhibisyonuna neden olur, böylelikle gravistimülasyon yanıtı olarak kök kıvrılması gerçekleşir.

Öksinin yukarıda bahsedilen kök uzaması modeli için birincil düzenleyici olduğu düşünülmektedir. Öksinin biriktiği yanda büyüme inhibisyonu gerçekleşir ve kök kıvrılır. Buna paralel olarak, öksinin ROS üretimini de uyardığı bilinmektedir (Schopfer, 2001; Schopfer *et al.*, 2002). Öksin aracılığıyla

gerçekleşen ROS üretiminin, hayvanlardaki sürece benzer şekilde NOX'ların fosfatidilinositol-3-kinaz aktivitesi sonucunda indüklenmesiyle gerçekleştiği rapor edilmiştir (Joo *et al.*, 2005). ROS moleküllerinin mısır pulvinusundaki gravitropik yanıtlarda da buna benzer şekilde iş gördüğü düşünülmektedir. Pulvini tahıl bitkilerinde nodların apikalinde oluşan yapılardır, gravistimülasyon sonrası asimetrik büyüme yanıtı oluşturulmasıyla yaprakların dikey ekseninde büyümesine aracılık ederler. Gravistimülasyon sonrasında, pulvinusta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeylerinin, büyüme yanıtından önce artış gösterdiği bulunmuştur (Clare *et al.*, 2008). Aynı çalışmada belirtildiği üzere, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi DPI uygulamasına yanıt vermemektedir, yani süreçte iş gören ROS, NOX aracılığıyla üretilmemektedir. Pulvininin üst kısmına 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandığında ise kıvrılma ters yönde gerçekleşmektedir. Diğer bir çalışmada ise öksin asimetrisinin ROS değişimlerinden sonra gerçekleştiği belirtilmiştir (Long *et al.*, 2002). Yani ROS üretimi öksin gradiyentinden daha hızlı gerçekleşmektedir; buna göre kökteki gravitropik yanıtın aksine, ROS moleküllerinin öksinin geri yolaklarında iş gördüğü sonucuna varılabilir.

### 1.3.6 Ekstrasellüler ATP, ROS ve kök uzaması

Ekstrasellüler ATP'nin hayvanlardaki düzenleyici görevlerine dair çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ekstrasellüler ATP'nin iyon kanalları ve G-proteini bağlı reseptörler üzerinden hücresel fonksiyonları düzenlediği bilinmektedir (Burnstock and Verkhratsky, 2009). Son yıllarda ekstrasellüler ATP'nin bitkilerde de önemli sinyal molekülleri olarak görev aldığı ortaya çıkmıştır (Roux and Steinebrunner, 2007). Ekstrasellüler ATP'nin bitkilerde yaralanma yanıtlarında, hücre canlılığında, büyümede, gravitropizmada, tigmotropizmada ve kök tüyleri ile polen tüplerinde uçtan büyüme sürecinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (Demidchik *et al.*, 2003a; Roux and Steinebrunner, 2007). Ekstrasellüler ATP'nin kök ve kök protoplastlarında ROS üretimini başlattığı gösterilmiştir, kök tüyünde görülen sinyal kaskadına benzer şekilde, AtRBOHC aracılığıyla plazma membranındaki Ca<sup>2+</sup> kanallarının aktivasyonu gerçekleşmektedir (Demidchik *et al.*, 2009). Ekstrasellüler ATP'nin hem ana kökte uzama bölgesinde hem de kök tüylerinde uzayan uca doğru biriktiği bulunmuş ve büyüme kontrolünde görev aldığı öne sürülmüştür (Kim *et al.*, 2006). Polen tüplerinde ise ekstrasellüler ATP sinyali uzama sürecinde NO ile birlikte iş görmektedir (Reichler *et al.*, 2009).

Ekstrasellüler ATP salınımı mekanik uyarım sonucunda da gerçekleşmektedir (Weerasinghe *et al.*, 2009). Ayrıca *A. thaliana*'da mekanik

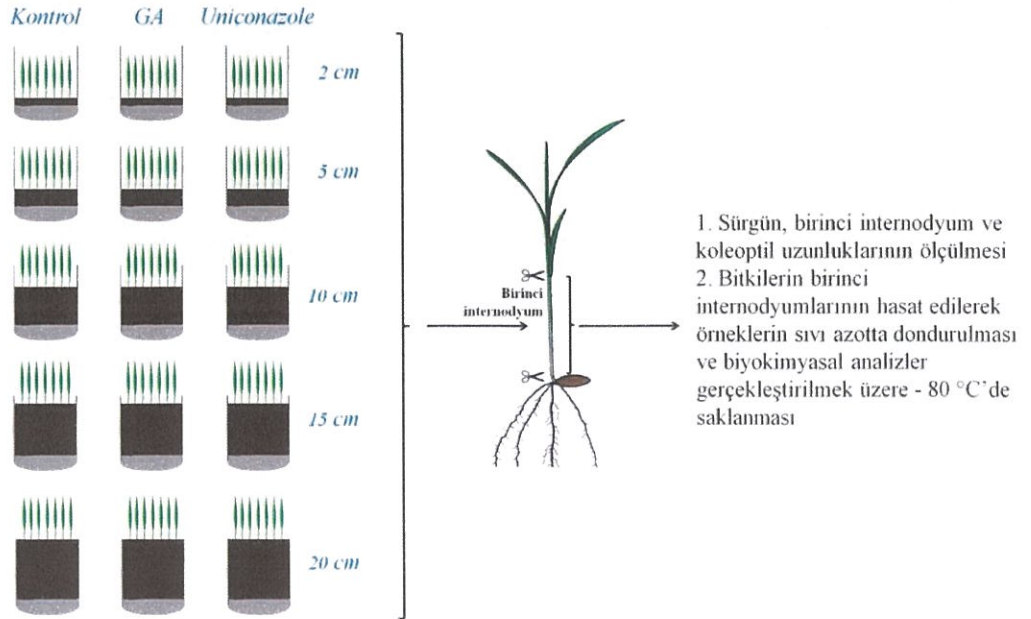
etkilerin algılanmasına ROS üretimi ve  $Ca^{2+}$  sinyalinin de katılım gösterdiği saptanmıştır (Monshausen and Gilroy, 2009). ROS ve hücre duvarı pH'sindeki bu değişimlerin mekanik etki sonucunda sitosolik  $Ca^{2+}$  düzeylerinin artışı aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Monshausen *et al.*, 2009). Bununla birlikte, kökün uzama bölgesinde, kök tüyü ucu uzamasının aksine mekanik uyarıya yanıt olarak verilen ROS değişimlerinin AtRBOHC aracılığıyla gerçekleşmediği açıklanmıştır (Monshausen *et al.*, 2009).

Sonuç olarak; uçtan büyüyen hücrelerde ROS ve NOX, sitoplazmik sinyal ağlarına katılarak ve hücre duvarı özelliklerinin kontrolünü sağlayarak bitki büyüme ve gelişimini düzenlemektedir. Bununla birlikte ROS moleküllerinin bitki gelişimindeki görevlerine dair başka örneklerde bulunmaktadır. Örneğin pamuk liflerinde sekonder hücre duvarlarının oluşumu (Pothika *et al.*, 1999), mısırda yaprak büyümesi (Rodriguez *et al.*, 2002) ve adventif kök oluşumu (Lanteri *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009) süreçlerine ROS moleküllerinin katılım gösterdiği bilinmektedir. ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki yaygın rollerini gösteren diğer bir çalışmada, NOX'ların baskılandığı domateslerde birçok gelişim anomalisi saptanmıştır (Sagi *et al.*, 2004). Tüm bu anlatılanlar, ROS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki rollerini açıkça gösterse de, daha önce bahsedildiği üzere bugüne kadar ROS moleküllerinin, buğdayların derin ekim toleransına katkı sağlayan birinci internodyum uzamasındaki rolü aydınlatılmamıştır. Bu eksiklik göz önüne alınarak, Tir buğdayının birinci internodyum uzaması üzerinde GA, ROS ve antioksidant sistem arasındaki etkileşimin aydınlatılması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni

Tir buğdayı tohumları Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Muzaffer TOSUN aracılığıyla temin edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu, tohumları 1 dakika boyunca % 70 (v/v) etanol çözeltisine, daha sonra 3 dakika boyunca % 5 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisine maruz bırakarak gerçekleştirilmiştir. Tohumlar etanol ve sodyum hipoklorit uygulamalarından sonra deiyonize suyla 5'er kere yıkanarak 24 saat boyunca şişirilmiştir. Tohumlar daha sonra 12 cm çapındaki kaplara 200 mL % 1 (w/v) agar konularak oluşturulan yaklaşık 2 cm'lik tabakaların üzerine yerleştirilmiştir. Her kaba 20 bitki ekilmiştir. Agarların üzerine 2 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm kalınlığında 7 : 2 : 1 oranına sahip torf : vermikülit : perlit karışımı ilave edilmiştir. Bitkiler JSR JSPC-420C bitki büyütme kabinde, 25 °C sıcaklık ve % 70 bağıl nem koşullarında ve karanlıkta yetiştirilmiştir. Buğday fidelerine ayrıca GA ve GA biyosentez inhibitörü uniconazole uygulanmıştır (Şekil 2.2). Ekzojen GA uygulaması için, GA<sub>3</sub> DMSO'da çözülerek % 1 agar ortamına ilave edilmiştir. Uygulanan GA<sub>3</sub> konsantrasyonu 2.89 µM'dır. Agardaki DMSO konsantrasyonu ise % 0.1'dir. Kontrol grupları sadece % 0.1 DMSO içermektedir. Ekzojen uniconazole ve uygulaması da GA<sub>3</sub> uygulamasıyla aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan uniconazole konsantrasyonları 0.2 µM, 2 µM ve 10 µM'dır.



Şekil 2.1. Deneme deseni şeması.

$K^+$  ve  $H_2O_2$ 'nin birinci internodyum uzaması üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için; 1.5 mM ve 3 mM KCl, GA ile aynı şekilde uygulanırken;  $H_2O_2$  uygulaması, Tir tohumları yüzey sterilizasyonunun ardından 24 saat boyunca 1 mM, 20 mM, 80 mM ve 120 mM  $H_2O_2$  çözeltilerinde bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra 7 günlük bitkilerin (Şekil 2.2) sürgün, birinci internodyum ve koleoptil uzunlukları ölçülerek birinci internodyumları hasat edilmiş ve sıvı azotta dondurulmuştur. Alınan örnekler biyokimyasal parametreler belirlenmek üzere -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 2.2. 7 günlük buğday fideleri (kontrol).

## 2.2 Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

### 2.2.1 $H_2O_2$ miktarının belirlenmesi

$H_2O_2$  miktarı tayini Cheeseman'a (2006) göre gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metot ferrous ammonium sulphate/xyleneol orange (FOX) yönteminin

değiştirilmiş versiyonudur (Gay *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2002). Kullanılan eFOX çözeltisi 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 µM ferrous ammonium sulphate, 100 µM sorbitol, 100 µM xylenol orange ve % 1 (v/v) etanol içermektedir. Örneklerin homojenizasyonu 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren - 20 °C'deki saf aseton aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. 0.1 g örnek 3 mL tampon ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4000 g'de 5 dakika boyunca santrifüje maruz bırakılmıştır. Süpernatantlardan 50 µL alınarak üzerine 950 µL eFOX çözeltisi ilave edilmiş, karışımlar vortex'lenmiş ve 30 dakika sonra 500 nm ve 800 nm'deki absorbanslar saptanmıştır. Örneklerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları % 30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılarak hazırlanan standarda göre hesaplanmıştır.

### 2.2.2 Antioksidant enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri

Bu aşamadaki bütün işlemler proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak için 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstratları 0.1 g örneğin 300 µL ekstraksiyon tamponunda [50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), % 0.2 (v/v) Triton™ X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ve % 2 (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)] homojenize ederek hazırlanmıştır. APX aktivite analizi için homojenizasyon tamponuna 5 mM AsA eklenmiştir. Homojenizasyonun ardından örnekler 14000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir, bu aşamadan sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır. Hücre duvarı POX aktivitesinin belirlenebilmesi için ise, santrifüjün ardından elde edilen pelletler 50 mM sodyum fosfat (pH 5.8) tamponuyla 10 dakika ve 1000 g'lik santrifüj uygulamalarıyla 4 kere yıkanmıştır. Pelletler daha sonra 2 saat boyunca 1 M NaCl çözeltisine maruz bırakılmıştır. Son olarak örnekler 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek protein miktarı ve enzim aktivitesi tayini için süpernatantlar alınmıştır.

Protein miktarı Bradford'a (1976) göre belirlenmiştir. Ölçüm Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlarda proteine bağlandığında kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanmaktadır. Mavi renk oluşumu 595 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart aralığı 0,02-0,2 mg/ml'dir.

POX (EC 1.11.1.7) aktivitesi Herzog and Fahimi (1973) tarafından kullanılan metoda göre saptanmıştır. Yöntem reaksiyon karışımındaki 3,3'-diaminobenzidine-tetra hidroklorid dihidrat (DAB)'ın ekstrakttaki POX'lar

tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi süpürmek için substrat olarak kullanılması ve buna bağlı renk oluşumunun 240 nm'de ölçümüne dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0.5 mM DAB, % 0.1 (w/v) jelatin, % 0.6 (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren 150 mM sodyum fosfat sitrat tamponudur (pH 4.4). 465 nm'deki absorbans 3 dakika boyunca gözlenmiştir. Enzimin, 1 mg toplam protein başına dakikada oksitlediği DAB miktarı, 1 U ( $\mu\text{mol DAB mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır.

APX (EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano and Asada'ya (1981) göre belirlenmiştir. Ölçüm, AsA'nın oksitlenmesine bağlı olarak 290 nm'deki absorbansın azalmasının izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0.1 mM EDTA, 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 0.5 mM AsA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponudur (pH 7.0). Oksitlenen AsA miktarı, ekstinksiyon katsayısı  $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimin 1 mg toplam protein başına dakikada oksitlediği AsA miktarı, 1 U ( $\mu\text{mol AsA mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır.

GR (EC 1.6.4.2) aktivitesi Foyer and Halliwell'a (1976) göre ölçülmüştür. Yöntem GSSG'yi redüklemek için GR tarafından oksitlenen NADPH'nin izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH içeren 25 mM sodyum fosfat (pH 7.8) tamponudur. NADPH oksidasyonu 340 nm'de takip edilmiştir. Oksitlenen NADPH miktarı ekstinksiyon katsayısı  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin 1 mg toplam protein başına dakikada oksitlediği NADPH miktarı, 1 U ( $\mu\text{mol NADPH mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır.

Antioksidant enzimlerin haricinde, ROS üreten NOX enzimlerinin de aktivitesi belirlenmiştir. NOX (EC 1.6.3.1) aktivitesi Jiang and Zhang'a (2002) göre ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 0.5 mM XTT ve 0.1 mM NADPH içermektedir. 470 nm'de 3 dakika boyunca XTT'nin redüksiyonu izlenmiştir. Reaksiyon dışı oluşabilecek renk değişiminin saptanması için 50 U SOD kullanılmıştır. O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretimi  $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ekstinksiyon kat sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 2.2.3 Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini

Örneklerden elde edilen protein ekstraktları denatürasyona sebep olmayan koşullarda poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılarak araştırılan enzimlere özel boya solüsyonlarıyla boyamalar gerçekleştirilmiştir. Örneklerin

hazırlanmasında aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü kullanılmıştır. Native-PAGE Laemmli'ye (1970) göre sodium dodecyl sulfate (SDS) kullanılmadan yapılmıştır. Jeller Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve Bio-Capt yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir.

SOD izoenzimlerinin belirlenebilmesi için örnekler % 12.5 ayırma ve % 4 hizalama jelinde elektforetik ayırma maruz bırakılmıştır. SOD boyaması, Beauchamp and Fridovich'e (1971) göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Riboflavin ışıkla birlikte  $O_2^-$  üretme özelliğine sahiptir, üretilen  $O_2^-$  NBT'yi oksitleyerek mavi-mor renkte formazan oluşumuna sebep olur. Boyamanın prensibi jel üzerinde SOD izoenzimlerinin bulunduğu bölgelerde NBT oksitlenmesinin inhibisyonu ile beyaz bantlar oluşmasının sağlanmasıdır. Jeller 60 dakika karanlıkta boya solüsyonunda bekletildikten sonra ışık altında çalkalanarak bantların oluşması beklenmiştir. SOD izoenzim tipleri Vitória *et al.*'a (2001) göre boya solüsyonuna inhibitör ilave edilerek belirlenmiştir. Cu/Zn-SOD inhibisyonu için 2 mM KCN, Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD inhibisyonu içinde 3 mM  $H_2O_2$  kullanılmıştır. Mn-SOD aktivitesi her iki inhibitörden de etkilenmemektedir.

POX izoenzimleri Seevers *et al.*'a (1971) göre saptanmıştır. Proteinlerin ayırımı için % 10 ayırma jeli ve % 4 hizalama jeli kullanılmıştır. Boya solüsyonu 1.3 mM DAB ve % 3 (v/v)  $H_2O_2$  içeren 200 mM sodyum asetat tamponudur (pH 5.0). Boyama POX enzimlerinin bulunduğu bölgelerde DAB'ın oksitlenmesi ile kahverengi bantlar oluşmasına dayanmaktadır. Elde edilen jeller % 7 (v/v) asetik asit çözeltisinde fikse edilmiştir.

GR izoenzimleri % 7.5 ayırma jeli ve % 4 hizalama jeli kullanılarak Hou *et al.*'a (2004) göre belirlenmiştir. Jeller 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 4 mM GSSG, 1.5 mM NADPH $\cdot$ Na<sub>4</sub> ve 2 mM DTNB içeren çözeltide 20 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) yıkanmıştır. Son olarak oda sıcaklığında 5-10 dakika boyunca 1.2 mM MTT ve 1.6 mM PMS uygulanarak jellerin boyaması tamamlanmış ve bantlar gözlenmiştir.

#### 2.2.4 GA-insensitif (*Rht*) genlerinin ifadesi

Tir buğdayı birinci internodyumlarından Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit kullanılarak total RNA elde edilmiştir. Saflaştırılan total RNA'da kalmış olabilecek DNA, DNase I (Fermentas) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. cDNA

sentezi ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak üreticinin direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir. Reaksiyonlardaki RNA miktarı factor *Act4* geni (GenBank: AB181991.1) kullanılarak normalize edilmiştir. Kantitatif PCR (qPCR) için Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Fermentas) kullanılmıştır. qPCR analizleri için StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) sistemi kullanılmıştır. 2 cm toprak derinliğine ekilen kontrol bitkileri (2C) kalibratör olarak kullanılmış ve diğer grupların gen ifadeleri 2C’nin katları olarak verilmiştir.

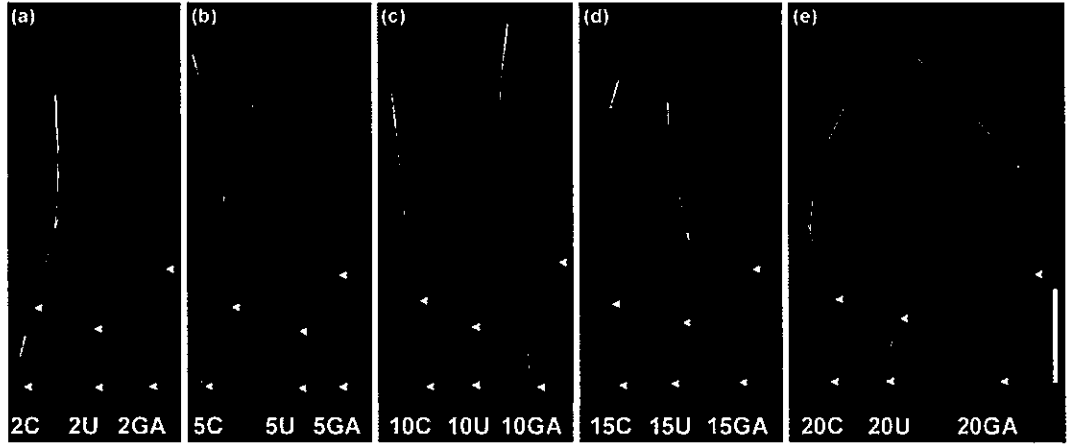
Çizelge 2.1 *Rht* genleri için primer listesi.

Gen adı	Primer dizileri (forward / reverse)	Kaynak
<i>Rht-A1</i>	5'-CGGGTTCGAGACCGTG-3' 5'-CCGCCGGCGAATAGG-3'	Wen <i>et al.</i> , 2013
<i>Rht-B1</i>	5'-CACTACTACTCCACCATGTTTCGATTCTCTG-3' 5'-GCGGCAGGAGCAGCAGCC-3'	Pearce <i>et al.</i> , 2011
<i>Rht-D1</i>	5'-ATGTACCGGGTGAAGAGCGAGAGC-3' 5'-AGCCTCTGAATTAGCAATGAAATTGTC-3'	Pearce <i>et al.</i> , 2011
<i>Act4</i>	5'-ACCTTCAGTTGCCAGCAAT-3' 5'-CAGAGTCGAGCACAATACCAGTTG-3'	Gil-Humanes <i>et al.</i> , 2009

### 3. BÜLGULAR

#### 3.1 Birinci İnternodyum, Koleoptil ve Sürgün Uzunlukları

Birinci internodyum uzamasıyla toprak derinliği arasındaki ilişkinin gözlenebilmesi için buğday tohumları 2 cm (derin olmayan ekim), 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilerek birinci internodyum uzunlukları ölçülmüştür (Şekil 3.1).



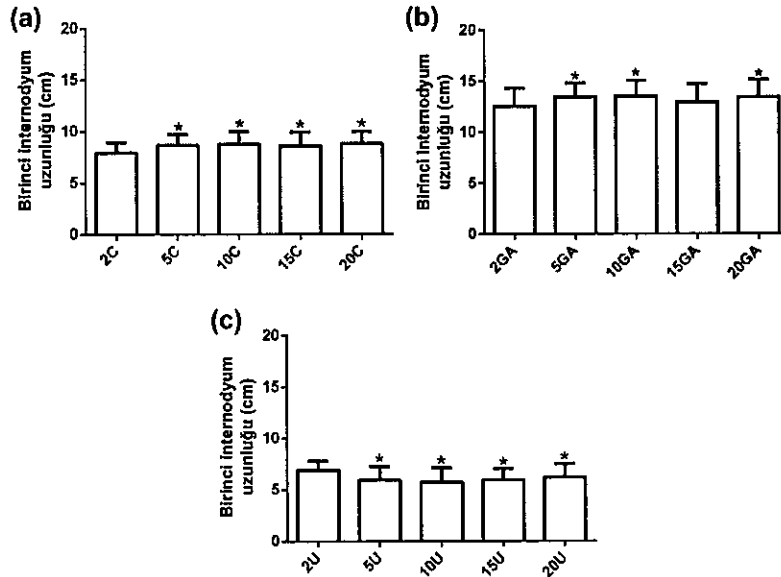
Şekil 3.1. Kontrol, uniconazole (0.2  $\mu$ M) ve GA gruplarında (a) 2 cm, (b) 5 cm, (c) 10 cm, (d) 15 cm ve (e) 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerin birinci internodyumları (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin, 2U = 2 cm/uniconazole, 5U = 5 cm/uniconazole, 10U = 10 cm/uniconazole, 15U = 15 cm/uniconazole, 20U = 20 cm/uniconazole) (Ölçek çubuğu = 10 cm).

Herhangi bir uygulama gerçekleştirilmeyen kontrol gruplarında, derine ekilmeyen bitkilerde birinci internodyum uzunluğu 7.91 cm olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte, derin ekim uygulamasının ilk derinliğinde, yani 5 cm'lik derinlikte birinci internodyum uzunluğunda % 9.35 ( $p = 0.0001$ ) oranında bir artış gözlenmiştir. Diğer taraftan, 5 cm'den daha yüksek toprak derinliklerinde de aynı etki gözlenmiştir. 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm'lik toprak derinliklerindeki birinci internodyum uzunlukları sırasıyla 8.65 cm, 8.74 cm (% 10.5 artış) ( $p < 0.0001$ ), 8.54 cm (% 8 artış) ( $p < 0.01$ ) ve 8.78 cm (% 11 artış) ( $p < 0.0001$ )'dir (Şekil 3.2 a). Sonuç olarak, derin ekim uygulamasının birinci internodyum uzamasını derin ekim şiddetinde bağımsız olarak uyardığı söylenebilir.

Tir buğdayının birinci internodyumundaki GA duyarlılığının belirlenebilmesi için bitkilere 2.89  $\mu$ M  $GA_3$  uygulanarak birinci internodyumların

verdiği yanıt gözlenmiştir. GA<sub>3</sub> uygulaması tüm toprak derinliklerinde aynı etkiyi göstererek birinci internodyum uzunluklarını 1.5 kat artırmıştır. Birinci internodyum uzunlukları 2 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla 12.52 cm, 13.43 cm, 13.50 cm, 12.90 cm ve 13.42 cm olarak saptanmıştır. GA uygulanmış bitkilerde de toprak derinliğine karşı kontrol gruplarına benzer bir etki gözlenmiştir. 5 cm, 10 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 7.3 (p < 0.005), % 7.8 (p < 0.005) ve % 7.2 (p < 0.05) oranlarında artış gözlenmiştir (Şekil 3.2 b). Sonuç olarak, GA uygulamasının birinci internodyum uzamasını orta derecede uyardığı ve GA gruplarının da derin ekime yanıt verdiği söylenebilir.

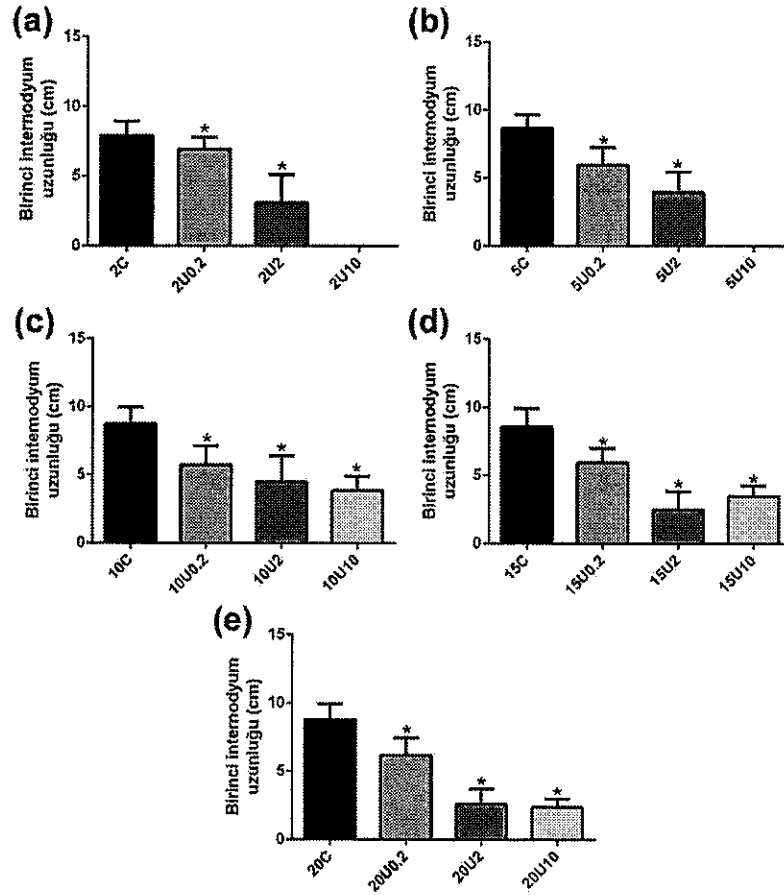
Birinci internodyum uzamasında endojen GA içeriğinin öneminin değerlendirilebilmesi için Tir buğdaylarına, farklı konsantrasyonlarda uniconazole (GA biyosentez inhibitörü) uygulanmıştır. 0.2 µM uniconazole uygulaması sonucunda birinci internodyum uzunluklarının 2 cm toprak derinliğinde % 12.5 (p < 0.0005), 5 cm'de % 31.3 (p < 0.0001), 10 cm'de % 34.6 (p < 0.0001), 15 cm'de % 30.3 (p < 0.0001) ve 20 cm'de % 29.7 (p < 0.0001) oranlarında azaldığı saptanmıştır. Uniconazole gruplarında, ekim derinliği ile birinci internodyum uzunluğu arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır. Derine ekilmeyen bitkilere göre birinci internodyum uzunluğunda 5 cm'de % 14.2 (p = 0.05), 10 cm'de % 17.4 (p = 0.0001), 15 cm'de % 14.1 (p < 0.05) ve 20 cm'de % 10.9 (p < 0.05) oranlarında azalma görülmüştür (Şekil 3.2 c).



Şekil 3.2. (a) Kontrol, (b) GA ve (c) uniconazole gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak birinci internodyum uzunluğundaki değişimi gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C

= 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin, 2U = 2 cm/uniconazole, 5U = 5 cm/uniconazole, 10U = 10 cm/uniconazole, 15U = 15 cm/uniconazole, 20U = 20 cm/uniconazole). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

Ayrıca uniconazole konsantrasyonu ile birinci internodyum uzunluğu arasında negatif korelasyon saptanmıştır (Şekil 3.3). 2  $\mu\text{M}$  uniconazole uygulaması sonucunda birinci internodyum uzunluklarında 2 cm toprak derinliğinde % 60.7 ( $p < 0.0001$ ), 5 cm'de % 54.3 ( $p < 0.0001$ ), 10 cm'de % 48.7 ( $p < 0.01$ ), 15 cm'de % 71 ( $p < 0.0001$ ) ve 20 cm'de % 70.4 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında azalma belirlenmiştir. 10  $\mu\text{M}$  uniconazole uygulaması ise 2 cm ve 5 cm toprak derinliklerinde birinci internodyum oluşumunu tamamen inhibe ederken; 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde ise birinci internodyum uzunluklarının sırasıyla % 56.1 ( $p < 0.0001$ ), % 59.4 ( $p < 0.0001$ ) ve % 72.7 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında azaltmıştır. Sonuç olarak, uniconazole'ün birinci internodyum uzaması üzerindeki etkinliği, Tir buğdayında birinci internodyum uzamasında endojen GA miktarının rol oynadığına işaret etmektedir.



Şekil 3.3. Uniconazole gruplarında konsantrasyona bağlı olarak (a) 2 cm, (b) 5 cm, (c) 10 cm, (d) 15 cm ve (e) 20 cm toprak derinliklerinde birinci internodyum

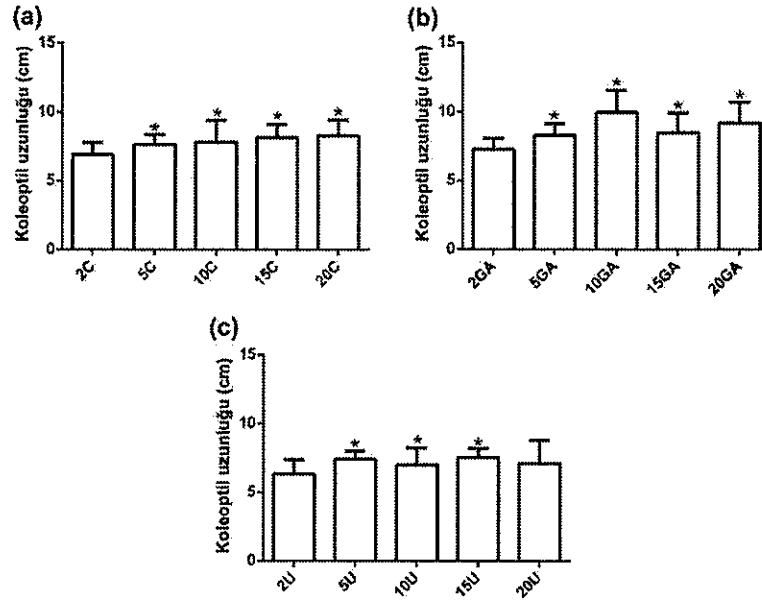
uzunluğundaki değişimleri gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 2U0.2 = 2 cm/0.2  $\mu$ M uniconazole, 2U2 = 2 cm/2  $\mu$ M uniconazole, 2U10 = 2 cm/10  $\mu$ M uniconazole, 5C = 5 cm/kontrol, 5U0.2 = 5 cm/0.2  $\mu$ M uniconazole, 5U2 = 5 cm/2  $\mu$ M uniconazole, 5U10 = 5 cm/10  $\mu$ M uniconazole, 10C = 10 cm/kontrol, 10U0.2 = 10 cm/0.2  $\mu$ M uniconazole, 10U2 = 10 cm/2  $\mu$ M uniconazole, 10U10 = 10 cm/10  $\mu$ M uniconazole, 15C = 15 cm/kontrol, 15U0.2 = 15 cm/0.2  $\mu$ M uniconazole, 15U2 = 15 cm/2  $\mu$ M uniconazole, 15U10 = 15 cm/10  $\mu$ M uniconazole, 20C = 20 cm/kontrol, 20U0.2 = 20 cm/0.2  $\mu$ M uniconazole, 20U2 = 20 cm/2  $\mu$ M uniconazole, 20U10 = 20 cm/10  $\mu$ M uniconazole). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

Tir buğdayının derin ekim toleransına koleoptil uzamasının katkı sağlayıp sağlamadığını saptayabilmek için farklı derinliklere ekilen buğdayların koleoptil uzunlukları ölçülmüştür. Kontrol gruplarında, derin ekim uygulaması gerçekleştirilmeyen bitkilerin (2 cm toprak derinliği) koleoptil uzunluğu 6.9 cm olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan, derin ekim uygulaması gerçekleştirilen bitkilerde koleoptil uzunluğunun artış gösterdiği belirlenmiştir. 5 cm toprak derinliğine ekilen buğdayların koleoptil uzunluğu % 10.7 ( $p = 0.0001$ ), 10 cm'de % 13.3 ( $p < 0.0001$ ), 15 cm'de % 17.9 ( $p < 0.0001$ ) ve % 20 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında artış göstermiştir (Şekil 3.4 a). Bu bağlamda, birinci internodyum uzaması ile birlikte koleoptil uzamasının da buğdayın derin ekim toleransına katkıda bulunduğu söylenebilir.

GA uygulanmış bitkilerin koleoptilleri uzama eğilimi göstermişlerdir. Özellikle 10 cm toprak derinliğinde kontrole göre % 27.5 oranında bir artış belirlenmiştir ( $p < 0.0001$ ). Ayrıca 5 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde de koleoptil uzunluğunda sırasıyla % 8.5 ( $p < 0.0001$ ) ve % 10.9 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında artış saptanmıştır. GA gruplarında da derin ekim uygulaması koleoptil uzunluklarında artışa neden olmuştur. 2 cm toprak derinliğine ekilen bitkilere göre koleoptil uzunluklarında 5 cm'de % 14.1 ( $p < 0.0001$ ), 10 cm'de % 37.3 ( $p < 0.0001$ ), 15 cm'de % 16.8 ( $p < 0.001$ ) ve 20 cm'de ise % 26.4 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında artış görülmüştür (Şekil 3.4 b). Sonuç olarak GA'nın koleoptil uzamasını az da olsa uyardığı ve derin ekim uygulamasının koleoptil uzamasını teşvik ettiği söylenebilir.

Uniconazole gruplarında (0.2  $\mu$ M) ise koleoptil uzunluklarında azalma gözlenmiştir. Koleoptil uzunluklarında 2 cm toprak derinliğinde % 8 ( $p < 0.05$ ), 5 cm'de % 10.4 ( $p < 0.005$ ), 15 cm'de % 7.5 ( $p < 0.05$ ) ve 20 cm'de % 14 ( $p < 0.01$ ) oranlarında azalma gözlenmiştir. Diğer taraftan derin ekim uygulaması uniconazole gruplarının koleoptillerinde uzamaya neden olmuştur. 2 cm toprak derinliğine ekilen bitkilere göre koleoptil uzunluklarında 5 cm'de % 16.5 ( $p <$

0.001), 10 cm'de % 10.4 ( $p < 0.05$ ) ve 15 cm'de % 18.4 ( $p < 0.0005$ ) oranlarında artış görülmüştür (Şekil 3.4 c).



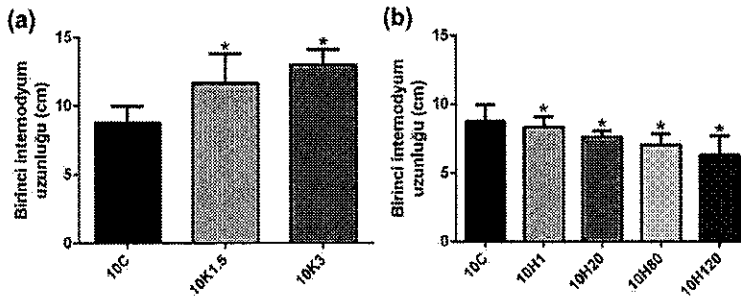
Şekil 3.4. (a) Kontrol, (b) GA ve (c) uniconazole gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak koleoptil uzunluğundaki değişimi gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin, 2U = 2 cm/uniconazole, 5U = 5 cm/uniconazole, 10U = 10 cm/uniconazole, 15U = 15 cm/uniconazole, 20U = 20 cm/uniconazole). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

Ekim derinliğinin sürgün uzunluğu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için farklı derinliklere ekilen buğdayların sürgün uzunlukları ölçülmüştür. Kontrol gruplarında ekim derinliğinin sürgün uzunluğu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Kontrol gruplarında ortalama sürgün uzunluğu 33 cm olarak bulunmuştur. GA uygulaması ise sürgün uzunluğunu uyarmıştır. GA gruplarında kontrol gruplarına göre 2 cm toprak derinliğinde % 15.8 ( $p < 0.0001$ ), 5 cm'de % 20.7 ( $p < 0.0001$ ), 10 cm'de % 19.2 ( $p < 0.0001$ ), 15 cm'de % 19.8 ( $p < 0.0001$ ) ve 20 cm'de % 16.7 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında artış belirlenmiştir. Kontrol gruplarına benzer şekilde GA gruplarında da derin ekim uygulaması sürgün uzunluğunu etkilememiştir. Uniconazole uygulaması (0.2  $\mu$ M) ise sürgün uzunluklarını beklendiği üzere azaltmıştır. Bununla birlikte uniconazole'ün sürgün uzunluğu üzerindeki etkisi, birinci internodyum uzunluğu üzerindeki etkisine göre oldukça azdır. Bu bağlamda GA uygulaması ile uniconazole uygulamasının sürgün uzunluğu üzerinde aynı şekilde etki gösterdiği söylenebilir. Uniconazole gruplarında 10 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde derin ekim

uygulanmayan bitkilere göre sürgün uzunluğunda sırasıyla % 14.1 ( $p < 0.0001$ ) ve % 8.5 ( $p < 0.01$ ) oranlarında azalma gözlenmiştir.

Birinci internodyum uzaması ile  $K^+$  arasındaki ilişkinin aydınlatılabilmesi için Tir buğdaylarına farklı konsantrasyonlarda (1.5 mM ve 3 mM)  $K^+$  uygulanarak bitkilerin birinci internodyum, koleoptil ve sürgün uzunlukları belirlenmiştir. Bitkiler sadece 10 cm derin ekim uygulamasında yetiştirilmiştir.  $K^+$  uygulamasının birinci internodyum ve koleoptil uzunluklarını önemli derecede indüklediği saptanmıştır. Birinci internodyum uzunlukları 1.5 mM ve 3 mM KCl uygulamaları sonucunda sırasıyla % 33.3 ( $p < 0.05$ ) ve % 48.7 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında artış göstermiştir (Şekil 3.5 a). Koleoptil uzunluklarında ise 1.5 mM ve 3 mM KCl uygulamaları % 41.6 ( $p < 0.0001$ ) ve % 39.8 ( $p < 0.005$ ) oranlarında artmıştır.  $K^+$  iyonunun sürgün uzunluğundaki etkisi birinci internodyum ve koleoptile göre çok daha azdır. 1.5 mM KCl sürgün uzunluğunu değiştirmezken, 3 mM KCl uygulaması sonucunda % 15.9 ( $p < 0.005$ ) oranında artmıştır.

Birinci internodyum uzaması ile  $H_2O_2$  arasındaki etkileşimin aydınlatılabilmesi için Tir buğdaylarına farklı konsantrasyonlarda  $H_2O_2$  uygulanarak bitkilerin birinci internodyum, koleoptil ve sürgün uzunlukları belirlenmiştir. Bitkiler sadece 10 cm derin ekim uygulamasında yetiştirilmiştir. 10 cm toprak derinliğinde yetiştirilen kontrol bitkilerine göre 1 mM, 20 mM, 80 mM ve 120 mM  $H_2O_2$  uygulanmış bitkilerin birinci internodyum uzunlukları sırasıyla % 4.6 ( $p < 0.05$ ), % 13 ( $p < 0.0001$ ), % 19.6 ( $p < 0.0001$ ) ve % 33.1 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında azalmıştır (Şekil 3.5 b). Koleoptil uzunluklarında ise 20 mM'da % 12.7 ( $p < 0.05$ ), 80 mM'da % 27.5 ( $p < 0.0001$ ) ve 120 mM'da % 24.7 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında azalma görülmüştür. Sürgün uzunluklarında ise 20 mM'da % 11.6 ( $p < 0.001$ ), 80 mM'da % 17.2 ( $p < 0.0001$ ) ve 120 mM'da % 18 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında düşüş belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlarda (a) KCl ve (b)  $H_2O_2$  uygulanmış Tir buğdaylarında birinci internodyum uzunluklarındaki değişimi gösteren grafikler (10C = 10

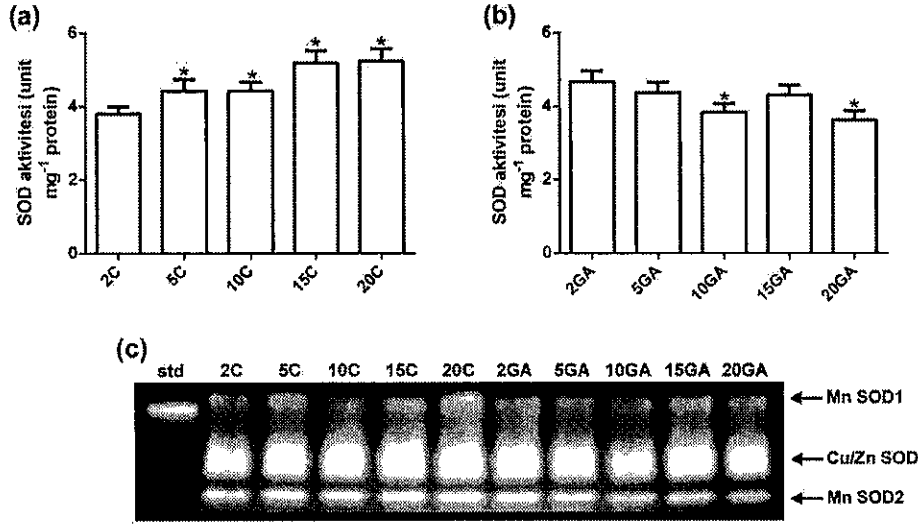
cm/kontrol, 10K1.5 = 10 cm/1.5 mM KCl, 10K3 = 10 cm/3 mM KCl 10H1 = 10 cm/1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10H20 = 10 cm/20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10H80 = 10 cm/80 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10H120 = 10 cm/120 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir (p < 0.05).

### 3.2 Biyokimyasal Parametreler

Birinci internodyum uzamasında antioksidant mekanizmanın rolünün aydınlatılabilmesi için, SOD aktivitesi ve izoenzimleri, POX aktivitesi ve izoenzimleri, APX aktivitesi, GR aktivitesi ve izoenzimleri, hücre duvarı POX aktivitesi, NOX aktivitesi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri belirlenmiştir.

#### 3.2.1 SOD aktivitesi ve izoenzimleri

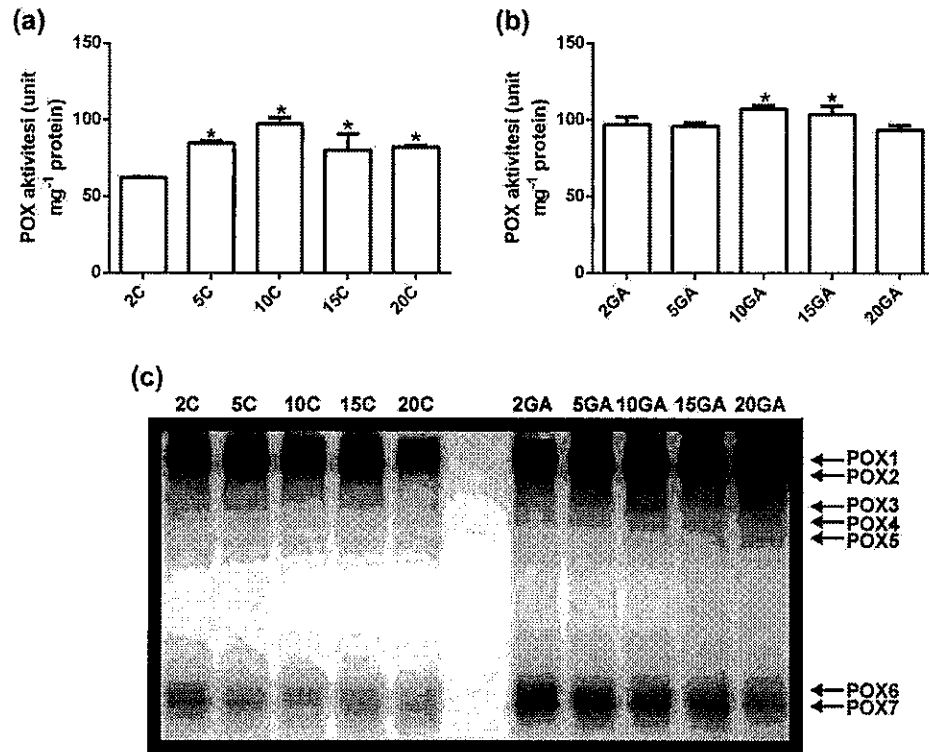
GA uygulanmayan Tir buğdaylarının birinci internodyumlarında derin ekim uygulaması SOD aktivitesini önemli derecede artırmıştır (Şekil 3.6 a). Derine ekilmeyen bitkilere göre birinci internodyumlarda SOD aktivitesi 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 16.3 (p < 0.01), % 16.3 (p < 0.005), % 36.3 (p < 0.0001) ve % 37.5 (p < 0.0001) oranlarında artış göstermiştir. GA gruplarında ise ekim derinliği ile SOD aktivitesi arasında negatif korelasyon saptanmıştır (Şekil 3.6 b). GA gruplarında derine ekilmeyen bitkilere göre birinci internodyumdaki SOD aktivitesinde 10 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 18 (p < 0.005) ve % 22.8 (p < 0.0005) oranlarında azalma belirlenmiştir. GA uygulamasının SOD üzerindeki etkisi, derine ekilen ve ekilmeyen bitkiler arasında farklılık göstermektedir. Derine ekilmeyen bitkilerin birinci internodyumlarında GA uygulaması SOD aktivitesini % 22.9 (p < 0.0005) oranında artırırken; 10 cm, 15 cm ve 20 cm'lik derin ekim uygulamaları SOD aktivitesini sırasıyla % 13.3 (p < 0.005), % 17 (p < 0.001) ve % 30.1 (p < 0.0001) oranlarında azaltmıştır. Ayrıca Tir buğdayı birinci internodyumlarında Mn SOD1, Mn SOD2 ve Cu/Zn SOD olmak üzere 3 farklı SOD izoenzimi tespit edilmiştir (Şekil 3.6 c).



Şekil 3.6. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak SOD aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler ile (c) kontrol ve GA gruplarında SOD izoenzimleri. Her kuyucukta 75 µg protein bulunmaktadır (Std = 1 U bovine karaciğeri SOD standardı, 2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir (p < 0.05).

### 3.2.2 POX aktivitesi ve izoenzimleri

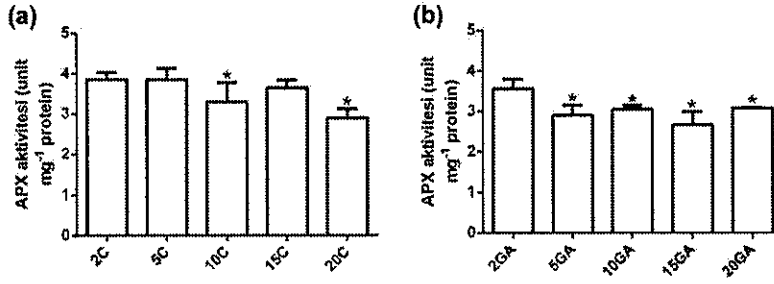
GA uygulanmayan Tir buğdaylarının birinci internodyumlarında derin ekim uygulaması gerçekleştirilen bitkilerin birinci internodyumlarında POX aktivitesinde artış belirlenmiştir (Şekil 3.7 a). 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerin birinci internodyumlarında POX aktivitelerinde sırasıyla % 36.4 (p < 0.0001), % 56.6 (p < 0.0005), % 28.8 (p < 0.05) ve % 32.1 (p < 0.001) oranlarında artış görülmüştür. GA uygulaması da bitkilerde POX aktivitesini artırmıştır (Şekil 3.7 b). Derine ekilmeyen buğday internodyumlarında GA uygulaması sonucu POX aktivitesi % 55.9 (p < 0.0001) oranında artarken; 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerde artış oranı sırasıyla % 13.1 (p < 0.0001), % 10.1 (p < 0.05), % 29.4 (p < 0.005) ve % 13.9 (p < 0.0001)'tur. Diğer taraftan, kontrol gruplarında olduğu gibi GA gruplarında da derine ekilen bitki birinci internodyumlarında POX aktivitesi artış gösterme eğilimindedir. 10 cm ve 15 cm toprak derinliklerinde POX aktivitesi sırasıyla % 10.7 (p < 0.001) ve % 7 (p < 0.05) oranlarında artmıştır. Ayrıca Tir buğdayı birinci internodyumlarında 7 farklı POX izoenzimi saptanmıştır (Şekil 3.7 c).



Şekil 3.7. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak POX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler ile (c) kontrol ve GA gruplarında POX izoenzimleri. Her kuyucukta 20 µg protein bulunmaktadır (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.3 APX aktivitesi

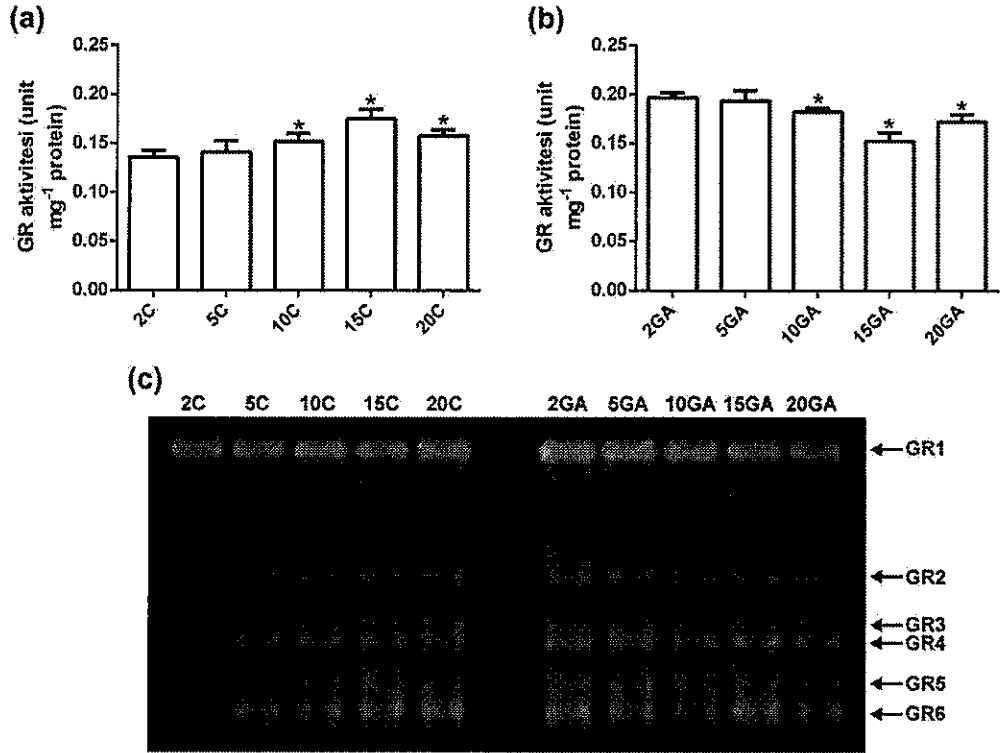
GA uygulanmayan buğdayların birinci internodyumlarında APX aktivitesi ekim derinliği arttıkça azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 3.8 a). Derine ekilmeyen bitkilere göre, 10 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerde APX aktivitesinde sırasıyla % 14.5 ( $p < 0.05$ ) ve % 24.8 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında azalma belirlenirken, diğer gruplardaki düşüş istatistiksel bir değere sahip değildir. GA gruplarında kontrol bitkilerine göre APX aktivitesi bazal seviyesi daha düşüktür (Şekil 3.8 b). 5 cm ve 15 cm toprak derinliklerinde GA uygulanan bitkilerde APX aktivitesi sırasıyla % 24.1 ( $p = 0.01$ ) ve % 26.9 ( $p = 0.001$ ) oranlarında azalmıştır. Ayrıca GA gruplarında birinci internodyumda APX aktivitesindeki derin ekime bağlı azalma daha belirgindir. GA gruplarında derine ekilmeyen bitkilere göre 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerin APX aktivitelerinde sırasıyla % 18 ( $p < 0.005$ ), % 14.1 ( $p < 0.05$ ), % 25.1 ( $p < 0.005$ ) ve % 13.5 ( $p < 0.05$ ) oranlarında azalma belirlenmiştir.



Şekil 3.8. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak APX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.4 GR aktivitesi ve izoenzimleri

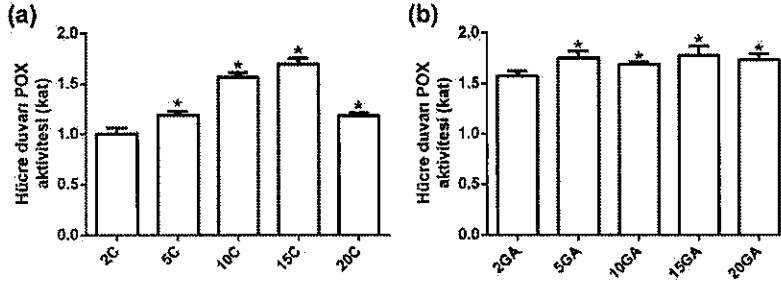
GA uygulanmayan buğdayların birinci internodyumlarında GR aktivitesi ekim derinliği ile pozitif korelasyona sahiptir (Şekil 3.9 a). Derine ekilmeyen bitkilere göre 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerin buğdayların birinci internodyumlarındaki GR aktivitesi sırasıyla % 11.9 ( $p < 0.05$ ), % 29.6 ( $p < 0.05$ ) ve % 17 ( $p < 0.05$ ) oranlarında artmıştır. GA uygulaması birinci internodyumdaki GR aktivitesi bazal seviyesini yükseltmiştir (Şekil 3.9 b). 2 cm, 5 cm ve 10 cm toprak derinliklerinde GR aktivitesi sırasıyla % 45.2 ( $p < 0.0005$ ), % 37.6 ( $p < 0.005$ ) ve % 17.8 ( $p < 0.0005$ ) oranlarında artmıştır. Diğer taraftan GA gruplarında ekim derinliği ile GR aktivitesi arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır. GA gruplarında derine ekilmeyen bitkilere göre 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerin buğdayların birinci internodyumlarındaki GR aktivitesi sırasıyla % 8.7 ( $p < 0.01$ ), % 22.5 ( $p < 0.001$ ) ve % 12.3 ( $p < 0.005$ ) oranlarında azalma görülmüştür. Ayrıca Tir buğdayı birinci internodyumlarında 6 farklı GR izoenzimi saptanmıştır (Şekil 3.9 c).



Şekil 3.9. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak GR aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler ile (c) kontrol ve GA gruplarında GR izoenzimleri. Her kuyucukta 20 µg protein bulunmaktadır (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.5 Hücre duvarı POX aktivitesi

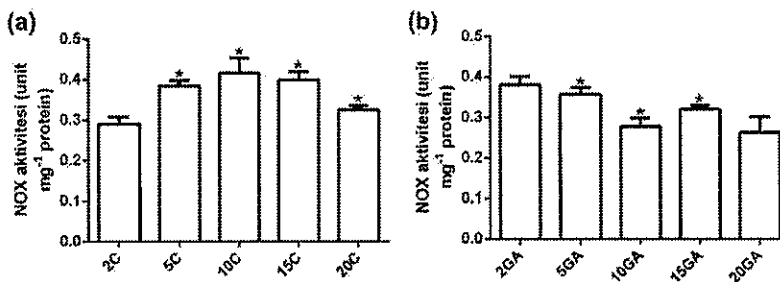
Tir buğdayı birinci internodyumlarında derin ekim ve GA uygulamaları hücre duvarı POX aktivitesini artırmıştır (Şekil 3.10 a, b). Kontrol gruplarında, derine ekilmeyen bitkilere göre 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerine ekilen bitkilerde sırasıyla % 18.8 ( $p < 0.0001$ ), % 56.4 ( $p < 0.0001$ ), % 69 ( $p < 0.0001$ ) ve % 18.3 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında artış belirlenmiştir. GA uygulaması, kontrol bitkilerine göre tüm derinliklerde hücre duvarı POX aktivitesini artırmıştır. Hücre duvarı POX aktivitesi GA uygulamasıyla 2 cm'de % 57.6 ( $p < 0.0001$ ), 5 cm'de % 47.1 ( $p < 0.0001$ ), 10 cm'de % 8 ( $p = 0.005$ ), 15 cm'de % 5.2 ( $p < 0.0001$ ) ve 20 cm'de % 46.6 ( $p < 0.0001$ ) oranlarında yükselmiştir. GA uygulanan bitkilerde derin ekime verilen yanıt daha az belirgindir. Derin ekim uygulanmayan bitkilere göre 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm derinliğe ekilen bitkilerde sırasıyla % 11.1 ( $p < 0.0001$ ), % 7.1 ( $p < 0.001$ ), % 12.8 ( $p < 0.05$ ) ve % 10 ( $p < 0.01$ ) oranlarında artış saptanmıştır.



Şekil 3.10. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak hücre duvarı POX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.6 NOX aktivitesi

GA uygulanmayan bitkilerin birinci internodyumlarında derine ekilmeyen bitkilere göre NOX aktivitesi 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 32.6 ( $p < 0.0005$ ), % 43.1 ( $p < 0.005$ ), % 37.3 ( $p < 0.0005$ ) ve % 10.3 ( $p < 0.05$ ) oranlarında artmıştır (Şekil 3.11 a). GA uygulanan gruplarda ise birinci internodyumdaki NOX aktivitesi ile ekim derinliği arasında negatif korelasyon belirlenmiştir (Şekil 3.11 b). Derine ekilmeyen bitkilere göre NOX aktivitesi 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 27.6 ( $p < 0.005$ ), % 15.9 ( $p < 0.05$ ) ve % 30.9 ( $p < 0.05$ ) oranlarında azalmıştır. GA uygulamasının NOX üzerindeki etkisi, derine ekilen ve ekilmeyen bitkiler arasında farklılık göstermektedir. Derine ekilmeyen bitkilerin birinci internodyumlarında GA uygulaması NOX aktivitesini % 31.3 ( $p < 0.005$ ) oranında artırırken; 5 cm, 10 cm ve 15 cm'lik derin ekim uygulamaları NOX aktivitesini sırasıyla % 7.2 ( $p < 0.05$ ), % 33.3 ( $p < 0.005$ ) ve % 19.6 ( $p < 0.005$ ) oranlarında azaltmıştır.

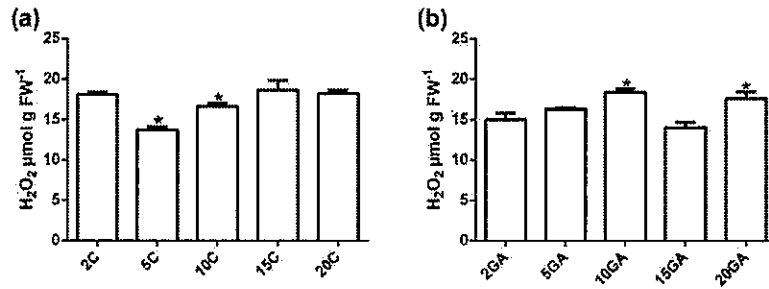


Şekil 3.11. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak NOX aktivitesindeki değişimi gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin,

15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı

Derine ekilmeyen bitkilerde GA uygulaması Tir buğdayları birinci internodyumlarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeyini % 20.7 ( $p < 0.05$ ) oranında azaltmıştır. Diğer taraftan GA uygulamasının 5 cm ve 10 cm derin ekim uygulamalarında birinci internodyumdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeylerini sırasıyla % 19 ( $p < 0.005$ ) ve % 7.6 ( $p < 0.05$ ) oranlarında artırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, 15 cm toprak derinliğinde GA uygulanan bitkilerde kontrol bitkilerine göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesi önemli derecede azalmıştır (% 32.7,  $p < 0.01$ ). Kontrol gruplarında birinci internodyumdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerinde dalgalı bir grafik saptanmıştır (Şekil 3.12 a). Derine ekilmeyen bitkilere göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri 5 cm ve 10 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 24.1 ( $p < 0.0005$ ) ve % 8.3 ( $p < 0.05$ ) oranlarında azalırken, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerinde değişim saptanmamıştır. GA gruplarında da derin ekim ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri arasında dalgalı bir grafik belirlenmiştir (Şekil 3.12 b). Derine ekilmeyen bitkilere göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri 10 cm ve 20 cm toprak derinliklerinde sırasıyla % 22.2 ( $p < 0.05$ ) ve % 17.3 ( $p < 0.05$ ) oranlarında artarken, diğer derinliklerde istatistiksel olarak değerli bir değişime rastlanmamıştır.

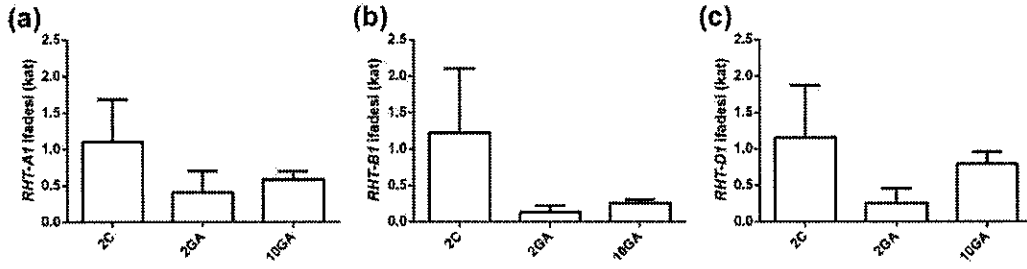


Şekil 3.12. (a) Kontrol ve (b) GA gruplarında toprak derinliğine bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerindeki değişimi gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 5C = 5 cm/kontrol, 10C = 10 cm/kontrol, 15C = 15 cm/kontrol, 20C = 20 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 5GA = 5 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin, 15GA = 15 cm/giberellin, 20GA = 20 cm/giberellin). \* işareti istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.8 GA-insensitif (*Rht*) genlerinin ifadeleri

*Rht-A1* geni ifadesi derine ekilmeyen kontrol gruplarına göre GA gruplarında, 2 cm toprak derinliğinde % 66, 10 cm toprak derinliğinde ise % 42.6 oranlarında azalmıştır (Şekil 3.13 a). *Rht-B1* ve *Rht-D1* genlerinde de buna benzer

grafikler belirlenmiştir (Şekil 3.13 b, c). *Rht-B1* geni ifadesi derine ekilmeyen kontrol gruplarına göre GA gruplarında, 2 cm toprak derinliğinde % 88.6, 10 cm toprak derinliğinde ise % 75.2 oranlarında azalırken *Rht-D1* geni ifadelerindeki düşüşler sırasıyla % 80.3 ve % 21.5 düzeyindedir.



Şekil 3.13. (a) *Rht-A1*, (b) *Rht-B1* ve (c) *Rht-D1* genlerinde farklı gruplarda ifade değişimlerini gösteren grafikler (2C = 2 cm/kontrol, 2GA = 2 cm/giberellin, 10GA = 10 cm/giberellin).

#### 4. TARTIŞMA

Buğdayda derin ekim toleransı birinci internodyum uzaması aracılığıyla sağlanmaktadır (Hoshikawa, 1969). Bugüne kadar buğdayın derin ekim toleransı üzerine bir çok çalışma gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, literatürde birinci internodyum uzaması hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bunların hiçbirisinde ROS moleküllerinin ve antioksidant mekanizmanın birinci internodyum uzamasındaki potansiyel rolü üzerinde durulmamıştır. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında bu konu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Buğdayın birinci internodyum uzamasına dair yayımlanmış makalelerde Hong Mang Mai isimli buğday çeşidi kullanılmıştır (Suge *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2011). Sunulan tez çalışmasında ise Türkiye’de yetiştirilen ve derin ekim toleransına sahip olan Tir buğdayı (Yagmur and Kaydan, 2009) materyal olarak kullanılmıştır.

Çalışmada öncelikle Tir buğdayı birinci internodyumlarının derin ekime uzama yanıtı verip vermediği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, düşük şiddetli derin ekim uygulaması (5 cm toprak derinliği) dahi birinci internodyum uzunluğunu artırmaktadır. Diğer taraftan, birinci internodyumların derin ekime verdiği yanıtın derin ekimin şiddetinden bağımsız olduğu saptanmıştır. 5 cm, 10 cm, 15 cm ve 20 cm toprak derinliklerindeki birinci internodyum uzunlukları hemen hemen aynı olsa da, en uzun birinci internodyum 20 cm toprak derinliğinde gözlenmiştir.

Uzun ve cüce buğday genotiplerinin GA’ya verdikleri yanıtlar arasında farklılık bulunmaktadır. GA uygulaması sonucunda uzun genotiplerde büyüme önemli derecede indüklenirken, cüce çeşitlerin GA’ya verdikleri yanıt oldukça sınırlıdır (Gale and Marshall, 1975). Birinci internodyum uzunluğu GA uygulaması sonucu 2 katına çıkan Hong Mang Mai çeşidi GA duyarlılığı açısından “süper duyarlı” olarak tanımlanmıştır (Chen *et al.*, 2003). Tir buğdayında GA uygulaması sonucunda birinci internodyum uzunluğu 1.5 kat artmaktadır. Buna göre Tir buğdayı birinci internodyumlarının GA duyarlılığı orta/yüksek dereceli olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan, Tir buğdayının GA biyosentez inhibitörü olan uniconazole’e karşı oldukça duyarlı olduğu saptanmıştır. Tir buğdaylarında birinci internodyum uzaması uniconazole’e konsantrasyona bağlı bir şekilde yanıt vermektedir. 10  $\mu$ M uniconazole uygulaması sonucunda derine ekilmeyen ve düşük dereceli derin ekim uygulaması

gerçekleştirilen bitkilerde birinci internodyum saptanamamıştır. Bu bağlamda, Tir buğdayında birinci internodyum uzamasının endojen GA miktarına sıkı bir şekilde bağlı olduğu söylenebilir. Hong Mang Mai'de birinci internodyum uzamasında endojen GA seviyesinin değil GA duyarlılığının önemli olduğu belirtilmiştir (Chen *et al.*, 2001, Nishizawa *et al.*, 2002). Tir buğdayı ise muhtemelen derin ekim toleransını hem orta derecede yüksek GA duyarlılığı hem de endojen GA miktarı aracılığıyla sağlamaktadır.

Organ büyümesi hem hücre çoğalması, hem de hücre genişlemesi (uzaması) aracılığıyla gerçekleşmektedir ve her iki süreç de GA aracılığıyla uyarılmaktadır (Achard *et al.*, 2008; Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2010; Claeys *et al.*, 2012; Nelissen *et al.*, 2012). Hücre uzaması bitki boyutundaki önemli artışlarda özellikle önemlidir (Chen *et al.*, 2003). Hücre uzaması iki parametre aracılığıyla kontrol edilmektedir: (a) hücre duvarı esnekliği, (b) hücresel ozmotik potansiyel. GA'nın söz konusu iki mekanizma üzerindeki pozitif etkisinin Hong Mang Mai'de birinci internodyum uzamasına katkı sağladığı düşünülmektedir (Chen *et al.*, 2003). Osmoregülasyon, hücre dışı su potansiyeli düşerken turgor basıncı veya hücre hacmini hücre içi ozmotik bileşiklerin miktarını artırarak düzenlemektedir (Hellebust, 1976). Potasyumun buğdayın kuraklığa verdiği osmoregülasyon yanıtında (Morgan *et al.*, 1992) ve GA-indüklü uzamada (Purves, 1966; Kawasaki *et al.*, 1978; De La Guardia and Benloch, 1980) rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca Hong Mang Mai'de birinci internodyum uzamasının potasyumun endojen GA ile etkileşimi aracılığıyla gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Chen *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2002). Tüm bunlarla uyumlu olarak, potasyum uygulamasının konsantrasyona bağlı bir şekilde Tir buğdayı birinci internodyum uzunluklarını önemli derecede artırdığı saptanmıştır. Mısırdaki, GA biyosentezinden sorumlu *AtGA20OX1* geninin aşırı ifadesi internodyumda hücre genişlemesini uyardığı rapor edilmiştir (Nelissen *et al.*, 2012). Tir buğdayında da derin ekime yanıtı olarak artış gösteren hücre uzaması oranının artan endojen GA düzeyleri ile potasyumun etkileşimi aracılığıyla gerçekleştiği ve buna orta yükseklikteki GA duyarlılığının eşlik ettiği söylenebilir.

Bitki dokularındaki uzama büyümesine genellikle hücre duvarı mekanik özelliklerindeki değişimler aracılık etmektedir (Cleland, 1967; Masuda, 1968; Yamamoto *et al.*, 1970). Hong Mang Mai'de GA'nın glukanaaz aktivitesini ve gen ifadesini etkileyerek hücre duvarındaki glukana oranını düşürmesi, hücre duvarı gevşemesine sebebiyet vererek, hücre genişlemesine yol açtığı bildirilmiştir (Chen

*et al.*, 2003). Buna paralel olarak; Lee and Kende (2002), Ogawa *et al.* (2003), Jan *et al.* (2004), Gallego-Bartolomé (2011), Ribeiro *et al.* (2012) ve Park *et al.* (2013) gibi farklı grupların gerçekleştirdiği çalışmalarda GA'nın hücre duvarı gevşemesini ekspansinlerin ve ksiloglukan endotransglukosilaz/endohidrolaz (XTH)'ların ifadelerini artırarak sağladığını rapor etmişlerdir. Diğer taraftan OH<sup>•</sup> radikallerinin de hücre duvarı gevşemesinde ve dolayısıyla hücre genişlemesinde iş gördükleri bilinmektedir (Schopfer and Liskay, 2006). OH<sup>•</sup> hücre duvarı POX tarafından Haber-Weiss tipi bir reaksiyon aracılığıyla O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> moleküllerinden üretilir, hücre duvarı polisakkaritleri bağları OH<sup>•</sup> tarafından parçalanır ve sonuç olarak hücre duvarı gevşemesi ve hücre uzaması sağlanmış olur.

Bu bağlamda ROS üretiminden ve ROS süpürümünden sorumlu enzimlerin birinci internodyum uzamasına eşlik eden hücre uzamasına katkı sağladığı düşünülebilir. Hücre duvarı POX (class III), çimlenmeden senesense kadar bitki hayat döngüsünün tüm süreçlerinde aktif olan bir enzimdir. Hücre duvarı gevşemesini ve hücre uzamasını indükleyebildikleri gibi hücre duvarı bileşenleri arasında çapraz bağların oluşmasına aracılık ederek hücre duvarının güçlenmesi ve dolayısıyla büyümenin sınırlandırılmasına da neden olmaktadır (Passardi *et al.*, 2004). Çalışmada elde edilen bulgulara göre Tir buğdayı birinci internodyumlarının hücre duvarı POX aktivitelerinde kontrol ve GA bitkileri arasında farklılık olduğu söylenebilir. GA uygulaması hücre duvarı POX aktivitesini artırmıştır, yani GA teşvikli uzamada ROS'ların rolü olduğu söylenebilir. Diğer taraftan, GA gruplarında derin ekimin hücre duvarı POX aktivitesi üzerindeki pozitif etkisi, kontrol bitkilerine göre çok daha azdır. GA uygulaması sonucunda muhtemelen derin ekime glukanaz, ekspansin ve XTH gibi diğer GA'ya yanıt veren hücre duvarı gevşemesinden sorumlu enzimler de yanıt vermektedir. Bununla birlikte GA teşviği olmadan, hücre duvarı POX aracılığıyla gerçekleşen hücre duvarı gevşemesinin derin ekim toleransına önemli katkı sağladığı düşünülebilir.

NOX'lar bitkilerde polen tübü uzaması, yaralanma, patojen yanıtları, tuz stresi yanıtları, stoma kapanması ve kök tüyü uzaması gibi ROS sinyalinin katılım gösterdiği birçok süreçte iş gördüğü bilinen plazma membranı proteinleridir (Marino *et al.*, 2012). NOX'ların tohum çimlenmesi, meyve olgunlaşması ve hipokotil ile kök uzaması süreçlerinde hücre duvarı gevşemesi/hücre genişlemesi aracılığıyla iş gördüğü rapor edilmiştir (Dunand *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2009). Buna paralel olarak, GA uygulanmayan Tir buğdayı birinci internodyumlarında

derin ekim uygulamasıyla NOX aktivitelerinin arttığı saptanmıştır. Yani birinci internodyum uzamasında da NOX'ların iş gördüğü söylenebilir. Derin ekim uygulanmayan bitkilerin birinci internodyumlarında NOX aktivitesinde artış belirlenirken, derin ekim uygulaması GA'nın NOX üzerindeki söz konusu indükleyici etkisini inhibe etmiştir. Hong Mang Mai'de, derine ekilen bitkilerin derine ekilmeyenlere göre daha yüksek GA duyarlılığı gösterdiği bildirilmiştir (Nishizawa *et al.*, 2002). Bu bağlamda, derin ekim uygulaması gerçekleştirilen Tir buğdaylarında da daha yüksek GA duyarlılığı aracılığıyla enzimatik hücre duvarı gevşemesi görüldüğü söylenebilir. Diğer taraftan derin olmayan ekimde GA teşvikli uzamada NOX daha baskın bir role sahiptir.

SOD, NOX aracılığıyla üretilen  $O_2^{\cdot-}$  radikalini  $H_2O_2$ 'ye dönüştürerek, hücre gevşemesinden sorumlu  $OH^{\cdot}$  radikalinin elde edildiği yolağın bileşenlerinden birisidir (Schopfer and Liskay, 2006). SOD'un aktivitesinin hıyar hipokotillerinde  $GA_3$  uygulaması sonucunda arttığı rapor edilmiştir (Li *et al.*, 2011). Buna benzer şekilde, derine ekilmeyen bitkilerde Tir buğdayı birinci internodyumlarında SOD aktivitesi artış göstermiştir. Diğer taraftan, GA gruplarında derin ekim SOD aktivitesinde düşüşe neden olurken, kontrol gruplarında derin ekim SOD aktivitesini uyarmıştır. Yani SOD aktivitesiyle NOX aktivitesinin uyumlu olduğu söylenebilir. Bu bulgu da, NOX-SOD-hücre duvarı POX yolağı aracılığıyla gerçekleşen  $OH^{\cdot}$  radikale bağlı hücre duvarı gevşemesinin Tir buğdayı birinci internodyumlarında önemli bir role sahip olduğunu gösterir niteliktedir.

Intraselüler POX (class I), CAT ile birlikte  $H_2O_2$ 'nin süpürümünden sorumlu antioksidant savunma proteinlerindedir ve kuraklık gibi stres koşulları altında aktivitesi artış göstermektedir (Uzilday *et al.*, 2011). GA uygulaması buğday birinci internodyumlarında POX aktivitesinde artışa neden olmuştur. Diğer taraftan, derine ekilmeyen bitkilerde söz konusu artışın çok daha güçlü olduğu belirlenmiştir. NOX ve SOD aktivitelerinin derine ekilmeyen bitkilerde GA uygulaması sonucunda artış gösterip, derine ekilen bitkilerde azaldıkları düşünülürse, muhtemel bir  $H_2O_2$  birikimi ve gösterebileceği toksik etkiden korunmak adına POX aktivitesinin güçlü bir artış görüldüğü düşünülebilir. Ayrıca, hem kontrol hem de GA gruplarında derin ekim uygulamasının birinci internodyumda POX aktivitesini artırdığı görülmüştür. Bu etki GA uygulanmayan gruplarda çok daha belirgindir. Sulama uygulanmadan derin ekim koşullarında yetiştirilen buğdayların kuraklık stresine maruz kaldığı, derine ekilecek buğdayda kuraklık toleransına da sahip olması gerektiği ve derin ekimin verim ve verimle

ilgili bir çok özelliği olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Farhad *et al.*, 2014). Bu bulguyla uyumlu olarak, özellikle 10 cm toprak derinliğinde (GA-) POX aktivitesinin yaklaşık 1.6 kat artış göstermesi, derin ekimin buğdayda strese yol açtığına ve antioksidant sistemi indükleyebileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte GA gruplarında bazal POX aktivite düzeyi daha yüksektir ve GA'nın hıyar hipokotillerinin antioksidant kapasitesini indükleyebildiği de düşünüldüğünde (Li *et al.*, 2011) GA'nın bazal POX aktivitesini artırarak buğdayın derin ekimin muhtemel olumsuz etkileriyle başa çıkabilmesi kolaylaştırdığı söylenebilir.

GR, AsA-GSH döngüsünde GSH'nin rejenerasyonundan sorumlu, bitki antioksidant savunma sistemi için oldukça önemli bir proteindir (Gill and Tuteja, 2010). GR büyük oranda kloroplastlarda bulunmakla birlikte, sitosolde ve mitokondride de iş görmektedir (Edwards *et al.*, 1990; Creissen *et al.*, 1994). Bitkilerde çeşitli stres faktörleri maruziyeti sonucunda GR aktivitesinin artış gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Eyidogan and Oz, 2005; Sharma and Dubey, 2005; Khan *et al.*, 2007; Melchiorre *et al.*, 2009). Derin ekim uygulaması da kontrol gruplarında GR aktivitesinde artışa neden olmuştur. Örneğin 15 cm toprak derinliğinde GR aktivitesi 1.3 katına çıkmıştır. GA gruplarında ise bazal GA aktivitesi daha fazladır. POX aktivitesiyle uyumlu olarak, GR aktivitesi de derine ekilmeyen GA bitkilerinde daha fazla artış göstermiştir. Derine ekilen bitkilerde ise GR aktivitesinin düşüş göstermesi, elde edilen POX sonuçlarıyla uyumludur. Yani GA'nın derin ekimin bitkiler üzerindeki muhtemel baskısının savuşturulmasında rol oynadığı ve kontrol gruplarında antioksidant mekanizmanın hem POX hem de GR aracılığıyla derin ekime yanıt verdiği söylenebilir.

APX su-su ve AsA-GSH döngülerinde görev alarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin süpürülmesini sağlamaktadır. APX'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı CAT ve POX'a göre daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu ve stres altında bitkilerde ROS düzenlenmesinde daha önemli bir role sahip olabileceği belirtilmektedir (Gill and Tuteja, 2010). APX aktivitesinin stres altında artış gösterdiğini kanıtlayan bir çok çalışma yayımlanmıştır (Sharma and Dubey, 2005; Srivastava *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). Bununla birlikte, hem kontrol hem de GA gruplarında derin ekim uygulaması APX seviyelerini azaltmıştır. GA uygulaması derine ekilmeyen bitkilerde APX aktivitesini değiştirmemiştir. GA gruplarında derin ekim uygulaması GR'ye benzer şekilde APX aktivitesini düşürmüştür. POX aktivitesindeki düşük seviyeli artış da düşünüldüğünde, derin ekimin gerçekten de GA uygulaması sonucunda stres etkisi göstermediği sonucuna varılabilir. Diğer

tarafından, kontrol gruplarında derin ekim nedeniyle APX aktivitesinin GR ve POX aktivitelerinin aksine düşüş göstermesi ilginçtir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksik bir hücre metabolit olmasının yanında, çeşitli faktörlere verilen yanıtların düzenlenmesinde sinyal molekülü olarak da iş gören bir moleküldür (Neill *et al.*, 2002). Bu nedenle hücre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeyleri sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Scheel and Wasternack, 2002; Mittler *et al.*, 2004). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri hem kontrol hem de GA bitkilerinde derin ekim uygulamasına karşı dalgalı bir grafik göstermiştir. *A. thaliana*'da hücre uzaması hızı ve ROS üretiminin dalgalı bir grafik gösterdiği rapor edilmiştir (Monshausen *et al.*, 2008). Bahsedilen dalgalı büyüme, hızlı ve hemen ardından gelen yavaş uzama periyodlarına sahiptir ve bunu takiben ROS üretimi artmakta ve azalmaktadır. Uzayan hücrelerdeki böyle bir dalgalı büyüme ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi düşünüldüğünde, Tir buğdayı birinci internodyumu gibi yüksek oranda hücre uzaması gösteren dokularda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ölçümünün yanıltıcı sonuçlar verebileceği söylenebilir.

Tir birinci internodyumlarının uzamasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengesinin önemi, birinci internodyum uzunluklarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasına konsantrasyona bağlı bir şekilde yanıt vermesinden de anlaşılabilir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması gerçekleştirilen bitkilerin birinci internodyum uzunluğunu önemli derecede düşürmüştür. Örneğin 120 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması birinci internodyum uzunluğunu yaklaşık 1.3 oranında azaltmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonucunda hücre uzamasının inhibe edildiği ve bunun hücre duvarı sertleşmesi aracılığıyla gerçekleşebileceği daha önce açıklanmıştır (Monshausen *et al.*, 2007). Bu bağlamda Tir birinci internodyumlarında da ROS dengesinin sağlanmasının hücre uzaması için oldukça önemli olduğu söylenebilir.

*Rht* (*Reduced height*) genleri GA duyarlılığını azaltarak buğday ya da pirinçlerin kısa boylu olmasına sebebiyet vermektedir. Kısa boylu buğday genotipleri rüzgara karşı daha dirençlidir, ayrıca gövdeleri tanelerini taşıyabilecek kadar güçlüdür. Kısa boylu genotiplerde asimilatların büyük kısmı gövde uzamasında değil tane oluşumunda kullanılarak verim artar (Hedden, 2003). *Rht* genleri, GA biyosentezini ve duyarlılığını baskılayan DELLA proteinlerini kodlamaktadır. Diğer taraftan GA da DELLA proteinlerinin degradasyonuna aracılık ederek uzamayı teşvik etmektedir. Tir buğdayı birinci internodyumlarında GA uygulaması DELLA proteini genlerinin (*Rht-A1*, *Rht-B1*, *Rht-D1*) ifadelerini önemli derecede düşürmüştür. DELLA proteinlerinin ROS detoksifikasyonunu stimüle ederek hücre genişlemesini ve dolayısıyla primer kök

ve kök tüyü uzamasını inhibe ettiği saptanmıştır (Achard *et al.*, 2008). Bu bağlamda birinci internodyumda GA'nın DELLA proteinlerinin ROS üzerindeki etkisini baskılayarak hücre uzamasını teşvik ettiği düşünülebilir.

Buğdayın derin ekim toleransına katkı yaptığı düşünülen bir diğer özellik koleoptil uzunluğudur. Hong Mang Mai'nin de (Nishizawa *et al.*, 2002) aralarında olduğu birçok buğday çeşidinde koleoptil uzunluğunun derin ekim toleransına katkı yapmadığı rapor edilmişse de (Mohan *et al.*, 2013), yapılan birçok çalışmada buğdayın derin ekim toleransı ile koleoptil uzunluğu ilişkilendirilmiştir (Schillinger *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 2002; Rebetzke *et al.*, 2005; Rebetzke *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2014). Kısa koleoptile sahip buğday çeşitleri 5 cm'den daha derine ekildiklerinde tane veriminin en az % 10 oranında düştüğü rapor edilmiştir (Reithmuller, 1990). Ayrıca koleoptil uzunluğunun kuraklık toleransına da katkı sağladığı belirtilmiştir (Farhad *et al.*, 2014). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Tır buğdayında da koleoptil uzamasının derin ekim toleransına katkı sağladığı söylenebilir. Tır buğdaylarında koleoptil uzunluğunun ekim derinliği ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Aynı pozitif korelasyon, GA ve uniconazole uygulanmış bitkilerin koleoptillerinde de gözlenmiştir. Ayrıca birinci internodyum kadar güçlü olmamakla birlikte, koleoptil GA ve uniconazole'e birinci internodyum benzeri yanıtlar verdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, Tır buğdayının derin ekim toleransında hem birinci internodyum uzaması, hem de koleoptil uzamasının katkı sağladığı söylenebilir. Tır buğdayı birinci internodyum uzamasında hücre uzamasının iş gördüğü ve bu süreçte kısmen ROS moleküllerinin iş gördüğü sonucuna varılabilir. Ayrıca derin ekimin muhtemel olumsuz etkilerinin savuşturulmasında GA'nın pay sahibi olduğu sonucuna varılmıştır.



## 5. SONUÇ

Derin ekim koşullarında yetiştirilen derin ekim toleransına sahip olmayan buğday çeşitlerinde bağıl büyüme ve yaprak yüzeyi gelişimi hızları düşüktür. Buna bağlı olarak buğdayın zararlı otlara karşı olan rekabet yeteneği azalır ve toprak yüzeyinde su kaybı artar. Sonuç olarak buğdayın su kullanma etkinliği azalarak verim düşer (Lopez-Castañeda and Richards, 1994). Ayrıca ilk yaprağın toprak yüzeyine ulaşması süresiyle, bitkinin hastalıklara karşı olan duyarlılığının korelasyon gösterdiği de rapor edilmiştir (Zhang and Wang, 2012). Sunulan yüksek lisans tezinde Tir buğdayının güçlü bir derin ekim toleransına sahip olduğu ve dolayısıyla derin ekim koşullarında yetiştirilmesinin oldukça uygun olduğu saptanmıştır. Diğer bir derin ekim toleransı buğday çeşidi Hong Mang Mai'nin aksine, Tir buğdayında sadece birinci internodyum uzaması değil, koleoptil uzaması da derin ekim toleransına katkı sağlamaktadır. Tir buğdayının orta/yüksek dereceli bir GA duyarlılığına sahip olduğu söylenebilir. Hong Mang Mai'nin GA'ya verdiği yanıt sadece birinci internodyumlarında gözlenmektedir. Tir buğdayında ise GA uygulaması sonucunda birinci internodyum ile birlikte sürgün ve koleoptil uzaması da görülmekle beraber, son ikisinin GA'ya verdiği yanıt birinci internodyum yanıtına göre oldukça düşüktür. Derin ekim uygulaması sonucunda Tir buğdayı birinci internodyumları uzama eğilimi göstermiştir. Bununla birlikte orta dereceli ve şiddetli derin ekim uygulamalarının birinci internodyum uzunluğu üzerindeki etkileri hemen hemen aynıdır. Diğer taraftan, GA uygulanmayan bitkilerde ekim derinliği ile SOD, POX ve GR antioksidant enzimleri aktivitelerinde güçlü bir indüklenme görülmesi, derin ekimin buğdayda stres yaratabileceğini işaret etmektedir. Bu sonuç, daha önce rapor edilen derin ekim koşullarının buğdayda verimliliği olumsuz etkilediği bulgusuyla uyumludur (Farhad *et al.*, 2014). Diğer taraftan, hücre duvarı POX ve NOX gibi ROS üretiminden sorumlu enzimlerin aktivitesindeki artış, birinci internodyum uzamasında temel rol oynayan hücre uzaması için gerekli hücre duvarı gevşemesi sürecinde iş gördüklerine dair kanıt sunmaktadır. Ayrıca, ROS tarafından kolaylaştırılan hücre duvarı gevşemesinin GA gruplarında kontrol gruplarına göre etkili olmadığı söylenebilir, çünkü derine ekilen bitkilerde SOD-NOX aktivitelerinde azalma gözlenirken, hücre duvarı POX aktivitelerinin de kontrol gruplarındaki kadar kuvvetli bir artış göstermediği gözlenmiştir. Bu bitkilerde GA'nın Hong Mang Mai'de olduğu gibi glukanaaz aktivite ve ifadesini artırarak hücre gevşemesini ve dolayısıyla hücre uzamasını teşvik ettiği söylenebilir. Dahası, hücre duvarı genişlemesinde rol oynayan OH<sup>•</sup> radikalinin söz konusu sürecin küçük bir kısmından sorumlu olduğu belirtilerek söz konusu radikalın

yüksek derecede toksik bir molekül olduğu için konsantrasyonları sıkı bir şekilde denetlenerek etkilerinin sadece ksiloglukanlar ve polisakkaritlerle sınırlandırılması gerekmektedir (Cosgrove *et al.*, 2005). Bu bağlamda sadece derin ekim kaynaklı stres kaynaklı değil, hücre uzaması sürecinde de açığa çıkabilecek ROS moleküllerinin indüklenen bazı antioksidant enzimler aracılığıyla süpürüldüğü söylenebilir.

Japonya'da üretilen cüce buğday genotipi Norin 10'den türevlenen, GA duyarsızlığına neden olan *Rht* genleri; kısa boylu, tane verimi yüksek ve rüzgar ile yağmura dayanıklı genotiplerin tarımda kullanılmasını sağlamıştır (Gale and Youssefian, 1985). 1960'lı ve 1970'li yıllarda gerçekleşen yeşil devrimin temeli söz konusu GA duyarsızlığına dayanmaktadır. Bugün ise kurak bölgelerde yetiştirilebilmek için derin ekime tolerans gösteren buğday çeşitlerinin kullanımı önem kazanmaktadır (Schillinger *et al.*, 1998). Hatta Chen *et al.* (2003) GA duyarlılığı yüksek söz konusu uzun buğday genotiplerinin başka bir yeşil devrime yol açabileceğini iddia etmişlerdir. Derin ekim, Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü bölgelerde olduğu gibi toprağın üst katmanın yeterli derecede nemli olmadığı yerlerde yetiştiricilerin yer altı suyundan faydalanmalarını sağladığı gibi, tohumların kuşlar veya kemirgenler tarafından yenilmesine ve bitkilerin "çıkış öncesi uygulanan herbisitler" in (trifluralin, pendimethalin) fitotoksik özelliklerinden etkilenmesine karşı da bir çözüm sunmaktadır (O'Sullivan *et al.*, 1985). Bu bağlamda, hızla yükselen dünya nüfusu ve küresel iklim değişiminin yarattığı olumsuz çevresel koşullar da düşünüldüğünde, sunulan yüksek lisans tezinde gösterilen Tir buğdayı gibi derin ekim toleranslı tahıl bitkileri üzerine yapılan çalışmalar artırılarak, tarımda mahsül veriminin sürdürülebilir bir şekilde yükseltilmesine dair geliştirmelerin sağlanmasının oldukça önemli olduğunu düşünmekteyim.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Achard, P., Renou, J.P., Berthomé, R., Harberd, N.P. and Genschik, P., 2008,** Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species, *Current Biology*, 18:656-660pp.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S. and Genschik, P., 2009,** Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*, *Current Biology*, 19:1188-1193pp.
- Allan, A.C. and Fluhr R., 1997,** Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells, *The Plant Cell*, 9:1559-1572pp.
- Allan, R.E., Peterson, C.J. and Vogel, O.A., 1962,** Seedling emergence rate of fall-sown wheat and its association with plant height and coleoptile length, *Agronomy Journal*, 54:347-350pp.
- Anthony, R.G., Henriques, R., Helfer, A., Meszaros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deak, M., Koncz, C. and Bogre, L., 2004,** A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*, *The EMBO Journal*, 23:572-581pp.
- Anthony, R.G., Khan, S., Costa, J., Pais, M.S. and Bogre, L., 2006,** The *Arabidopsis* protein kinase PTII-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXI1, *Journal of Biological Chemistry*, 281:37536-37546pp.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004,** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399pp.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971,** Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44:276-287pp.
- Bolwell, G.P. and Wojtaszek, P., 1997,** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – broad perspective, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51:347-366pp.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inzé, D., 1994,** Superoxide dismutase in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13:199-218pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254pp.
- Burnstock, G. and Verkhatsky, A.**, 2009, Evolutionary origins of the purinergic signalling system, *Acta Physiologica*, 195:415-447pp.
- Bushart, T.J. and Roux, S.J.**, 2007, Conserved features of germination and polarized cell growth: a few insights from a pollen-fern spore comparison, *Annals of Botany*, 99:9-17pp.
- Cardenas, L., McKenna, S.T., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K.**, 2006, NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth, *Plant Physiology*, 142:1460-1468pp.
- Carol, R.J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M.C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea S, Zarsky, V. and Dolan, L.**, 2005, A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells, *Nature*, 438:1013-1016pp.
- Charles, S.A. and Halliwell, B.**, 1980, Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose bisphosphatase, *Biochemical Journal*, 189:373-376pp.
- Cheeseman, J.M.**, 2006, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *Journal of Experimental Botany*, 57:2435-2444pp.
- Chen, L., Higashitani, A., Suge, H., Takeda, K. and Takahashi, H.**, 2003, Spiral growth and cell wall properties of the gibberellin-treated first internodes in the seedlings of a wheat cultivar tolerant to deep-sowing conditions, *Physiologia Plantarum*, 118:147-155pp.
- Chen, L., Nishizawa, T., Higashitani, A., Suge, H., Wakui, Y., Takeda, K and Takahashi, H.**, 2001, A variety of wheat tolerant to deep-seeding conditions: elongation of the first internode depends on the response to gibberellin and potassium, *Plant, Cell & Environment*, 24:469-476pp.
- Cheung, A.Y. and Wu, H.M.**, 2008, Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes, *Annual Review of Plant Biology*, 59:547-572pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Claeys, H., Skirycz, A., Maleux, K. and Inzé, D., 2012,** DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity, *Plant Physiology*, 159:739-747pp.
- Cleland, R., 1967,** Extensibility of isolated cell walls: measurement and changes during cell elongation, *Planta*, 74:197-209pp.
- Clore, A.M., Doore, S.M. and Tinnirello, S.M., 2008,** Increased levels of reactive oxygen species and expression of a cytoplasmic aconitase/iron regulatory protein 1 homolog during the early response of maize pulvini to gravistimulation, *Plant, Cell & Environment*, 31:144-158pp.
- Coelho, S.M., Brownlee, C. and Bothwell J.H., 2008,** A tip-high, Ca<sup>2+</sup>-interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes, *Planta*, 227:1037–1046pp.
- Coelho, S.M., Taylor, A.R., Ryan, K.P., Sousa-Pinto, I., Brown, M.T. and Brownlee, C., 2002,** Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca<sup>2+</sup> wave propagation in *Fucus* rhizoid cells, *The Plant Cell*, 14:2369-2381pp.
- Collins, G.N., 1914,** Pueblo Indian maize breeding: varieties specially adapted to arid regions developed by Hopis and Navajos—their work not sufficiently appreciated—probably much yet to be learned from them, *Journal of Heredity*, 5:255-268pp.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. and Tavladoraki, P., 2006,** Functions of amine oxidases in plant development and defence, *Trends in Plant Science*, 11:80-88pp.
- Conklin, P.L., Williams, E.H. and Last, R.L., 1996,** Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:9970-9974pp.
- Cosgrove, D.J., 2005,** Growth of the plant cell wall, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:850-861pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A.R. and Mullineaux, P.M.**, 1994, Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 102B:167-175pp.
- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A. and Mullineaux, P.**, 1999, Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress, *The Plant Cell*, 11:1277-1292pp.
- Dai, A.**, 2010, Drought under global warming: a review, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2:45-65pp.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F.**, 2000, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57:779-795pp.
- Davison, P.A., Hunter, C.N. and Horton, P.**, 2002, Overexpression of  $\beta$ -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*, *Nature*, 418:203-206pp.
- De La Guardia, M.D. and Benlloch, M.**, 1980, Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants, *Physiologia Plantarum*, 49:44-448pp.
- Demidchik, V., Nichols, C., Oliynyk, M., Dark, A., Glover, B.J. and Davies, J.M.**, 2003b, Is ATP a signaling agent in plants?, *Plant Physiology*, 133:456-461pp.
- Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B., Tester, M.A. and Davies, J.M.**, 2003a, Free oxygen radicals regulate plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -and  $\text{K}^{+}$ -permeable channels in plant root cells, *Journal of Cell Science*, 116:81-88pp.
- Demidchik, V., Shang, Z., Shin, R., Thompson, E., Rubio, L., Laohavisit, A., Mortimer, J.C., Chivasa, S., Slabas, A.R., Glover, B.J., Schachtman, D.P., Shabala, S.N. and Davies, J.M.**, 2009, Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *The Plant Journal*, 58:903-913pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demiral, T., Turkan, I. and Sekmen, A.H.**, 2011, Signaling strategies during drought and salinity, recent news, *Advances in Botanical Research*, 57:293-317pp.
- Dietz, K., Jacob, S., Oelze, M., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M., Baier, M. and Finkemeier, I.**, 2006, The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism, *Journal of Experimental Botany*, 57:1697-1709pp.
- Dunand, C., Crèvecoeur, M. and Penel, C.**, 2007, Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases, *New Phytologist*, 174: 332-341pp.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S. and Mullineaux, P.M.**, 1990, Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.), *Planta*, 180:278-284pp.
- Eyidogan, F. and Oz, M.T.**, 2005, Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 29:485-493pp.
- Farhad M.D., Abdul Hakim M.D., Ashraful Alam M.D. and Barma N.C.D.**, 2014, Screening wheat genotypes for coleoptile length: a trait for drought tolerance, *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2:237-245pp.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M. and Dolan, L.**, 2003, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature*, 422:442-446pp.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B.**, 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133:212-215pp.
- Gale, M.D., Marshall, G.A.**, 1975, The nature and genetic control of gibberellin insensitivity in dwarf wheat grain, *Heredity*, 35:55-65pp.
- Gale, M.D. and Youssefian S.**, 1985, Progress in Plant Breeding, Butterworths, London.
- Gallego-Bartolomé, J., Alabadí, D. and Blázquez, M.G.**, 2011, DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS ONE*, 6:e23918.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gapper, C. and Dolan, L.**, 2006, Control of plant development by reactive oxygen species, *Plant Physiology*, 141:341-345pp.
- Gay, C., Collins, J. and Gebicki, J.**, 1999, Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex, *Analytical Biochemistry*, 273:149-155pp.
- Gerland, P., Raftery A.E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B.K., Chunn, J., Lalic, N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G.K. and Wilmoth, J.**, 2014, World population stabilization unlikely this century, *Science*, 346:234-237pp.
- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Martín, A., and Barro, F.**, 2009, Comparative genomic analysis and expression of the APETALA2-like genes from barley, wheat, and barley-wheat amphiploids, *BMC Plant Biology*, 9:66p.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.**, 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930pp.
- Gonzalez, N., De Bodt, S., Sulpice, R., Jikumaru, Y., Chae, E., Dhondt, S., Van Daele, T., De Milde, L., Weigel, D., Kamiya, Y., Stitt, M., Beemster, G.T. and Inzé, D.**, 2010, Increased leaf size: different means to an end, *Plant Physiology*, 153:1261-1279pp.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.**, 1989, Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford.
- He, J.M., Bai, X.L., Wang, R.B., Cao, B. and She, X.P.**, 2007, The involvement of nitric oxide in ultraviolet-B-inhibited pollen germination and tube growth of *Paulownia tomentosa* in vitro, *Physiologia Plantarum*, 131:273-282pp.
- Hedden, P.**, 2003, The genes of green revolution, *Nature*, 19:5-9pp.
- Hellebust, J.A.**, 1976, Osmoregulation, *Annual Review of Plant Physiology*, 27:485-505pp.
- Herzog, V. and Fahimi, H.D.**, 1973, A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3-diaminobenzidine as hydrogen donor, *Analytical Biochemistry*, 55:554-562pp.
- Hoshikawa, K.**, 1969, Underground organs of the seedlings and the systematics of Gramineae, *Botanical Gazette*, 130:192-203pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hou, W., Liang, H., Wang, C. and Liu, D.,** 2004, Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 25: 2926-2931pp.
- Jackson, M.B.,** 1985, Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence, *Annual Review of Plant Physiology*, 36:145-174pp.
- Jan, A., Yang, G., Nakamura, H., Ichikawa, H., Kitano, H., Matsuoka, M., Matsumoto, H., Komatsu, S.,** 2004, Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is upregulated by gibberellin in rice, *Plant Physiology*, 136, 3670-3681pp.
- Jiang, M. and Zhang, J.,** 2002, Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid-and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215:1022-1030pp.
- Jones, M.A., Raymond, M.J., Yang, Z. and Smirnoff, N.,** 2007, NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase, *Journal of Experimental Botany*, 58:1261-1270pp.
- Joo, J.H., Bae, Y.S. and Lee, J.S.,** 2001, Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism, *Plant Physiology*, 126:1055-1060pp.
- Joo, J.H., Yoo, H.J., Hwang, I., Lee, J.S., Nam, K.H. and Bae, Y.S.,** 2005, Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *FEBS Letters*, 579:1243-1248pp.
- Joo, J.H., Yoo, H.J., Hwang, I., Lee, J.S., Nam, K.H., Bae, Y.S.,** 2005, Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *FEBS Letters*, 579:1243-1248pp.
- Kato, F., Araki, M., Miyazawa, Y., Fujii, N., Takeda, K., Suge, H., Takahashi, H.,** 2011, Factors responsible for deep-sowing tolerance in wheat seedlings: varietal differences in cell proliferation and the coordinated synchronization of epidermal cell expansion and cortical cell division for the gibberellin-mediated elongation of first internodes, *Annals of Botany*, 108:439-447pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kawasaki, H., Takada, H. and Kamisaka, S.**, 1978, Requirement of sodium chloride for the action of gibberellic acid in stimulating hypocotyl elongation of a halophyte, *Salicornia herbacea* L., *Plant and Cell Physiology*, 19:1415-1425pp.
- Khan, N.A., Singh, S., and Nazar, R.**, 2007, Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193:435-444pp.
- Kim, S.Y., Sivaguru, M. and Stacey, G.**, 2006, Extracellular ATP in plants. visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling, *Plant Physiology*, 142:984-992pp.
- Kozaki, A. and Takeba, G.**, 1996, Photorespiration protects C3 plants from photooxidation, *Nature*, 384:557-560pp.
- Ku, H.S., Suge, H., Rappaport, L. and Pratt, H.K.**, 1970, Stimulation of rice coleoptile growth by ethylene, *Planta*, 90:333-339pp.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D. and Schroeder, J.I.**, 2003, NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*, *The EMBO Journal*, 22:2623-2633pp.
- Laemmli, U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685pp.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.**, 1997, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:251-275pp.
- Lanteri, M.L., Laxalt, A.M. and Lamattina, L.**, 2008, Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber, *Plant Physiology*, 147:188-198pp.
- Lee, Y. and Kende, H.**, 2002, Expression of  $\alpha$ -expansin and expansin-like genes in deepwater rice, *Plant Physiology*, 130:1396-1405pp.
- Lee, Y.J. and Yang, Z.**, 2008, Tip growth: signaling in the apical dome, *Current Opinion in Plant Biology*, 11:662-671pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, S.W., Xue, L.G., Xu, S.J., Feng, H.Y. and An, L.Z.**, 2009, Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings, *Environmental and Experimental Botany*, 65:63-71pp.
- Li, Q., Li, C., Yu, X. and Shi, Q.**, 2011, Gibberellin A<sub>3</sub> pretreatment increased antioxidative capacity of cucumber radicles and hypocotyls under suboptimal temperature, *African Journal of Agricultural Research*, 6:4091-4098pp.
- Liszak, A., van der Zalm, E. and Schopfer, P.**, 2004, Production of reactive oxygen intermediates O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 'OH by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth, *Plant Physiology*, 136:3114-3123pp.
- Lombardo, M.C., Graziano, M., Polacco, J.C. and Lamattina, L.**, 2006, Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development, *Plant Signaling & Behaviour*, 1:28-33pp.
- Long, J.C., Zhao, W., Rashotte, A.M., Muday, G.K. and Huber, S.C.**, 2002, Gravity-stimulated changes in auxin and invertase gene expression in maize pulvinal cells, *Plant Physiology*, 128:591-602pp.
- Lopez-Castañeda, C. and Richards, R.A.**, 1994, Variation in temperate cereals in rain fed environment: III. Water use and water use efficiency, *Field Crops Research*, 39:85-98pp.
- Macpherson, N., Takeda, S., Shang, Z., Dark, A., Mortimer, J.C., Brownlee, C., Dolan, L. and Davies, J.M.**, 2008, NADPH oxidase involvement in cellular integrity, *Planta*, 227:1415-1418pp.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A. and Pauly, N.**, 2012, A burst of plant NADPH oxidases, *Trends in Plant Science*, 17:9-15pp.
- Masuda, Y.**, 1968, Cell-wall-degrading enzymes and cell wall loosening in oat coleoptiles, *Planta*, 83:171-184pp.
- Matsui, T., Inanaga, S., Shimotashiro, T., An, P. and Sugimoto, Y.**, 2002, Morphological characters related to varietal differences in tolerance to deep sowing in wheat, *Plant Production Science*, 5:169-174pp.
- McCall, M.A.**, 1934, Developmental anatomy and homologies in wheat, *Journal of Agricultural Research*, 48:283-322pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T. and Hiscock, S.J.**, 2006, Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk?, *New Phytologist*, 172:221-228pp.
- Melchiorre, M., Robert, G., Trippi, V., Racca, R. and Lascano, H.R.**, 2009, Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state, *Plant Growth Regulation*, 57:57-68pp.
- Messerli, M.A. and Robinson, K.R.**, 2007, MS channels in tip-growing systems: mechanosensitive ion channels, part A, *Current Topics in Membranes*, 58:393-412pp.
- Messerli, M.A., Creton, R., Jaffe, L.F. and Robinson, K.R.**, 2000, Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic  $Ca^{2+}$  during pollen tube growth, *Developmental Biology*, 222:84-98pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant Science*, 9:490-498pp.
- Mohan, A., Schillinger, W.F. and Gill, K.S.**, 2013, Wheat seedling emergence from deep planting depths and its relationship with coleoptile length, *PLoS ONE*, 8:e73314.
- Moller, I.M.**, 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 52:561-591pp.
- Monshausen, G.B. and Gilroy, S.**, 2009, Feeling green: mechanosensing in plants, *Trends in Cell Biology*, 19:228-235pp.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C. and Gilroy, S.**, 2007, Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:20996-21001pp.
- Monshausen, G.B., Messerli, M.A. and Gilroy, S.**, 2008, Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic  $Ca^{2+}$  follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 147:1690-1698pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morgan, J.M.**, 1992, Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat, *Australian Journal of Plant Physiology*, 19:67-76pp.
- Mori, I.C. and Schroeder, J.I.**, 2004, Reactive oxygen species activation of plant  $\text{Ca}^{2+}$  channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction, *Plant Physiology*, 135:702-708pp.
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R.A., Fry, S.C., Krieger-Liszkay, A. and Leubner-Metzger, G.**, 2009, In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress (*Lepidium sativum* L.) seed germination and elongation growth, *Plant Physiology*, 150:1855-1865pp.
- Nakano, Y. and Asada, K.**, 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22:867-880pp.
- Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J.**, 2002, Hydrogen peroxide signalling, *Current Opinion in Plant Biology*, 5:388-395pp.
- Nelissen, H., Rymer, B., Jikumaru, Y., Demuynck, K., Van Lijsebettens, M., Kamiya, Y., Inzé, D. and Beemster, G.T.S.**, 2012, A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division, *Current Biology*, 22:1183-1187pp.
- Nishizawa, T., Chen, L., Higashitani, A., Takahashi, H., Takeda, K. and Suge, H.**, 2002, Responses of the first internodes of Hong Mang Mai wheat to ethylene, gibberellins and potassium, *Plant Production Science*, 5:93-100pp.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C.H.**, 2002, Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling, *Journal of Experimental Botany*, 53:1283-1304pp.
- O'Donnell, B.V., Tew, D.G., Jones, O.T. and England, P.J.**, 1993, Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase, *Biochemical Journal*, 290:41-49pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- O'Sullivan, P.A., Weiss, G.M. and Friesen, D.**, Tolerance of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to trifluralin deep-incorporated in the autumn or spring, *Weed Research*, 25:275-280pp.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M. and Kuchitsu, K.**, 2008, Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, 283:8885-8892pp.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. and Asada, K.**, 1996, Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl, *Plant and Cell Physiology*, 37:790-799pp.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S.**, 2003, Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination, *The Plant Cell*, 15:1591-1604pp.
- Osborne, D.J.**, 1984, Ethylene and plants of aquatic and semi-aquatic environments: A review, *Plant Growth Regulation*, 2:169-185pp.
- Park, J., Nguyen, K.T., Park, E., Jeon, J.S. and Choi, G.**, 2013, DELLA proteins and their interacting RING finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 25:927-943pp.
- Passardi, F., Penel, C. and Dunand, C.**, 2004, Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall, *Trends in Plant Science*, 9:534-540pp.
- Pearce, S., Saville, R., Vaughan, S.P., Chandler, P.M., Wilhelm, E.P., Sparks, C.A., Al-Kaff, N., Korolev, A., Boulton, M.I., Phillips, A.L., Hedden, P., Nicholson, P. and Thomas, S.G.**, 2011, Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat, *Plant Physiology*, 157:1820-1831pp.
- Pedreira, J., Sanz, N., Pena, M.J., Sanchez, M., Queijeiro, E., Revilla, G. and Zarra, I.**, 2004, Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls, *Plant and Cell Physiology*, 45:530-534pp.
- Pitzschke, A., Schikora, A. and Hirt, H.**, 2009, MAPK cascade signalling networks in plant defence, *Current Opinion in Plant Biology*, 12:1-6pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Potikha, T.S., Collins, C.C., Johnson, D.I., Delmer, D.P. and Levine A.**, 1999, The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers, *Plant Physiology*, 119:849–858pp.
- Potocky, M., Jones, M.A., Bezdova, R., Smirnoff, N. and Zarsky, V.**, 2007, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth, *New Phytologist*, 174:742-751pp.
- Prado, A.M., Porterfield, D.M. and Fejjo, J.A.**, 2004, Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes, *Development*, 131:2707-2714pp.
- Purves, W.K.**, 1966, Monovalent cations and growth regulation. I. Growth responses in cucumber hypocotyl segments, *Plant Physiology*, 41:230-233pp.
- Purvis, A. C. and Shewfelt, R. L.**, 1993, Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?, *Physiologia Plantarum*, 88:712-718pp.
- Radley, M.**, 1970, Comparison of endogenous gibberellins and response to applied gibberellin of some dwarf and tall wheat cultivars, *Planta*, 92:292-300pp.
- Rasmusson A.G., Soole K.L. and Elthon T.E.**, 2004, Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria, *Annual Review of Plant Biology*, 55:23-39pp.
- Rebetzke, G.J., Bruce, S.E. and Kirkegaard, J.A.**, 2005, Longer coleoptiles improve emergence through crop residues to increase seedling number and biomass in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant and Soil*, 272:87-100pp.
- Rebetzke, G.J., Richards, R.A., Fettell, N.A., Long, M. and Condon, A.G.**, 2007, Genotypic increases in coleoptile length improves stand establishment, vigour and grain yield of deep-sown wheat, *Field Crop Research*, 100:10-23pp.
- Reichler, S.A., Torres, J., Rivera, A.L., Cintolesi, V.A., Clark, G. and Roux, S.J.**, 2009, Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide, *Journal of Experimental Botany*, 60:2129-2138pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reithmuller, G.P.**, 1990, Machinery for improved crop establishment in Western Australia, In "Agricultural Engineering Conference", 1990:40-45pp.
- Renew, S., Heyno, E., Schopfer, P. and Liskay, A.**, 2005, Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and *Arabidopsis* seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy, *The Plant Journal*, 44:342-347pp.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H. and Knight, M.R.**, 2004, OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*, *Nature*, 427:858-861pp.
- Ribeiro, D.M., Araújo, W.L., Fernie, A.R., Schippers, J.H.M. and Mueller-Roeber, B.**, 2012, Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*, 63:2769-2786pp.
- Ringli, C., Baumberger, N., Diet, A., Frey, B. and Keller, B.**, 2002, ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 129:1464-1472pp.
- Roux, S.J. and Steinebrunner, I.**, 2007, Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants, *Trends in Plant Science*, 12:522-527pp.
- Sagi, M. and Fluhr, R.**, 2006, Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases, *Plant Physiology*, 141:336-340pp.
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J.W. and Fluhr, R.**, 2004, Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*, *The Plant Cell*, 16:616-628pp.
- Samaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bogre, L., Baluska, F. and Hirt, H.**, 2002, Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth, *The EMBO Journal*, 21:3296-3306pp.
- Scheel, D. and Wasternack, C.**, 2002, Plant Signal Transduction, Oxford University Press, Oxford.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Schillinger, W.F., Donaldson, E., Allan, R.E. and Jones, S.S.**, 1998, Winter wheat seedling emergence from deep sowing depths, *Agronomy Journal*, 90:582-586pp.
- Sharma, P. and Dubey, R.S.**, 2005, Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant, *Journal of Plant Physiology*, 162:854-864pp.
- Schopfer, P. and Liskay, A.**, 2006, Plasma membrane-generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants, *BioFactors*, 28:73-81pp.
- Schopfer, P.**, 2001, Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth, *The Plant Journal*, 28:679-688pp.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G. and Wagner, A.**, 2002, Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth, *Planta*, 214:821-828pp.
- SeEVERS, P.M., DALY, J.M. and CATEDRAL, F.F.**, 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant Physiology*, 48:353-360pp.
- Sheffield, J. and Wood, E.F.**, 2008, Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations, *Climate Dynamics*, 13:79-105pp.
- Siedow, J. N. and Day, D.A.**, 2000, Respiration and photorespiration, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, 676-728pp.
- Singh, K., Shukla, S., Kadam, S., Semwal, V. K., Singh, N. K. and Khanna-Chopra, R.**, 2014, Genomic regions and underlying candidate genes associated with coleoptile length under deep sowing conditions in a wheat RIL population, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 10:1-7pp.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G. and Ohlrogge, J. B.**, 2000, Lipids, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, 456-527pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srivastava, A.K., Bhargava, P. and Rai, L.C.**, 2005, Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22:1291-1298pp.
- Sternberg, T.**, 2011, Regional drought has a global impact, *Nature*, 472:169p.
- Suge, H., Nishizawa, T., Takahashi, H. and Takeda, K.**, 1997, Phenotypic plasticity of internode elongation stimulated by deep-seeding and ethylene in wheat seedlings, *Plant, Cell & Environment*, 20:961-964.
- Sun, Y., Solomon, S., Dai, A. and Portmann, R.W.**, 2006, How often does it rain?, *Journal of Climate*, 19:916-934pp.
- Swanson, S. and Gilroy, S.**, 2010, ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*, 138:384-392pp.
- Takahashi, M. and Asada, K.**, 1988, Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267:714-722pp.
- Takeda, K. and Takahashi, H.**, 1999, Varietal variation for deep-seeding tolerance in barley and wheat, *Breeding Research*, 1:1-8pp.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K. and Dolan, L.**, 2008, Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells, *Science*, 319:1241-1244pp.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L.**, 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, *Current Opinion in Plant Biology*, 8:397-403pp.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. and Jones, J.D.**, 2002, *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:517-522pp.
- Troyer, A.F.**, 1997, The location of genes governing long first internode of corn, *Genetics*, 145: 1149-1154pp.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K. and Kobayashi, H.**, 1999, A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification, *The Plant Cell*, 11:1195-1206pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Turkan, I. and Demiral, T., 2009,** Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 67:2-9pp.
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J. and Bennett, M.J., 2009,** Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Current Biology*, 19:1194-1199pp.
- Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A.H., Ozgur, R. and Karakaya, H.C., 2011,** Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C<sub>4</sub>) and *Cleome spinosa* (C<sub>3</sub>) under drought stress, *Plant Science*, 182:59-70pp.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H., 2000,** Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction, *Plant Physiology*, 123:1289-1300pp.
- Vernoux, T., Sanchez-Fernandez, R. and May, M., 2002,** Glutathione biosynthesis in plants, *Oxidative Stress in Plants*, Taylor and Francis, London, 297-311pp.
- Vitória, A.P., Lea, P.J. and Azevedo, R.A., 2001,** Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues, *Phytochemistry*, 57:701-710pp.
- Weerasinghe, R.R., Swanson, S.J., Okada, S.F., Garrett, M.B., Kim, S.Y., Stacey, G., Boucher, R.C., Gilroy, S. and Jones, A.M., 2009,** Touch induces ATP release in *Arabidopsis* roots that is modulated by the heterotrimeric G-protein complex, *FEBS Letters*, 583:2521-2526pp.
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y. and Lebwohl, M., 2002,** Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein, *Cancer Letters*, 185:21-29pp.
- Wen, W., Deng, Q., Jia, H., Wei, L., Wei, J., Wan, H., Yang, L., Cao, W. and Ma, Z., 2013,** Sequence variations of the partially dominant DELLA gene Rht-B1c in wheat and their functional impacts, *Journal of Experimental Botany*, 64:3299-3312pp.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. and Hancock, J.T., 2008,** Nitric oxide synthesis and signalling in plants, *Plant, Cell & Environment*, 31:622-631pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wojtaszek, P.**, 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochemical Journal*, 322:681-692pp.
- Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K.**, 2007, Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension, *The Plant Cell*, 19:4022-4034pp.
- Yamamoto, R., Shinozaki, K. and Masuda, Y.**, 1970, Stress-relaxation properties of plant cell walls with special reference to auxin action, *Plant Cell Physiology*, 11:947-956pp.
- Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B. and Wang, J.**, 2008, Wang Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30:433-440pp.
- Zhang, H. and Wang, H.**, 2012, Evaluation of drought tolerance from a wheat recombination inbred line population at the early seedling growth stage, *African Journal of Agricultural Research*, 7:6167-6172pp.

## ÖZGEÇMİŞ

Turgut Yiğit AKYOL, 30.10.1986 tarihinde İzmir’de doğmuştur. Karşıyaka Anadolu Lisesi’nden 2004 yılında mezun olarak ortaöğrenimini tamamlamıştır. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çevre Biyolojisi Ağırlıklı Biyoloji Programından 2012 yılında mezun olmuştur. 2012 yılında lisansüstü eğitimine, Prof. Dr. İsmail Türkan danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında başlamıştır. 2014 yılının Mayıs ayından itibaren 114Z034 numaralı ve “*Triticum aestivum* cv. Tır Buğdayının Kuraklık Toleransına Katkı Yapan Birinci İnternodyum Uzamasında Giberellin (GA<sub>3</sub>), Reaktif Oksijen Türleri (ROS), K<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> Arasındaki Etkileşimin Araştırılması” adlı TÜBİTAK COST projesinde bursiyer olarak görev almaktadır.

