

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**NO-KÖKENLİ RNS'LERİN HÜCRE DUVAR
MODÜLASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Çağlar CANDAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aşkın Hediye SEKMEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.00

Sunuş Tarihi: 13.08.2018

Bornova-İZMİR

2018

Çağlar CANDAN tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “NO-kökenli RNS’lerin Hücre Duvar Modülasyonuna Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Doç. Dr. Aşkım Hediye SEKMEN



Raportör Üye

: Prof. Dr. Melike BOR



Üye

: Prof. Dr. Okan ACAR

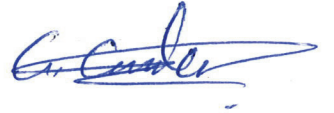


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “NO-kökenli RNS’lerin Hücre Duvar Modülasyonuna Etkisinin 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.

13 / 08 / 2018



Çağlar CANDAN

ÖZET**NO-KÖKENLİ RNS'LERİN HÜCRE DUVAR MODÜLASYONUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CANDAN, Çağlar

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aşkın Hediye SEKMEN

Ağustos 2018, 59 sayfa

Tahıl bitkilerinin tohumları genellikle toprak yüzeyinin yaklaşık birkaç cm altında olacak şekilde ekilir. Fakat toprağın üst kısımlarında yeterli derecede nemin olmadığı yarı kurak bölgelerde bitkileri yetiştirebilmek için tohumlar daha derine ekilirler. Bu sayede tohumların çimlenebilmesi için gereksinim duydukları su nemli topraktan alınmış olur. Bu koşullarda yetişebilecek bitkinin derin ekim toleransına adapte olmuş bir bitki olması gerekmektedir. Buğday bitkisinin derin ekim toleransı birinci internodyumun uzamasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Uzama mekanizmasının anahtar kısmı hücre duvarının gevşemesi ve buna bağlı hücrenin uzamasıdır. Bu uzama mekanizmasına giberellin gibi hormonların veya hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin etki gösterdiği üzerine çeşitli çalışmalar yapılmış olsa da, bugüne kadar birinci internodyum uzamasında RNS moleküllerinin etkisi üzerine herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca, RNS moleküllerinin bu tür fizyolojik süreçlerde ROS ve buna bağlı enzimlerle ilişkisinin önemi de son dönemlerde ortaya konmuştur. Bu bağlamda sunulan yüksek lisans tezinde, derin ekim toleransına sahip Tır buğdaylarına c-PTIO (NO ve NO sentaz inhibitörü) uygulanmış ve bitkiler hem normal hem de derin ekim koşullarında yetiştirilmiştir. 10 günlük bitkiler hasat edilerek birinci internodyum, koleoptil ve sürgün uzunlukları ölçülmüş ve hem derin ekime yanıt hem de NO duyarlılığı belirlenmiştir. Ayrıca birinci internodyumlarda bazı antioksidan enzimlerinin aktivitelerine bakılarak (POX, CAT) ve ROS üreten hücre duvarı POX ve NOX enzimlerinin aktiviteleri de belirlenerek, birinci internodyumun uzamasında RNS'nin etkisi ve bu uzamada ROS molekülleriyle ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Anahtar sözcükler: Buğday, derin ekim, birinci internodyum, RNS, hücre duvarı, antioksidan sistem

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NO-ORIGIN RNS ON THE
CELL WALL MODULATION**

CANDAN, Çağlar

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aşkın Hediye SEKMEN

August 2018, 59 pages

The seeds of cereal plants are generally planted under nearly a few centimeters of the soil surface. However, in order to be grown, the seeds are planted deeper in the higher layers of soil that has not enough moist. Thus, plants can take the sufficient water for germination and seedling through moistened soil by the underground water. It is necessary that the plant should adapt to deep sowing tolerance. The deep sowing tolerance of wheat occurs depending on the first internode elongation. The key part of elongation mechanism is loosening of the cell and accordingly elongation. Although there are some studies done related to the effects of hormones as gibberellin and reactive oxygen species as hydroxyl radical on this mechanism, there is no study done about the impact of RNS molecules on the first internode elongation. In addition, recently, the importance of the relation between ROS and enzymes depending on this in the physiological process has been carried out. In the master thesis presented within this context, c-PTIO (NO and NO synthase inhibitor) is applied to Tirm wheat that have deep sowing tolerance and the plants are grown both normal and deep sowing conditions. The first internode, coleoptile and growth length of 10 days old plants are measured and both the answer to deep sowing and NO sensitivity are defined by harvesting. Besides, by observing some antioxidative enzymes activities in the first internodes (POX, CAT) and by defining the enzyme activities of CWPOX and NOX that are producing ROS. It is aimed to clarify that the effects of RNS on the first internode elongation and the relation of ROS molecules in this elongation.

Keywords: Wheat, deep sowing, first internode, RNS, cell wall, antioxidant system



TEŞEKKÜR

Öncelikle, lisansüstü eğitim sürecimde bana engin bilgilerini sunan, beni yetiştiren ve kattıklarıyla geliştiren, benim için bir hocadan daha fazlası olan Sayın Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bana destek olan ve eğitimime katkı sağlayan diğer değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a, Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Melike BOR'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Barış UZİLDAY'a, Araş. Gör. Dr. Rengin ÖZGÜR'e ve Sayın Araş. Gör. Dr. Ali ÖZCAN'a; çalışmalarımda destek olan diğer meslektaşlarım Uzm. Azime GÖKÇE'ye, Uzm. Tolga YALÇINKAYA'ya, Elif EKEROĞLU'na, Damla GÜRDAL'a, Melis YÜNLÜ'ye, bu süreçte beraber çalıştığım ve sayısız anı biriktirdiğim Uzm. Osman DELİAVCI'ya ve diğer tüm genel biyoloji ekibi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, bu süreçte bana maddi ve manevi her zaman destek olan ve bu eğitim sürecini başarıyla tamamlamamı sağlayan sevgili ailem Mesut CANDAN'a, Fatma CANDAN'a, Kamil CANDAN'a ve hayat arkadaşım, güç kaynağım ve başarılarımın arkasındaki kadın Bengü ÖZGÜR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER 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	4
1.2 Azot Oksit ve Azot Oksit Türevli Moleküller	6
1.2.1 NO molekülü ve biyokimyasal özellikleri	6
1.2.2 Bitki fizyolojisinde NO rolleri	8
1.2.3 NO türevli reaktif türler	11
1.3 NO Moleküllerinin Bitki Büyüme ve Gelişmesindeki Rolü	13
1.3.1 NO ve büyüme ilişkisi	14
1.4 Bitki Hücre Duvar Yapısı ve Uzama Mekanizması	15
1.4.1 Bitki hücre duvar yapısı	15

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.4.2 Bitki hücre duvarı uzama mekanizması	18
2. MATERYAL VE METOT	21
2.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni	21
2.2 Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	22
2.2.1. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri	22
3. BULGULAR	25
3.1 Farklı Konsantrasyonlardaki “NO Sentaz” ve “NO” İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Farklı Derinliklerdeki Tır Buğdayının Koleoptil Uzaması Üzerindeki Etkisi.....	25
3.1.1 “NO Sentaz” ve “NO” İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen <i>Triticum aestivum</i> cv. Tır’in Koleoptil ve Birinci İnternodyum Uzaması Üzerindeki Etkisi.....	25
3.1.2 Farklı Konsantrasyonlardaki “NO Sentaz” ve “NO” İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Farklı Derinliklerdeki Tır Buğdayının Birinci İnternodyum Uzaması Üzerine Etkisi.....	25
3.2 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ve NO İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Uygulamasının, Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen <i>Triticum aestivum</i> cv. Tır’in Birinci İnternodyum ve Koleoptilindeki Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Hücre Duvar Peroksidazı (CWPOX) ve NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.1 Dışarıdan c-PTIO Uygulamasının Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen (2 cm ve 15 cm) <i>Triticum aestivum</i> cv. Tır'ın Birinci İnternodyumundaki Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Hücre Duvar Peroksidazı (CWPOX) ve NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi	27
3.2.1.1 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	27
3.2.1.3 Hücre Duvar Peroksidaz (CWPOX) Enzim Aktivitesi.....	28
3.2.1.2 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi.....	28
3.2.1.4 NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktivitesi.....	29
3.2.2 Dışarıdan c-PTIO Uygulamasının Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen (2 cm ve 15 cm) <i>Triticum aestivum</i> cv. Tır'ın Koleoptilindeki Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Hücre Duvar Peroksidazı (CWPOX) ve NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi	30
3.2.2.1 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	30
3.2.2.2 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi	30
3.2.2.3 Hücre Duvar Peroksidaz (CWPOX) Enzim Aktivitesi.....	31
3.2.2.4 NADPH Oksidaz Enzim Aktivitesi	31
3.3 Dışarıdan c-PTIO Uygulamasının Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen (2 cm ve 15 cm) <i>Triticum aestivum</i> cv. Tır'ın Birinci İnternodyum ve Koleoptilindeki Lipid Peroksidasyon (TBARS) Seviyesi Üzerindeki Etkisi	32
4. TARTIŞMA	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR DİZİNİ	43
ÖZGEÇMİŞ	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Buğday fidesinin kısımları	3
1.2 Nitrik oksit sentaz ve nitrat redüktaz enzimlerinin aktivitesiyle azot oksit oluşumunun gösterilmesi.....	8
1.3 Bitkilerin gelişim süreçlerinde NO'nun etkisi	10
1.4 Azot oksit aracılı post translasyonel modifikasyon modelinin şematik gösterimi.....	13
1.5 Bitki hücresinin plazma membranlarında bulunan rozet yapısı ve selüloz mikrofibrillerinin oluşumu	17
1.6 Ksiloglukanın yapısı	17
1.7 Bitki hücre duvar yapısı	17
1.8 Fenton, Haber-Weiss reaksiyonları ve hidroksil radikalının oluşumu	20
2.1 10 günlük buğday fideleri (kontrol).....	21
2.2 İnternodyum hasat şeması.....	22
3.1 100, 200 ve 300 µM c-PTIO'nun, 2 ve 15 cm toprak derinliklerine ekilen <i>Triticum aestivum</i> cv. Tir buğdayının koleoptil uzaması üzerine etkisi.....	25
3.2 100, 200 ve 300 µM c-PTIO'nun, 2 cm ve 15 cm toprak derinliklerine ekilen <i>T. aestivum</i> cv. Tir buğdayının birinci internodyum uzaması üzerine etkisi.....	26
3.3 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tir'in birinci internodyumundaki katalaz (CAT) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.4 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın birinci internodyumundaki peroksidaz (POX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	28
3.5 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın birinci internodyumundaki peroksidaz (POX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	28
3.6 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın birinci internodyumundaki hücre duvar peroksidaz (CWPOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	29
3.7 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın birinci internodyumundaki NADPH Oksidaz (NOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	29
3.8 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın koleoptilindeki peroksidaz (POX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	30
3.9 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın koleoptilindeki hücre duvar peroksidaz (CWPOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	31
3.10 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın koleoptilindeki NADPH oksidaz (NOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	32
3.11 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın birinci internodyumundaki TBARS seviyesi üzerindeki etkisi	33
3.12 Dışarıdan 200 µM c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı <i>T. aestivum</i> Tır'ın koleoptilindeki TBARS seviyesi üzerindeki etkisi.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAT	Katalaz
c-PTIO	Carboxy-PTIO potassium salt
CWPOX	Hücre duvarı peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSNO	S-Nitrosoglutasyon
GSNOR	S-Nitrosoglutasyon redüktaz
NO	Azot oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOX	NADPH oksidaz
NR	Nitrat redüktaz
POX	Peroksidaz
PTM	Post translasyonel modifikasyon
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SNP	Sodium nitroprusside

1. GİRİŞ

Küresel ısınma ve iklim değişimi, gün geçtikçe önemi daha da artan bir küresel sorun haline dönüşmüştür. Küresel iklim değişiminin en önemli noktası ise kuraklıktır. Günümüzde kuraklık; tarım alanları üzerinde olumsuz etkilere neden olan birçok faktör arasında en yaygın olanıdır (Sternberg, 2011). Özellikle son yıllarda küresel ısınmayla birlikte su kaynaklarının giderek azalmasına bağlı olarak kuraklık her geçen gün daha ciddi bir sorun olmaktadır (Dai, 2011). Yağış miktarının azalmasına bağlı olarak oluşan kurak bölgeler kuraklık stresinden fazlasıyla etkilenmektedir (Sun *et al.*, 2006). Son 40 yılda dünya genelinde, özellikle de sıcaklığın yüksek olduğu bölgeler olan Afrika, Güney Avrupa ve Doğu Avustralya'da kurak alanların artışı görülmektedir (Dai, 2011).

Kuraklık, birçok stres faktörü arasında tarımda verimliliği önemli derecede etkileyen ciddi bir faktördür. Günümüzde tarım alanlarının giderek azaldığını ve nüfus artışına bağlı olarak besin ihtiyacının da giderek arttığını dikkate alırsak, tarımda devamlılığın ve ürün veriminin sağlanması son derece önemlidir. Birçok olumsuz çevresel faktörün yanında, 2014 yılında yapılan World Population Prospects (WPP) yayınının verilerine göre, dünya nüfusunun da giderek artmış olması ve gelecekte de bu artışın hızla devam edecek olması besin kıtlığı açısından oldukça önemli bir diğer faktördür (Gerland *et al.*, 2014). Özellikle bu durum göz önünde bulundurulduğunda, oluşabilecek besin sorununa çözüm olarak stres faktörlerine karşı toleranslı bitkilerin kullanılabilirliği ve sürdürülebilirliği insanoğlu için oldukça önemlidir.

Toleranslı bitkilerin kullanımı çiftçiler tarafından uzun yıllardır yapılmaktadır. Örneğin; su kaynaklarının kısıtlı olduğu tarım alanlarında derin ekim toleransına sahip tahıl bitkileri yetiştiriciler tarafından kullanılmaktadır (Collins, 1914; Allan *et al.*, 1962; Takeda and Takahashi, 1999). Derin ekim yapılmasındaki amaç, kurak bölgelerdeki toprağın üst katmanlarının yeterince nemli olmamasıdır. Böylece bitkiler, çimlenmeleri için gerekli olan suyu daha alt katmanlardan, yer altı suyuyla nemlenmiş topraktan alırlar. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri'nin güneybatısı ve Meksika'nın batısında 25 ile 30 cm derinlikten çıkarak yetişen bir mısır türü vardır (Collins, 1914; Troyer, 1997).

Başka bir örnek olarak Çin'in Loess Platosu'nda yetişen yerel bir buğday çeşidi olan Hong Mang Mai verilebilir (Takeda and Takahashi, 1999). Bu buğday 18 ile 20 cm derinlikten internodyumun uzaması sayesinde çıkabilmektedir (Suge *et al.*, 1997). Bugüne kadar araştırmacılar tarafından derin ekimle ilgili çalışmalar yapılmış olsa da, özellikle buğdayda derin ekim toleransı ile ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır.

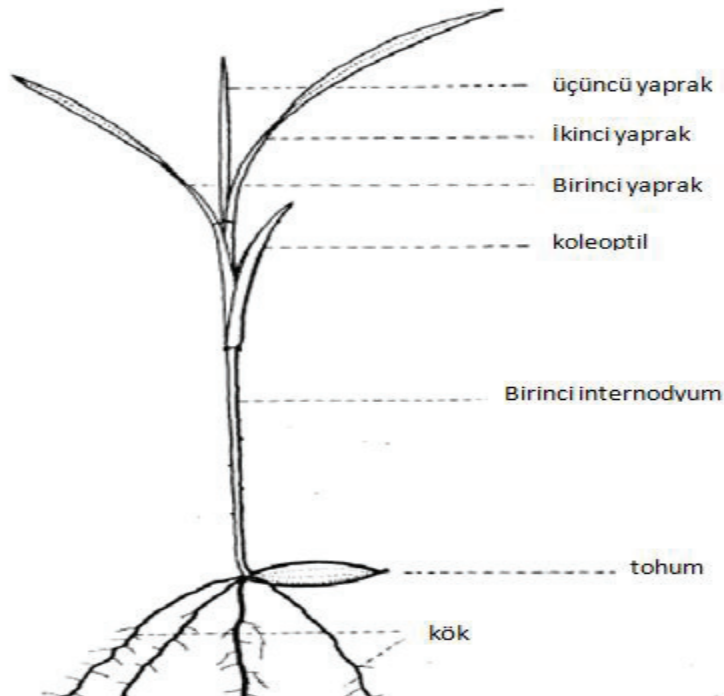
Azot oksit (NO), bitkilerde optimum ve stres koşulları altında birçok fizyolojik süreç de görev alan serbest gaz radikali formunda bir sinyal molekülüdür (Lamattina *et al.*, 2003; Corpas *et al.*, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008). Yapılan araştırmalarda fizyolojik süreçlerde azot oksidin yanı sıra NO türevli moleküllerin de işlev gösterdiği tespit edilmiştir. NO ve bulunmuş bu NO türevli moleküllerin tümüne birden Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) denilmektedir. NO türevli moleküller S-nitrosotiols, S-nitrosoglutasyon, peroksinitrit gibi moleküller olup hayvan ve bitki hücrelerinde birçok fizyolojik süreçlerde rol oynarlar (Halliwell and Gutteridge, 2007). RNS molekülleri, bitkilerde optimum ve stres koşullarında çoğunlukla sitozol başta olmak üzere kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi organellerde üretilmektedir. Yapılan çalışmalarda özellikle stres koşulları altında RNS miktarında artış görüldüğü ve bu moleküllerin bitkilerde biyotik ve abiyotik stresden korunmak için önemli görevler üstlendiği tespit edilmiştir (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Wendehenne *et al.*, 2004; Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2012). Bunun yanında, RNS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişmesinden hormonal sinyal iletimine kadar birçok fizyolojik süreçte önemli görevler üstlendiği bilinmektedir (Guo and Crawford, 2005; Grün *et al.*, 2006; Wilhelmova *et al.*, 2006; Lozano-Juste *et al.*, 2011; Fernandez-Marcos *et al.*, 2012).

Bugüne kadar RNS moleküllerinin birinci internodyum uzamasındaki rolleri üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Buğdayda derin ekim toleransı olarak birinci internodyum uzamasındaki fizyolojik mekanizmanın aydınlatılması, daha öncede bahsedildiği gibi dünya genelinde yaşanacak kuraklığa ve nüfus artışına bağlı sıkıntıların giderilmesi ve tarımda verimliliğin devam ettirilebilmesi için oldukça önemlidir. Bu yüzden sunulan bu yüksek lisans tezinde, RNS'lerin, Van bölgesinde tarımı yapılan derin ekim toleransına sahip *Triticum aestivum* cv. Tir

buğdayında birinci internodyum uzamasına etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen verilerin anlaşılması ve yorumlanabilmesi için, derim ekim toleransı ve internodyum uzaması, ayrıca bitkilerde RNS molekülleri ile bu moleküllerin bitki büyüme ve gelişimindeki rolleri üzerine detaylı anlatım yapılacaktır.

1.1 Tahıl Bitkilerinde Derin Ekim Toleransı

Tahıl bitkileri derim ekim koşullarında farklı yolaklar kullanmaktadırlar. Örneğin; mısır bitkisi derim ekim koşulunda apikal meristemlerini toprak yüzeyine ulaştırmak için mezokotillerini uzatırken, buğdayda mezokotil uzaması görülmemektedir. Buğday stratejik olarak birinci internodyum uzamasını gerçekleştirir (Şekil 1.1). Bunun dışında arpa ve pirinç bitkileri derim ekimde hem mezokotil hem de birinci internodyum uzaması gösterirler (Hoshikawa, 1969). Sonuç olarak farklı tahıl bitkileri farklı stratejiler izleyerek derin ekim adaptasyonu olarak toprak yüzeyine ulaşmaya çalışırlar. Tanım olarak bitkilerin bu özelliğine de derin ekim toleransı adı verilmektedir (McCall, 1934; Hoshikawa, 1969).



Şekil 1.1. Buğday fidesi kısımları. Koleoptilin altında yer alan birinci internodyumun uzaması sayesinde derin ekim toleransı oluşur (Hoshikawa'dan 1969).

Ayrıca bazı yarı-sucul ve sucul bitkiler su altından koleoptil, internodyum veya petiol uzatarak çıkabilmektedirler (Ku *et al.*, 1970; Osborne, 1984; Jackson, 1985). Buğday çeşitleri üzerinde yapılan çalışmalarda koleoptil uzunluğunun fidenin toprak yüzeyine çıkmasıyla ilişkisi arasında uyum olduğunu gösteren veriler olsa da özellikle yakın zamanda yapılan çok sayıda buğday türünün kullanıldığı bir çalışmada koleoptilin toprak yüzeyine ulaşmada önemli olmadığı belirtilmiştir (Rebetzke *et al.*, 2007; Mohan *et al.*, 2013). Derin ekim toleransına sahip Hong Mang Mai buğday türünün toleransı bulunmayan iki buğday türüyle yapılan karşılaştırılmasında koleoptil uzunlukları arasında belirli bir farkın olmadığı gösterilmiştir (Suge *et al.*, 1997).

1.1.1 Buğdayda Birinci İternodyum Uzaması

Daha öncede belirtilen derim ekim toleransına sahip bitki olan Hong Mang Mai varyetesi üzerine yapılan çalışmalar bizlere birçok veriyi sunmaktadır. Bu türün fidelerinin internodyum uzunluğunun, tolerans göstermeyen varyetelerin internodyumuna göre daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Suge *et al.*, 1997). Bu uzunluğun ekim derinliğine bağlı olmadığı gösterilirken, en uzun birinci internodyumun ise 8 cm'lik toprak derinliğinden çıkanlarda görülmektedir. Suge *et al.* (1997) tarafından yapılan bir çalışmada da etilenin birinci internodyum uzamasında görev aldığını gösterilmiştir. Fakat etilen ile derim ekim toleransı oluşturma yeteneği arasında net bir ilişkinin olmadığı da belirtilmiştir (Nishizawa *et al.*, 2002). Aynı araştırmada bitkilere giberellin uygulaması yapılmış ve birinci internodyumun uzamasını indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca potasyum uygulaması yapılan Hong Mang Mai bitkisinde birinci internodyum uzamasının arttığı tespit edilmiştir. Buğdayda kuraklık stresine karşı ozmotik düzenlenme yanıtının oluşumunda potasyumun görev yaptığı bilinmektedir (Morgan, 1992).

Yapılan bir diğer çalışmada, Hong Mang Mai'de ekzojen giberellin uygulaması yapıldığında sadece birinci internodyumun buna karşılık verdiği tespit edilmiştir. Ayrıca internodyumların 45 cm'e kadar uzadığı gösterilirken, zıt olarak derin ekime toleransı olmayan çeşitlerin (Hope ve Norin) giberelline yanıt vermediği gösterilmiştir (Chen *et al.*, 2001). Buna paralel bir çalışmada da giberellin uygulanmış bitkilerde giberelline bağlı indüklenen genlerin

transkripsiyon faktörü olan *GAMyb*'nin ifadesinin ciddi seviyede arttığı ve bu artışın 7 günlük fidelerde sadece birinci internodyumda olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak, giberellin uygulanmış Hong Mang Mai'de birinci internodyum uzamasında hücre duvar esnekliğine bakılmış ve aralarında bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Chen *et al.*, 2003). Glukanaz aktivitesi ve glukan içeriği bakıldığında da sonuçların hücre duvarı esnekliğiyle bağdaştığı görülmektedir. Kısaca giberellin, glukanaz ifadesine etki ederek glukan oranını düşürerek hücre duvarı gevşemesine ve hücrelerin genişlemesine neden olmaktadır.

Son yapılan araştırmalar sayesinde, güçlü bir derim ekim toleransına sahip olan Tir buğdayının derim ekim koşullarında birinci internodyumlarını uzatarak derin ekime tolerans oluşturdıklarını bilmekteyiz. Buna ek olarak sadece internodyumların değil, aynı zamanda koleoptillerinde derim ekim toleransına katkı sağladığı gösterilmiş, ayrıca giberellin uygulaması sonucunda sürgün ve koleoptil uzaması da tespit edilmiştir. Buna ek olarak, tıpkı Hong Mang Mai'de ki gibi bu bitkilerde de giberellinin glukanaz ifadesini artırarak hücre duvar gevşemesine ve hücrenin uzamasına etki ettiklerini görmekteyiz. Hong Mang Mai'nin derim ekim toleransının aydınlatılması için yapılan bir diğer çalışmada birinci internodyumda hücre genişlemesi ve çoğalması araştırılmıştır (Kato *et al.*, 2011). Çalışma sonucunda internodyum uzamasının hücre bölünmesiyle gerçekleştiği, hücre genişlemesine bağlı olmadığı vurgulanmıştır. Derin ekim toleransına sahip olmayan türlere göre bakıldığında epidermis ve kortekste hücre sayısının fazla olduğu tespit edilmiştir.

Kısaca buğdayda derim ekim toleransı ile ilgili bilgileri özetleyecek olursak: Hong Mang Mai fidelerinin giberelline duyarlılığının diğer varyetelere göre fazla olduğunu ve giberellin uygulamasının birinci internodyumu 45 cm'ye kadar uzattığını söyleyebiliriz. Buna ek olarak potasyumunda buna katkı sağladığını söyleyebiliriz. Ayrıca Hong Mang Mai birinci internodyumlarında hücre duvar esnekliğinin fazla olduğunu ve giberellin uygulamasının bu esnekliği arttığını görmekteyiz. Fakat yapılmış tüm çalışmalara rağmen buğdayda derim ekim toleransı tümüyle aydınlatılamamıştır. Bitki büyüme ve gelişmesinde, kök uzamasında ve birçok başka fizyolojik süreçte rol oynayan RNS moleküllerinin

birinci internodyum uzaması üzerindeki rolleri hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır. RNS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki rolleri üzerine yapılan çalışmaları da dikkate alırsak, öncelikle RNS moleküllerinin özelliklerinden bahsedilecek, daha sonra da RNS moleküllerinin bitki büyüme ve gelişimindeki rolleri hakkında detaylı bilgiler verilecektir.

1.2 Azot Oksit ve Azot Oksit Türevli Moleküller

Bilim adamları tarafından NO molekülünün hayvan fizyolojik süreçlerinde sinyal molekülü olarak işlev gösterilmesinden sonra, bu molekül bitki fizyolojisi çalışmalarında da önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar neticesinde artık azot oksidin biyolojik bir molekül olduğunu ve bitkilerin fizyolojik süreçlerinde önemli roller aldıklarını bilmekteyiz. Bitki fizyolojisindeki rolleri hakkında son yıllarda birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen henüz azot oksidin ve NO türevli moleküllerin (RNS'lerin) fizyolojideki işlevleri hakkında bilinmeyen birçok soru işareti bulunmaktadır. Bölümün bu kısmında bitkilerde azot oksit oluşumu, biyolojik etkileri ve işlevleriyle beraber, azot oksit türevli moleküller hakkında bilgiler verilecektir.

1.2.1 Azot Oksit Molekülü ve Biyokimyasal Özellikleri

NO, normal koşullarda olduğu kadar stres koşulları altında da bitki fizyolojisinde birçok süreçlerde görev alan önemli bir moleküldür. İşlevi açısından reaktif oksijen türü olan H_2O_2 'ye benzeyen NO, belirli seviyede sinyal molekülü olarak işlev gösterirken, aşırı üretiminde ise toksik etki yaparak DNA, karbonhidrat, protein ve lipidleri etkileyerek işlev bozulmalarına neden olabilecek birçok hücresel süreçlerde görev alırlar (Shapiro, 2005; Sanchez-Calvo *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2014).

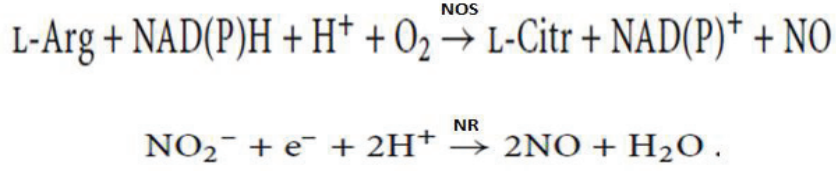
Azot oksit ya da sistematik adıyla nitrojen monoksit serbest radikal bir gazdır. Yapısının elektron kazanma veya kaybetmeye yatkın olması nedeniyle üç farklı redoksla ilişkili türü oluşabilir; azot oksit radikali ($NO\cdot$), nitrosonyum katyonu (NO^+) ve nitroksil anyonu (NO^-) (Stamler *et al.*, 1992; Wojtaszek, 2000). NO hücrede sitoplazma gibi hidrofilik bölgelerde kolay hareket edebilir, ayrıca

membran taşıyıcısına gerek olmadan difüzyonla membranlardan serbest bir şekilde geçebilir (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Bu reaktif radikal tür kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir (Bethke *et al.*, 2004a). Ama kısa yarılanma ömrüne sahip olmasına rağmen uzun mesafeler gidebilir (Henry *et al.*, 1997).

Hayvan hücrelerinde NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin aktivitesiyle üretilir. Bu enzim L-arginin'i L-citrulline ve NO'ya dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon içinde oksijen ve NADPH gerekmektedir (Wendehenne *et al.*, 2001). Bu enzimin hayvanlardaki keşfinden sonra, bitki fizyoloji üzerine yapılan çalışmalar sonucunda hayvan NOS'a benzer bitki NOS'u keşfedilmiştir (Lamattina *et al.*, 2003). Özellikle *Arabidopsis thaliana* üzerine uzun yıllar yapılan NOS çalışmaları sonucunda, NOS (AtNOS) aktivitesi ve buna bağlı NO oluşumunun bitkilerde de tıpkı hayvan fizyolojine benzer şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 1.2.) (Guo *et al.*, 2003; Corpas *et al.*, 2009a; Foresi *et al.*, 2010). Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarda NOS enziminin farklı izoformlarının bitki hücresinin farklı kısımlarında işlev göstererek NO üretimini sağladığı da tespit edilmiştir. Bu NOS'lara örnek olarak peroksizom NOS'u (Barroso *et al.*, 1999), kloroplast NOS'u (Jasid *et al.*, 2006) ve mitokondri NOS'u (Guo and Crawford, 2005) verilebilir. NOS bağımlı NO üretiminde kritik faktör oksijendir. Oksijene ulaşılabilirliğin olduğu, özellikle yeşil dokularda, L-arginin'e bağımlı NOS aktivitesi ve NO oluşumu gerçekleşir.

Bir diğer NO oluşum yolu, azot metabolizmasında görev alan nitrat redüktaz (NR) enziminin aktivitesiyle oluşan NO yolağıdır (Şekil 1.2.). NO, inorganik nitrojenin indirgenme basamaklarıyla üretilen ara bir üründür. NR, inorganik nitrojen kaynağı olan nitrati nitrite dönüştürmede işlev gösteren bir enzimdir, fakat nitritin hücresel seviyesi önemlidir çünkü nitrit seviyesinin artması hücrede toksit etki yaratmaktadır. Bu yüzden bu enzim aynı zamanda nitritin toksit etkisini ortadan kaldırmak için nitriti azot okside indirgenmesini gerçekleştirir. (Crawford, 1995; Rockel *et al.*, 2002). NR inhibitörü olan sodyum azid, potasyum siyanür gibi kimyasalların kullanıldığı araştırmaların sonucunda NO üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Bright *et al.*, 2006; Sang *et al.*, 2008). Oksijene ulaşılabilirliğin

azaldığı durumlarda, özellikle kök dokularında, nitrit bağımlı NO üretimi gerçekleşmektedir.



Şekil 1.2. Nitrik oksit sentaz ve nitrat redüktaz enzimlerinin aktivitesiyle azot oksit oluşumunun gösterilmesi.

NO hücre içinde bu enzim yollarıyla birçok bölgede üretilmektedir. NO; sitozolik nitrat redüktaz tarafından sitozolde, plazma membranına bağlı NR tarafından apoplastda, oksijene bağlı ya da bağımsız olarak, ya anoksik koşul altında NR aktivitesi ya da oksijen varlığında L-arginine bağımlı NOS aktivitesi sonucunda mitokondride, ayrıca L-arginine bağlı NOS aktivitesiyle peroksizom ve kloroplastda üretilmektedir (Barroso *et al.*, 1999; Guo and Crawford, 2005; Jasid *et al.*, 2006). Enzim bağımlı bu yolların dışında da NO'nun enzim bağımlı olmayan durumlarda da üretildiği gösterilmiştir. Örneğin; asidik pH da nitritin indirgenerek NO oluşturduğu gösterilmiştir (Wendehenne *et al.*, 2001). Enzimatik olmayan bu durum özellikle stres koşulu altında NOS aktivitesinin olmadığı durumlarda NO üretimi için önemli olduğu savunulabilir (Sehrawat and Deswal, 2014).

1.2.2 Bitki Fizyolojisinde Azot Oksidin Roller

Yapılan araştırmalar bize NO'nun çok çeşitli fizyolojik işlevlerde görev alan bir sinyal molekülü olduğunu göstermektedir (Şekil 1.2). NO işlevinin bitki çalışmalarındaki dönüm noktası, azot oksidin patojen-bitki etkileşimi boyunca savunma düzenleyicisi olarak görev aldığı tespit edilen iki araştırma ile olmuştur (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Bu gelişmenin ardından bitki büyüme ve gelişiminde de bu molekülün önemi daha da artmaya başlamıştır. Örneğin yapılan çalışmalarda azot oksidin; tohumun uyarılarak dormansinin kırılmasında (Beligni and Lamattina, 2000), primer kök büyümesi boyunca hücre uzamasının düzenlenmesinde (Fernandez-Marcos *et al.*, 2012), bitkinin

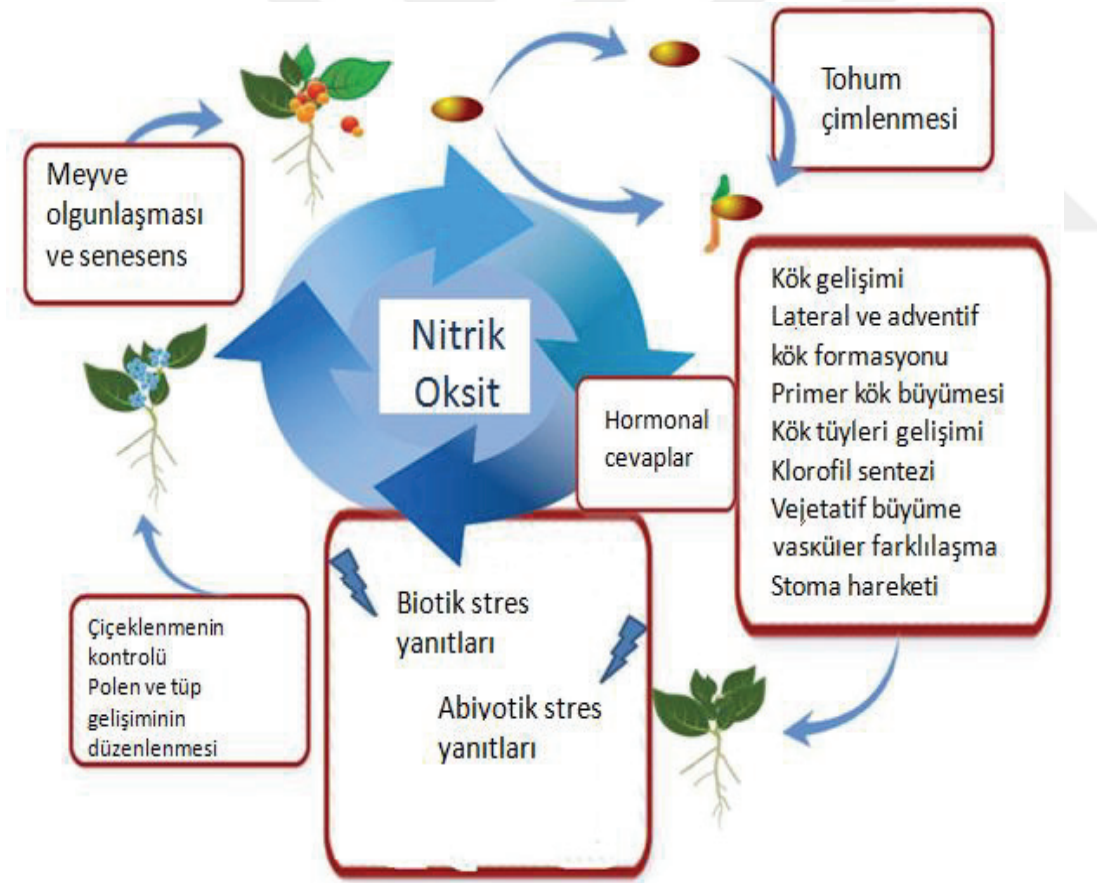
olgunlaşma ve senesensinde (Leshem *et al.*, 1998; Guo and Crawford, 2005; Wilhelmova *et al.*, 2006), çiçeklenme döneminin düzenlenmesinde (He *et al.*, 2004), stoma hücrelerinde iyon kanallarını düzenleyerek stoma hareketinin sağlanmasında (Garcia-Mata and Lamattina, 2001; Neill *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Desikan *et al.*, 2004; Bright *et al.*, 2006), önemli bir yönelme olan geotropizmada (Hu *et al.*, 2005), organel bazında mitokondri işlevselliğinde (Zottini *et al.*, 2002) ve fotosentez düzenlenmesinde (Takahashi and Yamasaki, 2002) görev aldıkları tespit edilmiştir. Ayrıca azot oksidin legümenler ve *Sinorhizobium* arasındaki simbiyotik ilişkide rol aldığı bulunmuştur (Baudouin *et al.*, 2006). Azot oksidin hastalık direnç süreçlerinin düzenlenmesinden sorumlu genlerin ifadesini düzenleyici görev oynadıkları görülürken (Polverari *et al.*, 2003), stresle ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ve sinyalleşme ile ilişkili kinazların düzenlenmesinde de rol aldıkları tespit edilmiştir (Parani *et al.*, 2004). *S*-nitrosothiol (SNO) gibi NO türevli moleküllerin patojenle etkileşim olduğunda artarak bitkiye direnç kazandırdığı da gösterilmiştir (Feechan *et al.*, 2005). Bunlara ek olarak, salisilik asit veya jasmonik asit gibi sinyalleşme molekülleriyle de etkileştikleri deneysel olarak gösterilmiştir (Grün *et al.*, 2006; Lozano-Juste *et al.*, 2011). Son araştırmalarda azot oksidin hücre içinde çeşitli bölgelerde işlev gösterdiği de bulunmuştur. Örneğin, azot oksidin mitokondride alternatif oksidaz aktivitesini düzenleyerek ROS üretimini düzenlediği görülmüştür (Cvetkovska and Vanlerberghe, 2012). Ayrıca peroksizomlarda da azot oksidin katalaz veya malat dehidrogenaz gibi bazı proteinlerin post translasyonel modifikasyonuna etki ederek işlevlerine etki ettikleri tespit edilmiştir (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). Tüm bu araştırmaların yanında ayrıca NO'nun, hücre ölüm mekanizmasında görev aldığı ve sitokinin teşvikli programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde de görev aldığı tespit edilmiştir (De Pinto *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2003).

NO normal fizyolojik işlevlerdeki görevlerinin yanı sıra stres yanıtlarında da görev alan bir moleküldür (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2008; Corpas *et al.*, 2013). Fakat stres durumlarında sinyal molekülü olarak işlev gösterebilmesi için belirli bir miktarda üretimi gerçekleştirilmesi gerekmektedir. NO'nun aşırı üretilerek kontrol edilemeyecek düzeye gelmesiyle oluşan stres durumuna

“Nitrosatif Stres” adı verilmektedir (Valderrama *et al.*, 2007; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Reaktif nitrojen türlerinin bitki fizyolojisindeki rollerini gerçekleştirmesinde reaktif oksijen türlerinin de önemli etkisi olduğu unutulmamalıdır. ROS/RNS molekülleri önemli sinyal yolları ve transkripsiyonel düzenlenme gibi birçok fizyolojik süreçte hücre içi ve dışında birlikte rol oynamaktadır (Fialkow *et al.*, 2007).

Görüldüğü üzere NO ve NO türevleri bitkilerde birçok fizyolojik süreçlerde önemli görevler alan moleküllerdir. NO ve türevleri üzerine yapılan çalışmalar henüz daha başındadır, günümüzde ve gelecekte NO ve türevlerinin fizyolojide olan etkileri üzerine yapılan çalışmaların devam edeceği kaçınılmazdır.



Şekil 1.3. Bitkilerin gelişim süreçlerinde NO'nun etkisi (Simontacchi'den 2015).

1.2.3 NO Türevli Reaktif Türler

NO ve NO türevli tüm moleküllere reaktif nitrojen türleri (RNS) tanımlaması yapılmıştır. Bu tanımlama içinde yer alan NO türevli bu moleküller S-nitrosotiol, S-nitrosoglutasyon ve peroksinitrit gibi moleküller olup hayvan ve bitki hücrelerinde birçok fizyolojik süreçlerde rol oynarlar (Halliwell and Gutteridge, 2007).

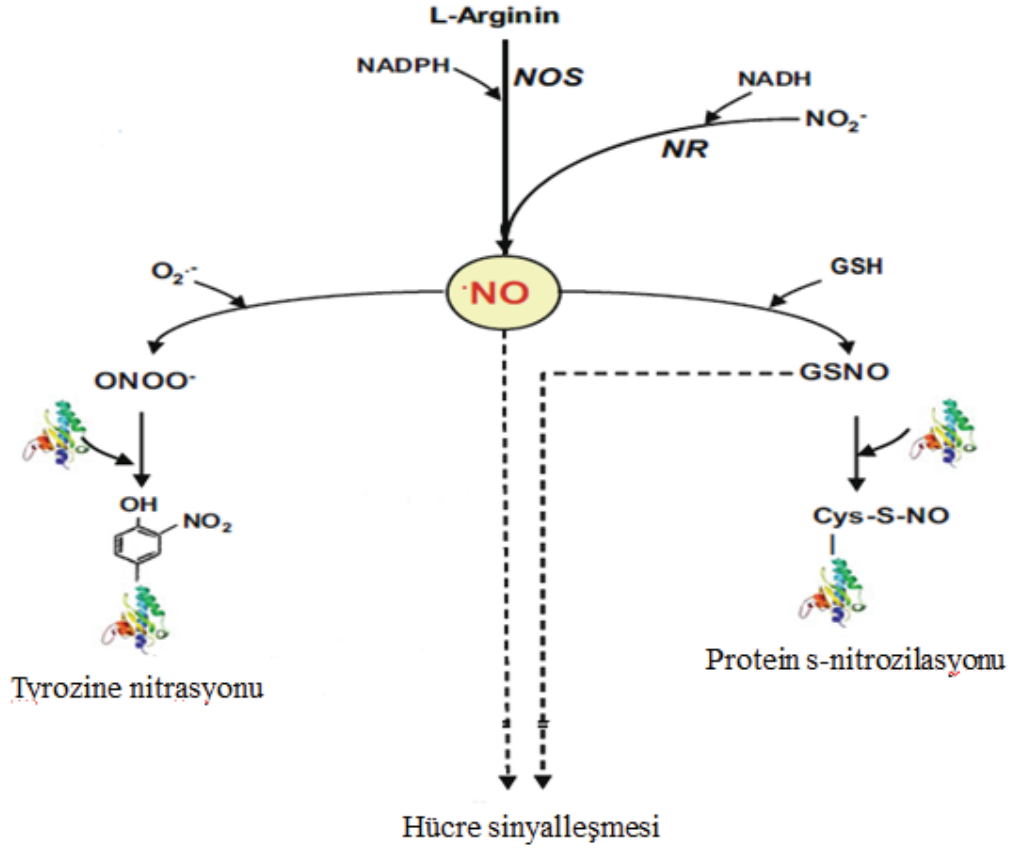
Azot oksit molekülünün süperoksit molekülüyle birleşmesi sonucunda peroksinitrit (OONO⁻) adı verilen bir nitrojen türü oluşmaktadır (Huie and Padmaja, 1993). Enzim gerektirmeyen bu reaksiyon sonucu oluşan peroksinitritin, özellikle stres yanıtının oluşumu için gerekli ROS ve NO'nun üretiminin arttığı durumlarda seviyesi yükselmektedir (Vandelle and Delledonne, 2011). Peroksinitrit ROS ve RNS'lerin birlikte işlev gördüğünü gösteren iyi bir örnektir. Aslında bu durum bir açıdan miktar olarak toksik olabilecek süperoksit radikallerinin süpürülmesinde NO'nun antioksidant olarak rol oynadığını gösterir, fakat oluşacak peroksinitrit miktarı da toksik etki yaratmaması için belirli bir seviyede tutulması gerekmektedir. Peroksinitrit yarılanma ömrü kısa olan bir nitrojen türü olup, sıcaklık ve pH değişimlerinden etkilendiği gibi, biyolojik membranlardan hızlı bir şekilde geçerek hedef molekülle etkileşim kurabilir (Szabo *et al.*, 2007). Bitkilerde ilk olarak *Phytophthora infestans* tarafından enfekte uğramış tütün bitkilerinde zamana bağlı peroksinitritin artışının gözlemlenmesiyle biotik strese yanıt oluşumunda görev aldığı tespit edildikten sonra araştırmacılar tarafından üzerinde daha çok çalışılmıştır (Saito *et al.*, 2006). Tuz stresine maruz bırakılmış *Arabidopsis* köklerinde artışının tespit edilmesiyle abiotik stres yanıtlarında da işlev gösterdiği ileri sürülmüştür (Corpas *et al.*, 2009b).

Peroksinitrit protein, lipid ve DNA'lar ile direk elektron oksidasyon reaksiyonlarıyla veya dolaylı olarak etkileşime girebilen reaktif bir radikal türüdür. Peroksinitritin özellikle proteinlerle olan etkileşimi bir post translasyonel modifikasyon (PTM) olup bitki için oldukça önemlidir. En sık görülen post translasyonel mekanizma şekli ise "Tyrosine nitrasyonu" adı verilen bir mekanizma olup, bu sisteme göre proteinin tyrosine rezidülerinin hidroksil

gruplarına bir nitro (-NO₂) grubunun bağlanmasıyla bir protein modifikasyonunun oluşmasıdır (Şekil 1.4) (Gow *et al.*, 2004). Bu post translasyonel mekanizma sonucunda proteinin işlevselliği oluşabilir veya proteinin işlev kaybı olabilir. Örneğin; tyrosine nitrasyonu tarafından *Arabidopsis* O-asetilserin(tiol)liyaz A1'in inhibe olduğu gösterilmiştir (Alvarez *et al.*, 2011).

Bir başka azot oksit türevi olan S-nitrosotiol, tıpkı peroksinitrit gibi proteinlerle etkileşerek post translasyonel modifikasyonlara sebep olan önemli bir reaktif nitrojen türüdür. PTM sebebiyle hücrede önemli sinyal yollarında ve stres yanıtlarında işlev gösterirler (Foster *et al.*, 2003; Benhar *et al.*, 2006; Letierrier *et al.*, 2011). S-nitrosotiol içinde en önemli molekül olan GSNO, NO ve redükte glutatyon'un (GSH) birleşmesiyle meydana gelmektedir ki bu sürece S-nitrosilasyon adı verilmektedir (Şekil 1.4) (Broniowska *et al.*, 2013). Yapılan araştırmalarda S-nitrosilasyonun bitki fizyolojisinde düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin; etilen biyosentezi için öncül molekül olan s-adenosilmethionin'nin S-nitrosilasyonu ile etilen biyosentezinde negatif düzenleyici rol oynadığı tespit edilmiştir (Lindermayr *et al.*, 2006).

GSNO çeşitli biyotik ve abiyotik stres yanıt oluşumunda önemli bir molekül olarak gösterilmiştir. Örneğin; ayçiçeğinde yüksek sıcaklık altında veya *Arabidopsis* de mekanik yaralanmalardan sonra içeriğinin arttığı tespit edilmiştir (Chaki *et al.*, 2011; Espunya *et al.*, 2012). GSNO havuzunun miktarını düzenleyen anahtar enzim is nitrosoglutatyon redüktaz'dır (GSNOR) ve bu enzim GSNO'yu okside glutatyon ve amonyağa çevirmektedir (Mur *et al.*, 2012). GSNOR'un bu işlevi oldukça önemlidir çünkü GSNO'nun miktar olarak artmasıyla oluşabilecek nitrosatif strese karşı bir savunma görevi üstlenir (Lindermayr and Durner., 2009).



Şekil 1.4 Azot oksit aracılı post translasyonel modifikasyon modelinin şematik gösterimi. L-arginin bağımlı nitrik oksit sentaz ve nitrat redüktaz ile üretilen NO, oksijen varlığında redükte glutatyonla birleşerek GSNO'yu oluşturur. Oluşan GSNO proteinle s-nitrosilasyon gerçekleştirir. Diğer taraftan NO süperoksit ile birleşerek peroksinitriti oluşturur. Oluşan peroksinitrit tyrosine nitrasyonunu gerçekleştirir. NO ve NO türevli moleküller hücre sinyalleşmesinde iş görürler (Corpas'dan, 2015).

1.3 NO Molekülünün Bitki Büyüme ve Gelişimindeki Rolü

Şimdiye kadar yapılan araştırmalar sayesinde NO moleküllerinin bitki stres yanıtının oluşumunun yanında bitkinin büyüme ve gelişiminde de önemli sinyal molekülleri olarak görev aldıklarını bilmekteyiz. Literatürde bitkinin erken embriyonik dönemden yetişkin dönemine kadar gelişimsel sürecinde bu moleküllerin işlevi hakkında birçok çalışma vardır.

1.3.1 NO ve Büyüme İlişkisi

NO bitki gelişiminin çeşitli süreçlerinde görev alan önemli bir sinyal molekülüdür. Örneğin; *Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada, NO'nun hızlı bir şekilde birikmesi sonucunda absisik asit (ABA) miktarının azaldığını ve buna bağlı olarak da tohum dormansisinin kırılmasının kuvvetlendiği tespit edilmiştir (Liu *et al.*, 2009). Yapılan başka bir araştırmada, NO'nun fidelerin de-etilasyonunda rol oynakları ve hipokotil uzunluğunun inhibisyonunda görev aldıklarını gösteren bulgular bulunmuştur, örneğin patates bitkisinin internodyum uzunluğunun, 100 μ M SNP uygulaması ve düşük ışık şiddeti koşulları altında büyümesi kontrolle karşılaştırıldığında % 20 azaldığı tespit edilmiştir (Beligni *et al.*, 2000). Azot oksidin lateral ve adventif kök uzamasının gelişiminde de görev aldıkları ve bunu oksin sinyalleşmesini düzenleyerek sağladıklarını gösteren deneyler yapılmıştır (Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004). NO'nun çiçeklenme üzerine etkisinin gösterildiği bir çalışmada, NO'nun bulunmadığı mutant bitkilerde çiçeklenmenin geciktiği, az miktarda NO'nun üretildiği mutantlarda ise çiçeklenmenin erken görüldüğü tespit edilmiştir (He *et al.*, 2004). NO'nun meyve olgunlaşmasında da görev alan bir molekül olduğu bazı denemelerde gösterilmiştir. Örneğin dışarıdan NO uygulamalarında bitkilerin etilen yolaklarının etkilendiği, NO'nun etilenle karşılıklı bu ilişkisiyle meyvelerin olgunlaşma sürelerinin değiştiğiyle ilgili çalışmalar mevcuttur (Manjunatha *et al.*, 2010). NO ve senesens ilişkisi ile ilgili yapılan araştırmalar da bizlere NO'nun bitki senesensinde işlevi olduğunu göstermektedir. Dışarıdan yapılan NO uygulamalarında etilen üretiminin inhibe olduğu ve ürünlerin hasat sonrası ömrünün uzadığı üzerine bulgular elde edilmiştir (Ya'acov *et al.*, 1998).

NO'nun bitki gelişim süreçlerinde birçok fizyolojik yolakta görev aldığını gösteren çalışmalar mevcut olup günümüzde bu araştırmalar devam etmektedir. Unutulmamalıdır ki NO dışında, özellikle GSNO gibi, diğer reaktif nitrojen türlerinin de büyüme ve gelişmede rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Corpas *et al.*, 2013). Fakat özellikle büyüme konusunda, bitki hücrelerinin uzaması ve buna bağlı duvar gevşemesi üzerine NO'nun etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. NO molekülünün buğdayın derim ekim toleransını sağlayan internodyum uzamasındaki rolü hakkında yeterli bilgiye sahip

olmamamızı göz önünde bulundurarak, Tir buğdayının birinci internodyum uzaması üzerinde NO ve antioksidan sistemin etkisi aydınlatılması amaçlanmıştır.

1.4 Bitki Hücre Duvar Yapısı ve Uzama Mekanizması

Bitki hücreleri güçlü bir hücre duvarı tarafından çevrelenmiştir. Hücre duvarı bitkiye dayanıklılık, hücre şeklini belirleme, uzama, suyun iletimi, patojenlere karşı doğal bir bariyer oluşturma gibi fizyolojik ve morfolojik birçok özellik kazandırmaktadır. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra insanoğlu içinde oldukça önemli bir yapıdır çünkü yapısal özellikleri nedeniyle gerek sağlık gerek de sanayide ekonomik öneme sahip doğal bir üründür (Saxena and Brown, 2005). Bitki hücre duvarının çoğunluğunu polisakkaritler oluştururken, polisakkaritlerin yanında yapısal polimerler, enzimler ve yapısal proteinler de duvar yapısına katılarak oldukça kompleks bir yapı oluştururlar (Şekil 1.7).

1.4.1 Bitki Hücre Duvar Yapısı

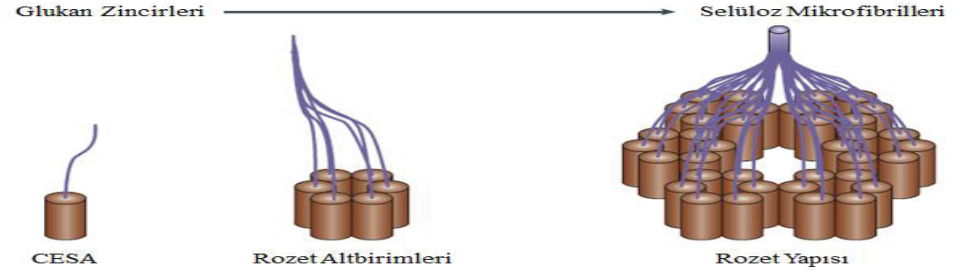
Hücre duvarları genel olarak iki tipe ayrılırlar; birincil hücre duvarı ve ikincil duvarı. Birincil hücre duvarı ince ve özellikle büyümekte olan birçok hücre tipinde görülen bir duvar yapısıdır, ikincil duvar yapısı ise kalın ve dayanıklı olup büyümesi sona ermiş ve özelleşmiş hücre tiplerinde görülür. Yapısal olarak farklılıklar görülse de hem birincil hem de ikincil hücre duvarının temel polisakkaritleri selüloz ve hemiselülozlardır. Yapısal farklılık ise; birincil duvarda pektin ve çeşitli yapısal proteinlerin miktarının fazla bulunmasıyken, ikincil duvarda pektin ve protein miktarının az, buna karşın lignin içeriğinin fazla bulunmasıdır (Carpita and McCann, 2000).

Hücre çeperlerine dayanıklılık ve esneklik sağlayan en önemli temel yapı selülozdur. Matriks içine gömülmüş olan selüloz mikrofibrillerinin asıl görevi matriks yapısını oluşturarak diğer polisakkaritlerin, glikoproteinlerin ve proteinlerin bir arada durmasını sağlamasıdır (Lerouxel *et al.*, 2006). Selüloz mikrofibrilleri, beta-1,4 glukan bağlarıyla birbirine tutunmuş güçlü dallanmamış glukan zincirlerinden oluşmaktadır (Somerville C.R., 2006). Plazma membranlarında bulunan ve rozet yapısı olarak adlandırılan protein kompleksleri,

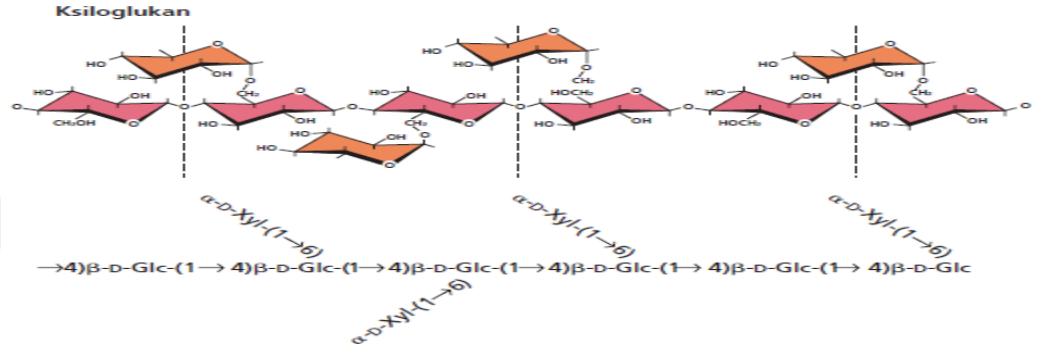
glukan zincirlerini bir araya getirerek selüloz zincirlerini oluşturan selüloz sentaz birimlerini içerirler (Şekil 1.5) (Kimura *et al.*, 1999). Rozet yapısını oluşturan selüloz sentaz katalitik alt birim (CESA) proteinleri ise CESA gen aile tarafından kodlanır (Doblin *et al.*, 2002).

Hücre duvar yapısını oluşturan matriks içindeki temel iki polisakkarit ise hemiselüloz ve pektinlerdir (Brett and Waldron, 1996). Hemiselülozlar, selüloz mikrofibrillerine bağlanan önemli polisakkaritlerdir. Kendi içinde ksilan, mannan gibi birçok farklı hemiselüloz tipi görülebilir fakat hemiselülozlar içinde en önemli ve en çok bulunan tipi ksiloglukanlardır (Carpita and McCann, 2000). Bu yapı selüloz yapısına benzese de selülozdan ayıran farkı ksiloz ve galaktoz yan zincirlerine sahip olmasıdır ve temel görevleri selüloz zincirlerine bağlanarak sıkı bir yapı oluşturmalarıdır (Şekil 1.6). Ksiloglukanlar dışında glukomannan ve glukuronoarabinoksilanlar gibi birçok önemli polisakkarit de duvar yapısında bulunan ve bütünlüğü sağlayan önemli hemiselülozlardır (Somerville *et al.*, 2004). Yapılan bir araştırmada birincil hücre duvarında yaygın olarak ksiloglukanların, ikincil hücre duvarında ise ksilan ve glukomannanın bulunduğu gösterilmiştir (Held *et al.*, 2014).

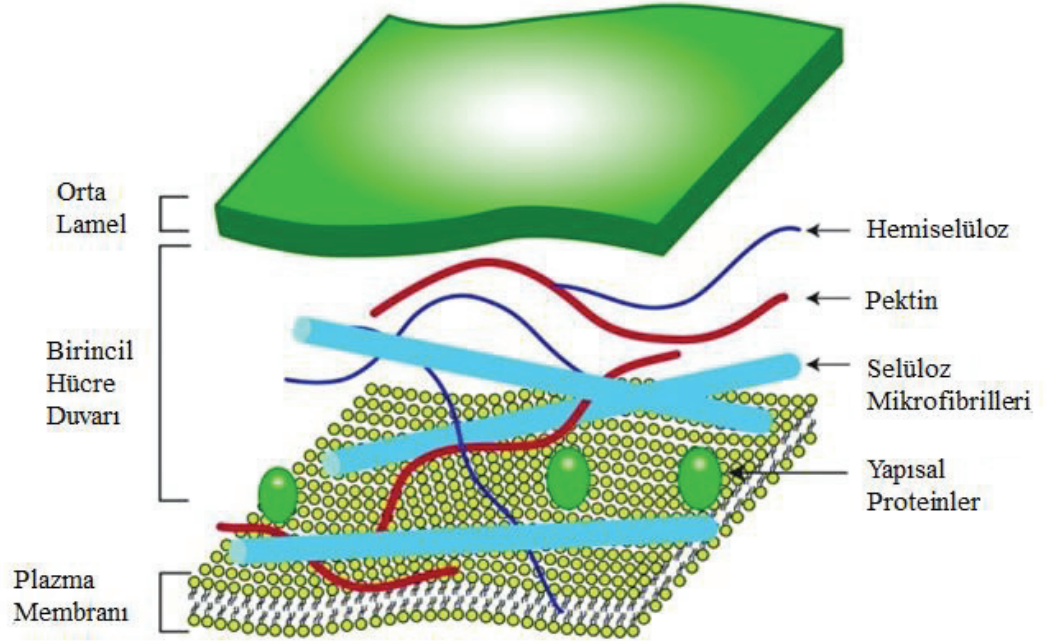
Matriksin bir diğer önemli polisakkarit grubu olan pektinler, asidik ve nötr şeker gruplarını içerirler ve bu şeker grupları matriksin jelleşmesini sağlar. Matriks içinde pektin ağı kalsiyum tarafından iyonik bağlanmalarla gerçekleşmektedir. Pektinler arasında duvar yapısında en bol bulunan ramnogalakturonan I (RG I)'dir. Bunun dışında homogalakturonan, arabinan, arabinogalaktan ve ramnogalakturonan II gibi birçok farklı pektin de matriks içerisinde bulunarak jel yapısını oluştururlar (Ridley *et al.*, 2001). Tüm bu şeker gruplarının yanında matriks içine gömülmüş önemli yapısal proteinlerde bulunmaktadır. Bu proteinler; HRGP (hidroksiprolince zengin glikoprotein), PRP (zengin prolinli protein), GRP(glisince zengin protein) ve AGP (arabinogalaktan protein) olarak tanımlanmış proteinlerdir (Showalter, 1993).



Şekil 1.5. Bitki hücresinin plazma membranlarında bulunan rozet yapısı ve selüloz mikrofibrillerinin oluşumu (Cosgrove'dan 2005).



Şekil 1.6. Ksiloglukanın yapısı (Carpita ve McCann'dan 2000).



Şekil 1.7. Bitki hücre duvar yapısı (Flint'den 2012).

1.4.2 Bitki Hücre Duvarı Uzama Mekanizması

Bitki hücreleri genişleme esnasında kendi çeperlerini parçalarken diğer bir yandan yeni polimerler sentezleyerek uzamayı gerçekleştirirler. Bu uzama mekanizmasının gerçekleşmesi için esnemeyi sağlayacak çeşitli fizyolojik mekanizmalar iş yapmaktadır. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda birçok farklı fizyolojik sürecin duvar modülasyonunu etkileyerek uzamayı sağladığı tespit edilmiştir (Delmer and Amor, 1995; Cosgrove, 1997; Ishi *et al.*, 1999).

Bitki hücre duvarlarının esnemesini sağlayan mekanizmalardan biri asit büyüme hipotezi adı verilen bir mekanizmadır (Rayle and Cleland, 1992). Bu hipoteze göre oksin hormonu, plazma zarındaki H^+ - ATPazı aktifleştirerek protonların atılması sağlar ve hücre duvarının asitleşmesine neden olur. Bu asitleşme hücre duvarının gevşemesine ve buna bağlı hücre uzamasının artışına neden olmaktadır. Uzamayı sağlayan mekanizma hücre duvarlarında bulunan ve asidin uyardığı ekspansin adı verilen yapısal proteinlerin yardımıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993). Henüz tam olarak mekanizma bilinmese de yapılan çalışmalarda ekspansinlerin duvarda bulunan polisakkaritlerin arasındaki kovalent olamayan, hidrojen bağlarını gevşeterek duvarın esnemesine neden olduğu gösterilmiştir (Cosgrove, 2000; Li and Cosgrove, 2001). *Arabidopsis* genomunun aydınlatılmasıyla iki farklı ekspansin geninin varlığı tespit edilmiştir, bu genlerde α -ekspansin ve β -ekspansin adı verilen iki ekspansin proteinini kodlamaktadır (Cosgrove, 2000). pH'ya bağımlı tüm bu duvar uzama mekanizması tüm kara bitkilerinde yaygın olarak görülür (Cosgrove, 2000).

Oksin hormonu dışında, giberellin hormonunun hücre duvarının esnemesine etki eden diğer önemli bir hormon olduğu tespit edilmiştir. Giberellin hormonu, oksinin etki mekanizmasının tam tersine ortamda asitleşme olmaksızın hücre duvarının esnemesini sağlamaktadır. Fakat tıpkı oksin gibi, giberellin de ekspansin proteinlerini etkileyerek duvarda esnemeyi gerçekleştirir (Cosgrove, 2000).

Hücre duvarında bulunan polisakkaritler, hormonlara bağlı ekspansin proteinlerinin etkisiyle gevşemesi dışında, ayrıca hidrolaz ve transglikozilaz gibi hidrolitik enzimlerin etkinlikleriyle de birbirinden ayrılırlar. Örneğin; glukanaaz enzimleri üzerine yapılan bir çalışmada bu enzimlerin duvarda bulunan ksiloglukan ve β -glukanları parçaladıkları gösterilmiştir (Hoson, 1993). Fakat bu enzimin direk olarak uzamaya katkısından çok dolaylı yoldan etki ettikleri düşünülmektedir. Glukanaazların dışında, ksilozidaz ve transglikozilaz gibi enzimler de duvarda gevşeme görevinde bulunabilirler. Ksilozidaz, ksiloglukan endotransglukosilaz/endohidrolaz (XHT), enzimleri ksiloglukanları yan dallarından ayırabilirken, transglikozilazlar hemiselüloz yapısını hem parçalayıp hem de ekleme yapabilirler (Cosgrove, 1999; Nishitani *et al.*, 1992). Enzimlerin bu etkinlikleri duvarın fiziksel özelliğinin değişmesine neden olabilir.

Yapılan tüm bu çalışmaların yanında, reaktif oksijen türlerinin ve bu türlere bağlı çalışan enzimlerin de hücre duvar modülasyonuna etki ettikleri ileri sürülmüştür. Selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi bitki hücre duvarındaki temel polisakkaritlere reaktif türlerin etki ederek hücre duvarının gevşemesine neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum bitki yaşam döngüsünün anahtar evreleri olan tohum çimlenmesi, uzama ve meyve olgunlaşması gibi süreçlerde oldukça önemli fizyolojik yolaklardır. Araştırılan bazı çalışmalara örnek verecek olursak; örneğin bir peroksidaz çeşidi olan hücre duvarı peroksidazının (CWPOX) hücre duvarına etki ettiği gösterilmiştir (Liszkay *et al.*, 2004). Peroksidaz enziminin etkinliğiyle birlikte Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bir dizi mekanizma sayesinde oluşan hidroksil radikalleri hücre duvarı polisakkaritlerinin bağlarını parçalayarak duvarın gevşemesine ve uzamasına etki ettiği tespit edilmiştir (Şekil 1.8) (Schopfer and Liszkay, 2002). Hidroksil radikalının özellikle ksiloglukan polimerlerini ayrılmasına etki eden bir reaktif tür olduğu tespit edilmiştir (Schopfer, 2001; Muller *et al.*, 2009). Ayrıca; hidroksil radikalının hücre duvar polisakkaritlerine olan etkisi araştırılırken bu radikalın oksin hormonu aracılı bir etkiyle bitki hücre duvar gevşemesine neden olduğu aktarılmıştır (Schopfer, 2001).

Reaktif oksijen türlerinin hücre duvar yapısına olan etkileriyle ilgili yapılan diğer araştırmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; hücre plazma

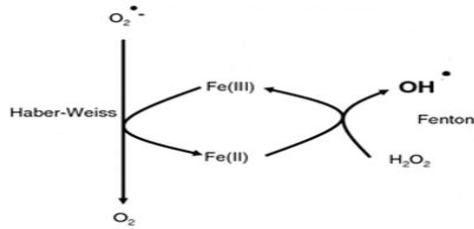
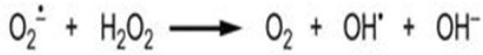
membranında bulunan NADPH Oksidaz (NOX) enziminin direkt hücre duvarına süperoksit salınımı yaparak hücre duvarı esnekliğini etkilediği gösterilmiştir (Potikha *et al.*, 1999; Pedreira *et al.*, 2004). Ayrıca yapılan başka araştırmalarda, hidroksil radikalının hyaluronik asite etki ettiği ve karbon-hidrojen bağlarını yıktığı tespit edilirken (Hawkins and Davies, 1996), bir diğer reaktif tür olan singlet oksijenin hyaluronik asidin degradasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Andley and Chakrabarti, 1983). Tüm bu sonuçlar hücre uzaması ile ilgili farklı birçok mekanizmanın varlığını bize sunmaktadır.

Son dönemde önemi artan reaktif nitrojen türlerinin duvar üzerindeki etkileri üzerine henüz tam olarak aydınlatılmış bir mekanizma bulunamamıştır. Yapılan bir çalışmada bitki dokularında, sentezlenen azot oksidin de enzimatik olmayan indirgenme yoluyla bir etki oluşturduğu gösterilse de tam olarak azot oksit ve azot oksit kökenli türlerin hücre duvarına etkileri bilinmemektedir (Bethke *et al.*, 2004b).

Fenton



Haber-Weiss



Şekil 1.8. Fenton, Haber-Weiss reaksiyonları ve hidroksil radikalının oluşumu.

2. MATERYAL VE METOT

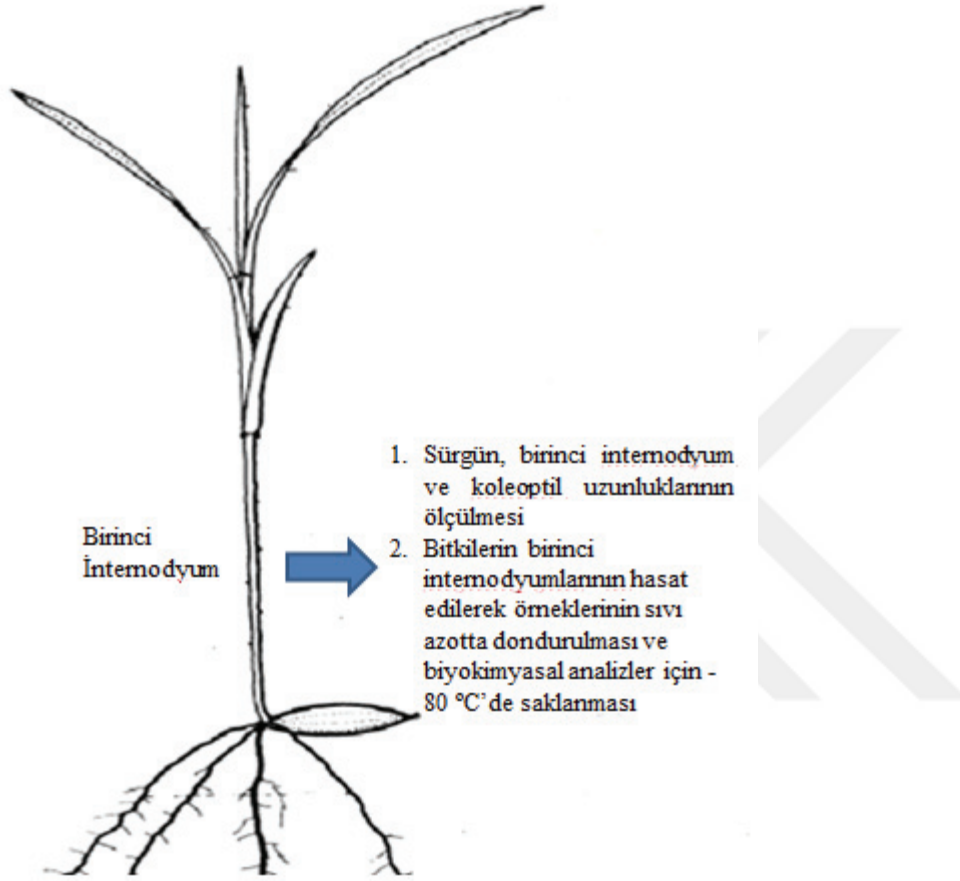
2.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni

Tir buğdayı tohumları Van bölgesinde çiftçilik yapan Suat Sier aracılığıyla temin edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu, önce 1 dakika boyunca % 70 (v/v) etanol çözeltisinde bekletilip, daha sonra 3 dakika boyunca % 5 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilerek yapılmıştır. Tohumlar bu sterilizasyon uygulamasından sonra deiyonize suyla 5 kez yıkanarak 24 saat boyunca şişmeye bırakılmıştır. Tohumlar şişme işlemi gerçekleştikten sonra 12 cm çapındaki kaplara 100 mL % 1 (w/v) agar konularak yapılan 2 cm'lik tabakaların üzerine, her kaba 20 bitki olacak şekilde ekilmiştir. Agarların üzerine 2 cm ve 15 cm kalınlığında ve 7 : 2 : 1 oranına sahip torf : vermikülit : perlit karışımı ilave edilmiştir. Bitkiler bitki büyüme odasında, 25 °C sıcaklık ve % 70 bağıl nem koşullarında ve karanlık ortamda yetiştirilmiştir (Şekil 2.1). Buğday fidelerine ayrıca azot oksit inhibitörü olan carboxy-PTIO potassium uygulaması yapılmıştır. Ekzojen c-PTIO uygulaması için c-PTIO 100, 200, 300 µM konsantrasyon olacak şekilde hesaplanıp, tohumların şişmeye bırakıldığı suda çözündürülmüştür. Kontrol gruplarında ise bu işlem gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 2.1 10 günlük buğday fideleri (kontrol).

Daha sonra 10 günlük bitkilerin sürgün, birinci internodyum ve koleoptil uzunlukları ölçülmüştür (Şekil 2.2). Hasat edilen birinci internodyumlar sıvı azotta dondurulmuştur. Alınan örnekler biyokimyasal parametrelerin belirlenmesi için -80 °C’de saklanmıştır.



Şekil 2.2. Internodyum hasat şeması.

2.2 Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

2.2.1 Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Analizleri

Bu başlık altında anlatılacak olan tüm enzim işlemleri proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak için 4 °C’de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstratları için 0.1 g örnek 300 µL ekstraksiyon tamponuyla [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 edilerek hazırlanmıştır.

Homojenizasyondan sonra örnekler 14000 g'de 10 dakika santrifüj edilir ve ardından elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesini belirlenmesi için kullanılmıştır. Hücre duvarı POX aktivitesinin belirlenmesi için santrifüjün ardından elde edilen pelletler 50 mM sodyum fosfat (pH 5.8) tamponuyla 10 dakika ve 1000 g'de 4 kez olacak şekilde santrifüj uygulamasıyla yıkanmıştır. Pelletler daha sonra 2 saat boyunca 1 M NaCl çözeltisinde bekletilmiştir. NaCl'ye maruz bırakıldıktan sonra örnekler 1000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır.

Protein miktarı Bradford'a (1976) göre belirlenmiştir. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlarda proteine bağlandığında kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanarak yapılan bir ölçümdür. Mavi renk oluşumu 595 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak ise bovine serum albumin (BSA) kullanılmış ve standart aralığı 0,02-0,2 mg/ml olarak seçilmiştir.

CAT (EC 1.11.1.6) aktivitesi Bergmeyer'e (1970) göre yapılmıştır. Bu yöntemde katalazın, 1 mg toplam protein başına dakikada süpürdüğü $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ miktarı 1 U ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmış, enzimin süpürmesi ise 240 nm'de izlenmiştir. Reaksiyon karışımı olarak da 0.1 mM EDTA ve % 3 H_2O_2 içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7.0) tamponu kullanılmıştır.

POX (EC 1.11.1.7) aktivitesi Herzog and Fahimi'ye (1973) göre kullanılan yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemde göre reaksiyon karışımında kullanılan 3,3'-diaminobenzidine-tetra hidroklorid dihidrat'ın (DAB) ekstrakta bulunan peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılarak H_2O_2 'yi süpürmesi ve buna bağlı gerçekleşen renk değişiminin 465 nm'de ölçülerek saptanmasına dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı ise 0.5 mM DAB, % 0.1 (w/v) jelatin, % 0.6 (v/v) H_2O_2 içeren 150 mM sodyum fosfat sitrat (pH 4.4) tamponundan oluşur. POX'un 1 mg toplam protein başına dakikada oksitlediği DAB miktarı ise 1 U ($\mu\text{mol DAB mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak belirlenmiştir.

Antioksidan enzimlerinin dışında, ROS üreten NOX (EC 1.6.3.1) enziminin de aktivitesi Jiang and Zhang'a (2002) göre hesaplanmıştır. Bu yöntemde reaksiyon karışımı 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 0.5 mM XTT ve 0.1 mM NADPH'dan oluşmaktadır. XTT'nin redüksyonu 3 dakika boyunca 470 nm'de takip edilmiştir. Background olarak ise 50 U SOD standardı kullanılmıştır. Süperoksit üretimi için ekstinksiyon kat sayısı $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Lipit peroksidasyonu, Madhava Rao and Sresty'e (2000) göre malondialdehit (MDA) içeriği belirlenerek hesaplanmıştır. MDA içeriğinin belirlenmesi için tiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonu kullanılmıştır. Konsantrasyonlar 532 nm ve 600 nm de ölçülen absorbans değerlerinin farkına dayanarak hesaplanmıştır. MDA miktarı hesaplamasında kullanılan ekstinksiyon katsayısı $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olacak şekilde hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 “NO Sentaz” ve “NO” İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen *Triticum aestivum* cv. Tir’in Koleoptil ve Birinci İnternodyum Uzaması Üzerindeki Etkisi

3.1.1 Farklı Konsantrasyonlardaki “NO Sentaz” ve “NO” İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Farklı Derinliklerdeki Tir Buğdayının Koleoptil Uzaması Üzerindeki Etkisi

Dışarıdan uygulanan c-PTIO’nun konsantrasyonunun artırılması sığ ve derin ekilen Tir buğdayının birinci internodyum ve koleoptil uzamalarını farklı şekilde etkilemiştir (Şekil 3.1). c-PTIO konsantrasyonundaki artış, sığ ekilen Tir buğdayının koleoptil uzamasını azaltmıştır. 100 μM c-PTIO, %11.8; 200 μM c-PTIO %14.82; 300 μM c-PTIO ise koleoptil uzamasını %32.86 azaltmıştır. Ancak, 100 μM c-PTIO hariç diğer c-PTIO konsantrasyonlarının derin ekilen Tir buğdayının koleoptil uzaması üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

<i>T. aestivum</i> cv. Tir KOLEOPTİL	Ekilen Toprak Derinliği	
	2 cm	15 cm
Kontrol	9,98 cm $\pm$ 0,58	10,7 cm $\pm$ 0,41
100 μM	8,8 cm $\pm$ 0,46	10,9 cm $\pm$ 0,67
200 μM	8,5 cm $\pm$ 0,55	9,6 cm $\pm$ 0,42
300 μM	6,7 cm $\pm$ 0,39	10,6 cm $\pm$ 0,48

Şekil 3.1. 100, 200 ve 300 μM c-PTIO’nun, 2 ve 15 cm toprak derinliklerine ekilen *Triticum aestivum* cv. Tir buğdayının koleoptil uzaması üzerine etkisi.

3.1.2 Farklı Konsantrasyonlardaki “NO Sentaz” ve “NO” İnhibitörü Olan c-PTIO’nun Farklı Derinliklerdeki Tir Buğdayının Birinci İnternodyum Uzaması Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki c-PTIO uygulaması, koleoptilin aksine, hem sığ hem de derin ekilen Tir buğdayının birinci internodyum uzaması üzerinde etkili olmuştur (Şekil 3.2).

Diğer yandan sığ ekim koşullarında, c-PTIO uygulaması, birinci internodyum uzamasında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. 100 μ M c-PTIO, derin ekilen (15 cm) Tir'in birinci internodyum uzamasını %27,3, 200 μ M c-PTIO %17,3 azaltırken 300 μ M c-PTIO uygulaması ise %54 azaltmıştır.

<i>T. aestivum</i> cv. Tir	Ekilen Toprak Derinliği	
BİRİNCİ İTERNODYUM	2 cm	15 cm
Kontrol	8,82 cm $\pm$ 0,62	11 cm $\pm$ 0,58
100 μ M	8,5 cm $\pm$ 0,71	8 cm $\pm$ 0,74
200 μ M	8,7 cm $\pm$ 0,50	9,1 cm $\pm$ 0,57
300 μ M	8,9 cm $\pm$ 0,64	5 cm $\pm$ 0,46

Şekil 3.2. 100, 200 ve 300 μ M c-PTIO'nun, 2 cm ve 15 cm toprak derinliklerine ekilen *T. aestivum* cv. Tir buğdayının birinci internodyum uzaması üzerine etkisi.

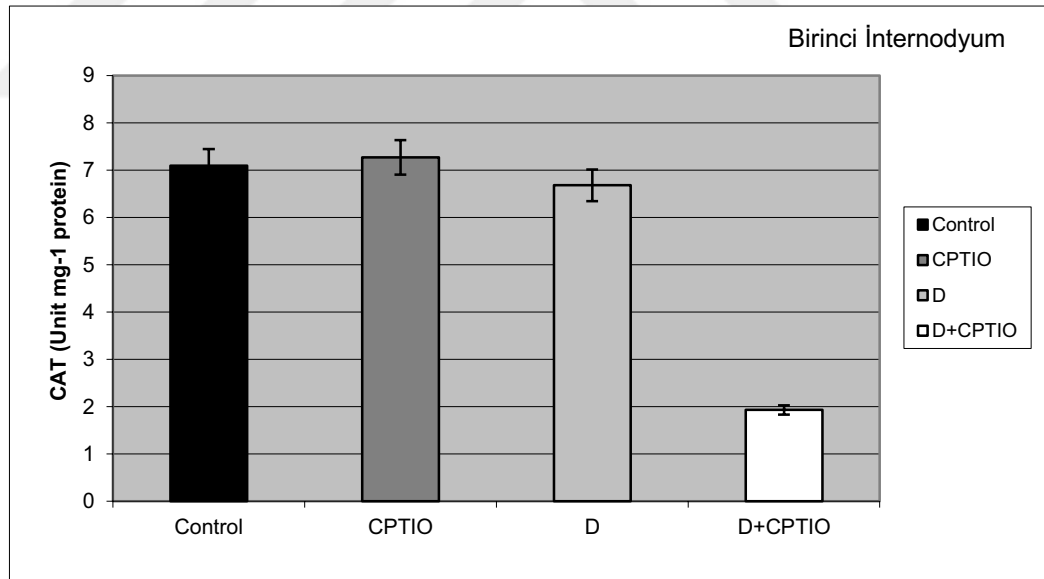
c-PTIO'nun hem koleoptil hem de birinci internodyum uzaması üzerindeki indirgeyici etkisi NO'nun, hem koleoptil hem de birinci internodyum uzaması üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda NO'nun koleoptil ve birinci internodyum uzama mekanizması üzerindeki etkisini belirleyebilmek için 200 μ M c-PTIO uygulanmış Tir buğdayının birinci internodyum ve koleoptillerindeki katalaz (CAT), peroksidaz (POX), hücre duvar peroksidazı (CWPOX) ve NADPH oksidaz (NOX) enzim aktiviteleri ve hücre membranlarındaki lipid peroksidasyon seviyeleri belirlenmiştir. Araştırmamızda 300 μ M c-PTIO'nun, Tir tohumlarının çimlenmesini engellediği ve bu nedenle yeterli birinci internodyum ve koleoptil örneği elde edilemediği için bu konsantrasyondaki c-PTIO'nun sadece koleoptil ve birinci internodyum uzaması üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

3.2 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ve NO İnhibitörü Olan c-PTIO'nun Uygulamasının, Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen *Triticum aestivum* cv. Tir'in Birinci İternodyum ve Koleoptilindeki Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Hücre Duvar Peroksidazı (CWPOX) ve NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi

3.2.1 Dışarıdan c-PTIO Uygulamasının Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen (2 cm ve 15 cm) *Triticum aestivum* cv. Tir'in Birinci İnternodyumundaki Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Hücre Duvar Peroksidazı (CWPOX) ve NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi

3.2.1.1 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

Sığ ekim koşulları altında (2 cm, kontrol) 200 μ M c-PTIO uygulaması, derin ekime toleranslı *T. aestivum* cv. Tir buğdayının birinci internodyumundaki CAT aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Derin ekilen (15 cm) Tir'in CAT aktivitesi de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişmemiştir. Ancak derin ekim koşullarındaki c-PTIO uygulaması CAT aktivitesinde ciddi bir azalmaya neden olmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CAT aktivitesindeki bu azalma oranı 3.67 kat olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.4).

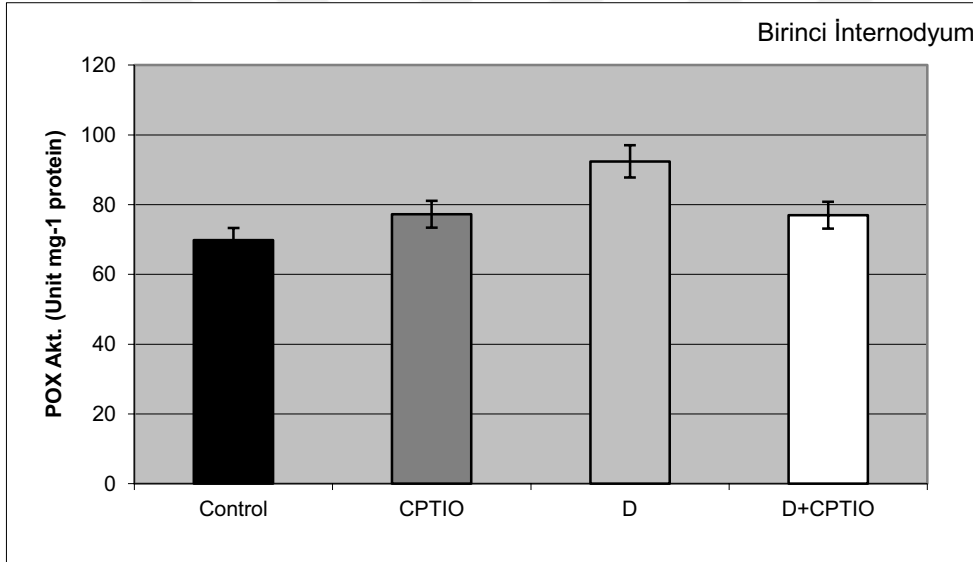


Şekil 3.4. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in birinci internodyumundaki katalaz (CAT) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

3.2.1.2 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi

T. aestivum cv. Tir tohumlarının ekildiği hem toprak derinliğindeki farklılık hem de dışarıdan uygulanan c-PTIO, bu buğday çeşidinin birinci internodyumundaki POX enzim aktivitesini değiştirmiştir.

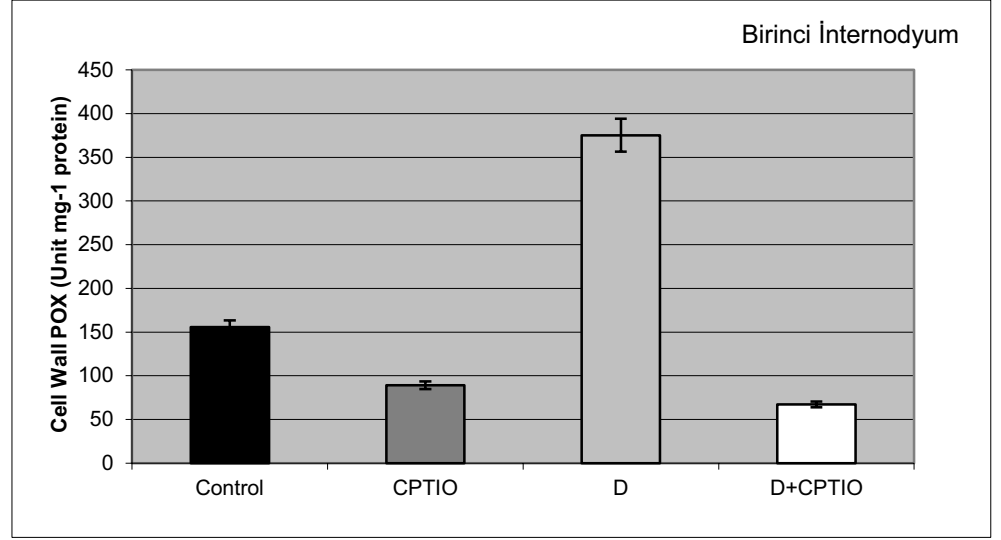
Sığ ekim koşulları altındaki c-PTIO uygulaması POX aktivitesini %10.7 arttırmıştır. Derin ekim ise sığ ekime göre POX aktivitesini %32.4 arttırmıştır. Aynı koşullar altındaki (derin ekim) c-PTIO uygulanmış Tir'in birinci internodyumundaki POX aktivitesindeki artış ise sadece %10.3 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla derin ekim koşullarındaki c-PTIO uygulaması POX aktivitesini %17 azaltmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in birinci internodyumundaki peroksidaz (POX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

3.2.1.3 Hücre Duvar Peroksidaz (CWPOX) Enzim Aktivitesi

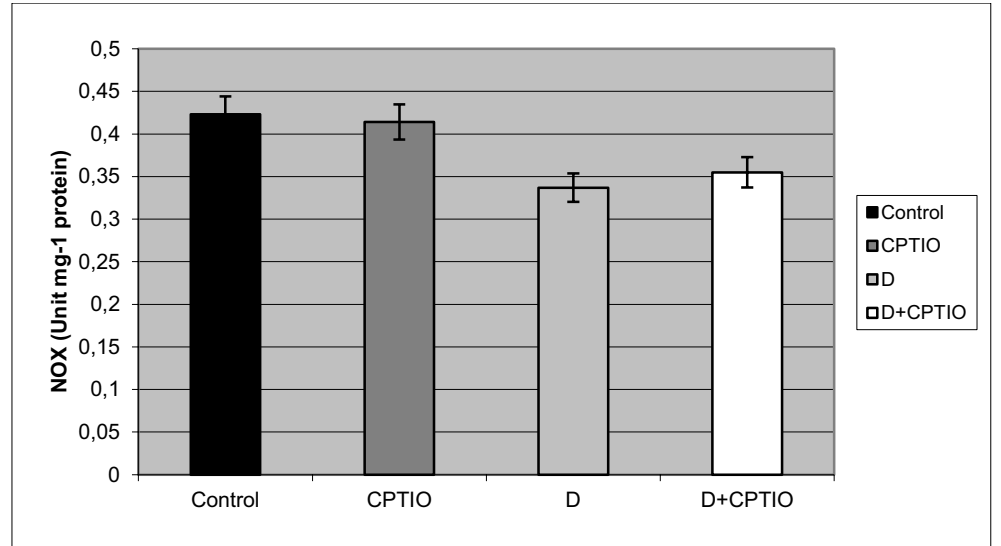
Sığ koşulları altında c-PTIO uygulaması Tir'in birinci internodyumundaki CWPOX aktivitesini 1.75 kat azalmıştır. Derin ekim ise CWPOX'ta 2.41 kat artışa neden olmuştur. Bunun aksine derin ekimde c-PTIO uygulaması ise CWPOX ta kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda 2.30 kat azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in birinci internodyumundaki hücre duvar peroksidaz (CWPOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

3.2.1.4 NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktivitesi

Sığ ekim koşulları altındaki c-PTIO uygulaması NOX aktivitesini değiştirmemiştir. Diğer yandan derin ekim koşulları ise Tir'in birinci internodyumundaki NOX aktivitesini %20.3 azaltmıştır. Bu oran, aynı koşullar altındaki c-PTIO uygulaması ile %16 olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in birinci internodyumundaki NADPH Oksidaz (NOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

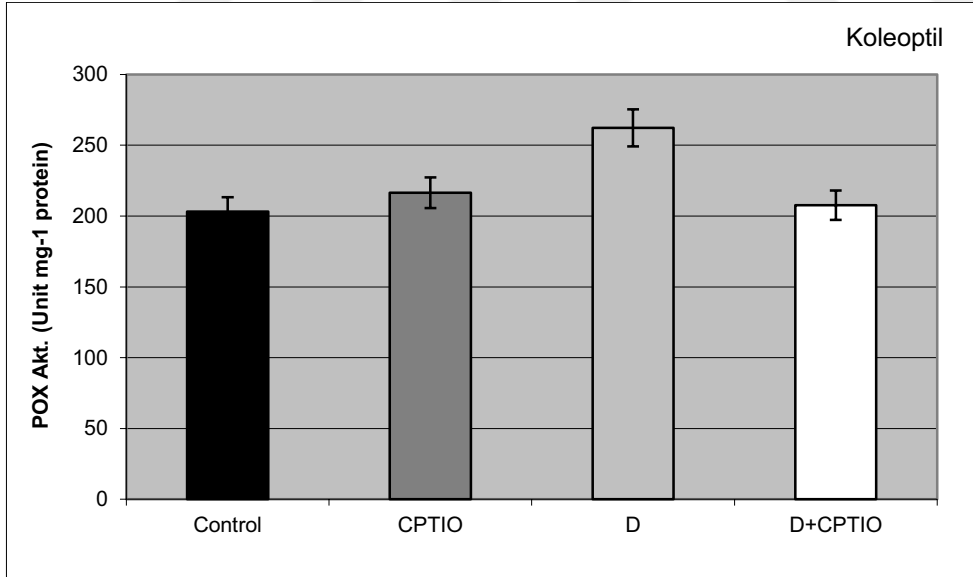
3.2.2 Dışarıdan c-PTIO Uygulamasının Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen (2 cm ve 15 cm) *Triticum aestivum* cv. Tir'in Koleoptilindeki Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Hücre Duvar Peroksidazı (CWPOX) ve NADPH Oksidaz (NOX) Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi

3.2.2.1 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

Koleoptil örneklerinde katalaz enzim aktivitesi tespit edilememiştir.

3.2.2.2 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi

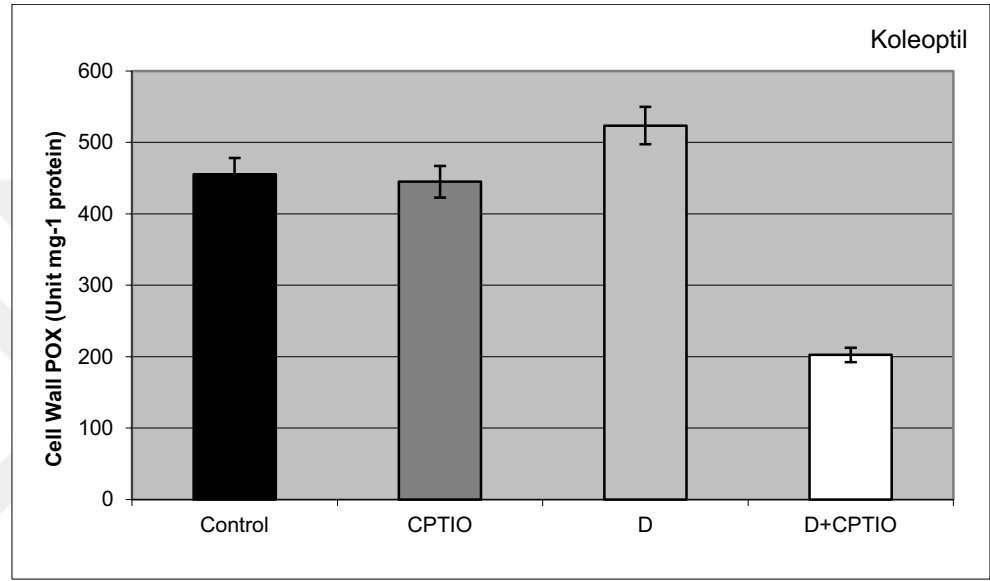
Dışarıdan c-PTIO uygulaması, sığ ekim koşullarında koleoptildeki POX aktivitesini değiştirmemiştir. Derin ekim ise POX aktivitesini %29 arttırmıştır. Ancak derin ekimdeki POX aktivitesindeki artışı, c-PTIO uygulaması %20 azaltmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in koleoptilindeki peroksidaz (POX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

3.2.2.3 Hücre Duvar Peroksidaz (CWPOX) Enzim Aktivitesi

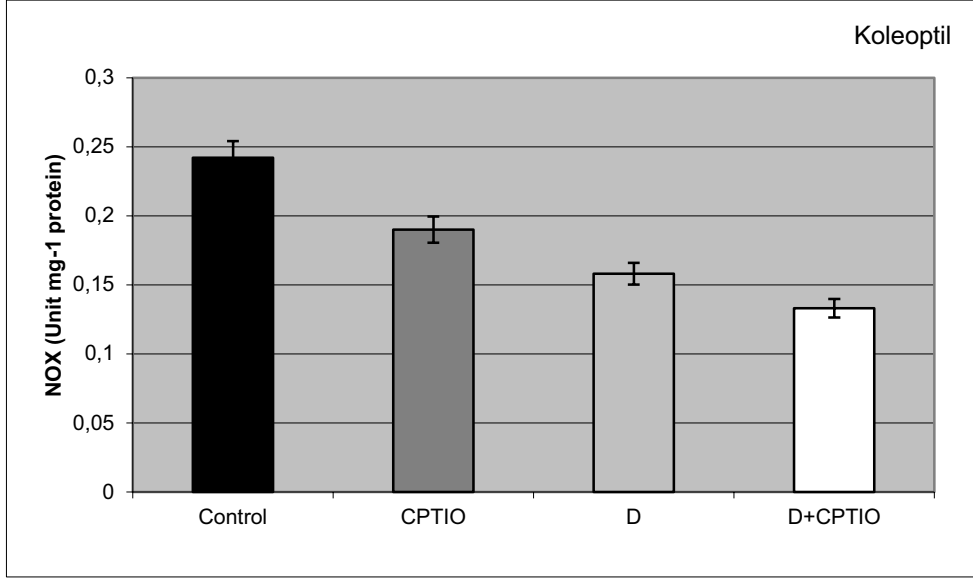
Sığ ekimde dışarıdan c-PTIO uygulaması CWPOX aktivitesini değiştirmemiştir. Derin ekim CWPOX aktivitesini arttırırken, derin ekimde c-PTIO uygulaması CWPOX aktivitesini belirgin oranda azaltmıştır. Derin ekim, CWPOX aktivitesini %15 arttırırken derin ekimle birlikte c-PTIO uygulaması 2.24 kat arttırmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tır'ın koleoptilindeki hücre duvar peroksidaz (CWPOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

3.2.2.4 NADPH Oksidaz Enzim Aktivitesi

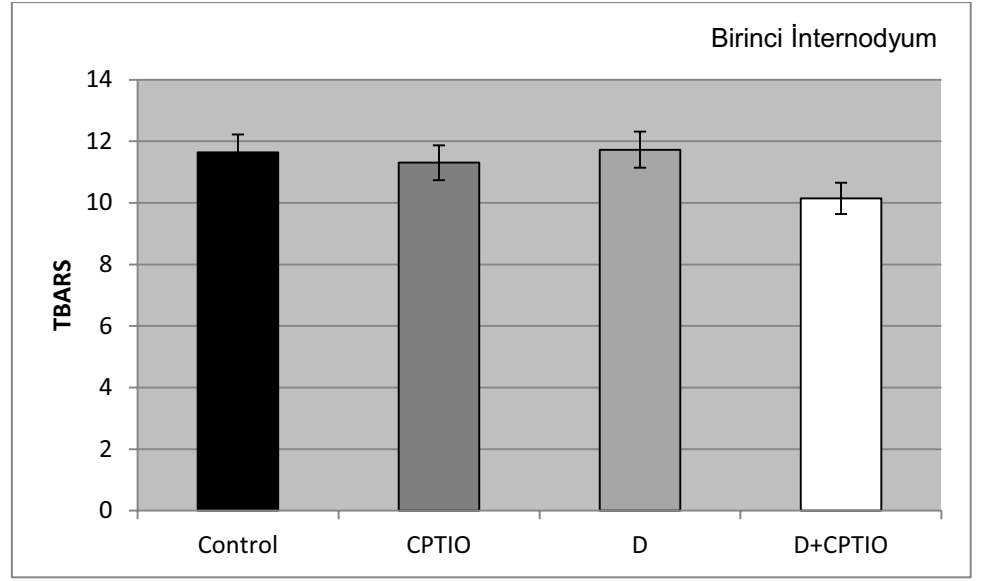
Dışarıdan c-PTIO uygulaması, sığ ekilen Tır'ın koleoptilindeki NOX aktivitesini değiştirmemiştir. Derin ekim ise NOX aktivitesinde %34.7 azalmaya neden olmuştur. Diğer yandan derin ekimde NOX aktivitesindeki bu azalma, c-PTIO uygulaması ile %15 daha fazla olmuştur. Dolayısıyla kontrole göre derin ekimdeki c-PTIO uygulaması NOX aktivitesini %45 azaltmıştır (Şekil 3.10).



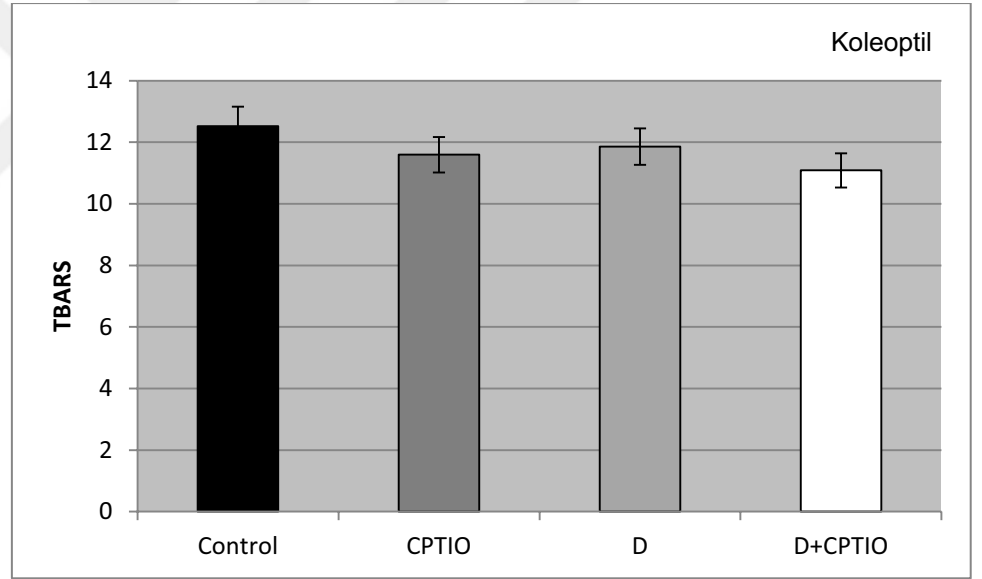
Şekil 3.10. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in koleoptilindeki NADPH oksidaz (NOX) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

3.3 Dışarıdan c-PTIO Uygulamasının Farklı Toprak Derinliklerine Ekilen (2 cm ve 15 cm) *Triticum aestivum* cv. Tir'in Birinci İnternodyum ve Koleoptilindeki Lipid Peroksidasyon (TBARS) Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Sığ (2 cm) ve derin ekim (15 cm) yapılan Tir'in birinci internodyum ve koleoptilindeki TBARS seviyeleri arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir (Şekil 8 ve Şekil 9). Ayrıca sığ ekimde c-PTIO uygulaması da ne birinci internodyumda ne de koleoptil hücre membranında lipid peroksidasyona neden olmamıştır. Diğer yandan derin ekilen Tir buğdaylarına c-PTIO uygulaması hem birinci internodyumun hem de koleoptilin TBARS seviyesini düşürmüştür. c-PTIO uygulaması derin ekilen Tir 'in birinci internodyumunda TBARS seviyesini %12 azaltırken (Şekil 3.11) koleoptilin TBARS seviyesinde %11.5 azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in birinci internodyumundaki TBARS seviyesi üzerindeki etkisi.



Şekil 3.12. Dışarıdan 200 μ M c-PTIO uygulamasının derin ekime toleranslı *T. aestivum* Tir'in koleoptilindeki TBARS seviyesi üzerindeki etkisi.



4. TARTIŞMA

Buğdayda derin ekim toleransı birinci internodyumun uzamasıyla gerçekleşmektedir (Hoshikawa, 1969). Günümüze kadar derin ekim toleransı üzerine birçok araştırma yapılmasına rağmen, birinci internodyum uzaması üzerine yapılan çalışmalar yeterli sayıda değildir ve bu araştırmaların hiçbirisinde NO moleküllerinin ve buna bağlı mekanizmanın birinci internodyum uzamasındaki etkileri aydınlatılmamıştır. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında bu konu üzerinde durulmuş ve aydınlatılmak istenmiştir.

Buğdayda birinci internodyum uzaması üzerine yayınlanmış makalelerde daha öncede belirtilen ve önemli bir buğday çeşidi olan Hong Mang Mai buğdayı kullanılmıştır (Suge *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2011). Sunulan bu tez çalışmasında ise Türkiye'nin Van bölgesinde yetişen ve derin ekim toleransı olan Tır buğdayı kullanılmıştır.

Azot oksidin birinci internodyum uzamasındaki önemi, NO ve NOS inhibitörü olan c-PTIO uygulanmasına bağlı olarak değişen internodyum uzunluklarından anlaşılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, c-PTIO uygulaması gerçekleştirilen bitkilerde internodyum uzunluklarında önemli derecede azalma olmuştur. 200 μ M c-PTIO uygulanmış bitkilerde birinci internodyum uzunluklarında yaklaşık yüzde 19 oranında azalma vardır. NO azalması sonucunda NO türevli reaktif türlerin neden olduğu post translasyonel modifikasyonlarla antioksidan enzimlerinde değişim gerçekleşmiştir. Değişim olarak özellikle katalaz ve peroksidaz enzim aktivitesinin düştüğü görülmüştür ve buna bağlı hidrojen peroksit seviyesinin artışı ön görülmektedir. Bu artışla hücre duvarının sertleşmesi gerçekleşmiş ve hücre uzamasında inhibisyon olmuştur. Bu durum daha önce yapılan hidrojen peroksit uygulamasının hücre uzamasında inhibisyona neden olduğunu gösteren çalışmaları destekler nitelikte bir sonucu bize vermiştir (Monshausen *et al.*, 2007). Sonuç olarak Tır birinci internodyumlarında RNS'lerin hücre uzamasında antioksidan enzimlerini etkileyerek bir denge kurduğunu söyleyebiliriz.

Hücre uzaması birinci internodyumun uzamasında önemli olan kısımdır. Bu uzama mekanizmasının önemli bir parametresi hücre duvarının esnekliğinin sağlanmasıdır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda ROS'ların hücre duvarını etkileyerek duvarın gevşemesine neden oldukları gösterilmiştir (Schopfer and Liskay, 2006). Hücre duvarının gevşemesi ve buna bağlı hücre genişlemesinde hidroksil radikallerinin görev aldıkları tespit edilmiştir. Bu radikaller hücre duvarı POX tarafından Haber-Weiss tipi reaksiyon yardımıyla süperoksit ve hidrojen peroksit moleküllerinden üretilir ve bu moleküller hücre duvarı polisakkaritlerini bağlayan bağları parçalayarak duvar gevşemesine ve hücre uzamasına neden olurlar. ROS'ların bu etkisinin yanında NO ve NO türevli moleküllerin etkisinin ne olduğu üzerine yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmada NO molekülün uzamaya olan etkisi araştırılmıştır. Daha öncede belirttiğimiz gibi NO'nun derin ekim koşulları altında birinci internodyum uzunluğunda önemli bir etken olduğunu söyleyebiliriz.

Bugüne kadar yapılmış sınırlı araştırmalar sonucunda azot oksidin uzama ve büyümeye olan etkisi hakkında bir takım veriler elde edilmiştir. Örneğin bu araştırmaların birinde, NO'nun hipokotil ve internodyum uzamasındaki etkisinin gösterilmesidir (Beligni *et al.*, 2000). NO donörü olarak 100 µM SNP uygulaması yapılmış patates bitkisinde hipokotil uzunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Fakat bunun sebebi SNP uygulamasına bağlı olarak artan azot oksidin toksik etki göstererek uzamayı negatif olarak etkilemesidir. Bizim çalışmamızda NO baskılayıcı olarak kullanılan c-PTIO ile ortamdaki azot oksit ve türevlerini ortadan kaldırıp, büyümeye olan etkisine bakılmıştır. Sonuç olarak büyümenin azaldığı görülmüş ve NO'nun sinyal molekülü olarak uzama ve büyümede önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir.

NO'nun büyüme ve uzamaya olan etkileri üzerine yapılan diğer araştırmalarda hücre duvarı bileşenlerini etkilediği ve büyümeyi tetiklediği gösteren verilerde elde edilmiştir. Örneğin; çeltik köklerinde yapılan bir araştırmada, alüminyum stresi altında, alüminyum hücre duvarını etkileyen önemli bir etkendir, NO'nun alüminyum toksitesini azaltarak lipid peroksidasyonunu hafiflettiği ve köklerin uzamasını artırdığı gösterilmiştir (Zhang *et al.*, 2011). Benzer bir çalışma buğday köklerinde bakılmış, c-PTIO uygulanarak

azalan NO miktarına bağlı olarak kök hücre duvarında pektin metilasyonunda artışla alüminyumun pektine bağlanmasının azaldığı görülmüştür (Sun *et al.*, 2016). Bir diğer çalışmada domates köklerinde azot oksidin selüloz sentezini nasıl etkilediğine bakılmış ve uygulanan SNP dozuna bağlı olarak selüloz içeriği belirlenmiştir (Correa-Aragunde *et al.*, 2008). Düşük konsantrasyon uygulamasında köklerde selüloz içeriğinin arttığı, yüksek konsantrasyonda da bunun ters etki yaptığı tespit edilmiştir. İşaretli glukozun, düşük SNP uygulamasıyla sinyal görevi üstlenen NO'ya bağlı olarak, selüloz yapısına geçtiği gösterilmiştir, buda bize NO'nun primer hücre duvarı selüloz sentezine etki ettiğini göstermektedir. Yapılan araştırmalar sınırlı olsa, bu sonuçlar bizim çalışmamıza paralel olarak bize azot oksidin hücre duvarına etki ederek uzama ve büyümeyi sağladığını göstermektedir.

Yapılmış önemli bir çalışmada, NO türevli bir RNS olan S-nitrosoglutasyon (GSNO) ile hücre duvarı arasındaki ilişkiye bakılmıştır (Moro *et al.*, 2017). Kök tüy mutantı olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, GSNO kök tüy hücrelerinin hücre duvarlarını düzenleyerek tüy uzamasını sağladığı tespit edilmiştir. GSNO'nun sinyal molekülü olarak, hücre duvarı bileşenleri ve metabolizmasını düzenleyen ilgili genlerin (rhd6 gibi) ifadesini sağlayarak bu uzamayı gerçekleştirdiği görülmüştür. Ayrıca histon modifikasyon enzimlerini ve gen ifadesinde oluşan proteinleri etkileyerek post translasyonel modifikasyona neden olması da hücre duvar düzenlenmesinde oldukça önemli olduklarını göstermektedir. Bu çalışmada c-PTIO uygulaması yapılması bunlara paralel olarak negatif etki yaratmıştır. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, yaptığımız çalışmada belirttiğimiz NO ve türevlerinin hücre duvarına olan etkisini destekler sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

NO, S-nitroglutasyon ve peroksinitrit gibi NO türevli reaktif nitrojen türlerinin gerçekleştirdiği PTM, S-nitrosilasyon ve tyrosine nitrasyonu olarak iki gruptan oluşur (Begara-Morales *et al.*, 2016). Yapılan son çalışmalarda bu iki PTM yolunun antioksidan sistemde görev alan enzimleri etkilediği gösterilmiştir. Örneğin; bir peroksidaz grubu olan peroksiredoksinler (PrxII E) hem S-nitrosilasyon hem de tyrosine nitrasyonuna maruz kalarak, stres durumunda aktivite kaybı veya kazancı sağlamasıyla yanıt oluştururlar (Romero-Puertas *et*

al., 2007). Aynı şekilde katalaz da her iki PTM durumundan etkilenen bir başka enzimdir (Chaki *et al.*, 2015). Antioksidan enzimlerin NO bağımlı PTM'den etkilenebiliyor olması, yaptığımız çalışmada elde edilen enzim verileriyle paralellik göstermektedir.

NAPDH Oksidaz (NOX) birçok süreçte iş gören bir plazma membran proteini olup, hipokotil veya kök uzaması gibi fizyolojik süreçlerde hücre duvarı gevşemesini sağlayan önemli bir enzimdir (Dunand *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2009). Ayrıca SOD da, NOX aracılı oluşan süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştüren ve duvar gevşemesine neden olan hidroksil radikalının oluştuğu yolağa etki eden bir diğer önemli enzimdir (Schopfer and Liskay, 2006). Yapılan çalışmada, derin ekim koşullarında kontrole göre c-PTIO uygulanmış Tır buğdayı birinci internodyumlarında NOX aktivitesinde az bir miktarda artış gözlemlenmiştir. Bu artışa paralel olarak oluşan süperoksit radikalleri SOD tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Oluşan bu radikallerin süpürülmesi CAT ve POX enzimleriyle yeterli düzeyde gerçekleşmediği için, artan hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi radikallerin toksik etki yaparak internodyum uzamasında inhibisyona neden oldukları öne sürülmektedir.

POX (class I) ve CAT hidrojen peroksitin süpürülmesinden sorumlu olan önemli antioksidan savunma proteinleridir (Mittler *et al.*, 2004). Bu enzimler NO türevli reaktif nitrojen türlerin (s-nitroglutasyon ve peroksinitrit) etkisiyle S-nitrosilasyon ve tyrosine nitrasyonu gibi post translasyonel modifikasyon geçirebilen enzimler olup, aktiviteleri bu modifikasyonlarla belirlenebilir (Romero-Puertas *et al.*, 2007; Chaki *et al.*, 2015). c-PTIO uygulaması yapılan Tır buğdaylarında derin ekim koşullarında kontrole göre CAT ve POX aktivitesinde düşüş görülmektedir. Bu düşüşün nedeni enzimlerin post translasyonel modifikasyonlarla düzenlenememiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Enzim aktivitelerindeki düşüş nedeniyle ortamda hidrojen peroksit seviyesinde artış ve buna bağlı birinci internodyumda inhibisyon gerçekleştiği söylenebilir.

Hücre duvarı POX (class III), hücre duvarı gevşemesine neden olduğu gibi, hücre duvarı bileşenlerini etkileyerek duvarın güçlenmesini de sağlayabilen

önemli bir diğer enzimdir (Passardi *et al.*, 2004). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguya göre, c-PTIO uygulanmış Tir buğdaylarında derin ekim koşulları altında kontrole göre CWPOX aktivitesinde azalma görülmektedir. Bu durumda tıpkı POX enziminde olduğu gibi PTM nedeniyle enzimde aktivite azalması olduğu düşünülmektedir. Bu durumdan hücre duvarı etkilenerek uzama mekanizmasında inhibisyon gerçekleşmiştir.

Derin ekim toleransında birinci internodyumun yanında koleoptil uzunluğunun da etkisinin olduğu düşünülebilir. Her ne kadar Hong Mang Mai de bu uzunluğun toleransa katkı yapmadığı söylenmişse de (Mohan *et al.*, 2013), yapılan başka çalışmalarda buğdayda derin ekim toleransında koleoptil uzunluğunun da etkisi olduğu gösterilmiştir (Rebetzke *et al.*, 2007). Örneğin, kuraklık toleransına katkı sağlamasıyla koleoptil uzunluğunun önemi belirtilmiştir (Farhad *et al.*, 2014). Bununla paralel olarak yapılan çalışmamızda, Tir buğdayında koleoptil uzamasının toleransa katkı sağladığı, ekim derinliğiyle uzunluğun pozitif ilişki gösterdiği ve NO'nun yokluğunda uzunluğun azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak NO tıpkı birinci internodyum uzamasında olduğu gibi koleoptilin uzamasında da işlev gösterdiği savunulabilir.

Sonuç olarak, Tir buğdayında derin ekim toleransı olarak hem birinci internodyumun hem de koleoptilin uzamasının ne kadar önemli olduğu bir kez daha gösterilmiştir. Bununla beraber, birinci internodyumun uzamasının nedeni olan hücre uzamasının önemli rol oynadığı ve bu uzama sürecinde NO ve türevlerinin antioksidan sistemi etkileyerek duvarın gevşemesinde işlev gösterdiği sonucuna varabiliriz.



5. SONUÇ

Derin ekim toleransına sahip buğday çeşitleri, derin ekim koşullarında bu toleransa sahip olmayan bitkilere göre farklı stratejiler geliştirerek dayanıklılık sağlamaktadırlar. Özellikle kurak bölgelerde bu tolerans sayesinde suyun kullanımını daha da artırarak gelişimlerini sürdürür ve toprak yüzeyine ulaşmaya çalışırlar. Sunulan bu yüksek lisans tezinde Tir buğdayının iyi bir derin ekim toleransına sahip olduğu gösterilmiştir. Buda bu bitkinin derin ekim koşullarında yetiştirilmesinin uygun olduğunu bize göstermektedir. Bir başka derin ekim toleransına sahip buğday çeşidi olan Hong Mang Mai'nin tersine, Tir buğdayında birinci internodyumla birlikte koleoptilin uzaması da bu toleransa katkı vermektedir. Birinci internodyumun uzamasında hücre duvarının esneyebilirliği önemlidir. Bu esneme duvarın gevşemesiyle sağlanır. NO ve türevleri gibi önemli sinyal molekülleri antioksidan sisteminin işlevini etkileyerek hücre içinde reaktif türlerin miktarında değişime neden olabilirler. Tir buğdayının birinci internodyum uzamasında bu moleküllerin işlev gösterdikleri söylenebilir. Bu reaktif türlerin engellenmesiyle birinci internodyum uzunluklarında azalma gözlemlenmiştir. Bu azalmanın sebebi, NO ve türevlerinin azalmasına bağlı olarak gerçekleşemeyen PTM yoluyla antioksidan enzimlerinin işlev kaybetmesi ve düşen enzim aktivitesine de bağlı olarak artan reaktif türlerin büyümeyi inhibe etmesidir. NO ve türevlerine bağımlı S-nitrozilasyon ve tyrozine nitrasyonu gibi post translasyonel modifikasyonlar özellikle CAT ve POX gibi enzimleri etkilemektedir. Elde ettiğimiz sonuçlarda da NO ve türevlerini baskılayıcı c-PTIO kullanımı yapıldığında bu enzimlerin aktivitelerinde düşüş gerçekleşmiştir. Bu durumda artan reaktif oksijen türlerine bağlı olarak stres oluşumu gerçekleşmiş ve uzama indüklenmiştir. Tüm bu sonuçlar bize azot oksidin önemli bir sinyal molekülü olduğunu ve dolaylı yollardan hücre duvarını etkileyerek uzamada işlev gösterdiğini söylemektedir.

Günümüzde derin ekim toleransı gösteren buğday çeşitlerinin kullanımı özellikle sıcaklığın yüksek olduğu kurak bölgelerde ya da toprak üst katmanının yeterli derecede nemli olmadığı yerlerde daha da önem kazanmaktadır. Yetiştiriciler bu bölgelerde derin ekim koşullarında hem biyotik hem de abiyotik strese karşı koruma sağlayarak verimi artırabilirler. Bu sayede, artan dünya nüfusu

ve olumsuz çevre şartlarına karşı verimi artırmak için, sunulan yüksek lisans tezinde gösterilen Tir buğdayı gibi derin ekim toleranslı tahıl bitkilerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Allan, R.E., Vogel, O.A. and Peterson, C.J.,** 1962, Seedling emergence rate of fall-sown wheat and its association with plant height and coleoptile length, *Agronomy Journal*, 54:347-350pp.
- Álvarez, C., Lozano-Juste, J., Romero, L.C., García, I., Gotor, C. and León, J.,** 2011, Inhibition of Arabidopsis O-acetylserine (thiol) lyase A1 by tyrosine nitration, *Journal of Biological Chemistry*, 286:578-586pp.
- Andley, U.P. and Chakrabarti, B.,** 1983, Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115:894-901pp.
- Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J.,** 2007, Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses, *Plant Science*, 172:876-887pp.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupianez, J.A. and Del Rio, L.A.,** 1999, Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274:36729–36733pp.
- Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly N. and Puppo A.,** 2006, Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* functional nodules, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19:970-975pp.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.,** 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44:276-287pp.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M.N., Carreras, A., Corpas, F.J. and Barroso, J.B.,** 2013, Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation, *Journal of Experimental Botany*, 65:527-538pp.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L.,** 2000, Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants, *Planta*, 210:215-221pp.
- Bergmeyer, H.U.,** 1970, Methoden Der Enzymatischen Analyse, Germany.
- Besson-Bard, A., Pugin A. and Wendehenne, D.,** 2008, New insights into nitric oxide signaling in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 59:21-39pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bethke, P.C., Badger, M.R. and Jones, R.L.,** 2004, Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues, *The Plant Cell*, 16:332–341pp.
- Bethke, P.C., Gubler, F., Jacobsen, J.V. and Jones, R.L.,** 2004, Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide, *Planta*, 219:847-855pp.
- 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.
- Brett, C.T. and Waldron, K.W.,** 1996, *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls* (Vol. 2), Springer Science & Business Media, Germany, 19pp.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. and Neill, S.J.,** 2006, ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis, *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 45:113–122pp.
- Broniowska, K.A., Diers, A.R. and Hogg, N.,** 2013, S-nitrosoglutathione, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830:3173–3181pp.
- Carpita, N. and McCann, M.,** 2000, The cell wall. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants, *American Society of Plant Physiologists*, 52-108pp.
- Chaki, M., Álvarez de Morales, P., Ruiz, C., Begara-Morales, J.C., Barroso, J.B., Corpas, F.J. and Palma, J.M.,** 2015, Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration, *Annals of Botany*, 116:637-647pp.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Corpas, F.J. and Barroso, J.B.**, 2013, Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants, *New Phytologist*, 199:633–635pp.
- Corpas, F.J. and Barroso, J.B.**, 2014, Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants, *Frontiers in Plant Science*, 5:97pp.
- Corpas, F.J., Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M. and Barroso, J.B.**, 2015, Nitration and S-nitrosylation: two post-translational modifications (PTMs) mediated by reactive nitrogen species (RNS) and their role in signalling processes of plant cells, *In Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*, Springer International Publishing, 267-281pp.
- Corpas, F.J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Begara-Morales, J.C., Carreras, A., Airaki, M., Del Río, L.A. and Barroso, J.B.**, 2008, Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions, *Plant Cell Physiology*, 49:1711-22pp.
- Corpas, F.J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M. and Barroso, J.B.**, 2009, Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants, *Plant Physiology*, 151:2083–2094pp.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Del Río, L.A. and Barroso, J.B.**, 2009, Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants, *New Phytologist*, 184:9-14pp.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. and Lamattina, L.**, 2004, Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato, *Planta*, 218:900-905pp.
- Correa-Aragunde, N., Lombardo, C. and Lamattina, L.**, 2008, Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots, *New Phytologist*, 179:386-396pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cosgrove, D.J.**, 1997, Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement, *The Plant Cell*, 9:1031pp.
- Cosgrove, D.J.**, 1999, Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility, *Annual Review of Plant Biology*, 50:391-417pp.
- Cosgrove, D.J.**, 2000, Loosening of plant cell walls by expansins, *Nature*, 407:321-326pp.
- Cosgrove, D.J.**, 2005, Growth of the plant cell wall, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:850-861pp.
- Crawford, N.M.**, 1995, Nitrate: nutrient and signal for plant growth, *The Plant Cell*, 7:859-868pp.
- Cvetkovska, M. and Vanlerberghe, G.C.**, 2012, Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide, *New Phytologist*, 195:32-39pp.
- Dai, A.**, 2011, Drought under global warming: a review, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2:45-65pp.
- De Pinto, M.C., Tommasi, F. and De Gara, L.**, 2002, Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells, *Plant Physiology*, 130:698-708pp.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C.**, 1998, Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature*, 394:585-588pp.
- Delmer, D.P. and Amor, Y.**, 1995, Cellulose biosynthesis, *The Plant Cell*, 7:987pp.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T. and Neill, S.J.**, 2004, ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells, *Journal of Experimental Botany*, 55:205-212pp.
- Doblin, M.S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D. and Delmer, D.P.**, 2002, Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes, *Plant Cell Physiology*, 43:1407-1420pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D.F.,** 1998, Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:10328-10333pp.
- Espunya, M.C., De Michele, R., Gómez-Cadenas, A. and Martínez, M.C.,** 2012, S-nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 63:3219–3227pp.
- Farhad, M., Hakim, M.A., Alam, M.A. and Barma, N.C.D.,** 2014, Screening wheat genotypes for coleoptile length: a trait for drought tolerance, *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2:237pp.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A. and Loake, G.J.,** 2005, A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance, *PNAS*, 102:8054–8059pp.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L. and Lorenzo, O.,** 2012, Nitric oxide, An emerging regulator of cell elongation during primary root growth, *Plant Signaling & Behavior*, 7:196-200pp.
- Fialkow, L., Wang, Y. and Downey, G.P.,** 2007, Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function, *Free Radical Biology and Medicine*, 42:153-164pp.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P. and Forano, E.,** 2012, Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut, *Gut Microbes*, 3:289-306pp.
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G. and Lamattina, L.,** 2010, Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent, *The Plant Cell*, 22:3816-3830pp.
- Forrester, M.T., Benhar, M. and Stamler, J.S.,** 2006, Nitrosative stress in the ER: a new role for S-nitrosylation in neurodegenerative diseases, *ACS Chemical Biology*, 1:355-358pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foster, M.W., McMahon, T.J. and Stamler, J.S.,** 2003, S-nitrosylation in health and disease, *Trends in Molecular Medicine*, 9:160-168pp.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B.,** 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133:21-25pp.
- García-Mata, C. and Lamattina, L.,** 2001, Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, *Plant Physiology*, 126:1196-1204pp.
- 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.
- Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A. and Ischiropoulos, H.,** 2004, Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287:262-268pp.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S. and Durner, J.,** 2006, Nitric oxide and gene regulation in plants, *Journal of Experimental Botany*, 57:507-516pp.
- Guo, F.Q. and Crawford, N.M.,** 2005, Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence, *The Plant Cell*, 17:3436-3450pp.
- Guo, F.Q., Okamoto, M. And Crawford, N.M.,** 2003, Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling, *Science*, 302:100-103pp.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.,** 2007, Reactive species can be poisonous, *Free Radicals in Biology and Medicine* 4th ed eds Oxford University Press, Oxford, 440-487pp.
- Hawkins, C.L. and Davies, M.J.,** 1996, Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials, *Free Radical Biology and Medicine*, 21:275-290pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M. and Jing, L.,** 2004, Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition, *Science*, 305:1968-1971pp.
- Henry, Y.A., Ducastel, B. and Guissani, A.,** 1997, Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides, Nitric oxide research from chemistry to biology, *Landes Company*, Olympia, 15-46pp.
- 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.
- Hoson, T.,** 1993, Regulation of polysaccharide breakdown during auxin-induced cell wall loosening, *Journal of Plant Research*, 106:369-381pp.
- Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z. and Cai, W.,** 2005, Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots, *Plant Physiology*, 137:663-670pp.
- Huie, R.E. and Padmaja, S.,** 1993, The reaction rate of nitric oxide with superoxide, *Free Radical Research Communications*, 18:195-199pp.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A., Darvill, A. and Albersheim, P.,** 1999, The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer, *Journal of Biological Chemistry*, 274:13098-13104pp.
- Jackson, M.B.,** 1985, Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence, *Annual Review of Plant Physiology*, 36:145-174pp.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C.G. and Puntarulo, S.,** 2006, Chloroplasts as a nitric oxide cellular source, effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins, *Plant Physiology*, 142:1246-1255pp.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kato, F., Araki, M., Miyazawa, Y., Fujii, N., Takeda, K., Suge, H. and Takahashi, H.,** 2011, Factors responsible for deep-sowing tolerance in wheat seedlings: varietal differences in cell proliferation and the co-ordinated synchronization of epidermal cell expansion and cortical cell division for the gibberellin-mediated elongation of first internodes, *Annals of botany*, 108:439-447pp.
- Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C.R. and Brown, R.M.,** 1999, Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*, *The Plant Cell*, 11:2075-2085pp.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685pp.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G.,** 2003, Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule, *Annual Review of Plant Biology*, 54:109-36pp.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H. and Keegstra, K.,** 2006, Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process, *Current Opinion in Plant Biology*, 9:621-630pp.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H. and Ku, V.V.V.,** 1998, Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36:825-833pp.
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J.M., Barroso, J.B. and Corpas, F.J.,** 2011, Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress, *Plant Signaling & Behavior*, 6:789-793pp.
- Li, L.C. and Cosgrove, D.J.,** 2001, Grass group I pollen allergens (β -expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis, *The FEBS Journal*, 268:4217-4226pp.
- Li, Z.C., Durachko, D.M. and Cosgrove, D.J.,** 1993, An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls, *Planta*, 191:349-356pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lindermayr, C. and Durner, J.,** 2009, S-Nitrosylation in plants: pattern and function, *Journal of Proteomics*, 73:1-9pp.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G., and Durner, J.,** 2006, Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation, *Journal of Biological Chemistry*, 281:4285-4291pp.
- Liszkay, A., Van Der Zalm, E. and Schopfer, P.,** 2004, Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth, *Plant Physiology*, 136:3114-3123pp.
- Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W. and Zhang, J.,** 2009, Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis, *New Phytologist*, 183:1030-1042pp.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R. and León, J.,** 2011, In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 62:3501-3517pp.
- Manjunatha, G., Lokesh, V. and Neelwarne, B.,** 2010, Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities, *Biotechnology Advances*, 28:489-499pp.
- McCall, M.A.,** 1934, Developmental anatomy and homologies in wheat, *Journal of Agricultural Research*, 48:283-322pp.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M. and Cosgrove, D.J.,** 1992, Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants, *The Plant Cell*, 4:1425-1433pp.
- 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.
- 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*, 104:20996-21001pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morgan, J.M.**, 1992, Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat, *Functional Plant Biology*, 19:67-76pp.
- Moro, C.F., Gaspar, M., Silva, F.R., Pattathil, S., Hahn, M.G., Salgado, I. and Braga, M.R.**, 2017, S-nitrosoglutathione promotes cell wall remodelling, alters the transcriptional profile and induces root hair formation in the hairless root hair defective 6 (rhd6) mutant of *Arabidopsis thaliana*, *New Phytologist*, 213:1771-1786pp.
- Mur, L.A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., Harren, F.J.M., Hebelstrup, K.H. and Gupta, K.J.**, 2012, Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge, *AOB Plants*, 5:1–17pp.
- 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 seed germination and elongation growth, *Plant Physiology*, 150:1855-1865pp.
- Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J.T.**, 2003, Nitric oxide signalling in plants, *New Phytologist*, 159:11-35pp.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A. and Hancock, J.T.**, 2002, Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells, *Plant Physiology*, 128:13-16pp.
- Nishitani, K. and Tominaga, R.**, 1992, Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule, *Journal of Biological Chemistry*, 267:21058-21064pp.
- 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.
- Ortega-Galisteo, A.P., Rodriguez-Serrano, M., Pazmino, D.M., Gupta, D.K., Sandalio, L.M. and Romero-Puertas, M.C.**, 2012, S-nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 63:2089-2103pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Osborne, D.J.**, 1984, Ethylene and plants of aquatic and semi-aquatic environments: a review, *Plant Growth Regulation*, 2:167-185pp.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. and Lamattina, L.**, 2002, Nitric oxide is required for root organogenesis, *Plant Physiology*, 129:954-956pp.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W. and Goldman, S.L.**, 2004, Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnology Journal*, 2:359-366pp.
- 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.
- Pedreira, J., Sanz, N., Peña, M.J., Sánchez, 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.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M. and Delledonne, M.**, 2003, Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 16:1094-1105pp.
- 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.
- Rao, K.M. and Sresty, T.V.S.**, 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant science*, 157:113-128pp.
- Rayle, D.L. and Cleland, R.E.**, 1992, The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well, *Plant Physiology*, 99:1271-1274pp.
- Rebetzke, G.J., Richards, R.A., Fettell, N.A., Long, M., Condon, A.G., Forrester, R.I. and Botwright, T.L.**, 2007, Genotypic increases in coleoptile length improves stand establishment, vigour and grain yield of deep-sown wheat, *Field Crops Research*, 100:10-23pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ridley, B.L., O'Neill, M.A. and Mohnen, D.,** 2001, Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, 57:929-967pp.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. and Kaiser, W.M.,** 2002, Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, *Journal of Experimental Botany*, 53:103–110pp.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M. and Delledonne, M.,** 2007, S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration, *The Plant Cell*, 19:4120-4130pp.
- Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K.,** 2006, Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells, *Plant and Cell Physiology*, 47:689-697pp.
- San Ku, H., Suge, H., Rappaport, L. and Pratt, H. K.,** 1970, Stimulation of rice coleoptile growth by ethylene, *Planta*, 90:333-339pp.
- Sánchez-Calvo, B., Barroso, J.B. and Corpas, F.J.,** 2013, Hypothesis: nitro-fatty acids play a role in plant metabolism, *Plant Science*, 199:1-6pp.
- Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A. and Tan, M.,** 2008, Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular antioxidant defense in maize plants, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50:231–243pp.
- Saxena, I.M. and Brown, R.M.,** 2005, Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts, *Annals of Botany*, 96:9-21pp.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sehrawat, A. and Deswal, R.**, 2014, S-Nitrosylation analysis in Brassica juncea apoplast highlights the importance of nitric oxide in cold-stress signaling, *Journal of Proteome*, 13:2599–2619pp.
- Shapiro, A.D.**, 2005, Nitric oxide signaling in plants, *Vitamins & Hormones*, 72:339-398pp.
- Showalter, A.M.**, 1993, Structure and function of plant cell wall proteins, *The Plant Cell Online*, 5:9-23pp.
- Simontacchi, M., Galatro, A., Ramos-Artuso, F. and Santa-María, G.E.**, 2015, Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress, *Frontiers in Plant Science*, 6:977pp.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. and Youngs, H.**, 2004, Toward a systems approach to understanding plant cell walls, *Science*, 306:2206-2211pp.
- Somerville, C.R.**, 2006, Cellulose synthesis in higher plants, *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 22:53-78pp.
- Stamler, J.S., Singel, D.J. and Loscalzo, J.**, 1992, Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science*, 258:1898-1902pp.
- Sternberg, T.**, 2011, Regional drought has a global impact, *Nature*, 472:169-169pp.
- 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*, 20:961-964pp.
- Sun, C., Lu, L., Yu, Y., Liu, L., Hu, Y., Ye, Y. and Lin, X.**, 2015, Decreasing methylation of pectin caused by nitric oxide leads to higher aluminium binding in cell walls and greater aluminium sensitivity of wheat roots, *Journal of Experimental Botany*, 67:979-989pp.
- Sun, Y., Solomon, S., Dai, A. and Portmann, R.W.**, 2006, How often does it rain?, *Journal of Climate*, 19:916-934pp.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H. and Radi, R.**, 2007, Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6:662-680pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takahashi, S. and Yamasaki, H.**, 2002, Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide, *FEBS Letters*, 512:145-148pp.
- Takeda, K. and Takahashi, H.**, 1999, Varietal variation for deep-seeding tolerance in barley and wheat, *Breeding Research*, 1:1-8pp.
- Troyer, A.F.**, 1997, The location of genes governing long first internode of corn, *Genetics*, 145:1149-1154pp.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomes-Rodriguez, M.V., Colmenero-Varea, P., Del Rio, L.A. and Barroso, J.B.**, 2007, Nitrosative stress in plants, *FEBS Letters*, 581:453-61pp.
- Vandelle, E. and Delledonne, M.**, 2011, Peroxynitrite formation and function in plants, *Plant Science*, 181:534–539pp.
- Wendehenne, D., Durner, J. and Klessig, D.F.**, 2004, Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 7:449–455pp.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F. and Durner, J.**, 2001, Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells, *Trends in Plant Science*, 6:177-183pp.
- Wilhelmová, N., Fuksová, H. and Srbová, M.**, 2006, The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide, and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves, *BioFactors*, 27:203-211pp.
- Wojtaszek, P.**, 2000, Nitric oxide in plants: to NO or not to NO, *Phytochemistry*, 54:1-4pp.
- Ya'acov, Y.L., Wills, R.B. and Ku, V.V.V.**, 1998, Evidence for the function of the free radical gas—nitric oxide (NO•)—as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36:825-833pp.
- Yun, B.W., Spoel, S.H. and Loake, G.J.**, 2012, Synthesis of and signalling by small, redox active molecules in the plant immune response, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820:770–776pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, Z., Wang, H., Wang, X. and Bi, Y., 2011, Nitric oxide enhances aluminum tolerance by affecting cell wall polysaccharides in rice roots, *Plant Cell Reports*, 30:1701pp.

Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F.L. and Terzi, M., 2002, Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo, *FEBS Letters*, 515:75-78pp.





ÖZGEÇMİŞ

Çağlar CANDAN, 31.01.1993 tarihinde İzmir’de doğmuştur. Buca 85. Yıl Anadolu Lisesi’nden 2010 yılında mezun olarak ortaöğretimini tamamlamıştır. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı Biyoloji programından 2015 yılında mezun olmuştur. 2015 yılında lisansüstü eğitimine, Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında başlamıştır.

