



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Buğday (*Triticum aestivum* L.) Fidelerinde Tuz-Poliamin  
Etkileşimlerinde Çalışan Genlerin İfadesi ve Antioksidan Enzim Aktivitesi

**Dilek ERMİŞ KAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY**

**Temmuz-2012**



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Buğday (*Triticum aestivum* L.) Fidelerinde Tuz-Poliamin  
Etkileşimlerinde Çalışan Genlerin İfadesi ve Antioksidan Enzim Aktivitesi

**Dilek ERMİŞ KAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY**

**Temmuz-2012**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) FİDELERİNDE TUZ-POLİAMİN  
ETKİLEŞİMLERİNDE ÇALIŞAN GENLERİN İFADESİ VE  
ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİ

DİLEK ERMİŞ KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Yrd.Doç.Dr. Nuray ERGÜN danışmanlığında hazırlanan bu tez 25/07/ 2012 tarihinde  
aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Nuray ERGÜN  
Başkan

Prof. Dr. Deniz YILDIZ  
Üye

Yrd.Doç.Dr. Murat TIRYAKIOĞLU  
Üye

Bu tez, Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

Prof.Dr. İlhan Üremiş  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma M.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir

**Proje No: 1105 Y 0107**

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

**İÇİNDEKİLER**

ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>11</b>
3.1. Materyal .....	11
3.2. Yöntem .....	11
3.2.1.Bitki Yetiştirme Koşulları.....	11
3.2.2. İncelenen Özellikler.....	13
3.2.2.1 Bitki Büyüme Ölçümleri .....	13
3.2.2.2. Kuru Madde Tayini .....	13
3.2.2.3. Pigment Analizi .....	13
3.2.2.4. Enzim Analizleri .....	14
a) Glutasyon Redüktaz (GR) Analizi .....	14
b) Katalaz (KAT) Analizi.....	14
3.2.2.5. Gen İfadelerinin Tespiti.....	14
a) RT-PCR Hazırlık Aşamaları.....	14
b)TOTAL RNA İzolasyonu .....	15
c)RNA İzolasyon Protokol Aşamaları.....	15
d).cDNA Elde Etme.....	16

e) Real Time PCR Protokolü .....	17
f) Verilerin Değerlendirilmesi.....	17
3.3 İstatistiksel Analizler.....	17
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>18</b>
4.1. Tuz-Poliamin Etkileşimlerinin Bitki Büyümesi Üzerine Etkileri.....	18
4.1.1. Kök Gelişimine Etkileri.....	18
4.1.2. Sürgün Gelişimine Etkileri.....	20
4.1.3. Pigment Miktarı Üzerine Etkileri.....	22
4.1.4. Katalaz ve Glutatyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	27
4.1.5. Gen İfadeleri ve Sonuçları.....	29
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>43</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>44</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>45</b>

## ÖZET

### BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) FİDELERİNDE TUZ-POLİAMİN ETKİLEŞİMLERİNDE ÇALIŞAN GENLERİN İFADESİ VE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİ

Bu araştırmada, buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Dağdaş, ES-14 ) fidelerinde tuz, tuz-spermin (spm) ve tuz-spermidin (spmd) etkileşimleri incelenmiştir. Kök, sürgün boyu ve kök,sürgün kuru ağırlığı, klorofil a (kla), klorofilb (klb), toplam klorofil (kla+b) ve karotenoid miktarı, katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) antioksidant enzim aktivite ve tuz, tuz+poliamin etkileşimlerinde çalışan MYB73, ERF1 ve SRG genlerinin ifadesi belirlenmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız Dağdaş ve ES-14 buğday çeşitlerinde kontrol grubuna kıyasla tuz uygulanan gruplarda tuzluluğun kök ve sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Yine tuzluluğun etkisiyle birlikte klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarlarında da bir azalma meydana gelmiştir. Pigment miktarlarının sadece tuz uygulanan fidelerde tuz+poliamin uygulanan fidelere göre bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir. Katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde ise tuz stresine bağlı olarak kontrole göre artışlar meydana gelmiştir. Dağdaş ve ES-14 fidelerine tuz+poliamin uygulamaları ile tuz uygulaması CAT ve GR enzim aktivitesini arttırmıştır. Gen verilerimiz incelendiğinde ise tuz stresine bağlı olarak kontrole göre tuz uygulamalarında MYB, SRG ve ERF gen miktarlarında artış meydana geldiği görülmüştür. Her iki çeşit ve yapılan uygulamalar göz önüne alındığında buğday fidelerinde en fazla gen ifadesinin MYB en az gen ifadesinin ise SRG olduğu tespit edilmiştir. Tuz+spm ve tuz+spd uygulamaları Dağdaş çeşitinde her 3 genin ifadesini yalnızca tuz uygulamalarına göre arttırmasına rağmen ES-14 çeşitinde gen ifadelerinde bir miktar azalma belirlenmiştir.

**2012, Sayfa 59**

**Anahtar kelimeler: Buğday, Tuz Stresi, Poliamin, Katalaz, Glutatyon redüktaz, RT-PCR,**

## ABSTRACT

### EXPRESSION OF GENES WHICH WORKS ON SALT POLYAMINE INTERACTIONS ON WHEAT (*Triticum aestivum* L.) AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY

In the present study, salt, spermin, salt-spermin, salt-spermidine and their interactions were investigated on wheat seedlings (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş, ES14). Root, shoot and root length, shoot dry weight, chlorophyll a and b, total chlorophyll (a+b) and caretenoid amount, catalase, glutation reductase enzyme activity as well as gene expressions during salt and salt-polyamine interactions were investigated.

Salt negatively affected shoot and root develeopment on wheat cultivars 'Dağdaş' and 'ES-14' used in this study. In addition, amount of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll also decreased with salt appilications. Amount of pigment was relatively higher on seedlings applied with salt and polyamine. Catalaz (CAT) and glutation reductase (GR) activites were higher than the control treatment. Both salt and salt+polyamine treatments increased the CAT and GR activities. Salt treatments also increased gene expression of MYB, SRG and ERF. When both cultivars and salt treatments were considered, MYB expression was highest, SRG was the lowest. Salt+spm and salt+spd treatments increased the expression of the three genes on Dağdaş while expression of the genes was lower on ES-14.

2012, Sayfa 59

**Keywords: Wheat, Salt Stress, Polyamine, Catalaz, Glutatione reductase, RT-PCR**

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AP</b>	Askorbat peroksidaz
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>GR</b>	Glutatyon Redüktaz
<b>GSH</b>	Glutatyon (İndirgenmiş)
<b>GSSG</b>	Glutatyon ( Yükseltgenmiş)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>MDA</b>	Malondealdehit
<b>MDHA</b>	Monodehidroaskorbat
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit radikali
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>PA</b>	Poliamin
<b>POD</b>	Peroksidaz
<b>ROT</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SPD</b>	Spermidin
<b>SPM</b>	Spermin



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil.4.1.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama kök boyundaki değişmeler.....	18
<b>Şekil.4.2.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama kök kuru ağırlığındaki değişmeler.....	19
<b>Şekil.4.3.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama sürgün boyundaki değişmeler.....	20
<b>Şekil.4.4.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama sürgün kuru ağırlığındaki değişmeler.....	21
<b>Şekil.4.5.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama klorofil a miktarındaki değişmeler.....	22
<b>Şekil.4.6.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama klorofil b miktarındaki değişmeler.....	23
<b>Şekil.4.7.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama toplam klorofil miktarındaki değişmeler.....	24
<b>Şekil.4.8.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama karotenoid miktarındaki değişmeler.....	25
<b>Şekil.4.9.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama katalaz miktarındaki değişmeler.....	27
<b>Şekil.4.10.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama glutatyon redüktaz miktarındaki	

değişmeler.....	28
<b>Şekil.4.11.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş, ES-14) fidelerinin MYB gen miktarındaki değişmeler.....	30
<b>Şekil.4.12.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin SRG gen miktarındaki değişmeler.....	32
<b>Şekil.4.13.</b> Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ERF gen miktarındaki değişmeler.....	33

## 1.GİRİŞ

Buğday, tarih boyunca olduğu gibi bugün de insanların beslenmesinde kullanılan en önemli tahıllardan birisidir (FAO 2010). Buğday (*Triticum*), Buğdaygiller (Poaceae) ailesinden bütün dünya da ıslahı yapılmış tek yıllık otsu bir bitkidir. Karasal iklimi tercih eder. Üretim bakımından ise mısır ve çeltikten sonra 3. sırada yer alır. Buğday; un, irmik, nişasta ve yem üretilmesinde kullanılan temel bir besin maddesidir. Kabuğu ayrılabilen gibi kabuğu ile de öğütülebilir. Buğday aynı zamanda çiftlik hayvanları için bir yem maddesi olarak da yetiştirilmektedir. Hasattan sonra atık ürün olarak saman balyası çıkar. Buğdayın yetişme şartlarına uygun olan yurdumuzun hemen hemen her yöresinde buğday ekilmektedir ve ekiliş ve üretim yönünden birinci planda yer almaktadır. Ülkemizde tarla tarımına ayrılan ekili alanların % 83'ünü buğday alanı kaplar. Buğday günümüzde olduğu gibi gelecekte de ülkemizde önemini koruyacaktır. Bu nedenle üretim artışının sürekli ve kararlı olabilmesi amacıyla, uygun çeşit ve yetiştirme tekniklerinin kullanılması yanında farklı iklim ve toprak şartlarında yetiştirilebilecek çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Tahıllar insan beslenmesinde doğrudan ya da dolaylı olarak kullanılan temel ürünlerdir. Günümüzde bilim adamlarının üzerinde önemle durduğu ve insanlığın tamamını ilgilendiren konuların başında, dengeli beslenmenin sağlanması ve açlık probleminin çözümü gelmektedir. Dünya nüfusunun sadece %15-20'sinin dengeli beslendiği, geri kalan nüfusun büyük bir bölümünün ise sadece fizyolojik olarak karnını doyurduğu göz önüne alınırsa konu daha da önemli bir boyut kazanmaktadır (Türk ve Yürür 2004). Dünya da nüfus artışının, besin maddeleri artışından daha fazla ve hızlı olması ve dünya nüfusunun 2020 yılında iki katına çıkacağı düşünülürse önümüzdeki bu kısa süre içerisinde birçok ürünlerdeki üretim düzeyinin iki katına çıkarılması gerektiği belirtilmektedir (Başer vd., 2005).

2010 yılı istatistiklerine göre dünya buğday ekim alanı 217 milyon hektar, üretimi 650 milyon ton, verimi ise 3000 kg/ha'dır (FAO 2010). Dünya nüfusunun %35'inin temel besin maddesi buğday olup, insanlar tarafından tüketilen günlük kalorinin %20'si buğdaydan sağlanmaktadır.

Abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık ve ağır metal vs.) ve biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) stresler ekonomik önemi olan tahıllar dahil tüm bitkilerde fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açarlar

(Akgün ve ark., 2011; Amudha ve Balasubramani, 2011; Roychoudhury ve ark. ,2011; Şen ve Ali kamanoglu,2011; Ergün ve Öncel, 2012). Bütün bu stresler bitkilerin normal fonksiyonlarını değiştirir ve böylece bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilirler (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Biyotik ve abiyotik streslerin varlığı zararlı oksijen türlerinin oluşumunu desteklemektedir. Bu oksijen türevleri çeşitli hücre komponentlerinin zararlanmasına ve parçalanmasına sebep olmaktadır. Aktif oksijenin formları olan serbest radikallerin oluşumu doğrudan ya da dolaylı yoldan metallerle ilişkilidir ve bunlar değişik hücre komponentlerinde özellikle biyolojik membranlarda zarara sebep olabilmektedir (Van Assche ve Clijsters 1990).

Bitkilerde abiyotik stres yoğunluğu ve pa seviyesi arasında ilişki olmasına rağmen, pa seviyesi ile fizyolojik temel arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammıştır.

Ürünlerin abiyotik streslere adaptasyonu transkripsiyon faktörlerini içeren stres koruma genlerinin ve onların regülatörlerinin, ekspresyonunda değişikliklere yol açmaktadır (Roychoudhury ve ark., 2011). MYB süper ailesinin proteinleri bitkilerde gelişim süreçleri ve savunma yanıtlarında merkezi rol oynamaktadır ( Zhang ve ark, 2011).

Tuzluluk, dünya topraklarının en önemli sorunlarından biridir. Dünya da her yıl 10 milyon hektar arazinin tuzluluk etkisiyle elden çıkması sorunun boyutunu daha iyi göz önüne sermektedir (Kwiatowski, 1998). Yurdumuzda ise toprakların 1,5 milyon hektarı tuzluluk sorunuyla karşı karşıyadır (Ekmekçi ve ark., 2005). Özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yetersiz yağış ve yüksek buharlaşma tuzluluğun başta gelen sebeplerindedir. Dünya da tarım arazilerinin sınırlı olduğu ve besin ihtiyacının katlanarak arttığı dikkate alınırsa en azından mevcut arazilerin daha verimli kullanılması gerektiği ortaya çıkar. Bu yüzden tuzlu toprakların ıslahı ve ekonomik bir şekilde değerlendirilmesi zorunluluğu vardır (Woods, 1996). Dünyadaki bitkisel üretim, su baskınları, tarım alanlarının kuraklık, tuzluluk, sulama hataları, erozyon, çevresel kirlenme gibi etmenlerle verimsizleşmesinden dolayı sınırlanmaktadır.

Çözünebilir tuzlar, bitkiler tarafından kolayca alınabilirler. Bu tuz bileşikleri belirli bir miktarı aşınca beslenme ve metabolizmayı bozmak yoluyla bitkiye zarar verirler. Bununla birlikte toprakta tuz konsantrasyonunun artmasıyla, bitkinin topraktan su alımı güçleşmekte ve böylece toprağın yapısı bozularak bitki gelişimi yavaşlamakta hatta

durmaktadır (Kanber ve ark. 1992; Güngör ve Erzel 1994). Bununla birlikte bitki verimi ve kaliteside düşer (Yurtseven ve Bozkurt, 1997; Kara ve Apan, 2000; Yurtseven, 2000; Yurtseven ve ark., 2001). Öte yandan yanlış sulama uygulamaları da özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluğa sebep olabilmektedir (Ergene, 1982).

Tuz stresi pek çok aktiviteyi etkilemektedir. Tuz stresi ile meydana gelen ozmotik etkiler sonucunda su eksikliği oluşur. Su eksikliği süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), tekil oksijen ( $^1O_2$ ) ve hidroksil radikalleri (OH $\cdot$ ) gibi çeşitli reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesine neden olur. Reaktif oksijen türleri (ROT), stres koşullarında mitokondri ve kloroplastlarda meydana gelen metabolik reaksiyonlar sonucu oluşur. Bunun yanı sıra endoplazmik retikulum ile nukleus membranında sitokrom oksidasyonu ve enzimlerin katalitik döngüleri sırasında da oluşmaktadır. ROT, hücrede membran lipitleri, nükleik asitler, proteinler, klorofiller ve diğer makromoleküllere zarar verirler. Bitkiler, tuz stresi ile oluşan rot'nden hücreyi korumak amacıyla glutatyon, askorbat, karotenoidler gibi antioksidanları ve katalaz, peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi antioksidatif enzimleri kullanırlar. Bu enzimler arasında katalaz (KAT E.C.1.11.1.6) ve askorbat peroksidaz (APx) ve glutatyon redüktaz (GR E.C.1.6.4.2) zellikle çok önemlidir (Yılmaz ve ark., 2011).

Yapılan alışmalar sonucunda elde edilen verilere göre tuz stresinin bitkinin kök, sürgün gelişiminde ve kuru ağırlığında azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. (Noori ve ark., 2000; avuşoğlu, 2006; Husain ve Munns, 2007; Duran ve ark., 2010; Akgün ve ark., 2011).

Tuzluluk bitkilerin pigment miktarları (klorofil a, klorofil b, klorofil a+b, karotenoid) zerinde de olumsuz bir etkiye neden olmaktadır (Yakit ve Tuna 2006; Husain ve Munns, 2007; Ayşe ve ark. 2011).

Tuzlu ortamda yetişen bitkilerin antioksidan enzim aktivitelerinde de (SOD, APX, GR, CAT) değişikliklerin meydana geldiği araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Genel olarak tuz stresi ile birlikte enzim aktivitelerinde artış meydana geldiği görülmüştür (Ayşe ve ark., 2011; Yılmaz ve ark., 2011; elik ve Atak, 2012).

Bitkilerde tuzluluk ile ilgili pek çok çalışmada ROT'ların zararlarını ortadan kaldırmak için antioksidan savunma sistemi ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur

(Argawal ve Pandey 2004, Koca vd. 2006, Kholova ve ark., 2010; Şen ve Alikamanoğlu 2011 ).

Tuz stresi  $\text{Na}^+$  iyonunun toksik aksiyonu  $\text{K}^+$  iyonunun beslemesinin bozulması, bitki su durumunun modifikasyonu gibi çok sayıda yıkıcı proseslere ve oksidatif stresler reaktif oksijen türlerinin oluşumu, membran zararları ve endojen protein oksidasyonu ya da yıkımı gibi sekonder streslere neden olmaktadır (Zhu, 2002).

Abiyotik stres faktörlerinden kaynaklanan zararlar buğday üretimini önemli derecede kısıtlamaktadır. Tuzluluktan kaynaklanan zararlar da küçümsenmeyecek kadar fazladır. Oluşan zararı en aza indirmek için kültürel önlemlerle yapılan mücadelenin yanında, dayanıklı çeşitlerin ıslahı da önem arz etmektedir. Dayanıklı çeşitlerin elde edilmesi, bu stres faktörüne bağlı morfolojik ve fizyolojik karakterlerin takip edilmesi ve genotiplerle olan ilişkilerinin belirlenmesiyle mümkündür. Günümüzde, farklı genotiplerin gen kaynağı olarak kullanılması ve tolerans genlerinin buğday kromozomu üzerindeki yerlerinin belirlenmesi, moleküler işaretleyiciler sayesinde daha kısa sürede yapılabilmekte ve genlerin klonlanmasını kolaylaştırmaktadır.

Poliaminlerin biyolojik membranların stabilizasyonunu ve direkt membran fosfolipitlerine bağlı hücresel yapıların stabilizasyonu, serbest radikallerin direkt temizlenmesi, osmotik düzenleme, anyon-kasyon dengesini sürdürmek, iyon kanallarının modülasyonu, antioksidan enzimlere bağlanarak ve onların aktivitesini arttırarak etki etmenleri bakımından tuz stres direncinde bu moleküllerin ilişkisi sorgulanabilir (Tang ve Newton,2005; Verma and Mishra 2005). Tuza toleranslı bitkilerin çeşitli streslere cevap olarak poliaminleri daha fazla biriktirme kapasitesine sahiptir (Roychoudhury vd, 2008).

Son yıllarda önemli bir yere sahip olan genetik araştırmalar ışığında edinilen bilgilere göre stres şartlarında gen ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2007; Wang ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında, buğday (*Triticum aestivum* L. cv Dağdaş ve ES-14) fidelerine tuz, tuz-spermin ve tuz-spermidin uygulamalarının etkileşimleri incelenmiştir. Çeşitler arasındaki stres tepkisi farklılıkları ile tuz stresinin çeşitli fizyolojik, biyokimyasal parametreler ile gen ifadesi üzerindeki etkilerinin belirlenerek meydana gelen inhibisyonların, poliaminler ile azaltılması ya da ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Buğday çeşitlerinin tuz stresine gösterdiği tepkiler fidelerin kök, sürgün boy ve kuru

ağırlıkları, pigment ( kl a, kl b, klorofil a+b ve karotenoid ) birikimi; CAT ve GR antioksidan antioksidan enzim aktiviteleri; tuzlulukta ifade edilen MYB, ERF ve SRG genlerinin gen ekspresyonları incelenmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte organizmalarda belirgin fizyolojik değişimler meydana getirebilme kapasitesidir (Kadıoğlu, 2007). Stresin şiddeti ve süresine bağlı olarak organizmalarda meydana gelen değişimler, türler ve hatta türün bireyleri arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Stres sonucu oluşan hasar, bir metabolizma bozukluğunun göstergesi olup, bitki büyümesi ve veriminde azalma ile sonuçlanır (Kadıoğlu, 2007).

Bitki gelişimi çoğunlukla biyokimyasal reaksiyonların bir fonksiyonudur. Bu reaksiyonlar enzimler tarafından kontrol edilir. Bir enzimin aktivasyonu baskılandığında onunla ilgili gelişim işlemleri de baskılanır (Treshow, 1970)

Bitkilerin stres koşullarına dayanıklılığı ile ilgili çalışmalar günümüzde stres koşullarında ifade olan genlerin tanımlanmasına doğru yönelmiştir. Bu genlerin tanımlanması, çeltik (*Oryza sativa*) ve Arabidopsis bitkilerinin gen dizilimlerinin belirlenmesi ile artış kazanmıştır (Bartels ve Sunkar 2005).

Poliaminler (Pas) diamin putresin ( $\text{put}^{+2}$ ), triamin spermidin ( $\text{spd}^{+3}$ ) ve tetraamin spermin ( $\text{spm}^{+4}$ ) içeren yaygın, düşük molekül ağırlıklı, düz zincirli alifatik aminlerdir. Konsantrasyonu 10  $\mu\text{M}$  dan mM a kadar değişen bitki büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik pH larında dolayı poliaminler, nükleik asitler, membran fosfolipitleri ve hücre duvar bileşenleri ile interaksiyona girebilir ve böylece bu molekülleri stabilize edebilirler. Son yıllarda osmatik stres, tuzluluk, kuraklık, sıcaklık, üşüme, yüksek ışık konsantrasyonu, besin eksikliği, ağır metaller, pH değişiklikleri, UV-ışınması ve kirlilik stresi gibi çeşitli çevresel streslere bağlı cevap olarak poliaminler dikkat çekmektedir (Alcazar ve ark. 2006; Liu ve ark. 2007).

Toprak suyu tuzluluğunun bitki gelişimi üzerinde meydana getirdiği zararlı etkileri şu şekilde sıralayabiliriz;

- Yavaş ve yetersiz çimlenme
- Fizyolojik kuraklık, solma ve kuruma
- Küçük yapraklar, kısa gövde ve dallar
- Çiçeklenmenin gecikmesi, daha az çiçek açma ve tohumların daha küçük olması
- Tuza dayanıklı yabancı otların gelişmesidir.

Genel olarak tuzlulukla ilgili çeşitli çalışmalar tuzluluk ile çimlenme oranı, rejenerasyon hücre yüzdesi, ortalama taze ve kuru ağırlık, gövde ve kök uzunluğu ve klorofil



içerisinde azalma gibi büyüme parametreleri arasında negatif bir ilişki vardır (Argawal ve Pandey 2004).

Bitkiler abiyotik strese maruz kaldıklarında, stres koşullarına uyum sağlamak amacıyla tepki olarak bazı genlerin anlatımlarında değişimler meydana gelmektedir (Seki ve ark., 2001; Singh ve ark., 2002).

Stres koşullarında anlatımı değişen genler:

- a) Sadece stres koşullarında anlatım yapanlar,
- b) Anlatımı artanlar,
- c) Anlatımı azalanlar,
- d) Anlatımı duranlar şeklinde dört grupta toplanmaktadır.

Özellikle sadece stres koşullarında anlatım yapan ve strese anlatımı artan genlerin, stres tepki mekanizmasının stres toleransını artırma, gen anlatımının düzenlenmesi ile sinyal iletimi kısımlarında işlevlerinin olduğu düşünülmektedir (Yamaguchi-Shinozaki ve ark., 2002).

Tuz stresi altındaki bitkiler, ozmotik dengelerini sağlamak için düşük molekül ağırlığa sahip çeşitli organik maddeleri yüksek konsantrasyonlarda bünyelerinde biriktirmektedirler. Tuzluluk şartları altında düşük molekül ağırlıklı şekerlerin miktarı artmaktadır. Polisakkaritler ve şekerler; ozmotik dengeyi sağlama ve koruma, tuz stresi altında çeşitli radikallerin temizlenmesi amacıyla biriktirmektedirler (Ashraf ve Parvaiz., 2004).

Çok yüksek konsantrasyonda tuza maruz kalan bitkilerin büyüme ve yaşam döngülerini tamamlayabilmelerine tuz toleransı denir.

Bitkiler tuza karşı gösterdikleri tepkilere göre halofitler ve glikofitler olmak üzere iki büyük grup altında toplanmaktadır.

-Halofitler yüksek tuz konsantrasyonlarına adaptasyon sağlamış bitkilerdir (salicornia herbacea, suaeda maritima gibi.)

-Glikofitler ise yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamlarını sürdüremeyen tuza duyarlı bitkilerdir.(mısır, arpa, pamuk, soğan gibi).

Konak ve ark., (1998), ege bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen 7 ekmeklik ve 2 makarnalık buğday çeşidinin çimlenme ve fide dönemindeki tuza toleranslarını incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, sera koşullarında hougland besin çözeltisinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında (kontrol ve EC degeri 8,16,24 mmhos/cm) buğdayları

yetiştirmişlerdir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, Cumhuriyet-75, Seri-82 ve Basribey-95 çeşitlerinin tuza toleranslı, Kaklıç ve Gönen çeşitlerinin ise hassas olduklarını belirlemişlerdir.

Mutlu ve Bozcuk (2000), ayçiçeği (*Helianthus annuus* L. cv. Santafe) tohumlarının çimlenmesi ve bazı erken büyüme parametreleri üzerine farklı konsantrasyonlardaki NaCl (50, 100, 200Mm) ve spermin (Spm)'in (0.01, 1, 2 mM) etkilerini incelemişlerdir. konsantrasyona bağlı olmaksızın tuz uygulaması yapılmayan şartlarda spm uygulaması, çimlenme yüzdesi ve bazı büyüme parametreleri (sürgün uzunluğu, taze ve kuru ağırlık üzerinde etkisiz bulmuşlardır.

Noori Sadat ve Mcneilly, (2000), 29 durum genotipinde tuzluluğun kök büyümesine etkisini inceledikleri çalışmada kök büyümesinin gerileme gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Öncel ve Keleş (2002), çeşitli buğday genotiplerinde 200 mM NaCl uyguladıkları çalışmada fidelerde büyümenin ve klorofil içeriğinin önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir.

Karagüzel, (2003), yaptığı çalışmada farklı tuz kaynak ve konsantrasyonlarının lupinus varius tohumlarının çimlenme özellikleri üzerine etkisini incelemiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre kök büyümesinde gerilemeler, sürgün ve köklerin yaş ve kuru ağırlığında ve buna bağlı olarakta kuru madde miktarında azalmalar meydana geldiği belirtilmiştir.

Ekmekçi ve ark., (2005), çeşitli bitkilerde tuzluluğun bitki gelişimine etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre, sulama suyu tuzluluğunun, ele alınan bitkilerin hemen hepsinde verim ve kaliteyi azaltıcı etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Çavuşoğlu (2006), bazı hormonlar ve büyüme düzenleyicilerinin yüksek sıcaklık ve tuz stresleri altındaki arpa ve turp tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda ise tuzluluğun arpa ve turp tohumlarının çimlenmesi için gerekli süreyi uzattığını ve çimlenme yüzdesini düşürdüğünü, fide büyüme parametreleri üzerinde de engelleyici etki gösterdiğini gözlemlenmiş ve bu etkinin hormon ve hormon benzeri aktivite gösteren büyüme maddeleri uygulanarak ortadan kaldırılmasının muhtemel olduğunu belirtmiştir.

Ma ve ark., (2006), 150 mM NaCl uygulanan arabidopsis bitkisinden 3. ve 24. saatlerde yaprak örnekleri ve gen ifadesi farklılıklarını karşılaştırmıştır. Çalışma

sonucunda en iyi stres cevabının uygulanan bu tuz konsantrasyonda alındığı belirlenmiştir.

Yakit ve Tuna (2006), tuzlu koşullarda yetişen mısır bitkisinde tuz stresinin yaprakların klorofil içeriği üzerine azaltıcı etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Husain ve Munns, (2007), çeşitli tuz konsantrasyonlarında (1 mM, 75 Mm, 150 Mm) yetiştirilen altı durum genotipinde, kuru ağırlığın, bitki boyunun ve klorofil içeriğinin olumsuz etkilendiğini ifade etmişlerdir.

Roychoundhury ve ark., (2008), 200 mM tuz uygulanan nonabokra, M-1-48 ve gobindolohog pirinç çeşitlerinde kök ve gövde büyümesi ile klorofil miktarının önemli ölçüde azaldığını ifade etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar tuz uygulaması sonucu antosiyanin, sistein ve prolin poliamin seviyesinin özellikle nonabokra çeltik çeşitinde arttığını belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra CAT aktivitesinin artan tuz konsantrasyonu ile azaldığını bildirmişlerdir.

Duran ve ark., (2010), farklı tuz konsantrasyonlarının (100 mM ve 200 mM) Mirzabey, Altın, Kunduru1149, DH-6 ve DH-8 genotipleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre tuzluluğun kök uzunluğu, kuru ağırlık ve pigment miktarları üzerinde olumsuz bir etki medya getirdiğini gözlemlemişlerdir.

Akgün ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada tuz uyguladıkları 5 triticale genotipinde tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kök ve gövde büyümesi ve kuru ağırlığında azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Ayşe ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada invitro doku kültüründe geliştirilen Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 buğday çeşitlerinin kültürlerine 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 mM konsantrasyonlarında NaCl uygulamıştır. Artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak 28 günlük olgun embriyo kültürlerinde her üç varyetede de bitki rejenerasyonunda bitki taze ağırlığı ve klorofil içeriğinde azalmalar bulmuşlardır. Çözünür protein içeriği Flamula-85 varyetesinde tuzlulukta artarken, Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerinde azaldığını bulmuşlardır. Ek olarak, her üç çeşitte de tuz cevabı olarak SOD, CAT ve POD enzim aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir.

Roychoundhury ve ark (2011), eksojen olarak kısa süreli tuz uygulaması ile birlikte uygulanan poliaminlerden spermin ve spermidinin M-1-48 (tuza duyarlı), nonabokra

(tuz toleransı) ve gobindolohog (çok duyarlı) hint çeltik çeşitlerine etkisini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir.

Yılmaz ve ark. (2011), bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri üzerine bir araştırma yapmışlardır. Tuz stresinin bitkilerde morfolojik, anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde pek çok değişikliğe neden olduğunu ve bunun sonucunda bitkilerin reaktif oksijen türlerini yok eden çeşitli enzimatik olmayan antioksidanlar ile antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttırılması, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve ozmolit sentezinin teşvik edilmesi, fotosentetik yolun değiştirilmesi, gen ifadesi ve SOS yolu ile iyon alımının düzenlenmesi, stresle ilgili genlerin aktive edilerek transkripsiyon faktörlerinin sentezlenmesi ve stres proteinlerinin üretiminin teşvik edilmesi gibi tolerans stratejileri geliştirdiklerini saptamışlardır.

Çelik ve Atak (2012), yaptıkları çalışmada iki çeşit tütünün ( İzmir Özbaş ve Akhisar 97) tuza toleranslarını karşılaştırmışlardır. Bu denemeyi invitro ve invivo koşullarda gerçekleştirmişlerdir. Çeşitli tuz konsantrasyonları (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 mM NaCl) uyguladıkları fidelerde analiz sonuçlarına göre; süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, katalaz aktivitelerinde anlamlı farklılıklar görülmemesine rağmen glutatyon redüktaz aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar olduğunu görmüşlerdir. Buradan yola çıkarak glutatyon redüktazın tütün çeşitlerinde tuz toleransının değerlendirilmesinde önemli bir enzim olduğu sonucuna varmışlardır.

### **3.MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

Araştırmamızda bitki materyali olarak (*Triticum aestivum* L. cv. Dağdaş ) ve ES-14) buğday tohumları kullanılmıştır. Buğday tohumları Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümün'den temin edilmiştir.

#### **3.2 Yöntem**

##### **3.2.1 Bitki Yetiştirme Koşulları**

Çalışmamızda materyal olarak kullanılan fidelerin yetiştirilmesi sürecinde buğday tohumları 20 dakika % 2'lik sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisi ile (Rubio vd. 1994) steril edildikten sonra, distile su ile yıkanmıştır, petrielerde distile su ile nemlendirilmiş filtre kağıdı arasında  $24\pm 2$  °C'lik inkübatörde 48 saat süre ile çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlendirilen tohumlar kum-perlit karışımı (1:1, v:v) (kum çapı ortalama olarak 0,7 mm, perlit çapı ortalama 2,8 mm) bulunan kavatalarda iklim kabininde beş gün distile su ile sulanarak büyütülmüştür. Beşinci günün sonunda fideler kum-perlit karışımından çıkarılmış ve kökler distile su ile zarar verilmeden iyice yıkanmıştır. Fidelerin su kültürü tekniği ile yetiştirilmesinde iki litrelik, dışı ışık geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılmış (Salisbury ve Ross, 1992) plastik kaplar kullanılmıştır. Plastik kapların ağız kısmına fideleri yerleştirmek üzere 6 adet delik bulunan özel kapaklar hazırlanmış ve kapakların üzeri yine alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Her kaba iki litre besin çözeltisi konulmuştur. Besin çözeltisi olarak pH'ı 5.7' ye ayarlanmış tam güçlü Arnon ve Hoagland (1940) çözeltisi kullanılmıştır. Daha sonra fidelerin kök-sürgün ayırım bölgesi bir parça sünger ile sarılmış ve fideler kapak üzerindeki 5 adet deliğe ayrı ayrı yerleştirilmiştir. Deliklerden biri ise çözeltiyi havalandırmak amacıyla kullanılmıştır. Kaplarda bu şekilde hazırlandıktan sonra iklim kabinine yerleştirilmişlerdir.



**Şekil.3.1:**Triticum aestivum fidelerinin besin solüsyonuna alınması ve büyütme kabinde yetiştirilmesi.

Fideler, gün boyu havalandırılmak suretiyle 10 gün büyütülmüşlerdir. 5. gün kaplardaki çözeltiler dökülüp yeni besin çözeltileri ile doldurulmuştur. Poliamin ve tuz uygulamaları (fideler 10 günlük iken) besin çözeltilerine karıştırılmak suretiyle yapılmıştır. Poliamin uygulamalarında spermin ve spermidin seçilmiş ve 1mM uygulama yapılmıştır. Tuz uygulamasında ise NaCl seçilmiş ve 200 mm uygulama yapılmıştır. Bitkiler iklim kabinde ortalama  $24\pm 2$  °C sıcaklıkta, nisbi nemin % 66 ve ışık koşullarının ortalama 1198 lüks olduğu koşullarında yetiştirilmiştir.

Her deneme ünitesi 3 tekrarlı yürütülmüştür. Deneme süresince kapların yerleri tesadüfi olarak belirlenmiş ve kendi aralarında her gün saat yönünde rotasyonla yerleri değiştirilerek tekdüzelik sağlanmıştır. Bitkiler, bu işlemlerin akabinde hasat edilmiştir.

Hasat sonrasında bitki büyüme ve klorofil ölçümleri taze materyalden gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal analizler için ayrılan fidelerin kökleri kök-sürgün ayırım bölgesinden kesilmiş ve sürgünler moleküler ve enzim analizleri için küçük parçalar halinde derin dondurucuda, -80 derecede saklanmıştır.

### 3.2.2. İncelenen Özellikler

#### 3.2.2.1. Bitki Büyüme Ölçümleri

Hasattan sonra tuz ve poliamin uygulamaları yapılan fideler arasından tesadüfi bloklar deneme desenine göre seçilen 5 fidede kök ve sürgün boyları cm olarak ölçülmüştür. Daha sonra fideler kök-sürgün ayırım bölgesinden kesilerek kök ve sürgün taze ağırlıkları ayrı ayrı belirlenmiştir.

#### 3.2.2.2 Kuru Madde Tayini

Fidelerde kuru madde miktarı hasattan sonra taze ağırlıkları alınan örnekler 110 °C'lik etüvde 48 saat kurutulduktan sonra tartılarak kuru ağırlıkları elde edilmiştir.

#### 3.2.2.3 Pigment Analizi

Yaprak dokularındaki klorofil *a* ve *b*, toplam klorofil (*a* + *b*) ve karotenoid miktarları (mg/ml,gr T.A.) Arnon (1949)' a göre belirlenmiştir.

Hasat edilen fidelerin birinci yapraklarının en geniş yerinden beşer cm'lik segmentler alınıp tartılmıştır. Segmentler, küçük parçalara ayrılarak 10 ml % 80' lik aseton ile havanda ezilerek süzölmüştür. Daha sonra spektrofotometrede (1240 UV/Vis. Spectrophotometer), 663, 645 ve 470 nm'deki absorbans değerleri kaydedilmiştir. Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Arnon, 1949).

$$Kla (AR) = [(12.7 \times A663) - (2.69 \times A645)]$$

$$Klb (AR) = [(22.9 \times A645) - (4.68 \times A663)]$$

$$Kla+b (AR) = [(20.21 \times A645) + (8.02 \times A663)]$$

$$Kla/b (AR) = Kla (AR) / Klb (AR)$$

Daha sonra bu değerler, Porra (2002)'ın önerisi dikkate alınarak aşağıdaki gibi düzeltilmiştir.

$$Kla (P) = Kl a+b (P) \times Kl a/b(P) / (Kla/b (P) + 1)$$

$$Klb(P) = Kl a+b (P) / (Kl a/b (P) + 1)$$

Burada gerekli olan Kla+b ve Kla/b değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır.

$$Kla+b (P) = 0.895(Kla+b (AR) )$$

$$Kla/b (P) = (0.593 + 0.459 (Kla/b (AR) ) + 0.229 (Kl a/b (AR) ) \times 2$$

Düzeltilmiş konsantrasyon değerleri ele alınarak önce birim yaprak ağırlığı başına klorofil pigment miktarları (mg. g<sup>-1</sup>) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$Kla(mg g^{-1}) = Kla (P) \times (V/W)$$

$$Klb(mg g^{-1}) = Klb (P) \times (V/W)$$

$$Kla+b(mg g^{-1}) = Kla+b (P) \times (V/W)$$

### 3.2.2.4 Enzim Analizleri

#### a. Glutasyon Redüktaz ( GR, 1.6.4.2 )

Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesi, Çakmak ve Marschner (1992) ve Çakmak (1994)'e göre 340 nm dalga boyunda NADPH oksidasyonuna bağlı olarak absorbanstadaki azalma dikkate alınarak ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı (1ml), 50 mM fosfor tamponu (pH 7.6), 0,1 mM EDTA, 0,5 mM okside glutasyon (GSSG) 0,12 mM NADPH.Na<sub>4</sub> ve enzim ekstratından oluşmaktadır

#### b. Katalaz (KAT, E.C. 1.11.6.1)

Katalaz enzim aktivitesi (KAT), spektrofotometrede 240 nm'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in parçalanma oranına bağlı olarak ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı (1ml), 50 mM fosfor tamponu (pH 7.6), 0,1 mM EDTA, 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve enzim ekstratından oluşmaktadır (Çakmak ve Marschner 1992).

### 3.2.2.5. Gen İfadelerinin Tespiti

#### a. RT-PCR Hazırlık Aşamaları

İklim odasında yetiştirilen buğday çeşitleri tuz, spermin ve spermidine maruz kalma süreleri içerisinde yaprak örnekleri alınarak sıvı azot içerisinde muhafaza edilerek ve -80°C' de tutularak RNA analizleri başlayınca kadar saklanmıştır.



## **b. TOTAL RNA İzolasyonu**

Kontrol ve stres uygulanmış bitkilerden ayrı ayrı RNA izolasyonları yapılmıştır. İzolasyon, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA çalışmalarında ön koşul, RNA'nın yapısını korumuş biçimde parçalanmadan izole edilmesidir. RNA parçalanmasına sebep olan en büyük etken ribonükleaz (RNaz) bulaşmasıdır. Çok az miktarda RNaz bulaşması dahi sağlam RNA izolasyonunu engellemektedir. RNA izolasyonu aşamasında ortama RNaz bulaşmasını engellemek için denemede kullanılan bütün plastik ve cam malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler, RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC muamelesine ilave olarak malzemeler, 121 °C ve 0.1 MPa basınçta 15 dakika otoklavlandıktan sonra 105 °C'de en az gece boyu bekletilmiştir. Havan ve havan kolları ise 300 °C'de gece boyu bekletilmiştir. RNA izolasyonu RNaz bulaşmasını engellemek için steril kabin içerisinde yapılmıştır.

Bu yöntemde tüm izolasyon işlemleri oda sıcaklığında yapılmıştır. Yöntem temel olarak;

- a) doku parçalama ve homejenizasyon,
- b) toplam RNA'yı kolona tutturma,
- c) RNA'nın yıkanması
- d) RNA'nın DEPC-H<sub>2</sub>O ile kolondan toplanması aşamalarından oluşmaktadır. Uygulanan RNA izolasyon protokolünün aşamaları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

## **c. RNA izolasyon protokol aşamaları:**

- 1) -80 °C'de saklanan bitki örneğinden 100 mg alınmış, porselen havanda dövülmüş ve 2 ml'lik, içinde cam boncukların bulunduğu mikrofüj tüplerine transfer edilmiştir.
- 2) Tüplere 1 ml TRIzol eklenmiş ve ribolyzer cihazında 45sn. homojenize edilmiştir.
- 3) 12000 rpm, +4 °C'de 10 dk santrüfuj edilmiş ve üst faz yeni tüpe transfer edilmiştir. Eğer üst fazda görünür yağ tabakası varsa yağ tabakası atılır.
- 4) 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 5) 0.2 ml kloroform eklenmiştir.

- 6) 15 sn vorteksle karıştırılmıştır.
- 7) 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 8) 12000 rpm, +4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- 9) Tüp 45 ° açı ile tutulup, üst faz yeni tüpe transfer edilmiştir.
- 10) 0.5 ml isopropanol eklenmiştir.
- 11) 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 12) 12000 rpm,+4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır.
- 13) 1 ml %75 EtOH eklenir ve kısa süre vorteksle karıştırılmıştır.
- 14) 7500 rpm ,+4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır.
- 15) 10 dk tüplerin ağzı açık bir şekilde kurutulmuştur.
- 16) 50 µl RNAaz free su eklenir, pipetle ve 60°C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
- 17) Numuneyi -70°C'de saklanmıştır.

#### **d. cDNA Elde Etme**

RNA molekülleri çabuk parçalanabilir bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle, mRNA'lar çok daha kararlı bir yapıya sahip olan DNA'ya dönüştürülerek cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen her bir DNA iplikçığı, kalıp olarak kullanılan mRNA'nın karşı iplikçığı özelliğinde olması nedeniyle bu DNA'lara tamamlayıcı DNA (complementar DNA) anlamına gelen cDNA denilmektedir. cDNA sentezi için First Strand cDNA Sentez Kiti (Fermentas®) kullanılarak ve sentez, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için DNaz I ile muamele sonrası elde edilen saf RNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılan RNA'ların miktarları 0.1 µg/µl olacak şekilde eşitlenmiştir. Belirtilen konsantrasyonun hazırlanması için spektrofotometre ölçüm sonucunda elde edilen toplam RNA konsantrasyon değerlerinden yararlanılmıştır. RNA'lardan cDNA sentezi, MMLV-Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılmış primerler literatürdeki anaerobik ortamlarda ortaya çıkan genlerden seçilmiş olup bu genlerden bazılarının isimleri Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1 de en iyi sonuç veren 5 primer araştırmamızdaki genotipleri taramak için kullanılmıştır. Pipet hatalarını en aza indirmek ve reaksiyonlar arasında en yakın benzerliği sağlamak amacıyla, her bir primer için kalıp RNA haricindeki diğer reaksiyon girdilerinden oluşan birer öz karışım hazırlanmıştır. İçinde 2.0 µl kalıp RNA (0.1 µg/µl, taze seyreltilmiş) olan 0,2 ml ince

duvarlı tüplere, hazırlanan öz karışımdan 17'şer  $\mu\text{l}$  ilave edilerek RT-PCR programının 37 °C aşamasının 10. dakikasında, her reaksiyon tüpüne 1  $\mu\text{l}$  MMLV-RTaz enzimi ilave edilip inkübasyona devam edilmiştir. Bu şekilde her bir örnek için toplamda 20  $\mu\text{l}$  cDNA sentezlenmiştir.

#### e. Real Time PCR Protokolü

cDNA sentez reaksiyonunun içeriği, sıcaklık programı ve aşamaları aşağıdaki gibidir.

94	°C'de	30 sn	
50 - 60	°C'de	2 dk	40 Döngü
72	°C'de	1 dk	
72	°C'de	5 dk	1 Döngü
+4	°C'de	$\infty$	

#### f. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistik olarak regresyon analizi için ilgili Arc Stat XLISPPLUS version 3.04 (<http://www.stat.umn.edu/arc/software.html>) paket programı kullanılmış olup, varyans analizi de MacAnova (<http://www.stat.umn.edu/macanova/>) programı kullanılarak yapılmıştır. Eşik döngülerinin (Ct) ortalamalarının karşılaştırılması için korunmuş Fisher's Least Significant test (en küçük önemlilik testi) kullanılmıştır ( $p < 0.05$ ).

#### 3.3. İstatistiksel Analizler

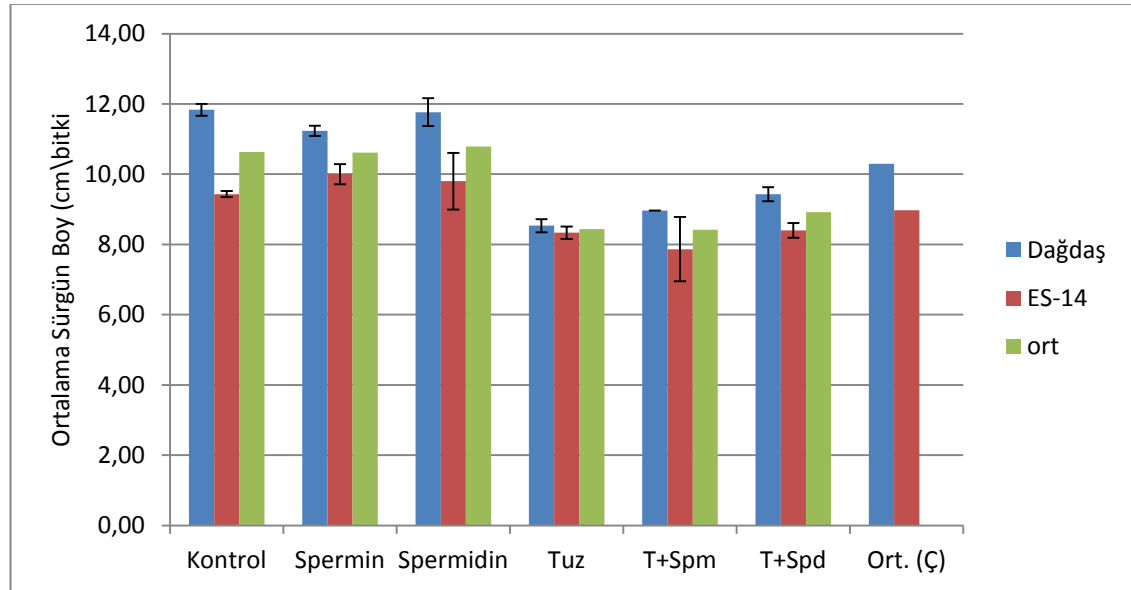
Sonuçlar, aritmetik ortalamaların ( $\bar{x}$ ) ve standart hataların ( $S\bar{x}$ ) hesaplaması ile değerlendirilmiştir (Apaydın vd., 2002). Deneme sonucunda elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında varyans analiz tekniğinden yararlanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS paket programından yararlanılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, sadece Hoagland besin çözeltilisinde yetiştirilen kontrol grubu buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş, ES-14) fideleri, tuz (200mM), spermin, spermidin uygulamalarına maruz kalan fideler arasındaki farklılıkları ve ayrıca tuz ile birlikte uygulanan spermin ve spermidinin tuz ile etkileşimlerini ortaya koyacak şekilde ele alınmıştır. Denemelerde kullanılan buğday fidelerinde kök ve sürgün boyu, kök ve sürgün kuru ağırlığı, klorofil (a,b,toplam), karotenoid miktarı, katalaz ve glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri ve bunun yanı sıra tuz koşullarında ifade edilen MYB, ERF ve SRG genlerinin RT-PCR analizlerinin sonuçları incelenmiştir

#### 4.1. Tuz-Poliamin Etkileşimlerinin Bitki Büyümesi Üzerine Etkileri

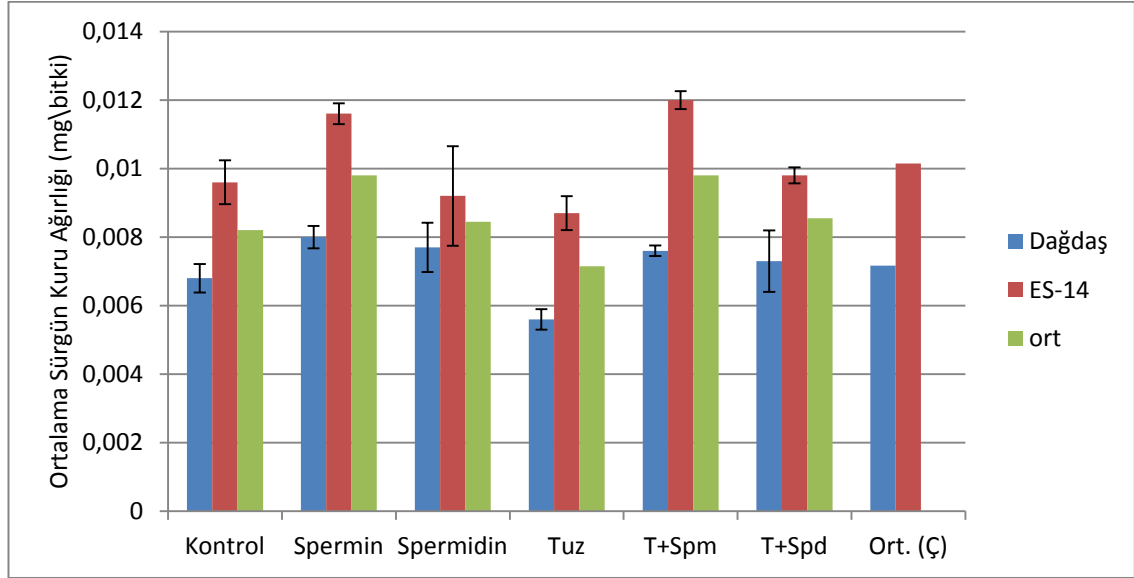
##### 4.1.1. Kök Gelişimine Etkileri



**Şekil.4.1.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş, ES-14) fidelerinin ortalama kök boyundaki değişimler

Tüm uygulamalarda Dağdaş çeşitine ait buğday fidelerinde kök uzunluğunun ES-14 çeşitine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Tuz+Spm uygulaması Dağdaş çeşitinde kök uzunluğunda artışa, ES-14 çeşitinde bir miktar azalmaya neden olmuştur. ( $p \leq 0,05$ ). Tuz+spd uygulaması gerek Dağdaş ve gerekse de ES-14 çeşitinde sadece tuz

uygulamasına göre kök boyunda artışa neden olmuştur ( $p \leq 0,05$ ). Kontrol grubuna göre tuz uygulamasıyla birlikte her iki çeşitte kök uzunluğunda azalma meydana geldiği görülmektedir ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.1).



**Şekil.4.2.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş, ES-14) fidelerinin ortalama kök kuru ağırlığındaki değişimler

Tuz uygulamasıyla birlikte her iki çeşitte kök kuru ağırlığında (KKA) azalmalar meydana gelmiştir. Çalışmamızda kullandığımız ES-14 çeşitinde kök kuru ağırlığının Dağdaş çeşitine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Spermin uygulaması her iki çeşitte (KKA) artışa neden olmuştur. Spermidin ve spermin uygulaması Dağdaş çeşitinde KKA bir miktar artışa sebep olmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Tuz ile birlikte uygulanan spm ve spd ise her iki çeşitte kka nda artışa neden olmuştur ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.2).

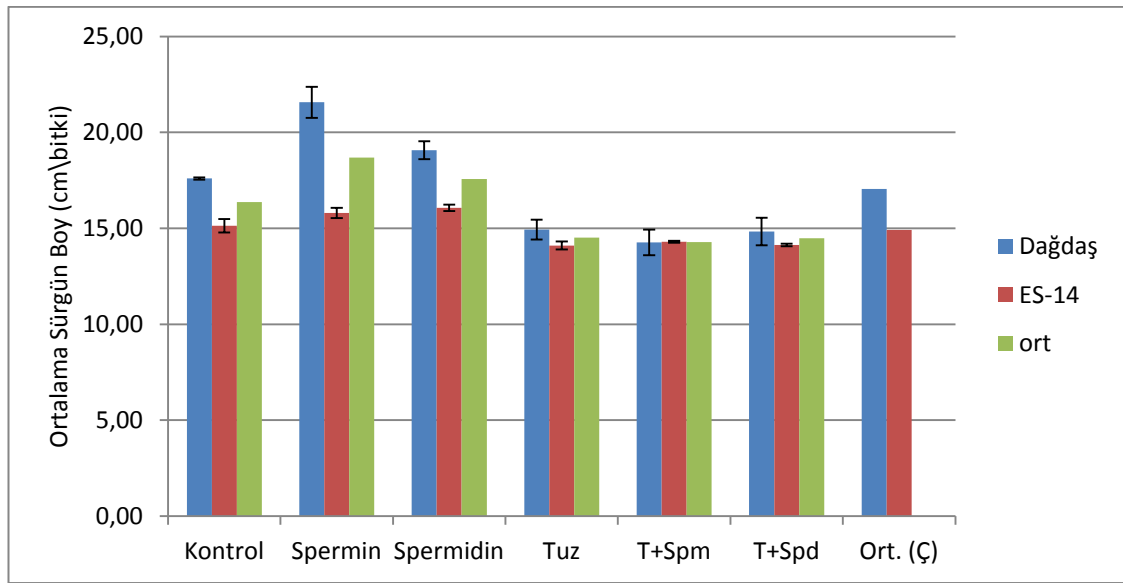
Tuz stresi kurak ve yarı kurak bölgelerde bitki verimliliğini sınırlamaktadır. Tuzluluk özellikle fizyolojik işlevleri olumsuz etkileyerek bitki büyümesinde azalmaya neden olmaktadır (Shannon, 1998; Allakhverdiev vd. 2000, Kao vd.2003, Mensah vd. 2006 ).

Genel olarak tuzluluk ile ilgili çalışmalarda tuzluluğun çimlenme oranı, rejenere hücre yüzdesi, ortalama taze ve kuru ağırlık, gövde ve kök uzunluğu ve klorofil içeriği üzerine negatif etkisi olduğu tespit edilmiştir (Argawal and Pandey,2004).

Çalışmamızda tuzluluğun her iki çeşitte de gerek kök boyu ve gerekse de kka ndaki inhibisyon ile ilgili verilerimiz literatür ile uyumludur.

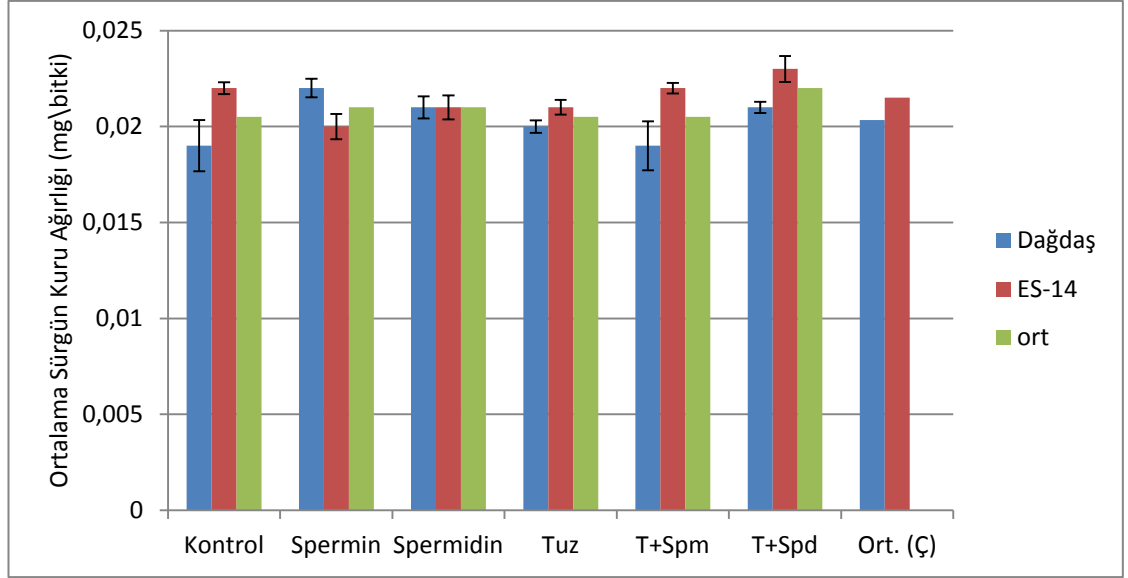
PA (spm-spd) uygulamalarının tuzluluğa maruz kalan hücrelerde hücresel zararı hafifletici etkisi vardır, kök büyümesindeki inhibisyonu giderdiği ifade edilmiştir. (Roychoudhury ve ark., 2011). Buna karşın çalışmamızda tuz+ pa uygulamalarının her iki çeşitte de kök büyümesi üzerine olumlu bir etkisi bulunamamıştır.

#### 4.1.2. Sürgün Gelişimine Etkisi



**Şekil.4.3.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama sürgün boyundaki değişimler

Çalışmamızda sürgün boyunun (SB) Dağdaş çeşitinde ES-14e göre daha fazla olduğu belirlenmiştir( $p \leq 0,01$ ). Her iki çeşitte de tuz uygulamasıyla birlikte gövde boyunda kontrole göre azalma meydana gelmiştir. Tuzluluk ile birlikte gövde uzunluğunda en fazla azalma ES-14 çeşidinde meydana gelmiştir ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.3).



**Şekil.4.4.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama sürgün kuru ağırlığındaki değişimler

Sürgün kuru ağırlığının ES-14 çeşitinde Dağdaş çeşitine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Tuz ile birlikte uygulanan spm vespde ES-14 çeşitinin sürgün kuru ağırlığında artış meydana getirmiştir ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.4).

Öncel ve Keleş (2002), çeşitli buğday genotiplerinde 200 mM NaCl uyguladıkları çalışmada fidelerde büyümenin ve klorofil içeriğinin önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir.

Husain ve Munns, (2007) çeşitli tuz konsantrasyonlarında (1 mM, 75 Mm, 150 Mm) yetiştirilen altı durum genotipinde, kuru ağırlığın ve bitki boyunun içeriğinin olumsuz etkilendiğini belirlemişlerdir.

Roychoundhury ve ark. (2008), tuz uyguladıkları pirinç fidelerinde kök ve gövde büyümesinin inhibisyona uğradığını ifade etmişlerdir.

Akgün ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada tuz uyguladıkları 5 triticales genotipinde tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kök ve gövde büyümesi ve kuru ağırlığında azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda tuzluluğun her iki çeşitte de gerek sürgün boyu ve gerekse de sürgün kuru ağırlığındaki azalmalar bakımından verilerimiz literatür ile paraleldir.

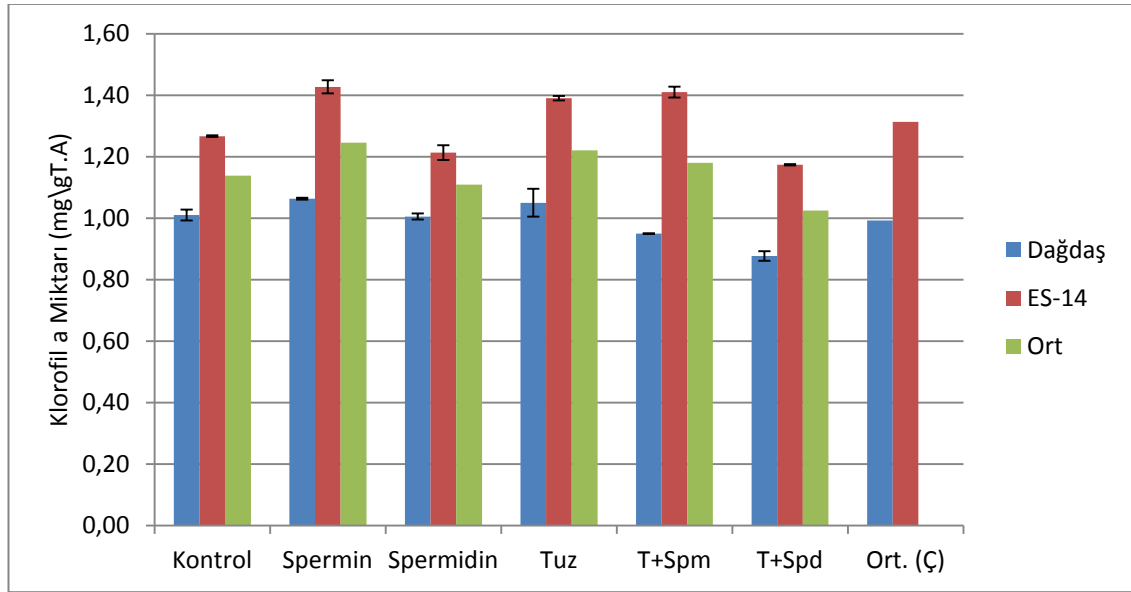
Mutlu ve Bozcuk (2000), ayçiçeği (*Helianthus annuus* L. cv. Santafe) tohumlarının çimlenmesi ve bazı erken büyüme parametreleri üzerine farklı konsantrasyonlardaki NaCl

(50,100,200Mm) ve spermin (Spm)'in (0.01,1,2Mm) etkilerini incelemiştir. konsantrasyona bağlı olmaksızın tuz uygulaması yapılmayan şartlarda spm uygulaması,çimlenme yüzdesi ve bazı büyüme parametreleri (sürgün uzunluğu,taze vekuru ağırlık) üzerinde etkisiz olduğunu ifade etmişlerdir.

Duran ve ark. (2010), farklı tuz konsantrasyonlarının (100 mM ve 200 Mm) mirzabey, altın, kunduru1149, DH-6 ve DH-8 genotipleri üzerine etkilerini incelemiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre tuzluluğun kök uzunluğu, kuru ağırlık üzerinde olumsuz bir etki medya getirdiğini gözlemlemiştir.

Roychoudhury ve ark., (2011),tuzluluk ile birlikte eksojen uygulanan spm ve spd pirinç fidelerinde gövde büyümesinde tuzluluğun meydana getirdiği inhibisyonu giderdiğini belirlemiştir. Bununla birlikte çalışmamızda tuz+ pa uygulamalarının her iki çeşitte de gövde büyümesi üzerine olumlu bir etkisi bulunamamıştır.

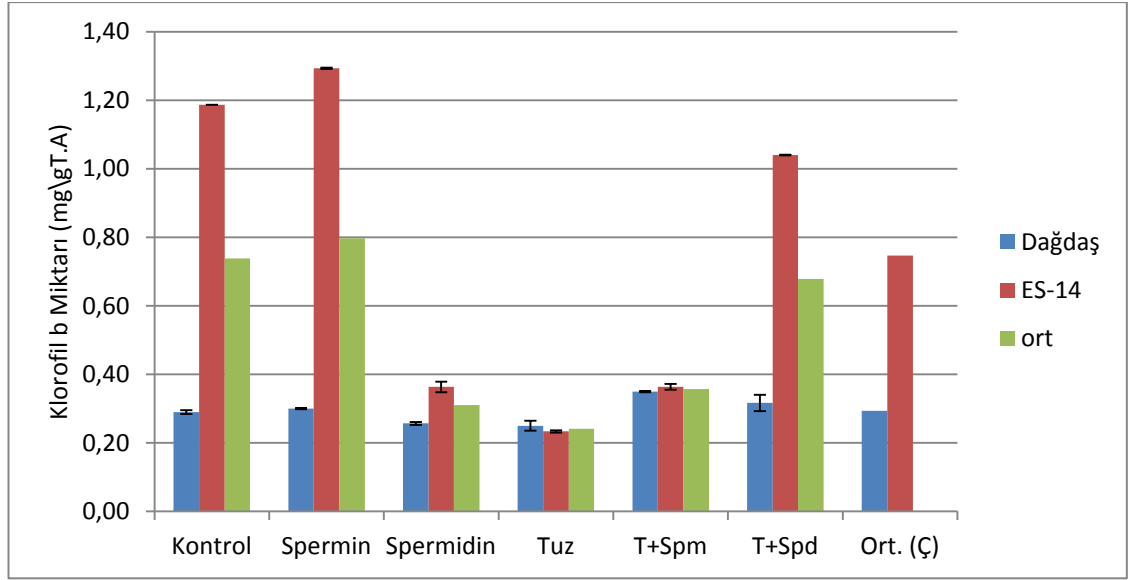
#### 4.1.3. Pigment Miktarı Üzerine Etkileri



**Şekil.4.5.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama klorofil a miktarındaki değişimler

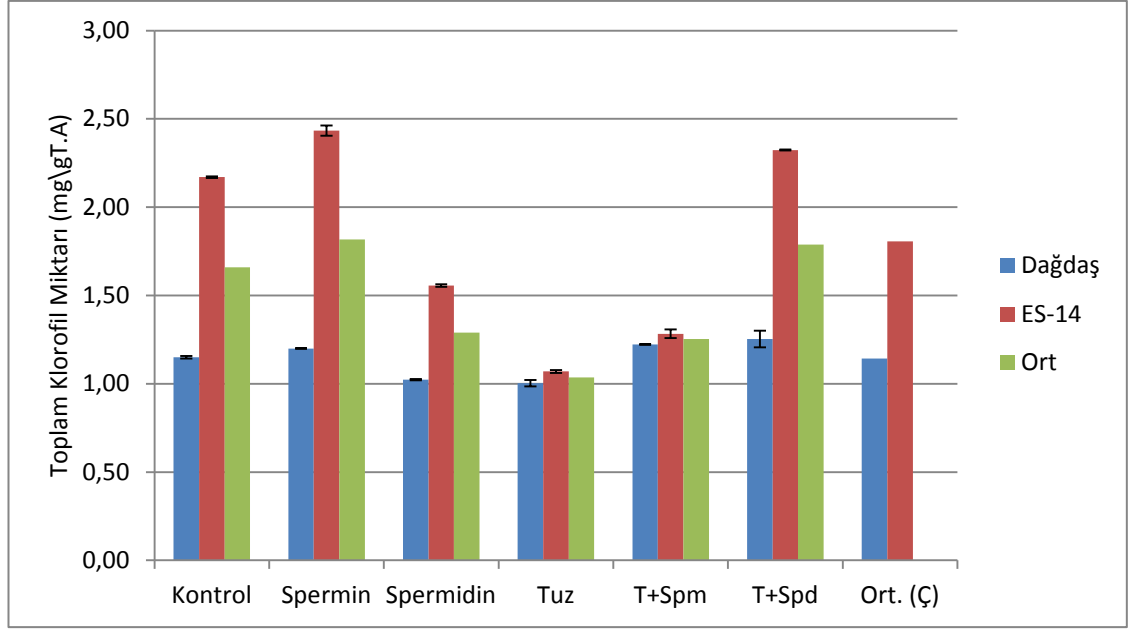
ES-14 çeşidinde klorofil a birikimi Dağdaş çeşidine göre daha fazla bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Tuz uygulaması her iki çeşitte de kl a miktarında azalmaya sebep olmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Her iki çeşitte de kontrole göre spm ve spd uygulamalarıyla birlikte kl-a miktarı artış göstermiştir ( $p \leq 0,01$ ). Tuz ile birlikte uygulanan spm ve spd her iki çeşitte de klorofil a miktarında artış meydana getirmiştir ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.5).





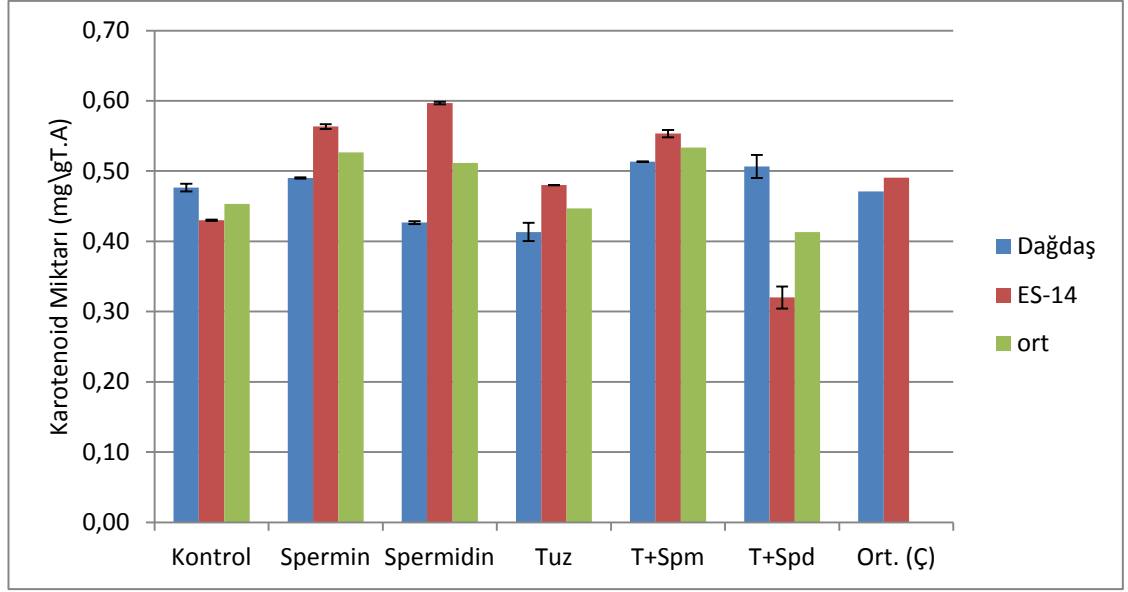
**Şekil.4.6.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama klorofil b miktarındaki değişimler

Buğday fidelerinde klorofil b miktarı incelendiğinde: ES-14 çeşidinde kl-b birikimi Dağdaş çeşidine göre daha fazla bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Tuz uygulaması her iki çeşitte de kl-b miktarında azalmaya neden olmuştur ( $p \leq 0,05$ ). Tuz ile uygulanan spm ve spd tuz uygulamasına göre her iki çeşitte de kl-b miktarını arttırmıştır ( $p \leq 0,01$ ). Tuz ile uygulanan spd ise ES-14 çeşidinde, spm ise Dağdaş çeşidinde kl-b artışına sebep olmuştur ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.6).



**Şekil.4.7.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama toplam klorofil miktarındaki değişimler

Denemelerde kullanılan çeşitlerden ES-14 çeşitinde kl-a+b birikimi Dağdaş çeşitine göre daha fazla bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Tuz uygulaması her iki çeşitte de kl-a+b miktarında azalmaya neden olmuştur ( $p \leq 0,05$ ). Tuz uygulamasına göre tuz ile birlikte uygulanan spm ve spd sonucunda her iki çeşitte de kl-a+b miktarında artış gözlenmiş ve bu artışın ES-14 çeşitinde Dağdaş'a göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.7).



**Şekil.4.8.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama karotenoid miktarındaki değişimler

Buğday fidelerinde karotenoid birikimi incelendiğinde uygulanan pa lerin her iki çeşitte karotenoid miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ) (Şekil.4.8). Tuz ile uygulanan spm her iki çeşitte karotenoid içeriğinde artışa neden olmuştur ( $p \leq 0,05$ ). Tuz+spd uygulaması Dağdaş çeşitinde tuz uygulamasına göre bir artışa neden olurken ES-14 çeşitinde ise karotenoid miktarında azalma gözlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ).

Tuz stresi altındaki bitkilerde yaprak dokusundaki total klorofil ve karotenoid içeriği genellikle azalma göstermektedir (Khavarinejad ve Mostofi, 1998; Agastian vd., 2000; Öncel ve Keleş, 2002; Argawal ve Pandey, 2004; El-Tayeb, 2005; Husain ve Munns, 2007; Roychoundhury ve ark., 2008; Roychoundhury ve ark., 2011; şen ve alikamanoğlu, 2011).

Öncel ve Keleş (2002), tuzluluk şartlarında bitkilerde kl b miktarına göre kl a miktarındaki artışın tuza toleransta önemli bir parametre olduğunu bildirmişlerdir.

Duran ve ark. (2010) , 100 mM ve 200 Mm tuz uygulanan mirzabey, altın, kunduru1149, DH-6 ve DH-8 genotiplerinde tuzluluğun kl a, kl b, toplam klorofil ve karotenoid miktarları üzerinde negatif bir etki oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Ayşe ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada invitro doku kültüründe geliştirilen Tekirdağ, pehlivan ve flamura-85 buğday çeşitlerinin kültürlerine NaCl uygulanmışlar

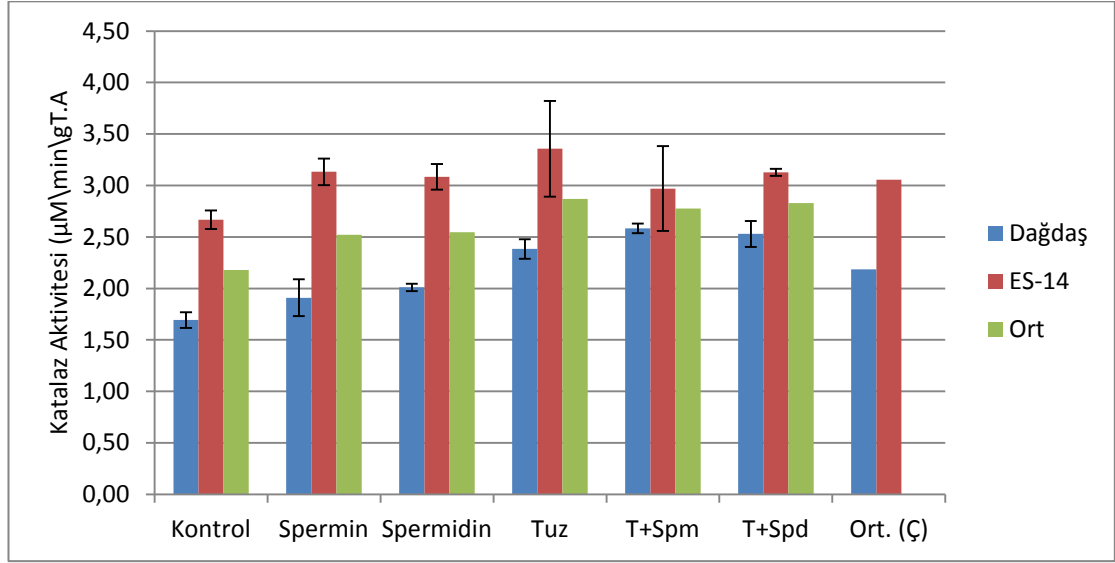
ve Artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak her üç varyetede de klorofil içeriğinde azalmalar bulunmuşlardır.

Poliaminlerin biyolojik membranların stabilizasyonunu ve direkt membran fosfolipitlerine bağlı hücrenel yapıların stabilizasyonu, serbest radikallerin direkt temizlenmesi, osmotik düzenleme, anyon-kasyon dengesini sürdürmek, iyon kanallarının modülasyonu, antioksidan enzimlere bağlanarak ve onların aktivitesini arttırarak etki etmenleri bakımından tuz stres direncinde bu moleküllerin ilişkisi sorgulanabilir (Tang ve Newton, 2005; Verma ve Mishra 2005).

Tuza toleranslı bitkilerin çeşitli streslere cevap olarak poliaminleri daha fazla biriktirme kapasitesine sahiptir (Roychoudhury vd., 2008)

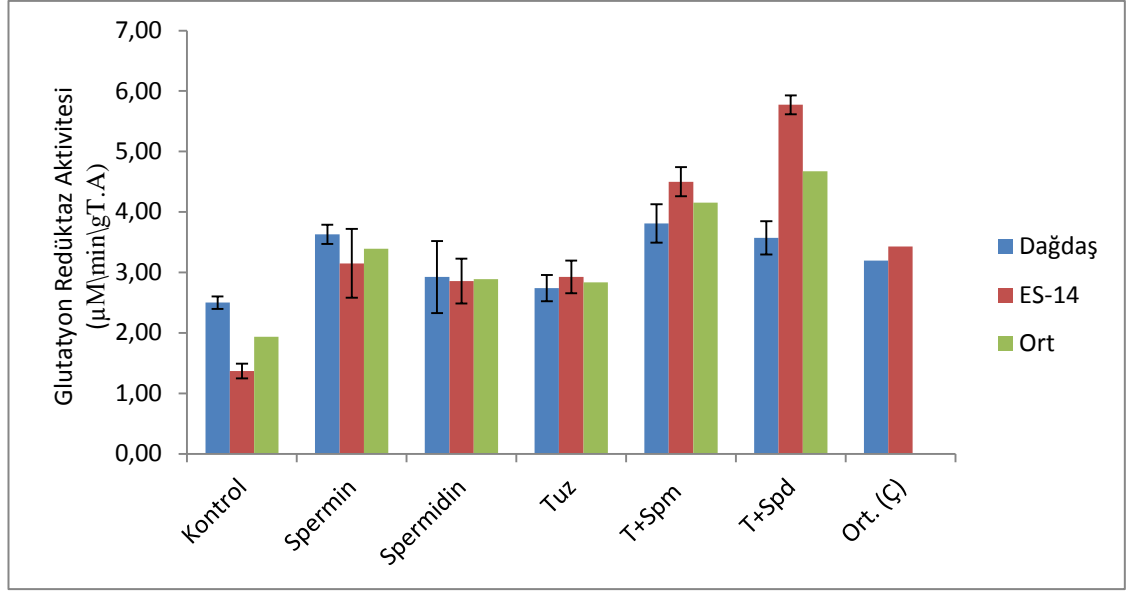
Çalışmamızda tuz uygulanan ES-14 ve Dağdaş çeşitlerinde kl a, klb ve toplam klorofil ve karotenoid miktarında azalmalar ile ilgili verilerimiz yukarıda sıralanan literatürler ile uyumludur. Bununla beraber her iki çeşitte de tuzla birlikte uygulanan gerek spm gereksede spdin belirtilen tüm pigment miktarlarında tuzluluk koşullarına göre önemli derecede iyileştirmeye sebep olduğu belirlenmiştir. Eksojen uygulanan poliaminlerin içsel poliamin seviyesinde artışa neden olabileceği beklenmektedir (Velikova ve ark., 2000). PA lerin klorofil kaybını önlediği (Demetriou ve ark. 2007), proteaz ve RNAaz aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Chattopadhyay ve ark. 2002). Çalışmamızda tuzluluk koşullarına göre Tuz+poliamin uygulamalarında pigment miktarında meydana gelen artış ile ilgili veriler içsel pa miktarını arttırması ile ilişkili olabileceği düşünölmektedir. Bu bakımdan biyolojik membranların stabilizasyona sebep olan pelerin tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarında buğday fidelerinin tuzluluğa toleransının arttırılmasında etken olduğu ifade edilebilir.

#### 4.1.4. Katalaz ve Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkileri



**Şekil.4.9.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama katalaz miktarındaki değişimler

Tuz, tuz+spm ve tuz+spd uygulamaları sonucu CAT enzim aktivitesi her iki çeşitte de kontrole göre artış göstermiştir ( $p \leq 0,01$ ). Bu artış en fazla ES-14 fidelerinde tuz+spm uygulamalarında görülmüştür. CAT aktivitesindeki artış ES-14 çeşitinde Dağdaş çeşitinden daha fazladır ( $p \leq 0,05$ ). Ayrıca tuz uygulamasına göre tuz ile birlikte uygulanan spm ve spd dağdaş çeşitinde cat aktivitesinde artış meydana getirirken es-14 çeşitinde azalmaya neden olmuştur ( $p \leq 0,01$ ) (Şekil.4.9).



**Şekil.4.10.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ortalama glutatyon redüktaz miktarındaki değişimler

Yapılan spm ve spd uygulamaları kontrole göre her iki çeşitte artışa neden olmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Tuz, tuz+spm ve tuz+spmd uygulamaları sonucu GR enzim aktivitesi her iki çeşitte kontrole göre artış göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Gr aktivitesindeki artış es-14 çeşitinde dağdaş çeşitine göre daha fazladır ( $p \leq 0,05$ ) (Şekil.4.10).

Bitkilerde tuz stresi ile ilgili araştırmaların çoğunda ROS ların zararlarını ortadan kaldırmada antioksidan enzim sistemi ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur (Agarwal and Pandey 2004; Koca vd. 2006; Kholova ve ark. 2010; Şen ve Alikamanoğlu 2011 ). CAT ve POD süperoksit radikali olan  $H_2O_2$  yi ortadan kaldıran ana detoksifikasyon enzimleridir. Bunun yanı sıra bu enzimler tuz stresine cevapta önemli rol oynarlar. Artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak tüm buğday varyetelerinde her iki enzimin aktivitesinin de kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir (Şen ve Alikamanoğlu,2011)

SOD, CAT ve POD gibi bitki antioksidan savunma enzimleri çok önemli serbest elektron süpürücüleridir (Mitler, 2002).Yine yapılan araştırmalar doğrultusunda çeşitli bitkilere uygulanan tuz, konsantrasyonuna bağlı olarak CAT ve POD aktivitesinde artışlara neden olmuştur (Agarwal and Pandey 2004; Chatzissawidis vd. 2008; Kholova ve ark. 2009; Wang vd. 2009).

Tuza toleranslı pirinç veya kuraklığa toleranslı buğday çeşitlerinde duyarlı çeşitlerle kıyaslandığında antioksidan enzimlerin önemli ölçüde arttığı ve stres toleransında spm ve spd nin putresinden daha fazla ilişkili olduğu belirlenmiştir ( Shen vd.,2000; Mutlu ve Bozcuk,2005)

Çalışmamızda tuz uygulanan ES-14 ve Dağdaş çeşitlerinde CAT ve gr antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. Antioksidan enzimlerdeki artış Tuz+poliamin uygulanan buğday fidelerinde sadece tuz uygulanan fidelere göre daha fazla gerçekleşmiştir. Birçok bitkide antioksidant enzim miktarındaki artışın tuz toleransı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Gossett vd. 1994, Benavides vd. 2000, Hernandez vd. 2000, Lee vd. 2001, Mittova vd. 2002, Bor vd. 2003).

Bu bakımdan tuz uygulanan ES-14 ve Dağdaş fideleri ile ilgili verilerimizin literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir. Roychoudhury ve ark., 2011, CAT aktivitesinin üç pirinç varyetesinde de tuz stresinde azaldığı görülmüştür ve bunun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin bir faktörü olabileceğini belirtmişlerdir. Bu bakımdan bizim antioksidan enzimlerle ilgili verilerimiz Roychoudhury ve arkadaşlarının (2011) verileri ile zıttır.

Eksojen spd elektrolit ya da aminoasit sızıntısını önleme ya da pirinç membranlarındaki tuzluluğa cevapta, plazma membran zarını iyileştirmede, su stresindeki kabak yapraklarında ve üşüme toleransında hayati rol oynamaktadır (Kubis, 2008). Poliaminler antioksidan enzimlerin seviyesini ya da antioksidan enzim ekspresyonunu indirekt olarak arttırmaktadır (Verma ve Mishra,2005). Yamaguchi vd. (2006), Spm'nin Arabidopsiste tuz stresine karşı koruyucu olduğu ifade etmişlerdir.

Bizim verilerimizde tuz ile birlikte uygulanan pa lerin antioksidan enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırmasının uyguladığımız poliaminlerin buğday fidelerinde tuz zararına karşı antioksidan enzimlere bağlanarak ve onların aktivitesini arttırmak suretiyle tuz stresini iyileştirmesiyle ilgili olabilir.

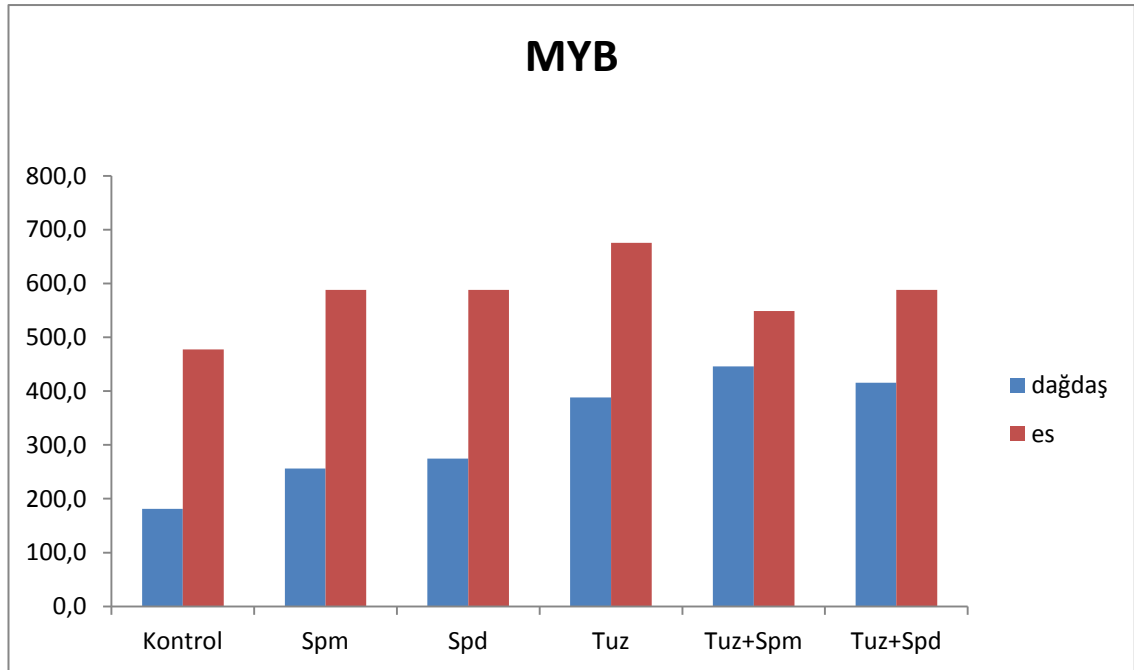
#### **4.1.5. Gen İfadeleri ve Sonuçları**

Araştırmada gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile yapılan kuantitatif mRNA analizlerinde tuz ve tuz-poliamin uygulanan buğday fidelerindeki mRNA transkripsiyonları incelenmiştir. Çalışmada tuz ile ilişkili olduğu düşünülen toplamda 3 adet primer kullanılmış olup genlerin isimleri ve dizilimleri tablo.1 de verilmiştir.

Bu primerlerin ifade olanları ve RT-PCR analizleri sonuçlarının rölatif (misli) değerleri grafiklerle gösterilmiştir.

GEN ADI	KOD ADI	LEFT PRIMER	RIGHT PRIMER	ÜRÜN BÜYÜKLÜĞÜ
Actin	ACT	GTCGGTGAAGGGGACTTAC A	TTCATACAGCAGGCAAGCA C	187
Salt Responce Gene	SRG	GAAGATGGAGGTCAGGGAC A	AGCTCTTGCTGAGAGGCTT G	182
Etilen-Responsv e Factors	ERF1	TCCTGTGATGGGTGATGCTA	AGGGCATGTCATCAAAGGT C	164
MYB	MYB7 3	CGACGACGGCGATAAACTA T	CGACGACGGCGATAAACTA T	102

**Tablo1:** Çalışmamızda kullandığımız tuzluluk koşullarında ifade olan primerlerin adları, kod adları, dizimleri ve ürün büyüklükleri.



**Şekil.4.11.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin MYB gen miktarındaki değişmeler



Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz verilerde MYB geninin Dağdaş buğday çeşitinde kontrol grubuna göre diğer uygulamalarda artış gösterdiği belirlenmiştir. Dağdaş buğday fidelerinde spermin ve spermidin uygulamaları sonucu MYB geni yaklaşık olarak 1,5 kat artış göstermiştir. Tuz uygulamasıyla birlikte ise bu genin ifadesinde yaklaşık 2,2 kat artış gözlenmiştir. Tuz kontrolüne göre tuz-spermin uygulamasında MYB gen miktarı 1,2 kat ,tuz-spermidin uygulamasında ise gen ifadesi 1,1 kat artmıştır.

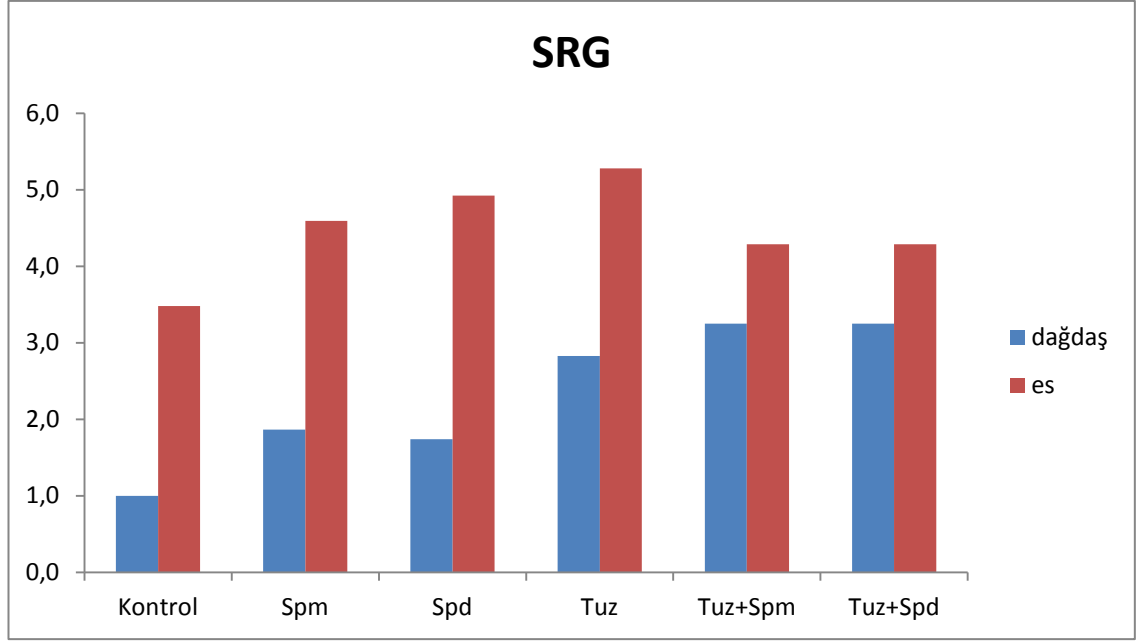
ES-14 buğday çeşitinde ise kontrol grubuna göre spermin ve spermidin uygulaması MYB gen ifadesinde 1,2 kat bir artışa sebep olmuştur. Bunun yanı sıra tuz uygulaması ile birlikte bu artış 1,4 kata çıkmıştır. Tuz-poliamin uygulamalarıyla birlikte tuz uygulanan gruba göre MYB gen ifadesi ES-14 çeşitinde tuz-spermin uygulamasında 1.2 kat, tuz-spermidin uygulamasında ise 1.6 kat azalmıştır.(Şekil.4.11)

Bitkilerde MYB transkripsiyon faktörleri biyotik cevapları çeşitli biyolojik fonksiyonları (Vaillau ve ark., 2002) ve abiyotik (Deneleamp ve Smeekens 2003, Geffers ve ark.,2001; Haeren ve ark., 1998; Magariggia ve ark., 1997; Urao et al. 1993) fonksiyonların yanı sıra bitki büyüme regülatörlerini içeren sinyal transdüksiyon yolunu kontrol etmektedir.

İlk bitki geni MYB, C1, *Zea mays* izole edilğinden bu yana (Paz-Ares ve ark., 1987), gen sayısı da dahil olmak üzere MYB gen ailesinin dizisi, karakterizasyonu, evrimi ve potansiyel fonksiyonları ilgili pek çok araştırma yapılmıştır (Chen ve ark., 2006; Matus ve ark, 2008;. Wilkins ve ark, 2009; Dubos ve ark,2010).

Yapılan çalışmalarda MYB geni (TaMYBsdu1)yaprak ve köklerde uzun süreli kuraklık stresinde çok belirgin şekilde up-regüle olduğu belirlenmiştir (rahaie et al. 2010)

MYB gibi TF genlerinin bitki moleküler stres yanıtlarında önemli cevap olduğu belirlenmiştir (Ahuja ve ark., 2010; zhang ve ark. 2011). Nitekim çalışmamızdada tuz stresi uygulanan buğday fidelerinde çalışılan genler arasında kontrol grubuna göre yaklaşık 7 kat ifade edilen gen MYB genidir.



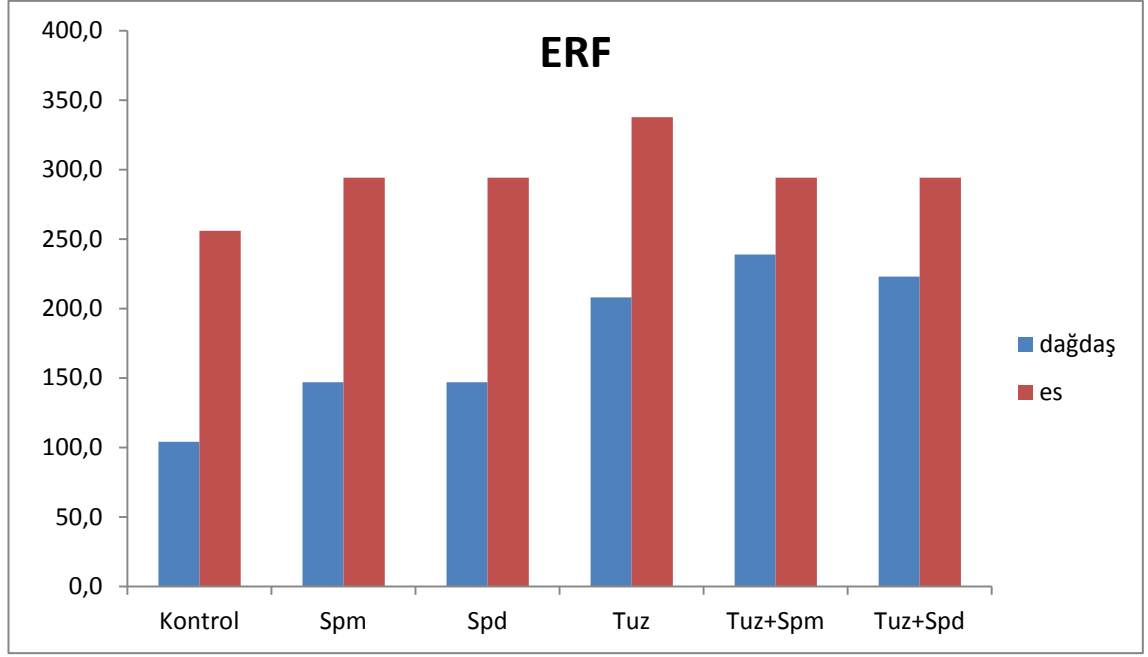
**Şekil.4.12.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş, ES-14) fidelerinin SRG gen miktarındaki değişimler

Çalışmamızda Dağdaş çeşidine ait buğday fidelerinde SRG genini spermin uygulamasının kontrole göre yaklaşık olarak 1,9 misli, spermidin uygulamasının ise 1,7 misli arttırdığı gözlemlenmiştir.

Yine Dağdaş buğday çeşitinde SRG geninin en fazla ifade edildiği uygulamalar kontrole göre 3,2 kat arttığı tespit edilen tuz-spermin ve tuz-spermidin uygulamalarıdır.

ES-14 buğday çeşitinde tuz uygulamaları kontrole göre SRG geninde 1,5 kat artışa neden olurken, tuz-spermin ve tuz-spermidin uygulamalarında genin ifadesinin 1,2 kat arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra spermin ve spermidin uygulamaları SRG geninde sırasıyla 1,3 kat ve 1,4 kat olmak üzere artışa neden olmuştur. (Şekil.4.11).

Tuz stresi bitkilerde çok sayıda genin ekspresyonunu uyarmaktadır (He ve ark.,2011). Buğdayda tuz stresinde TaSRG geninin ifadesinin arttığını bildirmişlerdir.



**Şekil.4.13.** Tuz ve tuz-poliamin uygulamaları altında yetişen buğday (*Triticum aestivum* cv. Dağdaş,ES-14) fidelerinin ERF gen miktarındaki değişimler

Yapılan analizler sonucunda Dağdaş buğday çeşitinde kontrole göre spermin ve spermidin uygulamaları ile birlikte ERF geninde 1.4 kat artış meydana geldiği görülmüştür. Bununla birlikte bu buğday çeşitindeki tuz uygulaması ile ERF geninde yaklaşık 2 kat artış belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında ise Dağdaş fidelerinde kontrole göre tüm uygulamalarda ERF geninde artış gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Bir diğer buğday çeşitimiz olan ES-14 fidelerinde ise Dağdaş çeşitinde de olduğu gibi kontrol grubuna göre spermin ve spermidin uygulamalarında ERF geninde yaklaşık 1,2 katlık bir artış meydana gelmiştir. Bu buğday çeşitimiz de kontrol grubu ve tuz grubunu karşılaştırdığımızda ise tuz uygulamasıyla birlikte ERF geninde yaklaşık 1,3 kat artış tespit edilmiştir. Tuz uygulamasına göre tuz-poliamin uygulamalarında ise Dağdaş buğday çeşitinde ERF gen ifadesinde ortalama %10 artış gözlenirken ES-14 buğday çeşitinde ise %14 azalma gözlenmiştir (Şekil.4.12).

ERF transkripsiyon faktörleri abiyotik ve biyotik streslerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Buğdayda ERF gen ailesinin ilk üyesi kuraklığın indüklediği cDNA kütüphanesinden izole edilmiştir.

TaERF1 geninin transkripsiyonu sadece kuraklık tuzluluk gibi abiyotik etmenlerle değil *blumeria graminis* gibi biyotik etmenler ilede indüklenmektedir. Patojenlere cevap olarak çok sayıda ERF geni bulunmuştur.şimdiye kadar monokotiledonlarda yalnızca birkaç tane ERF geni bulunabilmiştir. Buğdayda ERF familyasının ilk üyelerinin karakterizasyonu ve klonlamasını Xu ve ark., 2007 yapmıştır. Çalışmamızda kontrole göre tuzluluk stresinde genel olarak Dağdaş fidelerinde kontrole göre tüm uygulamalarda ERF geninde artış gözleendiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra tuzluluk koşullarında en fazla ES-14 çeşitinde ERF geni ifade edilmiştir. tuz ile birlikte uygulanan poliamin uygulamalarında ise ERF geninin en fazla Dağdaş çeşitinde ifade edildiği belirlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Dağdaş, ES-14) fidelerinde tuz ve tuz-poliamin etkileşimlerinde büyüme parametreleri, pigment içeriği, antioksidan enzim aktiviteleri ve tuzluluk koşullarında ifade edilen genlerde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bitkilerin büyüme ve gelişmeleri üzerinde tuzluluğun etkileri poliamin uygulamaları sonucu meydana gelen değişimlerle değerlendirilmeye çalışılmıştır. Tuzluluk ve Tuz+poliamin uygulamalarının incelenen parametreler üzerinde artış ve azalışlar şeklinde etkili olduğu saptanmıştır.

Kök ve sürgün büyümesi her iki çeşitte de tuzluluk koşullarında kontrole göre önemli derecede inhibe olmuştur. Tuzluluğun kök ve sürgün büyümesi üzerindeki en büyük inhibisyonu ES-14 fidelerinde belirlenmiştir.

Her iki çeşitte kök ve gövde kuru ağırlığı tuz uygulamaları ile önemli derecede azalmıştır. Kök kuru ağırlığındaki en fazla azalma Dağdaş çeşitinde meydana gelmiştir.

Tuz uygulamaları her iki çeşitte de kl a, kl b, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarında ciddi miktarda azalmalara neden olmuştur. Tuz+poliamin uygulanan fidelerde pigment miktarlarının sadece tuz uygulanan fidelere göre bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir. Tuz+poliamin uygulanan fidelerde pigment miktarları sadece tuz uygulanan fidelere göre bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir. Tuz+spm uygulaması sonucu Kl b miktarında en fazla artış Dağdaş fidelerinde, kl a+b miktarındaki artışın ise ES-14 fidelerinde olduğu belirlenmiştir. Tuz+spd uygulanan fidelerde kl b ve kl a+b miktarında en fazla artış ES-14 fidelerindedir. Aynı şekilde karotenoid miktarı her iki çeşitte tuz+spm uygulamalarıyla artmıştır. Tuz+spd uygulamalarında ise Dağdaş fidelerinde karotenoid miktarında artış gözlenirken ES-14 fidelerinde azalma meydana gelmiştir.

Dağdaş ve ES-14 fidelerine tuz uygulaması ve Tuz+poliamin uygulamaları CAT ve GR enzim aktivitesini arttırmıştır. Yalnızca tuz ve Tuz+poliamin uygulanan ES-14 fidelerinde CAT aktivitesi Dağdaş fidelerine göre daha fazla artış göstermiştir.

MYB, ERF ve SRG genlerinin ifadesi tuz uygulamaları ile her iki çeşitte önemli derecede artış göstermiştir. Bununla birlikte tuz uygulamasında MYB geninin ifadesi ES-14 çeşitinde Dağdaş çeşitinden daha fazla gerçekleşmiştir. Tuz+spm ve tuz+spd uygulamaları Dağdaş çeşitinde her 3 genin ifadesini yalnızca tuz uygulamalarına göre

arttırmasına rağmen ES-14 çeşitinde gen ifadelerinde bir miktar azalma belirlenmiştir. Her iki çeşit ve yapılan uygulamalar göz önüne alındığında buğday fidelerinde en fazla gen ifadesinin MYB en az gen ifadesinin ise SRG olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, önümüzdeki yıllarda tuza tolerans ile ilgili genlerin aşırı ifadesi tuza duyarlılığa karşı ürün geliştirmede tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve bu etkilere karşı bitkilerin verdikleri karmaşık cevaplar üzerine araştırmalar yoğun şekilde devam etmektedir. Bitkilerin gerek tuzluluk ve gerekse diğer abiyotik stres faktörlerine karşı tolerans geliştirdiği bilindiğinden, bitkilerin tuz stresine toleransını sağlayan biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler mekanizmaların belirlenmesi önemlidir. Dünyamızda tarımsal üretimi sınırlayan Tuzluluk problemine karşı toleranslı ve dayanıklı bitki türlerinin belirlenmesi ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR:

- Akgün , İ., Kara, B., Altındal, D., 2011. **Effect of salinity on germination, seedling growth and nutrient uptake of different triticale genotypes.** Turkish journal of field crops, 16(2):225-232
- Aksoy A.Ş. ve Karakaş, T., 1990 **Ozon Tabakasında Olan İncelme,** Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt: 27, Sayı:1
- Ali, R.M., 2000. **Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant,** Plant Science, 152, 173-179.
- Apse, M.P., Blumwald, E., 2002. **Engineering salt tolerance in plants.** Current opinion in biotechnology, 13:146-150.
- Ashraf, M., and Haris, P.J.C., 2004. **Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants.** Plant science, 166:3-16.
- Başer, İ., Korkut, K., Z., Bilgin, O., 2005. **Mutagen Uygulamasının Makarnalık Buğdaylarda (T. Durum Thell) M1 Generasyonundaki Varyasyona Etkisi.** Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. **Rapid determination of free proline for water stress studies.** Plant and Soil. 39.205-207.
- Benavides, M.P., Aizencang, G., Tomaro, M.L., 1997. **Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress,** Plant Growth Regul., 16, 205-211.
- Bilgin, O., Korkut, K.Z., 2005. **Bazı Ekmeklik Buğday Çeşit ve Hatlarının Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi.** Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2(3).
- Boru, G., Van Ginkel, M., Kronstad, W. E. and Boersma, L., 2001. **Expression And Inheritance of Tolerance To Waterlogging Stress In Wheat.** Euphytica, 117(2):91.
- Bressan, R.A., 2008. **Stres Fizyolojisi.** Editörler: Taiz, L., Zeiger, E., çeviri editörü: Türkan İ., Bitki fizyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara, 591-620.
- Brohi A.R., Aydeniz A. ve Karaman, M.R., 1995, **Toprak Verimliliği,** Gaziosmanpaşa Univ., Ziraat Fak. Yayınlan: 5, Kitaplar Serisi: 5
- Cakmak, I. and Marschner, H., 1992. **Magnesium deficiency and high-light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves.** Plant Physiol., 98: 1222-1227.
- Cakmak, I., 1994. **Activity of ascorbate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium- and potassium- deficient leaves, but not in phosphorus- deficient leaves.** J. Exp. Bot., 45: 1259-1266.
- Chattopadhyay, M.K., Tiwari, B.S., Chattopadhyay, G., Bose, A., Sengupta, D.N., Ghosh, B., 2002. **Protective role of exogenous polyamines on salinity stressed rice (*Oryza sativa*) plants,** Physiol. Plant., 116, 192-199.
- Chen, X.Y., He, Y.F., Luo, Y.M., Yu, Y.L., Lin, Q., Wong, M.H. 2003. **Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium.** Chemosphere. 50: 789-793.
- Collaku A. and Harrison, S. A., 2002. **Losses In Wheat Due To Waterlogging.** Crop Sci., 42:444-450.

- Cao, Y., Cai, S. B., Zhu, W., and Fang, X. W., 1991. **Genetic Evaluation of Waterlogging Resistance In The Wheat Variety Nonglin 46.** *Crop Genetic Resources*,4:31-32.
- Cao, Y., Wu, Z. S., Zhu, W., Fang, X. W. ve Xion, E. H., 1995. **Studies On Genetic Features of Waterlogging Tolerance In Wheat.** *Jiangsu Journal Of Agricultural Sciences* 11:11-15.
- Çelik, Ö., Atak, Ç., 2012. **The effect of salt stress on antioxidative enzymes and prolin content of two turkish tobacco varieties.** *Turkish journal of Botany* 36.339-356 .
- Das, S., Bose, A., Ghosh, B., 1995. **Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*.** *Phytochemistry*, 39, 283-285.
- Demirel, U., 2009. **Pamukta Yüksek Sıcaklık Stresi İle İlişkili Genlerin Farklılık Gösterim Yöntemiyle Belirlenmesi.** Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Duran, R.E., Coşkun, Y., Savaşkan, Ç., 2010. **Tuzun Makarnalık Buğday Genotiplerinde (*Triticum durum* Desf.) Bazı Kalitatif ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi.** Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 14-1
- Ekmekçi, E., Apan, M., and Kara, T., 2005. **Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi,** OMÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (3):118-125
- El-Shintinawy, F., 2000. **Photosynthesis in two wheat cultivars differing in salt susceptibility,** *Photosynthetica*, 38, 615-620.
- FAO,2002.<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/agl/agll/gaez/nav.htm> I On March 18, 2002.FAO, 2004. *Food Outlook* No.1. Pp. 1-39
- Gülşen, O. ve Mutlu, M., 2005. **Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları.** *Alatarım*, 4,27-37.
- Hamachi, U. Y., Furusho, M. ve Yoshida, T., 1989. **Heritability Of Wet Endurance In Malting Barley.** *Japanese Journal Of Breeding*, 39:195-202.
- Hodges,D.M., DeLong J.M., Forney C.F. ve Prange,R.K., 1999. **Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyan in and other interfering compounds.***Planta*, 207 :604-611.
- Husain, S., Muuns, R. 2003. **Effect of Sodium Exclusion Trait on Chlorophyll Retention and Growth of Durum Wheat in Saline Soil.** *Australian Journal of Agricultural Research*, 54 (6), 589-597
- Kalefetoğlu T. ve Ekmekçi Y., 2005. **Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri ve dayanıklılık mekanizmaları** *G.U. Journal of Science* 18(4):723-740
- Keleş,Y. Ve Öncel,I. 2002. **Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings.***Plant science* 163 (2002)783-790
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, İ., 2007. **The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars,** *enviromental and experimental botany*, 60:344-351
- Lin, C.C., Kao, C.H., 1995. **NaCl stress in rice seedlings: starch mobilization and the influence of GA<sub>3</sub> on seedling growth,** *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 36, 169-173.



- Lee et al., 2007. **A MYB transcription factor (TaMYB1) from wheat roots is expressed during hypoxia roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses.** *Physiologia plantarum* 129: 375-385.
- Mahajan, S., and Tuteja, N., 2005. **'Cold, salinity and drought stress: an overview'**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158
- Maiale, S., Sanchez, D.H., Guirado, A., Vidal, A., Ruiz, O.A., 2004. **Spermine accumulation under salt stress**, *Journal of Plant Physiology*, 161(1), 35-42.
- Mishra, S.N., Sharma, I., 1994. **Putrescine as a growth inducer and as a source of nitrogen for mustard seedlings under sodium chloride salinity**, *Indian J. Exp. Biology*, 32, 916-918
- Mocquot, B. Vangronsveld, F., Clusters, H. and Mench, M. 1996. **Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities.** *Plant and Soil*, 182, 287-300.
- Noori Sadat, S.A., Mcneilly, T. 2000. **Assessment of Variability in Salt Tolerance based on Seedling Growth in Triticum durum Desf.** *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 285-291
- Öncel, İ., Keleş, Y. 2002 **Tuz Stresi Altındaki Buğday Genotiplerinde Büyüme, Pigment İçeriği ve Çözünür Madde Kompozisyonunda Değişmeler.** *Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 23, 2.
- Parida, A.K., Das, A.B., and Mitra, B., 2003. **Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition, and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts.** *Photosynthetica*, 41 (2): 191-200.
- Parvaiz, A., and Satyawati, S., 2008. **Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review.** *Plant soil environment*, 54 (3): 89-99.
- Porra, R.J., Thompson, R.A. and Kriedemann, P.E. 1989. **Determination of accurate extinction coefficient and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvent verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy.** *Biochem. and Biophys. Acta*, 975, 384-394.
- Rahaie et al., 2010. **A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stress and differentially regulated between salt tolerant and sensitive genotypes.** *Plant cell rep.*
- Roychoudhury, A., Basu, S., Sarkar S. N. , Sengupta D. N., 2008. **Comparative physiological and molecular responses of a common aromatic indica rice cultivar to high salinity with non-aromatic indica rice cultivars.** *Plant cell rep* 27:1395-1410
- Roychoudhury et al. 2011. **Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica differ in their level of salt tolerance.** *Journal of plant physiology* 168:317-328.
- Sayre, K.D., M. van Ginkel, S. Rajaram, and I. Monasterio., 1994. **Tolerance to water-logging losses in spring bread wheat, effect of time of onset on expression.** *Colorado State Univ. In Annual Wheat Newsletter* 40:165-171.
- Sen, A., Alikamanoğlu, S., 2011. **In Vitro Doku Kültüründe Çeşitli Buğday (*Triticum aestivum* L.) Varyetelerinde Tuz Stresinin Büyüme Parametreleri ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi.** *Fresenius Environmental Bulletin* Vol 20-No 2a

- Setter, T.L., Ellis, M., Lourance, E.V., Ella, E.S., Mishra Senadhira, S.B., Sarkarung, S., Datta, S., 1997. **Physiology and genetics of submergence tolerance of rice.** Annals of Botany, 79: 67–77
- Subbaiah, C.C., Sachs, M.M., 2003. **Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress.** Annals of Botany, 91: 119–127.
- Swarup, A. ve Sharma, D. P., 1993. **Influence Of To Dressed Nitrogen In Alleviating Adverse Effects Of Flooding Of Growth And Yield Of Wheat In A Sodic Soil.** Field Crops Research 35:93-100.
- Tekin, F., Bozcuk, S., 1998. **Helianthus annuus L. var. Santafe (Ayçiçeği) tohumlarının çimlenmesi ve erken büyüme üzerine tuz ve dışsal putressinin etkileri,** Tr. J. of Biology, 22, 331-340.
- Tıprıdamaz, R., Durusoy, M., Bozcuk, S., 1995. **Effect of exogenous polyamines on  $\alpha$ -amylase activity during seed germination under salt stress,** Tr. J. of Botany, 19:411-416.
- Türk, M. ve Yürür., 2004. **Gönen Ekmeklik Buğday (T. aestivum var. aestivum L.) Çeşidinde Farklı Ekim Sıklığı ve Farklı Azotlu Gübre Uygulamalarının Verim ve Verim Öğeleri Üzerine Etkileri.** Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8-3 (2004), 102-106.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi- Shinozaki, K., Carnici, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., 2001. **Monitoring The Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes Under Drought and Cold Stresses by Using A Full Length cDNA Microarray.** Plant Cell, 13:61-72.
- Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Sebestyan, Z., 2002. **Effect of salt stress on free aminoacid and polyamine content in cereals,** Acta Biologica Szegediensis, 46 (3-4), 73-75.
- Singh, K.B., Foley, R.C., and Onate-Sanchez, L., 2002. **Transcription Factors in Plant Defense and Stress Responses.** Current Opinion in Plant Biology, 5:430-436.
- Van Assche, F.V. and Clijsters, H. 1990. **Effects of metals on enzyme activity in plants.** Plant Cell Environment 13, 195-206
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Kasuga, M., Liu, Q., Nakashima, K., Sakuma, Y., Abe, H., Shinwari, Z. K., Seki, M., And Shinozaki, K., 2002. **Biological Mechanisms of Drought Stress Response.** JIRCAS Working Report, 1-8.
- Yakıt, S., Tuna, A.L. 2006. **Tuz Stresi Altındaki Mısır Bitkisinde (Zea mays L.) Stres Parametreleri Üzerine Ca, Mg ve K'nın Etkileri.** Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (1), 59-67
- Yaşar, F., Ellialtıoğlu, Ş., Özpay, T., and Uzal, Ö., 2008. **Tuz stresinin karpuzda ( Citrullus lanatus (thunb.) mansf.) antioksidatif enzim aktivitesi üzerine etkisi.** Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J.Agric.Sci.) 18(1):61-65.
- Zapata, P.J., Maria Serrano, M., Teresa Pretel, M., Asuncian Amaros, M., Botella, A., 2004. **Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity,** Plant Science, 167, 781-788.

## TEŐEKKÖRLER

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımnda maddi-manevi yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen çok saygıdeğer ve sevgili danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nuray ERGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Moleküler analizlerimin yapılmasında yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Dr.Mustafa KOLUKIRIK'a, Biyokimyasal analizlerin yapılması sırasında yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Deniz YILDIZ' a, istatistiksel analizlerim ve deneylerim sırasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Suat ŐAHİNLER'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat TİRYAKİOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımna yardımcı olan değerli arkadaşlarım yüksek lisans öğrencisi Serhat ÖZÇUBUKCU, Özge TEMİZKAN, Özlem KURT ve çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tüm hayatım ve öğrenimim boyunca maddi-manevi olarak her zaman yanımda olan çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1988 yılında Adana'da doğdum. İlköğrenimimi Meryem Abdurrahim Gizer ilköğretim okulunda, lise öğrenimimi de Abdulkadir Paksoy Kız Lisesinde tamamladım. 2005 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nden, 2009 yılında mezun oldum. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans eğitimime başladım.

## EKLER

**Ek 1.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının ortalama kök boyuna (cm/bitki) etkisi

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	23.120	0,0001	***
Hata-1	4	0,085		
Uygulama	5	11.234	0	***
ÇxUyg	5	1.377	0,011	**
Hata-2	20	0,343		
Toplam	35			

\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$

**Ek 2.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının ortalama kök kuru ağırlığına (g/bitki) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	0,538	0,1323	
Hata-1	4	0,151		
Uygulama	5	20.567	0	***
ÇxUyg	5	0,886	0,1838	
Hata-2	20	0,525		
Toplam	35			

\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$

**Ek 3.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının ortalama sürgün boyuna (cm/bitki) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	40.534	0,0007	
Hata-1	4	0,469		
Uygulama	5	20.682	0	***
ÇxUyg	5	6.750	0	***
Hata-2	20	0,622		
Toplam	35			

**\*: p<0,05, \*\*: p<0,01 ve \*\*\*: p<0,001**

**Ek 4.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının ortalama sürgün kuru ağırlığına (g/bitki) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	0		
Hata-1	4	1.084		
Uygulama	5	4.944	0,0248	*
ÇxUyg	5	5.378	0,0178	*
Hata-2	20	1.500		
Toplam	35			

**\*: p<0,05, \*\*: p<0,01 ve \*\*\*: p<0,001**

**Ek 5.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının klorofil a miktarı üzerine ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{T.A}$ ) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Karele Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	0,731	0	***
Hata-1	4	0,001		
Uygulama	5	0,092	0	***
ÇxUyg	5	0,045	0	***
Hata-2	20	0,001		
Toplam	35			

**\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$**

**Ek 6.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının klorofil b miktarı üzerine ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{T.A}$ ) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	1.845	0	***
Hata-1	4	0		
Uygulama	5	0,357	0	***
ÇxUyg	5	0,329	0	***
Hata-2	20	0		
Toplam	35			

**\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$**

**Ek 7.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının toplam klorofil miktarı üzerine ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{T.A}$ ) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	3.967	0	***
Hata-1	4	0,001		
Uygulama	5	0,63	0	***
ÇxUyg	5	0,406	0	***
Hata-2	20	0,001		
Toplam	35			

**\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$**

**Ek 8.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının karotenoid miktarı üzerine ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{T.A}$ ) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	0,003	0,0536	
Hata-1	4	0		
Uygulama	5	0,015	0	***
ÇxUyg	5	0,023	0	***
Hata-2	20	0		
Toplam	35			

**\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$**



**Ek 9.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının katalaz aktivitesi (KAT) üzerine ( $\mu\text{m}/\text{min.g}^{-1}$  T.A) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	6.830	0,0002	***
Hata-1	4	0,041		
Uygulama	5	0,407	0,0000	***
ÇxUyg	5	0,149	0,0033	**
Hata-2	20	0,029		
Toplam	35			

\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$

**Ek 10.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde tuz-poliamin uygulamalarının glutatyon redüktaz (GR) üzerine ( $\mu\text{m}/\text{min.g}^{-1}$  T.A) etkisi.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Hata Kareler Ortalaması	F Değeri	
Çeşit	1	1.444	0,0122	*
Hata-1	4	0,077		
Uygulama	5	5.255	0,0000	***
ÇxUyg	5	2.206	0,0000	***
Hata-2	20	0,106		
Toplam	35			

\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$  ve \*\*\*:  $p<0,001$