



**ARPA FİDELERİNDE SODYUM NİTROPRUSSİD TEŞVİKLİ
NaCl TOLERANSI ÜZERİNE PROTEOMİK ANALİZLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Melike ELDEN

Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Ağustos, 2020

Bu tez çalışması, 18.FEN.BİL.01 ve 18.KARİYER.152 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARPA FİDELERİNDE SODYUM NİTROPRUSSİD TEŞVİKLİ
NaCl TOLERANSI ÜZERİNE PROTEOMİK ANALİZLER

Melike ELDEN

Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Ağustos, 2020

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13/08/2020

Melike ELDEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ARPA FİDELERİNDE SODYUM NİTROPRUSSİD TEŞVİKLİ NaCl TOLERANSI ÜZERİNE PROTEOMİK ANALİZLER

Melike ELDEN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Tarım topraklarının tuza maruz kalması dünya çapında ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Bitkilerde tuz toleransını artırmak için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Dışsal sodyum nitroprussid (SNP) uygulamasının tuzluluğun zararlı etkilerini hafifletebileceği ve bitkilerin tuz toleransını teşvik edebileceği gösterilmiş olmasına karşın, SNP'nin proteomik değişikliklerin düzenlenmesindeki rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. Bu amaçla, arpa (*Horedum vulgare* L.) fidelerinin tuz stresine verdiği tepkileri daha iyi anlamak ve tuz kaynaklı hasarı hafifletmede dışsal SNP'nin koruyucu rollerini anlamak için NaCl ve/veya SNP uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularında karşılaştırmalı proteomik analizler yapılmıştır. Dışsal SNP uygulamasının NaCl stresi tarafından inhibe edilen fide büyümesini iyileştirdiği belirlenmiştir. Proteomik analizler, 24 proteinin SNP ve/veya NaCl stresi uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğunu göstermiştir. Bu proteinlerden 15'i MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile başarıyla tanımlanmıştır. Gen ontolojisi analizi; fotosentez, protein metabolizması, stres savunma ve enerji metabolizması gibi yolların SNP ve/veya NaCl uygulamaları ile düzenlendiğini ortaya koymuştur. Dışsal SNP uygulaması, tuz stres altındaki arpa fidelerinin yapraklarında 20 kDa şaperonin, proteazom altbirim beta tip-2, 2-Cys peroksiredoksin BAS1, tiyazol biyosentetik enzim 1-1, ferredoksin-NADP redüktaz, S-adenozilmetiyonin sentetaz 3 ve uzama faktörü Tu proteinlerinin ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. Mevcut sonuçlar, SNP'nin fotosentezin düzenlenmesi, yanlış katlanmış veya hasarlı proteinlerin parçalanması, stres savunmasının aktivasyonu ve poliaminler, prolin ve GABA sentezinin teşvik edilmesi

yoluyla NaCl'nin neden olduğu büyüme inhibisyonunu hafifletebileceğini ileri sürmektedir. Bu çalışma, arpa fidelerinde tuz stresine yanıt olarak SNP'nin moleküler mekanizmasına proteomik düzeyde bilgi sağlayan ilk çalışmadır.

2020, xii + 67 sayfa

Anahtar kelimeler: Arpa, Sodyum nitroprussid, Tuz stresi, Proteomik



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

PROTEOMIC ANALYSIS ON SODIUM NITROPRUSSIDE INDUCED NaCl TOLERANCE IN BARLEY SEEDLINGS

Melike ELDEN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Mustafa YILDIZ

The salinization of agricultural soils poses a serious challenge in worldwide. Different strategies have been developed to improve salt tolerance of plants. Although it has been shown that exogenous sodium nitroprusside (SNP) administration can alleviate the harmful effects of salinity and promote plants salt tolerance, the roles of SNP in regulating proteomic changes have not been fully understood. For this purpose, comparative proteomic analysis were performed on leaf tissues of barley seedlings exposed to NaCl and / or SNP applications in order to better understand the responses of barley (*Horedum vulgare* L.) seedlings to salt stress and to understand the protective roles of exogenous SNP in alleviating salt-induced damage. The results showed that exogenous SNP application restored the seedling growth inhibited by NaCl stress. Proteomic analysis indicated that 24 proteins were differentially expressed under SNP and/or NaCl stress treatments. Among them, 15 proteins were successfully identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Gene ontology analysis revealed that several pathways were regulated by SNP and/or NaCl treatments, including photosynthesis, protein metabolism, stress defense, and energy metabolism. Exogenous SNP treatment was increased the expression levels of 20 kDa chaperonin, proteasome subunit beta type-2, 2-Cys peroxiredoxin BAS1, thiazole biosynthetic enzyme 1-1, ferredoxin-NADP reductase, S-adenosylmethionine synthetase 3, and elongation factor Tu proteins in the leaves of barley seedlings under salt stress. The present results suggest that SNP may alleviate NaCl-induced growth inhibition through regulation of photosynthesis, degradation of misfolded/damaged proteins, activation of stress defense, and the

promoting of the synthesis of polyamines, proline and GABA. This study is the first to provide insights at the proteomic level into the molecular mechanism of SNP in response to salt stress in barley seedlings.

2020, xii + 67 pages

Keywords: Barley, Sodium nitroprusside, Salinity stress, Proteomics



TEŞEKKÜR

Lisansüstü tez çalışmam süresince değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, deneysel çalışmalar ve tezin tamamlanması basamaklarının her aşamasında yapmış olduğu önemli katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkür ederim. Deneysel çalışmaların her basamağında göstermiş olduğu katkılardan dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ'ye teşekkür ederim. Kütle spektrometresi analizlerinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Murat KASAP (Kocaeli Üniversitesi)'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 18.FEN.BİL.01 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında sabırla bana destek olan, her türlü konuda maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana olan inançlarını ve sevgilerini her zaman hissettiren en büyük motivasyon kaynağım sevgili eşime ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak hayatımda her zaman özel olan, paylaşımlarla hayatı daha yaşanabilir ve keyifli kılan, beni motive eden, birlikte güzel zamanlar geçirebildiğim tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Melike ELDEN

Afyonkarahisar, 2020

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Arpa (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Bitkisinin Sistematığı ve Biyolojik Özellikleri	4
2.2 Stres Nedir?.....	5
2.2.1 Tuz Stresi.....	5
2.2.1.1 Tuz Stresinin Bitkilerdeki Fizyolojik Etkileri	6
2.2.2.2 Tuz Stresi Koşullarında Proteom Değişimleri.....	7
2.3 Nitrik Oksit	9
2.3.1 Nitrik Oksit Kimyasal Özellikleri	9
2.3.2 Nitrik Oksit Biyosentezi.....	9
2.3.3 Stres Koşullarında Nitrik Oksidin Büyüme ve Gelişme Üzerine Etkisi	12
2.3.4 Stres Koşullarında Nitrik Oksitin Moleküler Düzeydeki Etkileri.....	14
2.4 Tuz Stresi Toleransında Rolü Olan Diğer Bileşikler	15
2.4.1 Absisik Asit.....	15
2.4.2 Askorbik asit	15
2.4.3 Brassinosteroid	15
2.4.4 Glisinbetain	16

2.4.5 Kalsiyum	17
2.4.6 Prolin	17
2.4.7 Silisyum.....	18
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1 Bitki Materyali	19
3.2 Bitki Yetiştirme Koşulları ve Stres Uygulaması.....	19
3.3 Protein Ekstrasyonu	20
3.4 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi	21
3.5 Jellerin Boyanması ve Görüntü Analizleri.....	22
3.6 Jelde Triptik Kesim.....	22
3.7 Kütle Spektrometresi Analizleri	23
3.8 İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR	26
4.1 Fide Büyümesi Üzerine Dışsal SNP ve NaCl Uygulamalarının Etkisi.....	26
4.2 Proteom Değişimleri Dışsal SNP ve NaCl Uygulamalarının Etkisi	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
HCl	Hidroklorik asit
μM	Mikromolar
mA	Miliamper
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

GABA	Gama-aminobarbütirik asit
IEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradiyenti
NO	Nitrik oksit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNP	Sodyum nitroprussid

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Arpa (<i>Hordeum vulgare</i> L.) bitkisinin sistematığı	4
Çizelge 2.2 Tuzlu toprakların elektriksel iletkenliği (EC), toprak tuzluluk durumu ve bitki verimi üzerine etkisi.....	6
Çizelge 3.1 Protein tanımlamada kullanılan parametreler	24
Çizelge 4.1 Arpanın sürgün ve kök taze (TA) ve kuru ağırlıkları (KA) üzerine farklı SNP ve NaCl uygulamalarının etkisi	26
Çizelge 4.2 SNP ve/veya NaCl uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler.	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 NO'nın muhtemel biyosentez yolları	10
Şekil 2.2 Bitki hücrelerinde NO biyosentezi	11
Şekil 2.3 Bitki stres cevaplarında NO ve H ₂ O ₂ sinyal iletiminin olası yolları	13
Şekil 4.1 Kontrol, SNP, NaCl ve SNP+NaCl uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri	27
Şekil 4.2 Onaylanmış ve tahmin edilen etkileşimlere dayanarak STRING sistemi (http://string.embl.de) kullanılarak hazırlanan protein etkileşim haritası.	33
Şekil 4.3 BiNGO tarafından üretilmiş moleküler fonksiyon ağları	34

1. GİRİŞ

Kültür bitkisi arpa (*Hordeum vulgare* L.), dünyada mısır, buğday ve çeltikten sonra, Türkiye’de ise buğdaydan sonra ikinci sırada en çok tarımı yapılan tahıldır (Kızılgeçi vd. 2016). Fransa, Almanya, Birleşik Krallık ve İspanya, Dünya arpa üretiminin %40’ını karşılaması nedeniyle önemli üretici ülkelerdir. Bu Avrupa Birliği ülkeleri, 2018-2019 yılları arasında toplam 36.000.000 ton arpa üretimi ile Avrupa Birliği’nin %65’ini oluşturmaktadır (Anonim 2018). Rusya ise dünyanın ikinci en büyük arpa üreticisi olup, %12’lik paya sahiptir. Dünyanın en büyük arpa ihracatçısı olan Avustralya ise üretimde %6’lık paya sahiptir (Anonim 2017).

Ülkemizin her bölgesinde ekimi yapılan arpa, 2010-18 yılları arasında ekim alanı (2.4–3.0 milyon hektar) ve üretim miktarı (6.3-8 milyon ton) açısından buğdaydan sonra ikinci sırada yer alır (Anonim 2018). Özellikle İç Anadolu, Güneydoğu ve Ege Bölgelerinde olmak üzere özellikle Türkiye’nin her bölgesinde üretimi yapılmaktadır. Arpa ithalat miktarı yıllara göre değişim göstermekte; bu değişim üretim, yurt içi kullanım miktarı ve gelişen yem sanayinin hammadde ihtiyacına göre değişmektedir. TÜİK (2019) verilerine göre arpa ithalat miktarı 2018 yılında 656 bin ton ve ihracat miktarı ise 15 bin 610 ton olarak gerçekleşmiştir.

Tuzluluk, stresin karmaşık bir şekli olup; tuza tolerans, çeşitli kökenlere ve seviyelere sahip multigenik ve belirlenmesi çok zor bir özelliktir (Soares vd. 2018). Tuz stresi, bitkilerin genellikle kök bölgesinde çözünebilir tuzların aşırı birikimi nedeniyle ozmotik potansiyelin artması sonucu suyun kökler tarafından alınımının zorlaşması ve iyon toksisitesindeki artışa bağlı olarak ortaya çıkar (İnt. Kyn. 2). Toprak tuzluluğu bitkilerde fizyolojik kuraklığa, iyon toksisitesine hatta metabolik bozukluklara yol açabilir (Abd El-Mageed vd. 2018). Tuz stresi tohum çimlenmesi, kök uzunluğu ve bitki boyu gibi birçok fizyolojik olayda önemli düzeyde inhibeasyon etkisi göstermektedir (Liang vd. 2018). Bitkilerde tuzluluğa bağlı olarak ozmotik ve iyon stresinin artmasıyla enzim aktivitesi, protein sentezi ve zar geçirgenliği azalırken, kloroplast ve diğer hücresel yapılar önemli seviyede zarar görmektedir (İnt. Kyn. 2). Tuzluluğun yaprak büyüme hızını, hücrelerdeki geçici ozmotik dengesizlikler, hücre uzaması ve bölünmesinin

azalması (Fricke ve Peters 2002) ve/veya hücre duvarı sertleşmesi (Geilfus vd. 2017) gibi nedenlerle yavaşlattığı açıkça bilinmektedir.

Aktif molekül olan nitrik oksit (NO), farklı biyolojik yolları kullanarak oksidatif stresin zararlı etkilerinden korur (Carlos ve Lorenzo 2001). Normal ve stres koşullarında NO'nun sinyal rolü bitki büyümesini regüle etmektedir (Arora ve Bhatla 2017). Nitrik oksitin farklı fonksiyonel işlevlerde [Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşumu ve parçalanması, temel metabolizma, taşıma, hücre ölümü, savunma, sinyal iletimi gibi] yer alan genlerin tanımlanmasına izin veren transkripsiyonel değişiklikleri indüklediği bildirilmiştir (Karplus vd. 1991). NO, ROS ile arasındaki dengeye bağlı olarak toksik etki ya da koruyucu etki gösterebilir. Düşük miktarlardaki NO, ROS savunma yanıtlarının aktivasyonu için bir sinyal olarak görev yaparken, stres koşullarında ROS üretimi ile yüksek konsantrasyonlarda oluşan NO olumsuzluklara neden olabilir (Kopyra ve Gwózdź 2003). Antioksidan özelliğe sahip nitrik oksit molekülünün, hücresel redoks dengesi için genel mekanizmaları düzenlediği, O₂'nin H₂O₂ ve •O₂'ye dönüşümünü teşvik ettiği ve H₂O₂ süpürücü enzimlerin aktivitelerini arttırarak bitkilerde oksidatif hasarı inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhang vd. 2009).

Bitkilerde NO miktarı, tuz stresi toleransına karşı artar (Mishina vd. 2007). Bir NO donorü olan ekzojen sodyum nitroprusid (SNP), çeltik (Uchida vd. 2002), acı bakla (Kopyra ve Gwozdź 2003) ve salatalıkta (Yuqin vd. 2009) tuzluluğun oksidatif hasarını önemli düzeyde azaltmış, tuz stresi altındaki *Suaeda salsa*'da fide çıkışını (Song vd. 2009) ve mısır bitkisinin kuru ağırlığını (Guo vd. 2010) arttırmıştır. Tuz stresi koşullarında SNP ön uygulaması, endopeptidaz ve karboksipeptidaz aktiviteleri ve çözünebilir protein miktarını arttırarak karbon ve azot metabolizması arasındaki dengenin korunmasına önemli katkılar sağlamıştır (Zheng vd. 2010). Bununla birlikte aynı araştırmacılar, tuz stresi altında, dışsal SNP uygulamasının plazma membranı (PM) H⁺-ATPaz ifadesini teşvik ettiğini de bildirmişlerdir.

Yüksek tuz konsantrasyonlarında bitkilerin büyüebilme ve yaşam döngülerini tamamlayabilme yetenekleri tuzluluk toleransı olarak tanımlanmaktadır (Parida ve Das 2005). Birçok kültür bitkisinin tuzluluğa karşı duyarlı olması nedeniyle, önemli bir

Çevresel faktör olan tuzluluk sorununun ortadan kaldırılması ekonomik öneme sahiptir. Bitkilerde tolerans mekanizmalarının anlaşılması ve yüksek stres toleransına sahip tür ya da çeşitlerin ıslahı önemlidir (Anonim 2012). Arpa tuzluluğa toleransı en fazla olan kültür bitkilerinden biridir. Tuz stresi, birçok bitkide olduğu gibi arpada da bütün büyüme ve gelişme evrelerini özellikle çimlenme ve fide çıkışı evrelerini olumsuz etkilemektedir (Begum vd. 1992, Parlak 1999). Farklı arpa çeşitlerinde yapılan tuz toleransı çalışmalarında en fazla tolerans gösteren arpa eşidinin Tarm-92 olduğu bildirilmiştir (Benlioğlu ve zkan 2015). Bu tez çalışmasında, tuz stresi altındaki arpa (*Hordeum vulgare* L. convar. Tarm-92) fidelerinde bir nitrik oksit donörü olan sodyum nitroprusidin fide büyümesi ve yaprak proteom değişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Bitkisinin Sistematığı ve Biyolojik Özellikleri

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğdaygiller (Poaceae ya da Gramineae) familyasının *Hordeum* cinsine verilen isimdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinin sistematığı (İnt. Kyn. 1).

Alem	Plantae
Alt alem	Embryophyta
Şube	Spermatophyta
Sınıf	Monocotyledone
Takım	Graminales
Familya	Poaceae
Alt Familya	Festucoideae
Cins	<i>Hordeum</i>
Tür	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Kültür arpaları beş varyete olarak gruplanabilir.

- 1) *Hordeum vulgare* convar. *distichon* (iki sıralı arpa)
- 2) *Hordeum vulgare* convar. *hexastichon* (altı sıralı arpa)
- 3) *Hordeum vulgare* convar. *intermedium*
- 4) *Hordeum vulgare* convar. *labile*
- 5) *Hordeum vulgare* convar. *deficiens*

Dünyadaki arpa çeşitlerinin yarısından çoğu iki sıralı arpa grubunda yer almaktadır. Türkiye'deki arpa çeşitlerinin ise %70'inden fazlası bu gruba girer (İnt. Kyn. 2). Araştırmamızda kullanılan iki sıralı Tarm-92 arpa çeşidi; alternatif tipte, yatmaya karşı dayanıklı, kuraklığa ve toksik elementlere karşı toleranslı bir çeşittir (İnt. Kyn. 3).

Alternatif bir tip olan bu çeşit kışlık olarak ekilmek istendiğinde ekim zamanı 1-15 Ekim ve ekim derinliği ise 4-5 cm'dir (İnt. Kyn. 3).

2.2 Stres Nedir?

Stres faktörlerinin birlikte ya da birbirinden bağımsız olarak fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda bazı değişimlere neden olarak organizmada hasar oluşturma kapasitesi stres olarak tanımlanmaktadır (Levitt 1980). Stres faktörleri, mikroorganizmaların enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan biyotik stres faktörleri ve tuzluluk, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleri ise abiyotik stres faktörleri olarak sınıflandırılır (Lichtenhaler 1996). Dünyada verim kaybının birincil nedeni olan abiyotik stres, kültür bitkilerinde ortalama %50'den fazla ürün verimini azaltmaktadır (Wang vd. 2004).

2.2.1 Tuz Stresi

Toprak tuzluluğu ve tuz stresi denildiğinde genellikle NaCl'ün varlığından söz edilmekle birlikte, tuzluluğa klorür, sülfat, nitrat, karbonat ve bikarbonat ve borat gibi bileşikler de neden olur (Munns ve Termaat 1986). Tuzlu toprakların elektriksel iletkenliği, toprak tuzluluk durumu ve bitki verimi üzerine etkisi farklılık gösterir (Çizelge 2.2) (Soil Quality Test Kit Guide 1999).

Kullanılabilir tarım arazilerini en fazla etkileyen stres faktörü, kuraklıktan (%26) sonra %20'lik oranla tuzluluğu oluşturan mineral stresidir (Blum 1986, Tuteja 2007). Dünyada 90 milyon da'dan fazla alan tuzluluk stresi altındadır (Tuteja 2007). Ülkemiz yüzölçümünün %2'sini oluşturan çorak arazilerin %74'ü tuzlu, %25.5'i tuzlu-alkali ve %0.5'i alkali topraklardır (TÜİK 2011). Tuzluluk artışına bağlı olarak 21. yüzyılın ortalarında sürdürülebilir tarım arazilerinin yarısının tahrip olabileceği bildirilmiştir (Ahmadi vd. 2009).

Çizelge 2.2 Tuzlu toprakların elektriksel iletkenliği (EC), toprak tuzluluk durumu ve bitki verimi üzerine etkisi (Soil Quality Test Kit Guide 1999'den değiştirilerek)

Toprak EC değeri (dS/m)	Toprak tuzluluk durumu	Bitki verimi
0-0,98	Çok az tuzlu	Etkisi ihmal edilebilir düzeydedir.
0,98-1,71	Az tuzlu	Çok duyarlı bitkiler üzerinde etkilidir.
1,71-3,16	Tuzlu	Birçok bitki üzerinde etkilidir.
3,16-6,07	Çok tuzlu	Tuza dayanıklı bitkiler normal ürün verebilir.
6,07	Aşırı tuzlu	Tuza çok dayanıklı birkaç bitki ürün verebilir.

2.2.1.1 Tuz Stresinin Bitkilerdeki Fizyolojik Etkileri

İyon toksisitesine neden olan tuzluluk stresi koşullarında, Na ve Cl'un yüksek konsantrasyonları potasyum, kalsiyum ve azotun alınımını azaltarak bitkilerin iyon dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (Güneş vd. 1994). İyon dengesizliği ve köklerde hücre zarı geçirgenliğinin bozulması, bazı element alınımının engellenmesine ve fizyolojik semptomların gelişmesine neden olmuştur (Villora vd. 1997). Tuzlu koşullar, tüm bitkilerde genellikle çimlenmenin baskılanmasına, büyümenin yavaşlamasına, verimin azalmasına ve hatta ölümüne neden olabilir (Dölarslan ve Gül 2012). Tuzluluk bitkilerde karbon metabolizması ve elektron taşınım aktivitesini engellemektedir (Sreenivasulu vd. 2000). Tuz stresi altında, stomaların kapanması ve yaprak yüzey alanlarının azalması transpirasyonu azaltmakta, CO₂ girişi engellenmekte ve su kaybı en aza indirilerek topraktan su ile birlikte yüksek miktarda tuz alınımı engellenmektedir. Böylece CO₂ indirgenmesi azalmaktadır (Makela vd. 1998). Tuzluluğun stomaların kapanmasına ve kloroplastların yapısının bozulmasına neden olarak CO₂ fiksasyonunu azalttığı ve dolayısıyla fotosentezin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Zhu 2001).

Tuzluluk, mitoz bölünmeyi engellemek suretiyle hücrelerin çoğalmasını önleyerek çimlenmeye ket vurabilir (Tabur ve Demir 2010). Tuz stresi, tohumda amilaz ve proteaz

gibi enzimlerin aktivitesini engelleyerek çimlenmeyi olumsuz yönde etkileyebilir (Ashraf vd. 2002). Tuzluluk, nükleik asit ve protein sentezini engelleyerek büyüme ve gelişmeyi (Prakash vd. 1988, Coşkun-Arı vd. 2010) ve solunumu (Porath ve Poljakoff-Mayber 1964) olumsuz yönde etkileyebilir. Katalaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini azaltır (Yaşar vd. 2008).

2.2.2.2 Tuz Stresi Koşullarında Proteom Değişimleri

Bitki proteomik çalışmalarında proteomik ve genomik tabanlı teknolojiler kullanılmaktadır (Jiang vd. 2007). Bitkiler abiyotik strese tolerans gösterebilmek için karmaşık sinyal ağlarını değiştirerek yanıt verir (Abreu vd. 2013). Stresin bitki dokularında neden olduğu değişimlerin/hasarların ortaya konulmasında proteomik yaklaşımlar önemlilik arz etmektedir. Bunun nedeni, transkript profillerinin, transkript ve protein seviyeleri arasındaki sınırlı korelasyonlardır (Xiong vd. 2017). Bu yüzden mRNA verilerinin önemli bir tamamlayıcısı olan proteomik, bitki biyolojisinde önemli bir yaklaşım haline gelmiştir (Xiong vd. 2017). Biyokimyasal süreçte son belirleyici faktör olan ve fonksiyon gören proteinlerin proteomik analizleri metabolik yolların anlaşılmasında önemli veriler sağlamaktadır (Li vd. 2017). Kantitatif proteomik analizler, biyolojik örneklerdeki protein bolluğunda gerçekleşen değişiklikleri anlamak için güçlü bir yaklaşımdır.

Yapraklarda toksik iyonların birikiminin azaltılması bitki büyümesi ve verim için gerekli olduğundan, tuza bağlı tepkiler çoğu proteomik çalışma kökten ziyade sürgün dokuları üzerinde gerçekleştirilmiştir (Munns ve Tester 2008, Li vd. 2015). Tuz stresi altında farklı bitki türleri üzerinde yapılan proteomik analizler gerçekleştirilmiş ve bazı tuza-duyarlı proteinlerin, bitkilerin tuz stresine tepkisinin düzenlenmesinde kritik rol oynadığı bulunmuştur (Li vd. 2015, Lakra vd. 2018, Luo vd. 2018). Yüksek tuz stresi altındaki soya fasulyesi fidelerinin yaprakları ve köklerindeki karşılaştırmalı proteomik çalışma ile tuza duyarlı proteinlerin amino asit metabolizması, karbohidrat ve enerji metabolizması, protein sentezi ve redoks homeostazı ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Ji vd. 2018).

Biyotik ve abiyotik streslere verilen bitki tepkileri, morfolojik, fizyolojik, gelişimsel ve hücrel süreçlerle ilgili karmaşık bir dizi özelliğe dayanır ve bu süreçler çeşitli çapraz yollarla bağlantılı strese duyarlı genler (proteinler) tarafından iyi kontrol edilir. Abiyotik strese yanıtta yer alan genlerin veya proteinlerin tanımlanması, sinyal aracılarının moleküler mekanizmalarını anlamak için temel bir adımdır (Trapet vd. 2015). Omik teknolojileri, bitkilerdeki abiyotik stres koşullarının tüm yönlerini göz önüne alarak, sinyal aracılı abiyotik toleransı araştırmak için entegre bir yaklaşıma izin vermektedir (Kosová vd. 2011). Proteomik analizler, küresel protein ekspresyonunun çalışılmasını kolaylaştıran ve bireysel proteinlerin spesifik olarak biyolojik işlemlerde rolü hakkında bilgi sağlayan bir araçtır (Zhang vd. 2019).

Tuzluluk fotosentez, protein sentezi ve enerji metabolizması gibi birçok metabolik yolu etkiler (Abd El-Mageed vd. 2018). NaCl stresi altında, yonca kök ve sürgünlerinde fotosentezde yer alan sekiz proteinin bolluklarında değişim tespit edilmiştir (Xiong vd. 2017). Bu araştırmada, ışık reaksiyonlarında rol oynayan üç tilakoid membran proteini (sitokrom b₆f kompleksi, demir kükürt (Cyt b₆/f) ve klorofil a/b bağlayıcı protein) ve kloroplast oksijen geliştirici protein 1 (OEE1)'in azalan yönde ifade edildiği bildirilmiştir. *Prunella vulgaris*'de, DNA yapısını stabilize eden ve doğrudan proteinlerin transkripsiyonunu arttıran H2A 6 ve H2A 10 proteinlerinin tuz stresi altında azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Liu vd. 2019). Aynı araştırmacılar, tuz stresi altında, kalsiyum sinyalleme yolağı ile ilgili protein çeşitlerinin çoğundaki artışın, yüksek tuzluluğa tepkide önemli ve pozitif bir rol oynadığını belirtilmişlerdir.

Tuz stresi ile teşvik edilmiş bitkileri proteomundaki değişimleri konu alan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (Kosová vd. 2018). Tuz stresi koşullarında, soya fasulyesi (*Glycine max* L.) yaprak, hipokotil ve kökleri (Sobhanian vd. 2010), sürünen bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) yaprakları ve kökleri (Xu vd. 2010) ve pirinç (*Oryza sativa* L.) yaprakları ve kökleri (Liu vd. 2014), kanola kökleri (Kholghi vd. 2018), susam fideleri (Zhang vd. 2019) gibi çalışmalarda protein profillerindeki değişimler araştırılmıştır. Tuz stresi altında, farklı dokulardaki protein yanıtlarının çeşitlilik gösterdiği ve bazı proteinlerin dokuya özgü artış gösterdiği bildirilmiştir (Xiong vd. 2017).

2.3 Nitrik Oksit

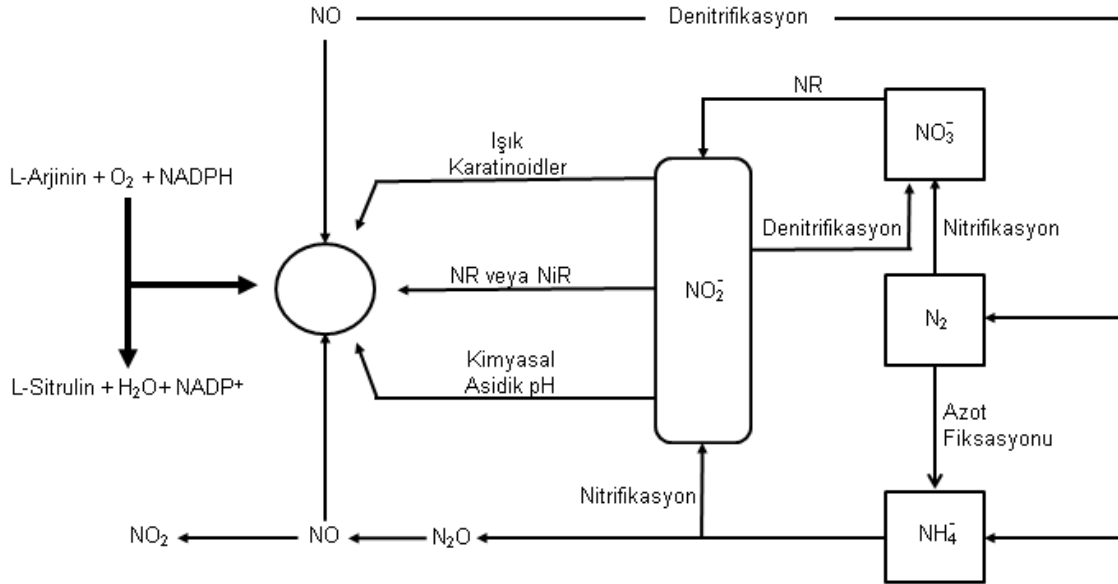
2.3.1 Nitrik Oksit Kimyasal Özellikleri

Nitrik oksit (NO, azot monoksit), bir mol azot ile bir mol oksijen atomunun birleşmesiyle oluşur. Renksiz ve gaz yapıda olan NO, lipofilik özelliği nedeniyle hücre zarlarından kolayca difüze olabilir. NO, küçük boyutlu, serbest radikal, kısa ömürlü ve oldukça dağınık bir yapıda olmasıyla karakterize edilir (Shao vd. 2018). Ayrıca serbest radikal olduğundan başka moleküllerle reaksiyonlara girebilir ve birkaç saniye yarı ömrü olan haberci moleküldür (Durner ve Klessig 1999, Neill vd. 2003). NO tek başına yüksek konsantrasyonlarda bile hücrelere zarar vermez (Pryor ve Squadrito 1995). Ancak hücrelerde kontrolsüz üretim ile artan NO, süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitriti (ONOO⁻) meydana getirmesi sonucunda toksik etki gösterebilmektedir.

2.3.2 Nitrik Oksit Biyosentezi

Enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile NO sentezlenir (Wojtaszek 2000). Enzimatik yollardan biri, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-argininin NO ve L-sitruiline dönüşümünün katalizlenmesidir (Şekil 2.1) (Barroso vd. 1999). Tütün, soya fasulyesi, mısır, bezelyede biyokimyasal, immunolojik ve moleküler teknikler kullanılarak kloroplast ve peroksizomların matriksinde NOS aktivitesi belirlenmiştir (Del Rio vd. 2004). Diğer enzimatik yol ise nitrattan enzimatik NO üretimi, nitrat redüktaz (NR), nitrit-NO redüktaz (Ni-NOR), ksantin oksidaz (XOR) ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri ile gerçekleştirilir (Şekil 2.1) (Bollmann vd. 1999). NO üretiminin başlıca kaynağı NADP(H)-bağımlı nitrat redüktaz (NR) enzimidir (Wu ve Brosnan 1992). Kofaktör olarak molibden (Mo) içeren bu enzim elektron vericisi NADP(H)'ı kullanarak NO₂⁻'den NO üretimini katalizlemektedir (Rockel vd. 2002). Bitkilerde NO üretiminde ksantin oksidoredüktaz (XOR), peroksidaz, sitokrom P450 ve bazı Fe içeren proteinler rol oynar. XOR'ın bezelye yaprak peroksizomlarında bulunduğu ve haberci molekül olarak NO üretiminde rol oynadığı gösterilmiştir

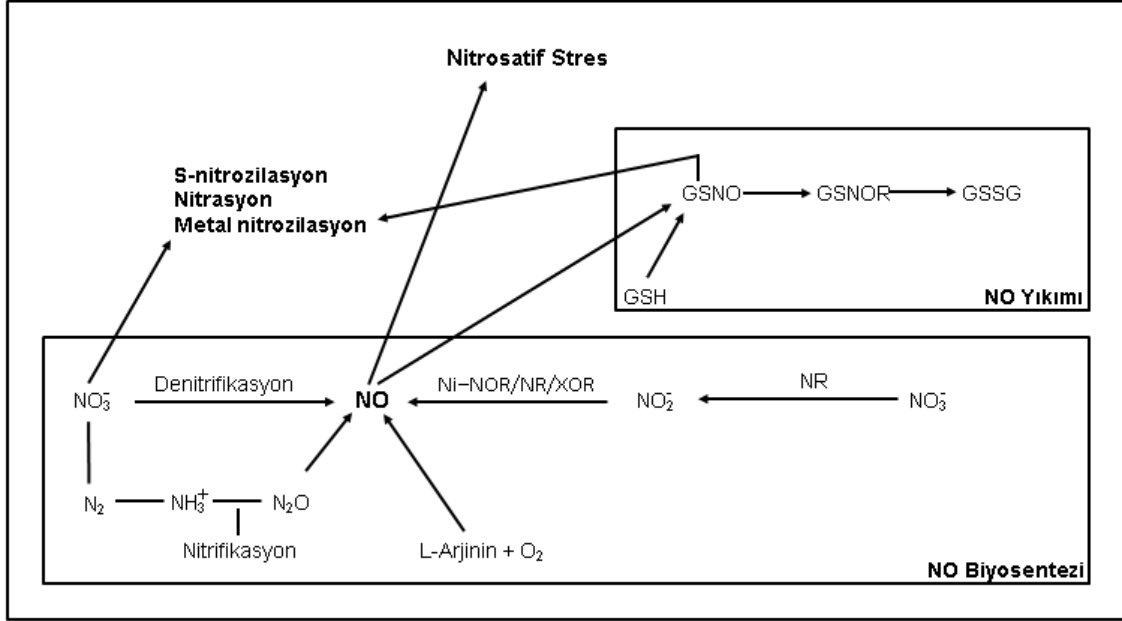
(Corpas vd. 2004). Peroksidaz enziminin N-hidroksiarginin ve H_2O_2 'den NO ürettiği bildirilmiştir (Veicht 2004).



Şekil 2.1 NO'nin muhtemel biyosentez yolları (Wojtaszek 2000'den değiştirilerek)

Nitrifikasyon ve denitrifikasyon diğer bir alternatif kaynak olarak en önemli NO üretim sürecidir (Şekil 2.2.) (Bollmann vd. 1999). Bununla birlikte, bitkilere dışsal sodyum nitropurissid (SNP) ve S-nitroso-N-asetil-penisilamin (SNAP) gibi uygulamalar ile NO enzimatik olmayan şekilde de bitkiye kazandırılabilir (Leshem 1996). NO biyolojik sistemlerde O₂ ile kuvvetli reaksiyona girdiğinde nitrozonyum iyonu (NO⁺), nitroksil anyonu (NO⁻), nitrit (NO₂⁻), nitrat (NO₃⁻), peroksinitrit (ONOO⁻) gibi "aktif azot oksit türleri" meydana gelir. Lipid, protein ve DNA'da yıkıma neden olan, güçlü oksidan özellik gösteren peroksinitrit gibi radikal özellik taşıyan azot oksit türleri aktif ve kısa ömürlü iken, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) ise NO oksidasyonunun kararlı son ürünleridir (Yamasaki vd. 1999, Garcés vd. 2001). Hücrede NO aktif oksijen türleriyle (H₂O₂, OH⁻, O₂⁻, ONOO⁻ vb.) kimyasal reaksiyona girdiğinde ise toksik ya da koruyucu etki gösterir. Ayrıca NO ve hücre içi glutatyon, askorbat, karotinoidler gibi antioksidanlar ile antioksidan enzimler arasında dolaylı bir koruyucu sinyal iletim yolu mevcuttur (Beligni ve Lamattina 1999). NO üretimi ve salınması aşırı miktardaki serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması için etkili detoksifikasyon

mekanizmalarından biridir (Gould vd. 2003). NO kolaylıkla difüze olabilmekte ve uzun ya da kısa mesafede NO öncü maddeleri olarak taşınmaktadır (Jackson 2002). Örneğin, bitki hücrelerinde NO'nun öncü maddesi olan nitritin ksilem yolu ile taşındığı bilinmektedir (Desikan vd. 2001).



Şekil 2.2 Bitki hücrelerinde NO biyosentezi. Bitkilerde nitrik oksitin ortadan kaldırılması ve detoksifikasyonu GSNO, S-nitrosoglutatyon, GSH, İndirgenmiş Glutatyon, GR, Glutatyon Redüktaz, GSNOR, S-nitrosoglutatyon redüktaz, GSSG, Okside olmuş Glutatyon.

Bitkilerde NO sinyal mekanizmasının süreçleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Literatür bilgilerine göre NO için bugüne kadar spesifik bir reseptörün varlığı kanıtlanamamıştır (Neill vd. 2003). Bununla birlikte, hücreler NO'e oldukça duyarlıdır ve varlığında çeşitli hücresel aktiviteler gerçekleşir. NO, sinyal iletim yolunda iyon kanal proteinleri ve onların gen ifadelerini düzenleyen proteinleri doğrudan aktivite ettiği gibi protein kinazlar, iyon kanalları, ikincil haberci üreten enzimler gibi sinyal proteinleriyle de dolaylı yoldan etkileşebilir (Neill vd. 2003, Crawford ve Guo 2005, Kolla ve Raghavendra 2007). Genellikle NO sinyal mekanizması, ikincil haberci olan cGMP'ye bağımlı ve cGMP'den bağımsız olarak iki şekilde oluşmaktadır (Bogdan 2001). cGMP bağımlı yolda, GTP'den cGMP sentezini sağlayan guanil siklaz (GC) enzimini aktive ederek, cGMP miktarını artırır. Böylece artan cGMP diğer bir ikincil

haberci olan cADPR aktivitesini arttırarak sitozolik kalsiyum seviyelerini yükseltir. Ayrıca hücre içinde cGMP'nin diğer bir hedefi de protein kinazları aktive etmektir (Honda vd. 2001, Trewavas vd. 2002). cGMP'den bağımsız yolda ise demir, bakır, çinko gibi metal ya da tiyol içeren proteinler NO'nin en önemli hücrel hedefleridir (Beligni ve Lamattina 2001a, Wendehenne vd. 2001).

2.3.3 Stres Koşullarında Nitrik Oksidin Büyüme ve Gelişme Üzerine Etkisi

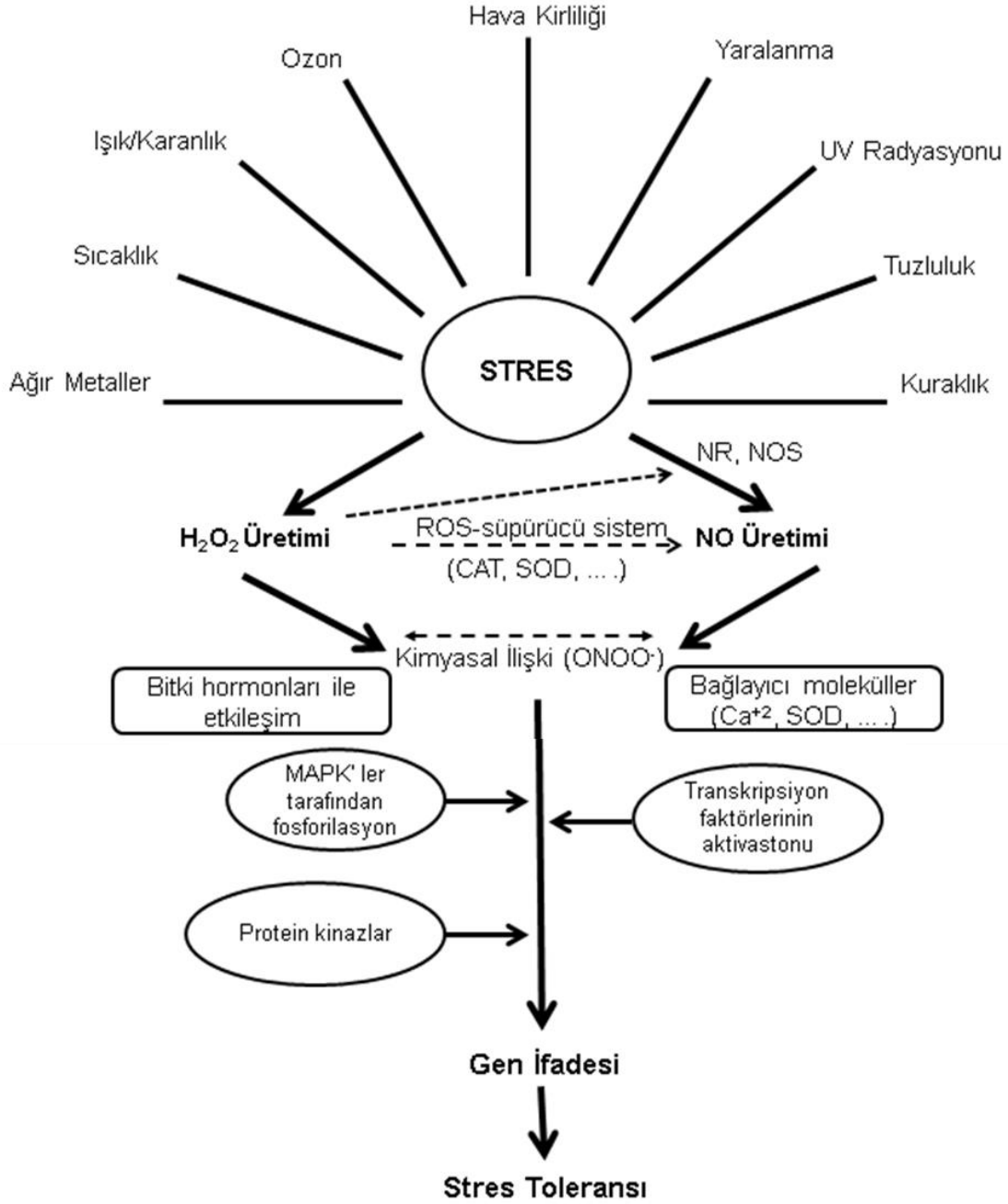
NO, patojen (Durner vd. 1998, Delledonne 2005), ışık (Beligni ve Lamattina 2001b), yerçekimi (Pedrosa ve Durzan 2000a), tuzluluk (Aytamka 2005) ve oksidatif stres (Beligni ve Lamattina 1999) gibi farklı streslere karşı oluşturulan cevaplarda bitkilerde antioksidan ve anti-stres ajan olarak rol oynamaktadır (Neill vd. 2003) (Şekil 2.3).

Stres koşulları altında yetişen bitkilerde NO miktarında ani bir artış olmaktadır (Zhang vd. 2006). Büyüme ve gelişmede NO'nin haberci bir molekül olduğu ilk kez memeli hücrelerinde belirlenmiş olup, stres cevaplarının oluşmasında da fonksiyon görmektedir. Daha sonra Anbar (1995), NO'nin bitki hücrelerinde de görev aldığı bildirmiştir. Bitkiler sadece dışsal NO'ye cevap vermezler, aynı zamanda içsel NO oluşumlarına da cevap üretirler (Wildt vd. 1997). NO sentezinin bitki türüne, dokusuna yetiştirme ortamına bağlı olarak değiştiği, sitozol, nükleus, peroksizom matriksi ve kloroplastlarda üretildiği gösterilmiştir (Barroso vd. 1999, Pedrosa vd. 2000b).

Abiyotik stres koşullarında bitkilerde NO artışının, abiyotik streslerin etkilerini hafifleten etkili uyum mekanizmalarını tetiklediği bildirilmiştir (Liao vd. 2012). NO teşvikli abiyotik toleransının gelişmiş bir antioksidan sistem ile ilişkili olduğu ve abiyotik stres koşullarında üretilen reaktif oksijen türlerini (ROS) temizlemek için bir antioksidan olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (Siddiqui vd. 2011, Domingos vd. 2015, Zhou vd. 2017).

Yüksek bitkilerde NO teşvikli abiyotik toleransın moleküler mekanizmaları hakkında çok az bilgi olduğu bildirilmiştir (Shao vd. 2018). NO ile ilgili araştırmalar artsa da NO ile ilgili olarak NO üretiminin temel kaynağı ve biyosentez mekanizması, NO'nin farklı

bitki dokularında algılanma mekanizması ve bozunma mekanizması ile ilgili tartışmalar devam etmektedir (Santisree vd. 2019).



Şekil 2.3 Bitki stres cevaplarında NO ve H₂O₂ sinyal iletiminin olası yolları (Qiao vd. 2014'den değiştirilerek).

Tohum çimlenmesinden çiçeklenmeye ve hatta meyve olgunlaşması dahil fizyolojik olaylarda NO'nın önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Carlos ve Lorenzo 2001). Bir

sinyal aracısı olarak işlev gören NO çimlenme, yaprak genişlemesi, yanal kök gelişimi, çiçeklenme ve stoma kapanması gibi birçok fizyolojik ve gelişimsel süreçte önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Shao vd. 2018). Nitrik oksit katalaz, askorbat peroksidaz ve akonitaz enzimlerinin inhibisyonu, hücre ölümü, senesens, iyon kanallarının düzenlenmesi, çeper ligninleşmesi, yaşlı hücrelerdeki mitokondri ve kloroplast işlevleri, demir birikimi gibi fizyolojik olaylarda görev yapmaktadır (Ferrer ve Ros Barcelo 1999, Pedroso vd. 2000b, Murgia vd. 2002, Garcia-Mata vd. 2003, Hung ve Kao 2003).

Yüksek bitkilerde NO'nin endojen bir olgunlaşma faktörü olduğu ve antisenesens özellik gösterdiği saptanmıştır (Leshem vd. 1998, Selçukcan 2005). Bezelye yapraklarına NO vericisi olan SNP uygulanmasının etilen biyosentezini inhibe ederek senesensi geciktirdiği kanıtlanmıştır (Leshem 2001). Ayrıca NO'nin sitokinin ile teşvik edilmiş programlanmış hücre ölümünde rol aldığı düşünülmektedir (Kakimoto 1996).

2.3.4 Stres Koşullarında Nitrik Oksitin Moleküler Düzeydeki Etkileri

Ekzojen NO donörleri veya inhibitörlerinin bitki stres tepkilerini modüle etmedeki yetenekleri genomik, proteomik ve postproteomik seviyelerdeki teknolojilerle incelendiği ifade edilmiştir (Santisree vd. 2019). NO birikiminin, stres koşulları altında ve iyileşme süreci sırasında savunma proteinlerinin gen ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Romero-Puertas vd. 2013, Fancy vd. 2017). *Gossypium hirsutum* yapraklarına sodyum nitroprussid (SNP) muamele edilerek yapılan öncü bir proteomik çalışma, çeşitli yollara ait 166 farklı şekilde eksprese edilen protein ve ardından SNP'ye cevap olarak diferansiyel olarak fosforile edilecek 167 fosfoprotein tanımlanmıştır (Fan vd. 2014). *Cicer aritinum* yaprak protein profillerinde 172 azalan ve 76 artan protein beneği belirlenmiştir (Santisree vd. 2019). NO teşvikli stres toleransının proteomik temeli anlaşılmasına çalışılmıştır (Bai vd. 2011, Sehrawat vd. 2013, Yang vd. 2013, Fan vd. 2014). Bunların sonucunda bitki stresine cevap olarak NO'nin sinyal yolağının aydınlatılmasında genomik ve proteomik çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

2.4 Tuz Stresi Toleransında Rolü Olan Diğer Bileşikler

2.4.1 Absisik Asit

Absisik asit (ABA) hormonu, bitkilerde tohum dormansisi, çimlenme, vejetatif gelişme, stomaların kapanması, çiçeklenme, meyve olgunlaşması ve senesens gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır (Kuhn ve Schroeder 2003, Umezawa vd. 2011, Finkelstein 2013). ABA'nın tuz stresi gibi abiyotik streslere karşı koruyuculuk özelliği olduğu bildirilmiştir (Etehadnia vd. 2008, Ozfidan vd. 2013). ABA'ya duyarsız ve biyosentetik mutantlarla, stresin ABA ile algılanması ve hücresel cevap oluşumu arasındaki ilişki araştırılmıştır (Bartels ve Sunkar 2005). Tuz stresi sırasında ABA miktarı artar (Szepesi vd. 2009). Bazı koruyucu genlerin sentezlenmesine aracılık eden ABA, bir hücresel sinyal molekülüdür (Hasanuzzaman vd. 2013). Tuz stresi koşullarındaki IAA içeriğinin ABA ile benzer olduğu bildirilmiştir (Ribaut ve Pilet 1994).

2.4.2 Askorbik asit

Askorbik asit, diğer antioksidantlarla birlikte, H_2O_2 ve diğer reaktif oksijen türlerini detoksifiye ederek oksidatif hasarın minimum seviyeye indirilmesine ve membranların stabilize edilmesine yardımcı olur. Askorbik asidin tuz stresi altındaki bitkilere uygulanması, çimlenme döneminde askorbat ve glutatyon içeriğinde bir artışa yol açmaktadır (Asada 1999).

2.4.3 Brassinosteroid

Brassinosteroid hormonunun tohum çimlenmesini arttırdığı (Ashraf vd. 2009, Yang vd. 2011), hücre duvarının esnekliğini artırarak hücre uzamasına neden olduğu (Sun vd. 2010) ve kök uzamasını uyardığı (Kartal vd. 2009, Yang vd. 2011) rapor edilmiştir. Grove vd. (1979), *Brassica napus* polenlerinden elde edilen ve tanımlanmamış aktif bileşikler brassinolid olarak tanımlanmış ve gelişimi teşvik edici aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. BR aynı zamanda, hücre genişlemesi, farklılaşma, polen uzaması gibi

farklı süreçlerde de rol oynar (Clouse 2002). Strese karşı toleransta BR tek başına ya da diğer bitki büyüme düzenleyicileri ile birlikte kullanılmaktadır (Divi ve Krishna 2009, Peleg ve Blumwald 2011, Hayat vd. 2012). BR'nin, bitkilerde çeşitli biyotik ve abiyotik streslere yanıtları düzenlediği bilinmektedir (Cui vd. 2011, Xia vd. 2011, Wang 2012). BR'nin bitkilerde özellikle tuz düşük ve yüksek sıcaklık gibi abiyotik streslere karşı dayanıklılığı arttırdığı gösterilmiştir (Cao ve Zhao 2008, Qu vd. 2011, Hayat vd. 2012, El-Mashad ve Mohamed 2012, Wu vd. 2014). Strese karşı toleransta BR konsantasyonunun önemli olduğunu, BR sinyalleşmesi için optimum seviyedeki BR'nin gerekli olduğu bildirilmiştir (Chinchilla vd. 2009, Kim vd. 2010, Belkadir vd. 2012, Wang 2012).

2.4.4 Glisinbetain

Ozmotik koruyucu glisinbetain (GB), stres koşulları altında hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde üretilen bir maddedir (Prasad ve Saradhi 2004). Stres altında bazı bitkiler dokularında aşırı miktarlarda GB biriktirirler. Tuz stresine bağlı olarak artan içsel GB konsantrasyonlarının ozmotik ayarlayıcı olarak görev yaptığı ve bu bitkilerde tuza karşı gösterilen toleransta önemli olduğu belirtilmiştir (Khan vd. 1998). Tuz stresine maruz bırakılan domates bitkilerine dışsal GB uygulandığında, tuz stresi koşullarında artan Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikiminin azaldığı bildirilmiştir (Heuer 2003). Tuz stresinin SOD, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin etkilerini önemli düzeyde azalttığı; fakat tuz stresi altında GB uygulamalarının katalaz ve peroksidaz aktivitesini azaltırken, SOD aktivitesini değiştirmedeği saptanmıştır (Hoque vd. 2006). Tuz stresi altındaki tuza hassas ve toleranslı çeltik çeşidine topraktan uygulanan 15 mM GB uygulamasının nispi su içeriği ve bazı antioksidan enzimlerin (superoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, katalaz, glutathione redüktaz) aktivitelerinde artışa neden olurken, peroksidaz aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Demiral ve Türkan 2004). Tuz stresine (120 mM NaCl) maruz kalan domates fidelerinin köklerine uygulanan GB (5 mM) uygulamasında kontrole göre 6 farklı stres proteininin sentezlendiği ve bu proteinlerin giberellin uygulaması sonrasında tuza karşı kazanılmış toleransa sebep oldukları bildirilmiştir (Chen vd. 2009). Raza vd. (2007), tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerine yapılan GB uygulaması (100 mM) sonucu Na^+ birikiminin kontrole

göre azaldığı, aksine K^+ ve Ca^{+2} birikimlerinin arttığı ve bunun da daha yüksek K^+/Na^+ ve Ca^{+2}/Na^+ oranlarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bitkilerde GB uygulamasının antioksidan enzim aktivitesini teşvik ettiği ve bu enzimlerin tuz stresine karşı toleransı sağladığı bildirilmiştir (Raza vd. 2007).

2.4.5 Kalsiyum

Kalsiyum, hücre membranlarında protein ve lipitlerle bağlar oluşturarak membranları kararlı hale getirmekte, hücre pH'sını etkilemekte ve hücreyi korumaktadır (Hirschi 2004). Tuzun bitki gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için temel yaklaşımlardan biri mineral besin ilavesidir. Bu bağlamda özellikle Ca ilavesinin glikofitlerde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Yan vd. 1992). Substrat ortamında yeterli Ca'un bulunması durumunda Na alımının zararı yönünde K alımını iyileştirerek K/Na seçiciliğinin K lehinde etkilendiği ifade edilmiştir (Grattan ve Grieve 1999). Kalsiyum, Na'a maruz kalmış bitkilerde dengeyi sağlayarak K taşınımının ve K/Na oranının düşmesini engeller (Rengel 1992). Cramer vd. (1986), tuzlu şartlarda kalsiyumun bitki metabolizmasını düzenlediği ve hücre zarında sodyumun Ca iyonuyla rekabet ettiğini bildirmişlerdir. Bu nedenlerle, ortamda yüksek Ca düzeylerinin hücre membranını tuzluluğun olumsuz etkilerinden koruduğunu da ifade etmişlerdir. Tuz stresine maruz bırakılan keten bitkisinde süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı, fakat tuz stresine maruz kalmış bitkilere $CaCl_2$ ve giberellik asitin tek tek ya da kombine bir şekilde uygulanması durumunda tuzluluğun zararlı etkisinin azaldığı bildirilmiştir (Nasir Khan vd. 2010).

2.4.6 Prolin

Prolin birikimi ile stres toleransı arasında pozitif ilişki olduğu ifade edilmektedir (Wyn 1981, Ashraf 1994). Prolin, strese maruz kalmış olan bitkilerde ozmotik dengenin sağlanmasında ve hücre içi yapıların korunmasında etkili rol oynamaktadır (Lutts vd. 1996, Kumar vd. 2003). Prolin, hücre içi ozmotik düzenleyici (Delauney ve Verma 1993), stres koşullarında miktarlarındaki artışla sitozolik pH düzenleyici (Venekamp 1989), enzim koruyucusu ve makromoleküller ile organellerin yapısını stabilize edici

(Gadallah 1999) aktivite gösterdiği ileri sürülmektedir. Prolin, kullanılabilir N birikimini düzenlediği (Wyn 1981, Ashraf 1994) membran kararlılığına katkı sağladığı (Rudolph vd. 1986, Gadallah 1999) ve hücre membranında parçalanmaya sebep olan NaCl'nin etkisini hafiflettiği (Mansour 1998) bildirilmiştir. Tuza ve kuraklığa toleransın arttırılmasında prolin biyosentezinde görevli enzim olan P5CS (Prolin-5-karboksilat sentaz) gibi bazı stresle ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transgenik bitkilerdeki ifadelerinin arttırılması önemli bulunmuştur (Kishor vd. 1995, Çelik ve Atak 2012).

2.4.7 Silisyum

Silisyum bitki beslenmesi üzerindeki rolü iyi anlaşılmamış birçok metabolik, fizyolojik aktivitelerde önemli roller oynayan bir elementtir (Epstein 1994). Silisyumun bitki gelişimi üzerine yararlı etkisi hücre çeperinin sağlamlaştırılmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Inanaga ve Okasaka 1995, Epstein 1999). Tuz stresi, metal toksisitesi, kuraklık stresi, radyasyon zararını azaltan silisyum, çeşitli hastalıklar, besin dengesizliği, yüksek sıcaklık ve don zararını önleyerek faydalı etkiler göstermektedir (Hanafy vd. 2008). Silisyum, tuz stresi koşullarında etileni uyararak süperoksit dismutaz aktivitesini artırdığı ve böylece hücrede lipidlerin peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerini baskıladığı bildirilmiştir (Alexieva vd. 2003, Edreva 2005). Bitkilerin silisyum içerikleri ile katalaz ve askorbat peroksidaz enzim aktivitesi arasında pozitif korelasyonun bulunduğu ve silisyumun antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak hıyar bitkisinde hastalığa ve oksidatif strese dayanıklılığı belirtilmiştir (Mohaghegh vd. 2011). Amirossadat vd. (2012), torf-perlit ortamında tuz uygulamaları koşullarında yetiştirilen hıyar bitkisine sodyum silikat (0-25-50-75 ve 100 mg/L) uyguladıklarında, bitki dayanıklılığının ve klorofil içeriğinin arttığı, fakat bitki boyunun azaldığını tespit etmişlerdir. Tuz stresine maruz kalmış gül bitkisinde silisyum uygulamasının malondialdehit içeriğini azalttığı, çiçek sayısını arttırdığı, yaprak yüzey alanı üzerindeki olumsuz etkileri azalttığı bildirilmiştir (Reezi vd. 2009). Silisyum Na alınımını azaltarak veya antioksidan enzim aktivitesini arttırarak bitkide tuz stresini önlediği belirtilmiştir (Liang 1998, Liang vd. 2002, Zhu vd. 2004).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali

Bitki materyali olarak Buğdaygiller(Poaceae ya da Gramineae) familyasının *Hordeum vulgare* türünün Tarm-92 çeşidi kullanılmıştır. Tarm- 92 yatmaya dayanıklı, kurak ve mikro element (çinko ve bor) toksisitesine toleranslı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, ekim nöbetinde en istikrarlı, orta-erkenci, başak kırıcılığı yok ve kolay harmanlanabilir bir çeşittir. İki sıralı, kılçıklı, uzun başaklı, kavuzlu-beyaz taneli, ince uzun yapraklı, bitki boyu 90-100 cm arasında olan morfolojik özelliklere sahiptir. Bin tane ağırlığı 40-45 g; protein oranı %10-12; elek üstü (2.5 mm <) %85 ve biyolojik değeri orta (%74.9)'dır (İnt. Kyn. 3).

3.2 Bitki Yetiştirme Koşulları ve Stres Uygulaması

Arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Tarm-92) çeşidine ait tohumlar Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu 5 dakika süreyle %1 sodyum hipoklorür çözeltisi ile yapıldıktan sonra tohumlar 5 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Steril edilen tohumlar içerisinde distile su ile ıslatılmış iki kat filtre kağıdı bulunan 20×11.5×5 cm boyutlarında şeffaf plastikten yapılmış çimlendirme kaplarında kontrollü iklim kabini (23°C, karanlık, %60 nem) 48 saat çimlendirilmiştir. Yaklaşık aynı kök uzunluğuna sahip çimlenmiş tohumlar seçilmiş drenajlı polistren tüplere (yaklaşık 50 cm³) ekilmiştir. Bu tüpler, 0.5 L besin çözeltisi [(mM), 2.4 Ca(NO₃)₂, 1.0 KH₂PO₄, 3.0 KNO₃, 1.0 MgSO₄ ve 0.5 NaCl, (μM), 23.1 H₃BO₃, 4.6 MnCl₂, 0.38 ZnSO₄, 0.16 CuSO₄, 0.052 H₂MoO₄ ve 44.8 FeEDTA; pH, 6.0] içeren 1 L'lik plastik saksıların kapaklarındaki deliklere yerleştirilmiştir. Fideler 3 gün daha kontrollü iklim kabini içinde hidroponik kültür ortamında bitki yetiştirme kabini (23°C, 14:10 foroperiyot, 250 μmol m⁻² s⁻¹ ışık şiddeti ve %60 nem) büyütülmüştür. Hidroponik olarak büyütülen fideler 48 saat 200 μM sodyum nitroprussid (SNP) ön uygulamasına maruz bırakılmıştır. SNP uygulaması kök ortamına SNP'nin ilavesiyle sağlanmıştır. SNP uygulamasından sonra fideler 100 mM NaCl uygulamasına maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak 4 farklı uygulama grubu

oluşturulmuştur, (1) Kontrol (0 μ M SNP ve 0 mM NaCl), SNP (200 μ M SNP ve 0 mM NaCl), NaCl (0 μ M SNP ve 100 mM NaCl) ve SNP+NaCl (200 μ M SNP ve 100 mM NaCl). Tuz uygulamasının 7. Gününde, fidelerin büyüme parametreleri (sürgün ve kök taze ve kuru ağırlıkları) belirlenmiştir. Uygulamalar sonucunda elde edilen fidelerin yaprak dokuları sıvı azot ile dondurulmuş ve analizlere kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.3 Protein Ekstrasyonu

Tuz stresine maruz bırakılan arpa çeşidine ait fidelerin taze yaprak dokularından proteinlerin ekstraksiyonu fenol ekstraksiyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Hurkman ve Tanaka 1986, Ahsan vd. 2008). Yaprak örnekleri (2 g) sıvı azot kullanılarak havan içerisinde iyice öğütülmüş ve 5 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponunda [0.5 M Tris-HCl (pH 8.3), %2 v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, %2 v/v β -merkaptoetanol, 1 mM fenilmetansülfonil florid ve 0.7 M sukroz] homojenize edilmiştir (Kim vd. 2001). Her bir uygulama grubu için üç tekrarlı olacak şekilde elde edilen homojenizatlar falkon tüplerine transfer edilmiş ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra homojenizata eşit hacimde Tris-HCl ile doyurulmuş fenol solüsyonu eklenmiş ve 10 dakika boyunca laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra $3.500 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra üst kısımda kalan fenol faz temiz bir tüpe alınmış ve eş hacimde ekstraksiyon tamponu ilave edildikten sonra 10 dakika laboratuvar koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler $3.500 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan fenol faz temiz bir falkon tüpüne transfer edilmiştir. Proteinlerin çöktürülmesi için tüplere 0.1 M amonyum asetat içeren 4 hacim soğuk metanol ilave edilmiş ve -20°C 'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu periyot sonunda çöktürülmüş proteinler 10 dakika $3.500 \times g$ 'de santrifüj edilmiş ve elde edilen protein peleti 3 kez 0.1 M amonyum asetat içeren soğuk metanol ile yıkanmıştır. Her yıkama basamağında tüpler 10 dakika $3.500 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Son yıkama basamağından sonra tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutularak kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır. Peletler lizis tamponunda (7 M urea, 2 M thiourea, %4 (w/v) CHAPS, 40 mM DTT ve %0.2 Ampholyte pH 3-10) çözünmüş ve peletlerdeki protein

miktarları Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.4 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Çözünebilir protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektroforezi (İzoelektrik Fokuslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, IEF/SDS-PAGE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforezin ilk yönü olan IEF'de, Protean IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde IPG (immobilized pH gradient) stripleri (pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmıştır. Protein peletleri rehidrasyon tamponunda çözünmüş ve 1 saat laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra 10 dakika 10.000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Görüntü analizlerinde kullanılacak analitik jeller için 80 μg protein, kütle spektrometrisi analizleri için kullanılacak jeller ise 500 μg protein olacak şekilde IPG striplere yüklenmiştir. Rehidrasyon işlemi laboratuvar koşullarında 16 saat olacak şekilde pasif olarak gerçekleştirilmiştir. Rehidrasyon işleminin ardından IPG stripler Protean IEF Cell sistemine transfer edilmiş ve toplamda 80.000 Vh olacak şekilde IEF işlemi gerçekleştirilmiştir.

IEF'den sonra stripler 15 dakika dengeleme solüsyonu I [6 M urea, 0.375 M Tris HCl, pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve 15 dakika dengeleme solüsyonu II [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2.5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir. Dengeleme basamağından sonra ikinci yön olan SDS-PAGE %12'lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl tamponu, pH 8.8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED) Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir. 2-D elektroforez PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad)'de gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak 14.4-97.4 kDa aralığında SDS-PAGE standardı (Bio-Rad) kullanılmıştır. 2-D elektroforez işleminde sonra jeller gümüş boyama işlemine kadar fiksatif (%30 etanol ve %10 glasiyal asetik asit) içerisinde saklanmıştır.

3.5 Jellerin Boyanması ve Görüntü Analizleri

Analitik jellerdeki protein benekleri gümüş boyama kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Sinha vd. 2001). Fiksasyon basamağını takiben jeller hassaslaştırma çözeltisi (3 g/L potasyum tetratiyonat, 0.5 M potasyum asetat, %30 etanol) ile muamele edilmiştir. Jeller yıkandıktan sonra gümüş nitrat çözeltisinde (2 g/L AgNO₃) inkübe edilmiştir. Jeller yıkandıktan sonra geliştirme çözeltisinde (30 g/L potasyum karbonat, 300 µL/L %40 formaldehit, 125 µL/L %10 sodyum tiyosülfat) benekler görünür hale gelinceye kadar inkübe edilmiştir. Son olarak, jeller durdurma çözeltisi (40 g/L Tris, 20 mL/L asetik asit) ile muamele edilmiştir. Bununla birlikte, kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılacak protein benekleri blue-silver boyama protokolü kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Candiano vd. 2004). Blue-silver boyama protokolü için jeller fiksatif (%50 etanol ve %2 fosforik asit) içerisinde gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller iki kez distile su ile yıkandıktan sonra boya solüsyonunda (%0.12 coomassie brilliant blue G-250, %10 amonyum sülfat, %10 fosforik asit ve %20 metanol) bir gece inkübe edilmiştir. Boyamayı takiben jeller birkaç kez distile su ile yıkanarak arka zemindeki fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Gümüş ve CBB boyalı jeller ChemiDoc™ MP jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. Farklı şekilde ifade olan protein benekleri (yeni sentezlenen, sentezi kaybolan, sentezi artan ve/veya azalan) PDQuest yazılımı (versiyon 8.0.1, Bio-Rad) ile saptanmış ve nispi hacimleri temelinde miktarları belirlenmiştir. Belirli bir protein beneğinin yoğunluğu, jel görüntüsündeki beneği oluşturan tüm piksellerin toplam yoğunluğu olarak tanımlanan protein hacmi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, protein miktar tayini, örnek yükleme veya jel boyama basamaklarında meydana gelebilecek olası hataları telafi etmek için her bir protein beneğinin hacmi, jelde bulunan tüm protein beneklerinin toplam hacminin yüzdesi olacak şekilde normalize edilmiştir.

3.6 Jelde Triptik Kesim

Seçilmiş protein benekleri CBB boyalı jellerden steril bisturi kullanılarak elle kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için In-Gel Tryptic Digestion Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Fazla boyanın uzaklaştırılması

için kesilen jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C’de 30 dakika muamele edilmiştir. Boya uzaklaştırma çözeltisi tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra indirgeme ve alkilasyon basamaklarına geçilmiştir. İndirgeme basamağı için jel parçacıkları 50 mM Tris(2-karboksietil)fosfin çözeltisi içeren 2 g/L amonyum bikarbonat çözeltisi ile 60°C’de 10 dakika muamele edilmiştir. Bu periyod sonunda indirgeme çözeltisi uzaklaştırılmış ve alkilasyon için jel parçacıkları 100 mM iodoasetamid ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Alkilasyon tamponu uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C’de 15 dakika muamele edilmiştir. Jel parçalarını dehidrate etmek için örnekler konsantre asetonitril ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Asetonitril çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş jel parçacıkları üzerine aktive edilmiş tripsin (10 ng/μL) eklenmiş ve 30°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler sonikatörlü su banyosunda 15 dk inkübe edildikten sonra içerisindeki solüsyon yeni bir tüp alınmıştır. Geriye kalan jel parçaları üzerine %10 trifloroasetik asit (TFA) eklenmiş ve sonikatörlü su banyosunda 15 dk daha inkübe edilmiştir. Tüplerin içerisindeki solüsyonlar bir önceki basamakta elde edilen solüsyonlar ile birleştirilmiş ve vakum konsantratör (Eppendorf, Germany) ile kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş örnekler 10 μL %0.1’lik TFA ile yeniden süspanse edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.7 Kütle Spektrometresi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0.1’lik TFA’da çözünmüş peptidler ZipTip C18 (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid solüsyonları, %50 asetonitril ve %0.1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L⁻¹ α-cyano-4-hydroxycinnamic asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 μL solüsyon MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sceix TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Her bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1

kV'lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Öncü MS spektrumları için internal kalibrasyon olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. MS verileri GPS Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak veri tabanlarına karşı aranmıştır. Arama kriterleri olarak Çizelge 3.1'deki parametreler kullanılmıştır. Veri tabanı taraması SwissProt protein veri tabanına karşı yapılmıştır. MS/MS verileri için %95'den daha büyük olarak belirlenen önemli derecede yüksek MASCOT skorları, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3.1 Protein tanımlamada kullanılan parametreler

Parametre	Açıklama
Enzim	Tripsin
Değişken modifikasyonlar	Metiyonin oksidasyonu
Sabit modifikasyonlar	Sistein karbamidometilasyonu
peptid toleransı	50 ppm
MS/MS toleransı	0.4 Da
Taksonomi	Viridiplantae (yeşil bitkiler)
Cihaz	MALDI-TOF/TOF

Protein-protein etkileşim ağlarının ortaya konulması için mevcut çalışmada tanımlanan proteinler STRING 11.0 ile analiz edilmiştir (Szklarczyk vd. 2011). Tanımlanan tüm proteinler, protein etkileşimlerinin ortaya konulması için *Arabidopsis thaliana* TAIR10 protein veritabanına (<http://www.arabidopsis.org/>) karşı taranmıştır. Biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar BiNGO 3.0.3 ile tahmin edilmiştir (Maere vd. 2005). Arama parametreleri için *A. thaliana* taksonomisi seçilmiştir.

3.8 İstatistiksel Analizler

Deneyler, tamamen rastgele bir blok tasarımında düzenlenmiştir. Üç tekrarlı olarak tasarlanan tüm deneyler iki kez tekrar edilmiş ve değerlerin ortalaması kullanılmıştır. Fizyolojik analiz için veriler SPSS.22 (Chicago, IL, ABD) kullanılarak varyans

analizine maruz bırakılmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan'ın çoklu aralık testi kullanılarak belirlenmiştir ($P < 0.05$).



4. BULGULAR

4.1 Fide Büyümesi Üzerine Dışsal SNP ve NaCl Uygulamalarının Etkisi

Bu araştırmada, arpa fidelerinde dışsal 200 μ M SNP uygulaması ve 100 mM NaCl stresinin fide büyümesi üzerine etkisi Çizelge 4.1’de verilmiştir. NaCl stresi hem sürgün hem de kök taze ve kuru ağırlıklarında kontrole göre önemli düzeyde azalmalara neden olmuştur ($P < 0.05$). Bununla birlikte, dışsal SNP uygulaması sürgün taze ağırlığı hariç diğer tüm parametreleri kontrol seviyesine veya üzerine getirmiştir. Diğer taraftan, dışsal SNP uygulaması kontrole göre büyüme parametrelerinde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Arpanın sürgün ve kök taze (TA) ve kuru ağırlıkları (KA) üzerine farklı SNP ve NaCl uygulamalarının etkisi

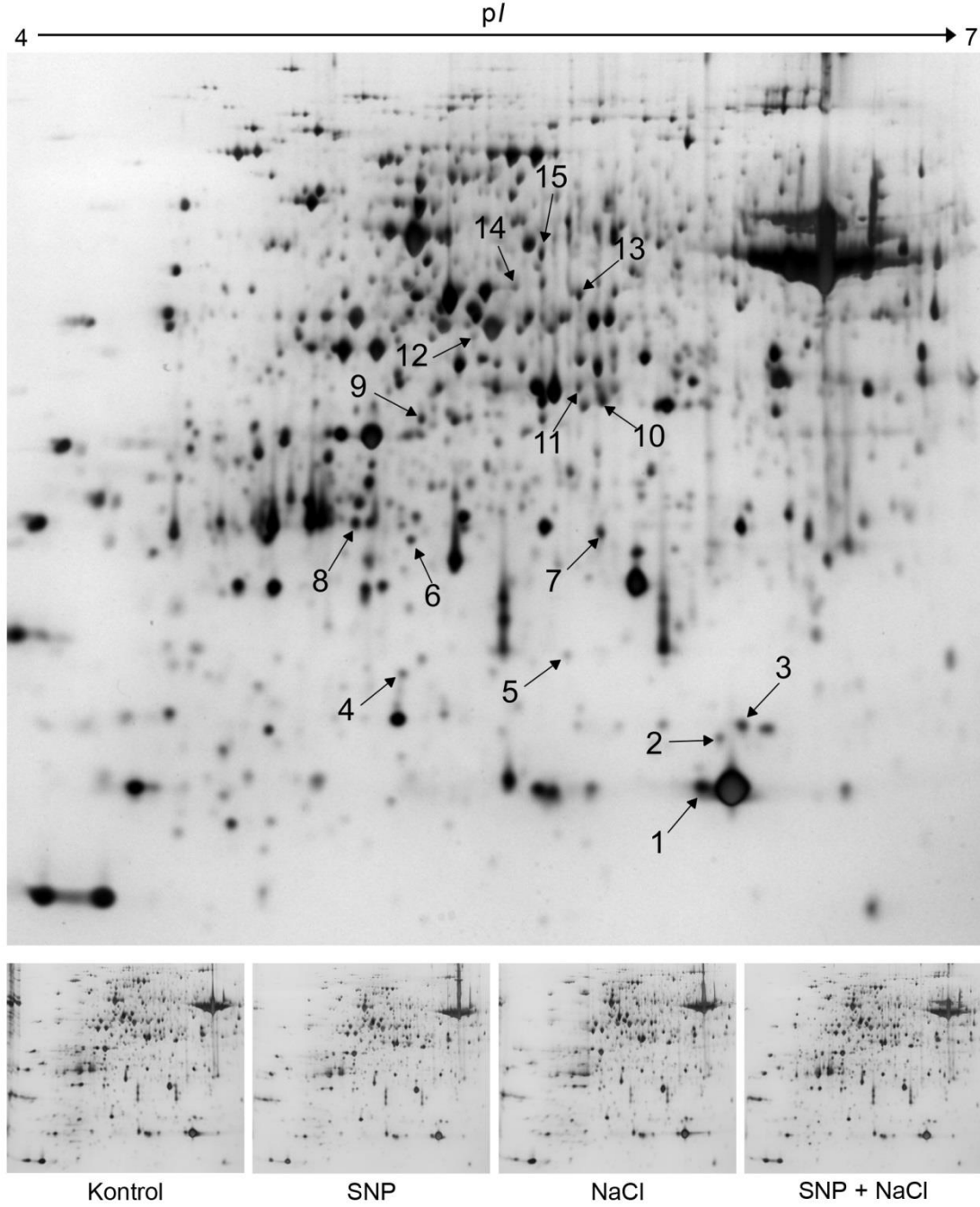
Uygulamalar	Sürgün TA	Sürgün KA	Kök TA	Kök KA
	mg fide ⁻¹			
Kontrol	647 $\pm$ 26 ^{b*}	63.7 $\pm$ 1.2 ^a	223 $\pm$ 8.6 ^b	14.0 $\pm$ 0.4 ^b
SNP	737 $\pm$ 25 ^a	68.2 $\pm$ 2.4 ^a	249 $\pm$ 13.9 ^a	16.3 $\pm$ 0.2 ^a
NaCl	409 $\pm$ 36 ^d	49.4 $\pm$ 2.6 ^b	160 $\pm$ 15.3 ^c	12.4 $\pm$ 0.8 ^c
SNP + NaCl	542 $\pm$ 21 ^c	64.0 $\pm$ 4.9 ^a	233 $\pm$ 6.4 ^{ab}	16.4 $\pm$ 1.0 ^a

* Her bir sütundaki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre uygulamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$). Her bir değer, her tekrarda 10 fidenin örneklediği altı tekrarın ortalamasıdır. Standart hata ($\pm$ SH).

4.2 Proteom Değişimleri Dışsal SNP ve NaCl Uygulamalarının Etkisi

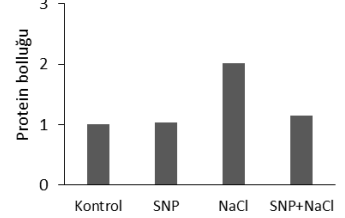
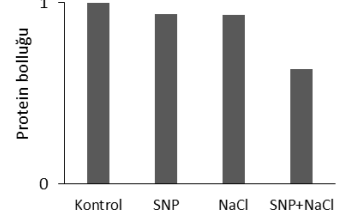
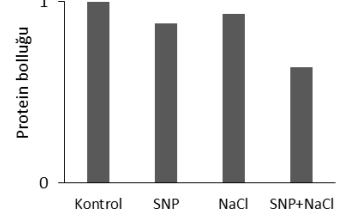
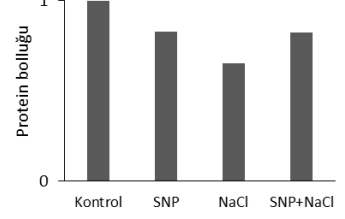
Bu araştırmada, kontrol, SNP, NaCl ve SNP+NaCl uygulamalarından elde edilen arpa fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin 3 tekrarlı profilleri 2-D (IEF/SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen 2-D jel profillerinde, proteinlerin ifadesindeki değişimler PDQuest programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu programla, ifade profilinde nispi bolluğu 1.5 kat veya daha fazla olan 24 protein beneği yaprak dokusunda belirlenmiştir. Bu protein benekleri jellerden kesilip triptik kesime maruz bırakılmış ve MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile analiz

edilip, Swiss-Prot veri tabanına karşı tarandığında, 15 protein beneği başarılı şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.2).

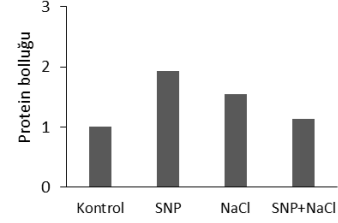
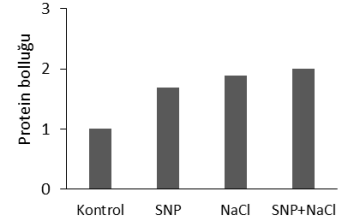
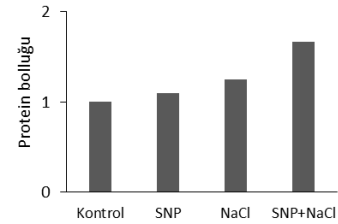
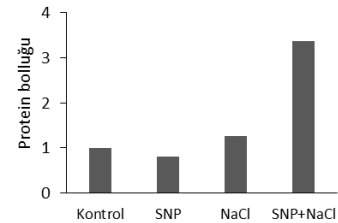


Şekil 4.1 Kontrol, SNP, NaCl ve SNP+NaCl uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri. Total proteinler (80 µg) 17 cm'lik IPG striplere (pH 4-7) yüklenmiş ve SDS-PAJE %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Jel profillerinde oklar ile gösterilmiş ve numaralandırılmış (1-15) proteinler artan ya da azalan şekilde ifade olan proteinlerdir (Çizelge 4.2).

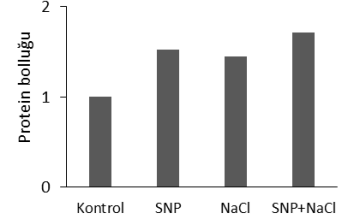
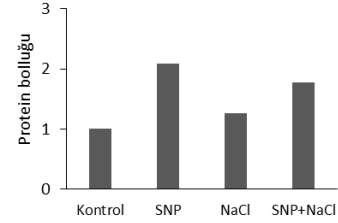
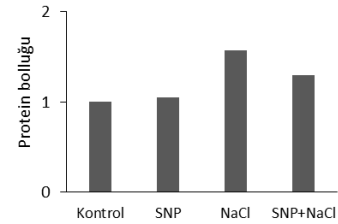
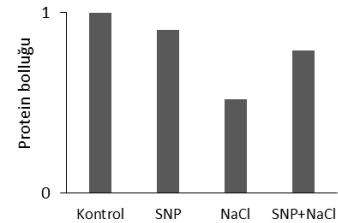
Çizelge 4.2 SNP ve/veya NaCl uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler.

Benek ^a	Aksesyon ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA/pI ^e	Örtüşme ^f	EP ^g	Protein bolluğu ^h
1	RBS_HORVU	RuBisCO küçük altbirim	293	19.4/8.98	%55	22	
2	RBS_HORVU	RuBisCO küçük altbirim	52	19.4/8.98	%27	8	
3	UCRIA_WHEAT	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt altbirimi	264	23.7/8.47	%57	15	
4	RBL_HORVU	RuBisCO büyük altbirim	316	53.0/6.22	%13	14	

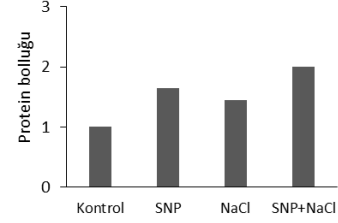
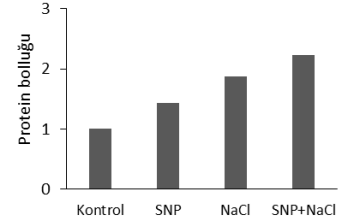
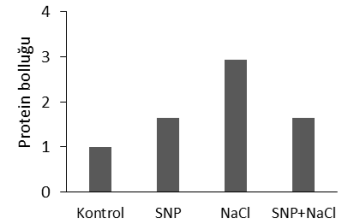
Çizelge 4.4 Devamı

Benek ^a	Aksesyon ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA/pI ^e	Örtüşme ^f	EP ^g	Protein bolluğu ^h
5	IF5A3_ARATH	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A-3	60	17.2/5.56	%32	7	
6	CH10C_ARATH	20 kDa şaperonin	47	26.8/8.86	%11	4	
7	PSB2_ORYSJ	Proteazom altbirim beta tip-2	63	23.5/5.42	%16	5	
8	BAS1_HORVU	2-Cys peroksiredoksin BAS1	83	23.3/5.48	%23	13	

Çizelge 4.4 Devamı

Benek ^a	Aksesyon ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA/pI ^e	Örtüşme ^f	EP ^g	Protein bolluğu ^h
9	THI41_MAIZE	Tiyazol biyosentetik enzim 1-1	260	37.1/5.22	%24	17	
10	FENR1_PEA	Feredoksin-NADP redüktaz	203	40.2/8.56	%31	19	
11	ALFC_ORYSJ	Fruktoz-bifosfat aldolaz	146	41.9/6.38	%16	11	
12	RCAA_HORVU	RuBisCO aktivaz A	246	51.0/8.04	%29	26	

Çizelge 4.4 Devamı

Benek ^a	Aksesyon ^b	Protein ^c	Skor ^d	MA/pI ^e	Örtüşme ^f	EP ^g	Protein bolluğu ^h
13	METK3_HORVU	S-adenozilmetiyonin sentetaz 3	160	42.7/5.51	%33	17	
14	EFTU_PEA	Uzama faktörü Tu	209	53.0/6.62	%12	8	
15	DCE_SOLLC	Glutamat dekarboksilaz	92	56.7/5.97	%9	8	

^a 2-D jellerde gösterilen benek numarasını ifade eder (Şekil 4.1).

^b SwissProt veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen aksesyon numarasını ifade eder.

^c SwissProt veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen proteini ve tanımlandığı bitki türünü ifade eder.

^d MS analizleri ve MASCOT taraması temelinde yapılan protein tanımlaması için olasılık skorunu ifade eder.

^e Tanımlanan protein için moleküler ağırlığı (MA, kDa) ve izoelektrik noktasını (pI) ifade eder.

^f Tanımlanan protein için örtüşen protein dizisinin yüzdesini ifade eder.

^g Eşleşen peptid sayısını ifade eder.

^h Uygulamalara bağlı olarak protein bolluğundaki değişimleri ifade eder.

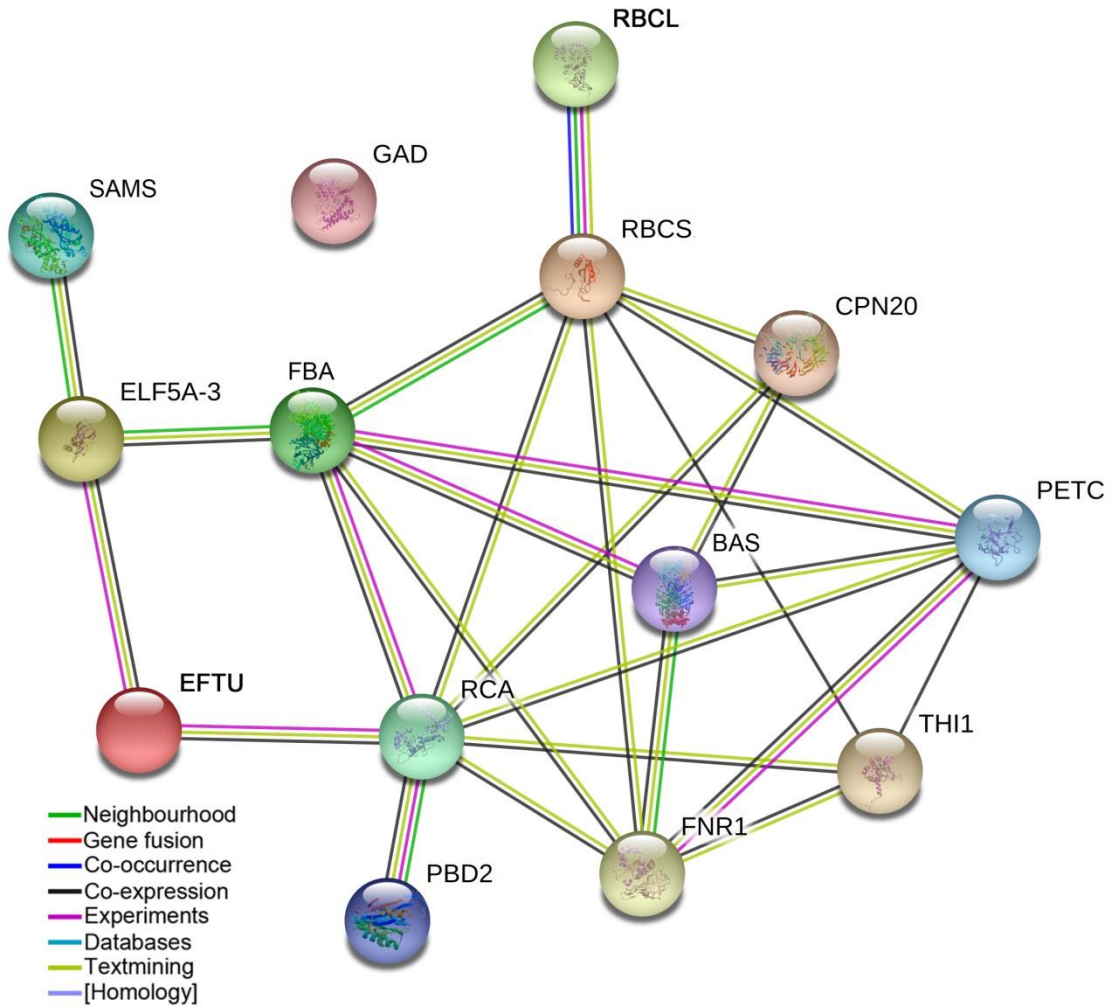
Yaprak dokusunda tanımlanan 15 protein fizyolojik fonksiyonlarına göre fotosentez, protein metabolizması, stres savunma, enerji metabolizması ve primer metabolizma gibi kategorilere sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.3). Mevcut araştırmada, fotosentez ile ilişkili 6 proteinin (benek 1, 2, 3, 4, 10 ve 12) kontrol uygulamasına göre SNP ve/veya NaCl uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1, Çizelge 4.2). Bu proteinlerden ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) küçük altbirimi (benek 1) proteinin ifade seviyesi NaCl uygulamasına artarken SNP+NaCl uygulamasında kontrol seviyesine düşmüştür. Diğer bir RuBisCO küçük altbirimi (benek 2) ve sitokrom b₆-f kompleksi demir-kükürt altbirimi (benek 3) proteinlerinin ifade seviyeleri SNP+NaCl uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Diğer taraftan, RuBisCO büyük altbirim (benek 4) ve RuBisCO aktivaz A (benek 12) proteinlerinin ifade seviyeleri NaCl uygulamasında azalırken, dışsal SNP uygulaması bu inhibisyonu azaltmıştır. Ayrıca ferredoksin-NADP redüktaz (benek 10) proteinin ifade seviyesi SNP ve SNP+NaCl uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir (Çizelge 4.2).

Protein sentezi ve metabolizması ile ilgili 4 proteinin (benek 5, 6, 7 ve 14) kontrol uygulamasına göre SNP ve/veya NaCl uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1, Çizelge 4.2). Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A-3 (benek 5) proteinin ifade seviyesi SNP ve NaCl uygulamalarında artan yönde düzenlenirken SNP+NaCl uygulamasında kontrol seviyesine düşmüştür. Proteazom altbirim beta tip-2 (benek 7) proteinin ifade seviyesi SNP+NaCl uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca 20 kDa şaperonin (benek 6) ve uzama faktörü Tu (benek 14) proteinlerinin ifade seviyesi kademeli olarak artış göstermiştir (Çizelge 4.2).

Stres savunma ile ilişkili 2-Cys peroksiredoksin BAS1 (benek 8) proteinin ifade seviyesi SNP+NaCl uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, diğer bir stres savunma ile ilişkili protein olan tiyazol biyosentetik enzim 1-1 (benek 9) proteinin ifade seviyesi SNP ve SNP+NaCl uygulamalarında artmıştır (Çizelge 4.2). Glikolizde fonksiyon gören bir protein olan fruktoz-bifosfat aldolaz (benek 11) proteininin ifadesi NaCl uygulamasında artarken, dışsal SNP uygulaması bu artışı ortadan kaldırmıştır. Metabolizma ilişkili S-adenozilmetiyonin sentetaz 3 (benek 13) proteinin ifade seviyesi SNP ve SNP+NaCl uygulamalarında artan yönde

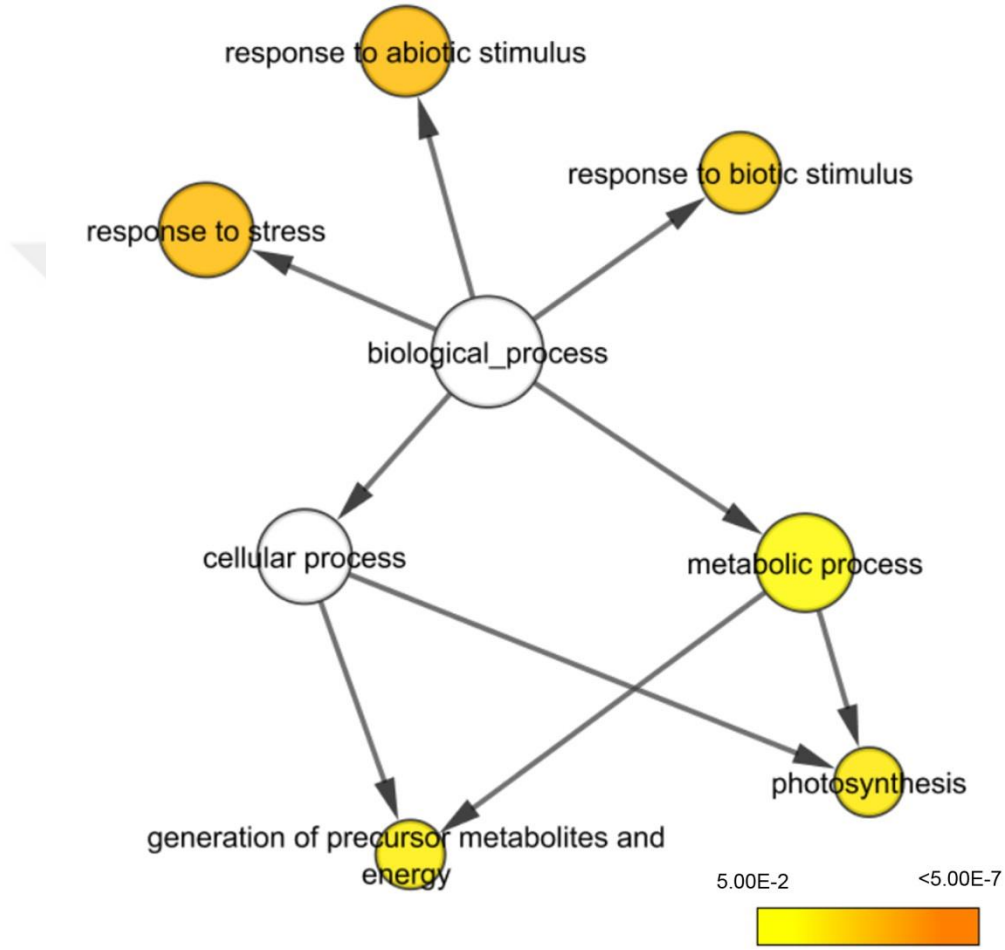
düzenlenmiştir. Son olarak, gama-aminobütirik asit (GABA) sentezinde rol oynayan glutamat dekarboksilaz (benek 15) proteinin ifade seviyesi kontrole göre tüm uygulamalarda artış gösterirken bu artış en fazla NaCl uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

STRING analizine dayanarak, SNP ve NaCl uygulamalarına bağlı olarak farklı şekilde ifade olan proteinlerin etkileşimleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. RuBisCO aktivaz, ferredoksin-NADP redüktaz, früktoz bifosfat aldolaz ve 2-Cys peroksiredoksin BAS proteinlerinin önemli etkileşim noktalarındadır ve bu da fotosentez, enerji metabolizması ve stres savunmanın NaCl stresine ve dışsal SNP’ye yanıt için çok önemli olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Onaylanmış ve tahmin edilen etkileşimlere dayanarak STRING sistemi (<http://string.embl.de>) kullanılarak hazırlanan protein etkileşim haritası. Farklı renkteki çizgiler, protein etkileşim türünü göstermektedir.

Tuz stresi ve SNP uygulamalarına ilişkin biyolojik yolların ve moleküler fonksiyonların istatistiksel olarak az ve fazla temsil edilen kategorilerini elde etmek için, farklı şekilde ifade olan proteinler BiNGO kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.3). Tuz stresi ve dışsal SNP, ağırlıklı şekilde strese yanıt veren proteinleri ve daha az seviyede fotosentez ile ilişkili proteinleri teşvik etmiştir.



Şekil 4.3 BiNGO tarafından üretilmiş moleküler fonksiyon ağları. Halkaların boyutu, bu gruptaki moleküllerin sayısı ile orantılıdır ve halkanın rengi zenginleştirmenin önemini ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nitrik oksit, çeşitli biyotik ve abiyotik stresler altında bitkilerin büyüme parametrelerindeki azalmaları hafifleten bir sinyal molekülü olduğu bildirilmiştir (Tripathi vd. 2017, Ahmad vd. 2018, Terrón-Camero vd. 2019). Mevcut araştırmada, NaCl stresi arpa bitkilerinde fide büyümesini önemli düzeyde azaltmıştır ve bu sonuçlar buğday (Kausar vd. 2013), biber (Abdel Latef ve Chaoxing 2014), çeltik (Mostofa vd. 2015) ve nohut (Ahmad vd. 2018) gibi bitki türlerinde yapılan önceki çalışmalar ile benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte, dışsal SNP uygulaması büyüme parametreleri üzerine NaCl stresinin olumsuz etkilerini hafifletmiştir. Bu sonuçlar, dışsal SNP uygulamalarının etkilerinin araştırıldığı birçok bitki türünde de gösterilmiştir (Ali vd. 2017, Yadu vd. 2017, Ahmad vd. 2018). Nitrik oksidin hücre çeperinin gevşetebildiği, fosfolipid tabakasını etkileyebildiği, membran akışkanlığı arttırabildiği ve hücre genişlemesini arttırarak bitki büyümesini teşvik edebildiği bildirilmiştir (Leshem ve Haramaty 1996). Dong vd. (2014), NO uygulamasının tuz stresi altındaki pamuk bitkilerinde gövde ve kök uzamasını arttırdığını ve NO'nun bitki hücrelerinin ozmotik basıncını arttırdığını ve yüksek tuzluluk altında sitoplazmik viskoziteyi iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, soya fasulyesi ve mısır bitkilerinde NO teşvikli tuz toleransının artan antioksidan enzim aktivitesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Zhang vd. 2004, Wu vd. 2011, Ahmad vd. 2016). Ayrıca NO'nun, hidrojen peroksit ve salisilik asit ile etkileşerek birçok stres koşulunda oksidatif hasarın giderilmesine aracılık edebileceği gösterilmiştir (Mostofa vd. 2015, Singh vd. 2015). Dışsal olarak uygulanan NO'nun su ve iyon homeostazını iyileştirmenin yanı sıra redoks dengesinin de arttığı ve bu durumun fotosentetik kapasiteyi ve bitki büyümesinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Kaya vd. 2015). Sonuç olarak mevcut araştırmada, dışsal SNP uygulaması ile arpa fidelerinde tuz toleransının artması reaktif oksijen türlerinin düşük seviyede birikimi, düşük toksik iyon alımı, önemli ozmotik koruyucu bileşiklerin yüksek seviyelerde birikimi ve oksidatif savunma sisteminin teşvik edilmesi ile ilişkili olabilir.

Yüksek toprak tuzluluğu ekim alanlarını kısıtlamakta ve kurak/yarı kurak bölgelerde tarımsal ürünlerin verimliliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle, bitkilerde tuz stresine olan

toleransın altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması, bitki ıslahçıların tuz stresine tolere edebilen bitki çeşitlerinin geliştirilmesi için yararlı olacaktır. Bu araştırmada, proteomik yaklaşım kullanılarak arpa fidelerinin yaprak dokularında SNP ve/veya NaCl stresinin etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 2-D IEF-SDS/PAJE yöntemi kullanılarak yaprak dokuları için proteom profilleri elde edilmiştir. Bu profillerde, PDQuest yazılımı kullanılarak nicel görüntü analizleri ile ifade seviyesi 1.5 kat veya daha fazla artan veya azalan yönde düzenlenen 24 protein belirlenmiştir. Bunlardan 15 protein MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve veri tabanı taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Farklı şekilde ifade olan proteinlerin fotosentez, protein sentezi ve metabolizması, stres savunma, enerji metabolizması ve primer metabolizma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Fotosentez tuzluluktan etkilenen birincil biyolojik süreçlerden biridir (Chaves vd. 2009). Tuz stresi koşulları altında fotosentetik etkinlikteki azalma, fotosentez ile ilişkili proteinlerin ifade seviyeleri ile doğrudan ilişkilidir. Fotosentetik yapıların organellerin işlevindeki düşüşün, bitkilerin stresin üstesinden gelme verimliliğini azalttığı bildirilmiştir (Soundararajan vd. 2017). Tuz stresi altındaki bitkilerde fotosentez kapasitesindeki azalmanın, klorofil içeriğindeki azalmanın yanı sıra, fotosentetik yapıların hasar görmesi ve stoma kapanmasına bağlı olarak CO₂ kullanılabilirliğindeki azalmadan kaynaklanabildiği belirtilmiştir (Ashraf ve Harris 2013). Mevcut araştırmada, proteomik analizler CO₂ fiksasyonu ve ışık reaksiyonu ile ilişkili olan 6 fotosentetik proteininin NaCl stresi ve dışsal SNP uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2). Bitkilerde CO₂ özümlemesinin ilk enzimi olan RuBisCO büyük altbirimi ve RuBisCO aktivaz A (RCA) proteinlerinin ifade seviyelerinin tuz stresi koşullarında azaldığı, ancak dışsal SNP uygulaması ile bu azalmanın hafifletildiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, tuz stresi RuBisCO küçük altbirim proteininin ifade seviyesinde kontrole göre yaklaşık 2 kat artışa neden olmuştur. RuBisCO, fotosentez sırasında CO₂'nin sabitlemesi için gereken temel enzimdir. Özellikle, karboksilasyonun katalitik etkinliği ve CO₂/O₂ özgülüğü için RuBisCO küçük altbiriminin gerekli olduğu rapor edilmiştir (Krech vd. 2012). RuBisCO aktivaz RuBisCO'nun aktivasyonunu katalizleyen önemli bir düzenleyici enzimdir (Ashraf ve Harris 2013). RCA, tuz stresinin neden olduğu düşük CO₂ seviyelerinde

asimilasyonunun sürdürülmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (de Abreu vd. 2014). NADH potansiyel bir NAD^+ kaynağıdır ve solunum zinciri reaksiyonlarına ana elektron vericisidir. NADH/NAD^+ oranı, hücrel yolların ve ATP sentezinin düzenlenmesi için hayati öneme sahiptir. Ferredoksin-NADP redüktaz (FNR), indirgenmiş ferredoksinden NADP^+ ya fotosentetik elektron akışında rol oynamakta ve bitkilerdeki CO_2 özümlemesi için gereklidir (Fukuyama 2004). Ayrıca ferredoksinin azot fiksasyonu, fenolik biyosentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve demir-kükürt kümelerinin biyogenezi gibi çeşitli metabolik süreçlerde rol oynadığı bildirilmiştir (Musumeci vd. 2012). FNR bitkilerin ATP ve indirgeyici güç taleplerini karşılamak için döngüsel ve döngüsel olmayan elektron akışını düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır ve CO_2 fiksasyonu için gereklidir (Spreitzer 2003). Ek olarak, tarımsal bitkilerde kloroplastik FNR enziminin aşırı ekspresyonunun oksidatif stres toleransını arttırdığı rapor edilmiştir (Rodriguez vd. 2007). Araştırmamızda, FNR proteininin ifade seviyesi SNP ve SNP+NaCl uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Sonuç olarak, fotosentetik enzimlerin dışsal SNP uygulamasında daha yüksek aktivitesi, arpa bitkilerin tuz stresi koşullarında daha iyi fotosentetik aktivite ve iyileşme sağlayabilir.

Tuz stresinin protein sentezini ciddi şekilde etkileyebildiği (El-Shintinawy ve El-Shourbagy 2001) ve endoplazmik retikulumda (ER) protein katlanmasını bozabildiği ve katlanmamış proteinlerin birikmesine ve ER stresine neden olabildiği bildirilmiştir (Wang vd. 2011). Mevcut araştırmada, protein sentezi ile ilişkili ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A-3 (ELF5A-3) proteininin ifade seviyesi sadece NaCl uygulamasında artarken, uzama faktörü Tu (EFTU) proteininin ifade seviyesi NaCl ve SNP+NaCl uygulamalarında artmış ve bu artış SNP+NaCl uygulamasında daha yüksek bulunmuştur. Kloroplastik EFTU, translasyonun uzama fazında önemli bir işleve sahiptir. Son çalışmalar, EFTU'nun *Brassica campestris* bitkilerinin yüksek sıcaklık toleransında önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (Peng vd. 2014). Tuz stresi koşullarında SNP uygulamasına bağlı olarak EFTU proteininin artması protein biyosentezini artırabilir ve böylece kloroplastlardaki fotosentetik proteinler üzerindeki tuz stresinin hasarını onarabilir. Bununla birlikte, protein katlanmasına fonksiyon gören 20 kDa şaperonin proteininin ifade seviyesi tüm uygulamalarda artarken en fazla SNP+NaCl uygulamasında artış göstermiştir. Şaperoninler protein katlanmasına ve bir

araya getirilmesine yardımcı olmakta ve stres koşulları altında proteinlerin korunmasında ve onarılmasında işlev görmektedir (Roy vd. 2019). Ayrıca protein yıkımı ile ilişkili bir protein olan proteazom altbirim beta tip-2 proteininin ifade seviyesinin SNP+NaCl uygulamasında artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Bu proteinin ubiquitin aracılı protein yıkımında rol oynadığı belirtilmiştir (Cui vd. 2012). Nitrik oksit, yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin parçalanmasını hızlandırarak tuz stresi kaynaklı hasarı hafifletmeye yardımcı olabilir. Sonuç olarak, protein metabolizması ile ilgili proteinlerin bolluğundaki SNP teşvikli bu artış, stres koşulları sırasında hücrel süreçlerde genel bir iyileşmeye yol açabilir.

Reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarlarda üretiminin neden olduğu oksidatif stres, tuz stresinin neden olduğu iyi belgelenmiş dolaylı bir hasar şeklidir (Hossain ve Dietz 2016). Mevcut araştırmada, 2-Cys peroksiredoksin BAS1 (BAS) ve tiyazol biyosentetik enzim 1-1 (THI1) proteinlerinin ifade seviyesi dışsal SNP uygulanmış ve NaCl stresi altındaki bitkilerde (SNP+NaCl) artmıştır. Bir tiyol spesifik antioksidan olan peroksiredoksin çok çeşitli organizmalarda bulunan ve çeşitli hücrel fonksiyonlara sahip bir antioksidan enzim olduğu bildirilmiştir. 2-Cys peroksiredoksinin, kloroplastlara lokalize olduğu ve bitki gelişimi ve fotosentez sırasında antioksidatif ve şaperon rolleri gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Kim vd. 2009). Bununla birlikte, THI proteininin tiamin biyosentezinde rol oynadığı ve bakteri, maya ve *Arabidopsis thaliana*'da DNA hasarı onarımı ve stres tolerans mekanizmalarına katıldığı gösterilmiştir (Machado vd. 1997, Ribeiro vd. 2005). Ayrıca THI1 proteininin, karbon metabolizmasında rol oynayan temel enzimlerin anahtar kofaktörü olan B1 biyosentezinde rol oynadığı bildirilmiştir (Ribeiro vd. 2005). Bununla birlikte, önemli bir stres-tepki molekülü olan tiyaminin, çevresel stresler sırasında bitkilerdeki oksidatif stresin etkilerini hafifletmeye yardımcı olduğu belirtilmiştir (Rapala-Kozik vd. 2012). Dışsal SNP uygulaması ile BAS ve THI1 proteinlerinin artması, oksidatif stresi azaltarak ve DNA stabilitesini koruyarak arpa yapraklarındaki NaCl teşvikli oksidatif stresi hafifletmeye yardımcı olabilir.

Tuz stresi koşulları altında, enerji metabolizmasının düzenlenmesi tuz stresinin üstesinden gelmede önemli stratejilerden biridir (Zhang vd. 2011). Araştırmamızda,

glikoliz ile ilişkili fruktoz bifosfat aldolaz (FBA) proteininin ifade seviyesi tuz stresi altındaki yaprak dokularında artan yönde düzenlenmiştir. FBA, fruktoz-1,6-bisfosfatın gliseraldehid 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfata geri dönüşümlü olarak ayrılmasını katalize etmektedir. Glikoliz bu ileri reaksiyonu kullanırken, glukoneogenez ve Calvin döngüsü (anabolik yollar) ters reaksiyonu kullanmaktadır (Lv vd. 2017). Yin vd. (2008), FBA'nın biyotik stres koşullarında *B. napus* yapraklarındaki fizyolojik fonksiyonlarının korunmasında önemli olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, *Sesuvium portulacastrum* FBA genini (*SpFBA*) aşırı ifade eden *E. coli* bakterilerinde tuz toleransının arttığı bildirilmiştir (Fan vd. 2009). Artan glikoliz aktivitesinin tuz stresinin üstesinden gelmede muhtemel bitki stratejisi olabileceğini göstermektedir.

S-adenozilmetiyonin sentaz (SAMS), metiyonin ve ATP'den SAM'ın biyosentezini katalize etmekte ve poliaminler ve etilen gibi bitki büyüme düzenleyicilerin öncülü olarak işlev görmektedir (Gong vd. 2014). Transgenik deneyler, SAM'ların PA birikimini arttırarak stres toleransına katkıda bulunduğunu kanıtlamıştır (Qi vd. 2010, Gong vd. 2014). Buğday, arpa, mısır ve domates gibi türlerde tuz stresinin SAMS protein bolluğunu arttırdığı rapor edilmiştir (Zörb vd. 2004, Witzel vd. 2009, Manaa vd. 2011). Tuz stresi altındaki bitkilerde SAM birikiminin artan glisin betain biyosentezi ve poliamin içeriği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sánchez -Aguayo vd. 2004). Bununla birlikte, tuza hassas arpa çeşidine göre tuza toleranslı çeşitte SAM ifadesinin daha fazla seviyede olduğu belirtilmiştir (Witzel vd. 2009). Mevcut araştırmada, dışsal SNP uygulaması hem kontrol hem de tuz stresi koşullarında SAMS proteininin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Benzer olarak, dışsal putresin uygulamasının salatalık bitkilerinde SAMS ifade seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (Yuan vd. 2016). Sonuç olarak, SNP uygulamasına bağlı olarak arpa yapraklarında SAMS aktivitesinin hücre çeperi lignifikasyonunu sağlayarak ve poliamin biyosentezini teşvik ederek tuz toleransını arttırdığı ileri sürülebilir.

Glutamat dekarboksilaz (GAD), γ -aminobütirik asit (GABA) sentezini katalize eden Ca^{+2} -bağımlı bir kalmodulin bağlayıcı proteindir. GABA, azot metabolizması, sitozolik pH regülasyonu ve TCA döngüsüne karbon akısı gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Gut vd. 2009). Tuzluluk dahil çok çeşitli çevresel streslere yanıt olarak

hücrelerde biriktiği rapor edilmiştir (Zhou vd. 2010). Renault vd. (2010) tuz stresi altındaki Arabidopsis bitkilerinde GABA birikiminin GAD aktivitesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, dışsal GABA uygulamasının antioksidan kapasiteyi ve fotosentetik aktiviteyi arttırarak, ozmotik ayarlamayı sağlayarak ve su kullanım verimliliğinin düzenleyerek tuz toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Li vd. 2020). GAD enziminin glutamattan prolin sentezini teşvik edebildiği bildirilmiştir. GAD enziminin tuza toleranslı susam genotipinde tuz stresine yanıt olarak arttığı ve bu genotipteki hızlı prolin birikimi ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang vd. 2019). Mevcut araştırmada, GAD proteinin ifade seviyesi NaCl uygulamasında yaklaşık 3 kat artış gösterirken, SNP ve SNP+NaCl uygulamalarında yaklaşık 1.6 kat artış göstermiştir. Sonuç olarak, GAD proteininin tuz stresine cevap olarak birikimi arpa bitkilerinin tuz toleransını arttırmaya katkıda bulunabileceğini ileri sürebilir.

Sonuç olarak, SNP uygulaması biyokütleyi önemli ölçüde arttırmış ve tuz stresi altında arpa fidelerinin büyümesini sürdürmelerine yardımcı olmuştur. Proteomik yaklaşım bitkilerde tuz toleransından sorumlu moleküler mekanizmaların çalışılmasında güçlü bir tekniktir. Araştırmamızda, arpa fidelerinde SNP uygulamasına ve/veya NaCl stresine cevap olarak farklı şekilde ifade olan ve önemli biyolojik işlevlerde fonksiyon gören proteinler MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmıştır. Çoğunlukla artan yönde düzenlenen bu proteinlerin tuz stresinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelebilmek için bitki metabolizmasını etkilediği ileri sürülebilir. SNP özellikle fotosentez, protein metabolizmasını ve savunma sistemlerini düzenleyerek tuz toleransının artmasına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Bu bulgular, arpa bitkilerinde SNP-teşvikli tuz toleransı mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacak ve sonraki fonksiyonel çalışmalar için bir temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Abd El-Mageed T A, Semida W M, Taha R S, Rady M M, 2018, Effect of Summer-Fall Deficit Irrigation on Morpho-Physiological, Anatomical Responses, Fruit Yield and Water Use Efficiency of Cucumber under Salt Affected Soil, *Scientia Horticulturae*, 237, 148–155.
- Abdel Latef A A, Chaoxing H, 2014, Does Inoculation with *Glomus mosseae* Improves Salt Tolerance in Pepper Plants, *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 644–653.
- Abreu I A, Farinha A P, Negrão S, Gonçalves N, Fonseca C, Rodrigues M, Batista R, Saibo N J, Oliveira M M, 2013, Coping with Abiotic Stress: Proteome Changes for Crop Improvement, *Journal of Proteomics*, 93, 145–168.
- Ahmadi A, Emam Y, Pessarakli M, 2009, Response of Various Cultivars of Wheat and Maize to Salinity Stress, *Journal of Food Agriculture Environment*, 71, 123–128.
- Ahmad P, Rasool S, Gul A, Sheikh S A, Akram N A, Ashraf M, Kazi A M, Gucel S, 2016, Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance, *Frontiers in Plant Science*, 7, 813.
- Ahmad P, Ahanger M A, Alyemeni M N, Wijaya L, Alam P, Ashraf M, 2018, Mitigation of Sodium Chloride Toxicity in *Solanum lycopersicum* L. By Supplementation of Jasmonic Acid and Nitric Oxide. *Journal of Plant Interactions*, 13, 64–72.
- Ahsan N, Lee D G, Alam I, Kim P, Lee J, Ahn Y O, vd., 2008, Comparative Proteomic Study of Arsenic-Induced Differentially Expressed Proteins in Rice Roots Reveals Glutathione Plays A Central Role during as Stress, *Proteomics*, 8, 3561–3576.
- Alexieva V, Ivanov S, Karanov E, 2003, Interaction between Stresses, *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue*, 1–17.
- Ali Q, Daud M K, Haider M Z, Ali S, Rizwan M, Aslam N, vd., 2017, Seed Priming by Sodium Nitroprusside Improves Salt Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum*

L.) by Enhancing Physiological and Biochemical Parameters, *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 50–58.

Amirossadat Z, Ghehsareh A M, Mojiri A, 2012, Impact of Silicon on Decreasing of Salinity Stress in Greenhouse Cucumber (*Cucumis sativus* L.) in Soilless Culture, *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6(17), 171–174.

Anbar M, 1995, Nitric-Oxide A Synchronizing Chemical Messenger. *Experientia*, 51(6), 545–550.

Anonim, 2012, TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.

Anonim, 2017, TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.

Anonim, 2018, TMO, Toprak Mahsülleri Ofisi, Hububat Sektör Raporu.

Anonim, 2019, TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.

Arora D, Bhatla S C, 2017, Melatonin and Nitric Oxide Regulate Sunflower Seedling Growth under Salt Stress Accompanying Differential Expression of Cu/Zn SOD and Mn SOD, *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 315–328.

Asada K, 1999, The Water–Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639.

Ashraf M, 1994, Breeding for Salinity Tolerance in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 131, 17–42.

Ashraf M Y, Sarwar G, Ashraf M, Afaf R, Satar A, 2002, Salinity Induced Changes in α Amylase Activity during Germination and Early Cotton Seedling Growth, *Biologiae Plantarum*, 45, 589–591.

Ashraf M, 2009, Biotechnological Approach of Improving Plant Salt Tolerance Using Antioxidants as Markers, *Biotechnology Advances*, 84–93.

Ashraf M, Harris P J C, 2013, Photosynthesis under Stressful Environments: An Overview, *Photosynthetica*, 512, 163–90.

- Aytamka E, 2005, *Glycine max* L. Bitkisinde Tuz Stresi ile Nitrik Oksit Arasındaki İlişki, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 19s, İstanbul.
- Bai X, Yang L, Yang Y, Ahmad P, Yang Y, Hu X, 2011, Deciphering the Protective Role of Nitric Oxide Against Salt Stress at the Physiological and Proteomic Levels in Maize, *Journal of Proteome Research*, 10, 4349–4364.
- Barroso J B, Corpas F J, Carreras A, Sandalio L M, Valderrama R, Palma J M, vd., 1999, Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729–36733.
- Bartels D, Sunkar R, 2005, Drought and Salt Tolerance in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23–58.
- Begum F, Karmoker J L, Fattah Q A, Maniruzzaman A F M, 1992, The Effect of Salinity and Its Correlation With K, Na, Cl accumulation in Germinating Seeds of *Triticum aestivum* L. cv. Akbar, *Plant Cell Physiology*, 337, 1009–1114.
- Beligni M V, Lamattina L, 1999, Is Nitric Oxide Toxic or Protective, *Trends in Plant Science*, 4, 299–300.
- Beligni M V, Lamattina L, 2001a, Nitric Oxide: A Non-Traditional Regulator of Plant Growth, *Trends Plant Science*, 611, 508–509.
- Beligni M V, Lamattina L, 2001b, Nitric Oxide in Plants: The History is Just Beginning, *Plant, Cell and Environment*, 24, 267–278.
- Belkhadir Y, Jaillais Y, Eppele P, Balsemao-Pires E, Dangl J K, Chory J, 2012, Brassinosteroids Modulate the Efficiency of Plant Immune Responses to Microbeassociated Molecular Patterns, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 109, 297–302.
- Benlioğlu B, Özkan U, 2015, Bazı Arpa Çeşitlerinin (*Hordeum vulgare* L.) Çimlenme Dönemlerinde Farklı Dozlardaki Tuz Stresine Tepkilerinin Belirlenmesi, *Journal of Field Crops Central Research Institute*, 24(2), 109–114.

- Blum A, 1986, Breeding Crop Varieties for Stress Environments, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199–238.
- Bogdan C, 2001, Nitric Oxide and the Regulation of Gene Expression, *Trends in Cell Biology*, 11, 66–75.
- Bollmann A, Koschorreck M, Meuser K, Conrad R, 1999, Comparison of Two Different Methods to Measure Nitric Oxide Turnover in Soils, *Biology and Fertility of Soils*, 29, 104–110.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B, vd., 2004, Blue Silver: A Very Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteome Analysis, *Electrophoresis*, 25, 1327–1333.
- Cao Y Y, Zhao H, 2008, Protective Roles of Brassinolide on Rice Seedlings under High Temperature Stress, *Rice Science*, 15(1), 63–68.
- Carlos G M, Lorenzo L, 2001, Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses Against Drought Stress, *Plant Physiology*, 104, 1015–1025.
- Chaves M M, Flexas J, Pinheiro C, 2009, Photosynthesis under Drought and Salt Stress: Regulation Mechanisms from Whole Plant to Cell, *Annals of Botany*, 103(4), 551–60.
- Chen S, Gollop N, Heuer B, 2009, Proteomic Analysis of Salt-Stressed Tomato (*Solanum lycopersicum*) Seedlings: Effect of Genotype and Exogenous Application of Glycinebetaine, *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 2005–2019.
- Chinchilla D, Shan L, He P, De Vries S, Kemmerling B, 2009, One for All: The Receptor Associated Kinase, *Trends Plant Science*, 14, 535–541.
- Clouse S D, 2002, Brassinosteroid Signal Transduction: Clarifying the Pathway from Ligand Perception to Gene Expression, *Molecular Cell*, 10, 973–982.
- Corpas F J, Barroso J B, Carreras A, 2004, Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Nitric Oxide in Young and Senescent Pea Plants, *Plant Physiology*, 136, 2722–2733.

- Coşkun-Arı F F, Gülelçin D, Çavuşoğlu K, Ürün Ş, Kılıç S, Kabar K, 2010, Gibberellik Asit ve 24-Epibrassinolid'in Tuz Stresi Koşullarında Çimlendirilen Arpa Tohumlarında Total DNA ve Protein İçeriğine Etkileri, Batı Akdeniz Doğa Bilimleri Sempozyumu, 4-6 Kasım, Burdur.
- Cramer G R, Lauchli A, Epstein E, 1986, Effects of NaCl and CaCl₂ on Ion Activities in Complex Nutrient Solutions and Root Growth of Cotton, *Plant Physiology*, 81, 792–797.
- Crawford N M, Guo F Q, 2005, New Insights into Nitric Oxide Metabolism and Regulatory Functions, *Trends in Plant Science*, 10, 195–200.
- Cui F, Liu L, Zhao Q, Zhang Z, Li Q, Lin Q, 2012, Arabidopsis Ubiquitin Conjugase UBC32 is An ERAD Component That Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance, *Plant Cell*, 24, 233–244.
- Cui J X, Zhou Y H, Ding J G, Xia X J, Shi K, Chen S C, vd., 2011, Role of Nitric Oxide in Hydrogen Peroxide–Dependent Induction of Abiotic Stress Tolerance by Brassinosteroids in Cucumber, *Plant Cell and Environment*, 34, 347–358.
- Çelik Ö, Atak Ç, 2012, Evaluation of Proline Accumulation and $\Delta 1$ -Pyrroline–5–Carboxylate Synthase (P5CS) Gene Expression during Salinity Stress in Two Soybean (*Glycine max* L. Merr) Varieties, *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 559–564.
- De Abreu C E, Araujo Gdos S, Monteiro-Moreira A C, Costa J H, Leite Hde B, Moreno F B, 2014, Proteomic Analysis of Salt Stress and Recovery in Leaves of *Vigna unguiculata* Cultivars Differing in Salt Tolerance. *Plant Cell Reports*, 33(8), 1289–306.
- Del Rio L A, Corpas F J, Barroso J B, 2004, Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase Activity in Plants, *Phytochemistry*, 657, 783–792.
- Delauney A J, Verma D P S, 1993, Proline Biosynthesis and Osmoregulation in Plants, *Journal of Plant Physiology*, 4, 215–223.
- Delledonne M, 2005, NO News is Good News For Plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 390–396.

- Demiral T, Türkan G 2004, Does Exogenous Glycinebetaine Affect Antioxidative System of Rice Seedlings under NaCl Treatment, *Plant Physiology*, 161, 1089–1100.
- Desikan R, Hancock J T, Ichimura K, Shinozaki K, Neill S J, 2001, Harpin Induces Activation of the Arabidopsis Mitogen–Activated Protein Kinases ATMPK4 and ATMPK6, *Plant Physiology*, 126, 1579–1587.
- Divi U K, Krishna, P, 2009, Brassinosteroid: A Biotechnological Target for Enhancing Crop Yield and Stress Tolerance, *New Biotechnology*, 26, 131–136.
- Domingos P, Prado A M, Wong A, Gehring C, Feijo J A, 2015, Nitric Oxide: A Multitasked Signaling Gas in Plants, *Molecular Plant* 8, 506–520.
- Dong Y J, Jinc S S, Liu S, Xu L L, Kong J, 2014, Effects of Exogenous Nitric Oxide on Growth of Cotton Seedlings under NaCl Stress, *The Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14, 1–13.
- Dölarslan M, Gül E, 2012, Toprak Bitki İlişkileri Açısından Tuzluluk, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 52, 56–59.
- Durner J, Wendehemme D, Klessig D F, 1998, Defense Gene Induction in Tobacco by Nitric Oxide, Cyclic GMP and Cyclic ADP–Ribose, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 10328–10333.
- Durner J, Klessig D F, 1999, Nitric Oxide as a Signal in Plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 369–74.
- Edreva A, 2005, Generation and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplast: A Submolecular Approach, *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 106, 119–133.
- El-Mashad A A A, Mohamed H I, 2012, Brassinolide Alleviates Salt Stress and Increases Antioxidant Activity of Cowpea Plants (*Vigna sinensis*), *Protoplasma*, 249, 625–635.

- El-Shintinawy F, El-Shourbagy M, 2001, Alleviation of Changes in Protein Metabolism in NaCl-Stressed Wheat Seedlings by Thiamine, *Biologia Plantarum*, 444, 541–545.
- Epstein E, 1994, The Anomaly of Silicon in Plant Biology, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 1–17.
- Epstein E, 1999, Silicon-Annual Review of Plant Physiology, *Plant Molecular Biology*, 50, 641–664.
- Etehadnia M, Waterer D R, Tanino K K, 2008, The Method of ABA Application Affects Salt Stress Responses in Resistant and Sensitive Potato Lines, *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 331–341.
- Fan W, Zhang Z L, Zhang Y L, 2009, Cloning and Molecular Characterization of Fructose–1,6–Bisphosphate Aldolase Gene Regulated by High-Salinity and Drought in *Sesuvium portulacastrum*, *Plant Cell Reports*, 28, 975–984.
- Fan S, Meng Y, Song M, Pang C, Wei H, Liu J, vd., 2014, Quantitative Phosphoproteomics Analysis of Nitric Oxideresponsive Phosphoproteins in Cotton Leaf, *PLOS One*, 9, E94261.
- Fancy N N, Bahlmann A K, Loake G J, 2017, Nitric Oxide Function in Plant Abiotic Stress, *Plant Cell and Environment*, 40, 462–472.
- Ferrer M A, Ros Barcelo A, 1999, Differential Effects of Nitric Oxide on Peroxidase and H₂O₂ Production by the Xylem of *Zinnia elegans*, *Plant Cell and Environment*, 22, 891–897.
- Finkelstein R, 2013, Absciscic Acid Synthesis and Response, In: *The Arabidopsis Book*, Washington, American Society of Plant Biologists, 11, E0166.
- Fricke W, Peters W S, 2002, The Biophysics of Leaf Growth in Salt-Stressed Barley, A Study at the Cell Level, *Plant Physiology*, 1291, 374–388.
- Fukuyama K, 2004, Structure and Function of Plant Type Ferredoxins, *Photosynthesis Research*, 81, 289–301.

- Gadallah M A A, 1999, Effects of Proline and Glycinebetaine on *Vicia faba* Responses to Salt Stress, *Biologia Plantarum*, 422, 249–257.
- Garcés H, Durzan D, Pedroso M C, 2001, Mechanical Stress Elicits Nitric Oxide Formation and DNA Fragmentation in *Arabidopsis thaliana*, *Annals of Botany*, 87, 567–574.
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt M R, 2003, Nitric Oxide Regulates K^+ and Cl^- Channels in Guard Cells Through a Subset of Absciscicacid Evoked Signaling Pathways, *Proceedings National Academy of Sciences*, 100(19): 11116–11121.
- Geilfus C M, Tenhaken R, Carpentier S C, 2017, Transient Alkalinization of the Leaf Apoplast Stiffens the Cell Wall during Onset of Chloride-Salinity in Corn Leaves, *Journal of Biological Chemistry* 292, 18800–18813.
- Gong B, Li X, Vandenlangenberg K M, Wen D, Sun S, Wei M, vd., 2014, Overexpression of S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase Increased Tomato Tolerance to Alkali Stress Through Polyamine Metabolism, *Plant Biotechnology*, 12, 694–708.
- Gould K S, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D, 2003, Nitric Oxide Production in Tobacco Leaf Cells: A Generalized Stress Response, *Plant Cell and Environment*, 26, 1851–1862.
- Grove M D, Spencer G F, Rohwedder W K, Mandava N, Worley J F, Warthen J.D, vd., 1979, Brassinolide, A Plant Growth-Promoting Steroid Isolated from *Brassica napus* Pollen, *Nature*, 281, 216–217.
- Guo L Q, Shi, C, Wang D L, 2010, The Key Physiological Response to Alkali Stress by the Alkali-Resistant Halophyte *Puccinelli attenuiflora* is the Accumulation of Large Quantities of Organic Acids and into the Rhizosphere, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(2), 123–135.
- Gut H, Dominici P, Pilati S, Astegno A, Petoukhov M V, Svergun D I, vd., 2009, A Common Structural Basis for pH and Calmodulin-Mediated Regulation in Plant Glutamate Decarboxylase, *Journal Molecular Biology* 392, 334–51.

- Güneş A, Post W H K, Kirkby E A, Aktaş M, 1994, Influence of Partial Replacement on Nitrate by Amino Acid Nitrogen or Urea in the Nutrient Medium on Nitrate Accumulation in NFT Grown Winter Lettuce, *Journal of Plant Nutrition*, 19297(1), 1938–1994.
- Hanafy A, Harb E M, Higazy M A, Morgan S H, 2008, Effect of Silicon and Boron Foliar Applications on Wheat Plants Grown under Saline Soil Conditions, *International Journal of Agricultural Research*, 26(3), 1–26.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam, M M, Roychowdhury R, Fujita M, 2013, Physiological Biochemical and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 145, 9643–9684.
- Hayat S, Maheshwari P, Wani A S, Irfan M, Alyemeni M N, Ahmad A, 2012, Comparative Effect of 28 Homobrassinolide and Salicylic Acid in the Amelioration of NaCl Stress in *Brassica juncea* L., *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 61–68.
- Heuer B, 2003, Influence of Exogenous Application of Proline and Glycinebetaine on Growth of Salt-Stressed Tomato Plants, *Plant Science*, 165, 693–699.
- Hirschi K D, 2004, The Calcium Conundrum, Both Versatile Nutrient and Specific Signal, *Plant Physiology*, 136, 2438–2442.
- Honda A, Adams S R, Sawyer C L, Lev-Ram V, Tsien R Y, Dostmann W R, 2001, Spatiotemporal Dynamics of Guanosine 3'-5'-Cyclic Monophosphate Revealed by a Genetically Encoded, Fluorescent Indicator, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 2437–2442.
- Hoque A, Okuma E, Banu N A, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y, 2006, Exogenous Proline Mitigates the Detrimental Effects of Salt Stress More Than Exogenous Betaine by Increasing Antioxidant Enzyme Activities, *Plant Physiology*, 164, 553–561.
- Hossain M S, Dietz K J, 2016, Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress, *Front Plant Science*, 7, 548.

- Hung K T, Kao C H, 2003, Nitric Oxide Counteracts the Senescence of Rice Leaves Induced By Absciscic Acid, *Journal of Plant Physiology*, 1608, 871–879.
- Hurkman W J, Tanaka C K, 1986, Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis of Two-Dimensional Gel Electrophoresis, *Plant Physiology*, 81, 802–806.
- Inanaga S, Okasaka A, 1995, Calcium and Silicon Binding Compounds in Cell Walls of Rice Shoots, *Soil Science and Plant Nutrition*, 41, 103–110.
- Jackson M B, 2002, Long Distance Signalling from Roots to Shoots Assessed: The Flooding Story, *Journal of Experimental Botany*, 53, 175–181.
- Ji F S, Tang L, Li Y Y, Wang W C, Yang Z, Li X G, vd., 2018, Differential Proteomic Analysis Reveals the Mechanism of *Musa paradisiaca* Responding to Salt Stress, *Molecular Biology Reports*, 46, 1057–1068.
- Jiang Y, Yang B, Neil, S H, Michael K D, 2007, Comparative Proteomic Analysis of NaCl Stress-Responsive Proteins in Arabidopsis Roots, *Journal of Experimental Botany*, 58, 3591–3607.
- Kakimoto T, 1996, CKII, A Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction, *Science*, 274, 982–985.
- Karplus P A, Daniels M J, Herriot J R, 1991, Atomic Structure of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase, Prototype for A Structurally Novel Flavoenzyme Family, *Science Journal*, 251, 60–66.
- Kartal G, Temel A, Arican E, Gozukirmizi N, 2009, Effects of Brassinosteroids on Barley Root Growth, Antioxidant System and Cell Division, *Plant Growth Regulation* 58(3), 261–267.
- Kausar F, Shahbaz M, Ashraf M, 2013, Protective Role of Foliar-Applied Nitric Oxide in *Triticum aestivum* under Saline Stress, *Turkish Journal of Botany*, 37, 1155–1165.
- Kaya C, Ashraf M, Sönmez O, Tuna A L, Aydemir S, 2015, Exogenously Applied Nitric Oxide Confers Tolerance to Salinity-Induced Oxidative Stress in Two

- Maize (*Zea mays* L.) Cultivars Differing in Salinity Tolerance, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 396, 909–919.
- Khan M A, Ungar I A, Showalter A M, Dewald H D, 1998, NaCl Induced Accumulation of Glycinebetain in Four Subtropical Halophytes from Pakistan, Physiologia Plantarum, 102, 487–492.
- Kholghi M, Toorchi M, Bandeh-Hagh A, Shakiba M R, 2018, An Evaluation of *Canola* Genotypes under Salinity Stress at Vegetative Stage Via Morphological and Physiological Traits, Pakistan Journal Botany, 50, 447–455.
- Kızılgöç F, Yıldırım M, Akıncı C, Albayrak Ö, 2016, Bazı Arpa Genotiplerinin Diyarbakır ve Mardin Koşullarında Verim ve Kalite Parametrelerinin İncelenmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 63, 161–169.
- Kim S T, Cho K S, Jang Y S, Kang K Y, 2001, Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of Rice Proteins by Polyethylene Glycol Fractionation for Protein Arrays, Electrophoresis, 22, 2103–2109.
- Kim S Y, Jang H H, Lee J R, Sung N R, Bin Lee H, Lee D H, vd., 2009, Oligomerization and Chaperone Activity of a Plant 2-Cys Peroxiredoxin in Response to Oxidative Stress, Plant Science, 177(3), 227–232.
- Kim S Y, Kim B H, Lim C J, Lim C O, Nam K H, 2010, Constitutive Activation of Stress-Inducible Genes in A Brassinosteroid-Insensitive 1 *Bri1* Mutant Results in Higher Tolerance to Cold, Physiologia Plantarum, 138, 191–204.
- Kishor P B K, Hong Z, Miao G H, Hu C A A, Verma D P S, 1995, Overexpression of 1–Pyrroline–5–Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants, Plant Physiology, 108, 1387–1394.
- Kolla V A, Raghavendra A S, 2007, Nitric Oxide is a Signaling Intermediate during Bicarbonate-Induced Stomatal Closure in *Pisum sativum*, Physiologia Plantarum, 130(1), 91–98.

- Kopyra M, Gwozdz E A, 2003, Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and Counteracts the Inhibitory Effect of Heavy Metals and Salinity on Root Growth of *Lupinus luteus*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 1011–1017.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil I T, Renaut J, 2011, Plant Proteome Changes under Abiotic Stress Contribution of Proteomics Studies to Understanding Plant Stress Response, *Journal Proteomics*, 74, 1301–1322.
- Kosová K, Vítámvás P, Urban, M O, Prášil I T, Renaut J, 2018, Plant Abiotic Stress Proteomics: The Major Factors Determining Alterations in Cellular Proteome, *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–22.
- Krech K, Ruf S, Masduki, F F, Thiele W, Bednarczyk D, Albus C A, vd., 2012, The Plastid Genome-Encoded Ycf4 Protein Functions as a Nonessential Assembly Factor For Photosystem I in Higher Plants, *Plant Physiology*, 159(2), 579–591.
- Kuhn J M, Schroeder J L, 2003, Impacts of Altered RNA Metabolism on Absciscic Acid Signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 463–469.
- Kumar S G, Reddy A M, Sudhakar C, 2003, NaCl Effects on Proline Metabolism in Two High Yielding Genotypes of Mulberry (*Morus alba* L.) with Contrasting Salt Tolerance, *Plant Science*, 165, 1245–1251.
- Lakra N, Kaur C, Anwar K, Singla-Pareek S L, Pareek A, 2018, Proteomics of Contrasting Rice Genotypes: Identification of Potential Targets for Raising Crops for Saline Environment, *Plant Cell Environment*, 41(5), 947–969.
- Leshem Y Y, Haramaty E, 1996, The Characterization and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* L., *Journal of Plant Physiology*, 148, 258–263.
- Leshem Y Y, Wills R B H, Ku V W, 1998, Evidence for the Function of the Free Radical Gas –Nitric Oxide (No)– as an Endogenous Maturation and Senescence Regulating Factor in Higher Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 825–833.

- Leshem Y Y, 2001, Nitric Oxide in Plants, London, UK: Kluwer Academic Publishers, Journal of Experimental Botany 51, 1471–1473.
- Levitt J, 1980, Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York, 2, 607.
- Liao W, Huang G, Yu J, Zhang M, 2012, Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Alleviate Drought Stress in Marigold Explants and Promote its Adventitious Root Development, Plant Physiology and Biochemistry, 58, 6–15.
- Liang Y C, 1998, Effects of Silicon on Leaf Ultrastructure, Chlorophyll Content and Photosynthetic Activity in Barley under Salt Stress, Pedosphere, 8, 289–296.
- Liang Y C, Ding R X, 2002, Influence of Silicon on Micro Distribution of Mineral Ions in Roots of Salt-Stressed Barley as Associated with Salt Tolerance in Plants, Science China Series C, 45, 298–308.
- Liang W, Ma X, Wan P, Liu L, 2018, Plant Salt-Tolerance Mechanism: A Review, Biochemical and Biophysical Research Communications, 495, 286–291.
- Lichtenhaler H K, 1996, Vegetation Stress: An Introduction to the Stress Concept in Plants, Journal of Plant Physiology, 148, 4–14.
- Li W, Zhao F, Fang W, Xie D, Hou J, Yang X, vd., 2015, Identification of Early Salt Stress Responsive Proteins in Seedling Roots of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Employing Itraq-Based Proteomic Technique, Front Plant Science, 6, 732.
- Li W, Dong C X, Yang X, Lan M H, Zhang S B, 2017, Comparative Physiological and Proteomic Analyses Reveal Different Adaptive Strategies By *Cymbidium sinense* and *Cymbidium tracyanum* to Drought, Planta, 247, 69–97.
- Li Z, Cheng B, Zeng W, Zhang X., Peng Y, 2020, Proteomic and Metabolomic Profiling Reveal Crucial Functions of Γ -Aminobutyric Acid In Regulating Ionic, Water, and Metabolic Homeostasis in Creeping Bentgrass under Salt Stress, Journal of Proteome Research, 19, 769–780.

- Liu S, Dong Y, and Xu L, 2014, Effects of Foliar Applications of Nitric Oxide and Salicylic Acid on Salt-Induced Changes in Photosynthesis and Antioxidative Metabolism of Cotton Seedlings, *Plant Growth Regulation*, 73, 67–78.
- Liu Z, Zou L, Chen C, Zhao H, Yan Y, Wang C, vd. Liu X, 2019, Traq-Based Quantitative Proteomic Analysis of Salt Stress in *Spica Prunellae*, *Scientific Reports*, 9, 9590.
- Luo M J, Zhao Y X, Wang Y D, Shi Z, Zhang P P, Zhang Y X, vd., 2018, Comparative Proteomics of Contrasting Maize, Genotypes Provides Insights into Salt Stress Tolerance Mechanisms, *Journal of Proteome Research*, 17(1), 141–153.
- Lutts S, Kinet J M, Bouharmont J, 1996, NaCl Induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance, *Annals of Botany*, 78, 389–398.
- Lv G Y, Guo X G, Xie L P, Xie C G, Zhang X H, Yang Y, vd., 2017, Molecular Characterization, Gene Evolution, and Expression Analysis of the Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase (FBA) Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Front Plant Science*, 8, 1030, 1–18.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M, 2005, Bingo: A Cytoscape Plugin to Assess Overrepresentation of Gene Ontology Categories in Biological Networks, *Bioinformatics*, 21, 3448–3449.
- Machado C R, De Oliveira R L, Boiteux S, Praekelt U M, Meacock P A, Menck C F, 1996, Thi1 a Thiamine Bio- Synthetic Gene in *Arabidopsis thaliana*, Complements Bacterial Defects in DNA, Repair, *Plant Molecular Biology*, 31(3), 585–93.
- Makela, P, Munns R, Colmer T D, Condon A G, Peltonen S P, 1998, Effect of Foliar Application of Glycinebetaine on Stomatal Conductance, Absciscic Acid and Solute Concentrations in Leaves of Salt and Drought Stressed Tomato, *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 663.

- Manaa A, Ahmed H B, Valot B, Bouchet J P, Aschi-Smiti S, Causse M, 2011, Salt and Genotype Impact on Plant Physiology and Root Proteome Variations In Tomato, *Journal of Experimental Botany*, 62, 2797–2813.
- Mansour M M F, Salama K H A, 2004, Cellular Basis of Salinity Tolerance in Plants, *Environmental and Experimental Botany*, 52, 113–122.
- Mishina T E, Lamb C and Zeier J, 2007, Expression of A Nitric Oxide Degrading Enzyme Induces A Senescence Programme in Arabidopsis, *Plant Cell and Environment*, 30, 39–52.
- Mohaghegh P, Khoshgoftarmanesh A H, Shirvani M, Sharifnabi B, Nili N, 2011, Effect of Silicon Nutrition on Oxidative Stress Induced by *Phytophthora melonis* Infection in Cucumber, *The American Phytopathological Society*, 954, 455–460.
- Mostofa M G, Fujita M, Tran L S P, 2015, Nitric Oxide Mediates Hydrogen Peroxide and Salicylic Acid Induced Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings, *Plant Growth Regulation*, 77, 265–277.
- Munns R, Termaat A, 1986, Whole-Plant Responses to Salinity, *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 143–160.
- Munns R, Tester M, 2008, Mechanisms of Salinity Tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Murgia I, Delledonne M, Soave C, 2002, Nitric Oxide Mediates Iron-Induced Ferritin Accumulation in Arabidopsis, *Plant Journal*, 30, 521–528.
- Musumeci M A, Ceccarelli A, Catalano-Dupuy D L, 2012, The Plant-Type Ferredoxin NADP⁺ Reductases, In *Advances in Photosynthesis-Fundamental Aspects*; Najafpour M, Ed, Intech: Rijeka, Croatia, 539–562.
- Nasir K M, Siddiqui M H, Mohammad F, Naeem M, Khan A, Masroor M, 2010, Calcium Chloride and Gibberellic Acid Protect Linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl Stress by Inducing Antioxidative Defence System and Osmoprotectant Accumulation, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 121–132.

- Neill S, Desikan R, Hancock J T, 2003, Nitric Oxide Signalling in Plants, *New Phytologist*, 159, 11–35.
- Özfıdan C, Turkan I, Sekmen A H, Seckin B, 2013, Time Course Analysis of ABA and Non Ionic Osmotic Stress-Induced Changes in Water Status, Chlorophyll Fluorescence and Osmotic Adjustment in *Arabidopsis thaliana* Wild-Type Columbia and ABA Deficient Mutant *Aba2*, *Environmental and Experimental Botany*, 86, 44–51.
- Parida A K, Das A B, 2005, Salt Tolerance and Salinity Effects on Plants: A Review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324–349.
- Parlak M, 1999, Farklı Gelişim Aşamalarında İki Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşidinin Tuza Toleransı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 20s, Ankara.
- Pedroso M C, Magalhaes J R, Durzan D J, 2000a, A. Nitric Oxide Burst Precedes Apoptosis in Angiosperm and Gymnosperm Callus Cells and Foliar Tissues, *Botany Journal of Experimental*, 51, 1027–1036.
- Pedroso M C, Magalhaes J R, Durzan D J, 2000b, B. Nitric Oxide Induces Cell Death in *Taxus* Cells, *Plant Science*, 157, 173–180.
- Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E, 2011, Cytokinin-Mediated Source/Sink Modifications Improve Drought Tolerance and Increase Grain Yield in Rice under Water-Stress, *Plant Biotechnology Journal*, 9, 747–758.
- Peng H T, Li Y X, Zhang C W, Li Y, Hou X L, 2014, Chloroplast Elongation Factor Bcef-Tu Responds to Turnip Mosaic Virus Infection and Heat Stress in Non-Heading Chinese Cabbage, *Biologia Plantarum*, 58(3), 561–566.
- Porath E, Poljakoff-Mayber A, 1964, Effect of Salinity On Metabolic Pathways in Pea Root Tips, *Israel Journal of Botany*, 13, 115–121.
- Prakash L, Prathapasenan G, 1988, Putrescine Reduces NaCl Induced Inhibition of Germination and Early Seedling Growth of Rice (*Oryza sativa* L.), *Australian Journal of Plant Physiology*, 15, 761–767.

- Prasad K V S K and Saradhi P P, 2004, Enhanced Tolerance to Photoinhibition in Transgenic Plants Through Targeting of Glycinebetaine Biosynthesis into the Chloroplasts, *Plant Science*, 166, 1197–1212.
- Pryor W A, Squadrito G L, 1995, The Chemistry of Peroxynitrite: A Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide, *American Journal of Physiology*, 268, 699–700.
- Rapala-Kozik M, Wolak N, Kujda M, Banas A K, 2012, The Upregulation of Thiamine Vitamin B1 Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* Seedlings under Salt and Osmotic Stress Conditions is Mediated by Absciscic Acid at the Early Stages of This Stress Response, *BMC Plant Biology*, 12, 2.
- Raza H S, Athar H R, Ashraf M, Hameed A, 2007, Glycinebetaine-Induced Modulation of Antioxidant Enzymes Activities and Ion Accumulation in Two Wheat Cultivars Differing in Salt Tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 60, 368–376.
- Reezi S, Babalar M, Kalantari S, 2009, Silicon Alleviates Salt Stress, Decreases Malondialdehyde Content and Affects Petal Color of Salt-Stressed Cut Rose *Rosa xhybrida* L. 'Hot Lady', *African Journal of Biotechnology*, 8(8), 1502–1508.
- Renault H, Roussel V, El Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, vd., 2010, The *Arabidopsis* Pop2-1 Mutant Reveals the Involvement of GABA Transaminase in Salt Stress Tolerance, *BMC Plant Biology*, 10–20.
- Rengel Z, 1992, The Role of Calcium in Salt Toxicity, *Plant Cell and Environment*, 15, 625–632.
- Ribaut J M, Pilet P E, 1994, Water Stress and Indol–3yl–Acetic Acid Content of Maize Roots, *Planta*, 193, 502–507.
- Ribeiro D T, Farias L P, De Almeida J D, Kashiwabara P M, Ribeiro A F, Silva-Filho M C, 2005, Functional Characterization of the Thi1 Promoter Region From *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1797–804.

- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J and Kaiser W M, 2002, Regulation of Nitric Oxide NO Production by Plant Nitrate Reductase *in vivo* and *in vitro*, *Journal of Experimental Botany*, 53, 103–110.
- Rodriguez R E, Lodeyro A, Poli H O, Zurbriggen M, Peisker M, Palatnik J F, vd., 2007, Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chloroplastic Ferredoxin–NADPH Reductase Display Normal Rates of Photosynthesis and Increased Tolerance to Oxidative Stress, *Plant Physiology*, 143(2), 639–649.
- Romero-Puertas M C, Rodriguez S M, Sandalio L M, 2013, Protein S-Nitrosylation in Plants Under Abiotic Stress: An Overview, *Frontiers in Plant Science*, 4, 373.
- Roy S, Mishra M, Dhankher O P, Singla-Pareek S L, Pareek A, 2019, Molecular Chaperones: Key Players of Abiotic Stress Response in Plants. In: Rajpal V, Sehgal D, Kumar A, Raina S, Eds Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches, Sustainable Development and Biodiversity, 1, 20.
- Rudolph A S, Crowe J H, Crowe L M, 1986, Effect of Three Stabilizing Agents –Proline, Betaine, and Trehalose– on Membrane Phospholipids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 245, 134–143.
- Sánchez A I, Rodríguez G J M, García R, Torreblanca J, Pardo J M, 2004, Salt Stress Enhances Xylem Development and Expression of S-Adenosyl-L-Methionine Synthase in Lignifying Tissues of Tomato Plants. *Planta Science*, 220, 278–285.
- Santisree P, Adimulam S S, Sharma K, Pooja Bhatnagar-Mathur P, Sharma K K, 2019, Insights into the Nitric Oxide Mediated Stress Tolerance in Plants, *Plant Signaling Molecules*, 25.
- Sehrawat A, Abat J K, Deswal R, 2013, Rubisco Depletion Improved Proteome Coverage of Cold Responsive S-Nitrosylated Targets in *Brassica juncea*, *Front Plant Science*, 4, 342.
- Selçukcan Ç, 2005, Ayçiçeği *Helianthus annuus* L. Bitkisinde Senesens ile Nitrik Oksit Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 19s, İstanbul.

- Shao R, Huifang Z, Jinliang Y, Shuangjie J, Tianxue L, Yongchao W, vd., 2018, Proteomics Analysis Reveals That Nitric Oxide Regulates Photosynthesis of Maize Seedlings Under Water Deficiency, Nitric Oxide, 46–56.
- Siddiqui M H, Al–Whaibi M H, Basalah M O, 2011, Role of Nitric Oxide in Tolerance of Plants to Abiotic Stress, Protoplasma, 248, 447–455.
- Singh A, 2015, Soil Salinization and Waterlogging: A Threat To Environment and Agricultural Sustainability, Ecological Indicators 57, 128–130.
- Sinha P, Poland J, Schnölzer M, Rabilloud T, 2001, A New Silver Staining Apparatus and Procedure for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time of Flight Analysis of Proteins After Two–Dimensional Electrophoresis, Proteomics, 1, 835–840.
- Soares A L C, Geilfus C M, Carpentier S C, 2018, Genotype–Specific Growth and Proteomic Responses of Maize Toward Salt Stress, Frontiers in Plant Science, 9, 661.
- Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y, Ehsanpour A A, Rastgarjazii F, and Motamed N, 2010, Proteome Analysis of Soybean Leaves, Hypocotyls and Roots under Salt Stress. Proteome Science, 8, 1–15.
- Soil Quality Test Kit Guide, 1999, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Song J, Shi G, Xing S, Chen M, Wang B, 2009, Effects of Nitric Oxide And Nitrogen on Seedling Emergence, Ion Accumulation and Seedling Growth under Salinity in the Euphalophyte *Suaeda salsa*, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 172(4), 544–549.
- Soundararajan P, Manivannan A, Ko C, Muneer H, Jeong S B R, 2017, Leaf Physiological and Proteomic Analysis to Elucidate Silicon Induced Adaptive Response under Salt Stress in *Rosa hybrida* ‘Rock Fire’, International Journal of Molecular Sciences, 18, 1768.

- Spreitzer R J, 2003, Role of the Small Subunit in Ribulose–1,5–Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase, Archives of Biochemistry and Biophysics, 414, 141–149.
- Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, Weschke W, 2000, Differential Response of Antioxidant Compounds to Salinity Stress in Salt–Tolerant and Salt–Sensitive Seedling of Fox–Tail Millet *Setaria italica*, Plant Physiology, 109, 435–442.
- Sun Y, Fan X Y, Cao D M, Tang W, He K, Zhu J Y, vd., Z Y, 2010, Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in Arabidopsis, Developmental Cell, 19, 765–777.
- Szepesi A, Csiszar J, Gemes K, Horvarth E, Horvath F, Simon L M, vd., 2009, Salicylic Acid Improves the Acclimation to Salt Stress by Stimulating Absciscic Aldehyde Oxidase Activity and Absciscic Acid Accumulation, and Increases Na⁺ Contents of the Leaves without Toxicity Symptoms in *Solanum lycopersicum* L., Journal of Plant Physiology, 166, 914–925.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, vd., 2011, The String Database In 2011, Functional Interaction Networks of Proteins, Globally Integrated and Scored. Nucleic Acids Research 39, 561–568.
- Tabur S, Demir K, 2010, Protective Roles of Exogenous Polyamines on Chromosomal Aberrations in *Hordeum vulgare* Exposed to Salinity, Biologia, 65(6), 947–953.
- Taş İ, Öztürk A, 2011, Karaman–Ayrancı Tuzlu Alkali Topraklarının Islahında Jips Kullanımı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi, 14,1.
- Terrón-Camero L C, Peláez V M Á, Del-Val C, Sandalio L M, and Romero-Puertas M C, 2019, Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Heavy Metal Stress: Exogenous Application versus Endogenous Production, Journal of Experimental Botany, 7017, 4477–4488.
- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourgue S, Nicolas-Frances V, Rosnoblet C, Besson-Bard A, Wendehenne D, 2015, No Signaling in Plant Immunity: A Tale of Messengers, Phytochemistry, 112, 72–79.

- Trewavas A J, Rodrigues C, Rato C, Malho R, 2002, Cyclic Nucleotides: The Current Dilemma, *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), 425–429.
- Tripathi D K, Singh S, Singh S, Srivastava P K, Singh V P, Singh S, vd., 2017, Nitric Oxide Alleviates Silver Nanoparticles Agnps-Induced Phytotoxicity in *Pisum sativum* Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 167–177.
- Tuteja N, 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants, *Methods in Enzymology*, 428, 419–438.
- Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T, Takabe T, 2002, Effects of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide on Both Salt and Heat Stress Tolerance in Rice, *Plant Science*, 163, 515–523.
- Umezawa T, Hirayama T, Kuromori T, Shinozaki T, 2011, *Advances in Botanical Research*, The Regulatory Elsevier, İsmail T, Eds, *Networks of Plant Responses to Absciscic Acid*, Japan, 57, 202-233.
- Qi Y C, Wang F F, Hui Z, Liu W Q, 2010, Overexpression of *Suadea salsa* S-Adenosylmethionine Synthetase Gene Promotes Salt Tolerance in Transgenic Tobacco, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 263–269.
- Qiao W, Li C, Fan L M, 2014, Cross-Talk Between Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in Plant Responses to Abiotic Stresses, *Environmental and Experimental Botany*, 100, 84–93.
- Qu T, Liu R, Wang W, An L, Chen T, Liu G, vd., 2011, Brassinosteroids Regulate Pectin Methylesterase Activity and Atpme41 Expression in Arabidopsis under Chilling Stress, *Cryobiology*, 63, 111–117.
- Veicht N C, 2004, Horseradish Peroxidase: A Modern Review of A Classic Enzyme, *Phytochemistry*, 65, 249–259.
- Venekamp J H, 1989, Regulation of Cytosol Acidity in Plants Under Conditions of Drought, *Physiologia Plantarum*, 76, 112–117.

- Villora G, Pulgar G, Moreno D A, Romero L, 1997, Effect of Salinity Treatments on Nutrient Concentration in Zucchini Plants (*Cucurbitia pepo* L. var. Moschata), Australian Journal of Experimental Agriculture, 37, 605–608.
- Wang M, Xu Q, Yuan M, 2011, The Unfolded Protein Response Induced by Salt Stress in Arabidopsis, Methods in Enzymology, 489, 319–328.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A, 2004, Role of Plant Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response, Trends in Plant Science, 95, 244–252.
- Wang Z Y, 2012, Brassinosteroids Modulate Plant Immunity at Multiple Levels, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 7–8.
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig D F, Durner J, 2001, Nitric Oxide: Comparative Synthesis and Signalling in Animal and Plant Cells, Trends in Plant Science, 6, 177–183.
- Wildt J, Kley D, Rockel A, Rockel P, Segschneider H J, 1997, Emission of NO from Several Higher Plant Species, Journal of Geophysical Research, 102, 5919–5927.
- Witzel K, Weidner A, Surabhi G K, Börner A, Mock H, 2009, Salt Stress-Induced Alterations in the Root Proteome of Barley Genotypes with Contrasting Response towards Salinity, Journal of Experimental Botany, 60, 3545–3557.
- Wojtaszek P, 2000, Nitric Oxide in Plants: To No or not to No, Phytochemistry, 54(1), 1–4.
- Wu G Y, Brosnan J T, 1992, Macrophages Can Convert Citrulline into Arginine, Biochemical Journal, 281, 45–48.
- Wu X, Zhu W, Zhang H, Ding H, Zhang H J, 2011, Exogenous Nitric Oxide Protects Against Salt-Induced Oxidative Stress in the Leaves from Two Genotypes of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Acta Physiologiae Plantarum, 33, 1199–1209.

- Wu X, Yao X, Chen J, Zhu Z, Zhang H, Zha D, 2014, Brassinosteroids Protect Photosynthesis and Antioxidant System of Eggplant Seedlings from High-Temperature Stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 251–261.
- Wyn J R G, 1981, Physiological Processes Limiting Plant Productivity, Salt Tolerance In: C.B. Johanson Eds, Butter Worths, London, 271–292.
- Xia X J, Zhou Y H, Ding J, Shi K, Asami T, Chen Z, vd., 2011, Induction of Systemic Stress Tolerance by Brassinosteroid in *Cucumis sativus*, *New Phytologist*, 191, 706–720.
- Xiong J, Sun Y, Yang Q, Tian H, Zhang H, Liu Y, vd., 2017, Proteomic Analysis of Early Salt Stress Responsive Proteins in Alfalfa Roots and Shoots, *Proteome Science*, 11, 3.
- Yadu S, Dewangan T L, Chandrakar V, Keshavkant S, 2017, Imperative Roles of Salicylic Acid and Nitric Oxide in Improving Salinity Tolerance in *Pisum sativum* L., *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 231, 43–58.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S, 1999, An Alternative Pathway for Nitric Oxide Production in Plants: New Features of An Old Enzyme, *Trends in Plant Science*, 2, 128–129.
- Yan F, Schubert S, and Mengel K, 1992, Effect of Low Root Medium Ph on Net Proton Release, Root Respiration and Root Growth of Corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.), *Plant Physiology*, 99, 415–421.
- Grattan S V, Grieve C M, 1999, Mineral Nutrient Acquisition and Response by Plants Grown in Saline Environments. In: Pessarakli M. Eds, *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcel Dekker, New York, 203–229.
- Yang C J, Zhang C, Lu Y N, Jin J Q, Wang X L, 2011, The Mechanisms of Brassinosteroids Action: From Signal Transduction to Plant Development, *Molecular Plant*, 4, 588–600.

- Yang L, Tian D, Todd C D, Luo Y, Hu X, 2013, Comparative Proteome Analyses Reveal that Nitric Oxide is an Important Signal Molecule in the Response of Rice to Aluminum Toxicity, *Journal of Proteome Research*, 12, 1316–1330.
- Yaşar F, Ellialtıoğlu Ş, Özpay T, Uzal Ö, 2008, Tuz Stresinin Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) Antioksidatif Enzim (SOD, CAT, APX ve GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 18, 51–55.
- Yin H, Li S, Zhao X, Bai X, Du Y, 2008, Isolation and Characterization of an Oilseed Rape *Bn*skp1 Gene *Bn*skp1 Involved on Defence in *Brassica napus*, *Journal Biotechnology*, 136, S227.
- Yuan Y, Zhong M, Shu S, Du N, Sun J, Guo S, 2016, Proteomic and Physiological Analyses Reveal Putrescine Responses in Roots of Cucumber Stressed by NaCl, *Frontiers in Plant Science*, 7, 1035.
- Yuqin K, Guoqiang H, Huaqin H, Jiaxu L, 2009, Differential Regulation of Proteins and Phosphoproteins in Rice under Drought Stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 133–138.
- Zhang F, Zhang H, Xia Y, Wang G, Xu L, and Shen Z, 2011, Exogenous Application of Salicylic Acid Alleviates Cadmium Toxicity and Reduces Hydrogen Peroxide Accumulation in Root Apoplasts of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*, *Plant Cell Reports*, 30, 1475–1483.
- Zhang Y, Tan J, Guo Z, Lu S, He S, Shu W, 2009, Increased Absciscic Acid Levels in Transgenic Tobacco Over-Expressing 9 Cis–Epoxy-carotenoid Dioxygenase Influence H₂O₂ and NO Production and Antioxidant Defences, *Plant Cell and Environment*, 32, 509–519.
- Zhang Y Y, Liu J, Liu Y L, 2004, Nitric Oxide Alleviates Growth Inhibition of Maize Seedlings under Salt Stress, *Journal Plant Physiology Molecular Biology* 30, 455–459.

- Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W, 2006, Nitric Oxide Enhances Salt Tolerance in Maize Seedlings Through Increasing Activities of Proton-Pump and Na^+/H^+ Antiport in the Tonoplast, *Planta*, 224, 545–555.
- Zhang Y, Wei M, Liu A, Zhou R, Li D, Dossa K, vd., 2019, Comparative Proteomic Analysis of Two Sesame Genotypes with Contrasting Salinity Tolerance in Response to Salt Stress, *Journal of Proteomics*, 201, 73–83.
- Zheng C, Jiang D, Dai T, Jing Q, Cao W, 2010, Effects Nitroprusside, A Nitric Oxide Donor, on Carbon and Nitrogen Metabolism and the Activity of the Antioxidation System in Wheat Seedlings under Salt Stress, *Acta Ecologica Sinica*, 30, 1174–1183.
- Zhou Y, Qiu S, Amombo E, Zhu Q, Tang D, Huang M, vd., 2017, Nitric Oxide Alleviates Cadmium Toxicity in Tall Fescue Photosystem II on the Electron Donor Side, *Environmental and Experimental Botany*, 137, 110–118.
- Zhou Y J, Gao F, Li X F, Zhang J, Zhang G F, 2010, Alterations in Phosphoproteome under Salt Stress in *Thellungiella* Roots, *Chinese Science Bulletin*, 55, 3673–3679.
- Zhu J K, 2001, Plant Salt Tolerance, *Plant Science*, 62, 66–71.
- Zhu Z. Al-Aghabary K, Shi Q, 2004, Influence of Silicon Supply on Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidative Enzyme Activities in Tomato Plants Under Salt Stress, *Journal of Plant Nutrition*, 2712, 2101–2115.
- Zhu Z, We, G, Li J, Qian Q, Yu J, 2004, Silicon Alleviates Salt Stress and Increases Antioxidant Enzymes Activity in Leaves of Salt-Stressed Cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Plant Science*, 167, 527–533.
- Zörb C, Schmitt S, Neeb A, Karl S, Linder M, Schubert, S, 2004, The Biochemical Reaction of Maize (*Zea mays* L.) to Salt Stress is Characterized by a Mitigation of Symptoms and not by a Specific Adaptation, *Plant Science*, 167, 91–100.

İnternet Kaynakları (İnt. Kyn.)

- 1– <http://www.ebitki.com/index.php?hq=Hordeum%20vulgare%20L.&gr=Latince>,
12.10.2019
- 2– <http://bedavaodevsitesi.blogspot.com/2007/10/arpa.html>, 10.10.2019
- 3– https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri/Belgeler/cesit_katalogu.pdf,
25.09.2019



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Melike ELDEN
Doğum Yeri ve Tarihi : 03.05.1993, Afyonkarahisar
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05070848684 / eldenmelike3@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Cumhuriyet Anadolu Lisesi, (2007-2011)
Lisans : Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, (2011-2015)