

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**TUZ STRESİ UYGULANMIŞ ARPA BİTKİLERİNDE  
WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN  
EKSPRESYON ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Özge GÜNGÖR**

**Danışmanı  
Dr. Öğr. Üy. Ayşe Feyza TUFAN**

**II. Danışmanı  
Dr. Öğr. Üy. Emre YÖRÜK**

**İstanbul – 2018**

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**TUZ STRESİ UYGULANMIŞ ARPA BİTKİLERİNDE  
WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN  
EKSPRESYON ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Özge GÜNGÖR**

**Danışman ve Tez Jürisi  
Dr. Öğr. Üy. Ayşe Feyza TUFAN (Danışman)  
Dr. Öğr. Üy. Emre YÖRÜK (II. Danışman)  
Doç. Dr. Sibel YILMAZ (Üye)  
Dr. Öğr. Üy. Özlem SAĞLAM UÇAR (Üye)**

**İstanbul – 2018**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Özge GÜNGÖR tarafından hazırlanan **Tuz Stresi Uygulanmış Arpa Bitkilerinde WRKY Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyon Analizi** adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12.06.2018

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

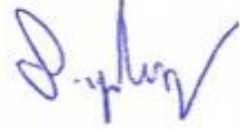
Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Ayşe Feyza TUFAN  
: Danışman, Haliç Üniv.



Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Özlem SAĞLAM UÇAR  
: Asıl Üye, Haliç Üniv.



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sibel YILMAZ  
: Asıl Üye, Yeni Yüzyıl Üniv.



---

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Temel SAVASKAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Vekil Müdür

## Tez Projesi

ORJİNALLİK RAPORU

% **13**  
BENZERLİK ENDEKSİ

% **11**  
İNTERNET  
KAYNAKLARI

% **4**  
YAYINLAR

% **5**  
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	fenbildergi.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	arastirma.tarim.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
6	www.cerezforum.net İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1

Pr.öğr. Üy. Ayşe Feyza Tufan

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince içinde bulunduğum T.C. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine ve Araştırma Görevlilerine öğrenim sürecimde ve tez çalışmamda vermiş oldukları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince bana her türlü destek ve yardımda bulunan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren her zaman sevgiyle hatırlayacağım değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üy. Ayşe Feyza TUFAN'a, Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında bilgi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üy. Emre YÖRÜK'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen ve yanımda olan, duydukları sevgi ve güveni bana hissettiren, sonsuz yardımları ve sabırları için anneme, babama ve ağabeyim Güvenç GÜNGÖR'e en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2018

Özge GÜNGÖR

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

<b>KISALTMALAR</b> .....	III
<b>ÇİZELGELER</b> .....	IV
<b>ŞEKİLLER</b> .....	V
<b>ÖZET</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Arpa .....	1
1.2. Abiyotik Stres ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri .....	3
1.3. Tuz Stres Toleransı .....	5
1.4. Sinyalin Algılanması ve İletilmesi .....	6
1.5. Transkripsiyon Faktörleri .....	8
1.6. WRKY Transkripsiyon Faktörleri .....	11
<b>2. AMAÇ</b> .....	16
<b>3. GEREÇLER</b> .....	17
3.1. Bitki Materyali .....	17
3.2. Çimlenme Aşamasında Kullanılan Solüsyonlar .....	18
3.3. Primerler .....	18
3.4. Kullanılan Kitler .....	19
3.5. RNA İzolasyonunda Kit İçeriğinde Yer Almayan Kimyasallar .....	19
3.6. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Kimyasallar .....	20
3.7. Sarf Malzemeler .....	20
3.8. Cihazlar .....	21
<b>4. YÖNTEM</b> .....	22
4.1. Fizyolojik Analiz .....	22
4.1.1. Arpa Tohumlarının Çimlendirilmesi .....	22
4.2.2. Tuz Stresinin Fenotipe Etkisinin Belirlenmesi .....	22
4.2. Biyoinformatik Çalışmalar .....	23
4.3. Gen Ekspresyon Analizleri .....	23
4.3.1. Total RNA İzolasyonu .....	23
4.3.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi .....	24
4.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Total RNA'nın Sağlamlığının Belirlenmesi ...	24
4.3.4. cDNA Sentezi .....	25
4.3.5. Primer Çiftlerinin Tasarlanması .....	25
4.3.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) .....	26
4.4. İstatiksel Analiz .....	27
<b>5. SONUÇLAR</b> .....	28
5.1. Fizyolojik Analizler .....	28
5.1.1. Tohum Çimlenmesinde Büyüme Karakteristikleri .....	28
5.1.2. Fenotipik Farklıların Analizi .....	30

5.2. Gen Ekspresyon Analizleri .....	31
5.2.1. Total RNA'nın Miktar ve Saflığı .....	31
5.2.2. qPCR ile Gen Ekspresyon Analizleri .....	32
5.2.2.1. <i>HvWRKY6</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	32
5.2.2.2. <i>HvWRKY9</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	33
5.2.2.3. <i>HvWRKY24</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	33
5.2.2.4. <i>HvWRKY25</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	34
5.2.2.5. <i>HvWRKY33</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	34
5.2.2.6. <i>HvWRKY34</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	35
5.2.2.7. <i>HvWRKY41</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	35
5.2.2.8. <i>HvWRKY42</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	36
5.2.2.9. <i>HvWRKY46</i> Geninin Ekspresyon Analizi .....	36
5.2.3. Arpa çeşitlerinde WRKY Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyon Analizi	37
<b>6. TARTIŞMA</b> .....	40
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	45
<b>8. EKLER</b> .....	54
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	56

## KISALTMALAR

<b>AA</b>	: Askorbik Asit
<b>ABA</b>	: Absisik Asit
<b>ANOVA</b>	: Varyans Analizi
<b>APX</b>	: Askorbat Peroksidaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CDPK</b>	: Ca <sup>2+</sup> Bağımlı Protein Kinaz
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
<b>Cq</b>	: Döngü Eşiği
<b>DREB</b>	: Dehidrata Duyarlı Element Bağlanması
<b>ERF</b>	: Etilen Yanıtlayıcı Faktör
<b>EST</b>	: Anlatım Dizi Etiketleri
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>GB</b>	: Glisin Betain
<b>GPX</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>LEA</b>	: Geç Embriyogenez
<b>NCBI</b>	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>MAPK</b>	: Mitojen Aktive Edici Kinaz
<b>qPCR</b>	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RNaz</b>	: Ribonükleaz
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TAE</b>	: Tris-Asetat-EDTA
<b>TF</b>	: Transkripsiyon Faktörü



## ÇİZELGELER

### Sayfa No.

<b>Çizelge 1.1.</b> Arpanın taksonomisi.....	1
<b>Çizelge 1.2.</b> Bitkilerin tuz stresine verdikleri yanıtta yer alan önemli TF'lerin etkilişimde buldukları cis-etkili elementler.....	10
<b>Çizelge 1.3.</b> Ekspresyonu incelenen <i>HvWRKY</i> 'lerin <i>Arabidopsis thaliana</i> ve <i>Oryza sativa</i> 'daki ortologları .....	13
<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan arpa çeşitleri ve özellikleri.....	17
<b>Çizelge 3.2.</b> Çimlenme aşamasında kullanılan solüsyonlar.....	18
<b>Çizelge 3.3.</b> qPCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri .....	19
<b>Çizelge 3.4.</b> Moleküler analizlerde kullanılan kitler.....	19
<b>Çizelge 3.5.</b> RNA izolasyonunda kit içeriğinde yer almayan kimyasallar .....	20
<b>Çizelge 3.6.</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve içeriği .....	20
<b>Çizelge 3.7.</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar.....	20
<b>Çizelge 3.8.</b> Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	20
<b>Çizelge 3.9.</b> Çalışmada kullanılan cihazlar.....	21
<b>Çizelge 4.1.</b> Çimlenme sürecinde büyüme karakteristiklerinin skorlanması.....	23
<b>Çizelge 4.2.</b> cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşenler .....	25
<b>Çizelge 4.3.</b> cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan bileşenler .....	25
<b>Çizelge 4.4.</b> qPCR'da kullanılan bileşenler .....	26
<b>Çizelge 4.5.</b> qPCR'da reaksiyon koşulları .....	26
<b>Çizelge 5.1.</b> Farklı konsantrasyonlarda tohum çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri .....	28
<b>Çizelge 5.2.</b> İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları.....	32
<b>Çizelge 5.3.</b> Arpa çeşitlerinin qPCR sonuçlarının ortalaması ve standart sapması ...	32
<b>Çizelge 5.4.</b> Arpa çeşitlerinde WRKY transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon analiz sonuçları .....	39

## ŞEKİLLER

### Sayfa No.

Şekil 1.1. ROS'ların kimyası .....	4
Şekil 1.2. Bitkilerde tuz stres toleransı .....	5
Şekil 1.3. Tuz stresinde rol oynayan temel sinyal tipleri .....	7
Şekil 1.4. Tuzluluk stresi toleransı ile ilişkili yollar ve SOS tarafından iyon homeostasinin düzenlenmesi.....	8
Şekil 1.5. Tuz stresinde ABA bağımlı ve ABA bağımsız sinyal yollarında gen ekspresyonunun düzenlenmesi.....	9
Şekil 1.6. WRKY'lerin bitkilerde farklı çevresel koşullar altında çoklu rolü .....	15
Şekil 5.1. Çizelge 5.1'de verilen kontrol değerleri kullanılarak arpa çeşitlerinin çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri bakımından karşılaştırılması.....	29
Şekil 5.2. Çizelge 5.1'de verilen %0,5'lik NaCl değerleri kullanılarak arpa çeşitlerinin çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri bakımından karşılaştırılması.....	29
Şekil 5.3. Çizelge 5.1'de verilen %1,0'lik NaCl değerleri kullanılarak arpa çeşitlerinin çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri bakımından karşılaştırılması.....	30
Şekil 5.4. Distile suda (kontrol) ve %0,5 ile %1,0'lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen Avcı 2002 (Av) çeşidinin tuz stresine verdiği yanıt .....	30
Şekil 5.5. Distile suda (kontrol) ve %0,5 ile %1,0'lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen Premium (Pr) çeşidinin tuz stresine verdiği yanıt.....	31
Şekil 5.6. Distile suda (kontrol) ve %0,5 ile %1,0'lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen Escadre (Es) çeşidinin tuz stresine verdiği yanıt .....	31
Şekil 5.7. Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY6</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması.....	33
Şekil 5.8. Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY9</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması.....	33
Şekil 5.9. Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY24</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması.....	34
Şekil 5.10. Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY25</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması .....	34
Şekil 5.11. Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY33</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması .....	35
Şekil 5.12. Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY34</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması .....	35

<b>Şekil 5.13.</b> Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY41</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması .....	36
<b>Şekil 5.14.</b> Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY42</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması .....	36
<b>Şekil 5.15.</b> Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki <i>HvWRKY46</i> göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması .....	37
<b>Şekil 5.16.</b> Avcı 2002 çeşidinin yapraklarındaki TF'lerin göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması.....	37
<b>Şekil 5.17.</b> Premium çeşidinin yapraklarındaki TF'lerin göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması.....	38
<b>Şekil 5.18.</b> Escadre çeşidinin yapraklarındaki TF'lerin göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması.....	38

## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Özge GÜNGÖR  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üy. Ayşe Feyza TUFAN  
II. Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üy. Emre YÖRÜK  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Haziran 2018

## ÖZET

### TUZ STRESİ UYGULANMIŞ ARPA BİTKİLERİNDE WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN EKSPRESYON ANALİZİ

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de tarımı yapılan 15 arpa çeşidi (*Hordeum vulgare* L. cvs. Avcı 2002, Burakbey, Cervoise, Clarica, Epona, Escadre, Gazda, Karatay 94, Lord, Oliver, Premium, Ramata, Tarm 92, Tokak 157/37, Yesevi 93) farklı tuz konsantrasyonlarında (%0,5 ve %1,0) çimlendirildi ve çeşitlerin tuz stresine verdikleri erken yanıt fenotipik ve moleküler analizlerle incelendi.

NCBI veritabanında arpada tanımlanmış olan 50 tane *HvWRKY* (2-61) transkripsiyon faktörü (TF) arasından literatür taraması ile daha önce tuz stresi ile ilişkisi tanımlanmamış olan aday TF’ler seçildi. Fenotipik analiz sonuçlarına göre, dayanıklı (Avcı 2002 ve Premium) ve hassas (Escadre) arpa çeşitleri seçildi ve çeşitlerin tuz stresine verdiği moleküler yanıt *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY25*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34*, *HvWRKY41*, *HvWRKY42* ve *HvWRKY46* genlerinin ekspresyon analizleriyle karşılaştırmalı olarak incelendi.

Gen ekspresyon analiz sonuçlarına göre, genel olarak *HvWRKY* genlerinin ekspresyon seviyelerinin tuz stresi ile birlikte anlamlı olarak indirildiği gözlemlendi. Kontrol bitkilerine göre %1,0’lik NaCl stresi uygulanan bitkilerden Avcı 2002 çeşidinde *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY34* ve *HvWRKY42* genlerinin, Premium çeşidinde *HvWRKY6*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34* ve *HvWRKY42* genlerinin, Escadre çeşidinde ise *HvWRKY42* geninin ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak düştüğü tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** arpa, tuz stresi, WRKY transkripsiyon faktörü

## GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Özge GÜNGÖR  
Field : Molecular Biology and Genetics  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Asst. Prof. Ayşe Feyza TUFAN  
Co-Supervisor : Asst. Prof. Emre YÖRÜK  
Degree Awarded and Date : Master of Science – June 2018

## ABSTRACT

### EXPRESSION ANALYSIS OF WRKY TRANSCRIPTION FACTORS IN BARLEY UNDER SALT STRESS

In this study, 15 barley varieties (*Hordeum vulgare* L. cvs. Avcı 2002, Burakbey, Cervoise, Clarica, Epona, Escadre, Gazda, Karatay 94, Lord, Oliver, Premium, Ramata, Tarm 92, Tokak 157/37, Yesevi 93), which are bred in Turkey were germinated under different salt stresses (0.5% and 1.0%) and the early response of varieties to salt stress was investigated by phenotypic and molecular analyses.

The NCBI database contains 50 *HvWRKY* (2-61) transcription factors (TFs) that are defined in barley, and with literature survey, candidate TFs that were not previously studied in response to salt stress were chosen. According to the results of phenotypic analyses, tolerant (Avcı 2002 and Premium) and sensitive (Escadre) varieties were selected and their molecular response to salt stress were examined comparatively by the expression analyses of *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY25*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34*, *HvWRKY41*, *HvWRKY42* and *HvWRKY46* genes.

According to gene expression analyses results, it was generally observed that expression of *HvWRKY* genes were significantly reduced under salt stress. Expression levels of *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY34* and *HvWRKY42* genes in Avcı 2002; *HvWRKY6*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34* and *HvWRKY42* genes in Premium; and *HvWRKY42* gene in Escadre were significantly reduced in plants treated with 1.0% NaCl compared with control plants.

**Keywords:** barley, salt stress, WRKY transcription factor

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Arpa

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelen en eski tahıl bitkilerinden birisidir. Bereketli Hilal “Fertile Crescent” olarak isimlendirilen bölgede (Türkiye, İsrail, Ürdün, Lübnan, Suriye, İran, Irak ülkelerini kapsayan alan) yaklaşık 10 bin yıl önce kültüre alındığı belirlenmiştir (Badr ve diğ., 2000). O dönemlerde ilk defa Türkiye’de Alman botanikçi Carl Koch tarafından keşfedilmiş bir alt tür olan yabani arpa (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum*) önemli bir besin kaynağı olarak kullanılmıştır (Salamini ve diğ., 2002). İnsanlar arpayı dünyanın farklı yerlerinde ıslah ederek bugün kullandığımız arpayı (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*) elde etmişlerdir.

Arpa, buğdaygiller (*Gramineae*) ailesinin *Hordeum* cinsine aittir. Arpanın taksonomisi Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Integrated Taxonomic Information System [Itis], 2018). *Hordeum*, diploid ( $2n=2x=14$ ), tetraploid ( $2n=4x=28$ ) ve heksaploid ( $2n=6x=42$ ) genotipe sahip 32 türden ve 45 taksondan oluşmakta olup günümüzde kültüre alınan arpa diploid özelliktedir (Von Bothmer ve diğ., 1995).

Çizelge 1.1. Arpanın taksonomisi

Alem	Planta
Altalem	<i>Tracheobionta</i>
Şube	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Liliopsida</i>
Altsınıf	<i>Commelinidae</i>
Takım	<i>Cyperales</i>
Aile	<i>Gramineae</i>
Oymak	<i>Triticeae</i>
Cins	<i>Hordeum</i> L.
Tür	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Tek yıllık uzun gün bitkisi olan arpa değişik gün uzunluklarına da uyabilir. Tahıllar içerisinde en çok kardeşlenenlerden olup boy uzunluğu 35–100 cm, başakları ortalama 8–15 cm arasındadır. Ekonomik değeri olan ve kültürü yapılan arpanın başak morfolojisine göre iki ve altı sıralı olmak üzere farklı iki tipi bulunmaktadır. Eksen,

başağın merkezi olup nodyumlarında yer alan ve içinde tohum gelişecek olan başakçıklardan oluşur. Altı sıralı arpa, başak ekseninin bir boğumundaki üç başakçığın üçününde dane bağlaması ile oluşurken, iki sıralı arpa yalnız ortadaki başakçığın dane bağlaması ile oluşur. Altı sıralı arpa, ılıman bölgelerde yetiştirilir ve protein oranı fazla olduğu için hayvan yemi olarak kullanılırken, iki sıralı arpa soğuk bölgelerde yetiştirilir ve protein oranı düşük olduğu için maltlık olarak kullanılır (Gramene, 2018).

Arpa, tahıl üretimi içerisinde Türkiye’de buğdaydan sonra ikinci sırada yer alırken; dünyada mısır (*Zea mays* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.) ve pirinçten (*Oryza sativa* L.) sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Food and Agriculture Organization [FAO], 2018). Ayrıca tahıllar içerisinde arpa tuz stresine karşı en dayanıklı tahıl iken; pirinç en duyarlı tahıldır (Munns ve Tester 2008). Arpa tahıllar arasında tuza en yüksek tolerans gösteren tahıl olmasına rağmen, farklı genotipleri arasında tuz toleransında yüksek oranda varyasyon gösterir.

Arpanın yetiştirilmesi için sıcaklığı 0 °C’nin altına düşmeyen ve 18–20 °C’nin üzerine çıkmayan, nispi nemi ise % 70-80 olan bölgeler tercih edilmelidir. Çok kuru ya da çok sulak olmayan her toprakta yetişebilen arpa farklı iklim ve stres koşullarına uyum sağlayabilen bir tahıl olup dünyanın çok çeşitli bölgelerinde yetişebilir. İklim koşulları açısından Türkiye’nin tüm bölgeleri arpa yetiştirilmesine uygunluk göstermektedir. Arpa üretiminde Türkiye; Avrupa Birliği, Rusya, Ukrayna, Avustralya ve Kanada’dan sonra altıncı sırada yer almaktadır (Foreign Agriculture Service [FAS], 2018).

Arpanın yazlık ve kışlık ekimi yapılmaktadır. Yazlıklarda protein oranı yüksek, dane küçük ve cılız, kışlıklarda ise protein oranı düşük, dane iri ve ağırdır. Ekimi yapılan arpanın Türkiye’de % 90’ı hayvan yemi olarak, kalan kısmı maltlık olarak bira sanayinde ve gıda endüstrisinde kullanılırken, dünyada ise % 65’i hayvan yemi olarak, % 33’ü biyodizel üretimi ile maltlık olarak bira ve viski yapımında, % 2’si ise gıda endüstrisinde insan besini olarak kullanılmaktadır (Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007).

Arpa, insan sağlığına yarar sağlayan bir tahıl olup tohumunun ortalama % 10–13 kadarı kavuzdur ve yapısında % 67 karbonhidrat, % 9–13 protein bulunur. Kavuzun fazla olması besleyicilik değerini düşürür. Tohumunun alevron tabakası, embriyo ve

skutellumunda bol miktarda selenyum, bakır ve niasin (B3 vitamini); endospermasında ise lif bulunur (Gupta ve diğ., 2010).

Arpanın haploid genom boyutu 5.1 Gb (gigabaz) olup genomu yüksek oranda tekrarlı diziler ve yüksek seviyede tek nokta mutasyonları (SNP) içermektedir (Dawson ve diğ., 2015). Uluslararası arpa genom dizileme konsorsiyomu (Mayer ve diğ., 2012) tarafından yapılan genom dizileme projesinde (“whole-genome shotgun”) arpa genomunun yaklaşık %84’ünün mobil elementler ve tekrarlı dizilerden (retrotranspozanlar) oluştuğu bildirilmiştir. Toplamda dizilenen 79,379 transkript takımının 26,159’u diğer bitki genomlarıyla homoloji gösteren “yüksek güvenilirlikte” genlerdir.

Arpada tuz toleransının genetik temelini araştırdığı çalışmalar yapılmakta olup son zamanlarda tuz stresiyle ilişkili bazı kantitatif karakter lokusları (QTL) tanımlanmıştır. Rivandi ve diğ. (2011) yaptıkları çalışmada *Hordeum vulgare* 1H kromozomunun uzun kolu üzerinde *HvNax4* olarak adlandırılan tuzun uzaklaştırılmasında görevli QTL’i tanımlamışlardır. Arpa; kendine döllen, on dört kromozoma sahip diploid yapısı ve kısa yaşam döngüsü ile fizyolojik ve moleküler çalışmalarda model bitki olarak kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalar birçok bilimsel konunun aydınlanmasında yararlı olmuştur (Shewry, 1992; Saisho ve Takeda, 2011).

## **1.2. Abiyotik Stres ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri**

Bitkilerde potansiyel bir hasarın oluşmasını sağlayan çevresel bir değişiklik stres olarak tanımlanır. Bitkiler yaşamları boyunca abiyotik ve biyotik stres faktörleri ile karşılaşmaktadır. Bitkilerde abiyotik strese fiziksel ve kimyasal çevre etmenleri neden olmakta olup bu etmenler içerisinde kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklık, besin açlığı, ağır metal stresi ile oksidatif stres yer almaktadır. Biyotik strese ise fungi, bakteri, böcek gibi doğada yaşayan organizmalar neden olmaktadır (Maheswari ve diğ., 2012).

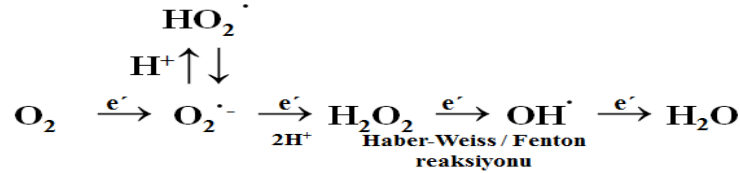
Abiyotik streslerden tuzluluk, kuraklıktan sonra ekim alanlarını en fazla etkileyen stres faktörüdür (Blum, 1986) ve dünyada tuzluluğa maruz kalmış alan 9 milyon ha’dan fazladır (Tuteja, 2007). Tuzluluk, bitkiler üzerindeki doğrudan etkisini ozmotik ve iyonik strese neden olarak, dolaylı etkisini (sekonder etki) ise oksidatif strese neden olarak gösterir. Tuz stresi, kullanılabilir su içeriğini kısıtlayan ozmotik etkisi ve de iyon içeriğinin toksik düzeye ulaşmasına neden olan iyonik etkisi ile



bitkilerde fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal değişimlere yol açmaktadır (Zhang ve diğ., 2012).

Ozmotik stres, bitkilerde kökün çevresindeki tuz konsantrasyonunun artışından dakikalar sonra oluşmaktadır. Kullanılabilir su miktarının azalmasına neden olup kök uzamasında ve sürgün gelişiminde yavaşlamaya neden olur. İyonik stres ozmotik stresin devamında ortaya çıkar, daha yavaş etkili olup etkisini göstermesi günleri, haftaları ya da ayları bulabilir. İyonik stres evresinde ortamda artan Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonlarının besin elementleri (K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> ve NO<sup>-3</sup>) ile rekabete girmesi sonucunda bitkilerde besin dengesizliği meydana gelir. Ayrıca, yapraklardaki iyon birikimi bitkide tuz toksisitesine neden olarak yaprağın ölmesine neden olur (Hu ve Schmidhalter, 2005).

Tuzluluğun bitkiler üzerindeki bir etkisi de, hücre içerisinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek miktarda birikmesi ile bitkilerin oksidatif strese girmesidir. ROS'lar normal koşullarda metabolik olaylar esnasında üretilirler fakat düşük konsantrasyonlarda zararlı etki oluşturmazlar. Oksijen (O<sub>2</sub>), bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli olup çevresel stres koşullarında konsantrasyonu arttığı zaman H<sub>2</sub>O oluşturmak için hücrede sürekli indirgenir ve çeşitli reaktif oksijen türlerini oluşturur (Şekil 1.1) (Desikan ve diğ., 2004).



Şekil 1.1. ROS'ların kimyası

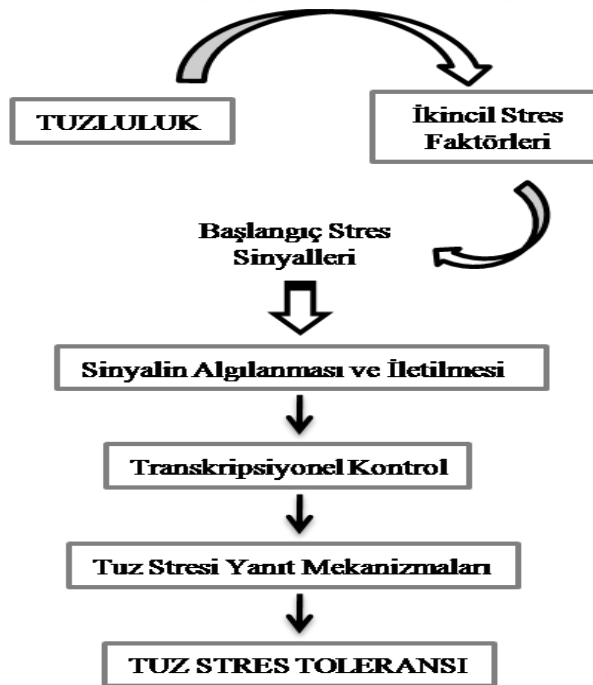
Hücrenel süreçte ikincil haberciler olarak da görev yapabilen bilinen başlıca ROS'lar singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), süperoksit molekülü (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>), perhidroksil radikali (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>)'dir. Çevresel stres koşullarında ROS'ların artışları proteinlerin oksidasyonu, nükleik asit hasarı, lipitlerin peroksidasyonu, enzim inhibisyonu, programlı hücre ölümünün aktivasyonu ve hücrelerin ölümü gibi birçok hasara yol açabilir (Sgherry ve diğ., 1996; Mittler, 2002).

Antioksidan sistemler, bitkiler oksidatif stres altındayken ROS'un kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlamakta olup aktivitelerinin azalması durumunda ROS'ların sentezlenmesini tetikleyerek birikimine neden olur (Breusegem ve diğ., 2001). Oksidasyona karşı mücadele eden maddeler olan antioksidanlar enzimatik

antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Enzimatik antioksidanlar süperoksid dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX)'dır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir (Smirnoff N, 2005).

### 1.3. Tuz Stres Toleransı

Bitkiler çevresel değişiklikler altında yaşamlarını sürdürebilmek için abiyotik strese karşı tolerans ve adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Abiyotik stres faktörleri (tuzluluk, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, kimyasal kirlilik vb.) bitkilerde birincil stres faktörleri olarak görev yapmakta olup başlangıç stres sinyallerini uyaran ikincil stres faktörlerini (ozmotik stres, oksidatif stres, iyonik stres) tetiklemektedir. Bitkide tuz stres toleransı ve dayanıklılığın sağlanması amacıyla başlangıç stres sinyalleri, sinyal sürecini ve transkripsiyonel kontrolü başlatarak hücrede bozulan dengenin geri kazanılması, hücre zarında oluşan hasarların onarılması ve proteinlerin korunması için tuz stresi yanıt mekanizmalarını aktive etmektedir (Şekil 1.2) (Vinocur ve Altman, 2005; Agarwal ve diğ., 2013).



Şekil 1.2. Bitkilerde tuz stres toleransı

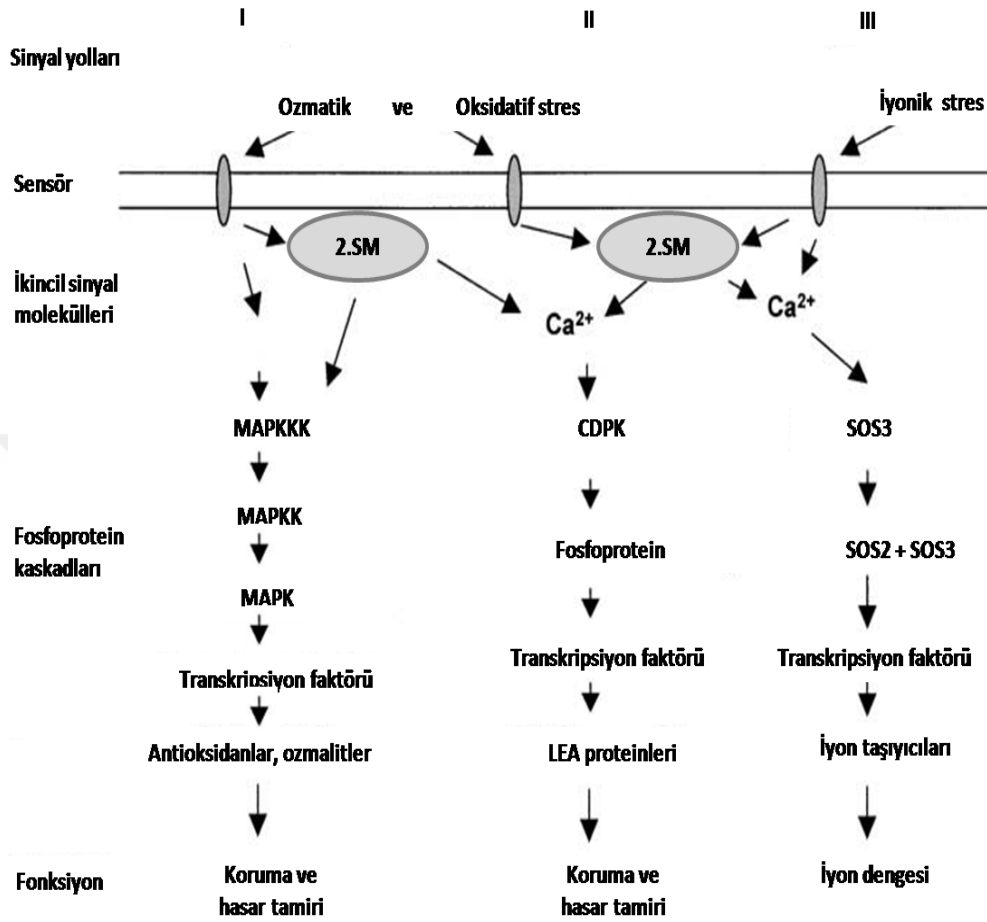
Tuz stresi yanıt mekanizmalarında yer alan genler erken cevap genleri ve geç cevap genleri olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. Geç cevap genlerinin aktivasyonunda görev alan ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan erken cevap genlerinin indüklenmesinde ortamda tüm sinyal bileşenleri önceden mevcut olduğu için yeni protein sentezine ihtiyaç duyulmamaktadır. Geç cevap genleri, hızlı (dakikalar içinde) ve geçici olarak indüklenen erken cevap genlerine göre daha yavaş indüklenir ve ekspresyonları devamlıdır (Sairam ve Tyagi, 2004).

Tuz stresinin indüklediği genlerin ürünleri olan moleküller görevlerine göre regülatör ve efektör moleküller olmak üzere iki gruba ayrılır. MAPK (Mitojen-aktive edici kinaz)'lar, fosfoinositol metabolizmasında yer alan enzimler (fosfolipazlar) ve transkripsiyon faktörleri stres yanıt mekanizmasında sinyal iletimini ve gen ekspresyonlarını düzenlemekle görevli olan regülatör moleküllerdir. Su kanal proteinleri, moleküler şaperonlar, LEA (geç embriyogenez) proteinleri, detoksifikasyon enzimleri, çeşitli proteazlar, düzenleyici ozmolitlerin sentezinde yer alan enzimler ve iyon taşıyıcılar çevresel streslere karşı koruyucu olarak görev alan efektör moleküllerdir (Seki ve diğ., 2003; Wu ve diğ., 2005a).

#### **1.4. Sinyalin Algılanması ve İletilmesi**

Tuz stresine ait sinyal iletim ağı (I) MAPK birimlerinin kullanıldığı ozmotik ve oksidatif stres sinyali, (II) LEA proteinlerini şifreleyen genlerin aktivasyonuna öncülük eden  $Ca^{+2}$ -bağımlı sinyal, (III) iyon dengesini düzenleyen  $Ca^{+2}$ -bağımlı SOS sinyali olmak üzere üç grupta toplanmaktadır (Şekil 1.3) (Xiong ve diğ., 2002). Sinyal yolu I'de kademeli aktivasyona sahip olan ve üç kinaz biriminden (sırasıyla MAPKKK, MAPKK, MAPK) oluşan MAPK kaskatı ozmotik ve oksidatif stres aracılığıyla düzenlenmektedir ve sonuçta ozmolit ve antioksidanlar üretilmektedir. MAPKKK çift fonksiyonlu MAPKK'yı aktive eder, MAPKK ise treonin ve tirozin fosforilasyonu ile MAPK'yı aktive eder. MAPK'nın fosforilasyon formu nukleusa geçip transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ve aktivasyonunu sağlayarak tuzluluk stresinde rol oynayacak genleri aktive etmektedir (Jonak ve diğ., 2000). Bu genlerin ürünü olan ozmolitler ve antioksidanlar hücrenin tuzluluk stresine karşı verdiği yanıt olup prolin, glisin betain ve sukroz bu ozmolitler arasında sayılabilir. Prolin, plazma zar bütünlüğünün korunmasını ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasını sağlar (Mani ve diğ., 2002). Glisin betain (GB), kompleks protein

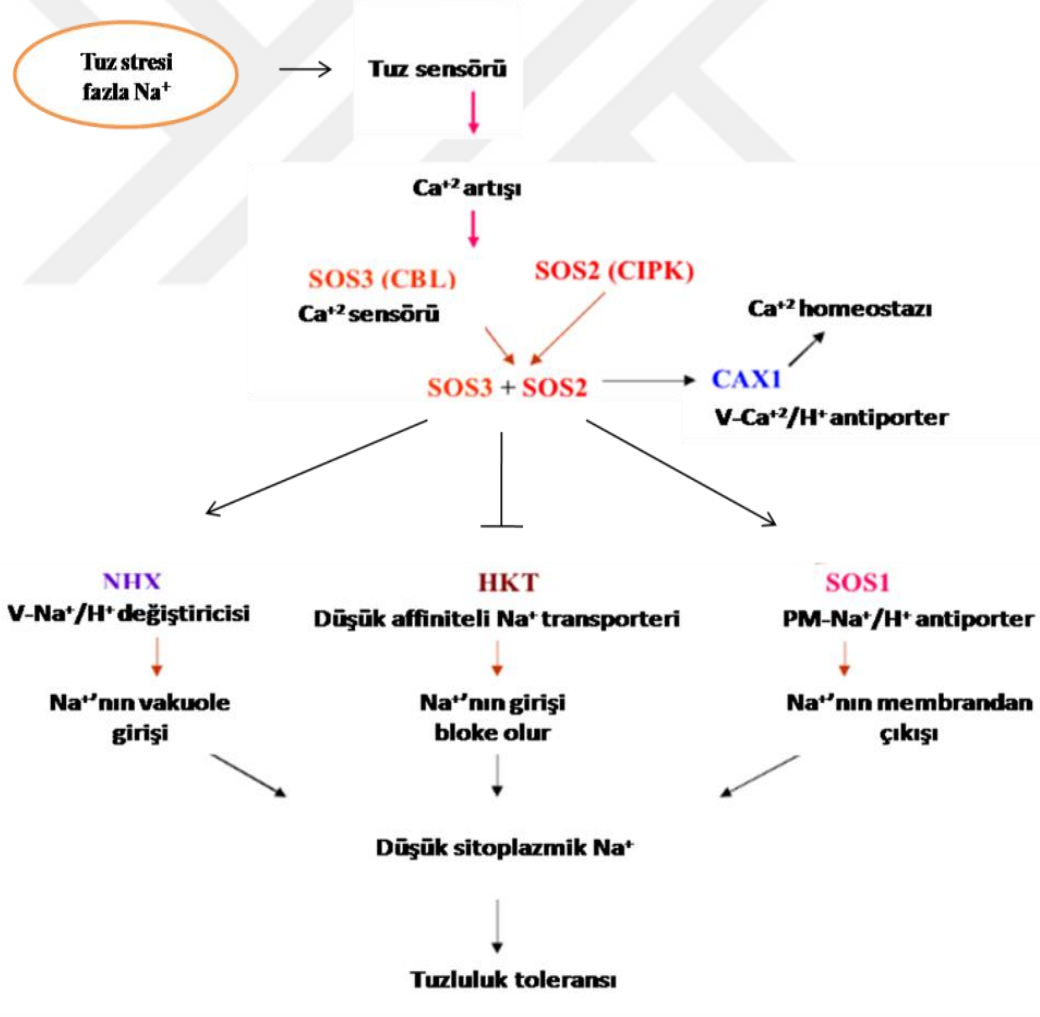
ve enzimlerin dördüncül yapılarının ve membranlarının korunmasında etkilidir (Gorham, 1995). Sukroz ise, osmotik dengeyi sağlayarak çözünür proteinlerdeki yapısal değişiklikleri önlemektedir (Wang ve diğ., 2000).



Şekil 1.3. Tuz stresinde rol oynayan temel sinyal tipleri (2. SM: İkincil sinyal molekülleri) (Xiong ve diğ., 2002)

Sinyal yolu II ve III sitosolde artan Ca<sup>+2</sup> ile tetiklenen sinyal iletim yollarıdır. İnorganik sinyali spesifik protein fosforilasyon kaskatlarına bağlamada temel rol oynayan proteinler Ca<sup>+2</sup>-bağımlı protein kinaz (CDPK) ve kalsiyum bağlayan SOS3'tür. Sinyal yolu II'de rol oynayan CDPK'ların düzenleyici bölgelerine Ca<sup>+2</sup>'nin bağlanmasıyla fosfoproteinlere Ca<sup>+2</sup> sinyali aktarılır ve LEA proteinlerini şifreleyen genlerin ekspresyonlarında görev alan transkripsiyon faktörleri aktif hale getirilir. Sentezlenen LEA protein grupları; dehidrasyona karşı hücrel toleransta suyun bağlanmasında, proteinler ile zar yapısının korunmasında ve devamlılığının sağlanmasında, sitozolik iyon konsantrasyonunun düzenlenmesinde ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortadan kaldırılmasında görev alırlar (Close, 1997).

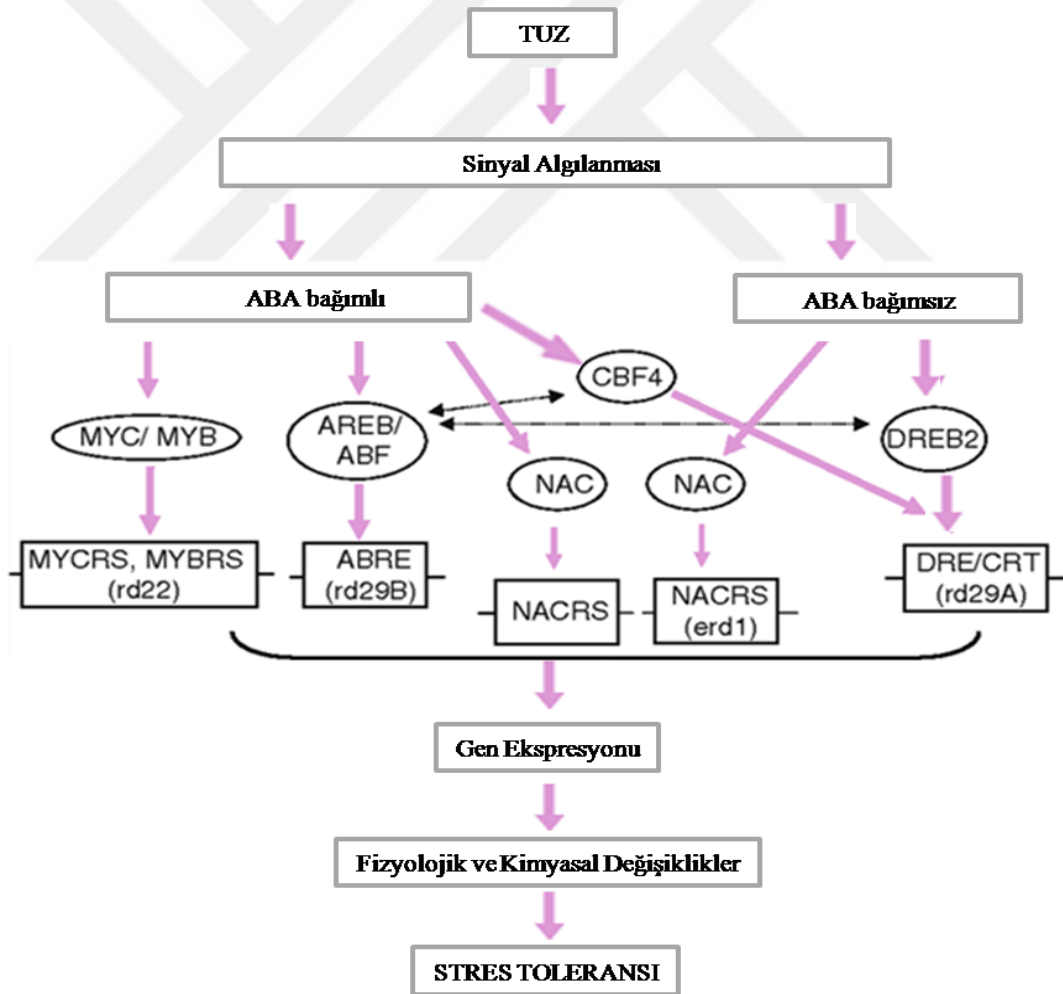
Sinyal yolu III tuz stresine özgü olup iyon taşıyıcılarını aktif hale getirerek iyon dengesini sağlar. Bu sinyal yolunda,  $Ca^{+2}$  bağlayan SOS3 proteini tarafından sitozoldeki  $Ca^{+2}$  artışı algılanır ve  $Ca^{+2}$  bağlı SOS3 proteini SOS2 protein kinazın düzenleyici bölgesine bağlanarak SOS2 proteinini aktive etmektedir.  $Na^{+}$ 'nın hücre dışına verilmesi SOS3-SOS2 protein kinaz kompleksinin çeşitli iyon taşıyıcılarını aktif hale getirmesi veya inhibe etmesi ile sağlanmakta olup üç yolla gerçekleşmektedir. SOS3-SOS2 kinaz kompleksi (I), *SOS1* genini aktive ederek  $Na^{+}$ 'nın atılmasını sağlar (II), HKT aktivitesini inhibe ederek hücre içine  $Na^{+}$ 'nın girişi önlenir (III), NHX aktive ederek fazla  $Na^{+}$ 'nın vakuolde biriktirilmesini sağlar. Böylece, tuz toleransı sitoplazmik  $Na^{+}$ 'nın seviyesi düşürülerek sağlanmış olur. Ayrıca, SOS3-SOS2 kinaz kompleksi sayesinde CAX1 aktivitesinin artması sonucunda tekrar sitozolik  $Ca^{+2}$  dengesi kurulur (Şekil 1.4) (Mahajan ve Tuteja, 2005).



Şekil 1.4. Tuzluluk stresi toleransı ile ilişkili yollar ve SOS tarafından iyon homeostasisının düzenlenmesi (Mahajan ve Tuteja, 2005)

## 1.5. Transkripsiyon Faktörleri

Tuz stresine yanıt mekanizmaları esas olarak gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesini kapsamaktadır. Tuz stresiyile birlikte algılanan dış sinyaller hücre içi sekonder mesajcılara (inositol fosfat,  $Ca^{+2}$  ve ROS gibi) dönüştürülür. Bu ikincil mesajcılar tuz stresi yanıt sinyal yolağını tetikleyerek sinyalleri güçlendirir. Ardından proteinler fosforlanarak ve defosforile edilerek yönlendirilir ve transkripsiyon faktörlerine ait gen ekspresyonları aktive olur. Böylece, transkripsiyon faktörleri aracılığıyla tuz stresi toleransında görevli olan moleküllerin sentezi gerçekleştirilmektedir. Tuz stresine bağlı olarak genlerin ekspresyonunu sağlayan sinyal yolları Absisik asit (ABA) bağımlı ve ABA bağımsız olduğu için bu yollarda yer alan TF'lerde, ABA bağımlı ve ABA bağımsız transkripsiyon faktörleri olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 1.5) (Agarwal ve diğ., 2013).



Şekil 1.5. Tuz stresi altında ABA bağımlı ve ABA bağımsız sinyal yollarında gen ekspresyonunun düzenlenmesi (Agarwal ve diğ., 2013)

ABA bağımlı yolda MYC (“myelocytomatosis”)/MYB (“myeloblastosis”), AREB (“ABA responsive element”)/ABF (“ABRE binding factor”) transkripsiyon faktörleri bulunurken, ABA bağımsız yolda DREB2 (“drought responsive element binding”) transkripsiyon faktörleri bulunur. Ayrıca, hem ABA bağımlı hem de ABA bağımsız yolda, NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transkripsiyon faktörleri görev alır.

Diziye özgü olan transkripsiyon faktörleri (TF), hedef genin promotörlerindeki DRE/CRT, ABRE gibi cis-etkili (aynı etkili) elementlere özgün olarak bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonu aktive veya inhibe eder. Bitkilerin tuz stresine verdikleri yanıtta yer alan MYC/MYB, AREB/ABF, NAC, CBF, DREB, ERF ve WRKY transkripsiyon faktörlerinin etkilişimde buldukları cis-etkili elementler Çizelge 1.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Bitkilerin tuz stresine verdikleri yanıtta yer alan önemli TF’lerin etkilişimde buldukları cis-etkili elementler

TF Ailesi	Cis-etkili (aynı etkili) elementler	
	İsim	Kor DNA dizisi
MYC/MYB	MYCRS/MYBRS	A/TAACCA ve C/TAACG/TG
AREB/ABF	ABRE	ACGTGGC
NAC	NACRS	TCNNNNNNACACGCATGT
CBF	CRT	TGGCCGAC
DREB	DRE	TACCGACAT
ERF	GCC kutusu	AGCCGCC
WRKY	W kutusu	TTGACC/T

Abiyotik stresle ilişkili birçok gen ve transkripsiyon faktörü farklı bitki türlerinde tanımlanmıştır (Agarwal ve diğ., 2013). Transkripsiyon faktörlerinden ERF (“ethylene responsive factor”), abiyotik ve biyotik streslere yanıtta rol oynamakta olup yaklaşık 124 ERF proteini *Arabidopsis* bitkisinde tanımlanmıştır (Zhou ve diğ., 2010; Riechmann ve diğ., 2000). DREB (“dehydration responsive element binding”) genleri, AP2/ERF (APETALA2/EREBP) TF ailesinin bir üyesidir. ABA bağımsız stres yanıt genleri, özgün 5'-TACCGACAT-3' nükleotid dizisine sahip olan DRE (“dehydration-responsive element”) elementlerine bağlanan DREB proteinleri tarafından düzenlenirler. İlk defa kuraklıktan sorumlu *rd29A* geninin promotöründe tanımlanan DRE elementi, dehidrasyon ve yüksek tuzluluk koşullarında *rd29A* geninin hızlı bir şekilde ekspresyonunu sağlamaktadır (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 1994). Korunmuş nükleotid dizisine sahip olan CRT (“C-repeat responsive element”) elementi, soğuk indüklemeli *cor15a* geninde tanımlanmıştır (Baker ve diğ., 1994).

DREB1 ve DREB2 transkripsiyon faktörleri DRE'ye bağlanarak DRE elementini taşıyan haberci (reporter) genin transkripsiyonunu sağladıktan sonra transkripsiyon faktörlerine ait mRNA molekülleri stres etkisiyle aktif hale gelerek hücrede yüksek seviyede birikmeye başlar (Kizis ve diğ., 2001). *Arabidopsis*'te DREB1'in DREB1A (CBF3), DREB1B (CBF1), DREB1C (CBF2), DREB1D (CBF4) olmak üzere 4 tane homologu tanımlanmışken, DREB2'nin DREB2A ve DREB2B olmak üzere 2 adet homologu tanımlanmıştır. CBF4/DREB1D hariç DREB1 genlerinin ekspresyonları düşük sıcaklıkla artarken, DREB2 genlerinin ekspresyonlarının tuz, kuraklık ve soğuk stresi altında indüklendiği belirtilmiştir (Liu ve diğ., 1998; Nakashima ve diğ., 2000; Dubouzet ve diğ., 2003). CBF4/DREB1D geninin ekspresyonunun ise soğukla indüklenmediği, kuraklık ve ABA uygulamasına verilen yanıtta biriktikleri gösterilmiştir (Haake ve diğ., 2002). Birçok CBF/DREB genlerinin pirinç (Matsukura ve diğ., 2010), buğday (Egawa ve diğ., 2006), mısır (Qin ve diğ., 2007), soya fasulyesi (Chen ve diğ., 2007) ve arpa (Choi ve diğ., 2002) bitkilerinde farklı streslere cevap verdiği belirtilmiştir.

Hem ABA bağımlı hem de ABA bağımsız yolda görev almakta olan NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transkripsiyon faktörleri bitki gelişiminde, patojene karşı cevapta ve tuz toleransında rol oynayan çeşitli genlerin aktivasyonunda görev alırlar (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007). NAC transkripsiyon faktörlerinin N terminal ucunda bulunan yaklaşık 150 aminoasitlik yüksek oranda korunmuş domen bölge NAM ("no apical meristem"), ATAF1 ("*Arabidopsis* transcription activation factor") ve CUC2 ("Cup-shaped cotyledon") genlerinde de bulunmaktadır. N-terminal ucundaki NAC domeni HTH ("helix turn helix") yapısı oluşturarak hedef DNA'ya bağlanmada görevliken, C-terminal bölgesi yüksek oranda çeşitlilik göstermekte olup transkripsiyonel aktivasyondan sorumludur (Olsen ve diğ., 2005). Genomdaki NAC sayısı farklı bitkilerde değişiklik göstermekte olup arpada 48, pirinçte 140, *Arabidopsis*'te 105 ve domateste 40 NAC aile üyesi belirtilmiştir (Fang ve diğ., 2008; Huang ve diğ., 2013; Ooka ve diğ., 2003).

Yüksek bitkilerde çok sayıda geni içeren en geniş transkripsiyon faktörü ailelerinden birisi olan MYB'ler ("Myeloblastosis") N-terminal ucunda yüksek derece korunmuş MYB domenleri ile karakterizedir. MYB domenleri 50-53 aminoasitlik mükemmel olmayan tekrarlardan oluşmakta olup tekrar sayısına göre birli (R1 MYB), ikili (R2R3 MYB) ve üçlü (R1R2R3 MYB) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. MYB proteinlerinin C-terminal ucu transkripsiyonel aktivasyondan



sorumlu olup farklı MYB proteinlerinde yüksek oranda çeşitlilik göstermektedir. Bitkilerde bulunan MYB proteinlerinin çoğu ikili tekrardan (R2R3) oluşan DNA'ya bağlanma domenlerine sahiptir (Liu ve diğ., 2014). *Arabidopsis*'te bulunan 198 MYB proteinin 126 tanesinin R2R3 MYB tipte olduğu belirtilmiştir (Chen ve diğ., 2006). Ayrıca, MYB genlerinin çoğunun ekspresyonunun farklı stres yanıtlarında farklı fonksiyonlara sahip olduğu gözlemlenmiştir.

## 1.6. WRKY Transkripsiyon Faktörleri

WRKY proteinleri çok sayıda üye barındıran ve bitkilere özgü olan korunmuş transkripsiyon faktörleri ailesidir (Rushton ve diğ., 2010). Bu aile üyelerinin N-terminal ucunda DNA'ya bağlanmadan sorumlu olan 60 amino asitlik yüksek oranda korunmuş WRKYGQK motifini içeren bir ya da iki tane WRKY domeni bulunmaktadır. WRKY proteinlerinin C-terminal ucunda ise C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ya da C<sub>2</sub>HC yapısında bir çinko parmak motifi bulunur (Ülker ve Somssich, 2004). WRKYGKK ve WRKYGEK'yi içeren WRKY motifleri, ortak bir W(R/K)(K/R)Y motifinin varlığını önermektedir.

ABA sinyalinde görev alan ABF, CO47 ve RD29A gibi çok iyi karakterize edilmiş genler WRKY transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerindedir (Rushton ve diğ., 2012). WRKY transkripsiyon faktörlerinin çoğunluğunda WRKYGQK domenleri dayanıklılıkla ilgili olan genlerin promotör bölgelerinde bulunan "W-box" olarak da bilinen TTGACC/T kor DNA dizisine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Rushton ve diğ., 2010). *Arabidopsis*'te WRKY4'ün WRKY domeninin C terminal bölgesinin NMR ("nükleer manyetik rezonans") analiz sonucuna göre, korunmuş WRKYGQK dizisinin, doğrudan DNA'ya bağlanma bölgesini içerdiği belirtilmiştir (Yamasaki ve diğ., 2005).

WRKY domenlerinin sayısı ve çinko-parmak motiflerinin özellikleri baz alınarak, WRKY proteinleri ailesi dört ayrı grup içerisinde sınıflandırılmaktadır (Eulgem ve diğ., 2000; Mingyu ve diğ., 2012). Grup I proteinleri iki WRKY domeni ve tipik olarak bir C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak motifi içermektedir. Grup II proteinleri tek bir WRKY domeni ve tipik olarak bir C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak motifine sahiptir. Ayrıca, kısa korunmuş yapısal motiflerin varlığına bağlı olarak a-e alt gruplarına bölünmektedir. Grup III proteinleri, tek bir WRKY domeni taşımaktadır fakat çinko parmak motifleri

C<sub>2</sub>HC yapısı şeklindedir. Grup IV proteinleri ise WRKY motifi içermektedir fakat tam bir çinko parmak motifine sahip değildir.

Gen duplikasyonları WRKY genlerinin büyümesinde önemli rol oynamakta olup yeni WRKY genlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Ramamoorthy ve diğ., (2008) yaptıkları araştırmada, pirinçte WRKY gen lokuslarının % 80'inin duplikasyon bölgelerinde bulunduğu belirtilmiştir. WRKY proteinlerinin evrim boyunca farklı zamanlarda ortaya çıktıkları bilinmektedir. Grup I ve II proteinlerinin çoğu üyesinin monokot ve dikotların ayrılmasından önce ortaya çıktığı, grup III WRKY proteinlerinin ise daha sonraki bir evriminin olduğu tahmin edilmektedir (Wu ve diğ., 2005b). Tatlı patatesten (*Ipomoea batatas*) ilk WRKY proteini SPF1 klonlanmıştır (Ishiguro ve diğ., 1994). Ayrıca, WRKY genleri arpa (Sun ve diğ., 2003, Xie ve diğ., 2007), tütün (*Nicotiana tabacum*) (Hara ve diğ., 2000), buğday (*Triticum aestivum*) (Sun ve diğ., 2003) gibi birçok bitkide de klonlanmıştır.

Mangelsen ve diğ., (2008) yaptıkları araştırmada *Hordeum vulgare*'de bulunan WRKY proteinlerin, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* genomlarında ortologları olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1.3). *HvWRKY* proteinleri, *AtWRKY* ve *OsWRKY* ortologları arasında sadece dizi benzerliği değil, aynı zamanda ekspresyon modellerinde de benzerlik göstererek ekspresyon düzeyiyle ilgili bilgi sağlamaktadır. Bulgular, monokot ve dikot bitkileri arasındaki çeşitlenmenin, WRKY transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonlarının farklılaşmasından sonra meydana geldiğini göstermektedir.

**Çizelge 1.3.** Ekspresyonu incelenen *HvWRKY*'lerin *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa*'daki ortologları

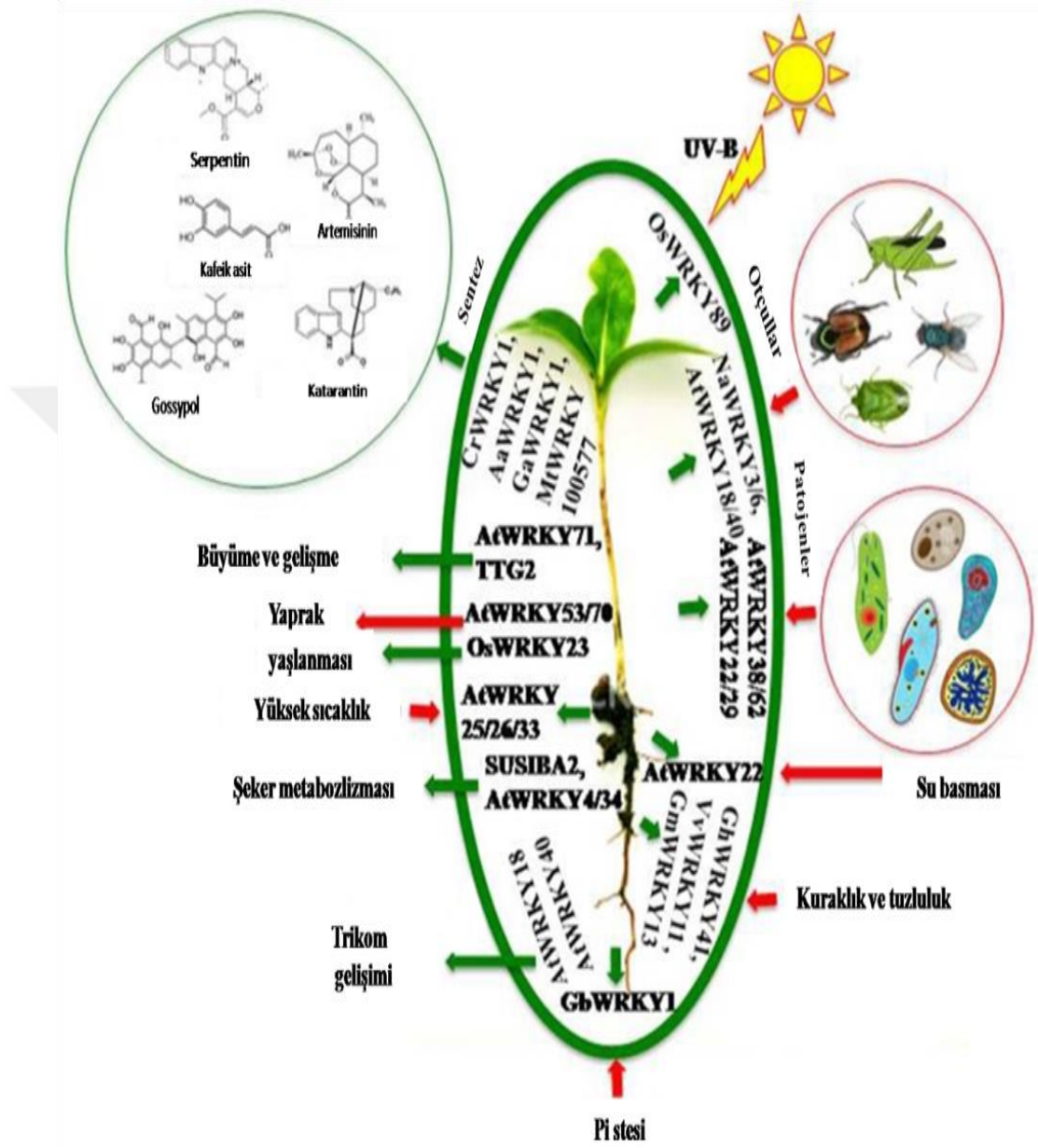
<i>HvWRKY</i>	Erişim numarası	WRKY grup	<i>AtWRKY</i> ortolog	<i>OsWRKY</i> ortolog
<i>HvWRKY6</i>	EF488106	I	1	82
<i>HvWRKY9</i>	DQ840408	IIId	7	-
<i>HvWRKY24</i>	DQ863108	I	30,41,53	63
<i>HvWRKY25</i>	DQ863109	III	30,41,53	81
<i>HvWRKY33</i>	DQ863117	III	-	46
<i>HvWRKY34</i>	DQ863118	III	-	46
<i>HvWRKY41</i>	DQ863124	I	-	-
<i>HvWRKY42</i>	DQ863125	I	2	80
<i>HvWRKY46</i> [SUSIBA2]	AY323206	I	20	78

Abiyotik ve biyotik strese verilen yanıtta WRKY transkripsiyon faktörleri anahtar düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Rushton ve diğ., 2010; Eulgem ve diğ., 2000; Zhou ve diğ., 2011). WRKY proteinleri savunma yanıtında pozitif ya da negatif düzenleyici olarak işlev görebilmektedir. Birçok rapor, WRKY proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitelerinin diğer bir deyişle WRKY üyelerini kodlayan genlerin ekspresyonlarının arttığını göstermektedir (Fowler ve Thomashow, 2002; Singh ve diğ., 2002; Seki ve diğ., 2002). Marè ve diğ. (2004) yaptıkları araştırmada, arpa bitkisinde düşük seviyede bulunan WRKY38 mRNA miktarının soğuk ve kuraklık stresiyle arttığını, 30 dakika kuraklık stresinde en yüksek miktara ulaşıldığını, ancak daha uzun süreli muamelelerin gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir.

*Arabidopsis* bitkilerine *GmWRKY21* ve *GmWRKY54* genleri aktarıldığında bu genlerin ekspresyonlarının artması sonucu tuza karşı toleransın arttığı belirtilmiştir (Zhou ve diğ., 2008). Wang ve diğ., (2010) yaptıkları araştırmada, sekonder hücre duvarı olmayan *Arabidopsis*'in korteks ve öz hücrelerinde WRKY12 geninin transkriptlerinin fazla miktarda bulunduğunu ve WRKY12'nin sekonder hücre duvarının biyosentezini baskıladığını bildirmişlerdir. Bulguların sonucunda bu genin mutantlarında, sekonder hücre duvarının biyosentezinde ve bitki biyokütlesini arttıran moleküllerin (selüloz, lignin, ksilan) ektopik birikiminde görev yapan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir.

Savunma yanıtının yanı sıra WRKY transkripsiyon faktörleri bitkilerde farklı çevresel koşullar altında bitki büyümesi ve gelişmesi, yaprak yaşlanması ve trikome gelişimi gibi çoklu rollere sahiptir ve farklı streslere yanıt olarak buldukları bitkilere dayanıklılık veya direnç sağlamaktadır (Şekil 1.6) (Phukan ve diğ., 2016). Pirinçte (*Oryza sativa*) WRKY89 bitkiyi zararlı UV radyasyonundan korumaktadır. Tütünde (*Nicotiana attenuata*) WRKY3/6 ve *Arabidopsis thaliana*'da WRKY18/40 otçullara; *AtWRKY22/29/38/62* patojen saldırısına karşı direnç sağlamaktadır. *AtWRKY22* su basmasına; Pamukta (*Gossypium hirsutum*) WRKY41, üzümde (*Vitis vinifera*) WRKY11 ve mısırdaki (*Glycine max*) WRKY13 kuraklığa ve tuza karşı dayanıklılık sağlamaktadır. *Gossypium barbadense*'de WRKY1 fosfat eksikliğinde bitkiye yardımcı olmaktadır. *AtWRKY18/40* trikome gelişiminde; SUSIBA2 ve *AtWRKY4/34* şeker metabolizmasında rol oynamaktadır. *AtWRKY25/26/33* termotoleransı sağlamaktadır. *AtWRKY53/70* yaprak yaşlanmasını tetiklerken, *OsWRKY23* yaprak

yaşlanmasını önlemektedir. *AtWRKY71*, TTG2 büyüme ve gelişmeyi sağlarken; *Catharanthus roseus*, *Artemisia annua* ve *Gossypium arboreum*'da WRKY1, *Medicago truncatula*'da WRKY'ler sekonder metabolizmaya katılmaktadır.



Şekil 1.6. WRKY'lerin bitkilerde farklı çevresel koşullar altında çoklu rolü (Yeşil oklar pozitif veya yararlı bir düzenlemeye işaret ederken, kırmızı oklar negatif veya zararlı düzenlemeleri göstermektedir) (Phukan ve diğ., 2016)

## 2. AMAÇ

Bitkiler yaşamları süresince tuzluluk, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, kimyasal kirlilik gibi çeşitli abiyotik çevresel faktörlere maruz kalmaktadır (Agarwal ve diğ., 2013; Mahajan ve Tuteja, 2005). Ürün verimini sınırlandıran en önemli abiyotik stres kaynaklarından biri olan tuzluluk için ülkemiz ve dünya genelinde hala ortak ve güçlü koruma yaklaşımları geliştirilememiştir.

Arpa, tuza dayanıklı bir tahıl olup üstün genetik ve genomik kaynaklara sahiptir. Bu nedenle, tahıllarda tuza dayanıklılık mekanizmalarının çalışılmasında iyi bir model teşkil etmektedir (Shelden ve diğ., 2016). Moleküler seviyede, strese yanıt veren ve strese dayanıklı genlerin indüklenmesi bitkilerin elverişsiz çevresel koşullara adapte olmasına katkıda bulunur (Chen ve diğ. 2012). Bu anlamda arpa çeşitlerinin tuz stresine verdiği yanıtın fenotipik ve moleküler düzeyde analiz edilmesi, tahıl yetiştiriciliği açısından önemlidir.

Stresle ilişkili genlerin indüksiyonu çoğunlukla transkripsiyonel seviyede meydana gelir. WRKY transkripsiyon faktörleri bitkilerde düzenleyici proteinlerin büyük bir ailesini teşkil etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda WRKY transkripsiyon faktörlerinin çeşitli abiyotik stres yanıtlarında ve birçok gelişimsel ve fizyolojik süreçlerde görev aldığı gösterilmiştir (Eulgem ve diğ., 2000; Zhou ve diğ., 2011).

Bu tez çalışmasında, öncelikle Türkiye’de tarımı yapılan 15 arpa çeşidinin (*Hordeum vulgare* L. cvs. Avcı 2002, Burakbey, Cervoise, Clarica, Epona, Escadre, Gazda, Karatay 94, Lord, Oliver, Premium, Ramata, Tarm 92, Tokak 157/37, Yesevi 93) farklı konsantrasyonlardaki (%0,5 ve %1,0) tuz stresine dayanıklılık derecelerinin belirlenmesi ve ardından dayanıklı ve hassas olarak seçilen çeşitlerde *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY25*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34*, *HvWRKY41*, *HvWRKY42* ve *HvWRKY46* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikliklerin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlandı.

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak yerel ticari arpa çeşitlerinden 2 sıralı Burakbey, Clarica, Gazda, Karatay 94, Premium, Tarm 92, Tokak 157/37 ve Yesevi 93 ile 6 sıralı Avcı 2002, Cervoise, Epona, Escadre, Lord, Oliver ve Ramata kullanıldı. Avcı 2002, Burakbey ve Tarm 92 tohumları Ankara Tarla Bitkileri Mrk. Araş. Ens. Müd., Epona ve Ramata tohumları Alfa Tohum Tarım Gıda İnş. Hayv. Paz. San. Tic. Ltd. Şti.; Cervoise, Clarica, Escadre, Gazda, Karatay 94, Lord, Oliver, Premium, Tokak 157/37 ve Yesevi 93 tohumları İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tohum Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı. Çalışmada kullanılan arpa çeşitlerinin morfolojik özellikleri Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan arpa çeşitleri ve özellikleri

Arpa Çeşidi	Kısaltma	Özellikleri
Avcı 2002	Av	Başakları 6 sıralı, kışlık, kılçıklı ve orta uzun boyludur. Beyaz homojen daneli, geniş koyu yapraklı, 95-105 cm bitki boyundadır. Yatmaya dayanıklı, suya ve azota tepkisi çok iyi, yüksek kardeşlenme ve biyolojik verime sahip, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilir bir çeşittir. Yemlik kalitesi iyidir.
Burakbey	Bu	Başakları 2 sıralı, kışlık, kılçıklı, uzun ve düzgündür. Beyaz ve iri daneli, geniş uzun yapraklı ve uzun boylu bir çeşittir. Sağlam saplı, yatmaya dayanıklı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, suya ve azota tepkisi iyi, eş zamanlı olgunlaşmaya sahip, başaklanma zamanı orta, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilen, yüksek verimli bir çeşittir. Yemlik kalitesi iyidir.
Cervoise	Ce	Başakları 6 sıralı, kışlık, orta uzun boylu ve sıktır. Saplar 85-95 cm uzunluğundadır. Kalın saplı, koyu yeşil yaprak yapısına sahiptir. Daneleri dolgun, orta büyüklükte ve beyaz renklidir. Kışlık gelişme tabiatlıdır. Kısa boyludur ve yatmaya karşı oldukça dayanıklıdır. Başaklanma zamanı erkenci olup gübreye reaksiyonu çok iyidir. Maltlık kalitesi çok iyidir.
Clarica	Cl	Başakları 2 sıralı, kışlık ve orta uzun boyludur. Dane yapısı dolgun ve iridir. Başaklanma zamanı orta erken olup yatmaya dayanıklıdır. Soğuğa karşı toleranslıdır.
Epona	Ep	Başakları 6 sıralı, kışlık, orta uzunlukta, uzun kılçıklı ve tam eğik görünümündedir. Bundan dolayı başak kırılması görülmez. Danesi orta irilikte, açık sarı renkte ve homojen yapıdadır. Soğuklara dayanıklılığı iyidir.
Escadre	Es	Başakları 6 sıralı, kışlık, başak boyu kısa ve oldukça sıktır. Bitki boyu 105-115 cm arasında değişmektedir. Daneleri orta büyüklüktedir. Başaklanma zamanı erken olup soğuğa karşı toleranslıdır. Yatmaya dayanıklıdır.

**Çizelge 3.1. (devam)** Çalışmada kullanılan arpa çeşitleri ve özellikleri

Arpa Çeşidi	Kısaltma	Özellikleri
Karatay 94	Ka	Başakları 2 sıralı, beyaz renkli ve kılçıklıdır. Kurağa dayanıklıdır. Yatmaya hassastır. Çinko eksikliği ve bor fazlalığına orta dayanıklıdır.
Gazda	Ga	Hırvatistan orijinli olup başakları 2 sıralı, kışlık ve orta boyludur. Daneleri orta büyüklüktedir. Başaklanma zamanı erken-orta olup soğuğa karşı toleranslıdır. Yatmaya dayanıklıdır. Yemlik kalitesi iyidir.
Lord	Lo	Hırvatistan orijinli olup başakları 6 sıralı, kışlık ve orta uzun boyludur. Daneleri orta büyüklüktedir. Başaklanma zamanı geç olup soğuğa karşı toleranslıdır. Yemlik kalitesi iyidir.
Oliver	Ol	Hırvatistan orijinli olup başakları 6 sıralı, kışlık ve orta boyludur. Daneleri orta büyüklüktedir. Erkenci bir çeşit olup yatmaya dayanıklıdır. Yemlik kalitesi iyidir.
Premium	Pr	Başakları 2 sıralı, kışlık, ince kılçıklı ve orta boyludur. Daneleri sarı renkli ve enine dolguncadır. Çok erkenci bir çeşittir olup soğuğa dayanıklıdır. Sert ve dayanıklı sap yapısı sayesinde yatmaya dayanıklıdır. Yüksek verimlidir. Kullanılan gübre miktarına bağlı olarak yemlik veya maltlık olarak da kullanılabilir.
Ramata	Ra	Fransız orijinli olup başakları 6 sıralı, kışlık ve uzun kılçıklıdır. Orta uzunlukta ve tam eğik görünümündedir. Bundan dolayı başak kırılması görülmez. Orta uzun boyludur. Danesi orta irilikte, açık sarı renkte ve homojen yapıdadır. Soğuklara dayanıklılığı iyi olup yatmaya karşı dayanıklıdır. Yemlik kalitesi iyidir.
Tarm 92	Ta	Başakları 2 sıralı, kışlık, kılçıklı ve uzundur. Bitki boyu 90-100 cm uzunluğundadır. Daneleri kavuzlu ve beyaz olup yaprakları ince uzundur. Yatmaya ve kuraklığa dayanıklıdır. Verimi yüksek, başaklanma zamanı orta-erkencidir. Yemlik kalitesi iyidir.
Tokak 157/37	To	Başakları uzun 2 sıralı, seyrek ve paralel kılçıklı arpa çeşididir. Bitki boyu 90-100 cm'dir. Daneleri açık saman sarısı rengindedir, kışa ve kurağa az dayanıklıdır. Başaklanma zamanı orta erkencidir. Maltlık kalitesi iyi olup adaptasyon kabiliyeti yüksektir.
Yesevi 93	Ye	Başakları 2 sıralı, kışlık, kılçıklı, uzun ve yarı dik görünümündedir. Bitki boyu 90-100 cm uzunluğundadır. Yatmaya ve kuraklığa dayanıklıdır. Başaklanma zamanı erkencidir. Yetiştirildiği ekolojije göre yemlik veya maltlık olarak kullanılabilir.

### 3.2. Çimlenme Aşamasında Kullanılan Solüsyonlar

Fizyolojik analiz için gerekli solüsyonlar Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.2.** Çimlenme aşamasında kullanılan solüsyonlar

Solüsyonlar	İçeriği	Markası
Sterilizasyon Solüsyonu	%0,64 Sodyum Hipoklorit (Çamaşır Suyu)	Domestos
	%10 Etanol	(Sigma-Aldrich)
Tuz Solüsyonları	%0,5 ve %1,0'lik NaCl	(Sigma-Aldrich)

### 3.3. Primerler

Gen ekspresyonu incelenecek genlere özgün tasarlanan primerler Çizelge 3.3'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.3.** qPCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri

Primerin adı	Yönü (5'-3')	Erişim Numarası	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Amplikon (bp)
<i>Hv</i> AKTIN_F	CGTGTTGGATTCTGGTGATG	AY145451.1	60	208
<i>Hv</i> AKTIN_R	AGCCACATATGCGAGCTTCT			
<i>Hv</i> WRKY6_F	CGAAGGTCATTGTGCTGTTG	EF488106.1	60	101
<i>Hv</i> WRKY6_R	CTGTACCCATCGCTCATCTT			
<i>Hv</i> WRKY9_F	AGGTTTCAGCTCATGCACCA	DQ840408.1	60	106
<i>Hv</i> WRKY9_R	TGACACCCTTGCCACCACTA			
<i>Hv</i> WRKY24_F	CATGAGCAGAGCACCATCT	DQ863108.1	60	110
<i>Hv</i> WRKY24_R	GACATCATCCGCACCTGTAT			
<i>Hv</i> WRKY25_F	CATCATGGAGGTCCAAGCAA	DQ863109.1	60	114
<i>Hv</i> WRKY25_R	ACCCGACAATGTCCTTCTGG			
<i>Hv</i> WRKY33_F	CTGCAACTTTCCAGGTA	DQ863117.1	60	96
<i>Hv</i> WRKY33_R	GGGTCGCTGTGATCTTCT			
<i>Hv</i> WRKY34_F	AACCAACAGAGCGACATAGG	DQ863118.1	60	98
<i>Hv</i> WRKY34_R	CTGTCCGGTCTCCATCTTGAC			
<i>Hv</i> WRKY41_F	AGGAAGAGGGAGATGAGCA	DQ863124.1	60	94
<i>Hv</i> WRKY41_R	TCGGCATCACCAACATCTC			
<i>Hv</i> WRKY42_F	AGTGAAGGACAGTGCTGATG	DQ863125.1	60	104
<i>Hv</i> WRKY42_R	GGTCTTCCTCGTTCTCTTCC			
<i>Hv</i> WRKY46_F	ATTCGCCTGGTATGGTTGAG	AY323206.1	60	106
<i>Hv</i> WRKY46_R	TCCTCCTCCTCAGTAGCATC			

### 3.4. Kullanılan Kitler

Moleküler analizlerde kullanılan kitler Çizelge 3.4'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.4.** Moleküler analizlerde kullanılan kitler

Kitler	Markası
Total RNA İzolasyon Kiti: NucleoSpin® Total RNA İzolasyon Kit	(Macherey-Nagel)
cDNA Sentez Kiti: Protoscript® First Strand cDNA Synthesis Kit	(BioLabs)
qPCR Kiti: SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	(Bioline)

### 3.5. RNA İzolasyonunda Kit İçeriğinde Yer Almayan Kimyasallar

RNA izolasyonunda kit içeriğinde yer almayan kimyasallar Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.



**Çizelge 3.5.** RNA izolasyonunda kit içeriğinde yer almayan kimyasallar

Kimyasallar	Markası
$\beta$ -Merkaptoetanol	(Merck)
%70'lik Etanol	(Sigma-Aldrich)

### 3.6. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Tampon ve Kimyasallar

Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan tampon ve içeriği Çizelge 3.6'da, kimyasallar ise Çizelge 3.7'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.6.** Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan tampon ve içeriği

Tampon	İçerik	Markası
TAE Tamponu	42 g Tris Bazı	(Sigma-Aldrich)
	57,1 ml Glasiyal Asetik Asit	(Merck)
	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)	(Sigma-Aldrich)

**Çizelge 3.7.** Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Markası
Agaroz	(Sigma-Aldrich)
UltraPure™ Etidyum Bromür (EtBr), 10 mg/ml	(Thermo Fisher Scientific)
6X Elektrofrez Yükleme Boyası	(Thermo Fisher Scientific)

### 3.7. Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.8'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.8.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Markası
Porselen Havan ve Havaneli	(Isolab)
Cam Petri	(Isolab)
Filtre Kağıdı	(Isolab)
Pens	(Isolab)
Spatül (İki Ucu Düz)	(Isolab)
Parafilm	(Bemis)
15 ml, 25 ml, 50 ml Falkon	(Isolab)
250 ml Erlen	(Isolab)
50 ml, 500 ml, 1000 ml Mezür	(Isolab)
250 ml, 500 ml, 1000 ml Borosiliat Cam-Şeffaf-Vida Kapaklı Şişe	(Isolab)
Beher	(Isolab)
10 mL Corning® Costar® Stripette® Serolojik Pipet	(Sigma-Aldrich)
Mikropipet uçları	(Isolab)

**Çizelge 3.8. (devam)** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Markası
0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Mikrosantrifüj Tüp	(Axygen)
0,2 ml PCR Tüpü	(Axygen)
Rack	(İsolab)
PCR <sup>®</sup> Mikroplate	(Axygen)
Eppendorf PCR Soğutucu	(Sigma-Aldrich)
Platemax <sup>®</sup> Ultra Clear Sealing Film	(Axygen)

### 3.8. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.9’da gösterilmektedir.

**Çizelge 3.9.** Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazlar	Markası
Laminar Kabin	(Faster Safe Fast Classic)
TK 252 İklimlendirme Kabini	(Nüve)
FN 500 Kuru Havalı Stelizatör	(Nüve)
Barnstead™ Smart2Pure™ Su Arıtma Sistemi	(Thermo Fisher Scientific)
Dik Tip Otoklav	(BES)
Azot Tankı	(Thermo Fisher Scientific)
-80°C Buzdolabı	(Haier-Biomedikal)
-20 °C Buzdolabı	(Beko)
AF80 Kar Buz Makinesi	(Scotsman)
MD592 Süper Mikrodalg	(Arçelik)
Finnpipette™ Değişken Hacim Tek Kanallı Pipet	(Thermo Fisher Scientific)
Finnpipette™ Novus Elektronik Tek Kanallı Pipet	(Thermo Fisher Scientific)
S1 Pipet Filler	(Isolab)
Hassas Terazî	(Isolab)
Vorteks	(Heidolph Reax Top)
Universal 320 R Masaüstü Santrifüj	(Hettich)
mySPIN™ 6 Mini Spin	(Thermo Fisher Scientific)
Multiskan™ GO Mikroplate Spektrofotometre	(Thermo Fisher Scientific)
Elektroforez Tankı	(Cleaver Scientific)
Elektroforez Güç Kaynağı EC250-90	(Thermo Fisher Scientific)
Jel Görüntüleme Cihazı GEN-BOX-imagER CFx	(ER Biyotek)
Thermal Cycler T100™ PCR	(BioRad)
CFX Connect™ Real-Time PCR Belirleme Sistemi	(BioRad)

## **4. YÖNTEMLER**

### **4.1. Fizyolojik Analizler**

Arpa çeşitlerinin (Av, Bu, Ce, Cl, Ep, Es, Ga, Ka, Lo, Ol, Pr, Ra, Ta, To ve Ye) farklı konsantrasyonlardaki (%0,50 ve %1,00) tuz stresine yanıtı fenotipik düzeyde araştırıldı. Kontrol bitkilerinin (%0) fizyolojik analizlerinin sonuçları ile deney gruplarının (%0,50 ve %1,00) sonuçları karşılaştırılarak, dayanıklı ve hassas çeşitler belirlendi.

#### **4.1.1. Arpa Tohumlarının Çimlendirilmesi**

Arpa çeşitlerine ait tohumlar % 0,64 sodyum hipoklorit ve % 10 etanol içeren çözeltide 5 dakika bekletilip, üç kez steril distile su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu yapıldı. Arpa çeşitlerine ait tohumlar 9 cm çapındaki steril cam petrielerde, her petride 10 tane olacak şekilde, steril kurutma kağıtları arasına yerleştirildi. Kurutma kağıtlarına kontrol grubu için distile su, stres grupları için % 0,5 ile % 1,0'lik NaCl solüsyonlarından 5'er ml eklenerek çimlendirme başlatıldı. Petrieler 25 °C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış iklimlendirme kabinde 10 gün inkübe edilerek, tohumların çimlenmesi sağlandı ve 10. günün sonunda bitkilerin yapraklarından örnekleme yapıldı. Yapraklar ani olarak sıvı azotla dondurulup -80 °C'de muhafaza edildi ve deney 2 biyolojik tekrarlı olarak 2 kez yapıldı.

#### **4.1.2. Tuz Stresinin Fenotipe Etkisinin Belirlenmesi**

Tohumların çimlenme sürecinde büyüme karakteristikleri Çizelge 4.1'de verilen skalaya göre belirlendi (Badridze ve diğ., 2009). Bu kapsamda, 10. günün sonunda çimlenen tohumların sürgün uzunlukları ölçülüp, kök sayısı ve morfolojisi değerlendirildi.

**Çizelge 4.1.** Çimlenme sürecinde büyüme karakteristiklerinin skorlanması

Skor	Açıklama
0	Hiç çimlenme yok
1	Bir adet küçük kök çıkmış ya da zayıf kök yapısı var
2	2 adet ya da biraz daha fazla kökler uzamış ve uçları kahverengi
3	3 adet ya da biraz daha fazla kökler uzamış ve uçları kahverengi
4	Yeşil sürgün var ve 10 mm'den kısa
5	Yeşil sürgün var ve 10-25 mm arasında
6	İlk yaprak çıkmış koleoptilden 1 cm ileride
7	İlk yaprak çıkmış koleoptilden 3 cm ileride
8	İlk yaprak çıkmış koleoptilden 6 cm ileride
9	İlk yaprak çıkmış koleoptilden 6 cm'den daha fazla ileride

## 4.2. Biyoinformatik Çalışmalar

NCBI veritabanında arpada tanımlanmış olan 50 tane *HvWRKY* (2-61) transkripsiyon faktörü (TF) arasından literatür taraması ile daha önce tuz stresi ile ilişkisi tanımlanmamış olan aday TF'ler (*HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY25*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34*, *HvWRKY41*, *HvWRKY42*, *HvWRKY46*) seçildi (EK-1) (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2018).

## 4.3. Gen Ekspresyon Analizleri

Fizyolojik analiz sonucuna göre seçilen dayanıklı (Avcı 2002 ve Premium) ve hassas (Escadre) arpa çeşitlerinin yapraklarından total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından cDNA sentezi yapılarak *HvWRKY* genlerin ekspresyonu qPCR analizleriyle belirlendi.

### 4.3.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu sırasında olası RNaz kontaminasyonunu önlemek amacıyla tüm malzemeler otoklavlandı. RNA izolasyonu için Macherey-Nagel Nucleospin RNA kiti kullanıldı ve izolasyon kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

1. İzole edilecek çeşide ait yapraklar (30 mg) havanda sıvı azot yardımıyla ezilerek toz haline getirildi ve 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Tüpe 350 µl RA1 tamponu ve 3,5 µl β-merkaptolanol eklendi ve vortekslenerek karışması sağlandı.
3. Karışım filtrasyon kolonuna yüklendi ve 11, 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

4. Filtre kolonu atıldı ve toplama tüpünde kalan karışım üzerine 350 µl % 70'lik etanol eklendi ve 5 kez pipetaj yapılarak karışımı sağlandı.
5. Karışım RNA kolonuna yüklendi ve 11, 000 x g'de 30 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNA kolonu yeni bir toplama tüpüne koyuldu.
6. RNA kolonuna 350 µl MDB eklendi ve 11, 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Steril bir tüpte rDNaz reaksiyon karışımı hazırlandı (Her bir örnek için 10 µl rDNaz I ile 90 µl rDNaz reaksiyon tamponu). Bu karışımdan 95 µl alınarak RNA kolonunun filtresini tamamen kaplayacak şekilde örneklere uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. 1.Yıkama: RNA kolonuna 200 µl RA2 tamponu eklendi ve 11, 000 x g'de 30 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNA kolonu yeni bir toplama tüpüne koyuldu.
9. 2.Yıkama: RNA kolonuna 600 µl RA3 tamponu eklendi ve 11, 000 x g'de 30 sn. santrifüj edildi.
10. 3.Yıkama: RNA kolonuna 250 µl RA3 tamponu eklendi ve 11, 000 x g'de 2 dk. santrifüj edildi. RNA kolonu steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne koyuldu.
11. RNA kolonuna 50 µL RNaz içermeyen distile su eklendi ve 11, 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

#### **4.3.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi**

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıklarının belirlenmesinde Multiskan™ GO Mikroplate Spektrofotometre cihazının microdrop aparatına her bir RNA örneğinden 3'er µl yüklendi. RNA'ların 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. 260 nm'deki 1 absorbans ünitesi tek zincirli RNA'nın 40 µg/ml'sine eşit olduğu için RNA miktarı;  $RNA (\mu g/ml) = A_{260} \times \text{sulandırım katsayısı} \times 40$  formülüne göre hesaplandı. RNA'ların saflıkları ise 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarındaki absorbans oranları ile belirlendi.  $A_{260}/A_{280}$  oranının 1,8–2,1 arasında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir.

#### **4.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Total RNA'nın Sağlamlığının Belirlenmesi**

RNA'ların sağlamlığının belirlenmesi için, RNA'lar %1'lik agaroz jelde görüntüldü. Bu amaçla %1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,5 g agaroz tartılıp 50 ml 1X TAE tamponunda kaynatılarak eritildi. Agaroz jel yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 0,5 µl/ml etidyum bromür ilave edildi. Hazırlanan agaroz

jel, tarağın yerleştirilmiş olduğu yatay elektroforez kasedine döküldü ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca katılaşmaya bırakıldı. Polimerize olan jel, içinde 1X TAE jel tamponu bulunan elektroforez tankına koyuldu. Her bir RNA örneği 1 µl 6X elektroforez yükleme boyası ile karıştırıldı. Ardından örnekler jeldeki kuyucuklara yüklendi ve 70 V akımda 50 dk. yürütülerek sağlamlılığı kontrol edildi.

#### 4.3.4. cDNA Sentezi

qPCR analizini gerçekleştirmek için RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi için Protoscript First Strand cDNA Synthesis Kiti kullanıldı ve sentez, kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Hedef gen ekspresyon değişikliklerinin tespiti için başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması önemlidir. Bu amaçla birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, başlangıç RNA miktarı 1 µg olacak şekilde ayarlandı. 0,2 ml'lik PCR tüplerinde Çizelge 4.2'de verilen miktarlarda kit bileşenleri bir araya getirilerek 70 °C'de 5 dk. inkübe edildi.

**Çizelge 4.2.** cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşenler

RNA	1 µg
Oligo d(T)23VN (50 µM)	2 µl
dH <sub>2</sub> O	Değişken
<b>Toplam hacim</b>	<b>8 µl</b>

Süre bitiminde tüpler buz üzerine alınarak Çizelge 4.3'de verilen miktarlarda kit bileşenleri ilave edildi ve 5 dk. buzda bekletildikten sonra 42 °C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından tüpler 85 °C'de 5 dk. bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. cDNA örnekleri 25 ng/µl olacak şekilde sulandırılarak qPCR'da kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

**Çizelge 4.3.** cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan bileşenler

M-MuLV Reaksiyon Tamponu	10 µl
M-MuLV Enzim Karışımı	2 µl
Total	12 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

#### 4.3.5. Primer Çiftlerinin Tasarlanması

Gen ekspresyon analizi yapılacak olan transkripsiyon faktörlerinin dizileri NCBI veritabanında taranarak erişim numaraları bulundu. qPCR'da kullanılacak primerlerin tasarlanmasında; primerlerin uzunlukları, % GC içeriği, erime sıcaklıkları

(Tm) ve gen ürünlerinin uzunlukları dikkate alındı. Genlere özgü primer çiftleri Primer Quest (idtdna.com/Primerquest/Home/Index) programıyla tasarlandı. Oligo analyzer 3.1 (eu.idtdna.com/calc/analyzer) programı ile primerlerin primer-dimer etkileşimlerine (self-dimer, hetero-dimer) girip girmediği ve saç tokası yapısı oluşturup oluşturmadığı kontrol edildi. Sentezletirilen primerler nükleaz-içermeyen suyla 100 µM olacak şekilde çözündürüldü ve -20 °C’de muhafaza edildi.

#### 4.3.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

*HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY25*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34*, *HvWRKY41*, *HvWRKY42* ve *HvWRKY46* genlerinin ekspresyon analizleri qPCR ile yapıldı. *HvAKTİN* geni referans gen olarak kullanıldı ve gen ekspresyon değişimlerinin analizi SensiFAST™ SYBR® No-ROX kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İlgili cDNA ve primerler kullanılarak hazırlanan bileşenler (Çizelge 4.4) 96 kuyucuklu plakaya konuldu ve plakanın üzeri şeffaf filmle kapatıldı. Plaka, 1500 rpm’de 30 sn. santifüj edildikten sonra CFX Connect™ Real-Time cihazına yerleştirildi.

**Çizelge 4.4.** qPCR’da kullanılan bileşenler

SensiFAST SYBR® Non-ROX Karışımı (2X)	10 µl
İleri primer (10 µM)	0,8 µl
Geri primer (10 µM)	0,8 µl
dH <sub>2</sub> O	5,9 µl
cDNA	2,5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

Her bir örneğe uygun bağlanma ısısı seçilerek Çizelge 4.5’de gösterilen reaksiyon koşullarında SYBR Green kanalında floresans okuma yapılarak analiz edildi.

**Çizelge 4.5.** qPCR’da reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	2 dk	1
Denatürasyon	95	5 sn	40
Bağlanma	58	10 sn	
Uzama	72	10 sn	

qPCR ile elde edilen floresan ışımalar hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleşebileceği gibi özgül olmayan bir üründe olabilir. En son aşamada istenen hedef bölgenin çoğalıp çoğalmadığını anlayabilmek için her örnek için “melting

curve” (erime eğrisi) analizi yapıldı. Erime eğrisi analizi için örnekler 65°C - 95°C arası 2-5 sn/aşama’da 0,5 °C arttırıldı. qPCR verileri CFX Connect™ yazılımı aracılığıyla elde edildi. Karşılaştırmalı Cq yöntemi ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ile ortalama hedef gen kopya sayısı ortalama referans gen (*HvAKT1N*) kopya sayısına oranlanarak örnekler arasındaki ekspresyon ve hedef genlerin göreceli mRNA seviyeleri belirlendi.

#### 4.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin GraphPad Prism (sürüm 5.01) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (“analysis of variance”) (ANOVA) Tukey HSD ile istatistiksel olarak analiz edildi (\* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).



## 5. SONUÇLAR

### 5.1. Fizyolojik Analizler

#### 5.1.1. Tohum Çimlenmesinde Büyüme Karakteristikleri

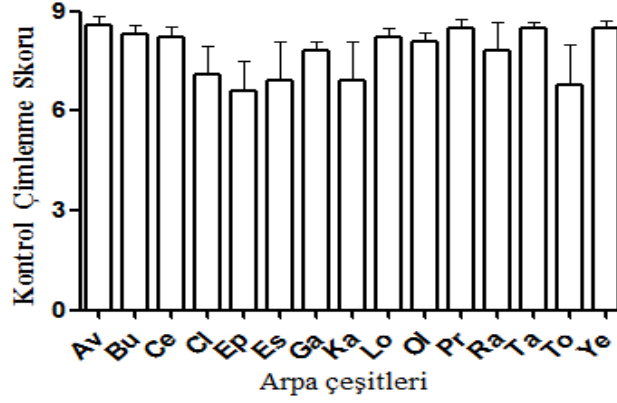
Arpa tohumlarının çimlenme sürecinde büyüme karakteristikleri Çizelge 4.1'de belirtilen skorlamaya göre belirlendi. Analiz edilen tüm arpa çeşitlerinde, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında %1,0'lik NaCl stresi uygulanan tohumlarda sürgün ve kök uzamasının anlamlı derecede baskılandığı görüldü. Çizelge 5.1'de farklı konsantrasyonlarda tohum çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri gösterilmektedir.

**Çizelge 5.1.** Farklı konsantrasyonlarda tohum çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri

Arpa çeşitleri	Fenotipik skor			Kontrole göre fark	
	Kontrol	%0,5'lik NaCl	%1,0'lik NaCl	%0,5	%1,0
Av	8,6 ± 0,2	7,2 ± 0,8	4,7 ± 0,8	1,4	3,9
Bu	8,3 ± 0,2	6,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,3	5,9
Ce	8,2 ± 0,3	5,3 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,9	5,9
Cl	7,1 ± 0,8	5,2 ± 0,4	3,5 ± 0,4	1,9	3,6
Ep	6,6 ± 0,8	3,3 ± 0,5	1,0 ± 0,4	3,3	5,6
Es	6,9 ± 0,9	5,4 ± 0,6	1,1 ± 0,4	1,5	5,8
Ga	7,8 ± 0,2	5,6 ± 0,8	2,0 ± 0,6	2,2	5,8
Ka	6,9 ± 0,9	5,5 ± 0,5	3,4 ± 0,3	1,4	3,5
Lo	8,2 ± 0,2	6,9 ± 0,6	2,7 ± 0,4	1,3	5,5
Ol	8,1 ± 0,2	6,9 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,2	6,7
Pr	8,5 ± 0,2	6,3 ± 0,5	3,9 ± 0,9	2,2	4,6
Ra	7,8 ± 0,6	6,9 ± 0,4	3,2 ± 0,4	0,9	4,6
Ta	8,5 ± 0,1	6,7 ± 0,3	3,1 ± 0,6	1,8	5,4
To	6,8 ± 0,9	4,3 ± 0,6	1,1 ± 0,4	2,5	5,7
Ye	8,5 ± 0,2	6,8 ± 0,8	3,2 ± 0,4	1,7	5,3

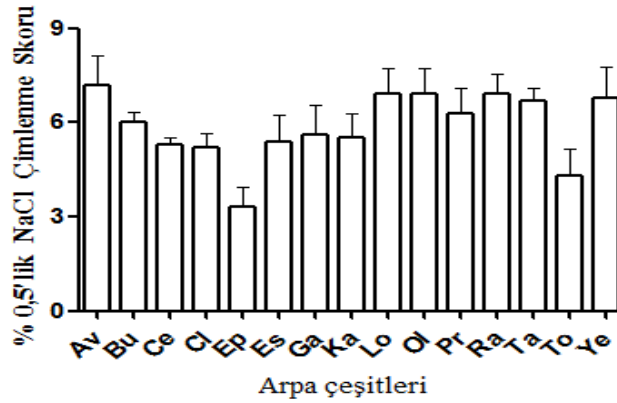
Her bir değer 2 biyolojik tekrarlı 2 deneyin Çizelge 4.1'de gösterilen skalaya göre ortalamasını ve standart hatayı ( $\pm$  SH) göstermektedir.

Tuz stresi uygulanmayan kontrol grubunda arpa çeşitleri arasında büyüme karakteristiği bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görüldü ( $P > 0,05$ ) (Şekil 5.1).



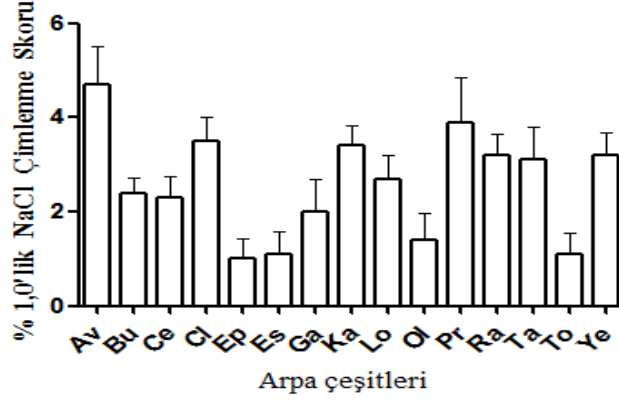
**Şekil 5.1.** Çizelge 5.1’de verilen kontrol değerleri kullanılarak arpa çeşitlerinin çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri bakımından karşılaştırılması (Av:Avcı 2002, Bu:Burakbey, Ce:Cerveoise, Cl:Clarica, Ep:Epona, Es:Escadre, Ga:Gazda, Ka:Karatay 94, Lo:Lord, Ol:Oliver, Pr:Premium, Ra:Ramata, Ta:Tarm 92, To:Tokak 157/37, Ye:Yesevi 93)

%0,5’lik NaCl stresi uygulanan grupta Av ( $7,2\pm 0,8$ ), Lo ( $6,9\pm 0,6$ ), Ol ( $6,9\pm 0,6$ ) ve Ra ( $6,9\pm 0,4$ ) çeşitlerinin sürgün uzunluklarının, Ep ( $3,3\pm 0,5$ ) çeşidine göre daha uzun olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $*P<0,05$ ) (Şekil 5.2).



**Şekil 5.2.** Çizelge 5.1’de verilen %0,5’lik NaCl değerleri kullanılarak arpa çeşitlerinin çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri bakımından karşılaştırılması (Av:Avcı 2002, Bu:Burakbey, Ce:Cerveoise, Cl:Clarica, Ep:Epona, Es:Escadre, Ga:Gazda, Ka:Karatay 94, Lo:Lord, Ol:Oliver, Pr:Premium, Ra:Ramata, Ta:Tarm 92, To:Tokak 157/37, Ye:Yesevi 93)

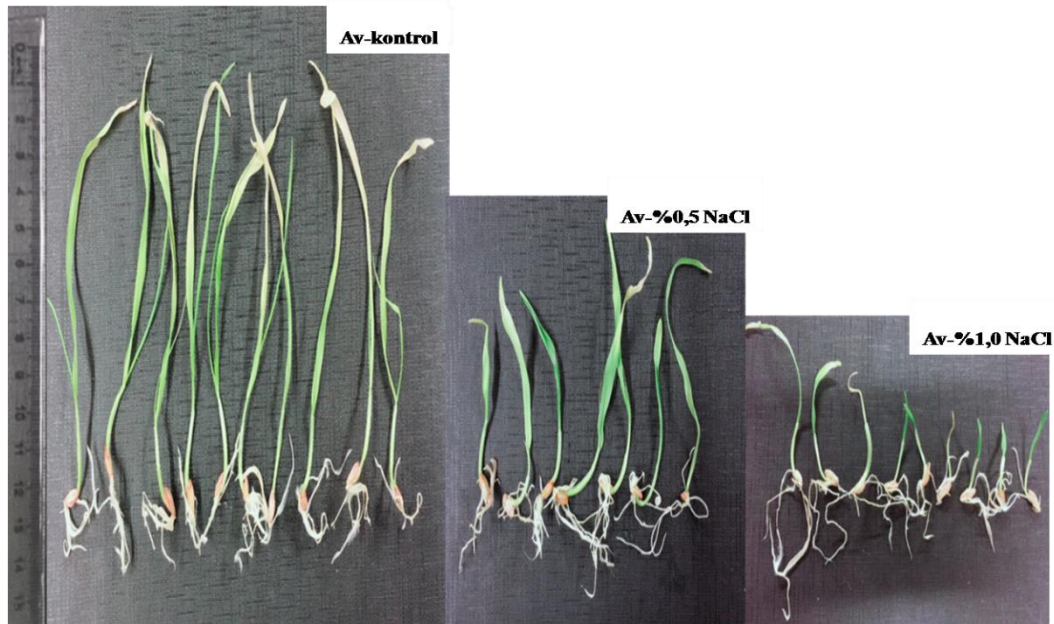
%1,0’lik NaCl stresi uygulanan grupta Av ( $4,7\pm 0,8$ ) ve Pr ( $3,9\pm 0,9$ ) çeşitleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $P>0,05$ ). Av ( $4,7\pm 0,8$ ) çeşidinin sürgün uzunluklarının, Ep ( $1,0\pm 0,4$ ) ( $***P<0,001$ ) ile Es ( $1,1\pm 0,4$ ), Ol ( $1,4\pm 0,5$ ) ve To ( $1,1\pm 0,4$ ) çeşitlerine göre daha uzun olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $**P<0,01$ ). Pr ( $3,9\pm 0,9$ ) çeşidinin sürgün uzunluklarının ise, Ep ( $1,0\pm 0,4$ ), Es ( $1,1\pm 0,4$ ) ve To ( $1,1\pm 0,4$ ) çeşitlerine göre daha uzun olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülürken ( $*P<0,05$ ); Ol ( $1,4\pm 0,5$ ) çeşidi ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $P>0,05$ ) (Şekil 5.3).



**Şekil 5.3.** Çizelge 5.1’de verilen %1,0’lik NaCl değerleri kullanılarak arpa çeşitlerinin çimlenme sürecindeki büyüme karakteristikleri bakımından karşılaştırılması (Av:Avcı 2002, Bu:Burakbey, Ce:Cervoise, Cl:Clarica, Ep:Epona, Es:Escadre, Ga:Gazda, Ka:Karatay 94, Lo:Lord, Ol:Oliver, Pr:Premium, Ra:Ramata, Ta:Tarm 92, To:Tokak 157/37, Ye:Yesevi 93)

### 5.1.2. Fenotipik Farklılıkların Analizi

Distile suda (kontrol) ve % 0,5 ile % 1,0’lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen arpa tohumları 10. günün sonunda sürgün ve kök gelişimleri açısından incelendi. Fenotipik farklılıklar değerlendirilerek skorlama yapıldı. Bunun için sürgün ve kök uzunlukları ölçüldü ve kök sayıları karşılaştırıldı. Fizyolojik analizlerin sonuçlarına göre çimlenme skoru bakımından en iyi büyüme karakteristiklerini göstermesi nedeniyle dayanıklı çeşitler Avcı 2002 ve Premium olarak belirlenirken (Şekil 5.4, 5.5), en az büyüme karakteristiği gösteren çeşitler arasında yer alan Escadre ise hassas çeşit olarak belirlendi (Şekil 5.6).



**Şekil 5.4.** Distile suda (kontrol) ve %0,5 ile %1,0’lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen Avcı 2002 (Av) çeşidinin tuz stresine verdiği yanıt



Şekil 5.5. Distile suda (kontrol) ve %0,5 ile %1,0'lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen Premium (Pr) çeşidinin tuz stresine verdiği yanıt



Şekil 5.6. Distile suda (kontrol) ve %0,5 ile %1,0'lik NaCl solüsyonlarında çimlendirilen Escadre (Es) çeşidinin tuz stresine verdiği yanıt

## 5.2. Gen Ekspresyon Analizleri

### 5.2.1. Total RNA'nın Miktar ve Saflığı

Avcı 2002, Premium ve Escadre arpa çeşitlerinin yapraklarından izole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları Çizelge 5.2'de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres)

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280	260/230
Av.K	235,5	2,142	2,223
Av.S	460,5	2,191	2,417
Pr.K	294,5	2,237	2,398
Pr.S	518,4	2,187	2,458
Es.K	248,3	2,219	2,440
Es.S	352,5	2,158	2,337

### 5.2.2. qPCR ile Gen Ekspresyon Analizleri

Arpa çeşitlerinin qPCR sonuçlarının ortalaması ve standart sapması Çizelge 5.3'de gösterilmektedir.

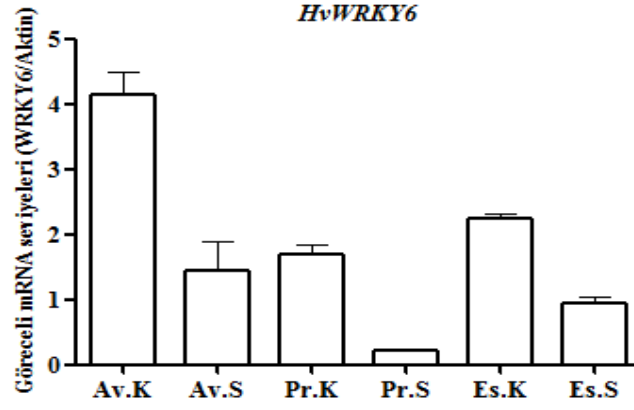
**Çizelge 5.3.** Arpa çeşitlerinin qPCR sonuçlarının ortalaması ve standart sapması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres)

TF'ler	AVCI 2002		PREMIUM		ESCADRE	
	Av.K	Av.S	Pr.K	Pr.S	Es.K	Es.S
<i>HvWRKY6</i>	4,15±0,49	1,2±0,61	1,68±0,21	0,2±0,02	2,24±0,08	0,94±0,11
<i>HvWRKY9</i>	7,83±1,57	1,24±0,09	1,72±0,33	0,91±0,15	1,63±0,46	1,70±0,40
<i>HvWRKY24</i>	2,16±0,28	1,14±0,03	1,66±0,15	1,00±0,11	1,50±0,11	1,84±0,31
<i>HvWRKY25</i>	0,72±0,11	0,97±0,35	1,58±0,46	0,95±0,43	1,84±0,59	1,00±0,38
<i>HvWRKY33</i>	0,97±0,25	0,70±0,08	2,28±0,34	0,87±0,21	1,23±0,03	0,71±0,06
<i>HvWRKY34</i>	1,69±0,24	0,91±0,02	2,28±0,26	0,80±0,21	1,25±0,03	0,57±0,04
<i>HvWRKY41</i>	0,96±0,16	0,61±0,05	1,83±0,63	1,33±0,28	2,01±0,09	0,89±0,16
<i>HvWRKY42</i>	1,72±0,12	0,43±0,04	0,98±0,10	0,22±0,07	1,59±0,07	0,11±0,05
<i>HvWRKY46</i>	1,09±0,05	0,99±0,05	1,55±0,16	1,15±0,27	1,12±0,02	1,01±0,09

#### 5.2.2.1. *HvWRKY6* Geninin Ekspresyon Analizi

Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY6* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Avcı 2002 (\*\* $P < 0,01$ ) ve Premium (\* $P < 0,05$ ) çeşitlerinde kontrole göre anlamlı düşüş, Escadre çeşidinde ise kontrole göre anlamlı olmayan düşüş görüldü (Şekil 5.7).

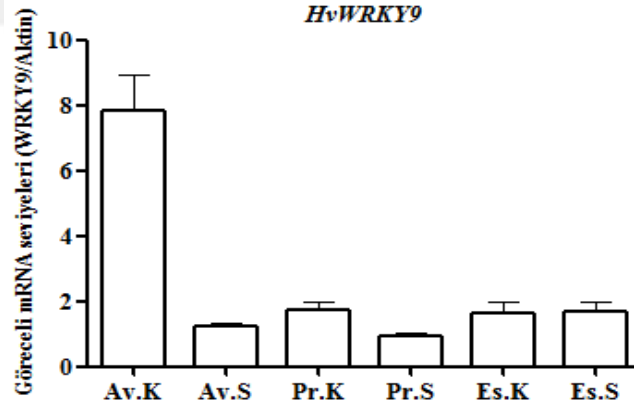




**Şekil 5.7.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY6* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K: Avcı 2002-Kontrol, Av.S: Avcı 2002-Stres, Pr.K: Premium-Kontrol, Pr.S: Premium-Stres, Es.K: Escadre-Kontrol, Es.S: Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.2. *HvWRKY9* Geninin Ekspresyon Analizi

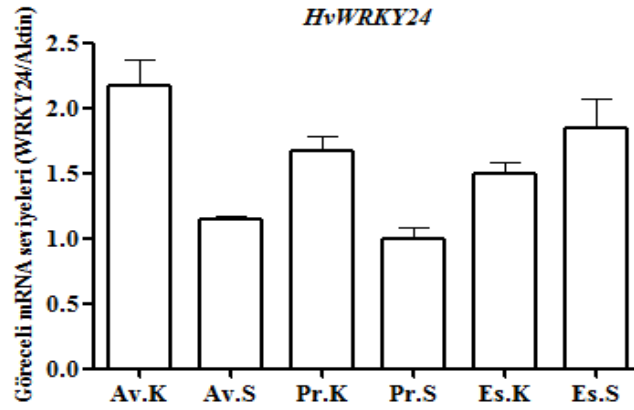
Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY9* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Avcı 2002 çeşidinde kontrole göre anlamlı düşüş ( $***P < 0,001$ ), Premium çeşidinde kontrole göre anlamlı olmayan düşüş, Escadre çeşidinde ise kontrole göre anlamlı olmayan artış görüldü (Şekil 5.8).



**Şekil 5.8.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY9* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K: Avcı 2002-Kontrol, Av.S: Avcı 2002-Stres, Pr.K: Premium-Kontrol, Pr.S: Premium-Stres, Es.K: Escadre-Kontrol, Es.S: Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.3. *HvWRKY24* Geninin Ekspresyon Analizi

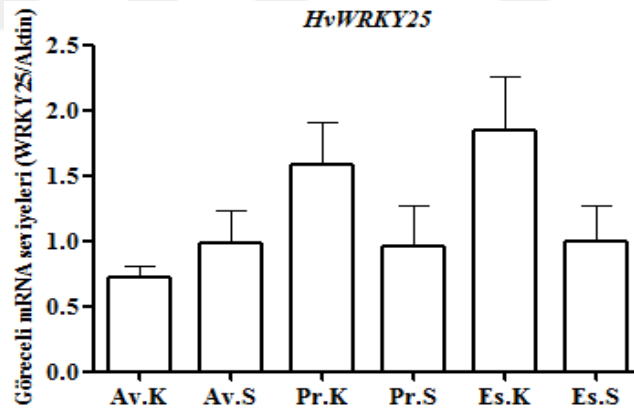
Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY24* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Avcı 2002 çeşidinde kontrole göre anlamlı düşüş ( $*P < 0,05$ ), Premium çeşidinde kontrole göre anlamlı olmayan düşüş, Escadre çeşidinde ise kontrole göre anlamlı olmayan artış görüldü (Şekil 5.9).



**Şekil 5.9.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY24* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.4. *HvWRKY25* Geninin Ekspresyon Analizi

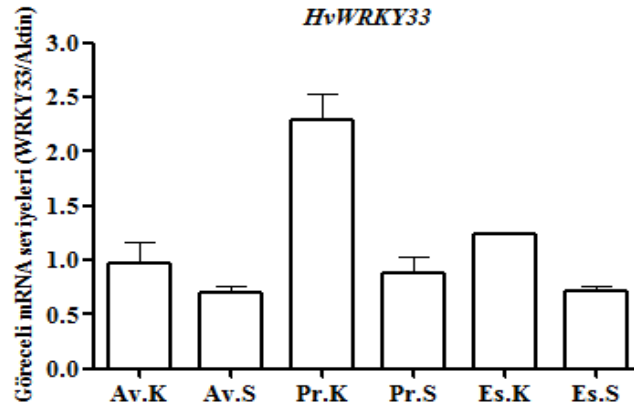
Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY25* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Avcı 2002 çeşidinde kontrole göre anlamlı olmayan artış, Premium ve Escadre çeşitlerinde ise kontrole göre anlamlı olmayan düşüş görüldü (Şekil 5.10).



**Şekil 5.10.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY25* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.5. *HvWRKY33* Geninin Ekspresyon Analizi

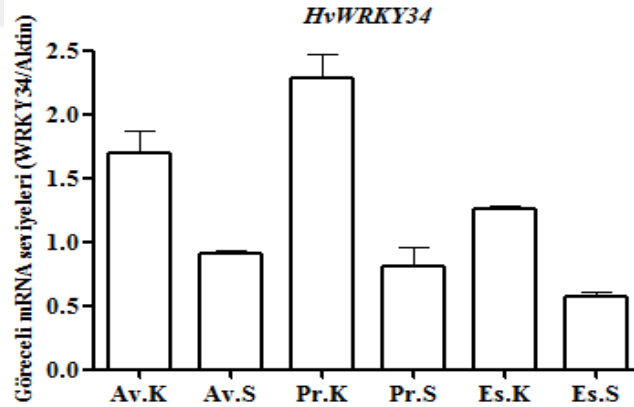
Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY33* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Premium çeşidinde kontrole göre anlamlı düşüş (\*\* $P < 0,01$ ), Avcı 2002 ve Escadre çeşitlerinde kontrole göre anlamlı olmayan düşüş görüldü (Şekil 5.11).



**Şekil 5.11.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY33* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K: Avcı 2002-Kontrol, Av.S: Avcı 2002-Stres, Pr.K: Premium-Kontrol, Pr.S: Premium-Stres, Es.K: Escadre-Kontrol, Es.S: Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.6. *HvWRKY34* Geninin Ekspresyon Analizi

Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY34* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Avcı 2002 ( $*P < 0,05$ ) ve Premium ( $**P < 0,01$ ) çeşitlerinde kontrole göre anlamlı düşüş, Escadre çeşidinde ise kontrole göre anlamlı olmayan düşüş görüldü (Şekil 5.12).

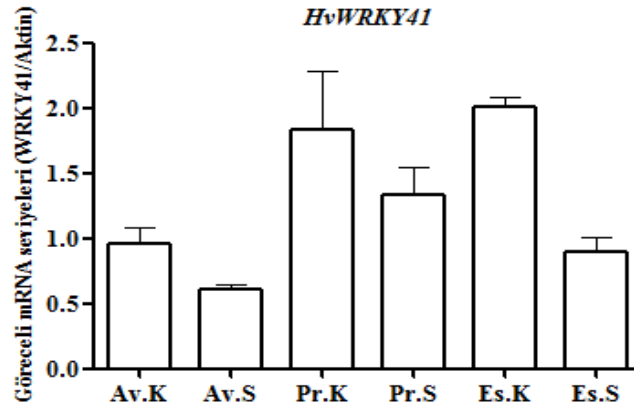


**Şekil 5.12.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY34* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K: Avcı 2002-Kontrol, Av.S: Avcı 2002-Stres, Pr.K: Premium-Kontrol, Pr.S: Premium-Stres, Es.K: Escadre-Kontrol, Es.S: Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.7. *HvWRKY41* Geninin Ekspresyon Analizi

Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY41* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm çeşitlerde kontrole göre anlamlı olmayan düşüş saptandı (Şekil 5.13).

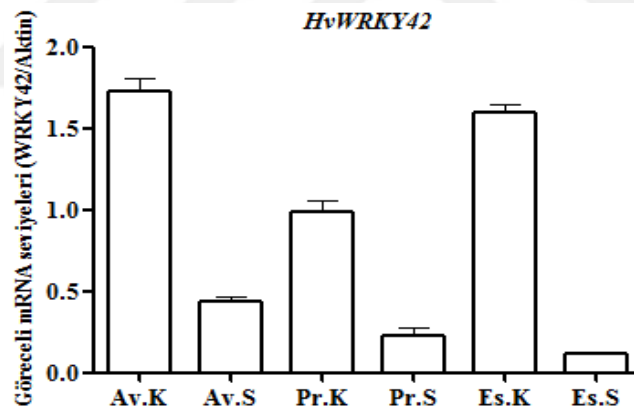




**Şekil 5.13.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY41* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.8. *HvWRKY42* Geninin Ekspresyon Analizi

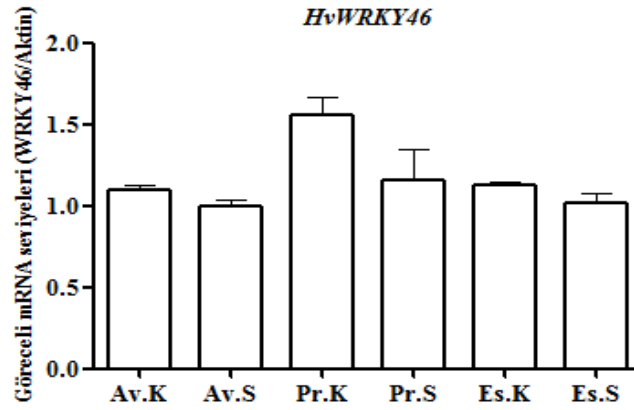
Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY42* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm çeşitlerde kontrole göre anlamlı düşüş saptandı (\*\* $P < 0,001$ ) (Şekil 5.14).



**Şekil 5.14.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY42* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

#### 5.2.2.9. *HvWRKY46* Geninin Ekspresyon Analizi

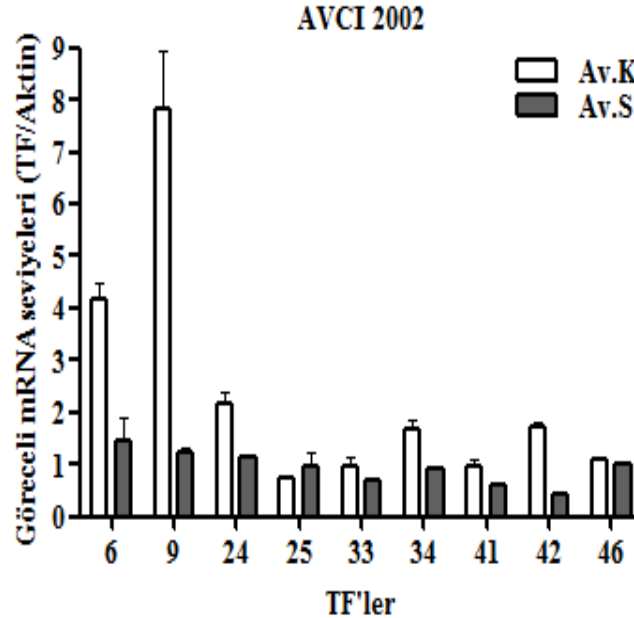
Avcı 2002, Premium ve Escadre çeşitlerinin kontrol grupları ile %1,0'lik NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarındaki *HvWRKY46* geninin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm çeşitlerde kontrole göre anlamlı olmayan düşüş saptandı (Şekil 5.15).



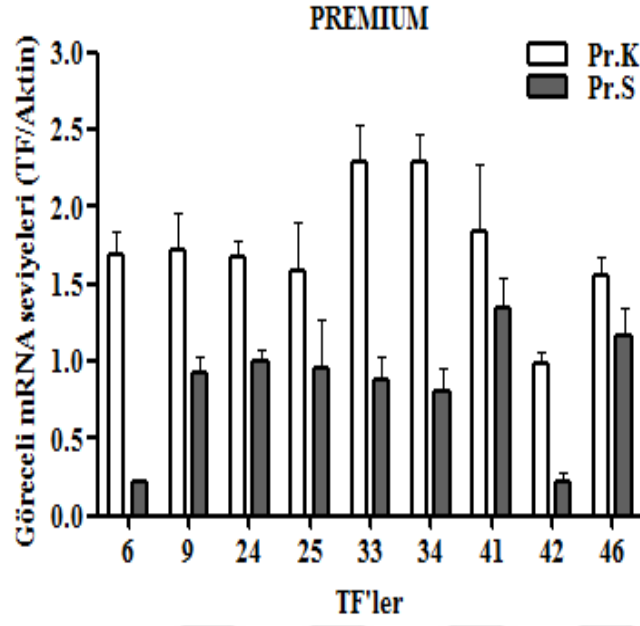
**Şekil 5.15.** Arpa çeşitlerinin yapraklarındaki *HvWRKY46* göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres, Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres, Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

### 5.2.3. Arpa çeşitlerinde WRKY Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyon Analizi

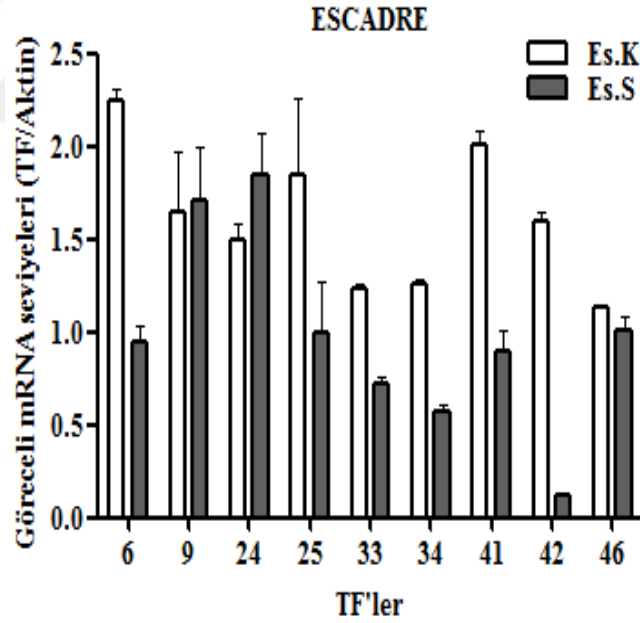
Arpa çeşitlerinde kontrol bitkilerine göre %1,0'lık NaCl stresi uygulanan bitkilerin yapraklarında analiz edilen tüm TF'ler arasında; Avcı 2002 çeşidinde *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY34* ve *HvWRKY42* genlerinin, Premium çeşidinde *HvWRKY6*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34* ve *HvWRKY42* genlerinin, Escadre çeşidinde ise *HvWRKY42* geninin ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak düştüğü tespit edildi (Şekil 5.16, 5.17, 5.18).



**Şekil 5.16.** Avcı 2002 çeşidinin yapraklarındaki TF'lerin göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Av.K:Avcı 2002-Kontrol, Av.S:Avcı 2002-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.



**Şekil 5.17.** Premium çeşidinin yapraklarındaki TF'lerin göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Pr.K:Premium-Kontrol, Pr.S:Premium-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.



**Şekil 5.18.** Escadre çeşidinin yapraklarındaki TF'lerin göreceli mRNA seviyelerinin kontrole göre karşılaştırılması (Es.K:Escadre-Kontrol, Es.S:Escadre-Stres). Veriler 2 biyolojik, 2 teknik replikanın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı göstermektedir.

Arpa çeşitlerinde WRKY transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon analiz sonuçları Çizelge 5.4'de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.4.** Arpa çeşitlerinde WRKY transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon analiz sonuçları

TF'ler	AVCI 2002				PREMIUM				ESCADRE			
	Artış		Azalış		Artış		Azalış		Artış		Azalış	
	Anlamlı	Anlamsız	Anlamlı	Anlamsız	Anlamlı	Anlamsız	Anlamlı	Anlamsız	Anlamlı	Anlamsız	Anlamlı	Anlamsız
<i>HvWRKY6</i>			√				√					√
<i>HvWRKY9</i>			√					√		√		
<i>HvWRKY24</i>			√					√		√		
<i>HvWRKY25</i>		√						√				√
<i>HvWRKY33</i>				√			√					√
<i>HvWRKY34</i>			√				√					√
<i>HvWRKY41</i>				√				√				√
<i>HvWRKY42</i>			√				√				√	
<i>HvWRKY46</i>				√				√				√

## 6. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de tarımı yapılan 15 arpa çeşidi farklı tuz konsantrasyonlarında (%0,5 ve %1,0) çimlendirildi ve çeşitlerin tuz stresine verdikleri erken yanıt fenotipik ve moleküler analizlerle incelendi. Arpa çeşitlerinin tuzluluğa olan toleransının fenotipik olarak belirlenmesinde sürgün ve kök uzunluğu parametrelerine göre çimlenme skorlaması yapıldı. Çimlendirilen arpa tohumlarının 10. günün sonunda sürgün uzunlukları ölçülüp, kök sayısı ve morfolojisi değerlendirildiğinde uygulanan tuz konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak tüm parametrelerde çimlenmenin anlamlı olarak baskılandığı görüldü.

%1,0’lik NaCl stresi uygulanan arpa çeşitleri çimlenme skoru bakımından değerlendirildiğinde 15 arpa çeşidi arasında Avcı 2002 ve Premium en iyi büyüme karakteristiklerini göstermesi nedeniyle dayanıklı çeşitler olarak seçilirken, Escadre çeşidi ise en az büyüme karakteristiği gösteren çeşitler arasında yer aldığından hassas çeşit olarak seçildi. Çalışmamıza benzer olarak, Othman ve diğ., (2006) yaptıkları araştırmada farklı tuz konsantrasyonlarında (100 mM ve 200 mM) çimlendirdikleri 12 arpa çeşidinde, uyguladıkları tuz konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranının düştüğünü belirtmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, NCBI veritabanında arpada tanımlanmış olan 50 tane *HvWRKY* (2-61) transkripsiyon faktörü arasından literatür taraması ile daha önce tuz stresi ile ilişkisi tanımlanmamış olan aday TF’ler (*HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY25*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34*, *HvWRKY41*, *HvWRKY42*, *HvWRKY46*) seçildi. TF’lerin ekspresyon seviyeleri kontrol ve %1,0’lik NaCl stresi uygulanmış dayanıklı (Avcı 2002 ve Premium) ve hassas (Escadre) arpa çeşitlerinin yaprak dokularında analiz edildi. Analiz sonucunda tuz stresinin Avcı 2002 çeşidinde *HvWRKY6*, *HvWRKY9*, *HvWRKY24*, *HvWRKY34* ve *HvWRKY42* genlerinin; Premium çeşidinde *HvWRKY6*, *HvWRKY33*, *HvWRKY34* ve *HvWRKY42* genlerinin; Escadre çeşidinde ise *HvWRKY42* geninin ekspresyon seviyelerini anlamlı olarak azalttığı görüldü.

*HvWRKY6*; *AtWRKY1* ve *OsWRKY82* genleri ile ortologtur (Mangelsen ve diğ., 2008). *AtWRKY1* fonksiyonel bir transkripsiyon faktörü olup mutanti ile yapılan çalışmalarda, *AtWRKY1*'in bekçi hücrelerinin ve stoma hareketlerinin ABA tarafından düzenlenmiş iyon değişimlerine artırılmış duyarlılık gösterdiği ve böylece bitki kuraklığı toleransını geliştirdiği bildirilmiştir (Duan ve diğ., 2007). Bir diğer ortolog, *OsWRKY82*'nin ise hem abiyotik hem de biyotik streslere yanıt veren, çoklu stresle uyarılabilen bir gen olduğu ve jasmonik asit / etilen bağımlı sinyal yolu ile abiyotik strese tolerans ve patojenlere karşı cevap verebilmek için regülasyona dâhil olabileceğini göstermektedir. *OsWRKY82*'nin, yüksek tuz stresi muamelesinin kantitatif RT-PCR analizi sonucunda; 0-1 saat aralığında *OsWRKY82* transkriptlerinde anlamlı bir artış olduğu, bu artışı takiben 6. saat sonrasında bir miktar azalış, 12. saat sonrasında tekrar ekspresyonunun artması ve 24 saat sonra ekspresyonun azalma yönünde eğilim gösterdiği belirlenmiştir (Peng ve diğ., 2011). Çalışmamızda ise tuz stresi uyguladıktan 10 gün sonra Avcı 2002 ve Premium çeşitlerinde *HvWRKY6*'nın ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı tespit edildi.

*HvWRKY9*, *AtWRKY7* ile ortologtur (Mangelsen ve diğ., 2008). *AtWRKY7*, besin yokluğu durumlarında kökler aracılığıyla hücrel cevabın oluşması için, iki potasyum kanalı ve bilinmeyen bir protein ile hidrojen peroksit'in ( $H_2O_2$ ) modüle edilmesinde görev yapmaktadır (Shin ve Schachtman, 2004; Mangelsen ve diğ., 2008). *AtWRKY7*, HsfA1a/1b'e bağımlı olarak çalışan sıcaklık stres geninin ürünüdür (Busch ve diğ., 2005). *AtWRKY7* aynı zamanda savunma sisteminin (patojen direnci) negatif düzenlenmesinde salisik asiti baskılayarak birçok genle beraber görev almaktadır (Andreasson ve diğ., 2005; Higashi ve diğ., 2008). Çalışmamızda, Avcı 2002 çeşidinde *HvWRKY9*'un ekspresyonunda anlamlı azalma görüldü. *AtWRKY7*'nin ortoloğu olan *HvWRKY9*, negatif düzenleme ile stres yolları ve hormonal yolak arasında işlev gösteriyor olabilir.

*HvWRKY24*, *AtWRKY30*, *\_41*, *\_53* ve *OsWRKY63* genleri ile ortologtur. *HvWRKY25* ise, *AtWRKY30*, *\_41*, *\_53* ve *OsWRKY81* genleri ile ortologtur (Mangelsen ve diğ., 2008). Bu genlerden; *AtWRKY53*'ün *AtWRKY30* ile bağımsız olarak etkileştiği gösterilmiştir. *AtWRKY30*'un, gelişmekte olan yaprağın yaşlanması boyunca eksprese edildiği ve diğer WRKY'ler ile bir yaşlanma sürecini düzenleyici görevde olabileceği önerilmektedir (Scarpeci ve diğ., 2008). *A. thaliana*'da; WRKY6, WRKY8, WRKY22, WRKY30, WRKY39, WRKY48, WRKY53 ve WRKY75'lerin  $H_2O_2$  uygulanmasına yanıt olarak upregüle olduğu bildirilmiştir (Davletova ve diğ., 2005). *AtWRKY30* ve

*AtWRKY53*, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi ek sinyallere yanıt verirler (Besseau ve diğ., 2012). *AtWRKY41* ise, jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) yolağının koordinasyonunda anahtar rol oynayan sinyal yolları ile birçok hücrel ve stres yanıt sürecinde yer alan bitkiye spesifik TF'yi kodlayan çok genli bir ailenin üyesidir (Higashi ve diğ., 2008). *HvWRKY24*, *OsWRKY63* geni ile ortologtur. Yapılan deneylerde, *Oryza sativa*'da *WRKY4*, *WRKY43*, *WRKY61*, *WRKY53*, *WRKY63* ve *WRKY100*'ün farklı abiyotik stres koşullarında birlikte düzenlendiği gösterilmiştir (Berri ve diğ., 2009). *OsWRKY63*'ün soğuk uygulanması ve ozmotik stres altında (yapraklar, 5. saat) ekspresyon miktarında artış meydana geldiği gözlenmiştir. *HvWRKY25*, *OsWRKY81* geni ile ortologtur. *OsWRKY81*, kuraklık ile metil jasmonat ve salisilik asit sinyal yollarında görev almaktadır (Ramamoorthy ve diğ., 2008). Çalışmamızda, Avcı 2002 çeşidinde *HvWRKY24*'ün ekspresyon miktarında anlamlı düşüş gözlemlendi. *HvWRKY25*'in ekspresyonu ise hiçbir arpa çeşidinde anlamlı olarak değişmedi. Bu genin ortolog genleri ile yapılan çalışmalarda da daha çok kuraklık ve hormon-stres yolu ilişkisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Ramamoorthy ve diğ., 2008).

*HvWRKY33* ve *HvWRKY34*, *OsWRKY46* ile ortologtur (Mangelsen ve diğ., 2008). *OsWRKY46*'nın tuz stresi altında upregüle olduğu gösterilmiştir (Ding ve diğ., 2014). *OsWRKY46*, kuraklık ve tuz stresi altında ozmolaritenin düzenlenmesi ve oksidatif detoksifikasyon ile ilişkili bir dizi genin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. NaCl ile oluşturulan stres koşulları altında *OsWRKY46*'nın ekspresyonu mRNA transkript seviyelerinde normalden 6,1 kat artış göstermiştir (Kiranmai ve diğ., 2016). Birçok farklı türde yapılan çalışmalarda gen ekspresyonunda meydana gelen artışlara karşın, çalışmamızda Premium çeşidinde *HvWRKY33* ile yaptığımız analizler sonucunda gen ekspresyonunun 2,6 kat anlamlı olarak azaldığı bulundu. Diğer bir araştırmada ise, tuz-alkali stresi iki farklı pirinç çeşitlerine (Dongdao-4; Çin'in kuzeydoğusunda tuz-alkali topraklarda yetişen bir elit pirinç çeşidi ve Jigeng-88; nispeten daha tuz-alkalin stresine duyarlı bir pirinç çeşidi) uygulanmıştır. Uygulama sonucunda *OsWRKY46*, orta dereceli tuz stresine karşı toleransın altında yatan fizyolojik ve moleküler mekanizmaları araştırmak için kullanılmıştır. qPCR ile analizi sonucunda, *OsWRKY46*'nın her iki genotipte upregüle olduğu ve Dongdao-4 ekspresyon miktarı Jigeng-88'e göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Li ve diğ., 2016). Çalışmamızda, Avcı 2002 ve Premium çeşitlerinde *HvWRKY34*'ün

ekspresyonunda anlamlı bir azalma görülmesi, Li ve diğ., (2016) yapmış olduğu çalışma ile benzerlik göstermemektedir.

*HvWRKY41*'in *Arabidopsis*'te ve *Oryza sativa*'da ortolog genleri belirlenmemiştir (Mangelsen ve diğ., 2008). *AtWRKY41*, jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) yolağının koordinasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Bu sinyal yolları birçok hücrel ve stres yanıt sürecinde yer alan JA ve SA fitohormonlarından sorumludur. *A. thaliana*'da filagellin proteini ile indüklenebilir genlerden biri olan WRKY, bitkiye spesifik TF'yi kodlayan çok genli bir ailenin üyesidir (Higashi ve diğ., 2008). *AtWRKY41*'in yokluğu, ABA duyarlılığını azalttığı için *AtWRKY41*'in ABA sinyal yolu yolunda pozitif düzenlemede rol oynadığı görülmüştür (Ding ve diğ., 2014). Çalışmamızda, *HvWRKY41*'in ekspresyonu hiçbir arpa çeşidinde anlamlı olarak değişmedi. *HvWRKY41*'in ortolog genleri ile ilgili bilgi yetersizliğinden dolayı, bu genin abiyotik stres ve patojen ile enfekte sonucu gen ekspresyon seviyelerindeki değişim gibi özellikleri karakterize edilmelidir.

*HvWRKY42*, *AtWRKY2* ve *OsWRKY80* ile ortologtur (Mangelsen ve diğ.,2008). *AtWRKY2* ile yapılan çalışmalarda, *AtWRKY2*'nin, NaCl ve mannitolün neden olduğu ozmotik strese uyarılabileceğini gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu genin ABA sinyal yolunda negatif düzenleyici olarak hareket ettiği bildirilmiştir (Jiang ve Yu., 2009). *OsWRKY80* geni, yüksek demir birikiminin olduğu pirinç tarlalarının su altındaki sürgünlerinde büyük ölçüde uyarılmıştır. Bundan dolayı bitkilerde aşırı demir bulunan koşullarda uyarılan transkripsiyon faktörüdür. Soğuk ile muamele edilmiş bitkilerde ise, yapraklarda *OsWRKY80* mRNA'sının birikiminde anlamlı bir değişiklik olmazken, tuz (100 mM NaCl) ile muamele edilmiş bitki yapraklarının mRNA oranlarında 24 saat sonra anlamlı bir düşüş göstermiştir (Ricachenevsky ve diğ., 2010). Her iki ortolog gende NaCl ile yapılan tuz stresinde, gen ekspresyonunda anlamlı azalma görülmesi çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Çalışmamızda, *HvWRKY42*'nin ekspresyonunun tüm arpa çeşitlerinde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç *HvWRKY42*'nin tuz stresi yanıtına doğrudan katılan bir transkripsiyon faktörü olabileceğini göstermektedir.

*HvWRKY46* [SUSIBA2], *OsWRKY78* ve *AtWRKY20* ile ortologtur (Mangelsen ve diğ., 2008). *OsWRKY78*'in, ISA (izoamilaz) ve nişasta dallanma enzimi IIB'yi (SBEIIB, SBE3) kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenlediği ve alternatif nişasta sentezi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2011). Bu genlerin, üç farklı organdan elde edilen örnekleri ile (kökler, yapraklar ve tohumlarda) karşılaştırmalı



ekspresyon analizi yapılmış ve en fazla miktarda buldukları organlarda aynı miktarda eksprese edildikleri gösterilmiştir. Uygulamaların tümünde *OsWRKY78* ekspresyon analizlerinin kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişmediği bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2011). Başka bir çalışmada Mangelsen ve diğ., (2010), endosperm dokularında *HvWRKY46*'nın yüksek düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir. Çalışmamızda analiz edilen arpa çeşitlerinde *HvWRKY46*'nın ekspresyon profillerindeki değişiminin anlamlı olmadığı tespit edildi. Sonuçlar, bu ortolog genlerin daha çok kök uzama regülasyonu ve tohum gelişimine doğrudan katılabileceğini göstermiştir (Zhang ve diğ., 2011).

İncelenen TF'lerin ekspresyonlarının artırılması ya da susturulmasıyla tuz duyarlılığı olan bitkilerde tuz toleransı artırılabilir. Teknolojik gelişmeler ışığında gen aktarımı aracılığıyla tuz stresine karşı dirençli biyoteknolojik ürünler geliştirilebilir. Bu anlamda arpada ekspresyonları incelenmiş olan WRKY genlerinin tuz stresine karşı yanıtlarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada dokuz farklı *HvWRKY* ile yaptığımız ekspresyon analizi sonucunda anlamlı azalışlar ve anlamsız artış-azalışlar tespit edildi. WRKY transkripsiyon faktörlerinin savunma yanıtında negatif yönde düzenleme yaparak ekspresyonlarının azalması, bitkilerde stres toleransının oldukça karmaşık olduğu ve tek bir mekanizmanın kontrolü altında olmadığını göstermektedir. Tuz stresi ile birlikte diğer abiyotik ve biyotik streslerin uygulanması, genlerde tekli veya birden fazla mutasyonların oluşturulması ile ortolog genler yardımıyla karşılaştırmalı genomik, transkriptomik ve biyoinformatik çalışmalar yapılması WRKY proteinlerinin etki ettiği sinyal yollarının aydınlatılmasına yardımcı olabilir.

## 7. KAYNAKLAR

Agarwal PK, Shukla PS, Gupta, K, Jha, B (2013). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular biotechnology*, 54, 102-23.

Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NHT, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO Journal*, 24:2579–2589.

Badr A, Müller K, Schafer Pregl R, El Rabey H, Effgen S, İbrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamani F (2000). On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510.

Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant molecular biology*, 24, 701-713.

Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O, Brasileiro AC, Fumasoni I, Satoh K, Kikuchi S, Mizzi L, Morandini P, Pè ME, Piffanelli P (2009). Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 22;9:120.

Besseau S, Li J, Palva ET (2012). WRKY54 and WRKY70 cooperate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63:2667–2679.

Blum A (1986). Breeding Crop Varieties for Stress Environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199-237.

Breusegem FV, Vranová E, Dat JF, Inz D (2001). The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction. *Plant Science*, 161, 405-414.

Busch W, Wunderlich M, Schöffl F (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 41(1):1-14.

Chen Y, Yang X, He K, Liu M, Li J, Gao Z, Lin Z, Zhang Y, Wang X, Qiu X, Shen Y, Zhang L, Deng X, Luo J, DengX, Chen Z, Gu H, Qu LJ (2006). The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family, *Plant molecular biology*, 60, 107-124.

Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ (2007). *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353, 299-305.

Chen L, Song Y, Li S, Zhang L, Zou C, Yu D (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2):120-8.

Choi DW, Rodriguez EM, Close TJ (2002). Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiology*, 129, 1781-1787.

Close TJ (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiology Plantarum*, 100, 291-296.

Cui XW, Zhang Y, Qi FY, Gao J, Chen YW, Zhang CL (2013). Overexpression of a moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) transcription factor gene *PheWRKY1* enhances disease resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *NRC Research Press*, 91: 486–494.

Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 268–281.

Dawson IK, Russell J, Powell W, Steffenson B, Thomas WTB, Waugh R (2015). Barley: a translational model for adaptation to climate change. *New phytologist*, 206, 913-931.

Desikan R, Hancock TJ, Neill SJ (2004). Oxidative Stress Signalling, Plant Responses to Abiotic Stress. Published by Springer, Germany, 300p.

Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Yu DQ, Li GX, Zhang SQ, Zheng SJ (2014). Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 79, 13–27.

Duan MR, Nan J, Liang YH, Mao P, Lu L, Li L, Wei C, Lai L, Li Y, SuXD (2007). DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein. *Nucleic Acids Research*, 35:1145–1154

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33, 751-763.

Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S (2006). Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a *DREB2* homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes and Genetics Systems*, 81, 77-91.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5(5), 199-206.

Fang Y, You J, XieK, Xie W, Xiong L (2008). Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular genetics and genomics*, 280, 547-563.

Fowler S and Thomashow MF (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell*, 14, 1675–1690.

Gorham J (1995). Betaines in higherplants: biosynthesis and role in stres metabolism. In Wallsgrave, R.M. ed, *Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 171-203.

Gujjar RS, Akhtar A, Singh M (2014). Transcription factors in abiotic stress tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(4):306-316.

Gupta M, Abu Ghannam N, Gallagher E (2010). Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9 (3), 318-328.

Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 130, 639-648.

Han Y, Zhang X, Wang W, Wang Y, Ming F (2013). The Suppression of WRKY44 by GIGANTEA-miR172 Pathway Is Involved in Drought Response of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, 8(11): e73541.

Hara K, Yagi M, Kusano T, Sano H (2000). Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Molecular Genetics and Genomics*, 263: 30-37.

Hatano H, Mizuno N, Matsuda R, Shitsukawa N, Park P, Takumi S (2012). Dysfunction of mitotic cell division at shoot apices triggered severe growth abortion in interspecific hybrids between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. *New Phytologist*, 194(4):1143-54.

He GH, Xu JY, Wang YX, Liu JM, Li PS, Chen M, Ma YZ, Xu ZS (2016). Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 16:116.

Higashi K, Ishiga Y, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetic and Genomics*, 279: 303–312.

Huang W, Miao M, Kud J, Niu X, Ouyang B, Zhang J, Ye Z, Kuhl JC, Liu Y, Xiao F (2013). *SINAC1*, a stress-related transcription factor, is fine-tuned on both the transcriptional and the post-translational level. *New phytologist*, 197, 1214-1224.

Ishiguro S and Nakamura K (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 50 upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Molecular Genetics and Genomics*, 244: 563–571.

Jiang WB and Yu DQ (2009). “Arabidopsis WRKY2 transcription factor may be involved in osmotic stress response”. *Acta Botanica Yunnanica*, (31), 5, pp. 427–432.

Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Siligan C, Baudouin E, Beyerly J, Cardinale F, Hausl C, Zwerger K, Meskiene I, Hirt H (2000). MAP kinases in plant signal transduction: versatile tools for signaling stress, cell cycle and more, In Cherry, J.H., Ryther, A., Locy, R.D (ed.), *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 67-76.

Kiranmai K, Gunupuru LR, Nareshkumar A, Reddy VA, Lokesh U, Pandurangaiah M, Venkatesh B, Kirankumar TV, Sudhakar C (2016). Expression Analysis of WRKY Transcription Factor Genes in Response to Abiotic Stresses in Horsegram

(*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.). *American Journal of Molecular Biology*, 6, 125-137.

Kizis D, Lumbreras V, Pages M (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters*, 498, 187-189.

Li H, Guo Q, Lan X, Zhou Q, Wei N (2014). Comparative expression analysis of five WRKY genes from Tibetan hulless barley under various abiotic stresses between drought-resistant and sensitive genotype. *Acta Physiol Plant*, 36:963-973.

Li Q, Yang A, Zhang WH (2016). Efficient acquisition of iron confers greater tolerance to saline-alkaline stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, Volume 67, Issue 22, 1.

Liu Q, Kasuga, M, Sakuma, Y, Abe, H, Miura, S, Goda, H, Shimada, Y, Yoshida, S, Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki, K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/ AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 10, 391-406.

Liu JH, Peng T, Dai W (2014). Critical *cis*-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. *Plant molecular biology reporter*, 32, 303-317.

Mahajan S and Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139.

Mangelsen E, Kilian J, Berendzen K, Kolukisaoglu U, Harter K, Jansson C, Wanke D (2008). Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC genomics*, 9(1), 194.

Mangelsen E, Wanke D, Kilian J, Harter ESK, Jansson C (2010). Significance of Light, Sugar, and Amino Acid Supply for Diurnal Gene Regulation in Developing Barley Caryopses. *Plant Physiology*, 153, pp. 14–33.

Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010). Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 283, 185-196.

Maheswari M, Yadav SK, Shanker AK, Kumar MA, Venkateswarlu B (2012). "Overview of Plant Stresses: Mechanisms, Adaptations and Research Pursuit." *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* (1):1-18.

Mani S, Van de Cotte B, Montagu MV, Verbruggen N (2002). Altered levels of proline dehydrogenase cause hyper sensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128, 73-83.

Marè C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L (2004). Hv-WRKY38: a new transcription factor involved, in cold- and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology*, 55: 399–416.

- Mayer KFX, Waugh R, Brown JWS, Schulman A, Langridge P, Platzer M (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491, 711-716.
- Meng Y and Wise RP (2012). *HvWRKY10*, *HvWRKY19*, and *HvWRKY28* Regulate *Mla*-Triggered Immunity and Basal Defense to Barley Powdery Mildew. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 25 (11), 1492–1505.
- Mingyu Z, Zhengbin Z, Shouyi C, Jinsong Z, Hongbo S (2012). WRKY transcription factor superfamily: structure, origin and functions. *African journal of biotechnology*, 11, 8051-8059.
- Mittler R (2002). Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *TRENDS in Plant Science*, 7, 405-410.
- Mondini L, Nachit M, Porceddu E, Pagnotta MA (2012). Identification of SNP Mutations in DREB1, HKT1, and WRKY1 Genes Involved in Drought and Salt Stress Tolerance in Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Journal of Integrative Biology*, 16(4):178-87.
- Munns R (2002). Salinity, Growth and Phytohormones, Salinity: Environment-Plants-Molecules, Published by Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0492-3, Dordrecht, The Netherlands, 522p.
- Munns R and Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-81.
- Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and highsalinity responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*, 42, 657-665.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in plant science*, 10, 79-87.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA research*, 20, 239-247.
- Othman Y, Al-Karaki G, Al-Tawaha AR, Al-Horani A (2006). Variation in germination and ion uptake in barley genotypes under salinity conditions. *World journal of agricultural sciences*, 2, 11-15.
- Peng XX, Tang XK, Zhou PL, Hu YJ, Deng XB, He Y, Wang HH (2011). Isolation and Expression Patterns of Rice WRKY82 Transcription Factor Gene Responsive to Both Biotic and Abiotic Stresses. *Agricultural Sciences*, 10(6): 893-901
- Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK (2016). WRKY Transkription Factors: Molekuler Regulation and Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7:760.
- Pourkheirandish M and Komatsuda T (2007). The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective. *Annals of Botany*, 100 (7), 999-1008.

Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LSP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*, 50, 54-69.

Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S (2008). A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiology*, 49: 865-79.

Reinert S, Kortz A, Léon J, Naz A (2016). Genome-Wide Association Mapping in the Global Diversity Set Reveals New QTL Controlling Root System and Related Shoot Variation in Barley. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1061.

Ricachenevsky FK, Sperotto RA, Menguer PK, Fett JP (2010). Identification of Fe-excess-induced genes in rice shoots reveals a WRKY transcription factor responsive to Fe, drought and senescence. *Molecular Biology Reports*, 37 (8), pp 3735–3745.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290, 2105-2110.

Rivandi J, Miyazaki J, Hrmova M, Pallotta M, Tester M, Collins NC (2011). A SOS3 homologue maps to *HvNax4*, a barley locus controlling an environmentally sensitive Na<sup>+</sup> exclusion trait. *Journal of experimental botany*, 62,1201-1216.

Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010). WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15, 247-58.

Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, Langum TJ, Lucas Smidt L, Boomsma DD, Emme NJ, Chen X, Finer JJ, Shen QJ, Rushton PJ (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology Journal*,10, pp. 2–11.

Saisho D and Takeda K (2011). Barley: emergence as a new research material of crop science. *Plant and cell physiology*, 52(5), 724-727.

Salamini F, Ozkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W (2002). Genetics and Geography of Wild Cereal Domestication in the Near East. *Nature Reviews Genetics*, 3, 429-441.

Sairam RK, Tyagi A (2004). Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants. *Current Science*, 86(3), 407-421.

Scarpeci TE, Zanon MI, Carrillo N, Mueller-Roeber B, Valle EM (2008). Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Molecular Biology*, 66 (4), 361-378.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31(3), 279–292.

- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003). Molecular Responses to Drought, Salinity and Frost: Common and Different Paths for Plant Protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 194-199.
- Sgherry CLM, Pinzino C, Navari-Izzo F (1996). Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O<sub>2</sub><sup>-</sup> production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 96: 446-52.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene Networks Involved in Drought Stress Response and Tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221-227.
- Shin R and Schachtman DP (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23): 8827–8832.
- Shewry PR (1992). Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology, Oxford: The Alden Press, CAB International, 085198-725-7.
- Shelden MC, Dias DA, Jayasinghe NS, Bacic A, Roessner U (2016). Root spatial metabolite profiling of two genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) reveals differences in response to short-term salt stress. *Journal of experimental botany*, 67(12), 3731–3745.
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 430–436.
- Smirnoff N (2005). Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions. In: Smirnoff N, ed. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 53-86.
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Borén M, Ahlandsberg S, Jansson C (2003). A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugarresponsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell*, 15: 2076-2092.
- Tufan F, Uçarlı C, Tunalı B, Gürel F (2017). Analysis of early events in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots in response to *Fusarium culmorum* infection. *European Journal of Plant Pathology*, 11(1): 34–38.
- Tuteja N (2007). Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in Enzymology*, 428, 419-438.
- Ülker B and Somssich IE (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current opinion in plant biology*, 7, 491-498.
- Vinocur B and Altman A (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 123-132.
- Von Bothmer R, Jacobsen N, Baden C, Jorgensen RB, Linde-Laursen I (1995). An ecogeographical study of the genus *Hordeum* (2nd edition). Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7, International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 929-0432-292.



- Wang HL, Lee PD, Chen WL, Huang DJ, Su JC (2000). Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1991-1999.
- Wang H, Liang X, Huang J, Zhang D, Lu H, Liu Z, Bi Y (2010). Involvement of ethylene and hydrogen peroxide in induction of alternative respiratory pathway in salt-treated *Arabidopsis* calluses. *Plant and Cell Physiology*, 51(10), 1754-1765.
- Wu Y, Wang Q, Ma Y, Chu C (2005a). Isolation and Expression Analysis of Salt Up-regulated ESTs in Upland Rice Using PCR-based Subtractive Suppression Hybridization Method, *Plant Science*, 168, 847-853.
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J (2005b). The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Research*, 12: 9-26.
- Xie Z, Zhang ZL, Hanzlik S, Cook E, Shen QJ (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant Molecular Biology*, 64: 293-303.
- Xiong L, Schumaker K, Zhu JK (2002). Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell*, 14, 165-183.
- Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *The plant cell*, 6, 251-264.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2005). Solution Structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA Binding Domain. *The Plant Cell*, 17: 944-956.
- Ye S, Jiang Y, Duan Y, Karim A, Fan D, Yang L, Zhao X, Yin J, Luo K (2014). Constitutive expression of the poplar WRKY transcription factor *PtoWRKY60* enhances resistance to *Dothiorella gregaria* Sacc. in transgenic plants. *Tree Physiology*, 34, 1118-1129.
- Zhang CQ, Xu Y, Lu Y, Yu HX, Gu MH, Liu QQ (2011). The WRKY transcription factor *OsWRKY78* regulates stem elongation and seed development in rice. *Planta*, 234:541-554
- Zhang H, Han B, Wang T, Chen S, Li H, Zhang Y, Dai S (2012). Mechanisms of plant salt response: Insights from proteomics. *Journal of proteome research*, 11, 49-67.
- Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, Wang CM, Wang HW, Zhang JS, Chen SY (2008). Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant biotechnology journal*, 6, 486-503.
- Zhou ML, Ma JT, Pang JF, Zhang ZL, Tang YX, Wu YM (2010). Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. *African Journal of Biotechnology*, 9, 9255-9279.

Zhou X, Jiang Y, Yu D (2011). WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, 31(4), 303-313.

### **Yazarsız Alıntılar**

Integrated Taxonomic Information System [Itis]. (2018). Erişim Tarihi: 05 Ocak 2018, [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=40874](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=40874)

Food and Agriculture Organization [FAO]. (2018). Erişim Tarihi: 05 Ocak 2018, <http://faostat3.fao.org>

Foreign Agriculture Service [FAS]. (2018). Erişim Tarihi: 05 Ocak 2018, <https://www.fas.usda.gov/search/World%20Barley%20Production>

Gramene. (2018). Erişim Tarihi: 05 Ocak 2018, [http://www.gramene.org/species/hordeum/barley\\_intro.html](http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_intro.html)

National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2018). Erişim Tarihi: 06 Ocak 2018, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)

## 8. EKLER

**EK-1.** NCBI veritabanında arpada tanımlanmış WRKY transkripsiyon faktörleri ve bu TF'lerle yapılan çalışmalar

Gen	Erişim Numarası	Stres	Kaynak
<i>HvWRKY2</i>	KC776268.1	Tuz stresi, Kuraklık, Abiyotik Stres	(Li ve diğ., 2014)
<i>HvWRKY3</i>	EF488104.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Hatano ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY4</i>	EF488105.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY5</i>	KC776269.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Li ve diğ., 2014)
<i>HvWRKY6</i>	EF488106.1, AJ853842.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY7</i>	DQ840406.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY8</i>	DQ840407.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Liu ve diğ., 2014), (Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY9</i>	DQ840408.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Han ve diğ., 2013)
<i>HvWRKY10</i>	DQ840409.1, KC776270.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Cui ve diğ., 2013), (Li ve diğ., 2014)
<i>HvWRKY11</i>	DQ840410.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY12</i>	DQ840411.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Tufan ve diğ., 2017)
<i>HvWRKY13</i>	DQ840412.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY14</i>	DQ840413.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY15</i>	DQ840414.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY16</i>	DQ840415.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY17</i>	DQ840416.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Liu ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY18</i>	DQ840417.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY19</i>	KC776271.1, DQ840418.1	Tuz Stresi, Kuraklık, Abiyotik Stres	(Li ve diğ., 2014), (Mangelsen ve diğ., 2008), (Meng ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY20</i>	DQ840419.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY21</i>	DQ863105.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY22</i>	DQ863106.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY23</i>	DQ863131.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY24</i>	DQ863108.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY25</i>	DQ863109.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY26</i>	DQ863110.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)

**EK-1. (devam)** NCBI veritabanında arpada tanımlanmış WRKY transkripsiyon faktörleri ve bu TF'lerle yapılan çalışmalar

Gen	Erişim Numarası	Stres	Kaynak
<i>HvWRKY27</i>	DQ863111.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY28</i>	DQ863112.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Meng ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY29</i>	DQ863113.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Reinert ve diğ., 2016)
<i>HvWRKY30</i>	DQ863114.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY31</i>	DQ863115.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY32</i>	DQ863116.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Han ve diğ., 2013)
<i>HvWRKY33</i>	DQ863117.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY34</i>	DQ863118.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Chen ve diğ., 2012), (Han ve diğ., 2013), (Ye ve diğ., 2014), (Gujjar ve diğ., 2014)
<i>HvWRKY35</i>	DQ863119.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY36</i>	DQ863130.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY37</i>	DQ863121.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008), (Han ve diğ., 2013)
<i>HvWRKY38</i>	AY541586.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mondini ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY39</i>	DQ863122.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY40</i>	DQ863123.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY41</i>	DQ863124.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Chen ve diğ., 2012), (Mangelsen ve diğ., 2008), (Han ve diğ., 2013), (Ye ve diğ., 2014), (Gujjar ve diğ., 2014)
<i>HvWRKY42</i>	DQ863125.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY43</i>	DQ863126.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY44</i>	DQ863129.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY45</i>	DQ863128.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Mangelsen ve diğ., 2008)
<i>HvWRKY46</i>	KC776272.1, AY323206.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Li ve diğ., 2014), (Mangelsen ve diğ., 2008), (Chen ve diğ., 2012), (Gujjar ve diğ., 2014)
<i>HvWRKY48</i>	JQ806389.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Meng ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY49</i>	JQ806390.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Meng ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY53</i>	JQ806391.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Meng ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY55</i>	JQ806392.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Meng ve diğ., 2012)
<i>HvWRKY61</i>	JX216840.1	Kuraklık, Abiyotik ve Biyotik Stres	(Meng ve diğ., 2012)

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Özge GÜNGÖR, 10.01.1991 tarihinde Bursa’da doğdu. 2008 yılında Bursa Fatih Lisesi’nden mezun olduktan sonra 2009 yılında Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde başladığı lisans öğrenimini 2015 yılında tamamladı. 2015 yılında, Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

