



**TUZ STRESİ ALTINDAKİ EKMEKLİK BUĞDAY
(*TRITICUM AESTIVUM*) GENOTİPLERİNDE
TOLERANS VE miRNA HEDEF GENLERİNİN
İFADE SEVİYELERİ**

Gökçe KARADAYI

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Güleray AĞAR

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TUZ STRESİ ALTINDAKİ EKMEKLİK BUĞDAY
GENOTİPLERİNDE (*TRITICUM AESTIVUM*) TOLERANS VE
miRNA HEDEF GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİ**

Güleray AĞAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

TUZ STRESİ ALTINDAKİ EKMEKLİK BUĞDAY GENOTİPLERİNDE (*TRITICUM AESTIVUM*) TOLERANS VE miRNA HEDEF GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİ

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Gökçe KARADAYI tarafından hazırlanan bu çalışma, 02/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Üye : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Üye : Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

Üye : Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 22/06/2017 tarih ve 22 / 58 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

TUZ STRESİ ALTINDAKİ EKMEKLİK BUĞDAY GENOTİPLERİNDE (*TRITICUM AESTIVUM*) TOLERANS VE miRNA HEDEF GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİ

Gökçe KARADAYI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Buğday bitkisi tuz stresi gibi abiyotik streslere sürekli maruz kalmakta ve verimi düşmektedir. Çalışmamızda, 11 ekmeklik buğday genotipi (Tır, Karasu 90, Haymana 79, Kırmızıgül, Bayraktar 2000, Es 26, Müfitbey, Conkesme, Kocabuğday, Gerek 79 ve Akbuğday) 200 mM tuzluluk stresine maruz bırakılmış ve tuz toleransı ile ilgili genler (GRP, CIPK29, SOS1, SOD2 ve SAP1) ve miRNA hedef genlerinin (bHLH135-benzeri transkripsiyon faktörü, PI-4 proteaz inhibitör benzeri protein, SQUAMOSA promotör bağlama protein benzeri, 70 kDa HSP geni, AP2/EREBP transkripsiyon faktörü/RAP2-7 benzeri etilen cevap transkripsiyon faktörü, Got1/Sft2 benzeri vezikül iletim protein ailesi izoform 1, Rab15B protein/ABA cevap geni) genomdaki ifade seviyeleri araştırılmıştır. Toleransla ilgili ve miRNA hedef genlerinin seviyeleri hesaplanarak tuzluluk stresinde etkili olan genler ve toleranslı genotipler belirlenmiştir. Genlerin ifade seviyeleri buğday genotiplerinin kökünde gövdeye göre daha yüksek upregülasyon gösterdiği bulunmuştur. Hem fizyolojik hem de gen ifadesi analizleri sonucunda en fazla tolerans meydana gelen genotipin Karasu 90 olduğu tespit edilmiştir. Buğday genotiplerinde tuzluluk toleransına en fazla katkı sağlayan genler olarak miR482 hedef geni olan Rab15B proteini ile SOS1 geni bulunmuştur. Ayrıca, CIPK29 ve SOD2 genlerinin tuz stresi altındaki aynı genotiplerde upregülasyon gösterdikleri tespit edilmiştir.

2017, 106 sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, Tuzluluk stresi, Gen ifadesi ve miRNA hedef genleri

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

EXPRESSION LEVELS OF TOLERANCE AND miRNA TARGET GENES IN BREAD WHEAT GENOTYPES (*TRITICUM AESTIVUM*) UNDER SALT STRESS

Gökçe KARADAYI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AĞAR

The wheat plant is constantly exposed to abiotic stresses such as salt stress and the yield is reduced. In our study, expression levels of genes relative to salt stress tolerance (GRP, CIPK29, SOS1, SOD2 and SAP1) and miRNA target genes (bHLH135-like transcription factor, PI-4 protease inhibitor like protein, SQUAMOSA promoter binding protein-like, 70 kDa HSP gene, AP2/EREBP transcription factor/RAP2-7-like ethylene response transcription factor, Got1/Sft2-like vesicle transport protein family isoform 1, Rab15B protein/ABA response gene) in the plant genomes were investigated when 11 genotypes (Tir, Karasu 90, Haymana 79, Kırmızıgül, Bayraktar 2000, Es 26, Müfitbey, Conkesme, Kocabuğday, Gerek 79 and Akbuğday) of *Triticum aestivum* plants exposed to 200 mM salinity stress. Moreover, the genes effective in salinity stress and tolerant genotypes were determined by the calculation of expression levels of miRNA targets and genes relative to tolerance. According to the results, related genes in the roots of wheat varieties were more upregulated than the genes in the stem samples. Besides, both physiological and gene expression results showed that Karasu 90 was the most tolerant genotype. Furthermore, miR482 target gene Rab15B protein and SOS1 were most effective contributors to salinity tolerance in wheat genotypes. CIPK29 and SOD2 genes were upregulated in the same genotypes under salt stress.

2017, 106 pages

Keywords: Wheat, Gene Expression, miRNA Target Genes and Salinity stress

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu çalışmanın planlanması ve değerlendirilmesinde büyük emeği geçen ve çalışmalar dışında da her zaman yanımda olan hocam Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim, çalışmalarına yardımda bulunan ve her zaman yanımda olan Sayın Arş. Gör. Esra ARSLAN, Sayın Uzm. Biyolog Burcu SİĞMAZ ve Sayın Uzm. Biyolog Semra YAĞCI'ya, tez yazım sürecinde desteklerini hiç esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a ve tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca benim tüm zorluklarıma katlanan sevgili eşim Arş. Gör. Dr. Mehmet KARADAYI'ya ve bu süre boyunca beni hiç üzmeyen oğluma, kendilerinden görmüş olduğum destek ve güvenden dolayı aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Gökçe KARADAYI

Mayıs, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	10
2.1. Buğday ve tuz stresi	10
2.2. Tuz stresine Bitkilerin Cevabı.....	11
2.3. Tuza Toleranslı Tahılların Gelişimi	12
2.4. Tuz Stresi Tolerans Genleri.....	13
2.4.1. Aşırı Tuza Duyarlı (Salt Overly Sensitive -SOS) Genleri	15
2.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Genleri	18
2.4.3. CBL-Etkileşen Protein Kinaz (CBL-Interacting Protein Kinases-CIPK) Genleri	21
2.4.4. Glisince Zengin Protein (Glycine Rich Protein-GRP) Genleri	27
2.4.5. Stresle İlişkili Protein (Stress Associated Protein) SAP Genleri	32
2.5. miRNA'lar ve hedef genler	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal	39
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	39
3.1.3. Kullanılan cihazlar	40
3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	41
3.1.3.a. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	41
3.1.3.b. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler	41
3.1.3.c. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler.....	42
3.2. Yöntem	43

3.2.1. Kullanılan bitki materyali.....	43
3.2.2. Tuzun bitkiye uygulanması	43
3.2.3. Aday genlerin eldesi için biyoinformatik çalışmalar	45
3.2.4. DNA izolasyonu	45
3.2.5. Kullanılan primerler	46
3.2.4.b. PCR protokolü.....	49
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi.....	49
3.2.6. RNA izolasyonu	50
3.2.7. cDNA sentezi	51
3.2.8. qRT-PCR ile Gen İfade Analizi	51
3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	53
4.1. Kök Analizleri	54
4.2. Gövde Analizleri	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	76
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	107

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik Asit
AGO	Argunat
AHA	<i>Arabidopsis</i> H ⁺ -ATPaz
APX	Askorbat Peroksidaz
BSA	Bovin Serum Albumin
Ca	Kalsiyum
CaM	Kalmodulin
CAT	Katalaz
CBL	Kalsinörin B-benzeri Protein
CDPK	Kalsiyum Bağımlı Protein Kinazlar
CML	CaM benzeri Protein
CSD	Soğuk Şok Domaini
CIPK	CBL-Etkileşen Protein Kinaz
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DCL	Dicer benzeri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit Trifosfat
DREB	Kuraklık Stresi Transkripsiyon Faktörü
dsRNA	Çift Zincirli RNA
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EST	Eksprese Dizi Etiketleri
Et-Br	Ethidium Bromid
g	Gram
GRP	Glisince Zengin Protein
HKT	Yüksek Afiniteli K ⁺ Taşıyıcısı
K	Potasyum
KCN	Potasyum siyanid
LCT	Düşük Afiniteli Katyon Taşıyıcısı
LEA	Geç Embriyogenez Bağımlı

M	Molarite
Mg	Magnezyum
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
MYBRS	MYB Tanıyan Sekans
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit
ng	Nanogram
NDPK	Nükleosit difosfat Kinaz
NO	Nitrik Oksit
OD	Okuma Değeri
OH	Hidroksil
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PL	Pyridoksal kinaz
PLP	Pyridoksal-5-fosfat
PPiaz	H ⁺ -İnorganik Pirofosfataz
ProT	Prolin Transporteri
PTGS	Post Transkripsiyonel Gen Sessizleştirme
PVP	Polivinilpirolidon
qRT-PCR	Kantitatif RT-PCR
QTL	Kantitatif Karakter Lokus
RISC	RNA tarafından İndüklenmiş Gen Susturma Kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
RNP	Ribonükleoprotein
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RRM	RNA Düzenleyici Motif
RT-PCR	Real Time PCR
rRNA	Ribozomal RNA

SAP	Stres İlişkili Protein
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sRNA	Küçük RNA
SnRNA	Küçük Nüklear RNA
SnRNP	Küçük Nüklear Ribonükleoprotein
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOS	Tuza Aşırı Duyarlı
TBE	Tris-Borat-EDTA Tamponu
TE	Tris-EDTA Tamponu
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ZFP	Çinko Parmak Protein
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tuz stresinde SOS yolu	17
Şekil 2.2. Tuz stresinde süperoksit dismutaz aktivitesi	20
Şekil 2.3. Abiyotik streslerde kalsiyum mekanizması	22
Şekil 2.4. CBL-CIPK sinyal sisteminde rol alan domainlerin yapısı	24
Şekil 2.5. Glisince zengin proteinler.....	28
Şekil 4.1. Buğday genotipleri köklerinde seçilen genlerin RT-PCR çalışma eğrileri	53
Şekil 4.2. Buğday genotipleri gövdelerinde seçilen genlerin RT-PCR çalışma eğrileri	53
Şekil 4.3. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki SOS1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	56
Şekil 4.4. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki SOD2 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	57
Şekil 4.5. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki CIPK29 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	57
Şekil 4.6. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki GRP geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	58
Şekil 4.7. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki SAP1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	59
Şekil 4.8. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR156a hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	59
Şekil 4.9. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR482 hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	60
Şekil 4.10. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR172b hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	61
Şekil 4.11. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR6108f hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	61
Şekil 4.12. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR5655 hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	62

Şekil 4.13. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR164 hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	63
Şekil 4.14. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR159c hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	63
Şekil 4.15. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki SOS1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	67
Şekil 4.16. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki SOD2 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	68
Şekil 4.17. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki CIPK29 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	68
Şekil 4.18. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki GRP geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	69
Şekil 4.19. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki SAP1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	69
Şekil 4.20. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR156a hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	70
Şekil 4.21. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR482 hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	71
Şekil 4.22. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR172b hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	71
Şekil 4.23. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR6108f hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	72
Şekil 4.24. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR5655 hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	73
Şekil 4.25. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR164 hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	73
Şekil 4.25. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR159c hedef geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tuz stresinde rol alan düzenleyici genler	14
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi	39
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi	40
Çizelge 3.3. Fizyolojik testlerde kullanılan Ekmeklik buğday genotipleri.....	44
Çizelge 3.4. Kullanılan primerlerin baz dizilimi	47
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan miRNA hedef genlerinin qRT-PCR için primer dizileri.....	48
Çizelge 4.1. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerdeki tolerans genlerinin ifade oranları	54
Çizelge 4.2. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerdeki miRNA hedef genlerinin ifade oranları.....	55
Çizelge 4.3. <i>Triticum aestivum</i> bitkisi genotiplerinde kök analizine göre tuzluluğa toleranslılık yönünden gruplandırılması	64
Çizelge 4.4. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki tolerans genlerinin ifade oranları.....	65
Çizelge 4.5. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miRNA hedef genlerinin ifade oranları	66
Çizelge 4.6. <i>Triticum aestivum</i> bitkisi genotiplerinde gövde analizine göre tuzluluğa toleranslılık yönünden gruplandırılması.....	75

1. GİRİŞ

Son yüzyılda dünya nüfusu hızlı bir şekilde artmakta, 2050 yılında ise 9,3 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonymous 2017). Bunun bir sonucu olarak yakın gelecekte insanoğlunun açlıkla karşı karşıya kalması kaçınılmaz görülmektedir. Bu noktada primer besin üreticileri olarak yeryüzündeki canlılığın devamının sağlanmasında büyük rolü olan bitkiler, ilgili araştırmaların en temel öğelerini oluşturmaktadırlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Tahıllar insanlık için en önemli bitki grubudur. Tahıllar içerisinde yer alan buğday, Dünya çapında tüketilen karbohidratların %55'ini, kalorisinin ise %20'sini sağlamaktadır (Breiman and Graur 1995). Bununla birlikte, küresel iklim değişikliğinin yanısıra çeşitli çevresel streslerin de tahıl üretimini olumsuz şekilde etkilediği bilinmektedir. Abiyotik stresler grubunda yer alan yüksek tuz stresi, dünya üzerindeki sulama alanlarının en az %20'sinde tahıl üretimini azaltan çevresel stresler içerisindeki en etkili olanlardan birisidir (Flowers 2004).

Dünya üzerinde sulama alanlarının 45 milyon hektarından daha fazlası tuz tarafından zarar görmekte ve her yıl yaklaşık 1,5 milyon hektar toprak, yüksek tuzluluk seviyesinin bir sonucu olarak üretimden çıkarılmaktadır. Bu durum her yıl yüzlerce milyon doların kaybedilmesine sebep olmaktadır (Munns and Tester 2008). Böyle oldukça kritik ekonomik kayıpların yaşanmasına sebep olan toprak tuzluluğunun ortaya çıkışı yanlış su yönetimi, yüksek buharlaşma ve deniz suyu uygulanmasının bir sonucudur (Tuteja 2007). Genelde sulama suyu, kalsiyum (Ca^{+2}), magnezyum (Mg^{+2}) ve sodyum (Na^{+}) içermektedir. Uygulamanın ardından su buharlaştığında toprakta Na^{+} baskın hale gelmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Böyle durumlarda toprak çözeltisindeki yüksek Na^{+} konsantrasyonunun besin-iyon aktivitelerini ve Na^{+}/Ca^{+2} veya Na^{+}/K^{+} 'un oranını değiştirdiği bilinmektedir. Ayrıca toprakta katyon konsantrasyonundaki artışlar köklere suyun girişini azaltmaktadır. Dolayısıyla topraktaki katyon konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak bitkilerde ortaya çıkan olumsuzluklar, kuraklık sonucu ortaya çıkan olumsuzluklarla birbirine benzerdir (Batoool *et al.* 2014).

Bitkiler tuza olan tepkileri bakımından iki grupta incelenmektedir. Birinci grupta yer alan glükofitler 200 mM altındaki tuz konsantrasyonlarında büyüyebilmekte ve pekçok tahıl türü bu grup içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu gruba ait bitkiler, şeker, prolin ve glisin betain gibi çözünen maddelerin sentezini artırarak osmotik dengeyi korumaya ve topraktan tuz alımını engellemeye çalışırlar (Tuteja 2007). İkinci grupta ise tuza toleranslı bitkiler olan halofitler yer almaktadır. Bu gruptaki bitkiler 250 mM tuz konsantrasyonunun üzerindeki değerlere sahip topraklarda büyüyebilmekte, hücre vakuollerinde tuzu biriktirme ve ayırma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Böylece sitozoldeki tuz artışını önledikleri ve hücrelerinde yüksek K^+/Na^+ oranını korudukları öne sürülmektedir (Hu and Schmidhalter 2005).

Tuzluluk stresi, bitkilerde birbirinden karmaşık ve işleyişleri henüz tam olarak aydınlatılamamış mekanizmalarla su ve iyon toksisitesine, besin element düzensizliklerine, oksidatif strese, metabolik süreçlerin değişmesine, membran hasarına, hücre bölünmesinde azalmaya ve düzensizliklere ve de genotoksiteye neden olmaktadır (Hasegawa *et al.* 2000; Zhu 2007). Bunların bir sonucu olarak tuz stresinin bitkilerin büyüme, gelişme ve hayatta kalma olasılıklarını azalttığı öne sürülmektedir. Ayrıca bir bitkinin gelişim esnasındaki tuz stresi bitkideki yağ metabolizması, protein sentezi, fotosentez, stoma kapanması gibi metabolik süreçlerde olumsuz etkiler ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Parida and Das 2005).

Tuzluluğun bitkilerdeki ilk etkisi osmotik stres şeklindedir. Yani tuz stresinden dolayı toprakta su olmasına rağmen bitki sudan yeterince yararlanamamaktadır (Çulha ve Çakırlar 2011). Tuz stresinin ikinci etkisi ise bitkilerde yapısal bozukluk ve birçok toksik maddelerin sentezlenerek bitki bünyesinde birikmesi şeklinde görülmektedir. Tuzluluktan dolayı bitkilerde birçok fonksiyon, özellikle fotosentezde aksamalar olmakta, klorofil miktarında azalma ve zarar görme, potasyum ve bazı besin elementlerinin alımında sıkıntılar yaşanmaktadır (Botella *et al.* 2005; Hong *et al.* 2010).

Tuzluluğun bitkiler üzerindeki etkisi iki farklı fazda incelemektedir (Munns 2005). Bunlardan birincisi, osmotik etki nedeniyle ortaya çıkan hızlı faz (osmotik stres), diğeri

ise bitkilerde tuz toksisitesine neden olan yapraklarda tuz birikimi nedeniyle oluşan yavaş fazdır. Bu faz tuzun spesifik etkilerinin görüldüğü fazdır.

Faz-1, bitkiler strese kısa süreli maruz kaldıklarında oluşur ve bitki köklerinin dışındaki tuzlu çözeltinin osmotik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Kök çevresindeki yüksek tuz konsantrasyonu su alımını daha da zorlaştıran bir seviyeye çıkartmaktadır. Bunun sonucunda ise yaprak ve kök büyümesinde azalma gözlenir. Gövde osmotik strese neden olan yüksek tuz konsantrasyonuna kökten daha duyarlıdır. Bu özellik toprak neminin tutulmasına izin vermekte ve topraktaki tuz konsantrasyonunun artışı önlenmektedir (Munns and Tester 2008).

Faz-2 ise bitkinin strese uzun süreli maruz kalmasından sonra oluşmaktadır. Bu faz tuzun toksik etkisine karşı bitkinin gösterdiği bir cevaptır. Tuzlar hızlı bir şekilde birikir ve enzim aktivitesini inhibe ederler. Duyarlı bitkilerde bitkinin fotosentetik kapasitesini azaltır ve yaşlı yapraklarda ölüm meydana gelir. Faz 2’de iyonlar, özellikle de Na^+ iyonu köklerden ziyade terleme akışına göre yaprak ayalarında birikir. Özellikle yaşlı yapraklarda Na^+ birikmesi toksik etki yapar. Yaşlı yapraklıların ölme oranının, yeni yaprakların üretilen oranından daha fazla olması durumunda, bitki genç yaprakların karbonhidrat gereksinimi karşılayamamakta ve büyüme oranını daha da azaltmaktadır (Munns and Tester 2008).

Fotosentetik dokuda Na^+ birikimi fotosentez bileşenlerini etkiler (Munns 2005). Bitkilerde yüksek Na^+ birikimi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini artırabilir. ROT antioksidatif mekanizmalarla hızla uzaklaştırılır (Foyer and Noctor 2003). Normalde ROT’lar bitkilerin abiyotik strese karşı olan cevaplarında hem stres metabolizmasının toksik yan ürünleri olarak hem de kalsiyum, hormon ve protein fosforilasyonu temelli stres cevaplarının ortaya çıkmasından sorumlu olan karmaşık metabolik süreçlerde önemli bir sinyal iletim molekülü olarak ikili rol oynamaktadırlar (Miller *et al.* 2010).

Bitki hormonları, bitkide üretilen ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunan sinyal molekülleridir. Absisik asit (ABA), bitkilerin tuza tepkisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ca^{+2} ve ABA, tuz stres sinyalleri olan Geç Embriyogenez Bağımlı (Late Embryogenesis Abundant, LEA) genlerinin ekspresyonuna aracılık etmektedirler. Yapılan çalışmalarda LEA tipi genlerinde meydana gelen aktivasyonun hasarlı tamir yollarını belirlediğini bildirilmiştir. Tuz ve osmotik strese LEA gen ekspresyonunun düzenlenmesi hem ABA-bağımlı hem de ABA-bağımsız sinyal yolları tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu durum ABA-bağımlı ve bağımsız transkripsiyon faktörlerinin stres toleransını geliştirmede ve cevabı oluşturmak için sinerjik bir etki gösterdiklerinde birbirleriyle karışabileceğine işaret etmektedir (Xu *et al.* 2006; Batool *et al.* 2014).

Tuz stresi, bitkileri birçok fizyolojik ve moleküler düzeyde etkilemektedir. Bitki büyüme döngüsünün en hayati safhası tohum çimlenmesidir. Bitkiler üzerine yapılan birçok çalışmada tuz stresinin tohum çimlenmesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir (Akbari *et al.* 2011; Khodarahmpour *et al.* 2012). Tuz stresi tohumun su alımını, nükleik asit metabolizmasında görev alan enzimlerin etkilerini, protein metabolizmasını ve hormonal dengeyi olumsuz etkileyerek çimlenmeyi azaltmaktadır (Khan and Weber 2006; Othman *et al.* 2006; Dantas *et al.* 2007; Gomes-Filho *et al.* 2008).

Kloroplastlardaki yüksek Na^{+} ve klor (Cl^{-}) birikimi fotosentezi kısıtlamaktadır (Fisarakis *et al.* 2001). Tuz stresi karbon metabolizması ve fotofosforilasyonunu yüksek oranda etkilemektedir (Sudhir and Murthy 2004).

Tuzluluk stresine uzun süreli maruz kalan bitkilerin olgun yapraklarında erken senesense yol açabilen iyonik stres oluşmaktadır. İyonik stres, enzim aktivitesinin değişmesi, protein sentezinin bozulması, yüksek Na^{+} 'dan dolayı olgun yapraklarda toksisite meydana gelmesi ve daha yaşlı yaprakların döneminden önce dökülmesine sebep olmaktadır. Bununla birlikte, fotosentetik alandaki azalmaya karşı bitkinin büyümesinin devamını desteklemek için tolerans mekanizmanın olduğu ileri sürülmüştür (Carillo *et al.* 2011). Ayrıca, aşırı kloroid, bitki enzimlerini etkileme potansiyeline ve hücrelerin şişmesine neden olur. Bu durum enerji üretiminin

azalmasıyla sonuçlanır. Bitkiler kloridin neden olduğu bu olumsuzluklarla başa çıkabilmek için hücrelerden dışarıya tuzu çıkarmak ya da hücrelerde mevcut olanı tolere etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir (Hasegawa *et al.* 2000).

Tuza duyarlı bitkilerde yüksek Na^+ birikimi ROT üretimini arttırabilir. ROT'ların bitki büyüme, gelişme, gravitropizma, hormon fonksiyonları ve diğer birçok fizyolojik olaylarda yer alan sinyal yolları etkilediğini bildiren pek çok çalışma sunulmuştur (Apel and Hirt 2004; Foyer and Noctor 2005; Miller *et al.* 2008). Bu durumların çoğunda, ROT üretimi genetik olarak programlanmakta ve üretilen ROT'lar ikincil mesajlar olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle ROT'ların hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de pleiotropik etkiye sahip oldukları görülmektedir. ROT'lar fazla üretildiklerinde meydana gelen kontrolsüz oksidasyon, hücresel hasara ve sonuçta hücre ölümüne yol açmaktadır. Bitkinin bu durumdan hasar görmesini önlemek için mevcut antioksidant mekanizması aktif oksijeni kontrol altında tutmaktadır (Bose *et al.* 2014). Tuz stresi tarafından bitkiler zarar görmediğinde ROT'lar hızlı bir şekilde antioksidant mekanizmalar tarafından yok edilmektedir (Ahmad *et al.* 2010). Yapılan çalışmalarda ROT sinyallerinin tuzluluk stresine cevapta da önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. ROT'lar hücre temel bileşiklerini, özellikle antioksidantlar tarafından detoksifiye olmayan membran lipidlerini oksitleyebilirler ve hücre membran hasarına neden olurlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat-glutatyon döngüsü ROT detoksifikasyonunun önemli yollarından bazılarıdır. Bu enzimler tuzluluk gibi diğer abiyotik stresler altında uyarılmaktadır.

Tuz stresine maruz kalmış bitkiler bu stresin neden olduğu olumsuz etkilere karşı biyokimyasal ve moleküler düzeyde tolerans mekanizmaları geliştirmektedir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinin sebeplerinden biri de, bitkilerin tuz stresine uyum sağlamaya çalışmasıdır (Xiong *et al.* 2002). Tuz stresi altında tuz toleransına katkıda bulunan proteinleri kodlayan genler veya tuz stresi altında hücrelerin korunmasına ve onarılmasına yol açan yollarda bulunan enzimlerin aktivitesini düzenleyen genler ve bu genleri aktive eden transkripsiyon faktörleri ifade olmaktadır. (Flowers 2004; Munns 2005).

Transkriptomik analizler strese cevapta rol alan aday genler ve gen ifadesinin gösterilmesinde kullanılan mRNA seviyesi hakkında detaylı bilgi sağlamaktadır. Genomik yaklaşımlar ilgili genlerin karakterizasyonu, kodlanması ve klonlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Tuzluluk stresine cevap çalışmalarında ya upregüle ya da downregüle olan genler ve transkripsiyon faktörlerinin büyük oranında transkriptomik ve genomik yaklaşımların kullanımı karakterize edilmekte ve belirlenmektedir. Transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunu kontrol eden en önemli düzenleyiciler olarak düşünülmektedirler. *bZIP* (Temel Lösin Fermuarı), *WRKY* (*WRKY* DNA bağlama proteini), *AP2* (Aptela 2), *NAC* (Nitrojen Asimilasyon Kontrolü), *CZH2* (*DOCK*; sitokinesize adanan protein) Çinko parmak geni ve *DREB* (Dehidrasyon Cevap Elementi) familyaları stres cevap üyelerinin büyük bir kısmını içermektedirler. Bu transkripsiyon faktörleri genlerin promotörlerinde özel cis-aktin elementine bağlanarak hedef genlerin geniş bir dizisinin ekspresyon kontrolünü yapma yeteneğine sahiptirler (Gupta and Huang 2014). Tuza duyarlı buğday genotiplerinde tuz stresinin *bZIP* geninin upregüle ederek dormansiye neden olduğu, fakat tuza toleranslı varyetelerde gen ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Johnson *et al.* 2002). Ayrıca hem buğday hem de çeltikte *NAC* transkripsiyon faktörünün aşırı ekspresyonu tuz toleransını sağlamış ve böylece bu faktörün stresi hafifletmedeki role sahip olabileceği belirlenmiştir (Nakashima *et al.* 2007). Çeltikte transkripsiyonel düzenlemeler ile yapılan çalışmalar *DREB1/CBF*, *DREB2*, *AREB/ABF*'yi kapsayan genlerin abiyotik strese cevapta önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (Fujita *et al.* 2011; Mizoi *et al.* 2012; Fujita *et al.* 2013). Halofit bitki türlerinden olan *Spartina alterniflora* tuz stresine maruz bırakıldığında osmotik düzenleme ile ilgili 10 genin upregülasyon sergilediği belirtilmiştir (Baisakh *et al.* 2006).

Tuzluluk stresinde rol oynayan Calcineurin B benzeri protein (*CBL*) *CBL*-etkileşen protein kinaz (*CIPK*) kompleksleri, hücre içi kalsiyum sinyallerini çözen ve bitki hücresinin strese transkripsiyonel ve translasyonel yanıtını düzenleyen mekanizmalardan biridir. *CBL* veya *CIPK*'ların aşırı ekspresyonu çimlenme, fide ve biyomas üretimi yoluyla çeşitli bitki türlerinde tuz toleransının artmasına neden olmuştur. Yine *CIPK*'ların tuz stresi meydana gelen bitkilerde Na^+ iletiminde, ROT

metabolizmasında ve ABA duyarlılığında rol aldığı gösterilmiştir (Kennedy *et al.* 2015). Zhang *et al.* (2013) *Populus euphratica* bitkisinde *PeCBL1*'in tuzlu koşullar altında hücreden dış ortama Na^+ akışını olumsuz etkilediğini belirtmiş, fakat bu olaya neden olan mekanizmalar açıklanmamıştır. Ancak, *CBL* ve *CIPK* komplekslerinin ABA bağımlı olduğu düşünülmektedir (Zhang *et al.* 2013). Bezelyede, tuzluluk stresi ile indüklenen helikaz 45 (*PDH45*) transkriptinin upregülasyonu ABA-bağımlı yolu, *CBL* ve *CIPK* genlerinin ise ABA-bağımsız yolu takip ettiği bildirilmiştir (Mahajan *et al.* 2006). ABA-bağımsız yollar osmotik stres gen ekspresyonunda önemli role sahiptirler. Stres indükleyici genlerin promotörleri, transkripsiyonel faktörler tarafından düzenlenen MYB tanıyan sekans (MYBRS), ABRE, BRE/CRT gibi cis-regülatör elementlerini içerir. ABA-bağımlı tuzluluk stresi sinyallerinin stres cevap genini arttırmak için ABRE elementine bağlanan AREB denilen temel lösün fermuar transkripsiyon faktörünü aktive ettiği bilinmektedir (Mahajan and Tuteja 2005).

Tuzluluk stresinde rol alan bir başka tolerans geni ise A20/AN1 çinko parmak domaini içeren stresle ilişkili protein (SAP) genidir. *Oryza sativa*'da *SAP11* geninin, su eksikliğini ve tuz stres toleransını birkaç ortak endojen genin ekspresyonunu etkileyen bir sinyal yolunu kullanarak artırdığı bildirilmiştir (Giri *et al.* 2011).

Süperoksit dismutaz (*SOD*) tuzluluk stresinde rol alan antioksidant savunma genlerinden biridir. Bu enzim mayalarda tuz toleransının plazma membran antiporter olarak teşhis edilmiştir (Shi *et al.* 2003b). Diğer taraftan, Na^+ -ATPaz aktivitesinden yoksun bir *Saccharomyces cerevisiae* suşunda (RH16.6) *SOD2* ekspresyonunun, tuza tolerans yeteneğini geri kazandırdığı belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2006). Ayrıca transgenik *Arabidopsis* bitkisinde *SOD2* geninin tuz stresi altında aşırı ekspresyonu tohum çimlenmesini teşvik etmiştir (Gao *et al.* 2003).

Tuz stresinin en önemli genlerinden biri ise Salt Overly Sensitive 1 (*SOS1*)'dir. Membran Na^+/H^+ antiporteri olarak Na^+ 'u dışa aktaran bir proteindir. *SOS1* kökten gövdeye Na^+ iletimini düzenler ve kök yüzeyinde Na^+ dışa aktarımına aracılık

etmektedir. Pek çok çalışmada tuz stresi ile *SOS1* geninin upregüle olduğu gözlemlenmiştir (Sandhu *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2017).

Bir başka tolerans geni olan bitki *GRP*'leri tekrarlayıcı glisin kalıntıları ile karakterize edilen bir protein grubudur. Bu proteinin çeşitli abiyotik streslerde bitkiye tolerans kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca transgenik *Arabidopsis* bitkisinde tuz ve ABA uygulaması sonrasında *GRP* geninin tohum çimlenmesini olumlu etkilediği bildirilmiştir (Long *et al.* 2013).

Son yıllardaki araştırmalar bitkilerin stres koşulları altında bitki büyümesini ve gelişmesini sağlamak için kritik post transkripsiyonel gen ekspresyonu düzenleyicileri olarak miRNA'ların rol oynadıklarını belirtmişlerdir (Ku *et al.* 2015). miRNA'lar müdahaleci RNA'ya (RNAi=RNA interference) dayalı gen sessizleştirme mekanizmasında görev alan küçük RNA'lardan biridir (Bodur and Demirpençe 2010; Xin *et al.* 2010). miRNA'lar küçük (20-24 nt) endojen RNA'ların bir sınıfını temsil etmekte ve DNA metilasyonu, kromatin yeniden modellenmesi, translasyonel baskılama ve doğrudan mRNA ayrılması yoluyla gen ekspresyonunu düzenlemektedirler (Zhang 2015). Genellikle, stresle upregüle olan miRNA'lar hedef mRNA'ları downregüle ederken, bu miRNA'ların baskılanması pozitif regülatörlerin birikmelerine ve işlevlerine bağlıdır (Chinnusamy *et al.* 2007).

Güncel çalışmalarda tahıllarda tane gelişimi ve fitohormon sinyalizasyonunun yanı sıra karbohidrat protein metabolizması, hücresel taşıma ve sinyal iletimi gibi olayları kapsayan besin biyosentezi gibi metabolik yolları hedef alan çok sayıda miRNA tanımlanmıştır (Sunkar and Zhu 2004; Zhao *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2013; Zhang and Wang 2015). Bir chemocyanin-like protein geni (*TaCLP1*) olan tae-miR408'in hedef geninin yüksek tuzluluk ve çizgili pasına karşı buğday bitkisinde düzenleyici bir rol oynadığı bulunmuştur (Feng *et al.* 2013).

Tuz stresi uygulanan *Medicago* bitkisinde AP2/EREBP ve bHLH transkripsiyon faktörleri, α -tubulin ve Rab11 proteinlerinin toleransta rol aldıkları bildirilmiştir. Aynı şekilde *Arabidopsis* bitkisinde ERF ile bHLH transkripsiyon faktörleri, Rab18 ve receptor-like protein kinazların yüksek tuzluluk stresinde toleransa katkıda bulunmuşlardır (Zahaf *et al.* 2012). Yine AP2 / ERF TF ailesindeki proteinlerin, buğday ve transgenik çeltikde tuz stresine tolerans kazandırdığı gösterilmiştir (Chen and Guo 2008). Nitekim Eren *et al.* (2015) tarafından yapılan bir çalışmada buğday bitkisine uygulanan tuz stresinin bu genleri hedef alan miRNA 'ları belirlemişlerdir. Buna ek olarak, buğday bitkisinde zma-miR482-5p'nin varsayılan hedefi olan ve su eksikliği ile bağlantılı bir dehidrin proteini rab15B geni tolerans sürecinde varolduğu tespit edilmiştir (Hassan *et al.* 2014).

Yüksek tuz stresinin moleküler mekanizmasının anlaşılması ve sonrasında tuza toleranslı tahılların geliştirilmesi odaklı çalışmalara ağırlık verilmesinin, günümüzde tahıl ürünlerinde tuz stresi etkisi ile meydana gelen azalma problemini çözmede kullanılabilecek önemli bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında bakıldığında, hazırlanan mevcut çalışmamızda, buğday bitkisinde tuzluluk stresine karşı toleranslı çeşitlerin belirlenmesi, tuzluluk stresi ile ilgili genlerin (GRP, CIPK29, SOS1, SOD2 ve SAP1) ve miRNA'ların (miR156a, miR482, miR12b, miR6108f, miR5655, miR164 ve miR159c) hedef genlerinin ifade düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Buğday ve tuz stresi

Buğday, $2n=14$ kromozomlu Diploit (AA), $2n=28$ kromozomlu Tetraploit (AABB) ve $2n=42$ kromozomlu Hekzaploit (AABBDD) olmak üzere 3 gruba ayrılır. Ekmeklik buğday, *Triticum aestivum*'dur. *T.durum* ve *T.compactum* ise diğer önemli buğday türleridir (Briggle and Reitz 1963). Buğday Dünyada yaygın olarak üretilen (%55) tahıllar arasında en çok tüketilen tahıllardan birisi olup tuza yüksek derecede toleransı olmayan glikofit bir bitki türüdür. Aynı zamanda morfolojik ve fizyolojik özellikler dikkate alındığında yeryüzünde 3000 buğday çeşidi tespit edilmiştir. Yalnız Türkiye'de bulunan çeşitlerin sayısı 500'den fazladır. Buğday bitkisindeki bu zengin çeşitliliğe rağmen özellikle topraktaki yüksek tuz oranı bütün Dünya'da bulunan buğday kültürlerinde büyük düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Ayolie *et al.* 2011). Toprak ve suda yüksek tuz konsantrasyonunun buğday üretimine zararlı etkilerinden dolayı birçok ülkede bilim adamlarının dikkatini çekmiştir (Poustini and Siosemardeh 2004; Vaziri *et al.* 2004). Bu nedenle, buğday bitkisinde tuz stresi toleransının geliştirilmesi, yeterli gıdanın sağlanması için bir görev olarak benimsenmiştir. Ülkemizde de buğday çeşitlerinde fizyolojik araştırmalar yapılmıştır. Bir araştırmada tuza tolerans indeksi hesaplanarak buğday çeşitlerinin tuza toleransları belirlenmiş ve böylece buğday genotiplerinde fizyolojik olarak çok hassas ve toleranslı fenotipler gruplandırılmıştır (Şenay vd 2005). Ayrıca buğdayda gelişen tuzluluk toleransının özelliklerini veya genleri tanılamayı amaçlayan araştırmalar da bulunmaktadır (Vaziri *et al.* 2004). Bu araştırmalar sonucunda tuzlu topraklarda yetiştirilen buğday ürünlerinde %20 artış meydana gelmiştir. Fakat buğday bitkisinin tamamlanamayan genomik sekans bilgisinin yanı sıra büyük ve karmaşık genomundan dolayı fonksiyonel genomiks araştırmaları geciktirmektedir.

2.2. Tuz stresine Bitkilerin Cevabı

Bitkiler, çevresel değişikliklere duyarlı olma (Vij and Tyagi 2007), koşullara adaptasyon sağlama ve cevap verme yeteneğine sahiptirler (Matsui *et al.* 2008). Gen ifadesinin düzenlenmesi tuz stresine adapte olan bitkilerde önemli anahtarlardan birisidir. Bitkilerde tuzluluğun indüklediği gen düzenlenmesinin en ilgi çekici mekanizmalarından biri çeşitli transkripsiyon faktörlerin aktivasyonunu takip eden fosforilasyon/kinaz dizisinin uyarılma aktivasyonudur (Xiong *et al.* 2002). Tuz stresi altında bulunan bitkiler normal fonksiyonlarını ve hücre dengesini yeniden kurmak için aktif olan transkripsiyon faktörleri, tuz toleransına katkıda bulunan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu veya tuz stresi altındaki hücrelerin tamir ve korunmasına yol açan ilgili enzimlerin aktivitesini düzenlemektedirler (Munns 2005). Hücrelere tuz alınımı ve iletimi çeşitli membran proteinleri tarafından kontrol edilir. Hücrelere Na^+ 'un girişi ya katyon kanalları tarafından ya da yüksek veya düşük afiniteli K^+ taşıyıcıları yoluyla meydana gelmektedir (Demidchik *et al.* 2002). *Saccharomyces cerevisiae*'da Na^+ alımına aracılık eden yüksek afiniteli K^+ taşıyıcısı (HKT1) ve buğdayda plazma zarı içinden Na^+ iletimine aracılık eden düşük afiniteli katyon taşıyıcısı (LCT)'nin varlığı bildirilmiştir (Amtmann *et al.* 2001). Ayrıca, tuz koşulları altında membran içinden dışa Na^+ akışı mekanizmasında LCT'nin rolü Ca^{+2} 'a duyarlılığı artırmak olduğu düşünülmektedir. Yine aynı çalışmada Na^+ 'un yüksek konsantrasyonlarının tüm bitki hücrelerinde (halofitlerde bile) toksik olduğu ve pek çok bitki türünde normal büyüme ve gelişme için K^+/Na^+ oranının korunması temel olduğu ifade edilmiştir (Zhang *et al.* 2010). Genellikle 3 mekanizma iyon dengesinin korunmasını sağlar. Bunlar;

- 1) Plazma zarındaki her bir Na^+/H^+ antiporter yoluyla Na^+ 'un çıkarımı (SOS1 antiporteri)
- 2) NHX1 geni gibi vakuolar Na^+/H^+ antiporterler yoluyla çıkarımı
- 3) Yüksek ve düşük K^+ kanallarının farklı fonksiyonları yoluyla hücrelerde K^+ tutulması ile gerçekleşir.

2.3. Tuza Toleranslı Tahılların Gelişimi

Tarımda tuzluluğun zararlı etkilerini en aza indirmek için iki büyük yaklaşım bulunmaktadır. Birincisi yüksek kaliteli sularla sulama, kanalizasyon ve ıslah çalışmalarını geliştiren teknolojik yaklaşımdır. Bu yaklaşım etkili olmasına rağmen masrafları yükseltir ve probleme bölgesel bir çözüm sağlamaktadır. İkinci yaklaşım ise, yüksek seviyedeki tuz konsantrasyonuna tolerans yeteneği gösteren bitkilerin geliştirilmesine ve araştırılmasına odaklanan biyolojik stratejileri kapsamaktadır. Tuza toleranslı bitkilerin geliştirilmesi tuzlu koşullar altında tahıl üretimini yükselten ekonomik bir yaklaşımdır (Ashraf and Akram 2009). Flowers and Yeo (1995) tuz koşulları altında tahıl üretimini artıran 5 temel genetik yaklaşım sunmuşlardır.

- 1) Alternatif tahıllar olarak halofitlerin yayılması
- 2) Mevcut tahıl türlerinde bulunan tuz toleransı için genetik varyasyonların araştırılması
- 3) Ticari kültürlerin tuz toleransını artırmak için hibridizasyonun kullanılması
- 4) Genetik mutasyon yoluyla mevcut tahıllarla varyasyon üretimi
- 5) Tuz ve diğer abiyotik streslere karşı daha yüksek toleranslı ürünlerin yetiştirilmesi şeklindedir.

Genetik haritalama, QTL (Kantitatif Karakter Lokus) analizi, transkripsiyon faktörleri ve genetik formasyon gibi moleküler genetik tekniklerdeki son ilerlemeler, bitki tuz toleransının genetik, fizyolojik ve biyokimyasal temellerinin anlaşılmasına daha fazla katkıda bulunmaktadır. Son birkaç yıldır, hücre ve organizma seviyelerinde meydana gelen bitki tuz toleransında rolleri olan bileşiklerin, enzimlerin veya genlerin karakterizasyonu ve tanımlanması yapılmaya çalışılmıştır (Cuartero *et al.* 2009; Plett and Moller 2010). Çeşitli türlerde gen ekspresyonu veya transgenik yaklaşımlar yoluyla elementlerin oluşumu tuz toleransını yükselterek bitkilerin daha verimli hale geldiği gösterilmiştir (Zhang and Blumwald 2001). Stres-tolerans genleri genellikle iki kategoriye ayrılır; strese karşı doğrudan hücreleri koruyan enzim ile proteinleri kodlayan yapısal genler ve sinyal iletimi ile düzenlenmesini içeren genler şeklindedir. Örneğin; zarların içinden Na^+ iletimini düzenleyen genler farklı bitki türlerinde tuz

toleransını artırmak için kullanılmıştır (Silva and Geros 2009). Yang *et al.* (2009) tuz stresine maruz bırakılan transgenik *Arabidopsis*'te farklı SOS genleri ve AtNHX1'in (*Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporteri) aşırı ekspre edildiğini bildirmişlerdir.

Tuz toleransı çalışmasındaki transgenik bitkilerde SOS1 ve SOS3 genlerinde önemli artışlar gerçekleştiği belirlenmiştir. Li *et al.* (2008) *Chenopodium glaucum* halofitik türünden tanımlanan NHX1 geninin çeltik bitkisinde aşırı ifade edildiği ve tuz toleransını yükselttiğini gözlemlemişlerdir. Genelde, glikofitlerde tuz toleransı için ifade edilen genlerin halofitlerdeki gibi benzer şekilde gerçekleştiğine inanılmaktadır. Ancak pek çok glikofitte bu genlerin normal koşullarda ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür (Zhu 2000).

Çeşitli bitki türlerinde tuz toleransının yükselmesine yol açan osmolitler ve osmoprotektanların oluşumunda genlerin rol aldığı önerilmiştir. Ancak, tuzlu koşullar altında transgenik yaklaşımlar ile tahıl üretiminde bu bitkilerin kullanılmasının daha uygun olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Li *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009).

2.4. Tuz Stresi Tolerans Genleri

Stres cevap genleri erken ve geç indüklenen genler olarak geniş bir şekilde kategorize edilmişlerdir. Erken indüklenen genler dakikalık stres sinyallerinin algılanmasıyla uyarılmakta ve sıklıkla kısa zamanlı eksprese olmaktadır. Çeşitli transkripsiyon faktörleri bir genin yeni proteinleri sentezlemesine gerek duymaz ve sinyallerde rol alan bileşiklerin çeşitli işlemlerden geçirilmesine neden olmaktadır. Daha yavaş şekilde stres tarafından aktive edilen genlerin çoğu saatlerce strese maruz kaldıktan sonra indüklendikleri için geç uyarılan kategoride sınıflandırılmaktadırlar.

Tuz stresi, öncelikle bitki hücrelerinin membranları üzerindeki reseptörler tarafından algılanmakta, ondan sonra sinyal sitoplazmaya iletilmekte ve inozitol fosfatazlar, ROT ve kalsiyumu kapsayan ikincil mesajcılarının üretimi şeklinde gerçekleşmektedir. İnozitol fosfatazlar gibi bu ikincil mesajcılar daha uzaktaki hücrelerarası kalsiyum seviyesini

düzenlemektedirler. Sitozolik kalsiyum seviyesindeki değişimler kalsiyum sensörleri olarak da bilinen kalsiyum bağlayıcı proteinler tarafından algılanmaktadır. Bu sensör proteinler, bazı moleküllerle etkileşerek fosforilasyon basamağını başlatmakta ve büyük stres cevap genleri veya bu genleri kontrol eden transkripsiyon faktörlerini hedef almaktadırlar. Bu stres genlerinin ürünleri bitki adaptasyonuna yol açmakta ve bitkinin hayatta kalmasına yardım etmektedirler. Böylece, bitki uygun olmayan koşulların üstesinden gelmiş olur. Bu nedenle, bitki sinerjik bir şekilde tüm bir organizma olarak veya bireysel hücreler olarak strese cevap vermektedir. Ayrıca gen ekspresyonundaki değişiklikleri indükleyen stres ABA, salisilik asit ve etilen gibi hormonların da üretilmesine katkı sağlayabilirler. Bu moleküller, başlangıç sinyallerini amplifiye edebilmekte ve aynı yolları takip edebilen veya sinyal yollarının farklı bileşiklerini kullanabilen ikinci bir seviyede başlatabilmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Bu nedenle Çizelge 2.1’de gösterildiği gibi tuz stresinde rol oynayan genler merak uyandırmış ve keşfedilmiştir.

Çizelge 2.1 Tuz stresinde rol alan düzenleyici genler

TÜRLER	GENLER	ÖZELLİKLERİ
<i>Arabidopsis</i>	MsGRP	Glisince zengin proteinleri kodlar
	CTR 1 EIN 1 EIN 3	Etilen Reseptörlerini kodlar
	SOS 1	Na ⁺ ve H ⁺ antiporterlerini kodlar
	SOS 2	Serin ve treozintipi protein kinazı kodlar
	AtHKT 1	Yüksek afiniteli K ⁺ transporterini kodlar
	TPS	Trehaloz fosfat sentetazı kodlar
	AVP 1	Vakuolar asitlenme gibi işlev gören H ⁺ - profosfataz kodlar
	NKS 1	Özellikle iyon dengesinde işlevi bilinmeyen bir proteini kodlar
<i>Triticum</i> (Buğday)	TaHIR1 TaHIR3	Pas mantarı enfeksiyonlarıyla ekspresyonları gerçekleşir
<i>Triticum durum</i> (Durum Buğdayı)	TaNAC69-1 TtNAMB-2	Tuz stresinde 24 ve 48. saatlerde ekspresyonları artmıştır.
<i>Nicotiana tobacum</i> (Transgenik tütün)	AISAP	Bir çinko-parmak proteinin kodlar
	Imt 1	Ononitol kodlar

Çizelge 2.1. (devam)

<i>Triticum durum</i> (Durum buğdayı)	TaCIPK29	CBL-etkileşen protein kinaz kodlar
<i>Hordeum vulgare</i> (Arpa)	KORCs	korC proteinini kodlar
	PKABA1	Tuz stresinde protein kinazı kodlar
<i>Gossypium hirsutum</i> (Pamuk)	DREB	dehydration-responsive element-binding proteinini kodlar
	GhHL 1	Tuza cevapta rol oynayan bir fosfatazı kodlar
	GhNHX 1	Varsayılan Na ⁺ /H ⁺ antiporter kodlar
<i>Oryza sativa</i> (Pirinç)	OsNHX 1	Vakuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter kodlar
	SKC 1	Na ⁺ transporterini kodlar
	katE	H ₂ O ₂ 'yi yok eden katalazı kodlar
	OSISAP 1	Tuz stresinin oluşturduğu bir çinko-parmak proteinin kodlar
	SOD 2	Na ⁺ transporrtlerini kodlar
<i>Atriplex hortensis</i> (Hayat Süpürgesi)	BADH	Betaine kodlar
<i>Brassica napus</i> (Kanola)	BnNHX 1	Vakuol Na ⁺ /H ⁺ antiporterları kodlar
Peamut (Yer Fıstığı)	Mt10	Mannite kodlar
<i>Phragmites australis</i> (Kamış)	PhaHKT1	Yüksek dayanaklı K ⁺ taşıyıcıların kodlar
<i>Zea mays</i> (Mısır)	P5CS	Prolini kodlar
<i>Thellungiella</i> <i>salsuginea</i>	TsVP	Na ⁺ birikimini hafifletmeye yardım etmek için vakuol pyrofosfatazı kodlar
<i>Thellungiella</i> <i>halophila</i>	ThHKT 1	İyon antiporterı kodlar
<i>Trifolium repens</i> L.	TrNHX 1	İyon dengesini ve tuz toleransını teşvik etmek için vakuol Na ⁺ /H ⁺ antiporter kodlar
Muz	MaGSTU 1 MaGSTU 2 MaGSTU 3 MaGSTF 1 MaGSTL 1	Glutathione S-transferases (GST) kodlar

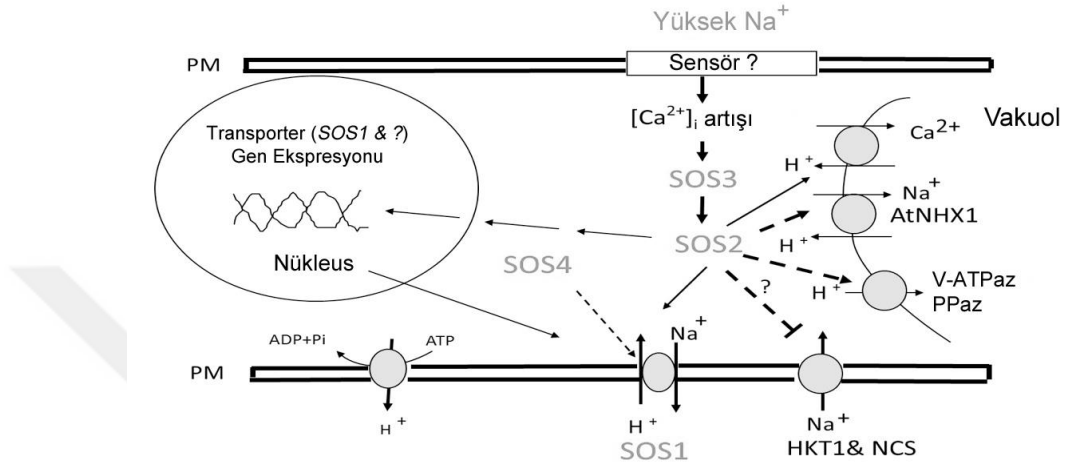
2.4.1. Aşırı Tuza Duyarlı (Salt Overly Sensitive -SOS) Genleri

Hem glikofit hem de halofit bitkiler sitoplazmalarında bulunan tuzun yüksek konsantrasyonunu tolere edemezler. Bu nedenle onlar ya vakuolde tuzun aşırı miktarını sınırlarlar ya da farklı dokularda temel iyonları kompartmanlaştırırlar. Na⁺'un, Cl⁻ yapımı öncesinde toksik bir konsantrasyona ulaşabildiği keşfedildikten sonra pek çok

çalışma Na^+ iletiminin kontrolü ve çıkarımı üzerine yoğunlaşmıştır. Böylece hücrelerin sitozolünde biriken Na^+ miktarı minimize edilerek bitkiler üzerindeki iyonik stresin azaltılması diğer bir temel mekanizmayı oluşturmuştur. Bu süreç doku toleransının yanı sıra bitki hücresi içerisindeki Na^+ iletiminin kontrolüne izin veren taşıyıcılar ve özel iyon kanallarını kontrol eden ekspresyonunun up veya down regülasyonu ile sağlanmaktadır (Munns and Tester 2008; Rajendran *et al.* 2009). Vakuoler Na^+/H^+ antiporterleri; etkili bir sitozolik Na^+ çıkarımını, içsel asiditenin dengelenmesini ve sitozolden zararlı iyonların taşınmasını gerçekleştirirler. Antiporterler, vakuoler H-translokasyon enzimi, H^+ -adenozin trifosfataz ve H^+ -inorganik pirofosfataz (PPi_{az}) tarafından üretilen proton taşıma gücünü kullanırlar. Bitki Na^+ çıkarımını K^+ alımı ile karşılayamazsa osmotik düzenleme için organik çözücülere daha büyük bir istek oluşturur. Ekstrasellular Na^+ bir membran reseptörü tarafından algılanabilir, oysaki intrasellular Na^+ ya membran proteini tarafından ya da sitoplazmadaki pek çok Na^+ duyarlı enzimlerin herhangi biri tarafından algılanabilir.

Na^+ sensörlerinden olan plazma membran Na^+/H^+ antiporteri SOS genlerinin duruma bağlı olarak doğrudan sentezlenir. SOS yolu 3 anahtar bileşikten oluşur; Ca^{+2} sensörü olarak aktive gösteren SOS3, bir serin/reonin protein kinazı olan SOS2 ve bir plazma membran Na^+/H^+ antiporteri olan SOS1 geni şeklinde tanımlanmaktadır (Silva and Geros 2009). Şekil 2.1’de tuz stresinde meydana gelen SOS yolu özetlenmiştir. SOS1 geni, *Arabidopsis* SOS1 mutantlarındaki genetik analizler sonucunda hedef SOS3-SOS2 yolunda belirlenmiştir. Tuz stresi uygulanan yabancı tiplerin yanı sıra osmotik SOS1 mutantlarında da iyonik denge bozulmuş ve tuz stresine aşırı duyarlılık sergilemişlerdir. Böylece SOS genlerinin tuz toleransında fonksiyon gösterdiği genetik olarak doğrulanmıştır (Zhu *et al.* 1998). *Arabidopsis*’te köklerde SOS2’nin mRNA seviyesi tuz stresine cevapta upregüle olduğu gösterilmiştir. SOS2/CIPK24 kompleksinin ise C terminal düzenleyici domain ve N terminal katalitik ile yeni bir serin/threonin protein kinazı kodladığı kanıtlanmıştır (Liu *et al.* 2000; Albrecht *et al.* 2001). SOS3 geni ise 4 EF hand Ca^{+2} bağlayan motifler ve bir miristoilasyon sekansı ile Ca^{+2} bağlayıcı proteini kodlamaktadır. Ca^{+2} sensörleri Ca^{+2} ’a bağlandıkları için farklılık gösterir ve bu farklılık çeşitli Ca^{+2} sensörlerinin şifrelerini çözmek ve ayırt etmede önemli bir parametre olarak

kullanılabilmektedir. Kalmodulin ve kaltraktin gibi Ca^{+2} sensörleri ile karşılaştırıldığında SOS3'ün nispeten daha düşük bir afinite ile Ca^{+2} 'a bağlandığı gözlemlenmiştir (Ishitani *et al.* 2000).



Şekil 2.1. Tuz stresinde SOS yolu

SOS proteinleri K^+/Na^+ 'un ayırt edilmesi ve Na^+ 'un dışa verilmesi olayını gerçekleştiren mekanizmaya geri dönen Ca^{+2} sinyalleri için bir sensördür. Özellikle SOS1, köklerden gövdeye uzun mesafede Na^+ iletiminin kontrolünde ve Na^+ çıkarımında kritik bir rol oynamaktadır (Shi *et al.* 2002). Bu antiporter sitosolde Ca^{+2} içeriğinin artışı ile tuz stresinin algılanmasından temellenen mekanizmada bir bileşik oluşturmaktadır. SOS2 ve SOS3 olarak bilinen diğer iki protein ile uyumlu olan SOS1'in aktivitesinde meydana gelen fosforilasyon ise geri dönüşümlüdür (Oh *et al.* 2010). *Saccharomyces cerevisiae* AXT3K suşunda yapılan bir çalışmada tuz tolerans artışının SOS1, SOS2 ve SOS3'ün ko-ekspresyonunun SOS2/SOS3 kompleksine bağlı olarak gerçekleştiğini önermektedir (Quintero *et al.* 2011).

Bu SOS genlerinin keşfinden birkaç yıl sonra ise SOS4 ve SOS5 genleri karakterize edilmiştir. SOS4; Vitamin B6'nın aktif bir formu olan pyridoksal-5-fosfat (PLP)'nin biyosentezinde rol alan pyridoksal kinaz (PL) kodlar. Ayrıca, pek çok hücrel enzimler için temel kofaktör olan PLP ve onun türevleri, hayvan hücrelerinde iyon transporterlerinin aktivitesini düzenleyen ligandlardır. Yapılan bir çalışmada, *sos4*

mutantları tuz stresi altında yabancı tip bitkiler ile karşılaştırıldığında çok daha fazla Na^+ biriktirdiği ve daha az K^+ 'u koruduğu rapor edilmektedir. Bu nedenle, SOS4 bitkilerde Na^+ ve K^+ dengesinin yeni bir düzenleyici bileşiği olarak tanımlanmaktadır (Shi *et al.* 2002). SOS5; normal hücre uzaması için gereken olası bir hücre yüzeyine bağlı protein olduğu görülmüştür. Ayrıca SOS5 hücre-hücre adhezyonunda fonksiyonu olduğu, hücre duvar bütünlüğünü koruduğu ve tuz stresi koşulları altında bile hücre genişlemesinin elde edilmesinde görev aldığı önerilmiştir (Shi *et al.* 2003a).

NAPDH oksidaz tarafından üretilen ROT'un, SOS1 mRNA'larının (transkriptlerinin) kararlılığını meydana getirdiği bilinmektedir. Böylece NAPDH oksidaz aktivitesinin SOS1 mRNA aktivitesini büyük oranda artırmıştır. Pek çok çalışma, SOS1 mRNA kararlılığını diğer stres indükleyici aracı olan bileşikler bulmak için kullanılarak birkaç abiyotik strese yaygın olan bir sinyal iletim yolunun erken sinyal adımında SOS1 'in muhtemel rolü hakkında bazı önemli ipuçları vermiştir (Turkan and Demiral 2009).

2.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Genleri

ROT veya Reaktif Nitrojen Türleri (RNT) ile biyolojik antioksidant sistemler arasındaki dengenin sebep olduğu oksidatif stres DNA, lipitler ve proteinler gibi makromoleküllerin modifikasyonlarına yol açabilir (Chen *et al.* 2008; Xie *et al.* 2008). Hücrenin redoks durumunun transkripsiyon faktörlerinin/aktivatörlerin düzenlemesiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çerçevede hücresel hedef gen ekspresyonunun etkilenmesi, uygun ROT ve RNT seviyeleri ve hücresel sinyal yollarının ayarlanması canlı organizmaların normal fizyolojik fonksiyonları için gereklidir. Ancak, aşırı redoks-aktif türler, DNA hasarına, hücresel enzimlerin aktivitelerinin bastırılmasına ve kaspaz ile kinaz dizilerinin aktivasyonu yoluyla hücre ölümünün uyarılmasına sebep olabilmektedirler (Giannattasio *et al.* 2008; Archer *et al.* 2008). Bitkilerin ROT'ların bertaraf edilmesinden sorumlu mekanizmalara ek olarak bu moleküllerin oluşumlarını da sınırlayan iyi gelişmiş savunma sistemlerine sahip oldukları bilinmektedir. Bu sistemlerin etkisiyle bitkilerde stres altında olmayan koşullarda reaktif oksijen oluşumunun bertaraf edilmesinin dengeli olduğu bilinmektedir. Ancak, stres koşulları

altında ROT oluşumu arttığında savunma sistemi bastırılabilir. Bitkilerde enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidant sürecin bertaraf edilmesini sağlayan savunma sistemi ROT'ların artışına karşı bir cevap olmaktadır. Fakat bu sürecin gerçek mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır (Alscher *et al.* 2002).

Bir hücrede SOD, ROT'a karşı savunmanın ilk hattını oluşturmaktadır. O^{-2} bir elektron iletim zincirinin varolduğu herhangi bir yerde üretilmekte ve bu nedenle O_2 aktivasyonu sitozol, apoplastlar, peroksizomlar, glikozomlar, mikrozomlar kloroplastlar, mitokondri gibi hücrenin farklı bölümlerinde meydana gelebilmektedir (Elstner 1991). Yapılan çalışmalarda süperoksit dismutaz ailesinin elektron iletim zinciri yoluyla oksijen metabolizmasının ürünleri gibi mitokondrial matriksle üretilenler ile iyonize radyasyon içeren ekstrasellüler uyarıcılardan kaynaklanan süperoksit anyon radikallerini yok etmede özelleştiği gözlemlenmiştir (McCord and Fridovich 1969). Yine SOD genlerinin ROT konsantrasyonunun dengelenmesinde esas rolü oynadığı bildirilmiştir. ROT'ların hem ekspresyonunda hem de aktivitesinde SOD'ların kontrolü düzenlemeye katkıda bulunmaktadır (Forman 2007; Liu *et al.* 2008). SOD'un 3 farklı izoformu karakterize edilmiş ve belirlenmiştir. Cu-Zn SOD; SOD1 geni tarafından, MnSOD; SOD2 geni tarafından, ekstrasellüler süperoksit dismutaz (ECSOD); SOD3 geni tarafından kodlanmaktadır. Genetik kıyaslamalar sonucunda amino asit homolojisi seviyesinde SOD1 ve SOD3 genlerinde bulunan benzerlikler belirlenmiştir. Öte yandan SOD2 geni ne SOD1 ne de SOD3 geni ile önemli amino asit homolojisi göstermemiştir (Parge *et al.* 1992). Şekil 2.2'de süperoksit dismutazın hücre içerisindeki aktiviteleri gösterilmiştir.

peroksizomlarında ve mitokondrisinde vardır. Mn ve Fe-SOD'lar primer, sekonder ve tersiyer yapılarında yüksek bir benzerliğe sahip olmalarına rağmen, bu enzimler Fe (II)'nin Mn-SOD aktivitesini düzenlemesinde veya bunun tam tersi durumunda oldukça farklı etkinlik gösterirler. Ökaryotlarda ve prokaryotlarda bulunan bu enzimler, potasyum siyanid (KCN) veya H_2O_2 tarafından inaktive edilemezler (Alscher *et al.* 2002).

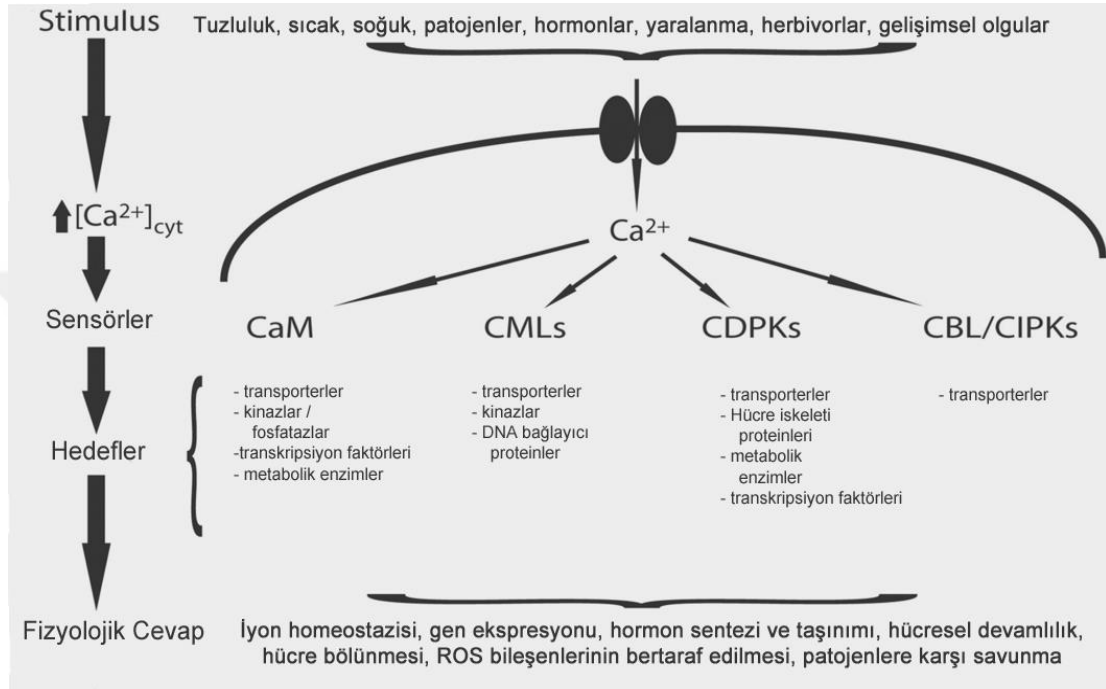
SOD3 (ECSOD) genin yapısında transkripsiyon başlama bölgelerinde bulunan 5 bp uzunluğundaki 1 ekzon bölgesi ile birlikte toplamda sadece 2 ekzon bulunmaktadır. Bu nedenle güncel çalışmalarda, bu kısa ekzonların fonksiyonlarının anlaşılması ve ilk ekzonun tam yerinin bulunmasına çalışılmaktadır. Klasik TATA kutusu olmayan 2 CAAT kutusu elementi SOD3'ün promotör bölgesinde bulunmaktadır. Ayrıca, Fe-SOD kloroplastlarda, Mn-SOD mitokondriyum ve peroksizomda, Cu-Zn SOD kloroplast, sitosol ve ekstrasellüler boşluklarda yer almaktadır (Folz and Crapo 1994).

2.4.3. CBL-Etkileşen Protein Kinaz (CBL-Interacting Protein Kinases-CIPK) Genleri

Ca^{+2} bitkilerde hemen hemen tüm biyolojik süreçlerde rol alan ikincil bir mesaj olarak hizmet etmektedir (Kim *et al.* 2009). Çevresel ve gelişimsel uyarılara cevapta bitki hücreleri sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunda özel geçici değişimlere uğrarlar. Bu durum, Ca^{+2} 'un farklı süreçlere özgül bir regülatör olduğunu göstermektedir (Hetherington and Brownlee 2004).

Bitki hücrelerindeki Ca^{+2} üzerine yapılan çalışmalarda, Ca^{+2} geçişlerinin mekânsal ve zamansal miktarlarının uyarılara özel karakteristik gösterdiğini ve bu durumun her bir uyarana karşı özel bir cevabın nasıl oluştuğunu anlamada anahtar rol oynayabileceğini göstermiştir (Sanders *et al.* 2002). Sitosolik Ca^{+2} konsantrasyonlarında uyarmaya özel yükselmeler “kalsiyum işaretçileri” olarak tanımlanırlar. Kalsiyum işaretçilerinin geçici dağılımı ve şekilleri uyarı-cevap bağlantısında rol aldıklarını göstermektedir. Uyarı-cevap düzenlenmeleri sinyal sensör proteinleri olarak fonksiyon gösteren Ca^{+2} -bağlayıcı

proteinler tarafından gerçekleştirilir. Bu proteinler Ca^{+2} işaretçileri tarafından kodlanan bilgiyi tercüme eder ve diğer yapılara iletirler (Batistic and Kudla 2004). Şekil 2.3’de abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde Ca^{+2} etkisi ile oluşan yapılar belirtilmiştir.



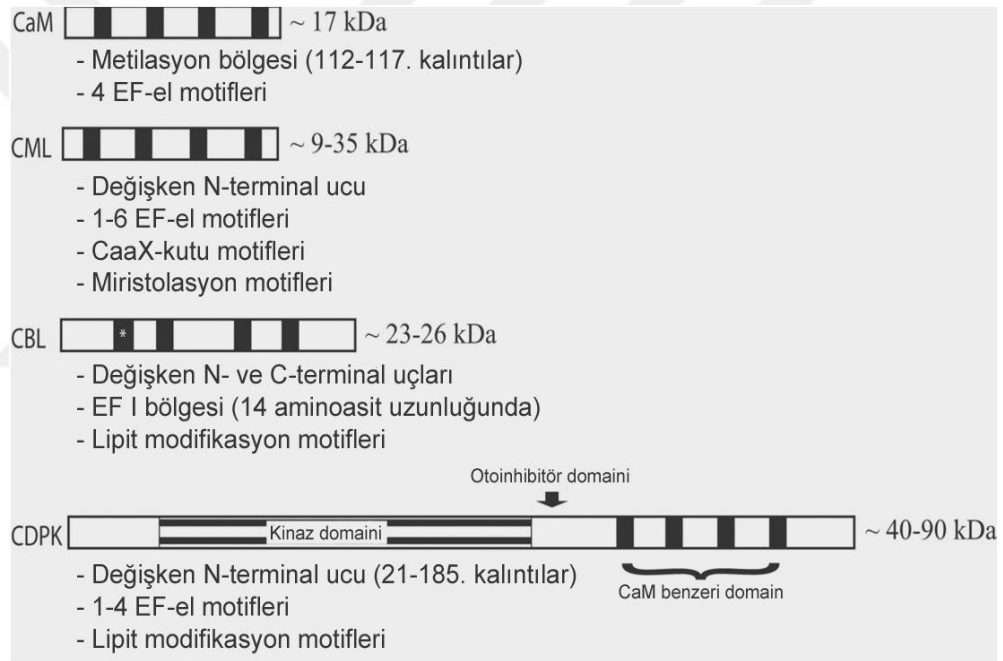
Şekil 2.3. Abiyotik streslerde kalsiyum mekanizması

Bitki hücrelerindeki Ca^{+2} sensör proteinleri ayrı bir dizi ile donatılmışlardır. Diğer ökaryotlarda bulunan Ca^{+2} -bağlayıcı proteinler olarak bilinen kalmodulin (CaM) ve CaM-benzeri proteinlere (CML) ek olarak, bitkilerde Ca^{+2} sinyalleri için Ca^{+2} -bağlayıcı proteinlerin özel aileleri bulunmaktadır. Bunlar arasında bulunan Ca^{+2} -bağımlı protein kinazlar (CDPKs) bir protein ile kinaz aktivitesi yapar ve Ca^{+2} -bağlayıcı ile birleşirler, böylece sensör-cevap modüllerini oluştururlar (Harper and Harmon 2005). Buna karşın, kalsinörin B-benzeri (CBL) protein ailesi ve onların etkileşim kinazları (CIPKs), Ca^{+2} bağlama fonksiyonu (sensör-yerini alma fonksiyonu) ve kinaz aktivitesi (cevap aktivitesi) denilen 2 olayı gerçekleştirirler. Bu özellik, karmaşık ve etkin bir yapıya sahip Ca^{+2} şifre çözücü sinyal ağının oluşmasına olanak sağlamaktadır (Batistic and Kudla 2009). Uyarı-cevap mekanizmasında rol alan CBL-CIPK sisteminin karmaşık bir yapısı bulunmaktadır. CBL-CIPK sinyal sisteminin değişkenliğinin en büyük nedeni

birbirlerini etkileyen “spesifik faktörlerin” kombinasyonlarının esnek olmasından kaynaklanmaktadır. Böyle spesifik faktörlerin kendilerine özgü olan gen ekspresyonu, farklı Ca^{+2} bağlayıcı ve CBL-CIPK kompleksinin farklı hücrel lokalizasyonu ile gerçekleştirilmektedir. CBL’ler ve CIPK’lar arasındaki karmaşık oluşum Ca^{+2} sensör proteinlerinden kinazlara sinyallerin iletilme mekanizmasına odaklanılmasını sağlamaktadır (Albrecht *et al.* 2003).

Diğer pekçok Ca^{+2} bağlayıcı proteinler gibi, CBL’lerde kısa bir bağlayıcı domaininin ayırdığı iki globular yapıdan oluşmaktadır (Nagae *et al.* 2003). Her bir CBL proteini, yapısında en az 4 Ca^{+2} iyonun bağlanmasını sağlayacak 4 EF-kol motifi içersede hiçbir CBL proteininde kanonik EF-el motifi bulunmaz. *Arabidopsis*’in 5 CBL proteini (CBL2, CBL3 CBL4, CBL5 ve CBL8) kanonik EF kolu içermez. Buna karşın CBL6, CBL7 ve CBL10 proteinlerinde 1 tane, CBL1 ve CBL9 proteinlerinde ise iki tane kanonik sekans motifi olan EF kolu vardır. Diğer bütün EF kolu motiflerinde dört kol üzerinde dağılım gösteren birbirinden farklı sekans varyasyonları vardır. Bu yüzden EF kollarındaki kompozisyon farklılıklarının CBL proteinlerinin farklı Ca^{+2} bağlama potansiyellerini açıklamada önemli bir neden olarak düşünülmektedir (Batistic *et al.* 2004). Biyokimyasal farklılıkların nedeni CBL-CIPK etkileşiminin Ca^{+2} ’a bağlı etkileri de olabilir. Ancak, CBL’lere aşırı Ca^{+2} bağlanması CIPK etkileşimini veya aşırı CIPK etkileşimi CBL’lerin Ca^{+2} ’a bağlanma afinitesini etkiler, bu nedenle daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. CBL1 ve CIPK1’in etkileşimini araştırılan *in vitro* deneylerde Ca^{+2} ’un mikromolar konsantrasyonlarının varlığına bağımlı bir kompleks oluşumunun meydana geldiği gözlemlenmiştir (Shi *et al.* 1999). Buna karşın, CIPK24/SOS2 ile CBL4/SOS3’ün etkileşimi bağımsız bir şekilde Ca^{+2} oluşumunu tetiklemiş, fakat CBL4’ün tek başına Ca^{+2} ’a bağlanma yeteneğini olumsuz etkilemiştir (Sanchez-Barrena *et al.* 2007). Ayrıca EF kolunun fonksiyonuna yönelik çalışmalar da mevcuttur. EF kolu motifinin bağlanma bölgesindeki 2 amino asitlik bir uzamadan dolayı bütün CBL proteinlerindeki bu EF kolunun Ca^{+2} bağlama yeteneğinde olmadığı öne sürülmektedir (Luan *et al.* 2002). Bununla birlikte CBL2 ve CBL4’ün kristal yapı analizleri EF1 kolunun ilave amino asitlerine rağmen Ca^{+2} iyonu bağlayabildiğini göstermiştir. Dahası, non-CIPK etkileşimli safhada CBL2, EF1 ve EF4 kolları

vasıtasıyla 2 Ca^{+2} iyonunu bağlar (Sanchez-Barrena *et al.* 2007). Bu molekül CIPK14 ile bağlandığında 4 EF kolu birden Ca^{+2} iyonlarına bağlanır (Akaboshi *et al.* 2008). CBL4 molekülü ise CIPK ile etkileşimde değilken 4 Ca^{+2} iyonunu EF kolları ile bağlar (Sanchez-Barrena *et al.* 2007). Ancak bu protein CIPK24 ile etkileşime girdiğinde yalnızca 2 Ca^{+2} bağlamaktadır. Bu sonuçlar, yalnızca CBL proteinlerinin Ca^{+2} bağlama yeteneklerinde sekansların rolünün olduğunu göstermekle kalmaz ayrıca bu süreçte CBL-CIPK etkileşimlerinin oldukça önemli olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 2.4'te CBL-CIPK sinyal sisteminde rol alan domainlerin yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.4. CBL-CIPK sinyal sisteminde rol alan domainlerin yapısı

CBL-CIPK komplekslerinin hedefleri ve fonksiyonları da araştırılmıştır. CBL-CIPK-substrat oluşumunun özel örneği SOS yoludur. Kalsinörin B-benzeri Ca^{+2} sensörü SOS3 (AtCBL4) ve CIPK-tip kinaz SOS2 (AtCIPK24) çalışılmıştır. Bu proteinler özel bir şekilde tuz stres sinyallerine aracılık etmekte ve Na^+/H^+ antiporteri SOS1'i düzenleyerek adaptasyonunu sağlayan Ca^{+2} - düzenleyici sinyal yollarının bir bölümünü oluştururlar (Liu *et al.* 2001). SOS sinyal yollarının daha detaylı analizleri, zara yerleşen Ca^{+2} sensörü CBL4 ile etkileşen CIPK24 kinazın plazma membranında gözlemlenmesi ile yüksek Na^+ konsantrasyonuna cevapta rol alan SOS1'in Ca^{+2} -bağlı aktivasyonu ile

ortaya çıkmaktadır. Aktive olan SOS1 ekstrasellüler boşluklara Na^+ 'u çıkararak tuz detoksifikasyonunu yükseltmektedir. CBL4'ün ekspresyonu kök dokularıyla sınırlı olması bitkinin diğer organlarında SOS yolunun fonksiyonun oluşumunu düşündürmektedir (Guo *et al.* 2001).

Bazı çalışmalarda Ca^{+2} sensörü CBL10'un CIPK24 kinaz ile ilişkili olduğu ve birlikte aktive gösterdikleri rapor edilmiştir (Kim *et al.* 2007; Quan *et al.* 2007). İlginç bir şekilde, *cbl10* mutantları tuz stresi şartları altında yabancı formlara göre daha az Na^+ iyonu biriktirmişlerdir. Buna karşın, CBL10'un fonksiyonunu kaybetmesi tuza hassas bitkilerin oluşmasıyla sonuçlanmıştır (Kim *et al.* 2007). Bu bulgu CBL10-CIPK24 kompleksinin fonksiyonu CBL4-CIPK24 kompleksinin fonksiyonundan daha açık bir şekilde farklı olduğunu ortaya koymaktadır. *In vivo* analizler CBL10-CIPK24 kompleksini tonoplastta lokalize olduğunu göstermiştir. Bu durum CBL10-CIPK24 kompleksinin Na^+ iyon akışının vakuoler yapılara yönlendirilmesi vasıtasıyla Na^+ detoksifikasyonuna katkı sağladığını işaret etmektedir. Bu bulgular, tuz toleransının mevcut düzenlenmesi modeliyle örtüşmektedir. Ayrıca mevcut veriler CIPK24 kinazların hem CBL10 hem de CBL4 ile etkileşime giren çift fonksiyonlu kinazlar olduğu yönündeki görüşüne de destek sağlamaktadır. CBL-CIPK24 kompleksi plazma membranındaki H^+/Na^+ antiporter SOS1'in düzenlenmesi yoluyla Na^+ 'un dengelenmesine katkı sağlarken CBL10-CIPK24 kompleksinin oluşumu bilinmeyen hedeflerin düzenlenmesi sonucunda Na^+ iyonlarının hapsedilmesine neden olur. Hücrese seviyedeki bu alternatif kompleks oluşumu birbiriyle örtüşen doku spesifik ekspresyon profillerinin oluşmasını sağlamaktadır. CIPK24 kinaz ifadesi bitkilerde tüm dokularda meydana gelirken *Arabidopsis*'te CBL4 ekspresyonu köklerde, CBL10 ifadesi ise sürgün dokularında gerçekleşmektedir. Bu ekspresyon farkı köklerden SOS-1 yardımcı Na^+ atımını, sürgün dokularında ise SOS1'den bağımsız kofullarda Na^+ iyonu biriktirilmesini mümkün kılmaktadır. Bununla birlikte hem köklerde hem de sürgün dokularda eksprese olan CBL1, Ca^{+2} sensöründe CIPK24 bağımlı SOS1 regülasyonu ile tuz toleransı sağladığı unutulmamalıdır (D'Angelo *et al.* 2006).

Tonoplast membranındaki CBL-CIPK24 komplekslerinin vakuoler $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$ antiporteri CAX1'i CBL4'ten bağımsız olarak aktive ve regüle edildiği gösterilmiştir (Cheng *et al.* 2004; Batelli *et al.* 2007). Yine bu çalışmalarda, V-ATPaz kompleksleri CIPK24'ün etkileşimlerindeki alt üniteler olarak tanımlanmıştır. Vakuole V-ATPaz bağımlı proton akışının uyarılarak düzenlenmesi ile tonoplast taşıyıcıları olan CAX1 ve NHX antiporterlerinin aktivitesi CIPK24'ün vakuoler iyon mekanizmalarını iyi bir şekilde düzenlemektedir.

Vakuoler V-ATPaz'a ek olarak plazma membranı H^{+} -ATPaz'ı olan *Arabidopsis* H^{+} -ATPaz2 (AHA2)'de CBL-CIPK sinyal kompleksinin hedefi olarak tanımlanmıştır (Fuglsang *et al.* 2007). AHA2'nin C-ucu içindeki serin kalıntısının fosforilasyonu 14-3-3 grubu proteinlerin bu domaine bağlanmasını engeller ve AHA2'nin proton taşıma aktivitesini azaltır. Mayalarda ikili hibrit etkileşim çalışmaları AHA2'nin CIPK11'den bağımsız regülasyonunda CBL2'nin potansiyel bir fonksiyonunun olduğunu göstermiştir (Fuglsang *et al.* 2007). Bununla birlikte bitkisel hücrelerdeki CBL2 özellikle tonoplastta lokalize olduğu için bitkilerdeki AHA2'nin Ca^{+2} bağılı regülasyonun gerçekte hangi CBL proteini tarafından sağlandığı bilinmemektedir. Yinede CIPK11 tarafından bir plazma membranı H^{+} -ATPaz'ın regülasyonu Ca^{+2} bağımlı fosforilasyonun hem vakuoler hem de plazma membranında yer alan proton taşıyıcıların etkinliklerini düzenlediğine işaret etmektedir (Batistic *et al.* 2008).

CBL-CIPK kompleksleri tarafından düzenlenen transport süreçlerin nitrat cevabı ve alınımı fonksiyonları da etkilemiştir (Hu *et al.* 2009). CIPK8 inaktif mutantlarının analizi nitrat uygulaması sonrasında nitrat cevap genlerinin ekspresyonları ve nitrat alımında düşüş olduğunu göstermiştir. Her ne kadar bu çalışma nitrat taşıyıcıları ve CIPK8 arasında fiziksel etkileşimler olduğuna dair bir kanıt sunmuş olmasa da böyle düzenleyici bir döngünün varlığı çoğu bilim insanı tarafından kabul edilmektedir. Ek olarak, bir diğer çalışmada CIPK'ların bitkilerin düzgün büyümesinde ve gelişmesinde kritik roller oynadığını göstermiştir (Tripathi *et al.* 2009). AtCIPK6'da meydana getirilen bir lezyon sürgünden köke doğru ve kök boyunca oksin taşımını önemli derecede azaltmış ve mutant bitkilerde birçok gelişimsel bozukluk oluşturmuştur.

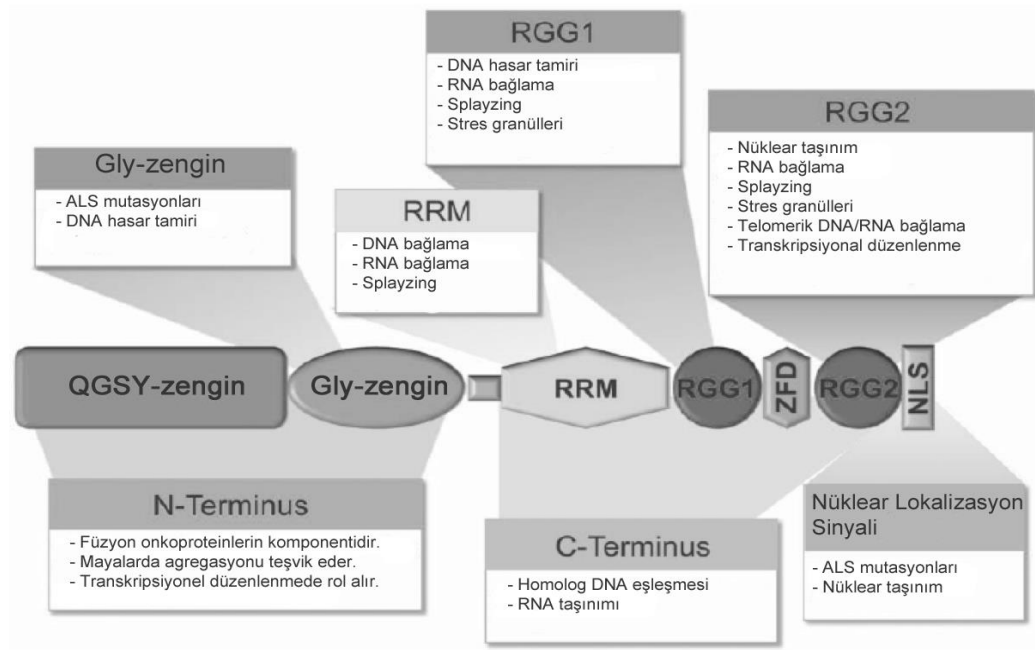
Ayrıca bu bitkilerde oksin taşınımı ve abiyotik strese cevap mekanizmaları ile ilgili çok sayıda genin ekspresyonunda da ciddi azalmalar olmuştur. Buna ek olarak, *Arabidopsis* mutantının yabanıl formuna göre tuz stresine hassasiyetinin de arttığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. Bu durum CIPK6 proteinin birden fazla fonksiyonunun olabileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışmalara ek olarak yapılan analizlerden elde edilen protein-protein etkileşimlerinin fonksiyonel veya fizyolojik sonuçların hala eksik olması ROT-uyarıcı süreçler ile CBL-CIPK ağının bir bağlantısı olduğunu önermektedir. Bunlar dikkate alındığında, iki hibrit mayada proteinlerle etkileşimi olan katalaz 2 (CAT2) ve CAT3'ün yanı sıra nükleosit difosfat kinaz 2 (NDPK2) belirlenmiştir (Verslues *et al.* 2007). Bu proteinler stres-uyaran ROS sinyallerini de kapsar ve H₂O₂ katabolizmasında büyük bir rol oynamaktadır. Bu veriler ROS-aracılı sinyal yollarında CIPK'ların muhtemel düzenleyici fonksiyonları olduğunun bir kanıtı olarak düşünülmüştür.

2.4.4. Glisince Zengin Protein (Glycine Rich Protein-GRP) Genleri

Bitkilerde glisince zengin proteinler (GRPs) yapılarında yüksek glisin bulundurmaları (%20-70) ile karakterize edilirler. İlk keşfedilen GRP'lerden biri petunya geni GRP-1'dir. 384 amino asit içeren bu proteinin %67'si glisinden oluşur ve GRP-1 tarafından kodlanmaktadır. Petunya GRP-1'inin glisince zengin domaini 8 antiparalel zincir içeren β -katlanmış bir tabakadan oluşur. Şekil 2.5'de glisince zengin proteinler ve rolleri gösterilmiştir. Sıklıkla serin ya da alanin tarafından temsil edilen bir X grubu ile Gly-X tekrar serilerini içermektedir. GRP-1 çoğunlukla tomurcuklar ve vasküler dokularda ifade edilmektedir (Condit *et al.* 1990). Normal büyüme için gereken glisinin hücre duvar plastititesinde yüksek oranda olması gerektiğinden dolayı Petunya GRP-1 proteini diğer GRP'ler boyunca hücre duvarında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda GRP proteinleri arasında yapısal ve fonksiyonel heterojenitenin büyük öneme sahip olduğunu açıkça gösterilmiştir. Bu proteinlerin hücre altı yerleşimleri ve yüksek orandaki değişken ekspresyon durumları, GRP proteinlerinin sadece hücre duvarı plastitisinde

değil birkaç farklı fizyolojik süreçte de önemli roller üstlenebileceğine işaret etmektedir (Sachetto-Martins *et al.* 2000).



Şekil 2.5. Glisince zengin proteinler

Glisince zengin domain içeren proteinler başlangıçta bir superfamilya olarak gruplandırılmıştır. Ancak, son zamanlarda GRP'ler bir superfamilya kapsamına girmeyen basit proteinler olarak tanımlanmaktadır. Bu kapsamda GRP'ler en az 4 sınıfta gösterilmiştir. Bir sinyal peptidi olan ve glisince zengin bir domaine sahip olan sınıf 1 GRP'ler $(\text{GlyGlyX})_n$ tekrarlarını içerirler. Bu sınıfta bulunan GRP'lerin çoğu hücre duvarlarına kanalizasyonlarından dolayı yapısal bir fonksiyona sahiptirler. Bu sınıfın örneği, petunya GRP-1 olarak tanımlanmıştır. Sınıf 2 GRP'ler C-terminal sisteince zengin bir domain tarafından takip edilen glisince zengin bir domaine sahiptirler. Bu Glisince zengin domain $(\text{GlyGlyXXXGlyGly})_n$ tekrarlarını içerir. Sınıf 3 GRP'ler ise diğer sınıflarla karşılaştırıldıklarında daha düşük glisin içeriğine sahiptir. Onlar yapısal farklılıkların daha yüksek dereceleri olan (GlyXGlyX) tekrarlarının varlığı ve sıklıkla korunan oleosin domaini (oleosinler su alımını sağlayan poleni içeren aşırı kuruma altında bitkilerin kısımlarında bulunan proteinlerdir) tarafından karakterize edilirler. Sınıf 1 ile 3 GRP'ler genellikle amino ucunda bir sinyal peptidi içerirler.

Aksine sınıf 4'ü ayıran özellik nükleik asit bağlama domainlerini içermesidir (Kar *et al.* 2012).

Sınıf 4 GRP'lerde RNA bağlama domainlerinin iki ana tipi vardır;

- RRM (RNA düzenleyen motif)
- CSD (soğuk şok domaini)

Sınıf 4'teki proteinlerin glisince zengin domaini ya RNA'ya bağlanır ya da protein-protein etkileşimine katkıda bulunan bir veya iki CCHC çinko parmağa gömülür. RRM, SR proteinleri (serin-arginince zengin domainler ile birbirine ekleyen faktörler), heterojen RNP'ler, kloroplast RNA-bağlayıcı proteinler, poly(A) bağlayıcı protein ve küçük nüklear ribonükleoprotein (SnRNP)'lerle ilişkili proteinleri içeren RNA bağlayıcı proteinlerin geniş bir dizisinde bulunur. Hem RRM hem de CSD tek zincirli RNA'ya bağlanabilmektedir (Lunde *et al.* 2007).

Glisince zengin domainler ayrıca ikincil yapılara da sahip olabilirler. Örneğin bir glisin lobu özel bir yapı oluşumuyla yükleme işlemi ve tamamlama yoluyla etkileşen iki paralel bitişik sarmal arasında bir sarmal-sarmal etkileşimine sebep olabilir. İkinci bir örnek ise antiparalel zincirlerin değişik sayılı β -tabakası içerebilmesidir. Non-glisin amino asitlerin yan zincirleri de etkileşimde oldukları proteinlerinde varolan diğer hidrofobik bölgelerle etkileşime girme yeteneğindeki güçlü hidrofobik domainleri içeren bir yüzey olan β -tabaka aynı alanına maruz kalırlar. Glisince zengin domainler çok esnektir, makromoleküller ve diğer proteinler ile GRP'lerin ilişkilerine esneklik katarlar (Steinert *et al.* 1991).

Çalışmaların büyük bir kısmı Sınıf 4 GRP'lerin su stresi veya kuraklık, salisilik asit, ABA ve soğuk uygulamaları sonrasında ekspresyonun arttığını göstermiştir. Bu durum bu moleküllerin stres cevap mekanizmalarında rol oynadığına işaret etmektedir. MhGR-RBP1 diğer GRP'lerle *Oryza sativa* (OsGRP-%81), *Malus prunifolia* (MpRBP1-%96) sekans benzerliği yüksek seviyelerdeki *Malus hupehensis*'den izole edilmiş bir sınıf 4

GRP'dir. MhGR-RBP1 kök ve gövde ile karşılaştırıldığında yapraklarda yüksek oranda ekspre edilir. MhGR-RBP1'in ekspresyon seviyesi kuraklık stresi, H₂O₂ ve yüksek tuza maruz kalındığında artar (Wang *et al.* 2012). Aksine ağaçlara ABA ve jasmonik asit uygulandığında MhGR-RBP1'in ekspresyon seviyesinin 24 saat süreyle düştüğü gözlenmiştir. Bu nedenle, sınıf 4 GRP'lerin önemli tahıl bitkilerinde ve elma ağaçlarında çevresel strese adaptasyonda yardımcı olabileceği öne sürülmüştür.

Yine *Arabidopsis*'te yapılan çalışmalarda AtGRP7'nin osmotik strese cevapta ve ABA'nın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Atgrp7 nakavt (knock-out) bitkiler ile yapılan deneylerde stres indükleyici genler olan RD29A ve RAB18'in iki transkript seviyesinin arttığı ve AtGRP7'nin ABA indüklenmesinin düzenlenmesinde rol alabileceği gözlemlenmiştir (Cao *et al.* 2006). Benzer bir diğer çalışmada yine atgrp7 nakavt hattı Kim *et al.* (2008a) tarafından kullanılmış ve nakavt mutantların yabancı bitkilerle ya da AtGRP7'nin aşırı ekspre olduğu bitkilerle karşılaştırıldığında yüksek tuz ve mannitol konsantrasyonlarında da çimlenebileceği ve hayatta kalabileceği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada AtGRP2'nin AtGRP7'nin aksine tuza maruz kalmış tohumların çimlenmesini etkilediği fakat osmotik stresi etkilemediği gözlemlenmiştir. Tohumların büyümesi ve bitki gelişimi AtGRP2'nin varlığından veya yokluğundan etkilenmez. AtGRP2'nin tohum çimlenmesi üzerine etkileri ancak ABA-bağımsız yol ile ortaya çıkabilir. Bu bulgular AtGRP2 ve AtGRP7'nin benzer abiyotik streslere cevapta aynı yollarda çalışmadıklarını açıkça göstermektedir. 10mM H₂O₂ kullanarak oksidatif strese maruz kalan *Arabidopsis* hücre kültüründe AtGRP2, AtGRP7 ve AtGRP8 up-regülasyon göstermiştir. Bu bulgu, bu 3 proteinin koordinasyonlu şekilde hedef mRNA'ların ekspresyonlarını düzenleyerek oksidatif strese hızlı bir cevap sağladıklarına işaret etmektedir (Schmidt *et al.* 2010).

AtGRP7 günlük düzenlemede gece en yüksek protein seviyesinde olduğu görülen bitkilerde ilk RNA-bağlanma proteini olarak belirlenmiştir (Fankhauser and Staiger 2002). Bitkiler güneş ışığında en önemli kaynaklarının değişimine katkı sağlamak için gelişen bir iç saate sahiptirler. Bitkiler karanlık-ışık döngüsünün optimal fazda daima meydana gelsin diye 24 saatlik bir ritimde canlı fizyolojik süreçlerini düzenlemektedir.

Bitkilerin verimi; çiçek açmasını, yaprak hareketini ve büyüme süreçlerini kapsar. İç saat tarafından yönetilen süreçler birkaç genin aktivitesi tarafından düzenlenir. Transkriptom'un %30'dan fazlası saat tarafından düzenlenir. Saatin düzenlenmesi promotörlerde saat-cevap elementleri yoluyla transkripsiyonel seviyede yürütülür (Staiger 2002).

RNA; çok kompleks 3 boyutlu yapılara katlanabilme yeteneğine sahip çok yönlü bir moleküldür. Bu 3 boyutlu yapılara katlanma olayı *Arabidopsis* genomu tarafından kodlanan ribozimler olarak bilinen RNA temelli enzimlerle ve translasyona yardımcı olan rRNA ve pre-mRNA'ların eklenmesine yardımcı olan small nuklear RNA (snRNA)'da gerçekleşen katalitik aktivitelerle en iyi şekilde açıklanmaktadır (Przybilski *et al.* 2005). Ancak kinetik olarak uygun çoklu yapılar varlığından dolayı RNA kolayca yanlış katlanmalar yapabilir. Bu durumu düzelterek doğru katlanma sürecini gerçekleştiren RNA şaperonları olarak bilinen proteinlerdir (Semrad 2011). RNA şaperonları özellikle stres adaptasyonunda önemlidir (Kang *et al.* 2013). Soğuk koşullarda RNA, translasyonu engelleyebilen ikincil yapıları oluşturma eğilimine sahiptir (Jiang *et al.* 1997). Büyük prokaryotik cold-shock proteins (CSP)'ler (bir 70 amino asit cold-shock domain (CSD) içeren küçük proteinler) ikincil yapıları kararsızlaştırdıkları için RNA şaperonları olarak tasarlanmaktadır. Onlar mRNA translasyonunu kolaylaştırmak için mRNA'ları tek zincirli olarak tutmaktadırlar. Ayrıca, CSD'yi içeren proteinler, bitkilerde soğuk toleransında da rol oynamaktadırlar (Sasaki and Imai 2012). Soğuğa duyarlı bir *E. coli*'de AtGRP7'nin ekspresyonu CSP'lerin fonksiyonlarının eksikliğinde soğuğa adaptasyon sağlama yeteneğini yeniden oluşturmaktadır. Bir saç tokası molekülü AtGRP7'nin nükleik asit erime yeteneğini değerlendirmek için kullanılmıştır. Saflaştırılmış AtGRP-GST eklentisi DNA-temelli saç tokası molekülünün çözülmesine neden olmuştur ve tek zincirli ribonükleaz T1'e daha duyarlı olan bir RNA oluşur. Bu nedenle AtGRP7 *E. coli*'de ekspre edildiğinde tek zincirli RNA'ların oranı artırdığı bildirilmiştir (Kim *et al.* 2008a).

2.4.5. Stresle İlişkili Protein (Stress Associated Protein) SAP Genleri

Stresle ilgili proteinler (Stress Associated Proteins SAP) olarak isimlendirilen SAP'lar farklı bitki türlerinde yapısal koruma ve fonksiyonel benzerlikte önemli rolleri oldukları gösterilmiştir. Bu proteinler zinc-finger protein (ZFP) domainlerinin özel tiplerini oluşturur ve çoklu stres cevap genlerinin ürünleri olarak pirinçte ilk kez belirlenmiştir (Mukhopadhyay *et al.* 2004). Bitkilerden başka, insanda doğal bağışıklığın anahtar düzenleyicisi olarak aktivasyon gösterirler. Bunun nedeni bitkiler ve hayvanların milyonlarca yıl önce ayrılmalarına rağmen hem hücresel hem de moleküler seviyelerde birkaç cevap mekanizmasında benzerlik göstermelerinden kaynaklanmaktadır (Beyaert *et al.* 2000).

ZFP'ler hem bitkiler hem de hayvanlarda hücresel cevap mekanizmalarında anahtar oyuncular olarak hizmet veren proteinlerdir. Bu proteinler çevresel streslere cevap geliştiren bitki süreçlerini düzenlemektedirler. Çeşitli transgenik bitkilerde abiyotik strese karşı ZFP'lerin koruma rolleri SAP'ların aşırı ekspresyonu ile gerçekleşmektedir. Şimdiye kadar çalışılan tüm SAP'ların bitkilerde çeşitli büyüme durumlarında abiyotik stres toleransına pozitif etkileri olduğu gösterilmiştir (Beyaert *et al.* 2000).

İlk kez çeltikte toplam 18 ve *Arabidopsis*'te 14 SAP geni belirlenmiştir. Bu genlerin çoğu abiyotik stresle uyarılan genler olarak saptanmıştır. Başka bir çalışmada, mısır ve populus (*Salicaceae*) bitkilerinde sırasıyla 11 ve 19 tane SAP geni ve *Chlamydomonas*'ta ise sadece 2 gen bulunmuştur (Jin *et al.* 2007). Aralarında protista, mantar, hayvan, insan ve bitkilerin bulunduğu 22 organizmanın genomu üzerinde yapılan kapsamlı bir çalışmada 1'den 19'a kadar çeşitli SAP genleri tespit edilmiştir (Vij and Tyagi 2008). Bu çalışmalar sınıflandırma arasında bir multigen ailesi olarak SAP'ların evrensel varlığını ortaya koymuşlardır. Tüm genomun ve gen duplikasyonlarının canlı organizmalarda önemli evrimsel kuvvetler olduğu bilinmektedir. Özellikle çiçekli bitkilerde, evrim bilgisi tüm genom duplikasyonlarının en az biri ile belirlendiği gibi tüm sekanslarda meydana gelen genom duplikasyonlarıyla da belirlenebilmektedir (Jiao *et al.* 2011).

SAP genlerinin önemli bir özelliği de intronsuz veya az intronlu bölgeler içermeleridir. 11 çeltik çeşidinin SAP1 geninde intron gözlemlenmemiş ve diğer bitkilerde ise önemli bir derecede intronsuz genlerin yüksek oranda olduğunu göstermiştir (Gimeno-Gilles *et al.* 2011; Sreedharan *et al.* 2012). İntronsuz SAP genleri prokaryotlarda da yaygındır (Jain *et al.* 2008). İntronsuz SAP genlerinin varlığı eski orjinlerini yansıtır ve post-transkripsiyonel süreçlerde hızlı transkript birikimleri oluşmaktadır. Şimdiye kadar çalışılan SAP'ların hiçbiri tipik nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) sahip değildir. Ancak, OsSAP1 ve AtSAP5 ilk önce çekirdekte yerleşmişlerdir (Giri *et al.* 2011; Kang *et al.* 2011).

SAP'lar çoklu abiyotik stresler tarafından hızlı bir şekilde uyarılmaktadırlar. Bitki SAP'larının gen ekspresyon analizleri abiyotik strese cevap mekanizmaları ile bu genlerin güçlü bağlantıları olduğu saptanmıştır. İlk karakterize edilen bitki üyeleri OsSAP1 tuz, kuraklık, soğuk, mekanik kuraklık ve ABA gibi çoklu streslere cevapta ifadeyi güçlendirdiğini göstermiştir (Mukhopadhyay *et al.* 2004). Karakterize edilen başka bir SAP olan OsSAP9, çeltik yaprak ve köklerinde ekspre edilmiş ve onun ekspresyonu H₂O₂, sıcak ve soğuk stresleri tarafından artırılmıştır. Fakat tuz stresi tarafından bastırılmış ZFP177 geni kuraklık stresi altında etkisiz bir şekilde kalmıştır (Huang *et al.* 2008). Benzer bir şekilde, mısır ve *Arabidopsis* SAP genleri bir dokuda ve strese özel durumlarda soğuk, tuz, osmotik ve kuraklık streslere cevap vermiştir. Yine, transkripsiyon faktörleri gibi sinyal ve düzenlemede rol alan genler de bitki abiyotik stres cevabında erken ifade olmaktadır (Nakashima *et al.* 2009). Bu genler hafif streslerde ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler ve başlatırlar. Bu nedenle, bitkilerde SAP genleri bitki stres adaptasyonlarını oluşturan yollarda erken cevabın temel elementlerinden biri olarak tanımlanmıştır (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006). Hayvanlarda böyle proteinlerin karakterizasyonu bitki SAP'larına olan benzerlikleri ve farklılıklarına ışık tutmaktadır.

Transgenik bitkilerde çeşitli SAP genlerinin ifadeleri stres toleransını arttırmak suretiyle tohum oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Bazı SAP'lar en önemli özellikleri bitkilerin tarımsal özelliklerini korumalarıdır. Tütün, durum buğdayı, çeltik ve halofit

bir çimde ALSAP'ın aşırı ekspresyonu stres olmayan koşullar altında verim veya büyümede gerileme göstermediği gibi stres koşulları altında daha yüksek verim almalarını sağlamıştır (Ben Saad *et al.* 2012). Benzer şekilde, *Arabidopsis*'te OsSAP11'in aşırı ekspresyonu tuz stresi ve su eksikliğine karşı verimi koruduğu görülmüştür (Giri *et al.* 2011).

Redoks bağımlı proteinlerin yapısal değişimleri ters çevrilebilir, böylece çevresel değişikliklere karşı hızlı bir cevap oluşturmada yardım ettikleri düşünülmektedir (Stroher and Dietz 2008). AtSAP12 geni bir hücrenin redoks mekanizmasındaki değişimler esnasında yüksek ağırlıktaki oligomerlerin oluşumunu ters çevirebilmektedir (Stroher *et al.* 2009). Korunan A20/AN1 domaini dışındaki sistein kalıntıları AtSAP12'nin redoks duyarlılık yeteneğine katkıda bulunur. Gelecekte yapılacak olan farklı SAP'lardaki araştırmalar SAP'ların redoks duyarlılığında ekstra sistein uygunluğunu anlamaya yardımcı olabilir.

Stressiz şartlarda transgenik *Arabidopsis* bitkisinde OsSAP11'in aşırı ekspresyonu diğer genlerin ekspresyonlarında değişikliklere yol açmaktadır. Birkaç uyarılan hedef genlerin abiyotik stres toleransı ile ilgili olabileceği bilinmektedir. Benzer şekilde, *Arabidopsis* ve pamukta yapılan çalışmada AtSAP5 geninin aşırı ekspresyonu bilinen abiyotik stresle ilgili genlerin transkript birikimini etkilemiştir (Kang *et al.* 2011; Hozain *et al.* 2012). Yine transgenik çeltikte ALSAP geni stresle ilişkili genlerin ekspresyonunu etkilemiştir. Bu genler DREB (kuraklık stresi ile ilgili bir transkripsiyon faktörü), HKT1 (tuz stresi ile ilgili zar transporteri), SOS1 (tuz toleransı ile ilgili bir gen), P5CS (prolin biyosentez geni), ProT (Prolin transporteri), SOD (superoksit dismutaz), APX1 (askorbat peroksidaz), MYB domaini transkripsiyon faktörleri ve şeker-amino asit metabolizma genlerini içerirler (Ben Saad *et al.* 2012). Böyle çalışmalar gösterir ki SAP'lar özellikle stres birikimiyle ilgili olan genlerin ekspresyonunu düzenleyebilirler. Ancak, SAP'ların doğrudan transkripsiyonu düzenlediği, DNA'ya bağlanıp bağlanmadığı veya gözlemlenen transkriptom değişimlerinin SAP'lar tarafından olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir.

SAP'ların eylem mekanizmasına başka yeni bir yaklaşım da tütünde MtSAP1'in aşırı ekspresyonu nitrik asit (NO⁻) birikimine yol açtığı için sinyalleri ile SAP'ların ilişkili olduğunu göstermiştir. NO⁻ hayvan ve bitkilerde önemli bir sinyal molekülüdür ve biyotik ve abiyotik strese cevabı düzenlemektedir. Transgenik tütün bitkileri MtSAP1 yabani tip bitkilerle karşılaştırıldığında daha iyi büyüme, gelişme ve stres toleransı göstermiştir (Charrier *et al.* 2012). SAP'lar bazı NLS-içeren protein ile etkileşime girerek nukleusa taşınabilir ve ondan sonra modifiye hedef düzenleyici proteinler veya stres cevap genlerinin cis-aktin elementlerine bağlanabilirler. Tüm bu olaylar strese tolerans sağlayan pekçok stresle ilgili genlerin ekspresyonunu uyaran veya NO⁻ gibi çeşitli sinyal moleküllerinin birikimine yol açmaktadır.

2.5. miRNA'lar ve hedef genler

Bitkilerde hedef genin ifade seviyesinin artırılmasında/azaltılmasında pek çok yöntem kullanılmaktadır (Kang *et al.* 2012). Hedef genin ifadesinin baskılanmasında kullanılan yöntemlerden birisi de miRNA'lardır (Bartel 2004; Ambros and Chen 2007; Khraiweh *et al.* 2012; Unver ve Budak 2009). miRNA'lar müdahaleci RNA'ya (RNAi=RNA interference) dayalı görev alan küçük RNA'lardandır (Bodur and Demirpençe 2010; Xin *et al.* 2010).

Stres şartlarına bağlı olarak hedef genlerin ifadelerinin değişmesinde doğrudan miRNA yani miR genlerinin rol oynadığı bilinmektedir (Lui 2002). miRNA'ların hem bitkilerde hem de hayvanlarda gen düzenleyici olarak önemli rol aldıkları bilinmektedir (Karakurt ve Karakurt 2008). Buğday, arpa ve çeltik gibi monokotil bitkilerde post-transkripsiyonel susturmada (PTGS = Post Transcriptional Gene Silencing) miRNA'lar; özellikle gen fonksiyonlarının tespit edilmesi amacıyla uygulanmaktadır (Reinhart *et al.* 2002; Lacombe *et al.* 2008; Gupta *et al.* 2012).

miRNA'lar yaklaşık olarak 21 nükleotid uzunluğundadırlar ve DICER-benzeri nükleaz enzimler tarafından öncü pre-miRNA'ların kalıp olarak kullanılmasıyla işlev kazanmaktadırlar (Kang *et al.* 2012). Bitki miRNA'ları genellikle protein kodlanmayan

genom bölgelerinde bulunurlar ve kendi genlerinden yani miR genleri tarafından üretildiği düşünülmektedir (Li *et al.* 2005; Yu *et al.* 2005; Ramachandran and Chen 2008). Bitki miRNA transkriptleri RNA polimeraz II ile oluşturulur ve öncül transkriptler (pri-miRNA) stem-loop yapısıyla karakterize edilmektedir (Lee *et al.* 2004). Bir kilobaz (kb)'a kadar uzun stem-loplara sahip olan pri-miRNA transkriptleri bitkilerde Dicer Like 1 (*DCL1*) tarafından işlenen çift iplikli yapılar haline katlanırlar. Bitkide dört ve daha fazla *DCL* proteini vardır (Khraiwesh *et al.* 2012).

Çift iplikli olgun ve metillenmiş miRNA; RNA tarafından indüklenmiş gen susturma kompleksine (RISC)'e katılır. Bu kompleks Argonat (AGO) proteininden oluşur. RISC kompleksi olgun miRNA'ya katılarak hedef mRNA transkriptini parçalamakta veya durdurmaktadır. Böylece hedef genin ifadesi baskılanmış olur (Hammond 2000; Ronemus *et al.* 2006; Atalay 2007; Mi *et al.* 2008).

Sonuç olarak bitkilerde fonksiyonel miRNA'nın oluşumu 4 temel adım içermektedir:1. Çift sarmallı RNA (dsRNA=double strand RNA)'yla miRNA işleminin başlatılması, 2. sRNA'lara (küçük RNA) dsRNA'nın işlenmesi, 3. sRNA'nın 3'-O-metilasyonu, 4. Sessizleştirme efektör komplekslerine metillenmiş sRNA'nın birleşmesi (Yang *et al.* 2006; Eldem *et al.* 2013).

miRNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesinde rol aldıkları belirlendikten sonra çeşitli tahıl ürünlerinde çalışılmaya başlanmıştır. *Triticum aestivum* bitkisinde yapılan bir çalışmada tuz stresine duyarlı ve toleranslı iki çeşit kullanılmıştır. Bu çeşitlerde 11 862 adet miRNA belirlenmiştir. Bunların 16 tanesi ilk kez tuza cevap miRNA olarak belirlenmiştir. 3 miRNA'nın ekspresyonunda 260 kat upregülasyon gözlemlenmiştir. Gen ontolojisi araştırmalarında ise 565 olası miRNA hedef geni rapor edilmiştir (Eren *et al.* 2015). Yine arpa bitkisinde tuzluluk stresine cevap veren miRNA ve hedef genleri çalışılmıştır. 126 aileye bağlı toplam 152 miRNA belirlenmiştir. Bu miRNA'ların 30'u tuzluluğa cevapta upregüle olurken 25'i downregüle olmuştur. Bu miRNA'ların hedefleri biyoinformatik yaklaşımlarla tespit edilmiştir. Böylece miRNA'lar ve hedef genlerinin ekspresyon profilleri ortaya konulmuştur (Deng *et al.* 2015). 6 farklı arpa

çeşidine tuzluluk, kuraklık besin eksikliği ve bor toksisitesi uygulanmıştır. Bu çevresel streslerde yaygın olarak kullanılan 4 referans gen ve 2 miRNA araştırılmıştır. Arpada miR168'in uygun bir referans gen olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Ferdous *et al.* 2015). *Arabidopsis* ve çeltikte miR396 ve miR393 araştırılmıştır. Bu miRNA'ların aşırı ekspresyonu tuz stresi altında tohum çimlenmesini ve toleransı olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Gao *et al.* 2011). Turunçgil köklerinde tuz stresi etkisinin araştırılmasını amaçlayan bir çalışmada 2574 mRNA ve 76 miRNA analiz edilmiştir. *NAC*, *MYB*, *CBF*, *ERF*, *WRKY*, *ZFP*, *CAMTA* ve *bZIP* içeren transkripsiyon faktör genleri tuz stresinde upregüle olurken, bu genleri hedef alan birkaç miRNA'nın downregüle olduğu görülmüştür. Bu durum transkripsiyon faktörlerince düzenlenen karbonhidrat metabolizması, poliamin yolu, ROT sistemi ve hormon sinyal yolundaki rolleri hakkında bilgi vermiştir (Xie *et al.* 2017).

Tuzluluk stresinde rol oynayan miRNA hedef genlerinden biri miR482'nin hedef geni olan Rab15B proteindir. Bu genin glisince zengin RNA bağlanma genlerinden olduğu ve streslere karşı direnç oluşturduğu bildirilmiştir (Jankowsky, 2011; Eren *et al.* 2015). Diğer bir miRNA olan miR5655'in hedef geni ise bitki Heliks-Loop-Heliks (bHLH) genidir. bHLH geni ışık sinyali ve hormon dengesinin düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik mekanizmalarda görev alan transkripsiyon faktörüdür (Castelain *et al.* 2012). miR164'ün hedef geni olan Got1/Sft2 vezikül taşıma proteini yine tuzluluk stresi gibi abiyotik ve virüslerle enfekte olan bitkilerde direnç oluşumunu sağladığı için biyotik streslerde rol oynamaktadır. En önemli görevi bitkilerde hücre içi maddelerin veziküle taşınımını düzenlemektir (Hames *et al.* 1994; Bazzini *et al.* 2007). Hedef geni PI-4 proteaz inhibitör benzeri proteini olan miR6108f'nin tuzluluk stresinde görev aldığı rapor edilmiştir (Eren *et al.* 2015). Bu gen proteazlardan olan serpin kodlayan genlerden biridir. Serpinlerin bitki savunmasında rol oynadığı ve tıpsin benzeri proteinleri inhibe ettikleri gösterilmiştir (Hejgaard 2005; Vercammen *et al.* 2006). Çeşitli abiyotik streslere karşı bitki savunmasına katılan miR156a'nın hedef geni SQUAMOSA promotör bağlama proteini benzeri (SPL) genleridir. Yüksek oranda korunan DNA-bağlama proteini içerirler. SPL genlerinin bakır ve fungal toksisiteye cevap oluşturduğu, sporogenesis, giberellin sinyalizasyonu, çiçek ve meyve oluşumu

gibi bitki büyüme ve gelişme süreçlerinde rol oynadığı görülen bitkiye özel transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca olgun yaprakların oluşmasına ve bitki gelişimine katkıda bulunduğu gözlenmiştir (Chen *et al.* 2010). Diğer bir abiyotik stres tolerans geni ise miR159c'nin hedef geni Heat-shock proteins (HSP) genidir. HSP genleri hücreleri yaralanmalardan korumakta ve normal büyüme koşullarına geri döndükten sonra iyileşmeyi ve hayatta kalmayı kolaylaştırmaktadır (Al-Whaibi 2011). Sadece yüksek sıcaklık koşullarında değil ayrıca diğer abiyotik streslerde de bitkideki proteinlerin yapısını koruyarak bitkiyi olumsuz koşullardan korumaktadır. Bu proteinler bitki ve hayvan türlerinde proteinlerin katlanmasını ve birikimini düzenleyen moleküler şaperonlar gibi davranmaktadırlar (Trippet *al.* 2009). miR172b hedef geni ise APETALA 2/etilen cevap faktörü (AP2/ERF)'dir. Stres koşulları altında etilen sinyal yolağının düzenlenmesi ve farklı ailelerde stresle ilişkili genlerin ekspresyonunun up veya down regülasyonuna neden olmaktadır (Abiri *et al.* 2016). Farklı monokotiledon ve dikotiledon türlerde kısa ve uzun vadeli tuzluluk stresinde AP2/ERF geninin upregüle edildiği gösterilmiştir (Achard *et al.* 2006; Tao *et al.* 2015).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Araştırmada Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden ve Erzurum Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü'nden elde edilen 63 adet ekmeklik buğday genotipi tohumları bitki materyali olarak kullanılmıştır. Belirtilen bitki materyalleri Çizelge 3.3'de belirtilmiştir.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmamızda genel olarak kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal Materyaller ve Markaları	
β-mercaptoethanol	Sigma, M6250
Bovine Serum Albumin	Sigma, A2058
Bromfenol Blue	Sigma, 114391
Hekzadesiltrimetilammoniyum bromid	Sigma, H6269
Dietilpirokarbonat	Sigma, H2395
Etil Alkol	46139
Ethidium Bromür	E1510
Fenol: Kloroform: İzooamil	Sigma, 77617
Hoagland	Sigma, H2395
Kloroform: İzooamil Alkol	Fluka, 25666
Primerler	Metabion International AG
Polivinilpirrolidon	P2307
Sodyum Dodesil Sülfat	L3771
Tris-Borate-EDTA	T4415
Tris-EDTA Buffer	T9285
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (74904)

Çizelge 3.1. (devam)

cDNA Sentez Kiti	Thermo Scientific (K1622)
SYBR Green/ROX qPCR Kiti	Thermo Scientific (K0221)

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve model bilgileri Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi

Cihazlar ve Modelleri	
Azot Tankı	Termo, Electron Corporation
Buzdolabı	Arçelik, 5223 NHEY A
Cam Mezür	Isolab, 015.01.100
Derin Dondurucu	Nuarie, -86 Ultralow Freezer
Elektroforez Tankı (yatay)	OWL B2, U.S.A.
Elektroforez Sistemi	Thermo Scientific, Owl EasyCast B1A
Etüv	Memmert, UN55
Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat, INFINITY-1000
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica / AREC
Hassas Terazı	AND GR-200
Kar makinesi	Scotsman, U.S.A., AH 19828 5
Mikrodalga Fırın	Altus, MD 564
Mikrosantrifüj Tüpü	Eppendorf, 078.03.003
Magnetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A
Nanodrop	Qiagen/Qiaxpert 200061 24V F 2.5A
Otoklav	Hirayama, HVE 50, SN 030787253
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
PCR	Corbett Research CG1-96
pH Metre	Crison, MM 41
RT-PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q
Saf Su Cihazı	mpMINIpure DEST up
Santrifüj Cihazı	Thermo Scientific, SL 16R
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Mikro 22R, M10
Su Banyosu	Jenotech, BS - 11
Steril Kabin	Esco, Sentinel-Gold
Vortex	Velp Scientifica, F202A0173

3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıdaki gibidir:

3.1.3.a. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Çözelti 1: 200 mM Tuz Çözeltisi (NaCl)

11,69 gram NaCl 700 ml saf suda çözülür. Daha sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

Çözelti 2: Hoagland Çözeltisi

1,6 gram Hoagland 700 ml saf suda çözölmüştür. Daha sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Çözelti 3: Dietilpirokarbonat (DEPC) Çözeltisi

100 ml saf su içersine 0.1 ml DEPC ilave edilmiş ve kuvvetlice çalkalanmıştır. 12 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve daha sonra otoklavlanmıştır.

3.1.3.b. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

DNA ekstraksiyon tamponu:

100mM Tris-HCl (pH 8.0)

50mM EDTA (pH 8.0)

500mM NaCl

%2 SDS (w/v)

%2 β -mercaptoethanol (v/v)

%1 PVP (w/v)

CTAB/NaCl:

%10 CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)

0,7 M NaCl

Fenol: Kloroform: İzooamil alkol:

25: 24: 1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

Kloroform: İzooamil alkol:

24: 1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

TE tamponu:

10mM Tris-HCl (pH 8,0)

1mM EDTA (pH 8,0)

%70'lik Etil Alkol:

70 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.c. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

Ethidium Bromür Çözeltisi: 500 ml 0,5X TBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Bovine Serum Albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanmış ve – 20°C’de muhafaza edilmiştir.

Bromfenol Blue Çözeltisi: 0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol’ün toplam hacminin 100 ml’ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra + 4°C’de muhafaza edilmiştir.

0,5X TBE tamponu: Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak satın alınmış ve 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

Primerlerin Hazırlanması: Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan bitki materyali

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla bitkileri Bölümü ve Erzurum Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü’nden elde edilen 63 adet ekmeklik buğday çeşidi laboratuvar şartlarında çimlendirilerek bunlardan kök ve gövde örnekleri alınmış DNA ve RNA izolasyonları yapılabildiği kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2. Tuzun bitkiye uygulanması

Çalışmada kullanılan 63 ekmeklik buğday çeşidinin eşit boyutlarda seçilen 25 adet tohumu musluk suyunda yıkandıktan sonra %1’lik NaOCl’de 3 dakika steril edilmiştir. Tohumlar dört kez steril saf su ile durulanmış ve steril filtre kağıdı ile kurutulmuştur. Sırasıyla seçilen 25 tohum saksılara çimlendirilmek üzere alınmıştır. Daha sonra hazırlanan Hoagland çözeltisi (Hoagland and Arnon 1950) ve steril su ile sulanmıştır.

Laboratuvarda 25°C sıcaklık ve 16/8 saat gündüz/gece çimlendirilmek üzere 10 gün bekletilmiştir. Bu süre sonunda tuz gruplarının her birine ayrı ayrı olacak şekilde 200 mM NaCl içeren çözelti eklenmiş ve tekrar 10 gün bekletilmiştir. Bu süre sonunda tuzluluğa dirençli ve tuzluluğa duyarlı genotiplerin seçilmesi için bitkilerin büyüme durumları incelenerek fizyolojik bir ön eleme yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Fizyolojik testlerde kullanılan Ekmeklik buğday genotipleri

Zerin	Sultan 95	Zencirci 2002
Es 26	Gerek 79	Karahan 99
Bezostaja-1	Polatlı Kösesi	Mızrak
Haymana 79	Demir 2000	Yayla 305
Alparslan	Soyer 02	Süzen 97
Altay 2000	Sert Buğday	İkizce 96
Kılçıksız Buğday	Müfitbey	Aytın 98
Aksel 2000	Nenehatun	Kocabuğday
Kırmızıgül	Çetinel 2000	Kate A-1
Sönmez 2001	Kutluk 94	Yakar 99
Dağdaş 94	Bayraktar 2000	Köse 220/39
Hawk (Şahin)	Kırgız 95	İzgi 2001
Tir	Akbuğday	Prostor
Lancer	Bağcı 2002	Kıraç 66
Ankara 093/44	Conkesme	Harmankaya 99
Bereket	Kırık	Karasu 90
Sürak 1593	Tosunbey	Kırmızı Yerli
Pehlivan	Atlı 2002	Palandöken 97
Gün 91	Nacibey	Türkmen
Aldane	Özlü Buğday	Uzunyayla
Ak 702	Kırkpınar 79	Bolal 2973

Bu 63 çeşit arasından en toleranslı olan 11 genotip (Tir, Karasu 90, Haymana 79, Kırmızıgül, Bayraktar 2000, Es 26, Müfitbey, Conkesme, Kocabuğday, Gerek 79 ve

Akbuğday) seçilmiştir. Uygulama yapılan bitki ve kontrol gruplarından kök ve gövde örnekleri alınarak DNA ve RNA izolasyonu işlemlerine geçilmiştir.

3.2.3. Aday genlerin eldesi için biyoinformatik çalışmalar

Triticum aestivum genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ile ilgili veri tabanlarından yararlanılarak *MsGRP*, *TaCIPK29*, *SOS1*, *SOD2* ve *OSISAP1* genlerine ait yeni bilgiler aday gen için primer tasarımı için kullanılmıştır. Diğer bitkilerde bulunan bu seçilen genlerin protein sekansları kullanılarak NCBI sisteminde TBLASTX ve TBLASTN veritabanı taramaları yapılmış ve EST protein dizileri belirlenmiştir. Birinci aşamada, belirlenen protein dizileri arasından en çok benzerlik gösterenler seçilmiştir. Böylece tarama yapılan EST dizileri ile *Triticum aestivum* proteinlerinin ne oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır. İkinci aşamada ise yüksek oranda benzerlik gösteren dizilerinden ileri ve geri yönlerde primer tasarımı yapılmıştır. *MsGRP*, *TaCIPK29*, *SOS1*, *SOD2* ve *OSISAP1* genlerinin ortologları bulunarak tespit edilmiştir. Böylece Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) yardımıyla primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin denenmesi için DNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir.

3.2.4. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü olarak Nardemir *et al.* (2015) esas alınmış ve birkaç maddesinde değişikliğe gidilmiştir.

- a. Önceden sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınan bitki materyali üzerine 1000µl DNA ekstraksiyon tamponu eklendi ve alt üst ederek karıştırıldı ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda 10–60 dk. bekletilmiştir.
- b. 12000 g ve 4°C'de 10 dk. santrifüjlenip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- c. 1000µl Fenol: Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst ederek karıştırılmıştır. 12000 g ve 4°C'de 5 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.

- d. Üst faza 1/10 hacim CTAB/NaCl çözeltisinden eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmıştır.
- e. 1000µl Kloroform: İzooamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12000 g ve 4°C'de 5 dk. santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- f. DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenerek -20°C'de 10 dk. bekletilmiştir.
- g. 12000 g ve 4°C'de 10 dk. santrifüjlenip üst faz atılmıştır.
- h. Pelet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- i. Yıkanan pelet bir gece bekletilerek kurutulmuştur.
- j. Kurutulan DNA 100µl TE tamponunda çözüldü.
- k. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA 250 kat (3µl DNA+747µl TE tamponu) seyreltilerek Nanodrop da okunmuştur. Stok DNA'dan 50ng/µl DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.5. Kullanılan primerler

Çalışmada Housekeeping geni olarak *β-Aktin* seçilmiştir. *β-Aktin*, *MsGRP*, *TaCIPK29*, *SOS1*, *SOD2* ve *OSISAP1* genleri için (Metabion International AG, Steinkirchen, Germany) kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.4'de verilmiştir. Ayrıca miRNA'ların hedef genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan primerler ise Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Kullanılan primerlerin baz dizilimi

Primerler	GenBank Aksesyon Numarası	İleri Primer 5'→3'	Geri Primer 5'→3'
β-AKTİN	AB181991.1	ACCTTCAGTTGCCCAGCAAT	CAGAGTCGAGCACAATACTG
MSGRP	JQ340083.1	GGAATTGGAGGTGGATATGG	GAACGGCTGAATGAGGAGAA
TaCIPK29	JX243013.1	GCTACCTCCCCTTCAACGAC	GCATCAGCTCCTCCAGCTC
SOD2	AF092524.1	CTGGGCCATTGATGAAGATT	CCAACAAAGGATGCAGGTTT
OSISAP1	XM_015795781.1	CCTCGATCTCTCCTGCAATC	AGAAGCAGTTCTGGCAGAGG
SOS1	KF169800.1	GACACTCCTGGCAAAAGCTC	GCGACTTTCCTCTCTGATGG

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan miRNA hedef genlerinin qRT-PCR için primer dizileri

Primerler	GenBank Aksesyon Numarası	Hedef Genlerin ID	İleri primer 5'→3'	Geri primer 5'→3'	Hedef Genlerin Fonksiyonu	Ürün uzunluğu (bp)
ath-miR5655	01H68036923	DQ019636.1	5'- TGATCGTGACGCCGAAAGAA-3'	5'- GCATCGGGAGCGAGTATAGG-3'	bHLH135-benzeri transkripsiyon faktörü	150
cca-miR6108f	162319715	EU293133.1	5'- GAACCTGGTCGTCTTCTCCG-3'	5'- CACAGGCCTATCTTCACCGC-3'	PI-4 proteaz inhibitör benzeri protein	123
hci-miR156a	49516924	AL810223.1	5'- GAAAGCGTCTTGATGGGCAC-3'	5'- CAGTTTTGCTCCGGTCTTGG-3'	SQUAMOSA promotör bağlama protein benzeri	135
mdm-miR159c	2827001	AF005993.1	5'- AGACAAGCCCATGATCGTCG -3'	5'- TCGTTGAAGTAGGCCGGAAC -3'	70 kDa HSP geni	162
osa-miR172b	68037672	DQ019639.1	5'- TCCCCGTGATGCTGAAGATG -3'	5'- GGGATGAAGAGTTGGCCCTC -3'	AP2/EREBP transkripsiyon faktörü RAP2-7 benzeri etilen cevap transkripsiyon faktörü	107
rgl-miR164	5869972	AJ237942.1	5'- CCGCCCCAAACAGAAACAAG-3'	5'- CTGACCCAAACACCGCATTG-3'	Got1/Sft2-like vezikül iletim protein ailesi izoform 1	183
zma-miR482-5p	21852	X62476.1	5'- GGAGGAGGAAGAAGGGCATC-3'	5'- GTCATCCCAGTGTGACCCTG-3'	Rab15B protein, ABA cevap geni	199

3.2.4.b. PCR protokolü

PCR işlemi için şu protokol izlenmiştir; 0,2 ml'lik tüpe 3 µl 10X PCR tamponu, 1,8 µl BSA (10 mg/ml), 1,2 µl dNTP (10mM), 1,2µl MgCl₂ (25 mM), 3µl DNA (100ng/µl), 1,2 µl primer (5 µM), 0,4 µl 5Unit/µl *Taq* DNA polimeraz (Sigma, D6677) ve 17,4 µl saf su ilave edilerek hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır.

Yukarıda verilen standart değerlere göre her bir örnekten izole edilen genomik DNA ve Çizelge 3.4'de verilen primerler ile her bir birey için ayrı PCR tüpü hazırlanmıştır.

Bu işlemlerin ardından örnekler PCR otomatik thermocycle aletine (Corbett Research Mastercycler Gradient Authorized Thermal Cycle) yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

1)	5 dk	94 °C	
2)	1dk 30 sn	94 °C	
	1dk 30 sn	37 °C	4 döngü
	3 dk	72 °C	
3)	1 dk	94 °C	
	1 dk	36 °C	41 döngü
	1 dk	42 °C	
	3 dk	72 °C	
4)	7 dk	72 °C	

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- a. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1.5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- b. Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5X TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0,5µg/ml olacak miktarda Et-Br eklenmiştir.
- c. Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- d. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3µl bromfenol mavisi + 7µl PCR ürünü) yüklenmiştir.
- e. Elektrik akımı verilerek 70V–150 dk. süre ile PCR ürünleri elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. İki saat sonunda elektrik akımı kesilmiştir.
- f. Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılmış ve protokol üretici firmanın talimatlarına uygun yapılmıştır.

- a. Maksimum 100 mg bitki örneği DEPC ile steril edilmiş havanda sıvı azot yardımıyla parçalanmış ve 2 ml'lik tüplere alınmıştır.
- b. 450 µl Buffer RTL veya Buffer RLC bitki örneği üzerine eklenmiş ve kuvvetlice vortekslenmiştir.
- c. Bu karışım lila tüplere aktarılmıştır. 2 dk. en yüksek hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- d. Üzerine (%96-100)'lük etanolden 0.5 volume eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır.
- e. Örnek (yaklaşık 650 µl) pembe kolonlara alınmıştır. 15 sn 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- f. RNeasy spin kolona 700 µl Buffer RWI eklenmiştir. Yine 15 sn 10000 rpm'de santrifüje edilmiştir ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- g. RNeasy spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenmiştir. 15 sn 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.

- h. Spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenmiştir ve 2 dk 10000 rpm’de çevrilmiştir.
- i. Kolon yeni bir 1.5 ml’lik tüpe alınmıştır. Üzerine 30-50 µl RNase Free Water eklenmiştir. 1 dk 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- j. Kullanılınca kadar –80°C’de saklanmıştır.

Elde edilen RNA’ların miktarlarını belirlemek için Qiagen Nanodrop’da absorbans (A) değerleri okunmuştur. RNA miktarları okunduktan sonra tüm örneklerin miktarları 0,1ng-5µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.7. cDNA sentezi

Miktarları eşitlenen RNA örnekleri Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti protokol üretici firmanın talimatlarına uygun yapılmıştır.

- a. Steril tüpe miktarı 0,1ng-5µg olacak şekilde toplam RNA, 1 µl oligo (dT)₁₈ primer konulmuş ve son hacim 12 µl’ye tamamlanmıştır.
- b. Bu karışım hafif bir şekilde santrifüj edilmiş ve 65°C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Çıkarıldıktan hemen sonra buz üzerine alınmıştır.
- c. Bu karışımın üzerine 4 µl 5X Reaksiyon Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT eklenmiş ve son hacim 20 µl olmuştur.
- d. Karışım hafif bir şekilde santrifüj edilmiş ve PCR’a konulmuştur. PCR döngüsü; 42°C’de 60 dk. inkübasyondan sonra 70°C’de 5 dk reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.2.8. qRT-PCR ile Gen İfade Analizi

qRT-PCR işlemini gerçekleştirmek için Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Kiti kullanılmıştır. Protokol üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır.

- a. Kullanılacak tüm solüsyonlar hafif bir şekilde vortekslenmiştir.
- b. Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

Maxima SYBR Green/ROX QPCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Forward Primer	0,3 µM
Reverse Primer	0,3 µM
Kalıp DNA	500 ng
Steril su	Son hacim 25 µl'ye tamamlanır

- c. Karışım PCR tüplerine aktarılır ve hafifçe santrifüjlenir.
- d. PCR döngüsü;

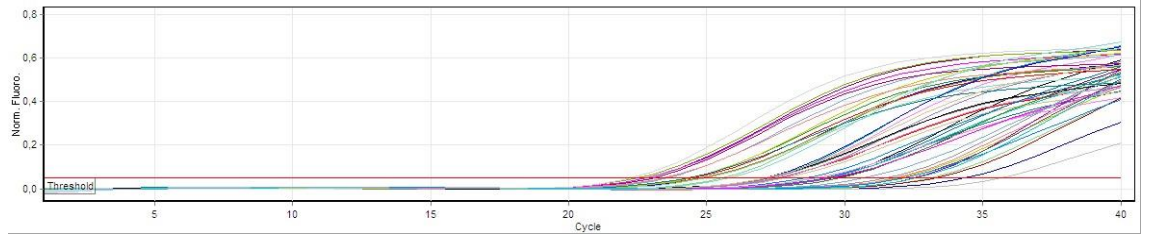
1)	10 dk	95°C	
2)	15 sn	95°C	
	30 sn	60°C	40 döngü
	30 sn	72°C	

3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

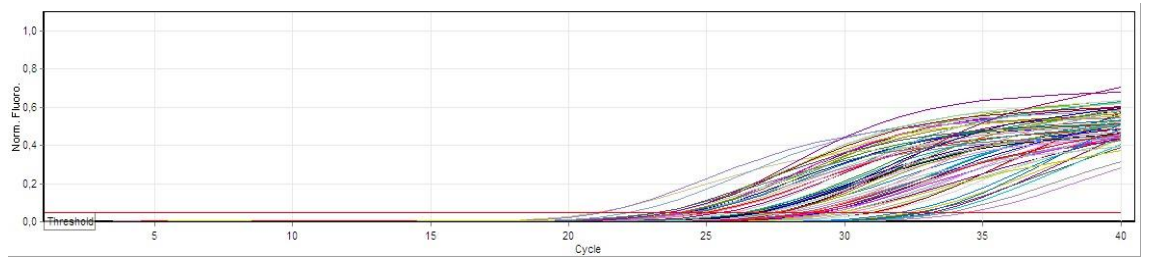
Gen ekspresyon analizi sonucunda örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buğday çeşitlerine ait genlerin ifade oranları Livak and Schmittgen (2001) göre $\Delta\Delta C_t$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. RT-PCR analizinde referans gen olarak buğday β -Aktin geni kullanılmış ve genlerin ifadesi referans gen ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, her genotip için rank toplam değeri (Kang, 1988) hesaplanmış ve buna göre genotipler tuzluluğa toleranslılık yönünden gruplandırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada 63 ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) genotipi 200 mM tuz stresine maruz bırakılarak fizyolojik ön elemeye tabi tutulmuştur. Bu ön eleme sonucunda tuzluluğa toleranslılık bakımından toleranstan hassasa doğru (Tir, Karasu 90, Haymana 79, Kırmızıgül, Bayraktar 2000, Es 26, Müfitbey, Conkesme, Kocabuğday, Gerek 79 ve Akbuğday) 11 buğday genotipi sıralanmıştır. Bu buğday genotiplerinde cDNA sentezi yapıldıktan sonra SOS1, SOD2, CIPK29, GRP ve SAP1 genlerinin yanısıra tuz stresine yanıt mekanizmasında rol oynayan miR156a, miR482, miR12b, miR6108f, miR5655, miR164 ve miR159c'nin hedef genlerine özgü sentezlenen primerler ile kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) yapılmıştır. Herbir çeşidin kök ve gövdeleri için qRT-PCR amplifikasyonu sonucunda çeşitler arasındaki SYBR-Green sinyal grafiği Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Ayrıca ifade oranlarını belirlemek için relatif kantitasyon analizi yapılmıştır.



Şekil 4.1. Buğday genotipleri köklerinde seçilen genlerin RT-PCR çalışma eğrileri



Şekil 4.2. Buğday genotipleri gövdelerinde seçilen genlerin RT-PCR çalışma eğrileri

4.1. Kök Analizleri

Buğday genotiplerinin köklerinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde gösterilmiştir. Çizelge 4.1’de buğday genotiplerinde belirlenen gen bölgeleri tuz stresine maruz kaldıktan sonra köklerdeki gen ifade oranları ve Çizelge 4.2’de ise miRNA hedef genlerinin ifade oranları verilmiştir.

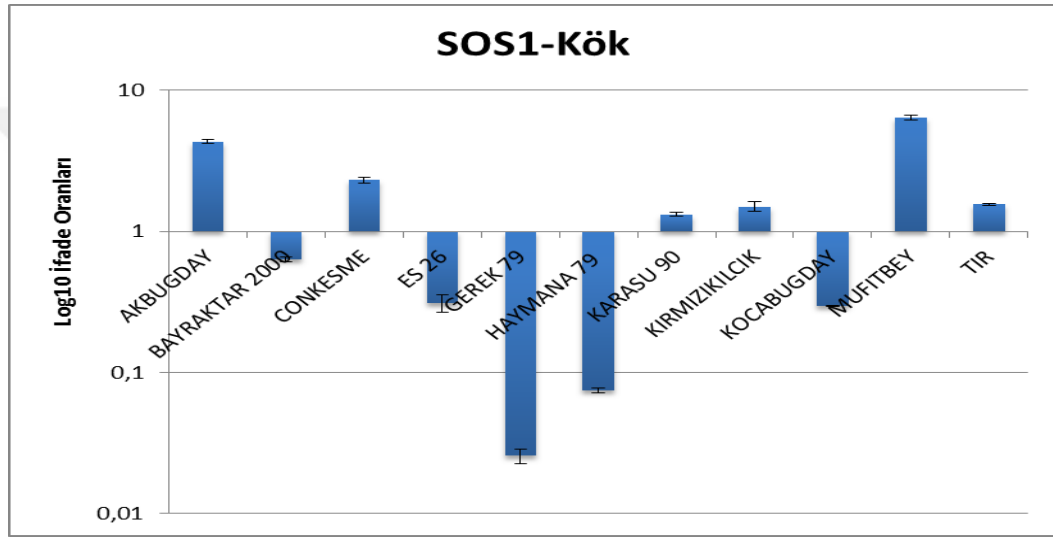
Çizelge 4.1. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki tolerans genlerinin ifade oranları

BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	SOS1	SOD2	CIPK29	GRP	SAP1
	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma
AKBUĞDAY	4,318±0,131	0,818±0,035	1,026±0,032	0,260±0,014	0,716±0,083
BAYRAKTAR 2000	0,628±0,024	0,062±0,001	0,244±0,011	0,251±0,010	1,973±0,160
CONKESME	2,315±0,109	1,448±0,060	1,616±0,183	1,332±0,054	0,351±0,020
ES 26	0,309±0,042	0,001±0,0002	0,638±0,070	0,151±0,049	0,222±0,014
GEREK 79	0,025±0,002	0,294±0,087	0,087±0,005	0,162±0,026	0,609±0,032
HAYMANA 79	0,074±0,003	0,0003±1,183	0,064±0,002	0,048±0,002	0,476±0,039
KARASU 90	1,313±0,042	0,601±0,004	0,285±0,001	0,271±0,002	0,061±0,004
KIRMIZIKILÇIK	1,494±0,119	0,201±0,013	0,345±0,021	0,162±0,012	1,707±0,303
KOCABUĞDAY	0,295±0,004	0,054±0,001	0,468±0,013	0,280±0,008	0,264±0,007
MÜFİTBEY	6,411±0,248	2,417±0,019	4,018±0,042	1,927±0,050	0,545±0,037
TİR	1,551±0,027	1,977±0,028	1,591±0,033	2,439±0,194	4,416±0,393

Çizelge 4.2. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miRNA hedef genlerinin ifade oranları

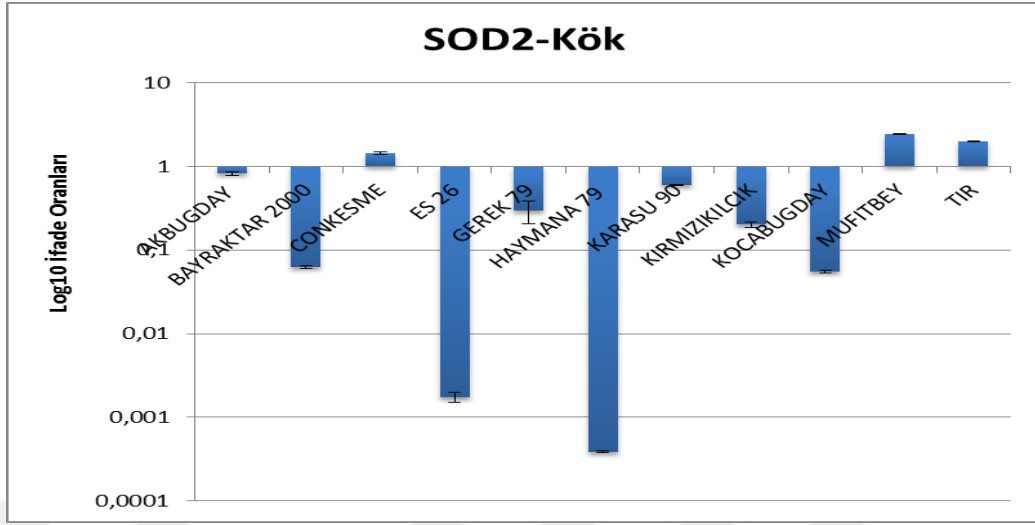
BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	miR156a SQUAMOSA promotör bağlama protein benzeri	miR482 Rab15B protein	miR172b AP2/EREBP transkripsiyon faktörü	miR6108f PI-4 proteaz inhibitor benzeri protein	miR5655 bHLH135-benzeri transkripsiyon faktörü	miR164 Got1/Sft2-like vezikül iletim protein ailesi izoform 1	miR159c 70 kDa HSP geni
	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma	İfade Oranları ±standart sapma
AKBUĞDAY	0,855±0,0147	40,213±2,499	1,138±0,030	0,037±0,022	0,212±0,011	0,355±0,072	0,403±0,011
BAYRAKTAR 2000	1,213±0,115	14,317±2,677	1,741±0,064	3,091±0,280	1,199±0,039	1,173±0,050	0,520±0,074
CONKESME	0,303±0,004	10,999±2,755	0,268±0,042	0,028±0,006	0,054±0,004	0,075±0,010	0,230±0,005
ES 26	0,906±0,016	0,438±0,055	1,066±0,012	0,695±0,009	0,717±0,025	0,427±0,010	0,514±0,074
GEREK 79	3,204±0,282	0,297±0,010	2,231±0,216	1,804±0,017	0,289±0,061	1,771±0,034	1,834±0,196
HAYMANA 79	2,386±0,090	518,879±195,745	1,025±0,086	0,289±0,010	0,830±0,020	1,025±0,050	1,018±0,022
KARASU 90	6,411±0,352	3190,657±212,638	7,586±0,666	0,327±0,081	1,160±0,018	2,836±0,176	16,765±1,300
KIRMIZIKILÇIK	3,405±0,179	0,240±0,018	1,127±0,019	2,209±0,037	1,001±0,240	1,037±0,029	2,004±0,112
KOCABUĞDAY	0,805±0,017	34,156±6,002	0,390±0,038	0,050±0,003	0,117±0,007	0,126±0,012	0,432±0,017
MÜFİTBEY	1,907±0,040	281,449±56,439	1,454±0,051	0,311±0,002	0,236±0,00	2,702±0,226	0,421±0,015
TİR	1,859±0,032	1359,976±318,098	1,831±0,089	0,255±0,033	1,150±0,213	0,355±0,072	1,749±0,072

Bu sonuçlara göre SOS 1 gen ifade analizi sonuçlarına göre Müfitbey, Tir, Karasu 90, Kırmızıgül, Conkesme ve Akbuğday genotiplerinde upregüle olurken, diğer genotiplerde down regüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip ise Gerek 79'dur. Müfitbey genotipinde ise en yüksek gen ifade oranı saptanmıştır. Ayrıca en düşük ifadeye sahip genotip ile en yüksek ifade seviyesine sahip genotip arasında 6 kat farklılık meydana gelmiştir (Şekil 4.3).



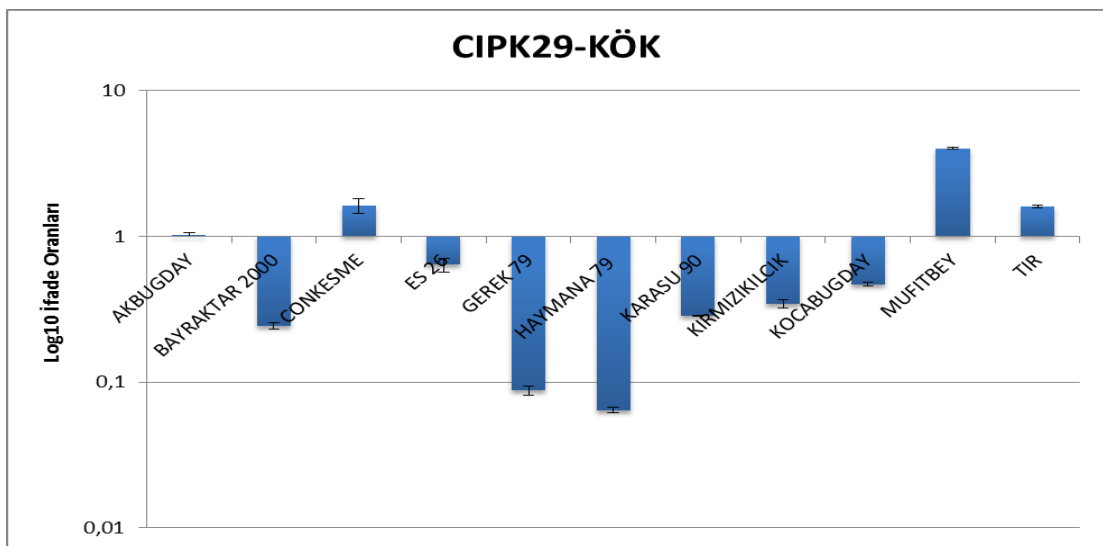
Şekil 4.3. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki SOS1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Müfitbey, Tir, ve Conkesme genotiplerinde SOD2 geni ise upregüle olmuştur. Bu gen ifadesi bakımından Haymana 79 genotipi en az, Müfitbey genotipi ise en yüksek ifade seviyesine sahip olmuştur. Ayrıca en düşük ifade seviyesine sahip genotip ile en yüksek ifade seviyesine sahip genotip arasında yaklaşık 2,5 kat ifade farklılığı bulunmuştur (Şekil 4.4).



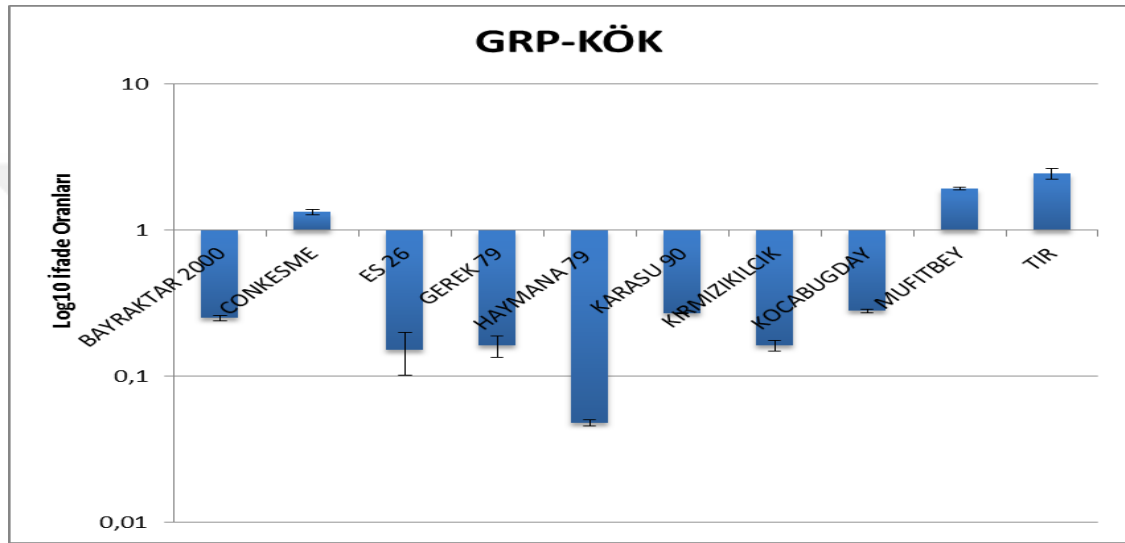
Şekil 4.4. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki SOD2 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

CIPK29 geni ifade analiz sonuçlarında Müfitbey, Tir, Conkesme ve Akbuğday genotiplerinde upregüle olurken diğer genotiplerde downregüle olmuştur. Genin en az ifade edildiği çeşit Haymana 79 iken genin en fazla ifade edildiği çeşit Müfitbey çeşididir. Ayrıca en düşük ifade seviyesine sahip genotip ile en yüksek ifade seviyesine sahip genotip arasında yaklaşık 4 kat ifade farklılığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



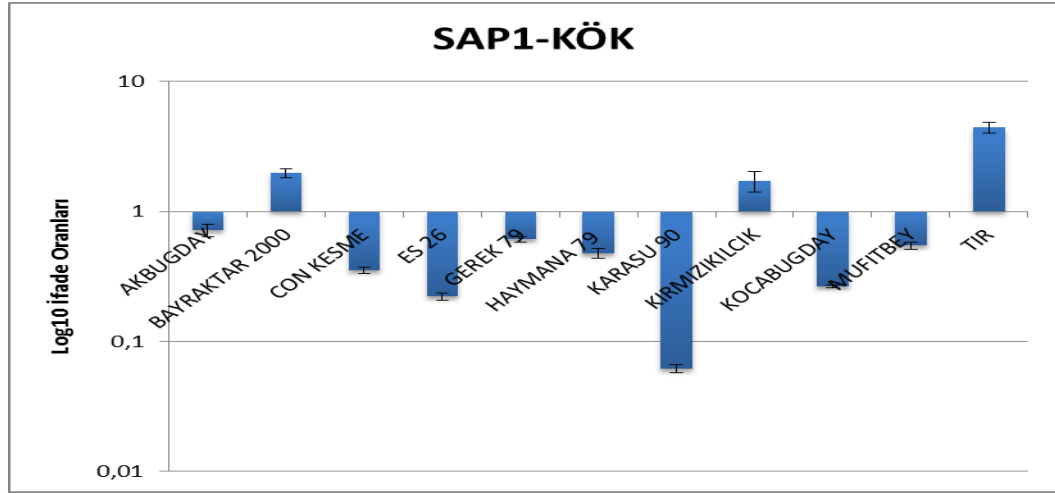
Şekil 4.5. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki CIPK29 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

GRP geni analiz sonuçlarında Müfitbey, Tir, ve Conkesme genotipleri upregüle olurken diğer genotiplerde down regüle olmuştur. Genin en az ifade edildiği çeşit Haymana 79 iken en fazla genin ifade edildiği çeşit Müfitbey'dir. Ayrıca en düşük ifade seviyesine sahip genotip ile en yüksek ifade seviyesine sahip genotip arasında yaklaşık 2 kat ifade farklılığı meydana gelmiştir (Şekil 4.6).



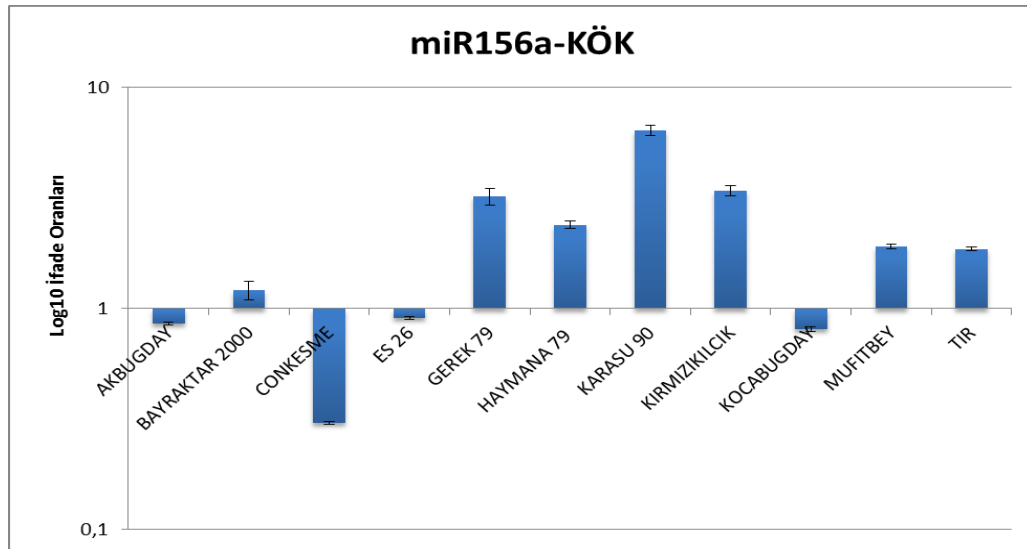
Şekil 4.6. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki GRP geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

SAP1 geni analiz sonuçlarında Bayraktar 2000, Kırmızıkilçık ve Tir genotiplerinde upregüle olmuştur. Bu genin en az ifade edildiği Karasu 90 iken en fazla ifade edildiği Tir genotipidir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotip ile en düşük genotip arasında yaklaşık olarak 4 kat ifade farklılığı bulunmuştur (Şekil 4.7).



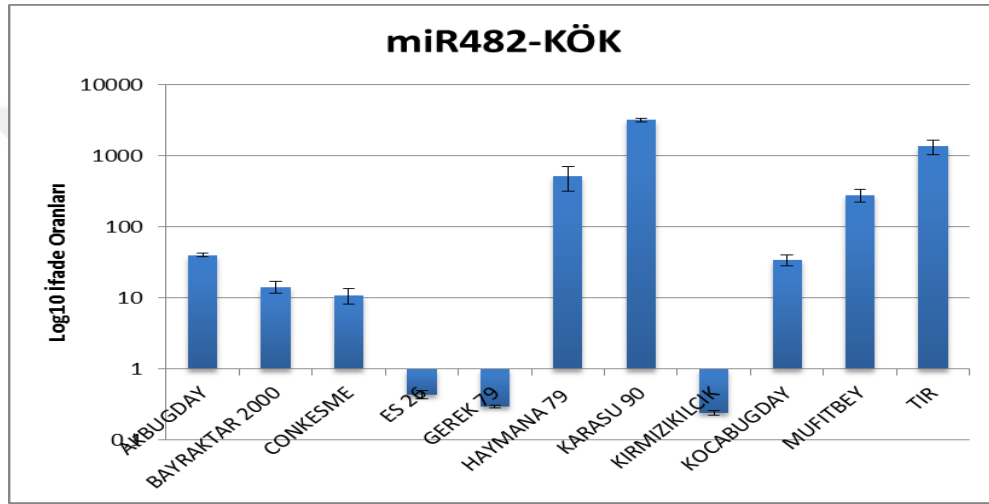
Şekil 4.7. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki SAP1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Çalışılan miRNA'lerden olan miR156a hedef geninin (AL810223.1) analiz sonuçlarında Bayraktar 2000, Gerek 79, Haymana 79, Karasu 90, Kırmızıkilçik, Müftibey ve Tir genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Conkesme iken en fazla genin ifade edildiği genotip Karasu 90'dır. Ayrıca en yüksek ve en düşük ifade seviyesine sahip genotipler arasında 6 kat ifade farklılığı meydana gelmiştir (Şekil 4.8).



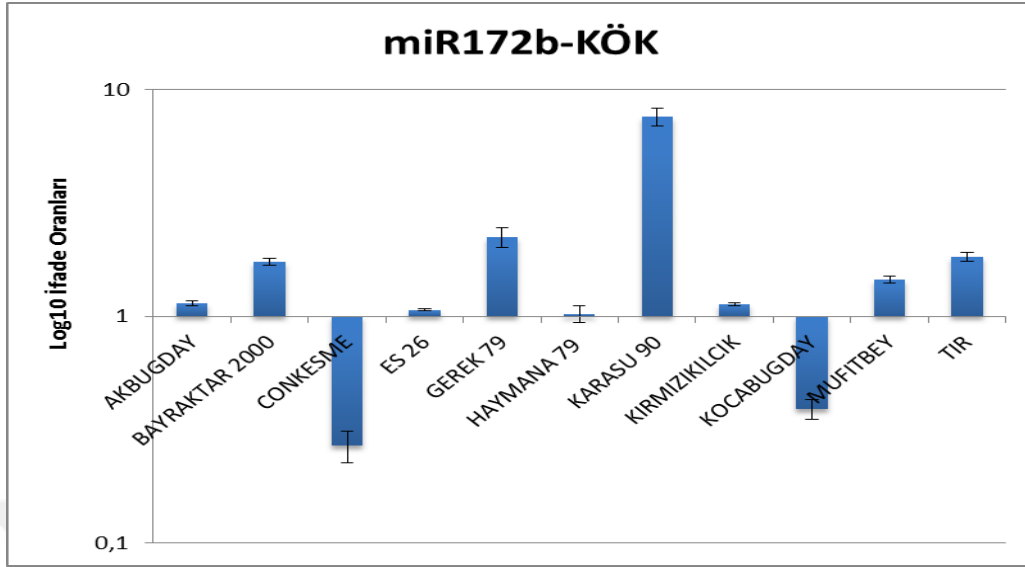
Şekil 4.8. Tuz stresi altındaki genotiplerin köklerindeki miR156a hedef geninin (AL810223.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR482 hedef geninin (X62476.1) analiz sonuçlarında Akbuğday, Bayraktar 2000, Conkesme, Haymana 79, Karasu 90, Kocabuğday, Müfitbey ve Tir genotipleri upregüle olmuştur. Kırmızıgül genotipinde gen en az ifade edilirken en fazla genin ifade edildiği genotip Karasu 90 genotipidir. En yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 3190 kat ifade oranı meydana gelmiştir. Bu oran tüm miRNA hedef genlerin kök analizlerinde en yüksek belirlenen ifade oranıdır (Şekil 4.9).



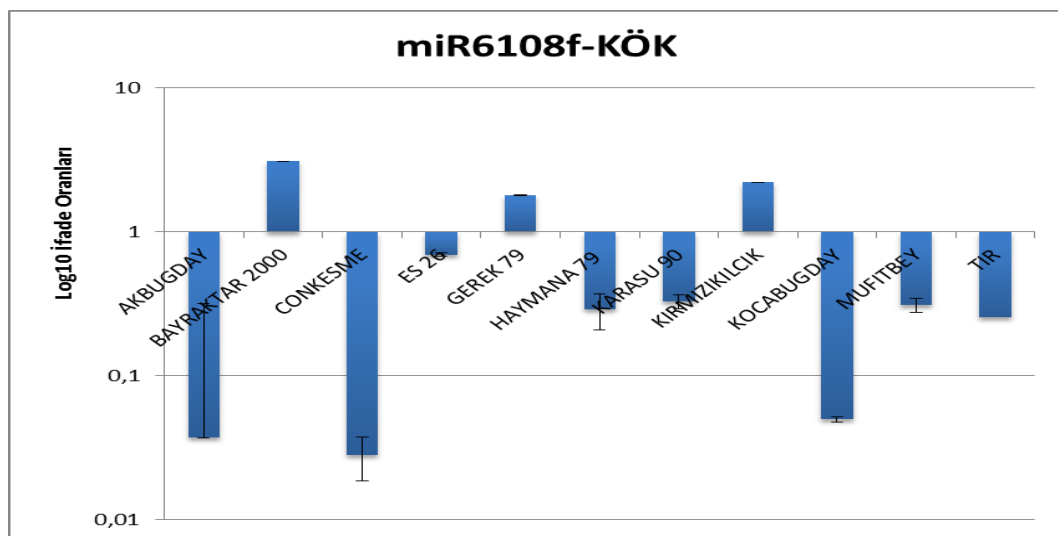
Şekil 4.9. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR482 hedef geninin (X62476.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Diğer bir miRNA olan miR172b hedef geninin (DQ019639.1) analiz sonuçlarında Akbuğday, Bayraktar 2000, Es 26, Gerek 79, Karasu 90, Kırmızıgül, Haymana 79, Müfitbey ve Tir genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Conkesme iken en fazla genin ifade edildiği genotip Karasu 90'dır. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 7 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.10).



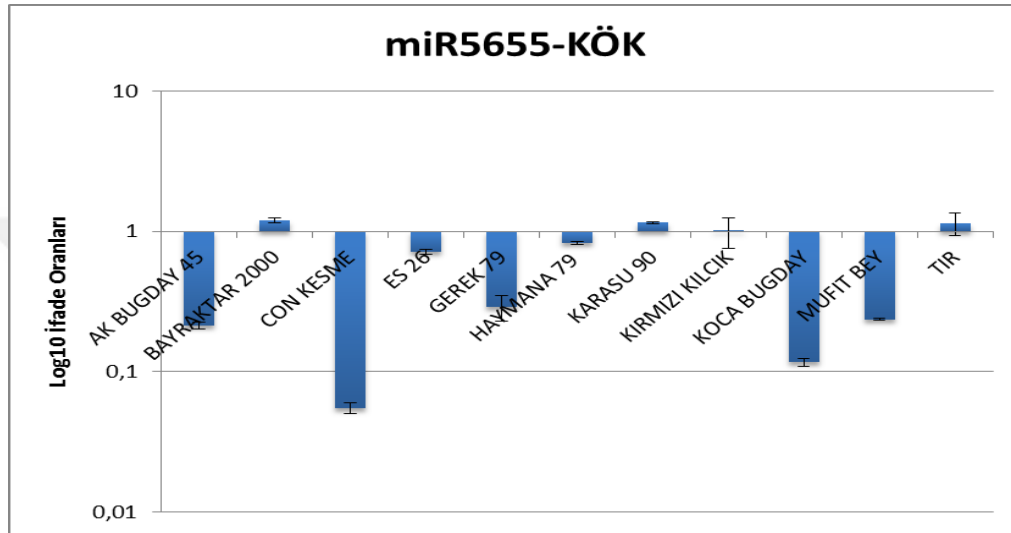
Şekil 4.10. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR172b hedef geninin (DQ019639.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR6108f hedef geninin (EU293133.1) analiz sonuçlarında Bayraktar 2000, Gerek 79 ve Kırmızıkilçik genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Conkesme iken en fazla genin ifade edildiği genotip Bayraktar 2000'dir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 3 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.11).



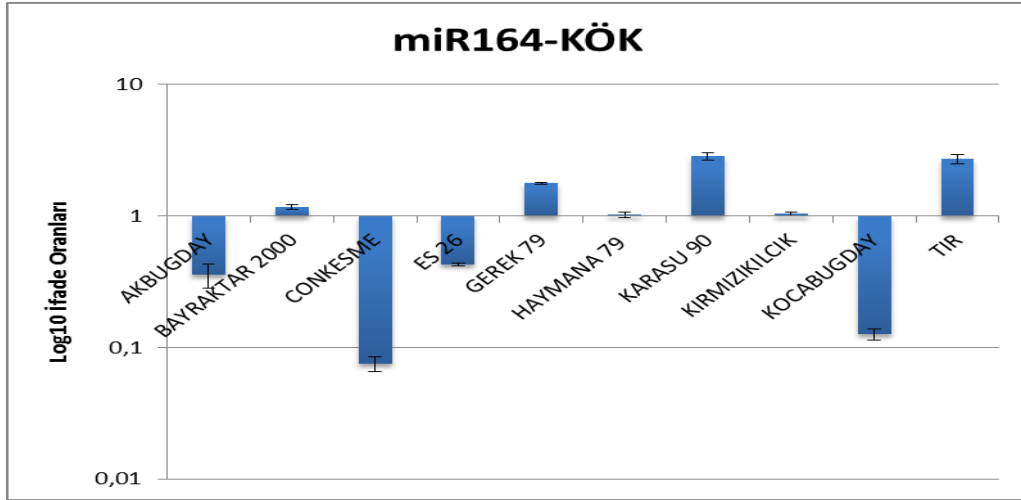
Şekil 4.11. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR6108f hedef geninin (EU293133.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR5655 hedef geninin (DQ019636.1) analiz sonuçlarında Bayraktar 2000, Karasu 90 ve Tır genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Conkesme iken en fazla genin ifade edildiği Bayraktar 2000 genotipidir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte yaklaşık 2 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.12).



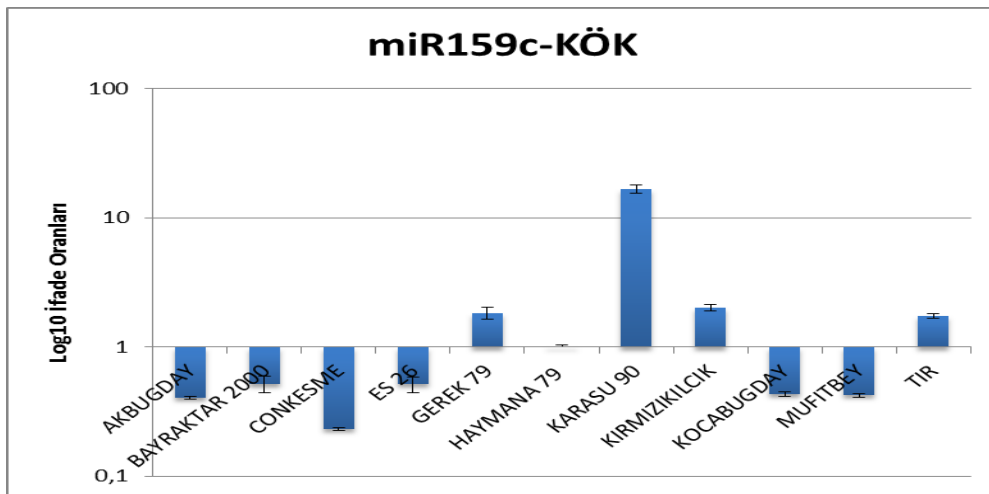
Şekil 4.12. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR5655 hedef geninin (DQ019636.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR164 hedef geninin (AJ237942.1) analiz sonuçlarında Bayraktar 2000, Gerek 79, Karasu 90 ve Tır genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Conkesme iken en fazla genin ifade edildiği Karasu 90 genotipidir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte yaklaşık 3 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR164 hedef geninin (AJ237942.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR159c hedef geninin (AF005993.1) analiz sonuçlarında ise Gerek 79, Karasu 90, Kırmızıgül ve Tir genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Conkesme iken en fazla genin ifade edildiği Karasu 90 genotiptir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 16 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin köklerindeki miR159c hedef geninin (AF005993.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Kökte yapılan gen ifadesi analiz sonuçlarına göre rank toplam değerleri hesaplanarak genotiplerin sıralamaları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan genlerin ifade seviyesi

bakımından tuzluluğa en yüksek cevap veren genotip Tir iken, en az cevap veren genotip Conkesme olarak belirlenmiştir. Çalışılan genlerin ifade seviyesi bakımından genotiplerin sıralaması Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Triticum aestivum* bitkisi genotiplerinde kök analizine göre tuzluluğa toleranslılık yönünden gruplandırılması

BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	RANK ORTALAMASI	RANK STANDART SAPMASI	RANK TOPLAMI	RANK SIRASI
TİR	3,8	2,4	6,2	1
MÜFİTBEY	4,2	2,8	7,0	2
KARASU 90	3,9	3,3	7,2	3
BAYRAKTAR 2000	5,3	2,8	8,0	4
KIRMIZIKILÇIK	5,3	2,8	8,1	5
AKBUĞDAY	6,5	2,8	9,3	6
GEREK 79	6,0	3,3	9,3	7
ES 26	7,7	2,0	9,6	8
KOCABUĞDAY	8,3	2,0	10,3	9
HAYMANA 79	7,4	2,9	10,3	10
CONKESME	7,8	3,9	11,6	11

4.2. Gövde Analizleri

Triticum aestivum bitkisinin gövdelerinde yapılan qRT-PCR sonuçları aşağıdaki çizelge ve şekillerde gösterilmiştir. Çizelge 4.4'de buğday genotiplerinde belirlenen gen bölgelerinin tuz stresine maruz kaldıktan sonra gövdelerindeki gen ifade oranları ve Çizelge 4.5'te miRNA hedef genlerinin ifade oranları verilmiştir.

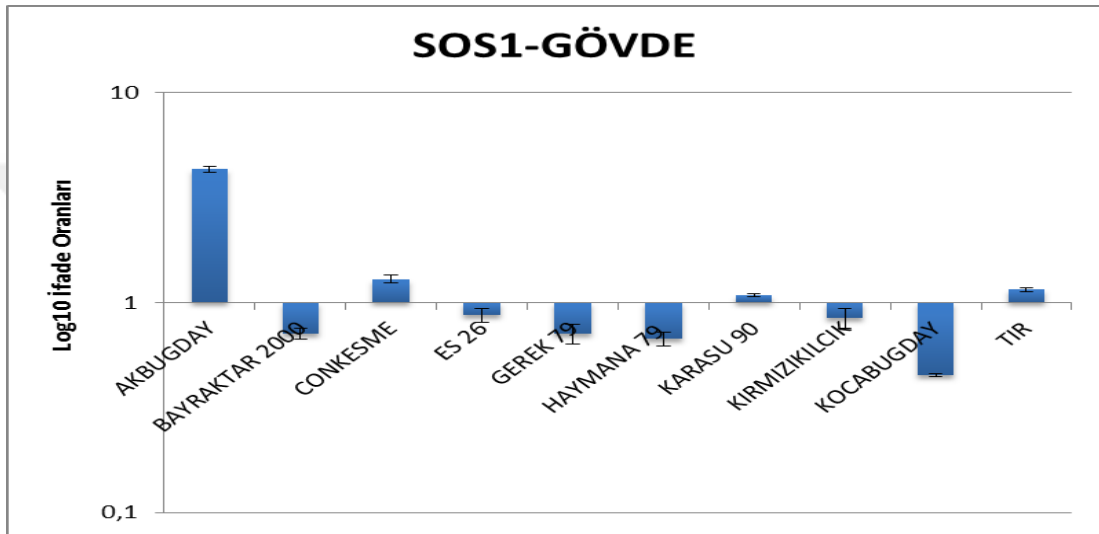
Çizelge 4.4. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki tolerans genlerinin ifade oranları

BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	SOS 1	SOD2	CIPK29	GRP	SAP1
	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma
AKBUĞDAY	4,318±0,131	0,818±0,035	1,026±0,032	-	0,900±0,018
BAYRAKTAR 2000	0,711±0,039	0,117±0,002	0,117±0,002	0,352±0,014	0,556±0,027
CONKESME	1,296±0,053	0,702±0,016	0,702±0,016	-	-
ES 26	0,872±0,067	0,804±0,026	0,804±0,026	0,095±0,010	0,394±0,015
GEREK 79	0,711±0,078	0,243±0,026	0,243±0,026	0,069±0,010	0,331±0,019
HAYMANA 79	0,673±0,049	0,254±0,003	0,254±0,003	-	-
KARASU 90	1,086±0,015	0,450±0,015	0,450±0,015	0,422±0,007	1,164±0,021
KIRMIZIKILÇIK	0,843±0,089	1,100±0,112	1,100±0,112	-	1,164±0,021
KOCABUĞDAY	0,451±0,007	0,163±0,002	0,163±0,002	-	-
MÜFİTBEY	1,151±0,025	0,658±0,021	0,658±0,021	0,242±0,002	0,828±0,040
TİR	4,318±0,131	0,241±0,007	0,241±0,007	0,532±0,024	-

Çizelge 4.5. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miRNA hedef genlerinin ifade oranları

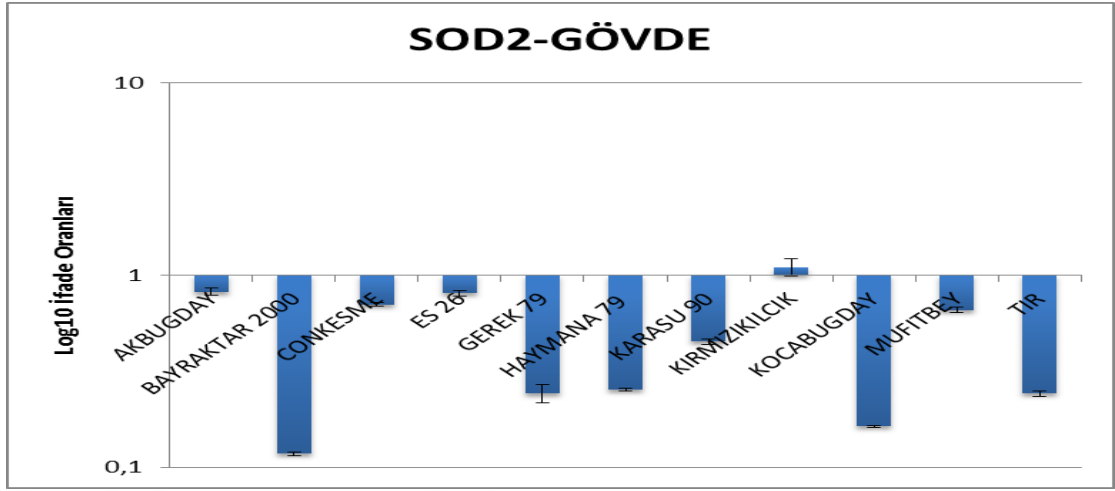
BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	miR156a SQUAMOSA promotör bağlama protein benzeri	miR482 Rab15B protein	miR172b AP2/EREBP transkripsiyon faktörü	miR6108f PI-4 proteaz inhibitor benzeri protein	miR5655 bHLH135-benzeri transkripsiyon faktörü	miR164 Got1/Sft2-like vezikül iletim protein ailesi izoform 1	miR159c 70 kDa HSP geni
	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma	İfade Oranları± Standart Sapma
AKBUĞDAY	8,627±0,395	562,904±126,062	14,080±0,969	5,974±4,486	1,467±0,043	0,321±0,006	2,876±0,178
BAYRAKTAR 2000	0,484±0,015	190,952±31,188	0,943±0,047	0,509±0,200	0,274±0,005	0,463±0,030	1,666±0,151
CONKESME	1,120±0,059	94,859±51,326	2,442±0,134	0,711±0,027	0,994±0,011	0,468±0,010	3,032±0,145
ES 26	0,616±0,011	273,905±72,027	0,834±0,014	0,586±0,012	0,883±0,033	0,706±0,040	1,783±0,176
GEREK 79	1,840±0,017	314,713±128,637	5,423±0,745	3,492±0,017	0,677±0,032	1,829±0,111	4,990±0,213
HAYMANA 79	0,957±0,012	16,354±17,391	3,784±0,520	1,685±0,217	3,951±0,502	0,381±0,050	10,204±1,405
KARASU 90	6,918±0,993	2023,418±223,095	5,702±0,747	0,662±0,055	5,234±0,184	1,606±0,023	2,596±0,308
KIRMIZI KILÇIK	1,907±0,011	498,660±268,151	1,924±0,134	2,027±0,078	0,861±0,022	0,771±0,049	7,977±0,567
KOCA BUĞDAY	1,536±0,133	3620,549±2472,02	1,773±0,085	0,608±0,044	2,229±0,140	1,763±0,136	1,763±0,136
MÜFİTBAY	0,166±0,007	14,857±6,340	0,376±0,033	0,266±0,010	1,135±0,079	1,984±0,064	7,232±0,269
TİR	1,735±0,051	368,016±63,260	2,767±0,286	1,272±0,033	1,002±0,023	0,321±0,006	4,315±0,873

Bu sonuçlara göre SOS1 geni gövde analiz sonuçlarında Akbuğday, Conkesme, Karasu 90 ve Tir genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Kocabuğday iken en fazla genin ifade edildiği genotip Akbuğday'dır. Ayrıca en düşük ifade seviyesine sahip genotip ile en yüksek ifade seviyesine sahip genotip arasında 4 kat ifade farklılığı meydana gelmiştir (Şekil 4.15).



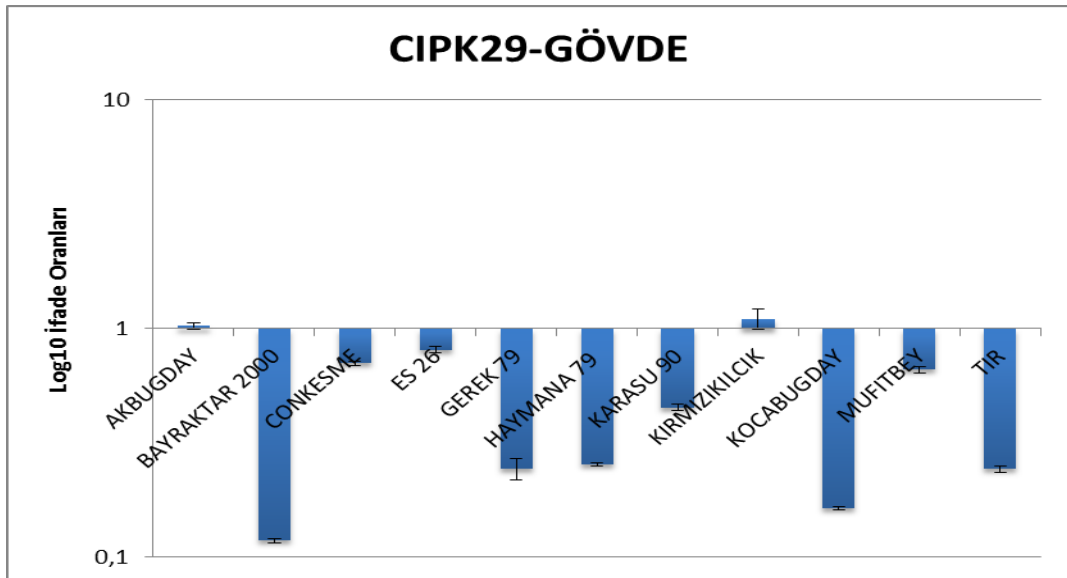
Şekil 4.15. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki SOS1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

SOD2 geni gövde analiz sonuçlarında sadece Kırmızıkilçık genotipi upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği Bayraktar 2000 genotipidir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte yaklaşık 2 kat ifade farklılığı meydana gelmiştir (Şekil 4.16).



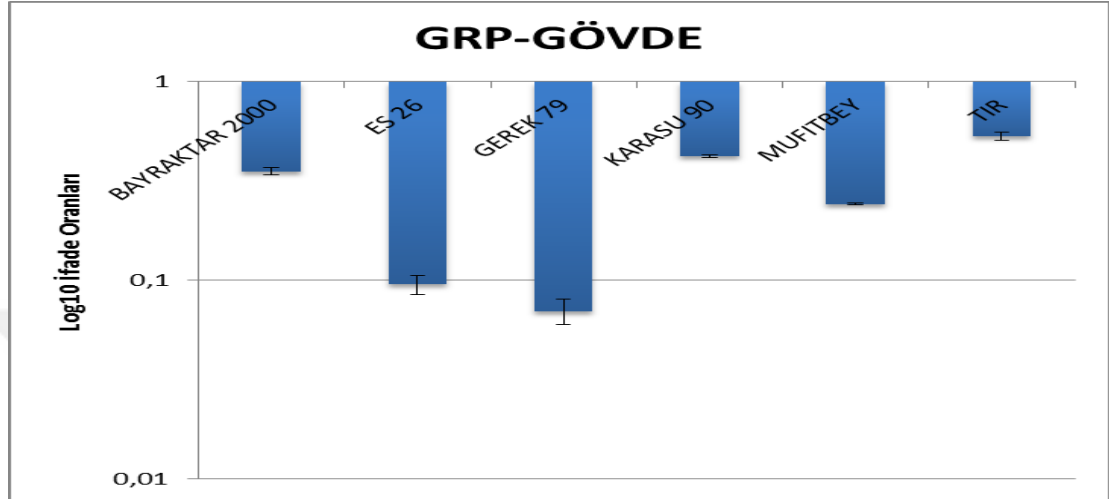
Şekil 4.16. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki SOD2 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

CIPK29 geni gövde analiz sonuçlarında sadece Kırmızıgül genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği Bayraktar 2000 genotipidir. En yüksek ifade seviyesine sahip genotip aklaşık 2 kat ifade farklılığı meydana gelmiştir (Şekil 4.17).



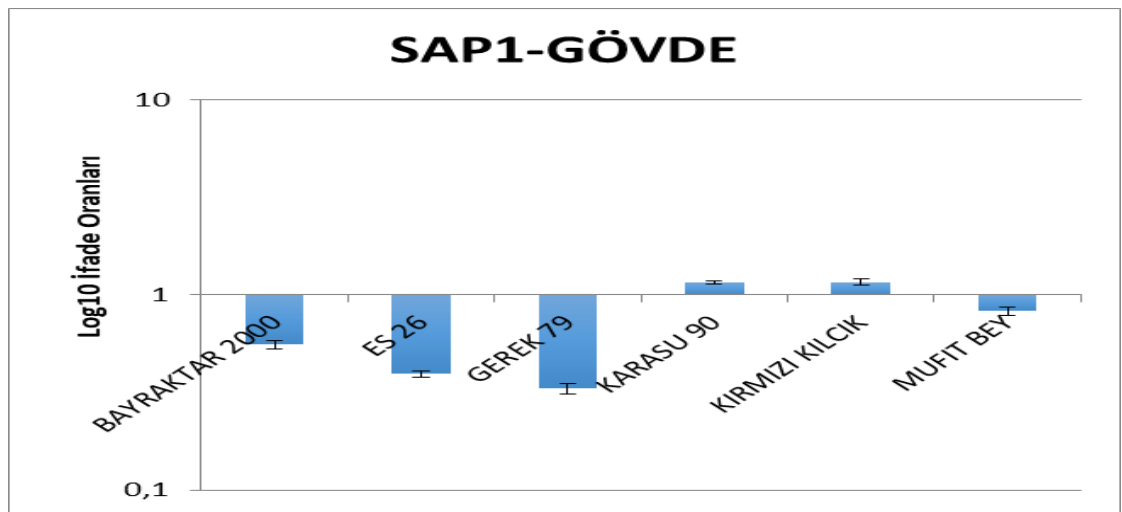
Şekil 4.17. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki CIPK29 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

GRP geni gövde analiz sonuçlarında tüm genotipler downregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Gerek 79'dur (Şekil 4.18).



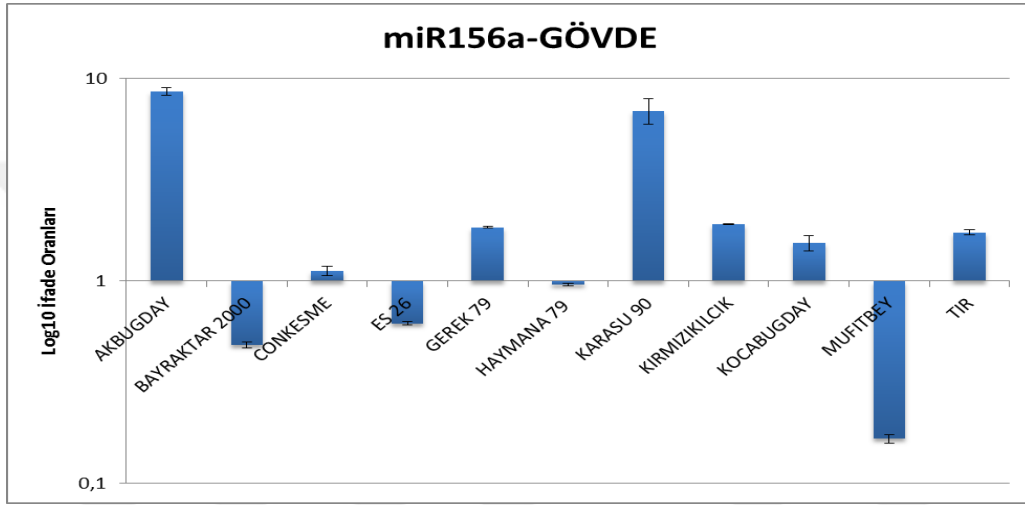
Şekil 4.18. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki GRP geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

SAP1 geni gövde analiz sonuçlarında sadece Karasu 90 ve Kırmızı Kılçık genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği Gerek 79 genotipidir. En yüksek ifade seviyesine sahip genotip yaklaşık 2 kat ifade farklılığı meydana gelmiştir (Şekil 4.19)



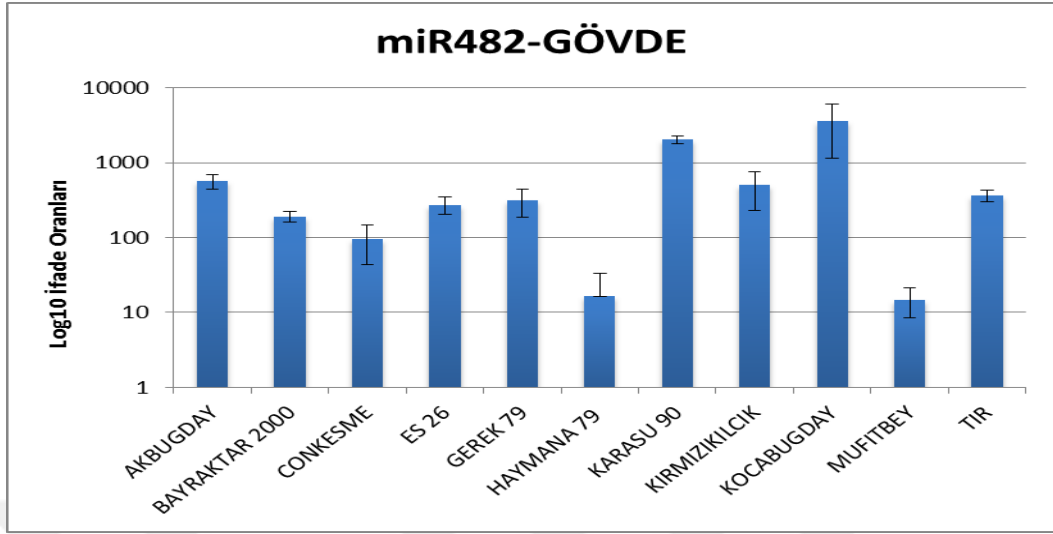
Şekil 4.19. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki SAP1 geninin ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR156a hedef geninin (AL810223.1) analiz sonuçlarında Akbuğday, Conkesme, Gerek 79, Karasu 90, Kırmızıgül, Kocabuğday ve Tir genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Müfitbey iken en fazla genin ifade edildiği genotip Akbuğday'dır. En yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 8 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.20).



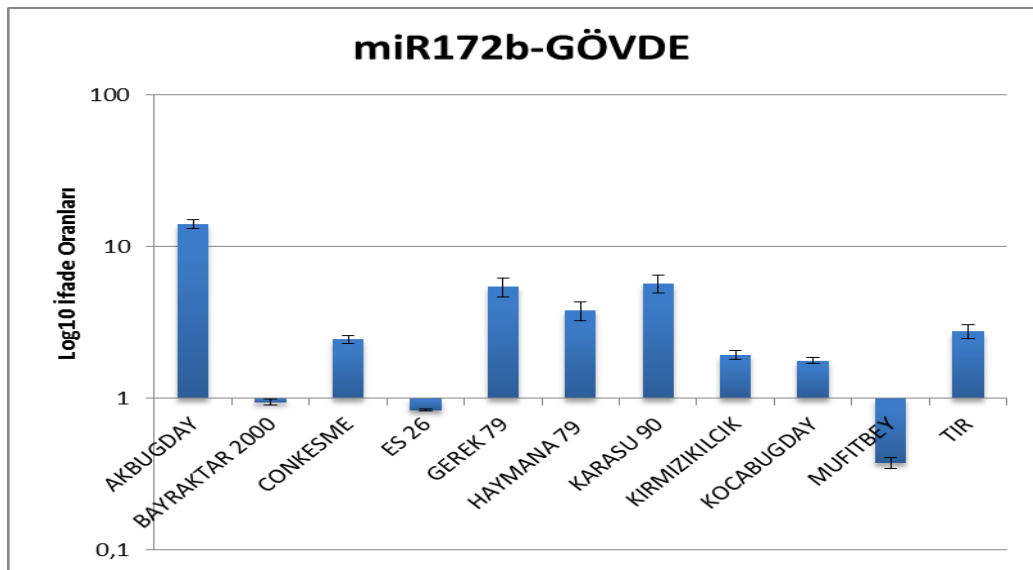
Şekil 4.20. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR156a hedef geninin (AL810223.1) ifade oranları (2^{-ΔΔCt})

miR482 hedef geninin (X62476.1) analiz sonuçlarında tüm genotipler upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Müfitbey iken en fazla genin ifade edildiği genotip Kocabuğday'dır. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 3620 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.21).



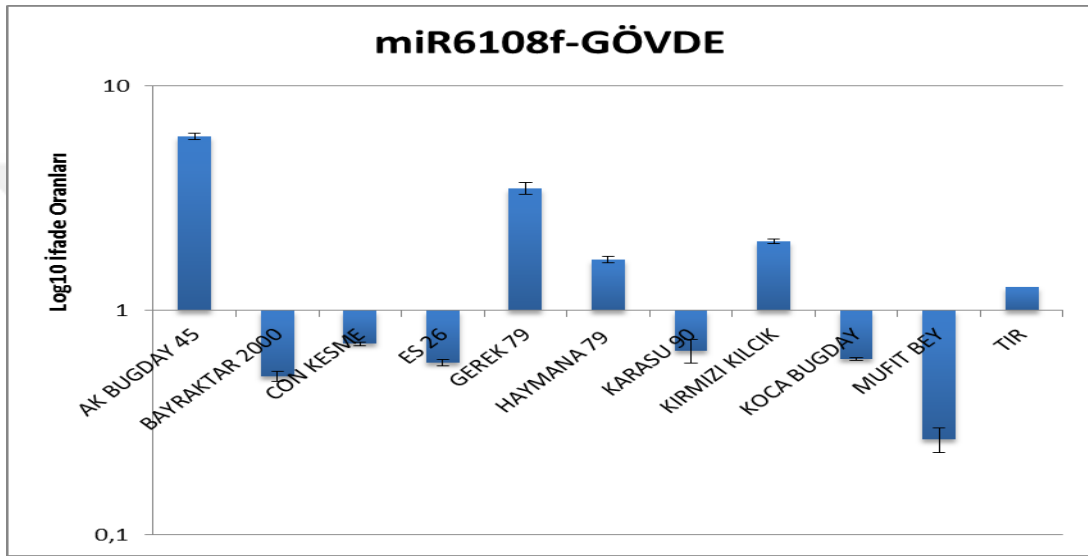
Şekil 4.21. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR482 hedef geninin (X62476.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR172b hedef geninin (DQ019639.1) analiz sonuçlarında Akbuğday, Conkesme, Gerek 79, Haymana 79, Karasu 90, Kırmızıkilçik, Kocabuğday ve Tir çeşitleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Müftibey iken en fazla genin ifade edildiği Akbuğday genotipidir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 14 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.22).



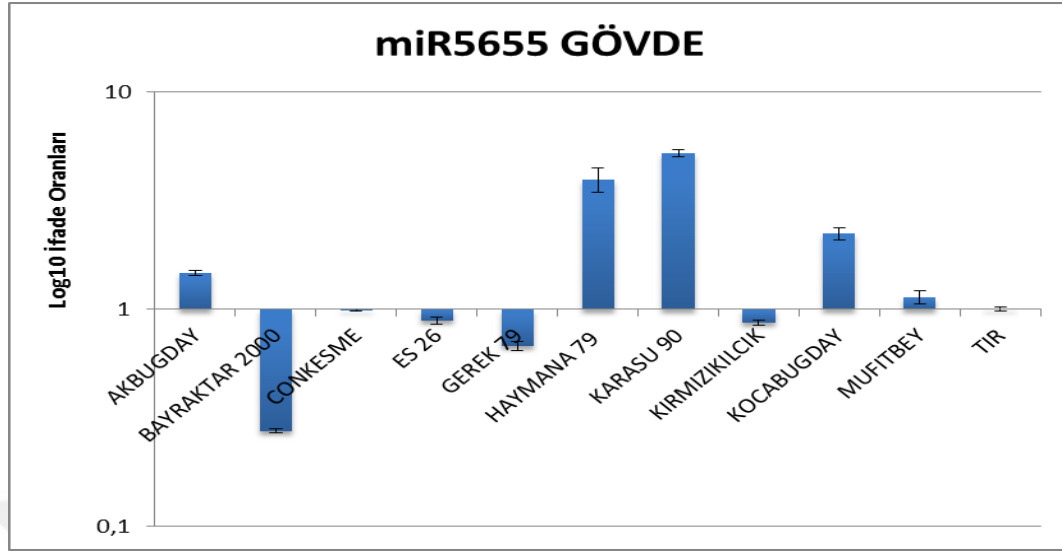
Şekil 4.22. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR172b hedef geninin (DQ019639.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR6108f hedef geninin (EU293133.1) analiz sonuçlarında Akbuğday, Gerek 79, Haymana 79, Kırmızı kılçık ve Tır genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Müfitbey iken en fazla genin ifade edildiği genotip Akbuğday'dır. En yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 5 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.23).



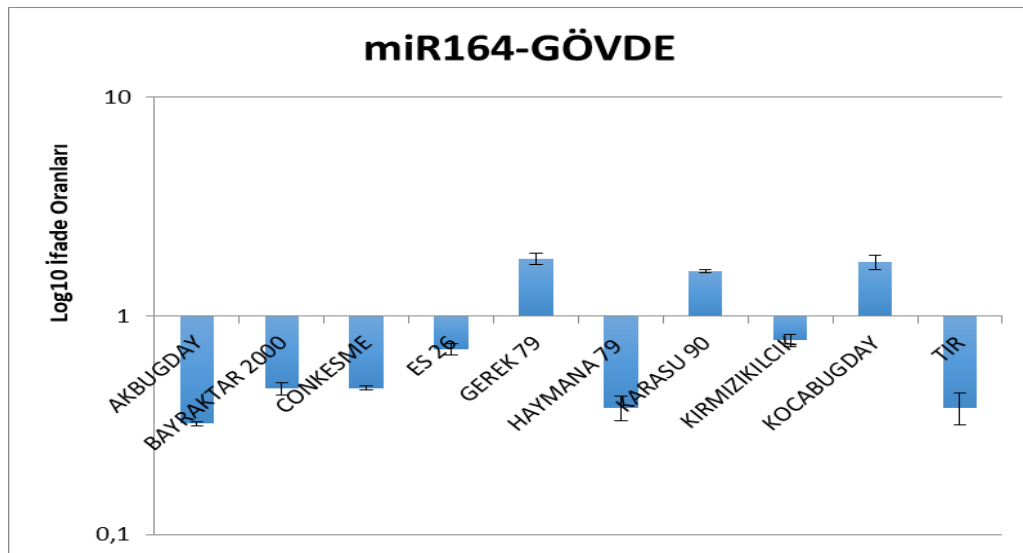
Şekil 4.23. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerin gövdelerindeki miR6108f hedef geninin (EU293133.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR5655 hedef geninin (DQ019636.1) analiz sonuçlarında Akbuğday, Haymana79, Karasu 90, Kocabuğday ve Müfitbey genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Bayraktar 2000 iken en fazla genin ifade edildiği Karasu 90 genotipidir. Ayrıca en yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 5 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.24).



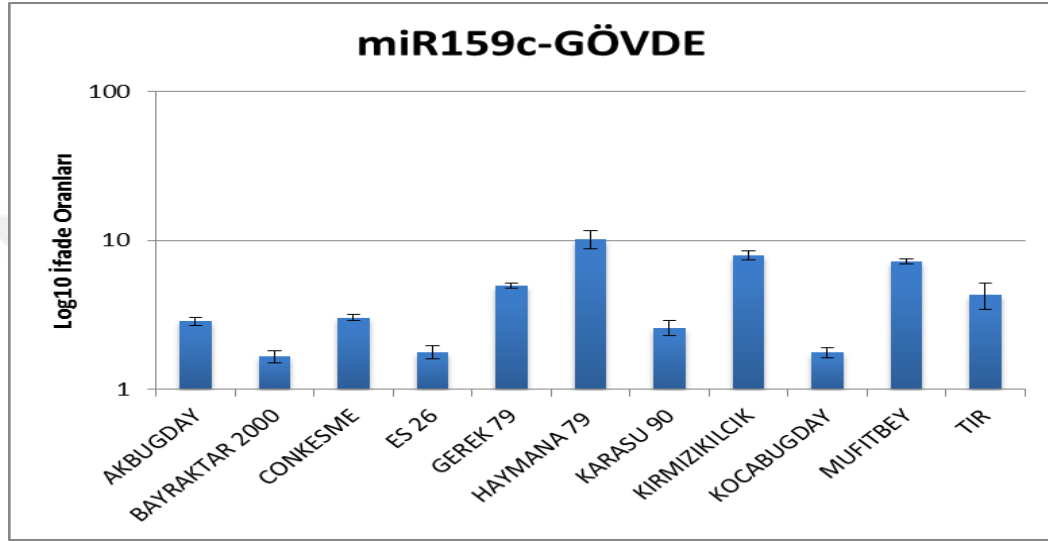
Şekil 4.24. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerin gövdelerindeki miR5655 hedef geninin (DQ019636.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR164 hedef geninin (AJ237942.1) analiz sonuçlarında Gerek 79, Karasu 90 ve Kocabuğday genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Akbuğday iken en fazla genin ifade edildiği Gerek 79 genotipidir. En yüksek ifade seviyesine sahip genotipte yaklaşık 2 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR164 hedef geninin (AJ237942.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

miR159c hedef geninin (AF005993.1) analiz sonuçlarında tüm buğday genotipleri upregüle olmuştur. En az genin ifade edildiği genotip Bayraktar 2000 iken en fazla genin ifade edildiği Haymana 79 genotiptir. En yüksek ifade seviyesine sahip genotipte 10 kat ifade oranı meydana gelmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinin gövdelerindeki miR159c hedef geninin (AF005993.1) ifade oranları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Gövdede yapılan gen ifadesi analiz sonuçlarına göre rank toplam değerleri hesaplanarak genotiplerin sıralamaları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan genlerin ifade seviyesi bakımından tuzluluğa en yüksek cevap veren genotip Akbuğday iken en az tolerans geliştiren genotip Bayraktar 2000 olarak belirlenmiştir. Çalışılan genlerin ifade seviyesi bakımından genotiplerin sıralaması Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. *Triticum aestivum* bitkisi genotiplerinde gövde analizine göre tuzluluğa toleranslılık yönünden gruplandırılması

BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	RANK ORTALAMASI	RANK STANDART SAPMASI	RANK TOPLAMI	RANK SIRASI
AKBUĞDAY	4,1	3,8	7,9	1
KARASU 90	4,8	3,3	8,0	2
KIRMIZIKILÇIK	4,7	3,4	8,1	3
GEREK 79	5,7	2,7	8,3	4
ES 26	6,8	2,3	9,1	5
TİR	6,0	3,3	9,3	6
CONKESME	6,9	2,9	9,8	7
MÜFİTBEY	6,3	3,7	9,9	8
KOCABUĞDAY	6,9	4,0	10,9	9
HAYMANA 79	7,3	3,7	11,1	10
BAYRAKTAR 2000	8,8	2,6	11,3	11

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Toprak tuzluluğu, insan nüfusunun artması ile tarım kapasitesini tehlikeye atan ve tarımsal ürünlerin üretimini sınırlandıran abiyotik bir stres faktörüdür. Tuz stresi hücre bölünmesinin azalması, membran hasarı, metabolik süreçlerin modifikasyonu, oksidatif stres, fizyolojik kuraklık, besinsel bozukluklar, iyon toksisitesi gibi pekçok yolla bitkileri etkilemektedir. Tuzluluk stresinin osmotik etkileri tuz uygulamasından sonra hemen gözlemlenmektedir (Izadi Darbandi and Bahmani 2011; Roy and Sengupta 2014; Bahmani *et al.* 2015).

Tuzluluk stresi, tuz stresine hassas tahıllardan biri olan buğdayın tane verimi ve protein içeriği üzerine olumsuz bir etkiye sahiptir (Houshmand *et al.* 2014). Buğdayda, tuz stresi şiddetine bağlı olarak %50 oranına kadar verimde azalmaya yol açmaktadır. Çalışmamızda tuz stresi uyguladığımız tüm buğday genotiplerinde çimlenme oranında gözle görülebilir bir azalmaya ve çimlenme süresinde ise uzamaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum hem tüm bitkide hem de hücrese seviyelerde gerçekleşen biyokimyasal ve moleküler süreçler tarafından etkilenen kompleks multigenik bir özelliktir (Sairam *et al.* 2002; Cuartero *et al.* 2006).

Modern moleküler biyoloji tekniklerinin ilerlemesi ile tuz stresine bitkilerin cevapları daha iyi anlaşılmakta ve bitki transformasyonu gibi genetik yaklaşımlar bitki tuz toleransındaki çalışmaların ilerlemesini sağlamaktadır. Hücrelerde çeşitli süreçlerin mekanizmaları fonksiyonel bir şekilde bağlantılı ve yakından ilişkilendirilmiştir. Çeşitli sinyal faktörleri birbirleri ile bağlantılı olup, çoklu stres faktörleri ve koşullarına cevap mekanizmalarına ait çalışmalarda farklı süreçlerin çalışma ağlarının varlığını kanıtlamıştır (Goyal *et al.* 2016). Bitkilerin de içinde bulunduğu çeşitli organizmalarda çoklu stres şartlarında bütünleşmiş tek cevabı oluşturmak için farklı yollar arasındaki iletişimler yaygın bir durum olarak gelişmektedir (Buyuk *et al.* 2016). Bu stres faktörlerine cevapta fonksiyonel olan çeşitli genler upregüle olarak stresin etkilerini azaltabilir, bitki toleransı ve hücrese çevrenin düzenlenmesine yol açabilirler. Birbirleri ile etkileşime giren bu stres sinyallerine cevapta doğa onları tolere etmek ve savaşmak

için farklı yollar geliştirmiştir. Bu yollar stresi hafifletmekle ilişkili aktivite göstermektedirler. Toleranslı bitkilerin, duyarlı bitkilerde bulunmayan bazı stres-cevap genlerine sahip olabildikleri düşünülmektedir. Sistematik genetik analizler ile stres cevap genleri kombine edildiğinde genom seviyesinde stres toleransına neden olan sinyal ağlarının çoğuna ulaşılmaktadır. Munns 2005, tuz toleransını artıran genleri 1) Tuz alımı ve iletimini kontrol edenler 2) Osmotik veya koruyucu bir fonksiyona sahip olanlar 3) Oldukça tuzlu topraklarda büyüyen bir bitki oluşturanlar olarak 3 ana grupta rapor etmiştir.

Tuzluluk stresi altında iyon dengesinin moleküler temeli *Arabidopsis sos* mutantlarında yapılan çalışmada açıklanmıştır (Zhu 2003). Tuzluluk toleransındaki en önemli mekanizma iyonların dışa çıkarma sistemleri ve Na^+ 'un seçimli alınımı ile sitozollere Na^+ iyonlarının girişinin sınırlandırılması şeklinde olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizma Salt Overly Sensitive (SOS) yoluyla gerçekleşmektedir. SOS yolu kök-toprak arasında Na^+ ve K^+ dengesinin ve köklerden gövdeye uzun mesafeli Na^+ iletiminin düzenlenmesini kapsamaktadır. SOS yolunun en önemli proteini SOS1'dir. Bu nedenle tuzluluk toleransı ile ilgili yapılan çalışmalarda SOS1 özellikle incelenmiştir (Davenport *et al.* 2005; Olias *et al.* 2009; Oh *et al.* 2009). Aktive olan SOS1 sitozolden kök dokuların apoplastına Na^+ 'u dışarı pompalamaktadır. SOS1 yapraklardan floeme Na^+ taşınımına yardımcı olmakta ve ondan sonra dışarı atım için köklere boşaltılmasını sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada SOS1 geninin Akbuğday, Conkesme, Karasu 90, Tir, Kırmızıkalçık ve Müfitbey buğday genotiplerinde upregüle olduğu gözlemlenmiştir. Kök dokularında elde edilen bulgularımızda gövde dokularına göre hem daha fazla genotipte hem de genotiplerdeki gen ifadesi ortalamalarına göre daha fazla upregüle olmuştur. Bu durum SOS1 geninin kök dokularında daha aktif olduğunu göstermektedir. Pek çok çalışmada da SOS1 geninin kök dokularında ifadesinin fazla olduğu rapor edilmiştir. Sathee *et al.* (2015), tuzluluk toleransında SOS1, SOS2 ve SOS3 genlerinin ifadesini ekmeklik buğdayın yaprak ve köklerinde çalışmıştır. Toleranslı ve duyarlı genotiplerin yaprak dokusunda SOS1 geninin ekspresyonu tuzlulukla uyarıldığını göstermiştir. Ancak, kök dokularında SOS yolu genlerinin upregülasyonunun çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, aynı çalışmada

toleranslı genotiplerin kök dokularında tuzluluk seviyesindeki artışa bağlı olarak SOS1 geninin upregülasyonun da arttığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, duyarlı genotipler ile karşılaştırıldığında toleranslı genotiplerde SOS1'in daha yüksek ifade olmasının nedenini kök apoplastına toksik Na^+ 'un çıkarılmasını kolaylaştırılmasından kaynaklandığı ile açıklamışlardır.

Transgenik *Arabidopsis*'te Na^+/H^+ antiporteri olan SOS1'in plazma membranındaki aşırı ifadesi toleransı artırmıştır. Ayrıca 100 mM NaCl uygulanan köklerin daha hızlı bir şekilde büyüdüğü ve 200 mM NaCl'de 5 gün maruz kalan bitkilerin de büyüme yüzdesi %17'den %43'e çıkmıştır. Bu durumun Na^+ alımının bitkiler tarafından %50 oranında azaltıldığından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Shi *et al.* 2003b). Yine ekmeklik buğdayda varsayılan SOS1 geni Na^+/H^+ değişim aktivitesini ve mayaların tuzluluk toleransını yükseltmiştir (Xu *et al.* 2008). Benzer şekilde, durum buğdayındaki SOS1 proteini *Arabidopsis* ve mayada Na^+/H^+ antiporterine etkili bir şekilde yardımcı olmuştur (Feki *et al.* 2011, 2014). Çalışmamızda bu genin upregüle olduğu Akbuğday, Conkesme, Karasu 90, Tir, Kırmızıgül ve Müfitbey genotiplerde yukarıda bahsedilen tolerans mekanizmalarına sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan SOD2 geni buğday bitkisinin köklerinde Conkesme, Müfitbey ve Tir genotiplerinde upregüle olduğu gövdede ise sadece Kırmızıgül genotipinde upregüle olduğu diğer genotiplerde downregüle olduğu ve en fazla Bayraktar 2000'de downregülasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu gen bakımından en yüksek ifade oranı toleranslı genotiplerden Kırmızıgül'da belirlenmiştir. MnSOD'un tuz stresi, manganez toksisitesine, soğuk ve kuraklık streslerine pozitif bir şekilde cevap verdiği rapor edilmiştir (Gonzalez *et al.* 1998; Wu *et al.* 1999; Lee and Lee 2000). Stres karşısında Fe-SOD enziminde artış meydana geldiğinde Cu-Zn SOD II'de azalma olduğu ve bunun nedeninin hücrelerarası sinyal yollarına SOD'ların katılmasıdır (Gomez *et al.* 1999). SOD'ların aşırı ekspresyonu spesifik streslere karşı bitkinin korumasına yol açmaktadır (Alscher *et al.* 2002). Buğday genotiplerinde köklerinde yaptığımız analizlerde SOD2 geninin bazı çeşitlerde upregüle olurken bazı çeşitlerde yüksek oranda downregüle olduğu gözlemlenmiştir. Bitkilerde SOD'ların ve diğer ROT

temizleyici enzimlerin aşırı ekspresyonunun stres toleransını artırdığı bilinmektedir. Ancak ROT uzaklaştırma yollarının oldukça karmaşık bir mekanizmaya sahip oldu görülmüştür. Bu nedenle, tuz stresine dirençli bitkilerin meydana gelmesinde hem başarılı hem başarısız sonuçlar elde edilmiştir (Slooten *et al.* 1995; Van Camp *et al.* 1996; Sairam and Tyagi 2004). Bu sonuçlarla çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Bitkilerde Ca^{+2} çeşitli hücrel ve gelişimsel süreçleri düzenlemede, biyotik ve abiyotik streslere cevapta oluşan çeşitli sinyal iletim yollarını aktive etmektedir (Kim *et al.* 2003; Ludwig *et al.* 2005). Bitkilerde pek çok kalsiyum duyarlı protein kinazların stres yanıtlarında rol aldıkları rapor edilmiştir (Chandran *et al.* 2006; Mori *et al.* 2006). *Arabidopsis*'te bu protein kinazlar kalsiyum bağımlı protein kinazlar ve Suc non-fermantation-related kinazlar (SnRK'lar) olarak gruplandırılmaktadır (Xiang *et al.* 2007). AtCBL/SOS3 benzeri kalsiyum bağlı proteinler (SCaBP'ler) ile ilişkili SOS2 benzeri protein kinazlar veya CIPK (Calcineurin B-like (CBL) proteinleri ile etkileşimli protein kinaz denilen SnRK3 subfamilya kapsayan 38 SnRK'lar bulunmaktadır (Kolukısaoglu *et al.* 2004; Mahajan *et al.* 2006). Bu bilgiler ışığında kurgulanan çalışmamızda buğday çeşitlerinin köklerinde çalışılan CIPK29 geni en fazla downregülasyonun Haymana 79 genotipinde olduğu gözlemlenmiştir. Yine buğday genotiplerinin gövdelerinde yapılan analizde ise en fazla upregülasyonun Kırmızıgül'de ifade edildiği belirlenmiştir. Ayrıca kök ve gövdelerdeki analizlerde en fazla Müfitbey genotipinde gözlemlenmiştir. Kökteki analizlerde ise Müfitbey, Tir ve Conkesme genotiplerinde upregülasyon elde edilmiştir.

Deng *et al.* 2013, buğdayda TaCIPK14 olarak tasarlanan CIPK genini tütün bitkisine aktarmış, bu genin aşırı ifade ettirildiği transgenik tütün soğuk ve tuz stresine karşı tolerans göstermiş ve kuraklık stresine nispeten tuz stresinde daha fazla tolerans göstermiştir.

Arabidopsis'te yapılan çalışmada CIPK14 geninin T-DNA insersiyonu ile susturulması sonucunda ABA ve tuz streslerine duyarlılığını arttırdığı rapor edilmiştir (Qin *et al.* 2008).

Bu bulgular, CIPK geninin aşırı ifade edilmesi K^+/Na^+ oranını yükselterek abiyotik streslere özellikle tuz stres toleransını artırdığı düşünülmektedir (Yang *et al.* 2009). Ayrıca CIPK geninin ROT'lar ile ilişkisi de çalışılmıştır. Tuzluluk stresi altındaki bitkide hücre ölümü ve membran yıkımına sebep olan ve hücrelere toksik olan aşırı ROT üretimi gerçekleşmektedir (Gouiaa *et al.* 2012). Tuz stresi altında hücresel membranların bütünlüğünün bozulduğu ve çeşitli enzimlerin aktivitelerinin hasarına neden olduğu bilinmektedir. TaCIPK14'ün aşırı ekspresyonu membran hasarını ve ROT birikimini azalttığı için antioksidant sistemi uyarmaktadır. Bu yolla stres ve savunma ile ilgili genlerin ekspresyonunun soğuk ve tuz stres toleransını yükselttiği rapor edilmiştir (Deng *et al.* 2013). Çalışmamızda gerek CIPK29 geninin gerekse SOD2 geninin gövdede ve kökte aynı genotiplerde downregüle olması Karasu 90, Haymana 79, Bayraktar 2000, Es 26, Kocabuğday ve Gerek 79 genotiplerinde antioksidant savunma sisteminin ROT birikimine engel olmadığı ve direnç sağlayamadığını düşündürmektedir. Ayrıca ABA-bağımsız yolların osmotik strese cevap oluşturduğu ve CIPK geninin ABA-bağımsız yollarında görev aldığı bilinmektedir (Mahajan *et al.* 2006).

Farklı çevresel sinyallere bitkilerin cevaplarında RNA bağlama protein (RBP)'lerin katılması sürekli olarak araştırılmaktadır (Sachetto-Martins 2000; Lorković 2009; Mangeon *et al.* 2010). Özellikle RBP'lerin işlevsel rolleri ve strese-duyarlı ekspresyonlarda rol alan GRP'ler farklı çevresel koşullar altında *Arabidopsis*, çeltik, arpa, buğday ve lahanada araştırılmıştır. Çeltikte düşük sıcaklık altında tohum çimlenmesini ve fidelerin büyümesini, *Arabidopsis*'te ise donma toleransını teşvik ettiği rapor edilmiştir (Kwak *et al.* 2005; Kim *et al.* 2010a). Bu çalışmalar GRP'lerin belirli aile üyelerinin bitkinin abiyotik streslere cevaplarında önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Çalışmamızda buğday genotiplerinin köklerinde yapılan analizlerde sadece Conkesme, Müfitbey ve Tir genotiplerinde upregülasyon meydana gelmiştir. Gövdelerde ise tüm genotiplerde downregülasyon gözlemlenmiştir. GRP geninin en az ifade edildiği çeşit Haymana 79 iken en yüksek Tir olmuştur. Transgenik *Arabidopsis* bitkisinde GRP7 geninin fonksiyonel rolleri tuzluluk, kuraklık ve soğuk stresleri altında stres toleransı, tohum çimlenmesi ve fide büyümesi süreçlerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada GRP7 geninin aşırı ifadesi tuzluluk stresi altında fide büyümesini azalttığı ve

tohum çimlenmesinin gecikmesine neden olduğu gözlemlenmiştir. Bunun aksine soğuk stresi altında ise bitkiye tolerans kazandırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca, koruyucu hücrelerde aşırı miktarda ifade edildiği ve stres koşullarında stomaların açılıp kapanmasını etkilediği gösterilmiştir (Kim *et al.* 2008a). Çeltikte ise soğuk stresi altında altı GRP geninin fonksiyonel rolleri incelenmiştir. Bu altı gen arasından GRP1, GRP4 ve GRP6 genlerinin soğuğa duyarlı oldukları görülmüştür. GRP1 ve GRP4 genleri *Arabidopsis grp7* mutant bitkisinin soğuk stresinde büyümesini artırmıştır ve GRP6 geni, GRP7 geninin ifadesini bastırarak bu mutant bitkide soğuk toleransı kazandırmıştır. Ayrıca, GRP4 ve GRP6 genleri *grp7* mutantında çekirdekten sitoplazmaya mRNA geçiş kusurunu düzeltmiştir (Kim *et al.* 2010b). *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada RNP'lerin bir grubu olan AtRH9 ve AtRH25 genlerinin aşırı ekspresyonu yüksek tuz koşulları altında tohum çimlenmesini geciktirmiştir, oysaki AtRH25 ekspresyonu soğuk toleransını artırmıştır (Kim *et al.* 2008b).

Bazı GRP gruplarının farklı alt hücrel lokalizasyonu ile birlikte görev alan GRP genlerinin yüksek çeşitliliği ve çok spesifik ekspresyonu bu proteinlerin farklı bağımsız fizyolojik süreçlerle ilişkili olduğunu açıkça göstermektedir (Magioli *et al.* 2001; Franco *et al.* 2002). WAK kinazlar hücre duvarı moleküllerinin ve çeşitli hücrelerarası domainlerin etkileşim yoluyla farklı çevresel sinyalleri tanıdığı ve bu sinyalleri hücrenin içine ilettiği önerilmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmada, AtGRP-3 salisilik asit uygulaması ile uyarılmıştır. Dışarıdan aktarılan AtGRP-3, *Arabidopsis* protoplastlarında WAK1 ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. Bu veriler AtGRP-3'ün WAK1'in hücre duvarı domainine bağlanarak WAK1 fonksiyonunu düzenlediği ve WAK1'in AtGRP-3 ile etkileşimi bitkide patojenlerle ilgili süreçleri etkilediği gözlemlenmiştir (Park *et al.* 2001). Vasküler dokularda bulunan GRP'lerin vasküler gelişme esnasında elastikiyet ve gerilme koşullarında rol aldığı düşünülmektedir ve bu süreç esnasında odunsu kısmın kalitesiyle ilgili özelliklerin çoğu hücre duvarının özellikleriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Showalter 1993).

Diğer taraftan, RBP ailesine mensup DEAD-box RH'lar ise RNA moleküllerinde ikincil yapıların çözülmesini katalize ettiği ve böylece canlı organizmalarda RNA

metabolizmasını etkiledikleri bildirilmiştir (Jankowsky, 2011). Ökalyptus'ta yapılan bir çalışmada RNA bağlayıcı GRP'leri kodlayan 27 ökalyptus dizisi belirlenmiş ve domainlerin yapısal düzenine göre sınıflandırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda RNA bağlayıcı proteinlerin dizilerinden bazılarının aynı genin alternatif susturma formlarına karşılık geldiği bildirilmiştir (Bocca *et al.* 2005).

Bu gen ailesinin bitkilere uygulanan abiyotik streslere cevapların genellikle yapraklarda cevap verdiği ve upregülasyon oluşturduğu bilinmektedir (Ciuzan *et al.* 2015). Ancak, araştırmamızda bu bilgilerin aksine tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde GRP geninin ifadesinin değişmemiş ve bunun muhtemel nedeni bu genin buğdayda stres altında görev almamış olabileceğini düşündürmektedir.

Bitkilerde ilk stresle ilişkili protein 1 (SAP1; A20/AN1 ZFP) çeltikte belirlenmiştir. SAP1 herhangi bir tipik nükleer lokalizasyon sinyalinden yoksun olduğu için bir transkripsiyon faktörü olmadığı düşünülmektedir (Tyagi *et al.* 2014). Ancak, protein-protein etkileşimiyle birlikte transkripsiyon faktörü olarak kullanılabilir. Mevcut çalışmada tuz stresine tepki olarak SAP1 geninin köklerde Tir, gövdede Karasu 90 genotiplerinde en yüksek upregülasyon göstermiştir. Genellikle köklerde ifade edildiği öne sürülen SAP1 geni çalışmamızda da gövdede tek bir genotipte, kökte ise Bayraktar 2000, Tir ve Kırmızıgül genotiplerinde ifade edilmiştir. SAP1 gen ifadesinin soğuk, kuraklık, tuz, ağır metal, ABA, yaralanmalar ve biyotik gibi birçok stres faktörleri tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (Mukhopadhyay *et al.* 2004; Vij *et al.* 2006; Jin *et al.* 2007; Kanneganti and Gupta 2008; Tyagi *et al.* 2014). Ayrıca SAP'ları içeren A20/AN1 çinko-parmak kodlayan 18 ve 14 gen sırasıyla çeltik ve *Arabidopsis*'te tespit edilmiştir. Çeltikte SAP geninin qRT-PCR temelli analizi ile tüm genlerin abiyotik stres uygulamaları tarafından uyarılabildiği ortaya konmuştur (Vij and Tyagi 2006). Çeltik ve diğer bitkilerdeki transgenik çalışmalarda SAP'ların abiyotik stres toleransı kazandırdığı ve bitki-verim kaybını koruduğu gösterilmiştir (Ben *et al.* 2012; Charrier *et al.* 2012; Sreedharan *et al.* 2012). Bu çalışmalarda, SAP'ların bitkilerdeki stres sırasında ubiquitin ligazı, redoks sensörü ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alabileceği önerilmiştir (Giri *et al.* 2013).

Diğer taraftan salisilik asit, jasmonik asit, H_2O_2 gibi moleküllerin SAP geninin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Mei *et al.* 2006; Iwai *et al.* 2007). Bu bilgiler bitkilerde ROT oluşumuna karşı toleransın artırılmasında SAP'ların rolü olduğunu düşündürmektedir. Çeltikte yapılan çalışmalarda salisilik asite cevap veren 10 SAP geninden 8'i strese cevap oluşturduğu, yine hem salisilik asit hem de jasmonik asit birikiminin çeltikte *M. Grisea*'ya direnç kazandırdığı bildirilmiştir (Mei *et al.* 2006; Iwai *et al.* 2007).

SAP1 geninin ekspresyon düzeyinin stres süresine ve genotipinin toleransına bağlı olarak değişebileceği ifade edilmiştir. Pokkali (tuza toleranslı) ve IR24 (tuza duyarlı) olmak üzere iki çeltik çeşidinde tuz stresinden sonra gen ekspresyon profilleri açısından karşılaştırılmış ve genlerin down veya up regülasyon olduğu bulunmuştur. İki çeşit arasındaki farkın aynı genin ekspresyon zamanlamasındaki farklılığından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Tuz stresi uygulamasından sonraki 15 dakikada Pokkali'deki ekspresyon profili IR24'ün 1 saat sonraki profiline benzer olduğu gözlemlenmiştir (Kawasaki *et al.* 2001). Araştırmamızda bitkiler uzun süreli tuz stresine maruz bırakılmış köklerde Bayraktar 2000, Tir ve Kırmızıgül genotiplerinde kayda değer upregülasyon gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar yukarıda belirtilen bulguların aksine bu genin daha çok toleranslı genotiplerde ifade edildiğini göstermektedir. Bu bulgular arasındaki farklılığın muhtemel nedeni kullanılan türlerin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Araştırmamızda bu genin ifadesi bakımından yüksek olan Tir, Bayraktar 2000 ve Kırmızıgül genotiplerinin aynı zamanda ön çalışmada toleranslı ilk beş genotip içerisinde yer alması bu genin daha çok erken dönemdeki tuz toleransında görev alabileceğini göstermiştir. Nitekim stres ve normal koşullar altında transgenik tütünde yapılan çalışmada transgenik tütünlerin taze ağırlığı, yeşil rengin devamlılığı, yaprak gelişimi ve çimlenme oranlarının çok daha iyi olduğu bulunmuştur (Mukhopadhyay *et al.* 2004). Bunlara rağmen SAP1'in bitki yanıtını hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı düzenlediği mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır.

Stres şartlarına bağlı olarak hedef genlerin ifadelerinin değişmesinde doğrudan miRNA yani miR genlerinin rol oynadığı bilinmektedir (Lui 2002). miR156a hedef geni analiz

edildiğinde köklerde Karasu 90, Kırmızıgül, Gerek 79, Haymana 79, Müfitbey, Tır ve Bayraktar 2000 genotiplerinde, gövdede ise Akbuğday, Karasu 90, Kırmızıgül, Gerek 79, Tır, Kocabuğday ve Conkesme genotiplerinde upregüle olmuştur. Diğer genotiplerde downregülasyon göstermiştir. miR156a hedef geni SQUAMOSA promotör bağlama proteini benzeri (SPL) genleridir. SPL genleri bakır ve fungal toksisiteye cevap oluşturan, sporogenesis, giberellin sinyalizasyonu, çiçek ve meyve oluşumu gibi bitki büyüme ve gelişme süreçlerinde rol oynayan bitkiye özel transkripsiyon faktörüdür. *Arabidopsis*'te birçok SPL geni miR156 tarafından post-transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir. Olgun yaprak gelişmesine ve bitki gelişimine katkıda bulunmaktadır. Yüksek oranda korunan DNA-bağlama proteini içerirler (Chen *et al.* 2010). *Arabidopsis*'te SPL7 miR398'in cis-elementine doğrudan bağlanır ve düşük bakır koşullarında miR398'in ekspresyonunu aktive etmiştir. Ayrıca SPL7'nin ifadesinde çoklu miRNA'lar miR397, miR408 ve miR857 rol oynamıştır (Yamasaki *et al.* 2009). *Arabidopsis*'te SPL14 geninin miR156 hedef bölgesinden yoksun olmasına rağmen vejetatif faz değişiminde ve çiçeklenme dönemine geçişte negatif bir regülatör olarak görev almıştır ve bu durum yeni düzenleyici yolların varlığını ortaya koymuştur (Stone *et al.* 2005). Bu genin kök analizlerimiz sonucunda belirlediğimiz toleranslı genotipler fizyolojik ve gen ifade analizlerinde belirlenen toleranslı genotiplerdir. Gövdede belirlediğimiz toleranslı genotipler ise gen ifade analizleri sonuçları ile örtüşmektedir, ancak fizyolojik çalışma ile bağdaşmamaktadır. Bu durum bu genin ifadesinde yukarıda açıklandığı gibi farklı miRNA'ların etkilediğinin kanıtı olduğunu düşünebiliriz.

Yaptığımız çalışmada kök ve gövde analizlerinde miR482'nin hedef genin tüm genotiplerde upregülasyon olduğu gözlemlenmiştir. Kök analizlerinde 1 ila 3190 kat upregüle olurken, gövde analizlerinde 14 ila 3620 kat oranında upregülasyon göstermiştir. miR482'nin hedef geni olarak Rab15B ve fonksiyonu olarak ise streslere karşı direnç proteini olarak gösterilmiştir (Eren *et al.* 2015). Bu hedef geni glisince zengin RNA bağlanma gen ailesine mensuptur. Bu ailenin çeşitli abiyotik streslere cevap oluşturmada rol aldığı pek çok çalışmada bildirilmiştir (Kwak *et al.* 2005; Kim *et al.* 2010a; Jankowsky, 2011). Araştırmamızda da tuz toleransında bu genin etkin bir görev aldığı belirlenmiştir. Bu genin kökteki ifadesi bakımından yüksek olan Karasu 90,

Tir ve Haymana 79 genotiplerinin ön çalışmada da toleranslı genotipler içerisinde yer alması bu genin tuzluluk toleransında önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Benzer olarak Eren *et al.* 2015 toleranslı genotiplerde bu genin upregüle olduğunu bildirmiştir.

miR172b hedef geni kök analizlerinde Karasu 90, Gerek 79, Tir, Bayraktar 2000, Müfitbey, Kırmızıgül, Akbuğday ve Es26 genotiplerinde upregüle olmuştur. Gövde analizleri sonucunda ise Akbuğday, Karasu 90, Gerek 79, Haymana 79, Conkesme, Tir, Kırmızıgül ve Kocabuğday genotiplerinde upregülasyon göstermiştir. miR172b hedef geni APETALA 2/etilen cevap faktörü (AP2/ERF) olarak adlandırılır. Stres koşulları altında etilen sinyal yolağının düzenlenmesi, farklı ailelerde stresle ilişkili genlerin ekspresyonunun up veya down regülasyonuna neden olur. Çeltikte AP2/ERF stres cevap yollarında işlev gördüğü düşünülen bir transkripsiyon faktörüdür (Abiri *et al.* 2016). Farklı monokotiledon ve dikotiledon türlerde kısa ve uzun vadeli tuzluluk stresinde AP2/ERF geninin upregüle edildiği gösterilmiştir (Achard *et al.* 2006; Tao *et al.* 2015). Bu genin tuz stresinde bazı bitkilerde fide büyümesini negatif şekilde düzenleyebileceği de bildirilmiştir (Albacete *et al.* 2009). Ayrıca bu genin ABA cevap geni olduğu rapor edilmiştir (Abiri *et al.* 2016). Bu gen genotiplerde köklere nazaran gövdede daha yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür. Bu durumun ABA'nın gövdede daha fazla birikmesi ve etkili olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Ayrıca, fizyolojik parametrede hassas genotip olarak belirlenen Akbuğday genotipinin gövdesinde en fazla upregüle olması da ABA birikiminin sorumlu olmasına bağlanabilir.

miR6108f hedef geninin ifade seviyesi kök analizlerinde Bayraktar 2000, Kırmızıgül ve Gerek 79 genotiplerinde upregüle olmuş, gövde analizlerinde ise Akbuğday, Gerek 79, Haymana 79, Kırmızıgül ve Tir genotiplerinde upregüle olmuştur. miR6108f hedef geni PI-4 proteaz inhibitör benzeri proteini kodlamaktadır. Bu protein bitki proteazların en büyük ve en yaygın ailesi olan serpin ailesine mensuptur. Serpin bağlı genler birçok organizmada belirlenmiştir (Rawlings *et al.* 2004b; Christeller and Liang 2005; Law *et al.* 2006). *Arabidopsis*'te Serpin 1'in bitki savunmasında rol aldığı bildirilmiştir (Vercammen *et al.* 2006). Bitki serpinlerinin upregülasyonu ile bitkilerin

karmaşık bağışıklık kazandırma mekanizmalarında rol aldığı gösterilmiştir (Law *et al.* 2006). Bitki serpinleri öncelikle tripsin benzeri proteinleri inhibe ettiği rapor edilmiş, ancak bitkilerde bu inhibitörler için hedefler açıklanamamıştır (Hejgaard 2005). Buğday serpinleri proteaz 1 bölgesinde glutamik asit, lizin ve arginine sahip olduğu ve kimotripsini inhibe ettiği bildirilmiştir (Roberts *et al.* 2003). Çalışmamızda bu genin köklerde hem fizyolojik çalışmada hem de gen ifade analizlerinde belirlenen toleranslı genotiplerde upregüle olmuştur. Fakat gövdede fizyolojik çalışmada belirlenen hassas genotiplerden olan Akbuğday ve Gerek 79'da upregüle olmuştur. Bu durum miR6108f hedef geninin tuzluluk stresi toleransında köklerde daha fazla etkili olduğu ve bitkiye tolerans kazandırdığını düşündürmektedir.

Diğer bir gen olan miR5655 hedef geni kök analizlerinde Bayraktar 2000, Tır ve Karasu 90 genotiplerinde upregülasyon olduğu diğerlerinde ise downregüle olduğu gösterilmiştir. Gövde analizlerinde ise Haymana 79 ve Karasu 90 genotiplerinde en yüksek upregüle olduğu gözlemlenmiştir. Gerek kökte ve gerekse gövdedeki bu genotipler ön çalışmada toleranslı genotipler içerisinde yer almıştır. miR5655'in hedef geni bitki Heliks-Loop-Heliks (bHLH) geni olup bu genin kodladığı proteinler, ışık sinyali ve hormon dengesi gibi birçok gelişim mekanizması içerisinde yer alan transkripsiyon faktörleri olarak görev aldığı bildirilmiştir (Castelain *et al.* 2012).

Çalışmamızda miR164 hedef geni kök analizlerinde Karasu 90, Tır, Gerek 79 ve Kırmızıgül genotiplerinde upregüle olurken diğer genotiplerde downregüle olmuştur. Gövde analizlerinde ise Gerek 79, Kocabuğday ve Karasu 90 genotiplerinde upregüle olmuştur. Bu genin ifade seviyesi gözönünde bulundurulduğunda genotipler arasında gövdede daha fazla downregüle olduğu görülmüştür. Bu miRNA'nın hedef geni Got1/Sft2 vezikül taşıma proteinidir. Bu gen bitkilerde hücre içi maddelerin veziküle taşınımını düzenlemektedir (Hames *et al.* 1994). Biyotik streslerde miR164'ün ekspresyon seviyesi bitki virüsleri ile enfekte olmuş tütün bitkisinde önemli bir şekilde artmıştır (Bazzini *et al.* 2007). Çalışmamızda miR164'ün hedef geninin fizyolojik çalışma esnasında belirlenen toleranslı genotiplerden Karasu 90 upregüle olması bu genin tuz stresinde toleransta görev aldığı bir göstergesidir.

miR159c hedef geni ifade seviyesi kök dokularında Karasu 90, Kırmızıgül, Gerek 79 ve Tir genotiplerinde upregüle olurken gövde dokularında tüm genotiplerde upregülasyon göstermiştir. miR159c hedef geni Heat-shock proteins (HSP) genidir. HSP genleri hücreleri yaralanmalardan korumakta ve normal büyüme koşullarına geri döndükten sonra iyileşmeyi ve hayatta kalmayı kolaylaştırmaktadır (Al-Whaibi 2011). Yüksek sıcaklık koşullarının yanı sıra diğer abiyotik streslerde de bitkideki proteinlerin yapısını koruyarak bitkiyi olumsuz koşullardan korumaktadır. Bu proteinler bitki ve hayvan türlerinde proteinlerin katlanmasını ve birikimini düzenleyen moleküler şaperonlar gibi davranmaktadırlar (Trippet *al.* 2009). miR159c hedef geninin gövdede etkili olduğu ve fizyolojik parametrelerle doğru orantılı olduğu görülmüştür. Köklerde ise fizyolojik çalışmada hassas olarak belirlenen Gerek 79 genotipinde upregüle olmasının protein katlanmalarını etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmalarımız sonucunda, kullanılan genlerin ifade seviyesi bakımından genotiplerin rank sıralaması yapıldığında ilk sırada kökte Tir, gövdede ise Akbuğday genotipi yer almıştır. Bunları köklerde Müfitbey, Karasu 90, Bayraktar 2000 ve Kırmızıgül, gövdede Karasu 90, Kırmızıgül, Gerek 79 ve Es 26 genotipleri takip etmiştir. Çalışmamızda ön çalışma olarak yaptığımız fizyolojik analizde genotiplerin toleranslılık sıralaması Tir, Karasu 90, Haymana 79, Kırmızıgül ve Bayraktar 2000 şeklinde görülmüştür. Fizyolojik çalışmada en hassas genotip olarak Akbuğday belirlenmiştir. Fakat gövde analizi rank toplamında en toleranslı genotip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum tuz stresinin birçok gen tarafından düzenlendiği ve çalışmamızda olmayan genlerin bu durumu etkilediği düşünülmektedir. Hem gen ifadesi analizlerinde hem de fizyolojik analizde Karasu 90 genotipinin tuzluluk stresine toleranslı genotip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, çalıştığımız genler bakımından SOS1 ve miR482 hedef genlerinin upregülasyon meydana gelmiştir ve tuz stresi toleransında ön plana çıkmışlardır. Fakat diğer genlerin strese maruziyet süresinde ifadelerinin değişmesi nedeniyle işlevleri ve toleransa katkıları tam olarak belirlenememiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alındığında tuzluluk stresinde verimi artırmak için buğday genotipleri arasından Karasu 90'nın kullanılması önerilmektedir. Tuzluluğa

toleranslı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde SOS1 ve miR482'nin hedef genleri kullanılabilir. Ayrıca gelecek çalışmalarda ise diğer genlerin toleranslılığa katkılarının belirlenmesi için strese maruz bırakılan üründen günlük veriler alınarak çalışılabilir.



KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G. and Sharma, S., 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol*, 30, 161–175.
- Akaboshi, M., Hashimoto, H., Ishida, H., Saijo, S., Koizumi, N., Sato, M. and Shimizu, T., 2008. The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *Journal of Molecular Biology*, 377, 246–257.
- Akbari, G.A., Hojati, M., Modarres-Sanavy, S.A.M. and Ghanati, F., 2011. Exogenously applied hexaconazole ameliorates salinity stress by inducing an antioxidant defense system in *Brassica napus* L. plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 244–250.
- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K. and Kudla J., 2001. The NAF domain defines a novel protein–protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases, *EMBO J.* 20, 1051–1063.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, Bock, R., Schulz, B., Harter, K. and Kudla, J., 2003. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant Journal*, 36, 457–470.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331–1341.
- Al-Whaibi, M.H., 2011. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science*, 23, 139–150.
- Amtmann, A., Fischer, M., Marsh, E.L., Stefanovic, A., Sanders, D. and Schachtman, D.P., 2001. The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology*, 126, 1061– 1071.
- Anonymous, 2017. <http://www.unfpa/swp>.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.
- Archer, S.L. Gombert-Maitland, M. Maitland, M.L. Rich, S. Garcia, J.G. and Weir, E.K., 2008. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria–ROS–HIF-1 α –Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, 570–578.
- Ashraf, M. and Akram, N.A., 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnology Advances*, 27, 744–752.
- Ayolié, K., El Yacoubi, H., Atmane, R., Kouakou, K.L. and Kouakou T.H., 2011. NaCl stress-induced growth, water and ions contents changes on in vitro selection of salt tolerant and salt sensitive callus of wheat (*Triticum durum* Desf.). *International Journal of Biosciences*, 1, 12–25.
- Bahmani, K., Noori, S.A S., Darbandi, A.I. and Akbari, A., 2015. Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. *Australian Journal of Crop Science*, 9(4), 321–336

- Baisakh, N., Subudhi, P.K. and Parami, N.P., 2006. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. *Plant Science*, 170, 1141–1149.
- Batistic, O. and Kudla, J., 2004. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*, 219, 915–924.
- Batistic, O., Sorek, N., Schultke, S., Yalovsky, S. and Kudla, J., 2008. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca^{2+} signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 1346–1362.
- Batistic, O. and Kudla, J., 2009. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 985–992.
- Batelli, G., Verslues, P.E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K.S., Grillo, S. and Zhu, J., 2007. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H^{+} -ATPase and upregulating its transport activity. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 7781–7790.
- Batool, N., Shahzad, A., Ilyas, N. and Noor, T., 2014. Plants and salt stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(9), 582–589.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N. and Asurmendi, S., 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 12157–12162.
- Ben Saad, R., Fabre, D., Mieulet, D., Meynard, D., Dingkuhn, M., Al-Doss, A., Guiderdoni, E. and Hassairi, A., 2012. Expression of the *Aeluropus littoralis* ALSAP gene in rice confers broad tolerance to abiotic stresses through maintenance of photosynthesis. *Plant Cell Environ.*, 35, 626–643.
- Bocca, S.N., Magioli, C., Mangeon, A., Junqueira, R.M., Cardeal, V., Margis, R. and Sachetto-Martins, G., 2005. Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the *Eucalyptus* expressed sequence tag database (ForEST) *Genetics and Molecular Biology*, 28, 608–624.
- Bodur, E. and Demirpençe, E., 2010. Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 8.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A. and Shabala, S., 2014. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1241–1257.
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressa, R.A. and Hasegawa, P.M., 2005. Plant adaptive responses to salinity stress. *Plant Abiotic Stress*, pp. 37–63.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inze, D., 1994. Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 13, 199–218.
- Breiman, A. and Graur D., 1995. Wheat evolution. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43, 85–98.
- Buyuk, I., Inal, B., Ilhan, E., Tanriseven, M., Aras, S. and Erayman, M., 2016. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean. *Molecular Biology Reports*, 43, 1251–1266.
- Cao, S., Jiang, L., Song, S., Jing, R. and Xu, G., 2006. AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in *Arabidopsis*. *Cell Mol Biol Lett*, 11, 526–535.

- Carillo, P., Annunziata, M.G., Pontecorvo, G., Fuggi, A. and Woodrow, P., 2011. Salinity Stress and Salt Tolerance. Intech, doi: 10.5772/22331.
- Castelaina, M., Hira, R.L. and Bellini, C., 2012. The non-DNA-binding *bHLH* transcription factor *PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7* is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 145, 450–460.
- Chandran, V., Stollar, E.J., Lindorff-Larsen, K., Harper, J.F., Chazin, W.J., Dobson, C.M., Luisi, B.F. and Christodoulou, J., 2006. Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition. *J Mol Biol*, 357, 400–410.
- Chao, D.Y., Dilkes, B., Luo, H., Douglas, A., Yakubova, E., Lahner, B. and Salt D.E., 2013. Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science*, 341, 658–659.
- Charrier, A., Planchet, E., Cerveau, D., Gimeno-Gilles, C., Verdu, I., Limami, A.M. and Lelievre, E., 2012. Overexpression of a *Medicago truncatula* stress-associated proteingene (*MtSAP1*) leads to nitric oxide accumulation and confers osmotic and salt stress tolerance in transgenic tobacco, *Planta*, 236, 567–577.
- Chen, X. and Guo, Z., 2008. Tobacco OPBP1 enhances salt tolerance and disease resistance of transgenic rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 2601–2613.
- Chen, A.F., Davies, C.M., De Lin, M. and Fermor, B., 2008. Oxidative DNA damage in osteoarthritic porcine articular cartilage. *J Cell Physiol*, 217, 828–833.
- Chen, X., Wang, Y., Li, J.Y., Jiang, A.L., Cheng, Y.W. and Zhang, W., 2009. Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 407–415.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A. and Mao, L., 2010. SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (11), 946–951.
- Cheng, N., Pittman, J.K., Zhu, J. and Hirschi, K.D., 2004. The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2922–2926.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J. and Luan, S., 2007. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52, 223–239.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu, J.K. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55, 225–236.
- Christeller, J. and Liang, W., 2005. Plant serine protease inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, 12, 439–447.
- Colmer, T.D., Flowers, T.J. and Munns, R., 2006. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1059–1078.
- Condit, C.M., McLean, B.G. and Meagher, R.B., 1990. Characterization of the expression of the petunia glycine-rich protein-1 gene product. *Plant Physiol*, 93, 596–602.
- Cuartero, J., Bolarin, M.C., Asins, M.J. and Moreno, V., 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *J Exp Bot*, 57, 1045–1058.

- Cuartero, J., Bolarinj, M.C., Moreno, V. and Pineda, B. 2009. Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. In: Molecular Techniques in Crop Improvement, 2nd Edition. Jain, S.M., Ed., Springer, The Netherlands. pp. 373–405.
- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H., 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları (021002)(11-34). Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 11(2).
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G., Cheong, Y., Schultke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R. and Kudla J., 2006. Alternative complex formation of the Ca²⁺-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. Plant Journal, 48, 857–872.
- Dantas, B.F., Ribeiro, L.D. and Aragão, C.A., 2007. Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress. Revista Brasileira de Sementes, 29(2), 106-110.
- Davenport, R., James, R.A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M. and Munns, R., 2005. Control of sodium transport in durum wheat. Plant Physiol, 137, 807–818.
- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Bueno, P. and Corpas, F.J., 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomed and cellular implications. Free Radicals in Biology and Medicine, 13, 557-580.
- Demidchik, V., Davenport, R.J. and Tester, M., 2002. Nonselective cation channels in plants. Annual Review of Plant Biology, 53, 67–107.
- Deng, X., Zhou, S., Hu, W., Feng, J., Zhang, F., Chen, L., Huang, C., Luo, Q., He, Y., Yang, G. and He, G., 2013. Ectopic expression of wheat *TaCIPK14*, encoding a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, confers salinity and cold tolerance in tobacco. Physiologia Plantarum, 149, 367–377.
- Deng, P., Wang, L., Cui, L., Feng, K., Liu, F., Du, X., Tong, W., Nie, X., Ji, W. and Weining, S., 2015. Global Identification of MicroRNAs and Their Targets in Barley under Salinity Stress. PlosOne, 10(9), e0137990.
- Eren, H., Pekmezci, M.Y., Okay, S., Turktas, M., Inal, B., Ilhan, E., Atak, M., Erayman, M. and Unver, T., 2015. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) root miRNome analysis in response to salt stress. Annals of Applied Biology, 167, 208-216.
- Eltner, E.F., 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell EJ, Steffen KL, eds. Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. American Society of Plant Physiologists, 13-25.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S., 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11(1), 52-67.
- Fankhauser, C. and Staiger, D., 2002. Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. Planta, 216, 1–16.
- Feki, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Masmoudi, K., 2011. Regulation of durum wheat Na⁺/H⁺ exchanger TdSOS1 by phosphorylation. Plant Mol Biol, 76, 545–556.
- Feki, K., Quintero, F.J., Khoudi, H., Leidi, E.O., Masmoudi, K., Pardo, J.M. and Brini, F., 2014. A constitutively active form of a durum wheat Na⁺/H⁺ antiporter SOS1

- confers high salt tolerance to transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, 33, 277–288.
- Feng, H., Zhang, Q., Wang, Q., Wang, X., Liu, J., Li, M., Huang, L. and Kang, Z. 2013. Target of ta-miR408, a chemocyanin-like protein gene (*TaCLP1*), plays positive roles in wheat response to high-salinity, heavy cupric stress and stripe rust. *Plant Molecular Biology*, 83, 433–443.
- Ferdous, J., Li, Y., Reid, N., Langridge, P., Shi, B.J. and Penny J., 2015. Tricker Identification of Reference Genes for Quantitative Expression Analysis of MicroRNAs and mRNAs in Barley under Various Stress Conditions. *PlosOne*, 10(3), e0118503.
- Fisarakis, I., Chartzoulakis, K. and Stavrakas, D., 2001. Response of Sultana vines (*V. vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. *Agricultural Water Management*, 51(1), 13–27.
- Flowers, T.J. and Yeo, A.R., 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants-where next. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22, 875–884.
- Flowers, T.J., 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 307–319.
- Folz, R.J. and Crapo, J.D., 1994. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics*, 22, 162–171.
- Forman, H.J., 2007. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 42, 926–932.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 119, 355–364.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1056–1071.
- Franco, L.O., deOManes, C.L., Hamidi, S., Sachetto-Martins, G. and de Oliveira, E., 2002. Distal regulatory regions restrict the expression of *cis*-linked genes to the tapetal cells. *FEBS Lett.*, 517, 13–18.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G. and Zhu, J.K., 2007. Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell*, 19, 1617–1634.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124, 509–525.
- Fujita, Y., Yoshida, T. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2013. Pivotalrole of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 147, 15–27.
- Gao, X.H., Ren, Z.H., Zhao, Y.X. and Zhang, H., 2003. Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 133, 1873–1881.
- Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., Cai, H., Ji, W., Chen, Q. and Zhu, Y., 2011. Osa-MIR393: a salinity and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular Biology Reports*, 38, 237–242.

- Giannattasio, S., Atlante, A., Antonacci, L., Guaragnella, N., Lattanzio, P., Passarella, S. and Marra, E., 2008. Cytochrome c is released from coupled mitochondria of yeast en route to acetic acid-induced programmed cell death and can work as an electron donor and a ROS scavenger. *FEBS Lett*, 582, 1519–1525.
- Gimeno-Gilles, C., Gervais, M.L., Planchet, E., Satour, P., Limami, A.M. and Lelievre, E., 2011. A stress associated protein containing A20/AN1 zing-finger domains expressed in *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiol Biochem*, 49, 303–10.
- Giri, J., Vij, S., Dansana, P.K. and Tyagi, A.K., 2011. Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *New Phytol*, 191, 721–32.
- Giri, J., Dansana, P.K., Kothari, K.S., Sharma, G., Vij, S. and Tyagi, A.K., 2013. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants, *Bioessays*, 639–648.
- Goyal, E., Amit, S.K., Singh, R.S., Mahato, A.K., Chand, S. and Kanika, K., 2016. Transcriptome profiling of the salt stress response in *Triticum aestivum* cv. Kharchia Local. *Scientific Reports*, 6, 27752.
- Gomes-Filho, E., Lima, C.R.F.M., Costa, J.H., Da Silva, A.C.M., Lima, M.D.G.S., De Lacerda, C.F. and Prisco, J.T., 2008. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. *Plant Cell Reports*, 27(1), 147-157.
- Gomez, J.M., Hernandez, J.A., Jimenez, A., del Rio, L.A. and Sevilla, F., 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31, 11-18.
- Gonzalez, A., Steffen, K.L. and Lynch, J.P., 1998. Light and excess manganese. Implications for oxidative stress in common bean. *Plant Physiology*, 118, 493-504.
- Gouiaa, S., Khoudi, H., Leidi, E.O., Pardo, J.M. and Masmoudi, K., 2012. Expression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNHXS1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 genes in tobacco from a bicistronic transcriptional unit improves salt tolerance. *Plant Mol Biol*, 79, 137–155
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.K., 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 13, 1383–1400.
- Gupta, B. and Huang, B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Genomics, doi: 10.1155/2014/701596.
- Harper, J.F. and Harmon, A., 2005. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 555–566.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463-499.
- Hashiguchi, A. and Komatsu, S., 2016. Impact of post-translational modifications of crops proteins under abiotic stress. *Proteomes*, 4, 42.
- Hejgaard, J., 2005. Inhibitory plant serpins with a sequence of three glutamine residues in the reactive centre. *Biol. Chem.*, 386, 1319-1323.
- Hetherington, A.M. and Brownlee, C., 2004. The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 401–427.

- Ho, Y.S., Howard, A.J. and Crapo, J.D., 1991. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 4, 278–286.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station Circular, 347, 1-32.
- Hong, Y., Zhang, W. and Wang, X., 2010. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell and Environment*, 33, 627-635.
- Houshmand, S., Arzani, A. and Mirmohammadi-Maibody, S.A.M., 2014. *Commun Soil Science Plant Anal*, 45, 297-308.
- Hozain, M., Abdelmageed, H., Lee, J., Kang, M., Fokar, M., Allen, R.D. and Holaday, A.S., 2012. Expression of AtSAP5 in cotton up-regulates putative stress-responsive genes and improves the tolerance to rapidly developing water deficit and moderate heat stress. *J Plant Physiol*, 169, 1261–70.
- Hu, Y. and Schmidhalter, U., 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 541–549.
- Hu, H., Wang, Y. and Tsay, Y., 2009. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant Journal*, 57, 264–278.
- Huang, J., Wang, M.M., Jiang, Y., Bao, Y.M., Huang, X., Sun, H., Xu, D.Q., Lan, H.X. and Zhang, H.S., 2008. Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of ZFP177 that contributes to temperature stress tolerance. *Gene*, 420, 135–44.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W. and Zhu, J.K., 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 12, 1667–1677.
- Iwai, T., Seo, S., Mitsuhashi, I. and Ohashi, Y., 2007. Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe oryzae* in adult rice plants. *Plant Cell Physiol*, 48, 915–924.
- Izadi Darbandi, A. and Bahmani, K., 2011. *Principal of Fennel cultivation and breeding*. Tehran, Tamadon Pars.
- Jain, M., Khurana, P., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P., 2008. Genome-wide analysis of intron-less genes in rice and Arabidopsis. *Funct Integr Genomics*, 8, 69–78.
- Jankowsky, E., 2011. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci*, 36, 19-29.
- Jian, H.J., Wang, J., Wang T.Y., Wei, L.J., Li, J. and Liu, L.Z., 2016. Identification of rapeseed MicroRNAs involved in early stage seed germination under salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 658.
- Jiao, Y., Wickett, N.J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A.S., Landherr, L., Ralph, P.E., Tomsho, L.P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Clifton, S.W., Schlarbaum, S.E., Schuster, S.C., Ma, H., Leebens-Mack, J. and dePamphilis, C.W., 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473, 97–100.
- Jin, Y., Wang, M., Fu, J., Xuan, N., Zhu, Y., Lian, Y., Jia, Z., Zheng, J. and Wang, G., 2007. Phylogenetic and expression analysis of ZnF-AN1 genes in plants. *Genomics*, 90, 265–275.

- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D. and Walker Simmons M.K., 2002. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiology*, 130(2), 837–846.
- Jones, P.L., Kucera, G., Gordon, H. and Boss, J.M., 1995. Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. *Gene*, 153, 155–161.
- Kang, M.S., 1988. A rank-sum method for selecting high-yielding, stable corn genotypes. *Cereal Research Communications*, 16, 113–115.
- Kang, M., Fokar, M., Abdelmageed, H. and Allen, R.D., 2011. Arabidopsis SAP5 functions as a positive regulator of stress responses and exhibits E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Mol Biol*, 75, 451–66.
- Kang, H., Park, S.J. and Kwak, K.J., 2013. Plant RNA chaperones in stress response. *Trends Plant Sci*, 18, 100–106.
- Kar, B., Nayak, S. and Joshi, R.K., 2012. Classification and comparative analysis of *Curcuma longa* L. expressed sequences tags (ESTs) encoding glycine-rich proteins (GRPs). *Bioinformation*, 8, 142–146.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell*, 4, 205–217.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. and Bohnert, H.J., 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 13, 889–905.
- Kennedy, E.L., Jacobs, A.K. and Roy, S.J., 2015. The role of the CBL–CIPK calcium signalling network in regulating ion transport in response to abiotic stress. *Plant Growth Regul*, 76, 3–12.
- Khan, M.A. and Weber, D.J., 2006. *Ecophysiology of high salinity tolerant plants* (Vol. 40). Springer Science and Business Media.
- Khodarahmpour, Z., Ifar, M. and Motamedi, M., 2012. Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 298–304.
- Kim, K.N., Lee, J.S., Han, H., Choi, S.A., Go, S.J. and Yoon, I.S., 2003. Isolation and characterization of a novel rice Ca²⁺-regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. *Plant Mol Biol*, 52, 1191–1202.
- Kim, B., Waadt, R., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Dominguez-Solis, J.R., Schüttke, S., Lee, S.C., Kudla, J. and Luan, S., 2007. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *Plant Journal*, 52, 473–484.
- Kim, J.S., Jung, H.J., Lee, H.J., Kim, K.A., Goh, C.H., Woo, Y., Oh, S.H., Han, Y.S. and Kang, H., 2008a. Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 55, 455–466.
- Kim, J.S., Kim, K.A., Oh, T.R., Park, C.M. and Kang, H., 2008b. Functional Characterization of DEAD-Box RNA Helicases in *Arabidopsis thaliana* under Abiotic Stress Conditions. *Plant Cell Physiol*, 49, 1563–1571.

- Kim, M.C., Chung, W.S., Yun, D. and Cho, M.J., 2009. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant*, 2, 13-21.
- Kim, J.Y., Kwak, K.J., Jung, H.J., Lee, H.J. and Kang, H., 2010a. MicroRNA402 affects seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions via targeting DEMETER-LIKE Protein3 mRNA. *Plant Cell Physiol*, 51(6), 1079–1083.
- Kim, J.Y., Kim, W.Y., Kwak, K.J., Oh, S.H., Han, Y.S. and Kang, H., 2010b. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *J Exp Bot*, 61, 2317-2325.
- Knight, H., Trewavas, A.J. and Knight, M.R., 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J*, 12, 1067–1078.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O. and Kudla, J., 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol*, 134, 43–58.
- Ku, Y.S., Wong, J.W.H., Mui, Z., Liu, X., Hui, J.H.L., Chan, T.F. and Lam, H.M., 2015. Small RNAs in plant responses to abiotic stresses: regulatory roles and study methods. *Int J Mol Sci*, 16, 24532–24554.
- Kuhn, J.M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M.B., Maktabi, M.H. and Schroeder, J.I., 2006. The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiology*, 140, 127–139.
- Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y. and Lida, H., 2013. Plant mechanosensing and Ca^{2+} transport. *Trends Plant Sci*, 18, 227–233.
- Kwak, K.J., Kim, Y.O. and Kang, H., 2005. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J Exp Bot*, 56, 3007-3016.
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T.A., Véry, A.A., Wang, A., Mortimer, J.C., Macpherson, N., Coxon, K.M., Battey, N.H., Brownlee, C., Park, O.K., Sentenac, H., Shabala, S., Webb, A.A.R. and Davies, J.M., 2012. *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable conductance in root cells. *Plant Cell*, 24, 1522–1533.
- Laohavisit, A., Richards, S.L., Shabala, L., Chen, C., Colaço, R.D.D.R., Swarbreck, S.M., Shaw, E., Dark, A., Shabala, S., Shang, Z. and Davies, J.M., 2013. Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in *Arabidopsis* require the calcium regulatory protein annexin1. *Plant Physiol*, 163, 253–262.
- Law, R., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A.M., Silverman, G.A., Wong, W., Rosado, C.J., Langendorf, C.G., Bird, P.I. and Whisstock, J.C., 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol*, 7(5), 216.
- Lee, Y.B. and Lee, S.M., 2000. Effect of S-adenosylmethionine on hepatic injury from sequential cold and warm ischemia. *Archives of Pharmacological Research*, 23, 495-500.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B. and Luan, S., 2009. A protein kinasephosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 21419-21424.
- Li, J.Y., He, X.W., Xu, L., Zhou, J., Wu, P., Shou, H.X. and Zhang, F.C., 2008. Molecular and functional comparisons of the vacuolar $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchangers

- originated from glycophytic and halophytic species. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9, 132–140.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S. and Zhu J.K., 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 3730–3734.
- Liu, B., Chen, Y. and St Clair, D.K., 2008. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med*, 44, 1529–1535.
- Liu, Y., Xu, Y., Xiao, J., Ma, Q., Li, D., Xue, Z. and Chong, K., 2011. OsDOG, a gibberellin-induced A20/AN1 zinc-finger protein, negatively regulates gibberellin-mediated cell elongation in rice. *J Plant Physiol*, 168, 1098–105.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta][\Delta]CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Long, R., Yang, Q., Kang, J., Zhang, T., Wang, H., Li, M. and Zhang, Z., 2013. Overexpression of a novel salt stress-induced glycine-rich protein gene from alfalfa causes salt and ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 32, 1289–1298.
- Lorković, Z.J., 2009. Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci*, 14, 229–236.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. and Gruissem, W., 2002. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 14, 389–400.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D. and Romeis, T., 2005. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 10736–10741.
- Lummer, M., Humpert, F., Steuwe, C., Caesar, K., Schüttelz, M., Sauer, M. and Staiger, D., 2011. Reversible photoswitchable DRONPA-s monitors nucleocytoplasmic transport of an RNA-binding protein in transgenic plants. *Traffic*, 12, 693–702.
- Lunde, B., Moore, C. and Varani, G., 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 479–490.
- Magioli, C., Barrôco, R.M., Benício Rocha, C.A., de Santiago-Fernandes, L.D., Mansur, E., Engler, G., Margis-Pinheiro, M. and Sachetto-Martins, G., 2001. Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (*Atgrp-5*). *Plant Sci*, 161, 559–567.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139–158.
- Mahajan, S., Sopory, S.K. and Tuteja, N., 2006. Cloning and characterization of CBL-CIPK signalling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS J*, 273, 907–925.
- Mangeon, A., Junqueira, R.M. and Sachetto-Martins, G., 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav*, 5, 99–104.
- Marti, M.C., Stancombe, M.A. and Webb, A.A., 2013. Cell- and stimulus type-specific intracellular free Ca^{2+} signals in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 163, 625–634.
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim,

- J.M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K. and Seki, M., 2008. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant and Cell Physiology*, 49, 1135–1149.
- McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049–6055.
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G. and Yang, Y., 2006. Inducible overexpression of a rice allene oxidesynthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Mol. Plant Microbe Interact*, 19, 1127–1137.
- Miao, L. and Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implication in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 344–356.
- Miller, G., Shulaev, V. and Mittler, R., 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133, 481–489.
- Miller, G.A.D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R.O.N., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 453–467.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 1819, 86–96.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriach, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M. and Schroeder, J.I., 2006. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol*, 4, e327.
- Mukhopadhyay, A., Vij, S. and Tyagi, A.K., 2004. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 6309–6314.
- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645–663.
- Munns, R., James, R.A. and Lauchli, A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1025–1043.
- Munns, R. and Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Nagae, M., Nozawa, A., Koizumi, N., Sano, H., Hashimoto, H., Sato, M. and Shimizu, T., 2003. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 42240–42246.
- Nakashima, K., Tran, L.S.P., Nguyen, D.V., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant Journal*, 51, 617–630.
- Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol*, 149, 88–95.
- Nardemir, G., Agar, G., Arslan, E. and Erturk, F.A., 2015. Determination of genetic and epigenetic effects of glyphosate on *Triticum aestivum* with RAPD and CRED-RA techniques. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27, 131–139.

- Niramaya, S.M., Ganesh, C.N., Nilima, S.R., Suprasanna, P. and Tukaram, D.N., 2016. Plant Salt Stress: Adaptive Responses, Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. *Bot Rev*, 82, 371–406.
- Oh, D.H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S.M., Li, Y.Z., Quintero, F.J., Jiang, X.Y., D'Urzo, M.P., Lee, S.Y. and Zhao, Y.X., 2009. Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant Physiol*, 151, 210–222.
- Oh, D.H., Lee, S.Y., Bressan, R.A., Yun, D.J. and Bohnert, H.J., 2010. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *Journal of Experimental Botany*.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. and Zhu, J.K., 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C/ABI2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 11771–11776.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., Marin- Manzano, M.C., Pardo, J.M. and Belver, A., 2009. The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. *Plant Cell Environ*, 32, 904–916.
- Othman, Y., Al-Karaki, G., Al-Tawaha, A.R. and Al-Horani, A., 2006. Variation in germination and ion uptake in barley genotypes under salinity conditions. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(1), 11–15.
- Owtrim, G.W., 2006. RNA helicase and abiotic stress. *Nucleic Acids Res*, 34, 3220–3230.
- Pandey, N., Ranjan, A., Pant, P., Tripathi, R.K., Ateek, F., Pandey, H.P., Patre' U.V. and Sawant, S.V., 2013. CAMTA 1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 14, 216.
- Parge, H.E., Hallewell, R.A. and Tainer, J.A., 1992. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 6109–6113.
- Parida, A.K. and Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349.
- Park, A.R., Cho, S.K., Yun, U.J., Jin, M.Y., Lee, S.H., Sachetto-Martins, G. and Park, O.K., 2001. Interaction of the *Arabidopsis* Receptor Protein Kinase Wak1 with a Glycine-rich Protein, AtGRP-3. *J Biol Chem*, 276, 26688–26689.
- Perl, A., Perl-Treves, R., Galili, S., Aviv, D., Shalgi, E., Malkin, S. and Galun, E., 1993. Enhanced oxidative stress defence in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 568–576.
- Pfaffl, M.W., 2006. Real Time PCR. (M.T. Dorak, editor). In: *Relative Quantification*. Taylor & Francis Group, New York, 3, 63–82.
- Plett, D.C. and Moller, I.S. 2010. Na^+ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell and Environment*, 33, 612–626.
- Postnikova, O., Shao, J. and Nemchinov, L.G., 2013. Analysis of the alfalfa root transcriptome in response to salinity stress. *Plant Cell Physiol*. 54, 1041–1055.
- Poustinia, K. and Siosemardehb, A., 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field Crops Research*, 85, 125–133.
- Przybilski, R., Gräf, S., Lescoute, A., Nellen, W., Westhof, E., Steger, G. and Hammann, C., 2005. Functional hammerhead ribozymes naturally encoded in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17, 1877–1885.

- Qin, Y., Li, X., Guo, M., Deng, K., Lin, J., Tang, D., Guo, X. and Liu, X., 2008. Regulation of salt and ABA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in Arabidopsis. *Sci China C Life Sci*, 51, 391–401.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M. and Guo, Y., 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell*, 19, 1415–1431.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K. and Pardo, J.M., 2002. Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 9061-9066.
- Quintero, F.J., Martinez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.J., Zhu, J.K. and Pardo, J.M., 2011. Activation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2611-2616.
- Rajendran, K., Tester, M. and Roy, S.J., 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 32(3), 237-249.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. and Barrett, A.J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *J Biochem*, 378, 705-716.
- Roberts, T.H., Marttila, S., Rasmussen, S.K. and Hejgaard, J., 2003. Differential gene expression for suicide-substrate serine proteinase inhibitors (serpins) in vegetative and grain tissues of barley. *J. Exp. Bot.*, 54, 2251-2263.
- Roy, C. and Sengupta, D.N., 2014. Effect of Short Term NaCl Stress on Cultivars of *S. lycopersicum*: A Comparative Biochemical Approach. *J Stress Physiol Biochem*, 10 (1), 59-81.
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O. and de Oliveira, D.E., 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif. *Biochim Biophys Acta*, 21, 1–14.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci*, 163, 1037-1046.
- Sairam, R.K. and Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current science*, 86, 407-421.
- Sanchez-Barrena, M.J., Fujii, H., Angulo, I., Martinez-Ripoll, M., Zhu, J. and Albert, A., 2007. The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Molecular Cell*, 26, 427–435.
- Sandhu, D., Cornacchione, M.V., Ferreira, J.F.S. and Suarez, D.L., 2017. Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of salt-response genes. *Scientific Reports*, 7, 42958.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and Harper, J.F., 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 14, 401–417.
- Sani, E., Herzyk, P., Perrella, G., Colot, V. and Amtmann, A., 2013. Hyperosmotic priming of Arabidopsis seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biol*, 14, 59.
- Sathee, L., Sairam, R.K., Chinnusamy, V. and Jha, S.K. 2015. Differential transcript abundance of salt overly sensitive (SOS) pathway genes is a determinant of salinity stress tolerance of wheat. *Acta Physiol Plant*, 37, 169.

- Schmidt, F., Marnef, A., Cheung, M.K., Wilson, I., Hancock, J., Staiger, D. and Lademery, M., 2010. A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced *Arabidopsis thaliana* RNA-binding proteins ATGRP7 and ATGRP8. *Mol Biol Rep*, 37, 839–845.
- Schöning, J.C., Streitner, C., Page, D.R., Hennig, S., Uchida, K., Wolf, E., Furuya, M. and Staiger, D., 2007. Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant J*, 52, 1119–1130.
- Shi, J., Kim, K.N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S. and Kudla, J., 1999. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11, 2393–2405.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Zhu, J.K., 2002a. The Putative Plasma Membrane Na^+/H^+ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na^+ Transport in Plants. *The Plant Cell Online*, 14(2), 465–477.
- Shi, H., Xiong, L., Stevenson, B., Lu, T. and Zhu, J.K., 2002b. The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 plant salt tolerance. *The plant cell*, 14, 575–588.
- Shi, H., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B., Lu, T. and Zhu, J.K., 2003a. The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and Is required for normal cell expansion. *The plant cell*, 15, 19–32.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. and Zhu, J.K., 2003b. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21, 81–85.
- Shoji, T., Suzuki, K., Abe, T., Kaneko, Y., Shi, H., Zhu, J.K., Rus, A., Hasegawa, P.M. and Hashimoto, T., 2006. Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1158–1168.
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell Wall proteins. *Plant Cell*, 5, 9–23.
- Silva, P. and Geros, H., 2009. Regulation by salt of vacuolar H^+ -ATPase and H^+ pyrophosphatase activities and Na^+/H^+ exchange. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 718–726.
- Slooten, L., Capiau, K., Van Camp, W., Van Montagu, M., Subesma, C. and Inze, D., 1995. Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxidedismutase in the chloroplasts. *Plant Physiology*, 107, 737–750.
- Song, Y., Ji, D., Li, S., Wang, P., Li, Q. and Xiang, F., 2012. The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *Plos One* 7, 41274.
- Sreedharan, S., Shekhawat, U.K. and Ganapathi, T.R., 2012. MusaSAP1, a A20/AN1 zinc finger gene from banana functions as a positive regulator in different stress responses. *Plant Mol Biol*, 80, 503–17.
- Staiger, D., 2002. Circadian rhythms in *Arabidopsis*: time for nuclear proteins. *Planta*, 214, 334–344.
- Steinert, P.M., Mack, J.W., Korge, B.P., Gan, S.Q., Haynes, S.R. and Steven, A.C., 1991. Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int J Biol Macromol*, 13, 130–139.

- Stroher, E. and Dietz, K.J., 2008. The dynamic thiol-disulphide redox proteome of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiol Plant*, 133, 566–83.
- Stroher, E., Wang, X.J., Roloff, N., Klein, P., Husemann, A. and Dietz, K.J., 2009. Redox-dependent regulation of the stress-induced zinc-finger protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 2, 357–67.
- Stone, J., Liang, X., Nekl, E. and Stiers, J., 2005. *Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J*, 41, 744–754.
- Sudhir, P. and Murthy, S.D.S., 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42(2), 481–486.
- Sunkar, W.R. and Zhu, J.K., 2004. Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 19.
- Şenay, A., Demir Kaya, M., Atak, M. ve Çifçi, C.Y., 2005. Farklı tuz konsantrasyonlarının bazı ekmeçlik buğday çeşitlerinin çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkileri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 14, 50–55.
- Thoday-Kennedy, E.L., Jacobs, A.K. and Roy, S.J., 2015. The role of the CBL–CIPK calcium signalling network in regulating ion transport in response to abiotic stress. *Plant Growth Regul*, 76, 3–12.
- Turkan, I. and Demiral, T., 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 6, 2–9.
- Tripathi, V., Parasuraman, B., Laxmi, A. and Chattopadhyay, D., 2009. CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plant. *Plant Journal*, 58, 778–790.
- Tripp, J., Mishra, S.K. and Scharf, K.D., 2009. Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant Cell Environ*, 32, 123–133.
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology*, 428, 419–438.
- Tyagia, H., Jhab, S., Sharmab, M., Girib, J. and Tyagia, A.K., 2014. Rice SAPs are responsive to multiple biotic stresses and overexpression of OsSAP1, an A20/AN1 zinc-finger protein, enhance the basal resistance against pathogen infection in tobacco. *Plant Science*, 225, 68–76.
- Van Camp, W., Capiou, K., Van Montagu, M., Inze, D. and Slight, L., 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology*, 112, 1703–1714.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., Langebartels, C. and Sandermann, H., 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology*, 12, 165–168.
- Vashisht, A.A. and Tuteja, N., 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. *J Phytochem Photobiol*, 84, 150–160.
- Vaziri, A., Ali-Reza, A., Hamid, F., Franceva, B. and Hossain, S., 2004. The effect of different concentrations of NaCl on the callus induction and lipids of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 75–77.

- Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J.A., De Rycke, R., Brackenier, A., Inze, D., Harris, J.L. and Van Breusegem, F., 2006. Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J. Mol. Biol.*, 364(4), 625-636.
- Verslues, P.E., Batelli, G., Grillo, S., Agius, F., Kim, Y., Zhu, J., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S. and Zhu, J., 2007. Interaction of SOS2 with NDPK2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in *Arabidopsis*. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 7771-7780.
- Vij, S. and Tyagi, A.K., 2006. Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, 276, 565-75.
- Vij, S. and Tyagi, A.K., 2007. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 361-380.
- Vij, S. and Tyagi, A.K., 2008. A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct Integr Genomics*, 8, 301-7.
- Wan, X.S., Devalaraja, M.N. and St Clair, D.K., 1994. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 13, 1127-1136.
- Wang, Z.Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.K. and Zhu, J., 2011. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23, 1971-1984.
- Wang, S., Wang, R., Liang, D., Ma, F. and Shu, H., 2012. Molecular characterization and expression analysis of a glycine-rich RNA-binding protein gene from *Malus hupehensis* Rehd. *Mol Biol Rep*, 39, 4145-4153.
- Weinl, S. and Kudla, J., 2009. The CBL-CIPK Ca²⁺- decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, 184, 517-528.
- Wu, G., Wilen, R.W., Robertson, A.J. and Gusta, L.V., 1999. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiology*, 120, 513-520.
- Wu, H., Shabala, L., Zhou M., Stefano, G., Pandolfi, C., Mancuso, S. and Shabala, S., 2015. Developing and validating a high-throughput assay for salinity tissue tolerance in wheat and barley. *Planta*, 242, 847-857.
- Xiang, Y., Huang, Y. and Xiong, L., 2007. Characterization of Stress-Responsive CIPK Genes in Rice for Stress Tolerance Improvemen. *Plant Physiology*, 144, 1416-1428.
- Xie, L., Zhu, X., Hu, Y., Li, T., Gao, Y., Shi, Y. and Tang, S., 2008. Mitochondrial DNA oxidative damage triggering mitochondrial dysfunction and apoptosis in high glucoseinduced HRECs. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 49, 4203-4209.
- Xie, R., Zhang, J., Ma, Y., Pan, X., Dong, C., Pang, S., He, S., Deng, L., Yi, S., Zheng Y. and Lv, Q., 2017. Combined analysis of mRNA and miRNA identifies dehydration and salinity responsive key molecular players in citrus roots. *Scientific Reports*, 7, 42094.
- Xin, W., Yu, W., Yingyin, Y., Chaojie, X., Huiru, Z.N and Qixin, S., 2010. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 10, 123.

- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14, 165–183.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L. and Wu, W.H., 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125, 1347–1360.
- Xu, H., Jiang, X., Zhan, K., Cheng, X., Chen, X., Pardo, J.M. and Cui, D., 2008. Functional characterization of a wheat plasma membrane Na^+/H^+ antiporter in yeast. *Arch Biochem Biophys*, 473, 8–15.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 781–803.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y. and Shikanai, T., 2009. SQUAMOSA promoter binding protein-like 7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 347–361.
- Yang, Q., Chen, Z.Z., Zhou, X.F., Yin, H.B., Li, X., Xin, X.F., Hong, X.H., Zhu, J.K. and Gong, Z., 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2, 22–31.
- Zahaf, O., Blanchet, S., de Zélicourt, A., Alunni, B., Plet, J., Laffont, C., de Lorenzo, L., Imbeaud, S., Ichanté, J.-L., Diet, A., Badri, M., Zabalza, A., González, E.M., Delacroix, H., Gruber, V., Frugier, F. and Crespi, M., 2012. Comparative transcriptomic analysis of salt adaptation in roots of contrasting *Medicago truncatula* genotypes. *Molecular Plant*, 5, 1068–1081.
- Zhang, H.X. and Blumwald, E., 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19, 765–768.
- Zhang, J.L., Flowers, T.J. and Wang, S.M., 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil*, 326, 45–60.
- Zhang, H., Lv, F., Han, X., Xia, X. and Yin, W., 2013. The calcium sensor PeCBL1, interacting with PeCIPK24/25 and PeCIPK26, regulates Na^+/K^+ homeostasis in *Populus euphratica*. *Plant Cell Rep*, 32, 611–621.
- Zhang, B., 2015. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *J Exp Bot*, 66, 1749–1761.
- Zhao, F., Guo, S., Zhang, H. and Zhao, Y., 2006. Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Science*, 170, 216–224.
- Zhao, X., Wei, P., Liu, Z., Yu, B. and Shi, H., 2017. Soybean Na^+/H^+ antiporter GmsSOS1 enhances antioxidant enzyme activity and reduces $Na(+)$ accumulation in *Arabidopsis* and yeast cells under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 19.
- Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L. and Luo, H., 2013. Constitutive expression of a miR319 Gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping Bentgrass. *Plant Physiology*, 161(3), 1375–1391.
- Zhu, D. and Scandalios, J.G., 1993. Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90, 9310–9314.
- Zhu, J.K., Liu, J. and Xiong L., 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10, 1181–1191.

- Zhu, J.K., 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124, 941–948.
- Zhu, J.K., 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6, 441–445.
- Zhu, J.K., 2007. *Plant Salt Stress*. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9780470015902.a0001300.pub2



ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzurum’da doğdu. İlköğrenimini ve orta öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2004 yılında kayıt yaptırdığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında yüksek lisans öğrenimini tamamlayarak Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak görev aldı. 2013 yılında Moleküler Biyoloji Bilim dalında doktora öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk annesi olup, halen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.